

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16680

研究課題名（和文）半月板欠損に対する脂肪由来幹細胞シートを用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）The new methods for meniscus regeneration using ADSC sheet

研究代表者

大島 健史（Oshima, Takeshi）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20735435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪由来幹細胞シートを使用して作製した再生半月板組織を用いて、力学試験及びコラーゲン等の遺伝子発現解析による評価を行い、また脂肪由来幹細胞シートによる半月板再生のメカニズム探索を行うことを目的とした。脂肪由来幹細胞シートを使用した再生半月板は、引張試験と圧縮試験の結果では力学的に優れており、コラーゲンなどの遺伝子発現量も多かった。半月板再生のメカニズムとして投与された脂肪由来幹細胞が半月板組織周辺の滑膜組織に働きかけ豊富な滑膜組織を半月板欠損部に誘導し半月板再生を促進する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

本研究は、半月板再生に向けた新たな治療法のエビデンス確立に貢献する。本研究は現在欠損すると治療困難とされてきた半月板欠損に対して革新的な新規治療法の開発にむけた非常に重要性が高い基礎研究である。本邦において400万人以上の患者が半月板損傷による膝痛を抱えていると言われている。採取が容易で患者への負担の少ない脂肪由来幹細胞を用いた半月板損傷に対する治療法の開発は健康寿命の増進、医療費の削減にも大きな利点がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the regenerated meniscus tissue using adipose-derived stem cell sheets by mechanical tests and gene expression analysis of collagen and other genes, and also to explore the mechanism of meniscus regeneration using adipose-derived stem cell sheets. The regenerated meniscus using adipose-derived stem cell sheets showed better mechanical properties in the results of tensile and compression tests, and had higher levels of collagen and other gene expression than the regenerated meniscus without adipose-derived stem cell sheets. The results suggested that the mechanism of meniscus regeneration may be that the transplanted adipose-derived stem cells act on the synovial tissue around the meniscus tissue and induce abundant synovial cells around the defect area of the meniscus, thereby promoting meniscus regeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪由来幹細胞シート 半月板 欠損

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

半月板は自然治癒能力が極めて低く、一度切除された半月板は通常再生しないと考えられている。我々はこれまで脂肪由来幹細胞シート(ADSC シート)が半月板再生を促進することを明らかにしてきた(Takata, et al. Arthroscopy 2020、他)。しかし、ADSC シートを使用した再生半月板の力学特性は不明なままである。また、どのように ADSC シートがウサギ半月板再生を促進するのか、そのメカニズムは明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

ADSC シートを使用して作製した再生半月板組織を用いて、力学試験及びコラーゲン等の遺伝子発現解析による評価を行い、また ADSC シートによる半月板再生のメカニズム探索を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

15~17 週齢の日本白色家兎(3.0~3.5kg)を使用し、肩甲骨間の脂肪を採取し、細分化した後に、分離、中和、遠心分離をかけることで ADSC を抽出した。シャーレで培養し、第3継代で細胞がコンフルエンスに達した時点で培養液にアスコルビン酸を添加することで、1週間で剥離可能な ADSC シートが形成された。各ウサギの両膝の内側側副靭帯(MCL)を目安に半月板の前半分を摘出し、片方の膝には ADSC シートを移植し(ADSC 群)、対側の膝は移植せずに閉創した(対照群)。ADSC シート移植から4週間後と12週間後にウサギを屠殺し、力学的評価として引張試験と圧縮試験を行った。遺伝子発現量の評価として、逆転写(RT)PCR法を行い各遺伝子発現量を計測した。半月板再生のメカニズムの探索として再生半月板組織の組織切片を作成マッソントリクローム染色を行い組織像を評価した。引張試験では、再生された部位を含む内側半月板全体をクランプで把持し、試験機に取り付け、3mm/秒の速度で引張試験を行った。圧縮試験では、関節面から5cmのところで大腿骨と脛骨を切断し、靭帯と半月板以外の軟部組織を全て切除した。MCLを切離し、圧力測定フィルムを内側半月板の下に挿入後、40Nの荷重を2分間かけた。圧縮試験後は、靭帯を切離し、脛骨関節面を真上から撮影し、脛骨前半分の関節面に対する再生半月板の比率を被覆率として算出した。また被覆率と加圧面積との相関関係についても調査した。遺伝子発現量の評価ではコラーゲンI型とII型(COL1/2)、SRY-box 転写因子9(SOX9)、アグリカン(ACAN)遺伝子のRNA発現量をGAPDHの発現量で除してADSCシート投与側と対照側の間で比較検討した。また投与された脂肪由来幹細胞の動態を探るため、DiI標識したADSCシートを移植し術後2週時にADSCの膝関節内での位置を観察した。

### 4. 研究成果

引張試験では、4週目の弾性率、最大引張強度は対照群と比較し有意差はなかった(それぞれ $p=0.059$ 、 $p=0.054$ )が、12週目の弾性率(ADSC群:  $70.30 \pm 18.50$  MPa、対照群:  $43.71 \pm 7.11$  MPa、 $p=0.009$ )と最大引張強度(ADSC群:  $22.69 \pm 5.87$ N、対照群:  $15.45 \pm 4.08$ N、 $p=0.038$ )はADSC群の方が高かった。圧縮試験における加圧面積は4週目(ADSC群:  $31.60 \pm 8.17$  mm<sup>2</sup>、対照群:  $20.33 \pm 2.86$  mm<sup>2</sup>、 $P=0.024$ )および12週目(ADSC群:  $41.07 \pm 6.09$  mm<sup>2</sup>、対照群:  $30.53 \pm 5.47$  mm<sup>2</sup>、 $P=0.039$ )にはADSC群が対照群より大きかった。最大圧力は4週目では有意差はなかったが(ADSC:  $14.94 \pm 1.24$  MPa、control:  $15.89 \pm 1.38$  MPa、 $P=0.88$ )12週目ではADSC群で有意に低かった(ADSC:  $11.91 \pm 1.03$  MPa、control:  $15.53 \pm 2.3$  MPa、 $P=0.002$ )。4週目におい

て、ADSC 群は対照群に比べ有意に高い被覆率を示した( ADSC :  $55.2 \pm 4.5\%$ 、対照群 :  $42.0 \pm 6.7\%$ 、 $P=0.002$  )。12 週目では、被覆率に両群間で有意差はなかったが ( ADSC :  $61.5 \pm 4.6\%$ 、対照群 :  $53.7 \pm 5.1\%$ 、 $P=0.11$  ) ADSC 群における被覆率は正常半月板 (  $62.0 \pm 0.01\%$  ) と同程度であった。被覆率と加圧面積の間には有意な正の相関を認めた (  $r=0.82$  ,  $P<0.001$  )。RT-PCR では、4 週時の COL2 と SOX9 と 12 週時の COL2 を除きすべての遺伝子で ADSC シート投与側で有意に高い RNA 発現を示した。組織切片をマッソントリクローム染色し観察すると、ADSC シート投与側では豊富な滑膜様組織が 4 週時に再生組織の表面を覆い、12 週時には減少していた。対照側では滑膜組織は 4 週時にはほとんど認めず、12 週時に再生組織の表面に少量認めた。ADSC の動態評価では、DiI 標識された ADSC は膝関節の内側コンパートメントにのみ存在し、特に半月板欠損部と裏打ちする滑膜組織と関節包に存在していた。

これらより、ADSC シート投与群の再生半月板は対照群より力学的に優れておりコラーゲンなどの遺伝子発現量も多かった。半月板再生のメカニズムとして投与された ADSC が半月板組織周辺の滑膜組織に働きかけ豊富な滑膜組織を半月板欠損部に誘導し半月板再生を促進した可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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