

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22658100

研究課題名（和文）：半月板損傷モデルの作成とBRPシステムによる半月板の再生に関する研究

研究課題名（英文）：Cruciate injury model and cruciate regeneration with MSC by using of BPR system in micro-mini pig.

研究代表者：藤木 誠 (FUJIKI MAKOTO)  
鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：60305167

## 研究成果の概要（和文）：

マイクロミニピッグ（MMP）を用いて半月板損傷モデルの作製と自己の皮下脂肪組織由来間葉系細胞による組織再生についての研究を行った。皮下脂肪組織由来間葉系細胞による移植細胞塊の作製は可能であることが確認された。MMP 半月板部分欠損モデルによる再生に関しては、移植細胞塊の性質が保てなかったことにより確認できなかった。関節切開を伴わない半月および骨軟骨欠損モデルについては、膝関節症モデルとしての有効性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The tissue regeneration was researched by using micro mini-pig (MMP) with the mesenchymal system cell derived from subcutaneous adipose tissue for meniscus injury model. It was confirmed that the preparation of plug for transplantation with mesenchymal cells derived from subcutaneous fat is possible. However, it was not possible to confirm meniscus regeneration by being not able to maintain the nature of the transplant spheroid for partial deficit model of the MMP. In meniscus and osteochondral defect model without arthrotomy, the effectiveness of knee osteoarthritis as a model was suggested.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	0	2,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：半月板再生

## 1. 研究開始当初の背景

損傷した半月板は部分切除や全摘出を行うことが多かったが、近年では、半月板の切除範囲が多いと早期に変形性膝関節症（OA）に移行しやすいと指摘されるようになり、半月板の再建・再生を目指す医療が行われている。しかし、細胞を埋植する足場となるコラーゲンスポンジなどの人工物で置換することが多く、異物反応に対するリスクや規制当

局への許認可のコストが足かせとなり、普及していなかった。連携研究者の中山らは従来の手法とは全く異なるアプローチで、細胞だけで大型の立体細胞構造体を作成することに成功しており、関節軟骨の再生医療の分野で臨床応用へと準備する段階に達していた。あわせて開発したロボットシステムにより、三次元データと細胞を投入するだけで、生きた細胞による立体的な構造体を作ることが

可能となっていた。このような、細胞だけで任意の形状の細胞構造体を作る手法 (Bio Rapid prototyping system: 以下 BRP) の有効性と臨床応用の可能性を検証するために、軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いて任意の形状の半月板組織を作成し、動物膝関節への自家細胞移植を行うこととした。

また、関節疾患モデルとして従来用いられているマウス、ラット、ウサギに代わり、歩行時の関節可動域がヒトに近く、かつ、成熟ビーグル犬と同等または小型の MMP を用いる事で関節への物理的負荷を反映した疾患モデル動物としての有効性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

細胞だけで任意の立体構造体を作成するシステムを応用し作成した自己由来の軟骨細胞および間葉系幹細胞からなる細胞構造体で、マイクロミニピッグ (以下 MMP) における膝関節半月板切除部位を一部置換し、組織再生を検証する。具体的には(1)半月板を再生するための移植細胞構造体を細胞だけで作ることができるのか、(2)移植後早期に生着、荷重が可能か、(3)移植した細胞構造体から組織再生がどのように進行するかを検証し、併せて、MMP での半月板切除による OA モデルの有効性について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞ソースの検討、培養条件の最適化: 軟骨細胞を用いて半月板状の構造体を作成し、一般的な軟骨マトリックス刺激培養であるアスコルビン酸添加培地で構造体の培養を行う。この条件で形成された構造体をベースラインとし、培養中の超音波刺激による細胞構造体の強度向上を計る。不十分であれば、TGF-Beta などのサイトカインの添加も考慮に入れる。

(2) 複数種類の細胞の立体的配置: 治癒促進のために、皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞を配置した構造体を作成する。

(3) MMP を用いた膝関節半月板切除による OA モデルの作成: モデル作成手術後は CT, MRI による画像解析と関節液の性状解析を行い、最後は病理組織学的な検討を行う。モデル作製では、術後関節炎の影響を可能な限りなくすために、関節への侵襲が少ない方法の検討を行う。

(4) MMP を用いた自家細胞移植実験: MMP の皮下脂肪組織から得られた間葉系幹細胞を用いて細胞構造体を作成し、移植する。単一の細胞構造体移植時と治癒経過を比較検討する。

## 4. 研究成果

### <2010 年度>

MMP の頸部より皮下脂肪組織を採取し、脂肪細胞由来間葉系細胞を単離、培養した後、細胞塊であるスフェロイド形成を誘導した。そのスフェロイドを直径 4mm の円柱状に配置し、移植用の立体構造を作成した (下図)。



この結果より、MMP 皮下脂肪由来間葉系細胞から移植に必要な細胞塊を作製する事が可能であることが示され、スキャフォードを用いない自己の細胞のみでの骨軟骨移植の可能性が示唆された。これらの事は軟骨再生においては非常に重要な点であり、現在実用化されている方法は見当たらない。

