

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390361

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞からの生体外作成軟骨シートによる鏡視下関節軟骨欠損修復術の開発

研究課題名(英文) Investigation

研究代表者

脇谷 滋之(WAKITANI, Shigeyuki)

武庫川女子大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70243243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は世界に先がけて自己骨髄間葉系幹細胞移植による関節軟骨欠損修復の臨床研究を行い、世界で最も多くの症例の経験を持つ。しかしこれまでの方法では修復が完全な硝子軟骨では行われないこと、および関節を切開するために手術侵襲が大きいという問題点があった。これらの問題点を改善するために、骨髄細胞培養時に軟骨分化誘導をかけて軟骨様シートを作成する方法を開発した。またヌードラットを使った動物実験で関節軟骨欠損部に軟骨様シート移植すると良好な修復が得られることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously reported some success repairing osteochondral defects with BMSCs, but did not regenerate new hyaline cartilage with the properties of native articular cartilage. To find better methods for regenerating articular cartilage defects using BMSCs, we hypothesized that the induction of chondrogenic differentiation and the seeding of many cells into the tissue matrix within the defect are important. We determined culture conditions that created stable scaffold-free cartilage-like cell-sheets from human BMSCs and assessed their effects after transplantation into osteochondral defects in nude rats. The results indicate that the FGF-2 enhances the proliferative and chondrogenic capacity of hBMSCs during expansion. Culture with FGF-2 with FBS may help to quickly generate sufficient numbers of cells to create stable and reliable scaffold-free cartilage-like cell-sheets, which contribute to the regeneration of osteochondral defects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨・軟骨代謝学 関節軟骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

細胞移植による関節軟骨欠損修復は、1968年チェスターマン(1)らの家兎同種軟骨細胞移植による関節軟骨欠損修復の報告以来、いくつかの軟骨細胞移植が研究されてきた。申請者らも1989年、家兎の実験系でコラーゲン・ゲルに包埋した同種軟骨細胞移植で関節軟骨欠損修復が促進されることを報告した(2)。同じ年、グランデ(3)らは家兎の実験系で自己軟骨細胞移植により関節軟骨欠損修復が促進されることを報告した。この方法はすぐに臨床応用され(4)、1997年米国食品医薬品局で承認され世界初の整形外科分野における再生医療商品として世界で普及した。しかしながら、従来の第一世代自己軟骨細胞移植ではモザイクプラスチーと比較して有意に良好な修復を得られていない(5)。関節軟骨欠損の修復を促進するために細胞移植を行うことを考えたときに、本来そこにあるべき細胞、即ち軟骨細胞を移植しようとするのはごく当然の考え方であり、このように初期から研究されてきた。しかしながら、軟骨細胞の場合、自己移植では軟骨組織採取による欠損が生じることから採取量に限界があること、同種移植では死体から組織採取のシステム構築が不可能であるという問題がある。

我々は体性幹細胞の一種である骨髄間葉系幹細胞に注目し、1994年、自己骨髄間葉系細胞移植により関節軟骨欠損修復が促進されることを家兎の実験系を使い世界で初めて報告し(6)、1998年、世界で初めて臨床応用した(7)。その後約40例に施行し、局所の感染や腫瘍形成を認めない、安全な方法であることを報告した(8,9,10)。さて、このように自己骨髄間葉系細胞は安全で有効な方法であるが、従来法では関節を切開するために、手術侵襲が大きいという問題がある。骨髄間葉系幹細胞から *in vitro* で分化誘導をかけ軟骨様シートを作成することが出来れば、修復成績をさらに改善し、より手術侵襲の小さい、関節鏡視下に行える軟骨修復方法となると考えられた。

### 2. 研究の目的

関節軟骨再生のために様々な細胞移植の前臨床試験が行われているが、実際に臨床応用されているものは少ない。我々は世界に先がけて自己骨髄間葉系幹細胞移植による関節軟骨欠損修復の臨床研究を行い、世界で最も多くの症例の経験を持つ。しかしこれまでの方法では関節を切開するために手術侵襲が大きいという問題点がある。より手術侵襲の小さい方法として関節鏡視下で行える細胞移植方法の開発が目的である。*in vitro* で骨髄間葉系幹細胞から軟骨シートを作成し、そのシートをヒトで関節鏡視下に移植できる技術を開発することが目的である。

