

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592235

研究課題名(和文) ヒト分離滑膜細胞と細切軟骨片を用いた一期的自家軟骨移植用インプラントの作製

研究課題名(英文) Development of a novel one-step implantation technique for articular cartilage repair using human minced cartilage and isolated synovial cells

研究代表者

中川 晃一 (NAKAGAWA, Koichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：30400823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：[目的] ヒト滑膜細胞と細切軟骨片の同時培養または移植が、軟骨分化に与える影響を検討した。[方法] ヒト滑膜細胞を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群を作製して培養またはヌードマウス皮下に移植し、組織学的・生化学的検討を行った。[結果] AC+SC群ではSC群と比較してプロテオグリカン含有量が増加し、II型コラーゲンおよびSOX9の発現が促進された。[考察] 細切軟骨片とともに移植した滑膜細胞が軟骨様細胞へ分化したと考えられた。滑膜細胞と細切軟骨片を含む移植片を利用することで、新しい一期的関節軟骨修復法の開発が可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：[Objective] To examine the effect of co-culture or co-implantation of synovial and minced cartilage on the chondrogenic differentiation. [Methods] Human synovial cells were isolated and embedded in fibrin gel. The fibrin gel implants containing only synovial cells (SC group) or both minced articular cartilage and synovial cells (AC+SC group) were cultured or implanted subcutaneously in nude mice and then examined the histological and biochemically. [Results] Intensity of Safranin-O staining and proteoglycan content (per weight) increased in the AC+SC group compared to the SC group. Furthermore, type II collagen and Sox9 expression were enhanced in the AC+SC group. [Conclusion] Co-culture or co-implantation of synovial cells with minced cartilage enhanced chondrogenic differentiation. The use of implant grafts containing both synovial cells and minced cartilage could be a novel approach for one-step joint cartilage repair.

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 軟骨再生

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¹⁾。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²⁾。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

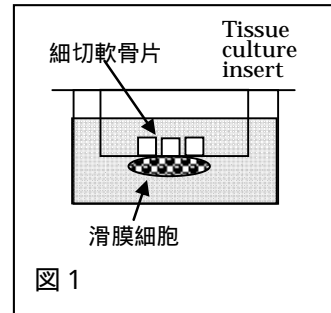
我々は、細切軟骨片との共存により滑膜由来細胞の軟骨分化が促進されることを報告した³⁾。ウサギの細切軟骨片と分離滑膜細胞 (継代培養は行わず) をフィブリンゲル内に包埋し、ヌードマウスの皮下に移植する実験を行ったところ、細切軟骨片と同時に移植した群で滑膜細胞の軟骨分化が有意に促進された (特許取得: 特許第 5373427 号) この結果より、細切軟骨片移植と滑膜細胞移植を組み合わせることで、従来の ACI の問題点を解決しうる新しい一期的修復方法の開発が可能と考えられた。今後は、臨床応用への前段階として、ヒト (成人) の細切軟骨片と分離滑膜細胞を用いた場合でも同様の効果が得られることを確認する必要がある。本研究の目的は、ヒト由来細胞を用いて移植用インプラントを作製し、その軟骨分化能を解析することである。

3. 研究の方法

変形性膝関節症の診断にて東邦大学医療センター佐倉病院で人工膝関節置換術を施行した患者 (10 名、女性 8 名、男性 2 名、平均年齢 65.4 歳) より同意を得て、軟骨片と滑

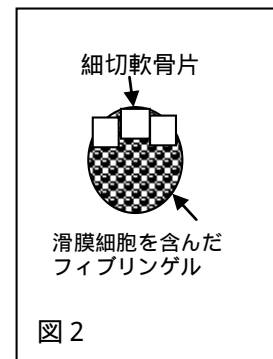
膜組織を採取して実験に使用した (院内倫理委員会承認済)。滑膜細胞は 1 時間のコラゲナーゼ処理にて分離した。

滑膜細胞は、幹細胞の軟骨分化誘導法として確立されている micromass culture 法 (Denker et al. 1995) により培養した。Tissue culture insert の下面に滑膜細胞を播種し、10% FBS および 0.2 mM Asc2-P を添加した DMEM/F12 培地にて 2 日間培養した。12 時間無血清培地とした後、1% FBS, 1% ITS mix, 160 μg/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml dexamethasone, 0.2 mM Asc2-P を添加した DMEM/F12 培地に変更し、細胞接着後上面に細切軟骨片を加えて共培養した群 (AC/SC 群、図 1) と、軟骨片を加えない群 (SC 群) とに分けて、さらに 4 週間の培養を行った。



