

201106012A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の  
開発と臨床応用に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関 矢 一 郎

平成 24 (2012) 年 3 月

# 厚生労働科学研究費補助金

## 再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用に関する研究

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	関矢 一郎	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科軟骨再生学	教授
研究分担者	宗田 大	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科運動器外科学	教授
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科発生発達病態学	准教授
	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所 ウイルス治療学	准教授
	赤澤 智宏	東京医科歯科大学大学院 保健衛生学研究科分子生命情報解析学	教授
	浅原 弘嗣	国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部 (平成23年4月～5月末) 東京医科歯科大学大学院 システム発生・再生医学研究分野 (平成23年6月～)	部長  教授
	齋藤 知行	横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学(整形外科)	教授
	中村 憲正	大阪保健医療大学保健医療学部	教授



# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
総括研究報告書

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

研究代表者

関矢一郎 東京医科歯科大学・大学院・軟骨再生学 教授

研究要旨

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を培養し、浮遊液の状態で軟骨欠損部に10分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。Hanging drop法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させることにより、操作性が高く、細胞接着の効率を改善することが期待できる。本年度の計画は(1) ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体の特性解析(2) 集合体の兔軟骨欠損部への移植実験を行い基礎データを収集するとともに、新規開発した(3) 変異細胞評価(4) 感染症検査を行いこれらの検査方法を間葉系幹細胞に対して実用化することである。さらなる発展を目指し、(5) iPS細胞での検討も行なう。

ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体の特性解析に対して、25万細胞をhanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。3次元培養前の単層培養時と比較して集合体では、BMP2、S OX5,6,9などの軟骨分化関連遺伝子や、TSG6、STC1などの抗炎症遺伝子の発現が上昇し、in vitro軟骨分化の評価で軟骨基質の産生が増加した。

集合体の軟骨欠損部への移植に対して、日本白色家兔の大腿骨溝に5x5x1.5mmの軟骨欠損を作成し、細胞集合体を、それぞれ、5、10、20、40、80個移植した。集合体は、容易に軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植翌日に移植細胞が軟骨欠損部に残存し、軟骨欠損部以外には細胞集合体を認めなかった。比較的低密度である、10個の集合体を移植した群で、移植4週、12週後に最も良好な軟骨の再生が得られた。

変異細胞評価に対して、p16メチル化断片の定量的解析を行ないp16メチル化陽性細胞のメ

チル化陰性細胞に対する比が0.1%でも検出できることを明らかにした。DNA損傷修復応答の検出に関して、DNA損傷を加えた血球系細胞（T細胞）では、Activation Induced Deaminase (AID) の発現を検出することができた。

感染症検査に関して、17種類の主なウィルスのプライマーを作成し、DNAウイルスゲノムはPCR法、RNAウイルスおよびレトロウイルスゲノムはRT-PCR法により解析した。測定系は全てのウイルスに対して50 copies/reactionの測定感度を持ち、検査対象ウイルス間には交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることを確認した。ヒト滑膜及び滑膜間葉系幹細胞31検体のウイルスの検査を行ない、いずれも検出限界（50 copies/reaction）以下であった。

iPS細胞での検討に関して、Nanogプロモータ制御下にEGFP、ColIIIプロモータ制御下にmCherryを発現する組み換えiPS細胞の樹立を目指している。Nanogプロモータ制御下にEGFP、ColIIIプロモータ制御下にmCherryを発現するベクターを作成し、ATDC5細胞にトランスフェクションし、軟骨分化に応じて緑から赤に変化することを確認した。

## A. 研究目的

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態で軟骨欠損部に10分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するための、次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発を行ない、安全性の観点からも検討し、多施設臨床研究を実施することが本研究の目標である。主な改良点は、hanging drop法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、

表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる点である。計画として最初に（1）ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体の特性解析（2）集合体の兎軟骨欠損部への移植実験を行い、基礎データを収集する。次に新規開発した（3）変異細胞評価（4）感染症検査、を行いこれらの検査方法を間葉系幹細胞に対して実用化する。さらなる発展を目指し、（5）iPS細胞での検討も行なう。

### （1）ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

間葉系幹細胞はその多分化能により再

生医療の細胞源として推奨されている。特に滑膜由来の間葉系幹細胞は、高い軟骨分化能と増殖能から、軟骨再生医療の魅力的な細胞源である。間葉系幹細胞を3次元培養し集合体とすることにより、操作性を高めることが期待できるが、細胞の特性が変わる可能性がある。今回、滑膜間葉系幹細胞を集合体とすることにより、変化する特性を検討した。

