

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09091

研究課題名（和文）体内再生誘導メカニズムを応用した新鮮損傷膝前十字靭帯の修復法の開発

研究課題名（英文）Development of primary repair of anterior cruciate ligament injury using induced regenerative medicine

研究代表者

石橋 恭之（Ishibashi, Yasuyuki）

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80292142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然治癒が得られにくい関節内組織損傷を、再生誘導の手法を用いて修復できるか研究した。骨軟骨欠損モデルマウスを作成し、HMGB-1 peptideもしくは生食（対照群）を投与した。対照群では軟骨欠損部は線維性軟骨で修復されたが、投与群では良好な硝子軟骨の再生を認めた。またparabiosis modelを作成し、同様に軟骨欠損を作成した。HMGB1投与によりMSCの血中動員メカニズムが生じ、血流を介した障害組織への細胞遊走能があることも証明できた。現在、半月板損傷やACL損傷にも同様の実験を継続している。本結果をふまえ変形性膝関節症に対するHMGB1投与の安全性評価の医師主導治験を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB-1 (high mobility group box-1 protein) は核内遺伝子発現調節タンパクであり、重度の生体組織損傷時に血中に放出され骨髄由来間葉系幹細胞を血中へ動員する。しかし同時に全身性炎症も惹起するため、既知の炎症関連ドメインを排除したshort length HMGB-1 peptideを共同研究者の玉井らが開発した。今回の動物実験からその関節軟骨治癒促進効果が確認され、現在、変形性膝関節症に対する医師主導治験を開始している。HMGB-1が実用化されれば、本邦で2500万人といわれる変形性膝関節症患者のdisease modifying drugとなる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether intra-articular tissue damage, which does not easily heal spontaneously, can be repaired using a regeneration induction technique. We created a mouse model with osteochondral defects and administered HMGB-1 (high mobility group box-1 protein) peptide or saline (control group). Although the cartilage defect was repaired with fibrous tissue in the control group, it was repaired with hyaline cartilage in the HMGB-1 group. In the parabiosis model with cartilage defects, it was demonstrated that the administration of HMGB1 facilitates transmigration of bone marrow mesenchymal stem cells into the cartilage defects through blood circulation. Currently, similar experiments for meniscus and anterior cruciate ligament injuries are ongoing. Based on these results, we have started a physician-led clinical trial to evaluate the safety of HMGB1 administration for osteoarthritis of the knee.

研究分野：整形外科

キーワード：再生医療 膝関節 軟骨 靭帯 半月板 変形性関節症

### 1. 研究開始当初の背景

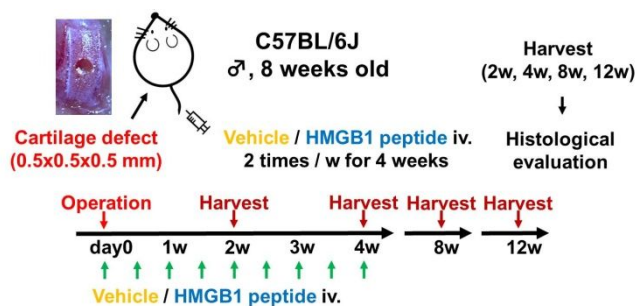
膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は頻度の高いスポーツ外傷であるが、自然治癒することがないことから、従来、靭帯再建術が行われてきた。しかし再建術は、自家組織を犠牲にすること、再受傷の問題、さらに術後の骨孔拡大が再手術を困難にするといった幾つかの問題点があった。また、再建術後に関節安定性が得られても変形性膝関節症へ進行する例も散見された。これは再建術を行ったとしても、膝の biomechanics が正常とは変化しており、さらに生物学的な因子が軟骨変性を加速することも一因と考えられる。関節内靭帯である ACL が自然修復できない原因については未だ明らかにされておらず、またどのような修復機構が働いているのかも不明である。我々はこれまで断裂 ACL に間葉型幹細胞 (MSC) が存在し治癒機転が存在することを証明してきたが、この修復機転を促進・増強することができれば、再建術の成績向上や一次修復、軟骨修復にも応用できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