得られた滑膜細胞層を papain にて酵素処理後、DNA 量 (ヘキストダイによる定量)、プロテオグリカン含有量 (DMMB 法) を測定した。また、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、およびアグリカンのコア蛋白の発現量を 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、軟骨片を加えない SC 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。

また、滑膜細胞浮遊液 200ul にトロンピンを 500unit/ml の濃度で添加してゲル化させ、細切軟骨片と滑膜細胞を含む移植片 (AC+SC) と滑膜細胞のみを含む移植片 (SC) を作製した。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 (図 2)。これらを、ヌードマウスの皮下に移植し、移植後 4 週で移植片を摘出した。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トルイジンブルー染色と II 型コラーゲンに対する免疫組織染色を行った。生化学的検討として



は、前述の通り、DNA 量、プロテオグリカン含有量の測定と、Sox9、軟骨型コラーゲンである II 型コラーゲン、およびアグリカンのコア蛋白の発現量測定を行った。

4. 研究成果

(細胞培養実験の結果)

細切軟骨片を加えて共培養した群 (AC/SC 群) では、軟骨片を加えない群 (SC 群) と比較して、プロテオグリカン量が有意に増加した (図 3)。また、Sox9、アグリカン、II 型コラーゲンの発現量は、いずれも AC/SC 群で増加した (図 4)。

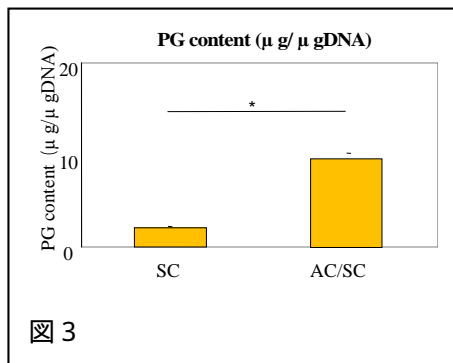


図 3

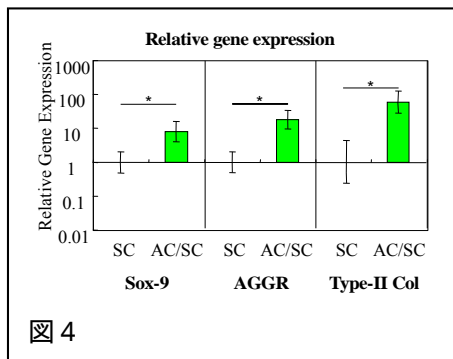


図 4

(ヌードマウス皮下移植実験の結果)

移植後 4 週の組織片の組織学的検討では、AC+SC 群ではトルイジンブルー染色および、II 型コラーゲンに対する免疫染色により染色された (図 5)。一方、SC 群ではこれらの染色法で染色はされなかった。

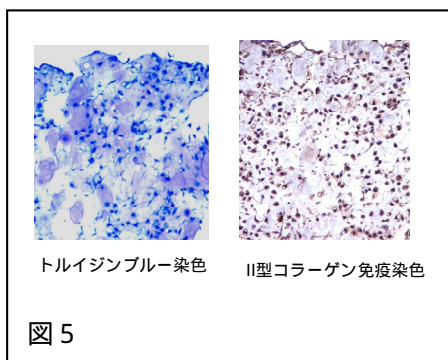


図 5

移植後 4 週の時点において、AC+SC 群におけるプロテオグリカン含有量は、SC 群と比較し

て有意に増加していた (図 6)。

Sox9、アグリカン、II 型コラーゲンの発現量は、いずれも AC/ACSC 群で増加した発現量は、AC+SC 群では SC 群と比較して有意に増加していた (図 7A, B, C)。

