

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09095

研究課題名（和文）RGDペプチド三次元細胞構造体を用いた新規半月板再生医療技術の開発

研究課題名（英文）Development of meniscus regenerative medicine using three-dimensional RGD peptide composites

研究代表者

片野 尚子（Katano, Hisako）

東京医科歯科大学・統合研究機構・講師（キャリアアップ）

研究者番号：50376620

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）：本研究の目的は、RGDペプチドを用いた非細胞足場素材と移植用細胞を組み合わせ、RGDペプチド三次元細胞構造体による新たな軟骨・半月板再生医療技術を開発することである。はじめにRGDペプチド三次元細胞構造体調製法の最適化を行い、RGDペプチドを用いた非細胞足場素材の使用がより大きな軟骨塊の形成に有用であることを明らかにした。その後、RGDペプチド三次元構造体の生体内評価を実施する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の影響により計画を変更し、研究の意義・目的を明確にするためNDBオープンデータの手術データを利用して関節ごとの年間人工関節置換術の実施件数をはじめて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RGDペプチドを用いた非細胞足場素材は滑膜MSCのin vitroでの軟骨形成を促進した。本素材を用いると、それを用いない対照培養に比べてより大きな軟骨ペレットが得られた。このin vitro研究で得られた知見は、今後のin vivo研究に寄与し、軟骨再生医療の発展に貢献しうる。一方、軟骨再生医療の対象人数を推定する資料は少ない。人工関節置換術件数は、これまでは主に医療機器の出荷件数で推定してきた。国民皆保険制度のもとで収集されるレセプトの全数調査に相当するNDBオープンデータの利活用により、人工関節置換術の実施件数および性別年齢別地域別の特徴を正確に示すことができるようになった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a new cartilage and meniscus regenerative medicine technique using three-dimensional RGD peptide composites. First, we optimized the RGD peptide 3D structures manufacturing process and found that three-dimensional RGD peptide composites improved the size of the cartilage pellets. Subsequently, we planned to conduct in vivo evaluation of RGD peptide 3D structures, but changed the plan due to the effects of the new coronavirus infection. To clarify the significance and purpose of the study, we revealed the annual total number of arthroplasties for each joint in Japan using the NDB Open Data Japan for the first time.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 体性幹細胞 間葉系幹細胞 生体材料 変形性膝関節症 人工関節置換術

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 半月板・軟骨を対象とした新規治療法の開発

半月板は膝関節内に1対ある三日月形の線維軟骨であり、衝撃吸収の機能を有する。半月板は血行が辺縁側の30%に限られ、細胞の密度が低く、荷重によるストレスにさらされるため、損傷すると自然治癒しにくい。半月板損傷に対するわが国で唯一の温存手術は縫合術であるが、再断裂のリスクが高く、必ずしも縫合術が積極的に行なわれている状況ではない。しかし、半月板を広範囲に切除すると必然的に変形性膝関節症が発症する。変形性膝関節症は関節軟骨の摩耗を特徴とする疾患で、高齢化社会を迎えた日本には2,500万人いると推定されている。2010年度国民生活調査によれば、要支援の約20%の原因が変形性関節症となっており、高齢者のQOL低下・健康寿命の短縮を引き起こすことから、変形性関節症の予防が日本の健康・医療分野における喫緊の課題となっている。

軟骨を再生させる戦略のひとつは、軟骨基質を産生する細胞を外から補うことである。私たちは滑膜由来の間葉幹細胞（滑膜幹細胞）が自己血清で効率よく増殖する（Nimura et al. *Arthritis Rheum*, 2008）こと、軟骨分化能が高い（Sakaguchi et al. *Arthritis Rheum*, 2005）こと、未分化な状態で軟骨欠損部に移植すると軟骨細胞に直接分化すること、細胞浮遊液を10分間静置すると軟骨欠損部に約60%の細胞が接着しブタの荷重面の軟骨欠損を再生させる（Koga et al. *Stem Cells*, 2007）ことを報告している。2008年には滑膜幹細胞による軟骨再生の臨床研究を開始し、安全性を確認するとともに、多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めた（Sekiya et al. *Clin Orthop Relat Res*, 2015）。また、半月板を切除したモデル動物に滑膜幹細胞を移植すると半月板再生が促進されることをラット、ウサギ、ブタで示した。これらの成果にもとづいて実施した半月板再生の臨床研究においても、術後2年の段階で、重篤な有害事象を認めず、全例臨床スコアが改善し、2017年に薬事承認を目指した医師主導治験を開始した。

