

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500403
 研究課題名（和文） 軟骨分化、軟骨再生における組織由来間葉幹細胞の特性と多様化に関する研究
 研究課題名（英文） The study of origin tissue dependency of MSCs on chondrogenesis.
 研究代表者
 市野瀬 志津子（ICHINOSE SHIZUKO）
 東京医科歯科大学・先端研究支援センター・助教
 研究者番号：60014156

研究成果の概要：本研究は、骨髄、滑膜、軟骨、脂肪組織由来間葉幹細胞の軟骨分化能の違いに関する実験を行うもので、骨髄、滑膜、軟骨、脂肪組織由来幹細胞の高密度培養とコラーゲンゲル培養により軟骨分化能を比較する *in vitro* 実験（平成19年度）と骨髄、滑膜、軟骨、脂肪組織由来幹細胞-コラーゲンゲル複合体をウサギ軟骨欠損部およびラットの骨膜近傍に移植して軟骨分化能を比較する *in vivo* 実験（平成20年度）から成っている。*in vitro* 実験では、骨髄、滑膜、軟骨組織由来の軟骨分化誘導過程を比較し、論文および学会に発表した。*in vivo* 実験では滑膜、骨髄組織由来の軟骨分化能を確認し、論文および学会に発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨髄、滑膜、軟骨、脂肪組織由来間葉幹細胞・軟骨分化能・軟骨再生能・高密度培養・コラーゲンゲル培養・移植実験

1. 研究開始当初の背景

失われた組織の再生のために自分自身の別の組織の細胞を利用できたら…、提供者が限られている組織の治療が提供の容易な組織幹細胞の移植で可能になったら…。間葉幹細胞の再生医療への応用に対する期待は高まっている。実際、米国ならびに日本において骨髄由来間葉幹細胞を骨・軟骨欠損の治療薬として臨床実験が行われている。

間葉幹細胞は、1976年Friedensteinにより初めて報告された。線維芽細胞様の紡錘

体の形をしている接着性の高い細胞で、ヒトの骨髄においては、単核細胞中の10,000～100,000個に1個の割合で存在している。2000年代には骨髄に加え、滑膜、海綿骨、脂肪組織、骨膜、骨格筋、乳歯などに間葉幹細胞の存在が報告されている。この組織由来間葉幹細胞は、高い自己複製能と骨や脂肪、軟骨、筋肉などに分化する多分化能を有することが明らかになった。しかし、由来組織の違いによる間葉幹細胞の特性や、分化能の違いに関する報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究は骨髄、滑膜、軟骨、脂肪組織由来間葉幹細胞を作製し、軟骨分化能および軟骨再生能の違いに関する実験を行い、組織由来間葉幹細胞の再生医療への応用の道を探ることを目的としている。

3. 研究の方法

実験は骨髄、滑膜、軟骨および脂肪組織由来の間葉幹細胞を採取し、高密度培養とコラーゲングル培養の三次元培養による軟骨分化誘導実験 (in vitro 実験) および動物の関節軟骨欠損部、ラットの骨膜下、筋肉中への移植を行う移植実験 (in vivo 実験) の2つの実験を行った。詳細を以下に示す。

(1) in vitro 実験 :

① 骨髄、滑膜、軟骨および脂肪組織由来間葉幹細胞 (MSC) を増殖培地で増殖させた後、TGF β 3、BMP2 および dexamethasone を含む軟骨分化培地中で高密度培養およびコラーゲングル培養を行った。

② 培養1日、7日、14日、21日目の高密度培養ペレットおよびコラーゲングルの組織を2.5%グルタルアルデヒドおよび4%パラホルムアルデヒド固定液で固定した。

③ 顕微鏡による形態観察には1%O₄固定液で後固定後、エタノールによる脱水の後、エポン包埋した。つづいて薄切して顕微鏡および電顕で観察した。

④ 免疫組織化学では0.5~1 μ m厚さの準超薄切片を作製し、一次抗体に浸漬後、蛍光抗体またはDABで標識して、顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡で観察した。免疫電顕では100 nm厚さの超薄切片を一次抗体に浸漬後、金粒子二次抗体で標識して、電顕で観察した。

⑤ 軟骨分化誘導における骨髄、滑膜、軟骨および脂肪組織由来の各幹細胞の特性と分化能の違いを統括した。

(2) in vivo 実験 :

① 骨髄、滑膜および脂肪組織由来幹細胞-コラーゲングル複合体を作製した。移植する間葉幹細胞は、QdotまたはDiIで標識した。

② ウサギ滑膜組織由来幹細胞-コラーゲングル複合体を軟骨欠損部に移植およびラット骨髄、脂肪組織由来幹細胞-コラーゲングル複合体をラットの骨膜下および筋肉中に移植する実験を行った。

③ 移植後3日、1週間、3週間、6ヶ月に移植組織を含む軟骨組織を採取して、電顕および顕微鏡での観察、免疫組織化学により蛋白の局在を調べた。

④ 本研究により、由来組織の違いによる間葉幹細胞の軟骨分化能および軟骨再生能の違いを明らかにした。

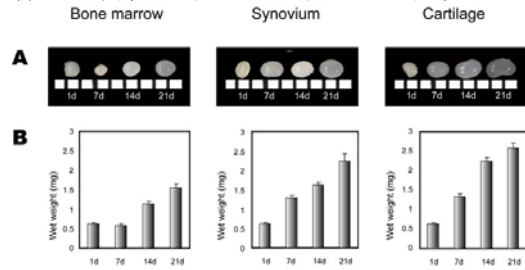
4. 研究成果

(1) 平成19年度 (in vitro 実験)

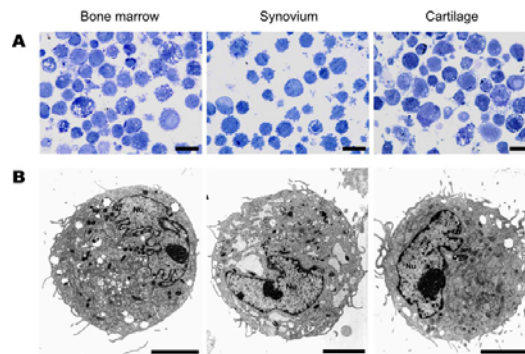
① 高密度培養 :

骨髄 (bone marrow)、滑膜 (synovium)、軟骨 (chondrocyte) 組織由来幹細胞の軟骨分化過程について

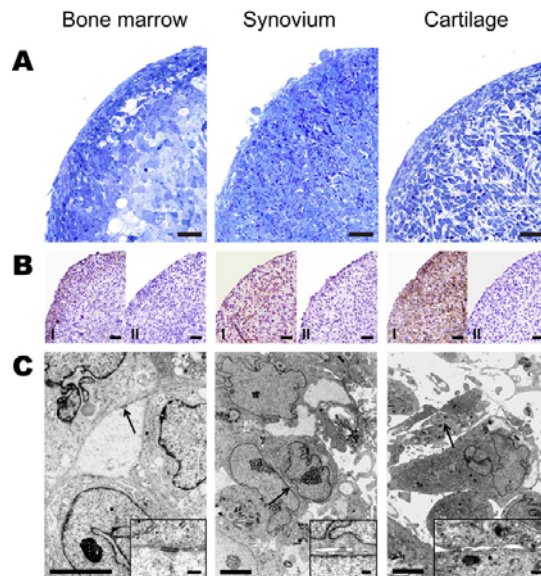
幹細胞凝集塊 (ペレット) の重量変化



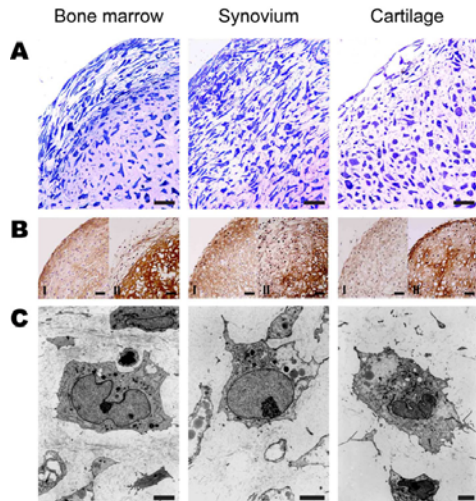
培養開始時



培養1日後



培養 2 1 日後

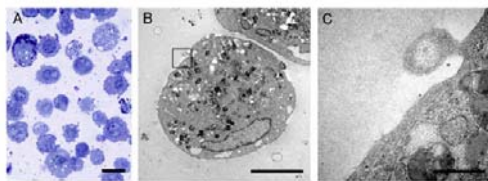


いずれの組織由来幹細胞も、軟骨分化に伴いペレット重量は、増加した。増加量は、軟骨、滑膜、骨髄の順であった。培養開始時の骨髄、滑膜、軟骨組織由来幹細胞に形態的な差異はなかったが、培養 1 日後のペレットの凝集能および幹細胞間接着機構に違いが認められた。培養 2 1 日で、すべてのペレットは軟骨組織を形成した。(Ichinose S, Lab Invest. 2010 Feb ;90(2):210-21 発表)

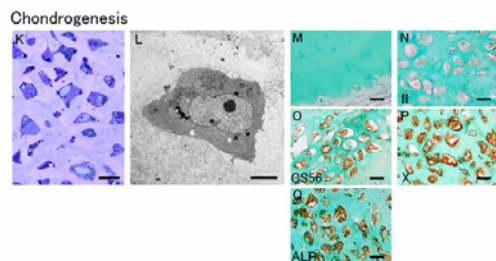
② コラーゲンゲル培養 :

骨髄および滑膜組織由来幹細胞-コラーゲンゲル複合体の軟骨分化誘導過程について

骨髄由来幹細胞-コラーゲンゲル複合体
培養開始時

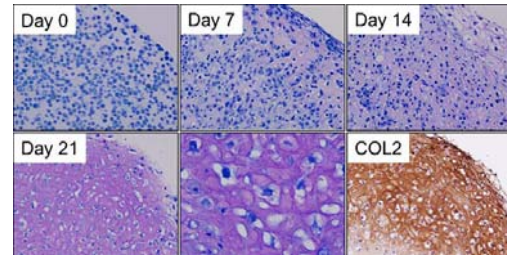


培養 2 1 日後



(市野瀬、第 64 回日本顕微鏡学会学術講演会 2008 年発表)

滑膜由来幹細胞-コラーゲンゲル複合体

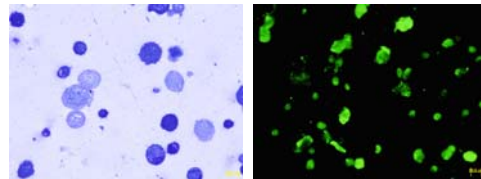


骨髄および滑膜由来幹細胞-コラーゲンゲル複体のいずれの場合においても培養 7 日において軟骨分化が開始、培養 2 1 日で、軟骨組織が形成された。(トルイジンブルー染色で紫色となり、コラーゲンタイプ II の D A B 発色で軟骨基質が、確認された。) 由来組織の違いによる幹細胞の軟骨分化能および軟骨再生能に違いは認められなかった。

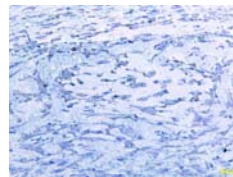
(2) 平成 20 年度 (in vivo 実験)

① 骨髄組織由来幹細胞-コラーゲンゲル複体のラット骨膜近傍への移植実験

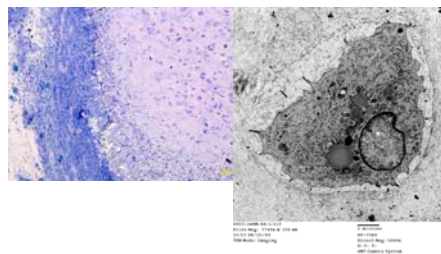
移植開始時



移植 3 日後



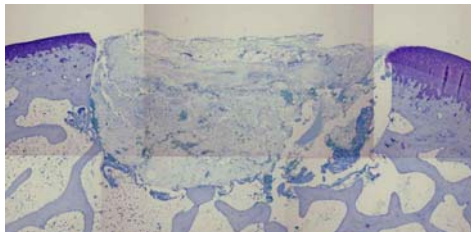
移植 1 4 日後



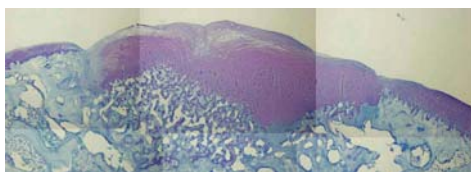
(市野瀬、第 65 回日本顕微鏡学会学術講演会 2009 年発表)

②滑膜由来幹細胞-コラーゲングル複合体のウサギ軟骨欠損部への移植実験

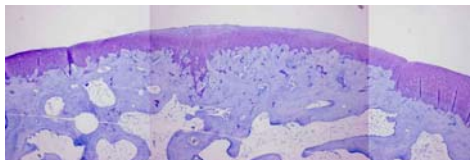
移植 1 日後



移植 4 週後



移植 24 週後



(Koga H, Muneta T, Ichinose S, Sekiya I et al, Stem Cells. 2007 Mar;25(3):689-96)

幹細胞は、コラーゲングル内で、分散して存在した。Qdot ナノクリスタルおよび DiI で確認できた。幹細胞は、軟骨細胞様に分化し、幹細胞-コラーゲングル複合体は軟骨および骨の複合構造を有する組織となった。由来組織の違いによる軟骨分化能および軟骨再生能の違いは認められなかった。

2 年間ですべての実験を終了することが出来ず、脂肪組織由来幹細胞の in vitro および in vivo 実験のデータの解析が残されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

①Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I. Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes.

