

機関番号： 14301  
 研究種目： 基盤研究 (B)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20390514  
 研究課題名 (和文) 滑膜から樹立した幹細胞による顎関節組織再生に関する基礎的研究  
 研究課題名 (英文) Reconstruction of temporomandibular joint tissue with mesenchymal Cells from synovial membrane  
 研究代表者 藤村 和磨 (FUJIMURA KAZUMA)  
 京都大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号： 30252399

研究成果の概要 (和文) : 間葉系幹細胞は優れた増殖能と多分化能を有し, 再生医療の細胞源として有用である. 滑液から分離培養した細胞の骨芽細胞および軟骨細胞への分化能は, 患者によって差を認める. 顎関節症患者の 6 症例の洗浄排液から接着細胞を分離培養し, 分化能の高い 3 症例と低い 3 症例に分類した. 骨芽細胞, 軟骨細胞分化誘導実験において 2 群間で分化誘導能に有意な差を認めた. 臨床症状の疼痛の程度により 2 群間で有意差を認めたが, 開口量に関しては認めなかった.

研究成果の概要 (英文) : Mesenchymal stem cell are fascinating sources for regenerative medicine. In previous studies, the ability of the proliferation and differentiation was different. Therefore, we investigated that this time clarify the connection between the clinical symptoms and the differentiation potential. Synovial fluid was obtained from 13 patients with temporomandibular disorder (TMD). We cultured the adherent cells of the 6 in 13 samples that had the detail clinical findings.

The subjects were divided into 2 groups. The first group included high differentiation of osteoblast and chondrocyte. The second group included poor differentiation.

The clinic symptoms was measured using the pain score and the mouth-opening distance. The pain score was assessed using a visual analogue scale. There was a significant difference in the osteogenic and chondrogenic potential among the two groups. In the clinical findings, there was a significant correlation in the pain score among the two groups. However, no difference was observed the mouth-opening distance. These results were demonstrated that osteogenic and chondrogenic potential of synovium-derived cells were significantly different in TMD.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
21 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
22 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：滑膜，顎関節

## 1. 研究開始当初の背景

### ① 本研究の学術的背景

現在の歯科領域で大きな課題の一つは、疾患、外傷、先天性欠損などによる口腔組織の欠損と機能障害の回復である。これに対する治療法の一つとして従来の自家組織移植が行われている。しかし採取できる部位や組織量は限られており、十分な再建が困難な場合が多い。近年、海外では脳死臓器移植が数多く行われ、多くの生命が救われている。本邦においても臓器移植法の施行に伴い、諸臓器移植の道が開かれつつある。もちろん歯科領域においても歯牙や顎骨そして軟組織の再建に期待できるものと思われるが、脳死判定の問題や国民の個人倫理の観点から見てもドナー不足は免れず、現実的な治療法として広く普及するのは遠い将来になると思われる。ごく最近、現在の臓器移植に代わる21世紀の新しい医療として幹細胞を使った再生治療が注目されている。これは1997年のクローンヒツジにはじまり、1998年のヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) を使い、動物実験において臓器の機能回復を試みる報告がされているが、ヒトへの応用には、先に倫理的問題を解決する必要があるため現時点では難しい。一方、20年ほど前から白血病患者や再生不良性貧血患者に対しては骨髄移植が既に行われているが、ごく最近、成人の血液以外に存在する体性幹細胞 (間葉系、上皮、肝など) を使って臓器再生が試みられるようになってきた。この方法は患者自身の組織中の幹細胞を取り出し、目的組織の再生能力を付与して患者に戻す方法であるため、倫理的問題が生じることがなく、本邦においても最も現実的な方法であり大いに期待されている。しかしながら、得られる幹細胞数は非常に少なく、現時点では、これもまた骨髄や実質臓器に供給源を必要とする欠点がある。したがって、この手法の課題は、細胞

