

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. 26-27.

結城 新、宗田 大、関矢一郎、大川淳、
古賀英之

Model-based image-matching technique
を用いた pivot shift test の解析

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、
名古屋、2012. 10. 27.

渡邊敏文、石突正文、宗田 大、関矢一
郎、大川 淳、Scott Banks

前十字靭帯置換型人工膝関節において後
十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響
第 27 回日本整形外科基礎学会、
2012. 10. 26-27.

中村智祐、関矢一郎、柳下和慶、渡邊敏
文、古賀英之、堀江雅史、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と術後成績・大腿骨
孔位置の関係

第 40 回日本関節病学会、鹿児島、
2012. 11. 8.

結城 新、宗田 大、関矢一郎、大川 淳、
古賀英之

Model-based image-matching technique
を用いた pivot shift test の解析

臨床バイオメカニクス学会、千葉、
2012. 11. 10.

山田 淳、辻 邦和、宮武和正、松倉 遊、
KahaerAbula、関矢一郎、宗田 大

変形性膝関節症に対する三次元歩行解析
の有用性について

第 5 回日本運動器疼痛学会、ポスター発
表、東京、2012. 11. 17.

関矢一郎

変性半月板に対する細胞治療

第 29 回膝関節フォーラム、口演発表、東

京、2012. 12. 1.

渡邊敏文、宗田 大、関矢一郎、古賀英

之、中村智祐、堀江雅史、Scott Banks
PS 型 TKA において術中関節ギャップが術
後膝キネマティクスに与える影響

第 43 回日本人工関節学会、口演発表、京
都、2013. 2. 22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
分担研究報告書

「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

研究要旨

滑膜間葉幹細胞はその高い軟骨分化能により軟骨再生における有用な細胞源として期待される。臨床応用に向けて、限られた細胞数で、より効率よく移植、再生するためには、移植操作、細胞の軟骨分化能、などを改善することが必要である。間葉幹細胞を3次元培養し集合体とすることがひとつの解決策として考えられる。今回、滑膜間葉幹細胞集合体の特性、*in vitro*、*in vivo*の軟骨分化を検討した。

2.5×10^5 のヒト滑膜間葉幹細胞を 35 μ 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。遺伝子プロファイルを microarray、real time RT-PCR により解析した。集合体を軟骨分化培養液で、21日間培養し、*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。

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。滑膜間葉幹細胞集合体では、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、集合体は、従来の単層培養した細胞と比べて、多くの軟骨基質を産生した。*in vivo*では、集合体は、容易に骨軟骨欠損部へ接着させることが可能であった。低密度で移植した群で、良好な軟骨の再生が得られた。得られた再生軟骨には、GFP陽性細胞を認めた。

予想に反し、低密度で移植した群で、良好な軟骨の再生が得られたが、原因としては、低栄養による細胞死が考えられた。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、軟骨再生に有用であると考えられる。

A. 研究目的

間葉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きた。特に滑膜由来の間葉幹細胞は、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。我々は、以前に、滑膜間葉幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に 10 分間静置することで、約 60%の滑膜幹細胞を軟骨欠損部に接着させることが可能で、軟骨修復を促進させることができることを報告している。この方法は、scaffold を使わず関節鏡を用いて移植が可能な低侵襲な方法で、有用である。しかし、細胞移植操作時に移植細胞がみえず、10 分ですべての細胞が接着するわけではないことから、移植時に無駄にしまう細胞がある。臨床応用を考えると、得られる細胞数は限られていることから、より効率的な移植方法の開発が期待される。間葉幹細胞を 3 次元培養し集合体とすることがひとつの解決策として考えられる。集合体とすることで、細胞が塊として扱えるため、移植がより容易になると期待される。しかし、滑膜間葉幹細胞を集合体とした時の特性、軟骨欠損部移植時の動態は不明である。今回、滑膜間葉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。

B. 研究方法

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。 2.5×10^5 の滑膜間葉幹細胞を 35 μ 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。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も 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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

本研究では、滑膜間葉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た。これは、おそらく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。

日本白色家兎の軟骨欠損モデルを用いた *in vivo* の検討では、滑膜間葉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が、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た群であった。我々は以前に collagen gel を包埋した滑膜間葉幹細胞を軟骨欠損部に移植した時には、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。

なぜ一定数以上の集合体を移植した時に、成績が不良となるのか？3つの理由が推測された。第一に、過剰に集合体を移植した時には、細胞を維持するのに必要な栄養素が枯渇していたと考えられる。*in vitro* での集合体の生存率の検討で、40個の集合体を1週間培養した well では、培養液の色が黄色に変色しており、集合体の数が過剰な時は、pH が大きく変化してしまっていた。第二に、過剰に集合体を移植した時には、細胞死をおこす細胞が増加していることがあげられる。第三に、過剰に集合体を移植することで、host の軟骨前駆細胞が、骨髄や関節液から軟骨欠損部へ遊走することが阻害されたと考えられる。GFP 陽性の滑膜幹細胞集合体を移植した実験で、得られた再生軟骨

には、GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在した。骨髄や関節液中には、間葉幹細胞が存在することは知られていることから、再生した軟骨は、移植した細胞が直接軟骨に分化しただけではなく、host の細胞が関与していることが示唆された。

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幹細胞移植の臨床治験を行っている。12症例の平均で、passage 0 で 5000 万細胞を得ることができ、約 280mm² 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、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。

過去の骨髄間葉幹細胞の報告と同様に、滑膜間葉幹細胞においても、集合体とすると、抗炎症遺伝子である TSG6、STC1 の発現が上昇していた。TSG6 の過剰発現、リコンビナント TSG6 の関節内投与は、関節炎を抑制すると報告されている。今回の日本白色の model では、関節炎は対照群でも強くなく、滑膜間葉幹細胞集合体の抗炎症効果は確認できなかった。今後、他の動物 model で、滑膜間葉幹細胞

胞集合体の抗炎症効果の検討を行うことは大変興味深い。

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と考えられる。

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

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.

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)327-3382012.

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.

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.

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.

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. *J Orthop Res*30(6)943-9492012.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

関矢 一郎、宗田 大
滑膜由来の幹細胞による再生医療
Bone Joint Nerve4(2)159-165.2012

2.学会発表

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,
Sanfrancisco, 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.

Watanabe T, Ishizuki M, Muneta T,
Dunbar N, Iorgulescu A, Banks SA.
Knee Kinematics in ACL Substituting
Arthroplasty With or Without PCL
2012 Orthopaedic Research Society
(ORS), Podium, San Francisco,
2012.2.7.

Watanabe T, Ishizuki M, Muneta T, Dunbar N, Iorgulescu A, Banks SA. Kinematic comparison of fixed-and mobile-bearing total knee arthroplasty in vivo
2012 Orthopaedic Research Society (ORS), Poster, San Francisco, 2012.2.4-5

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.

Muneta T, Articular Cartilage Wear and its Background: Serum Glucosamine Content, Cartilage Hardness and Thickness in ACL Injured Knees. ACL Study Group Meeting in Jackson Hole, WM, 2012.2.14.

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.

Jinno T, Koga D, Asou Y, Morita S, Hasegawa S, Matsubara M, Okawa A, Muneta T

Progressive bone atrophy around a stem with a proximal coating of arc-deposited titanium and hydroxyapatite.

The 85th Annual Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, Oral, Kyoto, Japan, 2012.5.19.

Watanabe T, Ishizuki M, Muneta T, Banks SA.

Matched comparison of fixed- and mobile-bearing TKA kinematics in

vivoThe 85th Annual Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, Oral, Kyoto, Japan, 2012.5.17-20.

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, Y 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 Orthopedic 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.

IWatanabe T, Muneta T., Sekiya I, Banks S, Koga H, Horie M, Nakamura T, B ntraoperative Joint Gap Affects Postoperative Knee Kinematics in Posterior-Stabilized Total Knee Arthroplasty
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たした 1 例

第 52 回関東整形外科災害外科学会、横浜、2012. 3. 22-23.

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.

望月智之、二村昭元、藤代 瞳、山口久

美子、宗田 大、秋田恵一

腱板の大結節停止部における血管分布の解剖学的解析

第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS)、沖縄、2012. 7. 19-21.

望月智之、藤代 瞳、二村昭元、安田和則、宗田 大、秋田恵一

膝伸展位および屈曲位における ACL 大腿骨付着形態の解剖学的研究

第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS)、沖縄、2012. 7. 19-21.

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.

渡邊敏文、宗田 大、Scott Banks

後方安定型人工膝関節全置換術の関節ギャップは術後可動域に影響する

第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS)、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兔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.

望月智之、二村昭元、大川 淳、宗田 大、秋田恵一
腱板大結節停止部における血管分布の解剖学的研究
—micro CT を用いた三次元的解析—
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
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. 26-27.

結城 新、宗田 大、関矢一郎、大川淳、
古賀英之
Model-based image-matching technique
を用いた pivot shift test の解析
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、
名古屋、2012. 10. 27.

渡邊敏文、石突正文、宗田 大、関矢一
郎、大川 淳、Scott Banks
前十字靭帯置換型人工膝関節において後
十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響
第 27 回日本整形外科基礎学会、
2012. 10. 26-27.

古賀英之、小笠原一生、宗田 大
Model-based image-matching technique
を用いた膝モーメントの推定による ACL
損傷メカニズムの解明
第 23 回日本臨床スポーツ医学会学術集
会、口演発表、横浜、2012. 11. 3-4.

中村智祐、関矢一郎、柳下和慶、渡邊敏
文、古賀英之、堀江雅史、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と術後成績・大腿骨
孔位置の関係
第 40 回日本関節病学会、鹿児島、
2012. 11. 8.

結城 新、宗田 大、関矢一郎、大川 淳、
古賀英之
Model-based image-matching technique
を用いた pivot shift test の解析
臨床バイオメカニクス学会、千葉、
2012. 11. 10.

山田 淳、辻 邦和、宮武和正、松倉 遊、

KahaerAbula、関矢一郎、宗田 大
変形性膝関節症に対する三次元歩行解析
の有用性について
第 5 回日本運動器疼痛学会、ポスター発
表、東京、2012. 11. 17.

渡邊敏文、宗田 大、関矢一郎、古賀英
之、中村智祐、堀江雅史、Scott Banks
PS 型 TKA において術中関節ギャップが術
後膝キネマティクスに与える影響
第 43 回日本人工関節学会、口演発表、京
都、2013. 2. 22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
分担研究報告書

「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・発生発達病態学分野 准教授

研究要旨

滑膜由来間葉系幹細胞を集合体として培養するにあたり、5種類の系を用いて変異細胞検出を試みた。腫瘍化の前段階としてのATM, p53のリン酸化、AIDの発現、腫瘍化前段階としてさらに進んだ段階でのp16遺伝子メチル化、腫瘍細胞検出のための染色体検査、nudeマウスへの移植実験を行った。その中でAID発現は染色法とリアルタイムPCR法を併用して実施した。その結果、集合体として培養した間葉系幹細胞におけるDNA損傷は極めて軽微で、また腫瘍細胞も検出されないことが明らかになった。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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 (後者は研究

代表者による実験)

(倫理面への配慮)

本研究は、再生医療用の組織を用いて検討を行った。今回の解析においては従って、最小限のサンプル量で行えるように留意し、

「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」として倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

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検体から用意したものでは下図に示すような結果を得た。

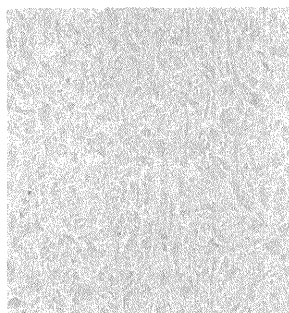


MsIgG

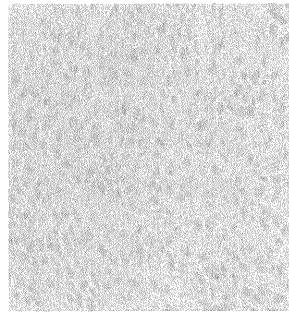


MsIgG

いずれもATM, p53のリン酸化は極めて軽微



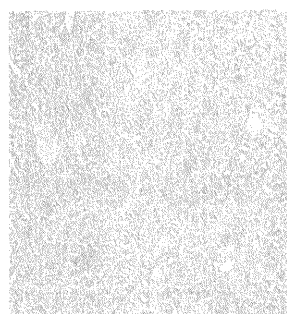
pATM



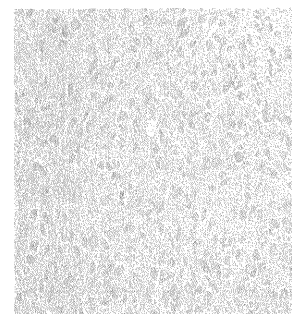
p-p53

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。



MsIgG



AID

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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)が確立し、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では腫瘍細胞が含まれていないことが明らかになった。

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. 著書(和文)

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

2. 学会発表

森尾友宏

再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング、第60回日本ウイルス学会学術集会(シンポジウム)、大阪、2012年11月13日-11月15日

森尾友宏

Challenge for Innovation –日本初の再生医療の普及に向けて-、第11回日本再生医療学会総会(パネルディスカッション)、横浜、2012年6月13日

森尾友宏

「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」：免疫細胞療法における指針及び治療の現状と展望、第60回日本輸血細胞治療学会(シンポジウム)、福島、2012年5月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

細胞製剤の品質・安全保証に関する研究

分担研究者

清水 則夫 東京医科歯科大学・ウイルス治療学 准教授

研究要旨

開発した網羅的ウイルス・マイコプラズマ検査系を使用し、滑膜幹細胞由来の細胞製剤の微生物汚染に対する安全検査法の確立を目標に研究を行っている。本年度は、17種類のウイルスおよびマイコプラズマ検査系により関節組織および滑膜幹細胞集合体（培養 14 日目）の検査を行った。合計 58 検体の検査を実施したところ、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、水痘帯状疱疹ウイルス、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ウイルスは検出されなかった。マイコプラズマはすべての検体が陰性だった。開発した検査系を自動化する取り組みも進めており、キアゲン社の QIASymphony および固相化試薬を用いた自

A. 研究目的

再生医療に使用する細胞製剤は、生体材料から得た組織・細胞を培養することにより調製し、生きた状態で投与されるため、原材料あるいは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、再生医療を実用化するためには、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極めて重要である。生体には細菌・真菌・ウイルスなど多くの微生物が持続感染しているため、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微生物汚染の問題を回避するには不十分であり、患

者に投与する最終製品を全数検査して治療の安全性を担保することが必要と考えている。本分担研究では、1. ヒトに持続感染することが知られているウイルスを主とした検査対象ウイルスのリストアップ 2. それらを網羅的に検出可能な検出系の作成 3. 関節関連組織及び滑膜由来軟骨幹細胞の微生物検査データの蓄積、4. 検査系の自動化 5. 滑膜由来軟骨幹細胞を使用した軟骨再生医の微生物安全検査法の確立 を目的に研究を行っている。本年度は、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系（17 種のウイルスを検出可能）および

マイコプラズマ(142 種類のマイコプラズマ属を検出可能)検査系の改良および改良された検査系により関節組織・末梢血・骨髄および滑膜組織よりハンギングドロップ法により調製した滑膜幹細胞集合体(培養14日目)の検査を実施した。さらに、キアゲン社のQIASymphony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。

B. 研究方法

1. DNA ウイルスゲノムの検出

DNA ウイルスのゲノムをPCR法により増幅した。

- ・検査対象ウイルス種
HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19 (PVB19)
- ・PCR装置: Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・PCR反応: 95°C10分処理の後、95°C15秒, 60°C60秒の反応を45サイクル。
- ・PCR試薬: AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・プライマー: 通常の合成DNAを使用
- ・プローブ: Taqman Probeを使用

2. RNA ウイルス、レトロウイルスゲノムの検出

RNA ウイルスおよびレトロウイルスゲノムをRT-PCR法により増幅した。

- ・検査対象ウイルス種
HTLV-1, -2, HIV-1, -2, HCV
- ・PCR装置: Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)

ムズジャパン)

- ・逆転写反応: 50°C30分処理
- ・PCR反応: 95°C15分処理の後、94°C15秒, 60°C60秒の反応を45サイクル
- ・RT-PCR試薬: QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)
- ・プライマー: 通常の合成DNAを使用
- ・プローブ: Taqman Probeを使用

3. マイコプラズマの検出

142種類のマイコプラズマ属が検出可能なマルチプレックスPCR検査系により、マイコプラズマ属の16Sリボソーム・23Sリボソームおよびそれらのスペーサー領域に設定したプライマー・プローブ(合計13種類)を使用し、マイコプラズマゲノムの当該領域を増幅した。

- ・PCR装置: 480 (ロッシュ)
- ・PCR反応: 95°C10分処理の後、94°C15秒, 60°C60秒の反応を45サイクル
- ・PCR試薬: PCR試薬: AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・プライマー: 通常の合成DNAを使用
- ・プローブ: Taqman Probeを使用

4. 関節関連組織・末梢血のウイルス・マイコプラズマ検査

10人の提供者より得た以下の検体の検査を実施した。

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、ハンギングドロップ法により滑膜から得た

細胞を培養した滑膜幹細胞集合体（培養 14 日目）10 検体

5. ウイルス・マイコプラズマ検査系の自動化に関する取組

・試薬の固相化：検査系を自動化するため、開発した検査系に使用する試薬を 96 ウェルプレートあるいは 8 連ストリップに固相化した。固相化に際しては、過去の研究結果からトレハロースを 3.5mol/well 加えると長期保存・感度・安定性が達成できることが明らかになっていたため、プライマー・プローブおよび当該濃度のトレハロースを加えて固相化試薬を作成した。

・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。

（倫理面への配慮）

検体の採取に当たっては、東京医科歯科大学医学部および難治疾患研究所の倫理委員会の許可を得たうえで、提供者のインフォームドコンセントを取得し、検体を採取した（東京医科歯科大学医学部軟骨再生学が担当）。採取された検体は、匿名化した上でウイルス治療学に引き渡され、患者の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。また、ウイルス検査

以外の検査（遺伝子検査など）は一切行わないこととした。

C. 結果

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た。作成したサンプルを使用した検討の結果、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。前年度に使用したウイルス検査系の感度は 50 copies/reaction だったが、プライマー配列の見直しにより感度が増していることが確認された。

2. 交差反応性の確認

披検ウイルスと間違えて他のウイルスが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 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実験を行った。その結果、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

提供者より採取した、滑膜組織 10 検体、骨髄