

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462268

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞導入(骨穿孔術)による変形性膝関節症治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategy for osteoarthritis using introduction of mesenchymal stromal cells from subchondral bone.

研究代表者

安達 伸生 (ADACHI, Nobuo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：30294383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨修復術の1つである骨穿孔術は、足関節の軟骨損傷部での治療成績は膝関節よりも良好であるが、その原因を解明すべく以下の実験を行った。日本白色家兎の大腿骨内側顆、大腿骨滑車、距骨(脛骨適合部)、距骨(脛骨非適合部)に骨軟骨損傷を作製し、骨穿孔を行った。4、8、12週で屠殺し、組織学的評価を行った。また、膝、足関節から採取した軟骨細胞の増殖能、プロテオグリカンの消失を比較した。距骨(適合部)では、他の部位と比較して早期から良好な硝子様軟骨を認めた。軟骨細胞の増殖能・プロテオグリカン消失は大腿骨、距骨間で有意差はなかった。本研究から、膝と足関節での軟骨修復には形態による差が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine whether morphological differences between the knee and ankle joint affect the results of bone marrow stimulation technique for osteochondral defect in a rabbit model. Osteochondral defects were created at the knee and ankle. In the knee, osteochondral defects were created at the medial femoral condyle and patellar groove. At the ankle, defects were created in the talus at either a covered or uncovered area by the tibia. After that, drilling was performed. Histological evaluations were performed at 4, 8, and 12 weeks. The proliferation of chondrocytes and proteoglycan release of cartilage tissue were analyzed in vitro in both joints. At 12 weeks, hyaline cartilage with normal thickness was observed only for the defect at the covered area of the talus. No significant differences of proliferation and proteoglycan release were detected between the knee and ankle. These results suggest that the congruent joint is advantageous for osteochondral repair.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 骨穿孔術 間葉系幹細胞 軟骨損傷 軟骨修復

1. 研究開始当初の背景

平成 16 年度の厚生労働省国民生活基礎調査によると、高齢者が要支援なる原因疾患の第一位は変形性関節症である。その中でも変形性膝関節症の有病率は高く、全国で 3,000 万人以上と推定されている。変形性膝関節症は高齢者の生活の質を著しく低下させるとともに、健康寿命を短縮させる。進行した変形性関節症に対しては自家組織の温存は困難であり、人工関節置換術を施行するほか有効な手術法はない。人工膝関節のほとんどは海外からの輸入製品であり非常に高価（1 関節 80 万円以上）であり、医療費増加の一因となっている。その解決のためには人工関節置換術によらない変形性関節症に対する治療法確立が急務である。関節軟骨修復術には様々な方法がある。骨穿孔術（ドリリング、マイクロフラクチャー）は軟骨損傷部から軟骨下骨髄までの access channel を作製し、血行のない軟骨組織に骨髄からの骨髄間葉系幹細胞（MSC）誘導をはかることにより、通常の創傷治癒機転を発現させようとする方法である。骨穿孔術は手技が簡便であること、関節鏡視下に施行可能であり手術侵襲が非常に少ないこと、特別な器具や手術材料が不要であり非常に安価であることなどの多くの利点を有する。一方、大きな問題点は手術を行う関節により手術成績に大きな差があることである。具体的には足関節の距骨軟骨損傷に対する治療成績は長期にわたり良好であるが、膝関節における成績は経年的に著しく低下することが明らかとなっている。この関節による手術成績の差といった相違点を研究することにより、現在罹患患者数が多いにもかかわらず、治療に難渋することが多い変形性膝関節症治療に大きく貢献できるのではないかと考え、研究を行った。

2. 研究の目的

膝関節および足関節軟骨損傷に対する骨穿孔術（骨髄間葉系幹細胞導入）の成績の差がどのようなメカニズムで生じているのか検討するために以下の実験を段階的に行う。

(1) 膝関節および足関節由来の MSC の分子生物学的な相違、特に細胞増殖能、軟骨分化能の差異を *in vitro* において検討する。また膝関節および足関節の軟骨細胞について、細胞増殖能などの差について検討する。

