

ら可動域訓練, 2週後から部分荷重, 6週後から全荷重を開始する。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12)。本軟骨治療の真の有効性を判断するためには, 多数例の長期間にわたる観察が必要であると考えている。



参考文献

- 1) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, 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.
- 2) 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 (8) : 2521-2529, 2005.
- 3) Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, 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.
- 4) 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 (2) : 207-215, 2008.
- 5) Nimura A, Muneta T, Koga H, et al: Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum*. 58 (2) : 501-510, 2008.
- 6) 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 (4) : R84, 2008.

違法コピーに注意!!

そのコピーは大丈夫ですか?

現代社会において、コピー(複写)はなくてはならないものになっていますが、その手軽さゆえに違法コピーが後を絶ちません。あなたが日常的に行っているコピーは大丈夫ですか? 著作権法に定められた例外、つまり、個人または家庭内等で使うために自らコピーする場合や図書館において調査研究等のため一部分をコピーする場合(著作権法第30, 31条等)のごく限られた範囲以外のコピーは、すべて著作権者の許諾を得なければ違法となります。企業や研究施設等で職務上利用するコピーはすべて許諾が必要となりますので、ご注意ください。

違法コピーは健全な創作活動、出版活動の障害となり、ひいては文化・学術の発展を阻害する大きな要因となります。今一度、著作権についてお考えください。

許諾の手続きは簡単です!

医学や関連領域の出版物の多くは、(社)出版者著作権管理機構(JCOPY)に複写権の管理・運営が委託されています。複写される場合は事前に(JCOPY)に連絡し許諾を得てください。

(社)出版者著作権管理機構

TEL03-3513-6969 FAX03-3513-6979 info@jcopy.or.jp



一般社団法人
日本医書出版協会

不正なコピーは

許さない!

Q&A サイト「それは違法かも。」

「これって違法?」著作権に関するよくある質問にわかりやすくお答えしています。

<http://www.ihokamo.net/>

情報受付窓口「不正コピー情報ポスト」

不正コピーなど、明らかに違法なものを見つけたら、こちらまで情報をお寄せください。

<https://www2.accsjp.or.jp/piracy/>
フリーダイヤル 0120-765-175



社団法人 コンピュータソフトウェア著作権協会
<http://www2.accsjp.or.jp/>

7. 滑膜間葉幹細胞を用いた 関節軟骨再生

関矢 一郎* 宗田 大**¹⁾ 古賀 英之**²⁾ 二村 昭元**³⁾
 森戸 俊行**⁴⁾ 島谷 雅之**⁵⁾ 望月 智之**⁶⁾ 瀬川 裕子**⁷⁾
 坂口 祐輔**⁸⁾ 辻 邦和[†] 市野瀬志津子^{††}

軟骨損傷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ひとつになる。滑膜由来の間葉幹細胞は他のものよりもコロニー形成能、自己血清による増殖能、*in vitro* 及び *in vivo* 軟骨分化能が高く、軟骨再生に対する cell source として優れている。滑膜幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に 10 分間静置すると、約 6 割の細胞が接着し、さらに浮遊液にマグネシウムを添加すると接着効率さらには増す。我々はこれまでの基礎研究の成果を基にして、滑膜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。

Cutting edge on research of cartilage metabolism.

Articular cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells.

Section of Cartilage Regeneration, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

Ichiro Sekiya

Section of Orthopedic Surgery, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

*Takeshi Muneta, Hideyuki Koga, Akimoto Nimura, Toshiyuki Morito,
Masayuki Shimaya, Tomoyuki Mochizuki, Yuko Segawa, Yusuke Sakaguchi*

*Global Center of Excellence Program for International Research Center for Molecular Science
in Tooth and Bone Disease, Tokyo Medical and Dental University.*

Kunikazu Tsuji

Instrumental Analysis Research Center, Tokyo Medical and Dental University.

Shizuko Ichinose

*東京医科歯科大学 大学院 軟骨再生学・教授 (せきや・いちろう)

**東京医科歯科大学 大学院 運動器外科学 ¹⁾ 教授 (むねた・たけし) ²⁾ (こが・ひでゆき) ³⁾ (にむら・あきもと)

⁴⁾ (もりと・としゆき) ⁵⁾ (しまや・まさゆき) ⁶⁾ (もちづき・ともゆき) ⁷⁾ (せがわ・ゆうこ) ⁸⁾ (さかぐち・ゆうすけ)

[†]東京医科歯科大学 グローバル COE (つじ・くにかず)

^{††}東京医科歯科大学 機器分析センター 電子顕微鏡室 (いちのせ・しづこ)

Cell transplantation has shown to be a promising strategy to repair cartilage defects. Mesenchymal stem cells derived from synovium have been shown to be a superior cell source for cartilage regeneration to those from other mesenchymal tissues due to their higher rates of colony formation, proliferation potential with autologous serum, and *in vitro/vivo* chondrogenic potentials. We have found that approximately 60% of synovial mesenchymal stem cells placed on cartilage defects adhered to the defect within 10 min, and the addition of magnesium enhanced this percentage further, which resulted in better cartilage regeneration. Based upon several basic research studies performed in our lab, we have begun the transplantation of synovial stem cells arthroscopically in a clinical study for the treatment of cartilage defects. To date, no adverse events have been reported in the study. Regeneration of cartilage, reduction in defect size and an improvement of symptoms have been obtained in most patients over the last 3 years.

■ 間葉幹細胞とその定義

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ひとつになる。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¹⁾。

間葉幹細胞は間葉組織由来で、自己増殖能と多分化能を有する細胞集団である。表面抗原型として、CD34(-), CD44(+), CD45(-), CD90(+), CD105(+), CD106(+), CD166(+), Stro-1(+)²⁾のパターンで示されることが多いが²⁾、特定のひとつで代表されるような特異的なものはない。自己増殖能を証明することは容易ではなく、Friedenstein が 1960 年代に報告したようにコロニー形成能で代わりに示されることが多い³⁾。

本稿では間葉幹細胞を間葉組織由来で、コロニー形成能を有し、*in vitro* で軟骨、骨、脂肪等に分化する能力を有する細胞集団とする。

間葉幹細胞のなかでは骨髄由来の報告が最も多く、一般的なものになっているが、2000 年以降、脂肪、筋肉等の骨髄以外の種々の間葉組織からも分離できることが数多く報告されている。最近では、すべての間葉組織に間葉幹細胞が存在すると言ってもよいかもしれない。間葉幹細胞は、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。

■ 間葉幹細胞のコロニー形成能

コロニー形成率は間葉幹細胞の特性のひとつである。特定のドナーから各種の間葉組織を採取し、有核細胞を種々の細胞密度で播種し、14 日間培養して、クリスタル・バイオレットで染色すると、滑膜、前十字靭帯、皮下脂肪等の由来のものは、骨髄に比べてコロニー形成率が 100 倍、あるいはそれ以上高い(図 1)⁴⁾。種々の間葉幹細胞の分化能等の特性を比較する際には、同一ドナーからの組織を用いて可及的に同じ条件で培養させる必要がある。間葉幹細胞の播種密度と培養期間は、増殖能や分化能に影響を与える⁵⁾。培養期間が同じであれば大きなコロニーを形成する培養条件が、その細胞群の最大増殖能を示すものとなる。コロニー同士が接触するとコロニーの大きさは小さくなるが、細胞密度が低いと 1 ディッシュ当たりの回収量が少なくなる。そのため私たちは、コロニー間の接触が明らかでなく、かつコロニー数が最多のものを至適細胞密度として、基本的にはこの密度で播種した細胞を回収し、解析を行っている。

■ 間葉幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能

25 万の間葉幹細胞をチューブに入れ、10 分間

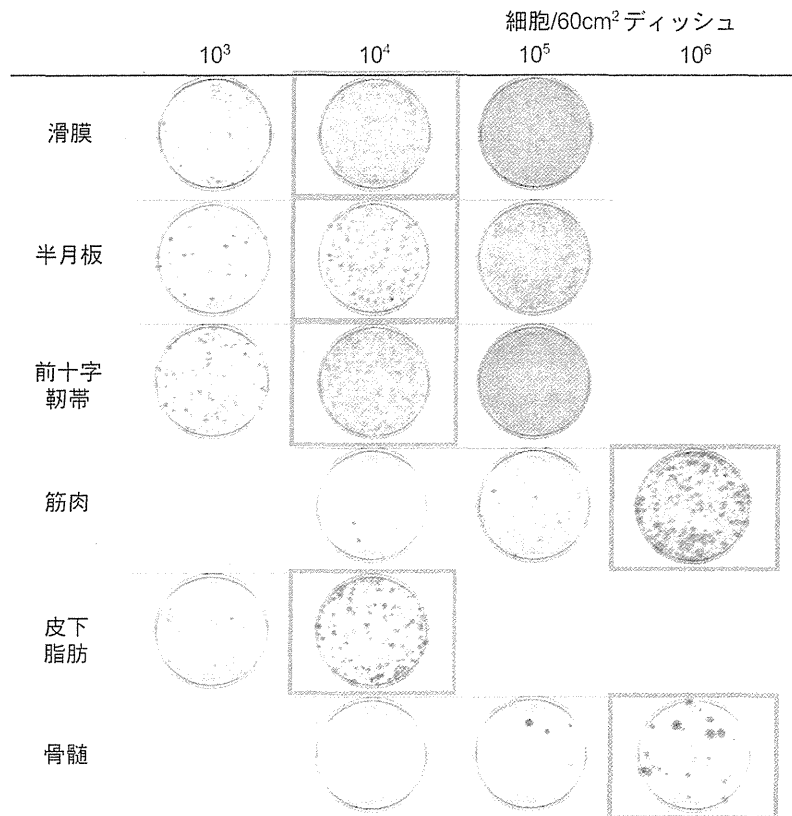


図1 ヒト各種間葉幹細胞のコロニー形成能の比較

人工膝関節置換術の際に間葉組織を採取し、骨髓液は濃度遠心法で、他の組織は酵素処理後に、有核細胞を種々の細胞密度で播種し、14日間培養後、染色したもの。細胞コロニーの大きさが維持され、コロニー数が最大の条件を枠で囲っている。

(巻頭カラーグラフィック7頁参照)

(文献4より)

遠心し、細胞塊とした後に、TGF- β (transforming growth factor- β)、デキサメタゾン、BMP (bone morphogenetic protein) 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⁶⁾⁻⁸⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾。

同一ドナーから骨髓液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉幹細胞を分離・増殖させ、同数の細胞を21日間ペレット培養させると、滑膜や骨髓由来のものが大きい軟骨塊を形成する(図2)¹¹⁾。同様のことは、ヒトのほかにもラット¹²⁾やウサギ¹³⁾でも示される。このことは滑膜や骨髓由来の間葉幹細胞が軟骨再生の間葉幹細胞源として優れていることを示すものである。

各種間葉幹細胞を *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

TGF- β : transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子)

BMP : bone morphogenetic protein (骨形成因子)

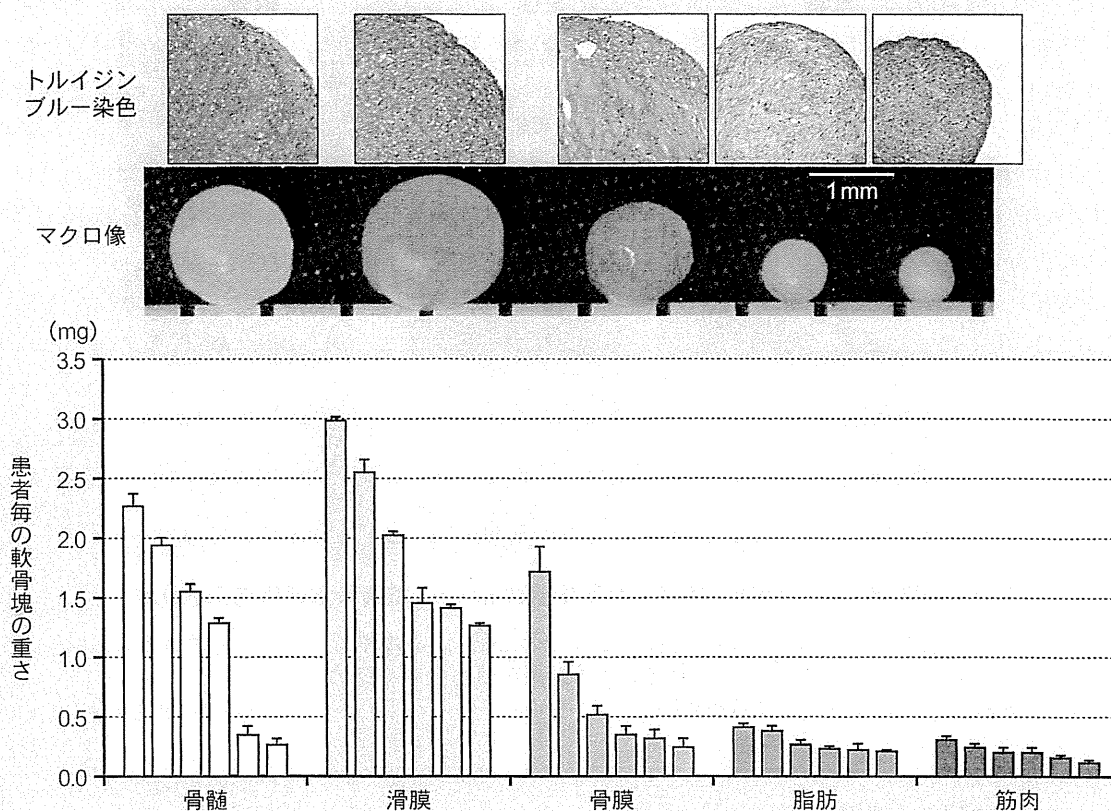


図2 ヒト各種間葉幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能の比較

同一ドナーから各間葉組織を採取し、間葉幹細胞を同条件で増殖させた後に、同数の細胞を、同一条件下に *in vitro* で軟骨分化させたもの。

(写真は巻頭カラーグラフィック8頁参照)

(文献 11 より)

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。骨髄幹細胞、滑膜幹細胞、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かったが、1日後に最も明らかな差異を認めた。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た。骨髄幹細胞は細胞間裂隙を伴わない円形の細胞、滑膜幹細胞では中等度の細胞間裂隙と紡錘形の細胞、軟骨細胞では豊富な細胞間裂隙とともに多角形の細胞で構成された(図3)¹⁴⁾。

各種間葉幹細胞の *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* の結果を反映した(図4)¹³⁾。

脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞

脂肪組織にも間葉幹細胞が存在するが、その軟骨分化能は高くない^{11) 13)}。Dragooらは膝蓋下脂肪体由来の間葉幹細胞が軟骨再生の細胞源として有用と報告しているが、この間葉幹細胞を脂肪由

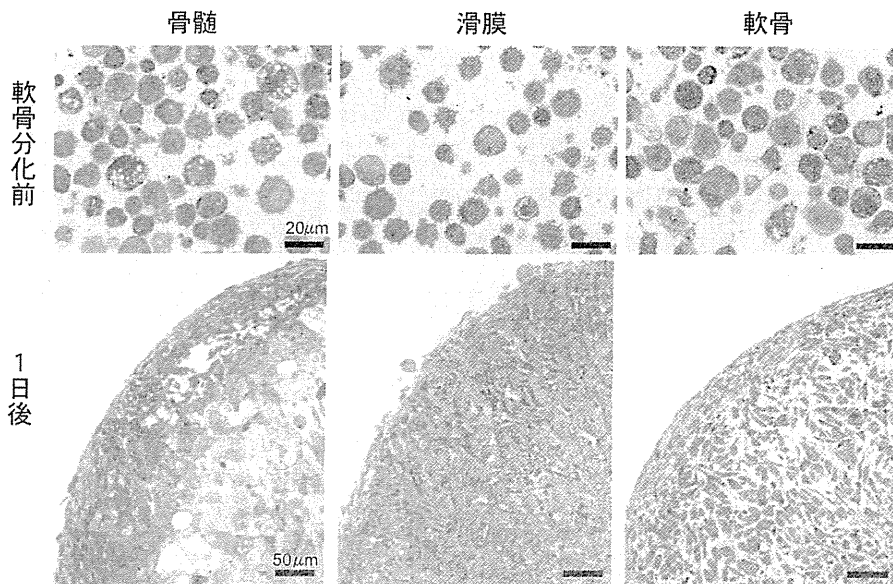


図3 骨髓幹細胞, 滑膜幹細胞, 軟骨細胞の *in vitro* 軟骨分化過程の形態比較

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た。

(巻頭カラーグラフィック8頁参照)

(文献 14 より)

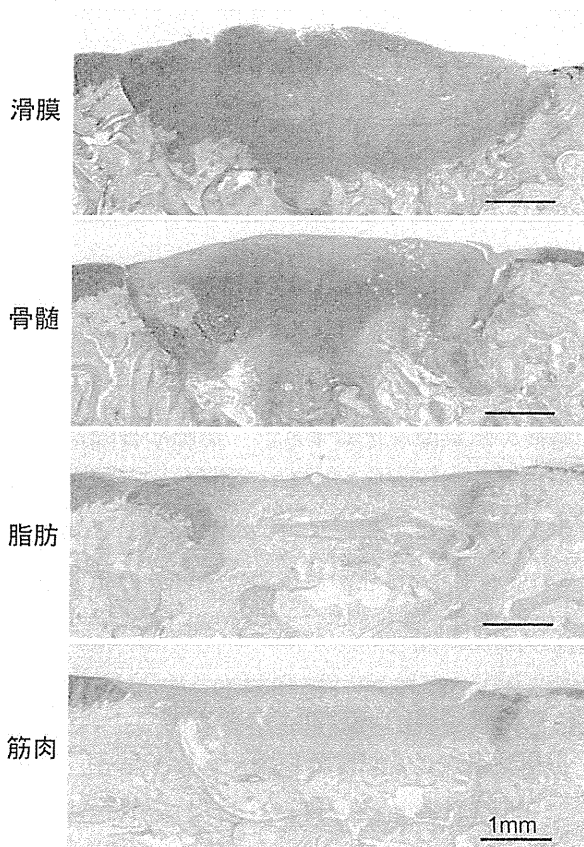


図4 ウサギ各種間葉幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較

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。

脂肪や筋肉由来のものは, 軟骨基質の産生が乏しかった。(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(文献 13 より)

来としていた¹⁵⁾。脂肪性滑膜は比重や組織学的特徴が、線維性滑膜と皮下脂肪の中間に位置する。しかし、これらの組織から間葉幹細胞を採取し、増殖能、軟骨・脂肪・石灰化能、表面抗原等を比較すると、脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞は、皮下脂肪由来のものよりも、線維性滑膜由来のものに類似する(図5)¹⁶⁾。脂肪性滑膜由来の間葉幹細胞は、脂肪由来ではなく、滑膜由来ととらえるべきである。

平均年齢 20 歳の前十字靭帯損傷のドナーと、平均年齢 70 歳の変形性膝関節症のドナーの滑膜幹細胞を比較すると、線維性滑膜、脂肪性滑膜、いずれにおいても増殖能や軟骨分化能は大きく変わらない。このことは、高齢者の変形性膝関節症に対しても、滑膜幹細胞による細胞治療の可能性を示すものである¹⁶⁾。

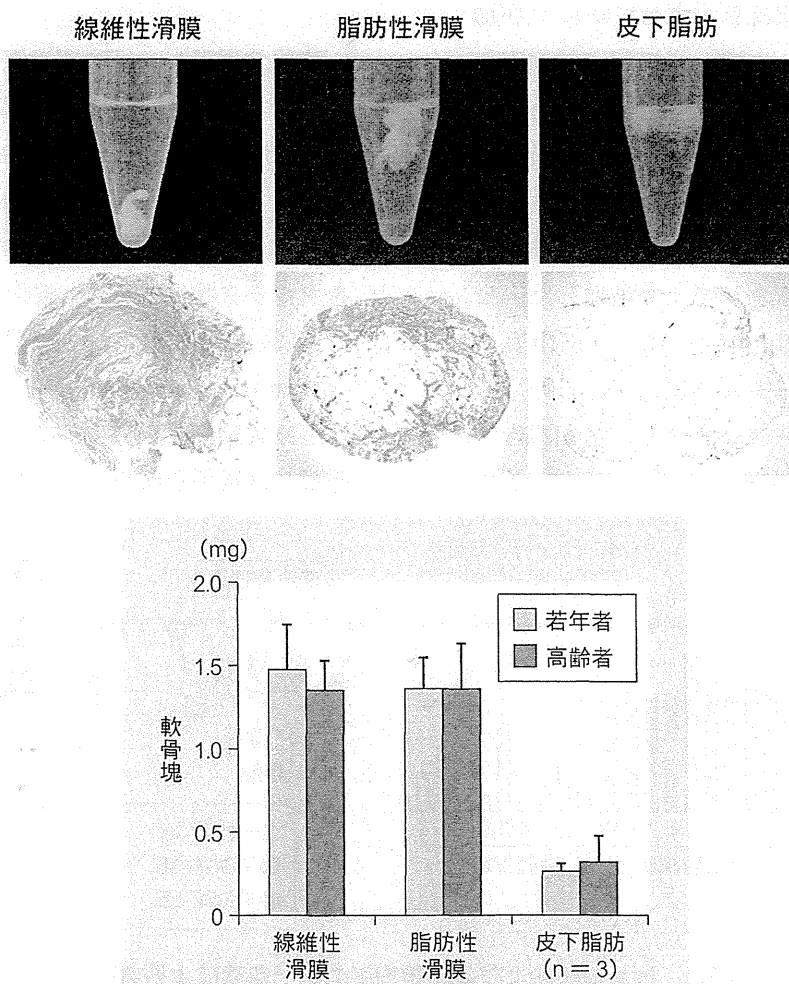


図5 高齢者と若年者由来の滑膜幹細胞に関する軟骨分化能の比較

(写真上段)左より線維性滑膜、脂肪性滑膜、皮下脂肪組織をエッペンドルフ・チューブ内のPBSに入れたもの。(写真下段)HE染色したもの。(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(グラフ)若年者と高齢者由来の各間葉幹細胞を *in vitro* 軟骨分化させた後の軟骨塊重量。

(文献 16 より)

自己血清による間葉幹細胞の増殖

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を行う患者から血液を約 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、滑膜幹細胞は 9 人すべてから 1,000 万細胞以上採取できた。一方、骨髓間葉幹細胞を 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6)。次にそれぞれを 50 細胞/cm² で播種し、10% 自己血清と 20% 牛胎児血清で 14 日間培養すると、滑膜間葉幹細胞は自己血清で、骨髓間葉幹細胞は牛胎児血清でより増殖した。ヒト血清には PDGF (platelet-derived growth factor) の AB アイソフォームが豊富に存在した。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、滑膜間葉幹細胞は PDGF α レセプ

ターが骨髓間葉幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが差を説明するものと考えられる¹⁷⁾。間葉幹細胞を使用する再生医療を実施するにあたり、用意できる細胞数は多いほどよいが、培養器や自己血清量に限界があることから、5,000 万から 1 億細胞を目標にするのが現実的と私たちは考えている。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、滑膜幹細胞は骨髓幹細胞よりも有利である。

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。人工膝関節置換術後に得られたヒトの軟骨をブロック状に用意し、軟骨欠損を作成した。DiI で標識した滑膜幹細胞 800×10³ 個を PBS (phosphate-buffered salines) に浮遊させ、こ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した。当初予定したものより

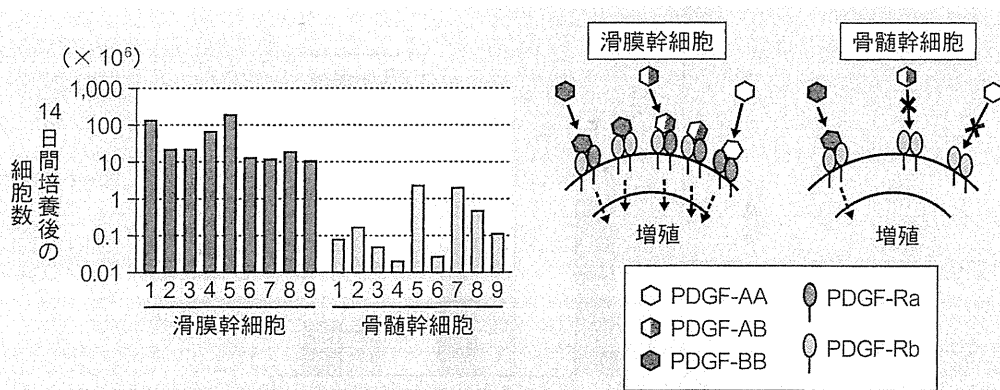


図6 ヒト滑膜および骨髓幹細胞の自己血清による培養

(左) 滑膜組織約 0.2 g と骨髓液約 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の 9 人の結果。(右) その差を説明するためのスキーム。
(文献 17 より)

PDGF : platelet-derived growth factor (血小板由来成長因子)
PBS : phosphate-buffered salines (リン酸緩衝生理食塩水)

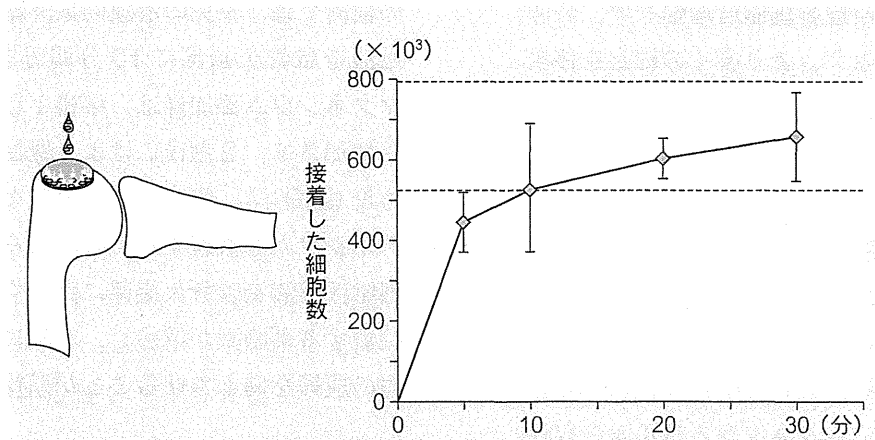


図7 滑膜幹細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部への接着細胞数との関係

(左) 滑膜幹細胞浮遊液の軟骨欠損部への静置の模式図。(右) 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 18 より)

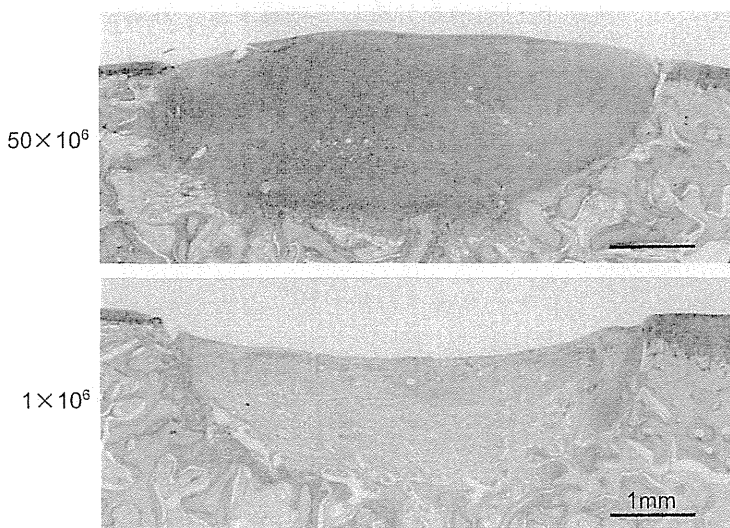


図8 軟骨欠損部へ移植する細胞数と軟骨修復との関係

ウサギの軟骨欠損部に、滑膜幹細胞を 1×10^6 細胞と 50×10^6 細胞をゲルに包埋して、骨膜で被覆して移植し、4週経過後のトリジンブルー染色による組織像。

(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(文献 13 より)

も早い時間で細胞は軟骨欠損部に接着し、10分間静置すると約60%の細胞が接着することが判明した(図7)。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、優れた軟骨修復効果を示した¹⁸⁾。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。

軟骨欠損部へ移植する細胞数と軟骨修復との関係

軟骨細胞と比較し、滑膜幹細胞はより多くの細胞数を用意できる利点がある。軟骨欠損に対して至適な滑膜幹細胞の数はどうであろうか。ウサギの膝に軟骨欠損を作成し、滑膜幹細胞を 1×10^6 細胞と 50×10^6 細胞をゲルに包埋して、骨膜で被覆して移植し、4週後に組織学的に比較すると、 50×10^6 細胞を移植したものではより多くの軟骨基質が軟骨欠損部に観察された(図8)¹³⁾。軟

