

図 4.4 骨髄間葉系幹細胞、滑膜間葉系幹細胞、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 日後の細胞をエポン包埋し、トルイジン・ブルー染色したもの。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る。

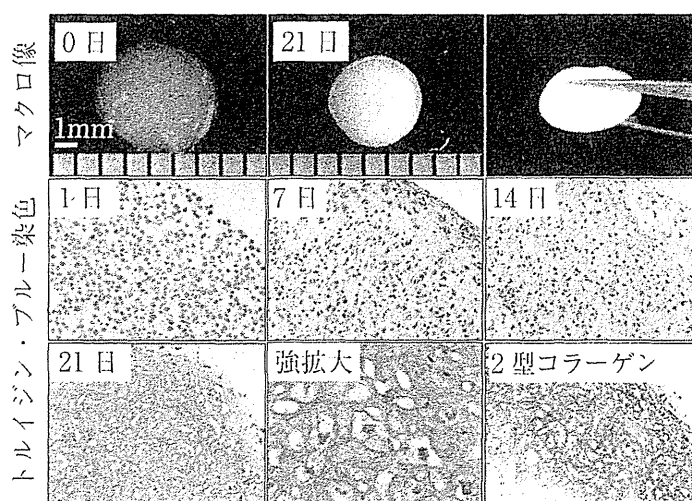


図 4.5 ヒト滑膜間葉系幹細胞とコラーゲンゲルの複合体を *in vitro* で軟骨分化させたもの (口絵 2 参照)

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。

4.2.3 各種間葉系幹細胞の *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種間葉系組織を採取し、間葉系幹細胞を同条件で調製したのちに、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* の結果を反映する (図 4.6)。

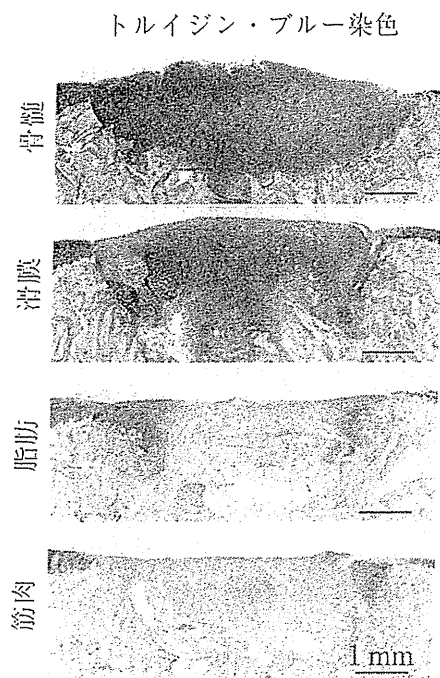


図 4.6 ウサギ各種間葉系幹細胞の *in vivo* 軟骨分化能の比較

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用意したのちに、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。骨髄由来と滑膜由来のものが軟骨基質を豊富に産生する。

4.2.4 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の被施術者9人から血液を約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、滑膜間葉系幹細胞は9人すべてから1000万細胞以上採取できた。一方、骨髓間葉系幹細胞を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4.7)。ヒト血清にはPDGF (platelet-derived growth factor, 血小板由来増殖因子)のABアイソフォームが豊富に存在し、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系幹細胞はPDGF α レセプターが骨髓間葉系幹細胞よりも高い割合で発現しており、このことが両者の違いを説明するものと考えられる。間葉系幹細胞を使用する再生医療を実施するに当たり、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、5000万から1億細胞を目標にするのが現実的と筆者らは考えている。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、滑膜間葉系幹細胞は骨髓間葉系幹細胞よりも

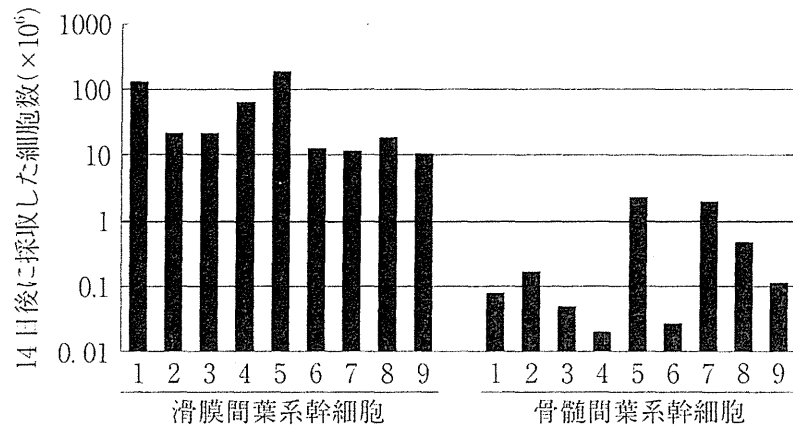


図 4.7 ヒト滑膜および骨髄由来間葉系幹細胞の自己血清による培養
滑膜組織約 0.2 g と骨髄液約 2 ml から得られた有核細胞を、10%自己血清を用いて 14 日間培養して得られた細胞数 (9 人の結果)。滑膜由来のものは 9 人全員から 1000 万個以上採取できた。

有利である。

4.2.5 滑膜における間葉系幹細胞の局在

生体内で幹細胞の未分化性を維持し、さらにその動態を制御している微少環境 (幹細胞ニッチ) については、いまだ不明な点が多い。間葉系幹細胞、特に滑膜間葉系幹細胞を特異的に識別するマーカーが存在しないことから、その局在を明らかにすることは現時点で困難であるが、筆者らは滑膜中の血管周囲に間葉系幹細胞が多く存在するのではないかと仮説を立て、その検証を行った。

人工膝関節置換術時に滑膜を採取し、細胞採取用と組織解析用の二つに分けた。細胞採取用のものはコラゲナーゼ処理後、有核細胞を 60 cm² のディッシュ当たり 1 万個播種し、14 日間培養後にコロニー形成数を求めた。組織解析用の滑膜は、 α -SMA (smooth muscle actin) 陽性の血管数と、CD31 陽性の内皮細胞の単位面積当たりの数を求めた。有核細胞当たりの間葉系幹細胞の数は、単位面積当たりの血管数および血管内皮細胞数と相関した (図 4.8)。

