



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	In Vivo Effects of Intra-articular Administration of Hyaluronic Acid on Hyaline Cartilage Regeneration Induced by Implantation of PAMPS-PDMAAm Double-network Hydrogel [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	福井, 孝明
Description	配架番号 : 2103
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11231号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55661
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takaaki_Fukui_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 福井 孝明

学 位 論 文 題 名

In Vivo Effects of Intra-articular Administration of Hyaluronic Acid on
Hyaline Cartilage Regeneration Induced by Implantation of PAMPS-PDMAAm

Double-network Hydrogel

(PAMPS-PDMAAm ダブルネットワークゲルによって誘導される硝子軟骨再生に
対するヒアルロン酸関節内投与の in vivo 効果に関する研究)

【背景と目的】スポーツ振興に伴う関節軟骨損傷の増加は、先進諸国において国民の福祉に関わる重要な問題と認識されている。これまで医学の常識では、一度損傷を受けた関節軟骨は 血管・神経が存在しないため、in vivo で自然再生することはないとされてきた。それ故、限局した欠損を有する関節軟骨損傷に対する治療法として、骨髄刺激法、自家骨軟骨移植術、培養軟骨細胞移植術などが行われている。しかし、これらの治療法には再生組織の質と耐久性、長い免荷期間、大きな手術侵襲、高額な治療費などの問題点がある。

申請者の研究グループは独自に開発した、Bioactive な生体材料である poly-(2-Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS) と poly-(N,N'-Dimethyl acrylamide) (PDMAAm) から構成された PAMPS/PDMAAm ダブルネットワークゲル以下 DN ゲルに着目した。そしてこの DN ゲルを成熟家兎膝蓋大腿関節軟骨欠損部の基底部に関節面からゲル表面まで、深さ数 mm の欠損が残るように埋め込む研究を行った。術後 4 週でこの欠損部に、関節軟骨が in vivo で自然再生することを発見した。この結果は「関節軟骨は in vivo で再生することは無い」とする医学の常識に大きな修正を加えるだけでなく、全く新しい関節軟骨再生治療戦略を提唱した。しかし、術後 12 週間を経過すると、その再生軟骨の量に減少が見られた。この事実は DN ゲルを硝子軟骨自然再生治療に応用しようと企図する時、大きな問題と考えられた。そこで、この問題を解決するためには、DN ゲルの硝子軟骨再生効果を増強できる付加的治疗法の開発が必要と考えられた。

軟骨再生治療において、その質の改善のために液性因子を含む生物学的因子の直接投与やスキャフォールドへの付加など様々な方法が研究されている。近年、ヒアルロン酸(以下 HA)は、in vitro において軟骨細胞の増殖とマトリックス合成を促進することが報告された。さらに申請者の研究グループは、HA の培地への添加が、DN ゲルのコンポーネントである PAMPS ゲルが ATDC5 細胞に対して有する軟骨分化誘導効果を増強させることを報告した。したがって、HA は DN ゲルを用いた関節軟骨自然再生を in vivo で促進させる可能性がある。申請者は、手術直後、術後 1 週、および術後 2 週における HA の関節内投与は、DN ゲルを用いて再生させた術後 12 週における硝子軟骨量を有意に増加させるという仮説を立てた。この研究の目的はこの仮説を検証することである。

【材料と方法】本研究では 2 つの実験を行った。実験動物には、日本白色家兎 48 羽を用いた。各々の手術には、pentobarbital 25 mg/kg による静脈麻酔施行後に清潔操作を用いて行った。第一の研究では家兎 36 羽を用いた。両膝において、内側傍膝蓋アプローチにより膝蓋骨を外側に転位させて膝関節を展開し、両膝大腿骨滑車中央の関節面（関節軟骨の厚みは約 0.5mm）に垂直な直径 4.3mm の骨軟骨欠損を作成した。36 羽中 18 羽には両膝に骨軟

