

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861173

研究課題名(和文) 大動物における滑膜幹細胞集合体移植による関節軟骨再生

研究課題名(英文) Articular cartilage regeneration by transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells in large animals

研究代表者

中村 智祐 (Nakamura, Tomomasa)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90725201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜幹細胞は関節軟骨再生の有用な細胞源になりうる。新たな移植方法として滑膜幹細胞集合体移植の有用性をヒトに近い大動物であるマイクロミニピッグで検討した。マイクロミニピッグ由来の滑膜幹細胞は良好なコロニー形成能、増殖能、多分化能を有した。作成した集合体は直径1mm程度で、鑷子で容易に骨軟骨欠損部に移植可能であった。移植後12週において、肉眼、組織スコアともに移植群が対照群よりも良好な軟骨再生が得られた。またMRIを用いて再生軟骨の質が対照群よりも移植群でより正常軟骨に近いことを確認した。

この成果により、従来法より効率の良い滑膜幹細胞移植が可能で、成績向上に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Synovial mesenchymal stem cells can be a useful cell source for articular cartilage regeneration. In this study, we analyzed the usefulness of synovial mesenchymal stem cell aggregates transplantation with microminipig. Synovial mesenchymal stem cells derived from microminipigs had good colony forming ability, proliferative capacity and pluripotency. The aggregates were easy to handle, and it was easily transplanted in osteochondral defects. At 12 weeks after transplantation, cartilage regeneration in the transplanted group was better in both the macroscopic and histological scores than in the control group. In addition, it was confirmed by MRI analyses that the quality of regenerated cartilage in the transplanted group was closer to normal cartilage than in the control group. According to this result, it is possible to transplant synovial mesenchymal stem cells more efficiently than conventional methods, which may contribute to improving clinical results.

研究分野：整形外科

キーワード：滑膜幹細胞 集合体 関節軟骨再生

### 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、時にひっかか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。最近の大規模疫学調査によると、日本国内に変形性膝関節症患者は 2500 万人いると推定されている。2010 年度国民生活調査によると、変形性関節症は要介護の 7%、要支援の 19%の原因となっており、高齢者の QOL を維持する上で、変形性関節症の予防が日本の重要な課題となっている。

現時点で軟骨欠損に対する外科的治療は大きく 3 つある。第 1 はマイクロフラクチャーに代表される、軟骨下骨を出血させ、軟骨前駆細胞の動員を期待し、軟骨基質を産生させるものである。しかし、本法では動員される軟骨前駆細胞の数が少ないことから、硝子軟骨での修復はあまり期待できず、多くの場合は線維軟骨の修復であり、長期的には軟骨が変性する。第 2 は、骨軟骨柱移植術である。硝子軟骨で軟骨欠損部を修復できる点で優れているが、正常軟骨を犠牲にする点が問題となりうる。第 3 は、自家軟骨培養移植術である。骨軟骨移植術よりも採取する正常軟骨の量が少なくすむが、体外で作成した軟骨組織を移植するのに骨膜固定を要する。今後の再生医療を目指すには、マイクロフラクチャー法と同程度の手術侵襲で、より有効な治療が望ましい。

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。

これらの結果を踏まえ、私たちは膝軟骨損傷に対して臨床研究を開始した。滑膜を採取して、酵素処理後、自己血清を用いて 14 日間、細胞治療センターで培養すると 5000 万の滑膜幹細胞を確保でき、これを乳酸リンゲル液中に浮遊させる。関節鏡視下に軟骨損傷部を真上に向け、還流液を関節内から排出し、細胞浮遊液を軟骨欠損部に 10 分間静置する。

すでに 10 人以上の患者さんに本法を行い、臨床症状、MRI、再鏡視で良好な結果が得られている。この方法は、マイクロフラクチャー法と同等の手術侵襲で、よりよい結果が期待され、人工素材を使用しない点でも安全性

が高いといえる。しかしながら、本法の移植方法は、軟骨欠損部を重力と垂直に置き、そこに細胞浮遊液を滴下するという簡単な方法であるが、しばしば細胞浮遊液が周囲に流れたり、周囲の滑膜を伝って拡散してしまうことがある。

この点を改善するために、hanging drop 法 (右図) を用いて滑膜幹細胞を培養し、得られた滑膜幹細胞集合体の解析及びウサギの膝関節軟骨欠損部への移植実験を行った。集合体は直径 1mm 程度の大きさがあり視認性、操作性に優れ、単層培養した滑膜幹細胞よりも軟骨に近い遺伝子発現があり、浮遊液による細胞滴下と同等の細胞接着が得られ、優れた軟骨再生能を持つことを報告した (Suzuki et al. Arthritis Res Ther. 2012)。

### 2. 研究の目的

臨床応用へ進むにあたって、よりヒトに近い大動物での検証は必須である。単層培養した滑膜幹細胞の軟骨欠損部への移植についてはブタを用いて検討し、良好な結果を得ている (Nakamura et al. Cytotherapy 2012)。本研究では、hanging drop 法を用いて滑膜幹細胞集合体を作製、ブタの膝関節軟骨欠損部に移植し、大動物における本法の有効性を比較検討する。

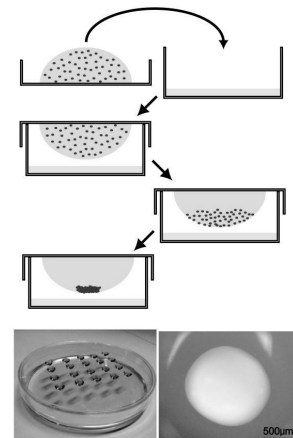
### 3. 研究の方法

#### (1)ブタ滑膜幹細胞集合体の特性 (invitro)

マイクロミニピッグの膝関節滑膜組織を検体材料とする。滑膜組織をコラゲナーゼ処理し、コラゲナーゼ処理 (3 時間、37 ) し、遠心分離を行い、得られた有核細胞を、培養用ディッシュに播種して 2 週間培養する。その後トリプシン処理して接着細胞のみを回収し、以下の 2 群に分ける；

単層培養群：培養用ディッシュに播種し単層培養する。2 週間培養後に、細胞を回収する。

Hanging drop 群：培養用ディッシュの蓋の裏に、35  $\mu$ l の細胞浮遊液 (細胞数  $2.5 \times 10^5$  個) を滴下し、蓋をひっくり返して PBS を入れたディッシュにかぶせる。3 日間培養し、細胞 (集合



- 体)を回収する。  
 両群に対し、以下の解析を行う。
- コロニー形成能:遠心分離で得られた有核細胞を、培養用ディッシュに同密度で1週間培養する。1週間後にクリスタルバイオレット染色を行い、コロニー数をカウントする。
  - 多分化能:invitro で軟骨分化・骨分化・脂肪分化誘導を行い、各条件下での多分化能の比較を行う。

以上の解析により、ブタにおける滑膜幹細胞集合体の特性について考察する。  
 上記の解析で得られた結果をもとに、in vivoでの軟骨分化能について検討を行う(2)。

**(2)ブタ骨軟骨欠損モデルに対する滑膜幹細胞集合体移植効果の検討 (in vivo)**

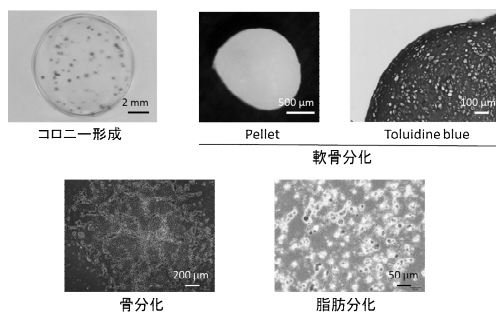
Hanging drop 法を用いた滑膜幹細胞移植が、大動物においてもより優れているか検討を行う。ここではマイクロミニピッグ骨軟骨欠損モデルを用いる。マイクロミニピッグの膝関節滑膜組織から滑膜幹細胞を分離培養して、骨軟骨欠損部へ移植して、軟骨再生能を組織学的に解析する。

マイクロミニピッグの滑膜を採取し、コラゲナーゼ処理後、有核細胞を14日間培養し、滑膜幹細胞を用意する。マイクロミニピッグの大腿骨顆間に4x4mm、深さ1.5mmの自然修復不能な骨軟骨欠損を作成する。

