

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791546

研究課題名(和文) 遺伝子導入・培養半月板移植による半月板損傷の修復促進と半月板再生

研究課題名(英文) Promotion of meniscal healing and regeneration

研究代表者

古松 毅之 (Furumatsu, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20432651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膝関節内のクッションとしてはたらく半月板は、断裂などの損傷をきたすと自然に治癒しにくい。その理由としては、血管が存在しないエリアが半月板に存在すること、半月板細胞の特徴が軟骨細胞に似ていること、日常生活における歩行や膝の曲げ伸ばしなどで常に過剰なストレスにさらされていることなどが挙げられる。今回の研究では、適切なストレスが半月板細胞の治癒能力を増加させることが判明した。これらの成果は、半月板損傷に対する手術方法や手術後のリハビリテーションを最適化し、治療成績を向上させる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The meniscus has several functions such as shock absorption and load distribution by controlling complex biomechanics of the knee joint. Treatments for meniscal injuries still have many clinical issues because of a poor healing status of the meniscus. Our study demonstrated that an appropriate mechanical stress increased the anabolic potential of the meniscus cells. These results will help to promote the healing of meniscal injuries.

研究分野：整形外科(膝関節・スポーツ医学)

キーワード：半月板 半月板修復 半月板再生 半月板移植 メカニカルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、半月板損傷に対する関節鏡視下縫合術は、飛躍的な進歩を遂げている。しかし、非血行領域に対する縫合術の成績は不安定であり、半月板の自己修復力には限界がある。これまでに、非血行 (inner) 領域における半月板修復を目的とし、血管新生誘導因子を塗布した系による半月板縫合も試みられているが、その成績は不良である。その理由として、inner 領域に特異的に存在する軟骨様細胞 (inner 細胞) と、線維軟骨組織に似た特徴的な細胞外基質 (ECM) が、半月板修復を妨げているものと考えられる。

## 2. 研究の目的

半月板 inner 領域損傷に対する治療成績が未だ不良であること・半月板縫合術の適応拡大を図ると同時に半月板治癒率の向上を目指す必要があることから、申請者は、半月板内部に存在する細胞を、生理的なメカニカルストレスの負荷や遺伝子導入により賦活化することで半月板の自己修復能を促進することを目的とした。

## 3. 研究の方法

半月板 inner 領域に存在する II 型コラーゲンの産生には、半月板細胞においても軟骨細胞と同様に軟骨細胞分化を制御する転写因子 SOX9 の活性化が重要である。また、半月板細胞に対する機械的伸張刺激も、SOX9 発現、ECM 産生、および成長因子 Ccn2 分泌の維持に重要であることを示唆する結果が得られている。これらのことから、半月板細胞の分離・培養、細胞増殖能の解析、遺伝子発現の評価などは申請者の先行研究に準じて行った。

また、周期的伸張刺激負荷による転写因子 SOX9 の核内移行および II 型コラーゲンエンハンサーに対する結合能は、免疫組織学的手法・western blot・クロマチン免疫沈降法などを用いて解析した。TGF-beta の細胞内シグナル伝達因子である Smad3 の核内移行や SOX9 との結合も同様の手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

半月板 inner 細胞に細胞内骨格の構成を制御する ROCK に対する阻害剤を添加し、培養することで SOX9・COL2A1 の発現が上昇した。また、ROCK 阻害剤添加により、半月板 inner

細胞における SOX9・Smad2/3 の核内への集積が増加していた。Western blot による解析で ROCK 阻害剤添加により核内に存在する SOX9 は 1.3 倍、Smad2/3 は 4.8 倍に増加していた。

本研究により、ROCK のはたらきを阻害することは半月板 inner 細胞における SOX9・Smad2/3 の核内移行を促進し、COL2A1 の発現を増強することが明らかとなった。これらの結果から、ROCK 阻害は SOX9-Smad2/3 転写複合体の形成を誘導することで、半月板 inner 細胞の軟骨細胞様形質を維持している可能性が示唆された。

また、半月板 inner 細胞に生理的と考えられる周期的伸張刺激 (0.5 Hz, 5% strain) を負荷することで、同様のメカニズムで COL2A1 の遺伝子発現が増加することを明らかにした。

これらの結果は、半月板損傷に対する半月板縫合術の治療成績向上と、半月板部分欠損などに対する組織工学を応用した半月板再生技術の開発に寄与するものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Narazaki S, Furumatsu T, Tanaka T, Fujii M, Miyazawa S, Inoue H, Shimamura Y, Saiga K, Ozaki T. Postoperative change in the length and extrusion of the medial meniscus after anterior cruciate ligament reconstruction. Int Orthop 査読有 2015 Feb 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25693884.

