

# 整形・災害外科

Orthopaedic Surgery and Traumatology

9月 Vol. 55  
No. 10  
September 2012

特集

## 関節リウマチに対する 新しい治療戦略

—新分類基準・ガイドラインに基づいて—

論究	Stem 周囲大腿骨骨折の術後評価	岡本尚史ほか	1251
臨床	神経根性疼痛を伴った腰痛に対する外来診察室で行う超音波ガイド下 仙骨硬膜外ブロックの効果	戸田佳孝ほか	1255
	頸部神経根症に対する後方椎間孔拡大術—直視下手術と tubular retractor を 用いた顕微鏡視下手術の比較検討	高橋良正ほか	1261
経験	関節リウマチによる環軸椎亜脱臼に対する Olerud cervical system を 用いた環軸椎後方固定術の手術成績	柏隆史ほか	1267
	大腿骨転子部骨折術後にラグスクリューが伸張して骨頭穿破を生じた1例	稲谷弘幸ほか	1273
	20年来の外傷後肘関節拘縮に対し関節授動術を行った1例	友利裕二ほか	1277

### 特集：関節リウマチに対する新しい治療戦略—新分類基準・ガイドラインに基づいて (企画：田中 栄)

関節リウマチに対する 1987年 ACR 改訂分類基準と 2010年 ACR/EULAR 分類基準	桃原茂樹	1167
関節リウマチの早期診断のために—抗 CCP 抗体などを中心に	沢田哲治	1175
関節リウマチの画像診断—関節エコー, MRI を中心に	持田勇一ほか	1183
関節リウマチの薬物療法 (1)—NSAIDs, ステロイドの位置づけ	西野仁樹	1191
関節リウマチの薬物療法 (2)—DMARDs	西村慶太	1203
関節リウマチの薬物療法 (3)—生物学的製剤	神戸克明	1211
関節リウマチの治療戦略 update	田中良哉	1219
関節リウマチ治療における外科治療	門野夕峰	1229

新しい医療技術 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	鈴木志郎ほか	1243
分子レベルからみた整形外科疾患 四肢背側化における Emx2 の関与	金谷耕平ほか	1164
Personal View 災害は忘れた頃にやってくる?	高木理彰	1163
医療史回り舞台 (243) 電撃性猩紅熱に斃れた平清盛	篠田達明	1242
整形外科用語の散歩道	国分正一	Meridian theory/1182, Myalgia/1239, Myotome/1265
整形外科手術・私のポイント 上腕骨近位部骨折に対する人工骨頭置換術	玉井和哉	1240

## 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

鈴木志郎<sup>\*1)</sup> 関矢一郎<sup>\*2)</sup> 宗田大<sup>\*1)</sup>

**要旨**：滑膜間葉系幹細胞は高い増殖・軟骨分化能を有し、軟骨再生の細胞源として魅力がある。滑膜間葉系幹細胞を集合体にするにより、軟骨分化関連遺伝子の発現が増し、*in vitro*での軟骨分化能が増加する。またウサギの軟骨欠損モデルに対し、滑膜間葉系幹細胞集合体は表面張力で容易に接着させることが可能で、軟骨再生を促進させる。多数の集合体にして使用する方法は、滑膜間葉系幹細胞を使用する軟骨再生に有用と考えられる。

### はじめに

軟骨欠損は進行すると、変形性関節症へと移行しADLの障害となる<sup>1)</sup>。軟骨は細胞密度が低く血管がないため、再生能力が低い組織である。軟骨の修復には、細胞や組織を補うことが戦略の一つとなる。現在臨床応用されている骨髄刺激法<sup>2)</sup>では硝子軟骨の再生には至らないこと、骨軟骨柱移植<sup>3)</sup>や自家培養軟骨細胞移植<sup>4)</sup>では手術侵襲が大きいことなどの課題が残っている。間葉系幹細胞は高い増殖能と多分化能により再生医療の細胞源となり得る<sup>5)</sup>。

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、筋肉、滑膜といった間葉系組織から得ることができるが、特に滑膜

由来の間葉系幹細胞は増殖能と軟骨分化能が特に優れていることから軟骨再生医療の細胞源に適している<sup>6)</sup>。細胞の移植方法として、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%の滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に接着させることができる(図1)<sup>7)</sup>。この方法によりscaffoldを使わず関節鏡視下で細胞移植が可能となるが、細胞移植操作時に移植細胞が肉眼的に観察できず、またすべての細胞を接着させることができないことが課題である。臨床応用を考えると、準備す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。

これらの課題を解決するために、間葉系幹細胞を三次元培養し集合体とすることが有用と考えた。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考えられる。しかし、滑膜間葉系幹細胞を集合体としたときの特性や軟骨欠損部移植時の動態は明らかとなっていない。そこで滑膜間葉系幹細胞集合体の形態および遺伝子プロファイル等の特性、*in vitro*, *in vivo*の軟骨分化能を検討した。

