

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791632

研究課題名（和文） 体性幹細胞を用いた変性軟骨の再生

研究課題名（英文） Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis

研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80324169

研究成果の概要（和文）：

本研究では、OA 自然発症モデルであるハートレー系 guinea pig を用いて骨髄幹細胞(MSCs)を有効に局所に定着させることと、軟骨再生に寄与していることを評価した。Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE)にてラベリングしたヒト BMSc を培養し、PBS と HA に混濁した。その混濁液を 7 ヶ月齢のハートレー系 guinea pig の膝関節に注入し、注入後 1, 3, 5 週で膝関節を摘出し蛍光顕微鏡にて評価、5 週においては組織学的評価、免疫組織学的評価も合わせて行った。コントロール群では同週齢のハートレー系 guinea pig に PBS と HA を単独で注入した。その結果 5 週齢に HA と MSCs を注入した群において軟骨再生が見られ、また MSCs が関節軟骨表面だけでなく軟骨深部へと移動しており、軟骨細胞へと分化、type II collagen をその細胞周囲で産生していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into various connective tissue cells. Several techniques have been used for the clinical application of MSCs in articular cartilage repair; however, there are many issues associated with the selection of the scaffold material, including its ability to support cell viability and differentiation and its retention and degradation in situ. The application of MSCs via a scaffold also requires a technically demanding surgical procedure. The aim of this study was to test the outcome of intra-articular transplantation of mesenchymal stem cells suspended in hyaluronic acid (HA) in the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis (OA). At 5 weeks post transplantation, partial cartilage repair was noted in the HA-MSC group but not in the other groups. Examination of CFDA-SE-labeled cells demonstrated migration, differentiation, and proliferation of MSC in the HA-MSC group. There was strong immunostaining for type II collagen around both residual chondrocytes and transplanted MSCs in the OA cartilage. Conclusion: This scaffold-free and technically undemanding technique appears to result in the regeneration of articular cartilage in the spontaneous OA animal model. Although further examination of the

long-term effects of transplantation is necessary, the findings suggest that intra-articular injection of HA-MSC mixture is potentially beneficial for OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	1,500,000	4,800,000

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：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は40歳代頃より発症が始まり、日本人の膝関節においては60歳代女性で約30%、80歳代女性では70%以上においてみとめると報告されており、今後高齢者人口の増加により初期病変も含めるとさらに膨大な患者数が存在するものと思われる。これら関節の変性疾患は運動器障害を引き起こし、QOLの低下を招く一因となっている。また現在変性疾患に対しての治療は、関節鏡視下手術、脛骨高位骨切り術、人工関節置換術など外科的治療に重点が置かれる傾向にあるが、現在行われている人工膝関節置換術では一件あたり約300万円の医療費がかかるなど、医療費を増加させる一因となっており、さらに病期が進んだ高齢者に対して手術を行っても発症前の活動性を回復することは困難であることから、より若年者の初期病変に対する保存療法と発症および進行を予防することが重要である。そこで我々は人工関節置換術に至らせないために生物学的なアプローチで、より初期病変から軟骨を修復し関節機能を維持するため、細胞移植を中心にTissue Engineeringを応用した軟骨再生を進めている。

細胞移植による軟骨修復ではどの細胞種

を使うかが問題となる。一番初めに試みられたのが自家および同種軟骨組織より採取した硝子軟骨細胞を欠損した軟骨部に移植する実験である。1968年に家兎を用いた実験系で同種軟骨細胞移植により関節軟骨再生が得られることが報告され(Lemparg, Acta Soc Med Ups. 1967)、1997年には米国食品医薬品局の認可を受け、欧米では現在2万例以上に行われている。しかし細胞の移植を伴わない軟骨修復術(mosaic plasty法やmicro fracture法)と比較して有意な差はなく、その有効性は示せていない。

