

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670747

研究課題名(和文) 間質血管細胞群移植による損傷腱組織再生迅速化

研究課題名(英文) Transplantation of stromal vascular fraction in tendon regeneration

研究代表者

関堂 充 (Sekido, Mitsuru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40372255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 屈筋腱損傷では十分な強度回復までの合併症による、機能的予後の悪化がしばしばある。本研究では、まず、マウスアキレス腱縫合モデルを作製、後療法として新規の術後足関節底屈位固定法を考案、術後評価方法として足関節可動域評価、およびアキレス腱使用再開までに要する期間を観察する実験系を確立した。続いて、マトリゲルに間質血管細胞群(SVF)と培養用培地を混合して移植する群と、マトリゲルに培養用培地のみ混合して移植する対照群を設け解析した。移植群では、可動域制限の改善とアキレス腱再使用までの期間が短縮した他、異所性軟骨形成が抑制され、SVF移植が腱再生における良好な治癒に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Flexor tendon injury of hand often results in limited hand functions. In this study, we have developed a new simple murine Achilles tendon suture model with ankle fixation. Right Achilles tendons were incised and 10-0 nylons were passed through the proximal and distal ends with modified Kessler's method. Then stromal vascular fraction in culture medium with Matrigel was applied in the SVF transplantation group, while only culture medium with Matrigel was applied in the control group. We recorded range of motion of plantarflexion of the ankles, and postoperative period until they started usage of the right Achilles tendons by their behavior. We revealed not only significant differences in those two factors, but also suppression of ectopic chondrogenesis which can lead poor quality of regenerating tendon.

研究分野：再建外科

キーワード：腱組織再生 マウスモデル 間質血管細胞群移植

1. 研究開始当初の背景

臨床における腱損傷に対する現在の治療体系は手術と後療法からなる。後療法としては固定法、早期運動療法などが行われている。屈筋腱損傷では、運動制限を解除できる程度に強度が回復するまで、術後約 12 週間という比較的長期の時間がかかるため、この間に関節可動域制限や周囲組織との癒着、再断裂等の合併症を生じ、機能的予後が悪くなるケースが少なくない問題点があった。これまでの約 30 年間は、上述の治療体系の範疇で、術式の改良やリハビリプロトコルの改良が行われてきたが、開発はプラトー相に達している。このため、さらなる合併症の低減を実現するには、新たなアプローチが必要であった。

一方で、近年、幹細胞を利用した再生医療研究が飛躍的に進展してきていた。ヒト皮下脂肪組織においては、多分化能を有する幹細胞の存在が 2001 年、Zuk らにより報告された¹⁾。この脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, ASC) の分化能は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) とは異なり限定的だが、骨芽細胞、軟骨、脂肪細胞、末梢神経、横紋筋、腱、平滑筋細胞、心筋、肝細胞等へ胚葉を超えた分化誘導が可能で注目されている。そのメカニズムにはパラクリン分泌される成長因子の関与等も関与しているとされる。

ヒトでは、皮下脂肪組織は脂肪吸引術等で大量に採取可能で、美容外科領域で注目されるようになっていた。本研究開始当初は再生医療新法の施行前であったが、「幹細胞治療」等を謳い、すでに多くの美容クリニック等で脂肪由来幹細胞 (を含む細胞群) の注入による若返り、豊胸術等が施行されていた。具体的には、現在までに、脂肪吸引術で採取した脂肪組織を酵素処理して得られる脂肪細胞以外である ASC が、移植されるかたちで豊胸術等に利用されている。移植後の組織の再生修復過程では ASC が中心的役割を果たすとされる。

近年、ASC は骨髄に代わる有用な組織幹細胞源として、各種組織治療研究で注目されている。また急性期の血管新生も促進すると報告されている。ASC は、MSC と骨、軟骨、筋肉、脂肪、神経、血管内皮等への同等な分化能を持っており、MSC よりも増殖力が高く、採取が容易かつ多量に採取可能であり臨床応用の際の利点になる。

