

平成 22 年 3 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591750  
 研究課題名（和文）一期的自家細切軟骨移植と間葉系幹細胞移植を組み合わせた新しい関節軟骨修復法の開発  
 研究課題名（英文）Development of a novel one-step procedure for articular cartilage repair using minced cartilage and mesenchymal stem  
 研究代表者  
 中川 晃一（NAKAGAWA KOICHI）  
 千葉大学・大学院医学研究院・講師  
 研究者番号：30400823

## 研究成果の概要（和文）：

[目的] 体外での培養を行わない新しい移植法の開発を目指し、細切軟骨片と滑膜由来幹細胞の同時移植が、滑膜細胞の軟骨分化に与える影響を検討した。[方法] ウサギ滑膜細胞を1時間酵素処理にて分離しフィブリンゲル内に包埋した。滑膜細胞のみを含むSC群、細切軟骨片と滑膜細胞を含むAC+SC群、細胞を含まないNC群を作製してヌードマウスの皮下に移植し、組織学および生化学的検討を行った。[結果] AS+SC群ではSC群と比較してSafranin-Oにてより強く染色される傾向を認め、重量あたりのプロテオグリカン含有量も有意に増加していた。またAS+SC群ではII型コラーゲンおよびSOX9の発現が有意に促進された。[考察] 細切軟骨片とともに移植した滑膜由来幹細胞は、軟骨片からの刺激により軟骨様細胞へ分化したと考えられた。本研究の結果を応用し、細切軟骨片と滑膜細胞を同時に含む移植片を作製することで、新しい一期的な関節軟骨修復法が可能と思われる。

## 研究成果の概要（英文）：

[Objective] To develop a novel implantation procedure without in vitro culture, the effect of co-implantation of minced cartilage and synovial cells on the chondrogenic differentiation of the synovial tissue-derived mesenchymal stem cells was investigated.  
 [Methods] Rabbit synovial cells were isolated by enzyme treatment for 1 h and embedded in fibrin gel. The fibrin gel implants containing only synovial cells (SC group), both minced articular cartilage and synovial cells (AC+SC group) or neither cartilage nor synovial cells (NC group) were implanted subcutaneously in nude mice and then examined the histological and biochemical findings.  
 [Results] Safranin-O staining tended to be stronger, and proteoglycan content (per weight) was significantly increased in the AC+SC group compared to the SC group. Furthermore, type II collagen and Sox9 expression were significantly enhanced in the AC+SC group.  
 [Conclusion] Co-implantation of minced cartilage with synovial cells enhances chondrogenic differentiation. The use of implant grafts containing both minced cartilage and synovial cells may be a novel approach for one-step joint cartilage repair.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,100,000	330,000	1,430,000
20年度	900,000	270,000	1,170,000
21年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：関節病学

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は無血管の組織であり、また細胞分裂活動に乏しいことから、広範囲の損傷は本来の硝子軟骨としては治癒せず、組織学的に劣る線維軟骨で修復される。関節軟骨欠損に対する新しい治療法として 1994 年に発表された自家培養軟骨細胞移植術 (Autologous chondrocyte implantation, 以下 ACI) は、自家軟骨細胞を体外で培養後に損傷部に移植する方法であり、その有用性は欧米において証明されている<sup>1)</sup>。しかし、この方法では、軟骨細胞を採取する手術と体外培養した細胞を移植する手術との 2 回の手術を要するため、多大な医療費と治療期間がかかり、また特殊な培養設備を必要とすることから、臨床応用は極めて限られた施設に制限されている。さらに、移植に用いる軟骨細胞は同じ関節内の正常軟骨 (非荷重部) より採取するため、移植可能な細胞数には限界がある。Lu らは、体外での細胞培養の段階を省略し、細切軟骨片を直接軟骨欠損部に移植する方法を報告した<sup>2)</sup>。この方法では、従来二期的に行っていた移植手術を、一期的手術へと改良することができるが、移植細胞数に限界があるという ACI の問題点は解決されていない。一方、この移植細胞数の問題を解消するために、滑膜組織に存在する軟骨前駆細胞を軟骨修復に利用する試みが近年なされている。滑膜由来細胞は軟骨移植に用いる細胞として有用と考えられるが、過去の報告では体外で長期間培養してから移植に用いられており、臨床応用された場合に多大な医療費と治療期間が必要になるという点は従来の ACI と同様である。

