

平成22年5月12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791043

研究課題名（和文）

磁気ターゲティング法を用いた半月板修復の基礎的研究

研究課題名（英文）

Repair of meniscus using mesenchymal cells with magnetic targeting method

研究代表者

山崎 琢磨 (YAMASAKI TAKUMA)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：50444683

研究成果の概要（和文）：膝半月板損傷に対し骨髄間葉系細胞（MSC）-磁気ビーズ複合体を関節内に注入し、関節外に留置した磁石によりMSCを損傷半月板に集積させ、修復に対する有効性を評価した。まずSprague-Dawleyラット（SDラット）由来MSCを用いてSDラット半月板損傷モデルにMSC複合体を注入し、次にヒトMSCを用いて免疫不全ラットに同様に注入した。いずれのモデルとも、磁石使用群における細胞注入後8週までの評価では明らかな軟骨基質の発現増加は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：Efficacy of intraarticular injection of mesenchymal cells (MSC) for meniscus injury was evaluated using MSC-magnetic beads complex in order to improve healing effect on injured meniscus. Firstly, MSC of Sprague-Dawley rats (SD rat) were injected into the knee of SD rats with injured meniscus. Secondary, human MSC were also injected into the knee of nude rats using the same protocol. However, no remarkable increase of extracellular matrices were observed by using the magnetic targeting method in the both models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：移植・再生医療・細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は“変形性膝関節症の進行に関与する半月板損傷をより簡便に修復させるために組織工学的手法を用いて半月板再生を行い、膝関節の安定化を図ることにより関節症の進行を予防し得ることを組織培養及び動物モデルで確認し、半月板損傷に対する新たな治療概念としての細胞治療法を開

発すること”である。

膝の正常半月板は関節内における荷重の分散、吸収、関節安定性の保持、及び関節の滑動などに関与している。半月板損傷はスポーツ障害や外傷として最も頻発する膝関節疾患であり、損傷に伴う疼痛や損傷後に惹起される関節軟骨損傷に対して手術的加療が選択されることが多い。半月板損傷に対して現

に行われている手術治療には縫合術及び部分切除術が選択されるが、半月板外側縁には血行があるものの残りの領域には血行がないため、縫合術は外縁の損傷のみに適応が限られ、部分切除術が汎用される。しかし部分切除により半月板欠損が広範に及ぶと機能が破綻し関節症に進行する問題は未だ解決されていない。

半月板損傷後の広範囲欠損部に対する治療として同種移植或いは半月板再生が考えられるが、同種移植は短期的には良好な成績が報告されているものの、長期成績は安定していない。また、本邦ではその社会的要因などにより、同種移植の臨床応用が難しい状況にある。このため、近年では生体材料移植、或いは組織工学的的手法による組織再生が期待されている。

組織再生に用いる細胞として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を利用した報告があり、骨・軟骨・筋肉・脂肪などへの多分化能を有することから、運動器再生医療における有用な細胞源として注目されている。このため、半月板の再生にMSCを利用すれば組織再生に有利ではないかと考え、我々は正常半月板から作製した足場材料(scaffold)とMSCを用いた組織再生の研究を行い、scaffold内でのMSCによる軟骨分化が示唆された(参考文献1)。また力学的評価からも培養組織が経時的に正常半月板とほぼ同等の硬度を有することも明らかになった。以上の結果を踏まえ、第二として培養組織のラット膝半月板欠損部への移植を行い、移植組織に要される重要な機能である関節軟骨の保護作用について、従来の同種移植と比較し評価を試みてきた(参考文献2)。前述の方法で作成した培養組織をSDラット膝内側半月板欠損部に移植し、術後の移植組織及び膝関節軟骨の組織学的評価を行い、これまでの結果よりMSCを播種しないscaffoldに比し、MSCを播種したscaffoldでは移植組織内の軟骨基質産生の拡大及び関節軟骨の保護作用に優れると考えている。

以上の研究成果からMSCを用いた半月板の修復・再生は今後臨床応用に向けて十分に期待される運動器再生医療分野の一つと考えられ、将来的に簡便で低侵襲な治療の開発が見込まれる。

当施設ではMSCを用いた多岐にわたる組織再生の研究を行っており、MSCのデリバリー法についても注目してきた。これまでMSCのデリバリー法としては、局所を展開し直接注入する局所投与法、静脈注射にて細胞を投与する経静脈投与法などが挙げられる。過去の実験の多くは損傷部位へMSCを直接投与したものであり、当施設にてラット膝関節内の前十字靭帯・関節軟骨・半月板に作成した損傷部位に対し、関節腔内注入されたMSCが損傷部

位に集積し組織修復に関与することを報告しており、関節腔内でも細胞の分化が行われることを確認している(参考文献3)。このため関節腔内投与は関節内の組織再生に対して有効に機能する可能性を持っている。また当施設では細胞のデリバリー法として磁性体ビーズを用いた磁気による細胞の標的組織への誘導についても報告してきた(参考文献4-7)。これまでの研究を基に、本研究では従来の手術治療に頼らない新しい低侵襲な半月板治療法の確立を目標として、今後はMSCを用い膝関節腔内で局所的に半月板修復の促進を図るという構想を有している。

2. 研究の目的

膝関節に生じる外傷として最も頻発する半月板損傷の治療に対し、組織再生能を有するMSCを組織工学的的手法及び磁気ターゲティング効果を利用して半月板損傷部に集積させ組織修復を図り、本疾患に対する新たな非観血的治療法の構築を目標とする。具体的にはMSCに磁気ビーズを付着させ、その複合体を関節腔内投与し、磁石にて半月板損傷部に誘導することにより半月板修復の促進を評価する。

