

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861191

研究課題名(和文) 肩腱板由来細胞シートを用いた新しい腱板修復術の開発

研究課題名(英文) Rotator Cuff Repair Using Cell Sheets Derived from Human Rotator Cuff

研究代表者

美船 泰 (MIFUNE, YUTAKA)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80608464

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)：ヒト腱板より幹細胞を分離・同定し、この細胞を使用してまず細胞シートを作成した。ラット肩腱板実験モデルを作成し、修復部に5x10⁷の腱板由来細胞から成る細胞シートを移植した。細胞シートを移植後、術後4週、8週でサンプルを採取した。術後4週のサフラニンO染色でシート移植群では赤色に染色されるenthesiの再生を認め、免疫染色でも有意に多くのType II collagenの発現を認めた。Isolectin B4染色でもシート群で腱板修復部周囲組織において有意に多くの微小血管を認め、術後8週の力学的試験においてもシート群で有意に高い引っ張り強度を示した。

研究成果の概要(英文)：To achieve biological regeneration of tendon-bone junctions, cell sheets of human rotator-cuff derived cells were used in a rat rotator cuff injury model. Human rotator-cuff derived cells were isolated, and cell sheets were made using temperature-responsive culture plates. Infrapinatus tendons in immunodeficient rats were resected bilaterally at the enthesi. In right shoulders, infrapinatus tendons were repaired by the transosseous method and covered with the cell sheet (sheet group), whereas the left infrapinatus tendons were repaired in the same way without the cell sheet (control group). In the sheet group, proteoglycan at the enthesi with more type II collagen and isolectin B4 positive cells were seen compared with in the control group. VEGF and Col2 expressions were higher and TeM gene expression was lower in the sheet group than in the control group. In mechanical testing, the sheet group showed a significantly higher ultimate failure load than the control group at 8 weeks.

研究分野：肩腱板再生

キーワード：細胞シート 肩腱板再生 肩腱板由来細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の国内・国外の研究動向及び位置づけ

肩腱板断裂の中で、断裂の大きさが 3-5cm を超える場合、いわゆる大断裂・広範囲断裂には一期的な腱板の縫合が不可能な場合も存在し、しばしば治療に難渋する。このような縫合不可能な症例に対して、良好な成績を獲得するためには、退行・変性した腱板組織の再建や再生が必要であると考えられるが、最適な治療法が未だ確立していないのが現状である。近年の再生医学・組織工学の進歩の中で、この腱板大断裂・広範囲断裂に対しても様々な研究が報告されている。腱板への移植材料として、まず生体非吸収性の人工靭帯やテフロンを用いる方法が研究されたが、異物反応を生じたり、生体親和性が低いことなどより成績が安定せず、近年ではあまり行われていない(1,2)。これらの問題を解決すべく、近年ではより生体親和性が高く組織再生を促すことが可能な人工材料や異種生体組織由来材料なども開発されつつあり、国外での使用報告はされているが、国内ではまだ使用可能なものはない(3,4)。我々も poly-lactide-co-glycolide (PLG) から作製した担体を用いた兔の腱板再生実験を行ってきたが、治療期間の短縮及び早期の力学的強度獲得のためには、更なる改良が必要である(5)。幹細胞を用いた腱板再生に関する研究の報告も散見されるが、動物実験のみ(6,7)であり、臨床応用に至っているものはない。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

我々はこれまでに、腱板断裂手術時に切除・破棄する断裂腱板断端部の組織を患者の同意の元で採取・保管し、肩腱板由来細胞の分離を行い、解析を行ってきた。まずフローサイトメトリーにより間葉系幹細胞マーカー (CD44、CD90、CD105、CD166