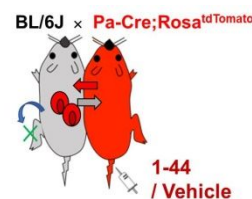
本研究の目的は、共同研究者の玉井らが臨床応用を進めている HMGB-1 (high mobility group box-1 protein) を用いて、関節内組織の自己修復を促進すること、またそのメカニズムを解明することである。HMGB-1 は核内遺伝子発現調節タンパクであり、重度の生体組織損傷時に血中に放出され骨髄由来 MSC を血中へ動員する。しかし同時に全身性炎症も惹起するため、既知の炎症関連ドメインを排除した short length HMGB-1 peptide を再生誘導因子として用いる。これまで、関節内の組織 (ACL、関節軟骨、半月板) の修復能が乏しいことが知られているが、この HMGB1 peptide を投与し関節内に骨髄由来 MSC を動員することによって、組織の自己修復が得られることが期待される。このように、これまで国内外で進められてきた治療法とは全く異なるコンセプトでの治療法である。本治療は、靭帯修復にとどまらず、治療困難とされてきた関節軟骨障害などに対しても独創的な治療法の開発につながるものと考えている。

### 3. 研究の方法

(1) 膝関節内組織損傷モデルとして、C57BL/6J マウスで骨軟骨欠損モデルを作成した。大腿骨滑車部に 0.5mm 径、深さ 0.5mm の骨軟骨欠損を作成し、HMGB1 peptide による治療効果を検討した。術後より週 2 回、4 週間 (計 8 回) の HMGB1 および対照群に生理食塩水の投与を行った。マウスをと殺後、組織学的、免疫組織学的 (線維軟骨マーカーとして Col1、硝子軟骨マーカーとして Col2、Sox9、アグリカン Acan を染色)、Single cell RNA sequence を用いて評価した。



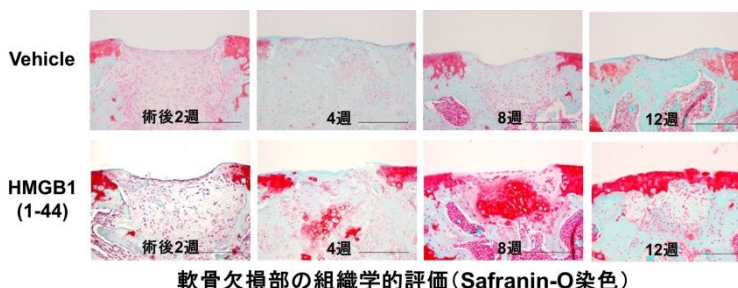
(2) 軟骨修復のメカニズムを解明するため、野生型 (WT) マウスと MSC マーカーの一つである PDGFRa (PDGF レセプター-α) を trace できる遺伝子改変マウス (PDGFRa-Cre;tdTomato) を使用し、Parabiosis モデルを作成した。WT 側の滑車部に 0.5mm 径の骨軟骨欠損を作成し、遺伝子改変マウス側に HMGB1 peptide または生食 (vehicle) を投与し、血流を介した軟骨損傷部への細胞の寄与があるかを検討した。



(3) 上記(1)と同じ手法を用いて、HMGB1 peptide に ACL 再建・修復後、半月板損傷後の治癒促進作用があるかどうかを検討している。

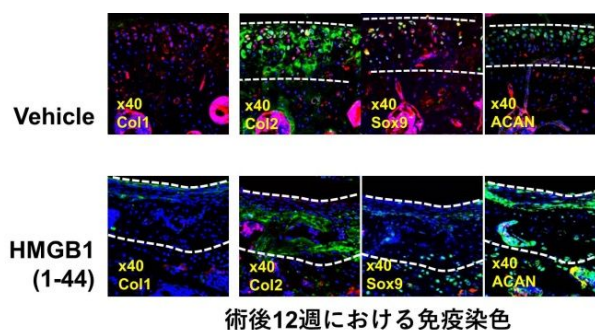
### 4. 研究成果

(1) 対照群は欠損部が線維軟骨で充填されるのみであったが、HMGB1 peptide 投与群は Safranin O で濃染される良好な硝子軟骨の再生を認めた。免疫染色を行うと、対照群は Col1 中心で修復するのに対し、HMGB1



peptide 投与群は硝子軟骨マーカーを中心に染色された。

(2) Parabiosis モデルでは、軟骨欠損部に Tomato 陽性 PDGFR $\alpha$  陽性細胞が集積しており、HMGB1 peptide 投与により欠損部への血流を介した細胞遊走があることを証明できた。また、動員された細胞が直接軟骨に分化しているかを見るべく免疫染色を行った。HMGB1 peptide 投与群では Tomato+細胞がみられ、更にその一部が Col2、Sox9、Aggrecan と共染色されており、血中を介し MSC が損傷部に集積し、直接軟骨再生に寄与している結果示された。



