

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10978

研究課題名(和文) 軟骨形成能に着目した副甲状腺ホルモンを用いた半月板再建術の開発

研究課題名(英文) meniscal reconstruction using PTH induced chondrogenesis

研究代表者

橋本 祐介 (Hashimoto, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10382178

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)：膝半月板切除後の関節症に対して本邦では自家移植腱を用いた再建術が行われているが、成績は安定しておらず、原因として腱と半月板の組織相違が考えられる。今回の研究は、副甲状腺ホルモン(PTH)を使用した組織再現による半月板再建術の開発することである。ラットアキレス腱にPTHを注入し、処置後4週の組織を確認したところ、腱内に軟骨様細胞が見られ、8週の組織では骨化は見られなかった。つまり、PTHは腱内で軟骨化を誘導するが、骨化は誘導しないことが分かった。次にPTH注入したラットアキレス腱を半月板部分欠損モデルの半月板欠損部分に移植した。術後4、8週での移植部分は半月板に類似した組織で充填されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、移植腱にPTHが作用し軟骨基質の産生が引き起こされ、PTH処理を行った半月板移植モデルにおいても、形態の維持だけでなく軟骨基質の産生も同時に確認され組織的にも正常半月板組織に近い状態になっている事がわかった。このことから、半月板切除後に対する自家腱を用いた移植手術においてPTH投与の有効性が明らかとなった。PTH(1-34)自体はすでに臨床応用されている薬剤であるため早期の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In our country, meniscal allograft transplantation was performed as a salvage surgery after meniscectomy. However, the clinical results were not stable, and the cause may be the difference in tissue between tendon and meniscus. This study is to develop a meniscus reconstruction by tissue regeneration using parathyroid hormone (PTH). After injecting PTH into the rat Achilles tendon and confirming the tissue 4 weeks after the treatment, chondroid cells were found in the tendon, and ossification was not observed in the tissue at 8 weeks. In other words, it was found that PTH induces chondrogenesis in the tendon but not ossification. Then, PTH-injected rat Achilles tendon was transplanted to the meniscal defect in the meniscal defect model. At 4 and 8 weeks after the operation, the transplanted part was filled with tissue similar to native meniscus.

研究分野：スポーツ整形外科

キーワード：半月板 自家腱移植 副甲状腺ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膝半月は、荷重に対する力学分散としての役割を担う。その生物学的治癒能力の低さから、半月板が損傷を受けた場合、特に無血管野の損傷については半月切除を余儀なくされてきた。その結果、高率に変形性膝関節症への移行することが報告されている。したがって、半月板切除後の補填材料の開発が喫緊の課題である。半月板の置換手段として本邦では自家腱の移植術が行われているが、その臨床成績は決して芳しくない。その一因は、自家腱が type1 コラーゲンでのみ構成され、軟骨基質が含まれていないことである。我々は以前、腱に rhBMP を注入し関節内の半月板欠損部に移植することにより、半月板再生を成功させたが、BMP は骨誘導が強く、移植腱の一部が骨化する現象も同時にみられた(文献1)

(2) そこで我々は副甲状腺ホルモン(PTH)に着目した。PTH(1-34)は骨形成能がある事で、骨粗鬆症薬として注目されているが、軟骨細胞や未分化間葉系細胞に対しては PTHrP と同様の作用、つまり肥大化軟骨分化から骨分化へ誘導させるのではなく、軟骨細胞のまま維持させる働きがある事が報告されている(文献2)。このことから、腱細胞あるいは腱内の未分化間葉系細胞に対して、PTH を投与することで、軟骨分化維持させ、半月板様組織が得られると考えた。すでに我々は前実験にて、ラットの腱における PTH receptor の存在を PCR 法で確認した。さらにラットアキレス腱に PTH を注入すると、4 週の組織像ではトルイジンブルー染色で異染性が認められ、軟骨基質が産生されていることを確認した。一方 8 週後の単純 X 線で石灰化、骨化が認められなかった。つまり、PTH は腱の軟骨化を導き、骨化誘導しない、半月板再生のための理想的な活性物質と考えた。以上の結果から、本研究では半月板切除後補填材料として、PTH 注入腱を応用した半月板再生技術の開発を動物実験レベルで実証し、医師主導型臨床研究への足掛かりにする計画である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腱組織に副甲状腺ホルモンを注入し、半月板切除部位へ移植することで、その有効性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) In vitro

