

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500400

研究課題名（和文）

液性因子処理滑膜由来幹細胞投与による腱マトリクス再構築の制御

研究課題名（英文）

Local administration of autologous synovium-derived cells improve the structural properties of anterior cruciate ligament autograft reconstruction in sheep

研究代表者

近藤 英司 (KONDO EIJI)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60374724

研究成果の概要（和文）：

Ex vivoにおいてTGF-beta1を加えた培地で培養した滑膜由来幹細胞を成羊前十字靭帯（ACL）再建モデルの移植腱周囲に投与（細胞療法）し、それがin vivoで移植腱のマトリクス再構築現象へ与える効果を明らかにした。

（方法）研究には成羊雌サフォーク種50頭を用いた。右膝に対してACL再建を行い、10頭ずつ以下の5群に分けた。I群では何も投与しなかった。II群では、移植腱にfibrinを投与した。III群では、左膝から採取した滑膜細胞を2週間培養して、 $5 \times 10^7$ 個の滑膜由来幹細胞を含むfibrin sheetを作製し移植腱に投与した。IV群では、上述のfibrin sheetにTGF-beta1(10ng/ml)を投与し、その24時間後に移植腱に投与した。V群では、TGF-beta1 20ngをfibrinと混合し移植腱に投与した。各群とも術後12週に各10頭を屠殺して、7頭を力学的評価に、3頭を組織学的観察に供した。

（結果）1)膝前後動揺性と断面積：5群間に有意差はなかった。2)最大破断荷重と線形剛性：IV群とV群は、I群、II群、およびIII群に比べて有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。IV群とV群の間に有意差はなかった。3)組織所見：IおよびII群では移植腱に無細胞領域が観察された。III群、IV群およびV群では細胞が腱深層まで浸潤しており、正常に近い膠原線維の配向を示した。

（考察）本研究はTGF-beta1処理培養自家滑膜由来幹細胞が移植腱の力学的劣化を抑制することを明らかにした。この結果は、「成長因子をEx vivoで与えた細胞」を用いる細胞療法が、他の関節構成体に有害な効果を与えない移植腱の力学的劣化抑制方法として有望である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Background: It is well known that the structural properties of a tendon autograft deteriorate during the remodeling phase after anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction.

Hypothesis: A local application of autologous synovium-derived cells cultured in TGF-beta1-supplemented medium may inhibit the deterioration of structural properties of the tendon graft after ACL reconstruction.

Study Design: Controlled laboratory study

Methods: Fifty-two mature sheep were used in this study. In each animal, the right knee underwent ACL reconstruction using the semitendinosus tendon autograft. Then, the animals were divided into 5 groups of 10 sheep each. No additional treatments were applied in Group 1, while fibrin sealant was applied around the graft in Group 2. In Group 3, autologous synovium-derived cells cultured in standard medium were applied around the graft with fibrin sealant, while autologous synovium-derived cells cultured in TGF-beta1-supplemented medium were applied with fibrin sealant in Group 4. In Group 5, fibrin sealant containing 20-ng TGF-beta1 was applied around the graft. Each animal was sacrificed at 12 weeks after the surgery. In each group, 7 and 3 sheep were used for biomechanical and histological evaluations, respectively. The

remaining two sheep were used to confirm whether the applied cells infiltrated into the graft at 1 week after surgery.

Results: Confocal microscope observations showed that the applied cells that were labeled before implantation infiltrated into the superficial portion of the graft at 1 week. Biomechanically, the maximum load and the stiffness of Groups 4 and 5 were significantly greater than those of Groups 1, 2, and 3. Histologically, necrotic lesions were observed in the core portion of the midsubstance in Groups 1 and 2. In Groups 3, 4, and 5, we could not find any necrotic lesions in the midsubstance.

Conclusions: A local application of autologous synovium-derived cells cultured in TGF-beta1-supplemented medium, or fibrin sealant containing TGF-beta1, significantly inhibit the natural deterioration of the structural properties of the tendon graft after ACL reconstruction.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体制御、治療、靭帯、腱組織、液性因子

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、腱・靭帯組織の修復を促進することを目的として種々の生物学的手法を応用し、マトリクス再構築を人為的に制御することを企図した治療手法の開発が試みられているが、いまだに有効な治療手法の確立に至っていない。研究者らはこれまでの研究で、腱・靭帯に対する *in situ* 凍結解凍処理法を独自に考案し、腱移植の本質である内在性線維芽細胞を選択的に壊死させた理想化自家腱移植モデルを開発し、これを用いて移植腱の構造および力学的特性が劣化する分子機序を明らかにしてきた。この成果を踏まえて、研究者らは力学的特性の自然劣化を人為的に制御する研究に着手し、まず TGF-beta1、などの各種液性因子の局所投与が家兎自家腱移植モデルのマトリクス再構築へ与える効果を検討した結果、TGF-beta1 投与がマトリクスの力学的劣化を最も顕著に抑制することを明らかにした。しかし、TGF-beta1 の関節内直接投与は関節の変性を進行させる可能性があるため、その安全な投与方法の開発が急務であった。そこで研究者は平成 17 年度科学研究費（基盤 C）の補助を受け、家兎 *in situ* 凍結処理靭帯モデルに対して TGF-beta1 で賦活化した滑膜由来幹細胞移植を行い、本移植法がその細胞浸潤を促進し力学的劣化を抑制することを明らかにした。し