移植治療の実現を目指して、簡便な方法で且つ最小限量の細胞を採取し、目的の分化能を有する細胞に培養・増殖を行い、十分な細胞数を供給可能にすることであると思われる。

顎関節疾患は、歯科領域でこの20年間活発に研究と治療法の検討が行われてきた。現在では、疼痛や開口障害などの症状の回復は可能になりつつあるが、欠損や変質している顎関節組織の再建または再生に関する研究は未だに進んでいない。近年、多くの臨床研究により、疼痛を伴う顎関節症では滑膜炎の存在が明らかになり、その滑液中ではIL-1 $\beta$  やTNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの上昇やマトリックスプロテアーゼの上昇がみられ、骨や軟骨破壊に関与していることが分かってきた。また炎症に伴い滑液中のヒアルロン酸の分子量の低下によって潤滑作用が減少し、関節内の摩擦係数が増加していることが分かってきた。そのため、最近特に、疼痛を伴う顎関節内障の治療では、滑液中のヒアルロン酸を補う必要があることが改めて認識されるようになってきた。整形外科領域で関節痛に対し高分子ヒアルロン酸(分子量90万と190万)を直接注入する方法で治療効果を挙げている。しかしこの治療の欠点は、ヒアルロン酸の産生機能が回復しないため、滑膜細胞が障害を受けている場合は定期的に反復投与をする必要があることである。そのため、疼痛を伴う顎関節内障の治療では、機能の持った細胞を移植して、関節内の滑膜細胞の機能を回復させて十分な量のヒアルロン酸を関節包内に供給させることが理想である。また外傷や顎関節症や顎関節強直症での関節円板切除術後の円板や欠損した関節軟骨を再生する方法はないために、各組織に分化能を有する細胞移植による顎関節組織再生治療は特に期待できるものと思われる。

BMP は、骨格形成、骨折治癒など生理的骨形成に必須のもので、骨再建や顎変形症の治療や骨形成性障害の治療に応用が考えられている。特に BMP-2 は、BMP ファミリーの中でも強力な骨誘導能を持っていることが知られており、内外で多くの基礎研究が進められている。臨床応用では、本邦で 1995 年より臨床治験が開始されており、米国においては整形外科領域で臨床使用がおこなわれている。一方、欧州では精製 BMP が臨床使用されている。しかしながら現在のところ BMP-2 の大量生産は不可能で、医療用製剤としては高価であるために、その遺伝子を使った治療が考え始められている。

また、多くの軟骨代謝の重要な調節因子の中で、HMGドメインを有する DNA 結合型転写因子 SOX9 (Sry-type high-mobility-group box 9) は、II 型コラーゲンのプロモーター活性をあげる転写因子として同定された分子である<sup>19,20)</sup> SOX5 と SOX6 の上流部分にあり間葉系幹細胞凝集塊形成以降の増殖軟骨細胞までの分化に必須と考えられている。ヒトにおいても SOX9 遺伝子変異体は、重篤な軟骨形成不全症を呈することが知られており、また、インターロイキン(IL)-1, TNF- $\alpha$  などの軟骨異化作用を有するサイトカインで発現抑制がかかるため、関節リウマチや変形性関節症などの病態と深く関わっていることが分かってきた<sup>21)</sup>。そのため本研究では SOX9 遺伝子を導入して細胞移植することで軟骨再生法を検討したい。一方、関節滑液の主成分であるヒアルロン酸は、顎関節症の発症と深く関わっているものとして注目されているが、これは軟骨基質の主要構成成分の一つで、グルクロン酸と N アセチルグルコサミンの 2 糖の繰り返し構造を持つ高分子の多糖類である。その生合成はヒアルロン酸合成酵素(Hyaluronic Acid Synthase: HAS)によって行われ、3 種類のアイズァイム(HAS1, HAS2, HAS3)があり、それぞれ異なる遺伝子(has1, has2, has3)でコードされている。四肢の発達過程

におけるヒアルロン酸合成は主に HAS2 により行われており、軟骨細胞の分化、増殖におけるヒアルロン酸合成には HAS2 が深く関与しているものと思われる。本研究では顎関節の滑液から収集して樹立した幹細胞に、HAS2 遺伝子を導入して、細胞分化を進めさせ後、顎関節包内に戻してやり、滑膜組織回復によるヒアルロン酸合成を促進させて、滑液成分の回復が可能かどうかを検討する予定である。

## 2. 研究の目的

- 1) 顎関節滑膜由来の間葉系幹細胞の樹立法開発
- 2) 幹細胞への遺伝子導入法の確立
- 3) その細胞移植の効果を生物検定で評価する

本研究では、骨組織再生を目的に骨形成因子(Bone morphogenetic protein-2: BMP-2)を、また軟骨組織再生を目的に SOX9 (Sry-type high-mobility-group box 9)を、さらに滑膜細胞にヒアルロン酸合成機能を持たせる目的でヒアルロン酸合成酵素(Hyaluronic Acid Synthase: HAS)の 3 遺伝子を用いて各々の顎関節組織の再生を検討したい。

