

Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, <u>Shimizu N.</u> Ito M, Fujiwara S.	Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice.	PloS ONE	6(10)	e26630	2011
Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, <u>Shimizu N.</u> Rice A, D.Ling P.	Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas.	PLoS ONE	6(11)	e27271	2011
Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Fukano T, <u>Akazawa C.</u> <u>Nakamura M.</u> Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A, Okano	Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior.	Biochem Biophys Res Commun	419	188-193	2012
Miyahara K, Kato Y, Koga H, Dizon R, Lane GJ, Suzuki R, <u>Akazawa C.</u> Yamataka A.	Visualization of enteric neural crest cell migration in SOX10 transgenic mouse gut using time-lapse fluorescence imaging.	J Pediatr Surg.	46	2305-2308	2011

The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. Kato H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H Miyahara K, Kato Y, Koga H, Dizon R, Lane GJ, Suzuki R, <u>Akazawa C,</u> Yamataka A.	The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest.	Mol Brain	Sep 23	4-34	2011
<u>Asahara H</u>	miRNAs in cartilage development	Clin Calcium	22(5)	653-7	2012
Miyaki S, <u>Asahara H.</u>	Analysis of molecular network in chondrocytes by WISH	Clin Calcium	21(6)	831-8	2011
Nakamura N., Takeuchi R., Sawaguchi T., Ishikawa H., <u>Saito T.,</u> Goldhahn, S.	Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS).	J Orthop. Sci.	16-Jul		2011

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 24 年度 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki S, <u>Muneta T.</u> Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, <u>Sekiya I.</u>	Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration.	Arthritis Res Ther	14(3)	R136,	2012.
Nakamura T, <u>Sekiya I.</u> <u>Muneta T.</u> Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E.	Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs.	Cytherapy	14(3)	327-338	2012.
Futami I, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa, N., Sadatsuki R, <u>Muneta T.</u> Arikawa-Hirasawa, E, <u>Sekiya I.</u> Kaneko K.	Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium.	PLoS One 7	E 45517		2012.
鈴木 志郎、 <u>関矢 一郎、</u> <u>宗田 大</u>	軟骨再生の細胞源としての滑膜間葉系幹細胞集合体の特性と有用性	整形・災害外科	55 (10)	1243-1248	2012.

関矢 一郎、 宗田 大	関節と体性幹細胞 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生	BIO Clinica	27 (9)	830-834	2012.
関矢 一郎、 宗田 大	軟骨治療の進歩：滑膜幹細胞による軟骨再生	日本医師会雑誌	141 (8)	1739	2012.
関矢 一郎、 宗田 大	滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用	整形外科	63 (3)	228	2012.
関矢 一郎、 宗田 大	滑膜間葉幹細胞を使った軟骨再生	再生医療叢書 第6巻 骨格系		38-51	2012.
関矢 一郎、 宗田 大 赤木 将男	滑膜由来の幹細胞による再生医療 変形性膝関節症の治療 —現状と展望— 鼎談	Bone Joint Nerve	4(2)	159-165 167-179	2012
森尾友宏、 梶賢一郎、 中田光 (監修)	大学病院などの再生医療を支える細胞プロセッシング室運営マニュアル (新潟大学 医歯学総合病院 生命科学医療センター編著、	星雲社			2012.
Ogawa M, Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M	Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis.	Jpn J Ophthalmol.	56(6)	529-535	2012.
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M.	Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	53(8)	4692-4698	2012

Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, <u>Shimizu N,</u> Mochizuki M.	Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	250 (12)	1877-1883	2012
Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, <u>Akazawa C.</u>	Correlation between multiple RET mutations and severity of Hirschsprung's disease	Pediatr Surg Int	29(2)	157-163	2013
Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K, <u>Akazawa C,</u> Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y.	Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS	J Neurosci		11586-11599.	2012.
Miyahara K Kato Y Suzuki R <u>Akazawa C</u> Tanaka N Koga H Doi T Geoffrey J. Lane . Yamataka A	Anorectal neural crest derived cell behavior after the migration of vagal neural crest derived cells is surgically disrupted: implications for the etiology of Hirschsprung' s disease	Springer-Verlag Berlin Heidelberg	29	9-12	2012.
Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, <u>Sato T,</u> Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H.	L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity.	The Journal of Biological Chemistry	287 (26)	22206-22215	2012
Choe H, Sakano H, Takigami H, Inaba Y, Matsuo K, <u>Saito T.</u>	Pyoderma gangrenosum with wrist joint destruction: case report.	J Hand Surg Am	38(2)	357-361.	2013