(2) 膝関節および足関節において力学的環境の異なる部位の軟骨損傷に対し骨穿孔術を行い、その修復組織を評価、検討する。

3. 研究の方法

(1) 膝関節および足関節由来の MSC の分子生物学的相違の検討

全身麻酔下に成熟日本白色家兎の大腿骨および距骨骨髄よりそれぞれ骨髄液 1ml を採取する。採取した骨髄液を 10%FBS および抗生物質を添加した DMEM 培地を用いて単層培養し、ディッシュに付着した細胞を

MSC として回収する。回収した MSC を引き続き単層培養し Pittenger ら (Science、1999) の方法に準じ TGF- β 3、dexamethasone を用いて軟骨分化誘導を行う。分化過程における軟骨分化マーカーの検索を行う。

①細胞増殖能；培養開始から 0 日、5 日、10 日、20 日の細胞数を Trypan blue dye exclusion test で計測。

②Alcian blue 染色；培養開始から 0 日、5 日、10 日、20 日に軟骨細胞外基質を経時的に Alcian blue 染色にて評価する。

③Western blot；培養開始から 0 日、5 日、10 日、20 日に細胞を融解し、Western blot により細胞中の軟骨分化の指標となるマーカーや抗体 (Sox-9・Type II collagen・ β -catenin・c-jun) を同定、定量する。各マーカーの経時的な変化より、軟骨分化の経時的段階を評価する。

④RT(real time)-PCR による mRNA の定量；培養開始から同様に 0 日、5 日、10 日、20 日に Total RNA を培養細胞より採取、精製し、RT(reverse transcription)-PCR により cDNA を採取する。培養開始から経時的に採取した cDNA から RT-PCR により発現する mRNA の比較定量を行う。定量する mRNA は Type II collagen、Type I collagen、Sox-9、 β -catenin、GAPDH である。定量した mRNA を解析し、軟骨細胞の分化に伴う各軟骨分化指標マーカー発現の関連性を評価する。

(2) 膝関節および足関節由来軟骨細胞の分子生物学的相違の検討

全身麻酔下に成熟日本白色家兎の大腿骨および距骨から関節軟骨を薄切・採取し、トリプシン、コラゲナーゼ処理を行い、軟骨細胞を単離する。

①細胞増殖能；WST-8 を用いて細胞数を大腿骨、距骨由来で差があるのか検討する。

②プロテオグリカン放出能；軟骨細胞に IL-1 β を添加し、放出されるプロテオグリカンに大腿骨と距骨とで差があるのか検討する。

(3) 解剖学的に異なる部位における骨穿孔術の治療効果の検討

日本白色家兎 (3.0~3.5 kg) の膝関節および足関節を展開し、大腿骨内側顆荷重面、距骨（脛骨との適合面）、距骨（脛骨との非適合面）に軟骨下骨に達しない軟骨欠損（直径 3 mm×深さ 2 mm）を作製する。軟骨欠損に対して、骨穿孔術（0.7mm ワイヤを用いて 4 か所）を行ったのち、関節を閉鎖する（図 1）。術後家兎はケージ内自由飼育とする。術後 4、8、12 週にて安楽死させ、細胞を移植した膝関節、足関節を摘出し修復軟骨組織の評価を行う。

①肉眼的観察：再生軟骨の性状・光沢、骨棘形成、滑膜炎の有無

②膝関節のレントゲン撮影：変形性関節症性変化の有無や進行の程度

- ③組織学的評価：サフラニン O 染色
- ④免疫組織染色：II 型コラーゲン、I 型コラーゲン、Sox9、MMP13、Ki67
- ⑤生化学的评价：コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、Type II collagen の定量 (HPLC 法)、アグリカン、II 型コラーゲンの mRNA の定量 (RT-PCR)

