

**Figure 4. The epitopic properties of mouse SMCs.** The flow cytometric analysis of mouse SMCs (blue bars), muscle-derived cells (red bars), and bone marrow derived cells (green bars). The values are the means and SD of the percent expression for each cell-surface protein. VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1, PDGFR $\alpha$ : platelet derived growth factor receptor alpha. doi:10.1371/journal.pone.0045517.g004

similar to that of cells from mouse muscle and bone marrow (Figures 3B and 3C). The colony-forming number of mouse SMCs was significantly higher in comparison to that of mouse bone marrow and was higher than that of cells derived from muscle (Figures 3D and 3E).

### Epitopic Properties of Mouse SMCs

Among the eight antigens examined, the rate of positivity for CD34 (a hematopoietic progenitor cell antigen), CD45 (a hematopoietic cell marker), and CD 117 (a stem cell factor receptor) in SMCs was less than 2% (Figure 4). The positive ratios for CD29 and CD44 in the SMCs and cells derived from muscle and bone marrow were 90% or over. The positive ratio of CD106 (VCAM-1) in SMCs and cells derived from muscle and bone marrow was less 10%. The positive ratio of CD140 $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) in SMCs was 50% or over, which was significantly higher than that in the cells derived from both muscle and bone marrow. The Sca-1 (mesenchymal stem cell maker) positive ratios in SMCs and cells derived from muscle and bone marrow were all approximately 30%, and no significant differences in the positivity were observed between the three cell types (Figure 4).

### Differentiation Potential of Mouse SMCs

**Osteogenesis.** To evaluate the osteogenic potential of the SMC populations, cells were cultured in osteogenic medium. All cells were calcified and positive for alizarin red staining (Figure 5A). The ratio of alizarin red-positive colonies in the SMCs was significantly increased in comparison to that in cells derived from bone marrow and was higher than that in cells derived from muscle (Figures 5A and 5B). qRT-PCR showed the expression levels of osteocalcin and type I collagen in SMCs and cells derived from muscle to significantly increase in comparison to those in cells derived from bone marrow. The expression levels of the mRNA for RUNX2 and osteopontin in SMCs were also higher than those in the cells derived from muscle and bone marrow (Figure 5C).

**Adipogenesis.** The adipogenic potential of the cells in the three populations was also compared. Lipid vesicles were observed in both SMCs and cells derived from muscle, and were less observed in cells derived from bone marrow (Figure 6A). The oil red-O positive colony rate, which was calculated by dividing the

number of oil red-O positive colonies (Figure 6A, upper lane) by the number of total colonies of the same culture (Figure 6A, lower lane) was determined. The oil red-O positive colony rate in the SMCs was significantly increased in comparison to that in cells derived from bone marrow and was also higher than that in the cells derived from muscle (Figure 6B). qRT-PCR demonstrated the expression levels of PPAR $\alpha$ , C/EBP $\alpha$  and FABP4 in SMCs to significantly increase in comparison to those in cells derived from bone marrow and higher than those in cells derived from muscle. The expression levels of the mRNA for Lpl in SMCs were also higher than those in the cells derived from muscle and bone marrow (Figure 6C).

**Chondrogenesis.** The *in vitro* chondrogenesis pellet culture was performed to evaluate the chondrogenic potential of three cell populations. During the *in vitro* chondrogenesis, the pellet increased in size and weight, which was attributable to the production of extracellular matrix [11]. The pellet from all three cell populations became spherical after 21 days of culture (Figure 7A). While the size of the pellets in these three populations was similar (Figure 7B), the weight of the pellet from SMCs was significantly heavier in comparison to that from the cells derived from bone marrow (Figure 7C). The pellets from SMCs and cells derived from muscle and bone marrow consisted of extensive cartilage matrix (Figure 7D). A subsequent qRT-PCR study demonstrated that the pellets from all three populations expressed Sox9, type II and type X collagen, and their expression levels increased time-dependently (Figure 7E).

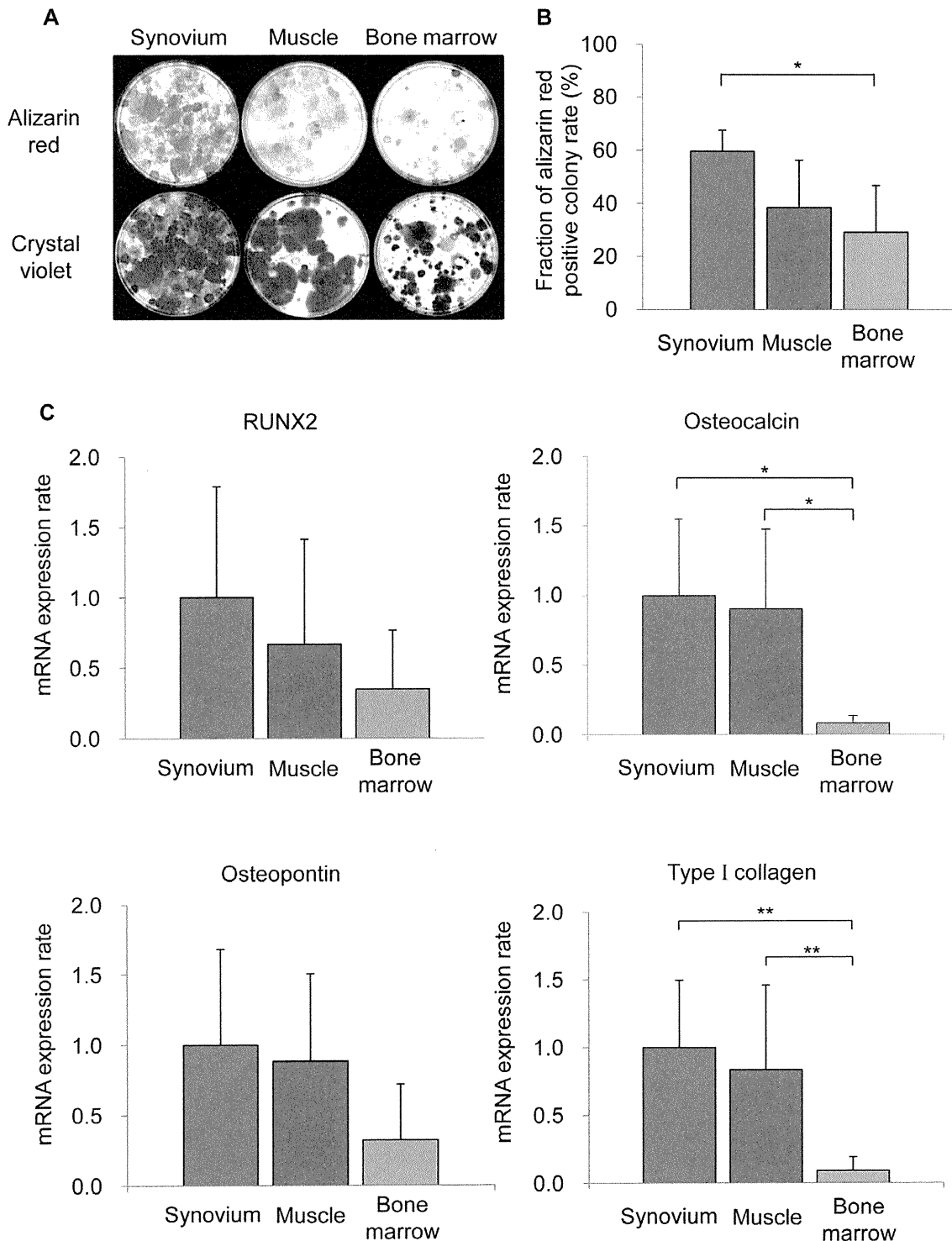
### Discussion

In this study, we determined the appropriate conditions for the isolation of SMCs from mouse knee joints (Table 2, Figures 1 and 2). The cells derived from mouse synovium demonstrated a capacity for self-proliferation (Figure 3) and multipotentiality (Figures 5–7), both characteristics of MSCs.

There have been several reports in which synovial cells were isolated from mouse arthritic joints and cultured for subsequent experiments [19,20]. There were also previous studies in which synovial cells were isolated from normal mouse knee joints [21,22,23]. However, these studies did not examine and/or describe an appropriate condition for the isolation and culture of mouse synovial cells, and furthermore they also did not examine their multipotentiality as MSCs. The current study is the first report that elucidated the appropriate conditions for the isolation and culture of mouse synovial cells, and demonstrated their proliferative capacity and multipotentiality.

The synovium is a thin layer of tissue that lines the joint space and covers a subsynovium [24]. Depending on its anatomical position, the subsynovium comprises either a fibrous or an adipose synovium, the latter is commonly called the infra-patellar fat pad. In humans, fibrous synovium-derived MSCs, which were harvested from the inner side of the joint capsule overlaying the non-cartilaginous area of the femoral condyle, and adipose synovium- (infra-patellar fat pad) derived MSCs were similar in terms of their cell morphological features, epitope profiles, colony-forming efficacy, chondrogenic, osteogenic, and adipogenic potential [25]. In this study, we microscopically isolated the mouse synovium from the infra-patellar fat pad, as isolation of the synovium from the infra-patellar fat pad is relatively easy in comparison to that from the joint capsule in mice.

The chondrogenic potential of synovial cells derived from rabbit synovium was initially reported in the 1990's [26,27]. In 2001, it was revealed that human synovial cells contained MSCs, which showed multipotentiality for bone, adipose tissue and cartilage [2].