Kanazawa T, Furumatsu T, Matsumoto-Ogawa E, Maehara A, Ozaki T. Role of Rho small GTPases in meniscus cells. J Orthop Res 査読有 2014;32:1479-1486.

Furumatsu T, Miyazawa S, Tanaka T, Okada Y, Fujii M, Ozaki T. Postoperative change in medial meniscal length in concurrent all-inside meniscus repair with anterior cruciate ligament reconstruction. Int Orthop 査読有 2014;38:1393-1399.

Furumatsu T, Matsumoto-Ogawa E, Tanaka T, Lu Z, Ozaki T. ROCK inhibition enhances aggrecan deposition and suppresses matrix metalloproteinase-3 production in human articular chondrocytes. Connect Tissue Res 査読有 2014;55:89-95.

Sakata K, Furumatsu T, Miyazawa S, Okada Y, Fujii M, Ozaki T. Comparison between normal and loose fragment chondrocytes in

proliferation and redifferentiation potential. Int Orthop 査読有 2013;37:159-165.

Fujii M, Furumatsu T, Yokoyama Y, Kanazawa T, Kajiki Y, Abe N, Ozaki T. Chondromodulin-I derived from the inner meniscus prevents endothelial cell proliferation. J Orthop Res 査読有 2013;31:538-543.

〔学会発表〕(計 10 件)

Furumatsu T, Miyazawa S, Tanaka T, Fujii M, Abe N, Ozaki T. Cyclic tensile strain stimulates TGF- $\beta$ -Smad3-dependent expression of CCN2 and COL2A1 in chondrocytic cells. SICOT TWC, Rio de Janeiro, Brazil 2014/11/19-22

古松毅之 半月板の形態と機能 - 細胞生物学的特徴とメカニカルストレスに対する細胞応答 - JOSKAS 広島市 2014/7/24-26

古松毅之、松本衣未、金澤智子、田中孝明、尾崎敏文 軟骨様細胞における TGF- $\beta$ -Smad3 を介した伸張刺激依存性 CCN2・COL2A1 発現調節機構の解明 日本軟骨代謝学会 京都市 2014/2/28-3/1

古松毅之、松本衣未、宮澤慎一、岡田幸正、藤井政孝、田中孝明、呂智超、尾崎敏文 半月板 inner 細胞における周期的伸張刺激を介した Smad3 依存性 CCN2 発現の調節機構 日本整形外科学会基礎学術集会 千葉市 2013/10/17-18

Furumatsu T, Kanazawa T, Ozaki T. Cyclic tensile strain increases CCN2 expression by inducing Smad3 phosphorylation in human inner meniscus cells. CORS Venice Italy 2013/10/13-16

古松毅之、阿部信寛、宮澤慎一、岡田幸正、藤井政孝、尾崎敏文 前十字靭帯再建を伴う半月板縫合術における再鏡視例の検討 JOSKAS 札幌市 2013/6/20-22

古松毅之、金澤智子、宮澤慎一、岡田幸正、藤井政孝、尾崎敏文 メカニカルストレスによる TGF- $\beta$  シグナルを介した CCN2 発現と半月板細胞の活性化 日本整形外科学会 広島市 2013/5/23-26

古松毅之、金澤智子、藤井政孝、松本衣未、三宅由晃、久保田聡、滝川正春、尾

崎敏文 半月板細胞における周期的伸張刺激を介した Smad3 依存性 CCN2 発現の制御機構 日本軟骨代謝学会 豊中市 2013/3/1-2

古松毅之、金澤智子、阿部信寛、宮澤慎一、迫間巧将、井上円加、岡田幸正、小澤正嗣、藤井政孝、松本衣未、尾崎敏文 半月板 inner 細胞と outer 細胞における軟骨細胞様形質の比較検討 日整会基礎学術集会 名古屋市 2012/10/26-27

古松毅之、小澤正嗣、尾崎敏文 ヒト軟骨様細胞における Smad2/3 を介した伸張刺激依存性 CCN2 発現の増加 日整会基礎学術集会 名古屋市 2012/10/26-27

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

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)

該当なし

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

岡山大学研究者カタログ

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=catalog&u=ed8084327ecdc9d574506e4da22f6611>

岡山大学整形外科

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/orthop/japanese/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

古松 毅之 ( FURUMATSU, Takayuki )

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20432651

### (2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：