

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19599014  
 研究課題名 (和文) 早期スポーツ復帰を目指した ACL 移植腱の再生促進についての研究  
 研究課題名 (英文) Stimulation of graft remodeling to accelerate returning period to sport activity

研究代表者  
 久保 晴司 (KUBO SEIJI)  
 神戸大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：30452494

研究成果の概要：前十字靭帯移植腱の再生を促進する手法に付きその有効な cell source としての関節内血腫、断裂靭帯断端、などから細胞を採取し、それぞれの細胞腫について、増殖能力、分化能力の比較を行った。有用な細胞腫と思われた CD34 陽性細胞の局所細胞移植、成長因子として G-CSF の局所投与に関する実験を動物実験で行い、その効果を組織学的、生体工学的に解析した所、いずれにおいてもその有用性を示す結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：前十字靭帯損傷、移植腱の成熟、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

膝靭帯損傷はスポーツ傷害のなかでも頻度が多く、また靭帯損傷の自然治癒の可能性は低いため、スポーツ復帰の為には関節内に作成した骨孔を経由して関節内に自家腱を移植する靭帯再建術が一般に行われている。しかし靭帯再建術後、移植された自家腱が成熟し力学的ストレスに耐えられるようになるには 6 から 12 ヶ月が必要とされており、

術後早期のスポーツ復帰を妨げる主要因となっている。移植腱の成熟の促進に前十字靭帯損傷時の血腫細胞から得られる、細胞シートや、成長因子としての役割も近年注目されてきている G-CSF、血管内皮細胞由来といわれる CD34 陽性細胞などを移植時に移植腱に局所投与することにより、役立てることはできないかと考え、研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) まず、前十字靭帯損傷時の関節内血腫細胞の由来を調査するために関節内に残存した前十字靭帯の断端に存在する細胞腫の解析を行った。

(2) 次に、自家靭帯移植において重要な要因である、骨孔-移植腱間の接着を促進する為にゼラチンにより徐放されるG-CSFを用いてイヌ前十字靭帯再建モデルを作成し、骨孔-移植腱間の組織学的成熟および破断強度に関する研究を行った。

(3) 靭帯の再生に対する細胞移植治療の有用性を確認するためにラット内側側副靭帯損傷モデルに前十字靭帯損傷時の血腫細胞の由来の一つである末梢血由来CD34陽性細胞を移植し、靭帯再生に対する細胞移植治療の有効性を組織学的、力学的に解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 前十字靭帯再建術の際得られた、前十字靭帯断裂部および残存靭帯からの癒痕、血腫組織を使用した(平均年齢 22.5 歳, n=8)。免疫組織化学染色において CD34+細胞, CD146+細胞の局在を検討し(n=3), 組織を損傷部と実質部に分けて前十字靭帯細胞を分離し, Flow cytometry により CD34+CD45-細胞, CD146+CD45-細胞の局在を解析し, さらに同細胞群および CD34-CD146-CD45-細胞群を分離, その増殖能, 多分化能を検討した(計6群)(n=5)。

(2) 足趾屈筋腱を用いたイヌ前十字靭帯再建モデルを作成し、両側膝の再建術を2週間時期をずらして行った。G-CSF含有ゼラチンを移植腱-骨孔間に局所投与した群と投与しない群間で、術後2, 4週の時点での骨孔-移植腱間の引っ張り試験による最大破断強度、組織学的成熟度、CTを用いての骨孔の直径変化、PCR法による骨孔-移植腱接合部の組織から抽出した mRNA の半定量的評価を行った。

(3) ノードラット内側側副靭帯断裂モデルを用いてヒト CD34 陽性細胞移植群、ヒト単核細胞移植群、細胞移植なし群の3群に付き

再生靭帯の引っ張り試験による力学的最大破断強度を力学試験器を用いて確認し、術後1週の時点での移植細胞の局所集積を免疫組織化学染色と局所組織から抽出した mRNA の PCR 法により確認した。局所の毛細血管形成密度を CD31 の免疫染色を用いて比較した。また、局所から得た mRNA の PCR によって靭帯組織特異的遺伝子の発現量の比較も行った。

