

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 年 月 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659722
 研究課題名（和文）
 自己血由来スキャフォールドを用いた運動器組織への分化誘導と再生医療への応用
 研究課題名（英文）
 Induction of differentiation to musculoskeletal tissue with autologous blood-derived scaffold and application to regenerative medicine
 研究代表者
 北 圭介（KITA KEISUKE）
 大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）
 研究者番号：30588869

研究成果の概要（和文）：関節構成成分である半月の治療において、近年、人工材料や、生体由来材料の有用性が報告がされてきたが、免疫拒絶反応、感染制御等、克服すべき問題が存在する。これらの問題の最も効率的な解決策は、自己由来の材料を用いることである。フィブリンクロットは、静脈血より簡単に作成される網状構造をもつ構造体であり、自己由来であるため安全性が高い材料である。本研究では、このフィブリンクロットを用いた半月再生治療技術について検討した。

研究成果の概要（英文）：In recent years, usefulness of the technique using artificial materials and animal-derived materials has been reported in the treatment of meniscus which is one of the tissue forming the synovial joint. However, the problems to be overcome, such as infection control and immune response, are still present. The most effective way to solve these problems is to use autologous materials only. Fibrin clot is a tissue with a network structure and is easily created from venous blood. Fibrin clot is highly safe because it is autologous. In this study, we examined the regenerative therapy of meniscus using the fibrin clot.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・整形外科学

キーワード：四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

関節構成成分である関節軟骨や半月を含む軟骨組織は荷重衝撃の緩衝、関節滑動性の獲得など重要な役割を担っているが、血行に乏しく難治性の組織である。一旦損傷すると十分に修復されることはなく、損傷部の放置は関節の荷重分散機能の著しい低下を来し、

関節軟骨の破壊を合併し、二次性の関節症へと進展することも多い。全世界で変形性関節症の潜在患者数は3千万人とも推定され、有効な半月や軟骨の治療法の開発は急務である。

近年、軟骨を対象とした再生医療的手法を用いた新規治療法が多く研究されているが、半月に対する新規治療の報告は少ない。古典

的な半月に対する治療法としては、損傷部分の縫合術が基本であるが、縫合可能な半月損傷は全体の5%程度であるとの報告もあり、やむなく切除せざるを得ない症例は非常に多い。半月を切除した場合、関節軟骨に過剰な荷重衝撃が加わり、数年で50%以上に関節症性変化が見られるということは周知の事実であり、半月の機能温存を目的とした細胞治療が研究され始めている。

これまで細胞治療を行う場合、細胞の集積の維持、細胞増殖、分化機能の安定化、さらには治療部位にかかる力学ストレスからの保護などの目的のために大多数の研究では生体基盤材料（スキャフォールド）が使用されてきた。これまで報告されている半月治療用スキャフォールドとしては①人工材料（ポリウレタン）②生物由来材料（ウシコラーゲン、同種半月）などがあるが、それらの材料の使用が生体に及ぼす影響は長期にわたっては予測しきれない問題がある。そこで我々は、患者さんの自己由来の静脈血に含まれるフィブリンをスキャフォールドとして使用する方法を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*にて自己血由来スキャフォールドを用いた三次元人工組織作製法の確立および*in vivo*にて膝関節半月板の再生医療の可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 自己血由来スキャフォールドを用いた三次元人工組織作製法の確立(*in vitro*)

①自己由来静脈血から得られるフィブリンクロットをスキャフォールドとし、ヒト滑膜幹細胞あるいはヒト半月板細胞を播種して三次元培養組織を作成する際の作成方法と至適培養条件につき検討した。

②作成した組織の免疫組織学的検討を免疫

組織染色法にて検討した。

③三次元培養組織内の遺伝子発現解析をRT-PCR法により検討した。

(2) ミニブタを用いた移植実験

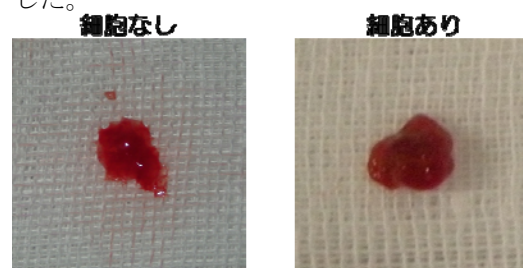
ミニブタの内側半月板前節に径5mmの欠損を作成し、三次元組織補填群、欠損群、フィブリンクロットのみの補填群の3群で手術後3か月後に肉眼的所見、組織学的所見を解析した。