## 3. 研究の方法

この研究で行う細胞採取方法は、顎関節症 III 型クローズドロックの治療法の一つであるパンピング・マニピュレーションおよび関節洗浄療法で得られる希釈滑液中の細胞を使用するため、簡便で低侵襲であり実施可能である。また申請者らは、以前より独自にアデノウイルスベクターやエレクトロポレーション法での遺伝子導入法の研究を継続しているが高い導入率が得られている。本研究では、この手法を活かして顎関節から得た滑膜幹細胞を増殖させ、骨・軟骨組織再生と滑膜細胞にヒアルロン酸合成機能を持たせる目的で遺伝子を導入して患部に戻すという、新しい再生治療の実用化をめざしたものである。また、この研究結果が良好なもので

あれば、この手法は顎関節疾患の治療にとどまらず、口腔組織再生に応用できるため、将来、新しい歯科の治療法の一つとして確立できると考えられる。

### I. ミニコイルスプリングを使用した機械的負荷によるウサギ顎関節炎モデルの作成

本研究で使用する動物顎関節炎モデルは、申請者らが従来から用いている方法、すなわちスプリングを用いて動物顎関節に1Nの牽引負荷をかけ、非菌的関節炎を誘導する<sup>1)</sup>。

- 1) 動物は45羽の日本白色種家兎(体重3.0-3.5kg。以下ウサギと表す)を用い、実験動物舎搬入後約1週

間の安静をさせ体重測定を行った後、エーテルで眠らせ、耳介静脈に24G留置針を挿入し乳酸リングル液を用いて静脈確保を行った後、静脈麻酔

(Pentobarbital 30mg/Kg)を行う。剃毛と消毒後、左側下顎下縁に約1.5cmの皮膚切開を行い、骨膜を剥離し下顎骨を露出させる。下顎切痕(antegonial notch)部にバーで2ヶ所穴を開け、0.5mmワイヤーを通し、さらに左側眼窩下縁頬骨移行部に同様に穴を開けて0.4mmワイヤーを通す。術野を洗浄後閉創し、2本のワイヤー間にコイルスプリング

(Helical Extension Spring SUS304WPB, JIS-G 4314. Accurate Sales Co., Accurate Sales Co. Japan)を正確に1Nの牽引力に設定する。

毎週牽引力を検査して緩みがあれば調整する。

- 2) 術後3日、1週および4週(各々n=5)に静脈麻酔にて眠らせ、MRI撮影(SIEMENS社、MAGNETOM VISION Plus 1.5T. HASTE撮影法)を行い、手術側

顎関節のJoint effusion(関節液貯留)を確認後、静脈麻酔の過剰投与により安楽死させ、顎関節組織標本作成を行う。すなわち頭部切断して組織固定(4% Paraformaldehyde)を4週間行い、処置側顎関節を中心に20 x 20 mmの大きさで摘出し、再度固定を48時間行う。その後硬組織のEDTA脱灰を4週間行う。その後パラフィン包埋し、5 μmに薄切して、HE染色とサフラニンO染色、トルイジンブルーなどの特殊染色および抗タイプIIコラーゲン抗体による免疫染色を行い、下顎頭骨欠損および関節軟骨の損傷を確認する。この標本は、Vの実験での遺伝子導入後に得られる標本と比較するためのコントロールとして用いる。

### II. 滑膜幹細胞の準備

- 1) 滑膜幹細胞の採取と培養

まず滑膜線維芽細胞(Synovial Fibroblastic Cells, SFCs)の採取は、Iで作成したウサギ顎関節炎モデルより、顎関節穿刺による希釈滑液混入細胞として採取する方法を用いる。希釈滑液中の細胞採取は、Tominagaらの方法<sup>2)</sup>を用い、申請者が改良した方法を用いて、処置側の顎関節から滑液を採取する。すなわち、27Gアトム頭皮静脈針を用い、ウサギ関節結節後方斜面に沿って上関節腔を穿刺し、そのやや後方にもう1針挿入して2ルート確保する。動注ポンプを用いて一方の針から生理食塩液を流し

(0.05ml/min)、残りのルートから滑液を約0.6ml採取する。抗生物質入り間葉系幹細胞培養培地(MSCGM)に入れて500Xgで5分間遠心し、細胞を集め、新たにMSCGM(室温)10mlを加えて細胞をほぐし、新たに10ml加えた後に、10cm培養デ

ィッシュ 2 枚に播種して、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) にて培地を定期交換しながら培養する。

※ ヒトの顎関節に比べて、ウサギの顎関節は狭小のため、滑液採取が困難な場合や細胞数が少ない場合が予測される。その場合は、体側の側頭部皮膚を切開して骨膜下を剥離して関節包を上方から開放し、上関節腔滑膜組織を約 2X2mm の大きさで採取する。あるいは膝関節の滑膜を同様の大きさで採取する。その後メスで細かく裁断して、コラーゲン分解酵素と混合して 2 時間攪拌する。これを濾過して PBS で洗浄して細胞を単離する。同様に抗生物質入り間葉系幹細胞培養培 (MSCGM) に入れて 500X g で 5 分間遠心し、細胞を集め、新たに MSCGM (室温) 10ml を加えて細胞をほぐし、新たに 10ml 加えた後に、10cm 培養ディッシュ 2 枚に播種する。また同様に CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) にて培地を定期交換しながら培養する。

