

平成21年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591752  
 研究課題名（和文） 関節軟骨欠損に対する自己血清を用いた骨髄幹細胞移植法と滑膜幹細胞移植法の比較  
 研究課題名（英文） Synovial mesenchymal stem cells flourish with human autologous serum; A comparison to fetal bovine serum and to bone marrow cells  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要：これまでに私たちは滑膜間葉幹細胞が増殖能、軟骨分化能において骨髄由来間葉幹細胞よりも関節構造体の再生医療により適していることを示した。間葉幹細胞を用いた再生医療の臨床応用を考慮する際に、細胞増殖の効率化・安全性は重要な課題である。細胞増殖の際に必須である血清の選択において、自己血清によって滑膜間葉幹細胞は、骨髄細胞よりよりよく確実に増殖し、通常用いられる牛由来血清を臨床応用上用いる必要性が無いことを明らかにした。またこの現象にヒト血清に含まれる PDGF $\alpha$  レセプターが関与することを示した。この研究は自己血清を用い滑膜間葉幹細胞による臨床応用の現実性と安全性を高めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：自己血清、滑膜、間葉幹細胞、軟骨再生、牛胎児血清

**1. 研究開始当初の背景**

家兎の軟骨欠損モデルを用いて、私たちは滑膜間葉幹細胞を用いた新しい細胞治療の可能性を示した。この治療法は低侵襲で実施できる利点が多い。しかしながら細胞培養自体の安全性を高め、担保しなければ真に低侵襲な治療法を実践するとはいえない。そこで臨床実施を見据えて、ヒトを対象とし、自己血清を用いて滑膜間葉幹細胞を十分に増殖することができるかを確認する必要がある。

**2. 研究の目的**

ヒト由来の滑膜幹細胞と骨髄幹細胞を培養する際、自己血清と牛胎児由来血清を用いて、細胞増殖能、軟骨分化能の違い、また個々の例での違いを確認する。

増殖性に違いのある場合にはそのメカニズムを明らかにすることも必要である。

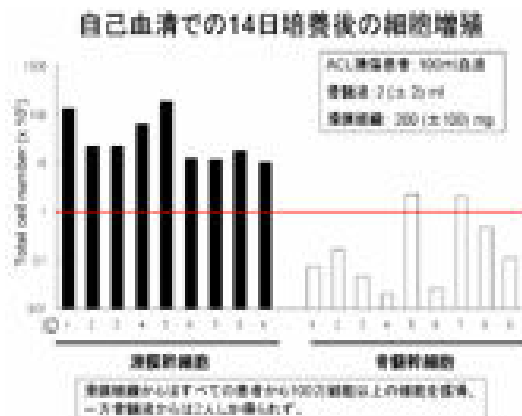
**3. 研究の方法**

インフォームドコンセント下に膝前十字靭帯再建術の患者より術前に約 100ml の全血を採取して血清を分離した。また術中に脛骨より骨髄液、関節内より滑膜組織を採取した。

滑膜および骨髄液より間葉幹細胞を分離した後、自己血清および牛胎児血清を用いて間葉幹細胞を増殖させた。分離した細胞の増殖能や脂肪、骨、軟骨への分化能、フローサイトメトリーを用いた表面抗原解析、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析など *in vitro* 実験を行った。

#### 4. 研究成果

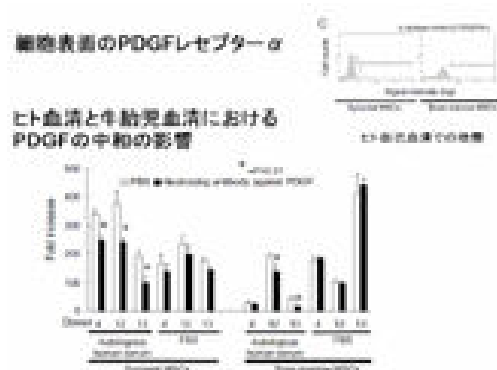
滑膜、骨髄間葉幹細胞の増殖能が自己血清、牛胎児血清濃度に依存することを 5~20% 血清濃度にて確認した。10 人のドナーから得られた滑膜、骨髄間葉幹細胞を 50 細胞/cm<sup>2</sup> にて自己血清、牛胎児血清を用いて培養し、その増殖能を比較をすると、滑膜間葉幹細胞では 10 人中 8 人のドナーにおいて自己血清にてよりよく増殖し、骨髄間葉幹細胞では 10 人中 8 人のドナーにおいて牛胎児血清にてよりよく増殖した(下図)。



