

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462324

研究課題名(和文)サル膝半月板損傷に対する修復術後の滑膜間葉系幹細胞移植

研究課題名(英文) Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates

研究代表者

渡邊 敏文 (Watanabe, Toshifumi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：60634053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自家滑膜幹細胞の集合体の移植で、高齢サルの半月板再生が促進されるかどうか調べた。両膝の内側半月板の前方1/2を切除した後に、滑膜幹細胞で作った集合体を、半月板欠損部に移植。対側の膝は、集合体を移植しないControl側とした。半月板と関節軟骨は、移植後8週(n=3)と、16週(n=4)で、肉眼、組織学分析。MSC群は、Control群に比べて、内側半月板は大きく、再生半月板の組織学的スコアは良好。大腿骨内顆部の軟骨のMankinスコアは、MSC群が、Control群に比べて良好。自家滑膜幹細胞の集合体の移植は、高齢サルの半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether transplantation of aggregates of autologous synovial MSCs promoted meniscal regeneration in aged primates. After the anterior halves of the medial menisci in both knees were removed, an average of 14 aggregates consisting of 250,000 synovial MSCs were transplanted onto the meniscus defect. No aggregates were transplanted to the opposite knee for the control. Meniscus and articular cartilage were analyzed macroscopically and histologically at 8 (n=3) and 16 weeks (n=4). The medial meniscus was larger and the histological score for the regenerated meniscus was better in the MSC group than in the control group in each primate at 8 and 16 weeks. Mankin's score for the medial femoral condyle cartilage was better in the MSC group than in the control group in all primates at 16 weeks. Transplantation of aggregates of autologous synovial MSCs promoted meniscus regeneration and delayed progression of degeneration of articular cartilage in aged primates.

研究分野：軟骨再生

キーワード：mesenchymal stem cells synovium meniscus regeneration primate

1. 研究開始当初の背景

(1) 半月板は、膝の関節軟骨にかかる衝撃を和らげる。半月板損傷の場合、関節軟骨の変性進行を抑制するために、半月板をできるだけ温存することが望ましい。半月板切除や半月板変性に対して、半月板移植や人工半月板が試されているが、結果は未だ議論の余地がある。今後、新しい半月板再生の治療が望まれる。

(2) 滑膜組織は、半月板治癒の中心的役割を担い、高い軟骨分化を持つ幹細胞を含んでいる。我々は、以前に、滑膜由来間葉系幹細胞(滑膜MSC)の関節内注射が、ラットやウサギの半月板切除後に半月板再生を促進することを報告している。また、滑膜MSCの集合体の移植でも、ラットの半月板再生を促進したことを示し、さらに、ブタのモデルでも、滑膜MSCを10分間静置することで、半月板切除や、半月板修復において、半月板再生や治癒を促進したことを報告している。

2. 研究の目的

半月板の解剖と生物学的特徴は動物種で異なる。基礎研究で得た知見を臨床応用するために、より遺伝的にヒトに近い動物を使うことが重要である。本研究では、我々は、滑膜MSCの移植が高齢サルの半月板を再生するかどうか調べた。これは、サルの半月板修復・再生を示した最初の報告である。

3. 研究の方法

それぞれのカニクイザルの両膝の滑膜を採取し、酵素処理後に有核細胞を培養した。 2.5×10^5 の滑膜MSCを35 μ lの培養液に懸濁し、hanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。カニクイザルの両膝の内側半月板前方2分の1を切除した。片膝のみに自家滑膜MSCの集合体を7~20個(平均14個)移植した。対側の膝は、細胞を移植

しないControl群とした。移植8週(n=3)、16週(n=4)後に、肉眼、組織学的に再生半月板、関節軟骨を左右の膝で比較した。また、16週後には、MRIのT1rho mapping像を用いて、左右の膝を比較した。

4. 研究成果

(1) 60cm²の培養皿に500個の滑膜由来の有核細胞を14日間培養した後にコロニー形成を認めた。コロニー形成細胞は、Oil-Red Oで染まる脂肪細胞や、alizarin redで染まるミネラル化した組織に分化した。コロニー形成した細胞のペレットは、トルイジンブルーに染まる軟骨組織に分化した。各サルの滑膜MSC数は、Passage0で、7匹中6匹で 1.0×10^6 個になった。Passage1まで継代培養し、細胞数は、Passage1で、 $2.0 \times 10^6 \sim 25.5 \times 10^6$ (平均 7.8×10^6)個になった。細胞数は、Passage0からPassage1で、 4.2 ± 2.5 (平均 \pm 標準偏差)倍増加した。

(2) サルの滑膜MSCは、hanging drop培養3日後に、 2.5×10^5 個の細胞で作られた集合体は、約1mm程度になった。集合体は、移植の際に、簡単に壊れることはなかった。

(3) 半月板切除後、集合体は、重力と表面張力によって、半月板欠損部に静置した。肉眼的に、半月板を切除した部分に、MSC群も、Control群も再生半月板を認めた。内側半月板は、8週の3匹すべてにおいて、MSC群は、Control群に比べて大きかった。16週の4匹すべてにおいても、MSC群は、Control群に比べて大きかった。組織学的に、再生半月板は、8週において、MSC群では、Safranin-Oの染色性をわずかに認めたが、Control群では、ほとんど認めず、辺縁が不整であった。16週においては、MSC群では、Safranin-Oの染色性を認めたが、一方、Control群では、依然として、ほとんど認め

なかった。modified Pauli 法による再生半月板の組織学的スコアは、8週 of 3匹、16週 of 4匹すべてで、MSC群で、Control群に比べて良好であった。16週 of 再生半月板のT1rho値は、4匹すべてで、MSC群が、Control群に比べて、正常半月板の値に近かった。

(4) 関節軟骨においては、組織学的に、16週 of 4匹すべてで、両群ともに変性を認めた。Mankin スコアによる組織学的評価では、16週 of 4匹すべてで、MSC群が、Control群に比べて良好であった。T1rho値は、4匹すべてで、MSC群が、Control群に比べて、正常軟骨の値に近かった。

(5) 本研究では、カニクイザルの滑膜から由来したコロニー形成細胞は多分化能という幹細胞の性質を示した。サルにおいて、滑膜MSCの移植は、半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。これは、サルの半月板再生に対する滑膜MSC移植の有効性を示した最初の報告である。

(6) 我々は、過去に、ラット、ラビット、ミニブタで、内側半月板前方1/2切除後に、滑膜MSCの移植が、半月板再生を促進することを報告している。半月板再生する期間は動物種によって異なる。サルは、遺伝的に、他の動物よりヒトに近いため、サルを用いた半月板再生の研究は価値がある。

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)

近藤 伸平、宗田 大、渡邊 敏文、早乙女 進一、大川 淳、関矢 一郎、
Transplantation of autologous synovial

mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates、
Journal of Orthopaedic research、査読有、
2016 Feb 24.

DOI: 10.1002/jor.23211.

[学会発表](計 4 件)

近藤 伸平、サル半月板広範囲切除モデルで滑膜間葉系幹細胞集合体の移植は半月板再生を促進する、第27回軟骨代謝学会、2014年3月1日、京都府医師会館(京都府京都市)

近藤 伸平、サルの滑膜間葉系幹細胞集合体移植による半月板再生、第33回日本運動器移植・再生医学研究会、2014年9月27日、第一ホテル両国(東京都台東区)

近藤 伸平、間葉系滑膜幹細胞の集合体の移植はサル半月板前方1/2切除モデルで半月板再生を促進する、第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月10日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

近藤 伸平、Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates、第62回米国整形外科学会基礎学会、2016年3月8日、フロリダ(米国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 敏文(WATANABE Toshifumi)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座講師
研究者番号: 60634053

(2)研究分担者

宗田 大(MUNETTA Takeshi)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 50190864

関矢 一郎 (SEKIYA Ichiro)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター

・教授

研究者番号：10345291

大川 淳 (OKAWA Atushi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科

・教授

研究者番号：30251507

早乙女 進一 (SOTOME Shinichi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科

・寄附講座教員

研究者番号：20401391

(3)研究協力者

近藤 伸平 (KONDO Shimpei)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・

大学院生