J Hand Surg Am					
Miyamae Y, Inaba Y, Kobayashi N, Choe H, Ike H, Momose T, Fujiwara S, Saito T.	Quantitative evaluation of periprosthetic infection by real-time polymerase chain reaction: a comparison with conventional methods.	Diagn Microbiol Infect Dis.	74(2)	125-130.	2012.
Akamatsu Y, Mitsugi N, Hayashi T, Kobayashi H, Saito T.	Low bone mineral density is associated with the onset of spontaneous osteonecrosis of the knee.	Acta Orthop.	83(3)	249-255	2012.
Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, Akagi M, Fukuda K.	Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants.	Inflamm Res.	61 10	1093-1100	2012
橋本和彦 赤木將男	強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性関節症モデルの作成	近畿大学医学雑誌	37 1・2	11-19	2012
井上 紳司 墳本 一郎 赤木 將男	レニン・アンジオテンシン系コンポーネントの軟骨組織における発現-軟骨細胞の増殖と分化への関与	近畿大学医学雑誌	37 3・4	121-130	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 25 年度 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Atesok K, Doral MN, Bilge O, <u>Sekiya I.</u>	Synovial stem cells in musculoskeletal regeneration.	J Am Acad Orthop Surg.	21(4):	258-9. doi: 10.5435/JAAOS-21-04-258.	2013 Apr;
Ichinose S, Tagami M, <u>Muneta T.</u> MukohyamaH, <u>Sekiya I.</u>	Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels.	Med Mol Morphol.	46(1)	24-33. doi:1 0.1007/s0 0795-012- 0005-9	2013 Mar. Epub 2013 Jan
Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, <u>Sekiya I.</u> <u>Muneta T.</u>	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.	431(1)	52-7. doi: 10.1016/j. bbrc.2012. 12.094.	2013 Feb Epub 2013 Jan
Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, <u>Morio T.</u> Teraoka H, Mizutani S.	Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks.	Cancer Sci.	104	703-10	2013

Sugtita S, Ogawa M, <u>Shimizu N,</u> <u>Morio T,</u> 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
Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, <u>Morio T,</u> <u>Shimizu N,</u> 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, <u>Shimizu N,</u> 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
Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H,	Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute	Raspiration		Epub ahead of print	2013

Watanabe K, <u>Shimizu N.</u>	Respiratory Distress Syndrome.				
Ito K, <u>Shimizu N.</u> , 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)	201-211	2013
<u>関矢一郎</u>	滑膜幹細胞による軟骨再生医療の開発	今日の移植	27(1)	53-60	2014
中村智祐 <u>関矢一郎</u> 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	32(12)	49-57	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 25 年度 書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関矢一郎	関節軟骨損傷	福林 徹 (監修) 篠塚昌述 (編集)	スポーツ 整形外科 マニュアル	中外 医学社	東京	2013	p194- 196
関矢一郎	変形性膝関節症	福林 徹 (監修) 篠塚昌述 (編集)	スポーツ 整形外科 マニュアル	中外 医学社	東京	2013	p197- 200
宗田 大	ひざ痛を治す	宗田 大 (総監修)	別冊 NHK きょうの健 康	NHK きょう の健康	東京	2013	P4~
関矢一郎	手術でひざの痛 みを改善する	宗田 大 (総監修)	別冊 NHK きょうの健 康	NHK きょう の健康	東京	2013	p66-79
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、	宗田 大 (総監修)	別冊 NHK きょうの健 康	NHK きょう の健康	東京	2013	p80-80
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	北條浩彦	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	株式会 社羊土 社	東京	2013	p72-74

清水則夫、 渡邊健、 外丸靖浩	実践編ープロト コールを中心にー 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	北條浩彦	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	株式会 社羊土 社	東京	2013	p192- 202
-----------------------	---	------	--	-----------------	----	------	--------------

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

1 / 2

整形外科

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
	陈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脛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
摩擦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…291

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、滑膜や骨髓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髓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)

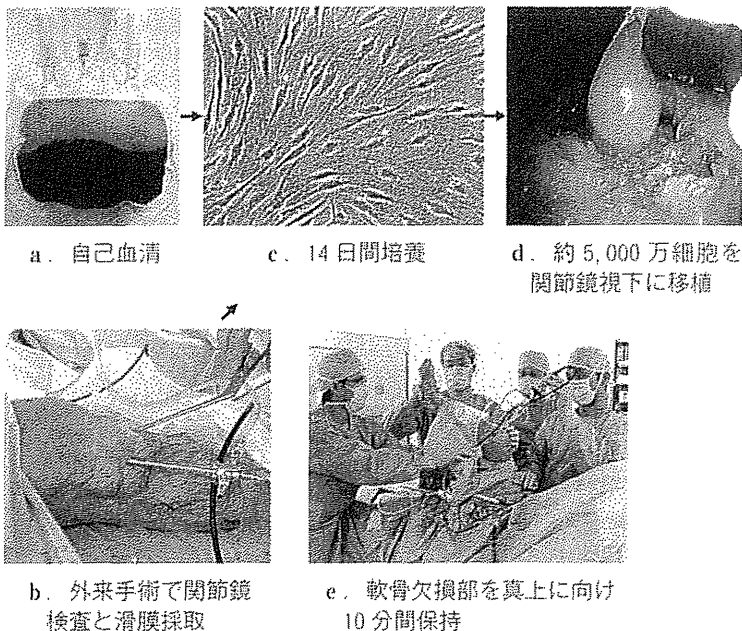


図1. 滑膜間葉幹細胞による軟骨再生医療のスキーム。はじめに自己血清を準備する。外来手術で関節鏡検査と滑膜採取を行う。約0.5gの滑膜を酵素処理後、14日間自己血清を使用して細胞治療センターで培養する。細胞浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に静置し、10分間肢位を保持する。

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 **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、

