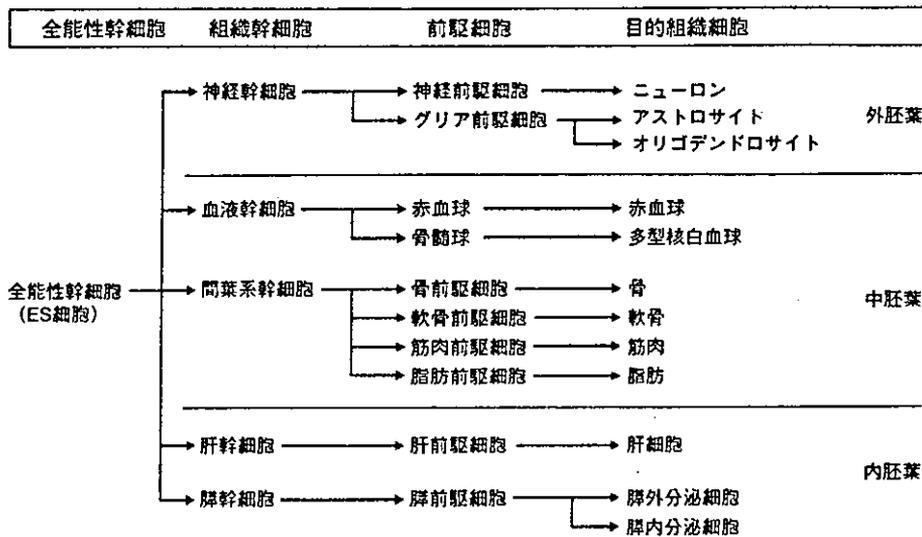


図1 幹細胞の分化



て神経・肝臓などの外胚葉・内胚葉の組織にも分化する可塑性を有することが示された^{2), 3)}。このような骨髄間葉系細胞の分化能・増殖能を利用した組織再生の研究が進められており、骨や軟骨以外にも、脊髄⁴⁾、心筋⁵⁾、冠動脈⁶⁾などの再生への基礎研究が行われている。

この細胞を骨髄間葉系幹細胞とよぶことがあるが、成人の骨髄間葉系細胞では増殖能に限界があること、およびこの細胞集団はさまざまな細胞の混在した状態であるために、この細胞分画すべてを間葉系幹細胞とよぶのは不正確であることなどを考え、ここでは骨髄間葉系細胞とよぶ。

骨髄間葉系細胞のマーカーとしてさまざまな抗体が報告されたが、いまだに特異的なものは存在しない。当初、特異的抗体として報告されたSH2はtransforming growth factor (TGF)- β レセプター-3 (endogrin)を認識するCD105と同等のものであり、SH3はvascular cell adhesion molecule-1を認識するCD106と同等のものであった⁷⁾。したがって現在のところ、いくつかの抗体を組み合わせで評価しているが(たとえば、CD44<ヒアルロン酸レセプター>+, CD34<血液幹細胞マーカー>-、CD105+, CD106+)、それでも確実に間葉系細胞を認識することは不

可能である。

骨髄間葉系細胞中の骨軟骨前駆細胞は分化度が低く、増殖能力が高いと考えられており、骨髄間葉系細胞を増殖させると前駆細胞の占める割合が増加することが報告されている。われわれは、自己骨髄間葉系細胞を増殖させ、なんら選別することなくそのまま骨軟骨欠損部に移植し、軟骨欠損の修復が促進されることを、動物実験および臨床応用で確認した。

家兔の関節軟骨欠損修復⁸⁾

家兔の脛骨近位部より骨髄血を採取し、接着細胞を培養、増殖させ、コラーゲンゲルに包埋して、同じ家兔の膝関節大腿骨内顆荷重部に作製した6×3×3mmの骨軟骨欠損部に充填した。移植後2週間で修復組織は骨軟骨欠損部全域がトルイジンブルーに異染性を示す硝子軟骨様組織となった。その後、骨髄側から血管の侵入が生じて骨に置換され、移植後24週後には軟骨下骨は完全に修復された。移植部の関節腔に面した部分は周囲の正常軟骨より薄いものの軟骨として残った。移植された骨髄間葉系細胞が骨髄血中の成長因子により軟骨に分化し、骨髄側で肥大軟骨化し、血管の侵入により骨に置換され

ていったと考えられる。

このように家兎の実験系では、骨髄間葉系細胞移植で骨軟骨欠損の修復が促進されることが明らかとなり、この方法をヒトの関節軟骨欠損の治療に応用した。

膝蓋骨の軟骨欠損修復

2例の膝蓋骨軟骨欠損患者に対して、自己骨髄間葉系細胞移植を行った。症例は44歳、男性と26歳、女性であった。手術の3週間前に腸骨より採取した骨髄血から接着細胞を培養し増殖させ、コラーゲンゲルに包埋した。手術時にabrasionした軟骨欠損部に細胞を包埋したコラーゲンゲルをおき、脛骨より採取した骨膜を、そのcambium layerを移植細胞側に向けて縫合した。7~8週後に関節鏡を施行したところ、2例ともに修復組織の再生を認め、術後臨床症状の改善を顕著に認めた。

そこでわれわれは変形性膝関節症の患者で高位脛骨骨切り術(HTO)の適応があり、同意が得られた患者に対し、細胞移植群と非細胞移植群の2群を設け、比較することにより骨髄間葉系細胞移植の有用性について検証した。

変形性膝関節症の軟骨再生⁹⁾

対象は、内側型の変形性膝関節症でHTOの適応のある患者24名、平均年齢は63歳であった。12名に自己骨髄間葉系細胞移植を行い、12名に細胞移植のないコラーゲンゲルを移植した。前述のようにあらかじめ手術前に自己骨髄間葉系細胞を用意した。HTOと同時に、大腿骨内顆荷重部の軟骨の消失した部分をabrasionし、自己骨髄間葉系細胞を包埋したコラーゲンゲルを移植し骨膜で被覆した。コントロール群では細胞のないコラーゲンゲルを移植し骨膜で被覆した。術後平均7週後の創外固定抜去時とその後平均42週後の内固定抜去時に関節鏡を施行し、

修復組織の肉眼的、組織的修復を観察した。

術後平均16週の臨床成績は、いずれも術前と比べると有意に改善したが、両群間で有意な差は認めなかった。しかし、鏡視下・組織学的所見のgrading scoreでは、7週後より42週後のほうが有意に改善し、どちらの時期でも細胞移植群のほうが有意に良好な修復を認めた。

今後の骨髄間葉系細胞移植の研究

上記のように、骨髄間葉系細胞移植による修復は完全な硝子軟骨ではなかった。移植した細胞は雑多な細胞集団であり、一部のみが前駆細胞であり、軟骨への分化が不十分である可能性がある。そこで、これらの細胞のなかから真の前駆細胞を識別できれば有用であると考えられる¹⁰⁾。あるいは、遺伝子の導入や成長因子の投与により、分化、増殖をコントロールし、修復を改善させることが試みられている。