かし、臨床応用を目指すこの新規治療理論を完成させるためには、家兎を用いた実験のみでは不十分である。靭帯再建術の研究分野では、人体への応用を企図した最終動物実験には羊または山羊を用いるのが一般的である。そこで今回、成羊を用い臨床的に行なわれている前十字靭帯 (ACL) 再建術を模倣するモデルを開発し、次に家兎 *in situ* 凍結処理靭帯モデルで成功している TGF-beta1 で賦活化した滑膜由来幹細胞移植がこのモデルに与える効果を解明するという着想が得られた。

#### 2. 研究の目的

成羊を用い、臨床的に行なわれている前十字靭帯再建術を模倣するモデルを開発し、その自然経過を生体力学的に明らかにする。Ex vivo において TGF-beta1 を加えた培地で培養した滑膜由来幹細胞を上記のモデルの移植腱周囲に投与し、それが *in vivo* で移植腱のマトリクス再構築現象へ与える効果を生体力学的、および分子生物学的に明らかにし、上述の生体力学および構造学的特性の経時的変化と比較対照する。

#### 3. 研究の方法

Ex vivo において TGF-beta1 を加えた培地で培養した滑膜由来幹細胞を上記のモデルの移植腱周囲に投与し、それが *in vivo* で移植

腱のマトリクス再構築現象へ与える効果を生体力学的、超微細構造学および分子生物学的に明らかにし、生体力学および構造学的特性の経時的变化と比較対照した。

本動物実験は、北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認の下に、同研究科動物実験規約に則って行われた。雌成熟サフォーク種 52 頭を用いた。右膝に対して後述する ACL 再建を行い、10 頭ずつ以下の 5 群に分けた。1 群では何も投与しなかった。2 群では、移植腱に fibrin を投与した。3 群では、左膝から採取した滑膜由来細胞を fibrin に包埋し投与した。4 群では、TGF-beta 処理培養自家滑膜細胞を投与した。5 群では、TGF-beta1 を fibrin と混合し移植腱に投与した。各群とも術後 12 週に各 10 頭を屠殺して、7 頭を力学的評価に、3 頭を組織学的観察 (HE 染色) に供した。残りの 2 頭には、培養細胞をラベル後 3 群と同じ処置を行い、術後 1 週でその細胞浸潤を観察した。

#### 4. 研究成果

1) ACL の長さは、1 群が  $19.1 \pm 2.9\text{mm}$ 、2 群が  $19.6 \pm 1.1\text{mm}$ 、3 群が  $20.2 \pm 1.3\text{mm}$ 、4 群が  $20.0 \pm 1.3\text{mm}$  および 5 群が  $20.3 \pm 1.0\text{mm}$  であった。断面積は、1 群が  $26.7 \pm 9.4\text{mm}^2$ 、2 群が  $32.0 \pm 6.1\text{mm}^2$ 、3 群が  $26.5 \pm 8.5\text{mm}^2$ 、4 群が  $27.7 \pm 6.1\text{mm}^2$  および 5 群が  $26.5 \pm 5.6\text{mm}^2$  であった。ACL の長さおよび断面積において、各群間に有意差は認められなかった。

2) 膝屈曲 60 度における膝前後動揺性に関しては、1 群が  $9.3 \pm 2.2\text{mm}$ 、2 群が  $8.1 \pm 1.0\text{mm}$ 、3 群が  $7.7 \pm 3.1\text{mm}$ 、4 群が  $6.8 \pm 1.7\text{mm}$ 、および 5 群が  $8.5 \pm 0.8\text{mm}$  と各群間に有意差は認められなかった。90 度においては 4 群が 1 群より有意に低値であった。

3) 引っ張り試験における破断様式は全例実質部断裂であった。最大破断荷重に関しては、1 群は  $301 \pm 146\text{N}$ 、2 群は  $211 \pm 141\text{N}$ 、3 群は  $216 \pm 175\text{N}$ 、4 群は  $493 \pm 181\text{N}$  および 5 群は  $572 \pm 152\text{N}$  であり、4 群および 5 群は 1 群、2 群および 3 群と比べて有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。線形剛性に関しても、4 群および 5 群は 1 群、2 群および 3 群と比べて有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。破断伸びに関しては、各群間に有意差は認められなかった。

4) 組織学的所見では、1 群および 2 群では移植腱中央部に無細胞領域が観察された。3 群、4 群および 5 群では細胞が腱深層まで浸潤しており、正常に近い膠原線維の配向を示した。本研究は TGF-beta1 処理培養自家滑膜由来幹細胞が移植腱の力学的劣化を抑制することを明らかにした。この結果は、「成長因子を Ex vivo で与えた細胞」を用いる細胞療法が、他の関節構成体に有害な効果を与えない移植腱の力学的劣化抑制方法として有望である可能性を示した。

#### 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 41 件)

1. Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Kotani Y, Tohyama H. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med* 40(2):315-24,2012 査読有 DOI:10.1177/0363546511426417
2. Yasuda K, Kondo E, Kitamura N, Kawaguchi Y, Kai S, Tanabe Y. A pilot study of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with ligament remnant tissue preservation. *Arthroscopy* 28(3):343-53,2012 査読有 DOI:10.1016/j.arthro.2011.08.305
3. Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Azuma C, Tohyama H. Local administration of autologous synovium-derived cells improve the structural properties of anterior cruciate ligament autograft reconstruction in sheep. *Am J Sports Med* 39(5):999-1007,2011 査読有 DOI:10.1177/0363546510390424
4. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis AA. Biomechanical comparison of anatomic double-bundle, anatomic single-bundle, and nonanatomic single-bundle anterior cruciate ligament reconstructions. *Am J Sports Med* 39(2):279-88,2011 査読有 DOI:10.1177/0363546510392350
5. Kitayama S, Onodera S, Kondo E, Kobayashi T, Miyatake S, Kitamura N, Tohyama H, Yasuda K. Deficiency of macrophage migration inhibitory factor gene delays healing of the medial collateral ligament: a biomechanical and biological study. *J Biomech* 44(3):494-500,2011 査読有 DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.09.018
6. Kawaguchi Y, Kondo E, Kitamura N, Kai S, Inoue M, Yasuda K. Comparisons of femoral tunnel enlargement in 169 patients between single-bundle and anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstructions with hamstring tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*

- 19(8):1249-57,2011 査 読 有  
DOI:10.1007/s00167-011-1455-7
7. Tohyama H, Kondo E, Hayashi R, Kitamura N, Yasuda K. Gender-based differences in outcome after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendon autografts, *Am J Sports Med* 39(9):1849-57,2011 査読有 DOI:10.1177/0363546511408864
  8. Miyatake S, Kondo E, Tohyama H, Kitamura N, Yasuda K. Biomechanical evaluation of a novel application of a fixation device for bone-tendon-bone graft (EndoButton CL BTB) to soft-tissue grafts in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 26(9):1226-32,2010 査読有 DOI:10.1016/j.arthro.2010.01.007
  9. Yasuda K, Tanabe Y, Kondo E, Kitamura N, Tohyama H. Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 26(9 Suppl):S21-34,2010 査読有 DOI:10.1016/j.arthro.2010.03.014
  10. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis AA. Biomechanical comparisons of knee stability after anterior cruciate ligament reconstruction between 2 clinically available transtibial procedures: anatomic double bundle versus single bundle. *Am J Sports Med* 38(7):1349-58,2010 査読有 DOI:10.1177/0363546510361234
  11. Inoue M, Tokuyasu S, Kuwahara S, Yasojima N, Kasahara Y, Kondo E, Onodera S, Yasuda K. Tunnel location in transparent 3-dimensional CT in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with the trans-tibial tunnel technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18(9):1176-83,2010 査読有 DOI:10.1007/s00167-009-0989-4
  12. Yasuda K, Kitamura N, Kondo E, Hayashi R, Inoue M. One-stage anatomic double-bundle anterior and posterior cruciate ligament reconstruction using the autogenous hamstring tendons. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17(7):800-5,2009 査読有 DOI:10.1007/s00167-009-0800-6
  13. Kawabata H, Katsura T, Kondo E, Kitamura N, Miyatake S, Tanabe Y, Setoguchi T, Komiya S, Yasuda K.