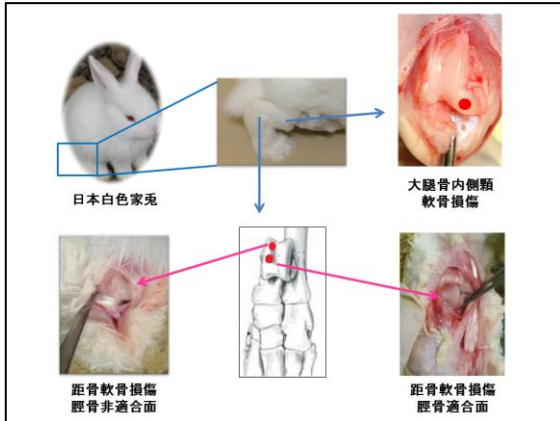


図 1. 日本白色家兔軟骨損傷モデル

4. 研究成果

(1) 膝関節および足関節由来の MSC の分子生物学的相違の検討

成熟日本白色家兔の距骨は小さく、骨髓液が十分量採取できなかったため、足関節由来 MSC の評価ができなかった。

(2) 膝関節および足関節由来軟骨細胞の分子生物学的相違の検討

軟骨細胞培養後、1、2、3 日で評価を行ったが、いずれも大腿骨遠位と距骨由来の軟骨では、細胞増殖能に差を認めなかった (図 2)。また、プロテオグリカン放出能の差も大腿骨遠位と距骨由来の軟骨では差は認めなかった (図 3)。

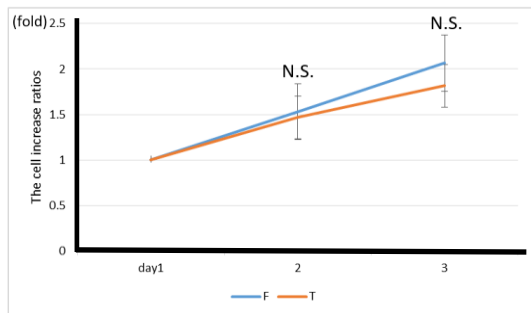


図 2. 大腿骨遠位および距骨由来軟骨細胞の増殖能の差 F；大腿骨、T；距骨

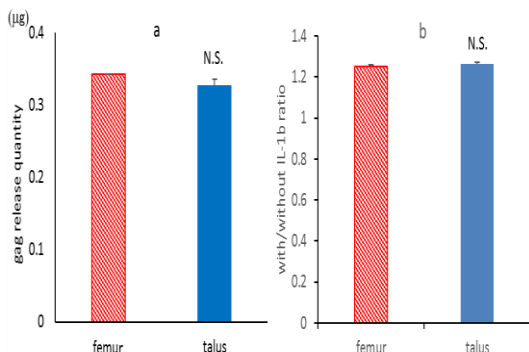


図 3. 大腿骨遠位および距骨由来軟骨細胞のプロテオグリカンの放出量の差異・IL-1β の反応性の差異

(3) 解剖学的に異なる部位における骨穿孔術の治療効果の検討

大腿骨内側顆は 8 週で硝子様軟骨を認めたが、大腿骨滑車は 8 週では線維軟骨を認めたのみであった。距骨 (適合部) は 4 週で欠損部全層での修復組織と軟骨下骨の良好な形成を認め、8 週で硝子様軟骨を認め、軟骨・軟骨下骨ともに周囲と同等の厚さとなっていた。距骨 (非適合部) では、4 週では修復組織を認めたが、8、12 週でも硝子様軟骨はほとんど認めなかった (図 4)。

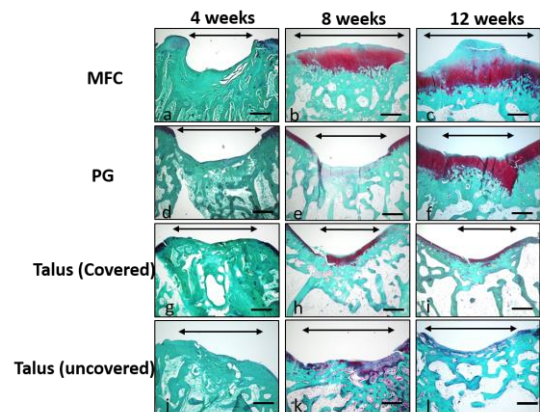


図 4. 骨穿孔術後の組織像 サフラニン O 染色

画像評価では、μCT により骨穿孔術後の軟骨下骨の状態を評価したところ、距骨の適合部でより早期に軟骨下骨の修復がおきていた (図 5)。

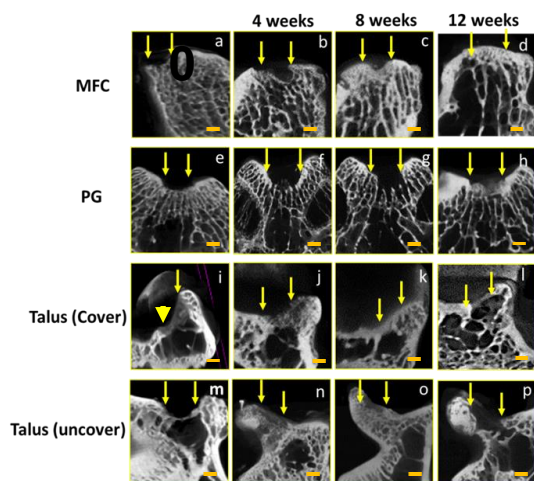


図 5. 骨穿孔術後の μCT 像 矢印；軟骨欠損部

免疫染色では、距骨適合部で、II 型コラーゲンが最もよく染色されていた (図 6)。

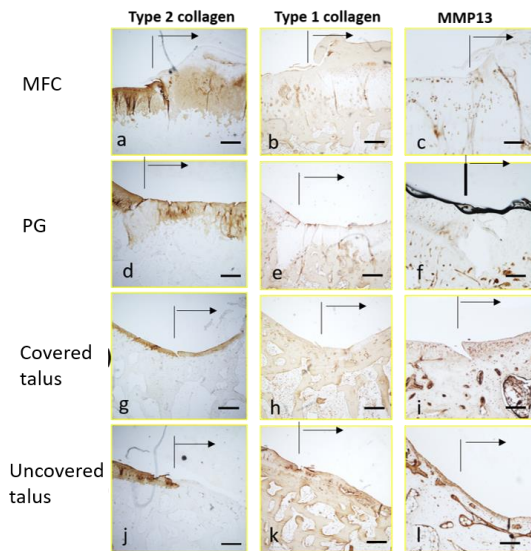


図 6. 骨穿孔術後の免疫染色（Ⅱ型コラーゲン、Ⅰ型コラーゲン、MMP13）

本研究から、膝と足関節での軟骨修復には形態による差が関与していると考えられた。また軟骨修復には早期に軟骨下骨の修復が重要と考えられた。

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 1 件）

1. Makitsubo M, Adachi N, Nakasa T, Kato T, Shimizu R, Ochi M. Differences in joint morphology between the knee and ankle affect the repair of osteochondral defects in a rabbit model. J Orthop Surg Res 2016 Oct 4:11(1):110. 査読有り

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 榎坪真奈美、中佐智幸、安達伸生、石川正和、高沢皓文、加藤智弘、清水良、原田洋平、越智光夫 膝関節と足関節の軟骨修復に関する因子の検討、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 26 年 10 月 9 日、城山観光ホテル（鹿児島市新照院町）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：30294383

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長
研究者番号：70177244

石川 正和 (ISHIKAWA MASAKAZU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：60372158

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769

（平成 26 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日

まで研究分担者）