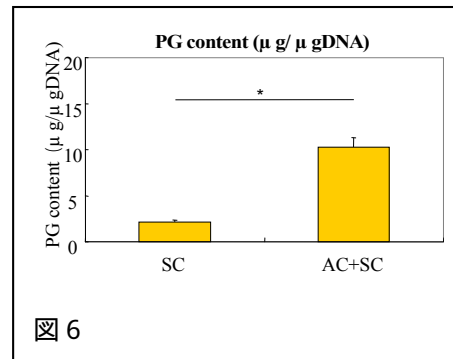


図 6

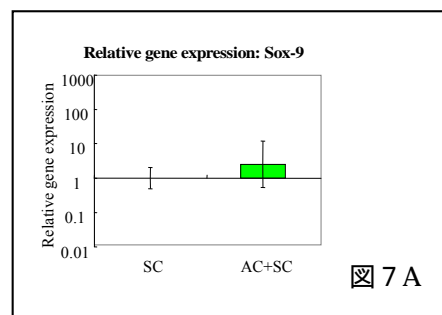


図 7A

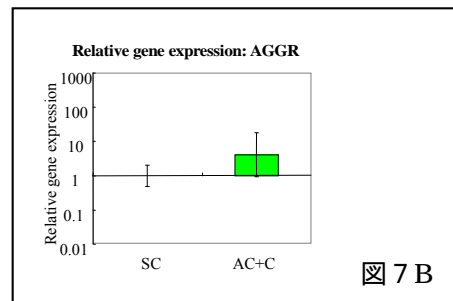


図 7B

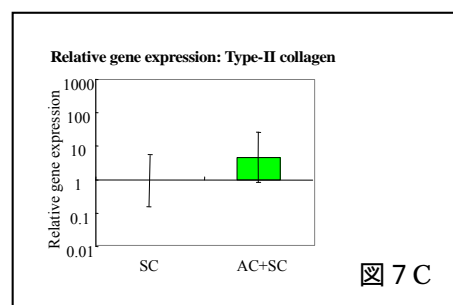


図 7C

(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⁴⁾、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⁵⁾。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⁶⁾。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^{4) 7)}。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、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 β) や bone morphogenetic protein (BMP) などの分化因子が必要である⁷⁾ が、軟骨細胞との共培養によっても、間葉系幹細胞の軟骨分化が促進されることが報告されている⁸⁾。また、我々はウサギの系を用いて、細切軟骨片との共存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³⁾。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。本研究では、ヒト細胞を用いた場合でも、同様の結果が得られることが明らかとなった。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、新しい一期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る。

(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) Louay Fallouh, 中川晃一, 佐粧孝久,

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.

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 8件)

1. Nakajima A, Nakagawa K, Aoki Y, Sonobe M, Shibata Y, Yamazaki M, Murakami M.: Changes in synovial fluid biochemical markers following arthroscopic surgery in patients with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* Jan; 33(1):209-214, 2013.

(査読有)

2. Aoki Y, Yamagata M, Ikeda Y, Nakajima F, Nakajima A, Nakagawa K, Ohtori S, Inaoka T, Takahashi K.: Failure of conservative treatment for thoracic spine fracture in ankylosing spondylitis: delayed neurological deficit due to spinal epidural hematoma. *Mod Rheumatol.* Sep; 23(5):1008-1012, 2013. (査読有)

3. Kudo H, Inaoka T, Kitamura N, Nakatsuka T, Kasuya S, Kasai R, Tozawa M, Nakagawa K, Terada H.: Clinical value of routine use of thin-section 3D MRI using 3D FSE sequences with a variable flip angle technique for internal derangements of the knee joint at 3T. *Magn Reson Imaging.* Oct; 31(8):1309-1317, 2013. (査読有)

4. 園部正人, 中川晃一, 谷口慎治, 青木保親, 中島 新, 寺島史明, 齊藤雅彦, 高橋 宏,

山田 学、北原聡太、池川直志. 近位および遠位リアライメントを同時に施行した膝蓋骨脱臼症例の経験. 千葉スポーツ医学研究会雑誌 10:13-17, 2013. (査読有)

5. 園部正人、中島 新、窪田綾子、中川晃二、勝呂 徹. 関節リウマチ患者の荷重関節に対するエタネルセプトの関節破壊抑制効果. 関節の外科 40:82-86, 2013. (査読有)

6. Aoki Y, Nakagawa K, Nakajima A, Shibata Y, Sonobe M, Ohtori S, Furufu T, Takahashi K. : The use of three visual analogue scales to evaluate back pain of patients motion, standing and sitting. J Spine Res 3: 863-866, 2012. (査読有)

7. Saito M, Sasho T, Yamaguchi S, Ikegawa N, Akagi R, Muramatsu Y, Mukoyama S, Ochiai N, Nakamura J, Nakagawa K, Nakajima A, Takahashi K. : Angiogenic activity of subchondral bone during the progression of osteoarthritis in a rabbit anterior cruciate ligament transection model. Osteoarthritis Cartilage: Dec;20(12): 1574-1582, 2012. (査読有)