## (2) 集合体の兔軟骨欠損部への移植

家兔の軟骨欠損モデルに対して滑膜間葉系幹細胞集合体を静置すると、集合体が軟骨欠損部に接着するか、その後の細胞挙動はどうか、移植細胞が直接分化するか、軟骨欠損が修復されるか等を検討した。

## (3) 変異細胞評価

滑膜由来間葉系幹細胞調製での品質保証体系の1つとして、変異細胞の有無について検出する系を立ち上げることを目的とした。実際に体細胞の培養系で変異細胞が生じ、生存を続けることは極めて稀な現象と考えられるが、変異細胞が生成する危険性を最小限にする培養系を確立するためのモニタリングシステムを検証することも目的とした。

## (4) 感染症検査

再生医療・細胞治療では、生体由来組織・細胞を原材料として使用し、多くは培養した生細胞を治療に用いるため、原材料およ

び最終製品を滅菌処理することにより安全性を確保することは事実上不可能である。

したがって、微生物汚染の問題を克服し、安全な治療用細胞製剤を供給する体制を整えることが再生医療・細胞治療を実用化するために極めて重要である。生体材料には細菌・真菌・ウイルスなど多くの微生物が持続感染していることが知られており、微生物汚染の問題を回避するためには、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは不十分である。したがって、患者に投与する前の最終製品を全数検査することにより治療の安全性を担保することが求められる。

本研究では、ヒトに持続感染することが知られているウイルスをリストアップし、それらを網羅的に検出可能な検出系を作成し、滑膜および培養滑膜間葉系幹細胞のウイルス検査を通じてデータを蓄積し、滑膜由来間葉系幹細胞を使用した軟骨再生医療の安全保証法を確立することを目的とした。

## (5) iPS細胞での検討

日本で関節軟骨の細胞治療を受けている患者は年間6000人と推定されているが、その大半が、マイクロフラクチャー法を受けており有効性に疑問を持たれている。軟骨再生を目指したドナー細胞に関する基礎的解析は乏しい。本研究は滑膜間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生治療の効果を検証する基礎的な研究として、滑膜間葉系細胞と

iPS 細胞から軟骨細胞細胞への分化機構を比較検討することを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

ヒトの滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。25 万個の滑膜間葉系幹細胞を 35 $\mu$ l の培養液に浮遊し、hanging drop 法で 3 日間培養し、集合体を形成させた。ヒト滑膜間葉系幹細胞を凝集体とさせた時の遺伝子プロファイルを microarray、real time RT-PCR により、凝集体とする前の単層培養時と比較することで解析した。ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体および従来の単層培養した滑膜間葉系幹細胞を遠心し形成させた pellet を軟骨分化培養液で、21 日間培養し、できる軟骨塊の湿重量、軟骨分化関連遺伝子発現を比較することで、in vitro の軟骨分化能を検討した。

### (2) 集合体の兔軟骨欠損部への移植

日本白色家兔の滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。25 万個の滑膜間葉系幹細胞を 35 $\mu$ 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。日本白色家兔の大腿骨溝に 5x5x1.5mm の軟骨欠損を作成し、自己滑膜間葉系幹細胞集合体を、それぞれ、5、10、20、40、80 個移植した。細胞を移植しない群を対照とした。移植細胞を追跡するため、GFP を発現する兔の滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討

した。移植後 4、12 週で、肉眼的、組織学的検討を行った。

### (3) 変異細胞評価

p16 メチル化アッセイに対して、U2OS(p16 メチル化陽性ヒト骨肉腫細胞株)と SaOS2(p16 メチル化陰性ヒト骨肉腫細胞株)から DNA を抽出し、常法に従ってバイサルファイト処理後、メチル化塩基配列特異的プライマー及び検出用プローブを用いて、リアルタイム PCR 機にてメチル化断片の定量的解析を行った。ヒト骨肉腫細胞 MG-63 についても同様の検討を行った。

DNA 損傷修復応答検出系は、実際の培養滑膜間葉系幹細胞につき染色用切片を作成した。また前段階として培養骨膜細胞を用いて染色用切片を作成し、ATM, Chk2, P53 のリン酸化特異的抗体を用いて染色を行った。さらに DNA 損傷を加えた血球系細胞をモデルとして、AID (activation induced deaminase)の発現についてスライド上で検討を行った。

### (4) 感染症検査

DNA ウイルスゲノムは PCR 法により、RNA ウイルスおよびレトロウイルスゲノムは RT-PCR 法により増幅した。

プライマーに関して次の 17 種類のものを作成した。GAPDH;  $\beta$ -actin; HSV1&2; CMV; VZV; EBV; HHV6; HHV7; HTLV-1 & -2; HIV-1; HIV-2;HCV.



DNA ウイルススタンダード作成のため、各種ウイルスの PCR 産物をクローニングし遺伝子配列を確認した後、制限酵素 ScaI 消化後に一本鎖にして精製し、OD 値を測定した。電気泳動の結果と OD 値からコピー数をもとめ、ロシュ社製 MS2RNA 10ng/ $\mu$ l 溶液にて段階希釈液を作成した。

RNA ウイルススタンダード作成のため、各種ウイルスの RT-PCR 産物をクローニングし遺伝子配列を確認した後、制限酵素 Sal I (T7 RNA polymerase の場合) または Nco I (SP6 RNA polymerase の場合) 消化した後一本鎖にし、精製後 OD 値を測定した。RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (プロメガ) により RNA を合成し、添付のマニュアルに従い鋳型 DNA の分解後に RNA 精製した。バイオアナライザー 2100 にて合成した RNA の定量と純度測定を行った。その結果よりコピー数をもとめ、ロシュ社製 MS2RNA 10ng/ $\mu$ l 溶液にて段階希釈液を作成した。

各種ウイルスが陰性なことを確認した細胞 DNA (0.5  $\mu$ g/well) に、作成した各種スタンダード 50 Copy を加えたもの感度測定に用いた。

特異性の確認のため、各種ウイルスプライマー、プローブ配列の相同性を GenBank にて検索し特異性を確認した。またプライマー、プローブ配列を引用した文献で実験的に特異性が調べられている場合は、その結果を採用した。陽性コントロールと特定のウイルスが検出された臨床検

体を用いて、お互いの交差反応性の有無の確認をした。

## (5) iPS 細胞での検討

Nanog プロモータ制御下に EGFP、Sox9 または ColII プロモータ制御下に mCherry を発現し、未分化な幼弱細胞で緑色蛍光、成熟した軟骨細胞に分化したときに赤色蛍光を発する iPS 細胞を作成することを目的とした。これらの発現ベクターが ATDC5 で機能することを確認する。

## (倫理面への配慮)

動物及びヒトの組織を用いる研究は、本学倫理委員会での承認を得て開始した。解析は最小限のサンプル量で行えるように留意した。ヒトの検体は匿名化し、個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。

## C. 研究結果

### (1) ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

3 日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体は、大きさが約 1mm で、容易には壊れず扱うことが容易であった。表層の細胞は紡錘形で、深層の細胞は円形であった。TUNEL 染色陽性細胞がみとめられたその数はわずかで、多くの細胞は生存していた。

3 次元培養前の単層培養時と比較して、集合体では、被検者によらずほぼ同様に発現プロファイルが変化していた。621 遺伝子が 5 倍以上発現上昇し、最も発現が上昇

していた遺伝子は BMP2 であった。集合体では、BMP2、SOX5,6,9 などの軟骨分化関連遺伝子や、TSG6、STC1 などの抗炎症遺伝子の発現が上昇していた。

軟骨分化培地で培養した集合体は、従来の単層培養した細胞と比べて、湿重量が重く、COL2A1、aggrecan、SOX9 を多く発現していた。

### (2) 集合体の兔軟骨欠損部への移植

集合体は、容易に軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植翌日に移植細胞が軟骨欠損部に残存し、軟骨欠損部以外には細胞は認めなかった。比較的低密度である、10 個の集合体を移植した群で、移植 4 週、12 週後に最も良好な軟骨の再生が得られた。GFP 陽性細胞の集合体を 10 個移植し、4 週後に再生した軟骨には、GFP 陽性細胞を認めた。再生した軟骨は GFP 陽性細胞とともに GFP 陰性の細胞も認めた。

### (3) 変異細胞評価

p16 メチル化陽性細胞、メチル化陰性細胞でそれぞれリアルタイム PCR を行い、陰性細胞では 40 cycle 以上でも陰性であることを確認した。さらに陽性細胞と陰性細胞を 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 の比率で混じてリアルタイム PCR を行ったところ、少なくとも 1:1,000 ではメチル化陽性細胞が検出できることを明らかにした。実際の培養滑膜間葉系幹細胞については、組織から DNA を抽出し、今後の検討に備えた。

DNA 損傷修復応答の検出に関して、培養滑膜細胞では、培養組織の辺縁において ATM, Chk2, P53 の微弱なリン酸化が認められた。また DNA 損傷を加えた血球系細胞 (T 細胞) では、AID の発現を検出することができた。ただし血球系の AID はバックグラウンドでも微弱に発現するようにみえ、その陽性陰性の判定が今後の課題である。同様に培養滑膜間葉系幹細胞からは染色用切片を作成して、今後の染色の準備が整った。

### (4) 感染症検査

検査系の感度を測定するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞 DNA0.5  $\mu$ g に各ウイルスのスタンダード DNA あるいは RNA を 50 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。作成したサンプルを使用した検討の結果、ウイルススタンダードを加えなかった場合は全て陰性だったが、ウイルススタンダードを加えたサンプルからはすべて陽性シグナルが検出され、測定系は全てのウイルスに対して 50 copies/reaction の測定感度を持つことが確認された。

検査結果が陽性の際に他のウイルスが誤って検出される交差反応の有無を確認するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA0.5  $\mu$ g に各ウイルスのスタンダードを 100~10000 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。測定の結果は、例えば CMV のスタンダード

DNA ウイルスを加えた場合には CMV の測定用ウェルからのみ陽性シグナルを検出できたが、他のウイルス検出用のウェルからは陽性シグナルが検出できず、全て陰性で交差反応性は陰性と判定された。検査対象すべてに同様の測定を行なったが、すべてスタンダードを加えたウイルスの検出用ウェルのみ陽性で、他のウイルス検出用ウェルは陰性だった。したがって、検査対象ウイルス間には交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることが示された。

滑膜から分離した培養滑膜間葉系幹細胞 31 検体から DNA および RNA を抽出し上記ウイルスの検査を行ったところ、いずれのウイルスも検出限界 (50copies/reaction) 以下だった。

#### (5) iPS 細胞での検討

Sox9 プロモータ領域を含む BAC クローニングに、大腸菌内相同組み替えを用いて mCherry を挿入することで、Sox9-mCherry を作成した。ATDC5 細胞にトランスフェクションして、軟骨分化条件で mCherry の発現誘導を調べたが、赤色蛍光は観察されず、mCherry mRNA も発現していなかった。そこで、Type II Collagen プロモータに mCherry を挿入し、ColIII-mCherry を作成した。同様に ATDC5 細胞にトランスフェクションし、軟骨分化条件で観察したところ、分化に応じて赤色蛍光が観察された。この発現ベクターを

Nanog-EGFP iPS 細胞にトランスフェクションして目的の iPS 細胞を樹立することを目指している。

#### D. 考察

##### (1) ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

本研究では、滑膜間葉系幹細胞の集合体を形成するため、hanging drop 法を用いた。この方法は、特に高価な特別な道具を必要としない、単純な方法である。滑膜間葉系幹細胞を集合体とすることで、劇的に遺伝子プロファイルは変化し、特に軟骨への分化が進み、抗炎症遺伝子の発現が上昇した。これは、細胞間接着様式の変化、低酸素、低栄養といった環境の変化によるものと推測される。

##### (2) 集合体の兔軟骨欠損部への移植

日本白色家兔の軟骨欠損モデルを用いた検討では、滑膜間葉系幹細胞集合体を比較的低密度で移植した群で良好な軟骨の再生が得られた。最も成績が不良であったのは、最も多くの集合体を移植し軟骨欠損部に集合体を敷きつめた群であった。我々は以前に collagen gel を包埋した滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植した場合には、より多くの細胞を移植した群で、より良好な成績が得られていたことから、今回の結果は予想に反するものであった。一定数以上の集合体を移植した時に、成績が不良となる理由として、細胞を維持するのに必要な栄養素が枯渇することが考えられる。

本研究では、比較的低密度で移植した時に良好な結果が得られたが、臨床応用を考えると望ましい結果であった。我々はすでに、ヒトの軟骨欠損部への自己滑膜間葉系幹細胞移植の臨床治験を行っている。14日間で平均5000万細胞を得ることができ、約280mm<sup>2</sup>の軟骨欠損部へ移植している。今回の日本白色家兎の model では、25mm<sup>2</sup>の欠損部に10個の集合体(250万細胞)を移植した際に最も良好な結果が得られた。臨床での軟骨欠損の面積と、用意できる細胞数を考慮すると、ウサギモデルで良好な結果が得られた条件は、臨床では実務上扱いやすい条件であった。

### (3) 変異細胞評価

本年の研究では p16 メチル化アッセイが稼働することが確認された。現時点では0.1%の検出感度であるが、実際には測定に用いる DNA 量を増やすことによって0.01%程度の感度は得られることが予想される。また DNA 損傷応答は染色にて評価可能と判断される。今後評価としては500-1000細胞あたりの損傷応答陽性細胞を算定し基礎データとしたい。また来年度からは実際の培養滑膜由来間葉系幹細胞を用いて解析することが可能である。現時点では培養法に関する大きな変化はないが、今後培養試薬等の変更があった際の指標として活用する。最終的な品質保証としては調製された細胞の Karyotyping を10検体以上で実施し、基礎データとしたい。

### (4) 感染症検査

検査系の構築と感度に関して、17種類のウイルスの検査系を作成した。すべての検査項目は50 copies/reactionの検出感度を持つことが示された。測定項目によっては5 copies/reactionの感度を持つものもあったが、50 copies/reactionギリギリの感度の項目もあった。プライマー・プローブ配列の見直しを行い、感度の向上を目指したい。

特異性に関して今回検討した限りにおいては、各プライマー、プローブ間に交差反応性はなく、特異的に被検ウイルスを検出できると考えられる。今後検査系の特異性、正確性をさらに高めていくためには、陽性シグナルが出た場合増幅産物の遺伝子配列の決定、陽性ウイルスに対する他のプライマー・プローブを使用した検査、などの検証実験を重ねていく必要があるだろう。

自動化への取り組みに関して現在、作成した検査系の自動化を目指し試薬の固相化と自動分注機との組み合わせに関する研究を行っている。通常の液体試薬を用いた場合に比べ、固相化試薬を用いた場合では結果がばらつく傾向がみられ、固相化試薬を溶解する段階に問題がある可能性がある。今後試薬の固相化法と溶解法の検討を継続して行う予定である。

軟骨再生のウイルス安全性に関して、滑膜由来間葉系幹細胞由来の培養細胞に対する17種類のウイルス検査結果はすべて陰

性だった。健常人の骨髄液由来のサンプルから HHV6, HHV7, CMV, ParvoB19 が検出される例があることが報告されている。例数は少ないものの滑膜由来細胞からはウイルスは検出されなかったことから、軟骨再生に使用する間葉系幹細胞のソースとして滑膜は骨髄よりも安全性が高いことが示唆された。今後例数を増やし、検証を続ける予定である。

### (5) iPS 細胞での検討

Sox9 プロモータは調節領域が長く通常のプラスミドでは全調節領域を包含出来ない。そこで、組み換え BAC を用いて mCherry 発現をドライブしようと試みたが、BAC ベクターはトランスフェクションによって細胞内に取り込まれるコピー数が少ないため、蛍光蛋白を発現させるトータルの活性が低かったと考えられる。現在、iPS 細胞で蛍光の発現を解析中であるが、TypeII Collagen プロモータは機能していることを確認した。

## E. 結論

### (1) ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、効率的に軟骨欠損部に接着させることが可能である。また集合体により、軟骨関連遺伝子発現や軟骨基質産生量が増加し、軟骨再生の細胞源として、より効果が期待できるものとなった。

### (2) 集合体の兎軟骨欠損部への移植

日本白色家兎の軟骨欠損モデルで滑膜間葉系幹細胞集合体を移植することにより、良好な軟骨修復を認めた。特に集合体を低密度で移植した際に、最もよい軟骨修復が認められた。

### (3) 変異細胞評価

変異細胞検出手法と、DNA 損傷修復応答解析手法が確立し、実際の培養細胞において検証した。十分な感度が得られることが判明した。

### (4) 感染症検査

17 種類のウイルス (HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2, HCV) を 50 copies/reaction の感度で測定する検査系を作成した。滑膜から分離した培養滑膜間葉系幹細胞 31 検体から DNA および RNA を抽出し上記ウイルスの検査を行ったところ、いずれも検出限界以下だった。

### (5) iPS 細胞での検討

Nanog プロモータ制御下に EGFP、ColIII プロモータ制御下に mCherry を発現するベクターを作成した。ATDC5 細胞にトランスフェクションし、軟骨分化に応じて緑から赤に変化することを確認した。

## F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model.  
Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, Sekiya I, Caroom CT, Prockop DJ, Thomas DB.  
J Bone Joint Surg Am.  
2012 Apr 18;94(8):701-12.
2. Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs.  
Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E.  
Cytotherapy. 2012 Mar;14(3):327-38.
3. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis.  
Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, Tsuji K, Miyaguchi K, Ogishima S, Tanaka H, Muneta T.  
J Orthop Res. 2012 Jun;30(6):943-9.
4. 滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用  
関矢一郎、宗田 大  
雑誌整形外科 2012 整形トピックス  
Vol.63, No.3, p228
5. 変形性膝関節症をめぐる進歩  
滑膜由来の幹細胞による再生医療  
関矢一郎、宗田 大  
Bone Joint Nerve 2012 Vol.2,  
No.1, p159-165
6. 再生医学のいま 基礎研究から臨床への展開に向けて  
滑膜幹細胞を用いた関節軟骨再生  
関矢一郎、宗田大  
治療 2011 Vol.93, No.8, p1784-1793
7. 滑膜間葉幹細胞を用いた関節軟骨再生  
関矢一郎、宗田大  
クリニカルカルシウム p83-93 Vol.21  
No.6 2011
8. 軟骨再生の概要と応用の可能性  
関矢一郎  
医事新報 p59-61 No. 4548 2011
9. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells.  
Jang SH, Lim JW, Morio T, Kim H.  
Free Radical Biol. Med. 52: 607-615, 2012.
10. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery.  
Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, Morio T, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK.  
Biomaterials 33:1563-72, 2012.
11. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. Nakamura K. Du L. Tunuguntla R. Fike F. Cavalieri S. Morio T. Mizutani S. Brusco A. Gatti RA.  
Hum Mutat. 33:198-208, 2012.
12. 細胞治療のウイルス安全性確保に関する取り組み  
日本医薬品等ウイルス安全性研究会  
医薬品の品質管理とウイルス安全性  
清水則夫 2011 p102 ~ 111
13. 病原微生物の網羅的検出法の開発と応用  
日本医薬品等ウイルス安全性研究会  
医薬品の品質管理とウイルス安全性  
清水則夫 2011 p287 ~ 294  
検出法の開発と応用

14. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95:345–349.
15. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. Ng S, Selvarajan V, Hung G, Zhou J, L Feldman A, Low M, Kwong Y, Shimizu N, Kagami Y, Aozasa K. *J Pathol.* 2011; 223:496–510.
16. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai S, Yasuda A, Shimizu N, Tojo N. *LAB CHIP.* 2011; 11:1166–1167.
17. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). Yagasaki H, Kato M, Shimizu N, Shichino H, Chin M, Mugishima H. *Ann Hematol.* 2011; 90(7):851–852.
18. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Ishida K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sagawa K. *Leukemia.* 2011; 25(8):1324–1334.
19. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N, Mochizuki M. *Jpn J Ophthalmol.* 2011; Jul 13. 55(5):495–501.
20. Detection of *Candida* & *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. Sugita S, Komori K, Ogawa M, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M. *Graefes Arch Clin Exp. in press.*
21. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. Ng S, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong Y, Shimizu N, Aozasa K, Chng W. *Blood.* 118(18):4919–4929. 2011 Nov 3.
22. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. *PLoS Pathogens*, 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.
23. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, Fujiwara S. *PloS ONE* 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.
24. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, Shimizu N, Rice A, D.Ling P. *PLoS ONE*, 2011;6(11):e27271 2011
25. Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Fukano T, Akazawa

- C, Nakamura M, Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A, Okano H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 9;419(2):188–93.
26. Visualization of enteric neural crest cell migration in SOX10 transgenic mouse gut using time-lapse fluorescence imaging. Miyahara K, Kato Y, Koga H, Dizon R, Lane GJ, Suzuki R, Akazawa C, Yamataka A. *J Pediatr Surg.* 2011 Dec;46(12):2305–8.
  27. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. *Mol Brain.* 2011 Sep 23;4:34.
  28. miRNAs in cartilage development. Asahara H. *Clin Calcium.* 2012; 22(5): 653–7.
  29. Analysis of molecular network in chondrocytes by WISH. Miyaki S, Asahara H. *Clin Calcium.* 2011; 21(6): 831–8.
  30. Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS). Nakamura N, Takeuchi R, Sawaguchi T, Ishikawa H, Saito T, Goldhahn S. *J Orthop Sci.* 2011 Sep;16(5):516–23
  31. Radiographic improvement of damaged large joints in children with systemic juvenile idiopathic arthritis following tocilizumab treatment. Inaba Y, Ozawa R, Imagawa T, Mori M, Hara Y, Miyamae T, Aoki C, Saito T, Yokota S. *Ann Rheum Dis.* 2011 Sep;70(9):1693–5.
  32. Posterior shear force and posterior tibial displacement using a sling bridge in patients with posterior cruciate ligament insufficiency. Sakai T, Koyanagi M, Nakata K, Fujisaki H, Yamagata T, Hidaka K, Suzuki Y, Nakamura N. *Br J Sports Med.* 45(4):370.2011
  33. Triple-bundle ACL grafts evaluated by second-look arthroscopy. Tanaka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N, Nakagawa S, Mae T, Otsubo H, Suzuki T, Nakata K. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 24–Ma.2011
  34. Single- versus Double-bundle ACL Reconstruction: Is There Any Difference in Stability and Function at 3-year Followup. obbi A, Mahajan V, Karnatzikos G, Nakamura N. *Clin Orthop Relat Res.* 11–Jun.2011
  35. Surgical Technique: Revision ACL Reconstruction With a Rectangular Tunnel Technique. Shino K, Mae T, Nakamura N. *Clin Orthop Relat Res.* 28–Jun.2011
  36. Effects of medial patellofemoral ligament reconstruction on patellar tracking. Kita K, Horibe S, Toritsuka Y, Nakamura N, Tanaka Y, Yonetani Y, Mae T, Nakata K, Yoshikawa H, Shino K. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15–Jun.2011
  37. A practical guide to research: design, execution, and publication. Editors: Jón Karlsson, M.D., Ph.D., Robert G. Marx, M.D., M.Sc., F.R.C.S.C., Norimasa Nakamura, M.D., Ph.D., and Mohit Bhandari, M.D., Ph.D., F.R.C.S.C. ISAKOS Scientific Committee, Audigé L, Ayeni OR, Bhandari M, Boyle BW, Briggs KK, Chan K, Chaney-Barclay K,



Do HT, Ferretti M, Fu FH, Goldhahn J, Goldhahn S, Hidaka C, Hoang-Kim A, Karlsson J, Krych AJ, LaPrade RF, Levy BA, Lubowitz JH, Lyman S, Ma Y, Marx RG, Mohtadi N, Marcheggiani Muccioli GM, Nakamura N, Nguyen J, Poehling GG, Poehling GG, Rosenberg N, Shea KP, Sohani ZN, Soudry M, Voineskos S, Zaffagnini S.

Arthroscopy.

2011 Apr;27(4 Suppl):S1-112.2011.

The 9th International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine Chang Gung Memorial Hospital - Keelung Taiwan 2012/3/24

鈴木志郎、宗田 大、関矢一郎

Properties and effectiveness of aggregated synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration.

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

堀江雅史、宗田 大、関矢一郎

Xenografts of Human Mesenchymal Stromal Cells(MSCs) Improve Repair of Rat Meniscus by Being Activated to Express Indian Hedgehog that Enhances Expression of Rat Type II Collagen

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

奥野真起子、宗田 大、関矢一郎

Syngeneic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat massivemeniscal defect model.

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

初鹿大祐、宗田 大、関矢一郎

Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in rabbit massive meniscal defect.

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

小田邊浩二、宗田 大、関矢一郎

Property of Mesenchymal Stem Cells in Oral Tissues.

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

尾島美代子、宗田 大、関矢一郎

Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with osteoarthritis.

Orthopaedic Research Society, SanFrancisco. 2012/2/4

大関信武、宗田 大、関矢一郎、齋藤知行

## 2. 学会発表

### a)国際学会発表

関矢一郎

Mesenchymal stem cells derived form synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration.

The 3rd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium (ICOA 2011) (Suwon, Korea)

2011/7/4

関矢一郎

Mesenchymal stem cells derived form synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration.

International Summer Program 2011

Tokyo Medical and Dental University

2011/8/30

関矢一郎

Mesenchymal stem cells derived form synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration.

BioKorea (Seoul)

2011/9/30

関矢一郎

Roles of stem cells in synovial fluid and clinical applications of stem cells from synovium

Singapore Orthopaedic Association

2011/10/13

関矢一郎

Cartilage regeneration with synovial stem cells.

BMP-7 treated Achilles tendon transplantation for meniscal defect in a rat model.  
Orthopaedic Research Society, San Francisco.  
2012/2/4

松尾 光祐、齋藤知行  
Expression of angiotensin II receptor (AT1R) in human articular chondrocytes.  
Orthopaedic Research Society, San Francisco.  
2012/2/4

宗田 大  
Remnant Preserving Double-bundle ACL Reconstruction.  
7th PCL Symposium in Seoul Prof, Jung Young-Bok.  
2011/2/12

宗田 大  
Remnant preserving double-bundle ACL reconstruction by transtibial technique. Debate: Remnant Preservation in ACL Reconstruction: Is it Worth Doing?  
ISAKOS 2011, Rio de Janeiro,  
2011/5/15

宗田 大  
17-year experience of 4-strand semitendinosus double-bundle ACL reconstruction ICL: ACL Reconstruction - Single vs. Double Bundle.  
ISAKOS 2011, Rio de Janeiro,  
2011/5/16

宗田 大  
Treatment for knee osteoarthritis before Total Knee - Biologic resurfacing options for osteochondral defects of the knee -. ICL: Treatment of Knee Osteoarthritis: What are the Options Before Total Knee?  
ISAKOS 2011, Rio de Janeiro,  
2011/5/16

宗田 大  
What's going on in the section of Orthopedic Surgery.  
Orthopedic Biomechanics Laboratory, Gainesville, FL.  
2011/5/20

宗田 大

17-year experience of 4-strand semitendinosus double-bundle ACL reconstruction.

Grand Rounds in Orthopaedics & Rehabilitation, OHSU.

2011/5/23

宗田 大

Anatomic double-bundle ACL reconstruction using 4-strand semitendinosus tendon. 1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijing.  
2011/6/10.

宗田 大

Medial patellofemoral reconstruction in various patellar instability.

1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijing.  
2011/6/11

宗田 大

Physiological background of ACL injured patients.

1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijing.  
2011/6/12

清水則夫

Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells.

XV International Congress of Virology, Sapporo, JAPAN,  
2011/7

中村 憲正

Do we need cells to restore chondral surface?  
ISAKOS 2011, Rio de Janeiro.

2011/5/16

中村 憲正

Scaffold-free tissue engineered construct (TEC) derived from mesenchymal stem cells for joint surface restoration.

ISAKOS 2011, Rio de Janeiro.

2011/5/16

中村 憲正

Mesenchymal stem cells (MSCs) in joint repair

ISAKOS 2011, Rio de Janeiro,  
2011/5/16

中村 憲正  
Novel Approaches to Prevent OA of the Knee  
MSC-based repair of Cartilage and Meniscus  
for joint surface restoration.

中村憲正  
Synovial stem cell-based therapy in chondral  
lesions.  
1st Annual Congress on Stem Cell Research  
Spanca, Turkey.  
2011/7/28

b) 国内学会発表

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨再生医療  
日本再生医療学会シンポジウム(新宿)  
2011/3/2

関矢一郎  
滑膜間葉幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医  
療におけるマグネシウムの細胞接着促進効果  
日本軟骨代謝学会シンポジウム(博多)  
2011/3/5

関矢一郎  
滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する軟骨再  
生医療  
東京整形外科画像診断研究会(神田)  
2011/6/11

関矢一郎  
滑膜間葉幹細胞による軟骨再生  
日本骨代謝学会シンポジウム(大阪)  
2011/7/28

関矢一郎  
関節液中の幹細胞と関節内組織損傷  
日本骨代謝学会シンポジウム(大阪)  
2011/7/30

関矢一郎  
滑膜幹細胞の視点から膝関節疾患の病態と  
構造体の再生を考える  
第10回鹿児島サイトカイン制御療法研究会  
2011/9/21

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生

信州運動器診療フォーラム(松本)  
2011/10/1

関矢一郎  
滑膜幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への  
応用  
日本整形外科学会 第26回基礎学術集会 ラ  
ンチョンセミナー  
2011/10/20

関矢一郎  
幹細胞による軟骨再生—現状と展望—  
日本臨床スポーツ医学会シンポジウム(青森)  
2011/11/6

関矢一郎  
滑膜幹細胞による軟骨再生  
東京大学 再生医療カンファレンス  
2012/2/16

宗田 大  
4 つ折りの半腱様筋腱を用いた 2 重束再建術  
の進歩と課題  
第3回 JOSKAS 特別シンポジウム 北海道  
2011/6/16

宗田 大  
膝関節の障害に対する保存療法と手術療法  
の位置づけ  
エルムセミナー10  
第3回 JOSKAS 北海道  
2011/6/17

宗田 大  
複合靭帯損傷に対する治療のコツとピットフ  
ォール  
第3回 JOSKAS セミナー 北海道  
2011/6/18

清水則夫  
網羅的ウイルス・真菌 PCR 法を用いた造血細  
胞移植後肺障害の迅速診断  
第33回日本造血細胞移植学会 松山市  
2011/3/10

清水則夫  
非血縁骨髄ドナー由来の Chromosomal  
integrate  
HHV-6(CIHHV-6)の1 女児例

第 33 回日本造血細胞移植学会 松山市  
2011/3/10

清水則夫

Yamada C et al. High levels of human  
cytokines were detected in a novel mouse  
xenograft model of CAEBV and EBV-HLH  
日本血液学会 名古屋  
2011/10/14-16

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

2009-001082、

赤澤智宏、井上高良、井上健、高坂新一.

トランスジェニック非ヒト動物(神経堤特異的蛍  
光標識マウス).

(財)ヒューマンサイエンス振興財団.

平成 21 年 1 月 6 日(再出願)