

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592275

研究課題名(和文)パラバイオシスラットを利用した半月板損傷修復過程解明と組織修復への応用

研究課題名(英文)Circulating nucleated peripheral blood cells contribute to early-phase meniscal healing

研究代表者

箕田 行秀 (Minoda, Yukihide)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90453133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：半月治癒過程で血流の重要性が言われている。半月修復に貢献する細胞のうち、血流細胞の関与を検討するためGFPラットと野生型ラットのパラバイオシスラットを用いて、半月欠損部の修復過程を検討した。パラバイオシスラット作製後4週で半月板部分切除し、その1,2,4,8,12週の組織を検討した。血流細胞関与率は1週22.3%、2週8.8%、4週4.2%、8週1.3%であった。初期1週で血流由来細胞の多くはマクロファージ由来細胞であった。術後12週でごく一部にcol2陽性細胞が見られ、初期には血流からマクロファージが遊走、組織貪食後に組織修復がなされていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to assess how peripheral blood cells (PBCs) contribute to meniscus repair, using a parabiotic rat model. The anterior part of the medial meniscus of parabiotic rat was removed. At 1, 2, 4, 8 and 12 weeks post-meniscectomy, repaired tissue was evaluated using stereomicroscopy. The ratios of PBCs in the repaired meniscus were 20.5% at 1 week, 8.3% at 2 weeks, 4.4% at 4 weeks, 2.1% at 8 weeks, post-meniscectomy. Histologically, fibrochondrocytes were observed in the repaired meniscus of WT rats after 4 weeks, some of which were GFP-positive. The chondrogenic marker, type II collagen, was merged within the PBCs in the repaired tissue. However, type-II-collagen-positive cell ratio and metachromasia in the repaired meniscus were not equivalent in normal meniscal tissue. This indicated that PBCs were present within the repaired meniscus at an early phase, replacing the excised meniscal cells, suggesting PBCs contributed to meniscal healing.

研究分野：関節再建外科

キーワード：半月修復 パラバイオシス 血流由来細胞 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

半月板損傷はスポーツ選手に多い傷害であるが、特に無血行野に障害が生じた場合は、組織修復能力が低いいためその摘出を余儀なくされてきた。しかし、摘出後、受傷前と同じレベルでのスポーツ復帰は困難であり、長期的には軟骨損傷、変形性関節症が高率に発生する。また、修復術後も治癒不全の例もみられる。この状況を打破する鍵は、未だ不明な点が多い半月板損傷の修復メカニズムを解明することである。半月板修復の過程で動員される細胞の同定や、その細胞を増殖・分化させる因子が解明できれば、その因子の投与によって自然修復が促進するだけでなく、倫理・コスト面で障害の多い細胞培養移植治療が不要となる。細胞培養を必要としない自然修復促進方法を開発することによりこの問題を解決することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

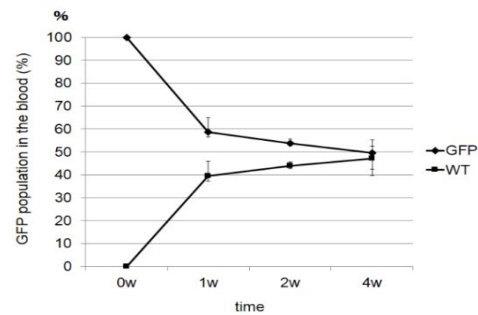
半月板損傷はいったん損傷すると、その治癒は困難であるが、過去の報告では血流の豊富な半月血行野では治癒良好であると言われていることから、血流の関与が強いと考えられる。今回、半月修復に貢献する細胞のうち、Circulation cell の関与を検討するため GFP ラットと野生型ラットのパラバイオシスラットを用いて、半月欠損部の修復過程を検討した。

