

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893066

研究課題名(和文) 軟骨・半月板再生医療の基盤開発を目指した滑膜間葉系幹細胞の局在解析

研究課題名(英文) Localization analysis of synovial mesenchymal stem cells aimed for the technological development of cartilage and meniscus regenerative medicine

研究代表者

水野 満 (Mizuno, Mitsuru)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・特任研究員

研究者番号：00733908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢化社会を迎えた我が国で変形性膝関節症に伴う半月板損傷や軟骨変性に対し優れた再生医療技術を開発することは、約850万人と推定される莫大な規模の患者に待望されている。そこで、本研究では滑膜に存在する間葉系幹細胞の局在部位の同定、ならびに純化した細胞の機能解析を行うことによって、特性に基づいた基盤技術の開発を試みた。

滑膜幹細胞の同定を行い、日本再生医療学会で報告した。さらに、細胞の機能解析により、不安定だが安全性の高いヒト血清を安定的に臨床現場で使用するための幹細胞培養法を開発した。その研究成果を査読有り英文雑誌であるStem cell research and therapy誌に公開した。

研究成果の概要(英文)：In Japan, which has become a super-aged society, to develop a superior regenerative medical technology for meniscal damage and cartilage degeneration associated with knee osteoarthritis is awaited by huge number of the patients estimated to be about 8.5 million. In this research, we tried to develop basic technologies based on the characteristics by performing identification to the localization of synovial mesenchymal stem cells and functional analysis of purified cells. We have suggested the localization of the synovial stem cells and presented the results at the 15th The Japanese Society for Regenerative Medicine. In addition, we have been developed stem cell culture methods for clinical cell transplantation study using human serum, which was instability and high safety material, by the functional analysis of purified cells. Then, we have published its research achievements in "Stem cell research and therapy" that was peer reviewed in English.

研究分野：整形外科学、再生医療

キーワード：再生医療 滑膜幹細胞 変形性膝関節症 滑膜組織 半月板 関節軟骨 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症に伴う半月板損傷や軟骨変性に対し優れた再生医療技術を開発することは、国内だけでも疼痛等の症状を有する約 850 万人、放射線学的に診断され得る約 2400 万人と推定されている莫大な規模の患者に待ち望まれている。さらに、要介護の原因の 10%が変形性関節症であり、超高齢化社会を迎えた我が国において健康寿命を延伸させるため、運動器疾患に対する革新的な治療法開発が急務となっている。

研究代表者らは、これら運動器疾患に対する新規治療法の開発を目指し、再生医療技術をベースとした基礎研究および臨床研究に取り組んできた。実際に、関節軟骨の欠損を伴った症例に対し、低侵襲に採取可能な滑膜から高い軟骨分化能を有する間葉系幹細胞を分離・培養し、移植を行うなどの軟骨再生に関する臨床研究を精力的に行っている。

さらに、研究代表者らは半月板再生における新規治療法の開発にも取り組み、基礎的検討として、ウサギ・ブタ半月板欠損モデルに対し、滑膜間葉系幹細胞を投与することで、再生半月板の形成を促進する技術を開発してきた(T. Muneta, I. Sekiya, et al, J. Orthop Res, 2013)。これまでの基礎研究や軟骨再生の臨床研究の成果に基づき、研究代表者らは、再断裂リスクの高い半月板損傷などの症例に対し、縫合術に加え、滑膜幹細胞を投与することにより、半月板縫合術の成績向上を期待する臨床研究を開始するに至った。

しかし、滑膜に存在する間葉系幹細胞の局在や単離後の細胞解析が不十分であったことから、低い増殖能および低い軟骨分化能を有する細胞の混入がより質の高い再生医療技術を提供する上で妨げとなっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで取り組ん

できた幹細胞生物学に関わる解析技術を基盤として、滑膜に存在する間葉系幹細胞に焦点をあて、滑膜に存在する間葉系幹細胞の局在部位の同定、ならびに純化した細胞の機能解析を行うことによって、その特性に基づいた革新的な再生医療の技術基盤を開発することである。

## 3. 研究の方法

同意を得た全人工膝関節置換術に適応する変形性膝関節症患者由来の滑膜組織を用いた。患者数 8 名 (70-82 歳)から提供を受けた。透過型電子顕微鏡による超微細形態学解析、免疫組織学的解析後の Image J による陽性領域の半定量化、FACS による分離培養後の細胞特性解析を CFU assay, Chondrogenic assay, Adipogenic assay, osteogenic assay により評価した。

## 4. 研究成果

### ・研究成果の概要：

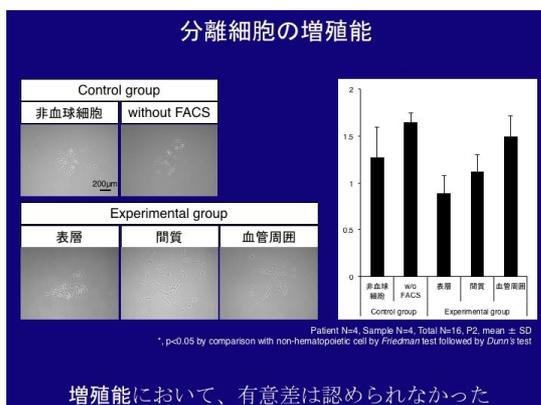
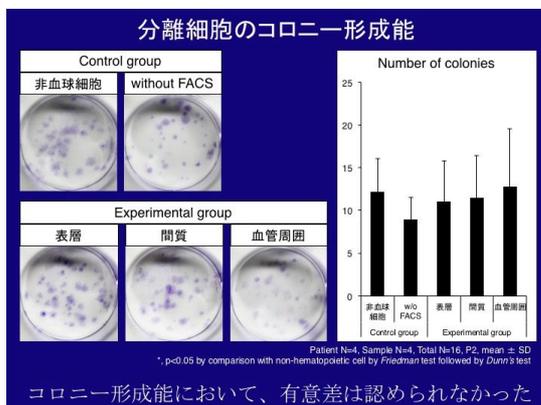
超高齢化社会を迎えた日本において変形性膝関節症に伴う半月板損傷や軟骨変性に対し優れた再生医療技術を開発することは、約 850 万人と推定される莫大な規模の患者に待望されている。そこで、本研究では滑膜に存在する間葉系幹細胞の局在部位の同定、ならびに純化した細胞の機能解析を行うことによって、特性に基づいた基盤技術の開発を試みた。

