

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06264

研究課題名(和文) ナノレベルの線維配向性を有するスキャフォールドを用いた新たな半月板治療の確立

研究課題名(英文) Repairing incurable meniscal tears using a novel nanofibrous scaffold

研究代表者

下村 和範 (Shimomura, Kazunori)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40755998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで治療が困難であった半月板損傷に対し、間葉系幹細胞および内部に微細線維構造を有するスキャフォールド(細胞の足場材料)を用い、半月板修復に有用かどうか検討した。動物(ウサギなど)を用いた検討にて、間葉系幹細胞を播種したスキャフォールドは隣接する関節軟骨の保護作用および半月板修復効果を認め、新たな治療法となり得ることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半月板は膝関節内において重要な機能を有するが、半月板は大部分が無血管野であり、一旦損傷すると自然修復が期待されず、これまで有効な治療法が無かった。また多くの場合、切除を余儀なくされ、変形性関節症の要因となっていた。本治療法は、これまで難治性であった半月板損傷に対する新たな治療法として期待され、今後、変形性関節症発症予防へ繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the applicability of cell-seeded nanofibrous scaffolds to repair the meniscal injury along with the prevention of subsequent cartilage degeneration using an animal model. The cell-seeded nanofibrous scaffolds contributed significantly to the reinforcement of meniscal torn site and exerted a chondroprotective effect, compared with the untreated control groups. Thus, we have demonstrated the feasibility of our technique to repair the meniscal injury, and prevent the progression to osteoarthritis, as a potential tissue engineering method.

研究分野：整形外科

キーワード：半月板 再生医療 スキャフォールド エレクトロスピニング 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

半月板は、膝関節内に存在する三日月状の線維軟骨組織であり、関節軟骨の衝撃吸収、関節安定化、関節潤滑など重要な機能を有する。外傷による半月板損傷や加齢による半月板変性は临床上よく遭遇するが(罹患数:本邦で2000万人、全世界で2億人)、損傷を放置すると疼痛や可動域制限などのADL障害を生じ、また関節軟骨への負荷が増大するため、二次性の軟骨損傷を来す(文献1)。そのため近年、半月板の重要性が認識されている。しかしながら、半月板は圧縮、剪断、伸張など様々な力学負荷を受けるため、非常に複雑な線維構造、生物特性を有しており、血行が辺縁部しか存在しないため、一旦損傷すると治癒が難しい組織である(文献2,3)。さらに、半月板損傷の多くは、無血管野を含む事から自然修復は期待されず、半月板切除を余儀なくされる事が多く、変形性関節症発症の原因の一つとなっている。そこで近年、従来切除の適応であった半月板損傷に対し、様々な縫合術を用いた半月板温存手術が試みられているが、満足のいく臨床成績は得られていない(文献4)。また類似の構造、特性を持つ組織を自家移植用組織として生体内に見つける事は難しく、さらに半月板に類似した内部構造、力学特性を持つ人工組織開発が困難である。従って、これまでは細胞を用いずに構造も半月とは類似しない高分子化合物を用いた永久型インプラントの開発が主としておこなわれてきたが、満足のいく成績は得られていない(文献5,6)。これらの原因として、損傷部に十分な力学的安定を付与する方法が無い、また元々無血管野であるため、損傷部自体が生物活性に乏しい、大きな欠損を有する損傷には元々治療法が存在しない事などが考えられる。

近年、整形外科の分野において組織工学的手法を用いた再生医療の研究が進んで来ているが、その中でもエレクトロスピニング法により作製されたバイオマテリアルに注目が集まっている。その理由として、ナノレベルの微細線維構造を有するスキャフォールドの作製が可能であり、また線維に一定の配向性を付与する事も可能である。さらに使用する材料を複数組み合わせたり、組成を変える事で、力学強度や密度、生体内での分解速度を調節する事が可能となる(文献7)。これらの技術を利用し、我々は、十分な力学的強度ならびに生体親和性が期待出来る人工ポリマーである α -カプロラクトンを用いたエレクトロスピニングにて、一定方向に配向性を付与したナノレベルの線維構造を持つシート状のスキャフォールドを作製し、*in vitro*の系(半月板組織培養)にて、半月板主コラーゲン線維の修復に対する有用性を示した(文献8)。この系では、半月板内を円周状に走行する線維が最も力学的に重要である事に注目し、作製したスキャフォールドの線維方向を半月板主線維と同じ方向に移植・補強する事で、力学的安定が得られる事を証明した。さらにスキャフォールドへの細胞播種により、損傷部の修復を促し、半月板細胞外マトリックスの産生の増加も見られた事から、損傷部への生物活性の向上も示された。以上より従来は治癒困難であった半月板損傷に対する有用性が可能性が示された。

