

令和元年6月10日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18806

研究課題名(和文)ウマの滑膜由来間葉系幹細胞を用いた骨軟骨再生に関する研究

研究課題名(英文) A study about osteochondral regeneration using equine synovial membrane-derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

村田 大紀 (Murata, Daiki)

佐賀大学・医学部・特任助教

研究者番号：00772683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、ポニーから分離した滑膜幹細胞を用いて、直径6.3mmで高さ5.0mmの、円柱状で移植に耐え得る強度を持った、細胞構造体を作製することに成功した。次に、ポニーの大腿骨内側顆に骨軟骨欠損を作出し、構造体を自家移植した。移植後6ヶ月間、CT検査により経過を観察し、無処置(無移植)の場合に比べて欠損が早く縮小する傾向が確認された。その後、移植後6ヶ月でMR検査と関節鏡検査を行った結果、関節表面が滑らかに再現され、関節軟骨の再生が認められる個体が確認された。その後は剖検を行い、組織学的検査を行った結果、欠損孔の表層には硝子軟骨が再生され、深層には軟骨下骨が形成されている個体が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ウマの関節疾患に対する治療法の確立を目的とした。当該疾患に対する現在の治療法において、関節軟骨と軟骨下骨が再生された例はなく、幹細胞から成る細胞構造体を用いて、軟骨と骨の両方を同時に再生させた我々の研究成果は、従来の治療法を根本から見直す次世代の治療法を提案するものである。また、国内で前例のないウマの膝関節骨軟骨欠損モデルを作出し、骨軟骨再生を実証した独創的な研究成果でもある。本研究成果は今後、動物医療分野のみならずヒト医療分野にも多大なる影響を及ぼし、中・高齢期に多い変形性関節症患者の骨軟骨欠損に対する新たな組織再建法として、生活水準の飛躍的な向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Firstly in this study, cylindrical cell constructs, which were 5.0mm in height and 6.3mm in diameter and stood implant operation, could be prepared using synovial membrane-derived mesenchymal stem cells that were isolated from ponies. Subsequently, an osteochondral defect was created in femoral medial condyle of each pony, and then the construct was autografted. The implanted sites had been observed by CT examination for 6 months after transplantation, and it was confirmed that the defects tended to shrink earlier than in the case of no treatment (no implantation). Then, as a result of MR examination and arthroscopy six months after implantation, the joint surface was reproduced smoothly, and the articular cartilage regeneration was confirmed in a pony. After that, autopsy was performed and then histological examination showed that the articular cartilage was regenerated on the surface layer of the defect and the subchondral bone was formed on the deep layer in a pony.

研究分野：再生医学

キーワード：骨軟骨再生 細胞構造体 スキャフォールドフリー 滑膜 間葉系幹細胞 軟骨下骨囊疱 変形性関節 症 ウマ

1. 研究開始当初の背景

動物における関節疾患の中でも、サラブレッド競走馬の関節内骨折、離断性骨軟骨症、および軟骨下骨嚢胞は、若齢期に変形性関節症が進行する、ウマにとって重篤な疾患である。しかしこれらの疾患に対して、損傷および欠損した組織を再建する有効な治療法は、未だ確立されていない。我々は以前より、細胞足場となる人工基材を一切用いることなく、幹細胞からなる細胞凝集塊を鋳型の中で三次元的に配置し、相互に癒合させることで形成される立体的な細胞構造体を骨軟骨欠損部に移植して、関節軟骨と軟骨下骨を同時に再生させる方法を、動物実験の実施を通して検討してきた。近年の再生医療研究では、幹細胞をシート化あるいはゲル化して移植する方法が提案されているが、申請者は「細胞が凝集塊をなす性質」と「細胞集塊を立体的に配置すると隣接する凝集塊同士が癒合する性質」を利用し、三次元立体細胞構造体を作製して骨軟骨欠損部に移植することで、組織を再生させる新たな細胞治療戦略を立てた。

これまで我々が行ってきた検討においては、実験用ミニブタを使用して、大腿骨非荷重面(滑車溝)に骨軟骨欠損を作出し、同一個体から得られた脂肪由来幹細胞を用いて細胞構造体を作製して、欠損部に自家移植してきた。その後、定期的に画像検査により組織の再生を観察・評価した上で、移植後6ヶ月が経過した時点で組織学的検査を行い、細胞構造体を移植することで関節軟骨および軟骨下骨を再生させることが可能であることを、既に確認している。また、関節疾患を発症したウマの滑液から、細胞を分離・培養することにも成功しており、得られた細胞の性質を解析して、その細胞を『滑液由来幹細胞』と同定した(正常な関節の滑液からでは通常、幹細胞はほとんど分離できない)。また滑液由来幹細胞の性質は、滑膜由来幹細胞と酷似していることがわかり、脂肪および骨髄由来幹細胞に比べて、特に軟骨分化能に優れていることも既に報告している(その実験では、滑液および滑膜由来幹細胞を平板培養して軟骨分化誘導を施すことで、軟骨様のシート状構造物が得られたため、我々はこのシートを『軟骨(コンドロ)シート』と名付けた)。そこで、正常な関節の滑液からでは幹細胞の分離が困難であることから、動物実験を行う際の移植細胞源としては滑膜が最適であると考えられ、本研究では滑膜由来幹細胞を用いて、関節軟骨および軟骨下骨の再生を目指す実験を行うこととした。

2. 研究の目的

ウマの関節内骨折、離断性骨軟骨症、および軟骨下骨嚢胞といった関節疾患に対する治療法の確立を目的とした本研究では、ウマの滑膜から分離・培養した幹細胞を三次元配置して細胞構造体を作製し、同一個体の関節に作出した骨軟骨欠損へと自家移植することで、関節軟骨および軟骨下骨の再生を目指すこととした。そのため、以下の3つを具体的な実施項目とした。

- (1) ウマの大腿骨荷重面(内側顆)に骨軟骨欠損を作出し、無処置の場合の経過を観察する。
- (2) ウマから滑膜を採取して幹細胞を分離・培養し、三次元立体細胞構造体を作製する。
- (3) 大腿骨内側顆に作出した骨軟骨欠損に、細胞構造体を自家移植して、経過を観察する。

3. 研究の方法

まず初めに、ウマの大腿骨荷重面である内側顆に骨軟骨欠損を作出し、無処置での修復過程を、画像検査および関節鏡検査によって観察した。次に、ウマの手根関節から滑膜を採取して幹細胞を分離・培養し、三次元立体細胞構造体を作製した。その後、新たに作出した骨軟骨欠損に細胞構造体を自家移植して一定期間、画像検査および関節鏡検査によって経過観察を行うことにより、骨軟骨再生を臨床的に評価した上で、最終的には組織学的検査も行い、骨軟骨再生の組織的評価も行った。それにより、関節軟骨および軟骨下骨の再生について、細胞構造体の移植効果を検討すると共に、臨床評価と組織評価の関連性についても明らかにすることとした。以上の研究内容について、その詳細な方法を以下に記載した。

- (1) 実験用ウマ(ポニー; n=3)の膝関節を切開して大腿骨内側顆を露出させ、内側顆の荷重面に直径**6.8 mm**で深さ**5.0 mm**の円筒状の骨軟骨欠損を作出した。その後、無処置の場合の修復過程を6ヶ月間、CT検査で経過を観察した後、手術後6ヶ月でMR検査と関節鏡検査を行った上で、最終的には剖検後に組織学的検査を行った。
- (2) ポニーの手根関節から関節鏡視下で滑膜を採取して、幹細胞を分離・培養し、 1×10^8 個以上の細胞が得られた段階で、1ウェルあたり 5×10^4 個ずつ、96ウェルのU底プレート20枚に播種した。48時間後、細胞が球状の集塊をなして形成する細胞凝集塊を、円筒状の鋳型(内径**6.3 mm**、高さ**10.0 mm**)の中に約**1,900**個積み重ね、その後の移植に耐え得る強度を持った三次元立体細胞構造体の作製に取り組んだ。
- (3) ポニーの膝関節を切開して大腿骨内側顆を露出させ、内側顆の荷重面に直径**6.8 mm**で深さ**5.0 mm**の円筒状の骨軟骨欠損を作出し、あらかじめ準備しておいた円柱状の細胞構造体を自家移植した。移植後6ヶ月間、CT検査で経過を観察した後、移植後6ヶ月でMR検査と関節鏡検査を行った上で、最終的には剖検後に組織学的検査を行った。また、臨床検査(CT検査・MR検査・関節鏡検査)と組織検査における評価結果の比較を行い、両者の関連性についても検討した。

