

20130600/A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の
開発と臨床応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関 矢 一 郎

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	関矢 一郎	東京医科歯科大学 再生医療研究センター	教授 (センター長)
研究分担者	宗田 大	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科運動器外科学	教授
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科発生発達病態学	准教授
	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所 ウイルス治療学	准教授
	赤澤 智宏	東京医科歯科大学大学院 保健衛生学研究科分子生命情報解析学	教授

目次

I. 総括研究報告

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用	7
研究代表者 関矢 一郎 (東京医科歯科大学再生医療研究センター 教授)	

II. 分担研究報告

1. 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用	21
研究分担者 宗田 大 (東京医科歯科大学大学院運動器外科学 教授)	
2. 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用	27
研究分担者 森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学 准教授)	
3. 細胞製剤の品質・安全保証に関する研究	31
研究分担者 清水 則夫 (東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 准教授)	
4. 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用	39
研究分担者 赤澤 智宏 (東京医科歯科大学大学院分子生命情報解析学 教授)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	47
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	55
----------------------	----

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究代表者

関矢一郎 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 教授

研究要旨

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態ですべて軟骨欠損部に10分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を本課題では検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、ピッグにおいても軟骨再生に有効であった。DNA損傷の評価系、DNA損傷を誘導する分子の評価系、腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞22検体を検証し、明らかな腫瘍化の徴候がないことを明らかにした。これまでに開発したマイコプラズマ検査系は17種類のマイコプラズマを5 cfu/reactionの感度で検出可能なこと、我々の開発したTMDU法は現在汎用されているマイコプラズマ検出キットよりも優れていること、DNAウイルス13種類の自動検査が可能であることを確認した。軟骨欠損モデルラットに軟骨分化能が高いiPS細胞を移植し、軟骨細胞に分化することを確認した。

これらの研究成果をもとに、今後有効で効率よく安全な軟骨再生医療の臨床応用を目指す。

A. 研究目的

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態ですべて軟骨欠損部に10分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞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。間葉系幹細胞を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、ヒトへの臨床応用に向け、滑膜間葉系幹細胞集合体移植をピッグで検討した。

(2) 変異細胞評価

滑膜由来間葉系幹細胞の品質管理・品質

保証系を確立することを目的とした。特に変異細胞の検出、変異を誘導する培養系の識別を目的として研究を行った。

(3) 感染症検査

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である。本年度は、これまでに開発したマイコプラズマ検査系のバリデーション試験と現在汎用されているリアルタイムPCR法を応用したマイコプラズマ検出キットとの比較試験、およびキアゲン社のQIASymphonyを用いたウイルス・検査系の自動化を目指した研究開発を実施した。

(4) iPS細胞の軟骨分化

本研究では、iPS細胞を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適したiPS株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。予め分化抵抗性細胞の残存が少ないiPSCs株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することを目指す。

B. 研究方法

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

マイクロミニピッグの滑膜間葉系幹細胞 2.5×10^5 個を $35 \mu\text{l}$ 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。マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と、大腿骨内顆にそれぞれ $6 \times 6 \times 1.5 \text{mm}$ 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、16 個ずつ移植した。移植細胞を追跡するため、GFP を発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。

(2) 変異細胞評価

1) 腫瘍化代替指標の定量的解析：p16 メチル化定量的 PCR

培養された間葉系幹細胞から常法に従って核酸を抽出し、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。パッセージ 0 から 2 を含む合計 22 検体にて検討を行った。

2) DNA 損傷修復応答の解析

過剰増殖刺激などで誘導される AID (activation induced deaminase) をリアルタイム PCR で定量化し、DNA 損傷反応としての ATM, P53 のリン酸化はそれぞれの分子に対するリン酸化特異的抗体を用いて、組織切片を用いて免疫組織染色を行った。

3) 大動物移植モデルを用いた病理組織学的解析

ミニブタにおける移植モデルを用いて、滑膜由来間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植した。さらに組織切片を採取し、HE 染色

を行って組織形成や、細胞浸潤、悪性化などを検討した。

(3) 感染症検査

1) TMDU 法によるマイコプラズマの検出
本学で開発した 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 15 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。

2) MycoSEQ によるマイコプラズマの検出
核酸抽出および検出操作を MycoSEQ (Lifetechnologies) の説明書に従って行った。

3) 添加回収試験の実施方法
マイコプラズマ試験法開発の標準細胞として採用されている CHO 細胞 DG44 株と添加する指標マイコプラズマとして *Mycoplasma orale* (E3329121020) を使用した。

