

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591914

研究課題名（和文） 軟骨損傷に対する滑膜幹細胞浮遊液静置療法において  
細胞接着効率を向上させる為の検討研究課題名（英文） Magnesium enhances adherence and cartilage formation of  
synovial mesenchymal stem cells through integrins

研究代表者

関矢 一郎（SEKIYA ICHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：10345291

研究成果の概要（和文）：

私たちは滑膜間葉幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に関節鏡視下で 10 分間静置し、細胞を軟骨欠損部に接着させる、低侵襲な関節軟骨の再生医療を開始している。滑膜間葉幹細胞の軟骨欠損部への接着効率の向上を目指し、細胞浮遊液へのマグネシウム添加効果を検討した。マグネシウムは容量依存性に、ヒト滑膜間葉幹細胞の collagen coated dish 及びヒト軟骨欠損部に対する接着性を増加した。家兎の滑膜間葉幹細胞を標識し、浮遊液を軟骨欠損部に静置した。5mM マグネシウム添加群は、移植 1 日後に接着細胞数を増加させ、2、4 週間にはより豊富な軟骨基質を認めた。マグネシウム含有細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置することにより、接着する細胞数が増加し、本法による軟骨再生医療の成績を向上させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that more than 60% of synovial mesenchymal stem cells (MSCs) placed on osteochondral defects adhered to the defect within 10 minutes and promoted cartilage regeneration. In this study, we investigated whether magnesium enhanced adherence and chondrogenesis of synovial MSC through integrins. Magnesium increased adhesion of human synovial MSCs to collagen and promoted synthesis of cartilage matrix during *in vitro* chondrogenesis of synovial MSCs. *In vivo* studies in rabbits showed that magnesium promoted adherence at 1 day and cartilage formation of synovial MSCs at 2 and 4 weeks. Magnesium enhanced adherence of synovial MSCs and promoted synthesis of cartilage matrix at an early phase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1500000	450000	1950000
2010 年度	1300000	390000	1690000
2011 年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

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：間葉幹細胞、滑膜、軟骨、マグネシウム、インテグリン

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は再生能力が低い組織である。細

胞密度が低く、血行を欠き、骨と異なりリモデリングしないためである。外傷で広範囲に

軟骨を欠損すると、もとの硝子軟骨に自然に修復されることは少なく、時にひっきり感等の物理的症状を生じ、その後、関節水腫、疼痛、可動域障害等の関節炎症状を呈する。さらに、ある割合で変形性関節症に進行し、恒久的な障害にまで悪化する。

軟骨を再生させる戦略のひとつは、軟骨基質を産生する細胞を外から補うことである。自己組織由来で、軟骨分化能が高く、十分な数を用意できるという点で、間葉幹細胞が魅力的である。私たちはこれまで滑膜由来の間葉幹細胞は自己血清で効率よく増殖し (Nimura et al. Arthritis Rheum. 2008)、軟骨分化能が特に高く (Sakaguchi et al. Arthritis Rheum. 2005)、未分化な状態で軟骨欠損部に移植すると環境に応じて軟骨細胞に直接分化し軟骨修復を促進する (Koga et al. Stem Cells. 2007) ことを報告している。

軟骨欠損に対する細胞移植は関節鏡視下で可能な方法が望ましい。乳酸リンゲル液中に滑膜幹細胞を浮遊させ、この細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置すると、重力の影響で細胞が底に沈み、接着させることが可能であることを私たちは 2008 年報告した。接着する細胞を増加させるためには、静置する時間が長いほどよいことが予測されるが、静置開始後 10 分で、60%以上の細胞が接着することが明らかとなった。次にウサギの膝に自然修復しない大きさの軟骨欠損を作成し、①コントロール群②滑膜幹細胞の浮遊液を関節内注射した群③同じ細胞浮遊液を軟骨欠損部に 10 分静置した群の 3 群で、組織修復過程を比較すると、静置群が最も良好な結果となった。また、細胞を移植したものが滑膜炎を生じるようなこともなかった (Koga et al. Arthritis Res Ther. 2008)。

## 2. 研究の目的

間葉幹細胞の接着に影響を与えるものとして考えられるマグネシウムを、通常用いている乳酸リンゲル液中に添加し、滑膜幹細胞の接着に影響を与え、軟骨再生を促進するかを検討し、さらにその機序を明らかにする。

