

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390365

研究課題名(和文) 膝前十字靭帯再建術における血管幹細胞応用の可能性

研究課題名(英文) Therapeutic potential of vascular stem cells for ACL reconstruction surgery

研究代表者

黒坂 昌弘 (KUROSAKA, MASAHIRO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70170115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：前十字靭帯損傷患者に対する自家損傷部組織を併用した前十字靭帯再建術の第Ⅰ相臨床試験の実現を目的とした。ラット、イヌの動物ACL再建モデルを用いてその有効性を確認し、学会、紙面に公表した。さらに当院倫理委員会承認のもと、「前十字靭帯損傷患者に対する自家損傷部組織を併用した前十字靭帯再建術の第Ⅰ相臨床試験」を開始し、5症例に本治療を適応した。全例でその安全性は確認されたが、臨床スコアにおいての有効性は見いだせなかったため、試験を終了とし、学会、紙面に報告した。今後は有効性を向上させる患者個々に特性による細胞の治癒能を追求する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to perform "Anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction with autologous ruptured tissue for patients with ACL injury." and assess the safety and efficacy. Prior to the clinical trial, we confirmed the efficacy of CD34+ cell or ruptured tissue transplantation for ACL reconstruction in rat and canine ACL reconstruction model. These series exhibited the reduction of tunnel enlargement by the treatment. So, we performed pilot study in which 5 patients were enrolled for tissue transplantation group and 5 patients for conventional ACL reconstruction group. The results showed the reduction of tunnel enlargement in the tissue group despite of no significant difference in clinical scores. So, we have to seek for the factors influencing on the efficacy of this treatment in future.

研究分野：整形外科学

キーワード：膝前十字靭帯 再生医療 組織移植

## 1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯(ACL)損傷は、膝のスポーツ傷害の中で最も高頻度に生じるものの一つであり、自然治癒能に乏しいために、損傷前安定膝の再獲得、後発する半月損傷・変形性関節症防止のために自家腱移植による ACL 再建術を行うのが通常とされ、とりわけスポーツ復帰を切望する症例では必須とされている。近年の手術技術の著しい発展により、骨付き膝蓋腱、ハムストリング腱を用いた解剖学的再建術を行うことで損傷前の生理的・運動学的安定膝を獲得することが可能になっている。しかし一方で、力学的ストレスに耐えうる移植腱(特に骨-腱間結合)に成熟するまでに6~12ヶ月を要し、スポーツ復帰を妨げる主要因になっている。これらの背景により、早期復帰を目的に、早期に強度な骨-腱間結合治癒を獲得するための新たな手法の確立が待たれている。

近年著しい飛躍を遂げている幹細胞研究の分野では、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell)、血管周囲細胞(pericyte)のマーカーとして知られているCD34,CD146陽性の血管由来幹細胞が注目されている。これらの科学的背景により、CD34/CD146陽性細胞は新たな血管を再生・新生させるだけでなく骨にも直接分化しうる点で、血管/骨再生・新生を通じた早期骨-腱間結合治癒をもたらすことは想像に容易である。また、急性期ACL損傷における関節鏡視下所見において、血腫組織が付着した損傷部によく遭遇し、後十字靭帯、大腿骨顆部などの異所性に付着治癒しているケースもみうけられる。

## 2. 研究の目的

「ACL損傷部に集積する細胞群はCD34,CD146表面マーカーを有し、高い増殖能・多分化能を備える血管由来幹細胞であり、これらの細胞群はACL再建術後の骨-腱間

結合治癒を促進する」という仮説を立証し、「前十字靭帯損傷患者に対する自家損傷部組織を併用した前十字靭帯再建術の第Ⅰ相臨床試験」の実現を目指すものである。CD34,CD146陽性細胞群を純化し、細胞移植を行うことも重要であるが、その過程には組織採取のためのPrimary surgery、細胞群分離・培養、細胞移植を併用したSecondary ACL reconstruction surgeryといった段階的で複雑な行程を経る必要があり、臨床応用実現のためのハードルが高い。したがって、臨床応用実現を視野にいれ、幹細胞を豊富に含むACL損傷組織移植をACL再建術に併用することは理想の治療といえる。

## 3. 研究の方法

平成23年度、24年度は予備実験で得られているACL損傷組織におけるCD34、CD146細胞群の幹細胞の特性を詳細に解析・確認し、すでに確立され予備実験済みであるラット、イヌの動物ACL再建モデルを用いてその有効性を確認することで前臨床試験とする。最終年度である25年度には「前十字靭帯損傷患者に対する自家損傷部組織を併用した前十字靭帯再建術の第Ⅰ相臨床試験」の準備・実施を行い、その新規治療法の安全性・有効性を確認する。

