

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861177

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を用いた半月板再生

研究課題名(英文) Scaffold-free tissue-engineered allogenic adipose-derived stem cells promote meniscus regeneration

研究代表者

五嶋 謙一 (Goshima, Kenichi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60706886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)による半月板再生について検討した。ウサギの内側半月板に欠損を作製し、欠損部をそのままにしたコントロール群と、ADSCsの3次元培養を行い、それらを多数凝集させ欠損部に充填したADSC群と比較した。肉眼的組織連続性は、コントロール群に比しADSC群で良好な結果が得られ、組織学的にもADSC群で有意差をもってスコアが高かった($P<0.05$)。また、免疫組織学的には半月板の修復部に抗Ⅰ型コラーゲンが観察され、染色性は経時的に増強する傾向を認めた。以上の結果から、ADSCsが半月板の再生を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To determine whether meniscal tissue could be regenerated by the implantation of adipose-derived stem cells (ADSCs) engrafted into the meniscal defect in a rabbit model of partial meniscectomy. Methods: We created full-thickness meniscal defects in the rabbit's knee. The defects were left empty in the control group, and were filled with ADSCs which created a 3-dimensional structure of ADSCs in the ADSC group. Results: Macroscopically, full-thickness defects remained in the control group, however, the defects were not observed in any time point in the ADSC group. Histologically, there was a consistent tendency toward significantly superior tissue quality scores in the ADSC group compared with the control group at all weeks ($p<0.005$). Regenerated tissue was positive for type I collagen and the extent of staining increased gradually over time in the ADSC group. Conclusions: This study shows that ADSCs adhere to meniscal defect and promote meniscus regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：半月板再生 脂肪由来幹細胞 細胞凝集塊 スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

膝半月板は半月状の形態をしており、膝関節における衝撃吸収のみならず、スムーズな関節の動きや膝関節の安定性において非常に重要な役割を果たしている。また、半月板の外側 1/3 には血管が流入しているため、血液から直接栄養されているが、内側 2/3 は無血管野であり血流に乏しく、関節液によって栄養されている。半月板が損傷すると、膝関節の腫脹、疼痛、可動域の制限を引き起こし、長期的には関節軟骨の損傷および変性を来し、変形性膝関節症に至ることも少なくない。そのため、半月板温存は膝関節機能の維持において必須である。現在、半月板損傷に対する治療の第一選択は半月板の生体力学的機能の温存を目的とした半月板縫合術であるが、断裂形態や欠損の範囲によっても半月板縫合術の適応に限界があり、また、血流に乏しい内側 2/3 は癒合しにくいといった特徴があるため、縫合術を行っても最終的には切除を余儀なくされる症例が少なからず存在する。そのような症例に対して、海外では人工半月板や屍体の半月板を用いた半月板移植が行われているところもあるが、長期成績や技術的・倫理的問題等があるため、我が国では実用化されていないのが現状である。

これまでに、半月板損傷に対する治療として、無血管野への血管侵入を促進する様々な方法が報告されているが、現在のところ臨床応用には至っていない。また、近年の再生医療の進歩とともに、細胞増殖因子の生体内への導入が徐々に可能になりつつある。しかし損傷治癒の過程や副作用の問題からもその使用にはタイミング、量が重要となり、整形外科領域、特に運動器の再生への適応拡大は容易ではない。同様に、幹細胞研究においても進歩は目覚しく、胚性幹細胞、組織幹細胞、造血幹細胞、記憶に新しいところでは人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に関する報告も徐々に増えてきている。しかし、胚性幹細胞や iPS 細胞のような万能細胞の臨床応用には break through しなければならない点が多数存在する。また、造血幹細胞はすでに臨床応用され、一定の成果を出しつつあるが、採取における負担が比較的大きい点が問題視される。一方、比較的倫理的問題が少なく、低侵襲で採取できる細胞源として間葉系の幹細胞 (mesenchymal stem cell:MSC) が注目されるようになり、脂肪組織にも含まれていることが確認されている。脂肪細胞は脂肪組織の体積の 90% 以上を占めているが、細胞数で見るとわずか 20~30% に過ぎず、毛細血管を構成する血管内非細胞や脂肪間質細胞などが数多く存在する。この脂肪間質細胞が脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stromal

cells:ADSCs) を含んでおり、脂肪細胞以外の細胞は脂肪組織を酵素処理することで間質血管細胞群 (stromal-vascular-fraction:SVF) として分離することが可能である。さらに、SVF を分化誘導することで、ADSCs が得られる。皮下脂肪組織は、痩身目的の脂肪吸引術において大量に採取可能であり、さらに、組織から採取した細胞群中の多分化能をもつ細胞の割合が高いこと、ADSCs の大量培養が容易であり、骨髄由来間葉系幹細胞とほぼ同等の潜在能力を持っていることなどから、再生医療の分野における新たな組織幹細胞群として期待されるようになった。我々はこの ADSCs に着目した。