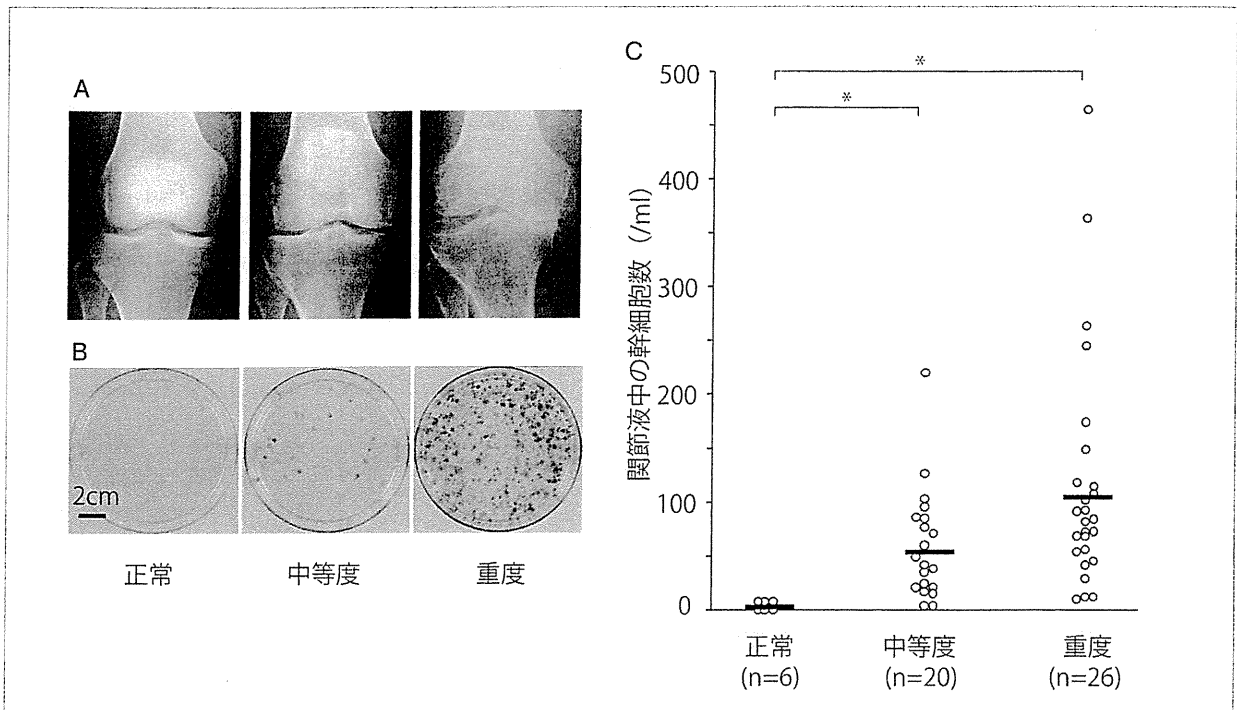


図1 変形性膝関節症の関節液中に含まれる間葉系幹細胞

(A) 立位伸展位正面のレントゲン像. Kellgren Lawrence分類でグレード1と2を中等度, グレード3と4を重度の変形性膝関節症とした. (B) 穿刺した関節液をフィルターに通しdebrisを除去後, 全細胞成分の1/6をディッシュに播種し14日間培養後, クリスタルバイオレットで染色したもの. 間葉系幹細胞のコロニーが観察される. (C) 変形性膝関節症のグレード毎にプロットした関節液1mlあたりの間葉系幹細胞の数. 平均値をバーで示す ($p=0.002$ by Kruskal-Wallis test; $*=p<0.05$ by Steel-Dwass test). (文献10より)

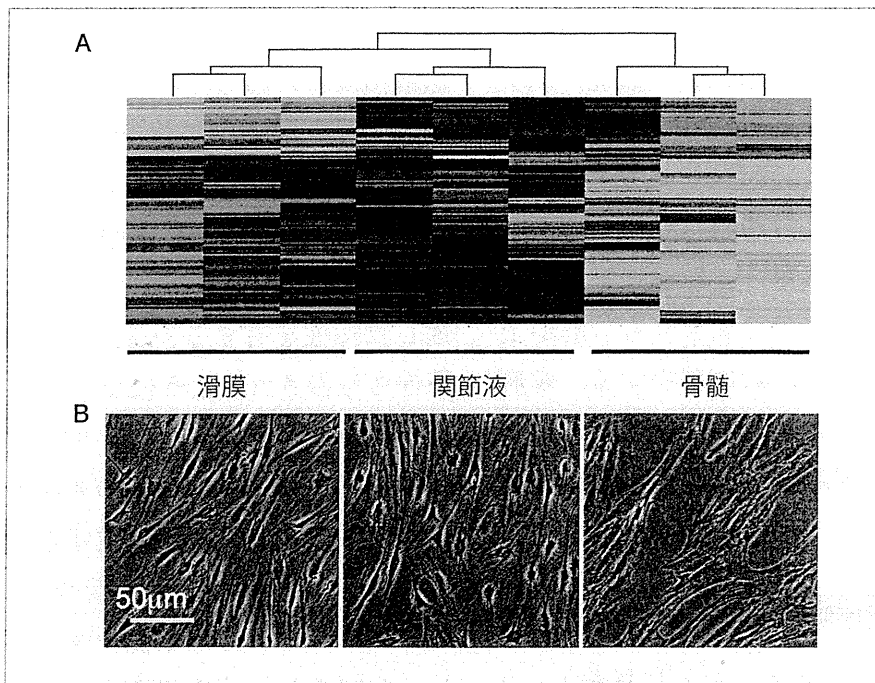


図2 滑膜, 関節液, 骨髄由来の間葉系幹細胞に関する特性の比較

(A) 3名の変形性膝関節症の方から手術時に各組織を採取し, 同一条件で間葉系幹細胞を分離後, total RNAを抽出し, マイクロアレイによる遺伝子プロファイル解析を行った. 発現が強い遺伝子が緑に, 弱い遺伝子が赤く示されている. 階層的クラスター分析の結果, 関節液由来の間葉系幹細胞は, 骨髄由来よりも滑膜由来のものに遺伝子プロファイルが類似する. (B) 滑膜, 関節液, 骨髄由来の間葉系幹細胞の形態. (文献10より)

