

図5 石灰化能の比較

各種間葉幹細胞100個をディッシュに播種し14日間培養しコロニーを形成させる。その後、石灰化培地で21日間培養する。アリザリンレッドで染色し、石灰化したコロニー数をカウント後、同じディッシュをクリスタルバイオレッドで染色し全コロニー数をカウントし、アリザリンレッド陽性コロニー形成率を求める。3人のドナーの結果をそれぞれ示す。(文献2)より改変)

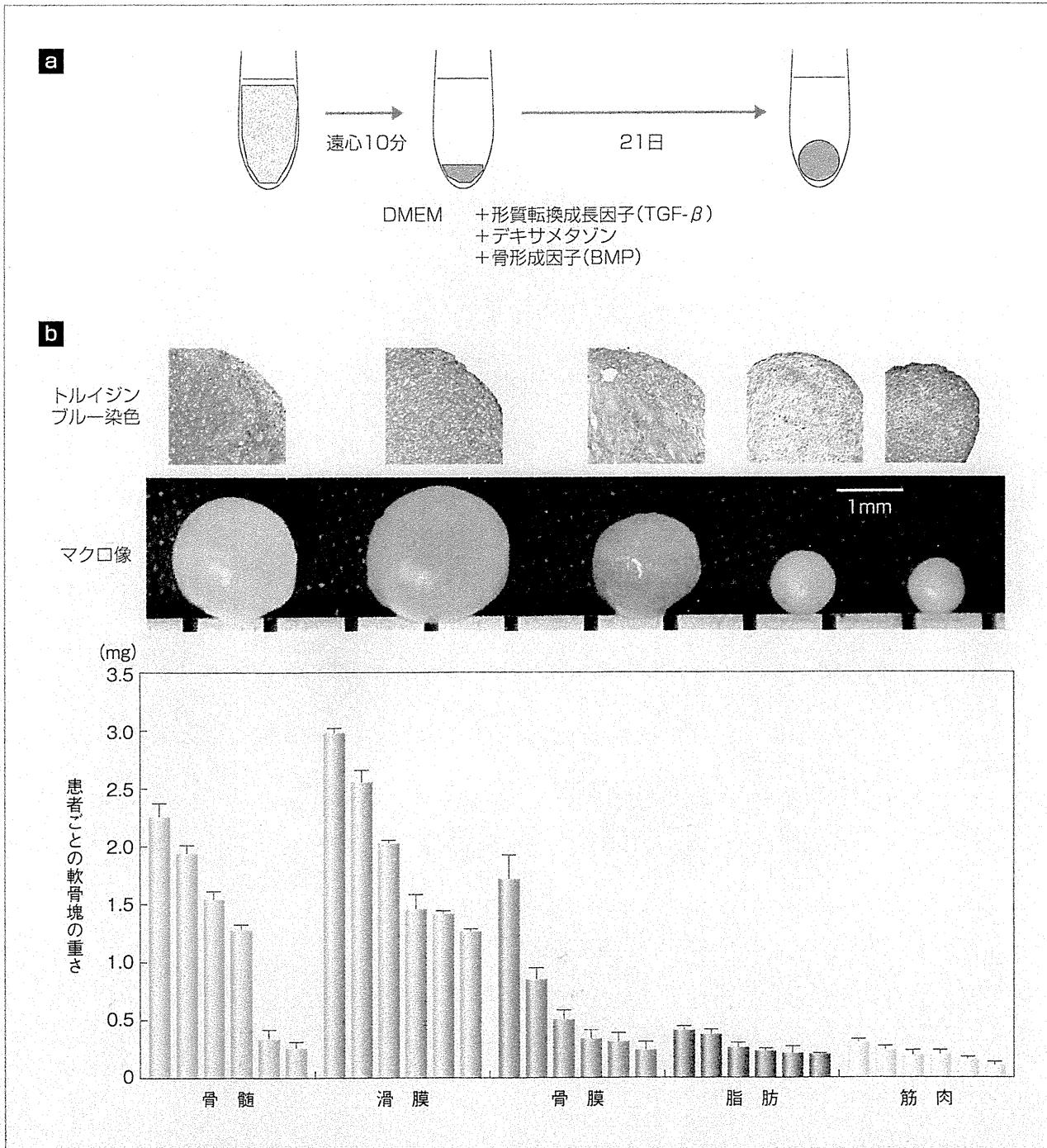


図6 *In vitro*軟骨分化能の比較
チューブ内で軟骨分化培地に浮遊させた25万の間葉幹細胞を10分間遠心し細胞塊とした後に、21日間培養する。軟骨塊のマクロ像、組織像と、ドナーごとの軟骨塊重量を示す。(文献2)より改変)

IV 各種間葉幹細胞の*in vivo*軟骨分化の比較

*in vitro*軟骨分化能の結果は必ずしも*in vivo*の結果を反映しない可能性がある。そこで同一ウサギから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で調整した後に、同数の未分化間葉幹細胞をゲル

に包埋し、移植後骨膜被覆して比較した。4週経過後の組織像を比較すると、滑膜や骨髄由来の間葉幹細胞は豊富に軟骨基質を産生したが、脂肪や筋肉由来のものは軟骨基質の産生が乏しかった

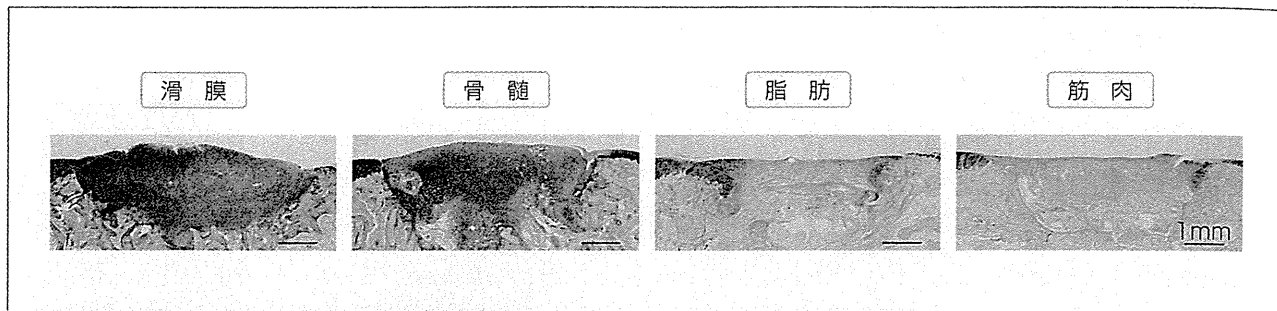


図7 各種間葉幹細胞の*in vivo*軟骨分化能の比較

同一ウサギから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で用意した後に、同数の細胞をゲルに包埋し、移植後骨膜被覆した。4週経過後の、トルイジン・ブルー染色による組織像を示す。(文献4)より改変)

(図7). *in vitro*の軟骨分化能の結果は*in vivo*の結果を反映した⁴⁾。骨髄と滑膜の軟骨分化能は高いが、軟骨は滑膜および骨髄に接することから、

軟骨に隣接する組織由来の間葉幹細胞の軟骨分化能が高いと考えられる。

V 自己血清による増殖能の比較

細胞を増殖させるためには血清成分が必要である。実験レベルでは牛胎児血清が一般的に用いられるが、細胞治療を臨床応用するために牛血清の使用は、牛成分の免疫反応や、感染が問題となり得る。そのため、自己血清の使用が推奨される。また、培養の際、継代を繰り返すと染色体異常を生じる可能性が増えるため、継代しない初代細胞の使用が望ましい。われわれの検討では、滑膜間

葉幹細胞は自己血清による培養で、骨髄間葉幹細胞よりもはるかに多くの初代細胞を採取できる(図8)。実験上多くの間葉幹細胞を移植することにより、軟骨再生の成績をあげたことから⁴⁾、滑膜間葉幹細胞は骨髄間葉幹細胞より自己血清での培養でより多くの細胞を確保できる点で有利である⁵⁾。

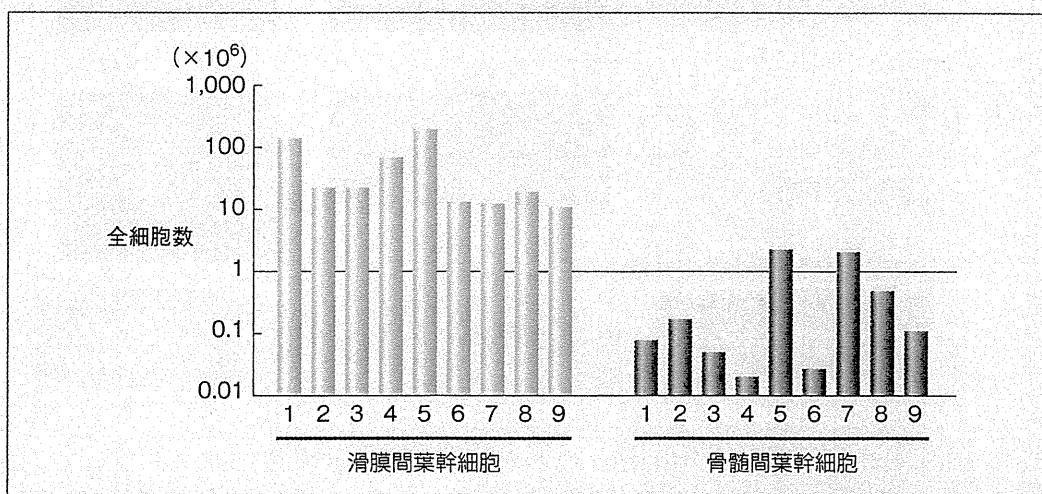


図8 自己血清で14日間培養して得られたヒト滑膜および骨髄由来の間葉幹細胞数

滑膜組織約0.2gと骨髄液約2mLから得られた有核細胞を10%自己血清を用いて同一条件で培養した。9人のドナー由来の結果を示す。

VI 軟骨欠損部への細胞浮遊液の静置

軟骨欠損部への滑膜間葉幹細胞の移植に関して、細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置し、ある時間経過すると、ある割合の細胞が接着すると予測される(図9a)。人工膝関節置換術後に得られたヒトの軟骨を用いて解析すると、10分間静置すると約60%の細胞が接着した(図9b)。ウサギの膝関

節に軟骨欠損を作成し、細胞浮遊液を10分間静置したものは、同じ細胞浮遊液を直接関節内注射したものと比較し、多くの細胞が軟骨欠損部に接着し、優れた軟骨修復を示した(図10)⁶⁾。この方法を用いることにより、ヒトでは関節鏡視下での細胞移植が可能となる。

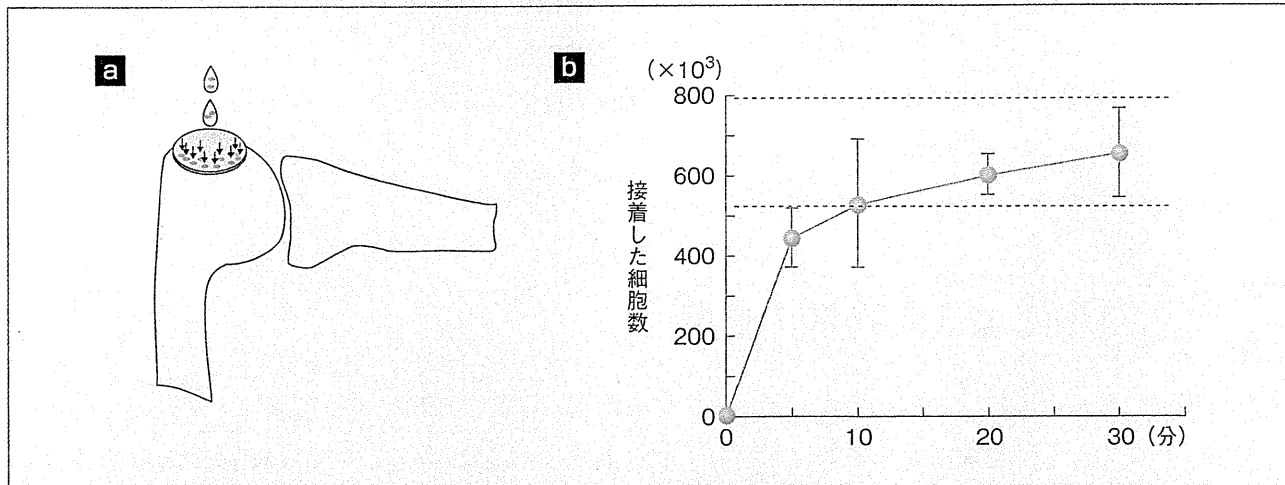


図9 滑膜幹細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部への接着細胞数との関係

(a)滑膜幹細胞浮遊液の軟骨欠損部への静置の模式図。(b)ヒト滑膜間葉幹細胞の浮遊液を、ヒト軟骨欠損部に静置した際の、時間と接着細胞数の関係。(文献6)より改変)

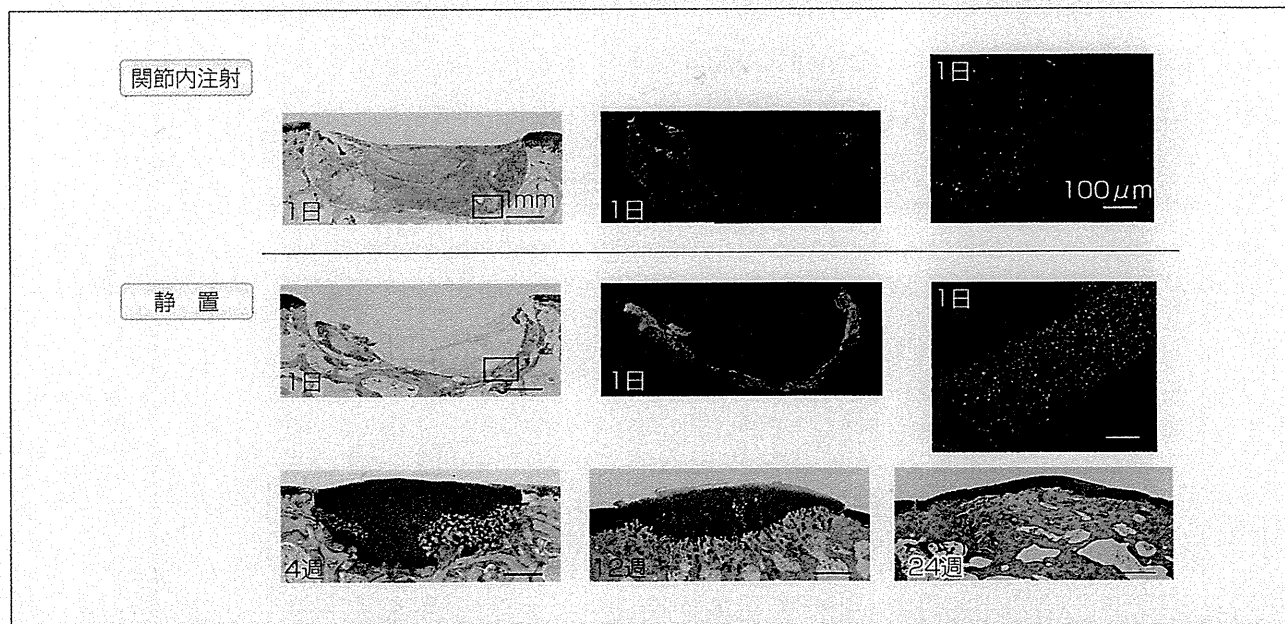


図10 ウサギの膝関節に軟骨欠損を作成し、ウサギ滑膜間葉幹細胞の浮遊液を関節内注射したものと、同じ浮遊液を軟骨欠損部に静置したものと、軟骨修復に関する組織学的比較

蛍光下で移植細胞を赤く、すべての細胞の核を青く発光させている。1日後の比較で、浮遊液を静置したものは、関節内注射したものよりも多くの滑膜間葉幹細胞が軟骨欠損部に接着している。接着した細胞は4週後に軟骨基質を豊富に産生し、その後、骨・軟骨境界部が上昇し、隣接軟骨と厚さが同等になる。(文献6)より改変)

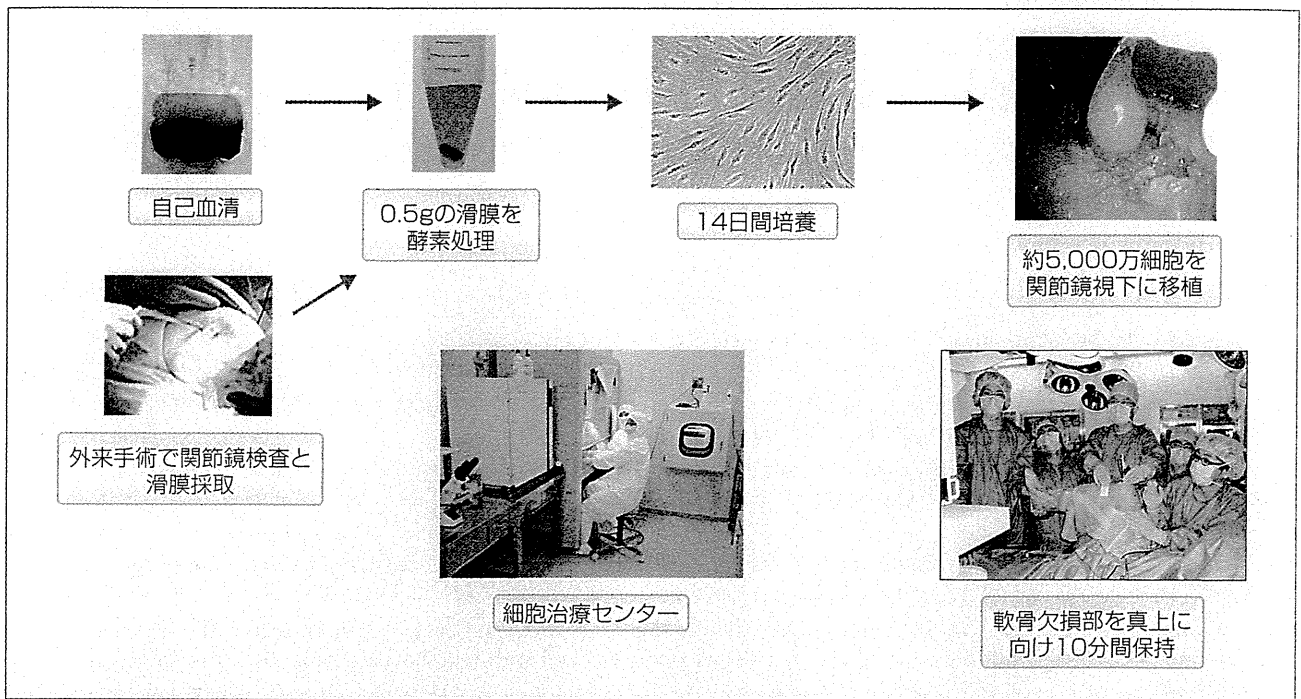


図 11 滑膜幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療のスキーム

外来手術で関節鏡検査の際に滑膜を0.5g採取し、細胞治療センターで酵素処理後、自己血清を用いて14日間培養し、約5,000万の滑膜幹細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に10分間静置し接着させる。

