

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660242

研究課題名(和文) 滑液及び滑膜由来間葉系幹細胞の関節内注射による軟骨再生治療試験

研究課題名(英文) A study on cartilage regeneration using intra-articular injection of synovial fluid and synovium derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

三角 一浩 (Misumi, Kazuhiro)

鹿児島大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10291551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウマ関節由来の滑液(SF)に含まれる間葉系幹細胞(MSC)の起源と多分化能を検討し、損傷軟骨の再生のための新たな治療法を提案した。関節内骨折及び離断性骨軟骨炎のある関節のSF中には、正常関節と比較して豊富なMSCが含まれており、それらは多分化能を有し、特に軟骨分化では特殊染色で強染されるゼラチン様シートを形成することを認めた。SF-MSCの特徴は滑膜(SM)由来のMSCと一致しており、実験用ブタによるSM-MSCの骨軟骨損傷関節内への自家移植では、損傷部への滑膜誘導と軟骨再生が組織学的に確認された。臨床応用に向けて、ウマ由来のSM-MSCを他家移植(関節注射)し、副反応や安全性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the origin and the multipotency of mesenchymal stem cells (MSC) in the synovial fluid (SF) of horses with intra-articular injury and synovitis, and provided a new strategy for regeneration of lost articular cartilage. Total number of colonies of SF-MSCs from diseased joints was significantly higher than the number from normal joints. Under specific nutrient conditions, SF-MSCs differentiated into osteogenic, adipogenic and tenogenic lineages. Chondrogenic induction resulted in a formation of a gelatinous sheet, that was stained with Alcian blue. The results were consistent with those of synovium (SM)-derived MSCs. In the experimental model of pig which was injured osteocartilage in the shoulder joints, the intraarticular implantation (autologous transplantation) of SM-MSCs promoted the cartilage regeneration due to the adhesion of synovium to the damaged area. Allogenic implantation of equine SM-MSCs into the normal horse joint was safe and induced no side-effects.

研究分野：獣医外科学

キーワード：幹細胞 再生医療 骨 軟骨 関節

1. 研究開始当初の背景

損傷した関節軟骨の再建治療は、骨穿孔術による骨髄刺激法やモザイクプラスチック（自家骨軟骨移植術、非加重面の軟骨を欠損部へ転位する手術）に始まり、今や骨髄 (BM) や脂肪 (AT) 由来幹細胞を用いた軟骨再生治療の実用化に向け、臨床研究が進められている。我々は、これまでに培ったブタ脂肪由来幹細胞の分離培養技術を基に、ウマの関節内骨折や離断性骨軟骨炎の症例から採取した滑液 (SF) や滑膜 (SM) 組織に含まれる間葉系幹細胞 (MSCs) の分離・培養に成功した。「これらの細胞は、関節鏡視下手術後、形成される骨軟骨欠損部に硝子軟骨を再生させるために有用であろう」と考え、SF-、及び SM-MSCs を体外で増幅し、高密度な細胞浮遊液として手術後の関節腔に直接注射し、治療後の硝子軟骨再生について肉眼的・組織学的に評価するという臨床試験を着想するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 実験にはブタを使用し、SF 及び SM-MSCs 移植による軟骨再生治療の安全性を試験する。関節の実験的軟骨搔爬手術の後、細胞浮遊液を同関節内の骨軟骨欠損部に移植し、組織学的評価を行う。
- (2) 手根関節の関節内骨折を起こしたウマに SF、及び SM-MSCs の移植を行う。関節鏡視下で骨片摘出と軟骨搔爬を実施し、予め SF から準備した幹細胞浮遊液を手術直後に関節内注射する。術後、軟骨表面及び滑膜の肉眼的評価を行う。

3. 研究の方法

【実験 1】SF、及び SM-MSCs の特性解析。

すでに一部の研究結果を得ているウマの SF、及び SM-MSCs について、細胞の倍加率、細胞老化に伴う幹細胞としての分化特性を解析し、幹細胞として先に確立されている BM、及び AT 由来の MSCs と比較し、相違点について検討を行った。

関節内骨折及び離断性骨軟骨症から関節症となったサラブレッドの手根関節及び足根関節から、関節鏡視下手術時において SF を無菌的に 3~4ml 採取した。SF は、培養液と懸濁後に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 4~5 週間培養した。関節鏡視下手術時に SM を 100 mg 採取した。SM はコラゲナーゼ処理して、組織片を除去後、遠沈した細胞層を播種・培養した。BM (30ml)、及び AT (30g) は、健康なウマから、それぞれ胸骨穿刺及び脂肪吸引法によって採取した。採取した BM はヘパリンと混和し、播種した。AT は、コラゲナーゼ処理した後、サンプルを遠沈して、その沈査を播種・培養した。

培養細胞の表面抗原と遺伝子発現をそれぞれフローサイトメトリーと RT-PCR で解析した。幹細胞としての多分化能については、骨・軟骨・腱・脂肪細胞への分化誘導に伴う

特異的な遺伝子発現と基質産生に基づき評価した。

【実験 2】実験用ブタにおける SF、及び SM-MSCs 移植の安全性評価と、軟骨再生の組織学的評価。

ブタの膝関節から、1~2ml の SF と 100mg の SM を無菌的に採取した。SF は、増殖培地と懸濁した後、培養フラスコに播種した。接着細胞の継代を繰り返し、P3 で 1×10<sup>7</sup> 個以上まで増幅させた。SM はコラゲナーゼ処理した後、組織破片を除去し、同フラスコに播種して同様に増幅させた。培養細胞の一部を用いて、細胞表面抗原の特性評価、骨・軟骨・脂肪細胞への分化能について遺伝子及び蛋白レベルで評価した。

MSCs が移植に用いる目標数に達するまでに約 1 ヶ月を要した。移植用の細胞が用意できた時点で、同じ個体の両側肩関節に関節切開を行い、両側の上腕骨頭に骨軟骨欠損 (直径 6mm) を作出した。右側欠損部には、3×10<sup>7</sup> 個の SF-、及び SM-MSCs の浮遊液 (300µl の PBS で希釈) を滴下し、10 分間静置して手術を終えた (図 1)。左側の骨軟骨欠損部には細胞移植を行わずに、対照とした。

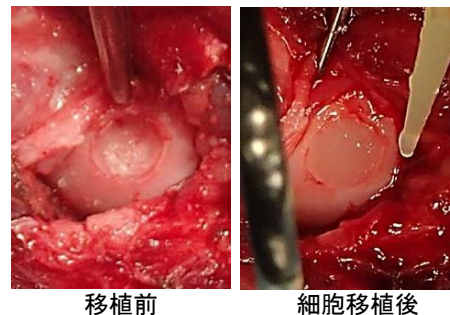


図 1. 細胞移植の手術中写真。ピペットを使って、骨軟骨欠損部に MSCs の細胞懸濁液を滴下、静置した。

【実験 3】正常ウマを用いた SF、及び SM-MSCs 移植の安全性評価

自然発生性の関節内骨折のウマ症例への SF、及び SM-MSCs の移植に先立ち、正常なウマの関節内に MSCs の細胞懸濁液を注射して、合併症の発現を評価した。関節疾患 (関節内骨折) のあるウマから採取した SF 及び SM を用い MSCs を分離・増幅した。3×10<sup>7</sup> 個の MSCs を 3 ml の生理食塩液に浮遊させて、健康なウマの右側橈骨・手根骨間関節内に注射した。左側橈骨・手根骨間関節内には生理食塩のみを注射し、対照側とした。