#### 4. 研究成果

1) 間葉系幹細胞は優れた増殖能と多分化能を有し、再生医療の細胞源として有用である。われわれは、これまでに採取された滑液から分離培養した細胞の骨芽細胞および軟骨細胞への分化能に差を認めることを明らかにした。今回われわれは、分化能に差が生じた理由として、臨床症状と関連があると考え、顎関節症患者の臨床症状と分化誘導能の関連について検討を行った。13 名の顎関節症患者の中で十分に滑液が採取され、詳細な臨床所見が検索できた 6 症例の洗浄排液から接着細胞を分離培養した。そのうち、分化能の高い 3 症例と低い 3 症例に分類した。培養の結果、骨芽細胞、軟骨細胞分化誘導実験において 2 群間で分化誘導能に有意な差を認めた。臨床症状においては、疼痛の程度は 2 群間で有意差を認めたが、開口

量に関しては認めなかった。本研究結果より、顎関節症患者間において骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導能に差があることが明らかとなった。

2) ウサギ顎関節滑液からの間葉系幹細胞を用いた軟骨再生では、ウサギ顎関節滑液を希釈回収法にて採取し Monolayer culture で培養、Passage3 まで行い、必要細胞数まで培養する (この時点の細胞を脂肪分化誘導培地、骨分化誘導培地で培養し Oil red O、Alizarin red で確認し脂肪細胞、骨細胞の分化を確認)、20 × 10<sup>5</sup>/20ml の細胞数で Pellet culture を行う。培養液中に FGF:100n/ml、TGF β :10n/ml、BMP:100n/ml、BMP:300n/ml、BMP:500n/ml の各濃度で培養を行い、最も Pellet weight が高かった 10<sup>-7</sup>M dexamethasone + TGF β 10 ng/ml + BMP 500 ng/ml で培養を行った。そして、うさぎ顎関節軟骨全層欠損モデルの作成し、うさぎ顎関節の下顎頭を明示し下顎頭中央部に径 3mm の欠損を作成し軟骨細胞の移植を行った結果組織学的に細胞移植群と sham ope 群に 4 週以降に有意な差を認めた。

3) ウサギ顎関節負荷モデルでの滑液細胞と滑膜細胞の細胞増殖能の検討では、ウサギ顎関節に機械的に 1N の負荷をかける。負荷をかけない control 群、負荷 2 週群、負荷 4 週群、負荷 8 週群で組織学的に比較を行った。組織学的には 2 週目以降で強い滑膜炎を認め MRI においても関節腔内に滑液の貯留を認めた。滑液採取した細胞に対して Control に比べて明らかに 4 週群の滑液は MTX アッセイにて増殖能が高く 8 週以降では増殖能が低下することが分かった。骨形成因子 (BMP-2) を、また軟骨組織再生を目的に SOX9 を、さらに滑膜細胞にヒアルロン酸合成機能を持たせる目的で HAS の 3 遺伝子を用いて、4 週群の滑膜細胞を培養して、遺伝子導入を行い、増殖させて形成された幼弱骨もしくは軟骨組織、細胞塊をウサギ顎関節

下顎頭または後方結合組織内に移植して、現在定時的に組織取り出しを行っている。術後3週の組織では、移植組織は吸収されて消失し、自己修復力にて一部骨組織に置き換わっていた。そのため、組織移植する際は、母床側の移植組織生着の環境設定の検討が必要であると思われた。

#### 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0件)  
英文投稿中2件

[学会発表] (計2件)

①藤村和磨, 別所和久, 他. 顎関節手術術後感染の対処に苦慮した先天性外耳瘻孔の一例. 第55回日本口腔外科学会総会. 2010年10月17日, 千葉市.

②藤村和磨, 別所和久, 他. 顎関節患者における滑液由来の骨芽細胞・軟骨細胞の分化能と臨床症状の関連について. 第158回京都歯科口腔外科集談会. 2009年12月19日.

[図書] (計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤村 和磨 (FUJIMURA KAZUMA)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30252399

##### (2) 研究分担者

大久保 康則 (OKUBO YASUNORI)  
研究者番号：50378618  
京都大学・医学研究科・講師

##### (3) 研究分担者

別所 和久 (BESSHO KAZUHISA)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90229138