Lab Invest. 2010 Feb;90(2):210-21. 査読有

② Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E.

Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect.

Stem Cells. 2009 Apr;27(4):878-87. 査読有

③ Torigoe I, Sotome S, Tsuchiya A, Yoshii T, Maehara H, Sugata Y, Ichinose S, Shinomiya K, Okawa A.

Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous beta-tricalcium phosphate in nonhuman primates.

Tissue Eng Part A. 2009 Jul;15(7):1489-99. 査読有

④ Yoshii T, Sotome S, Torigoe I, Tsuchiya A, Maehara H, Ichinose S, Shinomiya K.

Fresh bone marrow introduction into porous scaffolds using a simple low-pressure loading method for effective osteogenesis in a rabbit model.

J Orthop Res. 2009 Jan;27(1):1-7. 査読有

⑤ Mizuno K, Muneta T, Morito T, Ichinose S, Koga H, Nimura A, Mochizuki T, Sekiya I.

Exogenous synovial stem cells adhere to defect of meniscus and differentiate into cartilage cells.

J Med Dent Sci. 2008 Mar;55(1):101-11. 査読有

⑥ Vivatbutsiri P, Ichinose S, Hytönen M, Sainio K, Eto K, Iseki S.

Impaired meningeal development in association with apical expansion of calvarial bone osteogenesis in the Foxc1 mutant.

J Anat. 2008 May;212(5):603-11. Epub 2008 Apr 14. 査読有

⑦ Sato M, Maruoka Y, Kunimori K, Imai H, Kabasawa Y, Ichinose S, Harada K, Omura K. Morphological and immunohistochemical

changes in muscle tissue in association with mandibular distraction osteogenesis.
J Oral Maxillofac Surg. 2007 Aug;65(8):1517-25. 査読有

⑧ Kobayashi A, Miyake H, Hattori H, Kuwana R, Hiruma Y, Nakahama K, Ichinose S, Ota M, Nakamura M, Takeda S, Morita I.

In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jul 6;358(3):692-7. Epub 2007 May 11. 査読有

⑨ Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, von der Mark K, Sekiya I.

Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. Stem Cells. 2007 Mar;25(3):689-96. 査読有

⑩ 市野瀬 志津子、田上幹樹、宗田大、関矢一郎 : ヒト間葉幹細胞を用いた軟骨組織の再生 ニューサイエンス社 細胞 細胞生物講座 39, 2007, 311-315. 査読無

[学会発表] (計4件)

① 市野瀬志津子、井関祥子、河村裕子、田上幹樹：間葉幹細胞の生体内での挙動について
第41回日本臨床分子形態学会学術集会
2009年9月4-5日、神戸市

② 市野瀬 志津子、田上幹樹：コラーゲンゲル培養によるヒト骨髄由来間葉幹細胞の骨、軟骨組織の再生過程
第64回日本顕微鏡学会学術講演会 2008年5月23日、京都市

③ 市野瀬志津子、井関祥子、Philaiporn Vivatbutsiri、河村裕子、田上幹樹：間葉幹細胞の骨、軟骨分化過程の細胞接着について
第40回日本臨床分子形態学会学術集会
2008年10月3-4日、福岡市

④ 市野瀬 志津子、田上幹樹：由来組織の異なる間葉幹細胞の軟骨分化過程
第39回日本臨床分子形態学会学術集会
2007年9月28-29日、甲府市

[図書] (計1件)

①免疫染色・イメージングのコツ 井関 祥子、大田正人編 羊土社 2007年,
第5章 免疫電顕法のコツ 市野瀬志津子
113-123

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市野瀬 志津子 (ICHINOSE SHIZUKO)
東京医科歯科大学・先端研究支援センター・助教
研究者番号：60014156

(2) 研究分担者

宗田 大 (MUNETA TAKESHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50190864