これらから、腱損傷モデルへの、ASC を豊富に含む SVF の移植においても、損傷腱修復が促進されると考え、また一般医療機関での利用を前提とすると、移植は単離を要する ASC よりも SVF で行う方が実用化するまで早く望ましいと考えられたことから、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、上述の損傷屈筋腱治療に長期間がかかるという問題点に対して、損傷腱の再生迅速化を図ることで現状のリハビリプロトコルを前倒しせしめ、関節可動域制限や周囲組織との癒着を防止する戦略を立てた。

このために、脂肪組織から得られ ASC が多く含まれる間質血管細胞群 (stroma vascular fraction, 以下 SVF) の移植を、現状の手術療法に併用し、損傷腱の修復を迅速化させる治療法の可能性を追求することを目的とした。

また、遺伝子改変動物が比較的容易に利用できるマウスが動物モデルとしては優れている一方、その個体の小ささゆえの扱いにくさが問題点であった。ラット以上の動物モデルでは、腱縫合と後療法を行うモデルが多いが、マウスを用いた先行研究においては腱縫合を行わない腱断裂モデルが大半であり、腱縫合後に後療法を行っているものは腱再生治療モデルでは皆無であった。すなわち、これまでのマウス腱断裂モデルにおいては、腱治療や腱前駆細胞誘導に重要とされている mechanical stress²⁾の損傷腱へのかかり方が、ヒト臨床像とは乖離していた。本研究では、この実験系の根本的な問題点に関しても改良を試みた。

3. 研究の方法

まず、平成 25 年度に、マウスアキレス腱縫合+後療法を行う新規マウスモデルを構築した。右アキレス腱を切断後、10-0 nylon を用いて Kessler 変法で腱縫合を行い、後療法として、新規に考案したスプリントを用いて術後 7 日間の足関節底屈位固定をした。評価方法としては、本モデルで制限を生じやすい足関節底屈の可動域の計測評価、およびアキレス腱使用再開までに要する期間を行動学的に観察する実験系を確立した。

続いて、平成 26 年度に、マウス鼠径部皮下脂肪組織から SVF を採取し、3 継代を行って移植用細胞を調製し、細胞を調製したものと同系統の移植実験用マウスを準備し実験を進めた。マトリゲルを担体として SVF を培養用培地と混合して移植する SVF 移植群と、対照群としてマトリゲルに SVF の代わりに培養用培地のみを混合して移植する群を設け、実験を行った。術後の評価として、上述の足関節可動域評価、アキレス腱使用再開までの期間のほか、我々の予備的検討における治療過程でみられ、また先行研究においても腱治療過程では避けられないと報告されている異所性軟骨形成³⁾領域を組織学的に準定量評価した。

4. 研究成果

移植群では、アキレス腱再使用を開始するまでの期間が短縮した (図 1 上段)。また、足関節可動域制限の改善 (図 1 下段) は改善

した。

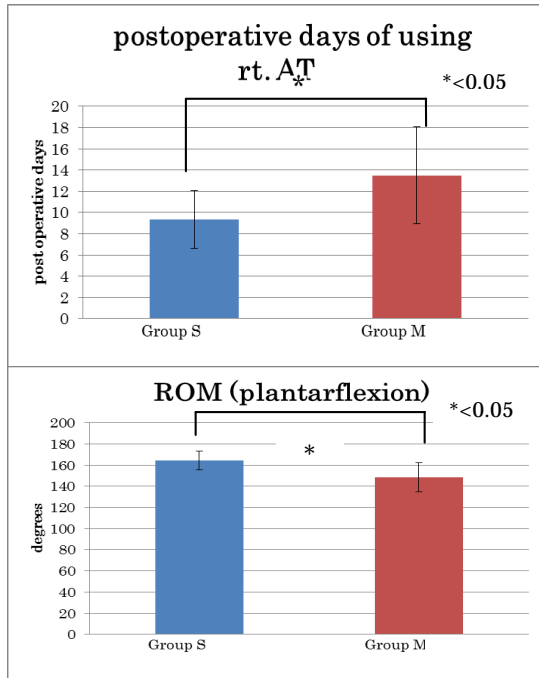


図 1

さらに、異所性軟骨形成の抑制傾向が認められた(図2上段:移植群。図2下段:対照群。赤線は、ともに近位遠位両アキレス腱断端)。SVF移植が腱再生過程における異所性軟骨形成とそれに引き続く異所性軟骨内骨化を抑制し、良好な治癒に寄与することが明らかとなった。

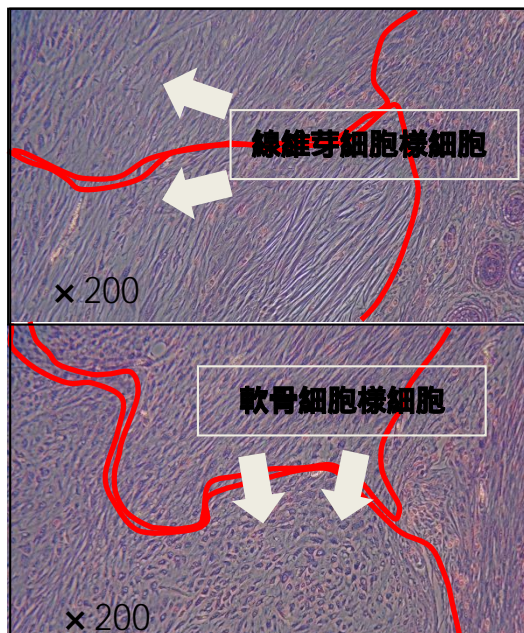


図 2

引用文献

- 1) Zuk PA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002;13:4279-4295.

- 2) Xiao Chen, et al. Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived MSCs to tenocytes. SCIENTIFIC REPORTS 2012. 2 :977. 3
- 3) Rooney P, et al. Endochondral ossification and de novo collagen synthesis during repair of the rat Achilles tendon. Matrix. 1992 Aug;12(4):274-81.

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)

[学会発表](計 5件)

1. 渋谷 陽一郎、木田 泰之、高山 祐三、櫛笥 博子、中須 麻子、関堂 充. 腱組織再生過程における SVF 移植の影響についての検討. 第 14 回日本再生医療学会総会. 2015 年 3 月 20 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. 渋谷 陽一郎、高山 祐三、櫛笥 博子、市原 佑紀、西島 暁生、橋本 佐知子、坂井 香、赤澤 俊文、佐々木 薫、相原有 希子、足立 孝二、木田 泰之、関堂 充. 脂肪由来幹細胞の腱、末梢神経再生への取り組みと課題. 第 8 回筑波大学形成外科同門会学会. 2015 年 03 月 14 日. 筑波大学(茨城県つくば市).
3. 渋谷 陽一郎、高山 祐三、櫛笥 博子、橋本 佐知子、佐々木 薫、足立 孝二、木田 泰之、関堂 充. 脂肪由来幹細胞のマウス腱縫合モデルへの移植効果. 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2014 年 10 月 9 日. キッセイ文化ホール(長野県松本市).
4. 渋谷 陽一郎、木田 泰之、高山 祐三、櫛笥 博子、関堂 充. 脂肪由来幹細胞の腱(前駆)細胞への分化誘導とマウス腱断裂モデルへの移植による腱再生への効果 - 第 1 報 -. 第 7 回筑波大学形成外科同門会学会. 2014 年 03 月 15 日. 筑波大学(茨城県つくば市).
5. 渋谷 陽一郎、木田 泰之、高山 祐三、櫛笥 博子、関堂 充. 遺伝子導入による幹細胞の tenocyte への分化誘導法開発およびモデルマウスにおける損傷腱再生迅速化への応用. 第 13 回日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月 5 日. 国立京都国際会館(京都府京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関堂 充 (Sekido, Mitsuru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40372255

(2) 研究分担者

佐々木 薫 (SASAKI, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号： 10536220

(3)研究分担者

足立 孝二 (ADACHI, Koji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号： 70572569