### 2. 研究の目的

我々は、軟骨細胞との共培養により、滑膜由来幹細胞の軟骨分化が促進されることを報告した<sup>3)</sup>。この結果より、細切軟骨片移植と滑膜細胞移植を組み合わせることで、従来の ACI の問題点を解決しうる新しい一期的修復方法の開発が可能と考えられた。本研究の目的は、細切軟骨片と非培養分離滑膜細胞を共存させて移植した場合に、移植滑膜細胞の軟骨分化にどのような影響があるかを検討することである。

### 3. 研究の方法

白色家兎より血液と関節軟骨および滑膜を

採取して実験に使用した。滑膜細胞は 1 時間のコラゲナーゼ処理にて分離し、PKH26 キットで細胞標識後、1million/ml の濃度で血漿に入れ、細胞浮遊液を作製した。この滑膜細胞浮遊液 200ul にトロンビン 500unit/ml の濃度で添加してゲル化させ、以下の移植片を作製した。細切軟骨片と滑膜細胞を含む移植片 (AC+SC)、滑膜細胞のみを含む移植片 (SC)、細胞を含まない移植片 (NC) の 3 種類である。AC+SC 移植片は、細胞浮遊液がゲル化する直前に 1-2 mm 角の大きさに細切した軟骨片を表層にのせ、同部に包埋することで作製した。これらを、ヌードマウスの皮下に移植し、移植後 1 週および 2 週後に移植片を摘出した。

摘出した移植片の一部は 4%パラホルムアルデヒドにて固定して組織学的検討に用い、一部は凍結して生化学的検討に用いた。組織学的検討用の試料は凍結切片としサフラニン-0 染色を行った。蛍光顕微鏡による移植滑膜細胞の局在の観察も同時に施行した。生化学的検討用の資料のうち AC+SC 移植片は二つの層に切り、滑膜細胞のみを含む側を AC+SC 群として扱い、軟骨片を含む側は AC 群 (ポジティブ・コントロール群) とした。試料の一部はパパインにて酵素処理し、DNA 含有量 (Hoechst 33258 dye 法) およびプロテオグリカン含有量 (DMMB 法) の測定を行った。残りの試料からは RNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を合成した後、軟骨分化因子である Sox9 と軟骨型コラーゲンである II 型コラーゲンの発現量を real time PCR 法により測定した。Applied Biosystems 社製のプライマー (TaqMan Gene Expression Assays) を使用し、軟骨片を含む試料 (AC 群) を対照とした比較定量解析を行った。統計学的解析は ANOVA にて行い、post hoc test として Fisher's PLSD を用いて P 値 0.05 以下を有意差ありとした。

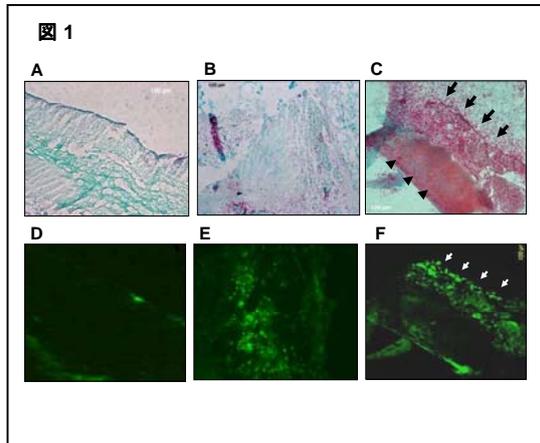
### 4. 研究成果

(結果)

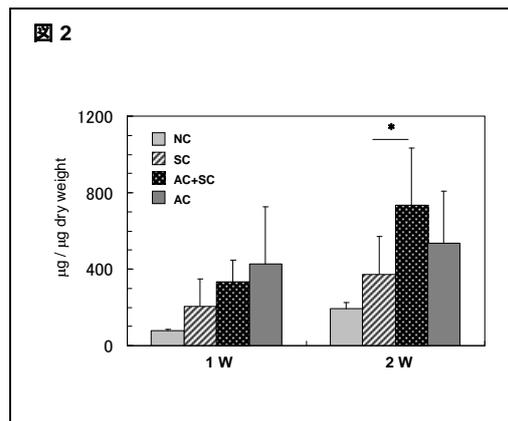
組織学的検討：

サフラニン-0 染色により、AC+SC 群では SC 群と比較して、より強く染色される傾向を認めた。SC 群では染色陽性部位は点在するのみであったのに対し、AC+SC 群では、染色性の強い部位がより広範囲に認められた。濃染部位は細切軟骨に隣接する部位だけでなく、や

や離れた部位にも認められた (図 1 A-C)。また、蛍光標識された滑膜細胞の局在は、サフラニン-O 染色陽性部位と一致しており、移植滑膜細胞が軟骨様細胞に分化していることが示された (図 1 D-F)。



DNA およびプロテオグリカン含有量：  
移植後 2 週の時点において、AC+SC 群における DNA 含有量は SC 群と比較して有意に高値を示した (図 2)。



重量あたりのプロテオグリカン含有量は、2 週間目に SC 群と比較して AC+SC 群で有意に増加していた (図 3 A)。DNA 量あたりのプロテオグリカン含有量も AC+SC 群で高い傾向を認められたが、統計学的な有意差はなかった (図 3 B)。

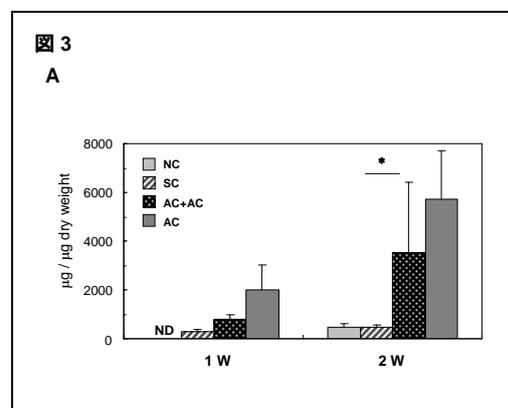
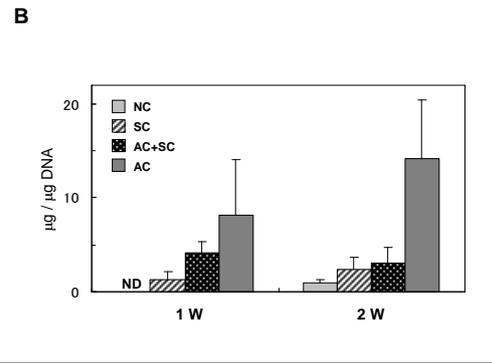


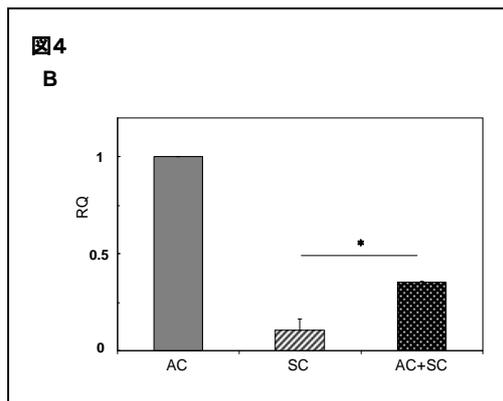
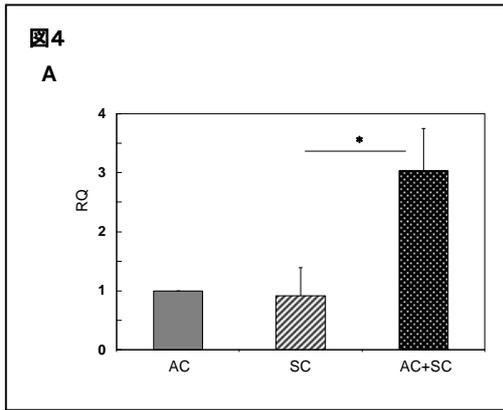
図 3



