

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10891

研究課題名(和文)自家腱と滑膜幹細胞を用いた半月板再生：マイクロミニピッグによる前臨床試験

研究課題名(英文) Meniscus regeneration by autologous tendon with synovial mesenchymal stem cells -experiments using microminipig

研究代表者

大関 信武 (Ozeki, Nobutake)

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト助教

研究者番号：10755359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BMP-2を添加した軟骨分化培地で腱を培養すると、滑膜幹細胞の有無に関わらず腱実質の細胞が軟骨様細胞に変化し、軟骨分化に影響する遺伝子発現も上昇した。半月板欠損に伴い生じる半月板逸脱に対して行われる半月板内方化術のバイオメカニクスについてブタ膝を用いて30度、45度、60度、90度の角度で検証し、いずれの場合も半月板逸脱で悪化した荷重分散が改善された。半月板欠損部への腱移植においても、45度および90度で荷重分散機能を再獲得できた。マイクロミニピッグに半月板損傷モデルにおいて、3次元構築するためのMRIの撮像条件を確立し、臨床で有用となる半月板の評価方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で有症状者800万人を超える変形性膝関節症の病態における半月板の役割は重要であり、半月板損傷に対する一般的な治療である半月板切除術が行われた場合に生じる半月板欠損部に対する治療はない。本研究において、腱に軟骨細胞を誘導することができ、また移植時の生体力学的検証でも半月板として機能することを証明できたことは、半月板の代用材料として自家腱を用いる実現性を示すことになった。また、臨床ではMRIが非侵襲評価法として用いられるが、3次元画像を構築して半月板の構造を評価する方法を確立できたことは、半月板に対する治療の是非を検証するうえでも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：When we culture rat tendons with bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), the tendon differentiated into cartilage-like tissue 1 week after the culture and we could observe chondrocyte within the tendon. This change was observed regardless of coculture with synovial mesenchymal stem cells, therefore, the original tendon cells possibly transdifferentiated into chondrocytes by BMP-2. We confirmed the biomechanical usefulness of load distribution of centralization technique for meniscus extrusion and tendon transplantation for meniscus defect which caused knee osteoarthritis using pig model with knee flexion angle 30, 45, 60, and 90 degrees. Lastly, we established the evidence for reconstruction of three dimensional image of MRI to evaluate the meniscus condition for clinical use. The meniscus injury was easily evaluated with 3D reconstructed MRI quantitatively and also T2 mapping qualitatively.

研究分野：整形外科

キーワード：半月板 バイオメカニクス 腱 軟骨

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

1. 研究開始当初の背景

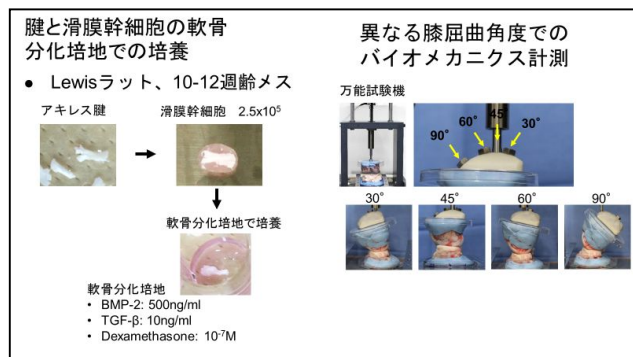
変形性膝関節症の本邦における有症状者は約 800 万人と推定され、要介護の原因の約 10% を占める。軟骨や半月板の再生医療が加速し、変形性関節症を予防できれば、高齢化社会における健康寿命の延伸につながり、その意義は大きい。われわれは、軟骨や半月板再生の細胞源として滑膜幹細胞に着目し増殖能や軟骨分化能に優れていることを *in vitro* および *In vivo* モデルで証明し、滑膜幹細胞の局所投与により軟骨再生や半月板損傷の治癒促進に有効であることを証明した。また、より早期から正常と同等サイズの半月板再生を得るための足場素材として、半月板と同様のコラーゲン配列を持つ自家腱に着目し、ラット半月板欠損モデルでその有用性を報告した。本研究の目的は、腱を *ex vivo* で軟骨分化培地や滑膜幹細胞と培養してより半月板に近いスキャフォールドとして移植することをバイオメカクスの検証を含めて行うことである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、現状では対処法のない半月板欠損部の治療法として、半月板の足場に自家腱を用いた移植術の有用性を、組織学的および生体力学的に検討し、マイクロミニピッグモデル膝を用いて本法の臨床応用に至るエビデンスを構築することである。