3. 研究の方法

使用動物は、野生型 (WT) Lewis ラット 4 週齢メスと、GFP transgenic ラット 4 週齢メスを用いた。まず、麻酔としてケタラルール (50 mg/mL; 三共社製) とキシラジン (0.2 mg/mL; Bayer HealthCare 社製) を 10:3 の比で 1 mL/kg 体重量で皮下注射を行い、それぞれ一対の側腹結合 (パラバイオシス) モデルを Nishizawa らの方法に準じて作製した。作製後、末梢血白血球中の GFP 陽性率をフローサイトメトリー (FACS caliber, Becton Dickinson 社製) にて計測し、互いの血流が均一化した 4 週間後 (Fig.1) に、前述と同様の麻酔方法で双方の片膝を関節切開し、内側半月を展開し、内側側副靭帯レベルから前方部分を切除しそのま

ま閉創した。手術後特に運動制限は設けなかった。

Fig1



切除術後 1、2、4、8、12 週で犠牲死させ、自然修復した半月組織を採取し、以下の検討を行った。

(1) 修復半月中の Circulation cell 有無の評価

WT 側半月を実体顕微鏡で観察し GFP 蛍光状態を評価した。また、凍結切片にて WT 側半月における抗ラット GFP 抗体 (MBL 社製) を用いて免疫染色を DAB 法にて検討した。さらに倒立型共焦点レーザー顕微鏡を用いて WT 側半月上に蛍光発色した GFP 陽性細胞数を各時点で計測した。核染色には DAPI を使用した。WT 側半月上に蛍光した GFP 陽性細胞は末梢血を經由した Circulation cell と考えられるため、GFP 陽性細胞数を総細胞数で除し、WT 側と GFP 側ラットの血流が同率で交通している前提から、実際の血流関与率は計測値の倍値と考えられ、Circulation cell 関与率を $(2 \times \text{GFP と DAPI 共陽性数} / \text{総細胞数}) \times 100(\%)$ と計算した。一方、GFP 側は GFP と共陽性とならない DAPI 単独陽性数を血流由来細胞とみなし、血流関与率は $(1 - 2 \times \text{GFP と DAPI 共陽性数} / \text{総細胞数}) \times 100(\%)$ と計算した。

(2) 修復組織の質的評価

GFP ラットと野生型ラットの側腹部皮膚を縫合するパラバイオシスラットを作成する。2 週間経過すると血行路が形成され、修復組織の凍結組織切片を作製し、Toluidine blue 染色による細胞外基質評価を行った。また、倒立型共焦点レーザー顕微鏡を用いて抗 Col2 抗体を用いて評価した。

(3) 修復初期に動員される細胞の同定

一般的に組織修復の初期にはマクロファージ () の集積が見られ、初期には炎症性マクロファージ

(M1) その後組織修復マクロファージ(M2)が集積することが知られていることから注目し、初期に集積する細胞群の同定のための実験を行った。前述したパラバイオシスモデルの半月切除後1,2週のWT側半月凍結切片を抗CD68抗体、抗CD163抗体を用いて免疫染色を行った。観察は蛍光顕微鏡で行い、強拡大でみられる半月修復部の全細胞数をDAPI陽性数で計測し、Circulation cellであるGFP陽性細胞数、M1であるCD68陽性細胞数、M2であるCD163陽性細胞数を計測、DAPI陽性数で除することで、GFP、CD68、CD163陽性率を検討した。Circulation cell中のCD68 or CD163陽性Mの割合をCD68 or CD163+/GFP+、CD68 or CD163陽性M中のCirculation cellの割合をGFP+/CD68+ or CD163で検討した。

4. 研究成果

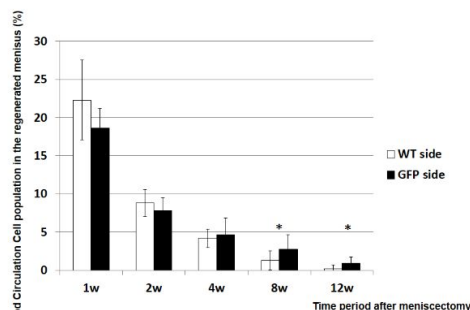
(1)実体顕微鏡では半月切除後1週の組織で修復した組織を認めた。WT側半月の蛍光顕微鏡観察では、GFP陽性領域が半月切除術後1週で最も大きく蛍光しており、徐々にその範囲は縮小した。また、凍結切片標本による観察においても、内側半月切除1週の修復組織において抗GFP抗体を用いた免疫染色で、多くのGFP陽性細胞を認めた(Fig.2)レーザー蛍光顕微鏡でのGFP蛍光を認め、経時的にGFP陽性領域は減少した。前述の公式に基づいて計算したCirculation関与率はWT側半月において1週で $22.3\% \pm 3.9\%$ 、2週で $8.8\% \pm 1.3\%$ 、4週で $4.2\% \pm 0.9\%$ 、8週で $1.3\% \pm 0.9\%$ 、12週で $0.2\% \pm 0.4\%$ であった。一方、GFP側半月では1週で $18.7\% \pm 1.8\%$ 、2週で $7.7\% \pm 1.2\%$ 、4週で $4.7\% \pm 1.6\%$ 、8週で $2.8\% \pm 1.4\%$ 、12週で $0.9\% \pm 0.6\%$ であった。1週と比べて8週以降で有意に減少し、WT側GFP側で各週間での有意差は

認めなかった

(Fig.3)

(2)修復組織の質的評価としてToluidine blue染色を行ったが、12週の時点で

Fig3



も正常半月と同様の染色は得られず、抗Col2抗体を用いた免疫染色でも、12週の時点で正常と比べて染色は乏しかった(Fig.4)

(3)CD68陽性細胞は術後修復半月全体に分布しており、術後1週で13.3%存在したが(fig5)術後2週ではその数は減じ、1.4%であった。CD163陽性細胞は術後1週と2週で5.6%、3.6%で差はな

かったが、術後2週で半月表面に位置する傾向があった。CD68+/GFP+は1週64.9%、2週15.8%、GFP+/CD68+は1週49.3%、2週42.9%であり、初期のCirculation cell中2/3は炎症性であることが分かった。またCD68陽性細胞の起

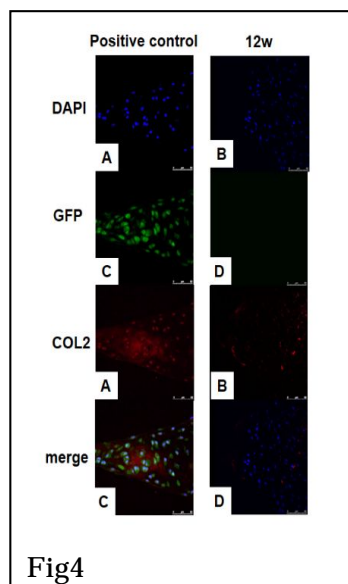


Fig4

源はほとんどがCirculation cell由来であることが分かった。CD163+/GFP+は1週19.4%、2週12.1%、GFP+/CD163+は1週38.5%、2週18.9%であったことから、組織修復に関わるM2は初期にはCirculation cell中20%程度の関与であり、CD163陽性細胞の起源は初期に80%程度を占めるが、2週間後には40%程度となり、resident由来細胞の関与が示唆された。

考察

本研究は、半月損傷後の自然修復における末梢血流の関与をCirculation cellを標識して検討し、

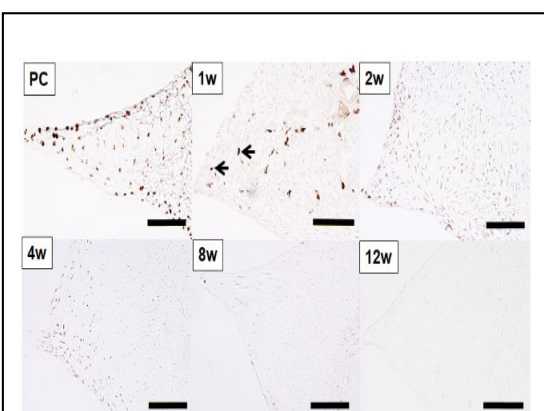
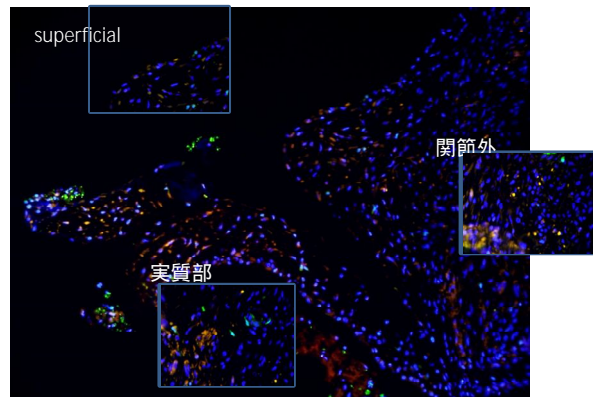