8. Tsuruoka H, Sasho T, Yamaguchi S, Ikegawa N, Saito M, Akagi R, Ochiai N, Nakagawa K, Nakajima A, Fallouh L, Takahashi K : Maturation-dependent spontaneous healing of partial thickness cartilage defects in infantile rats. Cell Tissue Res 346(2): 261-271, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 中川晃二、富田直秀、玉田靖、中島新、柴田孝史、園部正人、北原聡太、青木保親、高橋宏、齋藤雅彦、谷口慎治、山田学、平方栄一、青木秀之、齋藤知行: 広範囲関節軟骨欠損に対する骨髄刺激とフィブロイン被覆の併用療法の効果. 第 41 回日本関節病学会 (パネルディスカッション; OA の病態を考慮した治療の基礎と臨床), 名古屋, 2013.11.2-3

2. 中川晃二、富田直秀、玉田 靖、柴田孝史、園部正人、中島 新、青木保親、平方栄一、青木秀之、齋藤知行. イヌ広範囲関節軟骨欠損の修復過程におけるフィブロイン被覆法の初期効果. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 2013.10.17-18

3. 中島 新、青木保親、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齋藤雅彦、谷口慎治、山田学、後藤 憲一郎、田原正道、山中 一、玉井 浩、小林達也、中川晃二. 関節リウマチ患者における血中酸化ストレスの臨床的意義と滑膜線維芽細胞における活性酸素種 (ROS) 産生. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 2013.10.17-18

4. 中島 新、青木保親、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齋藤雅彦、谷口慎治、山田学、後藤 憲一郎、田原正道、山中 一、玉井 浩、小林達也、中川晃二. 関節リウマチ

滑膜組織における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現と関節破壊制御のメカニズム. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 2013.10.17-18

5. 中島 新、園部 正人、谷口 慎治、中川晃二. (主題; 生物学的製剤使用下でのリウマチ手術) 生物学的製剤使用・非使用下における術後創傷遅延、感染症発生の検討. 第 42 回リウマチの外科研究会, 名古屋, 2013.8.31

6. Aoki Y, Nakagawa K, Nakajima A, Shibata Y, Sonobe M, Takahashi H, Taniguchi S, Yamada M. Should the presence of back pain be considered when making surgical decisions for lumbar spinal fusion? International Society for Minimally Intervention in Spinal Surgery Japan, Sapporo, Japan, 2013.6.20-21

7. 中川晃二、富田直秀、玉田 靖、平方栄一、青木秀之、園部正人、柴田孝史、中島新、齋藤知行: (シンポジウム; 軟骨再生医療の最前線) フィブロインの cell delivery 機能を利用した関節軟骨再生法の開発. 第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS), 札幌, 2013.6.20-22

8. 山下剛司、渡辺淳也、本田英義、佐粧孝久、中川晃二、豊根知明、和田佑一: (シンポジウム; 基礎研究をもとにした軟骨修復および再生への新たな工夫) 関節軟骨修復術と MRI による組織評価. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012.10.26-27

9. 青木保親、中川晃二、中島新、大鳥精司、高橋和久: Discogenic Pain の基礎 (Modic を含む). 第 38 回日本整形外科学会スポーツ医学学術集会 (パネルディスカッション), 横浜, 2012.9.14

10. Aoki Y, Nakagawa K, Nakajima A, Shibata Y, Sonobe M, Ohtori S, Takahashi K. Improvement of back pain following lumbar decompression surgery: Evaluation by visual analogue scale for patients in motion, standing and sitting. 39th International Society for the study of the Lumbar Spine (ISSLS), Amsterdam, Netherland, 5/28-6/1/2012.

11. Fallouh L, Moriya H, Takahashi K, Nakagawa K, Sasho T, Kitahara S, Moriya T, Ikegawa N, Saito M, Akagi R, Wada Y. Co-implantation with minced articular cartilage enhances chondrogenic differentiation of synovial cells. The 8th Biennial Congress of International Society of Arthroscopy, Knee Surgery & Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS). Rio De Janeiro, Brazil. 5/15-19/2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔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 1 件）

名称：滑膜細胞および細切軟骨辺の軟骨修復
における使用
発明者：中川晃一
権利者：国立大学法人 千葉大学
種類：特許
番号：特許第 5373427 号
取得年月日：平成 25 年 9 月 27 日
国内外の別： 国内

〔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)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：30400823

(2) 研究分担者

青木 保親 (AOKI, Yasuchika)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：70584001

中島 新 (NAKAJIMA, Arata)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：60583995

(3) 連携研究者

佐粧 孝久 (SASHO, Takahisa)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：20312952