野生型 Lewis ラット(8-10 週齢、オス)12 匹よりアキレス腱を採取、PBS wash 後 1mm 角にカットしコラーゲナーゼ処理を行い、培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium + Fetal bovine serum + penicillin/streptomycin)で培養、接着した細胞を腱細胞として用いる。1 回継代ののちに 12 well plate に 1×10^5 /well の濃度で播種し、PTH(1-34)を 0, 1, 5, 10nM/ml の濃度で 3 群に分けて添加する。過去の報告では間欠的投与によって骨分化、1 回投与によって軟骨分化を促進する報告があることから、1 回投与とする。培地は 2 日毎に交換し 10 日後にプレートのアルシアンブルー染色により軟骨基質の発現を評価する。

(2) In vivo

使用動物は野生型 Lewis ラット(8 週齢、オス)を用いた。麻酔としてケタラル(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 体重で皮下注を行った。左アキレス腱を剖出し近位部を 5-0 nylon で結紮し薬液の漏出を防ぎ、遠位付着部付近より PTH90mg/15 μ l を注入した。術後 4 週、8 週で犠牲死させ、アキレス腱組織を評価した。

右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。前述の操作で同一個体の左アキレス腱に PTH90mg/15 μ l を注入し、摘出したものを移植腱とし、半月板切除部位に 6-0 nylon で縫着、半月板再建モデルとした。術後 4 週、8 週で犠牲死させ、組織評価を行った。

切除したアキレス腱・半月板組織を 4%パラホルムアルデヒド中で固定後、パラフィンに包埋し、厚さ 5 μ m の切片標本を作成した。組織学的評価は HE 染色、トルイジンブルー染色免疫染色(collagen type 2)にて検討した。

4. 研究成果

(1) 腱細胞のあるシアンブルー染色では PTH 5nM を投与したプレートにおいて異染性を認めた(図 1)。

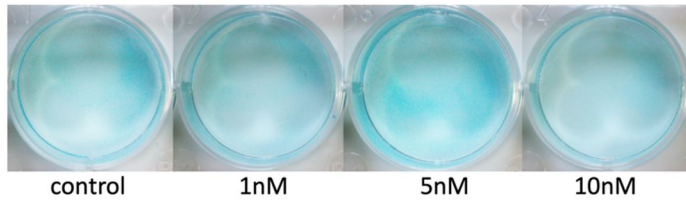


図1: 腱細胞のアルシアンブルー染色

(2) アキレス腱の組織画像を図 2 に示す。4 週、8 週モデルともに PTH 注入腱内にトルイジンブルー染色にて異染性を認め、免疫染色においても collagen type2 を認めた。

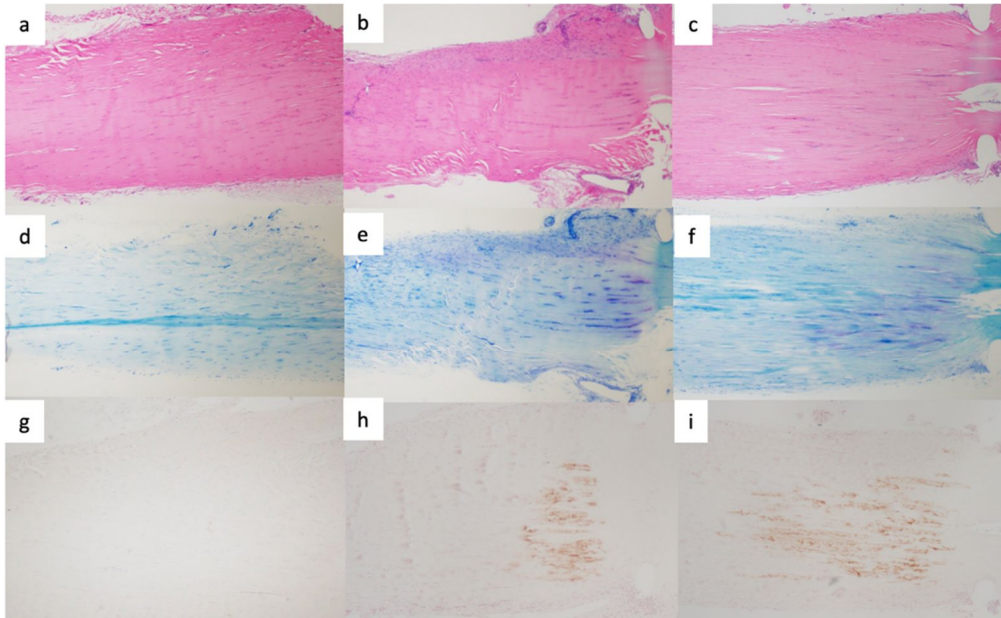


図2: アキレス腱組織(HE染色、トルイジンブルー染色、collagen type2免疫染色) control (a, d, g)、PTH 4週 (b, e, h)、PTH 8週 (c, f, i)

術後 8 週における膝関節組織の肉眼写真を図 3 に示す。移植した領域の半月板(矢印)は、Control 群に比べ PTH 群のほうが幅広く関節面を被覆できている。

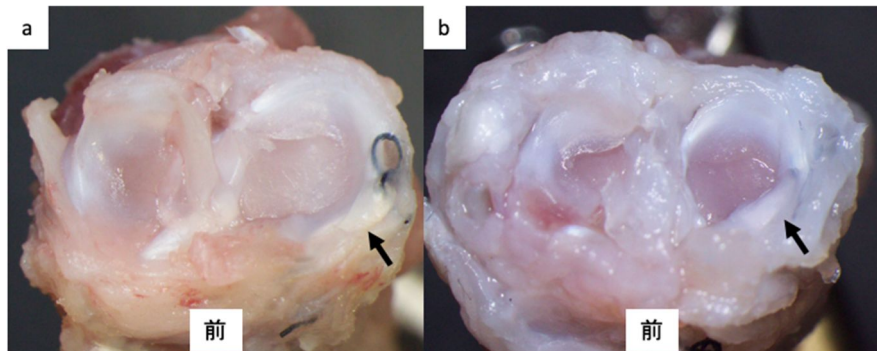


図3: マクロ写真 a; PBS control 8週、b; PTH 8週移植腱が確認できる(矢印)

組織学的所見においては、正常半月板に近い形態の半月板様組織が HE 染色で control 群、PTH 群共に認められていたが、トルイジンブルー染色では PTH 群でのみ異染性を認め、移植組織が軟骨基質に富んでいることが示唆された。(図 4)。

トルイジンブルー染色における異染性は 8 週まで維持されており、骨化を示唆する所見は認めなかった。

考察

現在の半月板損傷に対する治療は切除術が多く行われている。この方法は変形性膝関節症の発生が助長されるため、本来あるべき半月板の位置になんらかの補完を行う試みがなされている。同種移植は理想的なマテリアルだがわが国では使用困難であり、現実的には自家組織での修復を行う必要がある。自家腱移植も試みられているが、軟骨成分がないために組織学的に不十分な補填材料と考えられ、実際に臨床成績は決して芳しくない。これまで、腱内に PTH を注入する方法や、その後の半月板様組織への変化についての報告はなく本研究は非常に独創的な研究であった。PTH (1-34) は骨粗鬆症薬として市販されている生理活性物質であるが、我々の予備実験では腱細胞に PTH receptor が存在する事、腱組織に PTH を注入することで軟骨基質が分泌されること、骨化が起こらない事が判明しており、腱組織を半月板組織に置換させる理想的な生理活性物質として有用であると考えられた。本研究結果から、アキレス腱細胞自体に PTH が作用し軟

骨基質の産生が引き起こされた事、PTH 投与によりアキレス腱内に 2 型コラーゲンが産生されていた。半月板移植モデルにおいても、形態の維持だけでなく軟骨基質の産生も同時に確認され組織的にも正常半月板組織に近い状態になっている事がわかった。今後 PCR 実験によりコラーゲンの遺伝子発現を確認し、さらにはパラバイオースラットモデルを使用した動物実験によって移植腱内に産生された軟骨基質の由来を評価することにより PTH の半月板再生に対する効果をより明確にしていきたい。本研究より半月板切除後に対する自家腱を用いた移植手術において PTH 投与の有効性が明らかとなった。PTH(1-34)自体はすでに臨床応用されている薬剤であるため早期の臨床応用が期待できる。