図 2. 正常なウマの橈骨・手根骨間関節 (右写真) への細胞浮遊液 (左写真) の投与。

#### 4. 研究成果

【実験 1】SF から分離，4~5 週間の培養後， $1.0 \times 10^7$  個以上の MSCs を得た (図 3)。

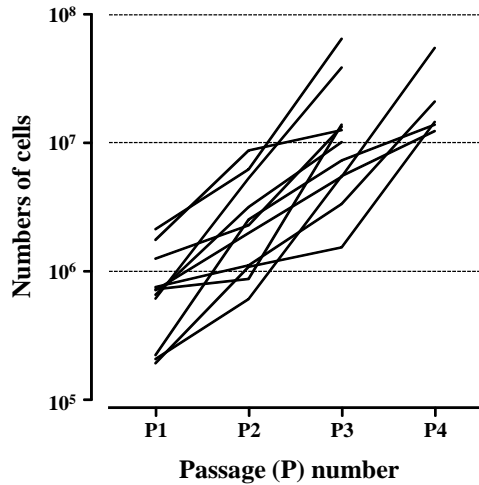


図 3. SF-MSCs の細胞増殖曲線。

また SF-MSCs の倍加率は，BM，及び AT-MSCs と比較してゆっくりしていることが明らかとなった (図 4)。

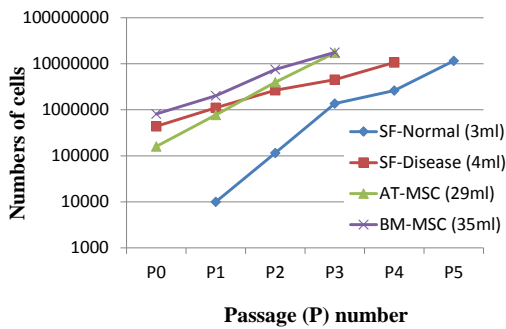


図 4. SF-MSCs と，BM,及び AT-MSCs の増殖曲線の比較。

SF,及び SM-MSC に認められる表面抗原(抗 CD44, CD90, MHC-I モノクローナル抗体に陽性, 抗 CD34, CD45 抗体では陰性), 及び特異遺伝子 (Nanog 及び Sox2) 発現は, BM, 及び AT-MSCs の結果と一致しており, 幹細胞としての特徴を有していた (図 5-1, 5-2, 5-3)。

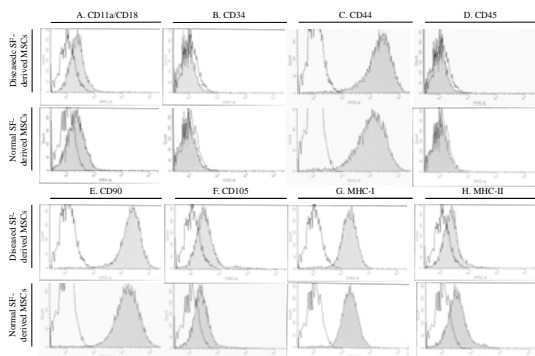


図 5-1. SF-MSCs の表面抗原解析の結果。

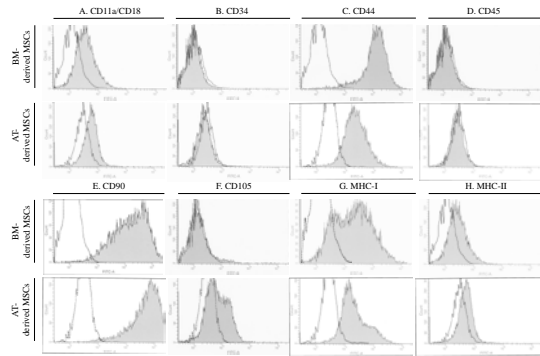


図 5-2. BM,及び AT-MSCs の表面抗原解析の結果。

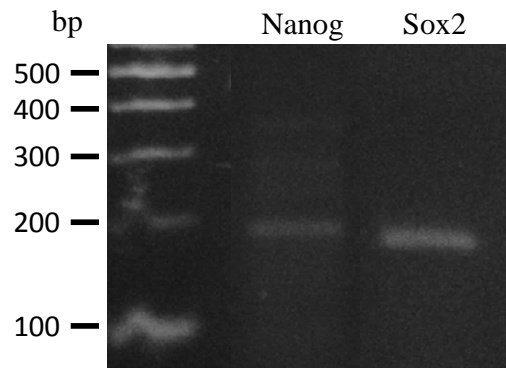


図 5-3. SF-MSCs における Nanog と Sox2 の遺伝子発現。

SF,及び SM-MSCs は, BM,及び AT-MSCs と同様な多分化能を有していたが, 軟骨細胞分化誘導による軟骨特異基質の産生能が, BM, 及び AT-MSCs に比べて高かった。MSCs を平板培養下で軟骨へと分化誘導した場合, SF, 及び SM-MSCs ではゲル状のシートを形成する一方で, BM, 及び AT-MSCs ではシートが形成されなかった (図 6)。