滑膜幹細胞の同定を行い、日本再生医療学会で報告した。さらに、細胞の機能解析により、不安定だが安全性の高いヒト血清を安定的に臨床現場で使用するための幹細胞培養法を開発した。その研究成果を査読有り英文雑誌である Stem cell research and therapy 誌に公開した。

### ・研究成果：

変形性膝関節症の診断で人工膝関節手術を施行後、廃棄される 8 人分の滑膜組織を解析した。細胞膜抗原と細胞外基質に関連

する 20 種の抗体で免疫染色後、各領域に特異的な発現を解析した。酵素処理した滑膜細胞を各マーカーにより分取した後に増殖させ、増殖・軟骨分化能を解析した。免疫染色による解析で、滑膜表層領域、間質、血管周囲に分類された。FACS による分取では、間質の分画が 90%以上を占めており、最も多く採取できた。軟骨形成能においては、滑膜表層領域由来の滑膜幹細胞が最も小さく  $1.36 \pm 0.26\text{mm}$ 、 $\text{CD90}^+ \text{CD271}^+$ 分画由来が最も大きな軟骨  $2.04 \pm 0.54\text{mm}$  を形成した( $n=8$ ,  $p < 0.05$ )。免疫組織学解析から特有のマーカーが明らかになった。滑膜幹細胞は滑膜間質由来のものが最も多く、血管周囲のものが最も軟骨分化能が高かった。



## 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、全て査読有)

Nakagawa Y., Muneta T., Otabe

K., Ozeki N., **Mizuno M.**, Udo M., Saito R., Yanagisawa K., Ichinose S., Koga H., Tsuji K., and Sekiya I. Cartilage derived from bone marrow mesenchymal stem cells expresses lubricin in vitro and in vivo. PLoS ONE. 2016. 11 巻 2 号, e0148777

Ozeki N., Sekiya I., Muneta T., Koga H., Nakagawa Y., **Mizuno M.**, Tsuji K., Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Futamura K, Matsumoto K., and Saito T. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. Osteoarthritis and Cartilage. 2016. in press

Kondo S., Muneta T., Nakagawa Y., Koga H., Watanabe T., Tsuji K., Sotome S., Okawa A., Kiuchi S., Ono H., **Mizuno M.**, and Sekiya I. Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates. Journal of Orthopaedic Research, 2016. in press

**Mizuno M.**, Katano H., Otabe K., Komori K., Matsumoto Y., Fujii S., Ozeki N., Tsuji K., Koga H., Muneta T., Matsuyama A., and Sekiya I., 2015. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative

capacity of human synovial mesenchymal stem cells., Stem Cell Research & Therapy. 6 卷 1 号, 1-11

Nakagawa Y., Muneta T., Kondo S., **Mizuno M.**, Takakuda K., Ichinose S, Tabuchi T, Koga H, Tsuji K., and Sekiya I., 2015. Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal repair in microminipigs., Osteoarthritis and Cartilage, 23 卷 6 号, 1007-1017

Ozeki N, Muneta T, Matsuta S, Koga H, Nakagawa Y, **Mizuno M.**, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Saito T and Sekiya I. Synovial Mesenchymal Stem Cells Promote Meniscus Regeneration Augmented by an Autologous Achilles Tendon Graft in a Rat Partial Meniscus Defect Model: Meniscus Regeneration by Tendon with Synovial MSC., Stem Cells. 2015. 33 卷 6 号, 1927-1938

〔学会発表〕(計 10 件中、4 件を表記)

**水野 満**、片野 尚子、馬淵 洋、緒方 勇亮、小田邊 浩二、小森 啓一郎、大関 信武、辻 邦和、宗田 大、関矢 一郎。滑膜組織表層、間質、血管周囲から分離した間葉系幹細胞の特性，第 15 回日本再生医療学会。2016 年 3 月 17-19 日，大阪（大阪）

**Mizuno M.**, Katano H., Otabe K., Komori K., Matsumoto Y., Ozeki N., Tsuji K., Muneta T., and Sekiya I., PDGF-AA/AB in

human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells., Mar. 5-8, 2016, Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, Orlando, Florida, USA.

**Mizuno M.**, Katano H., Mabuchi Y., Ogata Y., Ichinose S., Otabe K., Komori K., Matsumoto Y., Ozeki N., Tsuji K., Akazawa C., Muneta T., and Sekiya I., Properties of MSCs derived from surface, stroma, and perivascular synovium of OA patients., Mar. 5-8, 2016, Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, Orlando, Florida, USA.

**水野 満**、小森 啓一郎、片野 尚子、小田邊 浩二、辻 邦和、宗田 大、関矢 一郎。滑膜幹細胞増殖を予測する自己血清評価法の開発，第 14 回日本再生医療学会。2015 年 3 月 19-21 日，横浜（神奈川）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 満 (Mitsuru Mizuno)  
東京医科歯科大学 再生医療研究センター 特任研究員  
研究者番号：00733908

### (2) 研究分担者

なし