## 4. 研究成果

(1) CD34, CD146, smooth muscle actin (SMA) 抗体を用いた免疫組織化学染色において、CD34+細胞, CD146+細胞は血管壁・周囲に局在し、実質部に比較して、損傷部に有意に多く集積していた。Flow cytometry においても、CD34+CD45-細胞, CD146+ CD45-細胞は、実質部細胞群に比較し、損傷部細胞群に有意に多く認められた。実質部細胞群に比較し、損傷部より得られた CD34+CD45-細胞, CD146+CD45-細胞群は、有意に高い増殖能を示した。損傷部より分離された CD34+CD45-細胞, CD146+ CD45-細胞群は、in vitro 骨・軟骨・脂肪細胞分化誘導培地において、それぞれ骨・軟骨・脂肪細胞への分化誘導が確認され、CD34-CD146-CD45-細胞群に比較し、有意に高い分化効率を示した。ACL 損傷に際し、高い増殖能, 多分化能を有する CD34 陽性, CD146 陽性血管幹細胞は損傷部に集積し、治癒に貢献している可能性が示唆された。今後、これらの細胞を基盤とした ACL 再建術は、新たな戦略となりうる可能性を秘めている。

(2) 術後2週の時点での組織学的評価においてはG-CSF含有ゼラチン投与群で Sharpy 線維と毛細血管の形成が非投与群に比べて

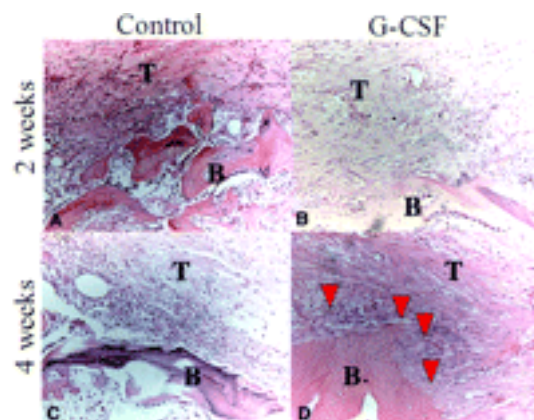


図 1. 骨孔-移植腱接合部の組織像

有意に増加していた (図 1)。4 週の時点では CT 撮影による骨孔径の評価で G-CSF 含有ゼラチン投与群が、非投与群に比べて有意に小さい骨孔径を示していた。移植腱及び骨孔内組織の PCR 法による mRNA の評価では G-CSF 含有ゼラチン投与群で有意に VEGF, osteocalcin の発現が増加していた。

さらに、術後 4 週の時点での引っ張り試験による最大破断強度についても G-CSF 含有ゼラチン投与群が、非投与群に比べて有意に強い強度を示した (図 2)。

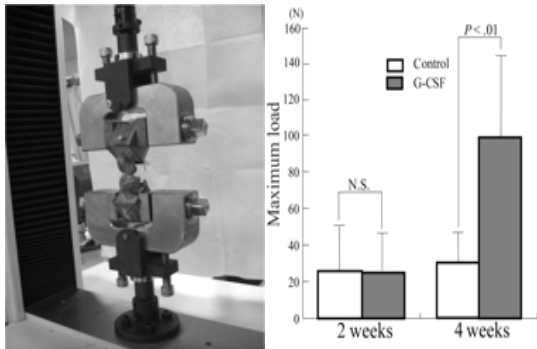


図 2. 最大破断強度の測定とその結果

この実験により、G-CSF 含有ゼラチンの局所投与が移植腱と骨孔間の接着を血管形成及び骨形成を通じて促進することが証明された。G-CSF 含有ゼラチンの局所投与が前十字靭帯再建術と組み合わせて用いること早期スポーツ復帰のために有用な方法である可

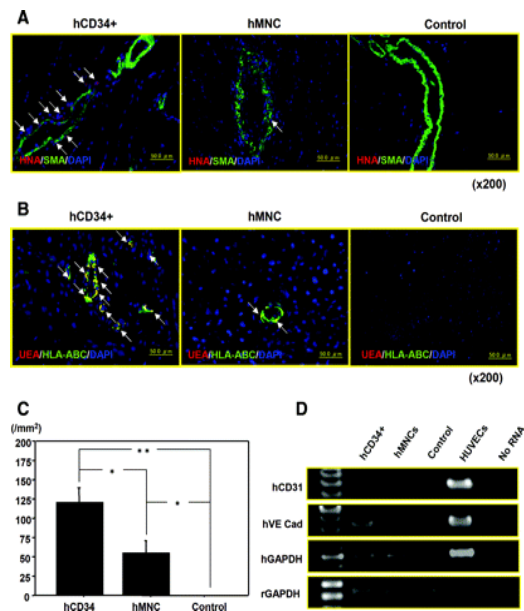


図 3. 移植細胞の存在 (赤色蛍光) を免疫染色、PCR 法で示している。緑色の蛍光は動脈を、青色の蛍光は細胞核を示している。

能性が示唆された。

(3) ヒト CD34 陽性細胞移植群では術後 1 週の時点で移植細胞が局所に多く止まっていることが確認できた (図 3A、矢印)。それに対しヒト単核細胞移植群では局所に止まっている細胞は少なかった (図 3A 中)。そしてもちろん、細胞移植なし群では局所にヒト由来細胞の存在を認めなかった (図 3A 右)。存在する細胞数には明らかな有意差を認めた (図 3C)。