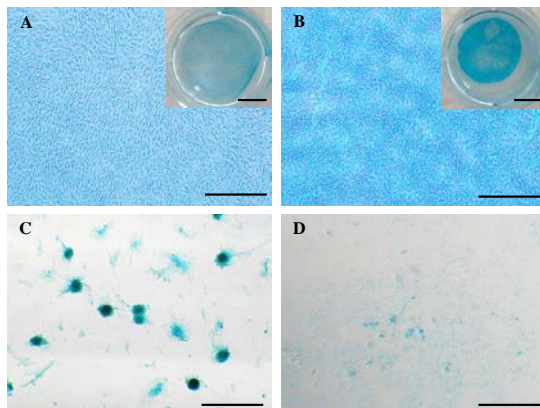


図 6. SF-(A), SM-(B), BM-(C),及び AT-(D) MSCs の軟骨誘導を平板培地で行った後, アルシアンブルーで染色。図上段 A, B では青染されるゲル状シートが確認されたものの, 下段 C, D では形成されなかった。

骨、軟骨、脂肪、及び腱細胞への分化誘導能については、各特異遺伝子の発現についても確認された (図 7-1, 7-2, 7-3)。

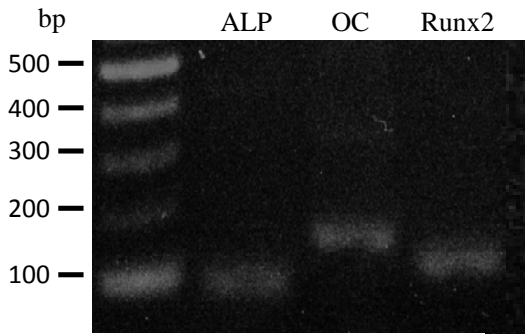


図 7-1. SF-MSCs の骨芽細胞への分化誘導に伴う特異遺伝子の発現。

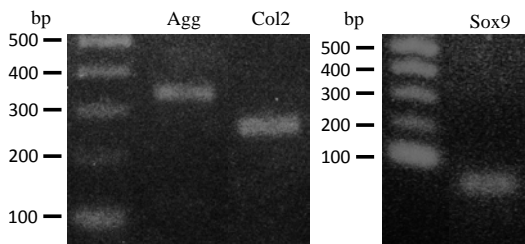


図 7-2. SF-MSCs の軟骨細胞への分化誘導に伴う特異遺伝子の発現。

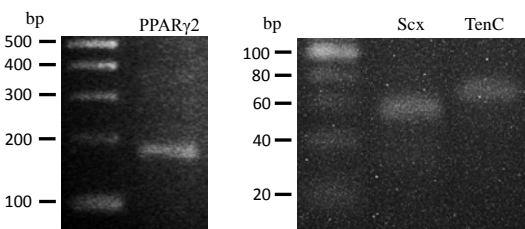


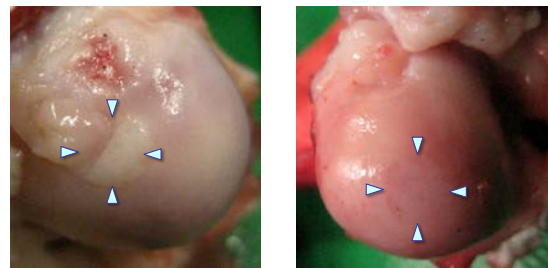
図 7-2. SF-MSCs の脂肪及び腱細胞への分化誘導に伴う特異遺伝子の発現。

以上、実験 1 の成果から、関節症と診断されたウマの SF から分離培養される MSCs 群は、幹細胞としての性質を有し、特に軟骨再生の新たな細胞源になることが明らかとなった。SF-MSCs は SM-MSCs と非常に類似した分化特性を有しており、いずれも軟骨分化に適した細胞群であると考えられた。また SF-MSCs を 10 継代し、細胞老化に伴うこの特性変化について検討したところ、軟骨分化誘導後の軟骨基質産生能が低下することが明らかとなった。正常滑液についても幹細胞の分離を試みた。関節疾患のある関節由来の SF と比べて、正常関節由来の SF からは、初代培養によって得られる MSCs のコロニー数が有意に少なかった。正常 SF からの MSC の分離・培養には時間を要する可能性があり、正常関節から移植用細胞を得るためには、正常 SM の方が適当と考えられた。