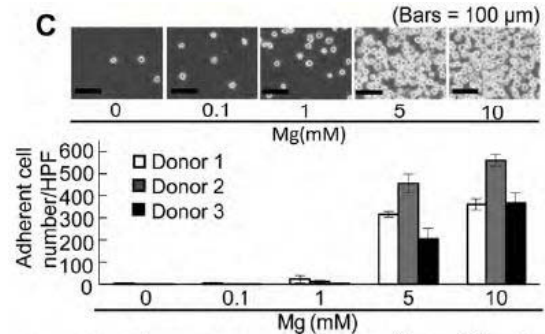
## 3. 研究の方法

人工膝関節置換術後に得られるヒトの軟骨をブロック状に数多く用意し、直径数 mm の軟骨欠損を作成する。DiI で標識したヒト滑膜幹細胞を浮遊させ、マグネシウムを添加し、軟骨欠損部に 10 分間、静置する。その後、欠損部を反転し、非接着細胞を除去する。軟骨欠損の裏面から蛍光を照射すると、接着した細胞数に比例して、蛍光を観察することが可能である。さらに、接着分子の阻害剤や中和抗体を用いてその影響を解析し、また免疫組織学的に検討し、効果の機序を明らかにする。最終的には、ウサギの軟骨欠損に対し

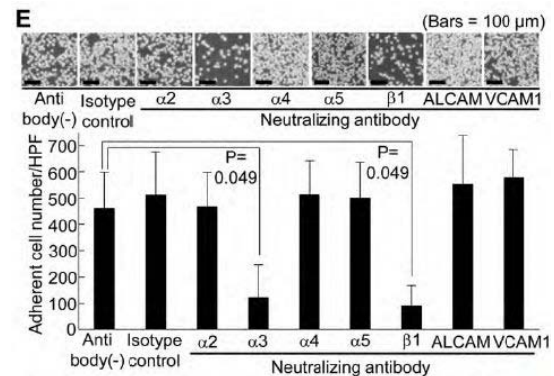
て、今回検討した細胞浮遊液を使用しその有効性を検討する。

## 4. 研究成果

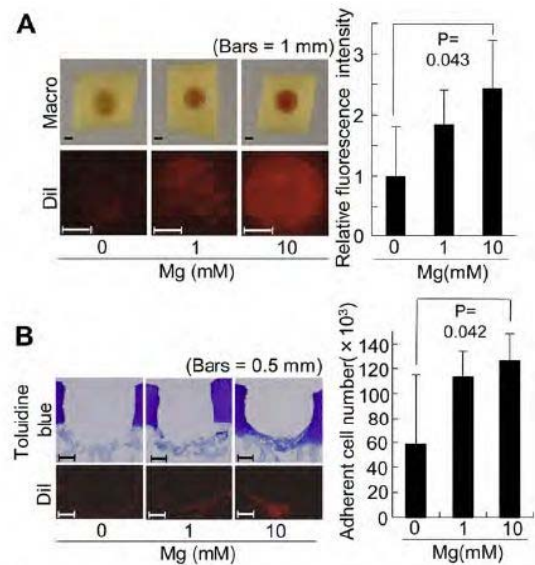
In vitro の検討で、マグネシウムは容量依存性に、ヒト滑膜間葉幹細胞の collagen coated dish の接着性を増加した。



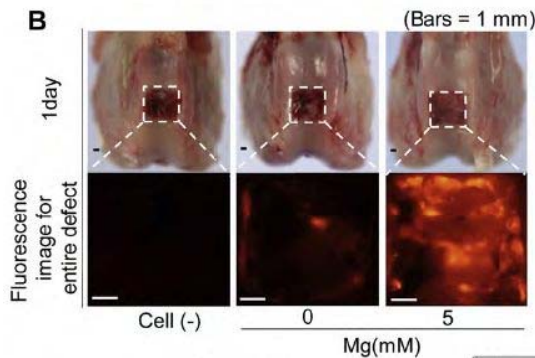
滑膜間葉幹細胞は $\alpha 3$  と $\beta 1$  インテグリンを発現し、 $\beta 1$  インテグリン中和抗体により、マグネシウムの効果は阻害された。



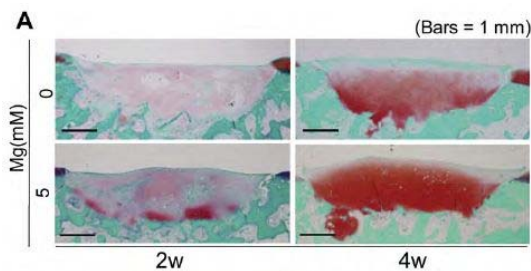
またマグネシウムは容量依存性に、ヒト滑膜間葉幹細胞の軟骨欠損部への接着性を増加した。