ヒト CD34 陽性細胞が血管内皮細胞へ分化していることを示している (図 3B 矢印)。ヒト CD34 陽性細胞移植群では多くの移植した細胞が血管内皮に分化していることが確認できた (図 3B 左、矢印)。それに対しヒト単核細胞移植群では血管内皮に分化している細胞は少なかった (図 3B 中、矢印)。そしてもちろん、細胞移植なし群では血管内皮に分化している細胞の存在を認めなかった (図 3B 右)。

PCR 法でもヒト CD34 陽性細胞移植群で血管へ分化していることを示す遺伝子発現を確認できた (図 3D)。

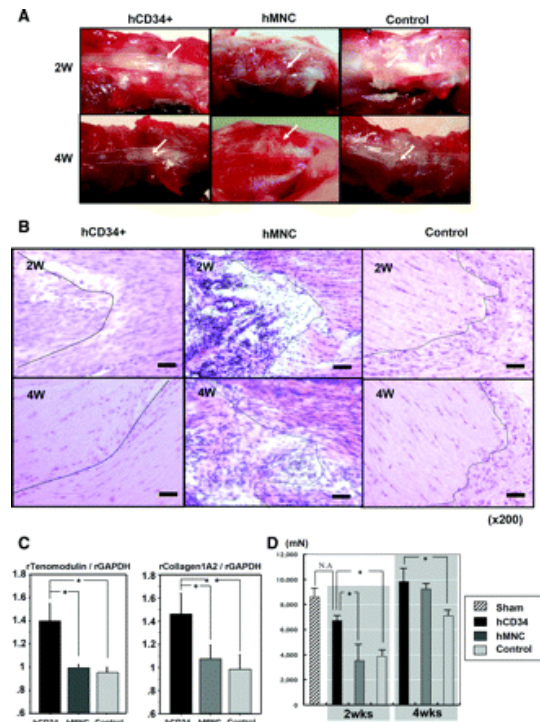


図 4. 再生された靭帯の肉眼所見と力学試験による最大破断強度

肉眼的観察においてはヒト CD34 陽性細胞移

植群では術後 2 週の時点で 33%の治癒率、4 週の時点で 100%の治癒率であった。(図 4A 左)。それに対しヒト単核細胞移植群では 2 週で 16%, 4 週で 33%であり(図 4A 中)、細胞移植なし群では 2 週で 0%、4 週で 33%であった(図 4A 右)。HE 染色での組織学的検討でも同様の傾向を示した(図 4B)

定量的 PCR による評価でも Tenomodulin 及び Collagen1A2 の遺伝子発現量はヒト CD34 陽性細胞移植群で他群に比べ有意に多かった(図 4C)。

引っ張り試験による最大破断強度においても再生した靭帯はヒト CD34 陽性細胞移植群で他群に比べ有意に強い力学的強度を示し、その強度は正常靭帯とほぼ同様であった(図 4D)。

以上のことからヒト CD34 陽性細胞の局所移植は靭帯の再生に有用であると考えられた。

#### 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 2 件)

1. Sasaki K, Kuroda R, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, Mifune Y, Kinoshita K, Tei K, Akisu e T, Tabata Y, Kurosaka M  
Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Sports Med.* (査読あり) 2008 Aug;36(8):1519-27. Epub 2008 Apr 15.
2. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R.  
Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells.* (査読あり) 2008 Mar;26(3):819-30. Epub 2008 Jan 10.

[学会発表] (計 2 件)

1. 松本知之、黒田良祐、大沢亜紀、久保晴司、Johnny Huard、Freddie H. Fu、黒坂昌弘；膝前十字靭帯由来血管幹細胞の分離と同定：第 23 回日本整形外科学

会基礎学術集会 2008. 10. 23-24 奈良

2. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Fujita N, Kubo S, Kurosaka M, Kuroda R ; Peripheral blood CD34-positive cells contribute to ligament healing: 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2008. 3. 2-5 San Francisco)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 晴司 (KUBO SEIJI)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：30482494

##### (2) 研究分担者

黒田 良祐 (KURODA RYOSUKE)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80379362  
黒坂 昌弘 (KUROSAKA MASAHIRO)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70170115  
藤岡 宏幸 (FUJIOKA HIROYUKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10252777  
三輪 雅彦 (MIWA MASAHIKO)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20397805

##### (3) 連携研究者

該当なし