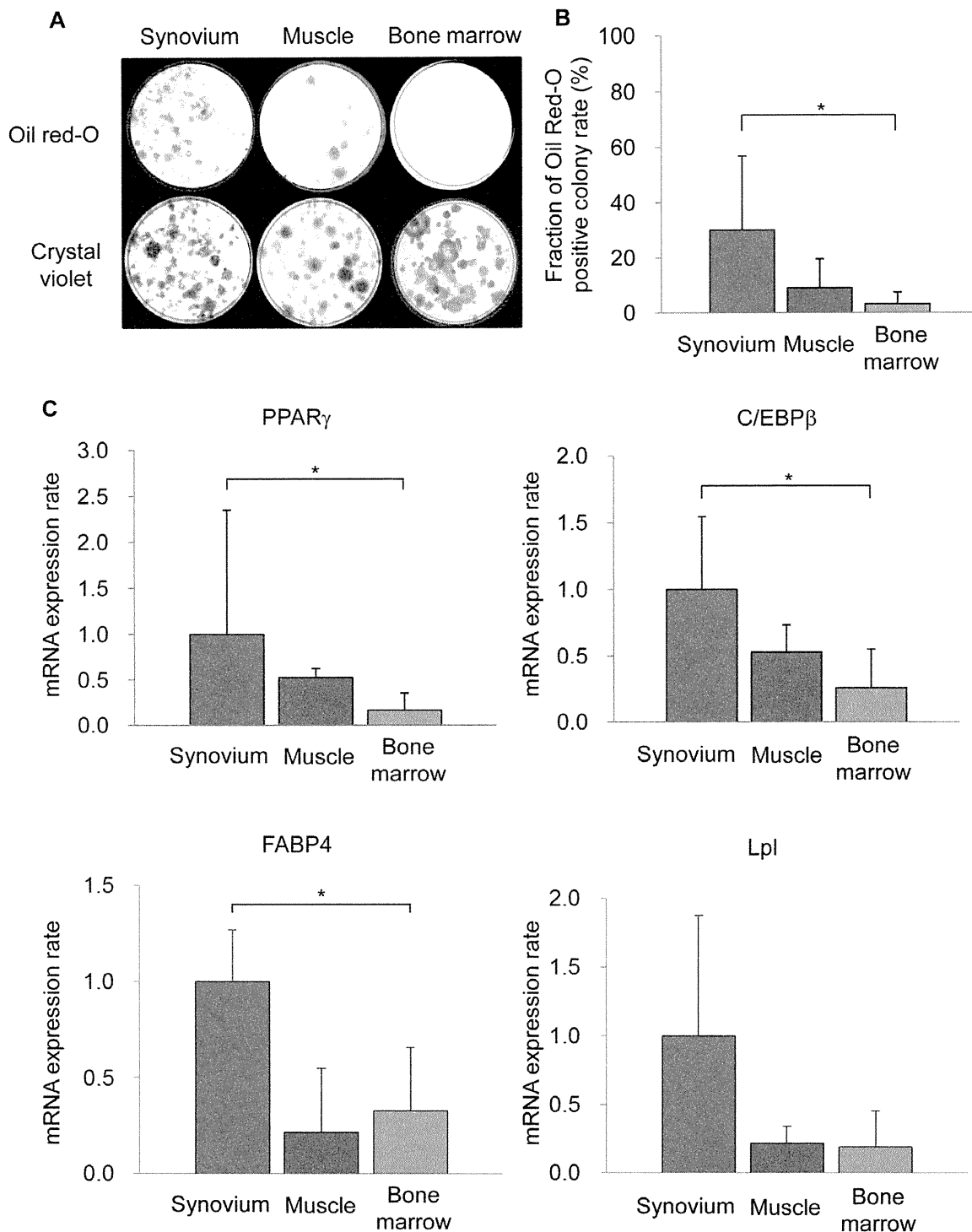


**Figure 5. The osteogenic potential of mouse SMCs.** (A): Calcified colonies stained with alizarin red (upper lane) and total colony number (lower lane). (B): The ratios of alizarin red-positive colonies to the total colonies. (C): qRT-PCR analyses for RUNX2, osteocalcin, osteopontin and type I collagen for osteogenesis. doi:10.1371/journal.pone.0045517.g005

Since then, these conditions for the isolation of human synovial cells have been used to isolate the mesenchymal cells of the synovium from rats and rabbits [14,16]. However, it was found in this study that these conditions cannot be used for isolating mouse synovial cells. This may, at least in part, be due to the cytotoxicity of the collagenase used for the isolation of synovial cells that differs

between humans, rats, rabbits and mouse cells, as both the collagenase reaction time and concentration had to be reduced (Table 2 and Figure 2) [28].

Human synovial cells containing MSCs can be cultured for more than 10 passages [2]. The mouse SMCs in this study also showed similar self-duplicating ability (Figure 3). This indicates

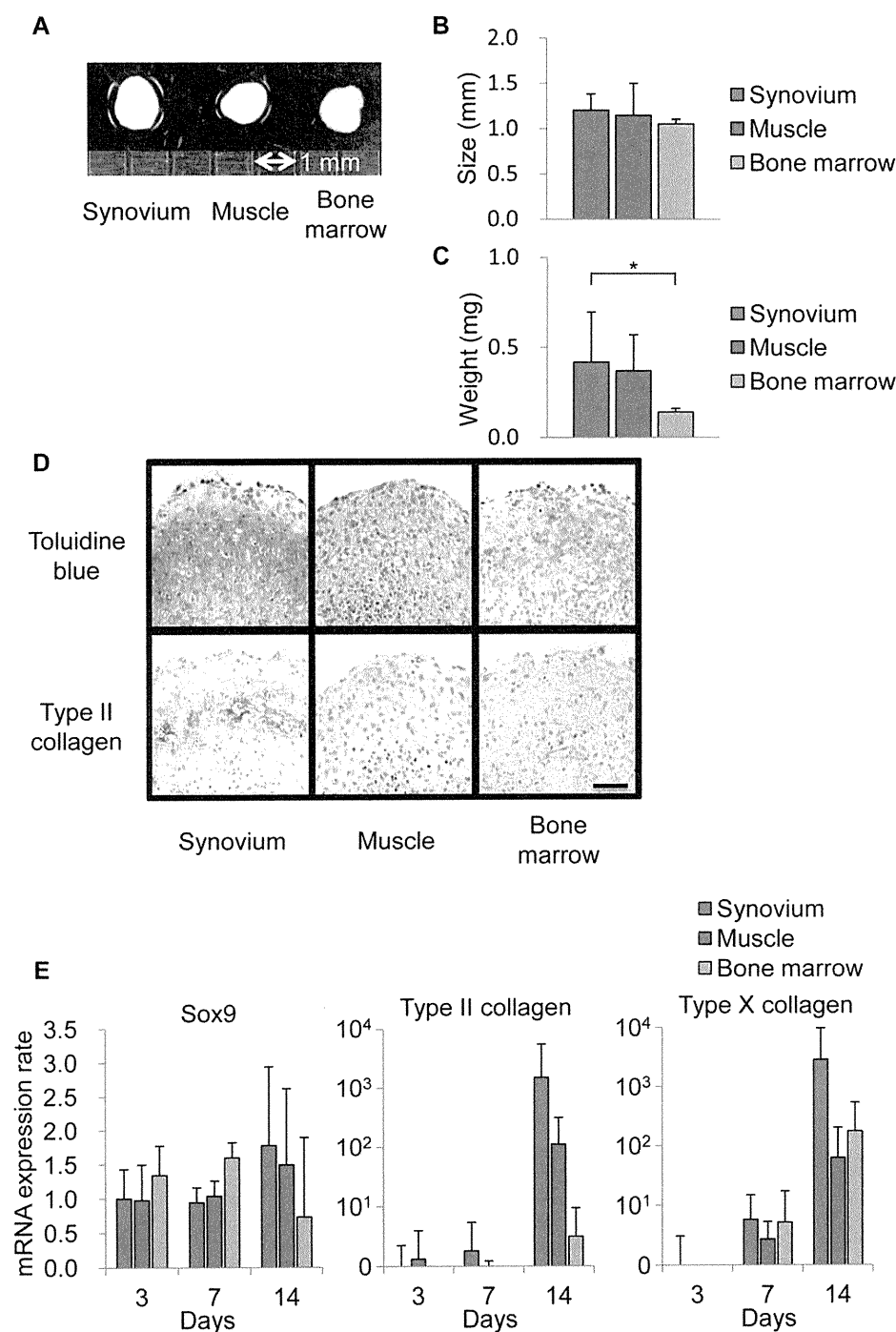


**Figure 6. The adipogenic potential of mouse SMCs.** (A): Oil red O (upper lane) and total colony number (lower lane). (B): The ratios of Oil red-O positive colonies to total colonies. (C): qRT-PCR analyses for PPAR $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , FABP4 and Lpl for adipogenesis. doi:10.1371/journal.pone.0045517.g006

that the mouse SMCs isolated under the conditions established in this study contain MSCs similar to human SMCs.

In comparison to bone marrow- and muscle-derived cells, the synovium-derived cells showed better proliferation potential in this study (Figure 3). Similar observations have been made for cells derived from the synovium, bone marrow, and muscle of both humans and rats. However, care should be exercised in

interpreting this findings, because the passage number of cells in which the CFU assay was conducted in this study (passage 4 or 5) was different from that of previous studies (passage 1 to 3) [11,16]. This was because the number of colonies that formed was too small to carry out effective comparisons at passage 1 to 3 in mice, so this assay was conducted using cells at passage 4 or 5 (Figures 3D and 3E).



