

ORTHOPEDIC SURGERY

臨床雑誌

整形外科

Vol. 63 No.3
2012-3

論 説 変形性股関節症例と健常例における前骨盤平面を基準とした大腿骨頸部前捻角の違い……今井教雄…201

経験と考察 腰椎棘突起正中縦割進入椎弓切除術の治療成績……………野村 裕…209

初回人工股関節全置換術・人工骨頭置換術後の大腿骨ステム周囲骨折の検討……………蜂須賀 晋…216

過酷なトレーニングが骨代謝マーカーに及ぼす影響……………内藤智子…221

臨床室 咽後膿瘍と鑑別を要した石灰沈着性頸長筋腱炎の3例……………尾立征一…224

右下肢痛を主訴とし脊椎疾患が疑われた閉鎖孔ヘルニアの1例……………佐藤 剛…229

陳旧性月状骨周囲脱臼を伴う手根管症候群の1例……………宮城道人…232

体育の跳び箱で生じた腸腰筋血腫により大腿神経麻痺をきたした1例……………酒井康臣…236

高度外反膝変形による胫骨疲労骨折の遷延化例に対して
ロングステムをもつ人工膝関節により治療した1例……………村上幸治…239

下垂足で発症した Churg-Strauss 症候群の1例……………大坪 誠…242

問題点の検討 整形外科回復期リハビリテーション病棟の現状と問題点……………矢田部佳久…247

バイオメカニクス 135°ネックステム角人工股関節で40°、45°のカップ外方開角における
カップ前方開角とネック前捻角の最適な組み合わせ……………吉峰史博…250



X線診断Q&A……………秋山 達…259

卒後研修講座
変形性膝関節症に対する保存的治療——個々の患者の病態に応じた治療法の選択
とガイドライン上での評価およびエビデンス……………山田治基…261

専門医試験をめざす症例問題トレーニング
リウマチ性疾患、感染症……………中川泰彰…271

最新原著レビュー
人工股関節全置換術後の歩行改善に影響を及ぼす因子の検討……………田中里紀…277

オステオポンチンはマクロファージからのサイトカイン分泌を介して
摩耗粉による骨溶解を促進する……………清水禎則…281

誌 説 医学教育——最近のトレンド……………渡辺雅彦…208

私 論 日暮れて道遠し……………堀田哲夫…220

整形トピックス
滑膜間葉幹細胞の役割と
低侵襲な軟骨再生への応用……………関矢一郎…228

Vocabulary
Neuropeptide Y (NPY) ニューロン……………笹沼秀幸…246

喫茶ロビー
整形外科医の趣味の園芸……………石井朝夫…286

学会を聞く
第30回日本運動器移植・再生医学研究会を
主催して……………岩本幸英…287

第38回日本股関節学会……………山本卓明…291

第39回日本関節病学会……………山崎琢磨…294

書 評
『新スポーツトレーナーマニュアル』……………高岸憲二…258

『感染症 Emergency』……………大川 淳…270

『運動処方指針——運動負荷試験と
運動プログラム(原著第8版)』……………芳賀信彦…280

『運動器の痛み プライマリケア
肘・手の痛み』……………稲垣克記…290

お知らせ
第23回日本末梢神経学会…215/一般医家に役立つリ
ハビリテーション医療研修会…249

Information……………245

別冊整形外科 No. 62
「運動器疾患の画像診断」要旨募集……………297

学会告知板……………298/寄稿のさだめ……………299

編集後記……………300

滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用

関節液中の細胞成分を培養皿に培養すると、ある割合の細胞がコロニー（細胞集団）を形成する。条件をかえてこの細胞を培養すると軟骨・骨・脂肪に分化する。関節液中にはコロニーを形成し、多分化能を有する間葉幹細胞が存在する。正常膝関節液中の間葉幹細胞はわずかにしか存在しないが、前十字靭帯損傷や変形性関節症の膝の関節液中には100倍以上多くの間葉幹細胞が存在する¹。

関節液中間葉幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、滑膜由来間葉幹細胞の遺伝子発現に類似することが示される²。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³。滑膜は間葉幹細胞のリザーブであり、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と考えられる。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れば自然治癒力を増強する可能性がある。

間葉幹細胞の軟骨分化能を *in vitro* および *in vivo* で

比較すると、滑膜や骨髄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^{4,5}。自己血清による培養で、滑膜間葉幹細胞は骨髄液由来のものよりも初代細胞を多く確保できるという利点がある⁶。滑膜間葉幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置すると、約60%の細胞が接着する⁷。

これらの基礎研究をもとに、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細胞浮遊液を10分間静置して移植する（図1）。翌日より可動域訓練、2週後より部分荷重、6週後より全荷重を開始する。これまで20例以上に行い、多くの症例で自覚症状が改善し、MRIで軟骨欠損部が修復されている結果を得ている。

文献

- 1) Morito T, Muneta T, Hara K et al: Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* 47: 1137-1143, 2008
- 2) Segawa Y, Muneta T, Makino H et al: Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res* 27: 435-441, 2009
- 3) 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* 27: 878-887, 2009
- 4) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K et al: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52: 2521-2529, 2005
- 5) Koga H, Muneta T, Nagase T et al: Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for *in vivo* chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333: 207-215, 2008
- 6) Nimura A, Muneta T, Koga H et al: Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 58: 501-510, 2008
- 7) Koga H, Shimaya M, Muneta T et al: Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 10: R84, 2008

（東京医科歯科大学軟骨再生学・関矢一郎/

同大学運動器外科・宗田大）

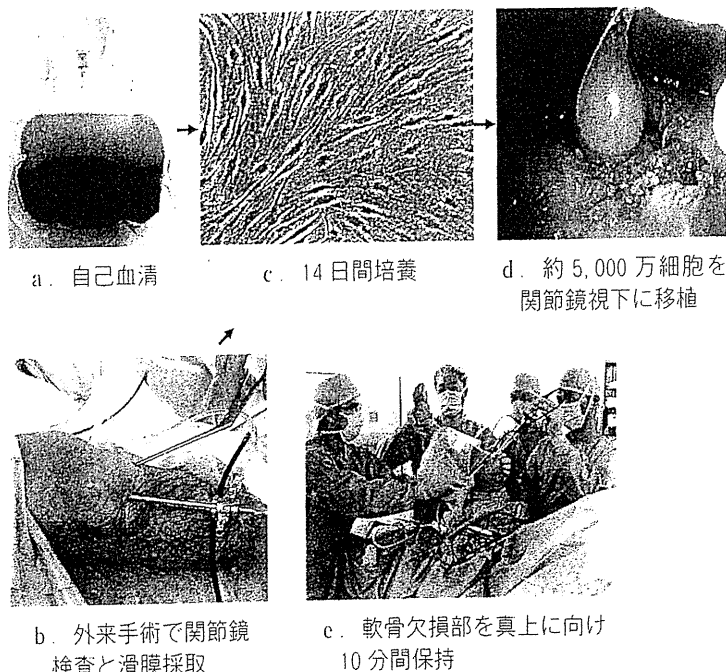


図1. 滑膜間葉幹細胞による軟骨再生医療のスキーム。はじめに自己血清を準備する。外来手術で関節鏡検査と滑膜採取を行う。約0.5gの滑膜を酵素処理後、14日間自己血清を使用して細胞治療センターで培養する。細胞浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に静置し、10分間肢位を保持する