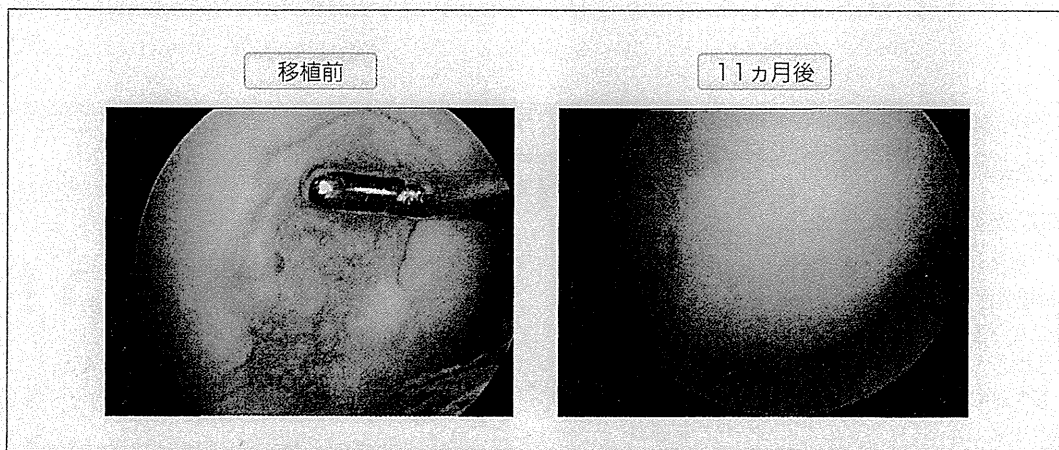


図 12 軟骨欠損に対して滑膜間葉幹細胞移植後11ヵ月時の関節鏡視像
移植前にみられた軟骨欠損が、軟骨様組織で覆われている。

VII 滑膜幹細胞の鏡視下移植術の実際

これまでの基礎研究の成果を基にして、臨床応用を開始した。まず末梢血を採取し、自己血清を分離して用意する。手術室での滑膜の採取に当たって、当初は腰椎麻酔下で関節鏡で観察しながら採取したが、今では関節内麻酔をベースに関節鏡を使用せずに外来手術で採取している。滑膜を

酵素処理後、本学の手術室と同じフロアにある細胞治療センターで、無菌的に滑膜間葉幹細胞を培養する。平均0.5gの滑膜から70mLの自己血清を使用し、14日間で平均5,000万細胞を採取できる。この細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に10分間静置する(図11)。後療法は、1日後か

ら可動域訓練, 2週後から部分荷重, 6週後から全荷重を開始する。これまで重篤な副作用を認めていない。多数の例で軟骨欠損部の再生, 症状の

改善を認めている(図12)。本軟骨治療の真の有効性を判断するためには, 多数例の長期間にわたる観察が必要であると考えている。



参考文献

- 1) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al: Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells, 20 (6) : 530-541, 2002.
- 2) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum, 52 (8) : 2521-2529, 2005.
- 3) Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al: In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 99 (7) : 4397-4402, 2002.
- 4) Koga H, Muneta T, Nagase T, et al: Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. Cell Tissue Res, 333 (2) : 207-215, 2008.
- 5) Nimura A, Muneta T, Koga H, et al: Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. Arthritis Rheum, 58 (2) : 501-510, 2008.
- 6) Koga H, Shimaya M, Muneta T, et al: Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. Arthritis Res Ther, 10 (4) : R84, 2008.

違法コピーに注意!!

そのコピーは大丈夫ですか?

現代社会において, コピー(複写)はなくてはならないものになっていますが, その手軽さゆえに違法コピーが後を絶ちません。あなたが日常的に行っているコピーは大丈夫ですか? 著作権法に定められた例外, つまり, 個人または家庭内で使うために自らコピーする場合や図書館において調査研究等のため一部分をコピーする場合(著作権法第30, 31条等)のごく限られた範囲以外のコピーは, すべて著作権者の許諾を得なければ違法となります。企業や研究施設等で職務上利用するコピーはすべて許諾が必要となりますので, ご注意ください。

違法コピーは健全な創作活動, 出版活動の障害となり, ひいては文化・学術の発展を阻害する大きな要因となります。今一度, 著作権についてお考えください。

許諾の手続きは簡単です!

医学や関連領域の出版物の多くは, (社)出版者著作権管理機構(JCOPY)に複写権の管理・運営が委託されています。複写される場合は事前に(JCOPY)に連絡し許諾を得てください。

JCOPY (社)出版者著作権管理機構

TEL03-3513-6969 FAX03-3513-6979 info@jcopy.or.jp



一般社団法人

日本医書出版協会

不正なコピーは

許さない!

Q&A サイト「それは違法かも。」

「これって違法?」著作権に関するよくある質問にわかりやすくお答えしています。

<http://www.ihokamo.net/>

情報受付窓口「不正コピー情報ポスト」

不正コピーなど, 明らかに違法なものを見つけたら, こちらまで情報をお寄せください。

<https://www2.accsjp.or.jp/piracy/>
フリーダイヤル 0120-765-175



社団法人 コンピュータソフトウェア著作権協会
<http://www2.accsjp.or.jp/>

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**¹⁾ 古賀 英之**²⁾ 二村 昭元**³⁾
森戸 俊行**⁴⁾ 島谷 雅之**⁵⁾ 望月 智之**⁶⁾ 瀬川 裕子**⁷⁾
坂口 祐輔**⁸⁾ 辻 邦和[†] 市野瀬志津子^{††}

軟骨損傷に対して細胞成分を補うことが、再生させるための手段のひとつになる。滑膜由来の間葉幹細胞は他のものよりもコロニー形成能、自己血清による増殖能、*in vitro* 及び *in vivo* 軟骨分化能が高く、軟骨再生に対する cell source として優れている。滑膜幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に 10 分間静置すると、約 6 割の細胞が接着し、さらに浮遊液にマグネシウムを添加すると接着効率さらには増す。我々はこれまでの基礎研究の成果を基にして、滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する軟骨再生医療を開始している。重篤な副作用を認めず、多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている。

Cutting edge on research of cartilage metabolism.

Articular cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells.

Section of Cartilage Regeneration, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

Ichiro Sekiya

Section of Orthopedic Surgery, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

**Takeshi Muneta, Hideyuki Koga, Akimoto Nimura, Toshiyuki Morito,
Masayuki Shimaya, Tomoyuki Mochizuki, Yuko Segawa, Yusuke Sakaguchi**

*Global Center of Excellence Program for International Research Center for Molecular Science
in Tooth and Bone Disease, Tokyo Medical and Dental University.*

Kunikazu Tsuji

Instrumental Analysis Research Center, Tokyo Medical and Dental University.

Shizuko Ichinose

*東京医科歯科大学 大学院 軟骨再生学・教授 (せきや・いちろう)

**東京医科歯科大学 大学院 運動器外科学 ¹⁾ 教授 (むねた・たけし) ²⁾ (こが・ひでゆき) ³⁾ (にむら・あきもと)

⁴⁾ (もりと・としゆき) ⁵⁾ (しまや・まさゆき) ⁶⁾ (もちづき・ともゆき) ⁷⁾ (せがわ・ゆうこ) ⁸⁾ (さかぐち・ゆうすけ)

[†]東京医科歯科大学 グローバル COE (つじ・くにかず)

^{††}東京医科歯科大学 機器分析センター 電子顕微鏡室 (いちのせ・しづこ)

Cell transplantation has shown to be a promising strategy to repair cartilage defects. Mesenchymal stem cells derived from synovium have been shown to be a superior cell source for cartilage regeneration to those from other mesenchymal tissues due to their higher rates of colony formation, proliferation potential with autologous serum, and *in vitro/vivo* chondrogenic potentials. We have found that approximately 60% of synovial mesenchymal stem cells placed on cartilage defects adhered to the defect within 10 min, and the addition of magnesium enhanced this percentage further, which resulted in better cartilage regeneration. Based upon several basic research studies performed in our lab, we have begun the transplantation of synovial stem cells arthroscopically in a clinical study for the treatment of cartilage defects. To date, no adverse events have been reported in the study. Regeneration of cartilage, reduction in defect size and an improvement of symptoms have been obtained in most patients over the last 3 years.