本結果を受けて、2021年1月より変形性膝関節に対するHMGB1ペプチド投与の安全性評価として当科において医師主導治験を開始している。また、2020年に軟骨疾患の治療薬(WO2020/085506)として特許も取得した。

(3) マウス膝前十字靭帯損傷モデル、マウス膝前十字靭帯再建モデルを作成することに成功しており、現在は治療効果の検討を行っているところである。また、半月板損傷モデルでは対照群に比較し良好な治癒が得られることを確認できている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishibashi Y, Adachi N, Koga H, Kondo E, Kuroda R, Mae T, Uchio Y	4. 巻 25(1)
2. 論文標題 Japanese Orthopaedic Association 2019 guidelines for anterior cruciate ligament injuries (3rd edition)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 6-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.10.009	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 -
1. 著者名 Sakamoto Y, Tsukada H, Sasaki S, Yamamoto Y, Tsuda E, Ishibashi Y	4. 巻 25(6)
2. 論文標題 Effects of the tibial tunnel position on knee joint stability and meniscal contact pressure after double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 1040-1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.12.006	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 -
1. 著者名 Sakamoto Y, Sasaki S, Kimura Y, Yamamoto Y, Tsuda E, Ishibashi Y	4. 巻 36(5)
2. 論文標題 Patellofemoral contact pressure for medial patellofemoral ligament reconstruction using suture tape varies with the knee flexion angle: a biomechanical evaluation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 1390-1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arthro.2019.12.027	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 -
1. 著者名 Sasaki E, Chiba D, Ota S, Kimura Y, Sasaki S, Yamamoto Y, Oishi M, Iino K, Ando M, Tsuda E, Ishibashi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced serum levels of anti-Mullerian hormone is a putative biomarker of early knee osteoarthritis in middle-aged females at menopausal transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84584-0	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 -

1. 著者名 Ishibashi K, Sasaki E, Ota S, Chiba D, Yamamoto Y, Tsuda E, Yoshikuni S, Ihara K, Ishibashi Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Detection of synovitis in early knee osteoarthritis by MRI and serum biomarkers in Japanese general population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69328-w	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石橋恭之
2. 発表標題 内視鏡手術技術認定における医療安全 膝関節鏡技術認定制度における医療安全
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋恭之
2. 発表標題 術中ナビゲーションによるACL遺残組織の生体力学的検討
3. 学会等名 JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋恭之
2. 発表標題 膝関節鏡視下手術の進歩と現状
3. 学会等名 日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村由佳
2. 発表標題 小児膝前十字靭帯損傷の手術待機期間と半月板損傷の関連
3. 学会等名 JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村由佳
2. 発表標題 ACL単独再建術における再断裂について
3. 学会等名 東日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi Y
2. 発表標題 Graft choice in ACLR
3. 学会等名 2019 APKASS Summit Lancheon Sminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi Y
2. 発表標題 Return to Play after Revision ACL: Asia Experience
3. 学会等名 The ACL Consensus Meeting Panther Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋恭太
2. 発表標題 再生誘導医薬HMGB1ペプチドを利用した損傷軟骨治療の可能性
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本整形外科学会(石橋恭之他) 編集	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 102
3. 書名 前十字靭帯 (ACL) 損傷診療ガイドライン 2019 (改訂第3版)	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 軟骨疾患の治療薬	発明者 玉井克人、新保敬史、佐々木英嗣、對馬誉大、山崎尊彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02020/085506	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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	津田 英一 (Tsuda Eiichi) (00361014)	弘前大学・医学研究科・教授  (11101)	
研究分担者	木村 由佳 (Kimura Yuka) (40455746)	弘前大学・医学研究科・講師  (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐々木 英嗣  (Eiji Sasaki)  (60587038)	弘前大学・医学研究科・助教    (11101)	

	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
連 携 研 究 者	玉井 克人  (Tamai Katsuto)  (20236730)	大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関