成長因子を用いて、*in vitro*で軟骨細胞への分化を促進させる方法として、Sekiyらは培養の際に、TGF- β 、dexamethasoneにbone morphogenetic protein (BMP)-6を追加して培養を行ったところ、細胞数は十倍にも増加し、II型X型コラーゲンの発現を認めた¹¹⁾。Mastrogiacomoraはinsulinlike growth factor, fibroblast growth factor-2, platelet derived growth factorを加えた三者の投与下で、骨髄間葉系細胞を培養した結果、単独投与ではFGF-2がコロニーのサイズ、*in vitro*での軟骨形成、*in vivo*での骨形成いずれも優れていた¹²⁾。

遺伝子を用いての実験では、軟骨の初期分化、増殖に関与するSry-related HMG box (Sox)-5,6,9, BMP, parathyroid hormone (PTH)/PTHrP, Hedgehog familyなど、あるいは細胞寿命に関与するtelomeraseなどを導入遺伝子として研究が進められている。Mansonらは、骨髄間葉系細胞にBMP-7を遺伝子導入し、家兎の軟骨全層欠損に移植することによって¹³⁾、片山らは、家兎の骨髄細胞にcartilage derived matrix protein-1を遺

伝子導入し、骨軟骨欠損部に移植することにより、コントロールと比し良好な修復を得た¹⁴⁾。

おわりに

自己骨髄間葉系細胞移植により、関節軟骨の修復が促進されることが明らかとなった。しかし組織の修復は十分であったとはいえず、今後さらに改善の余地があると思われる。

成長因子の利用、遺伝子導入など以外にも、細胞移植の担体の開発など、さまざまな研究が行われており、それらの成果を期待したい。

◆文 献◆

- 1) Pittenger MF, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science*, 284 : 143-147, 1999.
- 2) Kopen GC, et al : Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 10711-10716, 1999.
- 3) Bjornson CR, et al : Turning brain into blood : a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science*, 283 : 534-537, 1999.
- 4) Hofstetter CP, et al : Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 : 2199-2204, 2002.
- 5) Shake JG et al : Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model : engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 73 : 1919-1925, 2002.
- 6) Rafii S, et al : Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 13 : 61-67, 2002.
- 7) Barry FP, et al : The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*, 265 : 134-139, 1999.
- 8) Wakitani S, et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 76-A : 579-592, 1994.
- 9) Wakitani S, et al : Human culture expanded autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cart*, 10 : 199-206, 2002.
- 10) Prockop DJ, et al : Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from culture of human marrow stromal cells. *Cytherapy*, 3 : 393-396, 2001.
- 11) Sekiya I, et al : BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284 (2) : 411-418, 2002.
- 12) Mastrogiacomo M, et al : Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cart*, 9 (Suppl A) : S36-40, 2001.
- 13) Manson JM, et al : Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop*, 379S : 171-178, 2000.
- 14) 片山理恵ほか : 骨髄由来間葉系細胞移植に対するCDMP-1遺伝子導入と軟骨分化誘導の促進. *日整会誌*, 75 : S850, 2001.

特別寄稿

変形性関節症の軟骨再生の 現状と将来

天正恵治¹⁾ 中谷宏幸¹⁾ 岡部高弘¹⁾ 脇谷滋之¹⁾

Key Words 軟骨欠損 骨髄刺激法 細胞移植 骨髄間葉系細胞 遺伝子治療

変形性関節症(OA)は遺伝要因, 機械的ストレスなどの環境要因, および加齢による退行性変化により発症すると考えられている。遺伝的要因としては, II型コラーゲン異常によるOAがいくつか報告されているが, 一般的には多因子疾患であり, 糖尿病あるいは高血圧などの生活習慣病のように疾患感受性遺伝子が多数存在すると考えられる。機械的ストレスとしては, 外傷後の不安定性, 軟骨損傷による適合性の悪化, あるいは過度の負荷などがあげられる。しかし, もっとも大きな要因は加齢であり, 加齢とともにその有病率は増加する。現在日本人の患者数は1,000万人ともいわれ, これからの高齢者社会の進行とともに, ますます重要となる疾患である。

現在のOAの治療法は, 消炎鎮痛剤, ヒアルロン酸などの対症療法が主体であり, 進行した症例に対しては手術療法が選択される。手術療法は骨切り術と人工関節置換術に分けられる。人工関節置換術は高度の破壊関節に対して行われる。骨切り術は比較的破壊が軽度な症例に対して行われ, 一部の症例では関節軟骨の再生(硝子軟骨による修復ではなく線維軟骨による修復)が期待されるが, 確実に関節軟骨を再生する方法ではない。

OAの病態の主体は関節軟骨の磨耗であり, これを再生することによりOAの症状を緩和させ,

将来人工関節や関節固定術などの手術治療を回避することができると考えられるが, 現在のところ, 関節軟骨を確実に修復する方法は確立されていない。近年の組織再生工学の発達により, 関節軟骨修復が行われるようになってきたが, ほとんどは小さな関節軟骨欠損に対するものであり, OAを対象としたものは少ない。OAの関節軟骨を修復するために, さまざまな研究が行われている。本稿では, 現在の関節軟骨欠損修復法を紹介し, 今後の展望について解説する

関節軟骨の機能と構造

(1) 関節軟骨の機能

関節軟骨は関節面において骨表面を覆い軟骨下骨にかかる外圧を分散・吸収するショックアブソーバーの働きをしている。また関節表面の摩擦係数を低下させ滑動性を良くする役割ももっている。したがって, OAで関節軟骨が消失すると, 軟骨下骨同士が擦れ合い摩擦が大きくなり, また衝撃が直接軟骨下骨に伝わるため軟骨下骨が損傷しやすく, 骨硬化あるいは疼痛が生じると考えられる。

(2) 関節軟骨の構造

軟骨は, 組織学的に硝子軟骨・線維軟骨・弾性軟骨の3つに分類される。関節軟骨は硝子軟骨より構成されている。関節軟骨は疎な軟骨細胞と軟骨基質からなり血管・神経・リンパを欠く。軟骨基質はコラーゲン線維のネットワークとプロテオ

¹⁾ Keiji Tensho, Hiroyuki Nakaya, Takahiro Okabe, Shigeyuki Wakitani
信州大学医学部整形外科

グリカンからなり、コラーゲンは軟骨にかかる伸張力に抵抗し、プロテオグリカンは粘弾性を軟骨に与えている。軟骨基質はトルイジンブルーなどの塩基性色素に対して異染性を示すが、これは主成分の1つであるプロテオグリカンのもつ強い陰性荷電による。軟骨基質は含水性に富み約70%が水分である。血管をもたない関節軟骨は関節液からの拡散により栄養されており、荷重による関節軟骨圧縮時の関節液の移動により関節軟骨細胞の栄養が促進される。したがって、ギプスなどで関節の動きを制限すると軟骨細胞への栄養供給が傷害される。

(3) 関節軟骨の修復能力

関節軟骨の修復能力は非常に低い。その原因として、血流が乏しいこと、細胞周囲に密度の高い基質が存在していること、あるいは軟骨細胞自体が高度に分化しておりほとんど分裂増殖しないことなどが考えられている。

古くから、関節軟骨の層内にとどまる部分損傷は修復されず、軟骨下骨まで達する損傷は修復されるが関節軟骨本来の組織である硝子軟骨ではなく線維軟骨あるいは線維組織であると考えられてきた。実際には関節軟骨欠損の修復は、動物種、年齢、損傷の部位、大きさあるいは損傷の深さなどにより異なるために、いまだに詳細は不明である。ヒトにおける関節軟骨損傷は、一般的に動物より修復能力が乏しいと考えられてきたが、全く修復能力がないわけではない。近年、関節鏡やMRIでヒト関節軟骨欠損の長期経過が明らかになりつつある。

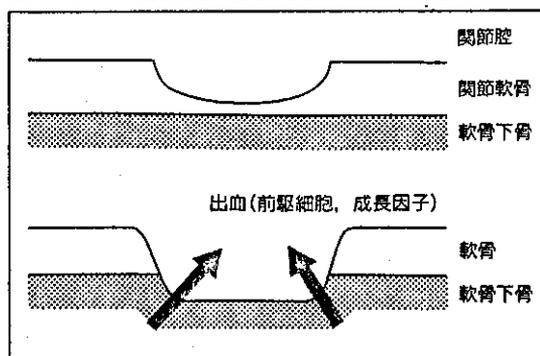
内側型の膝関節OAに対して高位脛骨骨切り術(HTO)で内側の荷重を軽減すると、内側の関節軟骨消失部分に軟骨様組織が再生するとの報告がある¹⁾。これは、すべての症例に起こる現象ではなく修復の生じない症例もたくさんあり、修復する場合でも約2年かかり、また修復組織は線維軟骨による修復である。

これまでの関節軟骨修復

(1) 骨髄刺激法(図1)

骨髄刺激法(marrow stimulation technique)は軟

図1 関節軟骨欠損の骨髄刺激法による修復



軟骨下骨からの出血を促し、軟骨欠損部に修復に必要な前駆細胞が成長因子を供給する。

骨損傷部の軟骨下骨の連続性を断ち、骨髄からの出血を生じさせ軟骨前駆細胞および成長因子を損傷部に供給し軟骨修復を促進させる方法である。軟骨下骨に多数の穴を開ける multiple perforation 法、削る abrasion 法、微小な骨折を作る microfracture 法がある。骨髄刺激法はOAの軟骨再生を促す方法として半世紀前に報告された^{2,3)}。これらの方法は簡便であり患者に対する侵襲も少ないことから現在も広く行われている方法である。しかし、この方法により再生されるのは本来の硝子軟骨ではなく線維軟骨であると考えられる。

動物実験では、線維軟骨による修復は長期の経過でOAになるとの報告があったが、ヒトではその証拠は乏しかった。近年、ヒトでの長期経過の報告が散見されるようになってきたが、それによると、線維軟骨での修復はOAになるようである⁴⁾。しかしながら短期の成績は問題なく、簡便な方法であるために、組織再生工学などの方法を行う前にまず試す価値のある方法である。

内側型の膝OAに対しては、高位脛骨骨切り術などの関節外での変形の矯正と同時に、骨髄刺激法を併用して行う報告が散見される。これらの方法でも組織修復の促進は認められるが、その有用性については一定の結論を得ていない⁵⁾。

(2) 骨軟骨移植

採取した軟骨下骨ごと欠損部に移植する方法で、同種移植と自己移植がある。同種移植は免疫反応や感染症の問題があり、またわが国では屍体からの供給が不可能であり行われていない。自己

移植は骨軟骨片の採取部に欠損ができることからあまり行われなかった。しかし、関節周辺の荷重にあまり関与しない部位から骨軟骨片を複数個採取し欠損部にモザイク状に移植するモザイクプラスチックが開発されてから比較的広く行われるようになり、良好な成績が報告されている⁶⁾。この方法は採取部を分散させるため大きな骨欠損を作らないこと、荷重しない部位からの骨軟骨片の採取が可能であることなどの利点がある。しかし、本来の曲率の関節軟骨表面の形状を再現するのが技術的に困難であること、採取できる骨軟骨片には限りがあり対応できる大きさに限界があること、周辺部とはいえ正常軟骨部に欠損が生じること、移植軟骨の層状剥離などが問題として指摘されている。この方法は基本的には小さな欠損に対して行われる方法であるが、一部でOAの軟骨欠損を修復する試みも行われている。しかし、OAに対してこの方法を行うにはさらにいくつかの問題がある。OAの広範な欠損部を修復するために十分な組織を採取するのが困難であること、あるいは採取する軟骨組織は同じ関節内であるためにその部分にも軟骨変性が認められ正常とはいえないことなどがあげられる。

細胞移植による関節軟骨欠損修復

(1) 自己培養軟骨細胞移植

1989年Grandeらは家兎の実験系において自己培養軟骨細胞移植を報告した。これは自家軟骨片を非荷重部から採取し、軟骨細胞を単離後単層培養し、増殖した軟骨細胞を、骨膜を縫着した軟骨欠損部に浮遊液の状態ですりつぶし、移植する方法である。1994年Brittbergらはこの方法を初めて臨床応用し⁷⁾、その後10年後の追跡においても良好な成績が得られたことを報告した⁸⁾。現在では自己軟骨細胞培養のシステムはGenzyme Biosurgery社により提供され、欧米ではすでに約1万例が行われており、日本でも約10例ほどが行われた。浮遊液の状態での移植は軟骨細胞の分布が不均一になりやすく、骨膜の表面から細胞が一部漏出してしまふことからOchiらは軟骨細胞をアテロコラーゲン・ゲルのなかで三次元培養し、欠損部に

移植することでこの欠点を改善し良好な成績を報告している⁹⁾。

これらの方法の利点は自己細胞移植であるので免疫反応および感染症が問題とならず、臨床応用が容易なことである。欠点としては、軟骨採取のため正常組織に欠損を作ること、自己組織採取のために別に1回手術が必要であること、培養で細胞を増殖させるのに脱分化を生じることなどがあげられる。また、この方法のOAへの臨床応用に関してはさらに多くの課題をかかえている。軟骨損傷の範囲が広範囲であること、あるいは採取する軟骨も正常ではないため軟骨細胞の増殖能や基質産生能が低下していることなどである。