**Figure 7. The chondrogenic potential of mouse SMCs.** (A): Representative macroscopic findings of the pellets on a 1-mm scale. (B): The pellet size. (C): The wet weight of the pellets. (D): The histological features after staining with toluidine blue (upper lane) and immunohistochemistry for type II collagen (lower lane). Scale bar = 100  $\mu$ m (E): qRT-PCR analyse for Sox9, type II and type X collagen. doi:10.1371/journal.pone.0045517.g007

The involvement of MSCs in mouse bone marrow in proliferation was first reported in 1976 [29]. On the other hand, it is believed that although the isolation and expansion of human bone marrow cells is relatively easy [30], rodent bone marrow is difficult to expand [29,31,32]. The current study revealed that the viability and expandability of mouse SMCs were superior to those of mouse bone marrow cells (Figure 3). This suggests that mouse SMCs could provide not only for a cell source of MSCs, but also for

elucidating the molecular mechanisms underlying the regeneration and differentiation of MSCs.

Muscle-derived cells, including in a cell line (C2C12) and primary cultured cells, have been shown to have multipotentiality [33,34,35,36]. While there are several isolation methods used to obtain cells from muscle, we used the simple plate culture technique [11,16,37]. Muscle satellite cells are deeply associated with muscle stem or progenitor cells and actually showed multipotentiality in previous studies [3,38,39]. However, it is

necessary to use flow cytometry to isolate these satellite cells [40,41,42], and they are present at a very low frequency in whole muscle cells, making their isolation difficult even when using flow cytometry for selection [43,44,45]. In addition, the use of flow cytometry is associated with a risk for contamination. Thus, it is not feasible to use muscle satellite cells for clinical applications.

There has been no definitive consensus about the expression patterns of the surface antigens of mouse MSCs. However, the expression patterns of mouse MSCs observed in this study were similar to those of mouse bone marrow [46,47,48]. The PDGFR $\alpha$  positive cells in murine MSCs showed superior proliferative potency and differentiation ability [46]. Similarly, the PDGFR $\alpha$  expression frequency in SMCs was significantly higher than that in muscle-derived cells and bone marrow-derived cells in mice (Figure 4). The frequency of Sca-1 positivity, which is one of the markers for MSCs, for synovium-, muscle- and bone marrow-derived cells were all approximately 30%, and no significant differences in the Sca-1 positive frequency were observed between them (Figure 4). This may be explained by fact that the Sca-1 positive frequency in Balb/c mice was approximately 30%, while that in NMRI mouse bone marrow cells was 50–60% [46,48].

The osteogenic potential of mouse SMCs was significantly superior compared to that of mouse bone marrow (Figures 5A and B). This was similar to that of human SMCs [11]. Consistent with this result, the RUNX2 expression of mouse SMCs was higher, but not significantly higher, than that of mouse bone marrow (Figure 5C). This result was also similar to that in human SMCs [11].

The adipogenic potential of mouse SMCs was significantly greater compared to that of mouse bone marrow (Figures 6A and 6B). In both humans and rats, the SMCs also showed superior adipogenic potential. This can be explained by the fact that both PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$  expression in mouse SMCs were significantly increased in comparison to the levels in mouse bone marrow (Figure 6C). These results regarding the adipogenic potential of mouse SMCs are consistent with previous studies using human and rat cells [11,16].

In this study, the chondrogenic potential of the cells was examined by a pellet culture system (Figure 7). Better extracellular matrix production was generally observed in cells derived

from the human synovium by the pellet culture system. Potent cartilage matrix formation was observed in the mice in this study, however, it was not as prominent as that observed in human SMCs (Figure 7A–D) [11]. With regard to the mRNA expression levels of the genes encoding Sox9, type II and type X collagen, which have a crucial role in chondrogenesis on days 7 and 14, the mouse SMCs showed higher expression levels of these genes in comparison to those of mouse muscle- and bone marrow-derived cells (Figure 7E). From these results, we concluded that the mouse SMCs that we obtained have chondrogenic potential similar or superior to that of cells derived from mouse muscle and bone marrow.

Tissue engineering techniques using MSCs have been investigated as new treatments for tissue repair [49]. While the synovium is thought to be an appropriate cell sources for tissue engineering [50,51,52,53], the molecular mechanisms are largely unknown. The mouse SMCs harvested by the established method in this study are expected to enable us to analyze the complex network of signaling pathways that regulates the proliferative and differentiation potential of synovial MSCs by conducting both *in vivo* and *in vitro* analyses of genetically modified experimental models.

In conclusion, primary mouse SMCs culture method was established by determining the conditions for isolation of the cells. The cells derived from mouse synovium demonstrated both the ability to proliferate and multipotentiality similar or superior to the cells derived from muscle and bone marrow.

## Acknowledgments

We give a special thanks to Dr. Hisashi Kurosawa for his support in making us the chance to conduct this study in Juntendo University.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IF MI KT NIT TM EAH IS. Performed the experiments: IF HK NIT RS. Analyzed the data: IF MI HK KT NIT RS EAH IS KK. Contributed reagents/materials/analysis tools: IF MI KT TM EAH IS KK. Wrote the paper: IF MI KT TM EAH IS KK.

## References

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928–1942.
- Asakura A, Komaki M, Rudnicki M (2001) Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68: 245–253.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279–4295.
- Bentley G, Kreutner A, Ferguson AB (1975) Synovial regeneration and articular cartilage changes after synovectomy in normal and steroid-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 57: 454–462.
- Mitchell N, Blackwell P (1968) The electron microscopy of regenerating synovium after subtotal synovectomy in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 50: 675–686.
- Campbell WG, Jr., Callahan BC (1971) Regeneration of synovium of rabbit knees after total chemical synovectomy by ingrowth of connective tissue-forming elements from adjacent bone. A light and electron microscopic study. *Lab Invest* 24: 404–422.
- Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutris RD, et al. (2002) Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 180–187.
- Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78: 721–733.
- Ahn JH, Yoo JC, Yang HS, Kim JH, Wang JH (2007) Second-look arthroscopic findings of 208 patients after ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15: 242–248.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52: 2521–2529.
- Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, et al. (2008) Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 10: R84.
- Prockop DJ (2009) Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17: 939–946.
- Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, et al. (2008) 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: 207–215.
- Shintani N, Hunziker EB (2007) Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis Rheum* 56: 1869–1879.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, et al. (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327: 449–462.
- Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ (2001) BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 411–418.

18. Sakamoto Y, Ishijima M, Kaneko H, Kurebayashi N, Ichikawa N, et al. (2010) Distinct mechanosensitive Ca(2+) influx mechanisms in human primary synovial fibroblasts. *J Orthop Res*.
19. Dulos J, Verbraak E, Bagchus WM, Boots AM, Kaptein A (2004) Severity of murine collagen-induced arthritis correlates with increased CYP7B activity: enhancement of dehydroepiandrosterone metabolism by interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 50: 3346–3353.
20. Waldburger JM, Palmer G, Seemayer C, Lamacchia C, Finckh A, et al. (2011) Autoimmunity and inflammation are independent of class II transactivator type PIV-dependent class II major histocompatibility complex expression in peripheral tissues during collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63: 3354–3363.
21. Langdon C, Kerr C, Hassen M, Hara T, Arsenault AL, et al. (2000) Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *Am J Pathol* 157: 1187–1196.
22. Li P, Sanz I, O'Keefe RJ, Schwarz EM (2000) NF-kappa B regulates VCAM-1 expression on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 164: 5990–5997.
23. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, et al. (2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 115: 622–631.
24. Mahadevan V (2008) Pelvic girdle and lower limb. In: Standring S, editor. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 40th ed. Philadelphia: Elsevier. 1327–1464.
25. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, et al. (2006) 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: 843–853.
26. Iwata H, Ono S, Sato K, Sato T, Kawamura M (1993) Bone morphogenetic protein-induced muscle- and synovium-derived cartilage differentiation in vitro. *Clin Orthop Relat Res*: 295–300.
27. Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, et al. (1999) Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 42: 2631–2637.
28. Waymouth C (1974) To disaggregate or not to disaggregate injury and cell disaggregation, transient or permanent? *In Vitro* 10: 97–111.
29. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267–274.
30. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, et al. (2002) 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: 530–541.
31. Simmons DJ, Seitz P, Kidder L, Klein GL, Waeltz M, et al. (1991) Partial characterization of rat marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int* 48: 326–334.
32. Aubin JE (1999) Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 72: 396–410.
33. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, et al. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755–1766.
34. Chalaux E, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Bartrons R, Ventura F (1998) JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 273: 537–543.
35. Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, et al. (1999) Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10: 3801–3813.
36. Teboul L, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Amri EZ, et al. (1995) Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem* 270: 28183–28187.
37. Rando TA, Blau HM (1994) Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol* 125: 1275–1287.
38. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N (2002) Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129: 2987–2995.
39. Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, Umeda R, Goto Y, et al. (2008) Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev* 125: 257–269.
40. Tamaki T, Okada Y, Uchiyama Y, Tono K, Masuda M, et al. (2007) Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells* 25: 2283–2290.
41. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, et al. (2002) Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 157: 571–577.
42. Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, et al. (2001) Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 152: 335–348.
43. Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, et al. (2000) Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150: 1085–1100.
44. Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14482–14486.
45. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390–394.
46. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, et al. (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206: 2483–2496.
47. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, et al. (2003) Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89: 1235–1249.
48. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M (2006) Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 48: 361–370.
49. Feitosa ML, Fadel L, Beltrao-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, et al. (2010) Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta cirurgica brasileira/Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 25: 416–422.
50. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, Sekiya I, Caroom CT, et al. (2012) Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 94: 701–712.
51. Jones BA, Pei M (2012) Synovium-Derived Stem Cells: A Tissue-Specific Stem Cell for Cartilage Engineering and Regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*.
52. Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ (2012) A Comparison of the Functionality and In Vivo Phenotypic Stability of Cartilaginous Tissues Engineered from Different Stem Cell Sources. *Tissue engineering Part A*.
53. Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M (2012) Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Chondrocyte Co-Cultures are Independent of Culture Conditions and Cell Sources. *Tissue engineering Part A*.

