

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09418

研究課題名(和文)新規シート状半月板scaffoldの開発と臨床応用に向けた検討

研究課題名(英文)Research and development of sheet scaffold for meniscal repair

研究代表者

大槻 周平(Otsuki, Shuhei)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：20589840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はポリグリコール酸(PGA)とポリL乳酸-カプロラクトン共重合体(P(LA/CL))からなる2層性新規半月板シートscaffold(Meniscus Sheet Scaffold; MSS)を開発した。本研究では開発したシートを用いて半月板ラッピング治療を行い、その効果を検討した。結果として、MSSを用いた半月板ラッピング治療は、劣悪な半月板損傷の環境を改善することで、損傷部への細胞取り込みと増殖を促進し、早期から半月板治癒の促進効果が明らかとなり、半月板の良好な組織学的修復と相対する軟骨の変性進行抑制に有用な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

縫合困難な半月板損傷に対する治療は部分切除が主に行われるが、切除後の変形性膝関節症増悪が問題である。ポリグリコール酸(PGA)とポリL乳酸-カプロラクトン共重合体(P(LA/CL))からなる2層性新規半月板シートを用いた半月板ラッピング治療は、劣悪な半月板損傷の環境を改善することで、損傷部への細胞取り込みと増殖を促進し、早期から半月板治癒の促進効果が明らかとなり、半月板の良好な組織学的修復と相対する軟骨の変性進行抑制に有用な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel meniscus sheet scaffold (Meniscus Sheet Scaffold; MSS) composed of polyglycolic acid (PGA) and poly(L-lactic acid)-caprolactone copolymer (P(LA/CL)). In this study, we performed meniscus lapping treatment using the developed sheet and investigated its effectiveness.

Results: The tensile strength of MSS was maintained more than 90% from the initial point to 4 weeks after hydrolysis, and more than 60% of the strength was maintained after 8 weeks. The cell viability ratio was increased from 2 to 4 weeks. Cartilage degeneration was suppressed in the MSS group.

Conclusion: Meniscus wrapping treatment with MSS may be useful for improving the environment of poor meniscus injury, promoting cell uptake and proliferation into the injured area, and accelerating meniscus healing from early stage, which may be useful for good histological repair of the meniscus and suppressing the progression of cartilage degeneration relative to the meniscus.

研究分野：再生医療

キーワード：半月板 シート 再生基材

半月板損傷に対する新規シート状 scaffold を用いたラッピング治療の有用性（ウサギを用いた検討）

## 1. 研究開始当初の背景

半月板の機能温存は変形性膝関節症の予防に重要である。現状、国内では半月板損傷に対する治療法は切除術または縫合術の選択肢しかない。半月板組織は血流に乏しく、自己修復能力が低いため、縫合術後の再断裂や治癒不全による再手術となることがしばしばある。そこで我々はこれまで半月板の新規治療法の研究を進めており、申請者らはミニブタの半月板に PGA と P(CL/LA) を使用した scaffold が良好な治療成績を示し(Otsuki et al. Am J Sport Med. 2019)、中川らはウサギ半月板水平断裂を人工硬膜シートでラッピングする治療法の可能性について報告した (Nakagawa, Otsuki et al. Cartilage. 2021)。

## 2. 研究の目的

半月板損傷に対する新規治療法として人工硬膜シートを用いたラッピング治療は一定の治療効果を示したが、より早期に自己修復を促進できないものか検討を進めた。そこで我々は、ポリグリコール酸(PGA)とポリ L 乳酸-カプロラクトン共重合体(P(LA/CL))からなる 2 層性新規半月板シート scaffold(Meniscus Sheet Scaffold; MSS)を開発した。本研究では開発したシートを用いて半月板ラッピング治療を行い、その効果を検討した。

## 3. 研究の方法

*in vitro* 試験としてまず、MSS の引張強度の分析を行った。次に、ウサギの内側半月板前節に 2mm 円柱欠損を作成し、欠損群と MSS でラッピング治療を行った群(MSS 群)とで比較した (n=40)。評価時期は術後 2、4、8、12 週とし、肉眼的及び組織学的に評価を行った。再生した半月板と欠損の大きさはマクロ写真を用いて評価した。再生組織は Safranin-O/Fast Green 染色を用いて Ishida score で評価した。細胞増殖能の評価を抗 Ki-67 抗体の免疫組織学的分析で行った。大腿骨内顆軟骨は OARSI score で評価した。

## 4. 研究成果

ポリグリコール酸とポリ乳酸/カプロラクトンからなる新規 2 層構造の半月板シート足場

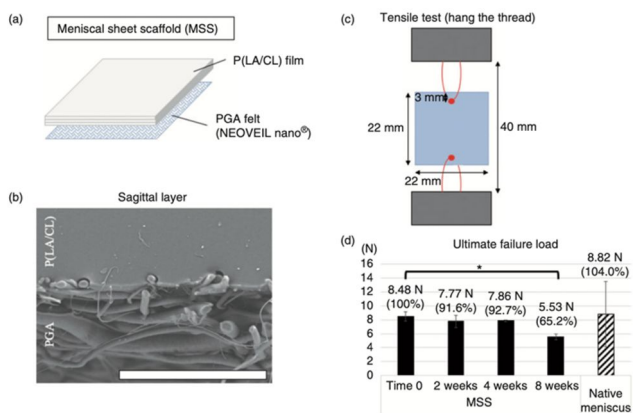


図 1 : (a, b)MSS の構造. (c, d)強度試験.

(MSS) の生体力学的強度を評価し、ウサギの半月板欠損モデルに対するラッピングを用いた半月板の治療について検討した。MSS の最大破断強度は、引張試験機を用いて *in vitro* で測定した (図 1a-d)。結果、MSS の強度は初期時点から加水分解後 4 週間まで 90%以上維持され、8 週間では 60%以上が残存していた (図 1d)。

ウサギ膝の内側半月板に 2mm の円柱状の欠損を形成し、欠損群には処置を施さず、MSS 群には MSS によるラッピング処置を施した比較した。移植後 2 週で MSS 群では大腿骨側表面に

多くの細胞が観察でき、欠損部への遊走を示唆する所見が得られ、4週では欠損部は多くの細胞を含んだ組織で充填された。その後、新生組織は glycosaminoglycan を多く含んだ細胞外基質へ成熟していた。一方欠損群は 12 週時点でも欠損部はそのままの状態であった。8 週間および 12 週間後の半月板の表面積は、MSS 群の方が欠損群よりも大きく、欠損サイズは小さかった。Ishida スコアでは、術後すべての時点において、MSS 群が欠損群に比べ有意に改善された (図 2a,b)。

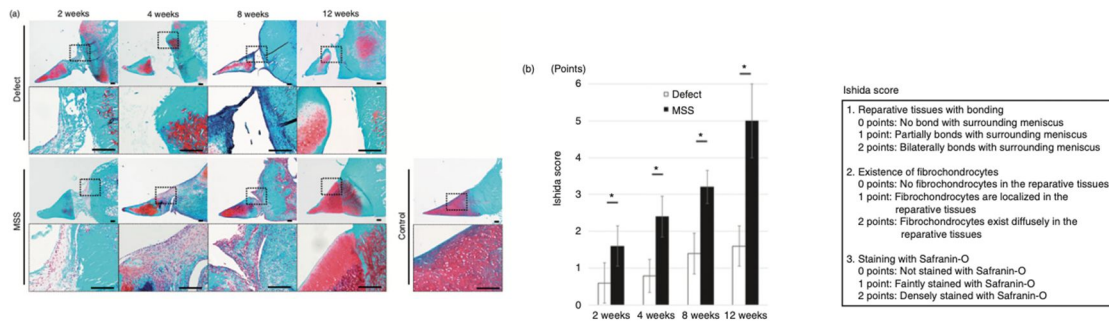


図 2 : (a)欠損およびMSSの Safranin-O/Fast Green 染色. (b)Ishida スコア.

次に免疫組織化学的解析により、Ki-67 による細胞増殖について検討した (図 3a-c). Ki-67 陽性細胞は欠損 4 週後の MSS 群では大腿骨側表面に多く観察でき、欠損部周辺での細胞増殖活性上昇が有意に確認できたが、欠損群では低い傾向にあった。Ki-67 陽性細胞比率は、MSS 群で表層では有意に高かったが、実質部では両群間に有意差は見られなかった。

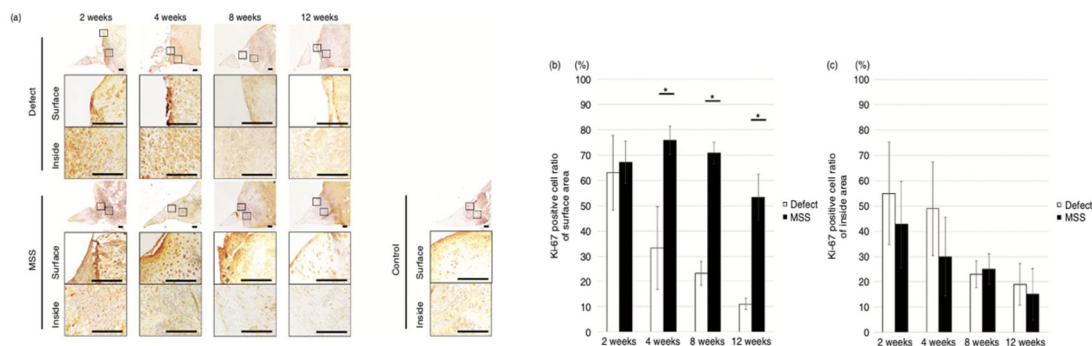


図 3 : (a)Ki-67 染色. (b,c)表層並びに実質部の陽性細胞比率.

Type I および II コラーゲン抗体による再生組織の構造を明らかにした (図 4a,b). Type I コラーゲンは半月板の outer 及び表面に陽性細胞を多く認めたが、Type II コラーゲンは MSS 群で 12 週後の欠損部周辺で陽性細胞が多く見られた。

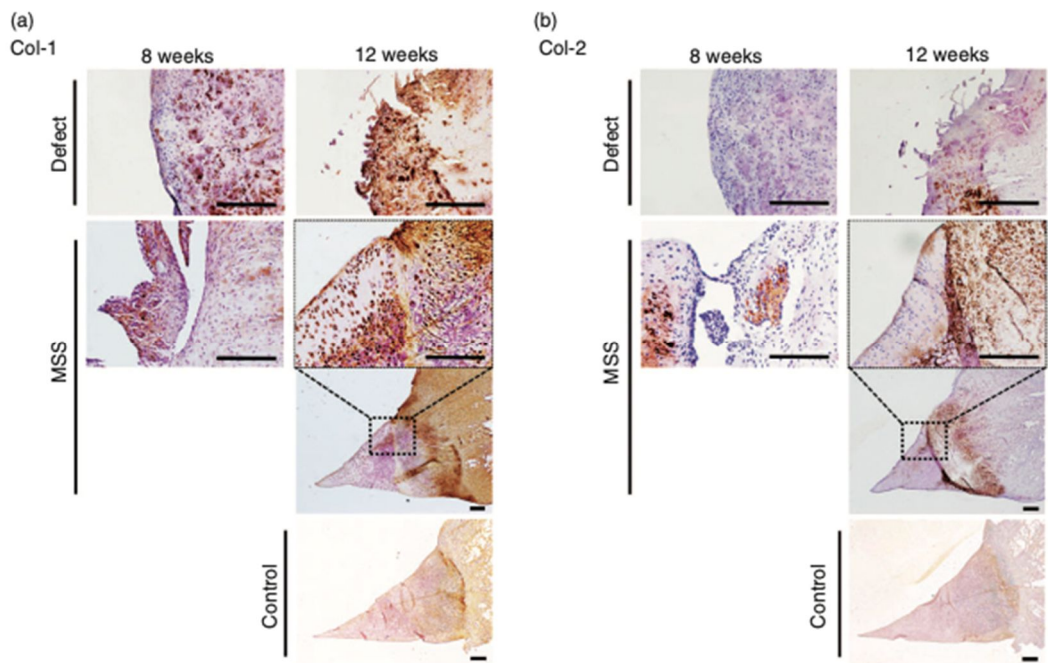


図4：(a,b) Type I および II コラーゲン免疫染色.

大腿骨内側軟骨を Safranin-O/Fast Green で染色し、OARSI のスコアで評価した( 図 5a,b ). 欠損群では OARSI score は有意に高く、8 週から 12 週にかけて関節軟骨の菲薄化及び cluster formation など変性所見が見られたが、MSS 群では軟骨の厚さおよび、glycosaminoglycan の含有など質も保持されていた .

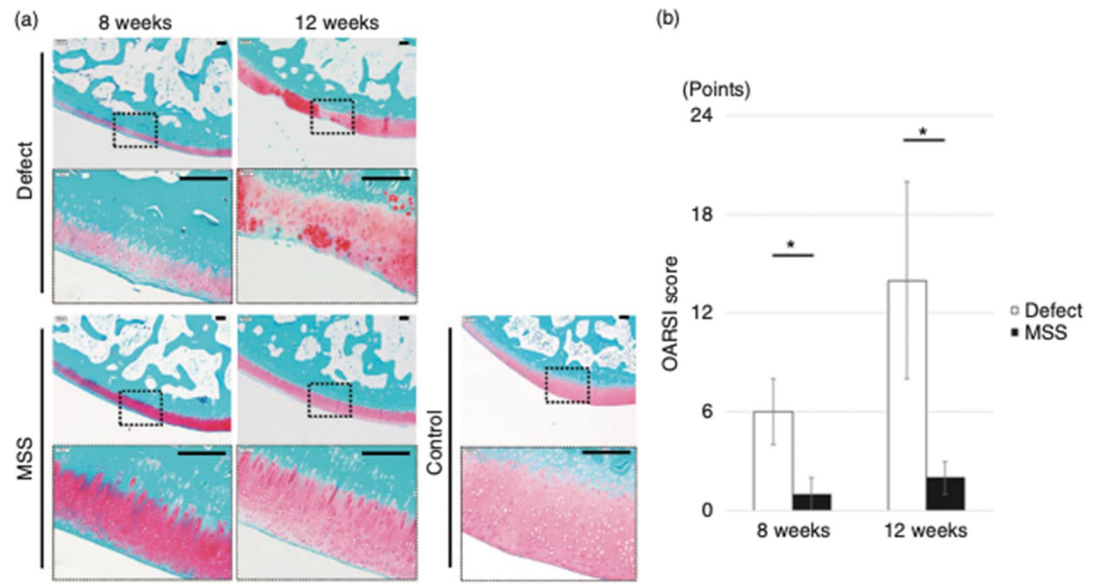


図5：(a)大腿骨内側軟骨の Safranin-O/Fast Green 染色.(b)OARSI スコア.

まとめ.半月板欠損に対するラッピング治療は、早期から半月板治癒の促進に有用であり、組織再生や細胞外基質の成熟促進に有益であった .また、人工硬膜シートより早期に修復させた 2 層性新規半月板シート scaffold は、PGA が自己組織に接触することが早期に自己組織に置換されることに繋がると考えられた (Ikeda, Otsuki et al. J Biomat Appl. 2021) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuniaki Ikeda, Shuhei Otsuki, Nobuhiro Okuno, Shunsuke Sezaki, Kosuke Nakagawa, Yuki Miyamoto, Yoshinori Okamoto, Hitoshi Wakama, Tomohiro Okayoshi, Masashi Neo	4. 巻 36
2. 論文標題 Development of a novel meniscal sheet scaffold and its effectiveness for meniscal regeneration in a rabbit defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biomater Appl.	6. 最初と最後の頁 517-527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/08853282211000523	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 Shunsuke Sezaki, Shuhei Otsuki, Kuniaki Ikeda, Yoshinori Okamoto, Hitoshi Wakama, Tomohiro Okayoshi, Masashi Neo	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of a Pressure-Sensitive Conductive Rubber Sensor for Analyzing Meniscal Injury in Porcine Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Appl Bionics Biomech	6. 最初と最後の頁 4931092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/4931092	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 Shunsuke Sezaki, Shuhei Otsuki, Kuniaki Ikeda, Takashi Ishitani, Yoshinori Okamoto, Hitoshi Wakama, Junya Matsuyama, Kaito Nakamura, Masashi Neo	4. 巻 111
2. 論文標題 Biomechanical assessment of a novel meniscal scaffold compared to partial meniscectomy: A study on porcine meniscal injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomed Mater Res B Appl Biomater.	6. 最初と最後の頁 895-902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.35199.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田邦明、大槻周平、岡本純典、奥野修大、若間仁司、岡吉倫弘、松山洵也、根尾昌志
2. 発表標題 半月板損傷に対する新規シート状scaffoldを用いたラッピング治療の有用性（ウサギを用いた検討）
3. 学会等名 日本整形外科学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 半月板再生基材	発明者 大槻周平、池田邦明、瀬崎峻輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-208522	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

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

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