

# 治療

特集

# 救急・災害 up to date

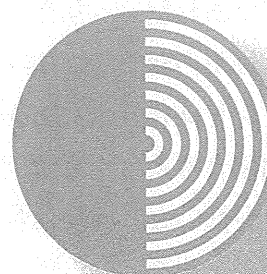
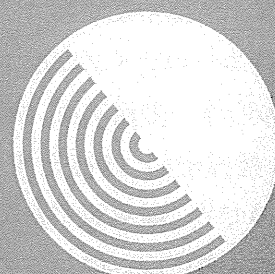
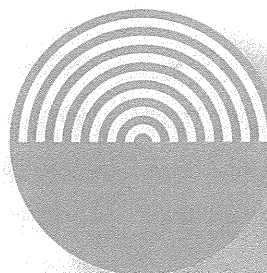
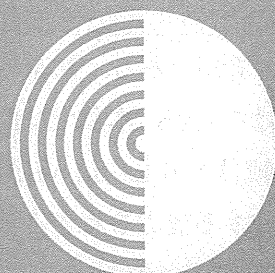
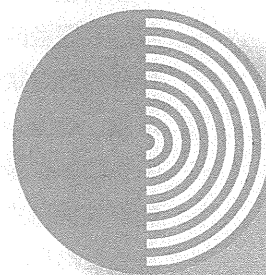
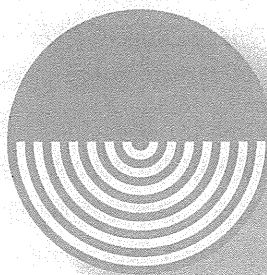
2011

8

Vol.93

THE JOURNAL OF THERAPY

これからの救急医療と災害医療を  
あらためて考える



南山堂

## 滑膜幹細胞を用いた関節軟骨再生

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 教授 2)東京医科歯科大学大学院運動器外科学 教授

### Summary

軟骨組織は細胞密度が低く、血行を欠くことから、再生能力が低い。そのため、軟骨欠損部に対して細胞成分を補うことが、再生させるための手段の1つになる。細胞源として間葉幹細胞は、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。骨髓液、滑膜、骨膜、皮下脂肪、筋肉から同一条件で間葉幹細胞を採取し比較すると、骨髓液と滑膜由来のものが軟骨分化能が高い。さらに滑膜由来のものは、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%の細胞が接着し、軟骨修復を促進させることが実験的に示されている。これまでの基礎研究の成果を基にして、滑膜間葉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。

### はじめに

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1つになる。細胞源として間葉幹細胞は、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。間葉幹細胞の定義はいまだ明確ではないが、本稿では間葉組織由来で、コロニー形成能を有し、*in vitro*で軟骨、骨、脂肪などに分化する能力を有する細胞集団とする。

### I 各種間葉幹細胞の増殖能の比較

間葉幹細胞の採取に関して、骨髓液であれば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、ディッシュに播種し、培養する。培養過程で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ディッシュ当たりには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(図1)。間葉幹細胞の形態、表面抗原、増殖能、分化能などの特性は、播種密度、培養期間、継代数などの影響を受けるので<sup>1)</sup>、細胞源が異なる間葉幹細胞の特性を比較する際には、同じ条件

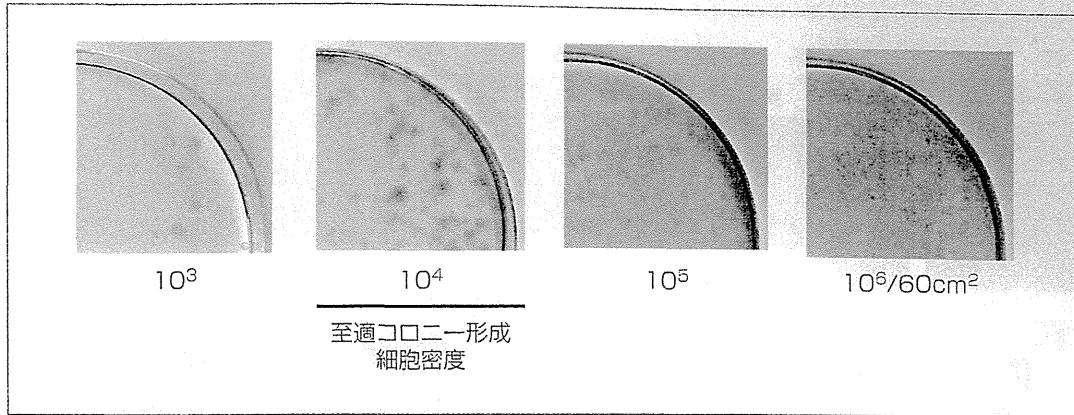


図1 細胞密度がコロニー形成に与える影響

滑膜を酵素処理後、有核細胞をディッシュ上に4種類の密度で播種し、14日間培養後、クリスタルバイオレット染色した。この場合  $10^4$  で播種したものがコロニーが大きく、その数も多いため、至適コロニー形成密度となる。(文献2)より改変

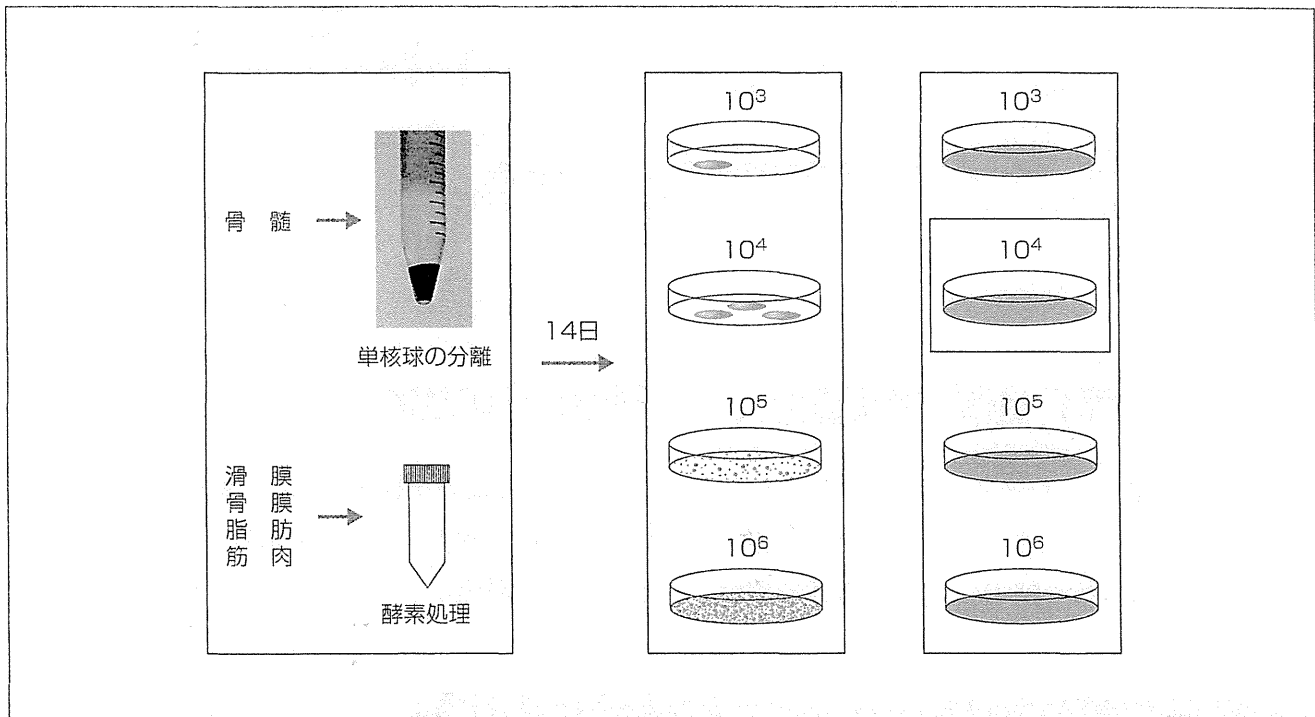


図2 5種の間葉組織から同じ条件で間葉幹細胞を培養する方法

骨髓はフィコールを用いて単核球を分離後に、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉はコラゲナーゼ処理後に、それぞれ細胞密度を変えた条件で6枚ずつ播種し14日間培養する。半分のディッシュをクリスタルバイオレットで染色し、至適コロニー形成密度を決定し、その密度で播種した残り3枚のディッシュから細胞を回収し解析を進める。この模式図では  $10^4$  で播種したものが至適コロニー形成密度となる。

で培養する必要がある。われわれは最も大きい細胞コロニーを形成し、かつ1ディッシュ当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(図2)<sup>2)</sup>。

膝の前十字靭帯再建術時に得られた骨髓液、滑

膜、骨膜、皮下脂肪、筋肉の有核細胞を至適コロニー形成細胞密度で14日間培養すると、いずれも紡錘形で小型の形態を呈する(図3a)。骨髓液由来のコロニー形成率はほかのものよりも1/100以下と低いが、1コロニー当たりの細胞数は多い(図3b)。



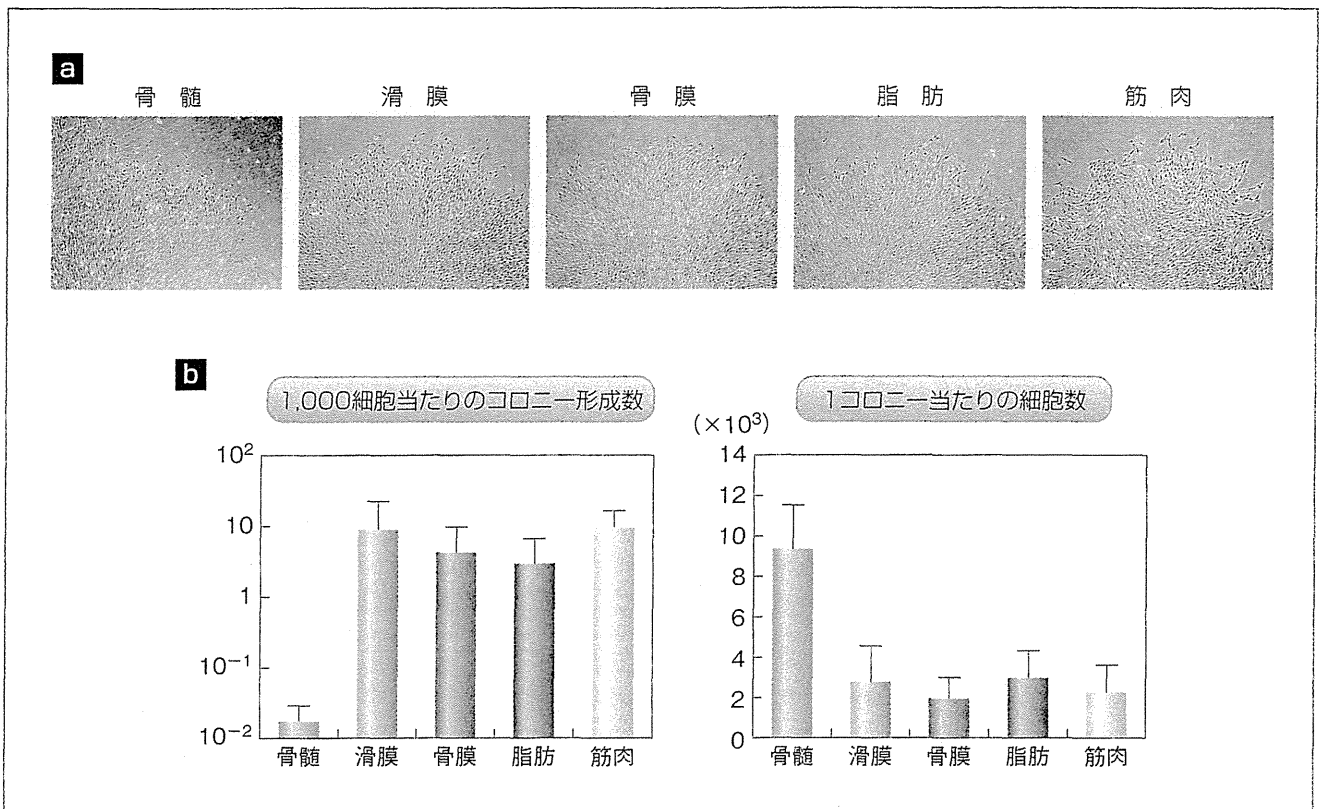


図3 骨髄、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉由来間葉幹細胞の形態とコロニー形成能

(a) いずれも小型の紡錘形である。(b) 1,000細胞当たりのコロニー形成数は骨髄由来のものが低いが、1コロニー当たりの細胞数は多い。(文献2)より改変

## II 各種間葉幹細胞の脂肪分化・石灰化能の比較

脂肪への分化能を、脂肪分化したコロニーの割合で比較すると、滑膜と脂肪由来の間葉幹細胞はほかのものよりも高い(図4)。同様の方法を用い

て石灰化する能力を検討すると、骨髄、滑膜、骨膜由来のものが脂肪、筋肉由来のものよりも高い傾向を示す(図5)。

## III 各種間葉幹細胞の*in vitro*軟骨分化の比較

25万の間葉幹細胞をチューブに入れ10分間遠心し細胞塊とした後に、形質転換成長因子(TGF- $\beta$ )、デキサメタゾン、骨形成因子(BMP)を含む軟骨分化培地で培養すると、底に沈んでいた細胞塊が時間経過とともに丸く、大きくなり、軟骨塊を形成する(図6a)。このペレット培養の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>3)</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。骨髄液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉由来の間葉幹細胞を比較すると、滑膜や骨髄由来のものが大きい軟骨塊を形成し、トリジンブルー陽性の軟骨基質を認める。骨膜由来のものも軟骨基質を産生するが、産生量は骨髄や滑膜のものと比較すると劣る。脂肪や筋肉由来のものはわれわれの検討では軟骨基質の産生が乏しかった(図6b)。

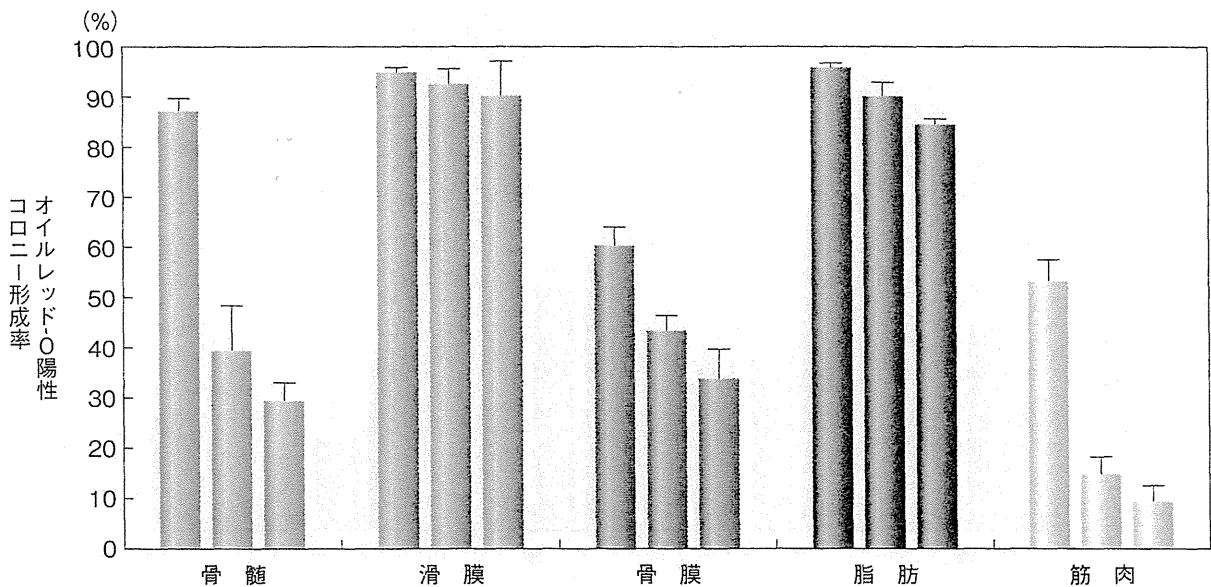
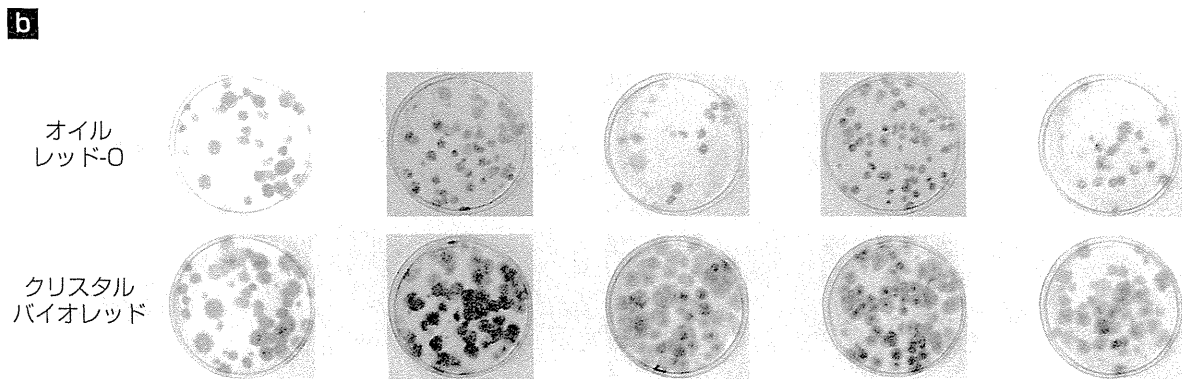
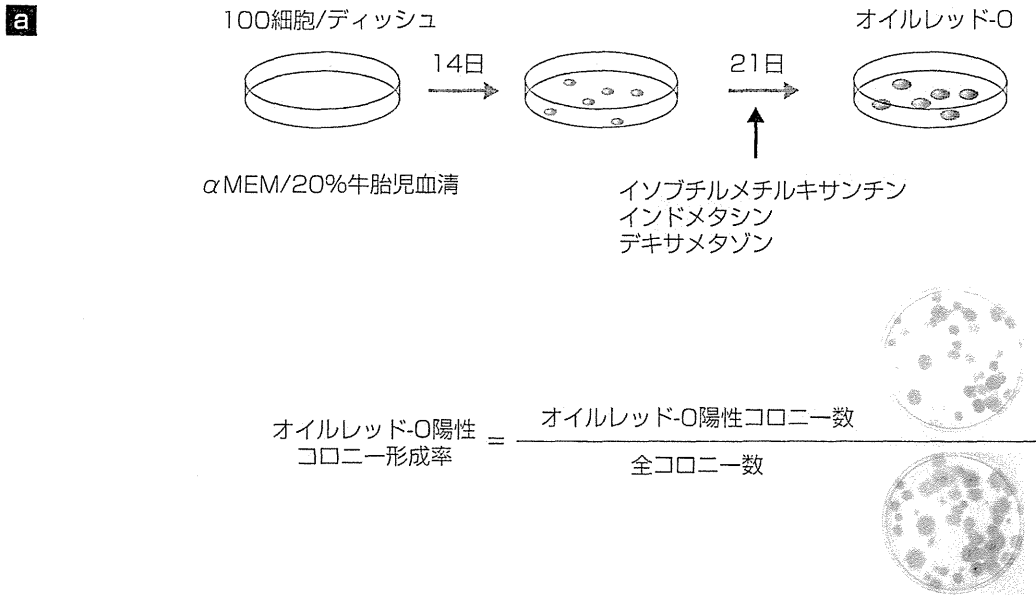
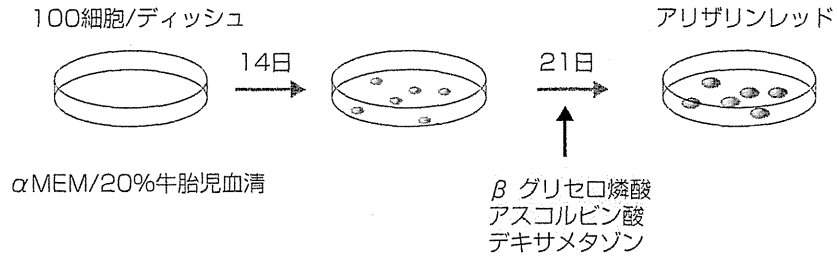


図4 脂肪分化能の比較

各種間葉幹細胞100個をディッシュに播種し14日間培養しコロニーを形成させる。その後、脂肪分化培地で21日間培養する。オイルレッド-Oで染色し、脂肪に分化したコロニー数をカウント後、同じディッシュをクリスタルバイオレットで染色し全コロニー数をカウントし、オイルレッド-O陽性コロニー形成率を求める。3人のドナーの結果をそれぞれ示す。(文献2)より改変

**a**

$$\text{アリザリンレッド陽性コロニー形成率} = \frac{\text{アリザリンレッド陽性コロニー数}}{\text{全コロニー数}}$$

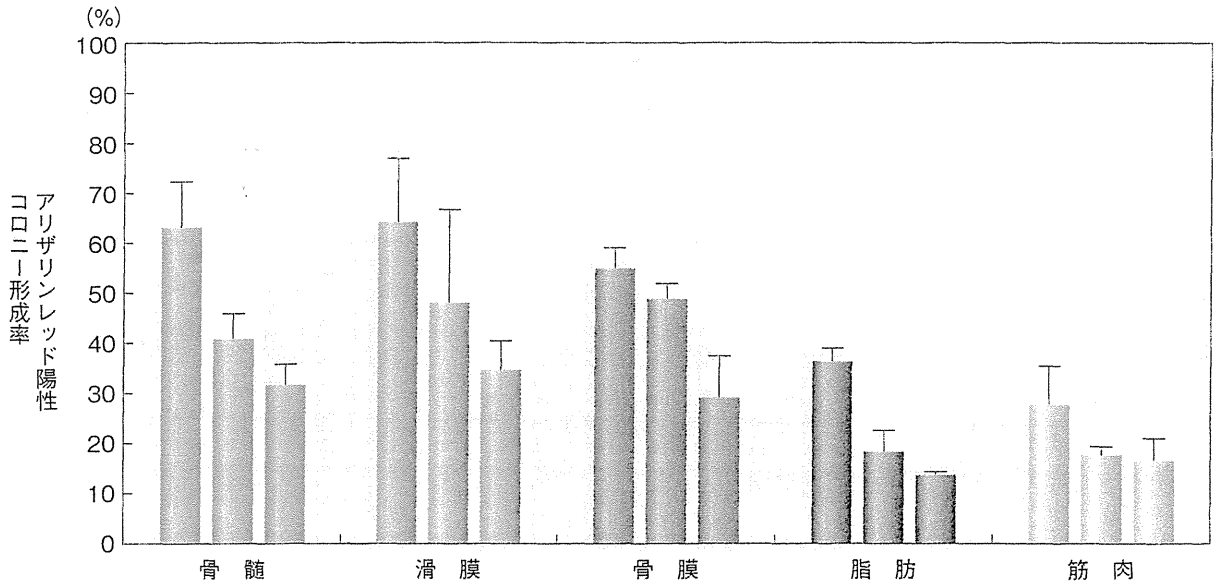
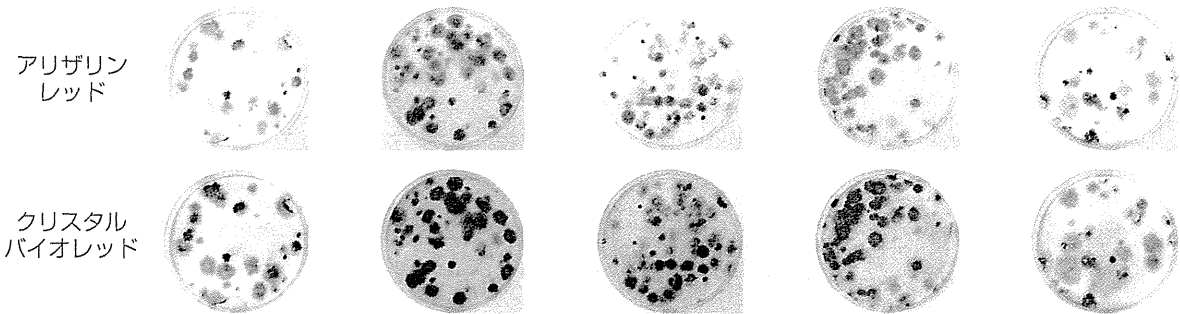
**b**

図5 石灰化能の比較

各種間葉幹細胞100個をディッシュに播種し14日間培養しコロニーを形成させる。その後、石灰化培地で21日間培養する。アリザリンレッドで染色し、石灰化したコロニー数をカウント後、同じディッシュをクリスタルバイオレットで染色し全コロニー数をカウントし、アリザリンレッド陽性コロニー形成率を求める。3人のドナーの結果をそれぞれ示す。(文献2)より改変)

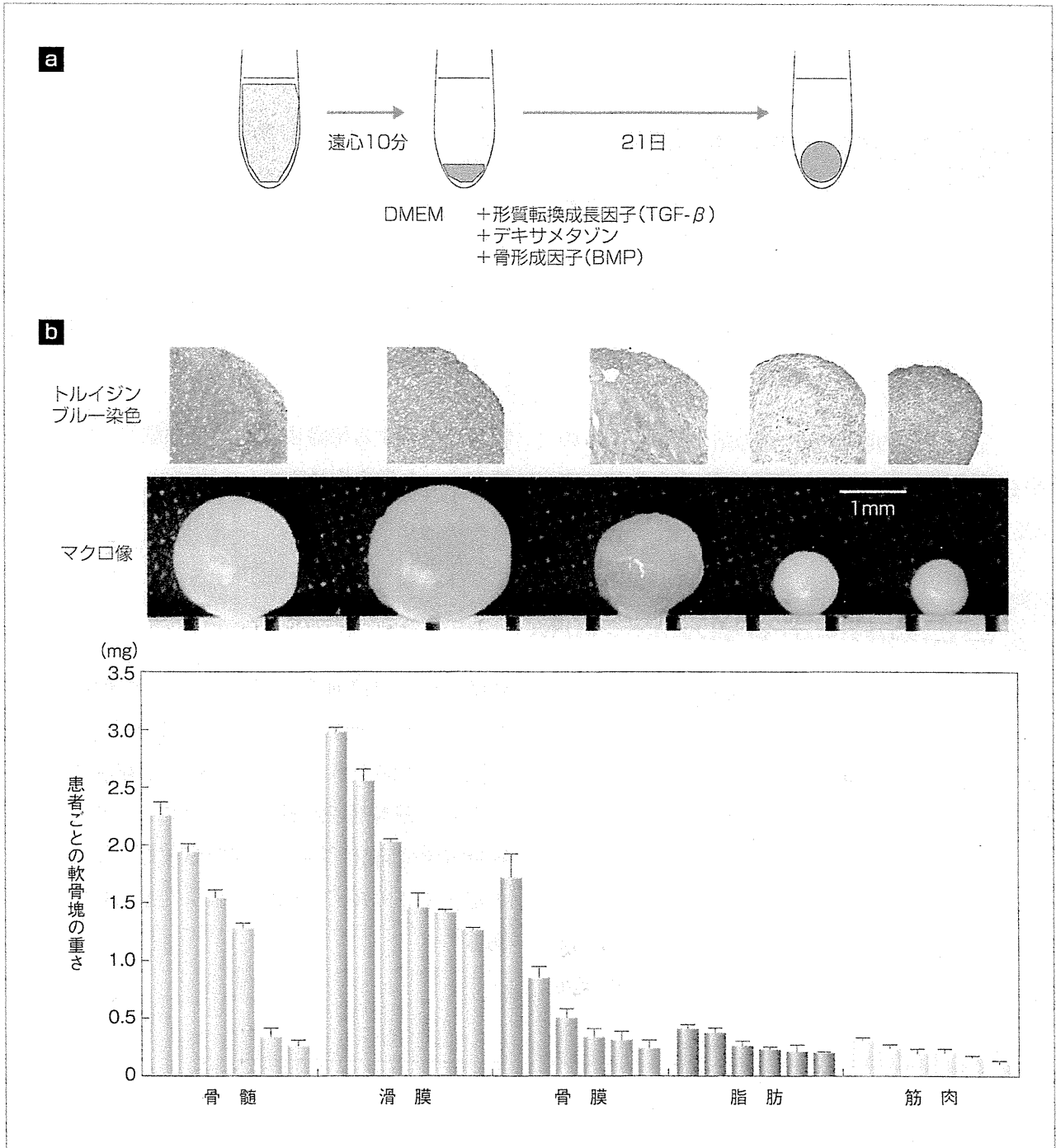


図6 *In vitro*軟骨分化能の比較

チューブ内で軟骨分化培地に浮遊させた25万の間葉幹細胞を10分間遠心し細胞塊とした後に、21日間培養する。軟骨塊のマクロ像、組織像と、ドナーごとの軟骨塊重量を示す。(文献2)より改変)

#### IV 各種間葉幹細胞の*in vivo*軟骨分化の比較

*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間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で調整した後に、同数の未分化間葉幹細胞をゲル

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

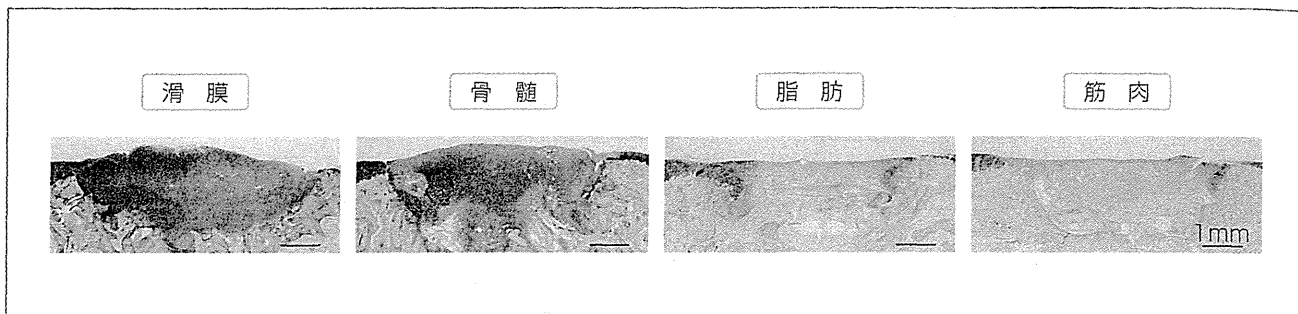


図7 各種間葉幹細胞の*in vivo*軟骨分化能の比較

同一ウサギから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で用意した後に、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。(文献4)より改変)

(図7). *in vitro*の軟骨分化能の結果は*in vivo*の結果を反映した<sup>4)</sup>。骨髄と滑膜の軟骨分化能は高いが、軟骨は滑膜およ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幹細胞の軟骨分化能が高いと考えられる。

## V 自己血清による増殖能の比較

細胞を増殖させるためには血清成分が必要である。実験レベルでは牛胎児血清が一般的に用いられるが、細胞治療を臨床応用するために牛血清の使用は、牛成分の免疫反応や、感染が問題となり得る。そのため、自己血清の使用が推奨される。また、培養の際、継代を繰り返すと染色体異常を生じる可能性が増えるため、継代しない初代細胞の使用が望ましい。われわれの検討では、滑膜間

葉幹細胞は自己血清による培養で、骨髄間葉幹細胞よりもはるかに多くの初代細胞を採取できる(図8)。実験上多くの間葉幹細胞を移植することにより、軟骨再生の成績をあげたことから<sup>4)</sup>、滑膜間葉幹細胞は骨髄間葉幹細胞より自己血清での培養でより多くの細胞を確保できる点で有利である<sup>5)</sup>。

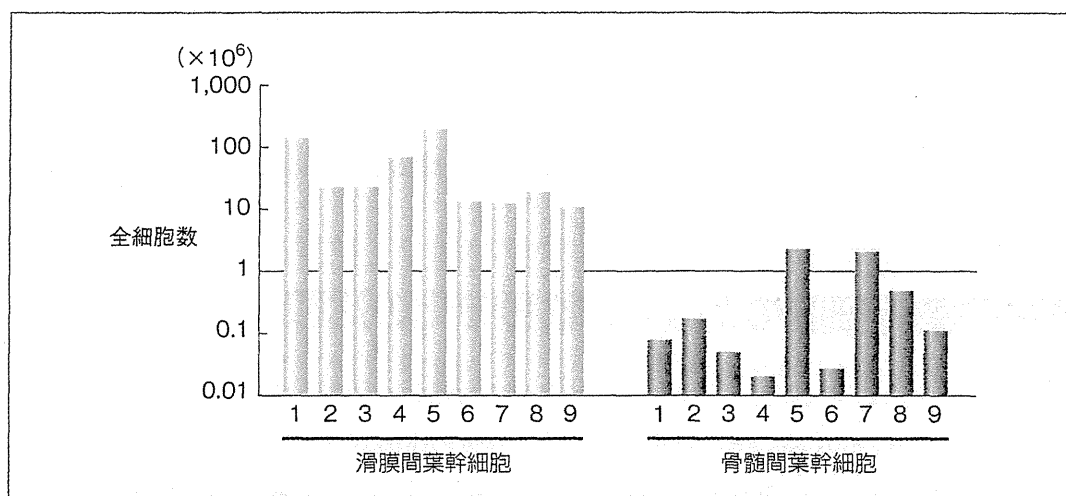


図8 自己血清で14日間培養して得られたヒト滑膜および骨髄由来の間葉幹細胞数

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。



## VI 軟骨欠損部への細胞浮遊液の静置

軟骨欠損部への滑膜間葉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(図9a)。人工膝関節置換術後に得られたヒトの軟骨を用いて解析すると、10分間静置すると約60%の細胞が接着した(図9b)。ウサギの膝関

節に軟骨欠損を作成し、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、多くの細胞が軟骨欠損部に接着し、優れた軟骨修復を示した(図10)<sup>6)</sup>。この方法を用いることにより、ヒトでは関節鏡視下での細胞移植が可能となる。

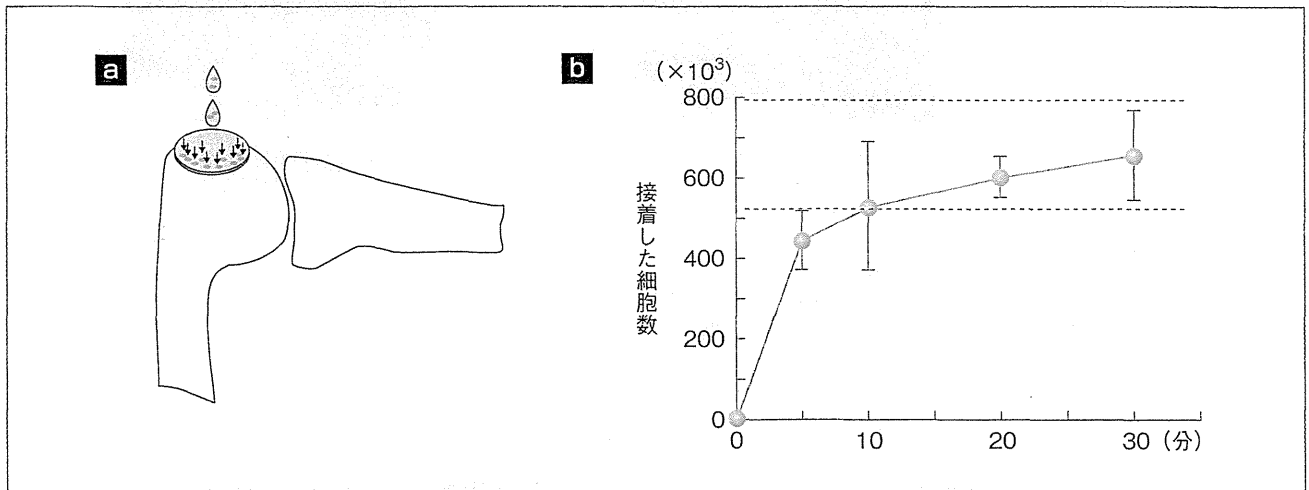


図9 滑膜幹細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部への接着細胞数との関係

(a)滑膜幹細胞浮遊液の軟骨欠損部への静置の模式図。(b)ヒト滑膜間葉幹細胞の浮遊液を、ヒト軟骨欠損部に静置した際の、時間と接着細胞数の関係。(文献6)より改変)

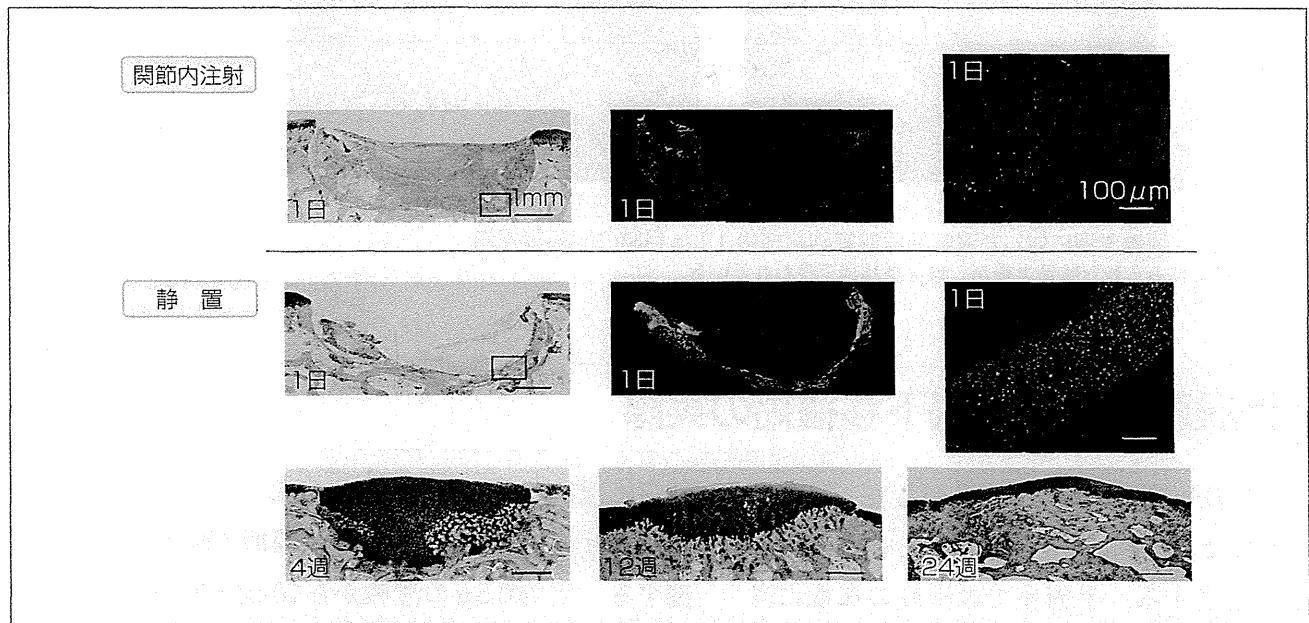


図10 ウサギの膝関節に軟骨欠損を作成し、ウサギ滑膜間葉幹細胞の浮遊液を関節内注射したものと、同じ浮遊液を軟骨欠損部に静置したものと、軟骨修復に関する組織学的比較

蛍光下で移植細胞を赤く、すべての細胞の核を青く発光させている。1日後の比較で、浮遊液を静置したものは、関節内注射したものよりも多くの滑膜間葉幹細胞が軟骨欠損部に接着している。接着した細胞は4週後に軟骨基質を豊富に産生し、その後、骨・軟骨境界部が上昇し、隣接軟骨と厚さが同等になる。(文献6)より改変)

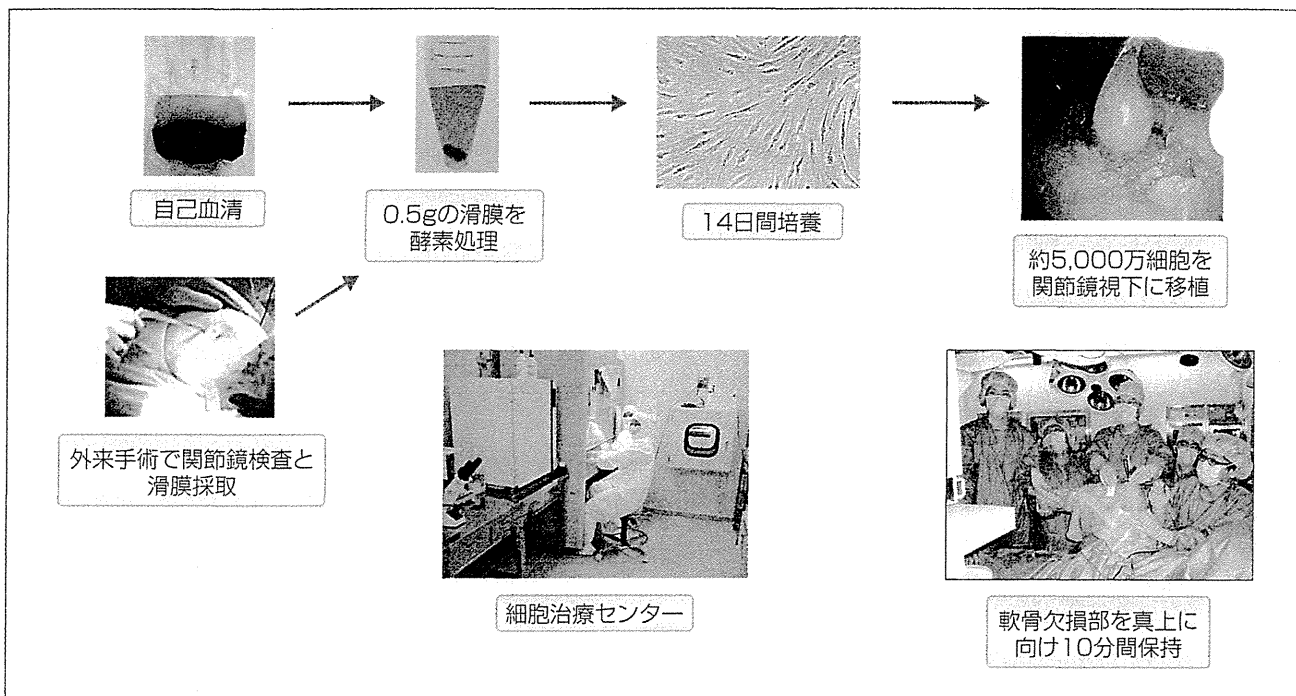


図 11 滑膜幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療のスキーム

外来手術で関節鏡検査の際に滑膜を0.5g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5,000万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。

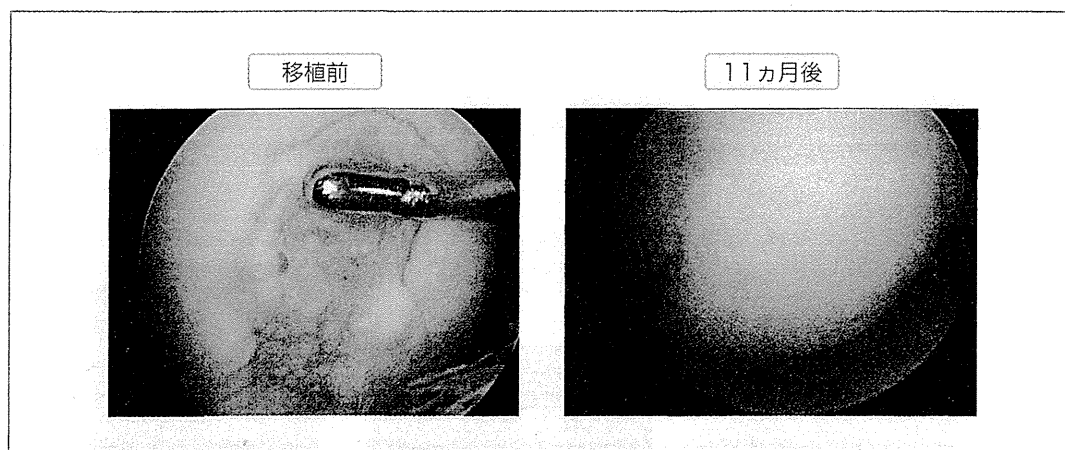


図 12 軟骨欠損に対して滑膜間葉幹細胞移植後11ヵ月時の関節鏡視像  
移植前にみられた軟骨欠損が、軟骨様組織で覆われている。

## VII 滑膜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基にして、臨床応用を開始した。まず末梢血を採取し、自己血清を分離して用意する。手術室での滑膜の採取に当たって、当初は腰椎麻酔下で関節鏡で観察しながら採取したが、今では関節内麻酔をベースに関節鏡を使用せずに外来手術で採取している。滑膜を

酵素処理後、本学の手術室と同じフロアにある細胞治療センターで、無菌的に滑膜間葉幹細胞を培養する。平均0.5gの滑膜から70mLの自己血清を使用し、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部に10分間静置する(図11)。後療法は、1日後か