

## 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 12 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：21591937

研究課題名（和文）滑膜幹細胞を用いた新しい低侵襲骨関節疾患治療の臨床応用の発展のための大動物研究

研究課題名（英文）Preclinical trial of less invasive synovial stem cell therapy using a pig knee articular cartilage defect model

研究代表者

宗田 大（MUNETA TAKESHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50190864

研究成果の概要（和文）：ミニブタの膝荷重部に作成した軟骨欠損部に同種滑膜幹細胞を 10 分間静置することによりコントロール群に比して術後 1, 2, 3 か月で欠損部の治癒過程が促進されることを関節鏡視下、組織学的に証明した。本結果はヒトの臨床応用の推進を後押しする。

研究成果の概要（英文）：Less invasive synovial stem cell transplantation promoted healing of a full-thickness articular cartilage defect at weight-bearing area in a mini pig model. The results facilitate to perform clinical trial of the transplantation on human patients with articular cartilage injury.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,800,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯学系

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：H:運動器外傷学

## 1. 研究開始当初の背景

膝関節内の重要な靭帯、半月板、関節軟骨等が自然修復能に乏しいのは、修復に寄与する幹細胞の絶対数が乏しいからと推測される。我々は滑膜由来間葉幹細胞が増殖能と軟骨・骨・脂肪分化能に最も優れることを報告し、ウサギの軟骨損傷モデルにおいて有意に良好な軟骨修復が得られること、細胞浮遊液を損傷部に 10 分間静置することで十分な生着が得られ、関節鏡視下に低侵襲で実施可能なこと、さらにヒト滑膜間葉系幹細胞の培養でヒトの血清で代用することの利点を示した。ヒトの外傷性膝軟骨損傷に対し、滑膜由来間葉系幹細胞を用いて、あらゆる間葉系組織（靭帯・半月板を含む）

の修復が出来れば理想的である。

## 2. 研究の目的

ヒト患者に対する臨床応用へ向けた研究として、大動物で、荷重部での欠損モデルを作成し滑膜由来間葉系幹細胞を用いた細胞治療を検討する。

## 3. 研究の方法

ミニブタ（Mexican Hairless Pig; MHP）から滑膜由来の間葉幹細胞（MSC）を採取し、増殖した後凍結保存した。それらの細胞はウサギ由来・ヒト由来と同様に、コロニー形成能を有し、約1年間増殖し続ける能力があり、また多分化能も有していた。さらには骨髄・骨膜・脂肪・筋肉由来のMSCに比し有意に優れた軟骨分化能を有していた。

続いてMHPの両膝の荷重部に8x8x2mmの骨軟骨欠損を作成し、細胞治療を試みた。右膝に平均 $3.8 \times 10^7$ のMSCを、左膝は対照群としてPBSを骨軟骨欠損部に滴下し、特別な固定は行わず、10分間静置するのみで処置した。移植後1週の組織学的所見では、移植細胞が十分量接着していることを確認した。

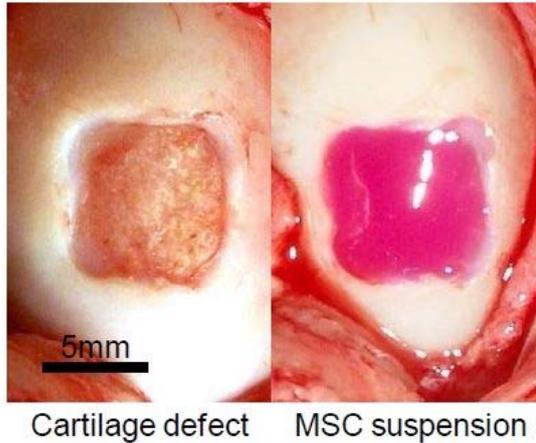


図1 ミニブタ膝荷重部に作成した軟骨欠損と滑膜幹細胞移植時の肉眼所見

図2 移植後1週、DiIによる滑膜幹細胞の染色



また、GFPブタ由来細胞とGFP関節鏡を用いて、生体内で動的にも十分量接着していることを確認した。1ヶ月目では肉眼上も組織学的にも両群に有意差を認めないが、2ヶ月目以降から関節鏡所見上も差が出はじめ、3ヶ月目には組織学的所見上も有意にMSC治療群に良好な軟骨再生が得られていることを確認した

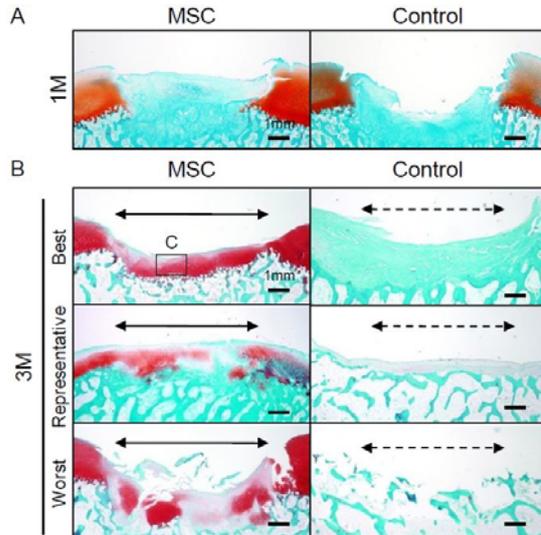


図3 術後3か月後の組織像。コントロールより有意ニサフラニン0の染色性がよい

さらに、関節鏡所見・肉眼的所見上、MSC治療群では対照群に比し炎症反応が抑制されており、関節症性変化も抑制されていたことから、MSCの関節炎抑制作用が示唆された。

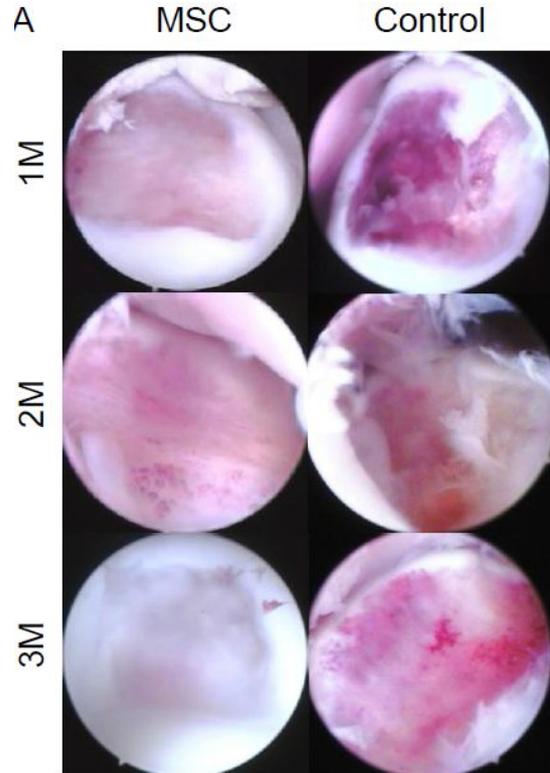


図4 関節鏡による継時的な観察。細胞移植群では継時的に移植部の治癒の進行が見られる

また、細胞治療試験を行った全例においてdGEMRIC法にて評価を行った。

#### 4. 研究成果

ミニブタを用いた荷重部の軟骨欠損治療においても、滑膜幹細胞治療により治療により、より質の良い軟骨再生が得られていることが確認された。本結果は本法をヒトでの臨床応用の実施の有用性をサポートする結果である。

#### 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 1 件)

Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E. Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy* 14: 327-338, 2012

〔学会発表〕(計 2 件)

中村智祐、関矢一郎、宗田 大、ほか: プタ軟骨欠損モデルにおける同種滑膜幹細胞移植、第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011, 10

Nakamura T, Sekiya I, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Muneta T, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E.: Synovial Mesenchymal Stem Cells Transplantation Contributes to Cartilage Regeneration in Porcine Model. Orthopaedic Research Society 2011, Poster, Long Beach, CA, 2011.1.13-16

〔図書〕(計 7 件)

関矢一郎、宗田 大: 滑膜間葉幹細胞を使った軟骨再生. 再生医療叢書 第 6 巻 骨格系 朝倉書店 2012

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 整形トピックス

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

関矢一郎、宗田大: 再生医学のいま 基礎研究から臨床への展開に向けて. 滑膜幹細胞を用いた関節軟骨再生治療 2011

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

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

関矢一郎・宗田 大: 半月板の再生医療 臨床整形外科 p42-45 Vol. 46 No.1 2011

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○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  
<http://www.tmd.ac.jp/grad/orj/orj-J.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗田 大 (MUNETAKESHII)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 50190864

(2) 研究分担者

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・教授

研究者番号: 10345291

小林英司 (KOBAYASHI EIJI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00245044

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: