

令和元年6月17日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10871

研究課題名(和文) SDF-1/CXCR4 システムを介した半月板修復機能の解明と臨床応用技術開発

研究課題名(英文) Mechanism of meniscal healing and clinical application through SDF-1/CXCR4 signaling pathway

研究代表者

箕田 行秀 (Minoda, Yukihide)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90453133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Stromal cell-derived factor 1(以下SDF-1)は、損傷組織に発現し造血幹細胞や間葉系幹細胞を誘導して組織修復を促すことが知られている。ラットの半月板切除モデルにSDF-1を関節内投与し、切除後6週で修復半月板の評価を行った。PBSを投与したコントロール群に比べ、SDF-1投与群では肉眼的評価によるPauliスコアが改善した。組織学的評価ではトルイジンブルー染色ではmetachromasiaの増加がみられ、サフランニンO染色では修復半月板がサフランニンに染まり軟骨基質に富んでいることを示した。以上からSDF-1の投与によって半月板の修復が促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半月板は血流に乏しいため損傷をきたすと治りにくい組織である。しかし損傷して半月板本来の衝撃吸収機能を失うと、関節軟骨に負荷がかかることから変形性関節症に至り、将来の膝関節痛の原因となる。このため現在は可能な限り半月板を温存するため、半月板縫合術という手術が選択されるが、その治癒能の乏しさから治療成績に限界があるのが現状である。今回はSDF-1/CXCR4系という組織修復に関わるシステムを促進させることによって、半月板の良好な修復が得られることが確認できた。これは臨床に応用すれば、半月板縫合術時の治療成績の向上に役立てられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is known to be as a chemokine vital in stem and progenitor cell recruitment for tissue repair after injury. We investigated whether intra-articular injected SDF-1 enhanced meniscal healing in rat partial meniscal defect model. The healed meniscus was evaluated 6 weeks after the resection surgery. The Pauli score by the macroscopic evaluation was improved in the SDF-1 administration group compared to the control group receiving PBS. Histological evaluation showed an increase in metachromasia with toluidine blue staining. By safranin O staining, we observed the repaired tissue surrounded by safranin O-positive extracellular matrix. It indicated that these cells seemed to undergo chondrocytic differentiation. These results suggest that intra-articular injection of SDF-1 promotes meniscal healing.

研究分野：膝関節外科

キーワード：半月板修復 再生 SDF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膝半月は、荷重に対する力学分散としての役割を担う一方で、生物学的治癒能力の低さから、一旦受傷すると修復されないため、半月板損傷後に ADL の低下をもたらす。また半月板の無血野は修復不能で半月切除を余儀なくされてきた結果、最終的に変形性膝関節症に進行することが証明されている。現在、半月板損傷に対する治療戦略は、できる限り温存する半月板縫合術が選択されている。しかしながら、長期的には半月縫合後再断裂による再手術率が 20% を超えており、さらなる技術的向上や、生物学的に治癒促進を付加する必要がある。動物実験レベルでは成長因子や幹細胞の投与によって、比較的良好な成績が報告されているが、ヒトへの臨床応用には至っていない。我々は半月板修復には血流由来細胞の関与とその大部分がマクロファージであり、同時に筋線維芽細胞も分布している事をつきとめた (Terai et al. Connect Tissue Res, 2017)。一方、様々な組織修復に骨髄からの細胞動員が確認されており、その機序は SDF-1/CXCR4 システムの関与が示されている。SDF-1/CXCR4 システムは骨髄における homing 現象を説明するものであり、最近では組織損傷時に局所の SDF1 発現上昇によって、骨髄からの細胞動員が見られ、それらの遊走細胞が組織治癒に関係する報告が散見されている。さらに局所発現には血小板の関与が示されており、半月板修復機転においても SDF-1/CXCR4 システムによって制御されている可能性が高い。その修復機転を把握することで、効率よく修復増幅させる治療あるいは修復が困難と言われる種類の半月板損傷に対して積極的温存治療が可能となり、これまでの半月板切除によって生じていた膝変形性関節症を最終的に回避できるようになると考えた。