最近、自己軟骨細胞移植と骨髄刺激法の一つであるmicrofracture法の比較研究が行われ、2年の経過で有意差がないとの報告がなされた。この方法の有用性の再評価が必要であろう¹⁰⁾。

(2) 骨髄間葉系細胞移植

骨髄血中の接着細胞は旺盛な増殖能力をもち骨髄間葉系細胞と呼ばれる。この細胞の一部が骨・軟骨・筋肉・脂肪などの間葉系の組織に分化する能力をもつ。骨髄血から分離され、骨髄血の採取は局所麻酔で可能であり、10日間の培養で2,000倍にも増加するため臨床応用に適した細胞である。骨再生、末梢循環障害改善をはじめ、さまざまな分野での再生医療に応用が試みられている。

筆者らはまず家兎の実験系で自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨修復を行った¹¹⁾。家兎の脛骨近位部より骨髄血を採取し接着細胞を培養、増殖させて利用した。家兎の膝関節大腿骨内顆荷重部に6×3×3mmの骨軟骨欠損を作成しこれらの細胞1×10⁶個をコラーゲン・ゲルに包埋して欠損部に充填した。移植後2週間で修復組織は、骨軟骨欠損部全域がトルイジンブルーに異染性を示す硝子軟骨様組織となった。その後、関節表面を残して骨髄側から血管の進入、軟骨細胞の肥大化を生じ骨に置換された。24週後には軟骨下骨は完全に修復され、関節腔に面した部分のみが修復軟骨として残ったが、周囲の正常軟骨と比してやや菲薄化していた。骨髄間葉系細胞移植で骨軟骨欠損の修復が促進されることが明らかになったためこの方法をヒトの軟骨欠損の治療に応用し

た。

筆者らは26歳女性と44歳男性の2例の膝蓋骨軟骨欠損症例に骨髄間葉系細胞移植を施行した¹²⁾。その2例は歩行障害が出るほどの膝の強い疼痛を主訴とし、精査の結果その痛みは軟骨欠損が原因であると考えられた。手術の3週間前に腸骨より採取した骨髄血から接着細胞を培養し増殖させ、コラーゲン・ゲルに包埋した。手術時にabrasionした軟骨欠損部に、細胞を包埋したコラーゲン・ゲルで充填し、脛骨より採取した骨膜のcambium layerを移植細胞側にして縫合した。2例とも7~8週後に施行した関節鏡で修復組織の再生を認め、術後臨床症状の改善は顕著であった。しかし、臨床症例では、細胞を移植しないコントロール群を設定できないために、本当に細胞移植が有効であったかを判断できにくい。たとえば、疼痛だけだと、手術とそれに続く安静およびリハビリテーションで回復し、改善する可能性がある。そこでコントロール群を設定し、今度はOA患者の広範囲な軟骨欠損に対して骨髄間葉系細胞移植を試みた¹³⁾。

対象は内側型の変形性膝関節症でHTOの適応のある患者24名、平均年齢は64歳(49~70歳)であった。細胞移植手術の約3週間前に本人の腸骨から骨髄血を採取し接着細胞を増殖させた。HTO時膝関節を展開し、12例に対して大腿骨内顆荷重部の関節軟骨欠損部の硬化した軟骨下骨をabrasionし、コラーゲン・ゲルに包埋した骨髄間葉系細胞を充填し脛骨内側より採取した骨膜に被覆した(細胞移植群)。他の12例に対しては同様にHTO施行時に細胞のないコラーゲン・ゲルを充填し骨膜で被覆した(コントロール群)。

術前の非荷重平均大腿脛骨角は181度で矯正後平均角は170度であった。臨床成績評価にはHospital for Special Surgery Knee-rating Scaleを用い術前平均11カ月の短期成績で比較した。細胞移植群が術前の66.3点から79.2点に12.9点の改善を認めたが、改善の程度に統計学的有意差を認めなかった。同意の得られた患者に対して、抜釘時に関節鏡を施行し、鏡視下および組織学的所見の修復度を比較した。移植後6週および42週で移植群はコントロール群に比較して有意に良好

であった。移植後6週では修復組織を覆った骨膜は残存していたが一部剥離を認めるものもあった。その下の修復組織は白色で柔らかく組織学的には一部トルイジンブルーに異染性を示すのみであった。移植後42週では骨膜組織は認められず修復組織は周囲の正常軟骨よりは柔らかいものの6週時よりは硬度は増しており組織学的には異染性を全体的に認め一部硝子軟骨様であった。この修復をgrading scoreで比較したところ細胞移植群のほうが有意に良好であった。当方法は現段階ではOAのような比較的広範囲の欠損に対しても応用が可能な方法であり短期的には良好な臨床成績であったが、修復軟骨が今後も長期にわたり良好な機能を維持できるかは不明であり注意深い経過観察が必要であろう。

現在、筆者らは離断性骨軟骨炎など他の関節軟骨欠損の症例に対しても、適応を十分検討したうえで骨髄間葉系細胞移植を行っている。

今後の治療戦略

(1) 経口投与による軟骨修復

上記のような手術による方法は侵襲が大きく、コストもかかるので経口投与あるいは関節内投与による軟骨修復が理想である。経口投与の軟骨修復で近年注目を浴びているのがグルコサミン、コンドロイチンなどの軟骨基質構成分子である。欧州では保険適応であるが、わが国ではそうではない。

さまざまな報告があり、その効果については混沌としていたが、2001年のLancetに信頼できる報告が掲載された¹⁴⁾。この報告では、3年間のフォローで、プラセボと比べてX線での関節裂隙狭小化が有意に少なく、一般に宣伝されているように関節軟骨を再生させる効果はないものの軽度の進行予防効果はあることが明らかになった。しかし、これらは糖であり大量の糖の投与がどのような影響を与えるのか、また値段に似合った効果があるのかは不明である。

(2) 関節内注入による軟骨修復

関節内注入により関節炎に適応があるのはヒアルロン酸であり、現在さまざまな分子量のものが

臨床で用いられている。疼痛・水腫に有効な例もあるが、ヒトでの軟骨再生に対する効果は期待できない。

関節軟骨再生を促進するために、軟骨の増殖あるいは分化を促進する因子を関節内に注入する研究が動物で行われてきた。しかし、単一の物質で十分な効果が得られるものはない。最近の新たな試みとして、抗アポトーシス療法がある。caspase阻害薬またはinsulin-like growth factor(IGF)-1を投与するとcollagenaseで誘発された軟骨細胞のアポトーシスの増加を抑えることができるとの報告がある¹⁵⁾。OA患者の軟骨ではアポトーシスが2~4倍に増加しており、OAの治療に応用できる可能性が示唆された。Lotz M.らはこれらのアポトーシス阻害薬をウサギOAモデルに関節内注射することによってOAの進行を軽度にすることを示し、OAへの有効性を示した。軟骨の再生ではないが、今後アポトーシスの抑制もOA治療のターゲットとなる可能性がある。

(3) 遺伝子治療

上記の成長因子を蛋白として関節内に注入しても数時間で消失する。そこでこれらの分子の遺伝子を関節の細胞に導入し、成長因子を持続的に供給する方法が考えられ、さまざまな遺伝子の導入が試みられている。

(4) 細胞移植

骨髄前駆細胞の軟骨への分化を促進するために、培養液中にTransforming growth factor(TGF)- β などの分化促進因子を加えて、生体外で軟骨を作る方法が開発された。Sekiyaらは上記軟骨分化培養液にbone morphogenic protein(BMP)-6を加えると大きな軟骨片が形成されることを報告した¹⁶⁾。しかしながら直径数ミリの小さな塊しかできないこと、やがて中心部から石灰化を生じるなどの問題があり、すぐに臨床応用することは困難である。

成長因子による軟骨再生の研究のなかで、遺伝子導入により骨髄間葉系細胞の分化、増殖をコントロールする研究が行われている。遺伝子導入にはin vivo法とex vivo法がある。In vivo法は遺伝子を直接組織に導入する方法である。簡便であるが、導入のコントロールなどが困難である。Ex

vivo法は細胞を生体から採取して体外で遺伝子を導入して、また体内に戻す方法である。関節内にさまざまな因子を供給するとともに、遺伝子を導入された細胞の分化をコントロールできるという利点があり、細胞移植においても移植細胞内への遺伝子の導入が実験的に行われている。軟骨形成促進作用のある成長因子(BMP, IGF, TGF- β など)の遺伝子を導入して移植すると修復が促進されることが報告された¹⁷⁾。さらに受容体、細胞内情報伝達物質、あるいは転写因子などの遺伝子を導入して研究も行われている。BMPの構成的活性化受容体、BMPの細胞内情報伝達物質Smad、転写因子であるSry-related HMG box(Sox)5, 6, 9などである。Sox 5, 6, 9の3つを導入すると軟骨への分化が促進されることが報告された。別の試みとして、Telomerase遺伝子を導入し、Telomereの長さを維持し分裂能を維持させる報告もある。

これらの方法は、軟骨修復を促進する成長因子を関節内に供給し軟骨再生を促進するのみならず、変性を促進する因子を阻害する物質を供給し、変性の進行を防ぐことも可能となり、最も注目されている分野のひとつである。

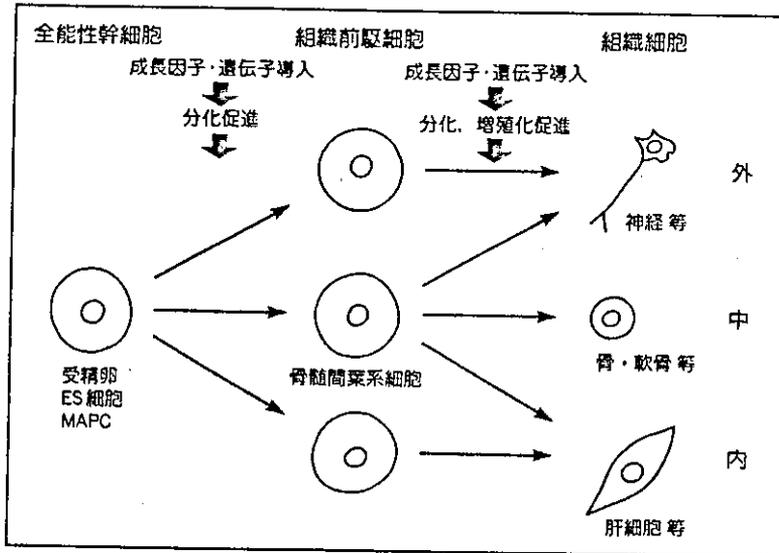
(5) 新たな細胞供給源(図2)

骨髄間葉系細胞の他にもさまざまな自己細胞が研究されている。生体の組織内には前駆細胞が存在することが明らかになり、末梢血幹細胞、筋肉サテライト細胞、脂肪細胞などからの組織再生の研究が行われているが、今のところ、これらの細胞による軟骨再生で骨髄間葉系細胞による再生に大きく勝るものはない。

一昨年前Scienceに報告され注目されたMultipotent Adult Progenitor Cell(MAPC)は成人骨髄に存在し胚性幹細胞(ES細胞)とほぼ同等の能力をもった細胞であり、すべての組織再生の源となる自己細胞と考えられた¹⁸⁾。もしこのような細胞が容易に採取できれば、すべての組織の修復が可能な自己細胞であり理想的な細胞と考えられた。しかしながら、その細胞の選定が技術的に難しく、臨床応用は現在のところ不可能である。

同種細胞としては、増殖能と多分化能をもったES細胞・羊膜細胞などが研究されている。ES細胞

図2 幹細胞の分化と増殖



胞は理論的には無限に増殖させることが可能であり、しかも増殖させた後でもすべての細胞に分化する能力を維持しているために、組織再生において理想的な細胞源と注目されている。しかしながら、現在のところ、十分に分化をコントロールできないために目的とする細胞のみを得ることが困難であること¹⁹⁾、同種細胞であるために免疫反応が生じることが問題である。現在、ES細胞の分化をコントロールする研究²⁰⁾、および同種免疫を抑えるためにドナーの核をES細胞に移植する therapeutic cloning などの研究が行われているが、倫理的問題もあり、臨床応用にはまだまだ時間がかかると考えられる。

おわりに

現在OAを含めた関節軟骨欠損に対してはさまざまな取り組みが行われているがどの方法もまだ一定の評価を得るには至っていない(表)。また筆者らは最終的にどのような施設でもすべての患者が受けることのできる再生医療を目指しているが、骨切り術や人工関節置換術などの手術治療に比較してこれらの方法は自己組織の採取・培養に手間やコストがかかり、手術侵襲も大きく、一般的な治療として行うにはまだまだ多くの課題を抱えている。しかし、近年細胞工学を用いた再生医

表 関節軟骨欠損に対する取り組み

従来の方法
● 骨髄刺激法 (multiple perforation, adrasion, microfracture)
● 同種軟骨移植
● 自己軟骨移植 (mosaic plasty)
細胞移植
● 自己培養軟骨移植
● 骨髄間葉系細胞移植
今後の治療戦略
● 他の細胞を用いた移植 (ES細胞, 羊膜細胞, 全能性幹細胞)
● 成長因子投与
● 遺伝子導入

療の発達は目覚ましく、近い将来OAの軟骨欠損を再生できる可能性は高いと考えられる。

文献

- 1) Fujisawa YK et al : The effect of high tibial osteotomy on osteoarthritis of the knee. An arthroscopic study of 54 knee joint. *Orthop Clin North Am* 10 : 585-608, 1979.
- 2) Pridie KH : A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J Bone Joint Surg* 41-B : 618-619, 1959.
- 3) Steadman JR : Microfracture technique for full-thickness chondral defect. *Operative Techniques in Orthop* 7 : 300-304, 1997.
- 4) Messner K et al : Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand* 67(5) : 523-529,

- 1996.
- 5) Akizuki S et al : Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation. A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy* 13 : 9-17, 1997.
 - 6) Matsusue Y et al : Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 9(3) : 318-321, 1993.
 - 7) Brittberg M et al : Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* 331 : 889-895, 1994.
 - 8) Peterson L et al : Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30(1) : 2-12, 2002.
 - 9) Ochi M et al : Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knees. *J Bone Joint Surg* 84-Br : 571-578, 2002.
 - 10) Knutsen G et al : Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. *J Bone Joint Surg* 86-A : 455-464, 2004.
 - 11) Wakitani S et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defect of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 76-A : 579-592, 1994.
 - 12) Wakitani S et al : Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae : Two case reports. *Cell Transplantation* (in press).
 - 13) Wakitani S et al : Human culture expanded autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defect in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cart* 10 : 199-206, 2002.
 - 14) Jean Y et al : Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression : a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* 357 ; 9252 : 251-256, 2001.
 - 15) Sharif M et al : Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum* 50(2) : 507-515, 2004.
 - 16) Sekiya I et al : BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(2) : 411-418, 2001.
 - 17) Gelse KK et al : Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 48(2) : 430-441, 2003.
 - 18) Jiang YBN et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893) : 41-49, 2002.
 - 19) Wakitani S et al : Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 42(1) : 162-165, 2003.
 - 20) Wakitani S et al : Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplantation* (in press).



■ 特集「理学療法による再建医療—ここまで可能」

関節軟骨修復と運動

天正恵治 岡部高弘 中谷宏幸 脇谷滋之

信州大学医学部整形外科

要旨 関節軟骨は修復力の乏しい組織であり、その修復には機械的ストレスが重要であると考えられている。しかしながら、機械的ストレスに対する修復はその種類・強さ・頻度により反応はさまざまであり、その詳細は明らかではない。今後、機械的ストレスに対する細胞の反応や、細胞増殖や基質産生に対する至適な機械的ストレスを解明することで、軟骨修復のための関節運動負荷の必要性が明らかにされると考えられる。

Abstract Articular cartilage has a limited capacity for repair and research on cartilage repair is done. Although mechanical stress is considered to play an important role in restoration of articular cartilage, the precise mechanism is still unknown. The response of cartilage over mechanical stress is different between its kind, strength or frequency. The necessity for the joint movement for cartilage restoration will be made clear by showing cell response to mechanical stress, or by clarifying ideal stress on the cells to form cartilage matrix or to proliferate.

Key words : 軟骨修復 (cartilage repair), 機械的ストレス (mechanical stress), 再生工学 (tissue engineering)

はじめに

関節軟骨は修復力の乏しい組織であり、関節軟骨損傷の修復はいまだに整形外科にとって大きな問題である。

近年の組織再生工学（組織再生工学とは、機能する細胞と人工の支持組織から臓器を作る方法である）の発達により、関節軟骨の再生が試みられ、一部、実用化されている。しかしながらいまだに確立された方法はなく、さまざまな研究が行われている。そのなかで、

関節に対する機械的ストレス、あるいは培養細胞に対する機械的ストレスは、軟骨細胞の形質発現に効果があると考えられており、さまざまな研究がされている。本稿では、現在、臨床で行われている種々の関節軟骨欠損修復法を紹介し、また軟骨修復における機械的ストレスとの関連性について解説する。

関節軟骨の構造

関節軟骨は組織学的に硝子軟骨よりなる。疎な軟骨細胞と軟骨基質からなり血管・神

Repair of articular cartilage and mechanical stress

Keiji TENSHO, MD, Takahiro OKABE, MD, Hiroyuki NAKAYA, MD and Shigeyuki WAKITANI, MD, PhD

連絡先：〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部整形外科 天正恵治 電話 0263-37-2659

経・リンパ管を欠く。軟骨基質はコラーゲン線維のネットワークとプロテオグリカンからなり、コラーゲンは軟骨にかかる伸張力に抵抗し、プロテオグリカンは粘弾性を軟骨に与えている。軟骨基質はトルイジンブルー等の塩基性色素に対して異染性を示すが、これは主成分の一つであるプロテオグリカンのもつ強い陰性荷電による。軟骨基質は含水性に富み約70%が水分である。

関節軟骨の修復能力は非常に低いが、その原因として、血流が乏しいこと、細胞周囲に密度の高い基質が存在していること、あるいは軟骨細胞自体が高度に分化しておりほとんど分裂増殖しないことなどが考えられている。古くから、関節軟骨の層内にとどまる部分損傷は修復されず、軟骨下骨まで達する損傷は修復されるが関節軟骨本来の組織である硝子軟骨ではなく線維軟骨あるいは線維組織の修復であると考えられてきた。実際には関節軟骨欠損の修復は、動物種、年齢、損傷の部位、大きさあるいは損傷の深さなどにより異なるために、いまだに詳細は不明である。ヒトにおける関節軟骨損傷は、一般的に動物より修復能力が乏しいと考えられてきたが、全く修復能力がないわけではない。近年、関節鏡やMRIでヒト関節軟骨欠損の長期経過が明らかになりつつある。

血管をもたない関節軟骨は関節液からの拡散により栄養されており、荷重による関節軟骨圧縮時の組織液の移動により関節軟骨細胞の栄養が促進される。したがって、ギブスなどで関節の動きを制限すると軟骨細胞への栄養供給が傷害されるのみならず、損傷された関節軟骨の修復にも悪影響を及ぼすことは容易に想像される。さらに、関節軟骨の修復においても運動が重要であることは1980年のSalterの報告¹⁾により明らかになり、以降、

軟骨修復とメカニカルストレスの関係に対して研究が続けられてきている。

現在の関節軟骨修復

可動関節において骨表面を被う関節軟骨には、日常生活の種々の動作やスポーツ・外傷でさまざまな過度の機械的ストレスがかかりこれが繰り返されることによって軟骨の損傷・摩耗が生じる。関節軟骨損傷による症状はさまざまであり、いまだ不明な点が多いが、最も臨床的に問題となるのは、疼痛と将来の変形性関節症（以下OA）への移行である。これを防ぐために、さまざまな関節軟骨修復法が考案されてきたが、いまだに十分な方法はない。

1. 骨髄刺激法

骨髄刺激法 (marrow stimulation technique) は軟骨損傷部の軟骨下骨の連続性を断ち、骨髄からの出血を生じさせ軟骨前駆細胞および成長因子を損傷部に供給し軟骨修復を促進させる方法であり、多数の穴を開ける multiple perforation 法、削る abrasion 法、微小な骨折を作る microfracture 法がある²⁻⁴⁾。これらの方法は簡便であり患者に対する侵襲も少ないことから現在も広く行われている方法である。この方法により再生されるのは本来の硝子軟骨ではなく線維軟骨であり、また、軟骨組織の再生は術後のメカニカルストレスの程度に依存する。このため変形の大きい膝OAに対しては骨髄刺激法と併用して高位脛骨骨切り術などの関節外での変形の矯正を行い損傷部のメカニカルストレスを減じる必要があるといわれている。

2. 骨軟骨移植

軟骨下骨ごと欠損部に移植する方法で、同種移植と自己移植がある。同種移植は免疫反応や感染症の問題があり、また本邦では屍体

からの供給が不可能であり行われていない。自己移植は関節周辺の荷重にあまり関与しない部位から骨軟骨片を複数個採取し欠損部にモザイク状に移植するモザイクプラスチックが開発され良好な成績が報告されている⁵⁾。この方法は採取部を分散させるため大きな骨欠損を作らないこと、荷重しない部位からの骨軟骨片の採取が可能であることなどの利点があるが、採取できる骨軟骨片には限りがあり対応できる大きさに限界があること、周辺部とはいえ正常軟骨部に欠損が生じること、移植軟骨の層状剥離などが問題として指摘されている。

細胞移植による関節軟骨欠損修復

1. 培養軟骨細胞移植

1994年 Brittberg らにより初めて臨床応用され⁶⁾、その後10年後の追跡においても良好な成績が得られたことを報告した。まず、本人の関節軟骨の荷重にあまり関与しない部位から関節鏡で関節軟骨を少量採取する。それを酵素処理で軟骨細胞に分離し、増殖させて、移植する方法である。現在では自己軟骨細胞培養のシステムは米国では Genzyme Biosurgery 社により商業ベースで提供され、欧米ではすでに約1万例が行われており、日本でも約10例ほどが行われた。この方法は、現在、治験が進行中であり、近い将来、わが国でも広く行われる可能性がある。また最近では鏡視下に軟骨細胞を移植する方法も報告されており⁷⁾、低侵襲での手術が可能になってきている。

2. 骨髄間葉系細胞移植

骨髄血中の接着細胞は旺盛な増殖能力をもち骨髄間葉系細胞と呼ばれ、この細胞の一部が骨・軟骨・筋肉・脂肪等の間葉系の組織に分化する能力をもつ。骨髄血から分離され、

骨髄血の採取は局所麻酔で可能であり、10日間の培養で2000倍にも増加するため、近年骨の再生、末梢循環障害改善をはじめ、さまざまな分野での再生医療に 응용が試みられている。

われわれはまず家兎の実験系で自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨修復を行い、骨軟骨欠損の修復が促進されることが明らかになったため⁸⁾この方法をヒトの軟骨欠損の治療に 응용した。

われわれは26歳女性と44歳男性の2例の膝蓋骨軟骨欠損症例に骨髄間葉系細胞移植を施行し、関節鏡で修復組織の再生を認め、術後臨床症状の改善は顕著であった⁹⁾。しかし、本当に細胞移植が有効であったかを判断しにくいため、コントロール群の設定が必要であると考えた。そこで内側型の変形性膝関節症患者24名の12例に対してはHTOと同時に大腿骨内顆荷重部の関節軟骨欠損部に細胞移植し(細胞移植群)、他の12例に対しては同様にHTO施行時に細胞のないコラーゲン・ゲルを充填し骨膜で被覆した(コントロール群)。術後平均11ヶ月の臨床評価では、両群とも手術により有意に改善していたが、改善の程度は有意差を認めなかった。抜釘時に関節鏡施行し、鏡視下および組織学的所見の修復度を比較したところ、移植後6週および42週で移植群はコントロール群に比較して有意に良好であった¹⁰⁾。当方法は短期的には良好な臨床成績であったが、修復軟骨が今後も長期間にわたり良好な機能を維持できるかは不明であり注意深い経過観察が必要であろう。現在、われわれは離断性骨軟骨炎など他の関節軟骨欠損の症例に対しても、適応を十分検討したうえで骨髄間葉系細胞移植を行っている。

3. これらの方法の有用性

これらの細胞移植による関節軟骨再生が、

本当に臨床症状を緩和させ、将来の変形性関節症への進行を予防するか、あるいはその効果がこれまでである骨髄刺激法より優れているか、実はいまだに明らかではなく、論争中である。それはヒトでは細胞移植をしないシャム手術だけのコントロール群を設定できないために臨床症状の改善が細胞移植のためであることを証明できないこと、また変形性関節症への進行の有無を見るには10年以上の経過を追う必要があるからである。今後、これらの問題を克服できる新しい評価法が確立され、細胞移植の有効性が証明されれば、こういった方法が広く行われるようになる可能性がある。

軟骨修復と運動

関節軟骨には関節の生理的な動きに伴いさまざまな機械的ストレスがかかり、それらは圧迫力・伸展力・剪断力・静水圧に大別される。これらの力学的負荷が、軟骨細胞の分化・増殖・基質の産生に影響を与える。正常の関節軟骨のみならず、骨髄刺激法により骨髄から出てきた細胞、あるいは外から移植された軟骨細胞および骨髄間葉系細胞なども、機械的ストレスの影響を受けるため、軟骨再生にも重要な役割を果たしていると考えられる。

1980年、Salterらは、適度な機械的ストレスが軟骨再生を促進することを、家兎の実験系で明らかにした。彼らは家兎の膝に軟骨欠損を作成し、関節を固定し運動を行わなかった群・固定を行わず自動運動だけ行わせた群・専用の器械を用いて持続的に関節運動を行った群に分け、その修復の程度を比較・評価した。結果持続的に関節運動を行った群だけが他の2群に比べて著明な軟骨の修復が見られた。この事から持続的な関節運動が関節軟骨の修復を促進することが明らかになり、

これが現在でも臨床的に使用されているcontinuous passive motion (以下CPM)の開発の原理になったことは有名である。

細胞の分化への機械的ストレスの影響

実際にどのような機械的ストレスが軟骨細胞の分化に影響を及ぼしているか、さまざまな研究がなされてきた。

機械的ストレスによる分化促進としては、Angeleらが周期的に静水圧を骨髄間葉系細胞に1週間加えることで軟骨細胞への分化が促進され結果として軟骨基質のコラーゲンやプロテオグリカンの産生が増加すると報告している¹¹⁾。また、Takahashiらもマウスの骨髄間葉系細胞に持続的に圧迫力を加えることで軟骨誘導因子であるsox9の発現が増加しtype IIコラーゲンやアグリカンの産生も増えていたと述べている。さらにtype IIコラーゲンやアグリカン産生の誘導阻害因子であるIL-1 β の発現も抑えられておりこれらの相互作用により骨髄間葉系細胞から軟骨細胞への分化が促進されたと推測している¹²⁾。

また、機械的ストレスは再生軟骨の大きさ・性状・強度にも影響を及ぼすと考えられる。そしてそれぞれのストレスやその大きさ・時間・頻度によって反応はさまざまである。Waldmanらの報告では軟骨細胞のペレットに剪断力を長期的にわたり間歇的に加えることで非刺激群に比べて重量は20%、組成もコラーゲンは40%、プロテオグリカンは35%増加し圧縮応力には3倍、剛性は6倍もの機械特性の改善が見られた¹³⁾。また、彼らは他の実験系において軟骨細胞に剪断力をかけた群と圧迫力をかけた群での組織の大きさや組成・機械的特性を比較し、剪断力を加えたほうがより圧縮応力も剛性も圧迫力をかけた群に勝っていたと述べている¹⁴⁾。

このように、機械的ストレスによる良い面がたくさんあるが、過度の機械的ストレスは修復を阻害し軟骨を傷害するのも事実である。この損傷のメカニズムとして Fujisawa らは過剰な機械的ストレスがサイトカインや NO を介して MMP などの軟骨基質を破壊する各種の酵素の産生を促進し破壊が進行することを報告している^{15,16)}。したがって、場合によっては過度の力学的負荷を軽減することで軟骨再生を促進する可能性があるかと推察される。具体的には OA において変形に伴う過度の機械的ストレスが原因となっている。そして高位脛骨々切り術(以下 HTO)などで変形を矯正し機械的ストレスを減じることで線維軟骨や硝子軟骨で修復されることがある。Kobayashi らの報告では HTO の抜釘時に採取した再生軟骨様組織の免疫染色はその組成に type II コラーゲンが多く含まれていたと述べておりこのことを裏づける結果である¹⁷⁾。

また単離した OA の軟骨細胞に間歇的な静水圧をかけることで MMP-2 や炎症系のメディエーターである IL-6・MCP-1 の産生が抑えられ、軟骨基質の破壊が抑制されることも報告されており¹⁸⁾、また違った側面での機械的ストレスの働きが指摘されている。

われわれは胚性幹細胞 (ES 細胞) での軟骨修復の研究を行い、機械的ストレスが ES 細胞の軟骨細胞への分化に大きな影響を及ぼすことを明らかにした^{19,20)}。ES 細胞は増殖能と分化能を維持した細胞であり、理論的には無限に増殖させた後でも、さまざまな組織細胞に分化する能力をもち、再生医療における細胞供給源として注目されている。軟骨修復の細胞源としても注目されているが、ES 細胞を軟骨細胞だけに分化させることができず、軟骨修復には応用できなかった。われわれは、細胞の分化には環境が重要であると考

え、ES 細胞を関節内に注入した。すると ES 細胞は皮下に移植されたのと同様に奇形腫を形成し関節を破壊した。続いて、われわれは ES 細胞を大腿骨顆間部に作成した骨軟骨欠損部に移植したところ、硝子様軟骨に分化し、奇形腫を全く形成せず ES 細胞が軟骨細胞だけに分化したと考えられた。ES 細胞が骨軟骨欠損部に移植されることにより、狭いスペースに押し込められ、上にある膝蓋骨により圧迫あるいは剪断力という機械的ストレスがかけられたことが要因の一つと考えられたが、骨髄から何らかの液性因子が供給された可能性もある。この事を証明するため、さらにわれわれは、ES 細胞を同じ骨軟骨欠損部に移植して、関節運動による機械的ストレスを受けないよう関節を固定した。これにより欠損部には奇形腫が形成され、ES 細胞の骨軟骨欠損部での軟骨への分化に力学的負荷が大きな要因であることが推察された。しかし、その分化制御の詳細なメカニズムはまだ明らかにされておらず、今後の研究が必要である。

おわりに

このように機械的ストレスはその種類や強さ・頻度によっては軟骨修復に対してプラスにもマイナスにも働くと思われる。われわれが現在軟骨修復の際に用いている骨髄間葉系細胞においても至適な機械的ストレスをかけることで軟骨細胞への分化を調節したり細胞数や軟骨基質を増やすことでより良い修復を得られる可能性がある。そのためには今後機械的ストレスに対する細胞の反応や細胞に対する至適な機械的ストレスを解明し理解する必要性があるだろう。

これらの *in vitro* での軟骨細胞への機械的ストレスの効果が明らかになると、これを応用し、関節軟骨の自然修復促進のため、ある

いはさまざまな関節軟骨修復法を行った後の修復促進のためのリハビリテーションとしての関節運動負荷の必要性が明らかにされてくると考えられる。

文 献

- 1) Salter RB. et al : The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 62-A : 1232-1251, 1980.
- 2) Pridie KH. : A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J Bone Joint Surg.* 41-B : 618-619, 1959.
- 3) Steadman JR. et al : Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee : average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19 : 477-484, 2003.
- 4) Johnson LL. et al : Arthroscopic abrasion arthroplasty : a review. *Clin Orthop.* 391 : S306-317, 2001.
- 5) Matsusue Y. et al : Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 9 : 318-321, 1993.
- 6) Brittberg M. et al : Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med.* 331 : 889-895, 1994.
- 7) Erggelet C. et al : The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy* 19 : 108-110, 2003.
- 8) Wakitani S. et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defect of articular cartilage. *J Bone Joint Surg.* 76-A : 579-592, 1994.
- 9) Wakitani S. et al : Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae : Two case reports. *Cell Transplant* 13(5) : 595-600, 2004.
- 10) Wakitani S. et al : Human culture expanded autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defect in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage* 10 : 199-206, 2002.
- 11) Angele P. et al : Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res.* 21(3) : 451-457, 2003.
- 12) Takahashi I. et al : Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci.* 111(Pt 14) : 2067-2076, 1998.
- 13) Waldman SD. et al : Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *J Orthop Res.* 21(4) : 590-596, 2003.
- 14) Waldman SD. et al : Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro. *J Bone Joint Surg.* 85-A : 101-105, 2003.
- 15) 藤澤拓生 : 培養軟骨細胞を用いた周期的メカニカルストレスによる軟骨破壊機序に関する研究. *岡山歯学会雑誌* 18 : 83-101, 1999.
- 16) Fujisawa T. et al : Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. *J Biochem.* 125 : 966-975, 1999.
- 17) Kobayashi H. et al : Immunolocalization of carboxy-terminal type II procollagen peptide in regenerated articular cartilage of osteoarthritic knees after reduction of mechanical stress. *Osteoarthritis Cartilage* 10 : 870-878, 2002.
- 18) Trindade MC. et al : Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 12 : 729-735, 2004.
- 19) Wakitani S. et al : Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 42(1) : 162-165, 2003.
- 20) Wakitani S. et al : Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13(4) : 331-336, 2004.