MP 2 頭の両膝関節に関節切開により直径 4mm の半月板欠損を作成し、立体構造体に配置した移植細胞塊を欠損部へ移植した。移植後は通常の飼育状況により観察し、6 カ月後の MRI 検査と剖検にて移植部分の評価を行った。

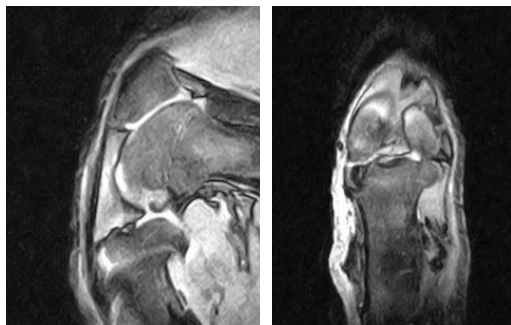
MRI 検査では、半月板欠損部位は再生による修復所見は確認されず、欠損によるものと考えられる所見が確認された。剖検による肉眼的所見においても MRI 所見と同様に半月板欠損部位には組織の再生は確認されず、欠損部のサイズは変化していなかった (右図、矢印)。



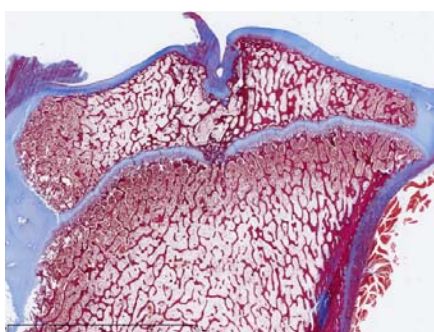
### <2011 年度>

MMP の頸部より皮下脂肪組織を採取し、脂肪細胞由来間葉系細胞を単離、培養した後、細胞塊であるスフェロイド形成を誘導した。そのスフェロイドを直径 4mm の円柱状に配置し、移植用の立体構造を作成した。作製した移植体はスフェロイドの接着が弱く、円柱状を維持することができない強度のものであった。その理由としては、脂肪組織から間葉系細胞を単離する場合の酵素処理が不適切であった事が考えられ、修正により改善できたが、

今回のモデルに移植した細胞塊は細胞の接着性が低いものであった。MRI 検査による検査では、半月板欠損部位は再生による修復所見は確認されず、欠損部には、半月板ではない組織で満たされると考えられる所見が確認された(下図)。また、剖検時の肉眼所見においてもMRIと同様に半月板欠損部に組織の再生は観察されず、骨軟骨欠損部は、何ら



かの組織で満たされ縮小していることが確認された(右図)。これらの結果も、移植細胞塊を構成するスフェロイドの接着性が低かった事により、移植細胞が移植部位にとどまる事ができなかったか、または細胞同士の接着が不十分であったために、移植後の細胞分化が十分に起こらなかったと推測された。組織学的検査においても欠損部には半月板の再生は確認されず、骨軟骨欠損部は繊維性組織で満たされており、不完全な軟骨修復が認められた(下図)。



半月板損傷モデルに関しては、関節切開を行わずに半月の一部を切除するモデルを作製した。骨生検用トレパンを用いて脛骨近位に肢端方向から関節方向に径4mmの骨軟骨および半月板欠損を作製することが可能であった。モデル作製において関節切開による処置は、モデルの経過観察の際、モデルの評価に対して手術手技による影響が大きいため、

移植効果の評価を複雑にする。特に豚においては、大腿骨の湾曲が大きい為、半月板へのアプローチを行うには、側副靭帯や前十字靭帯を切断しなければならない。しかし、関節切開を行わずしてモデル作製が可能であれば、靭帯切除が影響する関節の不安定性、関節内部への侵襲を除く事が可能であり、移植による組織再生の評価も明解になる。今回の結果では、作製した組織欠損を確認する事が可能であり、最終的には、大腿骨表面の軟骨病変も観察された(右図)。



したがって、MMP 皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞による半月板再生に関しては、皮下脂肪組織からウサギヒトと同様に、スフェロイドで形成した移植細胞塊を作製することが可能であることが確認された。しかし、細胞を単離する際の条件によってはスフェロイドの接着性が低下することが示唆された。また、非関節切開モデルは、関節の外部から関節面に向かって骨軟骨および半月板を一部除去することが可能であり、関節切開を行わずにモデルの作製が可能であった。しかも、その欠損部には6ヶ月間の観察期間中に二次的な軟骨損傷が発生し、二次的なOAへの進行が示唆された。つまり、本法は関節疾患モデルを作製する際に二次的な要因を含まない有効な手法であることが推測された。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤木 誠 (FUJIKI MAKOTO)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：60305167

### (2) 研究分担者

三角一浩 (MISUMI KAZUHIRO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：10291551

中山功一 (NAKAYAMA KOUICHI)

佐賀大学・理工学部・教授

研究者番号：50420609

川口博明 (KAWAGUCHI HIROAKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：60325777

松田秀一 (MATSUDA SYUICHI)

九州大学・医学部・講師

研究者番号：40294938