3. 研究の方法

MSCと磁気ビーズ複合体が膝関節内において損傷半月板に集積し、修復に対する有効性をまずラットモデルを用いて評価した。続いてヒトMSCを用い、免疫不全ラット膝に注入して細胞の半月板修復への有用性を検討した。

(1) ラット由来MSCの培養

Sprague-Dawley (SD)ラット脛骨より骨髓液を吸引・採取して単層培養を行った。培養皿内に接着系細胞が充満した後に継代培養を行い、以後はDMEM+FBS培地を用いて培養を続けた。

(2) MSC+磁気ビーズ複合体の作製

まず磁気ビーズ(フェリスフェア100[®])を活性化させ、その活性化した磁気ビーズにリガンドとしてRGDSペプチドを結合させた。培養したMSCとRGDSペプチドを結合させた磁気ビーズとを癒合させ、MSC+磁気ビーズ複合体を作製した。

(3) 半月板損傷モデルの作製および移植

12週齢のSDラットに予め内側半月板に損傷部を作成しておく。関節包を縫合して膝関節内側に4mm径磁石(フェライト磁石)を留置し、 1×10^5 個のMSC+磁気ビーズ複合体を関節腔内投与した。対照群として、MSC+磁気ビーズのみを投与する群を同時に作成した。

(4) 評価

病理学的評価により、MSC+磁気ビーズ投与群が対照群に比べ膝関節腔内側に磁気ビーズを有する細胞の集積及び損傷部の治癒を促進するか否かを検討した。細胞注入後4週間後、8週間後に10匹ずつ屠殺し、組織学的にSafranin-O染色による評価を行った。

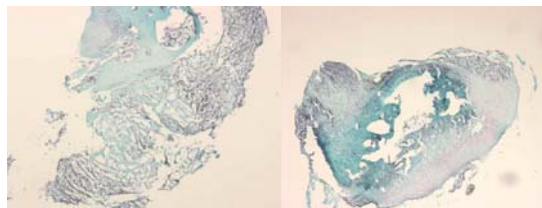
以上のラット膝関節内での半月板損傷治癒の結果を踏まえて、ヒト由来MSCを用いた免疫不全ラット膝に対する同研究を行った。

4. 研究成果

(1) SDラット由来MSC使用群

細胞注入後4週の組織学的評価において、MSC+磁気ビーズ群では、対照群に比し明らかな軟骨基質の発現増加などは認められなかった(図1)。細胞注入後8週の評価では、内側半月板にSafranin-O染色陽性を呈する組織も散見されたが、対照群と比し明らかな軟骨基質の発現増加などは認められなかった(図2)。

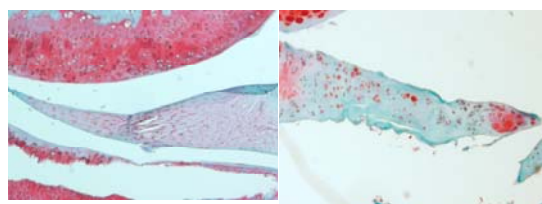
【図1】SDラットMSC+磁気ビーズ注入後4週



磁石使用群

対照群

【図2】SDラットMSC+磁気ビーズ注入後8週



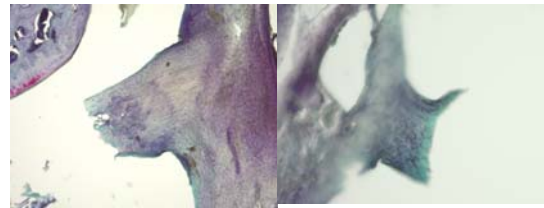
磁石使用群

対照群

(2) ヒト由来MSC使用群

細胞注入後4週及び8週の評価とも、対照群と比し明らかな軟骨基質の発現増加などは認められず、磁石の使用に伴う明らかな半月板の修復効果は認められなかった(図3、図4)。

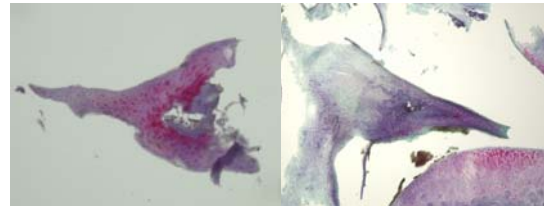
【図3】SDラットMSC+磁気ビーズ注入後4週



磁石使用群

対照群

【図4】SDラットMSC+磁気ビーズ注入後8週



磁石使用群

対照群

参考文献

- 1) Yamasaki T, Deie M, Ochi M, et al: Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow: J Biomed Mater Res Part-A. 2005
- 2) Yamasaki T, Deie M, Ochi M, et al: Transplantation of Meniscus Regenerated by Tissue Engineering with a Scaffold Derived from a Rat Meniscus and Mesenchymal Stromal Cells Derived from Rat Bone Marrow: Artificial Organs. in press
- 3) Agung M, Ochi M, Yamasaki T, et al: Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration: Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006
- 4) Nishida K, Tanaka N, Ochi M, et al: Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid: Neuroreport. 2006
- 5) Yanada S, Ochi M, Adachi N, et al: Effects of CD44 antibody or RGDS peptide immobilized magnetic beads on cell proliferation and chondrogenesis of mesenchymal stem cells: J Biomed Mater Res A. 2006
- 6) Hamasaki T, Tanaka N, Ochi M, et al: Characterization of labeled neural progenitor cells for magnetic targeting:

Neuroreport.2005

7) Nakashima Y, Deie M, Ochi M, et al:
Magnetically labeled human natural
killer cells, accumulated in vitro by an
external magnetic force, are effective
against HOS osteosarcoma cells: Int J
Oncol.2005

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 琢磨 (YAMASAKI TAKUMA)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 50444683

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: