

きる体制の整備は完了した。今後、実際のヒト骨髄細胞を利用したコールドランを実施、システム全体のフィージビリティを検証してから、実際の被験者の細胞調製を受け入れる予定である。

また、SOPは大阪大学以外の各研究分担者の細胞製品の製造担当者にも配布し、各施設のハードウェアや施設SOPに即したSOPの作成のための雛形ないしは参考としていただいた。

D. 考察

本研究はヒト幹細胞等の臨床研究に関する指針で実施が認められている、多施設共同研究に於いて他の医療機関で製造された細胞製剤を臨床研究に使用することを実践する研究である。大阪大学はCPCを持たない大阪市立大学病院と兵庫医科大学病院の被験者の細胞の培養を担当することに加え、本研究全体の調整事務局の役割を担っている。多施設共同ヒト幹細胞臨床研究の準備として、必要な文書の作成、倫理的手続き、細胞培養のための準備はほぼ本年度で準備が終了する。さらに本臨床研究を実施するに当たって、現在、参加病院間での契約手続きを実施しており、これが完了すれば今年度末あるいは平成26年度はじめより実際の被験者の組み入れが可能となる。本研究は、シーズがあってもCPCのない施設の細胞治療を可能にする前例となり、また十分に運用されていない施設の活用促進にもつながり、ひいては再生医療の促進になると考えられる。

E. 結論

「関節鏡視下自己骨髄間葉系幹細胞移植による関節軟骨欠損修復—多施設共同、非盲検、ランダム化、並行比較試験」に関し

て、その調整事務局として実施体制の構築実施準備がほぼ完了した。また、細胞の培養調整についても実施準備が完了した。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
目良 恒、 脇谷 滋之	骨髄間葉系細胞移植による軟骨再生医療	Pharma Medica	31 (4)	21-24	2013
目良 恒、 糸数 万紀、 脇谷 滋之	軟骨修復・再生の歴史と未来	CLINICAL CALCIUM	23 (12)	25-32	2013
亀井 豪器、 安達 伸生、 越智 光夫	自家培養軟骨移植による軟骨再生治療と磁気ターゲティングによる新たな治療開発	Pharma Medica	31 (4)	33-36	2013

骨・軟骨再生

骨髄間葉系細胞移植による軟骨再生治療

武庫川女子大学健康・スポーツ科学部 目良 恒, 脇谷 滋之

KEY WORDS

- 関節軟骨修復
- 骨髄間葉系細胞
- 細胞医療
- 自動細胞培養装置 (R-CPX)
- 細胞培養委託システム

Cartilage repair by bone marrow derived cell transplantation.
Hisashi Mera
Shigeyuki Wakitani (教授)

はじめに

関節軟骨欠損はたとえ病変部が小さくても自然修復が困難ではあるが、逆にある程度深い骨軟骨の全層欠損では、病変部の大きさや周囲の力学環境によっては、欠損部が線維軟骨で覆われることがある¹⁾³⁾。このことは軟骨組織が主に緻密な細胞外基質で構成された無血管組織であるため、欠損部への細胞遊走や創傷治癒過程での生物学的反応に限界があることを示している³⁾⁴⁾。欠損部と骨髄を交通させる、いわゆる骨髄刺激法は創傷治癒過程を促すきっかけとなるが、力学強度の劣る線維軟骨の修復では、長期的な変形性関節症進行への懸念が残る。さらにそれとは異なる方法で欠損部の修復を促進させるため何らかの細胞を移植することを考えたとき、本来そこにあるべき軟骨細胞を移植しようとするのは当然の発想で、歴史的にも軟骨細胞移植が最初に報告されている⁵⁾。いくつかの動物

実験が報告され⁶⁾⁹⁾、1994年にはじめてヒトに対する自己軟骨細胞移植が報告された¹⁰⁾。有症状の軟骨欠損に対する治療法として、従来の骨髄刺激法と骨軟骨柱移植に、新たに細胞治療が加わった。以降、欧米を中心に自己軟骨細胞移植が行われている。

I. 関節軟骨欠損に対する細胞治療

実際に軟骨細胞移植を行う際に十分な数の軟骨細胞を得るためには、軟骨組織が細胞成分に乏しい以上、相応の正常軟骨組織を採取するか、細胞の単離後に培養・増殖させる必要がある。しかし、採取できる正常軟骨組織の量には制限があり、分化した軟骨細胞は培養・増殖の過程で脱分化し本来の機能を失うため、治療対象となる欠損部の広さには自ずと制約がかかる。そこで十分量の細胞数確保のために極力小さな組織侵襲による採取が可能で、増

殖させた後でも分化を誘導することのできる前駆細胞が臨床応用には望ましい。また、軟骨細胞移植では正常軟骨組織採取のために手術室での関節鏡手術が必要であるが、骨軟骨前駆細胞として早くから注目されてきた骨髄細胞は、外来での局所麻酔でも採取可能である。また、骨髄細胞は培養による増殖が可能のため、臨床応用に適している。いくつかの間葉系細胞マーカーが陽性であり、骨、軟骨、筋肉、脂肪などに分化するため、骨髄間葉系細胞と呼ばれるようになった^{13,14)}。また、これら骨髄間葉系細胞は、免疫抑制、線維癆痕化抑制、アポトーシス、血管新生などに関わるさまざまな液性因子を分泌するため、自身の細胞分化能とは別に細胞移植を行うことで損傷組織の修復を促進する効果も期待されている^{15,18)}。

1994年、Wakitaniらはウサギの実験系で、この自己骨髄間葉系細胞を骨軟骨欠損部に移植すると、組織修復が促進されることを報告した¹⁹⁾。骨髄細胞を培養し、移植直前にコラーゲン・ゲルに包埋して、ウサギ膝大腿骨内側顆荷重部に作成した6×3×3mmの骨軟骨欠損部に充填した。移植2週後に修復組織は骨軟骨欠損部全域が硝子軟骨様組織となり、その後、骨髄に接する部分から細胞の肥大化が生じたのち、血管侵入が起こり骨に置換され、関節側表面の軟骨は残った。このことは、移植片の未分化な骨髄間葉系細胞が周囲の環境によって内軟骨性骨化の過程と類似した経過をとっていると考えられる^{20,21)}。

Wakitaniらは、1998年に世界ではじめてこの方法をヒトの関節軟骨欠損の治療に応用した²²⁾。2例のヒト膝蓋骨

軟骨欠損症患者から、手術3週前に腸骨から骨髄液を採取し、接着細胞を培養・増殖させ、移植前にコラーゲン・ゲルに包埋した。軟骨欠損部には軟部組織を搔破し軟骨下骨にドリリングを行い、その後細胞を包埋したコラーゲン・ゲルを置き、脛骨から採取した本人の骨膜を、その骨形成層を移植片側に向けてカバーした。2例とも術後7～8週で行った関節鏡では軟骨組織の修復を認め、臨床症状の改善は顕著だった。しかし、この研究では細胞を移植しないコントロール群との比較ができておらず、臨床症状の改善が本当に細胞移植によるものであるかを判断することが困難であった。

そこで、Wakitaniらは内側型変形性膝関節症に対し、高位脛骨骨切り術(high tibial osteotomy; HTO)を受ける患者24例を対象に、骨髄間葉系細胞移植の治療介入の有効性を検討した²³⁾。コラーゲン・ゲル担体のみ移植(コントロール群)と骨髄間葉系細胞を含むコラーゲン・ゲルの移植(細胞移植群)をそれぞれ12例ずつ行い、両群を比較した。手術後約1年半の臨床成績では両群とも術前に比べて有意に改善したが、両群間での改善度に差はなかった。同意が得られた症例で関節鏡を施行し、組織生検を行った。鏡視下および組織学的に修復組織を点数化し20点滴点で評価したところ、移植後7週で細胞移植群は98点でコントロール群の78点より高く、42週でもそれぞれ154点および107点と、細胞移植群が有意に良好な修復だった。臨床成績に差が認められなかったのは、HTOのみでも臨床症状が改善されるためであると考えられる。今後さらに長期の経過を追うと、臨床成績に差が出る可能

性が考えられる。

さらにKurodaら²⁴⁾やWakitaniら²⁵⁾により、自己骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復の有用性についての報告がなされている。

II. 骨髄間葉系細胞移植の問題点と対策

細胞移植によるこの方法は、早くから造腫瘍性の問題が示唆されていた。2005年にRubioらがヒト脂肪由来幹細胞を長期間培養すると癌化することを報告したが²⁶⁾、この論文はデータの再現性がなく2010年8月に撤回されている。腫瘍形成の可能性については長期の安全性を示すことが重要であるが、Wakitaniらが行った1998年1月から2008年12月までの11年5ヵ月間に実施された自己骨髄間葉系細胞移植41例45膝において、平均観察期間6年3ヵ月の経過で、少なくとも局所の感染も腫瘍形成も認められていない²⁷⁾。

このように、骨髄間葉系細胞を移植することで関節軟骨欠損の組織修復が促進されることや、その安全性が明らかになった。さらに臨床において広く受け入れられるためには、侵襲の大きい従来の関節切開から関節鏡下で細胞を移植し手術侵襲を低減することを目指している。すでに動物実験では、関節内注射による骨髄間葉系細胞移植が関節軟骨損傷の修復を促進することが報告されている^{28,31)}。その結果を踏まえ、関節内鏡視下で軟骨欠損部に骨髄刺激法を施行後、ヒアルロン酸に含ませた自己骨髄間葉系細胞を関節内注射する試験が計画されている。この方法の有用性を検証するため、西日本を中心とする8施設による多施設非盲検ラ

ンダム化並行群間比較試験が計画されている。この方法の有効性が明らかになれば、低侵襲関節軟骨修復の開発につながり、世界各国で広く用いられる、安全で汎用性の高い関節軟骨再生治療法となる可能性がある。

ただし、これまで説明してきた骨髄間葉系細胞移植法では、関節軟骨欠損の組織修復は促進されるが、完全な硝子軟骨による修復は得られていない。その理由の1つに、細胞の軟骨分化が不十分であった可能性があげられる。つまり骨髄間葉系細胞は、移植までは接着細胞として何ら修飾を受けずに培養され、細胞分化に関しては移植部位の環境下での自然な分化に委ねているのみである。したがって移植前に骨髄間葉系細胞をある程度軟骨細胞に分化させておくことは、より多くの硝子軟骨を得るうえで有効である可能性がある。現在盛んに行われている軟骨分化誘導のための各種サイトカインや成長因子、その受容体を含めた細胞内シグナル伝達分子の研究とともに、近年注目されてきているnon-coding RNA (ncRNA)の研究、低分子化合物の開発、遺伝子導入法を含めたdrug delivery systemの研究に期待がかかる。さらに、現在の技術では、すでに骨髄間葉系細胞をコラーゲンなどの担体を用いずに三次元的に再構築させ、*in vitro*で軟骨細胞シートを作製することが可能となっている²⁰⁾。この技術を利用すると、これまでわずかながら存在した担体に起因する炎症反応や免疫反応などの懸念が完全に払拭され、治療結果に反映される可能性がある。

III. 細胞治療の将来展望

また、これら細胞医療を実現するための整備も進められている。通常、治療に使用する細胞を培養するためヒト移植用細胞培養施設 (cell processing room ; CPC) が利用されるが、その代替となる自動細胞培養装置の開発である。CPCは非常に高度なクリーン環境が必要なため、数億円の初期投資や年間数千万円の維持費用がかかり、さらに高度な技術者も必要で、運営には大きな努力を要する。そこで、CPCを必要とせず、操作の自動化を目的に、川崎重工と共同で自動細胞培養装置 (R-CPX) を開発し、現在、大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センター (Medical Center for Translational Research ; MTR) に設置した。R-CPXは2台のロボットアームを中心に培地の交換や継代などの操作も自動化されている。またR-CPX内部は過酸化水素蒸気による滅菌が可能なので、内部を常に高いクリーン度に保つことができ、複数患者の細胞培養もコンピュータ制御され交差感染も防止できる。また、このようなハード面での整備に加え、施設間の細胞培養の委託システムの構築を進めている。細胞の委託システムが構築されれば、CPCがないことで細胞治療が不可能な施設でも細胞治療を行うことが可能であり、逆に、これまでCPCを備えていてもシーズ不足で十分に運用されていなかった施設の活性化 (各地域での細胞治療のHUBとして運用) も可能である。これらインフラの整備によって、関節軟骨のみならずあらゆる細胞治療が促進されると考えられる。

おわりに

現在、細胞生物学を中心に再生医学分野は目覚ましい発展を遂げている。今後、再生・細胞医療を実現させるためには、さまざまな分野の研究成果や技術革新からインフラの整備までを含めて、よりよい治療法の開発や臨床応用へ向けた努力が、より一層求められてくると考えられる。

文 献

- 1) Convery FR, Akeson WH, Keown GH : The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. Clin Orthop Relat Res 82 : 253-262, 1972
- 2) Mankin HJ : The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg Am 64 : 460-466, 1982
- 3) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ : Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 75 : 532-553, 1993
- 4) Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel PG, van Osch GJ, et al : Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 43 : 241-251, 1998
- 5) Chesterman PJ, Smith AU : Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. J Bone Joint Surg Br 50 : 184-197, 1968
- 6) Bentley G, Greer RB 3rd : Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. Nature 230 : 385-388, 1971
- 7) Aston JE, Bentley G : Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. J Bone Joint Surg Br 68 : 29-35, 1986
- 8) Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al : The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte trans-

- plantation. *J Orthop Res* 7 : 208–218, 1989
- 9) Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, et al : Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 71 : 74–80, 1989
 - 10) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331 : 889–895, 1994
 - 11) Caplan AI : Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 : 641–650, 1991
 - 12) Wakitani S, Saito T, Caplan AI : Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18 : 1417–1426, 1995
 - 13) Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, et al : The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170 : 73–82, 2002
 - 14) Gao J, Caplan AI : Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Chir Organi Mov* 88 : 305–316, 2003
 - 15) Caplan AI, Dennis JE : Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98 : 1076–1084, 2006
 - 16) Ko IK, Kean TJ, Dennis JE : Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells. *Biomaterials* 30 : 3702–3710, 2009
 - 17) Ko IK, Kim BG, Awadallah A, et al : Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. *Mol Ther* 18 : 1365–1372, 2010
 - 18) Kean TJ, Duesler L, Young RG, et al : Development of a peptide-targeted, myocardial ischemia-homing, mesenchymal stem cell. *J Drug Target* 20 : 23–32, 2012
 - 19) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76 : 579–592, 1994
 - 20) Suzuki F : Roles of cartilage matrix proteins, chondromodulin-I and -II, in endochondral bone formation : a review. *Connect Tissue Res* 35 : 303–307, 1996
 - 21) Shukunami C, Iyama K, Inoue H, et al : Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral bone formation. *Int J Dev Biol* 43 : 39–49, 1999
 - 22) Wakitani S, Goto T, Young RG, et al : Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4 : 429–444, 1998
 - 23) Wakitani S, Yamamoto T : Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microsc Res Tech* 58 : 14–18, 2002
 - 24) Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, et al : Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15 : 226–231, 2007
 - 25) Wakitani S, Nawata M, Tensho K, et al : Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation : three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 1 : 74–79, 2007
 - 26) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al : Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65 : 3035–3039, 2005
 - 27) Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al : Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 5 : 146–150, 2011
 - 28) Agung M, Ochi M, Yanada S, et al : Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14 : 1307–1314, 2006
 - 29) Nishimori M, Deie M, Kanaya A, et al : Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow-stimulating procedure enhanced by cultured allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Bone Joint Surg Br* 88 : 1236–1244, 2006
 - 30) Lee KB, Hui JH, Song IC, et al : Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects—a porcine model. *Stem Cells* 25 : 2964–2971, 2007
 - 31) McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, et al : Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27 : 1552–1561, 2011
 - 32) Maeda S, Fujitomo T, Okabe T, et al : Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Biosci Bioeng* 111 : 489–492, 2011

軟骨修復・再生の歴史と未来

目良 恒*¹⁾ 糸数 万紀*²⁾ # 脇谷 滋之*³⁾

関節軟骨が修復困難なことは、古代ギリシア時代から知られている¹⁾。今年4月に、日本の整形外科領域では初めての細胞治療として自家軟骨細胞移植 (ACI) が保険収載された。Chesterman による家兎同種軟骨細胞移植から半世紀²⁾、Brittberg のヒト ACI から約 20 年³⁾、日本では Wakitani らが行った動物実験から 24 年⁴⁾、Ochi らによるヒト ACI から 10 年以上が経過している⁵⁾。関節軟骨の治療法に対しては、エビデンスレベルの高い臨床研究を長期間にわたって検証する必要がある。ドラッグラグやデバイスラグの課題を含めたインフラ整備も、今後より一層求められると考えられる。

Bone and Cartilage Diseases and Regeneration.

Cartilage repair and regenerative medicine ; past, present, and future.

Department of Health and Sports Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan.

Hisashi Mera

Department of Health and Sports Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan.

Department of Orthopedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

Maki Itokazu

Department of Health and Sports Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan.

Shigeyuki Wakitani

Since the days of ancient Greece, it has been known that articular cartilage has poor potential to repair. In April, 2013, autologous chondrocyte implantation (ACI) was approved by the Japanese ministry of Health, Labour and Welfare, as the first orthopedic cell therapy in Japan. Half a century has passed since Chesterman's report on rabbit allogeneic chondrocyte implantation, and approximately 20 years since the first human ACI report by Brittberg. In Japan, 24 years has passed since Wakitani's allogeneic chondrocyte implantation, and over 10 years since the human ACI report by Ochi. A long-term follow-up clinical trial

*武庫川女子大学健康・スポーツ科学科 ¹⁾ (めら・ひさし) ²⁾ (いとかず・まき) ³⁾ 教授 (わきたに・しげゆき)

*大阪市立大学大学院医学研究科整形外科

with the high statistical power is needed to verify the safety and efficacy of new cartilage joint therapy. Moreover, we need the infrastructure, including drug and/or device regulation and timely approved by the government, to apply new therapies in similar time frames to other developed nations.