■ 間葉幹細胞とその定義

軟骨組織は細胞密度が低く、血行を欠くため、再生能力が低い。そのため、軟骨欠損に対して細胞成分を補うことが、軟骨再生を向上させるための手段のひとつになる。細胞源として間葉幹細胞は、軟骨組織を犠牲にせず、自分の細胞を使用でき、多数の細胞を確保できる点で有用である¹⁾。

間葉幹細胞は間葉組織由来で、自己増殖能と多分化能を有する細胞集団である。表面抗原型として、CD34(-), CD44(+), CD45(-), CD90(+), CD105(+), CD106(+), CD166(+), Stro-1(+)²⁾のパターンで示されることが多いが²⁾、特定のひとつで代表されるような特異的なものはない。自己増殖能を証明することは容易ではなく、Friedensteinが1960年代に報告したようにコロニー形成能で代わりに示されることが多い³⁾。

本稿では間葉幹細胞を間葉組織由来で、コロニー形成能を有し、*in vitro*で軟骨、骨、脂肪等に分化する能力を有する細胞集団とする。

間葉幹細胞のなかでは骨髄由来の報告が最も多く、一般的なものになっているが、2000年以降、脂肪、筋肉等の骨髄以外の種々の間葉組織からも分離できることが数多く報告されている。最近では、すべての間葉組織に間葉幹細胞が存在すると言ってもよいかもしれない。間葉幹細胞は、元の組織によらない共通した特性を有する一方、元の組

織に依存する特性も報告されるようになっている。

■ 間葉幹細胞のコロニー形成能

コロニー形成率は間葉幹細胞の特性のひとつである。特定のドナーから各種の間葉組織を採取し、有核細胞を種々の細胞密度で播種し、14日間培養して、クリスタル・バイオレットで染色すると、滑膜、前十字靭帯、皮下脂肪等の由来のものは、骨髄に比べてコロニー形成率が100倍、あるいはそれ以上高い(図1)⁴⁾。種々の間葉幹細胞の分化能等の特性を比較する際には、同一ドナーからの組織を用いて可及的に同じ条件で培養させる必要がある。間葉幹細胞の播種密度と培養期間は、増殖能や分化能に影響を与える⁵⁾。培養期間が同じであれば大きなコロニーを形成する培養条件が、その細胞群の最大増殖能を示すものとなる。コロニー同士が接触するとコロニーの大きさは小さくなるが、細胞密度が低いと1ディッシュ当たりの回収量が少なくなる。そのため私たちは、コロニー間の接触が明らかでなく、かつコロニー数が最多のものを至適細胞密度として、基本的にはこの密度で播種した細胞を回収し、解析を行っている。

■ 間葉幹細胞の*in vitro*軟骨分化能

25万の間葉幹細胞をチューブに入れ、10分間

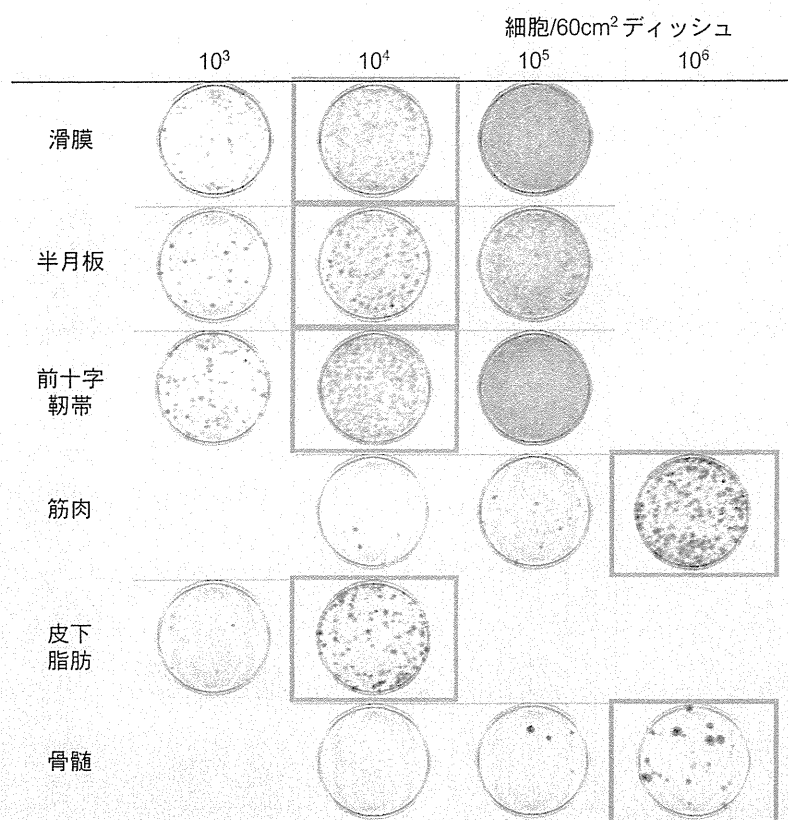


図1 ヒト各種間葉幹細胞のコロニー形成能の比較

人工膝関節置換術の際に間葉組織を採取し、骨髓液は濃度遠心法で、他の組織は酵素処理後に、有核細胞を種々の細胞密度で播種し、14日間培養後、染色したもの。細胞コロニーの大きさが維持され、コロニー数が最大の条件を枠で囲っている。

(巻頭カラーグラフィック7頁参照)

(文献4より)

遠心し、細胞塊とした後に、TGF- β (transforming growth factor- β)、デキサメタゾン、BMP (bone morphogenetic protein) を含む軟骨分化培地で培養すると、底に沈んでいた細胞塊が時間経過とともに丸く、大きくなり、軟骨塊を形成する^{6)~8)}。このペレット培養の軟骨分化過程で軟骨塊が増大するのは、主に軟骨基質が産生されるためである⁹⁾。細胞塊の大きさや重量は軟骨前駆細胞数と軟骨基質産生能を反映し、細胞集団の軟骨分化能の指標となる¹⁰⁾。

同一ドナーから骨髓液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉幹細胞を分離・増殖させ、同数の細胞を21日間ペレット培養させると、滑膜や骨髓由来のものが大きい軟骨塊を形成する(図2)¹¹⁾。同様のことは、ヒトのほかにもラット¹²⁾やウサギ¹³⁾でも示される。このことは滑膜や骨髓由来の間葉幹細胞が軟骨再生の間葉幹細胞源として優れていることを示すものである。

各種間葉幹細胞を *in vitro* で軟骨分化させると、最終的な軟骨塊の組織像は類似する。しかし分化

TGF- β : transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子)
 BMP : bone morphogenetic protein (骨形成因子)

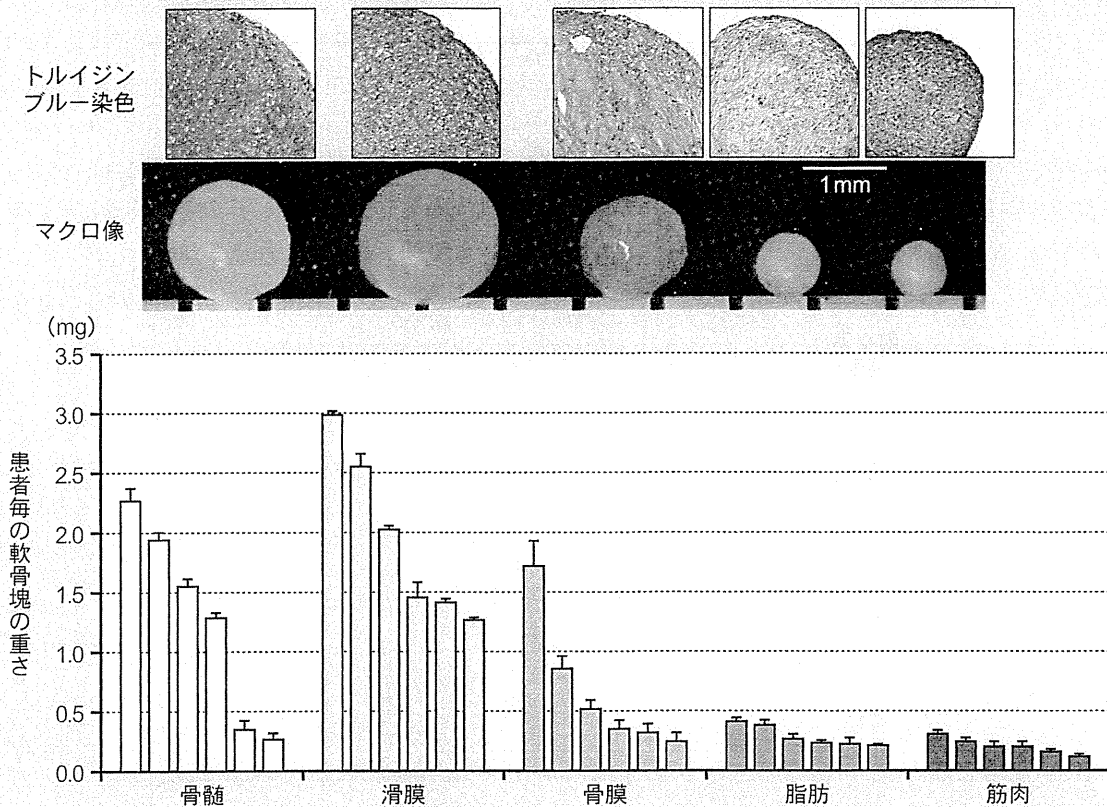


図2 ヒト各種間葉幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能の比較

同一ドナーから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で増殖させた後に、同数の細胞を、同一条件下に *in vitro* で軟骨分化させたもの。

(写真は巻頭カラーグラフィック8頁参照)

(文献 11 より)

