

(様式 甲 5)

氏 名	奥野 修大
(ふりがな)	(おくの のぶひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 1153 号
学位審査年月日	令和 3 年 1 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Feasibility of a self-assembling peptide hydrogel scaffold for meniscal defect: an in vivo study in a rabbit model (ペプチドハイドロゲルを使用した半月板治療の可能性:ウサギ半月板欠損モデルを使用した <i>in vivo study</i>)
論文審査委員	(主) 教授 佐浦 隆一 教授 植野 高章 教授 根本 慎太郎

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

半月板損傷は膝関節の損傷で、高頻度で発症し、治療しないまま放置すると変形性膝関節症の原因となるが、半月板組織は血流に乏しいため自己修復能力が低く、治療が困難である。そのため、治癒促進を目的とした半月板縫合方法の検討や断裂部・欠損部を補填する基材などの研究が数多く行われてきたが、半月板損傷の治療成績は満足のいくものではなく、新たな治療方法や治療材料が求められている。

近年、組織工学の進歩により様々なバイオマテリアルが開発されている。中でも自己集合性ペプチドハイドロゲルスキャホールド (self-assembling peptide hydrogel scaffold :

SAPS) は有望とされ、これまでに骨・軟骨・神経領域などで再生医療へ応用の可能性が報告されているが、半月板損傷に対する検討はなされていない。

半月板には関節液で満たされている環境下で荷重分散と衝撃吸収能が求められるので、組織再生の足場となる材料には、この様な環境下でも、局所に留まり、かつ荷重分散と衝撃吸収能を発揮することが要求される。SAPS は疎水基・親水基の繰り返しで構成されており自己集合性重合を繰り返してハイドロゲルスキャホールドを形成する。SAPS の強度はアミノ酸配列の変化により調整できるが、温度や PH の変化が力学的強度に影響することが明らかにされている。そのため、SAPS の力学的強度を向上させるための研究が行われてきたが、これまで荷重関節内で使用可能な SAPS はなかった。

今回、関西大学が力学的強度を向上させたペプチドハイドロゲル KI24RGDS (K=リシン、I=イソロイシン、R=アルギニン、G=グリシン、D=アスパラギン酸、S=セリン) の開発に成功したので、この KI24RGDS が実験的に作製した家兎半月板の欠損部に留まり、欠損部組織の再生を促進するかどうかを明らかにするために本研究を行った。

《方 法》

KI24RGDS を走査電子顕微鏡で形態を観察し、力学的特性は振動、温度を変化させて貯蔵弾性率 (G')、損失弾性率 (G'') を測定して評価した。

半月板欠損動物モデルとして日本白色家兎の内側半月前節に直径 2mm の円柱欠損を作製した。コントロール群として右膝の欠損部を放置した。KI24RGDS 群として左膝の半月板欠損部に KI24RGDS を移植した。両群を 2、4、8、12 週目で安楽死させ、半月板の形態は虎谷スコアの一部を改変した採点法を用いて、軟骨の表面形状は OARSI スコアを用いて肉眼的に評価した。半月板組織は HE 染色、Safranin O 染色による組織学的検討を行った。各評価時期の半月板の修復程度は修復面積の再生率 (R:D ratio) から量的評価を、Ishida スコアを用いて質的評価を実施した。両群とも 2 週目の組織のみマッソントリクローム染色、PTAH 染色を行い、SAPS 内部への細胞遊走の評価を行った。また、両群の 12 週目の組織はピクロシリウスレッド (PSR) 染色、抗 I 型・II 型コラーゲン抗体を用い

た免疫染色を行い、再生組織を質的に検討した。さらに、KI24RGDS の生体適合性の評価として滑膜組織の HE 染色を行い、Krenn スコアを用いて膝関節内の滑膜炎の程度を判定した。

なお、両群間の差異、あるいは群内での経時的な差異の有無は Mann-Whitney U test を用いて統計学的に検討した。

《結 果》

KI24RGDS はナノレベルの立体多孔構造を呈しており、振動や温度を変化させても $G' > G''$ が保たれており、ゲルの物性は維持されていた。

半月板の肉眼的評価では 2、4、8 週目の KI24RGDS 群で欠損部が有意差をもって結合組織で充填されていた (2 週; $p = 0.005$ 、4 週; $p = 0.007$ 、8 週; $p = 0.041$ 、12 週; $p = 0.102$)。一方、関節軟骨表面は両群とも肉眼的な差はなかった。R:D ratio と Ishida スコアはすべての評価時期で有意差をもって KI24RGDS 群が高値であった。マッソントリクローム染色、PTAH 染色では滑膜組織を含む関節内組織より遊走してきたと考えられる細胞が KI24RGDS 内に網細状に存在していることが示された。さらに、12 週間後の PSR 染色、抗 I 型・II 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色の結果から、KI24RGDS 群の再生組織は II 型コラーゲンを含む、線維の連続性を伴った再生組織であることが明らかとなった。一方、Krenn スコアは両群とも 2 点以下であり、半月板周囲の滑膜炎の程度は low grade と判定した。

《考 察》

本研究は SAPS の半月板治療における臨床応用の可能性を示した初めての研究である。本研究結果より、KI24RGDS は関節液で満たされ荷重負荷がかかる環境であっても半月板欠損部に留まり、集簇した細胞の足場となっていることが確認できた。また、肉眼的・組織学的評価により KI24RGDS 群ではコントロール群と比較して半月板に類似した良好な組織の再生が認められた。

これまでハイドロゲルの合成には天然由来の材料が使用されることが多かったが、SAPS は化学的に合成できるため、生体内に使用する場合に未知のウイルス感染などの生物学的汚染のリスクが少ないといえる。また、SAPS はアミノ酸が重合した物質であるため、生体分解性が高く臨床に導入しやすい材料であり、本研究でも SAPS による軟骨表面の変性や著明な滑膜炎は認めておらず、SAPS の高い生体適合性が示された。

走査電子顕微鏡による構造分析の結果、KI24RGDS は幅 10nm の線維で自己集合を繰り返す直径 5~200nm の 3 次元多孔構造であるが、この環境は生体本来の細胞外マトリックスを模倣した環境である。そのため、KI24RGDS は滑膜組織を含む関節内組織より遊走し集簇したと考えられる細胞の組織再生のための足場となり、日本白色家兎の欠損半月板部分の組織再生を促した可能性が大きい。

今回の動物モデルはヒト半月板損傷の断裂形態とは異なるため、さらなる研究が必要であるが、様々な形態の半月板損傷の修復・補填・再生効果が確認できれば、SAPS は注射針で注入可能なので、将来的にはエコー下観察・穿刺・注入といった半月板断裂に対する低侵襲治療への応用が大いに期待できる医療材料であると考えている。

(様式 甲 6)

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

半月板損傷に対する治療法である半月板切除術は変形性膝関節症発症のリスクを高めるため、可及的に半月板を温存できる半月板縫合術が推奨されている。しかし、半月板は血流が少ないため自己修復能が低く、半月板縫合術の臨床成績は満足のものではない。また、加齢や損傷後の時間経過などにより変性した半月板は縫合術自体が困難である。

そこで申請者は、再生医療で利用されているバイオマテリアルの自己集合性ペプチドハイドロゲルスキャホールド (self-assembling peptide hydrogel scaffold: SAPS) ・ KI24RGDS の患部に応じた形状変更が可能であるという特性を利用して、KI24RGDS を半月板損傷の治療に応用できないかと考え、基礎実験として白色家兎の半月板に円柱欠損を作成した動物モデルを用いて、KI24RGDS が半月板欠損部の再生を促すかどうかを組織学的に検討した。

本研究では、荷重負荷がかかる関節内・生体環境下であっても KI24RGDS は半月板欠損部に留まり、組織再生のために集簇してきた細胞の足場となっていることが確認できた。具体的には、KI24RGDS 移植群の欠損部充填組織は未処置のコントロール群と比較して、組織学的手法を用いた量的評価で有意に良好な結果であった。また、免疫染色の結果から、再生組織はⅡ型コラーゲンを含んだ半月板に類似した軟骨様繊維組織であることが明らかとなった。一方、KI24RGDS を移植しても膝関節内には有意な軟骨変性や滑膜炎は認められず、KI24RGDS は高い生体適合性を持つことも示された。本研究は、SAPS・KI24RDGS を半月板欠損の充填材料として初めて使用した研究であり、その結果、申請者は SAPS ・ KI24RDGS が半月板損傷治療のための有用な医療材料である可能性を示すことができた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Orthopaedic Research 39(1): 165-176, 2021 Jan

doi: 10.1002/jor.24841