しかし、移植できる細胞数に限界があり、大量の細胞塊を移植した場合には、目的部位への生着が得られなかったり、移植細胞塊の中心部の栄養や酸素が欠乏し生体内で十分に機能を発揮できなかったりする点が懸念される。そこで、細胞浮遊液と組織・細胞接着性に優れたRGDペプチドから構成される非細胞足場素材）を組み合わせることによって、これらの課題が解決できれば、半月板の摩耗や半月板切除術後の広範囲欠損例に対する新たな治療法の開発できると考えた。

### (2) 人工関節置換術の年間実施件数

変形性膝関節症は主に加齢により軟骨が摩耗し、膝の痛みにより運動機能が低下する疾患である。現行の変形性膝関節症に対する治療は病態によって異なる。軽度の痛みの症状に対しては鎮痛剤の使用やヒアルロン酸の関節内注射が行われるが、その効果は限定的である。重度の痛みに対しては人工膝関節置換術が適応になる。そこで、新たな細胞治療が確立された場合の対象患者数推計については、人工関節置換術の実施率や動向を正確に把握することが有用だと考えられた。NDB（National Database of Health Insurance Claims and Specific Health Checks of Japan）オープンデータジャパンでは、これらの手術のレセプト集計表が公開されている。このデータを用いることによって、人工関節置換術の年間実施件数を明らかにすることができると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) 半月板・軟骨を対象とした新規治療法の開発

本研究の目的は、RGDペプチドを用いた非細胞足場素材と移植用細胞を組み合わせたRGDペプチド三次元細胞構造体による新たな軟骨・半月板再生医療技術を開発することである。

### (2) 人工関節置換術の年間実施件数

本研究の目的は、日本における2014年から2017年の年間人工関節置換術件数を記録し、その4年間の推移、男女差、年齢分布、地域差などを完全調査により明らかにし、分析することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 半月板・軟骨を対象とした新規治療法の開発

人工膝関節置換術後に得られた6膝の滑膜から滑膜幹細胞を分離・培養した。12.5万細胞をペプチド三次元細胞構造体と混合後、遠心して細胞塊とし、軟骨分化培地で21日間培養し、ヒト滑膜MSCのin vitro軟骨形成に対する構造体添加の効果および機序を検討した。軟骨塊の湿重量、DNA量、グリコサミノグリカン量、サフラニンO染色、トルイジンブルー染色、電子顕微鏡により組織を解析し、構造体を混合しないコントロール群と比較した。

### (2) 人工関節置換術の年間実施件数

厚労省ホームページの NDB オープンデータ「K 手術」の性年齢別算定回数、都道府県別算定回数集計表から人工関節置換術、抜去術、再置換術のデータを使用し、2014、2015、2016 年、2017 度の年間実施件数、および、抜去術、再置換術件数の置換術件数に対する割合を求めた。さらに各置換術の年齢層別・性別・都道府県別実施件数の内訳を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 半月板・軟骨を対象とした新規治療法の開発

添加したペプチド三次元細胞構造体は、軟骨ペレットの重量を有意に増加させた。添加群では  $7.7 \pm 1.2 \text{ mg}$  ( $n = 108$ )、対照群では  $5.3 \pm 1.6 \text{ mg}$  であった。硫酸化グリコサミノグリカンおよび DNA の含有量は、コントロール群に比べ、添加群で有意に高値であった。光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡の画像から、1 日目にはペプチド三次元細胞構造体がペレットの骨格を形成し、7 日目には滑膜 MSC による軟骨マトリックスの生成により骨格が破壊され、21 日目には軟骨ペレットが大きくなり、ペプチド三次元細胞構造体が拡散して残存していることが確認された。したがって、ペプチド三次元細胞構造体はペレットの骨格を形成し、より高い細胞数を維持し、滑膜 MSC の *in vitro* 軟骨形成を促進することがわかった。軟骨塊の湿重量、軟骨塊あたりのプロテオグリカン量、軟骨塊あたりの DNA 量は添加群でコントロール群より有意に増加した。組織所見により、ペプチド三次元細胞構造体は空間を作り、その空間を埋めるように軟骨基質が産生されることが観察された (図 1)。

