

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11027

研究課題名(和文) 骨格筋間質幹細胞群を接着剤として利用した筋腱骨複合体の再生治療研究

研究課題名(英文) Regenerative medicine for a muscle-tendon bone complex using skeletal muscle-derived multipotent stem cell sheet pellets such as bio-bonds

研究代表者

内山 善康 (UCHIYAMA, Yoshiyasu)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80317784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスアキレス腱断裂モデルを作成し骨格筋間質幹細胞シートペレット(Sk-MSCSPs)を損傷部の架橋に生体接着剤(bio-bond)として使用した。断裂部にSk-MSCSPsを移植する細胞移植群と非移植群を移植後2、6、12週にて評価した結果、蛍光実態顕微鏡においてGFP陽性移植細胞は各週例とも連続性を認め、細胞非移植群と比べアキレス腱実質部は太く再生し、GFP陽性組織として着床していた。さらに新鮮凍結組織切片における免疫蛍光染色により、神経軸索数、血管数は非移植群に比べ移植群で優位に高値であった。したがって骨格筋間質の細胞群が腱の再生に利用可能であり、新たな再生治療法の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、組織特異的体性幹細胞を使用した組織再生治療は徐々に臨床応用されてきている。今回、我々は活発なシユワン細胞や血管内皮細胞への分化能力を持つ骨格筋由来幹細胞を損傷部へ組織の接着剤(bio-bond)として使用(移植)することで腱再生を可能にした。骨格筋自体は活発な自己再生能を有しており、かつ生体の中でもっとも大きな割合(約40～50%)を占める器官・臓器である。したがって、その一部を摘出しても生命に与える影響は少なく、自家細胞移植のソースとして適している。将来的に腱断裂や肩腱板断裂の治療にも応用できる可能性が高く、移植細胞としての可能性を新たに提示することができた。

研究成果の概要(英文)：To develop a new therapy for a mouse Achilles tendon rupture model (ATRM), we used skeletal muscle-derived multipotent stem cell sheet pellets (Sk-MSCSPs) as a novel alternative source of bridging tissues such as bio-bonds. We evaluated the cells transplanted with Sk-MSCSPs at the incision site of the ATRM and a control group without cell transplantation at 2, 6, and 12 weeks after transplantation. At each evaluation, GFP-positive transplanted cells were observed to be continuous under a fluorescence microscope; compared with that in the non-transplanted group. Furthermore, as determined by immunofluorescence staining in fresh frozen tissue sections, the number of nerve axons and blood vessels was significantly higher in the transplanted group than in the non-transplanted group. Therefore, skeletal muscle interstitial cells can be used for tendon regeneration, suggesting the possibility of a new regenerative treatment method.

研究分野：再生医療

キーワード：骨格筋 幹細胞 腱再生 血管誘導 神経誘導

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スポーツにおける筋・腱・腱付着部 (Enthesis) 損傷や中高年に見られる肩腱板断裂は良くみられる疾患である。これらの治療は損傷程度の軽いものであれば保存的治療 (シーネ・ギプス固定、安静のみ等) で改善することが多いが、重度な損傷 (不全断裂、断裂) になると手術的治療を選択しなければならない。しかしスポーツ選手の場合、再発の軽減と早期回復を希望する選手が多く治療には難渋するケースも存在する。また腱板断裂は断裂が大きな場合、腱の脆弱性や腱付着部の組織学的な修復が十分でなく再断裂を生じる (内山ら肩関節 2015)。

近年、iPS 細胞や組織特異的体性幹細胞 (Tissue-specific stem cells) を応用した組織再生研究が急速に活性化している。現在のところ iPS 細胞は未だ多くの問題を残しているが、組織特異的体性幹細胞は徐々に臨床応用が行われてきている。一方、申請者らのグループは骨格筋間質から多能性の幹細胞群 (Sk-34 細胞: CD34 + /CD45 -, Sk-DN 細胞: CD34 - /CD45 -) を見出した (Tamaki, Uchiyama et al. J Cell Biol 2002, J Histochem Cytochem 2002, Exp Cell Res 2003)。これらの幹細胞群は、マウス重度筋損傷モデルに移植することで、骨格筋細胞はもとより血管系細胞 (血管内皮、血管平滑筋、pericytes)、さらに末梢神経系細胞 (シュワン細胞、神経周膜) に分化し、損傷した神経・筋・血管をユニットとして再構築、質量・機能ともに非移植群の 3 倍を超える回復を助長した (Tamaki, Uchiyama et al. Circulation 2005; Histochem Cell Biol 2007)。

またこれらの細胞能力を維持した状態で臨床的に使用可能 (培養も簡素化し、量も多くとれ、細胞をシートとして取り扱いやすい) な細胞シートペレット (Tamaki T, Uchiyama Y et al. Regene Med 2013) を作成し、重度な筋腱移行部損傷 (ほぼ断裂) に移植した。その場合、損傷のみ群では筋重量、筋力ともほぼゼロであったにもかかわらず、移植細胞群では筋重量は健側と比べ 8 割まで回復し、筋力も 5 割まで回復していた。これは移植細胞が損傷筋腱移行部内で活発に神経血管束を再生し、生体の接着剤 (bio-bond) として働いたことにより、筋肉と腱を架橋した結果であると考えられた (Hasimoto H, Tamaki T, Uchiyama Y et al. PeerJ 2016)。

そこで我々は断裂した筋腱骨複合体をより機能的に、強固に、さらに早期の再生を促すことを目的にこの能力をもつ幹細胞を腱・腱骨付着部損傷部へ直接移植することで生物学的な接着剤 (bio-bond) として使用できないかと考えた。

2. 研究の目的

関節動作は 3 つ (筋・腱・骨) の違った組織が連続し構成され、骨格筋収縮により可動性を得ている。臨床的に下腿 3 頭筋肉離れ (筋腱移行部断裂) やアキレス腱断裂 (腱実質断裂)、肩腱板断裂 (腱骨付着部断裂) はその代表的な疾患であり、関節動作に問題が生じる。一度これらの損傷が発生すると保存的治療 (固定治療) や手術的治療 (縫合治療) を行ったとしても、正常な組織学的再生が得られず疼痛の残存や再発が危惧される。そこで本研究はこの限界を埋めるべく、活発なシュワン細胞や血管内皮細胞への分化能力を持つ骨格筋由来幹細胞を損傷部へ組織の接着剤 (bio-bond) として使用 (移植) することで筋腱骨複合体をより機能的に、強固に、さらに早期の再生を促すことを目的とする。

- (1) 細胞移植により筋腱骨複合体損傷治療に有効かどうかを検討する。
- (2) 細胞移植により縫合腱がより強く、早く治癒するか明らかにする。
- (3) 臨床応用に値するだけの効果があるのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

GFP マウス骨格筋間質から抽出したシートペレット (Tamaki T, Uchiyama Y et al. Regenerative Medicine 2013) を同系マウスアキレス断裂モデル (腱実質部断裂) に直接移植する実験を行う。移植細胞が有効に着床した場合、移植細胞の動向及び分化状況を組織学的に解析する。また非移植 (切離のみ) 群と比較することで機能的な再生ができるかを *in vivo* で検討する。

実験動物: 正常 6-10 週令マウスをレシピエントに、GFP-TG マウスをドナーに用いる。

(1) 骨格筋間質幹細胞シートペレットの作成

従来の純化した細胞 (Sk-34: CD34+/CD45-, Sk-DN 細胞: CD34-/CD45-) 移植 (Tamaki, Uchiyama et al. J Cell Biol 2002, Exp Cell Res 2003) では十分な細胞量を得ることが難しかったため、細胞能力を維持 (筋、神経、血管に分化誘導可能) した状態で多くの細胞を得るために、また取り扱いやすくするために、我々はゲル状細胞シート (シートペレット) を作成した。この分離・精製方法及び基本培養法に関してはすでに確立しており、シートペレット細胞群の分化能力に関しても明らかになっている (Tamaki T, Uchiyama Y et al. Regene Med 2013)。

(2) アキレス腱断裂モデル

GFP-TG マウス 6 匹から両側下肢の骨格筋間質幹細胞シートペレットを抽出し、ドナー細胞とする。

マウス (C57BL/6) 右アキレス腱実質部を切離してアキレス腱断裂モデルとして作成する (n=39)。この時、足底腱は切離することなく温存した。

アキレス腱切離モデルの切離部に細胞を移植する細胞移植群と細胞非移植群を移植後 2、6、12 週にて評価した (各 8 匹)。断裂部分にドナー細胞 (骨格筋間質幹細胞シートペレット) を移植し、その分化を観察する。

回復期である損傷後 2~8 週で経時的に破断実験及びサンプリングを行い、ドナー細胞を移植しないコントロール群と比較する (n=15)。

(3) 分析項目

蛍光実体顕微鏡で移植細胞の生体内での貢献度を GFP 陽性細胞としてマクロスコピックに評価する。

また、凍結組織切片を作成し蛍光顕微鏡を用いて免疫組織化学的検索を行う。

使用抗体: MBP (myelin basic protein), N200 (neuro-filament 200), GFAP (glial fibrillary acidic protein), Elastica Van Gieson, CD31

GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡的検索。着床細胞の局在を把握する。

4. 研究成果

(1) GFP 陽性組織の着床

蛍光実体顕微鏡において GFP 陽性移植細胞は移植後 2、6、12 週ともに連続性を認めアキレス腱実質部は太く再生し、GFP 陽性組織として着床していた。移植後 2 週の組織像 (図 1a,b) と正常アキレス腱像 (図 2)

図 1a



図 1b

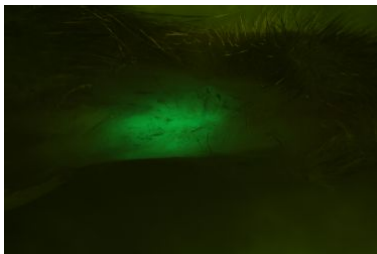


図 2

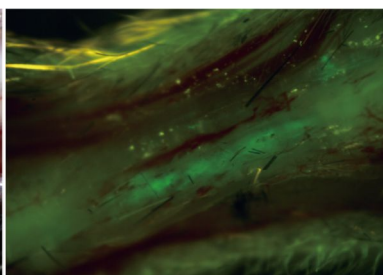


しかし移植後の週齢が増加するごとに GFP 陽性部分は縮小し 12 週では GFP 陽性 (図 3a) の腱様組織に置換していた (図 3b)。また細胞非移植群では連続性を認めるものの腱組織は細くなっていた。

図 3a



図 3b



(2) アキレス腱の組織染色と免疫蛍光染色

移植後 12 週において Elastica Van Gieson 染色を行い移植群が腱様構造が維持され (図 4a 紫)、腱組織と考えられる部分に GFP 陽性細胞がみられ (図 4b グリーン)、同部に血管 (図 4c 赤)、神経 (図 4d 赤) の再生もみられている。

図 4a

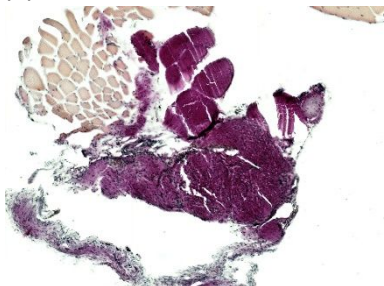


図 4b

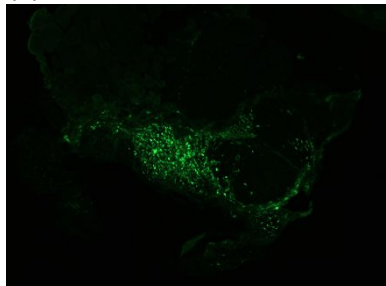


図 4c

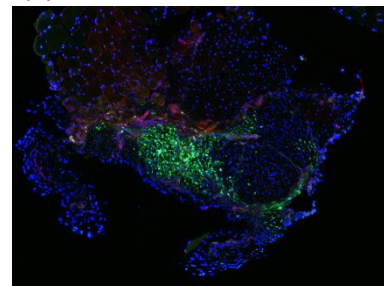
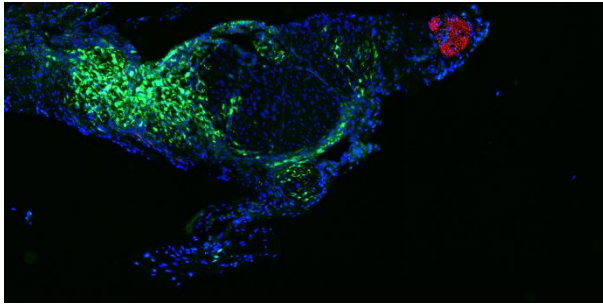


図 4d





そこで移植後 12 週の新鮮凍結組織切片（冠状断切片）における免疫蛍光染色（抗 CD31、N200）により、移植部中央、遠位 3 mm部、近位 3 mm部での血管数（CD31 陽性）、神経軸索数（N200 陽性）は非移植群に比べ移植近位部で優位に高値であった（表 1）。

表 1 移植後 12 週の再生腱内の血管、神経数

	移植群				非移植群			
	n	近位3mm	中央	遠位3mm	n	近位3mm	中央	遠位3mm
抗CD31	8	62 ± 35*	38 ± 21	45 ± 25	5	48 ± 29	25 ± 20	38 ± 30
抗N200	8	21 ± 10*	18 ± 11*	15 ± 9	5	10 ± 5	8 ± 6	7 ± 6

*p<0.05

結論

骨格筋間質幹細胞シートベレットが損傷腱周囲の血管や神経を活発に誘導、再生した結果、腱実質の再生に大きく関与したしたものではないかと考えている。したがって骨格筋間質の細胞群が筋腱骨複合体の再生に利用可能であり、新たな再生治療法の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----