過程において、細胞源に由来する形態学的特徴は存在するであろうか。骨髄幹細胞、滑膜幹細胞、軟骨細胞と比較すると、分化導入前の浮遊状態で形態学的差異は明らかでなかったが、1日後に最も明らかな差異を認めた。いずれも細胞塊は2層構造を呈し、特に深層に細胞種による特徴を認めた。骨髄幹細胞は細胞間裂隙を伴わない円形の細胞、滑膜幹細胞では中等度の細胞間裂隙と紡錘形の細胞、軟骨細胞では豊富な細胞間裂隙とともに多角形の細胞で構成された(図3)¹⁴⁾。

各種間葉幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較

In vitro 軟骨分化能の結果は必ずしも *in vivo* の結果を反映しない可能性がある。そこで同一ウサ

ギから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で調整した後に、同数の未分化間葉幹細胞をゲルに包埋し、移植後骨膜被覆して比較した。4週経過後の組織像を比較すると、滑膜や骨髄由来の幹細胞は豊富に軟骨基質を産生したが、脂肪や筋肉由来のものは、軟骨基質の産生が乏しかった。*In vitro* の軟骨分化能の結果は、*in vivo* の結果を反映した(図4)¹³⁾。

脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞

脂肪組織にも間葉幹細胞が存在するが、その軟骨分化能は高くない^{11) 13)}。Dragooらは膝蓋下脂肪体由来の間葉幹細胞が軟骨再生の細胞源として有用と報告しているが、この間葉幹細胞を脂肪由

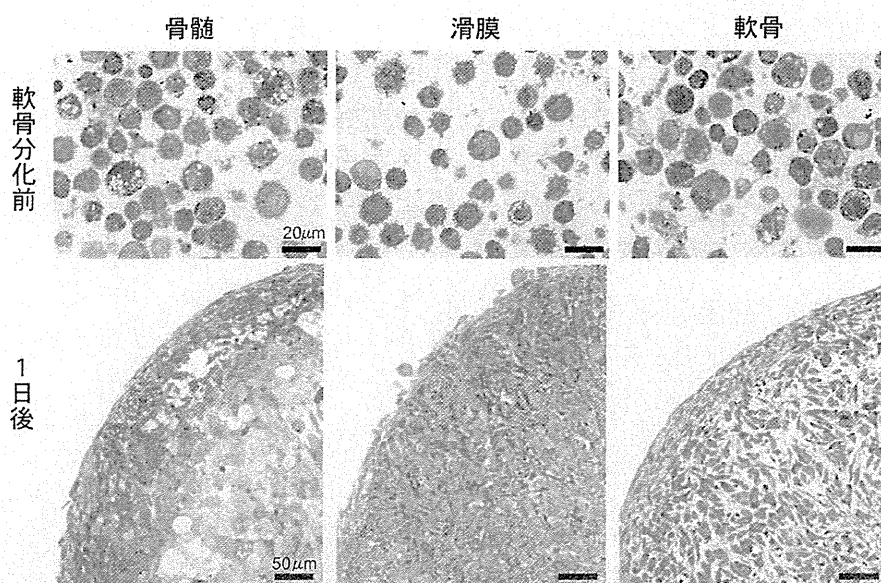


図3 骨髓幹細胞，滑膜幹細胞，軟骨細胞の *in vitro* 軟骨分化過程の形態比較
 ペレット培養開始前と1日後の細胞をエボン包埋し，トルイジンブルー染色したもの。1日後の細胞塊の深層に細胞種による差異を最も大きく認めた。
 (巻頭カラーグラフィック8頁参照) (文献 14 より)

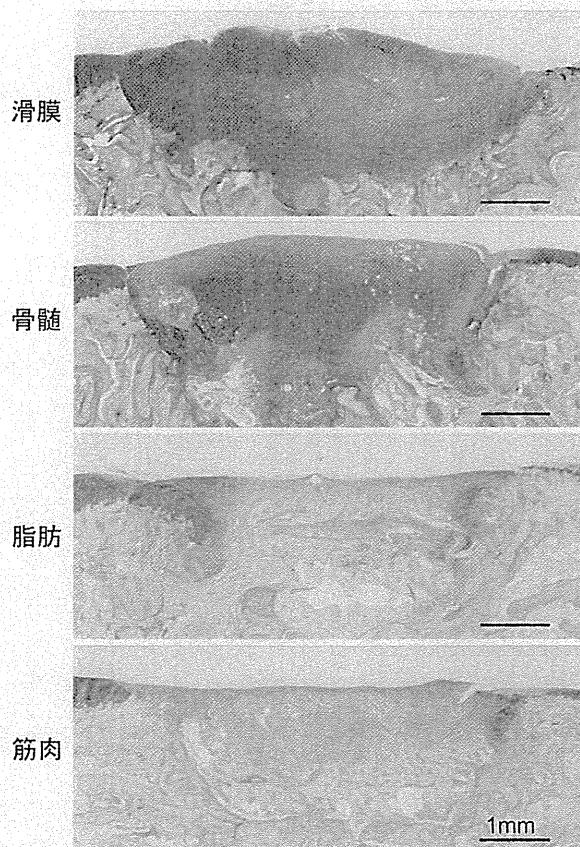


図4 ウサギ各種間葉幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較
 同一ウサギから各間葉組織を採取し，間葉幹細胞を同条件で用意した後に，同数の細胞をゲルに包埋し，移植後骨膜被覆した。4週経過後の，トルイジンブルー染色による組織像。
 脂肪や筋肉由来のものは，軟骨基質の産生が乏しかった。
 (巻頭カラーグラフィック9頁参照) (文献 13 より)

来としていた¹⁵⁾。脂肪性滑膜は比重や組織学的特徴が、線維性滑膜と皮下脂肪の中間に位置する。しかし、これらの組織から間葉幹細胞を採取し、増殖能、軟骨・脂肪・石灰化能、表面抗原等を比較すると、脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞は、皮下脂肪由来のものよりも、線維性滑膜由来のものに類似する(図5)¹⁶⁾。脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞は、脂肪由来ではなく、滑膜由来ととらえるべきである。

平均年齢 20 歳の前十字靭帯損傷のドナーと、平均年齢 70 歳の変形性膝関節症のドナーの滑膜幹細胞を比較すると、線維性滑膜、脂肪性滑膜、いずれにおいても増殖能や軟骨分化能は大きく変わらない。このことは、高齢者の変形性膝関節症に対しても、滑膜幹細胞による細胞治療の可能性を示すものである¹⁶⁾。

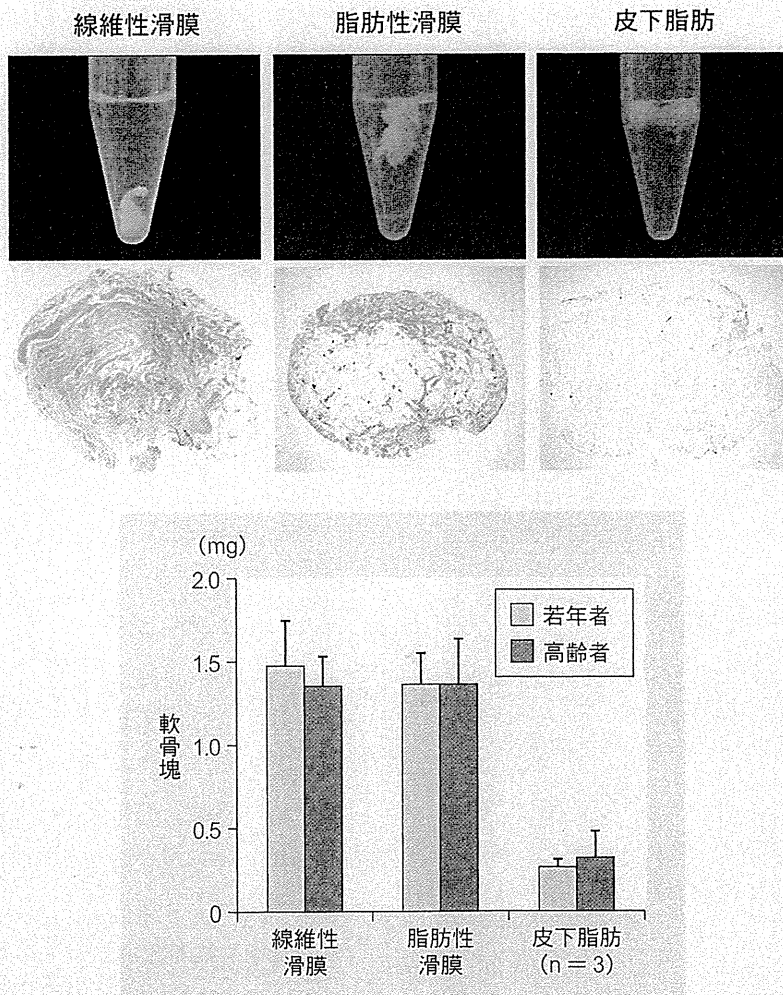


図5 高齢者と若年者由来の滑膜幹細胞に関する軟骨分化能の比較

(写真上段)左より線維性滑膜、脂肪性滑膜、皮下脂肪組織をエッペンドルフ・チューブ内のPBSに入れたもの。(写真下段)HE染色したもの。(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(グラフ)若年者と高齢者由来の各間葉幹細胞を *in vitro* 軟骨分化させた後の軟骨塊重量。

(文献 16 より)