2. 研究の目的

ラットの半月板切除モデルに SDF-1 を付加することで、SDF-1/CXCR4 系と半月板修復との関連を検証すること。

3. 研究の方法

使用動物は野生型 Lewis ラット (8 週齢、メス) を用いた。麻酔としてケタラール (50mg/mL; 第一三共社製) とキシラジン (0.2mg/mL; Bayer Health Care 社製) を 10:3 の比で 1mL/kg 体重量で皮下注を行った。片膝を内側傍膝蓋骨アプローチにて膝関節を露出させ関節包を切開し、膝蓋骨を外側に脱臼させた。内側半月板を確認し、内側側副靭帯レベルで半月板を垂直方向に切断し前方 1/2 を切除した。その後関節包を 6-0Nylon 糸で縫合した後に、SDF-1 200ng/50 μ L (Recombinant Rat SDF-1、PEPRO TECH 社) を関節内に投与し、表皮は 5-0Nylon 糸で閉創した。7 日目にも同様の方法で麻酔を行い、皮膚切開し関節包を露出させた状態で、SDF-1 を 200ng/50 μ L 関節内に投与した。閉創は 5-0Nylon 糸で行った。コントロール群は、SDF-1 投与群と同様に半月板切除時と 7 日目に PBS (50 μ L) を関節内に投与した。切除後 6 週で犠牲死させ、修復した半月板について肉眼的、組織学的検討を行った。肉眼的評価には Pauli スコアを用い、Mann-Whitney U 検定で比較検討した。切除した半月板組織を 4%パラホルムアルデヒド中で固定後、OCT コンパウンドに包埋し -80 で凍結させ、クリオスタットにて半月板を放射状に切離し厚さ 5 μ m の凍結切片標本を作成した。組織学的評価はトルイジ

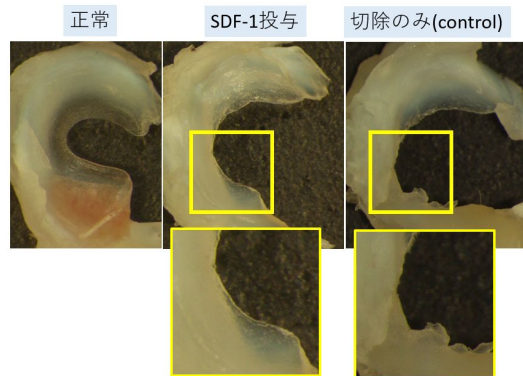
ンブルー染色とサフラニン 0 染色にて検討した。

4 . 研究成果

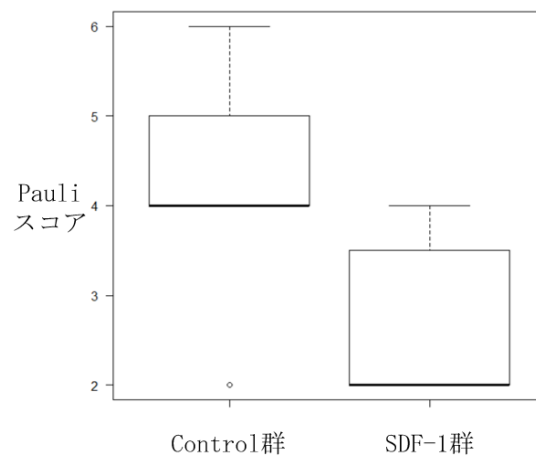
(1) 再生半月の肉眼的評価

実体顕微鏡にて撮影した切除後 6 週での肉眼所見を示す【Fig.1】。SDF-1 群において white-zone まで再生半月が見られた。Pauli スコアは SDF-1 投与群で 2.71、コントロール群で 4.22 であり、SDF-1 投与群で有意に再生していた ($p=0.018$)【Fig2】。