Sox9 および II 型コラーゲン発現量：  
軟骨細胞への分化因子のひとつである Sox9 の発現量は、AC+SC 群において、AC 群および SC 群の約 3 倍となっており、有意な増加を認めた (図 4 A)。軟骨に特異的なコラーゲンである II 型コラーゲンの発現量は、AC+SC 群では SC 群と比較して有意に増加していた (図 4 B)。

(考察)

関節内組織である滑膜組織には軟骨分化能を有する細胞が存在するとされ<sup>4)</sup>、Sakaguchiらは様々な組織由来の多能性細胞の中で滑膜由来細胞が最も軟骨形成能にすぐれていることを示した<sup>5)</sup>。この性質を関節軟骨修復に応用し、軟骨欠損に対する自家細胞移植術に滑膜細胞を利用する試みがなされている<sup>6)</sup>。滑膜細胞の軟骨分化に関する報告では、ほとんどが「滑膜由来の幹細胞(stem cells)、前駆細胞(progenitor cells)、間葉系細胞(mesenchymal cells)」などと称して、分離培養した細胞が用いられている。一方、滑膜細胞を分離培養せずに、滑膜組織をそのままゲルに包埋して培養(explant culture)またはヌードマウス皮下に移植して、軟骨への分化を解析した報告も散見される<sup>4) 7)</sup>。これらの結果は、滑膜組織内の特定の細胞群(幹細胞)のみが軟骨に分化するのではなく、滑膜細胞自体に軟骨分化能があることを示している。本研究では、酵素処理にて滑膜細胞を採取後、試験管内で培養することなくヌードマウス皮下に移植したが、組織学的および生化学的検討により、これらの細胞が軟骨分化傾向を示したことが確認された。滑膜由来細胞を体外で培養することなく使用すれば、一期的な細胞移植術が可能となり、また細胞培養に伴う費用も削減できることから、患者負担の軽減と医療経済面の双方において大きな意義がある。滑膜をはじめとする他組織由来の間葉系細胞を軟骨組織修復に利用する際には、より効果的に軟骨細胞に分化させることが重要である。滑膜由来細胞を軟骨に分化させるためには、transforming growth factor beta



(TGF・)やbone morphogenetic protein (BMP)などの分化因子が必要であることが知られている<sup>7)</sup>が、近年、軟骨細胞との共培養により、間葉系幹細胞の軟骨分化が促進されることが報告された<sup>8)</sup>。また、我々は、関節軟骨細胞との共培養により、滑膜由来細胞の軟骨分化傾向が高まることを報告した<sup>3)</sup>。これらの結果は、軟骨細胞自身が間葉系細胞の軟骨分化因子を産生している可能性を示唆している。本研究においても、細切軟骨片とともに移植した滑膜細胞は、軟骨片からの何らかの刺激により、軟骨様細胞へ分化したと考えられた。この結果を応用し、細切軟骨片と滑膜細胞を同時に含む移植片を作製することで、新しい一次的な関節軟骨修復法が可能と思われる。細切軟骨片移植のみでは不十分な細胞数を、採取しやすく軟骨形成能にすぐれる滑膜由来細胞で補うことができ、さらに軟骨片が産生する因子により滑膜由来細胞の軟骨分化促進が期待される。関節軟骨欠損部への移植実験等のさらなる検討が必要ではあるが、細切軟骨片と非培養分離滑膜細胞の同時移植は、患者への手術侵襲および医療経済的負担の少ない新しい関節軟骨修復法として有用と考えられた。

(引用論文)

- 1) Brittberg M, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994, 331(14): 889-895.
- 2) Lu Y, et al. Minced cartilage without

cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2006 Jun; 24(6): 1261-1270.

3) 守屋拓朗ほか. 関節軟骨細胞との共培養が滑膜細胞の軟骨分化に与える影響の解析. *日本整形外科学会雑誌.* 2008, 82: S991.

4) Nishimura K, et al. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1999, 42(12): 2631-2637.

5) Sakaguchi Y, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005, 52(8): 2521-2529.

6) Ando W, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2007, 28(36): 5462-5470.

7) Shintani N, Hunziker EB. Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis Rheum.* 2007, 56(6): 1869-1879.

8) Chen WH, et al. In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2009, 60(2):450-459.

#### 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)

1. Ogino S, Sasho T, Nakagawa K, Suzuki M, Yamaguchi M, Higashi M, Takahashi K, Moriya H : Detection of pain-related molecules in the subchondral bone of osteoarthritic knees. *Clin Rheumatol* 29: 1395-1402, 2009 (査読有り)
2. Louay Fallouh, 中川晃二, 佐糺孝久, 守屋拓朗, 鶴岡弘章, 東山礼治, 和田佑一, 守屋秀繁, 高橋和久 : 細切軟骨片との共存移植が滑膜細胞の軟骨分化に与える影響. *千葉スポーツ医学研究会雑誌* 6 : 1-4, 2009 (査読有り)
3. Matsuki K, Sasho T, Nakagawa K, Tahara M, Sugioka K, Ochiai N, Ogino S, Wada Y, Moriya H : RGD peptide-induced cell death of chondrocytes and synovial cells. *J Orthop Sci* 13: 524-532, 2008 (査読有り)
4. Kitahara S, Nakagawa K, Sah RL, Wada Y, Ogawa T, Moriya H, Masuda K : *In vivo*

maturation of scaffold-free engineered articular cartilage on porous hydroxyapatite. Tissue Eng Part A 14: 1905-1913, 2008 (査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

1. 中川晃一, Louay Fallouh, 佐粧孝久, 鶴岡弘章, 和田佑一, 守屋秀繁, 高橋和久: 細切軟骨片との共存移植による滑膜細胞の軟骨分化促進効果. 第28回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京. 2009.11.21
2. Louay Fallouh, 中川晃一, 佐粧孝久, 鶴岡弘章, 和田佑一, 守屋秀繁, 高橋和久: 細切軟骨片との共存移植が滑膜細胞の軟骨分化に与える影響. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 横浜. 2009.11.5-7
3. Fallouh L, Nakagawa K, Sasho T, Arai M, Kitahara S, Wada Y, Moriya H, Takahashi K. Effect of platelet-rich plasma gel on rabbit articular chondrocytes cultured in alginate beads. The 8<sup>th</sup> World Congress of the International Cartilage Repair Society. Miami, USA. 5/23-26/2009.
4. Kitahara S, Nakagawa K, Wada Y, Nakajima T, Takahashi K, Moriya H, Sah RL, Masuda K. Transplantation of newly developed composite graft using scaffold-free engineered cartilage and porous hydroxyapatite to treat osteochondral defects in a rabbit model. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). Las Vegas, USA. 2/22-25/2009.
5. 北原聡太, 中川晃一, 佐粧孝久, 荒井桃子, 和田佑一, 守屋秀繁, 小川哲朗, 中島武彦, 舩田浩一, Robert L. Sah, 高橋和久: 骨軟骨欠損治療のための新しい移植用軟骨-人工骨複合体の開発. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2008.10.23-24
6. 守屋拓朗, 佐粧孝久, 中川晃一, 北原聡太, 鶴岡弘章, 荒井桃子, 高橋和久, 和田佑一, 山下剛司, 守屋秀繁: 関節軟骨細胞との共培養が滑膜細胞の軟骨分化に与える影響の解析. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2008.10.23-24

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 滑膜細胞および細切軟骨片の軟骨修復における利用  
発明者: 中川晃一、守屋拓郎、佐粧孝久、和田佑一  
権利者: 千葉大学  
種類: 特許

番号: 特願 2009-040841  
出願年月日: 2009年2月24日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中川 晃一 (NAKAGAWA KOICHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号: 30400823

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: