

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19991

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞シートを用いた革新的半月板縫合術の確立-ウサギを用いた基礎研究-

研究課題名(英文) novel technique for meniscal repair using adipose stem cell sheet

研究代表者

中瀬 順介 (Nakase, Junsuke)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50584843

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)：脂肪由来幹細胞シートを用いた新しい半月板縫合術についてウサギ内側半月板を用いて研究をおこなった。脂肪由来幹細胞シートを併用してもウサギ内側半月板を組織学的に治癒することは困難であった。一方、半月板亜全摘後に脂肪由来幹細胞シートを半月板欠損部に留置することで、対照群と比較して有意に大きい半月板様組織が再生した。脂肪由来幹細胞シートが滑膜組織が侵入する足場となりうる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：A new meniscal repair using a adipose derived stem cell sheet was investigated using a rabbit medial meniscus. It was difficult to cure the medial meniscus of the rabbit histologically even when adipose derived stem cell sheet was used in combination. On the other hand, by placing the adipose-derived stem cell sheet in the meniscal defect site after subtotal meniscectomy, the meniscal-like tissue significantly larger than the control group was regenerated. We found that adipose-derived stem cell sheet could become a scaffold for synovial tissue invasion.

研究分野：整形外科

キーワード：半月板 脂肪由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膝半月板損傷によって衝撃吸収機能が失われると、膝関節軟骨は変性し、非可逆的な関節症性変化を来す。そのため、半月板損傷に対しては、半月板温存手術(半月板縫合術)が治療の第一選択となるが、半月板は血流に乏しい組織であり自己修復能が低いいため、縫合術の適応はかなり制限されている。それでも半月板縫合術後の再断裂率は30 - 40%と非常に高い。半月板の治癒能力を促進することができれば臨床的意義は非常に大きく、半月板縫合術の成功率の上昇及び適応拡大につながり、ひいては今後の膝関節治療を大きく変えるものとなり得ると考えている。このような背景から、申請者は当教室オリジナルの脂肪由来幹細胞シートを用いて、損傷した半月板の治癒能力促進し、新しい半月板縫合術の確立を目指し、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪由来幹細胞シートを用いて新しい半月板縫合術を確立することである。

3. 研究の方法

本研究ではウサギ後肢内側半月板を用いて、半月板縦断裂モデルを作成し、断裂部に脂肪由来幹細胞シートを挟み込んで半月板縫合術を行い、脂肪由来幹細胞の分化・誘導促進能を評価する。

<脂肪由来幹細胞による半月板治癒促進効果の検討>

内側半月板断裂に対して、半月板縫合術時に脂肪由来幹細胞シートを挟み込む群と縫合術のみを行う群を作製し、術後2, 4, 8, 12週の時点において半月板の治癒について、2群間で比較・評価を行う。

<本研究に付随する脂肪由来幹細胞に関する基礎研究>

半月板において脂肪由来幹細胞が、(1) どのように分化しているのか?(分化するのか?)(2) 成長因子などの誘導に関して分

子生物学的な手法を用いて検討する。

平成27年度

初年度は、脂肪組織の抽出・培養及び脂肪由来幹細胞シートの作成手技を確立する。すでに、脂肪組織の抽出に関しては手技が確立しているため、培養と脂肪由来幹細胞シートの作成について、共同研究者で脂肪由来幹細胞シートを世界に先駆けて報告した方向先生のもとで技術を習得する必要がある。脂肪由来幹細胞シートの安定供給が可能になったら、ウサギ半月板断裂モデルに対し、脂肪由来幹細胞シートを挟んで縫合術を施行し、治療群として飼育する。コントロール群についてはすでにモデルが確立し、手技的にも安定しているため、適時作成する。

(1) 脂肪由来幹細胞シートの作製

治療群に移植する脂肪由来幹細胞シートは同個体の脂肪組織から抽出する。ウサギの背部より脂肪組織を15g採取し、0.12%コラゲナーゼで酵素処理することで間質血管細胞群を分離する。得られた間質血管細胞群を通常培地で培養し、100mm² ディッシュあたり1×10⁶になるようにカウントし、培養する。細胞がconfluentとなったところで、アスコルビン酸を加えた培地で培養を行い脂肪由来幹細胞シートを作成する。

(2) 半月板縫合モデルの作製

成熟した雌日本白色家兔(体重2.5-3kg)80羽を実験に用いる。ウサギの内側半月板血管野から無血管野に及ぶ15mmの縦断裂を作成し、半月板損傷のウサギを得る。脂肪由来幹細胞シートを断裂部に挟み込んで縫合術を行う治療群と何も挟まずに縫合術を行うコントロール群をそれぞれ40羽作成する。縫合術には5-0ナイロン糸を使用して、縦断裂に対して、垂直縫合を4

回行う(図2)。術後はケージ内で自由に飼育し、術後2, 4, 8, 12週で各群10羽を解剖し、半月板を採取する。

平成28年度

初年度で作成技術を得た脂肪由来幹細胞シートを用いて、治療群の作製を継続する。また、引き続き、採取した半月板の評価も随時行う。

評価方法

(1) 肉眼的評価：採取した半月板を肉眼的に3段階で評価する。(Ruiz-Iban M et al. Arthroscopy 2011)

(2) 病理組織学的評価

H-E染色およびサフラニン-O染色を行い、断裂部分の細胞組成やプロテオグリカン含有の有無を観察する。また、組織学的評価を半定量化するためにIshida score (Ishida K et al. Tissue Eng 2007)を用いて半月板の質的評価を行う。

免疫組織学的評価

コラーゲンタイプⅠ、Ⅱの免疫染色を行い、修復部のコラーゲン組成を正常半月板組織と比較検討する。

4. 研究成果

ウサギ内側半月板縦断裂(長さ15mm)モデルで実験を開始したが、半月板が治癒するモデルを得ることができなかったため、縦断裂のモデルの改良(長さ10mm)や半月板縫合方法の改良および縫合糸の変更などを行ったが、半月板治癒モデルを確立することができなかった。原因としては術後の後療法などが考えられた。一方で、脂肪由来幹細胞シートには半月板再生の足場になりうる可能性を見いだすことができた。そのため、ウサギ内側半月板垂全摘モデルでの半月板再生能力についての研究を追加している。その結果、半月板垂全摘術後に脂肪由来幹細胞シートを膝関節内に留置することで、再生した半月

板の面積が対照群と比較して有意に大きい結果を得ることができた(半月板再生面積移植群 42.5 ± 7.7 、対照群 31.7 ± 10.1 、 $P = 0.014$ 、横径 移植群 1.9 ± 0.4 、対照群 1.2 ± 0.5 、 $P = 0.003$)。組織学的には半月板を再生することはできなかったが、滑膜組織の侵入誘導および足場として脂肪由来幹細胞シートが有効であった可能性が示唆された。現在、研究成果をまとめており、今後本研究成果について第43回日本整形外科学会スポーツ医学学会学術集会および第32回日本整形外科学会基礎学術集会で発表予定である。



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

中瀬 順介 (NAKASE, Junsuke)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50584843

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()