### 3. 研究の方法

骨髄間葉系幹細胞から *in vitro* で収縮することなく軟骨シートを作成する方法を開

発したが、さらに良好な軟骨シートを確実に作成する方法(培養条件、成長因子など)を確立する。作成した軟骨シートを家兎の大腿骨軟骨欠損部にフィブリン糊で固定し移植した。移植後2、4、12週で修復成績を肉眼的、組織学的、免疫組織学的に評価する。

### 4. 研究成果

cell culture insert にヒト間葉系幹細胞 ( $1.8 \times 10^6$  cells) および TGF- $\beta$ 、IGF1、デキサメタゾンなどを含む培養液(上側 0.3 ml、下側 1 ml) を入れ 3 週間培養すると高品質なシートが作成できることを明らかにした。

骨髄間葉系幹細胞からの軟骨シート作成にはヒトの細胞が最適であることを確認した。家兎骨髄間葉系幹細胞では十分な軟骨基質産生が不十分で、力学的強度の十分な軟骨シートが得られないことが明らかになった。さらに、ヒト骨髄間葉系幹細胞の一次培養時に FGF-2 を使用すると、2 次培養時に FGF-2 を加えなくても軟骨分化因子を加えることで軟骨基質産生能の高い細胞が大量に得られることが明らかになった。

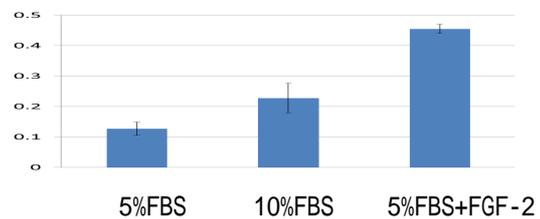


図1. population doubling/day

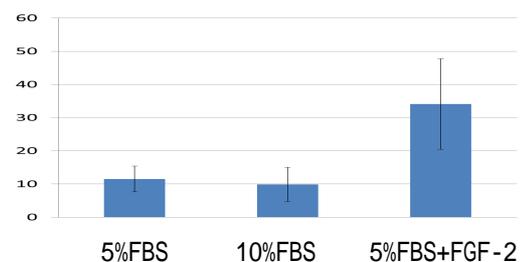


図2. 軟骨ペレットの DNA 量あたりの軟骨 GAG 量 GAG/DNA (μg/μg)

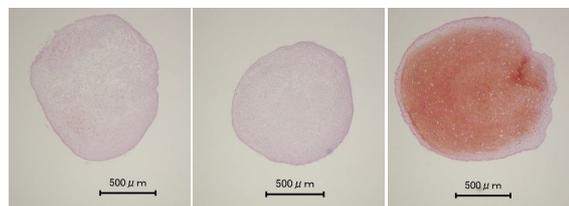


図3. 一次培養時に 5%FBS、10%FBS、5%FBS+FGF-2 で培養し、2 次で同じ軟骨分化誘導をかけたところ、5%FBS+FGF-2 でもっとも良好な軟骨ペレットが作成できた。

ヒト骨髄間葉系幹細胞から FGF-2 を使って

軟骨シートを作成すると、良好なシートが得られることを明らかにした。



図4 .肉眼写真  
(直径5mm)

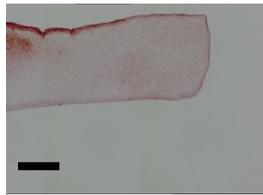


図5 .組織写真  
Safranin-O 染色  
バー = 0.5mm

ヌードラットの骨軟骨欠損への移植実験を施行した。ヒトの骨髄血を採取し、骨髄間葉系幹細胞を FGF-2 添加条件で培養増殖させた。その細胞から上記で開発した方法で軟骨シートを作成した。ヌードラットの大腿骨顆間部に直径 2mm の骨軟骨欠損を作成し、軟骨シートを移植した。移植後 2、4、12 週で肉眼的にシート移植群で良好な修復が得られた。