3. 研究の方法

腱を軟骨分化培地および滑膜幹細胞 1.0×10^6 個を用いて異なる 4 つの条件で軟骨分化が生じるかどうかを検討した。軟骨分化培地には臨床でも応用されている BMP-2 を添加した。評価はサフラニン 0 による組織学所見、Type I collagen の免疫組織染色、PCR とした。サフラニン 0 による組織学所見については、0-3 point でスコアリングした。



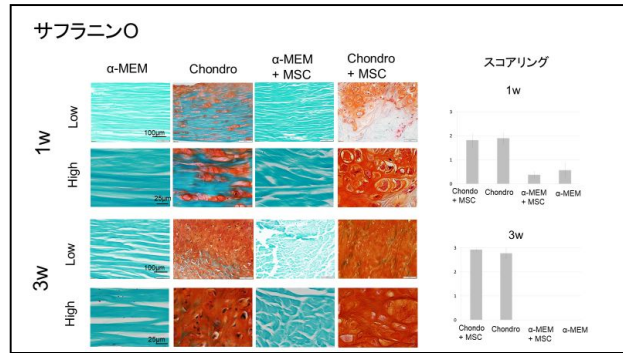
また、ブタ膝を用いて行う荷重分散に関するバイオメカクスの検討を、歩行時にさまざまな角度で荷重が加わることを考慮して30度、45度、60度、90度の条件において行った。モデルは半月板欠損において伴う半月板逸脱を作成し、内方化術の効果を検証した。また、半月板欠損部への腱移植の検討では、0度、90度の条件で行った。ブタ膝はセメントを用いて万能試験機に取り付け、大腿骨側より脛骨側に200Nの荷重をかけ、圧力分散計測システムを用いて計測した。半月板の評価は臨床において、MRIで行われるが、3D MRI画像を再構築することで、より半月板の状態や形態を把握することができる。マイクロミニピッグの膝を用いて3次元構築するためのMRI撮像の最適条件を検証し、3D MRI画像と組織学所見を対比させた。

4. 研究成果

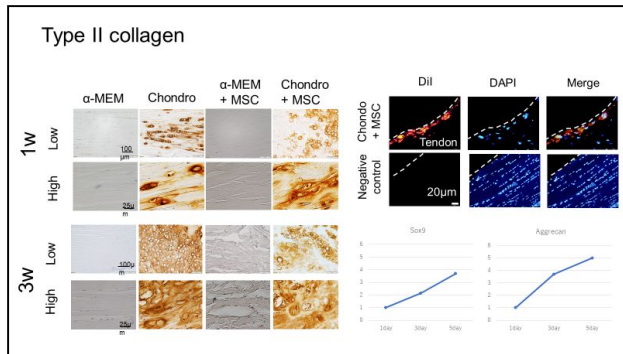
BMP-2を添加した軟骨分化培地で1週間腱を培養すると、腱の周囲を中心としたサフラニン0でよく染色される組織となり、この領域には軟骨様細胞を認めた。この変化は、滑膜幹細胞の有無に関わらず認められた。そのため、生着した細胞が軟骨細胞に分化し、軟骨基質を産生しているのではなく、腱実質の細胞が軟骨分化を生じたと考えられた。ま

た、3週間培養すると、サフラニンOの染色性は腱全体に広がり、より多くの軟骨基質を産生した。コラーゲン線維の配向が乱れることによりその形態を維持できず、移植に耐える組織でなくなるケースも散見された。

一方、通常培地で培養すると、滑膜幹細胞の有無に関わらずサフラニンOの染色性は上昇はなく、軟骨様細胞も認めておらず、軟骨分化培地で培養する群が有意に軟骨スコアが高かった。また、type II collagenの免疫組織染色を行うと、軟骨分化培地で培養した群で有意に発現が上昇していた。また、DiIでラベルした滑膜幹細胞を追跡したところ、腱周囲に生着することが確認できたが、腱の内部にmigrateしていなかった。PCRではType IIコラーゲンのほか、グリコサミノグリカン、SOX-9など軟骨分化に影響する遺伝子発現が上昇した。これらのことから、自家腱

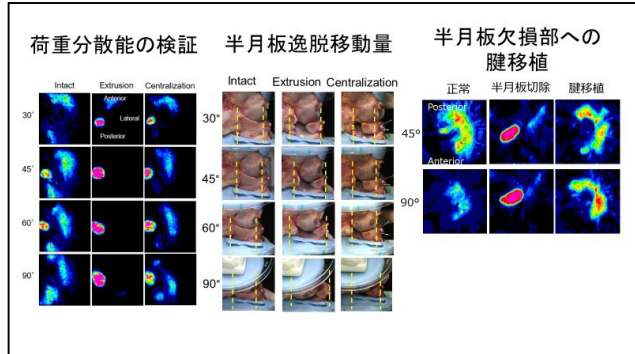


にBMPを投与して培養すると、滑膜幹細胞の有無に関わらず、腱に内在する腱細胞がBMP-2の作用により軟骨分化を起こしたと考えられた。



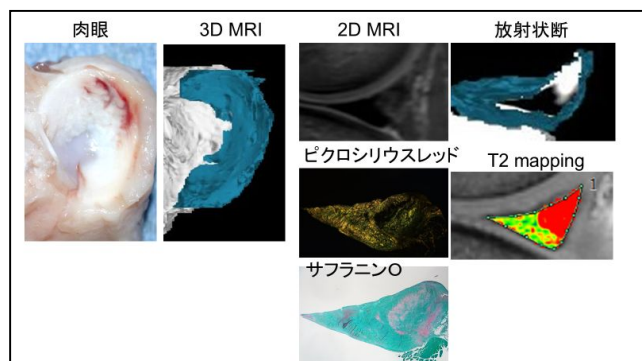
半月板欠損は半月板切除を受けた後に生じていることが一般的であり、その際半月板の位置異常である半月板逸脱が生じている。半月板逸脱に対しては逸脱した半月板をアンカーを用いて内方化させる手術が行われる。本手技のバイオメカニクスの検討を30度、45度、60度、90度の角度において行くと、いずれの場合も半月板逸脱により半月板の移動距離は増大し、半月板の内方化を行うことで半月板逸脱を改善させ、半月板の荷重分散機能も改善することが証明された。

また、荷重圧に関しても、半月板逸脱により半月板に加わる圧が低下し、脛骨プラトーに荷重圧が集中してしまうが、内方化により再び正常に近い荷重分散能を再獲得できることが実証された。半月板移植時には、半月板の内方化術を併用することが、より正常に近い半月板をつくる鍵になると考えられた。また、ピッグ半月板に腱の移植を行ったバイオメカニクスの検討では、有意に半月板切除部が被覆されることで、正常に近い荷重分散機能を再獲得できることが45度のみでなく90度における検討においても検証された。



また、ピッグ半月板に腱の移植を行ったバイオメカニクスの検討では、有意に半月板切除部が被覆されることで、正常に近い荷重分散機能を再獲得できることが45度のみでなく90度における検討においても検証された。

マイクロナニニピッグに半月板損傷を作成すると、2週後に同部は滑膜様組織で一部被覆されたが、3D MRI



を構築して放射状断を再構成すると、半月板内部に高輝度像を認め、半月板として十分な機能をもっているとはいえなかった。また、T2 mapping で同部は T2 の高値を認め、質的にも不良であることがサフラニン O でも示唆された。これらの結果から、現状では対処法のない半月板欠損部の治療法として、半月板の足場に自家腱を用いた移植術の有用性を、組織学的および生体力学的に検討し、本法の臨床応用に至るエビデンスを構築することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Ozeki N, Koga H, Matsuda J, Kohno Y, Mizuno M, Katano H, Tsuji K, Saito T, Muneta T, Sekiya I. Biomechanical analysis of the centralization procedure for extruded lateral menisci with posterior root deficiency in a porcine model. J Orthop Sci. 査読あり in press 2019 年, in press. 10.1016/j.jos.2019.02.015

Mizuno M, Katano H, Mabuchi Y, Ogata Y, Ichinose S, Fujii S, Otabe K, Komori K, Ozeki N, Koga H, Tsuji K, Akazawa C, Muneta T, Sekiya I. Specific markers and properties of synovial mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. Stem Cell Res Ther. 査読あり 23, 2018 年, 676-681. 10.1186/s13287-018-0870-9.