4. 研究成果

(1) 静脈血を摺りガラス棒にて約7分間ゆっくりと攪拌すると、ガラス棒に析出したフィブリンクロットを得ることができる。

①この静脈血にあらかじめ培養増殖しておいたヒト半月板由来細胞懸濁液を混入すると細胞数 1×10^6 個/20ml静脈血の条件にて、約90%の効率で細胞がとりこまれたフィブリンクロットを作成することが可能であった。

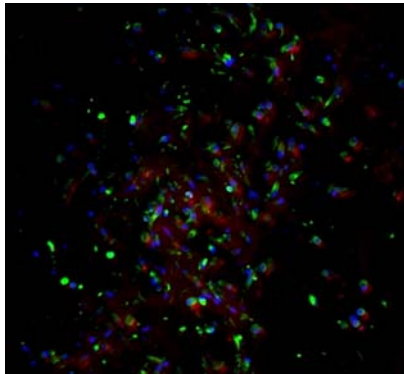
この細胞入りフィブリンクロットと細胞を入れていないフィブリンクロットをDMEM10%ウシ胎仔血清下に2週間培養すると、細胞を入れていないものは溶解したが、細胞を入れたフィブリンクロットは、3次元組織を形成した。



きし麺状に作成した3次元人工組織

②免疫組織学的検討

作成後、2 週間 DMEM10%ウシ胎仔血清下で培養した 3 次元組織を、間葉系細胞のマーカである vimentin と、核染色の DAPI、I 型コラーゲンにて免疫組織染色を行った。

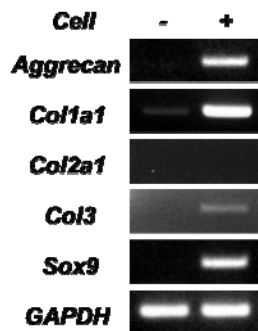


緑＝半月細胞
青＝細胞核
赤＝I型コラーゲン

緑に染色された細胞が、播種したヒト半月細胞であるが、3次元組織内での増殖を認めた。また、その周囲に赤で染色される I 型コラーゲンを認めた。

③遺伝子発現解析

作成後、2 週間 DMEM10%ウシ胎仔血清下で培養した 3 次元組織をホモジナイズし、細胞を播種していない群と播種した群で RT-PCR 法にて遺伝子発現を比較検討した。



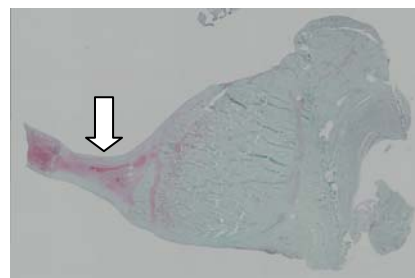
細胞播種した 3 次元組織においてアグリカンや I 型コラーゲンなどの遺伝子発現を認めた。半月板に少量含まれる II 型コラーゲンの発現は認めなかったが、その上流である

Sox9 の遺伝子発現を認めた。

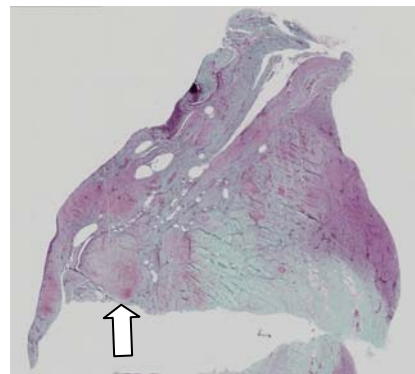
(2) ミニブタを用いた移植実験

ミニブタの内側半月板前節に径 5 mm の欠損を作成し、三次元組織補填群、欠損群、フィブリンクロットのみの補填群の 3 群で手術後 3 か月後に解析した。肉眼的には感染、癒着、関節炎は認めなかった。組織学的には、三次元組織補填群、フィブリンクロットのみの補填群では関節包からの滑膜増生を認めた。

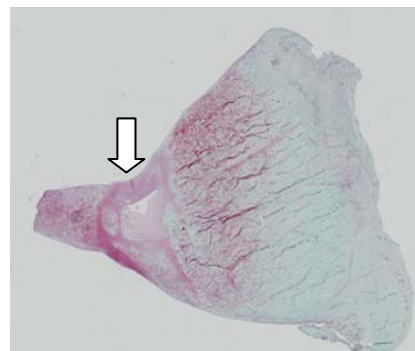
(白矢印が半月欠損作成部)