4. 研究成果

本研究では、ウマの滑膜から分離・培養した幹細胞を三次元配置して細胞構造体を作製し、同一個体の膝関節荷重面に作出した骨軟骨欠損に自家移植した。その後、関節軟骨および軟骨下骨の再生について、画像検査および関節鏡検査を行うことで経過観察して臨床的に評価し、最終的には組織学的検査により詳細な組織評価を行った。さらに、臨床検査（画像検査と関節鏡検査）と組織検査から得られた評価結果を統括し、臨床評価と病理評価の関連性について検討した。以上の研究内容について、その成果を以下に記載した。

- (1) ポニーの大腿骨内側顆に骨軟骨欠損を作出し、無処置の場合の修復過程を、画像検査や関節鏡検査を行って観察した。CT検査では、欠損作出直後に比べて欠損が一度大きくなる傾向が認められ、手術後6ヶ月の時点においても、骨の修復はほとんど認められなかった。手術後6ヶ月のMR検査では、表層に軟骨の修復を示唆する所見はごく一部でのみしか認められず、深層にも骨形成を示唆する所見はほとんど確認されなかった。関節鏡検査では、欠損部の表層に軟骨組織が被覆する所見は認められなかった。さらに、組織学的検査では、欠損孔は大きく開存しており、軟骨組織と骨組織の修復が部分的に認められたものの不完全で、欠損内部は線維性組織で充填されていた。
- (2) ポニーから関節鏡視下で滑膜を採取し、得られた幹細胞を用いて移植に適した細胞構造体の作製に取り組んだ。円筒状の鋳型の中に細胞凝集塊を積み重ね、移植時（細胞構造体の作製から7日後）に鋳型から取り出した際には、直径6.3mmで高さ5.0mmの円柱状の細胞構造体を得ることに成功した。また、本研究で作製した構造体は、弾力性を有しており、鑷子で保持しても形状が保持され、移植に耐え得る強度を持った移植体であった。
- (3) 膝関節を切開して、大腿骨内側顆に骨軟骨欠損を作出し、あらかじめ準備しておいた細胞構造体を自家移植した。移植後6ヶ月間、CT検査により経過を観察した結果、全てのポニーにおいて、無処置の場合に比べて欠損が早く縮小する傾向が認められた。CT検査後、移植後6ヶ月でMR検査と関節鏡検査を行った結果、関節表面が滑らかに再現されており、関節軟骨の再生が認められる個体が確認された。その後は剖検を行い、組織学的検査を行った結果、欠損孔の表層には硝子軟骨が再生され、深層には軟骨下骨が形成されている個体が認められた。以上の臨床検査および組織検査の結果から、得られた評価を統括してそれぞれの関連性についても検討し、実際の臨床現場における評価基準を設定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamasaki A, Kunitomi Y, Murata D, Sunaga T, Kuramoto T, Sogawa T, Misumi K. Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printing in minipigs. *Journal of orthopaedic research*. (in press) DOI: 10.1002/jor.24206. 【査読有】

Yamasaki A, Omura T, Murata D, Kobayashi M, Sunaga T, Kusano K, Ueno Y, Kuramoto T, Hobo S, Misumi K. A pilot study of regenerative therapy by implanting synovium-derived mesenchymal stromal cells in equine osteochondral defect models. *Journal of equine science*, 29(4), 117-122, 2018. DOI: 10.1294/jes.29.117. 【査読有】

〔学会発表〕(計 13 件)

村田大紀, 石川真悟, 齋藤靖生, 須永隆文, 十川英, 藤木誠, 三角一浩, 中山功一, 帆保誠二, 畠添孝. ウマ滑膜由来間葉系幹細胞を用いて作製した3次元細胞構造体による骨軟骨再生に関する研究. 第31回日本ウマ科学会学術集会. 2018年.

村田大紀, 石川真悟, 齋藤靖生, 須永隆文, 十川英, 藤木誠, 三角一浩, 中山功一, 帆保誠二, 畠添孝. ウマ滑膜由来間葉系幹細胞を用いて作製した立体構造体による膝関節荷重面の骨軟骨再生. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年.