自己血清による間葉幹細胞の増殖

細胞を増殖させるためには血清成分が必要である。臨床応用を考慮すると、感染症や免疫反応を避けるために、自己血清の使用が推奨される。そこで自己血清で十分な数の間葉幹細胞を確保することができるのか検討した。膝前十字靭帯再建術を行う患者から血液を約 100 mL 採取し、閉鎖式バッグを使用して血清を分離した。また、手術中に滑膜組織約 200 mg と脛骨から骨髓液を約 2 mL 採取した。10% 自己血清を用いて 14 日間培養すると、滑膜幹細胞は 9 人すべてから 1,000 万細胞以上採取できた。一方、骨髓間葉幹細胞を 100 万細胞以上採取できたのは、9 人中 2 人のみであった(図6)。次にそれぞれを 50 細胞/cm² で播種し、10% 自己血清と 20% 牛胎児血清で 14 日間培養すると、滑膜間葉幹細胞は自己血清で、骨髓間葉幹細胞は牛胎児血清でより増殖した。ヒト血清には PDGF (platelet-derived growth factor) の AB アイソフォームが豊富に存在した。これは PDGF α レセプターに結合することが報告されているが、滑膜間葉幹細胞は PDGF α レセプ

ターが骨髓間葉幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが差を説明するものと考えられる¹⁷⁾。間葉幹細胞を使用する再生医療を実施するにあたり、用意できる細胞数は多いほどよいが、培養器や自己血清量に限界があることから、5,000 万から 1 億細胞を目標にするのが現実的と私たちは考えている。継代をしないほうが染色体異常のリスクが低く、自己血清を使用する観点から、滑膜幹細胞は骨髓幹細胞よりも有利である。

軟骨欠損部への細胞浮遊液の静置

軟骨欠損部への滑膜間葉幹細胞の移植に関して、細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置し、ある時間経過すると、ある割合の細胞が接着すると予測される。人工膝関節置換術後に得られたヒトの軟骨をブロック状に用意し、軟骨欠損を作成した。DII で標識した滑膜幹細胞 800 × 10³ 個を PBS (phosphate-buffered salines) に浮遊させ、この浮遊液を軟骨欠損部に静置し、時間経過と接着細胞数との関係を解析した。当初予定したものより

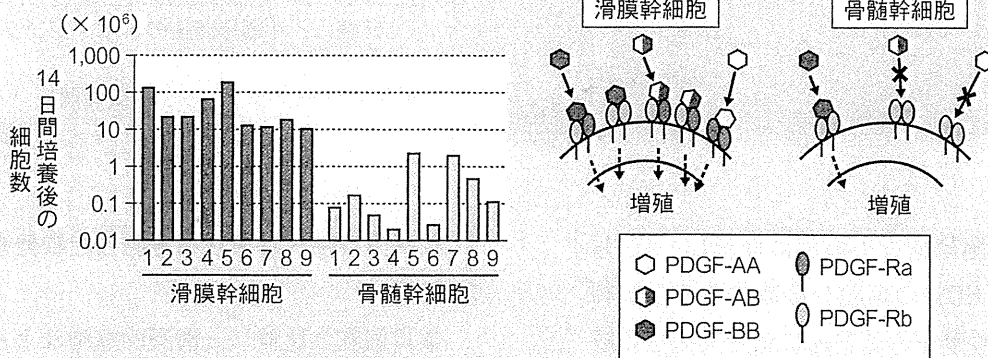


図6 ヒト滑膜および骨髓幹細胞の自己血清による培養

(左) 滑膜組織約 0.2 g と骨髓液約 2 mL から得られた有核細胞を、10% 自己血清を用いて 14 日間培養して得られた細胞数の 9 人の結果。(右) その差を説明するためのスキーム。

(文献 17 より)

PDGF : platelet-derived growth factor (血小板由来成長因子)
 PBS : phosphate-buffered salines (リン酸緩衝生理食塩水)

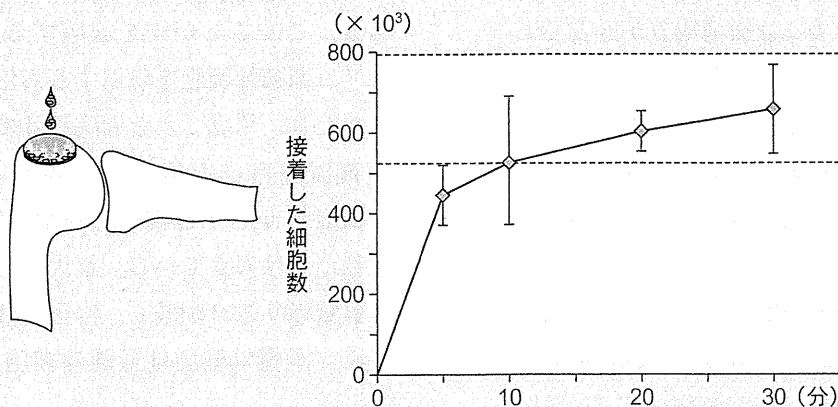


図7 滑膜幹細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部への接着細胞数との関係

(左) 滑膜幹細胞浮遊液の軟骨欠損部への静置の模式図。(右) ヒト滑膜間葉幹細胞の浮遊液を、ヒト軟骨欠損部に静置した際の、時間と接着細胞数の関係。
(文献 18 より)

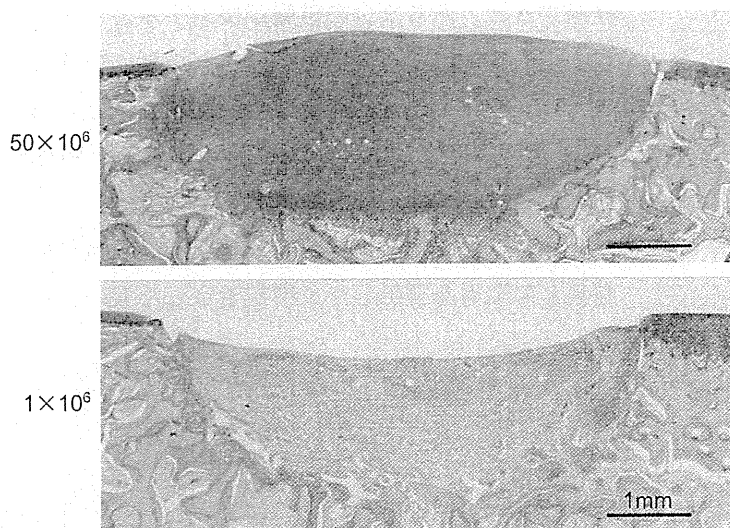


図8 軟骨欠損部へ移植する細胞数と軟骨修復との関係

ウサギの軟骨欠損部に、滑膜幹細胞を 1×10^6 細胞と 50×10^6 細胞をゲルに包埋して、骨膜で被覆して移植し、4週経過後のトルイジンブルー染色による組織像。
(巻頭カラーグラフィック9頁参照)
(文献 13 より)

も早い時間で細胞は軟骨欠損部に接着し、10分間静置すると約60%の細胞が接着することが判明した(図7)。ウサギの膝関節に軟骨欠損を作成し、細胞浮遊液を10分間静置したものは、同じ細胞浮遊液を直接関節内注射したものと比較し、多くの細胞が軟骨欠損部に接着し、優れた軟骨修復効果を示した¹⁸⁾。この方法を用いることにより、ヒトでは関節鏡視下での細胞移植が可能となる。

軟骨欠損部へ移植する細胞数と軟骨修復との関係

軟骨細胞と比較し、滑膜幹細胞はより多くの細胞数を用意できる利点がある。軟骨欠損に対して至適な滑膜幹細胞の数はどうであろうか。ウサギの膝に軟骨欠損を作成し、滑膜幹細胞を 1×10^6 細胞と 50×10^6 細胞をゲルに包埋して、骨膜で被覆して移植し、4週後に組織学的に比較すると、 50×10^6 細胞を移植したものではより多くの軟骨基質が軟骨欠損部に観察された(図8)¹³⁾。軟

骨欠損部に移植した滑膜幹細胞は増殖せず、時間経過とともに減少する¹⁹⁾。より多くの細胞を移植する方が、よい修復を得るのに有利と考えられる。

細胞浮遊液に添加するマグネシウムの効果

細胞接着にはインテグリンが関与し、マグネシウムの影響を受けることが知られている。細胞浮遊液にマグネシウムを添加し、軟骨欠損部への接着の効果を検討した。マグネシウムは用量依存性に、ヒト滑膜間葉幹細胞の collagen coated dish およびヒト軟骨欠損部に対する接着性を増加した。滑膜間葉幹細胞は $\alpha 3$ と $\beta 1$ インテグリンを発現し、 $\alpha 3$ および $\beta 1$ インテグリン中和抗体により、マグネシウムの効果は阻害された。*In vivo*

の検討では、家兎の滑膜間葉幹細胞を標識し、浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置すると、5mMマグネシウム添加群は、移植1日後に接着細胞数を増加させ、2週後にはより豊富な軟骨基質を認めた(図9)²⁰⁾。臨床で使用可能な輸液のなかにマグネシウムを含有するものがある。これを用いた細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置することにより、接着する細胞数が増加し、本法による軟骨再生医療の成績を向上させることが期待される。

滑膜幹細胞の鏡視下移植術の実際

これまでの基礎研究の成果を基にして、膝関節軟骨欠損に対して自己滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床研究を開始した。まず末梢血を採取し、自己血清を分離して用意する。外来手術で関

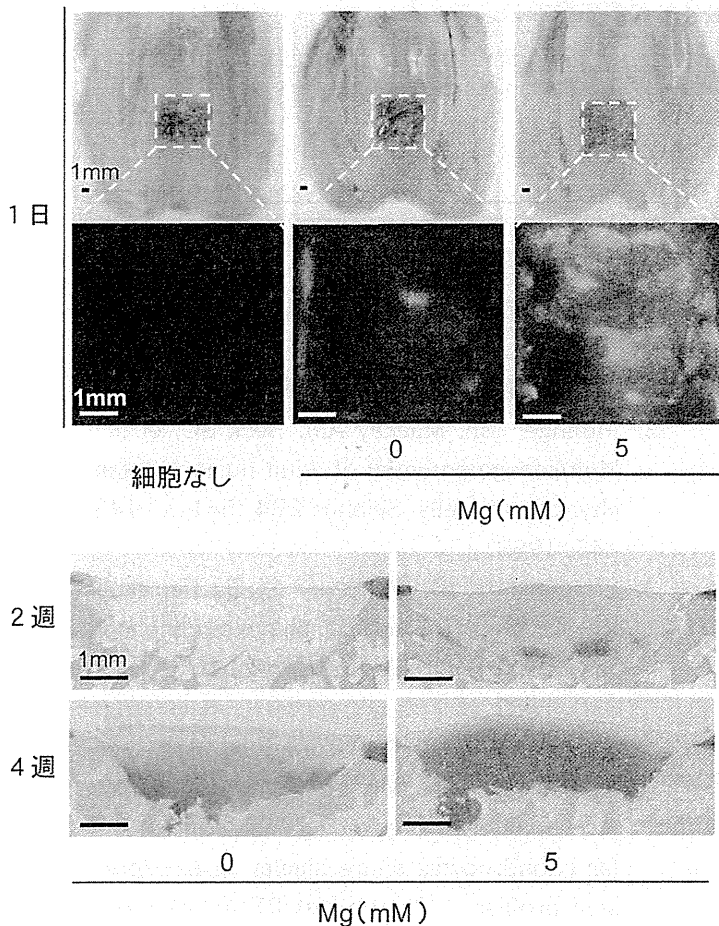


図9 滑膜幹細胞の軟骨欠損部への接着に対するマグネシウムの促進効果

(上)マグネシウムを含む、あるいは含まないPBSにDil標識した滑膜幹細胞を浮遊させ、ウサギ膝の軟骨欠損部に10分間静置後閉創し、1日後に実体顕微鏡で観察。

(下)移植2週、4週後のサフラニン-O染色による組織像。

(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(文献20より)

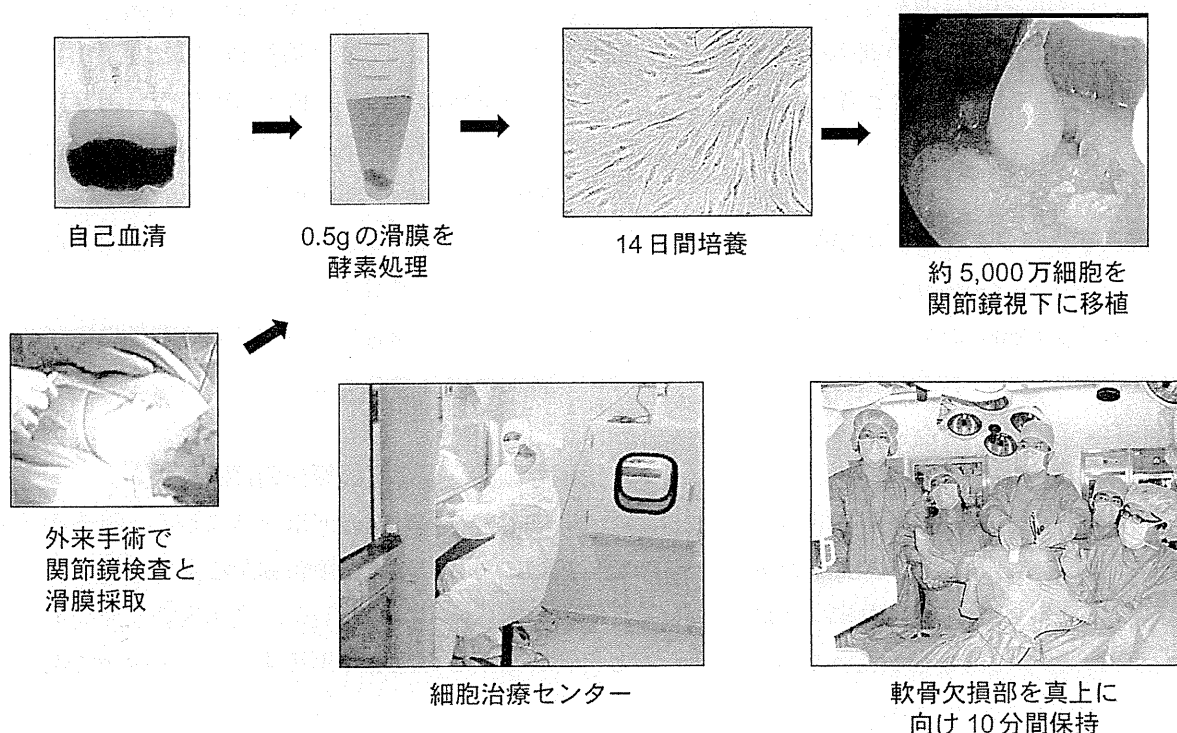


図 10 滑膜幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療のスキーム

外来手術で関節鏡検査の際に滑膜を 0.5 g 採取し、細胞治療センターで酵素処理後、自己血清を用いて 14 日間培養し、約 5,000 万の滑膜幹細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に 10 分間静置し接着させる。
(筆者提供)

関節鏡検査と同時に滑膜を採取する。本学の手術室と同じフロアにある細胞治療センターで、滑膜を酵素処理後、10%自己血清を用いて滑膜幹細胞を 14 日間培養する。平均 0.5 g の滑膜と 70 mL の自己血清から、14 日間で平均 5,000 万細胞を採取できる。この細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に 10 分間静置する(図 10)。後療法は、外固定をせず、2 週後から部分荷重、6 週後から全荷重を開始する。この方法は動物血清や人工素材を必要とせず、低侵襲で実施可能である利点がある。これまで重篤な副作用を認めていない。多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている。本軟骨治療の真の有効性を判断するためには多数例の長期間にわたる観察が必要であると考えている。

文 献

- 1) Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, et al : Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair : a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17 : 1289-1297, 2009.
- 2) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411) : 143-147, 1999.
- 3) Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV : Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16 (3) : 381-390, 1966.
- 4) Segawa Y, Muneta T, Makino H, et al : Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res* 27 (4) : 435-441,

- 2009.
- 5) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al : Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma : conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* **20** (6) : 530-541, 2002.
 - 6) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al : Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* **104** (9) : 2728-2735, 2004.
 - 7) Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, et al : Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* **320** (2) : 269-276, 2005.
 - 8) Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, et al : In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells : Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* **97** (1) : 84-97, 2006.
 - 9) Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al : In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (7) : 4397-4402, 2002.
 - 10) Nagase T, Muneta T, Ju YJ, et al : Analysis of harvest sites and culture parameters for optimal in vitro chondrogenic potential of synovial mesenchymal stem cells from knee joints with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **58** (5) : 1389-1398, 2008.
 - 11) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al : Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues : Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* **52** (8) : 2521-2529, 2005.
 - 12) Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al : Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* **327** (3) : 449-462, 2007.
 - 13) Koga H, Muneta T, Nagase T, et al : Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis : Suitable condition of cell therapy for rabbit cartilage defects *Cell Tissue Res* **333** (2) : 207-215, 2008.
 - 14) Ichinose S, Muneta T, Koga H, et al : Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest* **90** (2) : 210-221, 2010.
 - 15) Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, et al : Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* **85** (5) : 740-747, 2003.
 - 16) Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, et al : Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells : distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* **54** (3) : 843-853, 2006.
 - 17) Nimura A, Muneta T, Koga H, et al : Human synovial mesenchymal stem cells increase with human autologous serum ; A comparison to fetal bovine serum and to bone marrow cells. *Arthritis Rheum* **58** (2) : 501-510, 2008.
 - 18) Koga H, Shimaya M, Muneta T, et al : Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* **10** (4) : R84, 2008.
 - 19) Koga H, Muneta T, Ju YJ, et al : Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* **25** (3) : 689-696, 2007.
 - 20) Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, et al : Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. *Osteoarthritis Cartilage* **18** (10) : 1300-1309, 2010.