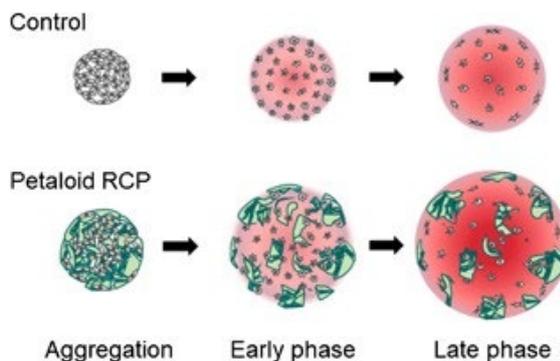


図 1 ペプチド三次元構造体の添加が軟骨形成過程に与える影響の模式図

##### (2) 人工関節置換術の年間実施件数

全関節の人工関節置換術の総数は 2014 年に 128,065 件であったが、2017 年には 146,189 件と徐々に増加した (図 2A)。膝関節形成術が 56.3% と最も多く、股関節形成術が 40.4% と 2 番目に多く、2017 年に行われた全関節形成術のうち、膝関節形成術、股関節形成術ともに 97% を占めています (図 2B)。肩関節形成術は 1.7%、指関節形成術は 1.1%、肘関節、足・足首、手・手首の関節形成術は 1.0% 未満であった。年齢別では、70 歳代後半が最も高くなっている (図 2C)。65 歳以上の高齢者が 8 割近くを占め、65~74 歳が 33.7%、75 歳以上が 45.9% であった (図 2D)。

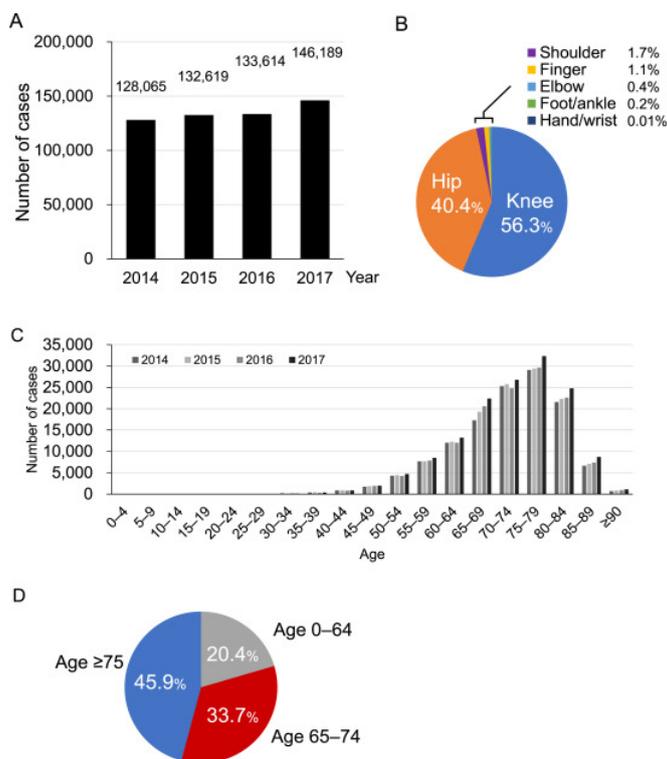


図 2 NDB オープンデータに基づく日本における 2014 年から 2017 年の全関節の人工関節置換術の実施状況

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hisako Katano, Nobutake Ozeki, Yuji Kohno, Yusuke Nakagawa, Hideyuki Koga, Toshifumi Watanabe, Tetsuya Jinno, Ichiro Sekiya	4. 巻 20
2. 論文標題 Trends in arthroplasty in Japan by a complete survey, 2014-2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Sci .	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.07.022	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 Naritomi M, Mizuno M, Katano H, Ozeki N, Otabe K, Komori K, Fujii S, Ichinose S, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Sekiya I	4. 巻 9999
2. 論文標題 Petaloid recombinant peptide enhances in vitro cartilage formation by synovial mesenchymal stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24042	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naritomi M, Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Fujii S, Ichinose S, Ozeki N, Tsuji K, Koga H, Sekiya I.
2. 発表標題 Petaloid Recombinant Peptide Constructs the Framework of Cartilage Pellet and Promotes In Vitro Cartilage Formation.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成富 真愛, 水野 満, 片野 尚子, 小田邊 浩二, 小森 啓一郎, 藤井 静花, 市野瀬 志津子, 大関 信武, 辻 邦和, 古賀 英之, 関矢 一郎.
2. 発表標題 花弁状組換えペプチド片は滑膜 幹細胞の軟骨基質産生を 促進させる
3. 学会等名 第 31 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片野 尚子 , 大関 信武 , 小田邊 浩二 , 河野 佑二 , 水野 満 , 古賀 英之 , 大川 淳 , 神野 哲也 , 関矢 一郎
2. 発表標題 レセプト全数調査に基づく人工関節置換術件数の推移
3. 学会等名 第 34 回日本整形外科学会基礎 学術集会
4. 発表年 2019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	関矢 一郎  (Sekiya Ichiro)  (10345291)	東京医科歯科大学・統合研究機構・教授    (12602)	

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
---------	---------