欠損群

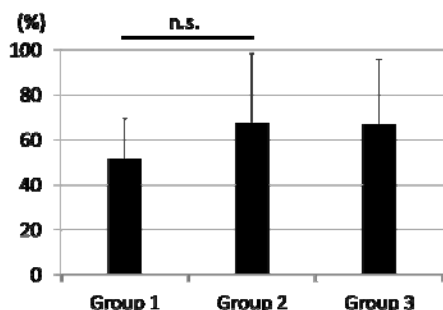


細胞なしフィブリンクロット



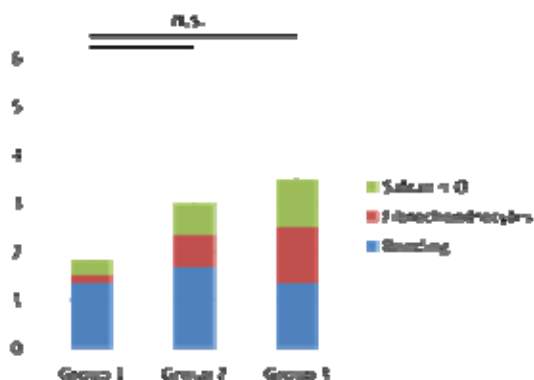
細胞ありフィブリンクロット

組織充填率は三次元組織補填群：67% (Group3)、欠損群(Group1)：52%、フィブリンクロットのみの補填群(Group2)：68%と欠損群で低い傾向にあったが、有意差は認めなかった。



組織スコアリング：過去の報告 (Ishida K et al, Tissue Eng., 2007) に従い組織スコアリングを行った。

1. Reparative tissue with bonding
 - 2 points: Bilaterally bonds with surrounding meniscus
 - 1 point: Partially bonds with surrounding meniscus
 - 0 points: No bond with surrounding meniscus
2. Existence of fibrochondrocytes
 - 2 points: Fibrochondrocytes exist diffusely in the reparative tissues
 - 1 point: Fibrochondrocytes are localized in the reparative tissues
 - 0 points: No fibrochondrocytes in the reparative tissues
3. Staining with Safranin-O
 - 2 points: Densely stained with Safranin-O
 - 1 point: Faintly stained with Safranin-O
 - 0 points: Not stained with Safranin-O



三次元組織補填群でスコアが高い傾向にあったが、他群と比較し有意差は認めなかった。

研究成果のまとめ

自己由来静脈血から得られるフィブリンクロットをスキヤフォールドとし、自己細胞

を播種し2週間培養することで、自己材料のみ由来の3次元組織を作成する技術を開発した。ミニブタ移植実験では、コントロール群に比し、有意ではなかったが、これは強度不足によるものと考えられる。向後、この3次元組織を組織に特徴的な形に形成したり、成長因子や薬剤を加え強度を持たせることで、より有用な再生医療材料として発展させることが期待できる。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 北圭介、中田研、前達雄、米谷泰一、中村憲正、松尾知彦、橘優太、金銅真世、太田啓介、吉川秀樹

自己由来滑膜細胞とフィブリンクロットを用いた一期的半月板再生治療の試み
第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、2013年6月20日、札幌

- ② 北圭介、前達雄、米谷泰一、松尾知彦、橘優太、金銅真世、吉川秀樹、中田研

膝関節半月板再生のためのコラーゲン補填材料 ミニブタを用いた feasibility study
第12回日本再生医療学会総会、2013年3月22日、横浜

- ③ 北圭介、中田研、前達雄、中村憲正、松尾知彦、金銅真世、太田啓介、吉川秀樹

自家細胞と自家静脈血フィブリンによる一期的cell delivery system ー半月細胞を用いた検討ー
第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012年10月26日、名古屋

- ④ 北圭介、前達雄、松尾知彦、下村和範、中村憲正、吉川秀樹、中田研

関節内骨軟骨欠損に対する軟骨下骨修復材料の検討
第4回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、2012年7月20日、沖縄

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 圭介 (KITA KEISUKE)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：30588869

(2) 研究分担者

中田 研 (NAKATA KEN)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00283747

(3) 研究分担者

前 達雄 (MAE TATSUO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10569734

(4) 研究分担者

樋口周久 (HIGUCHI CHIKAHISA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40432421

(5) 研究分担者

中村憲正 (NAKAMURA NORIMASA)
大阪大学・臨床医工学融合教育センター・
招聘教授
研究者番号：50273719

(6) 研究分担者

名井陽 (MYOI AKIRA)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10263261

(7) 研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558