

3Dバイオプリンタでつなぐ関節治療の再生医工学研究と 関節鏡手術シミュレータ研究の融合

花之内 健仁[†]、澤井 猛[†]、内田 宗志^{††}、
大槻 周平^{†††}、森山 博由^{††††}、森山 麻里子^{††††}

A combination study between tissue engineering and arthroscopy simulator
with 3D bio-printer

HANANOUCHI Takehito[†], SAWAI Takeshi[†], UCHIDA Soshi^{††},
OTSUKI Shuhei^{†††}, MORIYAMA Hiroyuki^{††††}, MORIYAMA Mariko^{††††}

Abstract

We performed the following two preliminary trials which are connected with a 3D bio-printing technology in this study. The first one was to seek which soft tissues from the knee joint can provide mesenchymal stem cells for a tissue-engineered cartilage. For this study, we investigated relative values of three genetic markers by the mesenchymal stem cells from the above soft tissues. Thus, we found an efficacy of the above soft tissues for the cell section for the regenerative medicine around the knee joint. The second one was to investigate mechanical properties of the soft tissues for the future regenerative therapy and/or the development of surgical simulator for arthroscopy using a developed probing device or classical experimental instruments. Thus, we found some mechanical parameters of the soft tissues for the regenerative medicine when making them with the 3D bio-printer.

† 大阪産業大学 工学部 機械工学科

†† 産業医科大学 医学部 整形外科

††† 大阪医科大学 医学部 整形外科

†††† 近畿大学 薬学総合研究所

草稿提出日 2020年11月7日

最終原稿提出日 2021年1月19日

Key Words: 3D bio-printer, Regenerative medicine, Mesenchymal stem cells: MSC,
Mechanical property

キーワード：3Dバイオプリンタ、再生医療、間葉系幹細胞、機械特性

背景

近年、平均寿命でなく健康寿命の向上が最重要課題の1つであると認識されている。健康寿命に影響する疾患の1つが、変形性関節症であり、総人口の27%を占める高齢者（65歳以上）の55%が罹患していると言われている^[1]。病態は、関節の動きをスムーズにする軟骨がすり減り、最終的には骨の変形を来し、関節全体に著明な疼痛を生じるものである^[2]。変形性関節症のきっかけは、軟骨自身のみならず・関節の安定性をはかるための、半月板・関節唇・靭帯等関節内の軟部組織の損傷が契機で引き起こされることがわかっている。変形性関節症の治療に関して、まずは、薬物療法、運動療法、関節内注射療法など非手術療法が選択され、長期にこれらの治療を継続しても効果がない場合、人工関節に置換する手術が選択される。従来、この非手術治療と、大きな侵襲を伴う手術治療との間の大きな溝をうめる治療が全くない状況であった。これには軟部組織自体に血行が十分でなく、自己再生能力が低いという理由があった。しかし、現在では、自分の組織をいったん体外に取り出し、培養などで成長させ、それを移植するといった再生医療への期待が高まっている。

この人工的に製造された再生組織を損傷した部位に置換するということを考えた場合、どのように置換するか、と、どのように経過観察していくか、は重要な検討課題となる。前者においては、ある組織を採取し、幹細胞にして培養などをして、3Dバイオプリンタで細胞を含めた組織として生体に戻すことを想定する。しかしながら、関節周囲の再生組織を考慮した場合、採取組織の種類についての検討が不十分であるため組織の分化能について評価する研究が必要となる。つまり3Dバイオプリンタで製造すべき細胞の選定についての研究がまだ必要となるのである。

他方、後者においては、再生組織が置換された場合に、経過観察のためにその組織を生体から取り出すことはできない、という課題のため、再生組織置換術後の組織の機械特性を、組織を取り出さずに把握できる機材の開発がもとめられる。さらに、関節周囲組織の再生に関しては、荷重環境下ないし力学的負荷に耐えうるものでなければならぬため、組織の機械特性を調査する必要がある。またこの機械特性は、手術シミュレータの開発にも役立つはずである。この得られた機械特性は、3Dバイオプリンタで組織を製造するときに考慮すべきものとなる。

上述した課題に対して、本研究では以下2つの研究を行った。1つ目は、人工膝関節全置換術を施行された変形性膝関節症患者の膝関節から採取した組織の分化誘導の評価、2つ目は、再生組織のための機械特性評価を行った。1つめの研究は、①採取した組織から間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells:MSC) を作成し、軟骨へ分化能を評価した。2つめの研究としては、②関節鏡手術における軟部組織の機械特性を評価できる著者の開発したプローブ機器^[3]による計測評価、③再生組織のための古典的機械特性評価を行った。

方法

①人工膝関節全置換術を施行された変形性膝関節症患者の膝関節から採取した組織から間葉系幹細胞の分化能の評価

対象は、変形性膝関節症患者3名(69歳女性、57歳女性、78歳男性)で、人工膝関節全置換手術施行時に組織を採取した。より臨床学的に採取された膝滑膜、皮下脂肪、軟骨、膝蓋下脂肪から、各間葉系幹細胞(MSC)を樹立した。樹立したそれぞれのMSCを脂肪細胞へ分化誘導し、その状態を観察した。また、分化誘導から14日後の細胞からtotal RNAを回収し、いわゆるqPCR法を用いて、COL10A1, SOX9, COL1A1遺伝子の発現を確認した^[4, 5]。この際、UBE2D2遺伝子を内部コントロールとした。これにより、分化時の発現量と未分化時の発現量を算出し比較した。このとき、数値が1を超えている優位なものを分化度の高いサンプルとして判断した。

②関節鏡手術における軟部組織の機械特性を評価できる著者の開発したプローブ機器による計測評価

荷重関節に置換される軟骨などを代替する再生組織は、組織の機械特性調査が必要であったが、それが現在ではできない状況(関節内の軟部組織の病態把握をする場合にも、金属の耳かきのような棒状のもので組織をつついたり、引っ張ったりする)であったため、上述したプローブ機器開発を行った。このプローブ装置は、通常関節鏡下プローブの半分の長さ(200mm)のプローブ部分と、プローブ先端の3軸の力を測定するために歪みゲージセンサーが埋め込まれたグリップコンポーネントからなる(Fig. 1)。

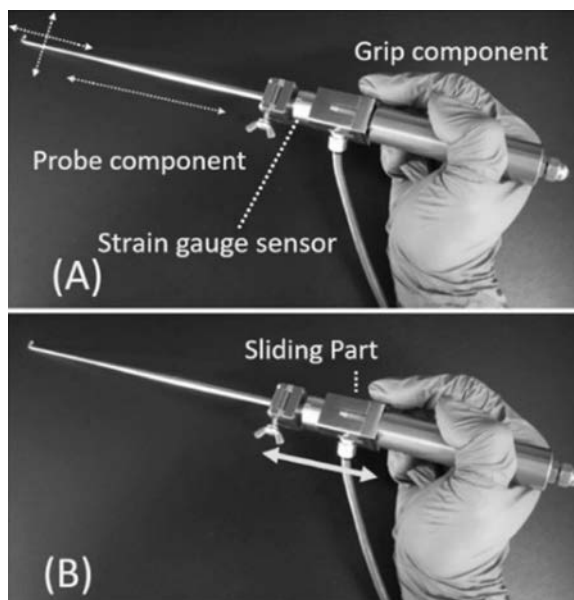


Fig. 1 : 本研究で使用したプローブ機器 (A)。前半にて従来のプローブ同様の形状 (Probe Component) を有し、後半にひずむセンサー (Strain gaugesensor) を搭載している。ひずみセンサーの搭載されている部分が、把持している部分 (図ではGrip component) に対してスライドすることができる (B)。

歪みゲージセンサーは、このプローブ専用で作られたものではあるが、x軸、y軸、z軸に対応する3つのホイートストーンブリッジが組み込まれており、歪みゲージの抵抗値が、適用される負荷の大きさに応じて変化することから、ブリッジの midpoint 電圧が変化し、力を電気信号として検出することができるものになる。このプローブデバイスの解像度は0.005Nで、精度については、正確度は0.013N、精度は0.0035Nであった。専用ソフトウェアによって、x、y、z方向 (xは横方向、yは垂直方向 (フックの方向)、zはプローブ軸) の3つの別々のグラフとして50Hzの周波数で計測が可能となる。

プローブ装置を用いた評価として、1つめとしては、股関節の模型を用いて関節唇の強度を計測し、その関節唇の状況に応じて計測結果に違いが生じること、2つめとしては、このプローブ機器で軟骨を模擬した材料の上を滑らすことによって、強度の評価ができることを明らかにした^[3]。

本研究では、このプローブ機器を用いた臨床前段階の実験と臨床研究を行った。前者については、通常の間節鏡手術を模倣した状態から豚膝半月板牽引した時の半月板の牽引に対する抵抗力を計測した。後者については、臨床の間節鏡視下において、このプローブ機器によって

股関節唇を牽引した際の関節唇の抵抗力を計測した。

③再生組織のための古典的機械特性評価

関節内組織の再生医療を考えた場合、荷重環境下ないし力学的負荷に耐えるものでなければならぬ。この機械学的特性の調査は未だ不十分な領域である。組織ごとの機械特性が把握できれば、その知見は手術訓練用のシミュレータの開発にもつなげていける。本研究では、上記②における半月板の圧縮試験機による機械特性と、股関節鏡視下を想定したエンドミルバーにおける骨掘削強度をスラストによって計測・評価した。

結果

①人工膝関節全置換術を施行された変形性膝関節症患者の膝関節から採取した組織から間葉系幹細胞の分化能の評価

軟骨分化マーカーである、COL10A1, SOX9, COL1A1遺伝子の発現量は、滑膜、皮下脂肪、軟骨、膝蓋下脂肪由来の間葉系間質幹細胞それぞれにおいて順に、1症例目は、COL10A1は、283.3, 76.6, 225.7, 6.0、SOX9は、4.1, 5.7, 3.4, 0.4、COL1A1は、6.2, 77.3, 8.0, 9.1であった。2症例目は、COL10A1は、1.5, 0.5, 0.1, 1.9、SOX9は、0.9, 4.3, 2.8, 1.8、COL1A1は、13.9, 4.2, 0.9, 11.6であった。3症例目は、COL10A1は、17.3, 0.8, 4.5, 45.4、SOX9は、0.8, 0.9, 0.7, 1.7、COL1A1は、6.7, 6.8, 6.9, 6.4であった。

②関節鏡手術における軟部組織の機械特性を評価できる著者の開発したプローブ機器による計測評価

臨床前段階の実験の結果について、右側の豚膝関節の内側ポータルからプローブした際の半月板の後節の抵抗力は、8.7, 8.2, 9.8Nであった。中節の抵抗力は2.7, 3.1, 2.8Nであった。また、前十字靭帯の牽引力は、内側から3回計測した結果は7.9, 7.2, 7.3Nであった。続いて、外側ポータルからの計測については、大腿骨側からのアプローチした場合の後節の抵抗力は5.6, 4.8, 4.8Nであり、脛骨側からのアプローチした場合のその抵抗力は、5.2, 6.4, 6.3Nであった。

以上プローブ機器の計測結果について、同一部位同一条件の場合は、おおむねばらつきが少なく計測できていることが確認できた。一方で、同部位を評価する場合でも、ポータルの違いや、どちらの骨近くからアプローチするかによって数値が異なることがわかった。今後は、個体間の違いについて評価できれば、数値によって病変の有無、手術介入効果の可否が評価できると考えられた。

続いて、臨床症例を用いた股関節鏡視下の股関節唇の抵抗力の結果について、全ての症例において、関節唇の処置前のプローブ機器による抵抗力を計測できた。

5 症例行うことができ、1 症例目は、牽引方向に5.0N 垂直方向に2.0N、2 症例目は、牽引方向に4.2N 垂直方向に0.5N、3 症例目は、牽引方向に6.5N 垂直方向に1.6N、4 症例目（この症例のみ再手術症例で関節唇の損傷はないが計測できた症例）は、牽引方向に9.8N 垂直方向に0.46N、5 症例目は、牽引方向に5.5N 垂直方向に0.1Nであった。

③再生組織のための古典的機械特性評価

②で述べた半月板を5mm径の円柱として抽出したサンプルにおいて、中節の厚さは2.1mm、後節の厚さは3.7mmで、応力はそれぞれ、2.07, 0.10MPaであった。

骨組織の機械特性評価については、2種類のエンドミルバーを用いて、回転数を3種類用意してスラストを評価した結果、球形の8フルート（8個の刃を持つという意味）のバーを使用した際の平均スラストは、8000rpmでは3.7N、10000rpmでは3.5N、12000rpmでは2.2Nであった。一方、球形のダイヤモンドバー（球形の表面にダイヤモンドチップが埋め込まれているもの）の場合の平均スラストは、8000rpmでは4.7N、10000rpmでは3.9N、12000rpmの時では2.9Nだった。

考察

①人工膝関節全置換術を施行された変形性膝関節症患者の膝関節から採取した組織から間葉系幹細胞の分化能の評価

この研究によって、再生医療分野において3Dバイオプリンタで組織を製造する際に含める細胞の選定の解明が進むと考えたわけであるが、軟骨分化マーカーである、COL10A1, SOX9, COL1A1遺伝子の発現量を調査したものの、予想する十分な結果は得られなかった。結果からは、同一患者内での採取組織間における軟骨細胞分化度には、一定性を見出すことが難しく、分化の時間や分化過程の細胞変容も多様なものとなった。統計学的検討の行える症例数までさらなる研究の継続が必要と思われた。