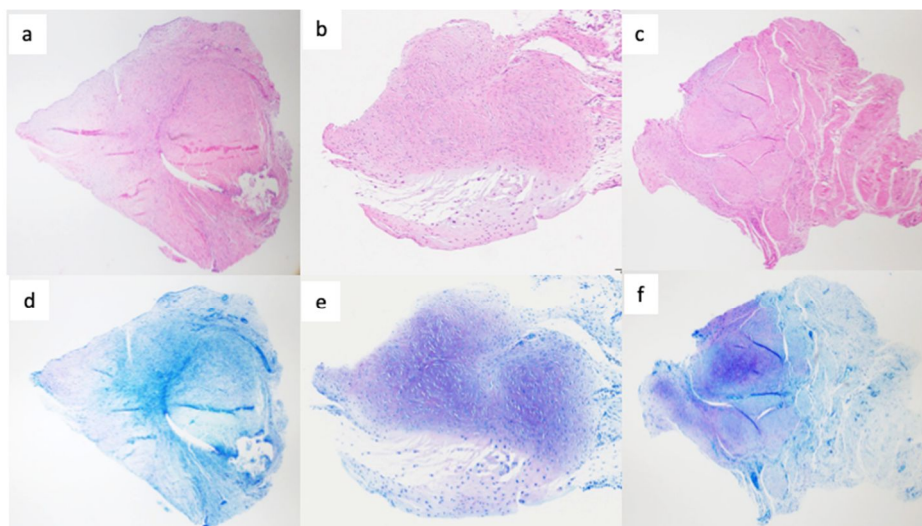


図4:半月板再建組織(HE染色、トルイジンブルー染色)
control (a, d)、PTH 4週 (b, e)、PTH 8週 (c, f)