2. 研究の目的

これまでに得られたの*in vitro*の結果を元に、家兎半月板損傷モデルを用い、エレクトロスピニング法により作製されたナノファイバースキャフォールドを移植し、*in vivo*の系において、新たな半月板治療となり得るかを検証する。さらに、今後の臨床応用も踏まえ、前臨床試験として大動物(ミニブタ)を用いた実験系においても、本スキャフォールドの有用性を検証し、手術手技を確立することで、将来的に新たな半月板再生治療を目指す。本手法により従来は治療困難であった半月板損傷に対し、新たな治療法の開発が期待されるのみならず、半月板損傷による変形性関節症の予防も期待される。

3. 研究の方法

(1)家兎半月板損傷モデルを用いた検証

スキャフォールドは、エレクトロスピニング法にて α -カプロラクトン及びポリエチレンオキサイドをハイブリッドさせ作成した。スキャフォールド内部の線維方向を一定の方向になるよう作成し、線維の直径が数100nmであることを確認した。さらに作成したスキャフォールドをPBSに浸水させ、ポリエチレンオキサイドを除去し、スキャフォールドのporosityを調節した。本手法により、スキャフォールドの力学強度を維持しつつ、細胞接着能、播種効率の向上を認めた(文献8)。

細胞は膝関節内の滑膜組織より間葉系幹細胞を採取し、3~5回程度継代したものをを用いた。当初、細胞播種法として細胞懸濁液をスキャフォールド上に乗せ、24時間インキュベーターで培養したものをを用いたが、*in vitro*での解析で、細胞接着率が低く、播種効率が悪かったため、我々が独自に開発した間葉系幹細胞由来人工組織(高密度培養にて、培養細胞よりマトリックスの産生を促し、シート状の細胞・マトリックス複合体を作成したもの)を作成、スキャフォールドへ被覆したものをを用いた。これにより細胞播種効率が高まった(文献9)。

骨成熟した家兎を麻酔下に膝関節切開し、内側半月板前節へ5mm幅の横断裂欠損を作成した。コントロール群は、未治療とし、閉創した。スキャフォールド群は、損傷部を半月板のHoop線維方向とスキャフォールドの線維方向が一致するよう、被覆・縫合固定とした。細胞・スキャフォールド群は、滑膜由来間葉系幹細胞より作成した前述人工組織をスキャフォールド表面に貼付し、スキャフォールド群と同様に損傷部へ被覆・縫合固定した。術後、1, 2, 3ヶ月で肉眼的、

組織学的解析を行った。

(2)ミニブタ半月板損傷モデルを用いた検証

ミニブタ半月板欠損モデルは、家兎と同様に内側半月板前節に幅を持たせた短冊状の欠損(横断裂)を作成した。Preliminaryの評価にて、本欠損モデルでは、半月損傷部の自然修復能が生じたため、欠損断端を(関節軟骨を傷つけないように)1秒程度焼灼処置を行うことで、欠損部の自然修復が生じないことが確認された。未治療のものをコントロール群とした。その他の群としては、スキャフォールド群、細胞・スキャフォールド群の合計3群用意した。コントロール群は、横断裂を作製した後に閉創とした。スキャフォールド群は、横断裂に対し、スキャフォールドの線維方向と半月板線維方向を一致させ、被覆・縫合した。細胞・スキャフォールド群は、滑膜間葉系幹細胞由来人工組織をスキャフォールドに貼付、スキャフォールド群と同様に横断裂を被覆・縫合固定した。当初、半月縫合群の用意を予定していたが、一部で半月板損傷部の断端同士を接着させ縫合するのが困難であったため(縫合糸が過緊張になる例、接着のために、周囲のリリースを要する例など認めた)、同様の条件下での評価は困難であると判断し、評価からは除外とした。術後は、飼育ケージ内で運動制限は行わず飼育した。各群の飼育期間は、4ヶ月とし、肉眼的、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1)家兎半月板損傷モデルを用いた検証