移植後  
2 週



移植後  
4 週



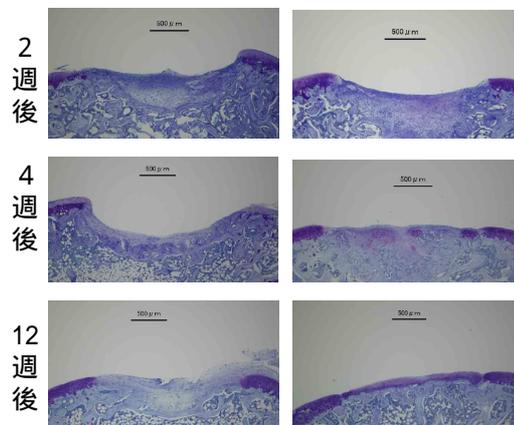
移植後  
12 週



コントロール群 シート移植群

図6 .軟骨様シート移植およびコントロール群の肉眼的所見

組織学的にもシート衣装群で良好な修復が得られた。



コントロール群 シート移植群

図7 .軟骨様シート移植およびコントロール群の組織学的所見トルイジンブルー染色

さらに移植した細胞の生存を確認するために、抗ヒトビメンチン抗体で染色し評価した。その結果、移植後 12 週で軟骨シート移植群ではコンとロー群に比較して有意に良好な修復が得られることが明らかになった。移植細胞は移植後 2 週ではたくさん存在したが、4 週ではやや減少し、12 週ではほとんど認められなかった。

#### 引用文献

- Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. J Bone Joint Surg Br 50:184-197,1968.
- Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. J Bone Joint Surg Br 71(1): 74-80,1989.
- Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. J Orthop Res 7(2): 208-218,1989.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med. 1994;331(14):889-95.
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. J Bone Joint Surg 89-Am:2105-2112,2007.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al : Mesenchymal cell - based repair of large, full thickness defect of articular cartilage . J Bone Sarg, 76 - A : 579 - 592 , 1994.
- Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, et

al. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. Cell Transplant 13(5): 595-600,2004.

Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al : Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis Cartilage 10(3):199-206,2002.

Wakitani S, Nawata M, Tensho K, et al. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving 9 defects in 5 knees. J Tissue Eng Regen Med 1(1):74-79,2007.

Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. J Tissue Eng Regen Med 5(2):146-150, 2011.

#### 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4件)

系数万紀、目良恒、玉村禎宏、高木睦、脇谷滋之 . 骨髄間葉系幹細胞からの軟骨様細胞シートの作製及び移植 (前臨床試験). 関節外科 34:108-117,2015

Yamasaki S, Mera H, Itokazu M, Hashimoto Y, Wakitani S. Cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation: review of pre-clinical and clinical studies. Cartilage 査読有、E-pub on May 19, 2014. DOI:10.1177/19476035533

Sato Y, Wakitani S, Takagi M. Xeno-free and shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disc-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells. Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、116(6)、2013、734-739. DOI:10.1016/j.jbiosc

目良恒、脇谷滋之 . 骨髄間葉系細胞移植による軟骨再生治療 . Pharma Medica 31(4)、2013、21-24

[学会発表](計14件)

佐藤康史、目良恒、高橋大介、眞島任史、岩崎倫政、脇谷滋之、高木睦 . 間葉系幹細胞を用いた軟骨様組織の型コラーゲン量増大におけるアスコルビン酸とコラーゲンの相乗効果 . 第14回日本再生医療学会、平成27年3月19日 - 21日、横浜国際会議場 (神奈川県横浜市)

系数万紀、目良恒、玉村禎宏、中村博亮、高木睦、脇谷滋之 . 骨髄間葉系幹細胞からの軟骨様細胞シートの作成及び移植 . 第14回日本再生医療学会、平成27年3月19日 - 21日、横浜国際会議場 (神奈川県横浜市)

系数万紀、目良恒、佐藤康史、中村博亮、高木睦、脇谷滋之 . ヒト骨髄細胞由来 scaffold-free 再生軟骨様細胞シート作成の工夫 . 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、平成26年10月9-10日、城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

系数万紀、目良恒、中村博亮、高木睦、脇谷滋之 . 骨髄間葉系幹細胞からの軟骨様シートの作成および移植 . 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、平成26年10月9-10日、城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

Sato Y, Wakitani S, Takagi M. Increase of Type 2 collagen Accumulation in Shrinkage-free Scaffold-free Cartilage-like MSCs Sheet. TERMIS-AM 2014, , December 13-16, 2014, Washington DC (USA)

系数万紀、目良恒、佐藤康史、中村博亮、高木睦、脇谷滋之 . ヒト骨髄細胞(hBMSCs)由来 scaffold-free 再生軟骨細胞シート作成の工夫 . 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、平成26年7月24~26日、広島国際会議場 (広島県広島市)

Itokazu M, Mera H, Sato Y, Nakamura H, Takagi M, Wakitani S. The enhancement of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) for scaffold-free cartilage-like cell-sheets 60<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING of Osteoarthritis Research Society International 2014 world congress, April 23, 2014, Paris (France)

系数万紀、目良恒、佐藤康史、中村博亮、高木睦、脇谷滋之 . 主題3 軟骨修復・再生 ヒト骨髄細胞由来 scaffold-free 再生軟骨様細胞シート作成の工夫 . 第27回日本軟骨代謝学会、平成26年2月28日、京都府医師会館 (京都府京都市)

佐藤康史、笠井信宏、高橋伊織、脇谷滋之、高木睦 . 骨髄間葉系幹細胞を用いた軟骨様細胞シートのECM蓄積量増大法の検討 . 日本生物工学会年会広島大会、平成25年9月18-20日、広島国際会議場 (広島県広島市)

Wakitani S. Clinical experience of stem cell implantation in an OA joint.

1<sup>st</sup> Summit meeting of International Cartilage Repair Society, May 30-31, 2013, Tallin (Estonia)  
Sato Y, Wakitani S, Takagi M.  
Xeno-free preparation of scaffold-free cartilage-like cell sheet using bone marrow mesenchymal stem cells. 日本動物細胞工学会国際大会 JAACT2012、平成 24 年 11 月 30 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）  
佐藤康史、脇谷滋之、高木睦。隔膜培養器と骨髄間葉系幹細胞を用いたスキャフォールドフリー軟骨様細胞シート作製。日本生物工学会、平成 24 年 10 月 25 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）  
佐藤康史、脇谷滋之、高木睦。隔膜培養器と骨髄間葉系幹細胞を用いたスキャフォールドフリー軟骨様細胞シート作製。第 11 回日本再生医療学会、平成 24 年 6 月 13 日、横浜国際会議場（神奈川県横浜市）  
脇谷滋之。骨髄間葉系細胞を用いた関節軟骨再生（イブニングセミナー）。第 85 回日本整形外科学会、平成 24 年 5 月 18 日、京都国際会議場（京都府・京都市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：間葉系幹細胞を用いた軟骨様シート作成方法

発明者：高木睦、佐藤康史、脇谷滋之、  
目良恒

権利者：高木睦、脇谷滋之

種類：特許

番号：特願 2015-18306

出願年月日：2015 年 2 月 2 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇谷 滋之 (WAKITANI, Shigeyuki)

武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・教授

研究者番号：70243243

(2) 研究分担者

高木 睦 (TAKAGI, Mutsumi)

北海道大学・工学研究科・教授

研究者番号：20263212

橋本 祐介 (HASHIMOTO, Yusuke)

大阪市立大学・医学研究科・講師

研究者番号：10382178

(3) 連携研究者

玉村 禎宏 (TAMAMURA, Sadahiro)

武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・博士研究員