参考文献

1. Naka Y, Hashimoto Y, et al. Repair of a meniscus defect through cartilaginous metaplasia of the autogenous tendon graft by injecting recombinant bone morphogenetic protein-2. J Musculoskeletal Res,14,4 :1-10, 2011
2. Liu Q et al. Effects of intermittent versus continuous parathyroid hormone administration on condylar chondrocyte proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2012 20;424(1):182-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Yusuke, Nishida Yohei, Takahashi Shinji, Nakamura Hiroaki, Mera Hisashi, Kashiwa Kaori, Yoshiya Shinichi, Inagaki Yusuke, Uematsu Kota, Tanaka Yasuhito, Asada Shigeki, Akagi Masao, Fukuda Kanji, Hosokawa Yoshiya, Myoui Akira, Kamei Naosuke, Ishikawa Masakazu, Adachi Nobuo, Ochi Mitsuo, Wakitani Shigeyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 106 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Teraoka Takanori, Hashimoto Yusuke, Takahashi Shinji, Yamasaki Shinya, Nishida Yohei, Nakamura Hiroaki	4. 巻 29
2. 論文標題 The relationship between graft intensity on MRI and tibial tunnel placement in anatomical double-bundle ACL reconstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00590-019-02518-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuura Takeshi, Hashimoto Yusuke, Kinoshita Takuya, Nishino Kazuya, Nishida Yohei, Takigami Junsei, Katsuda Hiroshi, Shimada Nagakazu	4. 巻 47
2. 論文標題 Donor Site Evaluation After Osteochondral Autograft Transplantation for Capitellar Osteochondritis Dissecans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 2836 ~ 2843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546519871064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shozaburo Terai, Yusuke Hashimoto, Shinya Yamasaki, Shinji Takahashi, Nagakazu Shimada, Hiroaki Nakamura	4. 巻 139
2. 論文標題 Prevalence, development, and factors associated with cyst formation after meniscal repair with the all-inside suture device	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00402-019-03176-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuya Nishino, Yusuke Hashimoto, Yohei Nishida, Shozaburo Terai, Shinji Takahashi, Shinya Yamasaki, Hiroaki Nakamura	4. 巻 35
2. 論文標題 Incidence and Risk Factors for Meniscal Cyst after Meniscal Repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arthro.2018.11.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Tomihara, Yusuke Hashimoto, Masatoshi Taniuchi, Junsei Takigami, Nagakazu Shimada	4. 巻 27
2. 論文標題 Shallow knee flexion angle during femoral tunnel creation using modified transtibial technique can reduce femoral graft bending angle in ACL reconstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 618 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-018-5191-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takigami Junsei, Hashimoto Yusuke, Tomihara Tomohiro, Yamasaki Shinya, Tamai Koji, Kondo Kyoko, Nakamura Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Predictive factors for osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle concurrent with a discoid lateral meniscus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 799 ~ 805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-017-4451-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Shinya, Hashimoto Yusuke, Takigami Junsei, Terai Shozaburo, Takahashi Shinji, Nakamura Hiroaki	4. 巻 45
2. 論文標題 Risk Factors Associated With Knee Joint Degeneration After Arthroscopic Reshaping for Juvenile Discoid Lateral Meniscus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 570 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546516668623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terai Shozaburo, Hashimoto Yusuke, Orita Kumi, Yamasaki Shinya, Takigami Junsei, Shinkuma Takafumi, Teraoka Takanori, Nishida Yohei, Takahashi Masafumi, Nakamura Hiroaki	4. 巻 58
2. 論文標題 The origin and distribution of CD68, CD163, and SMA+ cells in the early phase after meniscal resection in a parabiotic rat model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 562 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03008207.2017.1284825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Takeshi, Hashimoto Yusuke, Nishino Kazuya, Nishida Yohei, Takahashi Shinji, Shimada Nagakazu	4. 巻 45
2. 論文標題 Comparison of Clinical and Radiographic Outcomes Between Central and Lateral Lesions After Osteochondral Autograft Transplantation for Osteochondritis Dissecans of the Humeral Capitellum	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 3331 ~ 3339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546517730358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本祐介、山崎真哉、西野壱哉、中村博亮
2. 発表標題 Preventing OA by preserving meniscus -focusing on meniscus extrusion-
3. 学会等名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本祐介、脇谷滋之、中村博亮、稲垣祐介、上松耕太、田中康仁、柏薫、吉矢晋一、朝田滋貴、赤木将男、亀井直輔、石川正和、安達伸生、越智光夫
2. 発表標題 関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨修復 ~ 多施設共同前向き無作為化試験 ~
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本祐介、西田洋平、中村博亮
2. 発表標題 膝前十字靭帯大腿骨付着部の組織学的検討
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto Y, Yamasaki S, Takigami J , Nakamura H
2. 発表標題 Meniscal Repair up to date How to manage the juvenile discoid lateral meniscus
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto Y, Nishida Y, Nakamura H
2. 発表標題 Histological analysis of femoral attachment of Anterior Cruciate Ligament
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本祐介、山崎真哉、瀧上順誠、中村博亮
2. 発表標題 Risk factors of postoperative osteochondritis dissecans of lateral femoral condyle after meniscal surgery for juvenile discoid lateral meniscus patients.
3. 学会等名 第44回日本整形外科スポーツ医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 祐介、荻 久美、西田 洋平、中村 博亮
2. 発表標題 骨髄血由来と末梢血由来fibrin clotの成分分析
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本祐介、瀧上順誠、山崎真哉、西田洋平、富原朋弘、中村博亮
2. 発表標題 外側円板状半月板損傷に対する辺縁残存手術は亜全摘手術より離断性骨軟骨炎を抑制する
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本祐介、西田洋平、中村博亮
2. 発表標題 膝前十字靭帯大腿骨付着部の組織学的評価
3. 学会等名 第43回日本整形外科スポーツ医学会
4. 発表年 2017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
研究分担者	折田 久美 (Orita Kumi) (40748597)	大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員 (24402)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐伯 壮一 (Saeki Souichi) (50335767)	名城大学・理工学部・教授 (33919)	
研究分担者	箕田 行秀 (Minoda Hideyuki) (90453133)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	