

氏名	池田 邦明
(ふりがな)	(いけだ くにあき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第2号
学位審査年月日	令和3年7月14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	Development of a novel meniscal sheet scaffold and its effectiveness for meniscal regeneration in a rabbit defect model
	(新規半月板シート状 scaffold の開発とウサギ半月 板欠損モデルにおける半月板再生の効果について)
論文審査委員	(主) 教授 佐浦 隆一 教授 植野 高章 教授 近藤 洋一

学位論文内容の要旨

《目的》

半月板には関節内の荷重分散、衝撃吸収、関節安定化、潤滑などの重要な役割がある。半月板損傷の外科的治療として機能温存を目的に半月板縫合術が一般的には選択されるが、術後の再断裂や癒合不全のために再手術を要することも少なくない。この要因の一つとして、半月板組織は血流が乏しく自己修復能力が低い組織であることが推定されている。近年、自己修復能力を補うことを目的に半月板損傷に対する新規治療法として、シート状 scaffold を用いて損傷部を被覆し、組織修復の促進を期待するラッピング治療が注目されている。これまで、種々の生体材料を使用したラッピング治療が報告されているが、我々は損傷半月板の治癒率のさらなる向上のために、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid; PGA) とポリ L 乳酸-カプロラクトン共重合体 (poly L-lactic acid and caprolactone; P

(LA/CL) の 2 層構造である新規半月板シート状 scaffold (Meniscal Sheet Scaffold; MSS) を開発した。この MSS はラッピング治療に使用された場合、半月板側は細胞が接着しやすい PGA、関節軟骨側は分解吸収が遅く生体力学的安定性に優れた P (LA/CL) となり、損傷部の治癒促進が得られ、かつ生体内で長期間安定して存在するように設計されている。

本研究の目的は日本白色家兎の半月板損傷モデルに対して新規開発した MSS を用いたラッピング治療を行い、MSS の臨床的有用性の有無を検討することである。

《方 法》

MSS は接着された PGA 不織布と film 状 P (LA/CL) から構成される厚み 350 μ m の 2 層構造の scaffold である。まず、*in vitro* 試験として MSS の浸水処理後の引張強度試験と細胞生存率分析を行った。また、*in vivo* 試験として日本白色家兎の内側半月板前節に 2mm 円柱欠損を作製し、MSS で円柱欠損部を覆い半月板外縁に縫合固定したラッピング治療群 (MSS 群) と未処置群 (Defect 群) の欠損部と周囲組織を肉眼的および組織学的に比較した。術後 2、4、8、12 週に内側半月板の欠損部と再生組織の大きさを計測し、半月板再生の程度は Safranin-O/Fast Green 染色組織を Ishida score を用いて評価した。細胞増殖能は抗 Ki-67 抗体、再生組織の構造は抗 I 型・II 型コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行い組織学的に検討した。さらに、関節軟骨の変性の程度は、術後 8、12 週の大腿骨内顆関節軟骨の Safranin-O/Fast Green 染色組織を OARSI score を用いて評価した。

《結 果》

MSS は浸水処理開始時から 4 週間後まで初期強度の対比 90%以上、8 週間後で対比 60%以上の引張強度が維持されていた。また、細胞生存率の分析では 2 週から 4 週にかけて MSS 表面の生細胞数が増加していた。*In vivo* 試験では肉眼的に欠損部周囲の炎症所見は認めず、欠損部は 8 週から 12 週にかけて有意に縮小し、術後のすべての時点で Ishida score の評価では MSS 群が Defect 群に比べて有意に改善していた。Ki-67 陽性細胞の割合は再

生組織表層では MSS 群で有意に高く、MSS 群の再生組織の構造評価では I 型・II 型コラーゲンともに正常組織と同様であった。8、12 週ともに Defect 群の OARSI スコアは MSS 群に比較して有意に高かった。

《考 察》

本研究結果から PGA と P (LA/CL) の 2 層シート状 scaffold は日本白色家兎の半月板損傷モデルを用いて行われたラッピング治療で半月板欠損部の修復を促し、関節軟骨の変性進行を抑制した。これは半月板ラッピング治療の成績向上を目的に、シート状 scaffold を新規に設計・作製し、その有用性を示した初めての研究である。

半月板治癒過程には、断裂部での自己組織修復による *intrinsic healing* と半月板辺縁の血流豊富な領域からの半月板前駆細胞による *extrinsic healing* の 2 つがあるが、近年の研究では *extrinsic healing* の方が *intrinsic healing* より早期から治癒過程に関わると報告されている。

MSS 群の欠損部は 8 週から 12 週にかけて有意に縮小し、12 週では再生組織内に軟骨芽細胞類似の細胞と正常組織と同様の成熟した線維組織を認めた。新規に設計・作製した MSS を用いた日本白色家兎の半月板損傷に対するラッピング治療モデルでは、多孔性構造で細胞の接着能が高い PGA が *extrinsic healing*、すなわち半月板表層から損傷部への細胞遊走と増殖および良好な細胞外基質の再生が促された。また、分解速度が緩徐な P (LA/CL) がこのラッピング治療に用いた MSS の構造と組織修復に必要な環境を維持すると同時に、MSS の構造が維持されることによりラッピング治療を受けた部位に相対する関節軟骨の変性進行も抑制された可能性が考えられた。

本研究で使用した動物実験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、MSS を用いたラッピング治療は、半月板温存を目的とする半月板損傷の新規治療法となり得ることが示された。

論文審査結果の要旨

本邦での半月板損傷の外科的治療は半月板切除術または半月板縫合術が一般的であるが、切除後は軟骨変性が進行し、変形性膝関節症の発症リスクが高まることから、近年は縫合術が推奨されている。しかし、半月板組織の血流は乏しく、自己修復能力も低いため、縫合術後の再断裂や癒合不全により再手術に至ることも少なくない。そのため、半月板温存を目的とした半月板損傷の新規治療法としてシート状 scaffold を用いたラッピング治療の可能性と有効性が報告されるようになった。

そこで、申請者は治療成績のさらなる向上に資するため、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid; PGA) とポリ L 乳酸-カプロラクトン共重合体 (poly L-lactic acid and caprolactone; P (LA/CL)) の 2 層構造である新規半月板シート状 scaffold (Meniscus Sheet Scaffold; MSS) を設計・作製し、*in vitro* 試験および *in vivo* 試験で有用性を検討した。

申請者は本研究で、MSS は浸水処理後も力学的強度が維持され、その表面で細胞が良好に増殖することを確認した上で、MSS を用いてウサギ半月板欠損部のラッピング治療を行い、未治療群と比較して、MSS 群では組織学的スコアリングで有意に良好な修復がみられ、免疫染色の結果から MSS 群の再生組織は I 型・II 型コラーゲンを含んだ良好な半月板様組織であることを示した。そして、これらの結果から、ラッピング治療下での組織再生促進のメカニズムは、半月板辺縁の血流豊富な領域からの細胞遊走と増殖による *extrinsic healing* の促進によるものと考察した。また、2 層構造である MSS の構造が維持されることによりラッピング治療部位に相対する関節軟骨の変性進行も抑制された可能性を示した。

本研究は半月板ラッピング治療の成績向上に資するためのシート状 scaffold を新規に開発し、その効果を検証した研究である。この知見は今後の半月板損傷の新たな治療法開発の一助となる可能性が非常に大きい。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 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。

Journal of Biomaterials Applications 2021 in press

doi: 10.1177/08853282211000523. 〈オンライン掲載〉