HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	金, 佑泳
Description	配架番号：2452
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13438号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74340
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Wooyoung_Kim_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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 金 佑泳

学 位 論 文 題 名

高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発

（Development of a surgical technique for meniscal wound repair using an ultra-purified alginate gel）

【背景と目的】 半月板は膝関節内に存在し、大腿骨−脛骨間の内・外側に存在する三日月型の線維軟骨組織である。膝関節にかかる強大な荷重を分散する荷重緩衝作用、および安定性保持作用を有する。半月板組織は、辺縁の一部を除いては無血管領域であるために、自己修復能に乏しく一度損傷すると切除形成を行わざるを得ないことが多い。半月板に欠損が生じると荷重分散機能を失ってしまい、最終的には変形性膝関節症が惹起される。半月板損傷に対する治療法として、半月板同種移植、人工半月板、滑膜細胞移植など報告は散見されるが、半月板再生に関する研究は極めて少なく、本邦において臨床的に実用できる治療は存在しない。

当科で開発した高純度アルギン酸ゲル (UPAL ゲル) は、スキャフォールドとして、未分化細胞に対して優れた細胞増殖能、軟骨分化誘導能を持つ。また動物の骨軟骨欠損モデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞移植を併用することで良好な硝子軟骨様基質による軟骨修復が得られた。これらの研究結果に基づき、本基材は線維軟骨組織である半月板再生においても人工マトリクスとして用いることができる可能性があると着想した。本研究の目的は①家兎半月板部分欠損モデルにおいて UPAL ゲル移植が半月板修復に与える効果を検討し、②損傷した半月板の組織修復を担う組織、細胞の由来に関して in vivo 凍結解凍法 (freeze-thaw technique) を用いて明らかにすることである。

①家兎半月板部分欠損モデルにおいて UPAL ゲル移植が半月板修復に与える効果

【対象と方法】成熟日本白色家兎 43 羽 86 膝を用いた。両膝の内側半月板前節に対して直径 2 mm の生検用パンチを用いて円形全層欠損を作製し、左膝を欠損群、右膝をゲル群とした。術後 3 週、6 週、および 12 週で肉眼的・組織学的定量評価を施行した。また、術後 6 週及び 12 週において、0.5 mm の indenter tip を用い変位制御（0.5 mm）による繰り返し負荷試験 (cross-head speed 0.1 mm/sec) による力学的評価を行い、正常膝と比較した(n=6)。

【結果】欠損群の半月板欠損部は、薄い線維性組織で被覆され、12 週では 10 膝中 8 膝に前節部の欠損を認めた。一方、ゲル群では、欠損部には円形の核を有する軟骨細胞が多数観察され、12 週では Safranin-O 染色に濃染する線維軟骨様組織で充填されていた。肉眼的評価では、全ての週においてゲル群が欠損群より有意に高く(p=0.026)、12 週における組織学的評価においても、ゲル群は欠損群より有意に高かった(p=0.016)。修復組織の線形剛性は、ゲル群(6 週、12 週)では正常半月板より低値であったものの(p=0.015, p=0.022)、欠損群(6 週)と比べ有意に高値であった(p=0.006, p=0.015)。

②損傷した半月板の修復組織及び細胞の由来の追跡

【対象と方法】成熟日本白色家兎 32 羽 64 膝を用いた。家兎の内側半月板前節に直径 2 mm の円形全層欠損を作製した。凍結解凍処置を行った部位別に 4 群に分け (n=8)、欠損部に UPAL ゲルを充填した。ゲル群 A には凍結解凍を行わず、ゲル群 B には内側半月板全域を、ゲル群 C には内側半月板周囲の滑膜組織を、ゲル群 D には内側半月板全域およびその周囲の滑膜組織を凍結解凍した。 術後 1、6 週での修復組織を組織学的に評価した。組織学的評価には Zellner らの方法を用いた。統計学的評価には JMP pro を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

【結果】1 週目にはどの群にも線維軟骨組織は殆ど認められず、4 群間の組織学的スコアには有意差を認めなかった。 一方、6 週目には、ゲル群 A とゲル群 B の欠損部は、saf-O 染色で濃染する厚い線維軟骨様組織で満たされていた。また、修復組織の細胞は円形、卵円形の核と豊富な細胞質を含んでいた。一方で、ゲル群 C およびゲル群 D の欠損部は、疎な線維組織で満たされ、線維軟骨様細胞を殆ど認めなかった。滑膜を凍結解凍しなかった群（ゲル群 A、ゲル群 B）は滑膜を凍結解凍した群 (ゲル群 C、ゲル群 D)よりスコアが統計学的に有意に高値であった(ゲル群 A vs ゲル群 C とゲル群 D、$P<0.01$; ゲル群 B vs ゲル群 C とゲル群 D、$P<0.05$)。

【考察】先行研究において、UPAL ゲルの単独移植は家兎およびイヌ骨軟骨損傷モデルにおいて硝子様軟骨の修復を促進することが示されている。我々はこれらの結果に基づいて、UPAL ゲルの単独移植が半月板損傷部にも線維軟骨様組織の修復を促進するという仮定をたてた。仮説を検証するために行なった本研究(①)の結果、UPAL ゲル移植は線維軟骨様組織による修復を促進し、修復組織の線形剛性を向上させたことが示された。さらに、 半月板損傷の修復を担う細胞及び基質の由来がどの組織であるのかを明らかにするために本研究(②)を施行した。得られた結果から我々は、損傷半月板の修復を担う細胞の主な源泉は半月板より滑膜組織の SMSC (Synovium-derived msenchymal stem cell) であると結論づけた。本研究は半月板損傷に対する新しい組織工学的治療法を提示したという点で充分な意義があると考える。特に臨床面において、本方法は損傷した半月板を縫合するときに生じた間隙に UPAL ゲルを単独あるいは血餅等と混合して埋植することで、組織修復能と強度を向上させることが可能となる。また、半月板修復過程において、その修復に関与し再生をもたらす細胞の供給源となる組織を検討した結果、再生細胞が主に滑膜組織に由来していたことを明確にした。本研究結果を踏まえて、半月板損傷の再生治療開発に際して、滑膜および SMSC の役割とその効能を向上させることに重点を置くことが、今後の半月板再生医療における成功の鍵となり得ると考えられる。今回得られた結果は、今後の半月板の再生医療及び組織工学における重要な知見になると確信している。

【結論】UPAL ゲル移植によって、従来から修復困難とされている半月板損傷に対する治療成績の向上が期待される。また、半月板修復を担う細胞の主な供給源が滑膜であることを明かした。本結果は、半月板の再生医療及び組織工学の研究に重要な方向を提示すると期待される。今後は、半月板治療における UPAL ゲルの安全性と有効性を臨床研究で証明していく必要がある。将来的には、さらに低侵襲な関節鏡下で可能な手術手技となるよう、さらなる手技の開発と研究が必要になるだろう。