これまで、間葉系幹細胞のマーカー候補の一つである Stro-1 が滑膜の血管内皮細胞周囲に発現すること、骨髄において血管周囲が幹細胞ニッチの可能性が報告されている。筆者らの結果も血管内皮細胞周囲に滑膜間葉系幹細胞が存在することを示唆する。

4.2.6 関節液中の間葉系幹細胞

変形性膝関節症や関節リウマチ患者の、水腫のある関節液中に間葉系幹細胞が

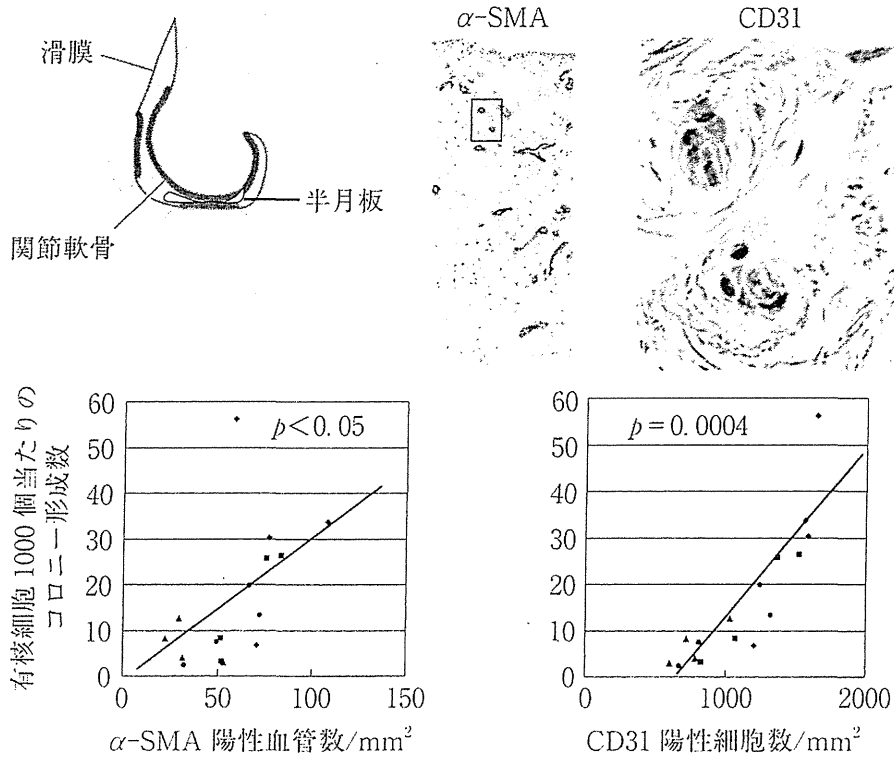


図 4.8 ヒト滑膜間葉系幹細胞と血管との関連

膝手術時に滑膜を採取し、それぞれを二つに分けた。細胞採取用のものはコラゲナーゼ処理後、 60 cm^2 のディッシュ当たり有核細胞を1万個播種し、14日間培養後、コロニー形成数を求めた。組織解析用の滑膜は、 α -SMA (smooth muscle actin) 陽性の血管数と、CD31 陽性の内皮細胞の単位面積当たりの数を求めた。有核細胞当たりの間葉系幹細胞の数は、単位面積当たりの血管数および血管内皮細胞数と相関した。

存在することを、2004年に McGonagle らがはじめて報告した。筆者らは膝前十字靭帯損傷膝の関節液中には、正常膝の関節液中よりも100倍以上多く間葉系幹細胞が存在し、その特性が骨髄よりも、滑膜由来のものにより類似することを報告している。さらに、変形性膝関節症の重症度に応じて関節液中の間葉系幹細胞が増加し(図4.9)、これらは滑膜由来のものに類似することを明らかにした。これらの結果は、膝関節内の組織が障害されると、骨髄からではなく、滑膜から間葉系幹細胞が動員され、関節液中の幹細胞が増加し、修復に寄与する機序が存在することを示唆する。

4.2.7 関節内と関節外間葉組織由来間葉系幹細胞の遺伝子プロファイル

膝関節の発生過程で、関節内組織である軟骨、滑膜、半月板、前十字靭帯は interzone cells から分化する。関節内組織の起源が共通していることから、関節内にあるそれぞれの組織中の間葉系幹細胞は、関節外組織由来の間葉系幹細胞とは区別できる共通した特性を持っていることが推測される。そこで関節内と関節

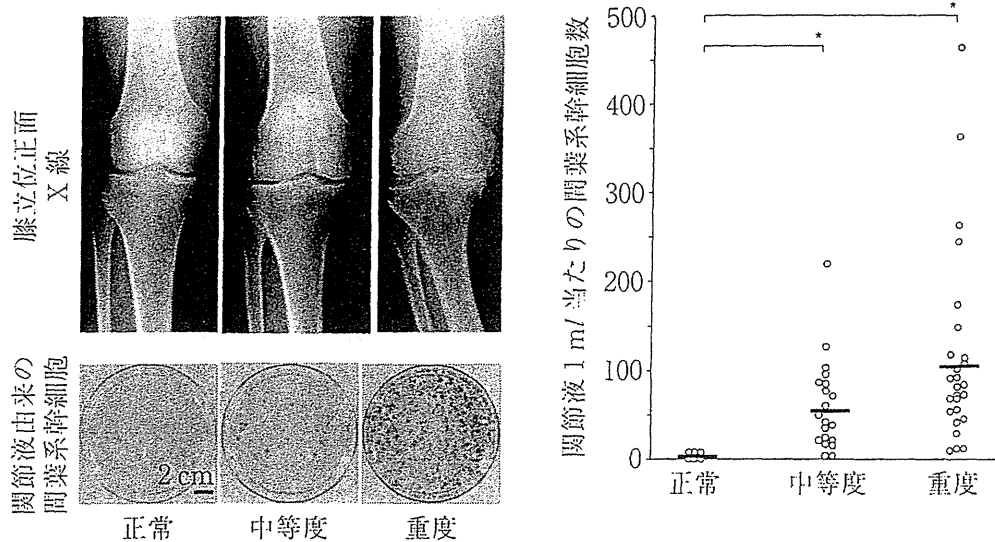
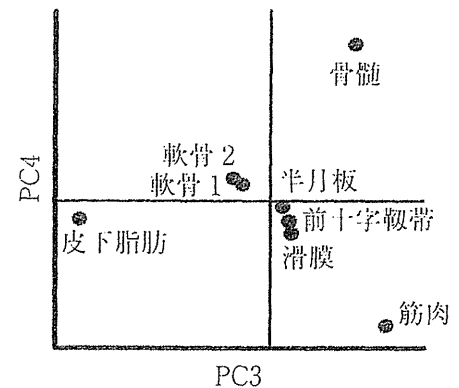


図 4.9 ヒト変形性膝関節症の X 線像による重症度と関節液中に存在する間葉系幹細胞との関連
最初に膝の X 線像により、重症度分類を行った。関節液を採取し、細胞成分を 14 日間培養後、細胞コロニーを染色した。重症度で分類し、関節液中の間葉系幹細胞数をプロットした。平均値を棒で示す。変形性膝関節症の重症度と関節液中の間葉系幹細胞数は関連する。

図 4.10 種々のヒト間葉系幹細胞と軟骨細胞における遺伝子プロファイルの主成分解析
関節内組織（滑膜、半月板、前十字靭帯）と関節外組織（骨髄、皮下脂肪、筋肉）から間葉系幹細胞を採取し、RNA を抽出した。また軟骨細胞からも RNA を抽出した。これらの遺伝子プロファイルの主成分解析した。関節内組織である滑膜、半月板、前十字靭帯由来の間葉系幹細胞と軟骨細胞の遺伝子発現は、関節外組織である筋肉、皮下脂肪、骨髄由来の間葉系幹細胞と比較して相互に近い。



外間葉系組織由来間葉系幹細胞の遺伝子プロファイルを比較した。

人工膝関節置換術の際に、ヒトの滑膜、半月板、前十字靭帯、筋肉、皮下脂肪、骨髄を採取した。これらの組織由来の間葉系幹細胞と、大腿骨頸部骨折の手術時に得られる関節軟骨由来の細胞から RNA を採取し、マイクロアレイを用いて 4 万 7000 種類の遺伝子発現を網羅的に解析した。主成分解析を行うと、関節内組織である滑膜、半月板、前十字靭帯由来の間葉系幹細胞と軟骨細胞の遺伝子発現は、関節外組織である筋肉、皮下脂肪、骨髄由来の間葉系幹細胞と比較して、相互に近いことが示された (図 4.10)。これらの結果は、関節内組織の細胞治療を行う際に、関節内組織由来の間葉系幹細胞を用いるほうが、関節外組織由来の間葉系幹細胞を用いる場合よりも有利であることを示唆する。

4.3 滑膜間葉系幹細胞の移植

4.3.1 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は、細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置し、ある時間が経過すると、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製し、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（図4.11）。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間葉系幹細胞を用いても同様の結果が得られる。

ウサギの膝関節に軟骨欠損を作製し、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、確実な軟骨修復が観察される（図4.12）。ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作製し、DiI (1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート) でラベルした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1週後に評価すると、組織学的にDiI陽性細胞を軟骨欠損部に認める（図4.13）。滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置して移植する方法は、ヒトでは関節鏡視下での低侵襲な細胞移植を可能とする。

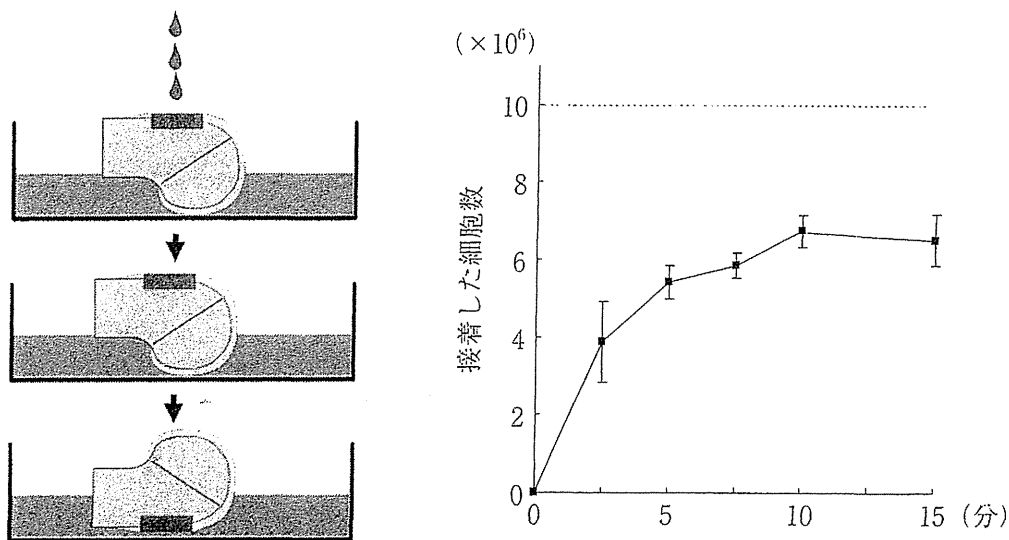


図4.11 滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に静置した際の、静置時間と接着細胞数の関係

ウサギ滑膜間葉系幹細胞 1000 万個を 100 μ l の PBS に浮遊させ、軟骨欠損部に静置し、一定時間経過ごとに軟骨欠損部を下に向け、接着した細胞数を求めた。10 分経過後にはすでに平衡状態となり、6 割以上の細胞が接着した。

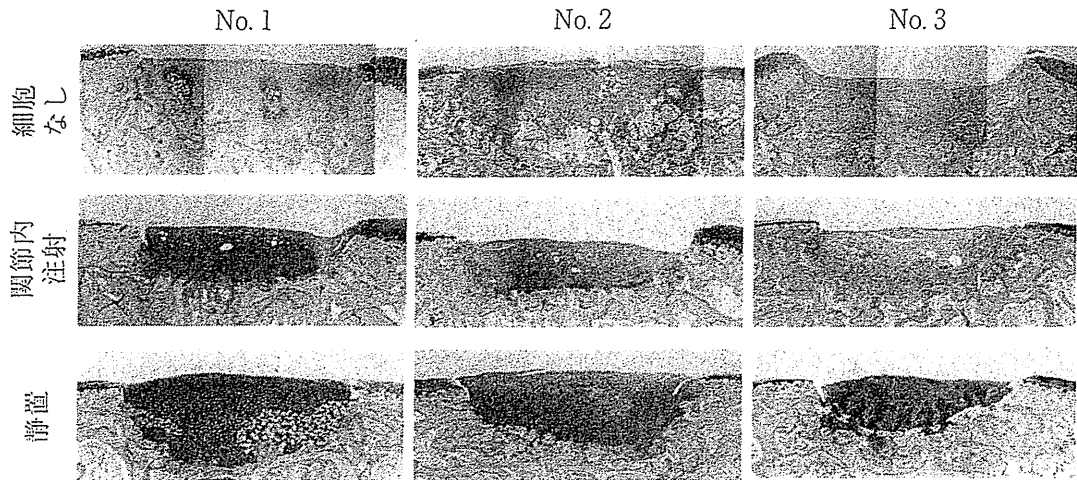


図 4.12 ウサギの膝関節に軟骨欠損を作成し、ウサギ滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を関節内注射したものと、同じ浮遊液を軟骨欠損部に静置したものと軟骨修復に関する組織学的比較