\*1) Shiro SUZUKI et al, 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

\*2) Ichiro SEKIYA, 同上, 軟骨再生学

Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration

**Key words** : Mesenchymal stem cell, Cartilage regeneration, Aggregate

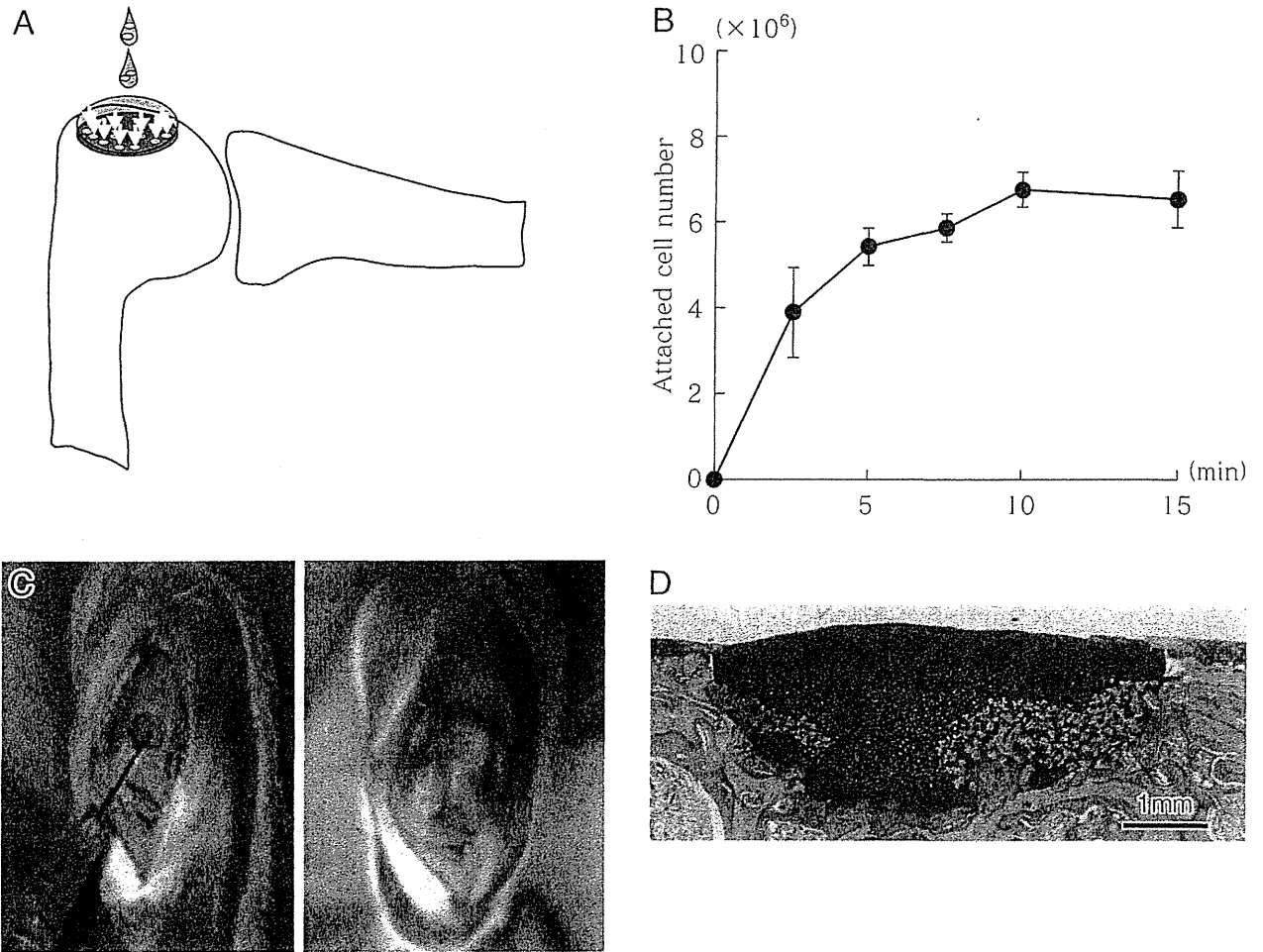


図 1

- A 滑膜間葉系幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置する方法の略図。
- B 細胞浮遊液の静置時間と軟骨欠損部に接着した細胞数との関係。10分後に約60%の滑膜間葉系幹細胞が軟骨欠損部に接着する。
- C 日本白色家兎の骨軟骨欠損部に滑膜間葉系幹細胞浮遊液を静置する際の手術写真。
- D 移植4週後の組織像 (Toluidine Blue 染色)。骨軟骨欠損部が軟骨基質で充填されている。

### I. 滑膜間葉系幹細胞集合体の特性

ヒトの滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。2.5  $\times 10^5$  の滑膜間葉系幹細胞を 35  $\mu$ l の培養液に懸濁し、hanging drop 法<sup>8)</sup>で、3日間培養し、集合体を形成させると、大きさが約1mmとなり、容易には壊れず扱うことが可能であった(図2A・B)。

Microarrayにより、遺伝子プロファイルを解析すると、単層培養時と比較して、集合体では、被検者によらずほぼ同様に発現プロファイルが変化していた。621遺伝子が5倍以上発現上昇し、最も発現が上昇していた遺伝子はBMP2であった(図2C)。集合体では、BMP2, SOX5, 6, 9な

どの軟骨分化関連遺伝子や、TSG6, STC1などの抗炎症遺伝子の発現が上昇していた(図2D)。

### II. 滑膜間葉系幹細胞集合体の軟骨分化

*In vitro*で軟骨分化培地で培養した集合体は、従来の単層培養した細胞と比べて、湿重量が重く、SOX9, COL2A1を強く発現していた(図2E~G)。

*In vivo*の検討のため、日本白色家兎の膝蓋大腿関節の大腿骨側に5 $\times$ 5 $\times$ 1.5mm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、5, 10, 20, 40, 80個移植した。細胞を移植しない群を対照とした。集合体を表面張力により容易に

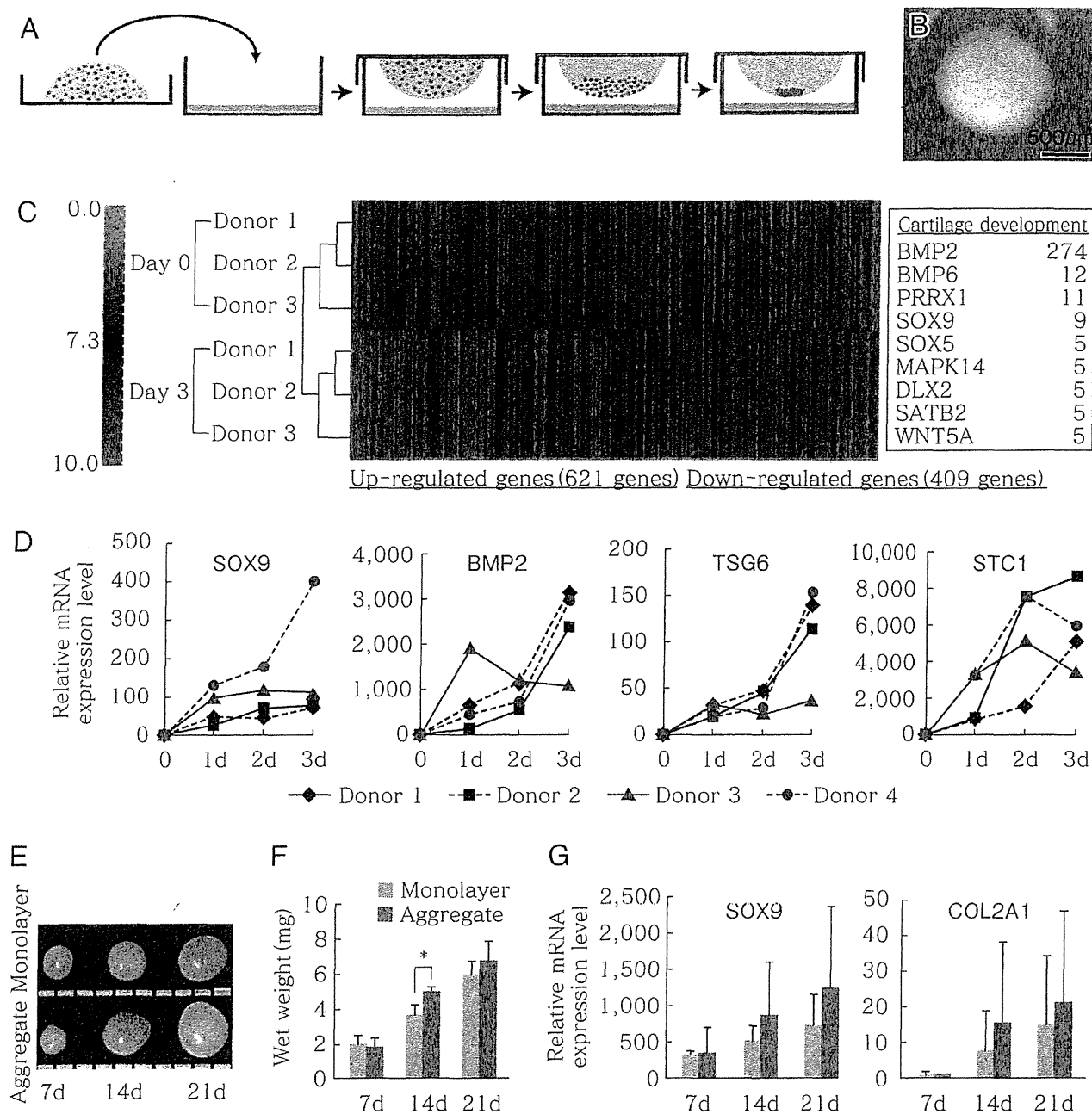


図 2

- A Hanging drop 法による滑膜間葉系幹細胞集合体の作成方法。  
 B Hanging drop 法で、3日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体の肉眼所見。  
 C 遺伝子プロファイルのクラスター解析。3人の独立した被検者から採取した細胞の集合体形成前後で解析した。軟骨分化関連遺伝子の発現変化も示す。  
 D 定量 PCR による各種遺伝子の hanging drop 中の経時的発現変化。  
 E・F・G *In vitro* での軟骨分能の比較。従来の単層培養した細胞と、集合体にした細胞とで、湿重量、SOX9・COL2A1 発現量を比較した。

軟骨欠損部に接着させることが可能であった。移植翌日には細胞集合体は軟骨欠損部に接着し、軟骨欠損部以外には観察されなかった (図 3 A)。比

較的低密度な 10 個の集合体を移植した群で、移植 4 週、12 週後に最も良好な軟骨の再生が得られた (図 3 B・C)。GFP 陽性細胞の集合体を 10 個移

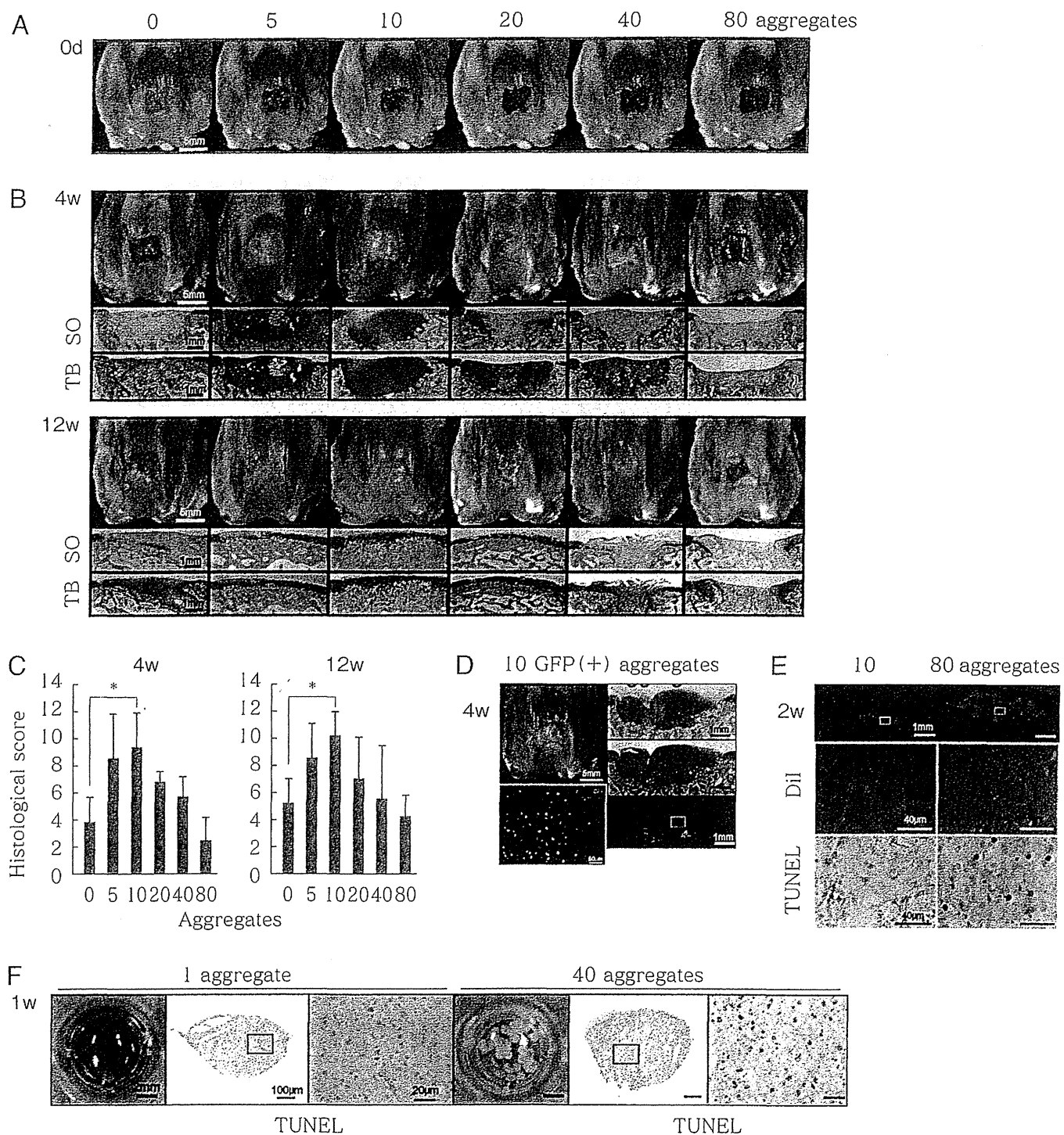


図 3

- A 日本白色家兎の軟骨欠損部に集合体を移植させた直後の肉眼所見。集合体は DiI で染色した。
- B 移植 4 週, 12 週後の肉眼所見, 組織所見。(SO : Safranin-O 染色, TB : Toluidine Blue 染色)
- C 移植 4 週, 12 週後の組織スコア。
- D GFP 陽性細胞の集合体を 10 個移植し, 4 週後の肉眼, 組織所見。再生軟骨には GFP 陽性細胞を認めた。
- E DiI で染色した集合体 10 個または 80 個を移植し 2 週後の組織所見。10 個の集合体移植時と比べて, 80 個の集合体移植時に, 多くの TUNEL 陽性細胞を認めた。
- F *In vitro* での集合体の細胞生存に関する検討。96 well plate で, 1 個ないし 40 個の集合体を 1 週間培養すると, 40 個の集合体を培養した well では培養液の色が赤から黄色になり, TUNEL 陽性細胞を多く認めた。

植し、4週後に再生した軟骨には、GFP陽性細胞を認めた。再生した軟骨はGFP陽性細胞とともにGFP陰性の細胞も認めた(図3D)。

より多くの集合体を移植したときに、成績が不良な原因を検討するため、TUNEL染色による生存率の検討を行った。移植2週後に、10個の集合体移植時と比べて、80個の集合体移植時に、多くのTUNEL陽性細胞を認めた(図3E)。低栄養環境が原因の一つと考え、*in vitro*での集合体の生存率の検討も行った。96 well plateで、1個と40個の集合体をそれぞれ1週間培養すると、40個の集合体を培養したwellで培養液が赤から黄色に変化し酸性となり、またTUNEL陽性細胞を多く認めた(図3F)。

### Ⅲ. 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。滑膜間葉系幹細胞を集合体とすることで、劇的に遺伝子プロファイルは変化した。これは、おそらく細胞間接着様式の変化、低酸素、低栄養といった環境の変化によるものと推察される。

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たが、最も成績が不良であったのは、最も多くの集合体を移植した群であった。われわれは以前の研究では、collagen gelに包埋した滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植したときには、より多くの細胞を移植した群で、より良好な成績が得られていた<sup>9)</sup>ことから、今回の結果は予想に反するものであった。

なぜ一定数以上の集合体を移植したときに、成績が不良となるのだろうか。第一に、過剰に集合体を移植したときには、細胞を維持するのに必要な栄養素が枯渇すると考えられる。*In vitro*での集合体の生存率の検討で、40個の集合体を1週間培養したwellでは、培養液の色が黄色に変色しており、集合体の数が過剰なときは、pHが大きく変化した。第二に、過剰に集合体を移植したと