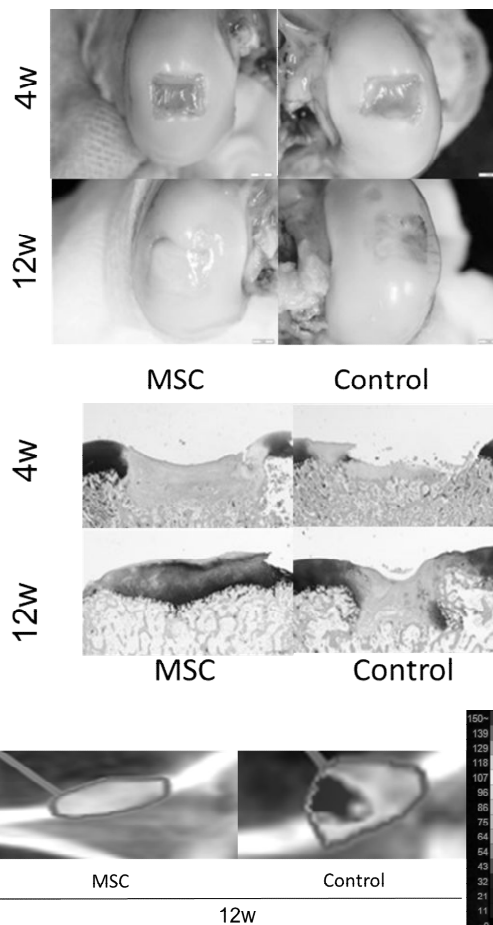
骨軟骨欠損部を真上に向けて、細胞移植を行う。得られた集合体を丁寧に骨軟骨欠損部に移植する。移植する集合体の個数を、0,4,8,16個に分けて検討する。4,8,12,24週後に肉眼的、組織学的に、骨軟骨欠損部を評価する。

4. 研究成果

マイクロミニピッグ由来の滑膜幹細胞は良好なコロニー形成能、増殖能、多分化能を有した。



作成した集合体は直径1mm程度で、鑷子で容易に骨軟骨欠損部に移植可能であった。移植後12週の大腿骨内顆において、肉眼、組織スコアとともに移植群(肉眼スコア $6.7 \pm 1.6$ 、組織スコア $9.8 \pm 2.5$ )が、対照群(それぞれ $5.3 \pm 1.7$ 、 $8.0 \pm 3.1$ )よりも良好な軟骨再生が得られた( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )。またT1rho mappingでは、移植群( $71.6 \pm 5.5$ ms)が、対照群( $85.5 \pm 11.3$ ms)よりも正常軟骨の値に近かった。またMRIを用いて移植1週間後に移植細胞が骨軟骨欠損部に残存することを確認した。



滑膜幹細胞集合体は、移植操作が容易で効率的に骨軟骨欠損部に接着させることが可能であり、対照群より良好な軟骨再生が得られることを確認できた。

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 3 件)

1. Kondo S, Muneta T, Nakagawa Y, Koga H, Watanabe T, Tsuji K, Sotome S, Okawa A, Kikuchi S, Ono H, Mizuno M, Sekiya J. Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates. J Orthop Res., 査読有、Vol 35, No. 6, 2017, 1274-1282. doi: 10.1002/jor.23211.
2. 関矢一郎. 再生医学による関節軟骨疾患治療の展望. BIO Clinica. 査読無、31巻、2016、1150-1154
3. 堀江雅史、関矢一郎. 関節軟骨損傷に対する滑膜幹細胞を用いた軟骨再生医療. カレントセラピー. 査読無、34巻、2016、997-1002

[学会発表](計 2 件)

1. 関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、小田邊浩二、中村智祐、中川裕介、大関信武、

片野尚子、水野満、大川淳、宗田大、滑膜幹細胞による軟骨・半月板を対象とした再生医療。第 89 回日本整形外科学会学術総会。2016 年 5 月 14 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

2. 近藤伸平、宗田大、中川裕介、中村智祐、辻邦和、関矢一郎。自家滑膜幹細胞集合体移植は軟骨再生を促進する - ピッグにおける検討 - 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会。2015 年 10 月 22 日 富山国際会議場（富山県富山市）

〔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 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

中村 智祐 (NAKAMURA, Tomomasa)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90725201

### (2) 研究分担者

宗田 大 (MUNETTA, 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

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )