

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861299

研究課題名(和文) 滑膜組織と滑膜由来間葉系幹細胞の至適保存条件の検討

研究課題名(英文) A study of optimal conditions for preservation of synovial tissues and synovium-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

堀江 雅史(Horie, Masafumi)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・助教

研究者番号：90622647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜由来の間葉系幹細胞(滑膜幹細胞)は、軟骨再生や半月板再生に対する有用な細胞源と考えられるが、細胞加工施設は国内でも限られており、細胞を用いた新たな治療の普及には、滑膜組織や分離した幹細胞を適切に保存し輸送することが必須となる。本研究では人工膝関節置換術にて採取された滑膜組織を用いて組織と分離した滑膜幹細胞を保存、搬送するための至適保存条件について調べた。滑膜組織は13～18℃での保存が適していることが分かった。滑膜幹細胞はヒト血清中に13℃で保存する方法が最も適していることが分かった。本研究で得られた知見により、多くの患者への適応を前提とした再生医療の基盤技術を確立できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Synovium-derived mesenchymal stem (synovial-MSCs) cells are one of the attractive cell sources for cartilage and meniscal regeneration. Because the number of cell processing center is limited in our country, it is essential to preserve and transport fresh tissues and/or the cell product for spreading our stem cell treatment to worldwide. In the present study, we explored the optimal conditions for preservation of tissues and cell products using synovial tissues which were obtained at total knee arthroplasty. The results demonstrated that the optimal temperature for preservation of synovial tissues was between at 13 to 18 °C. Also, preserving synovial-MSCs in human serum at 13 °C was the best condition for cell viability, colony-forming ability, cell proliferation ability and chondrogenic ability. Our finding will help us to establish basic technologies of our stem cell therapy designed for global usage.

研究分野：軟骨再生 半月板再生

キーワード：滑膜間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨や半月板は、自己修復能に乏しい組織である。間葉系幹細胞は成体の間葉組織から採取でき、自己の細胞を使用できる点から魅力的な細胞源である。なかでも滑膜由来の間葉系幹細胞(滑膜幹細胞)は、軟骨分化能が高く、関節軟骨や半月板の再生医療の細胞源として有用である。当施設では軟骨損傷に対して自家滑膜幹細胞を軟骨欠損部に移植する新たな治療法を開発し、良好な治療成績を得ているが、細胞を分離・培養するための施設(細胞治療センター)は限られており、本治療方法をより広く普及させるためには、滑膜組織や分離した幹細胞を適切に保存し輸送することが必須となる。しかしながら滑膜組織や滑膜幹細胞を長期間保存するのに適した条件はこれまでほとんど分かっていない。

当科にて行っている細胞治療の大まかな流れは、図1の通りである。

< 図 1 >



- ・関節鏡による滑膜組織の採取(手術室)
- ・滑膜組織からの細胞分離、培養(細胞治療センター)
- ・培養により得られた滑膜幹細胞の移植(手術室)

多施設において本治療を行うことを想定した場合、滑膜組織を手術室から細胞治療センターへ輸送する行程(*1)と、滑膜幹細胞を細胞治療センターから手術室へ輸送する行程(*2)において、サンプルを一定期間保存する必要性が生じることになる。これらの至適保存条件が明らかになれば、将来的により多くの施設において本治療を行うことができる可能性が広がる。

2. 研究の目的

本研究では滑膜組織および分離培養した滑膜幹細胞を、活性を失うことなく効率よく保存できる方法を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

人工膝関節置換術の際に切除される滑膜組織を検体材料とした。滑膜組織と滑膜幹細胞

を保存する至適条件とその時間的限界を明らかにするため、組織・幹細胞それぞれを候補となる保存溶液に様々な温度で一定時間保存したのちに、各条件での細胞生存率、細胞活性(コロニー形成能、軟骨分化能)を解析した。

