

201206003A

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関 矢 一 郎

平成 25 (2013) 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	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	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
	赤木 将男	近畿大学保健医療学部整形外科	教授

目次

I. 総括研究報告

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

----- 7

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)

II. 分担研究報告

1. 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

----- 27

研究分担者 宗田 大 (東京医科歯科大学大学院運動器外科学 教授)

2. 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

----- 39

研究分担者 森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学 准教授)

3. 細胞製剤の品質・安全保証に関する研究

----- 42

研究分担者 清水 則夫 (東京医科歯科大学難治疾患研究所ウィルス治療学 准教授)

4. 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

----- 49

研究分担者 赤澤 智宏 (東京医科歯科大学大学院分子生命情報解析学 教授)

5. 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

----- 51

研究分担者 浅原 弘嗣 (東京医科歯科大学大学院システム発生 教授)

6. 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

----- 54

研究分担者 齋藤 知行 (横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 61

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 71

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、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方法を本課題では検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

滑膜間葉幹細胞集合体は、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、また軟骨分化能が高く、軟骨再生に有用な細胞源であることを明らかにした。変異細胞前段階検出手法(ATM, p53リン酸化アッセイ、AID発現アッセイ、p16メチル化アッセイ、染色体分析、nude mice移植系)を確立し、培養自体のDNAへの損傷は最小限で、最終培養産物にも現時点の解析手法用いて腫瘍細胞が含まれないことを示した。私たちが開発したウイルス・マイコプラズマ検査系で58検体の検査を実施し、滑膜組織3検体、骨髄5検体、骨組織3検体の合計11検体からEBウイルスあるいはパルボB19ウイルスが検出されたが、滑膜幹細胞集合体からはウイルスは検出されず、マイコプラズマに関してはすべての検体が陰性だった。未分化なiPS細胞では緑色、軟骨細胞に終末分化した細胞では赤色に蛍光タンパク質がシフトするDual color iPS細胞を樹立した。

臨床研究を実施するため、2012年12月にヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に課題名「滑膜幹細胞の集合体による軟骨再生」を申請した。

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、浮遊液の状態ですべて軟骨欠損部に 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、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方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS 細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞を 3 次元培養し集合体とすることで、細胞の肉眼的観察が可能となり、表面張力で軟骨欠損部へ容易に接着可能となることが期待できる。しかし、滑膜間葉系幹細胞を集合体とした時の特性や軟骨欠損部移植時の動態は不明である。今回、滑膜間葉系幹細胞集合体の形態および遺伝子プロファイルといった特性、in vitro、in vivo の軟骨分化能を検討した。また in vivo の軟骨分化に関しては、移植凝集体数などの軟骨分化に影響を与える因子についても検討した。

(2) 変異細胞評価

滑膜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。

(3) 感染症検査

本年度は、これまでに開発した 17 種類のウイルス検出を可能とする網羅的ウイルス検査系および 142 種類のマイコプラズマ属を検出するマイコプラズマ検査系の感度・交差反応を検討後、末梢血・骨髄・滑膜組織および滑膜間葉系幹細胞集合体の検査を実施した。さらに、キアゲン社の QIA Symphony および固相化試薬を用いた自動検査系の開発を開始した。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

関節軟骨は損傷すると自然治癒が困難な組織であり、未だ有効な治療法が確立していない。また、軟骨再生を目指した移植ドナー細胞に関する基礎的解析は乏しく、軟骨治療に向けての基礎的・応用的研究は急務である。本研究では、体細胞採取の際の侵襲性が低く、ほぼ無限に増殖可能な iPS 細胞を利用して間葉系幹細胞を誘導し、軟骨を再生する技術開発

を目指す。

B. 研究方法

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

ヒトおよび日本白色家兎の滑膜より、間葉幹細胞を採取した。2.5x10⁵の滑膜間葉幹細胞を35μl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。ヒト滑膜間葉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。ヒト滑膜間葉幹細胞集合体および従来の単層培養した滑膜間葉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。*in vivo*の検討のため、日本白色家兎の膝蓋大腿関節の大腿骨側に5x5x1.5mmの軟骨欠損を作成し、自己滑膜間葉幹細胞集合体を、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を発現する兎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。1.0x10⁵細胞からなる集合体、25個、100個の移植も行い、4週で肉眼的、組織学的検討を行った。移植細胞の生存率を検討するため、DiIで染色した集合

体を10個、80個移植し、2週後の移植細胞のTUNEL染色による検討を行った。また96well plateで、1個ないし40個の集合体を1週間培養後の生存率をTUNEL染色により検討した。

(2) 変異細胞評価

1) DNA損傷修復応答の解析

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、ATM、P53のリン酸化特異的抗体を用いて染色を行った。またAID(activation induced deaminase)の発現についても同様に抗AID抗体を用いた染色を行った。AIDの発現についてはリアルタイムPCR法を用いて定量化した。コントロールとしては、EBVで形質転換したB細胞株を使用した。

2) p16メチル化アッセイ

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。また本方法を用いて培養滑膜間葉系幹細胞から抽出したDNA(10検体)にてリアルタイムPCRを行った。

3) 腫瘍化アッセイ

通常のkaryotypingとnude miceへの移植系を用いて腫瘍化の検証を行った。

(3) 感染症検査

1) 検査系の感度

17 種類の披検ウイルス陰性が確認されている細胞 DNA あるいは RNA 0.5 μ g に各ウイルスのスタンダード DNA あるいは RNA を 5、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、PCR 法により検討した。

2) 交差反応性の確認

披検ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA あるいは RNA 0.5 μ 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検討した。

3) 関節組織・末梢血・滑膜間葉系幹細胞集合体のウイルス・マイコプラズマ検査、提供者より採取した、滑膜組織 10 検体、骨髄(細胞成分)9 検体、骨髄(液体成分)9 検体、末梢血(細胞成分)10 検体、末梢血(液体成分)10 検体、骨組織 7 検体、滑膜幹細胞集合体 10 検体の合計 58 検体に対して、17 種類のウイルスの検査を実施した。また上記の合計 58 検体に対し、マイコプラズマ検査を実施した。

4) ウイルス・マイコプラズマ検査系の自動化に関する取組

核酸抽出、分注、増幅操作を自動で行う QIA symphony に我々が開発した固相化試薬を設置し、ウイルス・マイコプラズマ検査を自動化するための検討を実施するため、キアゲン社と共同研究契約を

締結して研究室に QIA symphony を設置した。実験は、QIA symphony DNA kit を使用した末梢血からの DNA 抽出実験から始めた。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

未分化の指標として Nanog もしくは Oct プロモータ制御下に EGFP を組み込んだ iPS 細胞を使用し、軟骨細胞への分化の指標となるプロモータ制御下に赤色蛍光色素を発現する組み換え iPS 細胞を樹立する。未分化な iPS 細胞では緑色、軟骨細胞に終末分化した細胞では赤色に蛍光タンパク質がシフトする Dual color iPS 細胞を樹立する。軟骨分化誘導過程を経時的に可視化することで、未分化 iPS 細胞や骨細胞の混入を防ぎ、安全な iPS 細胞移植技術の開発を目指す。

C. 研究結果

(1) 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可能であった。表層の細胞は紡錐形で、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が、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。

in vitro で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。

in vivo では、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みとめなかった。比較的低密度、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 陽性細胞をみとめた。再生した軟骨は GFP 陽性細胞とともに GFP 陰性の細胞もみとめた。

集合体の大きさがその特性に影響するかもしれないため、より小さい大きさの、 1.0×10^5 細胞からなる集合体、25 個、100 個の移植も行った。移植 4 週後、より低密度な 25 個移植群で、良好な軟骨再生が得られた。

より多くの集合体を移植した時に、成績が不良な原因を検討するため、TUNEL 染色による生存率の検討をおこなった。移植 2 週後に、10 個の集合体移植時と比べて、80 個の集合体移植時に、多くの TUNEL 陽性の細胞死した細胞をみとめた。

低栄養な環境が原因のひとつかもしれないため、in vitro での集合体の生存率の検討も行った。96well plate で、1 個ないし 40 個の集合体を 1 週間培養すると、40 個の集合体を培養した well で、培養液の色が赤から黄色になり、また TUNEL 陽性細胞を多く認めた。

(2) 変異細胞評価

1) DNA 損傷修復応答の検出

培養滑膜間葉系幹細胞（集合体）10 検体は、いずれも ATM, p53 のリン酸化は極めて軽微あるいは陰性と判断した。また AID についても染色条件を決定して、検討を行った。発現は極めて微弱であるが、陽性かどうかをさらに確実にするために、リアルタイム PCR 系を立ち上げて測定したところ、すべての検体で陰性であることが明らかになった。

2) p16 メチル化アッセイ

現時点では少なくとも 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ているが、今回の実験により培養滑膜間葉系幹細胞から DNA を抽出し、検討したところすべて感度以下であることが明らかになった。

3) 腫瘍化アッセイ

通常の karyotyping と nude mice への移植系では培養滑膜間葉系幹細胞には腫瘍細胞がないことが検証された。

(3) 感染症検査

1) 検査系の感度

測定系は全てのウイルスに対して 5 copies/reaction の測定感度を持つこと、偽陽性反応は生じないことを確認した。

2) 交差反応性の確認

検査対象ウイルス間には交差反応性が無く、特異的に検査対象ウイルスを検出できることを確認した。

3) 関節組織・末梢血・滑膜幹細胞集合体のウイルス検査

合計 58 検体に対して、17 種類のウイルスの検査を実施したところ、滑膜組織 1 検体、骨髄(液体成分)1 検体、血液(細胞成分)1 検体の合計 3 検体から EB ウイルス (EBV) が、骨髄(液体成分)1 検体から水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) が、滑膜組織 2 検体、骨髄(細胞成分)1 検体、骨髄(液体成分)1 検体、骨組織 3 検体の計 7 検体からパルボ B19 ウイルス (PVB19) が検出された。しかし、滑膜間葉系幹細胞集合体からウイルスは検出されなかった。上記の合計 58 検体に対し、マイコプラズマ検査を実施した。その結果、各組織、滑膜間葉系幹細胞集合体いずれからもマイコプラズマは全く検出されなかった。

4) ウイルス・マイコプラズマ検査系の自動化に関する取組

QIASymphony DNA kit を使用した末梢血からの DNA 抽出実験を行ったところ、末梢血から DNA が良好に抽出できることを確認した。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

軟骨分化の指標としてコラーゲン 2 (Col2) プロモータを用い、下流に mCherry を挿入した Col2-mCherry ベクターを作成した。マウス骨髄より間葉系幹細胞を分離し、Col2-mCherry ベクターをトランスフェクションして、軟骨分化条件における mCherry の発現誘導を調べた。その結果、軟骨分化後に赤色蛍光が観察され、また mCherry のモノクローナル抗体による免疫染色においても mCherry の発現を確認することができた。ATDC5 細胞 (マウス軟骨前駆細胞) を用いた観察でも同様に、分化に応じた赤色蛍光が観察された。現在、この発現ベクターをマウス iPS 細胞にトランスフェクションして、間葉系幹細胞の誘導・軟骨細胞への分化を行なっている。

D. 考察

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

ウサギ軟骨欠損部への移植で、幹細胞集合体を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幹細胞移植の臨床治験を行っている。2 週間の培養で約 5000 万の Passage 0 細胞を得られ、約 280mm² の軟骨欠損部へ移植している。今回のウサギモデルでは、滑膜間葉幹細胞集合体を無駄なく欠損部へ

接着させることができ、10 個の集合体 (250 万細胞) を 25mm² の欠損部へ移植した際に最も良好な結果が得られた。これらの結果から、ヒトにおいて、passage 0 で十分な細胞数を得ることができるといえる。

(2) 変異細胞評価

本年の研究では実際の腫瘍化の検出としての常法 (karyotyping と nude mice への移植系) が用いられ、いずれも陰性であることが明らかになった。また DNA 損傷修復応答でも培養中のストレスが最小限であることが判明した。p16 遺伝子メチル化アッセイも実稼働が開始された。これらの手法では例えばさらに p16 メチル化アッセイの感度を上げた場合などに、陽性との結果になる可能性があり、input 量にも依存するという状況も鑑み、さらなる検証が必要となると思われる。また今後の臨床応用に向けては変異細胞自体の検出系が重要になり、上記の常法以外にも foci 形成アッセイなどの常法や error rate 変化解析などを加えていく必要があるかもしれない。本格的な臨床応用に向けて、さらに解析を進めて行く必要がある。

(3) 感染症検査

昨年度の研究に使用した検査系の感度は 50 copies /reaction であったが、プライマー配列の改良により感度が上昇し

ていることが確認された。我々の培養法では EBV, VZV, PVB19 が混入しても培養中には増殖しないことが示唆された。マイコプラズマに関しては、各組織からも培養細胞からも全く検出されず、我々が実施する再生医療において、原材料からの持ち込みによるマイコプラズマ汚染の可能性は低いことが示唆された。本研究により得られたウイルス・マイコプラズマ感染に関する情報は再生医療実現化のための基礎資料として有用であり、今後他の再生医療実施施設に情報提供していくとともに、作成した検査系の技術導出も積極的に行っていきたい。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

軟骨分化誘導過程を経時的に可視化することで、未分化 iPS 細胞や骨細胞の混入を防ぐことが可能になる。現在、iPS 細胞での蛍光発現を解析中であるが、間葉系幹細胞では Col2 プロモータは機能していたことから、Dual color iPS 細胞は樹立可能だと考えられる。iPS 細胞を用いた軟骨治療は現在基礎研究の段階であり、臨床研究までは 5 年以上を要すると言われているが、分化誘導過程の最適化により安全性が向上し、より早期に臨床応用が可能になると考えられる。

E. 結論

滑膜間葉幹細胞集合体は、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、また軟骨分化能が高いことから、軟骨再生に有用な細胞源である。変異細胞前段階検出手法（ATM, p53リン酸化アッセイ、AID 発現アッセイ、p16 メチル化アッセイ、染色体分析、nude mice 移植系）を確立し、培養自体の DNA への損傷は最小限で、最終培養産物にも現時点の解析手法を用いて腫瘍細胞が含まれないことを明らかにした。私たちが開発したウイルス・マイコプラズマ検査系で 58 検体の検査を実施し、滑膜組織 3 検体、骨髄 5 検体、骨組織 3 検体の合計 11 検体から EB ウイルスあるいはパルボ B19 ウイルスが検出されたが、滑膜幹細胞集合体からはウイルスは検出されなかった。マイコプラズマに関してはすべての検体が陰性だった。未分化な iPS 細胞では緑色、軟骨細胞に終末分化した細胞では赤色に蛍光タンパク質がシフトする Dual color iPS 細胞を樹立した。なお、臨床研究を実施するため、2012 年 12 月にヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に課題名「滑膜幹細胞の集合体による軟骨再生」を申請した。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki S, **Muneta T**, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, **Sekiya I**. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*14(3)R136,2012.

2. Nakamura T, **Sekiya I, Muneta T**, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E. 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. *Cytherapy*14(3)327-338,2012.

3. Otabe K, **Muneta T**, Kawashima N, Suda H, Tsuji K, **Sekiya I**. Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell Medicine*4(1)13-21, 2012.

4. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, **Sekiya I**, Caroom CT, Prockop DJ, Thomas DB. Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am*18;94 (8)701-12, 2012.

5. Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, **Muneta T, Sekiya I**, Prockop D. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage*20 (10)1197-

12072012.

6. **Sekiya I**, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, Tsuji K, Miyaguchi K, Ogishima S, Tanaka H, **Muneta T**

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

JOrthop Res30(6)943-9492012.

7. Koga H, **Muneta T**, Yagishita K, Ju YJ, **Sekiya I**.

Surgical management of grade 3 medial knee injuries combined with cruciate ligament injuries.

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 20(1)88-942012.

8. Futami I, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa, N., Sadatsuki R, **Muneta T**, Arikawa-Hirasawa, E, **Sekiya I**, Kaneko K.

Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium.

PLoS One 7E455172012.

9. 鈴木 志郎、**関矢 一郎**、宗田 大
軟骨再生の細胞源としての滑膜間葉系幹細胞集合体の特性と有用性

整形・災害外科 55(10)1243-12482012.

10. **関矢 一郎**、宗田 大

関節と体性幹細胞 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生

BIO Clinica27 (9) 830-8342012.

11. **関矢 一郎**、宗田 大

軟骨治療の進歩：滑膜幹細胞による軟骨再生

日本医師会雑誌

141 (8)17392012.

12. **関矢 一郎**、宗田 大

滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用

整形外科 63 (3) 2282012.

13. **関矢 一郎**、宗田 大

滑膜間葉幹細胞を使った軟骨再生
再生医療叢書 第6巻 骨格系

38-512012.

14. **関矢 一郎**、宗田 大

滑膜由来の幹細胞による再生医療

15. **関矢 一郎**、赤木 将男

変形性膝関節症の治療

—現状と展望— 鼎談

Bone Joint Nerve4(2)159-165

167-1792012

16. **森尾友宏**

大学病院などの再生医療を支える細胞プロセッシング室運営マニュアル

新潟大学 医歯学総合病院 生命科学医療センター編著、

森尾友宏、畠賢一郎、中田光監修、星雲社、

2012年6月30日

17. Ogawa M, Sugita S, **Shimizu N**,

Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M

Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis.

Jpn J Ophthalmol. 56(6):529-535, 2012.

18. Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M.

Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.

Invest Ophthalmol Vis Sci.

12;53(8):4692-8. 2012.

19. Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, **Shimizu N**, Mochizuki M.

Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 250(12):1877-1883, 2012.

20. Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 250:391-398, 2012.
21. Correlation between multiple RET mutations and severity of Hirschsprung's disease. Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, **Akazawa C**. Pediatr Surg Int. 2013 Feb; 29(2): 157-63.
22. Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K, **Akazawa C**, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. J Neurosci. 2012 Aug 22; 32(34): 11586-99.
23. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, **Asahara H**. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity. J Biol Chem. 287(26):22206-15. (2012)
24. **浅原弘嗣**
軟骨細胞分化における miRNA
CLINICAL CALCIUM
22 (5)
25. Decreased Semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. Takagawa S, Nakamura F, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, **Saito T**. BMC Musculoskelet Disord. 2013 Jan 23;14:40.
26. Pyoderma gangrenosum with wrist joint destruction: case report. Choe H, Sakano H, Takigami H, Inaba Y, Matsuo K, **Saito T**. J Hand Surg Am. 2013 Feb;38(2):357-61.
27. Mid-term results of stryker® scorpio plus mobile bearing total knee arthroplasty. Kobayashi H, Mitsugi N, Mochida Y, Taki N, Akamatsu Y, Aratake M, Ota H, Ishii K, Harigane K, Ideno T, **Saito T**. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 2012 Oct 18;4(1):38.
28. Good long-term outcome of synovectomy in advanced stages of the rheumatoid elbow. Ishii K, Inaba Y, Mochida Y, **Saito T**. Acta Orthop. 2012 Aug;83(4):374-8.
29. Quantitative evaluation of periprosthetic infection by real-time polymerase chain reaction: a comparison with conventional methods. Miyamae Y, Inaba Y, Kobayashi N, Choe H, Ike H, Momose T, Fujiwara S, **Saito T**. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;74(2):125-30.
30. Plasma accumulation of fondaparinux 2.5 mg in patients after total hip arthroplasty.
31. Yukizawa Y, Inaba Y, Watanabe S, Yajima S, Kobayashi N, Ishida T, Iwamoto N, Hyonmin C, Nakamura M, **Saito T**. J Thromb Thrombolysis. 2012 Nov;34(4):526-32.
32. Radiologic analysis of the effect of tocilizumab on hands and large joints in

- children with systemic juvenile idiopathic arthritis.
Inaba Y, Ozawa R, Aoki C, Imagawa T, Mori M, Hara R, Miyamae T, **Saito T**, Yokota S.
Mod Rheumatol. 2012 Jul 13. [Epub ahead of print]
33. Low bone mineral density is associated with the onset of spontaneous osteonecrosis of the knee.
Akamatsu Y, Mitsugi N, Hayashi T, Kobayashi H, **Saito T**. Acta Orthop. 2012 Jun;83(3):249-55.
34. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors.
Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T, Takagawa S, Muschler GF, **Saito T**. J Orthop Res. 2012 Sep;30(9):1516-21.
35. Medial versus lateral condyle bone mineral density ratios in a cross-sectional study: a potential marker for medial knee osteoarthritis severity.
Akamatsu Y, Mitsugi N, Taki N, Kobayashi H, **Saito T**. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012 Jul;64(7):1036-45.
36. Association between venous thromboembolism and plasma levels of both soluble fibrin and plasminogen-activator inhibitor 1 in 170 patients undergoing total hip arthroplasty.
Yukizawa Y, Inaba Y, Watanabe S, Yajima S, Kobayashi N, Ishida T, Iwamoto N, Choe H, **Saito T**. Acta Orthop. 2012 Feb;83(1):14-21.
37. Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, **Akagi M**, Fukuda K.
Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants.
Inflamm Res. 61101093-11002012
38. Hashimoto K, **Akagi M**, Kishimoto H, Teramura T, Onodera Y, Chiba Y. Characterizing Non-surgical Murine Knee Osteoarthritis Model Produced by Controlled Forced Running.
J Orthop Res. submitted
39. Tsukamoto I, **Akagi M**, Inoue S, Teramura T, Onodera Y, Ohtani K. Renin-angiotensin system could regulate the hypertrophic differentiation of chondrocytes through activating angiotensin II type 1 and type 2 receptors
Biochemical and Biophysical Research Communications Submitted
40. 橋本和彦、**赤木將男**
強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性関節症モデルの作成
近畿大学医学雑誌
371・211-192012
41. 井上 紳司、墳本 一郎、**赤木 將男**
レニン・アンジオテンシン系コンポーネントの軟骨組織における発現-軟骨細胞の増殖分化への関与
近畿大学医学雑誌
37 3・4 121-130 2012
2. 学会発表 (研究代表者分)
a) 国際学会発表
Kahaer A, Muneta T, Yamaga M, Miyatake M, Yamada J, Matsukura Y,

Sekiya I Tsuji K.

BMP7 is prerequisite for postnatal joint homeostasis
The 6th Global COE International Symposium. Poster, Tokyo, Japan, 2012.1.23

Koga H, Muneta T, Sekiya I.

Effect of graft fixation angles on knee kinematics, graft tension curves and load sharing in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction.
International Symposium on Ligaments & Tendons - XII, Oral, San Francisco, LA, 2012.2.3.

Otabe K, Sekiya I, Kawashima N, Tsuji K, Muneta T.

Properties of mesenchymal stem cells derived from removed teeth.
2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Annual Meeting, San Francisco, 2012.2.4-7.

Hatsushika D, Sekiya I, Horie M, Takeshi Muneta T.

Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in rabbit massive meniscal defect
2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Annual Meeting, Oral, San Francisco, 2012.2.6.

Miyatake K, Yamaga M, Sekiya I, Muneta T, Tsuji K.

Human chitinase 3-like protein 2 (YKL39) is a novel secreted protein which supports cell proliferation and chondrocytic differentiation of ATDC5
2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Poster, San Francisco, 2012.2.4.

J Yamada, K Miyatake, M Yamaga, I Sekiya, T Muneta, K Tsuji.
Follistatin alleviates articular cartilage

degradation induced by carrageenan.
2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Poster, San Francisco, 2012.2.4.

Ozeki N, Sekiya I, Otabe K, Katagiri H, Okuno M, Tsuji K, Saito T, Muneta T.
BMP-7 treated Achilles tendon transplantation for meniscal defect in a rat model

2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Annual Meeting, San Francisco, 2012.2.4-2.7.

Horie M, Choi H, Sekiya I, Muneta T, Prockop D J.

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.

2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Annual Meeting, Oral presentation, San Francisco, 2012.2.5.

Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Sekiya I.

Properties and effectiveness of aggregated synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration.
2012 Orthopaedic Research Society(ORS), Poster, San Francisco, 2012.2.4-7.

Koga H, Muneta T, Sekiya I.

Effect of Graft Fixation Angles on Knee Kinematics in Double-bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction.
58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Oral, San Francisco, LA, USA, 2012.2.4-7.

Kahaer A, Muneta T, Yamaga M, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y,

Sekiya I, Tsuji K.

BMP7 is prerequisite for postnatal joint homeostasis

The 25th Annual Meeting of The Japanese Society of Cartilage Metabolism. Poster, Nagoya, Japan, 2012.3.9.

Tsuji K, Yamada J, Miyatake K, Abula K, Matsukura Y, Sekiya I, Muneta, T.

Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degradation induced by carrageenan in mice

World Congress on Osteoarthritis, Barcelona' s International Convention Centre, Barcelona, Spain, 2012. 4. 26-29.

Miyatake K, Tsuji K, Yamada M, Kahaer A, Matsukura Y, Sekiya I, Muneta T.

Articular cartilage degradation induced by extensive treadmill exercise is greatly exacerbated by estrogen depletion in mice.

2012 Osteoarthritis Research Society International(OARSI), Poster, Barcelona , Spain, 2012.4.26.

Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Sekiya I.

Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration.

2012 Osteoarthritis Research Society International(OARSI), Poster, Barcelona , Spain 2012.4.26-29.

Ozeki N, Sekiya I, Saito T, Muneta T.

Transplantation of Achilles tendon treated with BMP-7 promoted meniscus regeneration in a rat massive meniscus defect model.

World Congress on Osteoarthritis, Barcelona, Spain, 2012.4.26-29.

Ozeki N, Sekiya I, Saito T, Muneta T.

Transplantation of Achilles tendon treated with BMP-7 promoted meniscus regeneration in a rat massive meniscus defect model.

11th World Congress of the international cartilage repair society, Montreal, Canada, 2012.5.12-15.

Horie M, Driscoll M, Sampson W, Sekiya I, Caroom C, Prockop D J, Thomas D.

Implantation of Allogenic Synovial Stem Cells Promotes Meniscal Regeneration in a Rabbit

World Congress of the International Cartilage Repair Society (ICRS) 2012, Montreal, Canada, 2012.5.12.

Kahaer A, Muneta T, Yamaga M, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y, Sekiya I, Tsuji K.

Endogenous BMP7 activity is prerequisite for postnatal joint homeostasis

The American Society for Bone and Mineral Research' s 2012 Annual Meeting. Poster, Minneapolis, US, 2012.10.13.

Kahaer A, Muneta T, Yamaga M, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y, Sekiya I, Tsuji K.

Endogenous BMP7 activity is prerequisite for postnatal joint homeostasis

The 27th Annual Research Meeting of The Japanese Orthopedic Association. Oral, Nagoya, Japan, 2012.10.27..

Hatsushika D, Sekiya I, Nakamura T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Muneta T.

Porcine massive meniscal defect is regenerated by intraarticular injections

of synovial stem cells
2013 Orthopaedic Research
Society(ORS),Annual
Meeting,Oral,SanAntonio, 2013.1.29

Miyatake K, Tsuji, K, Yamada J,
Matsukura Y, Kahaer A, Arai Y, Sekiya I,
Muneta T.
Articular cartilage degeneration and
synovitis observed in the
ovariectomized mice are greatly
exacerbated by forced running.
2013 Orthopaedic Research
Society(ORS) , poster, Henry B
Gonzalez Convention Center, San
Antonio, 2013.1.26.

Yamada J, Tsuji K, Miyatake K,
Matsukura Y, Kahar A, Arai Y, Sekiya I,
Muneta T.
Forced running (60km in 6wks)
reverses bone and articular cartilage
degeneration induced by ovariectomy
in C57Bl/6 mice.
2013 Orthopaedic Research
Society(ORS), Poster, Henry B
Gonzalez Convention Center, San
Antonio, 2013.1.26.

Matsukura Y, Sekiya I, Tsuji K, Muneta
T.
Mesenchymal stem cells in synovial
fluid increase after meniscus injury.
2013 Orthopaedic Research
Society(ORS), Annual Meeting, Henry
B Gonzalez Convention Center, San
Antonio, TX, USA, 2013.1.26-29.

Ozeki N, Sekiya I, Tsuji K, Katagiri H,
Okuno M, Nakagawa Y, Saito T,
Muneta T.
Weekly intraarticular injections of
synovial mesenchymal stem cells delay
cartilage degeneration in a rat anterior
cruciate ligament transection model

2013 Orthopedic Research
Society(ORS), Annual Meeting, Henry
B Gonzalez Convention Center, San
Antonio, TX, USA, 2013.1.26-29.

Intraoperative Joint Gap Affects
Postoperative Knee Kinematics in
Posterior-Stabilized Total Knee
Arthroplasty
Watanabe T, Muneta T, Sekiya I,
Banks S, Koga H, Horie M, Nakamura
T, Banks S.
2013 Orthopaedic Research Society
(ORS), Poster, Henry B Gonzalez
Convention Center, San Antonio,
USA, 2013.1.26-29.

b) 国内学会発表

宗田 大、関矢一郎、柳下和慶、朱 寧
進、古賀英之、堀江雅史、中村智祐
新しいプライマリー症例用 PS 型人工膝
関節の紹介と短期成績
第 42 回日本人工関節学会、沖縄、
2012. 2. 25

朱 寧進、関矢一郎、柳下和慶、古賀英
之、堀江雅史、中村智祐、大川 淳、宗
田 大
人工膝関節全置換術における大腿骨コン
ポーネント設置前後のギャップ変化と大
腿骨骨切り量との関係
第 42 回日本人工関節学会、沖縄、
2012. 2. 24-25.

宮武和正、辻 邦和、山田 淳、Kahaer
Abula、松倉 遊、関矢一郎、宗田 大
変形性関節症 (OA) 発症における卵巣摘
出と強制走行の影響
第 25 回日本軟骨代謝学会、ポスター発表、
名古屋、2012. 3. 9

山田 淳、辻邦 和、宮武和正、Kahaer Abula、松倉遊、関矢一郎、宗田 大
Carrageenan 誘導性の関節炎において Follistatin は軟骨の退行変性を抑制する
第 25 回日本軟骨代謝学会、口演発表、名古屋、2012. 3. 9.

鈴木志郎、関矢一郎、辻 邦和、宗田 大
滑膜間葉幹細胞集合体による軟骨再生
第 25 回日本軟骨代謝学会、口演発表、名古屋、2012. 3. 9-10.

高橋 晃、朱 寧進、関矢一郎、大川 淳、宗田 大
人工膝関節全置換術後に手指壊死を来した 1 例
第 52 回関東整形外科災害外科学会、横浜、2012. 3. 22-23.

関矢一郎

変形性関節症膝の関節液中に存在する間葉系幹細胞
第 85 回日本整形外科学会学術総会、京都、2012. 5. 20.

中村智祐、関矢一郎、柳下和慶、朱 寧進、古賀英之、堀江雅史、大川 淳、宗田 大
2 重束前十字靭帯再建術における術中固定時の張力パターンが術後成績に及ぼす影響
第 85 回日本整形外科学会、京都、2012. 5. 17.

堀江雅史、関矢一郎、望月智之、朱 寧進、古賀英之、中村智祐、大川 淳、宗田 大
2 重束 ACL 再建術における大腿骨孔位置計測のための新しい術後レントゲン評価法 (modified quadrant method) : その有用性と再現性について

第 85 回日本整形外科学会学術総会、京都、2012. 5. 19.

堀江雅史、中村智祐、古賀英之、望月智之、Darwin J Prockop、関矢一郎、宗田 大
滑膜間葉幹細胞の局所投与は半月板の再生を促進する-ウサギ半月板無血行野部分欠損モデルを用いた検討
第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS)、沖縄、2012. 7. 20.

朱 寧進、宗田 大、関矢一郎、柳下和慶、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、大川 淳
PS 型人工膝関節全置換術において術前の上顆軸撮影で術中の大腿骨後顆骨切り前の屈曲ギャップの内外側不均衡は推測できるか
第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS)、沖縄、2011. 7. 17-19.

古賀英之、結城 新、関矢一郎、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、大川 淳、宗田 大
7 段階評価法を用いた pivot shift test のより詳細な評価の試み
第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS)、展示発表、沖縄、2012. 7. 19-21.

大関信武、関矢一郎、辻 邦和、片桐洋樹、小田邊浩二、奥野真起子、齋藤知行、宗田 大
ラット膝前十字靭帯損傷モデルにおける滑膜由来間葉系幹細胞の関節内毎週投与による軟骨変性抑制効果
第 31 回日本運動器移植・再生医学研究会、弘前、2012

初鹿大祐、関矢一郎、堀江雅史、古賀英之、辻 邦和、大川 淳、宗田 大
ピッグ半月板広範囲切除モデルで滑膜間葉系幹細胞の関節内投与は関節軟骨変性を抑制する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、口演発表、名古屋、2012. 10. 27.

初鹿大祐、関矢一郎、堀江雅史、古賀英之、辻邦和、大川 淳、宗田 大
滑膜間葉系幹細胞の関節内投与は家兎広範囲半月板切除後の半月板再生を促進する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、ポスター発表、名古屋、2012. 10. 26.

宮武和正、辻 邦和、山田 淳、松倉 遊、Kahaer Abula、大川 淳、関矢一郎、宗田 大
変形性関節症 (OA) 発症における卵巣摘除と強制走行の影響
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、ポスター発表、名古屋、2012. 10. 26.

山田 淳、辻 邦和、宮武和正、松倉 遊、Kahaer Abula、新井嘉則、大川 淳、関矢一郎、宗田 大
C57Bl/6 マウスにおいて 6 週 60km の走行負荷は卵巣摘除後の関節軟骨退行変性を抑制する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術総会、口演発表、名古屋、2012. 10. 27.

大関信武、関矢一郎、辻 邦和、片桐洋樹、小田邊浩二、奥野真起子、齋藤知行、大川 淳、宗田 大
BMP-7 は腱細胞を軟骨細胞に形質転換させる
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012. 10. 26-27.

大関信武、関矢一郎、辻 邦和、片桐洋

樹、小田邊浩二、奥野真起子、齋藤知行、大川 淳、宗田 大
アキレス腱の半月板移植における細胞動態
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012. 10. 26-27.

松倉 遊、関矢一郎、辻 邦和、大川 淳、宗田 大
半月板損傷後に関節液中に間葉系幹細胞は増加する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、ポスター発表、名古屋、2012. 10. 27.

中川裕介、関矢一郎、辻 邦和、市野瀬志津子、袴塚康治、大川 淳、宗田 大
 β -TCP ミクロン顆粒は間葉系幹細胞に貪食され石灰化を促進する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、ポスター発表、名古屋、2012. 10. 27.

堀江雅史、中村智佑、古賀英之、望月智之、Darwin J Prockop、関矢一郎、宗田 大
関節内投与した骨髄由来の間葉系幹細胞は Indian Hedgehog シグナルが活性化し半月板再生に寄与する
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012. 10. 26.

鈴木志郎、関矢一郎、辻 邦和、大川 淳、宗田 大
軟骨再生における滑膜間葉系幹細胞集合体の使用：その特性と有用性
第 27 回日本整形外科学会基礎学術総会、口演発表、名古屋、2012. 10. 26-27.

古賀英之、宗田 大、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、大川 淳、関矢一郎
2 重束 ACL 再建術における移植腱固定角度が制動性および張力に与える影響