ADSCs は in vitro では骨、軟骨をはじめ、神経、肝臓、心筋など、胚葉を超えた分化能力が確認されている¹⁾。すでに形成外科領域では乳房再生医療の分野で ADSCs を用いた再生医療が臨床応用されており、数多くの報告がされていることや、クローン病の腸瘻に対する治療 (Phase) 虚血性心疾患、皮膚潰瘍、移植片体宿主病 (GVHD) など (Phase) に対して臨床試験が行われている。また、申請者の所属する金沢大学整形外科では、ADSCs を用いた組織再生を研究しているため、ADSCs の分離・抽出、ADSCs の培養に関する手技は確立されている。さらに、ADSCs は後述する『細胞構造体』に形成して移植する方法を考えた。ADSCs を細胞構造体にすることで、細胞としても構造的にもより安定した状態となるため、関節液に満ちた荷重関節である膝関節内の環境においても、ADSCs が安定した状態で長期間保持できる可能性が高いためである。

以上のことから、申請者は ADSCs の細胞構造体を用いた半月板再生の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウサギの半月板損傷モデルに同種他家由来の脂肪由来幹細胞 (ADSCs) を移植し、欠損した半月板を再生することである。

3. 研究の方法

日本白色家兎の左後肢内側半月板前角無血管野に皮膚生検パンチを用いて径 1.5 mm の円柱状欠損を作製し、半月板部分欠損のウサギを得た。欠損部をそのまましたコントロール群と、同種他家由来の ADSCs の 3 次元培養を行い細胞凝集塊 (スフェロイド) を得たのち、それらをさらに多数凝集させ欠損部と同じ形状に形成した細胞構造体を作製し、半月板欠損部に充填した ADSC 群の 2 群について比較、評価を行った。

脂肪細胞は日本白色家兔の後頸部から大量に採取可能である。採取した脂肪細胞をコラゲナーゼ処理して ADSCs を抽出し、スフェロイドプレートを用いて 3 次元培養を行い、スフェロイドを得た。さらに得られたスフェロイドを本研究用に作製した特殊な型に入れてさらに培養することで、欠損部と同じ形状に形成した細胞構造体を得られる。

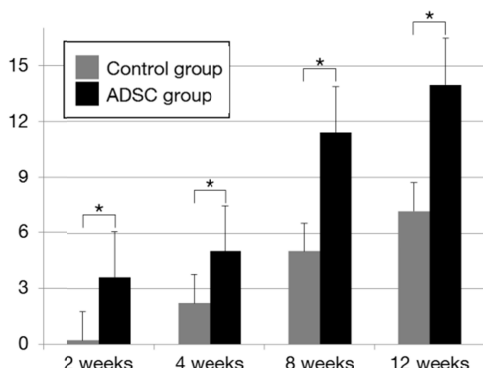
コントロール群および ADSC 群を各々 20 羽ずつ作成し、それぞれ術後 2 週、4 週、8 週、12 週経過時に半月板の評価を行った。評価は肉眼的評価、組織学的評価によるスコアリング、免疫組織化学的評価に関して行った。

肉眼的評価は、半月板欠損部の全層欠損が視覚的に確認できるかどうかで評価を行った。組織学的評価はパラフィン固定した半月板欠損部を含んだ切片をサフラニン O 染色し、スコアリングで評価を行った。免疫組織学的評価は Type collagen の染色を行った。

4. 研究成果

肉眼的所見では、半月板欠損部の全層欠損が確認できたものがコントロール群では 2 週と 4 週で 3 例ずつ、8 週で 2 例、12 週で 1 例認められたが、ADSC 群では全層欠損を認めたものはなく、全例で欠損部に再生組織を認めた。組織学的評価では ADSC 群で 2 週目から再生組織がサフラニン-O 染色で染まり、時間とともに染色性と染色される再生組織が増えた。一方、コントロール群では欠損部は部分的に再生組織で満たされており、半月板の自然修復を認めたが、ADSC 群に比べて再生組織のサフラニン-O 染色の染色性はいずれの週においても弱かった。組織学的スコアリングでは全ての週において、統計学的有意差をもってコントロール群に比べて ADSC 群の方が高いスコアが得られ、両群で時間とともに上昇を認めた。

(*:P<0.05)



さらに免疫組織学的にはコントロール群では半月板再生組織の染色性は認めなかったが、ADSC 群では欠損部に抗型コラーゲンの染色性のある再生組織を認め、染色性は

経時的に増強する傾向があった。

また、蛍光染色の DiI(1,1 - dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) で染色した ADSCs で作製した細胞構造体を移植すると、ADSCs は半月板欠損部に残存していた。

以上の結果から、ウサギ半月板部分欠損モデルにおいて、同種他家由来の ADSCs を移植すると ADSCs は半月板欠損部に残存し半月板の再生を促進することが判明した。ADSCs は低侵襲に大量採取が可能で、多分化能をもつ細胞の割合が高く、大量培養が容易な細胞であるということ、すでに一部の領域では臨床で使用されており、臨床応用がしやすいと考えられる。今後は ADSCs の分化形態や産生因子など、半月板再生のメカニズムについて更なる検討を行い、より大きな動物での研究を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五嶋 謙一 (GOSHIMA KENICHI)
金沢大学・医学系・研究協力員
研究者番号：60706886

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：