# 整形・災害外科

Orthopaedic Surgery and Traumatology

9月 Vol. 55  
No. 10  
September 2012

特集

## 関節リウマチに対する 新しい治療戦略

—新分類基準・ガイドラインに基づいて—

論究 Stem 周囲大腿骨骨折の術後評価	岡本 尚史ほか	1251
臨床 神経根性疼痛を伴った腰痛に対する外来診察室で行う超音波ガイド下 仙骨硬膜外ブロックの効果	戸田 佳孝ほか	1255
頸部神経根症に対する後方椎間孔拡大術—直視下手術と tubular retractor を 用いた顕微鏡視下手術の比較検討	高橋 良正ほか	1261
経験 関節リウマチによる環軸椎亜脱臼に対する Olerud cervical system を 用いた環軸椎後方固定術の手術成績	柏 隆史ほか	1267
大腿骨転子部骨折術後にラグスクリューが伸張して骨頭穿破を生じた1例	稲谷 弘幸ほか	1273
20年来の外傷後肘関節拘縮に対し関節授動術を行った1例	友利 裕二ほか	1277

### 特集：関節リウマチに対する新しい治療戦略—新分類基準・ガイドラインに基づいて (企画：田中 栄)

関節リウマチに対する 1987年 ACR 改訂分類基準と 2010年 ACR/EULAR 分類基準	桃原 茂樹	1167
関節リウマチの早期診断のために—抗 CCP 抗体などを中心に	沢田 哲治	1175
関節リウマチの画像診断—関節エコー, MRI を中心に	持田 勇一ほか	1183
関節リウマチの薬物療法 (1)—NSAIDs, ステロイドの位置づけ	西野 仁樹	1191
関節リウマチの薬物療法 (2)—DMARDs	西村 慶太	1203
関節リウマチの薬物療法 (3)—生物学的製剤	神戸 克明	1211
関節リウマチの治療戦略 update	田中 良哉	1219
関節リウマチ治療における外科治療	門野 夕峰	1229

新しい医療技術 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	鈴木 志郎ほか	1243
分子レベルからみた整形外科疾患 四肢背側化における Emx2 の関与	金谷 耕平ほか	1164
Personal View 災害は忘れた頃にやってくる?	高木 理彰	1163
医療史回り舞台(243) 電撃性猩紅熱に斃れた平清盛	篠田 達明	1242
整形外科用語の散歩道	国分正一	Meridian theory/1182, Myalgia/1239, Myotome/1265
整形外科手術・私のポイント 上腕骨近位部骨折に対する人工骨頭置換術	玉井 和哉	1240



## 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

鈴木志郎<sup>\*1)</sup> 関矢一郎<sup>\*2)</sup> 宗田大<sup>\*1)</sup>

**要旨**：滑膜間葉系幹細胞は高い増殖・軟骨分化能を有し、軟骨再生の細胞源として魅力がある。滑膜間葉系幹細胞を集合体にするにより、軟骨分化関連遺伝子の発現が増し、*in vitro*での軟骨分化能が増加する。またウサギの軟骨欠損モデルに対し、滑膜間葉系幹細胞集合体は表面張力で容易に接着させることが可能で、軟骨再生を促進させる。多数の集合体にして使用する方法は、滑膜間葉系幹細胞を使用する軟骨再生に有用と考えられる。

### はじめに

軟骨欠損は進行すると、変形性関節症へと移行しADLの障害となる<sup>1)</sup>。軟骨は細胞密度が低く血管がないため、再生能力が低い組織である。軟骨の修復には、細胞や組織を補うことが戦略の一つとなる。現在臨床応用されている骨髄刺激法<sup>2)</sup>では硝子軟骨の再生には至らないこと、骨軟骨柱移植<sup>3)</sup>や自家培養軟骨細胞移植<sup>4)</sup>では手術侵襲が大きいことなどの課題が残っている。間葉系幹細胞は高い増殖能と多分化能により再生医療の細胞源となり得る<sup>5)</sup>。

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、筋肉、滑膜といった間葉系組織から得ることができるが、特に滑膜

由来の間葉系幹細胞は増殖能と軟骨分化能が特に優れていることから軟骨再生医療の細胞源に適している<sup>6)</sup>。細胞の移植方法として、滑膜間葉系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%の滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に接着させることができる(図1)<sup>7)</sup>。この方法によりscaffoldを使わず関節鏡視下で細胞移植が可能となるが、細胞移植操作時に移植細胞が肉眼的に観察できず、またすべての細胞を接着させることができないことが課題である。臨床応用を考えると、準備す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。

これらの課題を解決するために、間葉系幹細胞を三次元培養し集合体とすることが有用と考えた。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考えられる。しかし、滑膜間葉系幹細胞を集合体としたときの特性や軟骨欠損部移植時の動態は明らかとなっていない。そこで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等の特性、*in vitro*、*in vivo*の軟骨分化能を検討した。

\*1) Shiro SUZUKI et al, 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

\*2) Ichiro SEKIYA, 同上, 軟骨再生学

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

**Key words** : Mesenchymal stem cell, Cartilage regeneration, Aggregate



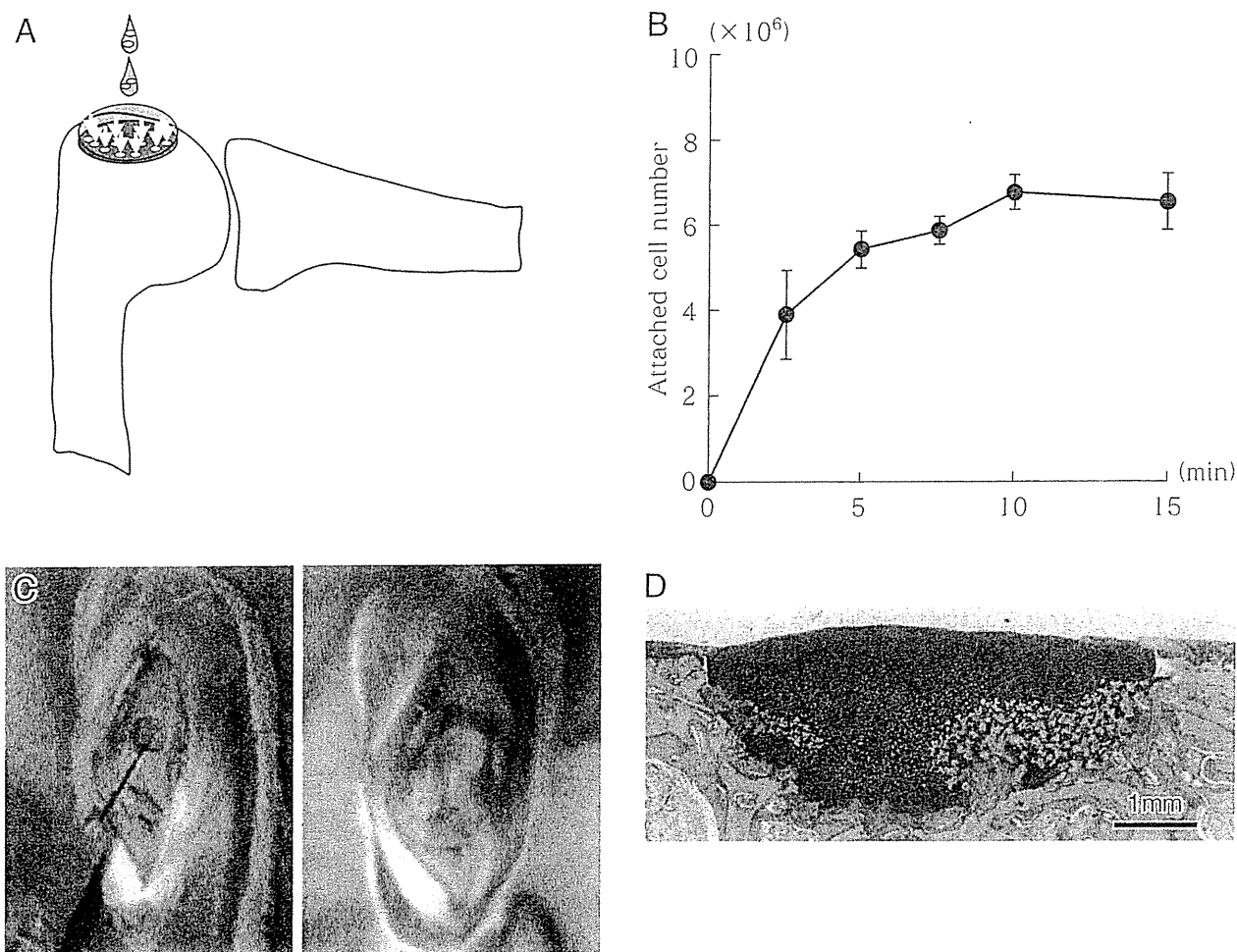


図 1

- A 滑膜間葉系幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置する方法の略図。  
 B 細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部に接着した細胞数との関係。10 分後に約 60% の滑膜間葉系幹細胞が軟骨欠損部に接着する。  
 C 日本白色家兎の骨軟骨欠損部に滑膜間葉系幹細胞浮遊液を静置する際の手術写真。  
 D 移植 4 週後の組織像 (Toluidine Blue 染色)。骨軟骨欠損部が軟骨基質で充填されている。

### I. 滑膜間葉系幹細胞集合体の特性

ヒトの滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。2.5  $\times 10^5$  の滑膜間葉系幹細胞を 35  $\mu$ l の培養液に懸濁し、hanging drop 法<sup>8)</sup> で、3 日間培養し、集合体を形成させると、大きさが約 1 mm となり、容易には壊れず扱うことが可能であった (図 2 A・B)。

Microarray により、遺伝子プロファイルを解析すると、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 (図 2 C)。集合体では、BMP2, SOX5, 6, 9 など

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 (図 2 D)。

### II. 滑膜間葉系幹細胞集合体の軟骨分化

*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、SOX9, COL2A1 を強く発現していた (図 2 E~G)。

*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 5  $\times$  5  $\times$  1.5 mm 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。集合体を表面張力により容易に

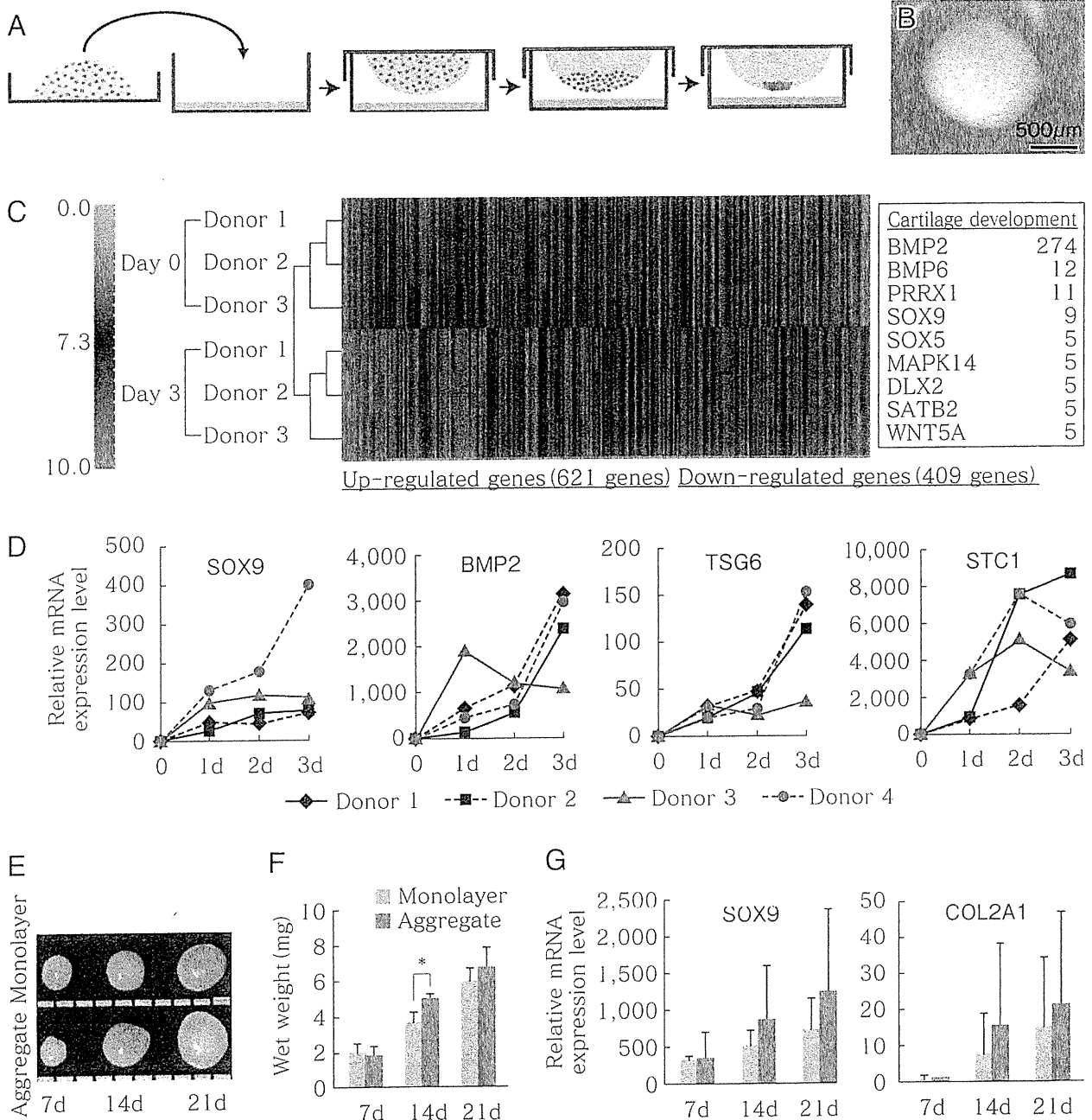


図 2

- A Hanging drop 法による滑膜間葉系幹細胞集合体の作成方法。  
 B Hanging drop 法で、3日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体の肉眼所見。  
 C 遺伝子プロファイルのクラスター解析。3人の独立した被検者から採取した細胞の集合体形成前後で解析した。軟骨分化関連遺伝子の発現変化も示す。  
 D 定量 PCR による各種遺伝子の hanging drop 中の経時的発現変化。  
 E・F・G *In vitro* での軟骨分能の比較。従来の単層培養した細胞と、集合体にした細胞とで、湿重量、SOX9・COL2A1 発現量を比較した。

軟骨欠損部に接着させることが可能であった。移植翌日には細胞集合体は軟骨欠損部に接着し、軟骨欠損部以外には観察されなかった(図 3 A)。比

較的低密度な 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(図 3 B・C)。GFP 陽性細胞の集合体を 10 個移

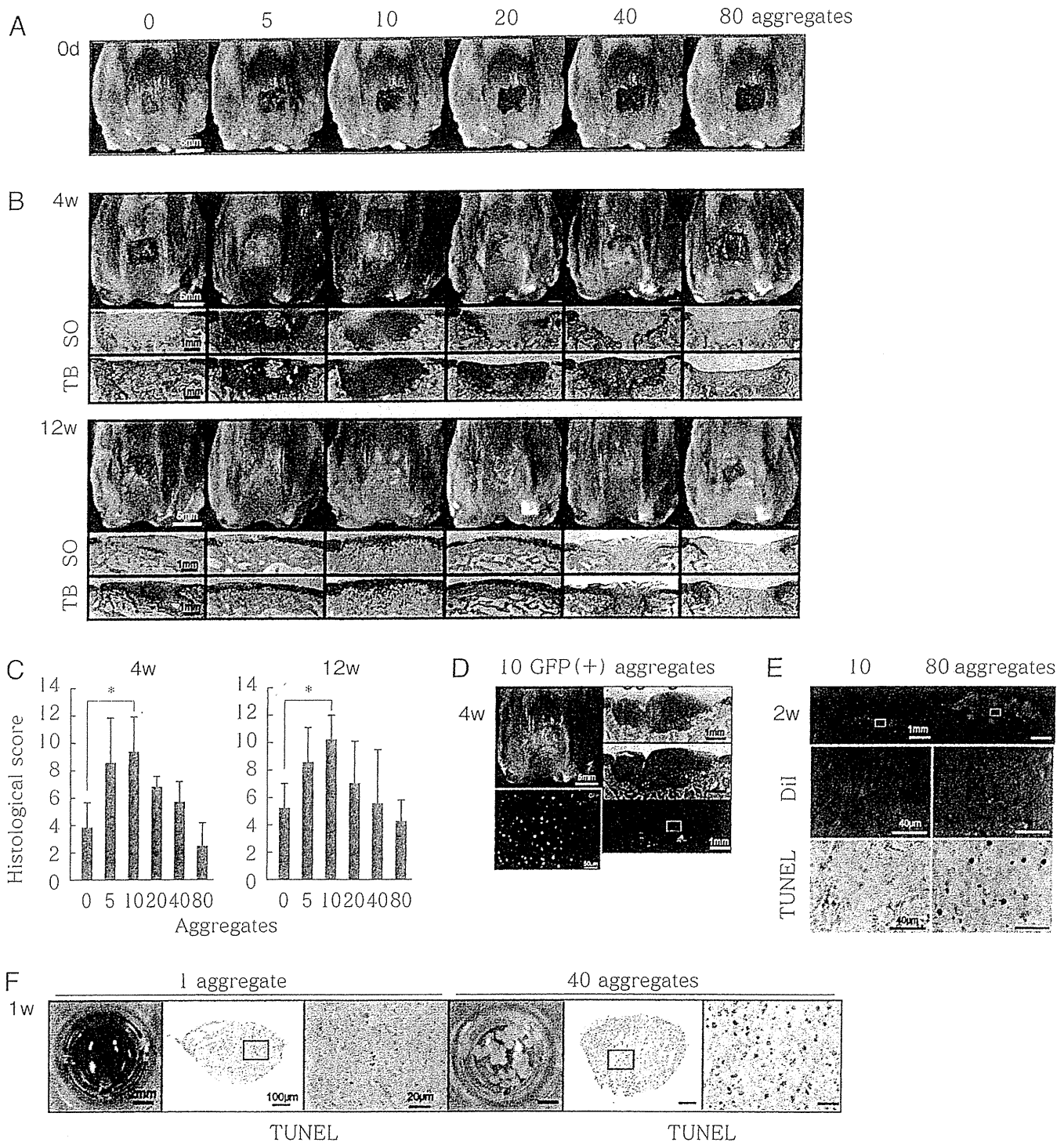


図 3

- A 日本白色家兎の軟骨欠損部に集合体を移植させた直後の肉眼所見。集合体は DiI で染色した。
- B 移植 4 週, 12 週後の肉眼所見, 組織所見。(SO : Safranin-O 染色, TB : Toluidine Blue 染色)
- C 移植 4 週, 12 週後の組織スコア。
- D GFP 陽性細胞の集合体を 10 個移植し, 4 週後の肉眼, 組織所見。再生軟骨には GFP 陽性細胞を認めた。
- E DiI で染色した集合体 10 個または 80 個を移植し 2 週後の組織所見。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 陽性細胞を認めた。
- F *In vitro* での集合体の細胞生存に関する検討。96 well 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 では培養液の色が赤から黄色になり, TUNEL 陽性細胞を多く認めた。

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(図3D)。

より多くの集合体を移植したときに、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行った。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陽性細胞を認めた(図3E)。低栄養環境が原因の一つと考え、*in vitro*での集合体の生存率の検討も行った。96 well plateで、1個と40個の集合体をそれぞれ1週間培養すると、40個の集合体を培養したwellで培養液が赤から黄色に変化し酸性となり、またTUNEL陽性細胞を多く認めた(図3F)。

### Ⅲ. 考 察

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た。これは、おそらく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察される。

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。われわれは以前の研究では、collagen gelに包埋した滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植したときには、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<sup>9)</sup>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ときに、成績が不良となるのだろうか。第一に、過剰に集合体を移植したときには、細胞を維持するのに必要な栄養素が枯渇すると考えられる。*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ときは、pHが大きく変化した。第二に、過剰に集合体を移植したと

ときには、細胞死を起こす細胞が増加していることが挙げられる。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陽性の滑膜間葉系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、間葉系幹細胞が存在することから、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の細胞が関与する。

本研究では比較的低密度で移植したとき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。われわれは既に、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研究を行っている。当初の12症例で、passage 0の細胞を平均5,000万個回収し、平均280 mm<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、滑膜間葉系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25 mm<sup>2</sup>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。

過去の骨髄間葉系幹細胞の報告と同様に、滑膜間葉系幹細胞においても、集合体とすると抗炎症遺伝子であるTSG6の発現が上昇した。TSG6の過剰発現や、TSG6蛋白の関節内投与は、関節炎を抑制することが報告されている<sup>10,11)</sup>。今回のウサギモデルで、関節炎は対照群でも強くなく、滑膜間葉系幹細胞集合体の抗炎症効果は明らかでなかった。今後他のmodelで、滑膜間葉系幹細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と考えている。

### 結 論

滑膜間葉系幹細胞を集合体にするにより、移植操作が容易となり、効率的に軟骨欠損部に接着させることが可能となった。また軟骨分化能が増加した。多数の集合体にする方法は滑膜間葉系幹細胞を使用する軟骨再生に有用と考えられる<sup>12)</sup>。

文 献

- 1) Shelbourne KD et al : Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee ; a natural history study. *J Bone Joint Surg* **85-A** (Suppl 2) : 8—16, 2003
- 2) Steadman JR et al : Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee ; average 11-year follow-up. *Arthroscopy* **19** : 477—484, 2003
- 3) Hangody L et al : Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* **391**(Suppl) : S328—336, 2001
- 4) Brittberg M et al : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331** : 889—895, 1994
- 5) Wakitani S et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* **76-A** : 579—592, 1994
- 6) Sakaguchi Y et al : Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues ; superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* **52** : 2521—2529, 2005
- 7) Koga H et al : Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* **10** : R84, 2008
- 8) Potapova IA et al : Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* **25** : 1761—1768, 2007
- 9) Koga H 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** : 207—215, 2008
- 10) Mindrescu C et al : Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in DBA/1 J mice expressing the TSG-6 transgene. *Arthritis Rheum* **46** : 2453—2464, 2002
- 11) Mindrescu C et al : Amelioration of collagen-induced arthritis in DBA/1 J mice by recombinant TSG-6, a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible protein. *Arthritis Rheum* **43** : 2668—2677, 2000
- 12) Suzuki S et al : Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther* **14** : R136, 2012

---

\*

\*

\*

\*

\*

### 3 関節と体性幹細胞： 滑膜間葉系幹細胞 による軟骨再生

■ 関矢 一郎<sup>1)</sup>・宗田 大<sup>2)</sup>

- 1) 東京医科歯科大学大学院 軟骨再生学  
2) 東京医科歯科大学大学院 運動器外科学



関矢 一郎  
1990年 東京医科歯科大学医学部卒業  
6年間整形外科の研修  
2000年 東京医科歯科大学大学院卒業  
2000年 Tulane University ポスドク  
2002年 東京医科歯科大学  
運動器外科学 助手  
2006年 軟骨再生学助教授  
2011年 軟骨再生学教授  
研究テーマ：間葉系幹細胞の臨床応用、  
関節軟骨・半月板の再生医療

Key words：間葉系幹細胞, 滑膜, 軟骨, 関節, 再生医療

#### Abstract

骨髄液, 滑膜, 骨膜, 皮下脂肪, 骨格筋から同一条件で間葉系幹細胞を採取し比較すると, 滑膜由来のものが軟骨分化能が高く, 自己血清を用いて優れた増殖を示すことから軟骨再生の細胞源として有用である。滑膜間葉系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, 軟骨修復を促進させることが実験的に示されている。基礎研究の成果を基にして, 滑膜間葉系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。

#### 1. 間葉系幹細胞による軟骨再生

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。細胞源として間葉系幹細胞は, 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。間葉系幹細胞の定義はまだまだ明確ではないが, 本論文では間葉系組織由来で, 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<sup>1)</sup>。間葉系幹

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系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, すべての間葉系組織に間葉系幹細胞が存在するといってもよいかもしれない。間葉系幹細胞は, 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。

#### 2. 関節液中の間葉系幹細胞

関節液中の細胞成分を培養すると, ある割合の細胞がコロニーを形成する。このコロニー細胞は多分化能を有し間葉系幹細胞である。正常膝関節液中の間葉系幹細胞はわずかにしか存在しないが, 前十字靭帯損傷<sup>2)</sup>や変形性関節症<sup>3)</sup>の膝の関節液中には100倍以上多くの間葉系幹細胞が存在する(図1)。

関節液中間葉系幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると, 滑膜由来間葉系幹細胞の遺伝子発現に類似することが示される<sup>4)</sup>。動物モデルで前十字靭帯, 軟骨, 半月板をそれぞれ欠損させ, 滑膜間葉系幹細胞を関節内注射すると損傷部位に接着し, 組織修復が促進する<sup>5)</sup>。滑膜は関節内の間葉系幹細胞の貯蔵庫であり, 関節内組織

Joint and somatic stem cells : cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells : Ichiro Sekiya<sup>1)</sup>, Takeshi Muneta<sup>2)</sup>,  
1) Tokyo Medical and Dental University, Department of Cartilage Regeneration 2) Department of Joint Surgery and Sports Medicine

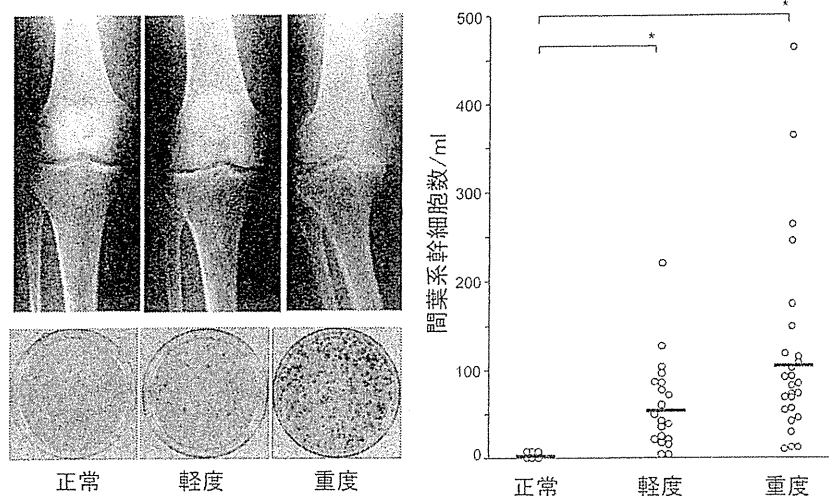


図1  
 (左上) 変形性膝関節症の重症度によるレントゲン像。  
 (左下) 膝の関節液中の細胞成分を14日間培養後にクリスタル・バイオレットで染色したデッシュ像。  
 (右) 変形性膝関節症の重症度ごとに、関節液中の間葉系幹細胞数をドナーごとにプロットしたもの。

損傷時には滑膜から関節液中に幹細胞が動員され、損傷部位に接着し、修復に寄与する機序が存在すると予測される。関節内組織損傷の自然治癒に限界があるのは、動員される幹細胞の絶対数が少ないためであり、体外で滑膜由来の幹細胞を増殖して移植することは、自然治癒力を増強するものと考えられる。

### 3. 間葉系幹細胞の調整

間葉系幹細胞の採取に関して、骨髓液であれば直接あるいはフィコールを用いて単核球を分離後に、固形の組織であればコラゲナーゼ処理後に、デッシュに播種し、培養すると、1細胞由来と考えられるコロニーを形成する。播種密度が低いと1デッシュあたりに得られる細胞数が少なくなりその後の解析が難しくなる。播種密度が高いとコロニー同士が接触し、コロニーのサイズが小さくなる。間葉系幹細胞の形態、表面抗原、増殖能、分化能等の特性は、播種密度、培養期間、継代数等の影響を受けるので<sup>9)</sup>、細胞源が異なる間葉系幹細胞の特性を比較する際には、同じ条件で培養する必要がある。私たちは最も大きい細胞コロニーを形成し、かつ1デッシュあたりの細胞数が多くなる至適コロニー形成細胞密度を求

め、この条件で得られた細胞を比較している<sup>7)</sup>。

### 4. 間葉系幹細胞の軟骨分化能の比較

間葉系幹細胞を遠心後、細胞塊として培養するペレット培養の手法を用いての *In vitro* 軟骨分化は Johnstone らにより初めて報告された<sup>8)</sup>。これは骨髓間葉系幹細胞を、DMEMにTGFβとデキサメタゾンを追加した培地を使用して培養したものである。私たちはこの分化培地にBMPを追加することにより、従来の方法よりも重量が10倍大きく、軟骨基質の染色性に優れた軟骨塊が形成可能となることを示した<sup>9)</sup>。この *In vitro* 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<sup>10)</sup>。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。

ヒトの同一ドナーから骨髓液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉系幹細胞を分離・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)<sup>11)</sup>。同様のことは、ラットやウサギでも示される。このことは滑膜や骨髓由来間葉系幹細胞の軟骨分化能が高いことを示すものである。このような比較で、滑膜や骨髓由来のものが大き

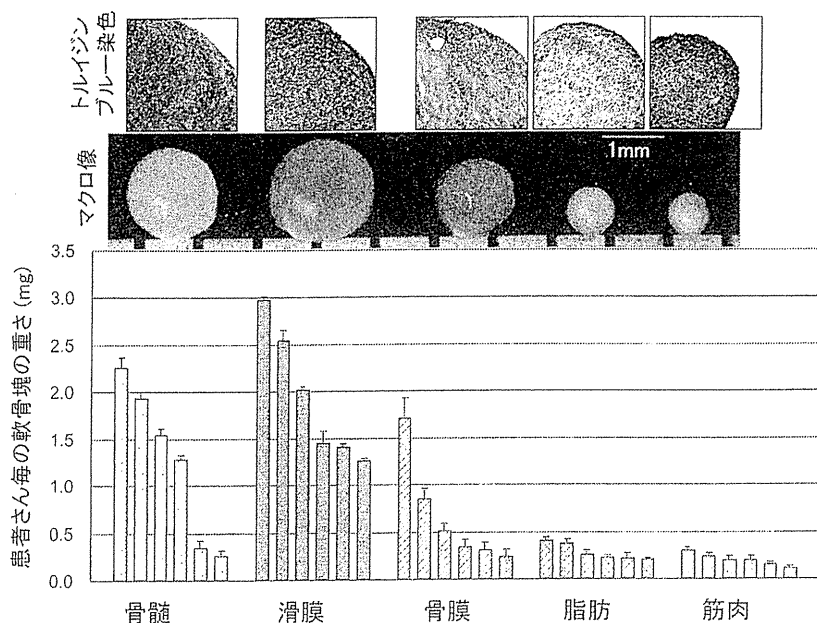


図2 *In vitro* 軟骨分化能の比較。チューブ内で軟骨分化培地に浮遊させた25万個の5種類の間葉系幹細胞を10分間遠心し細胞塊とした後に、21日間培養したもの。軟骨塊の組織像、マクロ像、及びドナー毎の軟骨塊重量を示す。

い軟骨塊を形成するのは、軟骨分化条件がこれらに適している可能性はあるが、脂肪や筋肉由来の間葉系幹細胞に適した軟骨分化条件を用いてこれらの細胞が、滑膜や骨髄由来のものよりも軟骨分化能が高いことを示す報告はこれまでない。

*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種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で調整した後に、同数の未分化間葉系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系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<sup>12)</sup>。骨髄と滑膜の軟骨分化能は高いが、軟骨は滑膜及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系幹細胞の軟骨分化能が高いと考えられる。

### 5. 自己血清による間葉系幹細胞の増殖

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系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なう方から血液を約100ml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200mgと脛骨から骨髄液を約2ml採取した。10%自己血清を用いて14日間培養すると、滑膜間葉系幹細胞は9人の方、すべてから1000万細胞以上採取できた。一方、骨髄間葉系幹細胞を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3)。ヒト血清にはPDGFのABアイソフォームが豊富に存在し、これはPDGF $\alpha$ レセプターに結合することが報告されているが、滑膜間葉系幹細胞はPDGF $\alpha$ レセプターが骨髄間葉系幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが両者の差の一部を説明するものと考えられる<sup>13)</sup>。間葉系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とも考えられるが、培養器や自己血清量に限界があることから、5000万から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



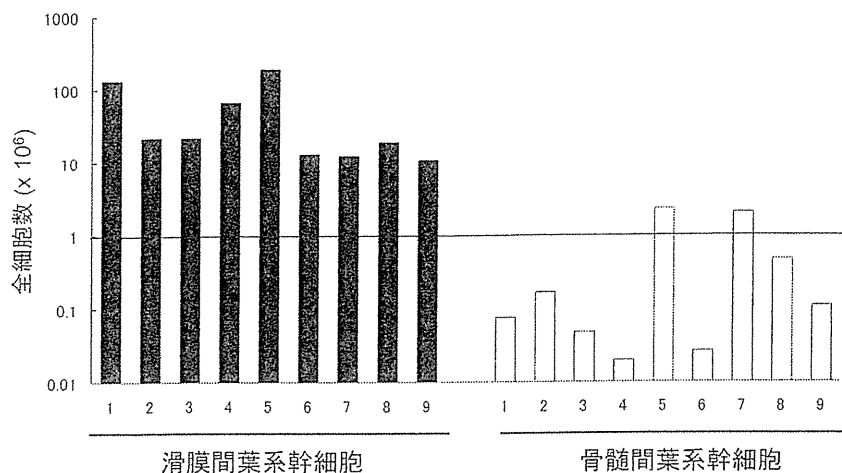


図3 自己血清で14日間培養して得られたヒト滑膜及び骨髄由来の間葉系幹細胞数。滑膜組織約0.2gと骨髄液約2mlから得られた有核細胞を10%自己血清を用いて同一条件で培養した。9人のドナー由来の結果を示す。

する観点から、滑膜間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞よりも有利である。

### 6. 軟骨欠損部への滑膜間葉系幹細胞の移植

軟骨欠損部への滑膜間葉系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。ウサギの膝に軟骨欠損を作成し、滑膜間葉系幹細胞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すると、10分間静置後すでに平衡状態となり、60%以上の細胞が接着する。人工膝関節置換術後に得られるヒトの軟骨組織とヒト滑膜幹細胞を用いても同様の結果が得られる<sup>14)</sup>。

ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作成し、滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置し、特に固定や荷重制限をせずに、経時的に関節鏡で評価した。欠損を作成しただけのコントロールでは、時間経過とともに軟骨欠損が拡大した。滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置したものは、1ヶ月時に軟骨欠損部が滑膜様の組織で覆われ、2ヶ月時に軟骨組織で被覆され、3ヶ月時には軟骨組織が厚くなるような修復過程を示した<sup>15)</sup>(図4)。

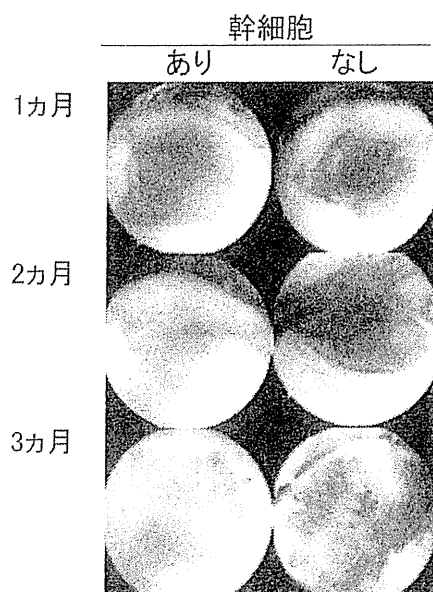


図4 ミニブタの両膝の大腿骨内顆荷重部に軟骨欠損を作成後、片側のみ滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置した。1ヶ月ごとに、関節鏡で軟骨欠損部を観察した。

### 7. 滑膜幹細胞の鏡視下移植術の実際

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間葉系幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床研究を開始している。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%

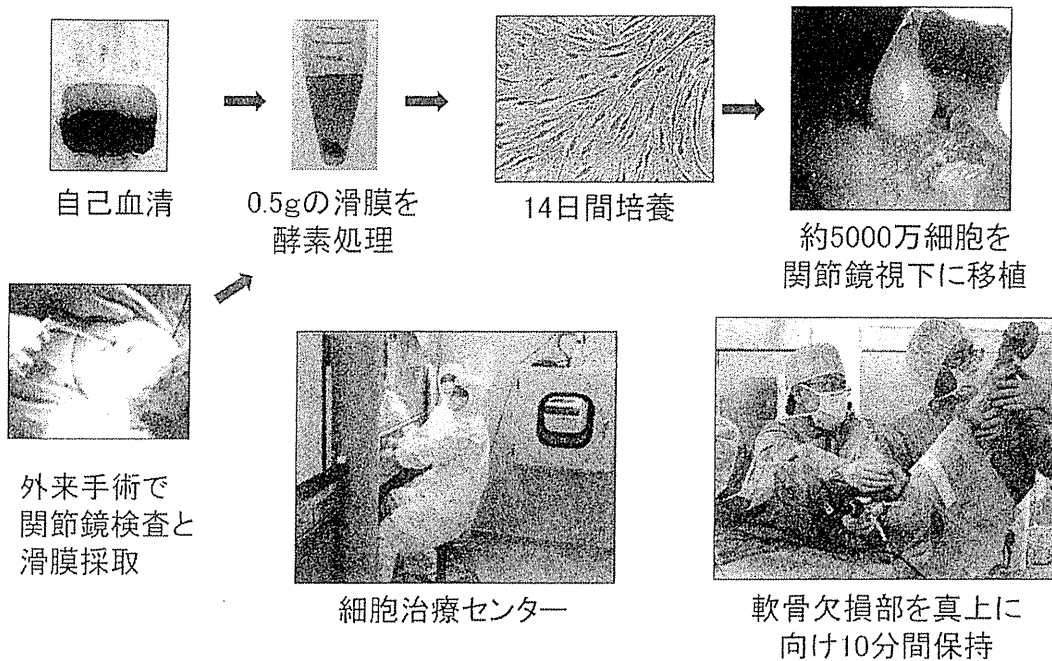


図5 滑膜幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療のスキーム。外来手術で関節鏡検査の際に滑膜を0.5 g採取し、細胞治療センターで酵素処理後、自己血清を用いて14日間培養し、約5000万の滑膜幹細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に10分間静置し接着させる。

自己血清を用いて滑膜間葉系幹細胞を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(図5)。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。

おわりに

滑膜由来の間葉系幹細胞は増殖・軟骨分化能が高く、軟骨再生の細胞源として有用である。また細胞浮遊液を10分間軟骨欠損部に静置することにより、関節鏡視下での治療が可能となる。より軟骨分化能が高い細胞の調整や、より確実な細胞移植手技の開発が今後の課題である。

文献

- 1) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al.: *Cytherapy*. 2006 ; 8 (4) : 315-7.
- 2) Morito T, Muneta T, Hara K, et al.: *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug;47 (8) : 1137-43.
- 3) Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al.: *J Orthop Res*. 2012 Jun;30(6) : 943-9.
- 4) Segawa Y, Muneta T, Makino H, et al.: *J Orthop Res*. 2009 Apr;27 (4) : 435-41.
- 5) Horie M, Sekiya I, Muneta T, et al.: *Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect.*
- 6) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al.: *Stem Cells*. 2002;20 (6) : 530-41.
- 7) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al.: *Arthritis Rheum.*, 52: 2521-9, 2005.
- 8) Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al.: *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10;238 (1) : 265-72.
- 9) Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, et al.: *J Cell Biochem*. 2006 Jan 1;97 (1) : 84-97.
- 10) 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.*
- 11) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al.: *Arthritis Rheum.*, 52: 2521-9, 2005.
- 12) 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*
- 13) Nimura A, Muneta T, Koga H, et al.: *Arthritis Rheum*. 2008 Jan 31;58 (2) : 501-510
- 14) Koga H, Shimaya M, Muneta T, et al.: *Arthritis Res Ther*. 2008;10 (4) : R84.
- 15) Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, et al.: *Cytherapy*. 2012 Mar;14 (3) : 327-38.

# 日本医師会雑誌

THE JOURNAL OF THE JAPAN MEDICAL ASSOCIATION

11

第141巻・第8号

2012

平成24年

## 特集 成人の関節痛の臨床

【座談会】さまざまな関節痛を診断し、治療する  
—予防の視点でロコモティブシンドロームも含めて

成人の変形性関節症の頻度

関節疾患の諸症状とその診察法

リウマチ専門医からみた関節痛を有する病変の病態と診断

肩関節痛の原因およびその診断・予防法・治療法

股関節痛の鑑別診断・予防と保存療法

股関節疾患を専門医に紹介するタイミング、手術法・長期成績

膝関節痛の診断および変形性膝関節症の保存療法

成人膝関節慢性疾患の手術法・長期成績と専門医に紹介するタイミング

手指・足趾の関節痛の原因・診断・治療

関節の外傷(捻挫・脱臼)の診断・治療 ほか

- ◆各科臨床のトピックス アレルゲン特異的免疫療法の現状と将来展望—舌下免疫療法を中心として
- ◆新薬紹介 リバーロキサバン
- ◆画像診断セーフティマネジメント 卵巣子宮内膜症—卵巣がんと紛らわしい症例
- ◆外来での小外科 適応外とする症例



日本医師会

<http://www.med.or.jp/>

# 軟骨治療の進歩—滑膜幹細胞による軟骨再生

関矢一郎\* 宗田 大\*\*

膝の関節液から細胞成分を取り出し培養すると、コロニー形成細胞が認められる。この細胞は軟骨・骨・脂肪に分化する能力がある。関節液中にはコロニーを形成し、多分化能を有する間葉系幹細胞が存在する。正常膝関節液中の間葉系幹細胞はわずかしか存在しないが、関節内靭帯損傷や変形性関節症の膝の関節液中にはその100倍以上多くの間葉系幹細胞が存在する<sup>1)</sup>。

関節液中に存在する間葉系幹細胞は、関節を裏打ちする膜である滑膜の間葉系幹細胞に遺伝子プロファイルが類似する。動物モデルで前十字靭帯、軟骨、半月板をそれぞれ欠損させ、滑膜間葉系幹細胞を関節内注射すると、損傷部位に接着し、組織修復が促進する<sup>2)</sup>。滑膜は間葉系幹細胞の保存庫であり、関節内組織損傷時には滑膜から関節液中に幹細胞が動員され、損傷部位に接着し、修復に寄与する機序が存在することが予測される。関節内組織損傷の自然治癒に限界があるのは、動員される幹細胞の絶対数が少ないためであり、体外で滑膜由来の幹細胞を増殖して移植することによって、自然治癒力が増強する可能性がある。

間葉系幹細胞の軟骨分化能を比較すると、滑膜や骨髓液由来のものは、皮下脂肪や骨格筋由来のものよりも軟骨分化能が高い<sup>3)</sup>。自己血清による培養で、滑膜間葉系幹細胞は骨髓液由来のものよりも初代細胞をより多く確保できる利点がある<sup>4)</sup>。滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置すると、6割の細胞が接着する<sup>5)</sup>。

これらの基礎研究を基に、筆者らは軟骨再生の臨床研究を開始している。採取した滑膜を酵素処理後、自己血清を使用して14日間、本学の細胞治療センターで培養し、関節鏡視下で軟骨欠損部に

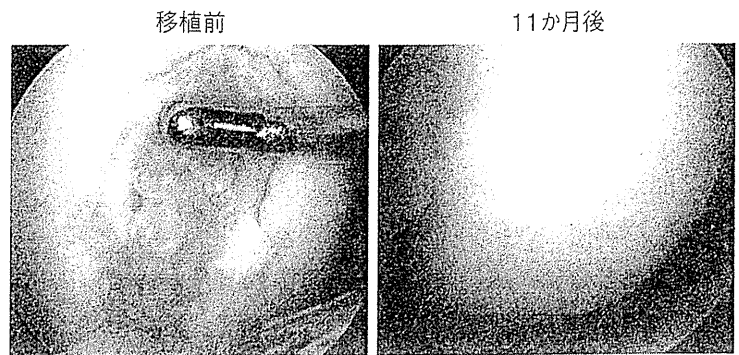


図1 軟骨欠損に対する滑膜間葉系幹細胞移植11か月後の関節鏡視像

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。

細胞浮遊液を10分間静置して移植する。これまで20例以上に行い、多くの例で自覚症状が改善し、関節鏡やMRI検査で軟骨欠損部の修復を確認している(図1)。

..... 文 献 .....

- 1) Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, *et al* : Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res* 2012 ; 30 : 943-949.
- 2) Horie M, Sekiya I, Muneta T, *et al* : Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009 ; 27 : 878-887.
- 3) 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* 2005 ; 52 : 2521-2529.
- 4) 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* 2008 ; 58 : 501-510.
- 5) Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, *et al* : 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. *Cytotherapy* 2012 ; 14 : 327-338.

Progress of cartilage treatment : Cartilage regeneration by synovial stem cells. \*Ichiro Sekiya : Department of Cartilage Regeneration, Tokyo Medical and Dental University, \*\*Takeshi Muneta : Department of Joint Surgery and Sports Medicine, Tokyo Medical and Dental University. \*東京医科歯科大学大学院教授 (軟骨再生学), \*\*教授 (運動器外科学)