Murata D, Ishikawa S, Saito Y, Sunaga T, Sogawa T, Fujiki M, Misumi K, Nakayama K, Hobo S, Hatazoe T. Osteochondral regeneration using a scaffold-free 3D-construct of SM-MSCs in horse. 14th World Congress of International Cartilage Repair Society. 2018.

村田大紀, 石川真悟, 齋藤靖生, 須永隆文, 十川英, 藤木誠, 三角一浩, 中山功一, 帆保誠二, 畠添孝. ウマ滑膜由来間葉系幹細胞を用いて作製した3次元立体構造体による膝関節荷重面の骨軟骨再生. 第17回日本再生医療学会総会. 2018年.

村田大紀, 三角一浩, 中山功一. 産業動物獣医療での応用に向けた骨軟骨再生への試み. 第160回日本獣医学会学術集. 2017年.

村田大紀, 山崎淳史, 松崎翔大, 須永隆文, 十川英, 宋丹丹, 國富芳博, 原田香織, 中山功一, 三角一浩. プタ脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いてバイオ3Dプリンターで作製した立体構造体による骨軟骨再生. 第16回日本再生医療学会総会. 2017年.

村田大紀, 三角一浩, 中山功一. 獣医学領域での運動器再生への試み. 第 160 回日本獣医学学会学術集会. 2017 年.

Murata D, Kunitomi Y, Harada K, Song D, Sunaga T, Nakayama K, Sogawa T, Fujiki M, Misumi K. Osteochondral regeneration using a scaffold-free construct of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printer with needle-array in pigs. International Cartilage Repair Society Heritage Summit. 2017.

大村昂也, 村田大紀, 小林稔, 草野寛一, 帆保誠二, 三角一浩. サラブレッドにおける滑膜由来間葉系間質細胞の他家及び自家移植による骨軟骨治療. 第 93 回日本獣医麻酔外科学会. 2016 年.

石川真悟, 村田大紀, 堀之内千恵, 溝口隆悟, 三角一浩, 帆保誠二. サラブレッド狼歯由来歯髄幹細胞の簡便かつ安定的な培養法の確立. 第 29 回日本ウマ科学会. 2016 年.

Murata D, Tokunaga S, Akieda S, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K. Osteochondral regeneration of the loading-bearing site using a scaffold-free 3D construct of swine AT-MSCs. 13th World Congress of International Cartilage Repair Society. 2016.

Yamasaki A, Matsuzaki S, Murata D, Sunaga T, Tantan S, Kunitomi Y, Harada K, Nakayama K, Misumi K. Osteochondral regeneration using a scaffold-free 3-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells created by bio 3-dimensional printer. 13th World Congress of International Cartilage Repair Society. 2016.

村田大紀, 徳永 暁, 秋枝静香, 藤木 誠, 中山功一, 三角一浩. ブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた 3 次元立体細胞構造体による膝関節荷重面の骨軟骨再生. 第 159 回日本獣医学学会学術集会. 2016 年.

〔図書〕(計 1 件)

村田大紀, 中山功一. 脂肪組織由来間葉系幹細胞の三次元構造体による骨軟骨再生. 臨床整形外科, 53(1), 35-41, 2018 年.

〔産業財産権〕

- ・出願状況 (計 0 件)
- ・取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

- ・researchmap 村田 大紀
(https://researchmap.jp/daiki_net_official/)
- ・日本の研究.com 村田 大紀
(<https://research-er.jp/researchers/view/741549>)
- ・佐賀大学 教員活動データベース 村田 大紀 (医学部)
(<https://research.dl.saga-u.ac.jp/profile/ja.a2db15634a4e7499.html>)
- ・日本ウマ科学会 学術集会 第 31 回学術集会優秀発表賞受賞者
(jses.equinst.go.jp/contents/page.php?id=372)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

- ・畠添 孝 (HATAZOE, Takashi)
- ・帆保 誠二 (HOBO, Seiji)
- ・石川 真悟 (ISHIKAWA, shingo)
- ・須永 隆文 (SUNAGA, Takafumi)
- ・斎藤 靖生 (SAITO, Yasuo)
- ・十川 英 (SOGAWA, Takeshi)
- ・藤木 誠 (FUJIKI, Makoto)
- ・三角 一浩 (MISUMI, Kazuhiro)
- ・中山 功一 (NAKAYAMA, Koichi)