4) QIASymphony を使用した検査の自動化
QIASymphony DSP DNA Minikit192 Version1 と LightCycler480 qPCR を使用した。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

1) マウス MSCs の分離・培養方法

マウス的大腿骨・脛骨からコラゲナーゼ処理によって骨髄細胞を抽出し、フローサイトメーター (FACS) で PDGFR α (+)、

Sca-1(+)、CD45(-)、Ter119(-)の MSCs を採取した。

2) マウス iPS 細胞

A 株 (MEF 由来 Nanog GFP/SOX10 DsRed-iPSCs)、B 株 (MEF 由来 Nanog GFP-iPSCs)、C 株 (MEF 由来 Oct GFP-iPSCs) の 3 株の iPS 細胞を検討した。

3) 軟骨分化誘導と分化能力評価

MSCs の分化誘導の際は 3×10^5 個、iPSCs は 6×10^5 個を 3 週間ペレット培養した。

4) 軟骨組織欠損ラットへの細胞移植

Lewis ラットの膝関節に 1.8mm の軟骨組織欠損を作成し、DiI で染色した細胞塊を移植した。

5) ラット大腿骨の摘出および組織染色

移植後 2 週及び 4 週時にラット大腿骨を摘出し、凍結ブロックを作成し、トルイジンブルーおよびサフラニン O 染色で評価した。

C. 研究結果

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞集合体は、容易にピッグ膝の軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植 4 週後に良好な軟骨の再生が得られた。GFP 陽性細胞の集合体は、4 週後に再生軟骨部に生着しているのを確認した。

(2) 変異細胞評価

1) p16 メチル化定量的 PCR

1/10,000 細胞のレベルでの p16 メチル化を検出できるようになり、ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体は 22 検体すべてで陰性であった。

2) DNA 損傷修復応答

AID は 21 検体で陰性であり、1 検体は検出感度以下の陽性であった。

3) 病理組織学的解析

滑膜間葉系幹細胞移植群 7 匹で検討を行ない、軟骨基質の豊富な産生を認め、異型細胞は皆無であった。

(3) 感染症検査

1) マイコプラズマ検出の感度検定

17 種類のマイコプラズマ属の菌種について、5 ~1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行ない、n=3 の実験で、すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。

2) キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に Mycoplasma orale 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では $20 \mu\text{g}$ 、QIAGEN 法では $12 \mu\text{g}$ であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

3) MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN法およびprepSEQによりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。シグナル強度は QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が 3 倍以上高く、良好に検出された。

4) TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN法およびprepSEQにより指標となるマイコプラズマ (*Mycoplasma orale*) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。シグナル強度は抽出法による差はほとんど観察されなかった。

5) MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、マイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの T_m 値が中間段階になり判定に迷う場合があった。

6) ウイルス検査系の自動化

検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能であり、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的データを得ることが可能であった。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

軟骨分化に適した iPSCs のスクリーニング

3 株の iPSCs (A 株, B 株, C 株) における *in vitro* での軟骨分化能を評価した。B 株が軟骨分化能が高かった。

Hanging drop 培養による Nanog 発現量の解析

Hanging drop 培養法前の Nanog の発現量に対して Hanging drop 培養 1 日以降で Nanog 発現量が減少する傾向がみられた。Hanging drop 培養を用いることで腫瘍化の原因になりうる Nanog 遺伝子の発現を低下させる事が確認された。

MSCs を用いた軟骨組織再生

マウス MSCs をラット軟骨欠損部に移植する系を確立し、MSCs の軟骨再生への関与を直接的に解析することを可能とした。

iPSCs を用いた軟骨組織再生

ラット軟骨欠損モデルに対し、マウス iPSCs の移植を試みた。移植後 4 週の関節を取り出し、組織切片を作成して解析した結果、移植細胞全体が軟骨細胞様の染色像を示した。また、移植組織から細胞を回収し、遺伝子発現解析を行った結果、未分化状態の B 株よりも Nanog の発現は減少し、軟骨分化マーカーの発現が上昇していることを確認した。

D. 考察

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

ピッグにおいても、家兎同様に滑膜間葉系幹細胞の集合体を移植した時に良好な軟骨再生が得られ、ヒトへの臨床応用が期待された。

(2) 変異細胞評価

本研究では滑膜由来間葉系幹細胞に焦点を絞って、変異細胞検出と、DNA 損傷の程度の評価に取り組んだ。今までの世界的な報告からも、間葉系幹細胞からの腫瘍発生の報告は皆無（1 例の報告は細胞の contamination とされる）である。本研究は従って、間葉系幹細胞の安全性についての基盤的データを供給するものであり、また今後の培養系開発にあたっての、安全な手技の選択という面で有用になるものと考えている。