Fig2

Fig5



経時的に評価し得た初めての報告である。これまでに組織修復における末梢血流の関与を検討した論文は散見され、Kumagaiらは骨折治癒モデルにおいて、同様にWTラットとGFPラットとのパラバイオシスモデルにおいて骨折後2週で10.8%、4週で8.0%の血流関与を報告している。また、Okanoらは、軟骨修復を同様にパラバイオシスラットモデルで検討しており、軟骨損傷後1週で54%、4週で14%、24週で0%の血流関与を報告している。さらにSongらは皮膚欠損を作製したマウスのパラバイオシスモデルにおいて、損傷後3日で57%、7日目で38%のCirculation cellの関与を認めたと報告している。本研究では半月切除後1週で約20%、2週で約8%のCirculation cellの関与を示すことができた。過去の報告と割合の差に関しては、動物種の問題、各組織の元々の血行の分布率などに依存するため、直接的な比較はできないが、どの報告も経時的にCirculation cellの割合が減少していくということは一致していた。つまり、末梢血由来の細胞は修復後早期に強く影響し、修復が進むにつれてその関与は弱くなる可以说。さらに初期反応として末梢血由来細胞の8割はで占められており、他の臓器の組織修復と同様に、炎症性の関与が示唆された。しかしながら2週では炎症性は著減し、組織修復に関わることがhost由来とCirculation cell由来が協調して組織修復に関与していることが示唆された。

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 13 件)

Takigami J, Hashimoto Y, Yamasaki S, Terai S, Nakamura H. Direct bone-to-bone integration between recombinant human bone morphogenetic protein-2-injected tendon graft and tunnel wall in an anterior cruciate ligament reconstruction model.

Int Orthop. 2015. in press. (査読有)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Terai S, Takigami J, Takahashi S, Nakamura H. Proposed Referential Index to Resect

Femoroacetabular Cam-Type Impingement During Arthroscopy Using a Cadaveric Hip Model. Arthroscopy. 2015 in press. (査読有)

Minoda Y, Yoshida T, Sugimoto K, Baba S, Ikebuchi M, Nakamura H. Detection of Small Periprosthetic Bone Defects after Total Knee Arthroplasty. J Arthroplasty. 2014;29:2280-4. (査読有)

Minoda Y, Nakagawa S, Sugama R, Ikawa T, Noguchi T, Hirakawa M, Nakamura H. Intraoperative assessment of midflexion laxity in total knee prosthesis. Knee. 2014;21:810-4. (査読有)

Minoda Y, Hata K, Iwaki H, Ikebuchi M, Hashimoto Y, Inori F, Nakamura H. No difference in in vivo polyethylene wear particles between oxidized zirconium and cobalt-chromium femoral component in total knee arthroplasty. KSSTA 2014;22:680-6. (査読有)

Takigami J, Hashimoto Y, Yamasaki S, Terai S, Nakamura H. A case of asymptomatic bilateral massive pulmonary embolism after arthroscopic multiple knee ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2014 in press. (査読有)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Takigami J, Terai S, Takahashi M, Wakitani S, Nakamura H.

Circulating nucleated peripheral blood cells contribute to early-phase meniscal healing. J Tissue Eng Regen Med. 2014 in press. (査読有)

Minoda Y, Kobayashi A, Ikebuchi M, Iwaki H, Inori H, Nakamura H. Porous tantalum tibial component prevents periprosthetic loss of bone mineral density after total knee arthroplasty for five years -a matched cohort study-Journal of Arthroplasty. 2013;28:1760-4. (査読有)

Minoda Y, Watanabe K, Iwaki H, Takahashi S, Fukui M, Nakamura H. Theoretical risk of anterior femoral cortex notching in total knee arthroplasty using a navigation system. Journal of Arthroplasty.2013; 28:1533-7. (査読有)

橋本祐介 円板状半月損傷に対する形成・縫合術の適応と術後スポーツ復帰 臨床スポーツ医学 31 巻 12 号 1180-1186. 2014 (査読無)

橋本祐介 股関節鏡視下手術を行う上で必要な解剖学的知識 関節外科 33 巻 2 号 20-25 2014 (査読無)

箕田行秀 変形性膝関節症に対する手術療法のトピックス 大阪臨床整形外科医学会報 39:82-86,2013. (査読無)

箕田行秀, 小林章郎, 格谷義徳, 岩城啓好, 岩切健太郎. 忘れてはいけないポリエチレン摩耗 整形外科・災害外科 56(3):1151-1156,2013. (査読無)

[学会発表](計 11 件)

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura H. Assymetric Tibial Component Reduced The Risk Of Malrotation In TKA. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03.28 Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura

H. Comparison Of In Vivo Polyethylene Wear Particles Between Mobile- And Fixed-bearing TKA In The Same Patients. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03. 28 Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y, Kondo Y, Kadoya Y, Kobayashi A, Nakagawa S, Hirakawa M, Noguchi T, Higuma Y. Joint Gap At 120° In Flexion Is A Predictor Of Postoperative Flexion Angle After TKA. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03. 28 Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura H. Mobile-bearing TKA Reduced The Anteroposterior Displacement Comparing To Fixed-bearing TKA In The Same Patients. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03. 28 Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura H. Mobile-bearing Tka Reduced The Postoperative Anteroposterior Laxity Comparing To Fixed-bearing TKA In The Same Patients. 61st Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) 2015.03. 28 Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura H. Assymmetric Tibial Component Reduced The Risk Of Malrotation In TKA 61st Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) 2015.03.28 Las Vegas, NV, USA.

Itokazu M, Minoda Y, Ikebuchi M, Mizokawa S, Yoshida T, Yamamura K, Nakamura H. Measured Resection Technique Does Not Always Results In Rectangular Flexion Joint Gap In TKA. Annual meeting of American

Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS).
2014.03.15 New Orleans, LA USA.
Minoda Y, Hata K, Mizokawa S, Ohta Y,
Itokazu M, Yamamura K, Nakamura H.
Sequentially Annealed Highly Cross-linked
Polyethylene Reduced In Vivo Wear Particle
Generation In TKA. 60th Annual meeting of
Orthopaedic Research Society (ORS) 2014.03.
15 New Orleans, LA USA.
Minoda Y, Mizokawa S, Ikebuchi M, Ohta Y,
Itokazu M, Yamamura K, Sugimoto K, Baba S,
Kasai A, Nakamura H. The Detection of Small
Periprosthetic Bone Defects in TKA using a
Novel Technique of Tomography. 60th Annual
meeting of Orthopaedic Research Society
(ORS) 2014.03. 15 New Orleans, LA USA.
Yamasaki S, Hashimoto Y, Nakamura H.
Contribution of Circulation Cells to
Meniscus Healing in Early Phase. 60th Annual
meeting of Orthopaedic Research Society
(ORS) 2014.03. 15 New Orleans, LA USA.
Yusuke Hashimoto, Shinya Yamasaki, Junsei
Takigami, Shouzaburo Terai, Kunikazu
Kaneda, Tomohiro Tomihara, Hiroaki
Nakamura. Occurrence of Osteochondritis
dissecans after surgery is different for
resection pattern with complete discoid
lateral meniscus in juvenile knees. The
16th ESSKA Congress. 2014.5.8 Amsterdam
Holland

〔図書〕(計 1 件)

橋本祐介、半月板再生 再生医療叢書第6巻骨
格系 160-178. 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

箕田 行秀 (MINODA, Yukihide)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)

・講師

研究者番号: 90453133

(2)研究分担者

橋本祐介 (HASHIMOTO, Yusuke)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)

・講師

研究者番号: 10382178

中村博亮 (NAKAMURA, Hiroaki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)

・教授

研究者番号: 60227931

岩城啓好 (IWAKI, Hiroyoshi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)

・准教授

研究者番号: 20381981

脇谷滋之 (WAKITANI, Shigeyuki)

武庫川女子大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号: 70243243