など) の発現を確認し、また *in vitro* でそれぞれ骨・軟骨・脂肪分化培地にて培養し、化学染色や PCR により多分化能を有する細胞であることを確認した(8)。一方で、近年注目される細胞シート技術に着目し、温度応答性細胞培養皿を用いて、細胞シートを作成し、膝前十字靭帯再建時の移植腱に細胞シートを巻きつけて移植し、骨-靭帯癒合の促進が得られることも報告した(9)。そこで今回は、この細胞シート技術を用いて肩腱板由来細胞シートを作成し、これを用いた広範囲腱板断裂に対する新しい治療方法の開発を計画した。

<参考文献>

- (1) Aoki M, et al. Mechanical strength of latissimus dorsi tendon transfer with Teflon felt augmentation. *J Shoulder Elbow Surg.* 1997 Mar-Apr;6(2):137-43.
- (2) Kimura A, et al. Reconstruction of a defect of the rotator cuff with polytetrafluoroethylene felt graft. Recovery of tensile strength and histocompatibility in an animal model. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Mar;85(2):282-7.
- (3) Cheung EV, et al. Strategies in biologic augmentation of rotator cuff repair: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Jun;468(6):1476-84.
- (4) Dines JS, et al. Tissue engineering and rotator cuff tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007 Sep-Oct;16(5 Suppl):S204-7
- (5) Inui A, et al. Regeneration of rotator cuff tear using electrospun poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) scaffolds in a rabbit model. *Arthroscopy.* 2012 Dec;28(12):1790-9
- (6) Gulotta LV, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med.* 2011 Jun;39(6):1282-9.
- (7) Yokoya S, et al. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 2012 Jun;40(6):1259-68.
- (8) Nagura I, et al. Differentiation Potential of

the Cells derived from Torn human Rotator cuff. 58th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society 2012.

- (9) Mifune Y, et al. Tendon graft revitalization using adult anterior cruciate ligament (ACL)-derived CD34+ cell sheets for ACL reconstruction. *Biomaterials*. 2013 Jul;34(22):5476-87.

2. 研究の目的

(1) 細胞シートの作成には培養時の細胞濃度や培養時間などの調整が重要であり、ラット腱板の大きさから 12well の温度応答性細胞培養皿(UpCell)を用いて、ヒト腱板由来幹細胞による細胞シート作成における最適な培養条件を検索し、均一化した細胞シート作成が行えるようにする。これまでにヒト靭帯由来細胞での細胞シート作成に成功しており、おおよその培養条件は予想される。

(2) 次に、腱板由来細胞シートが腱板修復部の治癒促進に働くのか、を明らかにするために動物実験を行う。肩腱板実験モデルとして汎用されているラットを用いて、腱板修復モデルを作成し、修復部に細胞シートを移植する。その際、ヒト由来細胞を移植するので、ヌードラットを使用する。ヌードラット肩腱板修復モデルを作成し、細胞シートを移植後、経時的にサンプルを採取し、腱-骨付着部の修復状態を、組織学的な構築評価や免疫染色による腱再生評価、real-time PCR によるコラーゲン定量などの生物学的再生評価を行う。また、引っ張り試験により各腱板組織の最大破断強度や弾性率を計測し、臨床上最も重要である力学的強度に関しても検討する。最後に、細胞シートを筋膜パッチ術と組み合わせることで、高い初期固定力が得られると同時に、より早期に筋膜グラフトの生着が得られるかを、同様にラット腱板修復モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