細胞の増殖と分化は通常、相反するものであるため、増殖させると脱分化してしまうことが多い。関節軟骨再生を目的とした場合、移植用細胞が十分量採取できず、細胞を増殖させる必要があるが、採取した自己軟骨細胞を増殖させた場合、容易に脱分化するため、増殖にも限界がある。

その問題を解決する手段として、増殖させたのちでも分化を誘導することのできる前駆細胞が注目されている。現在国内では体性幹細胞、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いた軟骨再生の研究が行われており、特に体性幹細胞その中でも骨髄血から採取される骨髄間葉系幹細胞(BMSC)は採取

が容易であり、臨床応用されやすい細胞源として注目されている。

2. 研究の目的

初期変形性膝関節症に対する治療で現在行われているヒアルロン酸の関節内注入は、治療効果は一時的であり、軟骨再生に対する根本的な治療法ではない。しかし投与方法は簡便であり、何よりも入院、手術を必要としない。今回我々はヒアルロン酸ではなく BMSc を採取、培養し適切な時期に、scaffold とともに関節内に注入することで、変性軟骨の再生を図ることをこの研究の目的とした

3. 研究の方法

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE)にてラベリングしたヒト BMSc を培養し、PBS と HA に混濁し、その混濁液を7ヵ月齢のハートレー系 guinea pig の膝関節に注入し、注入後 1, 3, 5 週で膝関節を摘出し蛍光顕微鏡にて評価、5 週においては組織学的評価、免疫組織学的評価も合わせて行った。コントロール群では同週齢のハートレー系 guinea pig に PBS と HA を単独で注入した。

4. 研究成果

5 週齢に HA と MSCs を注入した群において軟骨再生が見られ、また MSCs が関節軟骨表面だけでなく軟骨深部へと移動しており、軟骨細胞へと分化、type II collagen をその細胞周囲で産生していることがわかった。

(図 1-3)

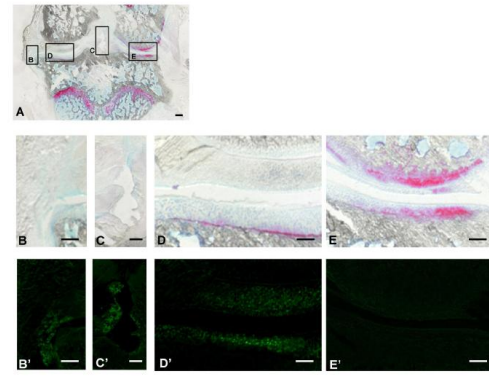


図 1

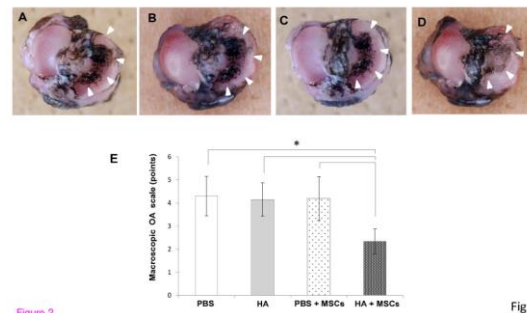


Figure 2

Fig. 2

図 2

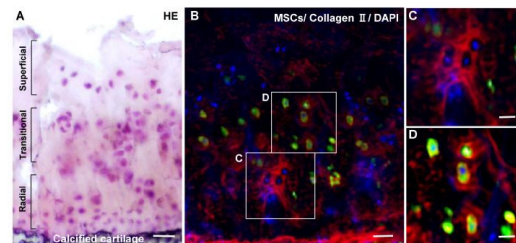


図 3

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] (計1件)

Mitsuhiko Sato, Kenzo Uchida, Hideaki Nakajima, Tsuyoshi Miyazaki, Alexander Rodriguez Guerrero, Shuji Watanabe, Sally Roberts, Hisatoshi Baba. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 7;14(1). 2012
doi: 10.1186/ar3735 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80324169