【Fig1】



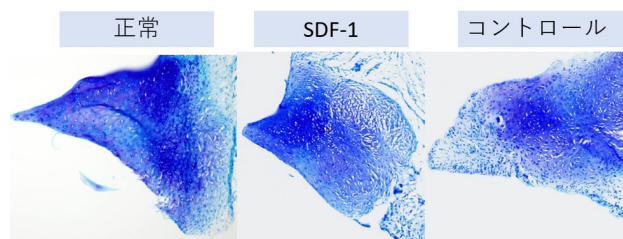
【Fig2】

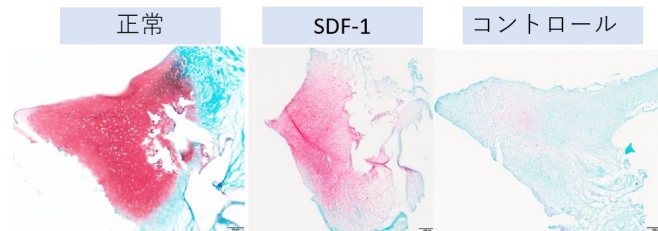


(2) 組織学的評価

トルイジンブルー染色では SDF-1 群で metachromasia を認め、再生半月は軟骨基質に富んでいることが示唆された【Fig3】。サフラニン 0 染色でも同様に、SDF-1 群においてサフラニン 0 に染まる部位が多くみられ、再生半月は軟骨基質に富んでいることが示唆された【Fig4】。

【Fig3】





【Fig4】

<考察>

半月板は解剖学的に辺縁 1/3 が血流に富み、中央 1/3 が無血行野となっている (Arnoczky and Warren et al. AJSM, 1982) ため、損傷時には治癒能に乏しい。半月板治癒促進のために、様々な半月板や軟骨など組織由来の細胞を用いた報告がなされてきた (Nakata et al. 2001, Marsano et al. 2007)。特に間葉系幹細胞 (MSC) の投与により半月板の良好な修復を得たという報告は多数みられる。(Horie et al. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. Ozeki et al. Stem Cells, 2015)

様々な組織修復に SDF-1/CXCR4 システムの関与が確認されており、歯周組織欠損時や腎障害後、靭帯損傷後に SDF-1 が上昇 (Kimura et al. *frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2014、Wan et al. *PLOS ONE*, 2014、Shimode et al. *Tissue Engineering*, 2009) したことや、骨折後の治癒を促進した (Liu et al. *PLOS ONE*, 2013) などの報告がみられる。MSC にもその受容体である CXCR4 が発現しており、SDF-1 が MSC を遊走させる可能性が示唆されている。(Wynn et al. *Blood*, 2004. Schantz et al. *Tissue Engineering*, 2007.) そこで半月板損傷時に SDF-1 を投与することで MSC を遊走させられれば、MSC を投与した過去の報告と同様に半月板の修復が促進されるのではと仮定した。結果は SDF-1 投与によって、軟骨基質に富んだ良好な半月板の修復を得ることが出来た。

一方我々は過去に半月板修復に末梢血、中でもマクロファージが関与していることを報告してきた。SDF-1 は血管新生にも作用 (Zraggen et al. *PLOS ONE*, 2014) し、マクロファージを関節内に遊走させる (Blades et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2002) ことも示されている。

本研究では関節内に SDF-1 を投与することによって、半月板の良好な修復を確認することが出来たが、骨髄内の MSC、造血幹細胞、線維芽細胞など、具体的にどのような細胞が遊走しどの程度治癒に関与したかについては明らかでなく、今後検証が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Ueyama H, Minoda Y, Sugama R, Ohta Y, Yamamura K, Nakamura S, Takemura S, Nakamura H. Two-dimensional measurement misidentifies alignment outliers in total knee arthroplasty: a comparison of two- and three-dimensional measurements. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2019 May;27(5):1497-1503. (査読あり)

Ueyama H, Minoda Y, Sugama R, Ohta Y, Yamamura K, Nakamura S, Takemura S, Nakamura H. An accelerometer-based portable navigation system improved prosthetic alignment after total knee arthroplasty in 3D measurements. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2019 May;27(5):1580-1586. (査読あり)

Iwakiri K, Ohta Y, Minoda Y, Kobayashi A, Nakamura H. Effect of periarticular morphine injection for total hip arthroplasty: a randomised, double-blind trial. *Hip Int.* 2019 May;29(3):245-252. (査読あり)