【実験 2】ブタの SF は採取量が少なく、SM

から MSCs を分離培養した方が、移植に用いる細胞数を短期間で確保するために有用であった。実験 1 で実施したウマの SM-MSCs に関する実験成果を基に、ブタの SM-MSCs を分離・培養した。ブタにおいては、多くの表面抗原を認識できる特異抗体が揃っておらず、抗 CD90 及び CD105 抗体に対して陽性を示す細胞であることを確認した。

ブタの SM-MSCs は、4 週間の培養で、移植に十分な数に達した。SM-MSCs を移植した右肩関節の骨軟骨欠損部では、術後 3 ヶ月に行った剖検の肉眼所見において、骨軟骨欠損部は周囲と区別できる厚い白色の軟骨によって再被覆されており、その表面には滑膜が癒着していた。細胞を移植していない対照側の骨軟骨欠損も軟骨で被覆されていたが、新生軟骨は薄く、周囲との正常軟骨との違いや境界が明瞭であった (図 8)。



右(細胞移植側)

左(対照側)

図 8. 骨軟骨欠損部の病理解剖肉眼所見. 細胞移植側の骨軟骨欠損部には滑膜が付着し、その表面は厚い白色軟骨で被覆されている。対照側に認める新生軟骨は白さを欠く。矢頭で囲む領域が、骨軟骨欠損部分である。

病理組織学的検査では、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色において、SM-MSCs を移植した骨軟骨欠損部に、滑膜が誘導され、その下層に厚い軟骨が新生していることがわかった。滑膜付着部を中心に、軟骨表面のわずかな不整が認められたものの周辺の正常部からの移行も滑らかで、陥凹部はほぼ解消されていた (図 9-1)。

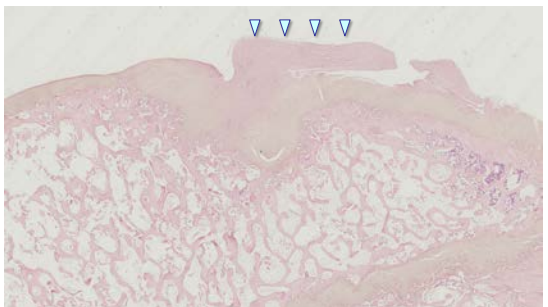


図 9-1. 細胞移植部の HE 染色. 骨軟骨欠損部に誘導された滑膜 (矢頭部分) の下層に、厚い軟骨が新生されている。軟骨表面の不整は少ない。

一方、細胞を移植していない対照側の骨軟

骨欠損では滑膜の誘導は確認されず、陥凹部が大きく残存しており、軟骨表層も不整なままであった。周囲との境界についても、組織学的に明瞭であった（図 9-2）。

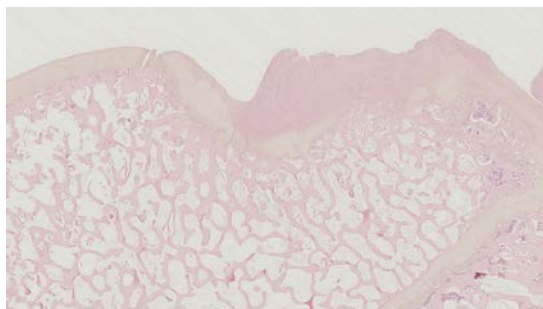


図 9-2. 細胞移植を行わなかった骨軟骨欠損部の HE 染色. 滑膜の誘導・付着はなく、陥凹部が残る。陥凹部表面は不整であり、周囲健全部との違いが明瞭である。

SM-MSCs を移植した骨軟骨欠損部のアルシアンブルー (AB) 染色 (軟骨基質を青染する特殊染色) では、軟骨表面に付着する滑膜を中心に、正常軟骨と同様、強く青染される軟骨基質が欠損分に充填されている組織像が認められた (図 10-1)。軟骨基質が強く青染される領域の強拡大像では、細胞成分が少なく、1 ないし数個の軟骨細胞が 1 つの小腔内に収まり、硝子軟骨の様相を呈していた (図 10-2)。

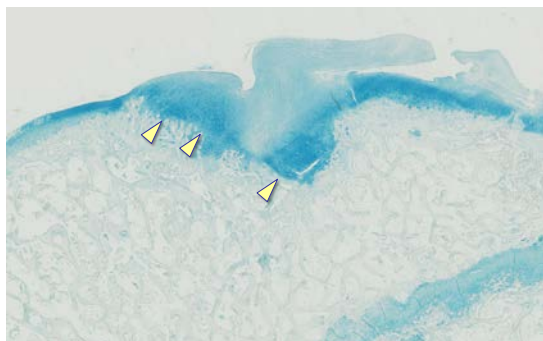


図 10-1. 細胞移植部の AB 染色. 骨軟骨欠損部に誘導された滑膜下で、強青染される軟骨基質 (矢頭部分) が再生している。軟骨表面の不整は少ない。

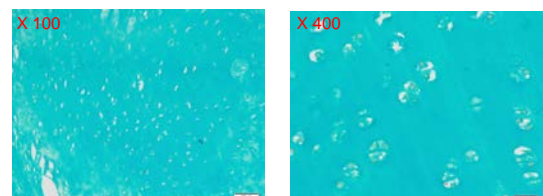


図 10-2. 細胞移植部の AB 染色 (強青染部分の拡大像). 均質に染色される軟骨基質に取り囲まれる小腔内には、軟骨細胞が収まっている。細胞成分は少なく、硝子軟骨の様相を呈している。

SM-MSCs を移植しなかった対照側の骨軟

骨欠損部の AB 染色では、陥凹部の表層に薄く青染される軟骨基質領域が観察されるのみであり、その上層には染色性の低い線維性組織が増生していた (図 11-1)。軟骨基質が強く青染される数少ない領域の強拡大像では、小腔内に収まる軟骨細胞が観察された。しかし、それらの上層の大部分は線維性結合組織及び線維軟骨の様相を呈していた (図 11-2)。

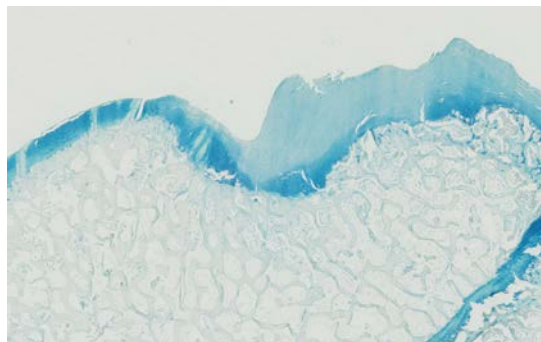


図 11-1. 対照側における骨軟骨欠損部の AB 染色. 滑膜の誘導・付着はなく、再生軟骨も乏しい。軟骨表面は不整であり、周囲健全部との差が明らかである。

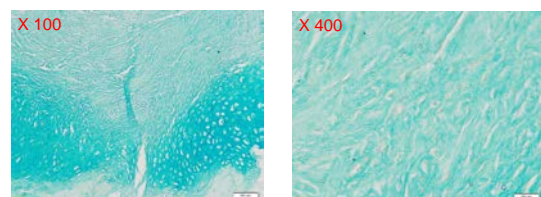


図 11-2. 対照側における骨軟骨欠損部の AB 染色. 少量の硝子軟骨の上層に線維性組織と線維軟骨が観察された (左図)。線維性組織の拡大像 (右図)。

実験 2 の結果から、SM-MSCs 幹細胞を移植することによって、骨軟骨欠損部における軟骨再生が促進される可能性が示唆された。細胞移植を行わなかった欠損部では、軟骨再生活動に乏しく、陥凹部は少量の硝子軟骨によって薄く被覆されたのみであった。SM-MSCs を移植することで、骨軟骨欠損部には軟骨再生が促されたが、それは周辺滑膜の付着を伴うものであった。幹細胞移植によって周辺の健全滑膜が軟骨損傷部に誘導されて、組織治癒及び硝子軟骨の再生を高めていく可能性が強く示唆された。

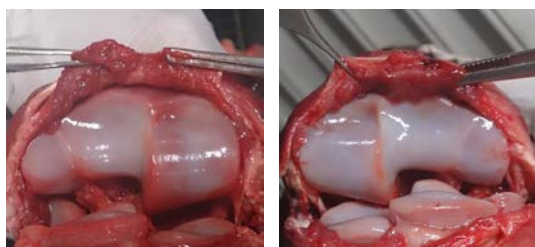
本実験は、実験室で分離・培養した幹細胞を生体に移植することに生じる合併症を観察することが当初の目的であった。SM-MSCs は PBS による細胞懸濁液として投与したが、移植側に強い組織炎症や軟骨変性部分の拡大を示唆する所見は観察されておらず、むしろ細胞移植による有効性のみが現れる結果となった。