4. 研究成果

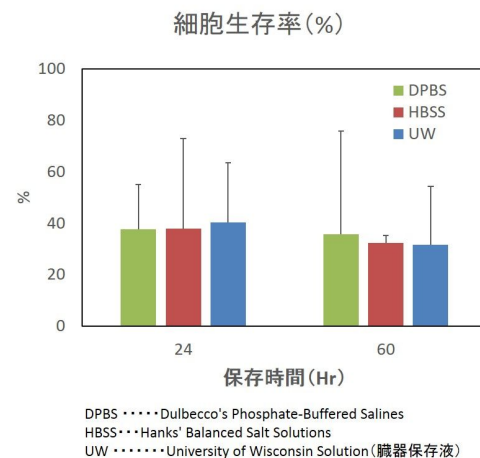
(1) 滑膜組織の保存

膝滑膜組織を候補となる各種溶液に一定時間保存し検討を行った。

保存液の検討

保存液として最も一般的な Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) を使用すると、生細胞数は経時的に減少し、24 時間後には 37% (n = 5) に減少した。University of Wisconsin 液等の臓器保存液として開発されているものの有効性は得られなかった(図2)。

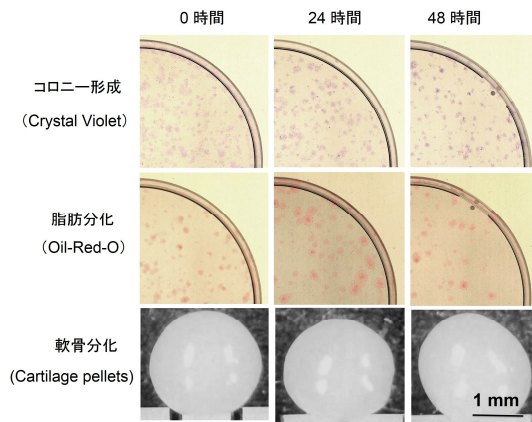
< 図 2 >



組織保存後の幹細胞活性

分離後の生細胞を 10^4 / dish で播種し、14 日間培養後のコロニー形成数、コロニーサイズ、細胞収量を評価した。保存前と、HBSS 中で 24 時間および 48 時間保存したものとで明らかな差は認められず、少なくとも保存期間が 48 時間までは保存期間の影響は少ないことが示された。また、得られた細胞について、脂肪、骨、軟骨への分化誘導を行った結果、48 時間保存後も分化能を有することを確認した(図3)。

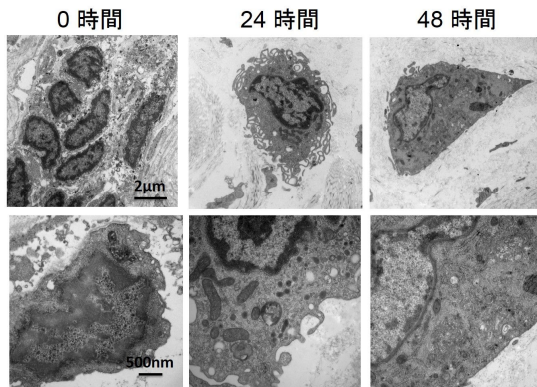
< 図 3 >



組織保存による細胞形態変化

滑膜組織を溶液に 24 時間、48 時間保存した際の細胞形態を透過電顕にて観察した。24 時間後には、細胞質内に空胞を認め、48 時間後ではその空胞が不明瞭となり、細胞の空胞変性が進行していることが確認された(図 4)。