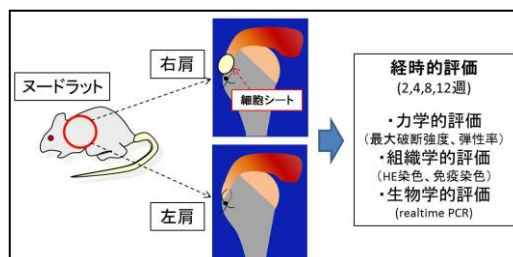
(1) ヒト腱板由来幹細胞による細胞シート作成

患者同意の元、腱板修復手術時にトリミング操作により切除・破棄される腱板の断端組織を採取・保管し、細胞分離を行う。この腱板由来細胞に関しては、すでにフローサイトメトリーによる細胞マーカーの分析や増殖能・分化能などの検討は終えている(8)。細胞シートの作成には培養時の細胞濃度や培養時間などの調整が重要であり、今回使用するラット腱板の大きさから 12well の温度応答性細胞培養皿(UpCell)を用いて、ヒト腱板由来幹細胞による細胞シート作成における最適な培養条件を検討し、再現性の高い細胞シート作成を行う。ヒト靭帯由来細胞でのシート作成においては、 1×10^5 /well の細胞密度で 16-17 時間の培養時間が最適な条件であったので、この条件を基準にして実験を開始し、細胞密度および培養時間の増減を行いながら、ヒト腱板由来細胞における最適条件を検討する。

(2) ラット腱板修復モデルに対する細胞シート移植治療の検討

ラット腱板修復モデルは、我々の施設でこれまでも使用してきた棘下筋断裂後修復モデルを使用する。腱板は上腕骨頭の骨孔を作成して縫合し、修復部に腱板由来細胞シートを縫合・固定する。

ヌードラット(10週齢)を48匹用意し、右肩を細胞シート移植(S)群、左肩を非治療群(コントロール;C)群として使用する。ソムノペンチルの腹腔内投与による



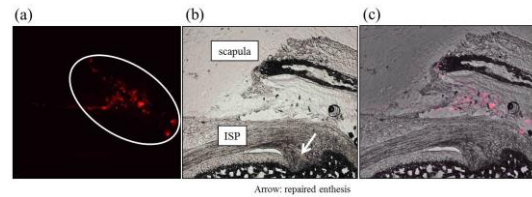
全身麻酔下に、棘下筋断裂を作成し、上腕骨頭に骨孔を作成し、縫合・修復する。同時に右肩（S群）では細胞シートを修復部を覆うように縫合し、左肩（C群）では何も移植せずにそのままとする。術後4W、8Wに各期各群12匹ずつソムノペンチル大量投与により安楽死させ、①引っ張り試験による力学的評価（最大破断強度(N)、弾性率(N/mm)、n=4)、②組織学的評価（サフランインO染色による組織構築評価、免疫染色による腱再生評価、n=4）、③生物学的評価（real-time PCRによるコラーゲン定量、n=4）を行い、それらの結果を統計学的に評価し、各群間での比較を行う。また、移植した細胞の動きを確認するために、予め細胞をDiIで標識し、のちに蛍光顕微鏡により移植した細胞の広がり調べ。

4. 研究成果

(1) まず、腱板由来細胞を用いて細胞シートの作成を行った。患者同意の元、腱板修復手術時にトリミング操作により切除・破棄される腱板の断端組織を採取・保管し、collagenase処理を行い細胞分離を行った。細胞シートの作成には培養時の細胞濃度や培養時間などの調整が重要であり、今回使用するラット腱板の大きさから12wellの温度応答性細胞培養皿(UpCell)を用いて、ヒト腱板由来幹細胞による細胞シート作成における最適な培養条件を検討したところ、ヒト腱板由来細胞でのシート作成においては、 1×10^5 /wellの細胞密度で16-17時間の培養時間が最適な条件であることがわかり、これにより再現性の高い細胞シート作成を行うことが可能になった。

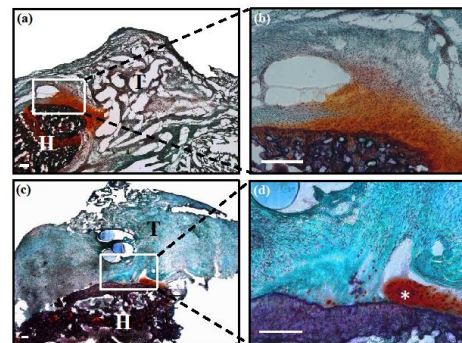
(2) ラット腱板修復モデルを用いたin vivo実験では、まず細胞シート移植の状態を確認するために、細胞をDiIにて染色し、