Katano H, Koga H, Ozeki N, Otabe K, Mitsuru M, Tomita M, Muneta T, Sekiya I. Trends in isolated meniscus repair and meniscectomy in Japan, 2011-2016. J Orthop Sci. 査読あり 23, 2018 年, 676-681. 10.1016/j.jos.2018.04.003.

Sasaki A, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Tsuji K, Koga H, Mochizuki M, Sekiya I. Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow. PLoS ONE. 査読あり 13, 2018 年, e0202922. 10.1371/journal.pone.0202922.

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Koga H, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Sekiya I. Comparison of mesenchymal stem cells obtained by suspended culture of synovium from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. BMC Musculoskelet Disord. 査読あり 19, 2018 年, 78. 10.1186/s12891-018-1998-6.

Ozeki N, Muneta T, Kawabata K, Koga H, Nakagawa Y, Saito R, Udo M, Yanagisawa K, Ohara T, Mochizuki T, Tsuji K, Saito T, Sekiya I. Centralization of extruded medial meniscus delays cartilage degeneration in rats. J Orthop Sci 査読あり 22, 2017 年, 542-548. 10.1016/j.jos.2017.01.024

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Komori K, Fujii S, Otabe K, Horie M, Koga H, Tsuji K, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Muneta T, Sekiya I. Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Stem Cell Res Ther 査読あり 8, 2017 年, 115-115. 10.1186/s13287-017-0572-8

Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Kohno, Fujii S, Ozeki N, Horie M, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Sekiya I. Complete human serum maintains viability and chondrogenic potential of human synovial stem cells: suitable conditions for transplantation. Stem Cell Res Ther 査読あり 8, 2017 年, 144-144,

10.1186/s13287-017-0596-0

大関 信武, 宗田 大, 齋藤 知行, 関矢 一郎. 滑膜間葉系幹細胞の定期的関節内投与は変形性膝関節症の進行を抑制する. 再生医療 査読無 16, 2017年, 241-248. DOIなし

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Koga H, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Sekiya I. Comparison of mesenchymal stem cells obtained by suspended culture of synovium from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. BMC Musculoskelet Disord 査読あり 19, 2018年 78

Ozeki N, Koga H, Sekiya I. Transplantation of synovial mesenchymal stem cells for cartilage and meniscus regeneration. Clin Calcium 査読あり 28, 2018年, 319-327. CliCa1803319327

大関 信武, 関矢 一郎. 早期変形性膝関節症の概念. Bone Joint Nerve 査読なし 6, 2016年. 473-479. DOIなし

大関 信武, 関矢 一郎. 変形性膝関節症に対する幹細胞の関節内投与 ラットモデルでの解析. Bone Joint Nerve 査読なし 6, 2016年, 579-588. DOIなし

[学会発表](計 11件)

大関 信武. マイクロミニピッグ半月板変性断裂モデルにおいて滑膜幹細胞投与は滑膜被覆による癒合を促進する. 第33回日本整形外科学会基礎学術集会. 2018年

Ozeki N. Three-Dimensional MRI, T2 Mapping and Histological Analyses of Meniscus Repair After Transplantation of Synovial Mesenchymal Stem Cells in a Novel Degenerative Meniscus Injury Model in Pig. Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting. (国際学会) 2018年

大関 信武. 三次元MRI画像による半月板高輝度像の解析 マイクロミニピッグ半月板変性モデル・滑膜幹細胞投与での解析. 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 2018年

大関 信武. 半月板逸脱に対する Centralization 法の生体力学的解析. 第9回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017年

大関 信武. 早期変形性膝関節症の診断 どれくらい早期に診断できるのか 早期変形性膝関節症の概念. 第9回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2017年

大関 信武. マイクロミニピッグ半月板損傷モデルにおける滑膜幹細胞関節内投与の効果: 三次元MRI解析を用いた半月板の評価. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017年

越智 美晴, 大関 信武. 軟骨分化誘導させた滑膜幹細胞/腱複合体による半月板再建 第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017年

Ochi M, Ozeki N. Effects of synovial stem cells and BMP-2 on cartilage formation of tendon. Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会) 2018年

大関信武. 半月板欠損部に対する自家腱による半月板再建術の荷重分散におけるバイオメカニクス. 日本臨床バイオメカニクス学会 2016年

大関信武. 半月板付着部の損傷に対する修復術の効果. 日本整形外科基礎学術集会 2016年

大関信武. 半月板逸脱に対する Centralization 法のバイオメカニクス評価. 日本整形外科学会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者なし

(2) 研究協力者なし