Stress deprivation from the patellar tendon induces apoptosis of fibroblasts in vivo with activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biomech* 42(15):2611-5,2009 査読有 DOI:10.1016/j.jbiomech.2009.07.027

[学会発表] (計 120 件)

1. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis AA. Biomechanical comparisons of knee stability after anatomic double-bundle ACL reconstruction between 2 clinically available surgical techniques: trans-tibial versus trans-portal procedures. The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), Moscone West Convention Center, San Francisco, California, USA, February 4-7, 2012
2. Kondo E, Tohyama H, Yasuda K. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after ACL reconstruction in Sheep. The ACL Study Group Meeting 2012 Hotel Terra, Jackson Hole, Wyoming, USA, February 12-16, 2012
3. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis AA. Biomechanical analysis of partial tears of anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament. The 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), The Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA, January 13-16, 2011
4. Kondo E: Graft preparation for anatomic double-bundle ACL reconstruction. ACL Double-bundle Reconstruction Course. University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia, August 12-13, 2010
5. Kondo E: Biomechanics of anatomic double-bundle ACL reconstruction. ACL Double-bundle Reconstruction Course. University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia, August 12-13, 2010
6. Kondo E: Evidence-based outcome of anatomic double-bundle ACL reconstruction. ACL Double-bundle Reconstruction Course. University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia, August 12-13, 2010

7. Kondo E: Evidence-based outcome of anatomic double-bundle ACL reconstruction. ACL. The 54<sup>th</sup> Annual Fall Congress of the Korean Orthopaedic Association. Grand Hilton Hotel, Seoul, Korea, October 14-16, 2010
8. Kondo E, Merican A, Yasuda K, Amis A. Biomechanical evaluation of anatomic double-bundle ACL reconstruction using the Anatomic ACL Guide System: comparisons among 3 different procedures. The ACL Study Group Meeting 2010. February 20-26, 2010, The LeMeridien Beach Resort in Phuket, Phuket, Thailand
9. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis, AA. Biomechanical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using the anatomic ACL guide system: comparisons among 3 different procedures. The 56<sup>th</sup> Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), New Orleans, Louisiana, USA. March 6-9, 2010
10. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis, AA. Biomechanical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using the anatomic ACL guide system: Comparisons among 3 different procedures. The 14<sup>th</sup> Euroean Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy (ESSKA) Congress, Oslo Spektrum and Radisson Blue Plaza Hotel, Oslo, Norway, June 9-12,2010
11. Kondo E, Merican AM, Yasuda K, Amis, AA. Biomechanical evaluation of double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: Comparisons among 3 different procedures. 6<sup>th</sup> World Congress of Biomechanics, Singapore, Singapore Suntec Convention Centre, August 1-6,2010
12. Kondo E, Yasuda K. Technical Considerations in Double Bundle ACL Reconstruction: Trans-tibial Technique. The 7<sup>th</sup> Biennial International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS) Congress, Osaka, Japan, April 5-9, 2009
13. Kondo E: Technical considerations in double bundle ACL reconstruction: Trans-tibial technique. The Combined Meeting of 39<sup>th</sup> Malaysian Orthopaedic Association AGM/Annual Scientific Meeting and WENMISS 2009, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, May 21-23, 2009
14. Kondo E: Graft preparation and fixation in anatomic double-bundle ACL reconstruction. The biomechanics and the procedure. The Combined Meeting of 39<sup>th</sup> Malaysian Orthopaedic Association AGM/Annual Scientific Meeting and WENMISS 2009, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, May 21-23, 2009
15. Kondo E, Ishikawa T, Fujiki H, Daimaruya M, Onodera S, Yasuda K. The influence of genetic ablation of macrophage migration inhibitory factor on healing of the Achilles' tendon: a biomechanical study. The 9<sup>th</sup> International symposium on ligaments & tendon, Las Vegas, NV, USA, February 21,2009
16. Kondo E, Merican A, Yasuda K, Amis A: Biomechanical comparisons between clinically available anatomic double-bundle and single-bundle procedures for anterior cruciate ligament reconstruction, The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), The Venetian Hotel Resort Casino/Sands Expo Convention Center, Las Vegas, Nevada February 22-25,2009
17. Kondo E, Hayashi R, Katsura T, Kitamura N, Miyatake S, Arakaki K, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K. Effects of application of synovial fibroblasts on properties of the graft after ACL reconstruction. The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) The Venetian Hotel Resort Casino/Sands Expo Convention Center, Las Vegas, Nevada February 25-28,2009
18. Kondo E, Hayashi R, Katsura T, Azuma C, Tohyama H, Yasuda K. Local administration of synovium-derived fibroblasts cultured in TGF-beta1-supplemented medium inhibits natural reduction of the structural properties of the tendon autograft after ACL reconstruction: A sheep model study. The 7<sup>th</sup> Biennial International Society of Arthroscopy,

Knee Surgery and Orthopaedic  
Sports Medicine (ISAKOS) Congress,  
Osaka, Japan, April 5-9, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 英司 (EIJI KONDO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60374724

(2) 研究分担者

安田 和則 (YASUDA KAZUNORI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20166507

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)

北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号：00359481

北村 信人 (KITAMURA NOBUTO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80447044

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：