In vivo の検討で、家兔の滑膜間葉幹細胞を標識し、浮遊液を軟骨欠損部に静置した。5mM マグネシウム添加群は、移植 1 日後に接着細胞数を増加させた。



またマグネシウム添加群は 2、4 週後により豊富な軟骨基質を認めた。



## 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 6 件)

Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, Tsuji K, Sekiya I. Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Oct;18(10):1300-9. 査読有

関矢一郎、宗田 大  
滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用  
雑誌整形外科 2012 Vol. 63, No. 3, p228  
査読無

関矢一郎、宗田 大  
変形性膝関節症をめぐる進歩  
滑膜由来の幹細胞による再生医療  
Bone Joint Nerve 2012 Vol. 2, No. 1, p159-165 査読無

関矢一郎、宗田大  
滑膜幹細胞を用いた関節軟骨再生治療 2011 Vol. 93, No. 8, p1784-1793  
査読無

関矢一郎  
滑膜間葉幹細胞を用いた関節軟骨再生  
クリニカルカルシウム p83-93 Vol. 21 No. 6  
2011 査読無

関矢一郎  
軟骨再生の概要と応用の可能性  
医事新報 p59-61 No. 4548 2011 査読無

[学会発表] (計 17 件)

関矢一郎  
Mesenchymal stem cells derived from synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration  
Morehouse college (Atlanta)  
2011/1/18

関矢一郎  
Cartilage regeneration with synovial stem cells  
The International Symposium of Global Center of Excellence Program  
Clinical Researches and Experiences for Cartilage Regeneration Therapy  
Tokyo Medical and Dental University  
2011/2/3

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨再生医療  
日本再生医療学会シンポジウム(新宿)  
2011/3/2

関矢一郎  
滑膜間葉幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療におけるマグネシウムの細胞接着促進効果  
日本軟骨代謝学会シンポジウム(博多)  
2011/3/5

関矢一郎  
滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する軟骨再生医療  
東京整形外科画像診断研究会(神田)  
2011/6/11

関矢一郎  
Mesenchymal stem cells derived from synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration  
The 3rd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium (ICOA 2011) (Suwon, Korea)  
2011/7/4

関矢一郎  
滑膜間葉幹細胞による軟骨再生

日本骨代謝学会シンポジウム(大阪)  
2011/7/28

関矢一郎  
関節液中の幹細胞と関節内組織損傷  
日本骨代謝学会シンポジウム(大阪)  
2011/7/30

関矢一郎  
Mesenchymal stem cells derived from  
synovium: their properties and clinical  
application for cartilage regeneration  
International Summer Program 2011  
Tokyo Medical and Dental University  
2011/8/30

関矢一郎  
滑膜幹細胞の視点から膝関節疾患の病態と  
構造体の再生を考える  
第10回鹿児島サイトカイン制御療法研究  
会  
2011/9/21

関矢一郎  
Mesenchymal stem cells derived from  
synovium: their properties and clinical  
application for cartilage regeneration  
BioKorea (Seoul)  
2011/9/30

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生  
信州運動器診療フォーラム(松本)  
2011/10/1

関矢一郎  
Roles of stem cells in synovial fluid and  
clinical applications of stem cells from  
synovium  
Singapore Orthopaedic Association  
2011/10/13

関矢一郎  
滑膜幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への  
応用  
日本整形外科学会 第26回基礎学術集会 ラ  
ンチョンセミナー  
2011/10/20

関矢一郎  
幹細胞による軟骨再生—現状と展望—  
日本臨床スポーツ医学会シンポジウム(青  
森)  
2011/11/6

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨再生

東京大学 再生医療カンファレンス  
2012/2/16

関矢一郎  
Cartilage regeneration with synovial stem  
cells  
The 9th International Symposium for  
Orthopaedic Sports Medicine  
Chang Gung Memorial Hospital - Keelung,  
Taiwan 2012/3/24

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
関矢 一郎 (SEKIYA ICHIRO)  
東京医科歯科大学医歯学総合研究科  
寄附講座教授  
研究者番号 10345291

(2)連携研究者  
宗田 大 (MUNETAKESHI)  
東京医科歯科大学医歯学総合研究科教授  
研究者番号 50190864