< 図 4 >



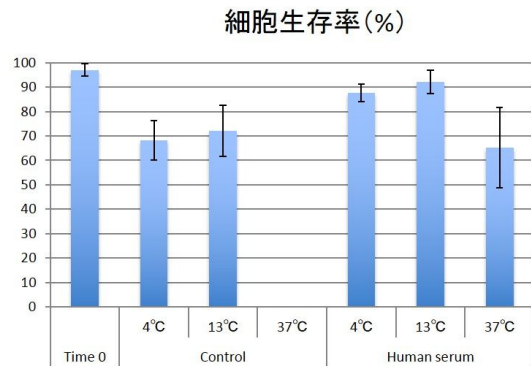
至適温度の検討

至適温度の検討では、組織中の細胞生存率は 13~18 が適していることがわかった。

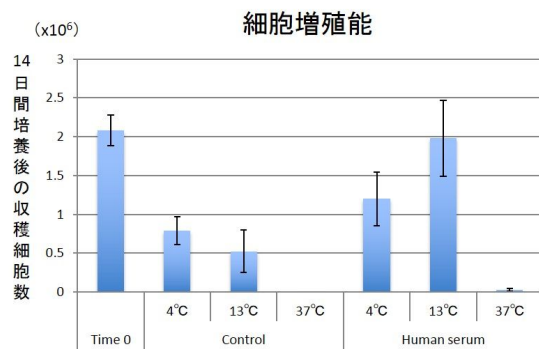
(2) 滑膜幹細胞の保存

滑膜組織より分離培養して得られた滑膜幹細胞を回収し、乳酸リンゲル液または 100% ヒト血清に 4、13、37 で 48 時間保存し、細胞生存率、コロニー形成能、細胞増殖能、軟骨分化能の評価を行った。細胞生存率は、乳酸リンゲル液での保存では 4 で 68%、13 で 71%であったが、ヒト血清での保存では 4 で 87%、13 で 91%、37 で 64%であり、ヒト血清 13 での保存が最も良好であった(図 5)。コロニー形成能、細胞増殖能は、ヒト血清 13 で保存したものは、未保存の対照群とほぼ同等に保たれていたが、他の条件では対照群に比べ劣っていた(図 6)。またヒト血清 13 で保存した細胞は in vitro において軟骨分化能を保持していた。

< 図 5 >



< 図 6 >



本研究により、軟骨・半月板再生に有用な細胞源となる滑膜組織および滑膜幹細胞の至適保存条件と、その時間的限界が明らかとなった。これらの知見を元に、より多くの患者への適応を前提とした再生医療の基盤技術を確立できるものと期待される。

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 6 件)

Sekiya I, Muneta T, Horie M, Koga H. Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects. Clin Orthop Relat Res. 2015, 473(7):2316-26. doi: 10.1007/s11999-015-4324-8.

Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, et al. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. Osteoarthritis Cartilage. 2014, 22(7):941-50. doi:10.1016/j.joca.2014.04.028.

堀江 雅史、関矢一郎、宗田 大、滑膜由来間葉系幹細胞による膝半月板再生、免疫と臨床、21 巻、2013、148-156

堀江 雅史、関矢一郎、宗田 大、滑膜由

来間葉系幹細胞を用いた半月板再生の基礎
と臨床への展望、整形・災害外科、56 巻 5 号、
2013、593-601

堀江 雅史、関矢一郎、宗田 大、滑膜由来間葉系幹細胞を利用した半月板再生技術、
骨研究最前線、3 巻、2013、207-215

Katagiri H, Muneta T, Tsuji K, Horie M, et al. Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 14;435(4):603-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.026.

〔学会発表〕(計 3 件)

堀江 雅史、Synovial stem cell therapy for meniscal regeneration、ISAKOS (招待講演) 2015 年 6 月 9 日、リヨン(フランス)

堀江 雅史、滑膜幹細胞を用いた半月板再生、JOSKAS 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(招待講演) 2014 年 7 月 26 日、広島県広島市

堀江 雅史、滑膜幹細胞を用いた半月板再生、日本関節病学会(招待講演) 2014 年 11 月 6 月 7 日、東京都新宿区

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/med/arm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 雅史 (HORIE, Masafumi)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・助教

研究者番号：90622647

(2) 研究協力者

関矢 一郎 (Sekiya, Ichiro)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授

水野 満 (Mizuno, Mitsuru)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・助教