コントロール群、スキャフォールド群では、関節軟骨の変性が促進したが、一方で、細胞・スキャフォールド群では、術後3ヶ月まで関節軟骨保護作用がみられ、また修復半月板は半月板様組織で修復されていた。以上より、家兎膝関節内側半月板欠損モデルにて、細胞を播種した本スキャフォールドの有用性を示した。

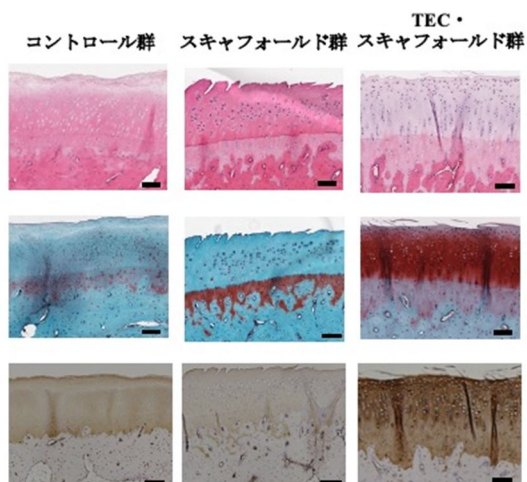


術後3ヶ月の修復半月板

細胞(TEC)・スキャフォールド群では、半月板修復が見られる

TEC: 間葉系幹細胞由来三次元人工組織

文献9より引用・一部改編



術後3ヶ月の隣接する関節軟骨(大腿骨内顆)の組織像

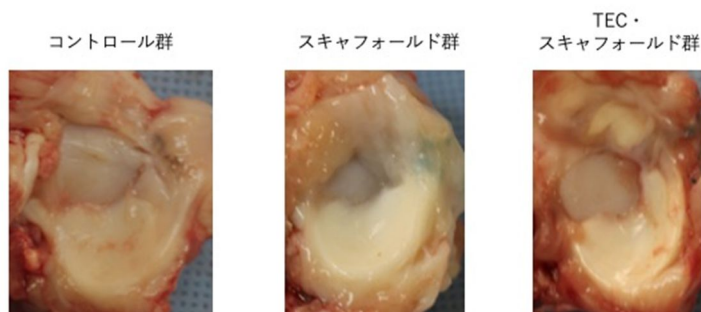
H&E染色(上段)、サフラニンO染色(中央)、2型コラーゲン免疫染色(下段)、Bar = 100 μm

細胞(TEC)・スキャフォールド群では、軟骨保護作用が見られる

文献9より引用・一部改編

(2)ミニブタ半月板損傷モデルを用いた検証

コントロール群では、関節軟骨の変性が促進したが、一方で、スキャフォールド群、細胞・スキャフォールド群では、術後4ヶ月まで関節軟骨保護作用がみられ、また修復半月板は半月板様組織で修復されていた。



術後4ヶ月の修復半月板

コントロール群では、欠損部の修復は認めないが、スキャフォールド群、細胞(TEC)・スキャフォールド群では、半月板の修復を認める

以上の結果より、今回用いたナノファイバースキャフォールドは、間葉系幹細胞と組み合わせることで、半月板修復を促し、隣接する関節軟骨の保護作用を示した。本手法は、従来治療困難であった半月板損傷に対する新たな治療法となる可能性が期待される。また半月板修復により、変形性関節症患者の発生頻度を抑えることも期待され、現在国内に限っても10万症例ある人工関節手術を大幅に減少させる可能性がある。人工関節手術は非常に高額な医療費を要し、今後高齢化社会を迎えるに当たり更なる医療費の高騰が予想されるため、医療費の低減に結びつくことは社会的にも重要な意義があると考えられる。

<引用文献>

- (1) McDermott ID, et al. J Bone Joint Surg Br 2006;88:1549-56.
- (2) Arnoczky SP, et al. Am J Sports Med 1982;10:90-5.
- (3) Fox, A.J., et al. Sports Health 2012; 4: 340-51.
- (4) Choi, N.H., et al. Am J Sports Med 2010; 38: 2472-6.
- (5) Maher SA, et al. Arthroscopy 2010;26:1510-9.
- (6) Zur G, et al. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2011;19:255-63.
- (7) Shimomura K, et al. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20: 468-76.
- (8) Shimomura K, et al. Tissue Eng Part A. 2015;21:2066-75.
- (9) Shimomura K, et al. Biomaterials 2019; 192:346-354.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimomura K, Rothrauff BB, Hart DA, Hamamoto S, Kobayashi M, Yoshikawa H, Tuan RS, Nakamura N.	4. 巻 192
2. 論文標題 Enhanced repair of meniscal hoop structure injuries using an aligned electrospun nanofibrous scaffold combined with a mesenchymal stem cell-derived tissue engineered construct.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 346-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2018.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimomura K, Hamamoto S, Hart DA, Yoshikawa H, Nakamura N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Meniscal repair and regeneration: Current strategies and future perspectives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Orthop Trauma	6. 最初と最後の頁 247-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcot.2018.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimomura K, Ando W, Fujie H, Hart DA, Yoshikawa H, Nakamura N.	4. 巻 5
2. 論文標題 Scaffold-free tissue engineering for injured joint surface restoration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Orthop	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40634-017-0118-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimomura K	4. 巻 2018
2. 論文標題 Establishing a new meniscus treatment with nano-level fibrous orientation scaffolds, the Japan Society for the Promotion of Science (interview article)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2018.2.50	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Krych AJ, Nakamura N	4. 巻 9
2. 論文標題 The Meniscus Tear: A Review of Stem Cell Therapies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9010092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamamoto S, Chijimatsu R, Shimomura K, Kobayashi M, Jacob G, Yano F, Saito T, Chung UI, Tanaka S, Nakamura N	4. 巻 7
2. 論文標題 Enhancement of chondrogenic differentiation supplemented by a novel small compound for chondrocyte-based tissue engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Exp Orthop	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40634-020-00228-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 下村和範, 吉川 秀樹, 中村 憲正
2. 発表標題 膝関節痛のマネジメント (シンポジウム3 「こうすれば解決!? コモンディジーズ」)
3. 学会等名 第11回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazunori Shimomura, Benjamin B. Rothrauff, David A. Hart, Shuichi Hamamoto, Masato Kobayashi, Hideki Yoshikawa, Rocky S. Tuan, Norimasa Nakamura
2. 発表標題 Enhanced Repair of Meniscal Hoop Structure Injuries Using An Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村 和範, Benjamin B. Rothrauff, David A. Hart, 濱本 秀一, 小林 雅人, 吉川 秀樹, Rocky S. Tuan, 中村 憲正
2. 発表標題 ナノレベル線維構造を有するスキャフォールドを用いた半月板フープ機能の修復
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura K, Rothrauff BB, Hart DA, Hamamoto S, Kobayashi M, Yoshikawa H, Tuan RS, Nakamura N
2. 発表標題 Enhanced Repair of Meniscal Hoop Structure Injuries Using an Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct.
3. 学会等名 International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura K, Rothrauff BB, Hart DA, Hamamoto S, Kobayashi M, Yoshikawa H, Tuan RS, Nakamura N
2. 発表標題 A novel approach to the treatment of meniscal hoop injuries using a mesenchymal stem cell-seeded electrospun nanofibrous scaffold.
3. 学会等名 International Cartilage Repair and Joint Preservation Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura K, Hamamoto S, Kobayashi M, Yoshikawa H, Nakamura N
2. 発表標題 Repair of Meniscal Hoop Function Using an Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura K, Yoshikawa H, Nakamura N
2. 発表標題 Regenerative Medicine Approaches for the Treatment of Incurable Meniscal Injuries
3. 学会等名 Japanese Orthopaedic Society of Knee, Arthroscopy and Sports Medicine (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 憲正 (Nakamura Norimasa)	大阪保健医療大学・教授	
研究協力者	ツアン ロッキー (Tuan Rocky)	ピッツバーグ大学(米国)・professor	
研究協力者	ハート デイビッド (Hart David)	カルガリー大学(カナダ)・professor	
研究協力者	ロスラーフ ベンジャミン (Rothrauff Benjamin)	ピッツバーグ大学(米国)	