骨欠損作成後、関節表面から2mmの深さの空隙が残るように基底部にDNゲル円柱プラグを埋植した(Group DN)。2mmの空隙を残した理由は、申請者らの研究グループの過去の実験においてDNゲルが最も効果的に軟骨再生を誘導した深さだからである。残り18羽は骨軟骨欠損にDNゲルプラグを埋植せずコントロール群とした(Group C)。ヒトに使用されている平均分子量80万DaのHAを実験に用いた。両群のすべての家兎に対して、左膝にはHA 1.0mlを術直後、術後1週と2週の計3回、経膝蓋腱アプローチで穿刺して関節内へ投与した(Sub-group HA(+))。この投与法はStraussらの方法に準じた。また、右膝には左膝と同様にPBS 1.0mlを計3回関節内投与した(Sub-group HA(-))。手術後、各々動物は関節固定を行わずにケージ内で自由に動けるように飼育した。それぞれのグループは術後2週、4週、および12週にて6羽ずつ安楽死させ、組織学的、免疫組織学的評価に供した。

第二の研究は第一の研究結果を基盤として企画され、家兎12羽を用いて、再生組織内に発現したⅡ型コラーゲン、アグリカン、およびSox 9 mRNAを測定した。すべての家兎の両膝に、第一の研究同様にDNゲルプラグを埋植し、左膝にはHAを投与し(Sub-group HA(+))、右膝にはPBSを関節内投与した(Sub-group HA(-))。術後2および4週に欠損部に再生した組織を採取しreal-time polymerase chain reaction (PCR)を用いてⅡ型コラーゲン、アグリカン、Sox 9のmRNA発現量を測定し、Sub-group HA(+)とSub-group HA(-)で比較した。術後2および4週を選択した理由は、申請者の研究グループの先行実験においてこれらの遺伝子発現に対してのHA関節内投与の影響を見るために最も適した時期として考えられたからである。

各週におけるサフラニンO（以下S-O）染色標本をオドリスコールスコアを用いて定量化した。このスコアは24点満点で、点数が高いほど良好な軟骨修復であることを示す。また12週におけるGroup DNのS-O染色標本は画像処理・解析用フリーソフトimageJを用いて再生組織の面積と再生組織におけるプロテオグリカンーリッチエリアの面積比を算出した。免疫組織学的評価でⅡ型コラーゲンの確認を行った。リアルタイムPCRを用いてアグリカン、Ⅱ型コラーゲン、Sox9およびGAPDHのmRNA発現を解析した。リアルタイムPCRにより得られた各遺伝子発現量はGAPDHの発現に対する相対値とした。統計学的解析には対応のあるt検定及び分散分析を用いて検討した。

【結果】4、12週Group DNにおける組織標本では再生軟骨組織を認めた。免疫組織学的標本ではS-O染色陽性部と一致した反応を認めた。Group Cでは、いずれのsub-groupにおいても再生組織は主として骨組織であり、再生軟骨は認めなかった。

オドリスコールスコアでは4、12週のGroup DNはそれぞれGroup Cに比べ有意に高値であった。また12週Group Gでは4週Group Gに比べ有意に高値であった。

12週S-O染色組織標本におけるプロテオグリカンーリッチエリアの面積比では、Group DNのSub-group HA(+)が他の群よりも有意に大であった。

リアルタイムPCRによる解析では、2週においてmRNA発現量がSub-group HA(+)でアグリカン、Ⅱ型コラーゲンとSox9の発現量が有意に高値であった。

【考察】本研究の結果、術後のHA関節内投与は、DNゲルの基底への埋植が誘導する、関節軟骨自然再生の2週におけるアグリカン、Ⅱ型コラーゲン、Sox9のmRNA発現を有意に促進し、また術後12週の再生組織における軟骨組織の量を有意に増加させることを示した。

12週Group DNの(Sub-group HA(+))の再生軟骨において、プロテオグリカンに富む軟骨組織の量が(Sub-group HA(-))に比べ有意に多かったという事実は、2週で見られた遺伝子発現に与えた効果は、最終的な軟骨組織の量の有意な増加をもたらせたと考えられた。今後は、HAの投与回数、骨欠損作成部位の変更、HA投与が長期成績に与える効果および再生軟骨の生体力学的評価を検討することが必要である。

【結語】DNゲルを用いた軟骨自然再生誘導治療を行った直後のHA関節内投与は、術後2週において軟骨関連遺伝子の発現を促進し、12週において再生軟骨組織量を増加させた。

臨床への関連として、HAの付加的効果はDNゲルによるセルフリー軟骨再生治療法の臨床応用への可能性を前進させた。