再生医療叢書

6

骨格系

日本再生医療学会

[監修]

脇谷滋之

鄭 雄一

[編集]

朝倉書店

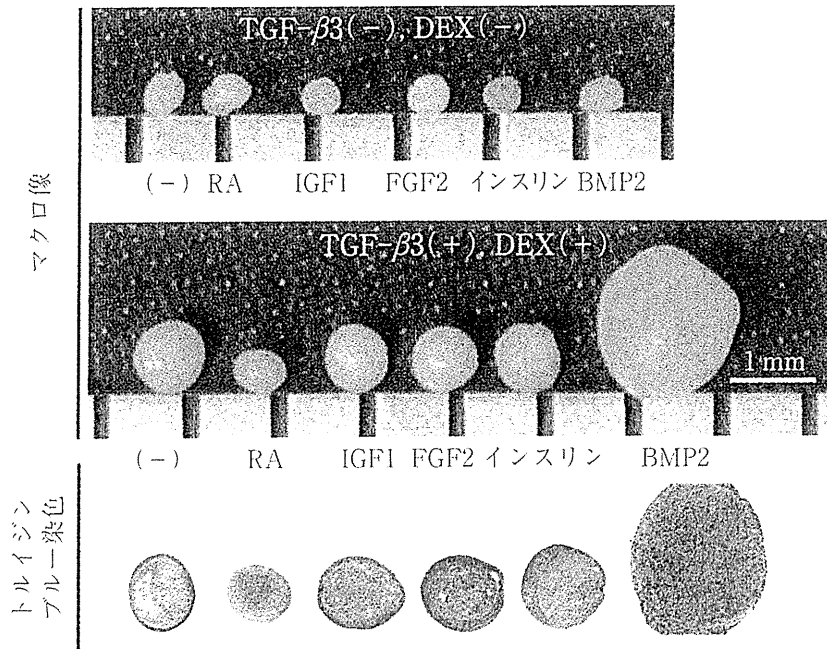
再生医療叢書

6

骨格系

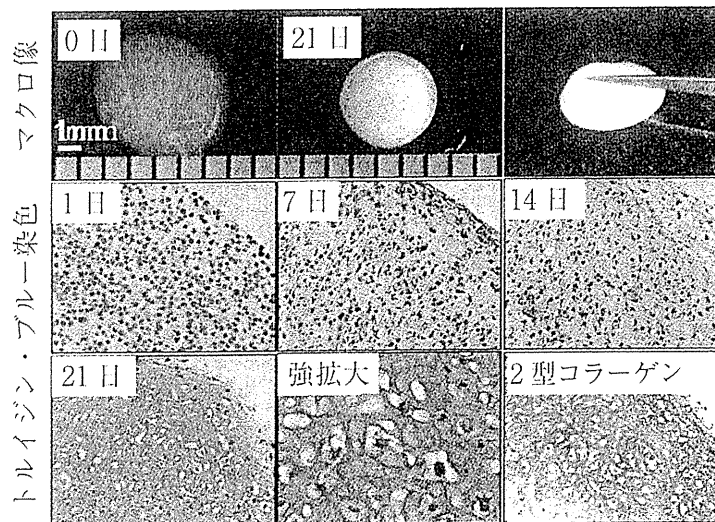
日本再生医療学会
脇谷滋之・鄭 雄一
[監修]
[編集]





口絵1 ヒト滑膜間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの効果 (図4.2)

25万個の細胞を遠心し細胞塊としたのちに、3種までの組合せで薬剤、サイトカインを培養液中に添加し3週間培養した。TGF- β 3、デキサメタゾン、BMP2の組合せを用いたものが最も大きい軟骨塊を形成した。



口絵2 ヒト滑膜間葉系幹細胞とコラーゲンゲルの複合体を *in vitro* で軟骨分化させたもの (図4.5)

培養期間とともに細胞外基質の染色性が増し、21日後には2型コラーゲン陽性となり、軟骨様の硬さとなった。

4.2.2 間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化

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 らによりはじめて報告された。これは骨髄間葉系幹細胞を、DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) に TGF (β transforming growth factor)- β とデキサメタゾン (dexamethasone) を添加した培地を使用して培養したものである。筆者らはこの分化培地に BMP (bone morphogenetic protein) を添加することにより、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。滑膜間葉系幹細胞に対しても *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの組合せを検討して、同等の結果が得られた (図4.2)。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。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髄液、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日間ペレット培養すると、滑膜や骨髄由来のものが大きい軟骨塊を形成する (図4.3)。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髄由来間葉幹細胞の軟骨分化能が高いことを

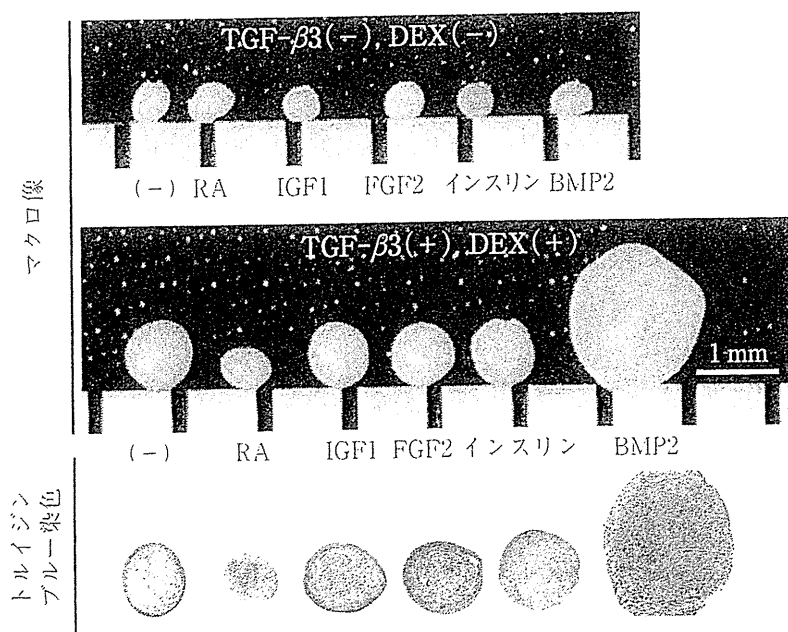


図4.2 ヒト滑膜間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの効果 (口絵1参照)

25万個の細胞を遠心し細胞塊としたのちに、3種までの組合せで薬剤、サイトカインを培養液中に添加し3週間培養した。TGF- β 3、デキサメタゾン、BMP2の組合せを用いたものが最も大きい軟骨塊を形成した。TGF- β 3 (transforming growth factor- β 3)、DEX (dexamethasone)、RA (retinoic acid)、IGF1 (insulin like growth factor-1)、FGF2 (fibroblast growth factor-2)、BMP2 (bone morphogenetic protein-2)。

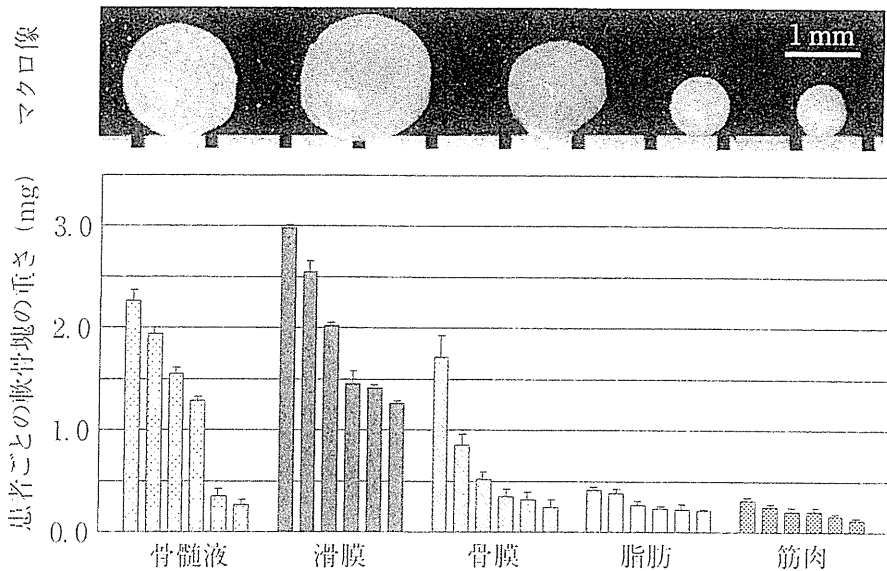


図 4.3 ヒト各種間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能の比較

同一ドナーから各種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で増殖させたのちに、同数の細胞を、同一条件で *in vitro* で軟骨分化させたもの。滑膜由来のものが最も大きく重い軟骨塊を形成する。

示すものである。このような比較で、滑膜や骨髄由来のものが大き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みられない。

各種間葉系幹細胞を *in vitro* で軟骨分化させると、最終的な軟骨塊の組織像は類似する。しかし分化過程において、細胞源に由来する形態学的特徴は存在するであろうか。骨髄および滑膜由来間葉系幹細胞と軟骨細胞で比較すると、分化導入前の浮遊状態で形態学的差異は明らかでないが、1日後に最も明らかな差異を認める。いずれも細胞塊は2層構造を呈し、特に深層に細胞種による特徴を認める。骨髄間葉系幹細胞は細胞間裂隙を伴わない円形の細胞、滑膜間葉系幹細胞では中等度の細胞間裂隙と紡錘形の細胞、軟骨細胞は豊富な細胞間裂隙とともに多角形の細胞で構成される (図 4.4)。

ペレット培養を用いて *in vitro* で軟骨分化させる場合、最大でも直径 3 mm 程度の軟骨塊しか形成されない。しかし滑膜間葉系幹細胞をスキャフォールドと組み合わせることにより、もっと大きな軟骨組織を *in vitro* で作成することが可能となる (図 4.5)。この場合、安全性の観点から使用が容易でない TGF- β の使用と、大量に BMP を要することが臨床応用では問題となりうる。

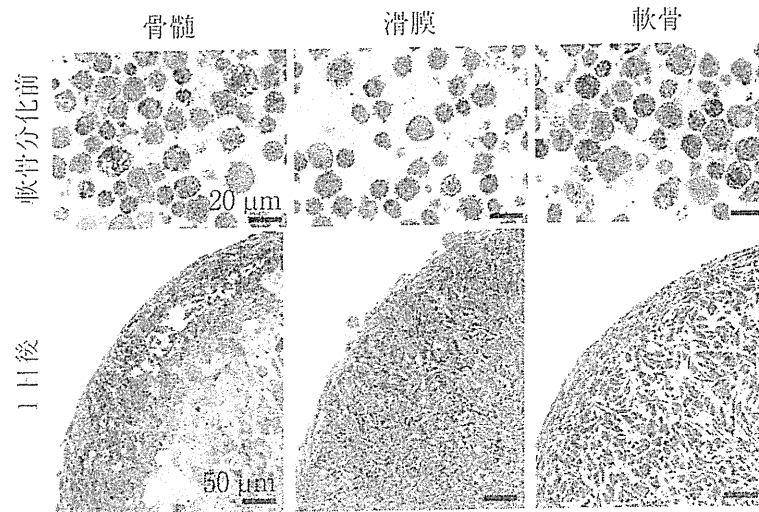


図 4.4 骨髄間葉系幹細胞、滑膜間葉系幹細胞、軟骨細胞の *in vitro* 軟骨分化過程の形態比較。ペレット培養開始前と 1 日後の細胞をエボン包埋し、トルイジン・ブルー染色したもの。1 日後の細胞塊の深層に、細胞種による差異を最も大きく認める。

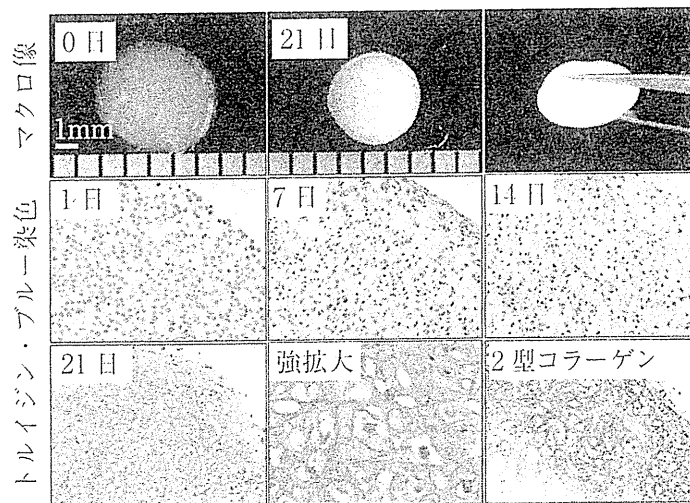


図 4.5 ヒト滑膜間葉系幹細胞とコラーゲンゲルの複合体を *in vitro* で軟骨分化させたもの (口絵 2 参照)

培養期間とともに細胞外基質の染色性が増し、21 日後には 2 型コラーゲン陽性となり、軟骨様の硬さとなった。

4.2.3 各種間葉系幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較

in vitro 軟骨分化能の結果は必ずしも *in vivo* の結果を反映しない可能性がある。そこで同一ウサギから各種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で調製したのちに、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* の結果を反映する (図 4.6)。

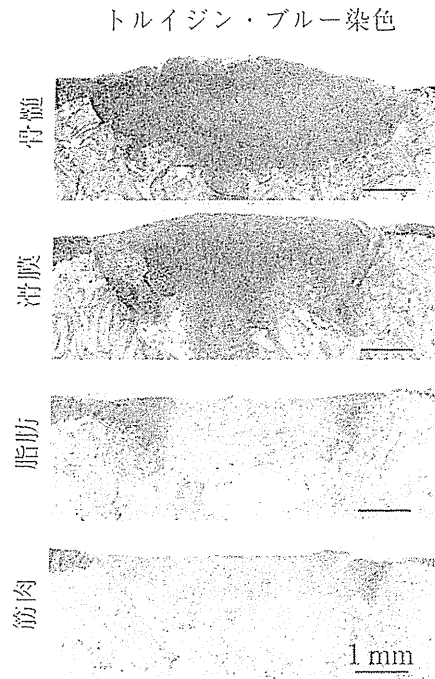


図 4.6 ウサギ各種間葉系幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較

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用意したのちに、同数の細胞をゲルに包埋し、移植後骨膜被覆した。4週経過後の、トルイジン・ブルー染色による組織像を示す。骨髄由来と滑膜由来のものが軟骨基質を豊富に産生する。

4.2.4 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の被施術者9人から血液を約100 ml採取し、閉鎖式バッグを使用して血清を分離した。また、手術中に滑膜組織約200 mgと脛骨から骨髓液を約2 ml採取した。10%自己血清を用いて14日間培養すると、滑膜間葉系幹細胞は9人すべてから1000万細胞以上採取できた。一方、骨髓間葉系幹細胞を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4.7)。ヒト血清にはPDGF (platelet-derived growth factor, 血小板由来増殖因子)のABアイソフォームが豊富に存在し、これはPDGF α レセプターに結合することが報告されているが滑膜間葉系幹細胞はPDGF α レセプターが骨髓間葉系幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが両者の違いを説明するものと考えられる。間葉系幹細胞を使用する再生医療を実施するに当たり、用意できる細胞数が多いほどよいが、培養器や自己血清量に限界があることから、5000万から1億細胞を目標にするのが現実的と筆者らは考えている。継代をしないほうが染色体異常のリスクが低く、自己血清を使用する観点から、滑膜間葉系幹細胞は骨髓間葉系幹細胞よりも

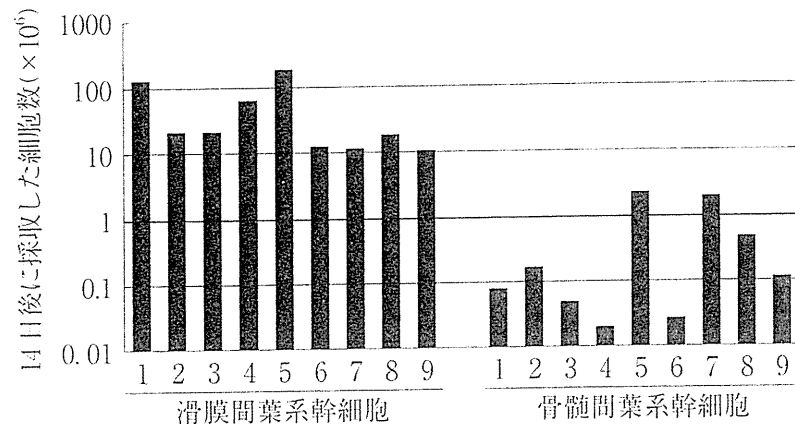


図 4.7 ヒト滑膜および骨髄由来間葉系幹細胞の自己血清による培養
滑膜組織約 0.2 g と骨髄液約 2 ml から得られた有核細胞を、10%自己血清を用いて 14 日間培養して得られた細胞数 (9 人の結果)。滑膜由来のものは 9 人全員から 1000 万個以上採取できた。

有利である。

4.2.5 滑膜における間葉系幹細胞の局在

生体内で幹細胞の未分化性を維持し、さらにその動態を制御している微少環境 (幹細胞ニッチ) については、いまだ不明な点が多い。間葉系幹細胞、特に滑膜間葉系幹細胞を特異的に識別するマーカーが存在しないことから、その局在を明らかにすることは現時点で困難であるが、筆者らは滑膜中の血管周囲に間葉系幹細胞が多く存在するのではないかと仮説を立て、その検証を行った。

人工膝関節置換術時に滑膜を採取し、細胞採取用と組織解析用の二つに分けた。細胞採取用のものはコラゲナーゼ処理後、有核細胞を 60 cm² のディッシュ当たり 1 万個播種し、14 日間培養後にコロニー形成数を求めた。組織解析用の滑膜は、 α -SMA (smooth muscle actin) 陽性の血管数と、CD31 陽性の内皮細胞の単位面積当たりの数を求めた。有核細胞当たりの間葉系幹細胞の数は、単位面積当たりの血管数および血管内皮細胞数と相関した (図 4.8)。

これまで、間葉系幹細胞のマーカー候補の一つである Stro-1 が滑膜の血管内皮細胞周囲に発現すること、骨髄において血管周囲が幹細胞ニッチの可能性が報告されている。筆者らの結果も血管内皮細胞周囲に滑膜間葉系幹細胞が存在することを示唆する。

4.2.6 関節液中の間葉系幹細胞

変形性膝関節症や関節リウマチ患者の、水腫のある関節液中に間葉系幹細胞が

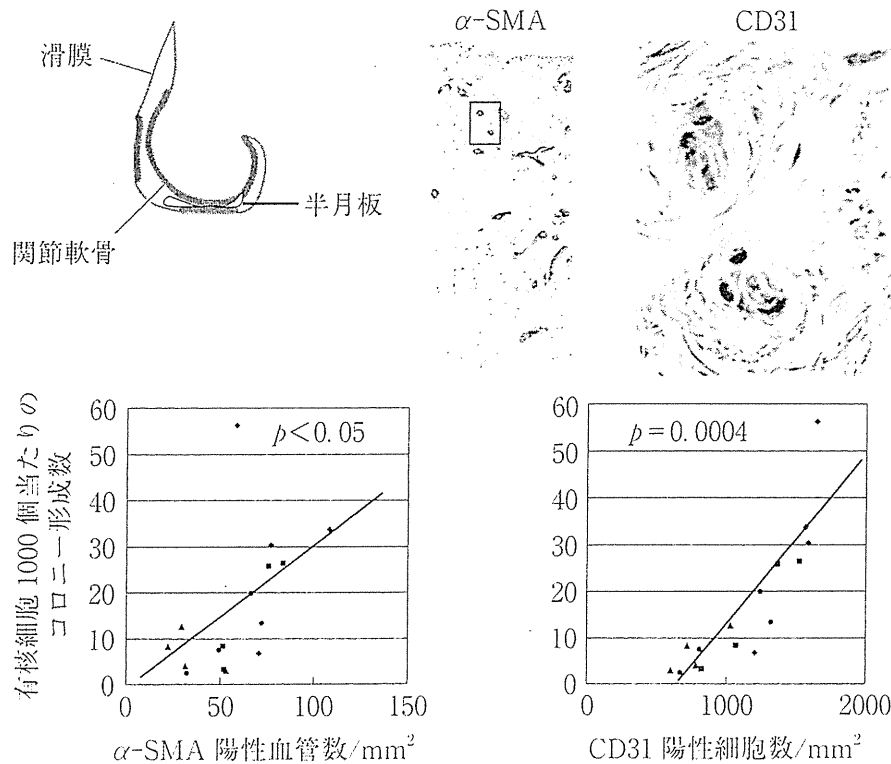


図 4.8 ヒト滑膜間葉系幹細胞と血管との関連

膝手術時に滑膜を採取し、それぞれを二つに分けた。細胞採取用のものはコラゲナーゼ処理後、60 cm²のディッシュ当たり有核細胞を1万個播種し、14日間培養後、コロニー形成数を求めた。組織解析用の滑膜は、 α -SMA (smooth muscle actin) 陽性の血管数と、CD31 陽性の内皮細胞の単位面積当たりの数を求めた。有核細胞当たりの間葉系幹細胞の数は、単位面積当たりの血管数および血管内皮細胞数と相関した。

存在することを、2004年に McGonagle らがはじめて報告した。筆者らは膝前十字靭帯損傷膝の関節液中には、正常膝の関節液中よりも100倍以上多く間葉系幹細胞が存在し、その特性が骨髄よりも、滑膜由来のものにより類似することを報告している。さらに、変形性膝関節症の重症度に応じて関節液中の間葉系幹細胞が増加し(図4.9)、これらは滑膜由来のものに類似することを明らかにした。これらの結果は、膝関節内の組織が障害されると、骨髄からではなく、滑膜から間葉系幹細胞が動員され、関節液中の幹細胞が増加し、修復に寄与する機序が存在することを示唆する。

4.2.7 関節内と関節外間葉組織由来間葉系幹細胞の遺伝子プロファイル

膝関節の発生過程で、関節内組織である軟骨、滑膜、半月板、前十字靭帯は interzone cells から分化する。関節内組織の起源が共通していることから、関節内にあるそれぞれの組織中の間葉系幹細胞は、関節外組織由来の間葉系幹細胞とは区別できる共通した特性を持っていることが推測される。そこで関節内と関節

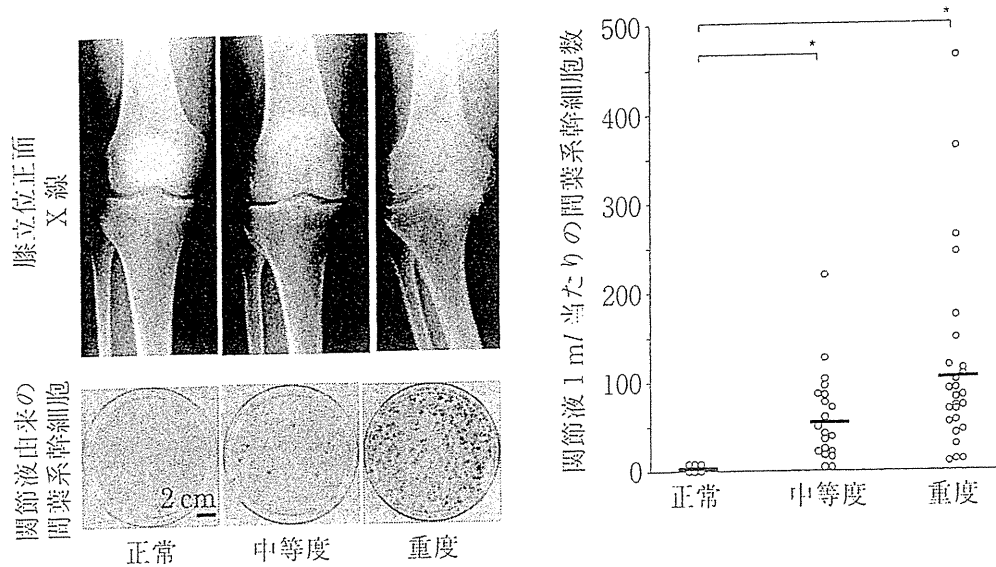
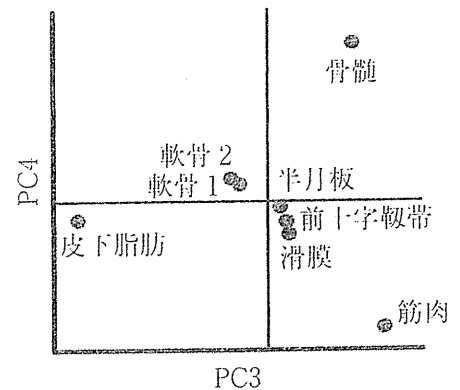


図 4.9 ヒト変形性膝関節症の X 線像による重症度と関節液中に存在する間葉系幹細胞との関連。最初に膝の X 線像により、重症度分類を行った。関節液を採取し、細胞成分を 14 日間培養後、細胞コロニーを染色した。重症度で分類し、関節液中の間葉系幹細胞数をプロットした。平均値をバーで示す。変形性膝関節症の重症度と関節液中の間葉系幹細胞数は関連する。

図 4.10 種々のヒト間葉系幹細胞と軟骨細胞における遺伝子プロファイルの主成分解析。関節内組織（滑膜、半月板、前十字靭帯）と関節外組織（骨髄、皮下脂肪、筋肉）から間葉系幹細胞を採取し、RNA を抽出した。また軟骨細胞からも RNA を抽出した。これらの遺伝子プロファイルの主成分解析した。関節内組織である滑膜、半月板、前十字靭帯由来の間葉系幹細胞と軟骨細胞の遺伝子発現は、関節外組織である筋肉、皮下脂肪、骨髄由来の間葉系幹細胞と比較して相互に近い。



外間葉系組織由来間葉系幹細胞の遺伝子プロファイルと比較した。

人工膝関節置換術の際に、ヒトの滑膜、半月板、前十字靭帯、筋肉、皮下脂肪、骨髄を採取した。これらの組織由来の間葉系幹細胞と、大腿骨頸部骨折の手術時に得られる関節軟骨由来の細胞から RNA を採取し、マイクロアレイを用いて 4 万 7000 種類の遺伝子発現を網羅的に解析した。主成分解析を行うと、関節内組織である滑膜、半月板、前十字靭帯由来の間葉系幹細胞と軟骨細胞の遺伝子発現は、関節外組織である筋肉、皮下脂肪、骨髄由来の間葉系幹細胞と比較して、相互に近いことが示された (図 4.10)。これらの結果は、関節内組織の細胞治療を行う際に、関節内組織由来の間葉系幹細胞を用いるほうが、関節外組織由来の間葉系幹細胞を用いる場合よりも有利であることを示唆する。

4.3 滑膜間葉系幹細胞の移植

4.3.1 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は、細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置し、ある時間が経過すると、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製し、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（図4.11）。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間葉系幹細胞を用いても同様の結果が得られる。

ウサギの膝関節に軟骨欠損を作製し、細胞浮遊液を10分間静置したものは、同じ細胞浮遊液を直接関節内注射したものと比較し、確実な軟骨修復が観察される（図4.12）。ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作製し、DiI (1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート) でラベルした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1週後に評価すると、組織学的にDiI陽性細胞を軟骨欠損部に認める（図4.13）。滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置して移植する方法は、ヒトでは関節鏡視下での低侵襲な細胞移植を可能とする。

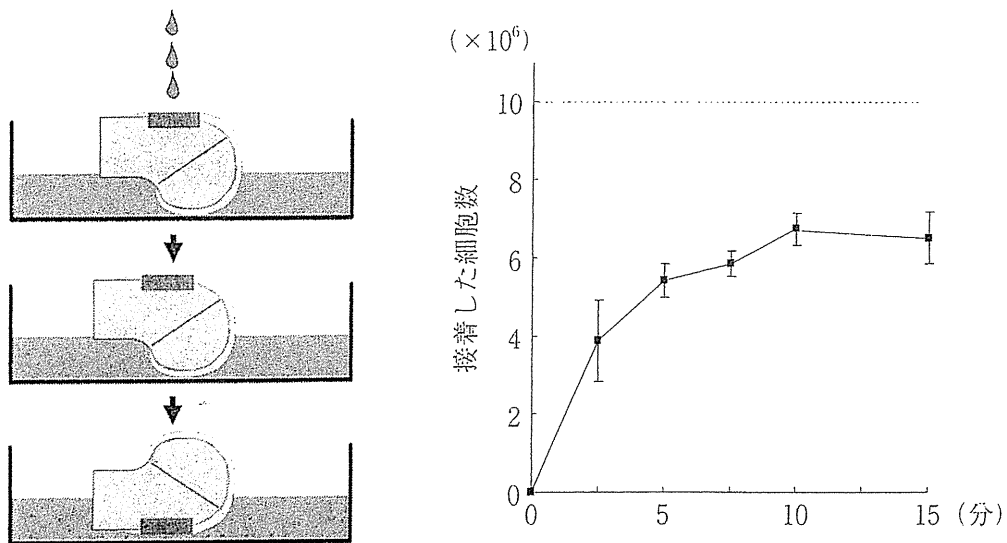


図4.11 滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に静置した際の、静置時間と接着細胞数の関係

ウサギ滑膜間葉系幹細胞1000万個を100 μ lのPBSに浮遊させ、軟骨欠損部に静置し、一定時間経過ごとに軟骨欠損部を下に向け、接着した細胞数を求めた。10分経過後にはすでに平衡状態となり、6割以上の細胞が接着した。

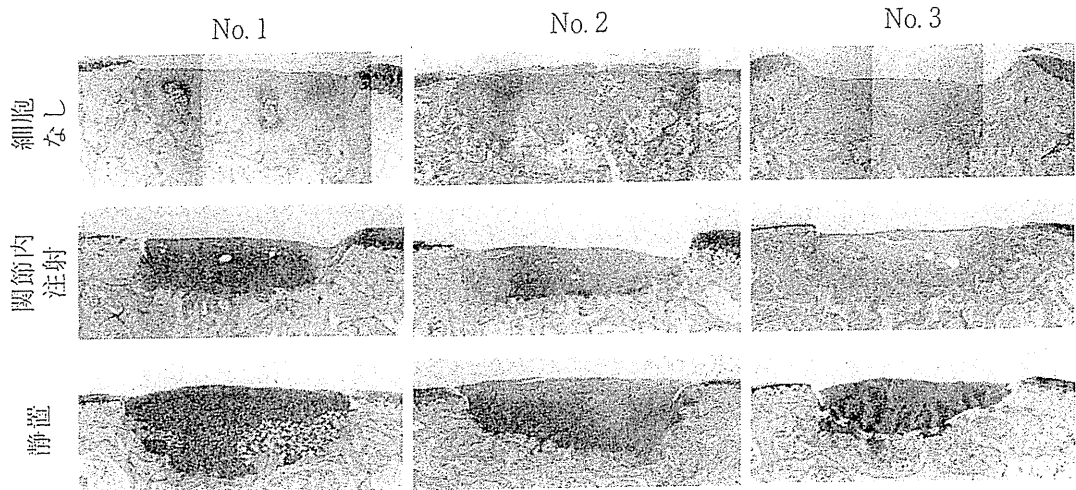


図 4.12 ウサギの膝関節に軟骨欠損を作成し、ウサギ滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を関節内注射したものと、同じ浮遊液を軟骨欠損部に静置したものと軟骨修復に関する組織学的比較

4 週後の組織像を、3 膝ずつ示す。細胞を投与しないものは、欠損部に軟骨基質をほとんど認めない。細胞浮遊液を関節内投与したものは、欠損部に軟骨基質を豊富に認めるものがある一方、乏しいものもあり結果が安定しない。細胞浮遊液を 10 分間静置したものはほとんどの例で、豊富な軟骨基質を認めた。

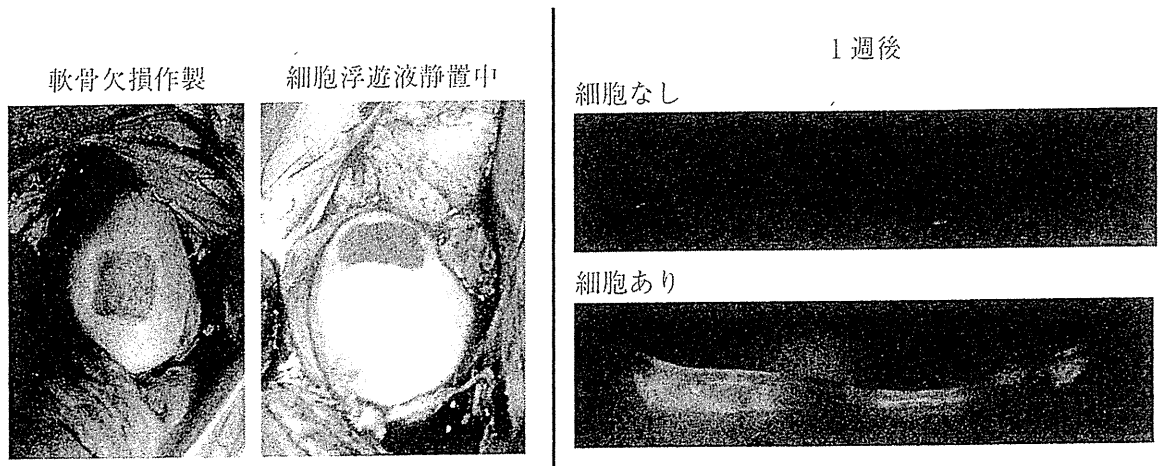


図 4.13 滑膜間葉系幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置することによる細胞接着の、ブタを用いた検討

ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作製し、DiI でラベルした滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を 10 分間静置した。1 週間後に組織学的に観察した。DiI 陽性細胞を軟骨欠損部に認める。

4.3.2 滑膜間葉系幹細胞の鏡視下移植術の実際

これまでの基礎研究の成果をもとにして、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、

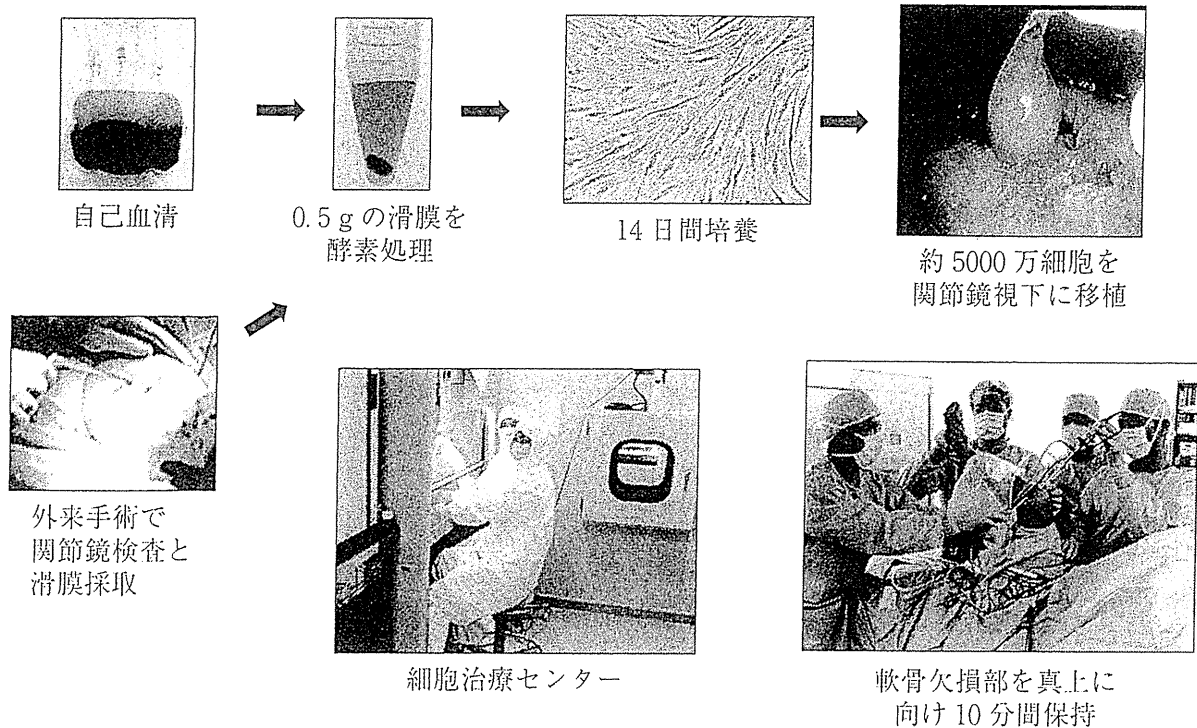


図 4.14 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生医療

外来手術で関節鏡検査と同時に滑膜を採取し、酵素処理後、自己血清を用いて 14 日間細胞治療センターで培養し、細胞浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に静置し移植する。

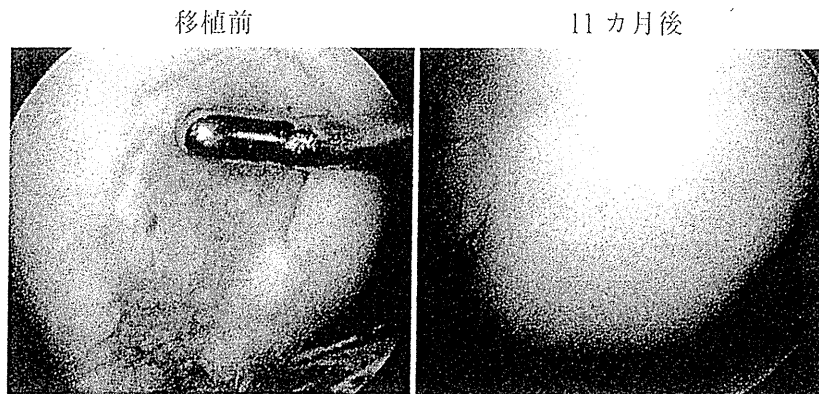


図 4.15 軟骨欠損に対して滑膜間葉系幹細胞移植後 11 カ月時の関節鏡視像

移植前にみられた軟骨欠損が、軟骨様組織で覆われている。

10% 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 0.5 g の滑膜と 70 ml 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 4.14)。後療法は、外固定をせず、2 週後から部分荷重、6 週後から全荷重を開始する。この方法は動物血清や人工素材を必要とせず、低侵襲で実施可能である利点がある。これまで重篤な副作用を認めていない。多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている (図 4.15)。

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製や、より確実な細胞移植手技の開発が今後の課題である。半月板の再生を含めて変形性膝関節症への応用を目指したい。

〔関矢一郎・宗田 大〕

文 献

- 1) Dominici M. et al: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4) : 315-317, 2006
- 2) Sekiya I. et al: Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20(6) : 530-541, 2002
- 3) Yoshimura H. et al: Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327(3) : 449-462, 2007
- 4) 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
- 5) Johnstone B. et al: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1) : 265-272, 1998
- 6) Sekiya I. et al: BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(2) : 411-418, 2001
- 7) Sekiya I. et al: Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320(2) : 269-276, 2005. Epub Mar 19, 2005
- 8) Shirasawa S. et al: In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 97(1) : 84-97, 2006
- 9) Sekiya I. et al: In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7) : 4397-4402, 2002
- 10) Koga H. et al: Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: Suitable condition of cell therapy for rabbit cartilage defects. *Cell Tissue Res* 333(2) : 207-215, 2008
- 11) Ichinose S. et al: Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest* 90(2) : 210-221, 2010
- 12) Yokoyama A. et al: *Cell Tissue Res* 320(2) : 269-276, 2005. Epub Mar 19, 2005. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 322(2) : 289-298, 2005. Epub Nov 3, 2005
- 13) Nimura A. et al: Human synovial mesenchymal stem cells increase with human autologous serum: A comparison to fetal bovine serum and to bone marrow cells.

- Arthritis Rheum 58(2) : 501-510, 2008
- 14) Nagase T, et al : Analysis of harvest sites and culture parameters for optimal in vitro chondrogenic potential of synovial mesenchymal stem cells from knee joints with medial compartment osteoarthritis. Arthritis Rheum 58(5) : 1389-1398, 2008
 - 15) Ruger B. et al : Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Arthritis Rheum 50(7) : 2157-2166, 2004
 - 16) Shi S, Gronthos S : Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res 18(4) : 696-704, 2003
 - 17) Jones EA, et al : Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. Arthritis Rheum 50(3) : 817-827, 2004
 - 18) Morito T, et al : Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. Rheumatology (Oxford) 47(8) : 1137-1143, 2008
 - 19) Zhang S, et al : Autologous Synovial Fluid Enhances Migration of Mesenchymal Stem Cells from Synovium of Osteoarthritis Patients in Tissue Culture System. J Orthop Res 26(10) : 1413-1418, 2008
 - 20) Ratajczak W : Early development of the cruciate ligaments in staged human embryos. Folia Morphol (Warsz) 59(4) : 285-290, 2000
 - 21) Archer CW, et al : Development of synovial joints. Birth Defects Res C Embryo Today 69(2) : 144-155, 2003
 - 22) Segawa Y, et al : Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. J Orthop Res 27(4) : 435-441, 2009
 - 23) Koga H, et al : Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. Arthritis Res Ther 10(4) : R84, 2008

Bone Joint Nerve

感覚・運動骨格機能系の学術研究誌 BJN Japan —こつ・かんせつ・しんけい—

特集

変形性膝関節症をめぐる進歩

- ① 変形性膝関節症の疫学
 - ② 変形性膝関節症の基礎的研究
 - ③ 変形性膝関節症の評価
 - ④ 変形性膝関節症の保存療法
 - ⑤ 変形性膝関節症の手術療法
 - ⑥ 鼎談「変形性膝関節症の治療：現状と展望」
- あなたならどうしますか？ —Q&A—
 - 手術手技シリーズ
膝十字靭帯損傷に合併した3度膝内側側副靭帯損傷に対する
つり上げ修復法
 - コラム
ステロイド小史-1

2012

叢書 通巻第4号
(Vol.2 No.1)

BJN
Bone Joint Nerve
アークメディア

① 変形性膝関節症の疫学

変形性膝関節症の疫学：大規模住民コホート調査ROADより

東京大学 吉村 典子 5

変形性膝関節症の発生要因および予防に関する疫学的研究

弘前大学 井上 亮ほか 11

② 変形性膝関節症の基礎的研究

変形性膝関節症とプロテオグリカン

東京医科歯科大学 篠村 多摩之 19

関節軟骨の潤滑性と細胞外マトリクス

帝人ファーマ株式会社 安井 秀一ほか 25

骨軟骨再生治療のための組織工学技術の進歩

京都大学 田畑 泰彦 33

BMP7による変形性関節症の予防

東京医科歯科大学 林 将也ほか 39

ヒアルロン酸関節内注射の鎮痛機序

島根大学 内尾 祐司 47

ヒアルロン酸関節内投与がOA軟骨下骨のMMP-13に与える影響

京都府立医科大学 平岡 延之ほか 53

③ 変形性膝関節症の評価

MRIによる軟骨の定量化

東京大学 岡 敬之 61

変形性膝関節症のMRI評価

帝京大学ちば総合医療センター 渡辺 淳也ほか 67

変形性膝関節症におけるバイオマーカーの有用性
—バイオマーカーで捉える初期変形性膝関節症—

順天堂大学 石島 旨章ほか 75

④ 変形性膝関節症の保存療法

変形性膝関節症に対する物理療法

日本医科大学 高橋 謙治 85

変形性膝関節症に対する運動療法

宮崎大学 帖佐 悦男 91

変形性膝関節症に対する運動療法—理学療法士の立場から—

東京西徳洲会病院 八木 茂典ほか 99

NSAIDsの使い分け

東邦大学 高木 賢治ほか 105

変形性膝関節症に対するサプリメントの効果

慶應義塾大学 榎本 宏之 113

変形性膝関節症に対するヒアルロン酸関節内注入療法の位置づけ

藤田保健衛生大学 山田 治基ほか 119

⑤ 変形性膝関節症の手術療法

変形性膝関節症に対する鏡視下手術の適応と手技

帝京大学ちば総合医療センター 松木 圭介ほか 125

高位脛骨骨切り術の適応と手技

横浜市立大学 赤松 泰ほか 131

片側置換型人工膝関節置換術の適応と手技

近畿大学 赤木 将男 137

人工膝関節置換術の適応と手技

大分大学 平川 雅士ほか 143

Distraction Arthroplasty

広島大学 出家 正隆ほか 151

滑膜由来の幹細胞による再生医療

東京医科歯科大学 関矢 一郎ほか 159

⑥ 鼎 談

変形性膝関節症の治療—現状と展望—

近畿大学 赤木 将男
広島大学 出家 正隆
(司会)東京医科歯科大学 関矢 一郎 167

● あなたならどうしますか? —Q&A—

船橋整形外科病院 高橋 憲正 181

● 手術手技シリーズ

膝十字靭帯損傷に合併した3度膝内側側副靭帯損傷に対する つり上げ修復法

東京医科歯科大学 古賀 英之ほか 185

● コラム

ステロイド小史-1

西野整形外科・リウマチ科 西野 仁樹 190

滑膜由来の幹細胞による再生医療

Regenerative medicine for osteoarthritis using mesenchymal stem cells from synovium

関矢 一郎* 宗田 大**

Sekiya Ichiro

Muneta Takeshi

抄録 ▶ 変形性膝関節症において、滑膜から間葉系幹細胞が関節液中に動員され、軟骨変性部に接着し、軟骨基質の産生を促す機序の存在が予測される。滑膜由来の間葉系幹細胞は軟骨分化能が高く、確実に細胞数を確保できるため、軟骨再生医療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、効率よく細胞が接着し、軟骨の再生が認められる。この方法は自然修復を促進するものと考えられ、また低侵襲な軟骨再生を可能にする。さらに変形性膝関節症への応用も期待できる。

Key Words

間葉系幹細胞, 滑膜, 関節液, 骨髄, 軟骨再生

東京医科歯科大学大学院軟骨再生学 共同 運動器外科学

変形性膝関節症の再生医療

変形性膝関節症は、膝関節軟骨の磨耗・消失と、骨棘形成を特徴とする、進行性の関節疾患である。軟骨は代謝の低い組織であるが、正常膝では軟骨基質の合成と分解のバランスが調和し、基質の量が維持される。変形性膝関節症の進行過程では、軟骨基質の合成よりも分解が上回るため、軟骨基質の全体量は減少する。変形性膝関節症の再生を考える場合、軟骨基質の合成を司る自然機序を促進させることが戦略のひとつとなる。

間葉系幹細胞について

骨髄液を直接培養用ディッシュに播種し、2週間培養すると1つの細胞由来と考えられる細胞集団、いわゆるコロニーを形成する。このコロニー形成細胞をまとめて回収し、条件を変えて培養すると、骨、軟骨、脂肪に分化し、多分化能が示される。このコロニー形成細胞は特有

の表面抗原パターンを示し、間葉系幹細胞と呼ばれる。間葉系幹細胞は生体の恒常性を維持し、組織損傷時の修復に寄与する。

2000年以降になると骨髄以外の皮下脂肪や骨格筋などの種々の間葉組織から、間葉系幹細胞が採取できることが多数報告されるようになった¹⁾。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^{2,3)}。

私たちは軟骨再生に対して間葉系幹細胞を用いる際に、どの組織由来のものが最適か検討を重ねてきた。膝関節を構成する組織で、手術中に採取が容易な骨髄液、滑膜、骨膜、骨格筋、皮下脂肪から同等な手法で間葉系幹細胞を採取し、増殖させ、その特性を検討した。すると骨髄液と滑膜由来のものが、軟骨に分化する能力の高いことが明らかになった^{4,6)}。軟骨組織は骨髄と滑膜に隣接することが、その理由になると考えられる⁷⁾。獲得できる細胞数を比較すると、骨髄よりも滑膜由来の間葉系幹細胞のほうが、