## 4. 研究成果

平成23年度、24年度においては、(1)ラット、(2)イヌの動物ACL再建モデルを用いてその有効性を確認し、学会、紙面に公表した。ACL損傷部組織の骨-腱間結合治癒能に対する効果が前臨床試験的に証明されたことより、さらに当院倫理委員会承認のもと、「前十字靭帯損傷患者に対する自家損傷部組織を併用した前十字靭帯再建術の第Ⅰ相臨床試験」を開始し、5症例に本治療を適応した。全例でその安全性は確認され、また、ACL損傷部組織移植群(5症例)は非移植群(5症例)と比較してCTによる骨孔定

量評価において、有意に骨孔拡大が減少している傾向が見られた。しかし、臨床スコアにおいての有効性は見いだせなかったため、試験を終了とし、学会、紙面に報告した。本治療法は細胞分離・培養等の過程も必要なく従来通りの一回の関節鏡手術で完結でき、かつ効果的な治療法として新たな戦略となりうる可能性がある。

平成 25 年度には有効性の向上を目指し、さらに ACL 損傷部組織の特性解析を行い、年齢、性別、受傷から手術までの期間等の患者特性による解析を行った。結果として、10 代、20 代、30 代の患者から採取した ACL 細胞では、in vitro での細胞特性評価において 10 代群で有意に細胞増殖能、骨芽細胞・血管内皮細胞分化に優れていることが判明し、また免疫不全ラット ACL 再建動物モデルにヒト細胞を移植する系において、10 代群で骨 - 腱間結合治癒能に対する効果が優れていることを組織学的・力学的評価において確認された。

現在は同様の実験系において受傷期間の及ぼす影響を検討中である。

#### 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 4 件)

1. Matsumoto T, Kubo S, Sasaki K, Kawakami Y, Oka S, Sasaki H, Takayama K, Tei K, Matsushita T, Mifune Y, Kurosaka M, Kuroda R. Acceleration of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament graft using autologous ruptured tissue. *Am J Sport Med* 40(6): 1296-1302, 2012
2. Matsumoto T, Kuroda R, Matsushita T, Araki D, Hoshino Y, Nagamune K, Kurosaka M. Reduction of Tunnel Enlargement with Autologous Use of Ruptured Tissue in Anterior Cruciate

Ligament Reconstruction: A Pilot Clinical Trial. *Arthroscopy* 30(4):468-74, 2014

3. Uefuji A, Matsumoto T, Matsushita T, Ueha T, Shurong Z, Kurosaka M, Kuroda R. Age-related Differences in Anterior Cruciate Ligament Remnant Vascular-Derived Cells. *Am J Sport Med* 42(6):1478-1486, 2014
4. Nakano N, Matsumoto T, Takayama K, Matsushita T, Araki D, Uefuji A, Nagai K, Zhang S, Inokuchi T, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Age-healing potential of anterior cruciate ligament remnant-derived cells. *Am J Sport Med* 43(3): 700-8, 2015

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Matsumoto T, Kubo S, Sasaki K, Kawakami Y, Oka S, Takayama K, Sasaki H, Tei K, Ueha T, Matsushita T, Mifune Y, Kurosaka M, Kuroda R. Acceleration of Tendon-Bone Healing of Anterior Cruciate Ligament Graft Using Autologous Ruptured Tissue. at 58th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, February 4-7, 2012: New Orleans, USA.
2. Matsumoto T, Kuroda R, Matsushita T, Oka S, Kurosaka M. Biological Enhancement of ACL healing. 9th Biennial ISAKOS congress, May 12-16, 2013: Tronto, Canada.
3. 上藤淳朗, 松本知之, 松下雄彦, 川上洋平, 岡真也, 西澤勇一郎, 松崎時夫, 長井寛斗, 黒田良祐, 黒坂昌弘. 膝前十字靭帯由来細胞の細胞特性における年齢による差異の検討. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013.10.17-18、千葉
4. Matsumoto T, Kuroda R, Matsushita T, Araku D, Kawakami Y, Takayama K, Nagamune K, Kurosaka M. Anterior Cruciate Ligament Reconstruction with Autologous Ruptured Tissue. at Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons

2014, March 11-15, 2014: San Antonio, USA.

5. Uefuji A, Matsumoto T, Matsushita T, Ueha T, Shurong Z, Kurosaka M, Kuroda R. Age-related Differences in Anterior Cruciate Ligament-derived Cells. at 60th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, March 15-18, 2014: San Antonio, USA.
6. Matsumoto T, Kuroda R, Matsushita T, Araku D, Kawakami Y, Takayama K, Hoshino Y, Nagamune K, Kurosaka M. Anterior Cruciate Ligament Reconstruction with Autologous Ruptured Tissue. at 1st Congress of Asia-Pacific knee, Arthroscopy and Sports Medicine Society (APKAS), April 14-15, 2014: Nara, Japan.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒坂 昌弘 (KUROSACA Masahiro)  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：70170115

### (2)研究分担者

松本 知之 (MATSUMOTO Tomoyuki)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50546588

### (3) 研究分担者

松下 雄彦 (MATSUSHITA Takehiko)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40467650

### (3) 研究分担者

黒田 良祐 (KURODA Ryosuke)  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：80379362