骨欠損部に移植した滑膜幹細胞は増殖せず、時間経過とともに減少する¹⁹⁾。より多くの細胞を移植する方が、よい修復を得るのに有利と考えられる。

細胞浮遊液に添加するマグネシウムの効果

細胞接着にはインテグリンが関与し、マグネシウムの影響を受けることが知られている。細胞浮遊液にマグネシウムを添加し、軟骨欠損部への接着の効果を検討した。マグネシウムは用量依存性に、ヒト滑膜間葉幹細胞の collagen coated dish およびヒト軟骨欠損部に対する接着性を増加した。滑膜間葉幹細胞は $\alpha 3$ と $\beta 1$ インテグリンを発現し、 $\alpha 3$ および $\beta 1$ インテグリン中和抗体により、マグネシウムの効果は阻害された。*In vivo*

の検討では、家兎の滑膜間葉幹細胞を標識し、浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置すると、5mMマグネシウム添加群は、移植1日後に接着細胞数を増加させ、2週後にはより豊富な軟骨基質を認めた(図9)²⁰⁾。臨床で使用可能な輸液のなかにマグネシウムを含有するものがある。これを用いた細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置することにより、接着する細胞数が増加し、本法による軟骨再生医療の成績を向上させることが期待される。

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、膝関節軟骨欠損に対して自己滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床研究を開始した。まず末梢血を採取し、自己血清を分離して用意する。外来手術で関

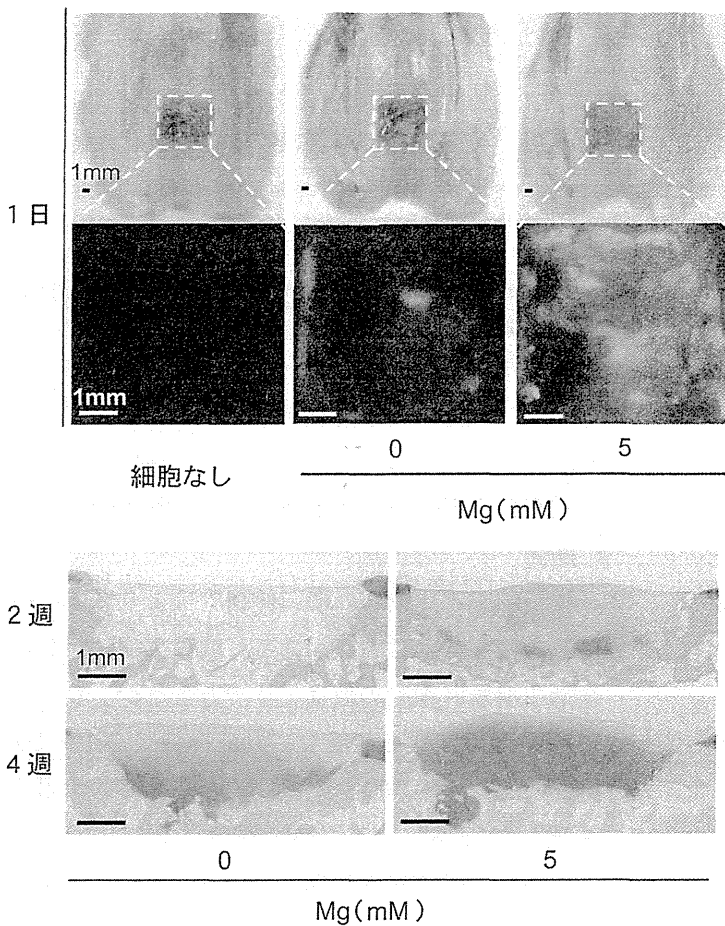


図9 滑膜幹細胞の軟骨欠損部への接着に対するマグネシウムの促進効果

(上)マグネシウムを含む、あるいは含まないPBSにDil標識した滑膜幹細胞を浮遊させ、ウサギ膝の軟骨欠損部に10分間静置後閉創し、1日後に実体顕微鏡で観察。

(下)移植2週、4週後のサフラニン-O染色による組織像。

(巻頭カラーグラフィック9頁参照)

(文献 20 より)