

氏 名	小 田 周 平
(ふ り が な)	(おだ しゅうへい)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 22 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	A new method for meniscus repair using type I collagen scaffold and infrapatellar fat pad (I 型コラーゲン材料と膝蓋下脂肪体を併用した新規半月板治療)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 植 野 高 章 教授 前 村 憲 太 朗

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究の目的》

半月板は無血管組織であるが故に自己修復能に乏しく、一旦、損傷を受けると縫合術を実施しても再断裂の危険性が高いので、断裂半月板の切除術や半月板形成術が選択されることが多い。しかし、若年者では半月板切除後の経年的な関節症性変化の進行が報告され、半月板修復術や再建術が推奨される。半月板修復術は本邦でも実施可能であるが、人工半月板や同種半月板移植を用いた再建術は本邦では未だ研究段階である。また、間葉系幹細胞 (MSC) を利用した半月板修復術後の良好な成績も報告されているが、MSC の採取と MSC を利用した半月板修復術が実施可能な施設は限られており、より簡便な治療法の開発が急がれる。

そこで今回は、半月板と同じ I 型コラーゲンを材料にした医療材料は多数あるが、人工真皮 (ペルナック®) と膝関節内に存在し MSC を豊富に含むと報告されている膝蓋下脂肪

体（IPFP）に注目し、I型コラーゲン材料とIPFP併用療法による半月板修復の可能性を家兎半月板欠損モデルと培養ヒト半月板細胞を用いて検討した。

《方 法》

日本白色家兎の内側半月板前節に生検パンチで直径2mm大の全層欠損を作製した。
Group I：欠損（無移植）群、Group II：I型コラーゲン材料移植群、Group III：I型コラーゲン材料+IPFP併用移植群の3群、各6膝とし、Sham手術の6膝をコントロールに8週間後に評価した。肉眼評価として半月板の表面積をImage Jで計測し、病理学的評価はIshidaスコアを用いて検討した。免疫組織学的検索として、抗I型コラーゲン抗体、抗II型コラーゲン抗体、抗Ki67抗体を用いた免疫染色を行った。また、ヒト半月板細胞（MC）、IPFP細胞（IPFPC）へのI型コラーゲン材料の影響を評価するため、I型コラーゲン材料存在下にMCおよびIPFPCの共培養を行い、3週間培養後のコラーゲン分子、サイトカインなどのmRNAの発現を半定量RT-PCRを用いて比較検討した。

《結 果》

Group Iの半月板欠損部の肉眼所見では、欠損部がそのままか、あるいは前後方向へ退縮していた。Group IIでも欠損部がそのままか、あるいは半月板前節周囲の滑膜炎所見が観察された。一方、Group IIIでは欠損部は再生組織で埋められていた。Group Iの半月板は退縮し、内側半月板の表面積はコントロールあるいはGroup IIIと比較して小さくなっていた。一方、Group II、Group IIIはコントロールと同じ程度の表面積であった。

組織学的検討では、Group Iの半月板は欠損したままであった。Group IIでは再生組織で欠損部は充満していたが、再生組織はサフラニンOで染色されなかった。Group IIIも欠損部は細胞成分を含む再生組織で充満しており、サフラニンOで強く染色されていた。

抗I型コラーゲン抗体、抗II型コラーゲン抗体を用いた免疫染色では、Group IIIはコントロールと同様の染色態度を示したが、Group I、IIでは再生組織あるいは欠損部周囲が染色されていた。Ki67陽性細胞はGroup I、IIに比較して、Group IIIで有意に多く存在

していた。

半定量 RT-PCR の結果では、I 型コラーゲン材料存在下で MC と IPFPC を共培養した場合、MMP-13 mRNA の発現は I 型コラーゲン材料非存在下での MC 単独培養より低下していた。一方、Col1 mRNA、Col2 mRNA、Col10 mRNA、alpha SMA mRNA、SOX9 mRNA、IL-1 β mRNA の発現には、両群で差はなかった。

《考 察》

本研究の結果から I 型コラーゲン材料と IPFP 併用移植は、I 型コラーゲン材料単独移植に比較して組織再生を促すことがわかった。本研究で用いた IPFP は脂肪、滑膜両方の特徴を持ち、IPFP 由来の MSC は軟骨分化能に優れているが、IPFP 単独使用による半月板修復は力学的脆弱性のため成績が不良であることが報告されているので、足場となる I 型コラーゲン材料を併用した IPFP 移植は有用な治療法となり得る可能性が示唆された。

皮膚欠損における I 型コラーゲン材料の修復機序としてコラーゲン材料内への線維芽細胞、新生血管の侵入を伴う組織再生が報告されている。

本研究でも、Group III で最も良好な組織再生が観察されたことや Ki67 陽性細胞率が高いことから、IPFP 内の MSC が I 型コラーゲン材料内に侵入、線維軟骨細胞に分化して細胞外基質や線維成分を産生し、組織を再生したと推察される。周囲組織からの血流や関節液からのサイトカインによる修復機序もあるが、IPFP 中の MSC が再生に関与している可能性が大きい。

異化マーカーである MMP-13mRNA の発現が I 型コラーゲン材料存在下の MC および IPFPC の共培養で低下し、炎症性サイトカインである IL-1 β mRNA の発現を認めなかったことから、I 型コラーゲン材料はヒト半月板や IPFP に影響しない材料であると考えられる。

以上、採取した組織と人工材料を併用した移植法は、医療経済の観点からも有用な治療法となり得る可能性がある。

論文審査結果の要旨

半月板は自己修復能に乏しいので半月板切除術が選択されることが多いが、半月板を切除すると経年的に関節症性変化を引き起こすので、損傷半月板の温存や再建術が推奨される。欧米では人工半月板を用いた再建術が行われているが、本邦では未だ研究段階である。また、間葉系幹細胞（MSC）による半月板修復術の良好な治療成績が報告されているが、MSC を用いた修復術の実施が可能な施設は限定されるので、より簡便な治療法の開発が望まれている。

そこで申請者は、半月板類似の I 型コラーゲンからなる人工皮膚（ペルナック®）と MSC が豊富であり膝関節内に存在する膝蓋下脂肪体（IPFP）に注目し、I 型コラーゲン材料と IPFP 併用療法による半月板修復の可能性を家兎半月板欠損モデルと培養ヒト半月板細胞（MC）を用いて検討した。

そして、本研究の結果から、I 型コラーゲン材料と IPFP の併用移植は損傷された半月板の表面積を維持し、欠損部の組織再生を得ることが明らかにした。また、I 型コラーゲン材料存在下の MC と IPFP 細胞共培養の場合は、異化マーカーである MMP-13 の発現は、MC 単独培養の場合より低下し、一方、炎症性サイトカインである IL-1 β は上昇しないことを示した。

そして、これらの結果から、I 型コラーゲン材料と IPFP 併用移植は半月板欠損部の組織再生を促すことと I 型コラーゲン材料はヒト半月板細胞や IPFP に対して影響を及ぼさないことを明らかにした。

今回の知見は、本邦での半月板損傷の新たな治療法開発の一助になる可能性がある。

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 biomaterials applications 29(10): 1439-1448, 2015