シート移植後1Wに肩関節組織を採取し、組織学的に細胞シートの位置を確認したところ、移植直後のまま修復腱板の上にとどまっていることが確認できた。

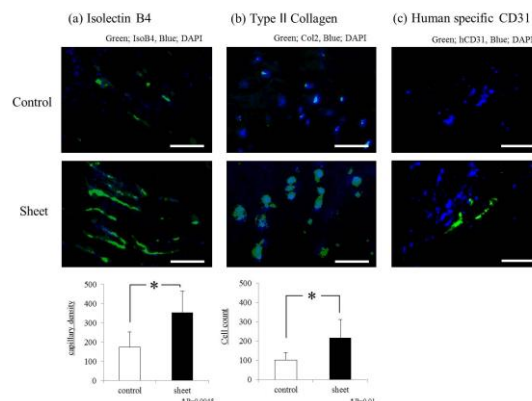


次に、術後4週でシート群ではサフランインO染色において腱修復部に多くの軟骨基質を認め、SafraninO染色でもシート移植群で赤色に染色されるenthesisの再生を認めた。

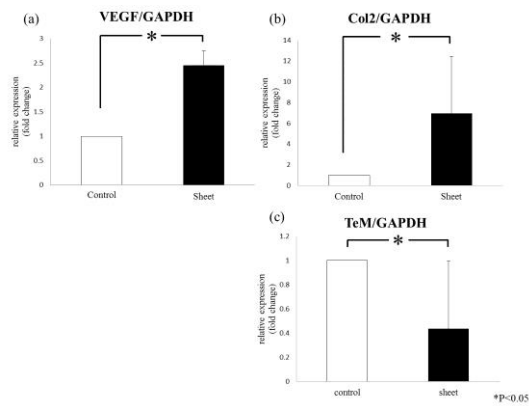
Fig.3



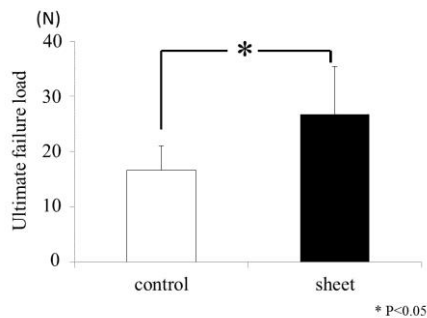
また、免疫染色でも有意に多くのType II collagenの発現を認めた。Isolectin B4を用いた免疫染色でもシート群で腱板修復部周囲組織において有意に多くの微小血管を認め、ヒト特異的CD31の発現も確認できた。



定量的 PCR では VEGF および type II collagen においてはシート群で有意に高い発現を認め、テノモジュリンに関してはシート群において有意に低い発現を認めた。



術後 8 週での力学的試験においてはシート群では有意に高い引っ張り強度を示した。



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 1 件)

- ①Harada Y, Mifune Y, Inui A, Sakata R, Muto T, Takase F, Ueda Y, Kataoka T, Kokubu T, Kuroda R, Kurosaka M. Rotator cuff repair using cell sheets derived from human rotator cuff in a rat model. Orthop Res. 2016 May 12. doi: 10.1002/jor.23289.

[学会発表] (計 2 件)

- ①美船泰、乾淳幸、無藤智之、原田義文、高瀬史明、黒坂昌弘、国分毅 第 125 回中部日本災害整形外科学会 2014 年 10 月 2-3 日 愛知
- ②Harada Y, Kokubu T, Mifune Y, Muto T, Inui A, Takase F, Kurosaka M. Effect of Regeneration of tendon-bone junction using a cell sheet composed human tendon derived cells. At 69th Annual meeting of American society for Surgery of the Hand (ASSH). Boston MA US. Sep 18-20 2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

美船 泰 (MIFUNE, Yutaka)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：80608464