滑膜間葉幹細胞ではドナー間に差があったが、骨髄間葉幹細胞では自己血清の方がコロニー形成率が低かった。1 コロニーあたりの細胞数は滑膜間葉幹細胞では自己血清の方が多かったが、骨髄間葉幹細胞では血清間に差はなかった。2 週間毎に巻き換えを行った場合の継代能については、いずれも牛胎児血清の方がより長期間継代することができた。

マイクロアレイによる階層型クラスタリング分析を用いて自己血清、牛胎児血清で培養した滑膜、骨髄間葉幹細胞の遺伝子発現プロファイリングを行うと、血清の違いよりも細胞種の違いのほうが遺伝子発現により影響

していた。さらにフローサイトメトリーにより 19 種類の表面抗原の発現を解析すると PDGFR-a の発現が細胞種間で異なっていた。PDGFR-a が滑膜間葉幹細胞では 42% に発現しているのに対し、骨髄間葉幹細胞では 6% であった。ヒト血清内には PDGF が豊富に含まれており、その主成分は PDGF-AB であった。PDGF が細胞増殖におよぼす影響を検討するために血清内 PDGF を中和するとヒト自己血清では滑膜間葉幹細胞では 3 ドナー中 3 人、骨髄間葉幹細胞では 2 人で増殖の抑制が示され PDGF がヒト血清内で増殖因子として働いていることが示された(下図)。



自己血清、牛胎児血清で培養した滑膜、骨髄間葉幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能をペレット培養により比較すると、牛胎児血清で前培養した滑膜間葉幹細胞はヒト自己血清のものより重い軟骨塊を形成した。この結果より自己血清を用いた前培養により軟骨分化能が損失されることを危惧し、ウサギ軟骨欠損モデルを用いてウサギ滑膜間葉幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能をウサギ自己血清と牛胎児血清にて比較した。結果は滑膜間葉幹細胞移植した「自己血清群」「FBS 群」は「欠損群」に比べ良好な修復を認めたが、血清種による違いは認めなかった。

#### 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)

〔雑誌論文〕(英文計 21 件)

① 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*. 25:689-96, 2007 査読有り

② Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum*. 58(2):501-10, 2008. 査読有り

③ Nagase T, Muneta T, Ju YJ, Hara K, Morito T, Koga H, Nimura A, Mochizuki T, Sekiya I. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 58:1389-98. 2008 査読有り

④ Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res* 332(3):469-78. 2008 査読有り

⑤ Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*. 47:1137-43. 2008 査読有り

⑥ Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A,

Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. 333(2):207-15. 2008 査読有り

⑦ Zhang S, Muneta T, Morito T, Mochizuki T, Sekiya I. Autologous synovial fluid enhances migration of mesenchymal stem cells from synovium of osteoarthritis patients in tissue culture system. *J Orthop Res*. 26:1413-8. 2008 査読有り

⑧ Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, Mochizuki T, Sekiya I. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther*. 10:R13, 2008 査読有り

⑨ Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, Suzuki S, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther*. ;10:R84, 2008 査読有り

[学会発表] (国際学会 計24件)

① Ju Y, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovium-derived mesenchymal stem cells enhance tendon-bone healing by producing collagen fibers. 53th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Diego. U.S.A .2007.2.11-14.