②関節鏡手術における軟部組織の機械特性を評価できる著者の開発したプローブ機器による計測評価

この研究の目的は、再生医療において、3Dバイオプリンタによって製造した組織がどの程度の強度をもっていないといけないかがわかっていないために調査を行った。手術を行う状況下で力学調査を行う必要があると考えたからであった。結果から言えることは、関節唇が損傷している場合には、5N近辺の抵抗力になっており、そうでない場合は10N近辺であることから、損傷の有無を力によって計測しうることが明らかとなった。この関節唇損傷の有無による計測値の違いは、以前に米国ユタ大学で新鮮屍体組織を計測した際に得られた数値と近似して

いたことから^[6]、屍体組織で軟部組織の抵抗性を評価する検討については妥当な方法であると考えられる。

他に得られた知見としては、実際の臨床での計測の場合は、プローブ機器が滅菌できないことから、滅菌カバーで対応しないといけない事で手術中の管理が非常に煩雑であること、カバーをすることによって操作感が低下することから、今後この機器を使用する医師に対しては、操作方法を十二分に行う必要があると考えた。また、実臨床では、実際の手術中に短時間に素早く行う必要があることから、プローブ機器の挿入のスムーズさの検討を重ねていく必要があると考えた。さらには、術者は実際のモニタ画面をみることが必須であるため、そこにプローブ機器で計測している数値を表示する画面を同期させていく課題もあると考えた。研究課題から得られた知見もさることながら、次につなげるための課題も明らかとなり、非常に有意義な研究であったと考える。

③再生組織のための古典的機械特性評価

この研究の目的も、再生医療において、3Dバイオプリンタによって製造した組織がどの程度の強度をもっていないといけないかがわかっていないために調査であるが、②と異なるのは、手術を行う状況下でなく、実験力学的観点から、古典的な力学調査による検討を行った。

②で用いた半月板を5mm径の円柱として抽出したサンプルにおいて、中節の厚さは2.1mm、後節の厚さは3.7mmで、応力はそれぞれ、2.07, 0.10MPaであった。これらの値は、ヒトの半月板の再生組織を3Dバイオプリンタで作成する上で参考になるデータになりうると考えた。

2種類のエンドミルバーによる骨皮質の掘削では骨にかかるスラストが多少異なるが、5N以下であることがわかった。これを3Dバイオプリンタを用いて骨組織を製造するための参考値、およびシミュレータを作成するときの参考値にできることがわかった。

結語

本研究では、将来3Dバイオプリンタで再生組織が製造されることを想定した基礎的事項を調査する2つの研究を行った。一つは、関節周囲組織における軟骨への分化能調査の研究であるが、滑膜、皮下脂肪、軟骨、膝蓋下脂肪由来の間葉系間質幹細胞について有効性は示唆されるものの、軟骨細胞分化度には、一定性を見出すことが難しかった。もう一つは、開発したプローブ機器による関節内軟部組織抵抗力評価及び、骨軟部組織の古典的機械特性の評価である。後者の研究については、これまで測定されてこなかったものについての新知見が得られた。再生医療を行う際や機械特性を加味した手術シミュレータを開発する際に役立つ研究が行えたと考えられる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費 JP19K09658, JP18KK0104の助成を受けたものです。

参考文献

- 1 変形性関節症：健康長寿ネット（公益財団法人長寿科学振興財団）(<https://www.tyojyu.or.jp/net/byouki/henkeiseikansetsushou/about.html>, 2020年11月7日閲覧)
- 2 変形性膝関節症：日本整形外科学会 (https://www.joa.or.jp/public/sick/condition/knee_osteoarthritis.html, 2020年11月7日閲覧)
- 3 Hananouchi T. A Probing Device for Quantitatively Measuring the Mechanical Properties of Soft Tissues during Arthroscopy J Vis Exp 1; (159). 2020 e60722
- 4 Kim HJ, Lee JH, Im GI. Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds J Biomed Mater Res A. Feb; 92 (2): 659-666. 2010
- 5 Im GI, Kim HJ. Electroporation-mediated gene transfer of SOX trio to enhance chondrogenesis in adipose stem cells Osteoarthritis Cartilage Apr; 19 (4): 449-457. 2011
- 6 Hananouchi T, Aoki SK. Quantitative evaluation of capsular and labral resistances in the hip joint using a probing device Biomed Mater Eng 30 (3): 333-340. 2019