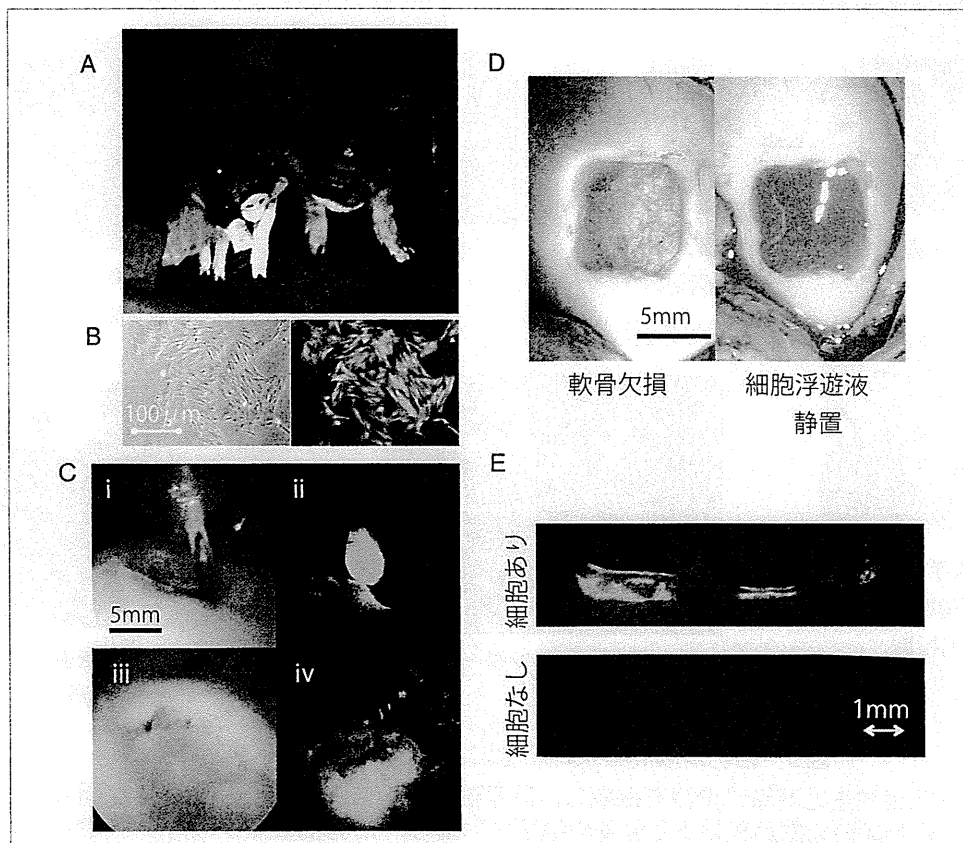


図3 軟骨欠損部に細胞浮遊液を10分間静置する方法による，細胞接着効果のブタを用いた検討

(A) 蛍光を照射すると全身が緑に発色する遺伝子改変ブタ。特に目および白い鼻や四肢が強く緑に発色している。(B) 遺伝子改変ブタ由来の滑膜間葉系幹細胞の形態。(C) 蛍光を検出する関節鏡を用いた観察。(i) 野生型ブタの大腿骨内顆に軟骨欠損を作成し，注射針を軟骨欠損部に向ける。(ii) 細胞浮遊液を注射器で軟骨欠損部に静置する。(iii) 10分後に膝関節内を還流液で満たす。(iv) 関節鏡の先端から還流液が勢いよく流れているにもかかわらず，細胞が軟骨欠損部に接着している。(D) ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作成し，赤く標識した滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置した。(E) 1週間後に組織学的に観察し，移植細胞が軟骨欠損部に接着していることが確認される。(文献15より)

確実に多くの細胞数を確保できるため，軟骨再生の細胞源としてより有用である⁸⁹⁾。

変形性膝関節症の関節液中に含まれる幹細胞

正常膝の関節液を培養用ディッシュに播種し，培養しても，ほとんど細胞のコロニーを認めない。中等度の変形性膝関節症の関節液を培養すると少数の，高度の変形性膝関節症の関節液では多数のコロニー形成細胞を認める(図1)。これらのコロニー形成細胞は培養条件を変えることにより，骨，軟骨，脂肪に分化し，多分化能を有する。また特有の表面抗原パターンを示