半月板損傷 (断裂) モデル動物を用いた SM-MSCs の移植治療効果に関する最近の研究によると、移植された SM-MSCs には、周

辺滑膜を断裂部に誘導する働きがあり、それを介して、半月板断裂部の再生が促されると考えられている。実験2で観察された滑膜の付着を伴う旺盛な軟骨再生という所見は、このような新しい研究成果と一致しており、**SM-MSCs** が関節内構造体の組織再生に適した幹細胞であることを支持するものと考えられた。

【実験3】自然発症性の関節内骨折のウマから採取した**SF**から**MSCs**を増幅させて、健常なウマの右側橈骨・手根骨間関節内に注射した。左側の同関節には生理食塩液のみを注射して対照とした。

移植後剖検を行うまでに、左前肢及び注射部位に特異的な臨床症状(関節の腫脹、疼痛、跛行)は観察されなかった。投与後3日で病理解剖して、肉眼的に関節内腔を評価した。図12に示すように、関節軟骨及び滑膜に細胞移植による影響を示唆する炎症や変性病変は認められなかった。



右(細胞移植側) 左(対照側)

図12. **SF-MSCs**の細胞移植を行った健常馬の橈骨・手根骨間関節内腔の剖検時写真。移植した関節に対照側との明らかな違い(軟骨の変性や欠損)を認めない。

当初、ウマの関節内骨折や離断性骨軟骨炎の自然発症例に対する**SF-MSCs**の自家移植を行うことによって、軟骨再生への効果を試験する計画となっていた。しかしながら、受傷後に**SF-MSCs**を分離・培養して移植に必要な十分数の細胞を準備するためには、1ヵ月以上を要することが分かった。これは、実験1において示したように、**SF-MSCs**が**BM-**及び**AT-MSCs**と比べて増殖率がゆっくりであることに起因すると考えられた。

結果的に、自然発症例では、関節鏡視下手術を遅らす必要が生じることから、獣医臨床において本技術を普及させる上での障害になると考えられた。そこで、受傷後の手術までの期間を従来通り(2週間以内)に保ちながら、手術直後の細胞移植を、予め関節内骨折の別症例(別個体)から採取した**SF-MSCs**を移植する同種他家移植とすることを考えた。

実験3では、幹細胞移植の同種他家移植の安全性を試験するために自然発症したウマの関節内骨折例から**SF-**及び**MSCs**を分離、培養して、健常な別のウマの関節内に注射した。免疫抑制措置を講じなかったものの、急

性の副反応は認められなかった。今後継続予定の試験では、より長期的な経過観察を行うことになっている。

【継続中試験】ウマ**SF-MSCs**の実験的骨軟骨欠損モデルへの移植試験

他機関との共同研究として、**SF-**及び**SM-MSCs**の同種他家移植を実施する計画である。実験用サラブレッドを2頭用意しており、**H27**年6月の移植手術に向けて、現在は、自然発症した関節疾患への関節鏡手術の際に細胞源となる滑液や滑膜を採取し、**SF**及び**SM-MSCs**の増幅を継続している。この試験を終えた後に、臨床応用へと向かう。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

1. Murata, D., Miyakoshi, D., Hatazoe, T., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., Nakayama, K., and Misumi, K. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. Vet. J. 202, 53-61, (2014 Oct).査読有

[学会発表](計 1件)

1. 村田 大紀, 徳永 暁, 宮越 大輔, 畠添 孝, 三浦 直樹, 藤木 誠, 中山 功一, 三角 一浩. 「ウマ滑液由来間葉系幹細胞の培養とその性質」 第157回日本獣医学会 於札幌市(2014)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-surg/surg/index.php?%E7%A0%94%E7%A9%B6%E7%B4%B9%E4%BB%8B> にデータの一部を公開。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三角 一浩 (MISUMI KAZUHIRO)  
鹿児島大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号: 10291551

(2) 研究分担者

帆保 誠二 (HOBO SEIJI)  
鹿児島大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号: 60446507

川口 博明 (KAWAGUCHI HIROAKI)  
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号: 60325777