Nishino K, Hashimoto Y, Nishida Y, Terai, Takahashi S, Yamasaki S, Nakamura H. Incidence and Risk Factors for Meniscal Cyst After Meniscal Repair. *Arthroscopy.* 2019 Apr;35(4):1222-1229 (査読あり)

Kishimura Y, Minoda Y, Mizokawa S, Sugama R, Ohta Y, Nakamura H. Cup alignment in total hip arthroplasty using the muscle-sparing modified Watson-Jones approach-comparison between lateral and supine positions. *Int Orthop.* 2019 Mar 6. doi:10.1007/s00264-019-04316-y. [Epub ahead of print] (査読あり)

Matsui Y, Matsuura M, Minoda Y, Nakagawa S, Okajima Y, Kobayashi A, Inori F. Intraoperative manipulation for flexion contracture during total knee arthroplasty. *J Orthop Surg.* 2019 Jan-Apr;27(1) (査読あり)

Tomihara T, Hashimoto Y, Taniuchi M, Takigami J, Takahashi S, Nishida Y, Shimada N. Shallow knee flexion angle during femoral tunnel creation using modified transtibial technique can reduce femoral graft bending angle in ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2019 Feb;27(2):618-625. (査読あり)

Sawa M, Wakitani S, Kamei N, Kotaka S, Adachi N, Ochi M. Local administration of WP9QY (W9) peptide promotes bone formation in a rat femur delayed-union model. *J Bone Miner Metab.* 2018 Jul;36(4):383-391. (査読あり)

Takigami J, Hashimoto Y, Tomihara T, Yamasaki S, Tamai K, Kondo K, Nakamura H. Predictive factors for osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle concurrent with a discoid lateral meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2018 Mar;26(3):799-805. (査読あり)

Tsujii A, Hiramatsu K, Shimomura K, Kobayashi M, Mera H, Wakitani S, Nakamura N, Horibe S, Mitsuoka T. Long-term results of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for cartilage defects in the patella: Two case reports with more than 18 years of follow-up. *J Orthop Sci.* 2018 Feb 14. pii: S0949-2658(18)30036-8 (査読あり)

Matsuura T, Hashimoto Y, Nishino K, Nishida Y, Takahashi S, Shimada N. Comparison of Clinical and Radiographic Outcomes Between Central and Lateral Lesions After Osteochondral Autograft Transplantation for Osteochondritis Dissecans of the Humeral Capitellum. *Am J Sports Med.* 2017 Dec;45(14):3331-3339. (査読あり)

Terai S, Hashimoto Y, Orita K, Yamasaki S, Takigami J, Shinkuma T, Teraoka T, Nishida Y, Takahashi M, Nakamura H. The origin and distribution of CD68, CD163, and SMA⁺ cells in the early phase after meniscal resection in a parabiotic rat model. *Connect Tissue Res.* 2017 Nov;58(6):562-572. (査読あり)

Tomihara T, Hashimoto Y, Taniuchi M, Takigami J, Han C, Shimada N. One-stage revision ACL reconstruction after primary ACL double bundle reconstruction: is bone-patella tendon-bone autograft reliable? Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2017 May;25(5):1653-1661. (査読あり)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Takigami J, Terai S, Takahashi S, Nakamura H. Risk Factors Associated With Knee Joint Degeneration After Arthroscopic Reshaping for Juvenile Discoid Lateral Meniscus. Am J Sports Med. 2017 Mar;45(3):570-577. (査読あり)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Takigami J, Terai S, Takahashi M, Wakitani S, Nakamura H. Circulating nucleated peripheral blood cells contribute to early-phase meniscal healing. J Tissue Eng Regen Med. 2017 Mar;11(3):609-617. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 橋本 祐介

ローマ字氏名： (HASHIMOTO, Yusuke)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号；10382178

研究分担者氏名： 脇谷 滋之

ローマ字氏名： (WAKITANI, Shigeyuki)

所属研究機関名：武庫川女子スポーツ大学

部局名：スポーツ健康科学部

職名：教授

研究者番号；70243243

研究分担者氏名： 折田(荻) 久美

ローマ字氏名： (ORITA, Kumi)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：博士研究員

研究者番号；40748597