② Nagase T, Muneta T, Sekiya I. Distribution of vascular niche and parameters during expansion of

mesenchymal stem cells from synovium in medial osteoarthritis knee with the objective of cell source for cartilage regeneration. 53rd Annual Meeting Orthopaedic Research Society, San Diego. USA. 2007.2.11-14

③ Shimizu S, Asou Y, Itoh S, Shinomiya K, Muneta T.

Intraarticular Osteoprotegerin Administration Prevents Cartilage Destruction in a Murine Model of Osteoarthritis. 53th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Diego. U. S. A. 2007. 2. 11-14.

④ Sekiya I Promotion of Meniscus Repair by Injecting Synovium-derived Mesenchymal Stem Cells into the Joint 6th Biennial ISAKOS ( International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) Congress. Florence, Italy. 2007.5.27-31

⑤ Morito T, Sekiya I, Yagishita K, Shirasawa S, Hara K, Muneta T Role of Mesenchymal Stem Cells in Synovial of Knee After Anterior Cruciate Ligament injury. 6th Biennial ISAKOS ( International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) Congress. Florence, Italy. 2007. 5. 27-31

⑥ Koga H, Sekiya I, Ju YJ, Nagase T, Muneta T. Sequential events during in vivo chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells. 6th Biennial ISAKOS ( International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) Congress. Florence, Italy. 2007. 5. 27-31

⑦ Yoshimura H, Sekiya I, Muneta T, Morita I, et al..Anti-MCP-1 gene therapy attenuated collagen deposition in rat arthrofibrosis model. 6th Biennial ISAKOS ( International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) Congress. Florence, Italy. 2007. 5. 27-31

⑧ Shimizu S, Asou Y, Itoh S, Chung U, Kawaguchi H, Shinomiya K, Muneta T Intra-articular Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin Prevents Cartilage Degeneration in a Murine Model of Osteoarthritis. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Honolulu, Hawaii, USA. 2007. 9. 16-19.

⑨ Hayashi M, Sekiya I, Muneta T Weekly intraarticular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibit progression of osteoarthritis in rabbit anterior cruciate ligament transected knees. 7th World Congress of the International Cartilage Repair Society, Warsaw, Poland. 2007. 9. 29-10. 2

⑨ Koga H, Muneta T, Sekiya I Comparison of Mesenchymal Stem Cells for In Vivo Chondrogenesis and Optimal Conditions of Cell Therapy for Rabbit Cartilage Defects

54th Annual Meeting Orthopaedic Research Society, San Francisco. USA. 2008. 3. 2-5

⑩ Koga H, Muneta T, Sekiya I Newly-developed Implantation Procedure with Synovium-derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration 54th Annual Meeting Orthopaedic Research

Society, San Francisco. USA. 2008.3.2-5

〔図書〕(計 14 件)

① Tomoyuki Mochizuki, Keiichi Akita,  
Takeshi Muneta. : Numbness/Saphenous Nerve.  
In The Anterior Cruciate Ligament:  
Reconstruction and Basic Science. Brown Fu,  
Georgoulis Gobbi, Howell Jhonson, Paulos  
Shelbourne (eds). Saunders Elsevier.  
Philadelphia. USA. 2007, pp580-4

② 宗田 大 : 膝痛—知る診る治す。メジカ  
ルビュー社。東京 2007.10.1

③ 宗田 大 : 反復性膝蓋骨脱臼に対する内  
側膝蓋大腿靭帯再建術。OS NOW No.8 スポー  
ツによる膝・足関節靭帯損傷の治療。P126—  
144、2008.11.10

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

① 宗田 大 NHK きょうの健康「ひざの痛  
み」。2008.3.31-4.2 ; 4.4

② 宗田 大 NHK 名医にQ「膝の痛み」  
2008.7.19、7.26

③ 宗田 大 「ラジオあさいちばん」 「健康  
ライフ」コーナー出演 10.27-10.31 「膝  
を大切に～大事に長持ちさせる～」

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗田 大 (MUNETAKESHII)

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

(2) 研究分担者

関矢 一郎 (SEKIYA ICHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・准教授

研究者番号 : 10345291

(3) 連携研究者