(3) 感染症検査

1) TMDU 法によるマイコプラズマ検出の感度検定

TMDU 法によるマイコプラズマ検出においては、遺伝子配列からは 142 種類のマイコプラズマを特異的に検出できることが示されている。日本・欧州・米国薬局方に記載されているマイコプラズマ属の菌種は合計 9 種類であるが、すべて今回使用した 17 種類の中に含まれるため、TMDU 法は 3 極薬局方の検出要件を満たしていると考えられる。

2) マイコプラズマ検出における MycoSEQ と TMDU 法の比較

一般に汎用されているリアルタイム PCR を応用したマイコプラズマ検査キット MycoSEQ と我々が開発した TMDU 法との比較試験を行ったところ、抽出時間が TMDU 法

の方が 2 時間早く抽出でき、最終産物を検査する場合には非常に有利であると考えられる。

3) ウイルス検査系の自動化

本研究により、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用して確認された。今後は、RNA ウイルスとマイコプラズマ測定の可否・プログラムの最適化を進める必要がある。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

本研究では軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング方法を開発し、予め細胞集塊を形成する過程で Nanog 遺伝子を低下させ、安全で効果的な iPSCs 移植治療の可能性を示した。スクリーニングで用いたペレット培養法は、*in vivo*における軟骨分化を *in vitro* で疑似化したものであり、iPSCs 株のスクリーニングとして有用であると期待される。また、移植前に細胞集塊を形成する際、未分化 iPSCs を軟骨分化誘導培地で 3 日間培養したが、より長期間分化誘導をかけた iPSCs を用いれば、*in vivo*での更なる軟骨分化誘導が期待できると考えられる。

E. 結論

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、ピッグにおいても軟骨再生に有効であった。

DNA 損傷の評価系（及び DNA 損傷を誘導

する分子の評価系)、腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞 22 検体にて検証した。その結果、調製細胞においては DNA 損傷が最小限であり、また明らかな腫瘍化の徴候が認められないことが明らかになった。

これまでに開発したマイコプラズマ検査系は 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。我々の開発した TMDU 法は、現在汎用されているマイコプラズマ検出キット (MycoSEQ: Lifetechnologies) よりも優れていた。また、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることを確認した。

軟骨欠損モデルラットにマウスの MSCs および iPSCs を移植し、軟骨細胞様の分化を確認することに成功した。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Atesok K, Doral MN, Bilge O, **Sekiya I**. Synovial stem cells in musculoskeletal regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013 Apr;21(4):258-9. doi: 10.5435/JAAOS-21-04-258. No abstract available. PMID:23545732

Ichinose S, Tagami M, **Muneta T**, Mukohyama H, **Sekiya I**. Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. *Med Mol Morphol*. 2013 Mar;46(1):24-33. doi: 10.1007/s00795-012-0005-9. Epub 2013 Jan 17. PMID:23325551

Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, **Sekiya I, Muneta T**. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 1;431(1):52-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094. Epub 2013 Jan 3. PMID:23291184

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, **Morio T**, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci*. 104:703-10, 2013.

Sugita S, Ogawa M, **Shimizu N, Morio T**, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. *Ophthalmology*. 120:1761-8, 2013.

Ito K, **Shimizu N**, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11 (2013)

Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K,

Saijo M, **Morio T, Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.

Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. Journal of the Neurological Sciences 324, 190-194(2013)

Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ.:

EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. blood 121: 4512-4520(2013)

関矢一郎 :

滑膜幹細胞による軟骨再生医療の開発 : 今日の新移植 Vol.27. No1 : P53-60

中村智祐、**関矢一郎**、**宗田 大**、小林英司 : 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生治療 : ミニブタモデルでの検討

CLINICAL CALCIUM23 巻 12 巻 p49-57

関矢一郎 :

関節軟骨損傷

スポーツ整形外科マニュアル p194-196

関矢一郎 :

変形性膝関節症

スポーツ整形外科マニュアル p197-200

宗田 大 :

膝屈筋腱を用いた double-bundle

reconstruction I - 4 つ折半腱様筋腱を用い

経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔を作製する 2

重束 ACL 再建術—

整形外科最少侵襲手術ジャーナル 66 : 57

- 66、2013. 2

宗田 大 :

VIII. 靭帯再建術後再断裂に対する

Revision Surgery 「再再建術と私のポイント」

膝靭帯手術のすべて

MEDICAL VIEW 2013. 4. 10 p. 385-389

宗田 大 (総監集) :

ひざ痛を治す

別冊 NHK きょうの健康 2013. 6. 25 発行

関矢一郎 :

手術でひざの痛みを改善する

別冊 NHK きょうの健康 ひざ痛を治す

p66-79 2013. 6. 25 発行

関矢一郎 :

すり減った軟骨を再生させる新しい治療に期待、

別冊 NHK きょうの健康 ひざ痛を治す、

p80-80 2013. 6. 25 発行

宗田 大 :

膝前十字靭帯再建術 : ハムストリング腱使用例

臨床スポーツ医学臨時増刊号「関節鏡視下手術と術後リハビリテーション」

Vol. 30: p104-107, 2013. 7. 15 発行

宗田 大 :

膝蓋腱炎 (ジャンパー膝) の治療 upda

【特集】腱・付着部症の最近の展開

整形災害外科 55: p1371 - 1376 2013. 10. 1

発行

北條浩彦、**清水則夫** :

基本編—原理と基本知識—

リアルタイム PCR を使った解析の基本

10 プライマー/プローブの設計手順②マルチプレックスの場合

原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全

実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ :

p72-74 2013 発行

清水則夫、渡邊健、外丸靖浩 :

実践編—プロトコールを中心に—

IV章 遺伝子量解析

15 ウイルス感染症を診断する ウイルス

ゲノムの定性的検査と定量的検査

原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全

実験ガイド 最強のステップ UP シリー

ズ:p192-202

2. 学会発表

a) 国際学会発表

Ichiro Sekiya

Arthroscopic transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration
Sportsclinic Germany
Hannover, Germany, 2013.9.30

Ichiro Sekiya

Arthroscopic transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration
Maartenskliniek
Woerden, Netherlands, 2013.10.2

Ichiro Sekiya

Cartilage and meniscus regeneration with synovial stem cells
Symposium on Materials and Regenerative Medicine, Taipei, TAIWAN, 2013.11.30

Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta

Arthroscopic Transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration
International Cartilage Repair Society
2013.9.15. Izmir, Turkey

Nobutake Ozeki, **Ichiro Sekiya**, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model
11th International Society for Stem Cell Research, Annual Meeting
2013/6/12-15, USA

Nobutake Ozeki, **Ichiro Sekiya**, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model
International conference of cartilage repair
2013/9/15-18, Turkey

Yusuke Nakagawa, **Ichiro Sekiya**, Kondo S, Saito R, Yanagisawa K,

Tabuchi T, Nagata T, Obara M, Okuaki T, Koga H, Tsuji K, **Takeshi Muneta**
Comparison of MRI T1rho mapping and histology for normal and torn menisci in a pig model.

11th International cartilage repair society annual meeting
2013/9/15-18, Turkey

Mio Udo, **Ichiro Sekiya**, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**

Evaluation of a rat arthritis model induced by various doses of monoiodoacetic acid
11th International cartilage repair society annual meeting
2013/9/15-18,

Toshifumi Watanabe, **Takeshi Muneta**, Nicholas Dunbar, Alex Iorgulescu, Scott A Banks

Intraoperative Joint Gap Affects Postoperative Knee Kinematics in Posterior-Stabilized TKA
26th ISTA2013, 2013.10.16-19, USA

Miyoko Ojima, **Ichiro Sekiya**, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**

Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee after harvest of synovium
11th International cartilage repair society annual meeting
2013/9/15-18, Izmir, Turkey

b) 国内学

関矢一郎 :
滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生
変形性膝関節症に対する私たちの取り組み.
2013. 4. 20 日本リウマチ学会、京都

関矢一郎 :
滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の実際 特に安全性の観点から
2013. 5. 23 日本整形外科学会総会、広島

関矢一郎 :
自己血清で増殖させた体性幹細胞による関節軟骨・半月板再生医療
2013. 5. 22 JMS 社内講演会 広島

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013. 5. 29 第4回関節治療研究会 東京

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生：基礎
から臨床まで現状と展望
2013. 6. 20 JOSKAS 札幌

関矢一郎：

滑膜幹細胞による半月板治癒促進
2013. 6. 20 JOSKAS 札幌

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013. 7. 14 第26回日本臨床整形外科学会
浜松

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013. 7. 27 第23回膝肩スポーツの会 名
古屋

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療の
開発
2013. 9. 12 山梨運動器再生セミナー 甲
府

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療
2013. 10. 10 BioJapan 2013 横浜

関矢一郎：

滑膜幹細胞による半月板再生
2013. 10. 18 日整会基礎 幕張

関矢一郎：

滑膜幹細胞による関節軟骨・半月板再生医
療の開発
2013. 10. 11 東大 臨床研究者育成プログ
ラム 東大

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療
2013. 10. 12 整形外科初期研修セミナー
富浦

関矢一郎：

滑膜幹細胞による関節軟骨・半月板再生医
療の開発
2013. 10. 28 第28回新潟移植再生研究会
新潟

関矢一郎：

体性幹細胞による軟骨・半月板の再生医療
基礎から臨床まで
2013. 11. 14 東京医科歯科大学大学院ボー
ダレス講義 東京医科歯科大学

関矢一郎：

滑膜由来の間葉系幹細胞による軟骨・半月
板再生
2013. 11. 16 第25回日本臨床検査医学会
東京医科歯科大学

関矢一郎：

滑膜間葉幹細胞による関節軟骨・半月板再
生
2013. 12. 2 新技術説明会 市ヶ谷

関矢一郎：

関節軟骨障害治療 2013 指定発現：Stem
Cell 治療
2013. 12. 7 膝関節フォーラム 高田馬場

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013. 12. 16 第60回山陰整形外科集談会
松江

宗田 大：

人工膝関節後の痛みとその対応
第43回日本人工関節学会 ランチオンセ
ミナー
2013. 2. 23 滋賀医科大学

宗田 大：

膝のスポーツ外傷と障害
第29回埼玉・県南東部整形外科勉強会
2013. 3. 8 獨協医科大学越谷医療センタ
ー大関覚

宗田 大：

症例から学ぶ膝関節外科

2013. 5. 26 第 86 回日本整形外科学術総会ランチョンセミナー、広島

宗田 大：

スポーツ復帰への膝外傷・障害の治療
2013. 5. 30 第 3 回大分膝関節疾患研究会、大分

宗田 大：

滑膜間葉幹細胞移植による関節構成体の再生医療の実現化
第 36 回大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー
2013. 6. 4 第 36 回大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー東京医科歯科大学

宗田 大：

ACTIYAS デザイン～開発背景からコンセプト～
2013. 7. 13 ACTIYAS セミナー KYOCERA

辻邦和、片桐洋樹、中村香織、**関矢一郎、**

宗田 大：

前十字靭帯再建術の手術侵襲に伴う関節疼痛の重症度は、術後の関節液中の CD105 陽性細胞数に逆相関する
2013. 2. 7-8 第 6 回日本運動器疼痛学会神戸

中村香織、辻邦和、片桐洋樹、井上牧子、

Kahaer Abula、**関矢一郎、宗田 大：**

前十字靭帯再建術後の関節疼痛の重症度は術後関節液中の CD105 陽性細胞と逆相関する

2014. 2. 28-3-1 第 27 回日本軟骨代謝学会京都

中村智祐、望月智之、二村昭元、**宗田**

大、秋田恵一：

前十字靭帯脛骨側付着部の解剖学的研究
外側半月板から連続する線維構造。

中村智祐、**関矢一郎、**柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、古賀英之、堀江雅史、大川淳、**宗田 大：**

解剖学的二重束前十字靭帯再建術における移植腱の太さが及ぼす影響。

2013. 03 第 86 回日本整形外科学術集会広島

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、**関矢一郎：**

解剖学的 2 重束 ACL 再建術における大腿骨孔位置が移植腱張力変化及び膝制動性に与える影響

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：**

二重束 ACL 再建術における大腿骨孔位置が移植腱張力変化および膝制動性に与える影響。

2013. 03 第 86 回日本整形外科学術集会広島

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、**関矢一郎：**

ACL 再建術 one bundle から two bundle 同一施設での outcome の比較

1 重束及び 2 重束 ACL 再建術の前向き無作為化比較試験の長期成績。

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

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、**関矢一郎：**

逸脱外側半月板に対する鏡視下半月板制動術の短期成績。

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田 大、関矢一郎、**古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

人工膝関節全置換術において後十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田 大、関矢一郎、**古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

ロボット支援モジュール式人工膝関節のキネマティクス

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、宗田 大、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐

新しい日本人向け後方安定型人工膝関節の短期成績

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

Kahaer Abula, 宗田 大, 宮武和正, 山田淳, 松倉遊, 井上真紀子, 大川淳, 関矢一郎, 辻邦和 :

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2013. 10. 17 日整会基礎学会 千葉幕張

Kahaer Abula, 宗田 大, 宮武和正, 山田淳, 松倉遊, 井上真紀子, 大川淳, 関矢一郎, 辻邦和

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2014. 3. 1 日本軟骨代謝学会 京都

森尾友宏 :

易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症

2013. 10. 25. 平成 25 年度遺伝子病制御研究所研究集 北海道、

森尾友宏 :

免疫細胞培養ガイドライン (免疫治療関連 6 学会合同策定) について : 医療機関・研究施設に求められる基準

2013. 8. 24. 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 名古屋

今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉佑規乃、新井文子、中澤温子、伊藤守、

清水則夫、藤原成悦 :

難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究

2013. 11 日本ウイルス学会 神戸

清水則夫 :

再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発

2013. 9 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 東京

須藤絵里子グレース、馬淵洋、小柳明日香、大関信武、宗田大、関矢一郎、

赤澤智宏 :

マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の有効性の検討

2014. 3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

馬淵洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、宗田 大、関矢一郎、赤澤智宏 :

組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析

2014. 3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

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

滑膜間葉系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。間葉系幹細胞を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。以前我々は、日本白色家兎において、集合体移植によって軟骨再生が良好な結果が得られたことを報告した。今回、ヒトへの臨床応用に向け、滑膜間葉系幹細胞集合体の大動物における *in vivo* の軟骨分化を検討した。

2.5x10⁵のマイクロミニピッグの滑膜間葉系幹細胞を35μlの培養液に懸濁し、hanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と大腿骨内顆に6x6x1.5mm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、16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を発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。移植後4週の肉眼的検討をおこなった。

3日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体は、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。滑膜間葉系幹細胞集合体では、*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。移植後4週の移植した群で、大動物でも、肉眼的に良好な軟骨の再生が得られた。現在4週での組織学的検討、12週での肉眼的、組織学的検討を施行している。

滑膜間葉系幹細胞集合体は、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。

A. 研究目的

間葉系幹細胞はその多分化能により再生医療の細胞源として期待されている。特に滑膜由来の間葉系幹細胞は、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。間葉系幹細胞を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。これまで我々は、日本白色家兎における集合体移植群で良好な軟骨再生が得られたことを報告している。今回、ヒトへの臨床応用にむけて、大動物における滑膜間葉系幹細胞集合体の *in vivo* の軟骨分化能を検討した。

B. 研究方法

マイクロミニピッグの滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。2.5x10⁵の滑膜間葉系幹細胞を35μlの培養液に懸濁し、hanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。*in vivo*の検討のため、マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と、大腿骨内顆にそれぞれ6x6x1.5mm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、16個ずつ移植した。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を発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉系幹細胞集合体の同種移植も検討した。

C. 研究結果

3日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体は、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。

*in vivo*研究で、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を認めなかった。移植4週後に移植群で良好な軟骨の再生が得られた。GFP陽性細胞の集合体を16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。現在4週での組織学的検討、12週での肉眼的、組織学的検討を施行している。

D. 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。

以前の我々が報告した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ており、**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** 陽性細胞を認めた。

本研究では、大動物においても、同様に集合体を移植した時に良好な軟骨再生が得られ、ヒトへの臨床応用が期待される。我々はすでに、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治験を行っている。10 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。今回のマイクロミニピッグの 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、16 個の集合体(4 万細胞)を 36mm² の欠損部へ移植し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。

E. 結論

滑膜間葉系幹細胞集合体は、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。大動物でも軟骨再生の可能性が示唆され、今後ヒトへの応用が期待できる。

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

Ichinose S, Tagami M, **Muneta T**, Mukohyama H, Sekiya I. Comparative sequential morphological analyses during *in vitro* chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. *Med Mol Morphol*. 2013 Mar;46(1):24-33. doi: 10.1007/s00795-012-0005-9. Epub 2013 Jan 17. PMID:23325551

Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, **Muneta T**. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 1;431(1):52-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094. Epub 2013 Jan 3. PMID:23291184

中村智祐、関矢一郎、**宗田 大**、小林英司：滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生治療：ミニブタモデルでの検討
CLINICAL CALCIUM23 巻 12 巻 p49-57