ときには、細胞死を起こす細胞が増加していることが挙げられる。第三に、過剰に集合体を移植することで、hostの軟骨前駆細胞が、骨髄や関節液から軟骨欠損部へ遊走することが阻害されたと考えられる。GFP陽性の滑膜間葉系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陽性細胞と陰性細胞が混在した。骨髄や関節液中には、間葉系幹細胞が存在することから、再生した軟骨は、移植した細胞が直接軟骨に分化しただけではなく、hostの細胞が関与する。

本研究では比較的低密度で移植したときに良好な結果が得られたが、臨床応用を考えると望ましい結果であった。われわれは既に、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。当初の12症例で、passage 0の細胞を平均5,000万個回収し、平均280 mm<sup>2</sup>の軟骨欠損部へ移植している。今回の日本白色家兎の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、10個の集合体(250万細胞)を25 mm<sup>2</sup>の欠損部へ移植した際に最も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。

過去の骨髄間葉系幹細胞の報告と同様に、滑膜間葉系幹細胞においても、集合体とすると抗炎症遺伝子であるTSG6の発現が上昇した。TSG6の過剰発現や、TSG6蛋白の関節内投与は、関節炎を抑制することが報告されている<sup>10)11)</sup>。今回のウサギモデルで、関節炎は対照群でも強くなく、滑膜間葉系幹細胞集合体の抗炎症効果は明らかでなかった。今後他のmodelで、滑膜間葉系幹細胞集合体の抗炎症効果の検討を行うことは大変興味深いと考えている。

### 結 論

滑膜間葉系幹細胞を集合体にするにより、移植操作が容易となり、効率的に軟骨欠損部に接着させることが可能となった。また軟骨分化能が増加した。多数の集合体にする方法は滑膜間葉系幹細胞を使用する軟骨再生に有用と考えられる<sup>12)</sup>。

文 献

- 1) Shelbourne KD et al : Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee ; a natural history study. *J Bone Joint Surg* **85-A (Suppl 2)** : 8—16, 2003
- 2) Steadman JR et al : Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee ; average 11-year follow-up. *Arthroscopy* **19** : 477—484, 2003
- 3) Hangody L et al : Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* **391 (Suppl)** : S328—336, 2001
- 4) Brittberg M et al : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331** : 889—895, 1994
- 5) Wakitani S et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* **76-A** : 579—592, 1994
- 6) Sakaguchi Y 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
- 7) Koga H et al : Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* **10** : R84, 2008
- 8) Potapova IA et al : Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* **25** : 1761—1768, 2007
- 9) Koga H 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
- 10) Mindrescu C et al : Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in DBA/1 J mice expressing the TSG-6 transgene. *Arthritis Rheum* **46** : 2453—2464, 2002
- 11) Mindrescu C et al : Amelioration of collagen-induced arthritis in DBA/1 J mice by recombinant TSG-6, a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible protein. *Arthritis Rheum* **43** : 2668—2677, 2000
- 12) Suzuki S et al : Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther* **14** : R136, 2012

---

\*

\*

\*

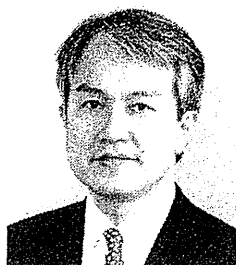
\*

\*

### 3 関節と体性幹細胞： 滑膜間葉系幹細胞 による軟骨再生

■ 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  
2) 東京医科歯科大学大学院 運動器外科学



関矢 一郎  
1990年 東京医科歯科大学医学部卒業  
6年間整形外科の研修  
2000年 東京医科歯科大学大学院卒業  
2000年 Tulane University ポスドク  
2002年 東京医科歯科大学  
運動器外科学 助手  
2006年 軟骨再生学助教授  
2011年 軟骨再生学教授  
研究テーマ：間葉系幹細胞の臨床応用、  
関節軟骨・半月板の再生医療

Key words：間葉系幹細胞，滑膜，軟骨，関節，再生医療

#### Abstract

骨髄液，滑膜，骨膜，皮下脂肪，骨格筋から同一条件で間葉系幹細胞を採取し比較すると，滑膜由来のものが軟骨分化能が高く，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。滑膜間葉系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，軟骨修復を促進させることが実験的に示されている。基礎研究の成果を基にして，滑膜間葉系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。

#### 1. 間葉系幹細胞による軟骨再生

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。細胞源として間葉系幹細胞は，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。間葉系幹細胞の定義はいまだ明確ではないが，本論文では間葉系組織由来で，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<sup>1)</sup>。間葉系幹

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系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，すべての間葉系組織に間葉系幹細胞が存在するといってもよいかもしれない。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. 関節液中の間葉系幹細胞

関節液中の細胞成分を培養すると，ある割合の細胞がコロニーを形成する。このコロニー細胞は多分化能を有し間葉系幹細胞である。正常膝関節液中の間葉系幹細胞はわずかにしか存在しないが，前十字靭帯損傷<sup>2)</sup>や変形性関節症<sup>3)</sup>の膝の関節液中には100倍以上多くの間葉系幹細胞が存在する(図1)。

関節液中間葉系幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると，滑膜由来間葉系幹細胞の遺伝子発現に類似することが示される<sup>4)</sup>。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，滑膜間葉系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<sup>5)</sup>。滑膜は関節内の間葉系幹細胞の貯蔵庫であり，関節内組織

Joint and somatic stem cells : cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells : Ichiro Sekiya<sup>1)</sup>, Takeshi Muneta<sup>2)</sup>,

1) Tokyo Medical and Dental University, Department of Cartilage Regeneration 2) Department of Joint Surgery and Sports Medicine



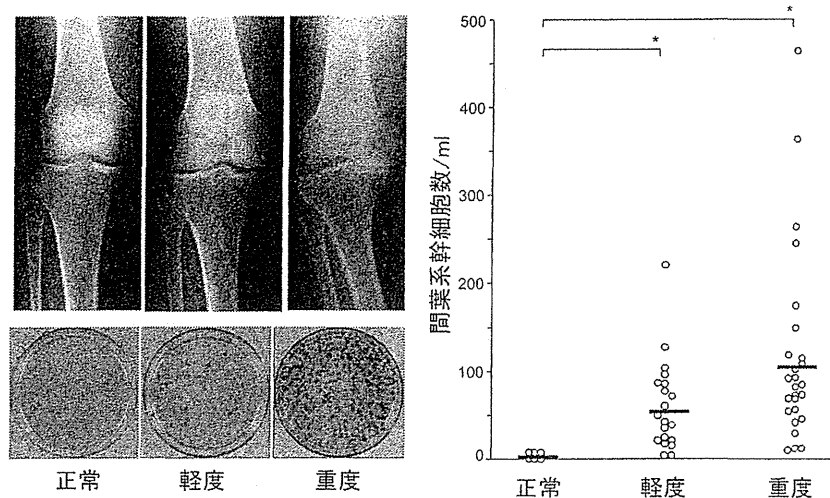


図1  
 (左上) 変形性膝関節症の重症度によるレントゲン像。  
 (左下) 膝の関節液中の細胞成分を14日間培養後にクリスタル・バイオレットで染色したデッシュ像。  
 (右) 変形性膝関節症の重症度ごとに、関節液中の間葉系幹細胞数をドナーごとにプロットしたもの。

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予測される。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ることは、自然治癒力を増強するものと考えられる。

### 3. 間葉系幹細胞の調整

間葉系幹細胞の採取に関して、骨髓液であれば直接あるいは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、デッシュに播種し、培養すると、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デッシュあたりに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。間葉系幹細胞の形態、表面抗原、増殖能、分化能等の特性は、播種密度、培養期間、継代数等の影響を受けるので<sup>9)</sup>、細胞源が異なる間葉系幹細胞の特性を比較する際には、同じ条件で培養する必要がある。私たちは最も大きい細胞コロニーを形成し、かつ1デッシュあ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<sup>7)</sup>。

### 4. 間葉系幹細胞の軟骨分化能の比較

間葉系幹細胞を遠心後、細胞塊として培養するペレット培養の手法を用いての *In vitro* 軟骨分化は Johnstone らにより初めて報告された<sup>8)</sup>。これは骨髓間葉系幹細胞を、DMEMにTGF $\beta$ とデキサメタゾンを追加した培地を使用して培養したものである。私たちはこの分化培地にBMPを追加することにより、従来の方法よりも重量が10倍大きく、軟骨基質の染色性に優れた軟骨塊が形成可能となることを示した<sup>9)</sup>。この *In vitro* 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>10)</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。

ヒトの同ドナーから骨髓液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉系幹細胞を分離・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)<sup>11)</sup>。同様のことは、ラットやウサギでも示される。このことは滑膜や骨髓由来間葉系幹細胞の軟骨分化能が高いことを示すものである。このような比較で、滑膜や骨髓由来のものが大き

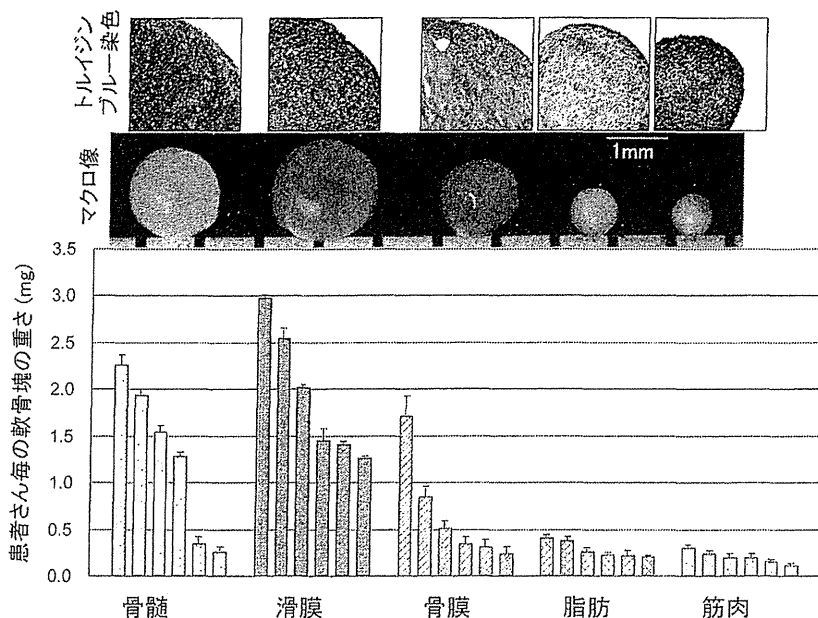


図2 *In vitro* 軟骨分化能の比較。チューブ内で軟骨分化培地に浮遊させた25万個の5種類の間葉系幹細胞を10分間遠心し細胞塊とした後に、21日間培養したもの。軟骨塊の組織像、マクロ像、及びドナー毎の軟骨塊重量を示す。

い軟骨塊を形成するのは、軟骨分化条件がこれらに適している可能性はあるが、脂肪や筋肉由来の間葉系幹細胞に適した軟骨分化条件を用いてこれらの細胞が、滑膜や骨髄由来のものよりも軟骨分化能が高いことを示す報告はこれまでない。

*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種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で調整した後に、同数の未分化間葉系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系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<sup>12)</sup>。骨髄と滑膜の軟骨分化能は高いが、軟骨は滑膜及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系幹細胞の軟骨分化能が高いと考えられる。

## 5. 自己血清による間葉系幹細胞の増殖

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系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なう方から血液を約100ml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200mgと脛骨から骨髄液を約2ml採取した。10%自己血清を用いて14日間培養すると、滑膜間葉系幹細胞は9人の方、すべてから100万細胞以上採取できた。一方、骨髄間葉系幹細胞を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3)。ヒト血清にはPDGFのABアイソフォームが豊富に存在し、これはPDGF $\alpha$ レセプターに結合することが報告されているが、滑膜間葉系幹細胞はPDGF $\alpha$ レセプターが骨髄間葉系幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが両者の差の一部を説明するものと考えられる<sup>13)</sup>。間葉系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とも考えられるが、培養器や自己血清量に限界があることから、5000万から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

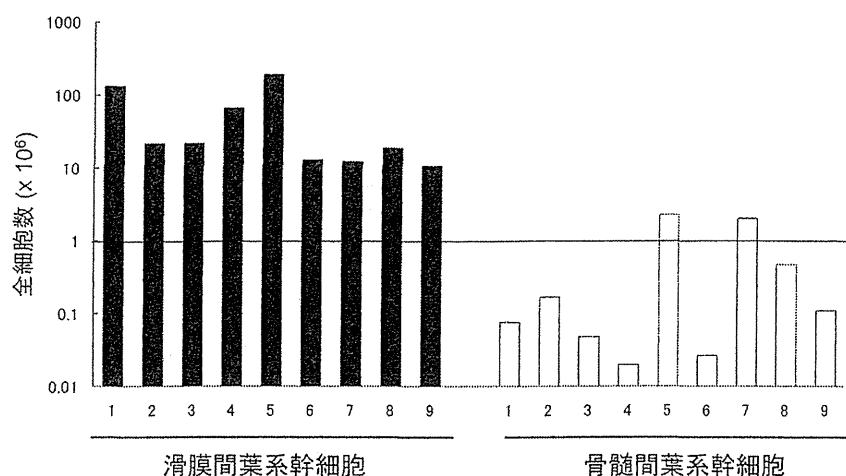


図3 自己血清で14日間培養して得られたヒト滑膜及び骨髄由来の間葉系幹細胞数。滑膜組織約0.2gと骨髄液約2mlから得られた有核細胞を10%自己血清を用いて同一条件で培養した。9人のドナー由来の結果を示す。

する観点から、滑膜間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞よりも有利である。

### 6. 軟骨欠損部への滑膜間葉系幹細胞の移植

軟骨欠損部への滑膜間葉系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。ウサギの膝に軟骨欠損を作成し、滑膜間葉系幹細胞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すると、10分間静置後すでに平衡状態となり、60%以上の細胞が接着する。人工膝関節置換術後に得られるヒトの軟骨組織とヒト滑膜幹細胞を用いても同様の結果が得られる<sup>14)</sup>。

ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作成し、滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置し、特に固定や荷重制限をせずに、経時的に関節鏡で評価した。欠損を作成しただけのコントロールでは、時間経過とともに軟骨欠損が拡大した。滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置したものは、1ヶ月時に軟骨欠損部が滑膜様の組織で覆われ、2ヶ月時に軟骨組織で被覆され、3ヶ月時には軟骨組織が厚くなるような修復過程を示した<sup>15)</sup>(図4)。

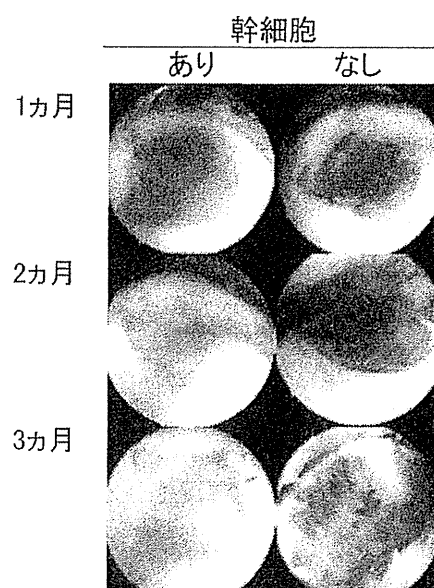


図4 ミニブタの両膝の大腿骨内顆荷重部に軟骨欠損を作成後、片側のみ滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を10分間静置した。1ヶ月ごとに、関節鏡で軟骨欠損部を観察した。

### 7. 滑膜幹細胞の鏡視下移植術の実際

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。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%

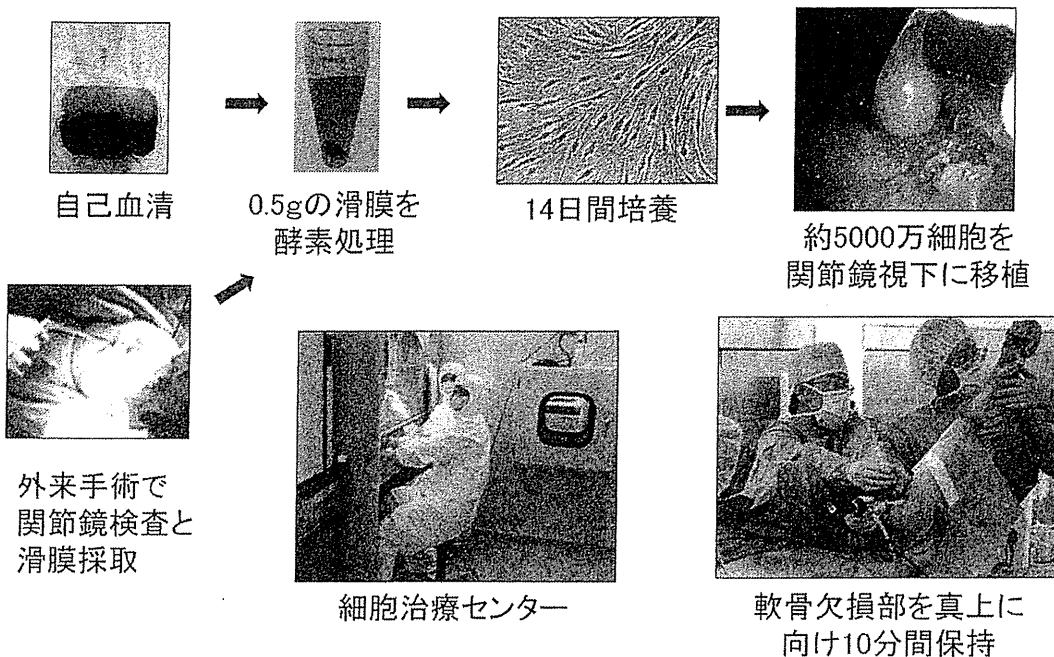


図5 滑膜幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療のスキーム。外来手術で関節鏡検査の際に滑膜を0.5g採取し、細胞治療センターで酵素処理後、自己血清を用いて14日間培養し、約5000万の滑膜幹細胞の浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に10分間静置し接着させる。

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5000万細胞を採取できる。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5)。後療法は、外固定をせず、2週間後から部分荷重、6週間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。多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている。

### おわりに

滑膜由来の間葉系幹細胞は増殖・軟骨分化能が高く、軟骨再生の細胞源として有用である。また細胞浮遊液を10分間軟骨欠損部に静置することにより、関節鏡視下での治療が可能となる。より軟骨分化能が高い細胞の調整や、より確実な細胞移植手技の開発が今後の課題である。

### 文献

- 1) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.*: *Cytherapy*. 2006 ; 8 (4) : 315-7.
- 2) Morito T, Muneta T, Hara K, *et al.*: *Rheumatology (Oxford)* . 2008 Aug;47 (8) : 1137-43.
- 3) Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, *et al.*: *J Orthop Res*. 2012 Jun;30(6) : 943-9.
- 4) Segawa Y, Muneta T, Makino H, *et al.*: *J Orthop Res*. 2009 Apr;27 (4) : 435-41.
- 5) 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.
- 6) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, *et al.*: *Stem Cells*. 2002;20 (6) : 530-41.
- 7) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, *et al.*: *Arthritis Rheum.*, 52: 2521-9, 2005.
- 8) Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, *et al.*: *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10;238 (1) : 265-72.
- 9) Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, *et al.*: *J Cell Biochem*. 2006 Jan 1;97 (1) : 84-97.
- 10) 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.
- 11) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, *et al.*: *Arthritis Rheum.*, 52: 2521-9, 2005.
- 12) 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
- 13) Nimura A, Muneta T, Koga H, *et al.*: *Arthritis Rheum*. 2008 Jan 31;58 (2) : 501-510
- 14) Koga H, Shimaya M, Muneta T, *et al.*: *Arthritis Res Ther*. 2008;10 (4) : R84.
- 15) Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, *et al.*: *Cytherapy*. 2012 Mar;14 (3) : 327-38.

# 日本医師会雑誌

THE JOURNAL OF THE JAPAN MEDICAL ASSOCIATION

11

第141巻・第8号

2012

平成24年

## 特集 成人の関節痛の臨床

【座談会】さまざまな関節痛を診断し、治療する  
—予防の視点でロコモティブシンドロームも含めて

成人の変形性関節症の頻度

関節疾患の諸症状とその診察法

リウマチ専門医からみた関節痛を有する病変の病態と診断

肩関節痛の原因およびその診断・予防法・治療法

股関節痛の鑑別診断・予防と保存療法

股関節疾患を専門医に紹介するタイミング、手術法・長期成績

膝関節痛の診断および変形性膝関節症の保存療法

成人膝関節慢性疾患の手術法・長期成績と専門医に紹介するタイミング

手指・足趾の関節痛の原因・診断・治療

関節の外傷(捻挫・脱臼)の診断・治療 ほか

◆各科臨床のトピックス アレルゲン特異的免疫療法の現状と将来展望—舌下免疫療法を中心として

◆新薬紹介 リバーロキサバン

◆画像診断セーフティマネジメント 卵巣子宮内膜症—卵巣がんと紛らわしい症例

◆外来での小外科 適応外とする症例



日本医師会

<http://www.med.or.jp/>

## 軟骨治療の進歩—滑膜幹細胞による軟骨再生

関矢一郎\* 宗田 大\*\*

膝の関節液から細胞成分を取り出し培養すると、コロニー形成細胞が認められる。この細胞は軟骨・骨・脂肪に分化する能力がある。関節液中にはコロニーを形成し、多分化能を有する間葉系幹細胞が存在する。正常膝関節液中の間葉系幹細胞はわずかしか存在しないが、関節内靭帯損傷や変形性関節症の膝の関節液中にはその100倍以上多くの間葉系幹細胞が存在する<sup>1)</sup>。

関節液中に存在する間葉系幹細胞は、関節を裏打ちする膜である滑膜の間葉系幹細胞に遺伝子プロファイルが類似する。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、滑膜間葉系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<sup>2)</sup>。滑膜は間葉系幹細胞の保存庫であり、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ことが予測される。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ることによって、自然治癒力が増強する可能性がある。

間葉系幹細胞の軟骨分化能を比較すると、滑膜や骨髓液由来のものは、皮下脂肪や骨格筋由来のものよりも軟骨分化能が高い<sup>3)</sup>。自己血清による培養で、滑膜間葉系幹細胞は骨髓液由来のものよりも初代細胞をより多く確保できる利点がある<sup>4)</sup>。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、6割の細胞が接着する<sup>5)</sup>。

これらの基礎研究を基に、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

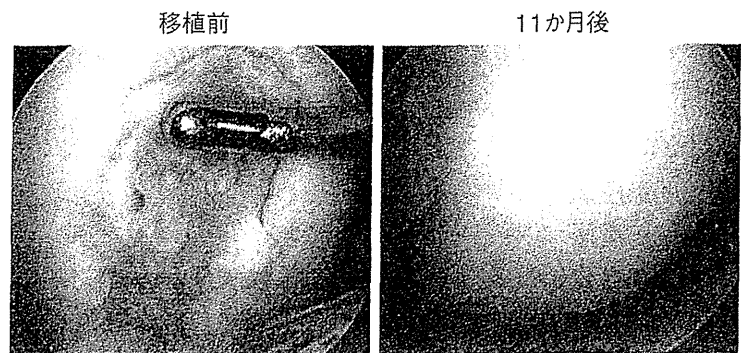


図1 軟骨欠損に対する滑膜間葉系幹細胞移植11か月後の関節鏡視像

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。

細胞浮遊液を10分間静置して移植する。これまで20例以上に行い、多くの例で自覚症状が改善し、関節鏡やMRI検査で軟骨欠損部の修復を確認している(図1)。

### 文 献

- 1) 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* 2012 ; 30 : 943-949.
- 2) 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* 2009 ; 27 : 878-887.
- 3) 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* 2005 ; 52 : 2521-2529.
- 4) 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* 2008 ; 58 : 501-510.
- 5) 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 stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytotherapy* 2012 ; 14 : 327-338.

Progress of cartilage treatment : Cartilage regeneration by synovial stem cells. \*Ichiro Sekiya : Department of Cartilage Regeneration, Tokyo Medical and Dental University, \*\*Takeshi Muneta : Department of Joint Surgery and Sports Medicine, Tokyo Medical and Dental University. \*東京医科歯科大学大学院教授(軟骨再生学), \*\*教授(運動器外科学)

ORTHOPEDIC SURGERY

整形外科

臨床雑誌

Vol. 63 No.3 2012-3

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
	陳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胫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 摩耗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…294
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<sup>1</sup>。

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<sup>2</sup>。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<sup>3</sup>。滑膜は間葉幹細胞のリザーバであり、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、滑膜や骨髄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<sup>4</sup>。自己血清による培養で、滑膜間葉幹細胞は骨髄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<sup>6</sup>。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<sup>7</sup>。

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) Iloric 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）

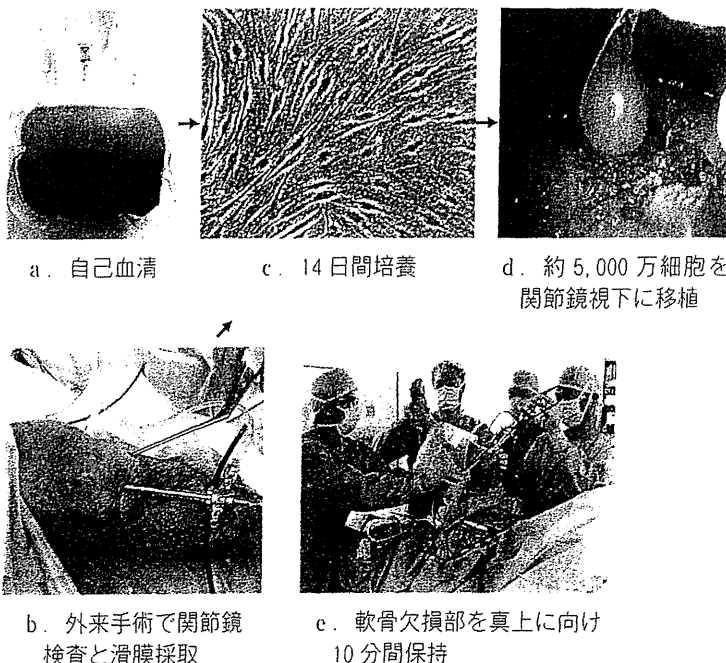


図1. 滑膜間葉幹細胞による軟骨再生医療のスキーム。はじめに自己血清を準備する。外来手術で関節鏡検査と滑膜採取を行う。約0.5gの滑膜を酵素処理後、14日間自己血清を使用して細胞治療センターで培養する。細胞浮遊液を関節鏡視下で軟骨欠損部に静置し、10分間肢位を保持する



再生医療叢書

6

# 骨格系

日本再生医療学会

[監修]

脇谷滋之

鄭 雄一

[編集]

朝倉書店

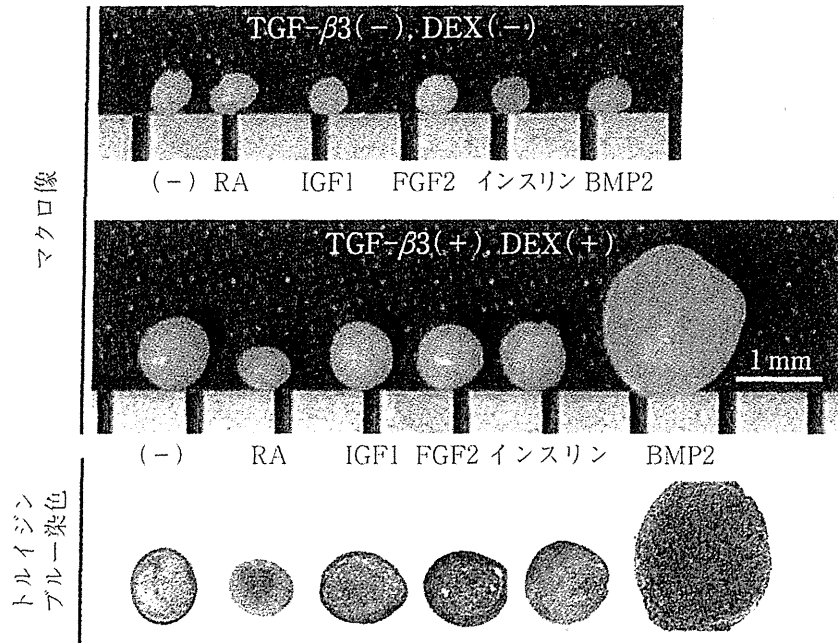
再生医療叢書

6

# 骨格系

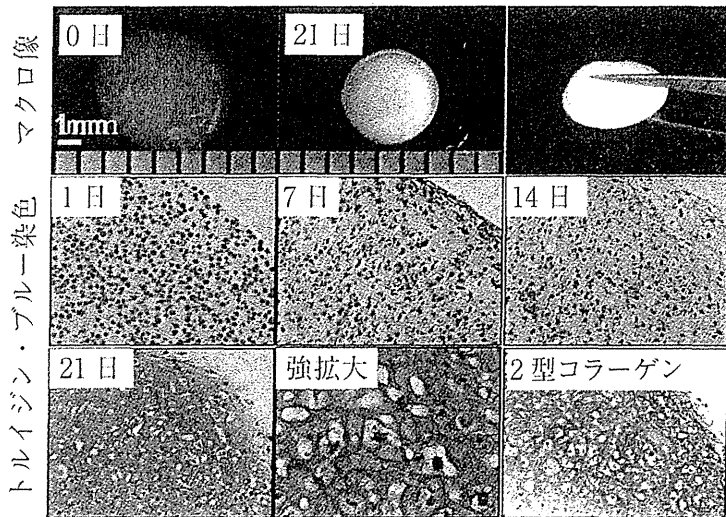
日本再生医療学会  
脇谷滋之・鄭 雄一  
…… [監修]  
…… [編集]





口絵1 ヒト滑膜間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの効果 (図4.2)

25万個の細胞を遠心し細胞塊としたのちに、3種までの組合せで薬剤、サイトカインを培養液中に添加し3週間培養した。TGF-β3、デキサメタゾン、BMP2の組合せを用いたものが最も大きい軟骨塊を形成した。



口絵2 ヒト滑膜間葉系幹細胞とコラーゲンゲルの複合体を *in vitro* で軟骨分化させたもの (図4.5)

培養期間とともに細胞外基質の染色性が増し、21日後には2型コラーゲン陽性となり、軟骨様の硬さとなった。

### 4.2.2 間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化

間葉系幹細胞を遠心後、細胞塊として培養するペレット培養の手法を用いての *in vitro* 軟骨分化は Johnstone らによりはじめて報告された。これは骨髄間葉系幹細胞を、DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) に TGF ( $\beta$  transforming growth factor)- $\beta$  とデキサメタゾン (DEX) を添加した培地を使用して培養したものである。筆者らはこの分化培地に BMP (bone morphogenetic protein) を添加することにより、従来の方法よりも重量が10倍大きく、軟骨基質の染色性に優れた軟骨塊が形成可能となることを示した。滑膜間葉系幹細胞に対しても *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの組合せを検討して、同等の結果が得られた (図4.2)。この *in vitro* 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。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。

ヒトの同一ドナーから骨髄液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉系幹細胞を分離・増殖させ、同数の細胞を21日間ペレット培養すると、滑膜や骨髄由来のものが大きい軟骨塊を形成する (図4.3)。同様のことは、ラットやウサギでも示される。このことは滑膜や骨髄由来間葉幹細胞の軟骨分化能が高いことを

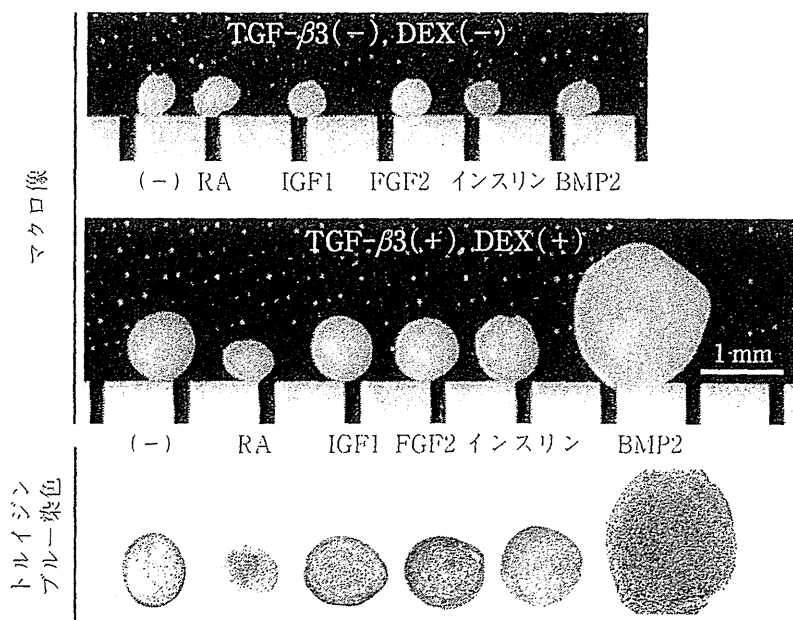


図4.2 ヒト滑膜間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化における薬剤、サイトカインの効果 (1.1絵1参照)

25万個の細胞を遠心し細胞塊としたのちに、3種までの組合せで薬剤、サイトカインを培養液中に添加し3週間培養した。TGF- $\beta$ 3、DEX、BMP2の組合せを用いたものが最も大きい軟骨塊を形成した。TGF- $\beta$ 3 (transforming growth factor- $\beta$ 3), DEX (dexamethasone), RA (retinoic acid), IGF1 (insulin like growth factor-1), FGF2 (fibroblast growth factor-2), BMP2 (bone morphogenetic protein-2).

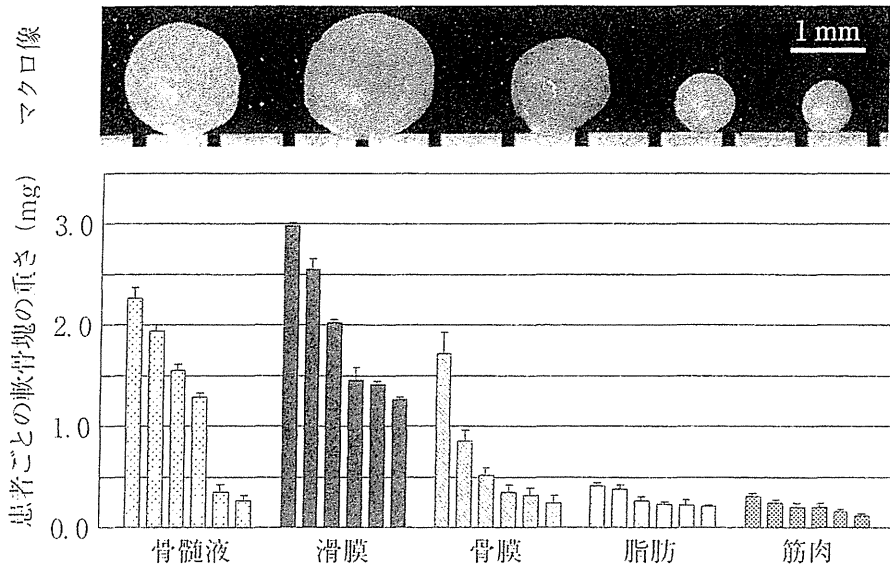


図 4.3 ヒト各種間葉系幹細胞の *in vitro* 軟骨分化能の比較

同一ドナーから各種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で増殖させたのちに、同数の細胞を、同一条件で *in vitro* で軟骨分化させたもの。滑膜由来のものが最も大きく重い軟骨塊を形成する。

示すものである。このような比較で、滑膜や骨髄由来のものが大きい軟骨塊を形成するのは、軟骨分化条件がこれらに適している可能性はあるが、脂肪や筋肉由来の間葉系幹細胞に適した軟骨分化条件を用いて、これらの細胞が滑膜や骨髄由来のものよりも軟骨分化能が高いことを示す報告はこれまでみられない。

各種間葉系幹細胞を *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。骨髄および滑膜由来間葉系幹細胞と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いが、1日後に最も明らかな差異を認める。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る。骨髄間葉系幹細胞は細胞間裂隙を伴わない円形の細胞、滑膜間葉系幹細胞では中等度の細胞間裂隙と紡錘形の細胞、軟骨細胞は豊富な細胞間裂隙とともに多角形の細胞で構成される (図 4.4)。

ペレット培養を用いて *in vitro* で軟骨分化させる場合、最大でも直径 3 mm 程度の軟骨塊しか形成されない。しかし滑膜間葉系幹細胞をスキャフォールドと組み合わせることにより、もっと大きな軟骨組織を *in vitro* で作成することが可能となる (図 4.5)。この場合、安全性の観点から使用が容易でない TGF- $\beta$  の使用と、大量に BMP を要することが臨床応用では問題となりうる。