Q

軟骨再生の概要と応用の可能性

軟骨は再生しないというのが長年の常識とされていたが、近年の再生医療の進歩により、軟骨再生が可能になりつつあると聞く。治療法の概要と適応について。また、今後の医療応用の可能性と展望（特に変形性膝関節症）はいかがか。（埼玉県 M）

A

軟骨損傷に対する外科的治療として、骨髄刺激、骨軟骨柱移植、軟骨細胞移植等の方法が行われている。最近、骨髄液や滑膜等から採取した幹細胞を移植する方法が試みられている

(1) 概要

軟骨は細胞密度が低く、血行を欠くため、再生能力が低い組織である。軟骨下骨に達しない部分欠損は通常自然修復しない。

一方、軟骨下骨に達する全層欠損の修復は年齢、欠損の大きさや部位などに依存する。小さな欠損は硝子軟骨により修復されることもある。しかし、大きな欠損は修復されずとも線維性組織や線維軟骨によって被覆される。この場合、正常軟骨より組織的、力学的に劣るため、結果として軟骨組織の変性、ひいては関節症性変化を引き起こす。軟骨損傷に対して、これまでにいくつかの外科的治療法が開発されている。

(2) 治療法

①骨髄刺激法

マイクロフラクチャーやドリリングによる骨髄刺激法は軟骨下骨を外科的に穿孔し、骨髄からの出血を促し、軟骨前駆細胞の遊走や、損傷部位でのサイトカイン産生を期待するものである。手技が他よりも容易で特別な器具を必要とせず、低コストであることから、最も普及している方法である。しかし結果が安定せず、線維組織もしくは線維軟骨による修復となる。

②骨軟骨柱移植

骨軟骨柱移植（モザイクプラスティ）は、膝

蓋大腿関節の大腿骨溝の端や大腿骨顆間の非荷重部から軟骨を骨とともに円柱状に採取し、軟骨欠損部位に1つ、あるいは複数個の骨軟骨柱をプレスフィットさせ移植するものである。硝子軟骨で修復される利点があるが、採取する正常骨軟骨柱の数に限界があり、手術侵襲が他のものと比較して大きい。

③自家培養軟骨細胞移植

自家培養軟骨細胞移植は、膝関節の非荷重部位より軟骨組織を採取し、体外で酵素処理後軟骨細胞を分離・増殖し、コラーゲンゲルに包埋した軟骨細胞を移植し、骨膜や人工素材シートで覆い周囲正常軟骨組織に縫合して固定するものである。国内では治験が終了した¹⁾。平成21年にJ-TEC社から製造販売承認申請が厚労省に提出されている。

(3) 滑膜幹細胞移植による軟骨再生

骨髄液や滑膜などの間葉組織中には、よく増殖し、軟骨や骨に分化する能力のある間葉幹細胞が存在する。軟骨細胞は増殖能力が低く、さらに増殖させると脱分化して軟骨細胞の特徴が低下する。このため、細胞数を大量に確保することが難しい。しかし、間葉幹細胞では細胞数を十分確保できる利点がある²⁾。筆者らは、滑膜由来の間葉幹細胞が自己血清でよく増殖すること³⁾、細胞の浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置することにより6割以

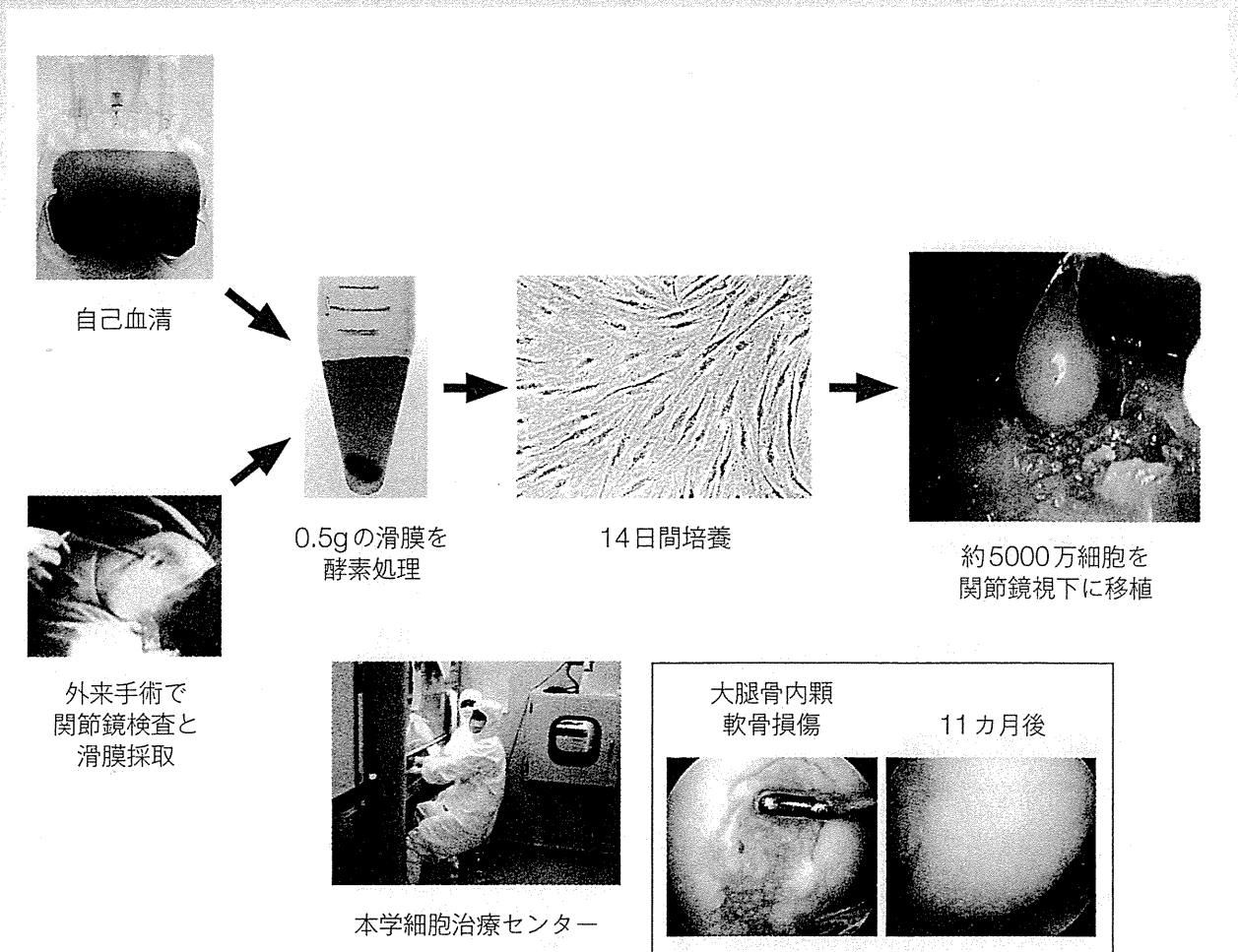


図1 軟骨欠損に対して滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する再生医療

上の細胞が軟骨欠損部に接着すること⁴⁾、未分化な状態の細胞を軟骨欠損部に接着すると環境に応じて分化し、軟骨の基質を産生して軟骨欠損部が軟骨基質で覆われること⁵⁾を基礎研究で明らかにした。

この成果に基づき、3年前から臨床研究を行っている。まず末梢血を採取し、自己血清を分離して用意する。外来手術で関節鏡検査と同時に滑膜を採取する。本学の手術室と同じフロアにある細胞治療センターで、滑膜を酵素処理後、10%自己血清を用いて滑膜間葉幹細胞を14日間培養する。平均0.5gの滑膜と70mLの自己血清から、14日間で平均5000万細胞を採取できる。この細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に10分間静置する。

後療法は、外固定をせず、2週後から部分荷重、6週後から全荷重を開始する。この方法は動物血清や人工素材を必要とせず、低侵襲で実施可能である利点がある。これまで重篤な副作用を認めていない。多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている(図1)。

軟骨は再生しないというのが長年の常識となっていたが、近年の再生医療の進歩で、主に外傷性の軟骨損傷に対しては、低侵襲な方法で再生できるケースも出てきたと言える。

(4) 変形性膝関節症に対する再生医療

高齢化社会において、変形性膝関節症に対する再生医療の開発が期待されている。変形性膝関節症に対して細胞移植を施行した再生

医療は、Wakitaniら⁶⁾により報告されている。これは高位脛骨骨切術の際に、大腿骨内顆にコラーゲンゲルに包埋した骨髄間葉幹細胞を移植し、骨膜で被覆固定したものである。骨切術を行い細胞移植を施行しないコントロール群よりも、移植群は再鏡視及び生検所見が優れていた。ただし、臨床症状は変わらなかった。

この報告は変形性膝関節症の再生医療の難しさを示している。変形性膝関節症の患者の症状が、必ずしも軟骨を再生させることで解決しないことが、治療成績を短期間で評価する際の難しい点である。

(5) 今後の課題と展望

変形性膝関節症の病因や悪化因子は、常に複数あり、関節軟骨のみを一時的に再生できても、再度変性が進行するリスクを有する。アライメント不良例では骨切術が必要と考えられるが、その侵襲は大きい。また筆者らの臨床経験では、間葉幹細胞を軟骨障害部に移植すると、その細胞が軟骨組織に再生するかは、隣接する半月板の状態に影響を受ける。

変形性膝関節症では半月板の変性・摩耗や逸脱を伴い、半月板に対する再生医療を含めた取り組みも必要となる⁷⁾。

患者個々の変形性膝関節症の病態を考え、その病態に応じた複数の低侵襲な治療法を選択するのが、予防を含めた今後の目指すべき治療方法と考える。

▶ 文 献

- 1) Tohyama H, et al : J Orthop Sci 14 : 579, 2009.
- 2) Sekiya I, et al : Stem Cells 20 : 530, 2002.
- 3) Nimura A, et al : Arthritis Rheum 58 : 501, 2008.
- 4) Koga H, et al : Arthritis Res Ther 10 : R84, 2008.
- 5) Koga H, et al : Stem Cells 25 : 689, 2007.
- 6) Wakitani S, et al : Osteoarthritis Cartilage 10 : 199, 2002.
- 7) Horie M, et al : Stem Cells 27 : 878, 2009.

▶ 回 答

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

関矢一郎