すことから，これらは間葉系幹細胞の特徴を有する。変形性膝関節症のレントゲン分類による重症度が増すほど，関節液中に含まれる間葉系幹細胞の数が増す¹⁰⁾。

骨髓，滑膜，関節液から間葉系幹細胞を採取し，遺伝子発現を網羅的に解析すると，関節液由来の間葉系幹細胞は骨髓由来のものよりも，滑膜由来のものに類似する(図2)。また細胞形態も，より細長く，核が明瞭である点で，関節液由来の間葉系幹細胞は骨髓由来のものよりも，滑膜由来のものに類似する。

私たちは過去に，前十字靭帯損傷後に得られ

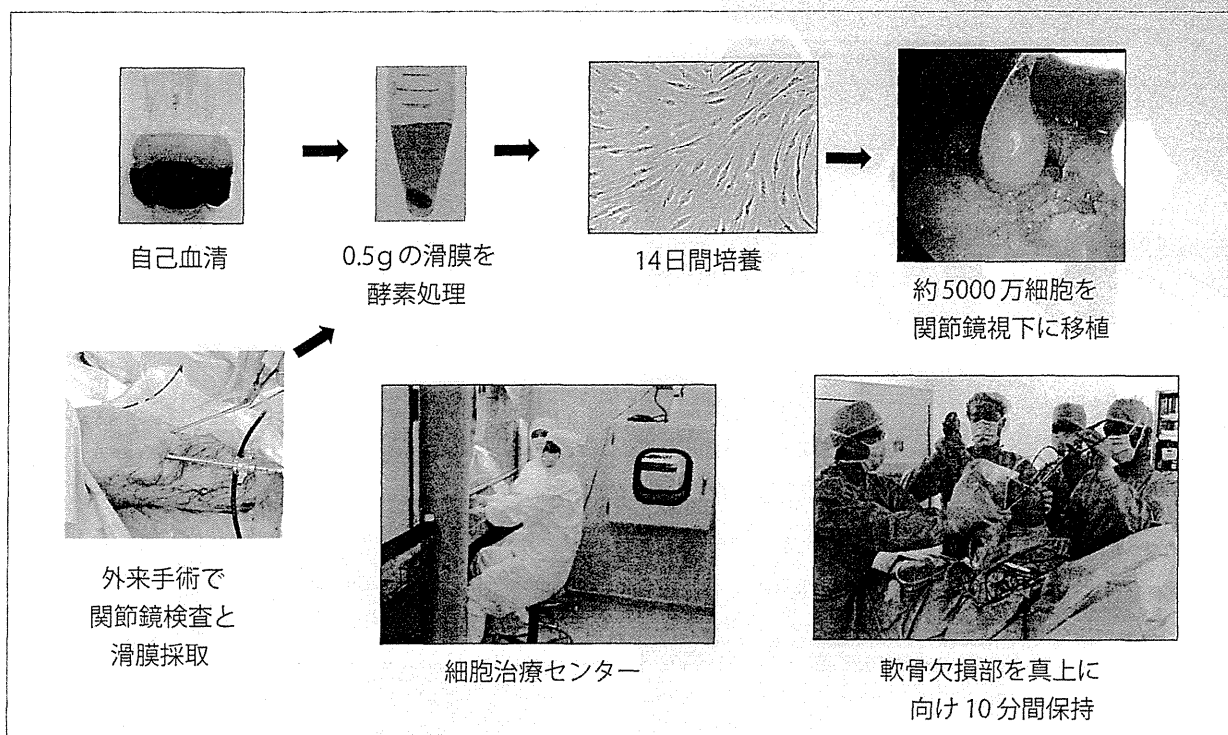


図5 自己滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生医療のスキーム

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、10分間肢位を保持して細胞を接着させる。

グから滑膜を採取し、間葉系幹細胞を採取した(図3)。注射器を用いて軟骨欠損部に滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に静置し10分間保持した後に、関節内を還流液で満たし、GFPを検出する関節鏡で観察すると、関節鏡の先端から勢いよく還流液が流れ出しているにもかかわらず、GFP陽性滑膜間葉系幹細胞は軟骨欠損部に接着していた。また蛍光を照射すると赤く発色する色素でラベルした滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置させ、1週後に観察すると軟骨欠損部にラベルされた細胞を検出できた。

さらにこの方法を用いて、ブタの軟骨欠損部に滑膜間葉系幹細胞を接着させ、再生過程を関節鏡で経時的に観察した。軟骨欠損を作成し細胞を投与しないコントロール群では、軟骨欠損部が時間経過とともに拡大した(図4)。一方、細胞を投与したものは、1カ月時に薄い膜で覆われ、2カ月時に膜が厚くなり、3カ月時には軟骨様の組織で覆われた。組織で評価すると、コントロールでは、1カ月時よりもさらに軟骨欠

損部が拡大していることが確認される一方で、細胞投与群では1カ月時に膜様組織で欠損部が満たされ、3カ月時には軟骨基質が観察された¹⁵⁾。このブタのモデルでは、軟骨再生が完了するまでに3カ月以上の期間を要するものと思われる。

滑膜間葉系幹細胞の鏡視下移植術の実際

私たちはこれまでの基礎研究の成果を基にして、膝関節軟骨欠損や局所に限定している変形性膝関節症に対して、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(図5)。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%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5,000万細胞を採取できる。この細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損

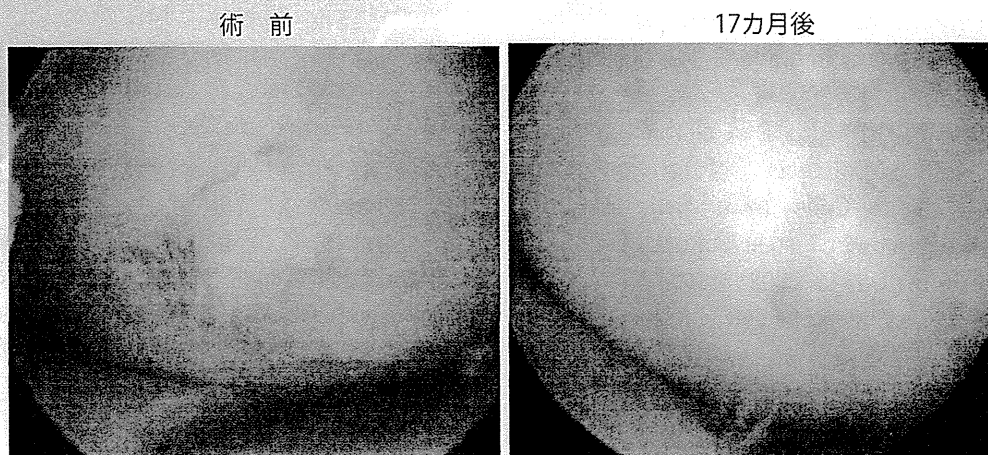


図6 臨床例

内側型変形性膝関節症に対して、高位脛骨骨切術後、自己滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨変性部に静置し、10分間肢位を保持した。17カ月後の抜釘時に再鏡視を行った。細胞移植した大腿骨内顆の軟骨が厚くなっている。

部に10分間静置する。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。多くの場合で自覚症状が改善し、MRIで軟骨が再生することを確認している。内反変形の強い変形性膝関節症の場合は高位脛骨骨切術を併用している。再鏡視で軟骨が厚くなる効果を確認しているが(図6)、骨切術のみの場合と比較する検討が必要と考えている。

文 献

- 1) Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y 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 : 84-97, 2006
- 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) Ichinose S, Muneta T, Koga H et al : Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest* 90 : 210-221, 2010
- 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) Yoshimura H, Muneta T, Nimura A et al : Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327 : 449-462, 2007
- 6) 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. *Cell Tissue Res* 333 : 207-215, 2008
- 7) Nagase T, Muneta T, Ju YJ 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 : 1389-1398, 2008
- 8) Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K et al : In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 322 : 289-298, 2005
- 9) Nimura A, Muneta T, Koga H 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 : 501-510, 2008
- 10) 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* (in press)
- 11) Morito T, Muneta T, Hara K et al : Synovial fluid-de-

- rived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* 47 : 1137–1143, 2008
- 12) Zhang S, Muneta T, Morito T et al : Autologous Synovial Fluid Enhances Migration of Mesenchymal Stem Cells from Synovium of Osteoarthritis Patients in Tissue Culture System. *J Orthop Res* 26 : 1413–1418, 2008
- 13) 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
- 14) Shimaya M, Muneta T, Ichinose S et al : Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. *Osteoarthritis Cartilage* 18 : 1300–1309, 2010
- 15) 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 stem cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy (in press)*

*

*

*