

## ． 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。

2.5x10<sup>5</sup>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、移植時に無駄にしてしまう細胞がある。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。2.5x10<sup>5</sup> の滑膜間葉系幹細胞を 35 $\mu$ 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。*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兔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 low density 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研究を行っている。10 症例の平均で、passage 0 で 5000 万細胞を得ることができ、約 280mm<sup>2</sup> 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 36mm<sup>2</sup> 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 CALCIUM*23 巻 12 巻 p49-57  
**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

#### **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・附着部症の最近の展開  
整形災害外科 55 : p1371 1376 2013.10.1  
発行

## **2.学会発表**

### **a)国際学会発表**

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 Reseach, 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)国内学会発表

##### 宗田 大 :

日本関節鏡膝スポーツ医学会 (JOSKAS) ガ  
イドライン策定委員会  
東京医科歯科大学 委員長  
日本内視鏡学会理事

##### 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 ランチョンセ  
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  
大関賞

##### 宗田 大 :

症例から学ぶ膝関節外科  
2013.5.26 第 86 回日本整形外科学会学術総  
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  
2013.6.4 第 36 回大学院医歯学総合研究  
科 大学院セミナー

##### 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、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

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