4 週後の組織像を、3 膝ずつ示す。細胞を投与しないものは、欠損部に軟骨基質をほとんど認めない。細胞浮遊液を関節内投与したものは、欠損部に軟骨基質を豊富に認めるものがある一方、乏しいものもあり結果が安定しない。細胞浮遊液を 10 分間静置したものはほとんどの例で、豊富な軟骨基質を認めた。

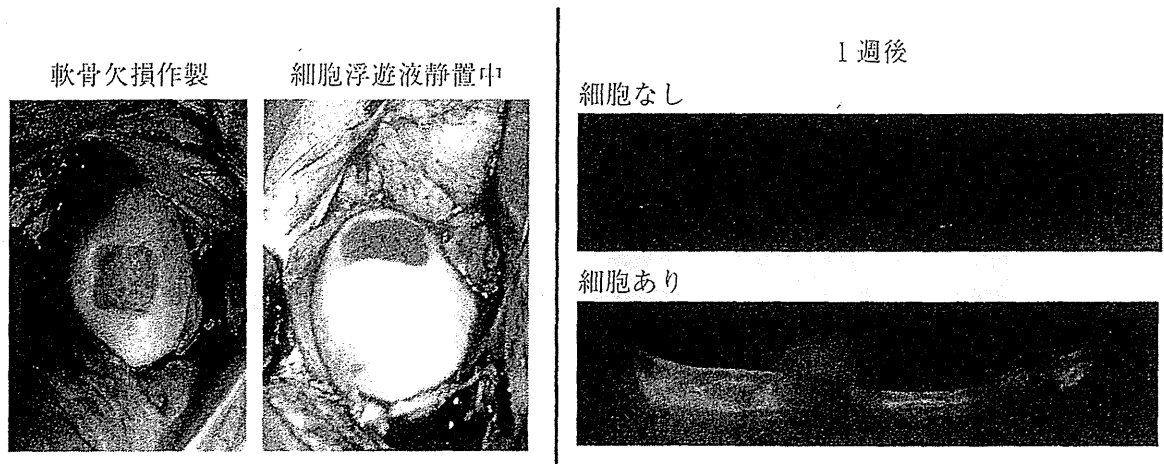


図 4.13 滑膜間葉系幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置することによる細胞接着の、ブタを用いた検討

ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作製し、DiI でラベルした滑膜間葉系幹細胞の浮遊液を 10 分間静置した。1 週間後に組織学的に観察した。DiI 陽性細胞を軟骨欠損部に認める。

4.3.2 滑膜間葉系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もとにして、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、

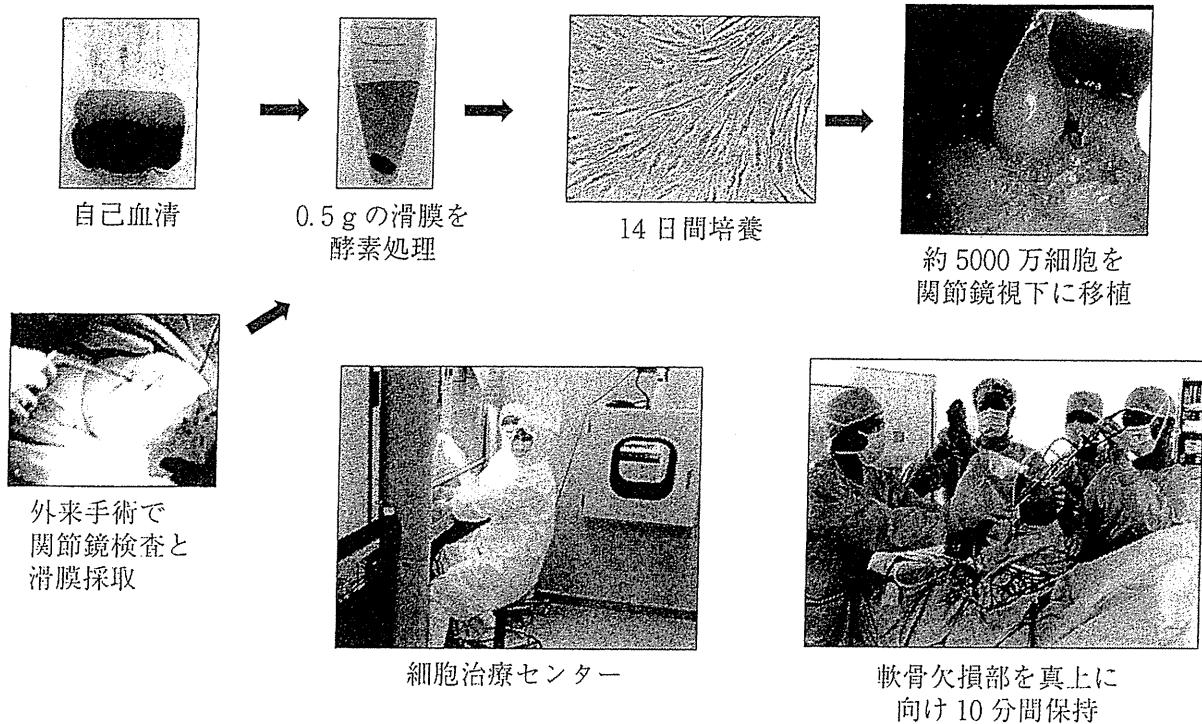


図 4.14 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生医療

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移植する。

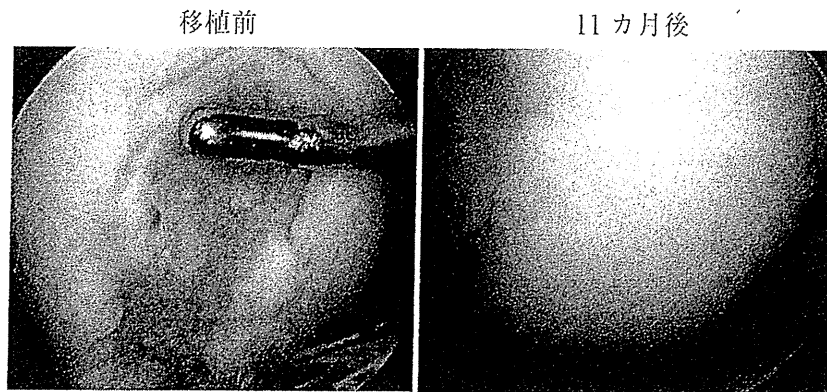


図 4.15 軟骨欠損に対して滑膜間葉系幹細胞移植後11カ月時の関節鏡視像

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。

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0.5 gの滑膜と70 ml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4.14)。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。多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている(図4.15)。

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製や、より確実な細胞移植手技の開発が今後の課題である。半月板の再生を含めて変形性膝関節症への応用を目指したい。

〔関矢一郎・宗田 大〕

文 献

- 1) Dominici M, et al: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4) : 315-317, 2006
- 2) Sekiya I, 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
- 3) Yoshimura H, et al: Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327(3) : 449-462, 2007
- 4) 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
- 5) Johnstone B, et al: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1) : 265-272, 1998
- 6) Sekiya I, et al: BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(2) : 411-418, 2001
- 7) Sekiya I, et al: Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320(2) : 269-276, 2005. Epub Mar 19, 2005
- 8) Shirasawa S, 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(1) : 84-97, 2006
- 9) Sekiya I, 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
- 10) Koga H, 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(2) : 207-215, 2008
- 11) Ichinose S, et al: Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest* 90(2) : 210-221, 2010
- 12) Yokoyama A, et al: *Cell Tissue Res* 320(2) : 269-276, 2005. Epub Mar 19, 2005. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 322(2) : 289-298, 2005. Epub Nov 3, 2005
- 13) Nimura A, 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(2) : 501-510, 2008
- 14) Nagase T, 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(5) : 1389-1398, 2008
 - 15) Ruger B, et al : Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50(7) : 2157-2166, 2004
 - 16) Shi S, Gronthos S : Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18(4) : 696-704, 2003
 - 17) Jones EA, et al : Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 50(3) : 817-827, 2004
 - 18) Morito T, et al : Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* 47(8) : 1137-1143, 2008
 - 19) Zhang S, et al : Autologous Synovial Fluid Enhances Migration of Mesenchymal Stem Cells from Synovium of Osteoarthritis Patients in Tissue Culture System. *J Orthop Res* 26(10) : 1413-1418, 2008
 - 20) Ratajczak W : Early development of the cruciate ligaments in staged human embryos. *Folia Morphol (Warsz)* 59(4) : 285-290, 2000
 - 21) Archer CW, et al : Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2) : 144-155, 2003
 - 22) Segawa Y, et al : Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res* 27(4) : 435-441, 2009
 - 23) Koga H, et al : Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 10(4) : R84, 2008

Bone Joint Nerve

感覚・運動骨格機能系の学術研究誌 BJN Japan —こつ・かんせつ・しんけい—

特集

変形性膝関節症をめぐる進歩

- ① 変形性膝関節症の疫学
 - ② 変形性膝関節症の基礎的研究
 - ③ 変形性膝関節症の評価
 - ④ 変形性膝関節症の保存療法
 - ⑤ 変形性膝関節症の手術療法
 - ⑥ 鼎談「変形性膝関節症の治療：現状と展望」
- あなたならどうしますか？ —Q&A—
 - 手術手技シリーズ
膝十字靭帯損傷に合併した3度膝内側側副靭帯損傷に対する
つり上げ修復法
 - コラム
ステロイド小史-1

2012

叢書 通巻第4号
(Vol.2 No.1)

BJN
Bone Joint Nerve
アークメディア

① 変形性膝関節症の疫学

変形性膝関節症の疫学：大規模住民コホート調査ROADより

東京大学 吉村 典子 5

変形性膝関節症の発生要因および予防に関する疫学的研究

弘前大学 井上 亮ほか 11

② 変形性膝関節症の基礎的研究

変形性膝関節症とプロテオグリカン

東京医科歯科大学 篠村 多摩之 19

関節軟骨の潤滑性と細胞外マトリクス

帝人ファーマ株式会社 安井 秀一ほか 25

骨軟骨再生治療のための組織工学技術の進歩

京都大学 田畑 泰彦 33

BMP7による変形性関節症の予防

東京医科歯科大学 林 将也ほか 39

ヒアルロン酸関節内注射の鎮痛機序

島根大学 内尾 祐司 47

ヒアルロン酸関節内投与がOA軟骨下骨のMMP-13に与える影響

京都府立医科大学 平岡 延之ほか 53

③ 変形性膝関節症の評価

MRIによる軟骨の定量化

東京大学 岡 敬之 61

変形性膝関節症のMRI評価

帝京大学ちば総合医療センター 渡辺 淳也ほか 67

変形性膝関節症におけるバイオマーカーの有用性
—バイオマーカーで捉える初期変形性膝関節症—

順天堂大学 石島 旨章ほか 75

④ 変形性膝関節症の保存療法

変形性膝関節症に対する物理療法

日本医科大学 高橋 謙治 85

変形性膝関節症に対する運動療法

宮崎大学 帖佐 悦男 91

変形性膝関節症に対する運動療法—理学療法士の立場から—

東京西徳洲会病院 八木 茂典ほか 99

NSAIDsの使い分け

東邦大学 高木 賢治ほか 105

変形性膝関節症に対するサプリメントの効果

慶應義塾大学 榎本 宏之 113

変形性膝関節症に対するヒアルロン酸関節内注入療法の位置づけ

藤田保健衛生大学 山田 治基ほか 119

⑤ 変形性膝関節症の手術療法

変形性膝関節症に対する鏡視下手術の適応と手技

帝京大学ちば総合医療センター 松木 圭介ほか 125

高位脛骨骨切り術の適応と手技

横浜市立大学 赤松 泰ほか 131

片側置換型人工膝関節置換術の適応と手技

近畿大学 赤木 将男 137

人工膝関節置換術の適応と手技

大分大学 平川 雅士ほか 143

Distraction Arthroplasty

広島大学 出家 正隆ほか 151

滑膜由来の幹細胞による再生医療

東京医科歯科大学 関矢 一郎ほか 159

⑥ 鼎 談

変形性膝関節症の治療—現状と展望—

近畿大学 赤木 将男
広島大学 出家 正隆
(司会)東京医科歯科大学 関矢 一郎 167

● あなたならどうしますか? —Q&A—

船橋整形外科病院 高橋 憲正 181

● 手術手技シリーズ

膝十字靭帯損傷に合併した3度膝内側側副靭帯損傷に対する
つり上げ修復法

東京医科歯科大学 古賀 英之ほか 185

● コラム

ステロイド小史-1

西野整形外科・リウマチ科 西野 仁樹 190

学術集会案内 84
教育研修会 195
Vol.2 No.1 Key Words 198

投稿規定 199
次号予告 200
編集後記(関矢 一郎) 200

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、

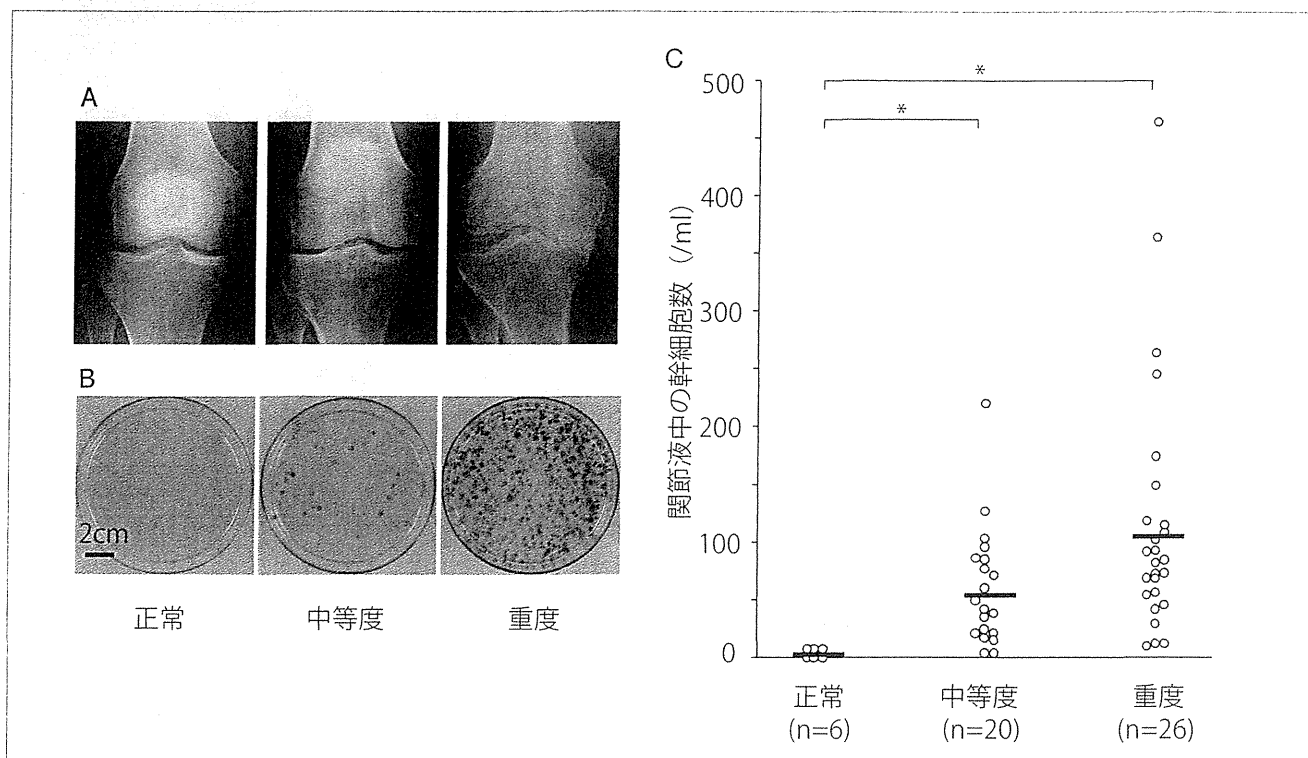


図1 変形性膝関節症の関節液中に含まれる間葉系幹細胞

(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を通し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)

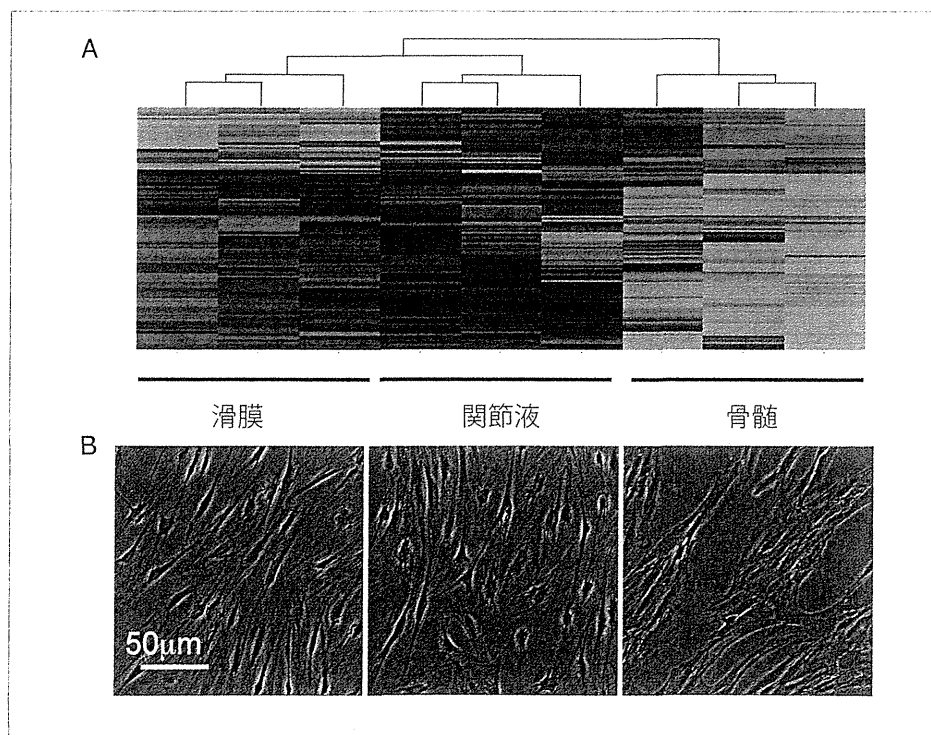


図2 滑膜, 関節液, 骨髄由来の間葉系幹細胞に関する特性の比較

(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)

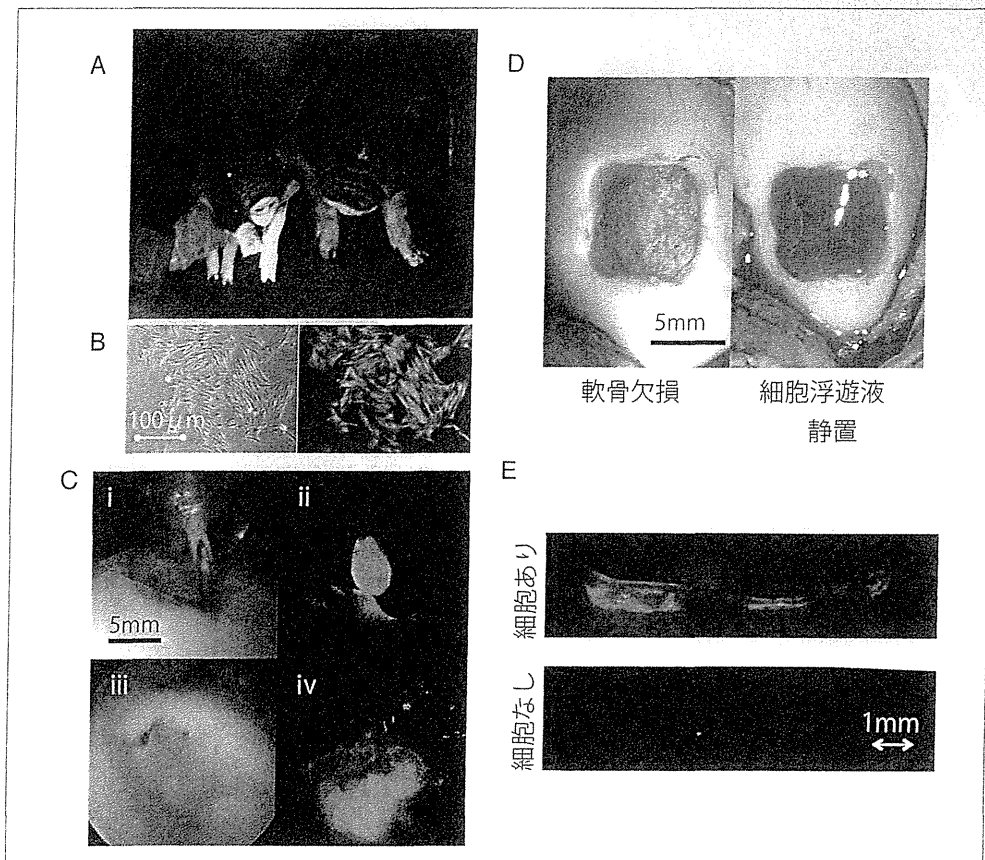


図3 軟骨欠損部に細胞浮遊液を10分間静置する方法による、細胞接着効果のブタを用いた検討

(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^{8,9)}。

変形性膝関節症の関節液に含まれる幹細胞

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

る関節液中には、正常膝と比較して約100倍以上の間葉系幹細胞が存在すること、前十字靭帯を損傷してから関節液を採取するまでの期間と関節液中の間葉系幹細胞の数が相関すること、関節液中の間葉系幹細胞の遺伝子プロファイルは骨髄由来よりも滑膜由来の間葉系幹細胞に類似することを報告している。さらにウサギの前十字靭帯の部分欠損や軟骨欠損を作成し、滑膜由来の間葉系幹細胞を関節内注射すると、損傷部に細胞が接着することを明らかにした^{6,11)}。これらのことは、関節内組織が損傷されると、滑膜から間葉系幹細胞が関節液中に動員され、損傷部位に接着し、自然修復する機序の存在を示す。変形性膝関節症においても、滑膜から間葉系幹細胞が関節液中に動員され¹²⁾、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。滑膜間葉系幹細胞を体外で増殖させて、軟骨変性部に移植することは、自然治癒過程を促進させる可能性がある。

軟骨欠損部への滑膜間葉系幹細胞の移植

軟骨を欠損させた膝関節に、滑膜間葉系幹細胞を関節内に注射するだけでも細胞は軟骨欠損部に接着する。しかし接着する細胞数にはばらつきが多く、軟骨再生する効果は不安定であった。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、細胞は重いので重力で沈み、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%以上の細胞が接着した。また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間葉系幹細胞を用いても同様の結果が得られた。さらに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

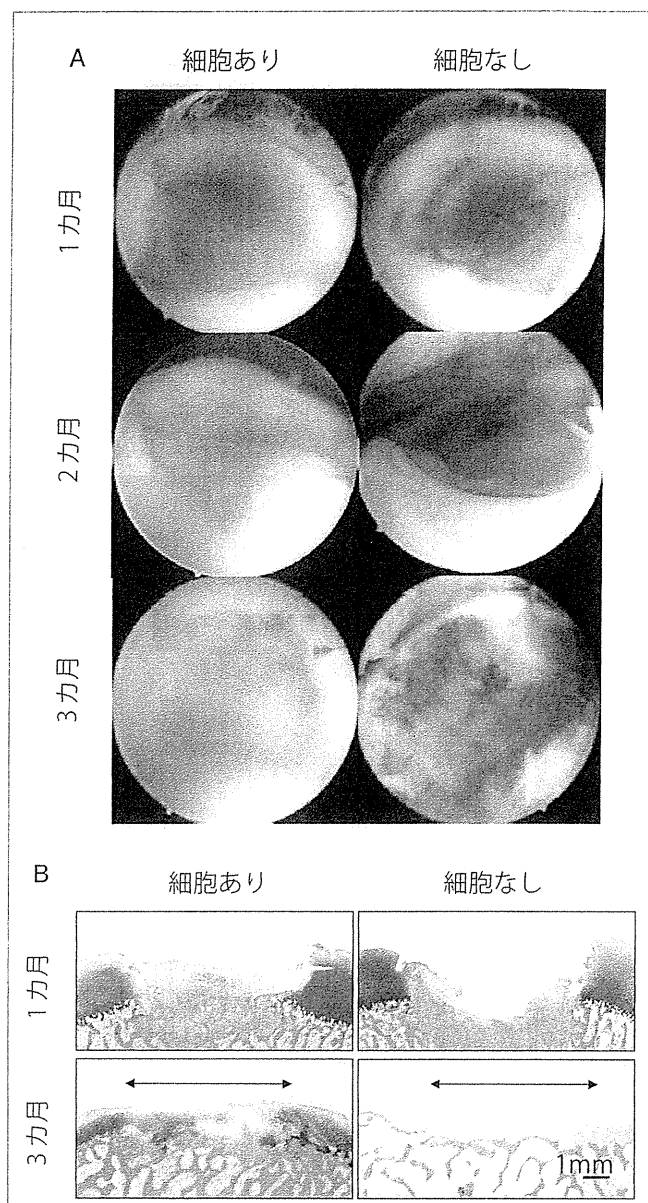


図4 軟骨欠損部に細胞浮遊液を10分間静置する方法による、軟骨再生に関するブタを用いた検討

(A) ブタの大腿骨内顆に軟骨欠損を作成し、関節鏡で1カ月ごとに観察した。細胞を移植しないものは、軟骨欠損が経時的に拡大した。軟骨欠損部に細胞浮遊液を10分間静置したものでは、1カ月時に軟骨欠損部が薄い膜様組織で覆われ、2カ月時に膜様組織が厚くなり、3カ月時に軟骨様組織で覆われた。(B) サフラニンO染色による組織。最初に作成した欠損部を両矢印で示す。細胞を移植したものは、1カ月時に膜様組織で覆われ、3カ月時には軟骨欠損部に軟骨基質を認める。(文献15より)

したものと比較し、確実な軟骨修復が観察された^{13,14)}。

前臨床試験として、ブタの膝関節大腿骨内顆の荷重面に軟骨欠損を作成して、検討を行った。蛍光を照射すると全身が緑に発色するGFPピッ

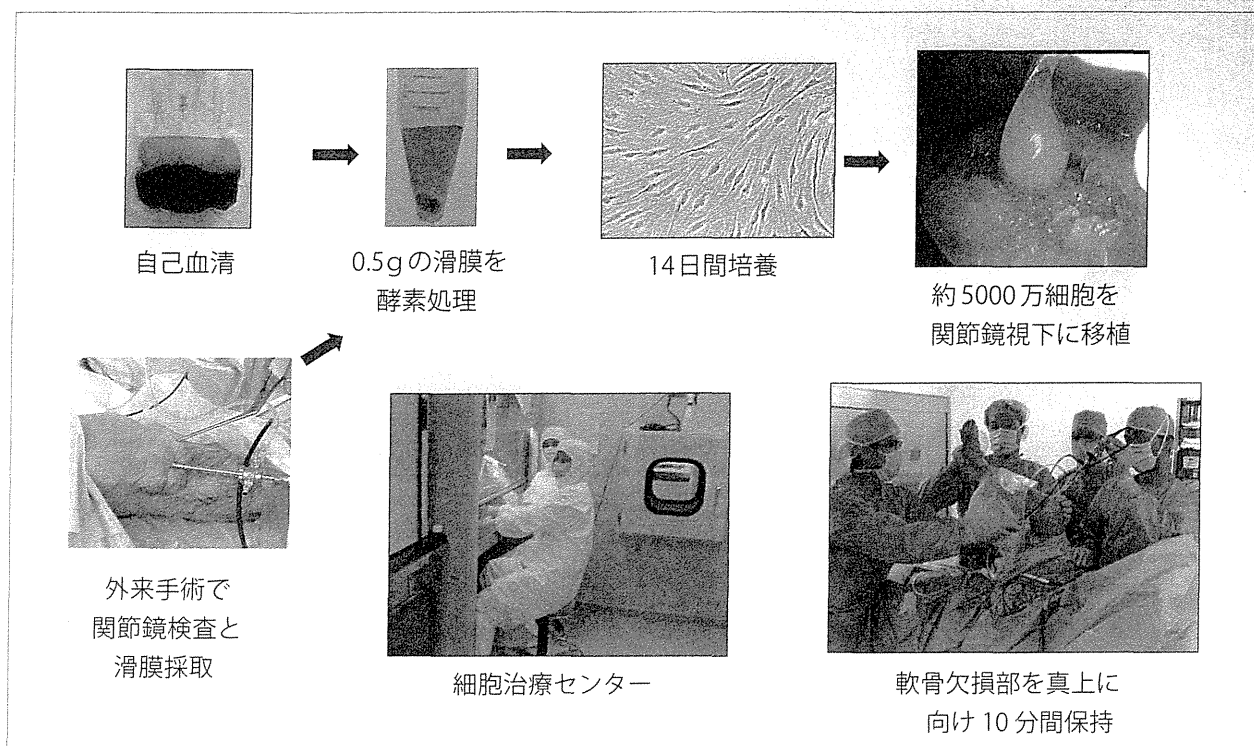


図5 自己滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生医療のスキーム

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

術 前



17カ月後

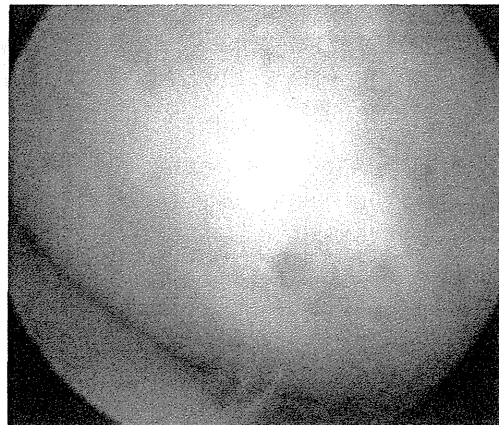


図6 臨床例

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)

*

*

*