はじめに～細胞治療の始まり～

関節軟骨欠損の修復が困難なことは、紀元前4～5世紀の古代ギリシアのヒポクラテスの時代から知られており、そのことは1743年にHunterによって紹介されている¹⁾。関節軟骨欠損はたとえ病変部が小さくても自然修復が困難であるが、ある程度深い骨軟骨の全層欠損症例では欠損部が線維軟骨で覆われることがある⁶⁾。このことは軟骨組織が主に緻密な細胞外基質で構成された無血管組織であるために、創傷治癒過程における生物学的反応に限界があることを示している⁶⁾。欠損部と骨髄を交通させる、いわゆる骨髄刺激法は創傷治癒の主体となる細胞遊走のきっかけとなるが、軟骨や周辺組織である骨髄・滑膜からの細胞がどのように寄与するかは不明な点が多い^{6) 7)}。また骨髄刺激法による線維軟骨の修復では、長期的な変形性関節症進行への懸念が残る。

欠損部の修復を促進させるため、何らかの細胞を移植することを考えた時に、本来そこにあるべき軟骨細胞を移植しようとするのは当然の発想で、1968年Chestermanらが家兎同種軟骨移植による関節軟骨欠損修復を報告した²⁾。また、1989年Wakitaniらは、家兎の実験系を用いて、コラーゲン・ゲルに包埋した同種軟骨細胞を移植し関節軟骨修復が促進されることを報告した⁴⁾。同年Grandeらは、家兎の実験系で自家軟骨細胞移植(ACI)により関節軟骨欠損の修復が促進されることを報告した⁸⁾。1994年Brittbergらによって、ヒトACIの23例が初めて報告された³⁾。有症状の関節軟骨欠損に対する治療法として、新た

に細胞治療が行われるようになった。以降、欧米を中心にACIが行われている。

ACIとEvidence based medicine (EBM)

初期のACIは、関節鏡視下に非荷重部の健全軟骨組織から細胞を分離し、単層で増殖させた細胞を細胞浮遊液にして病変部に注入し、脛骨から採取した骨膜で辺縁部を固定するというものであった。この方法による臨床成績では、8割以上の症例で良好な結果が得られ、術後ほぼ2年以内に不良例と経過が分かると報告された⁹⁾。しかしながら、ACIが軟骨欠損に対する治療法として確立するためには、他の治療法と比較したランダム化試験での評価が必要であると指摘されている¹⁰⁾。

また、ACIで得られた修復組織も、硝子軟骨に線維軟骨が混在していることが初期から報告されており⁹⁾、手技上の改善点も併せて改良が試みられている。いわゆる第二世代のACIは、病変部の被包素材としてブタ由来コラーゲン膜を自家骨膜の代替に用い、手術侵襲を軽減したが、組織像に対する影響は不明なままである¹¹⁾。また、担体(マトリックス)膜上で培養した自家軟骨細胞をそのまま移植するマトリックス誘導性自家軟骨細胞移植(MACI)や、ヒアルロン酸およびコラーゲン・ゲルなどのスキャフォールドに包埋した自家軟骨細胞を移植する、いわゆる第三世代のACIによって操作性と細胞集積性が改善された^{12) 13)}。しかし、これらの臨床研究も初期のACIで指摘されたのと同様に¹⁰⁾、軟骨欠損に対する治療体系の中で細胞治療を位置づけるための十分なエビデンス

ACI：自家軟骨細胞移植、EBM：evidence based medicine、MACI：マトリックス誘導性自家軟骨細胞移植

レベルは満たしていない。高いエビデンスレベルを満たす研究結果を得るためには、多施設共同ランダム化群間比較前向き試験が研究デザインとして必要である。

Sarisらは、ACIと骨髄刺激法を比較した多施設共同ランダム化群間比較前向き試験を行った¹⁴⁾。その結果、術後1年経過時の臨床成績は両群間で差はないものの、ACI群の組織像が良好なため、今後長期の臨床成績に影響する可能性を示唆している¹⁴⁾。また、ACIに関する費用対効果についても検討されており¹⁵⁾、今後さらに、安価・簡便かつ長期間安定した成績を保證する治療戦略や、それに基づく研究開発が求められている。

細胞源

前述の通り、ACIでは自己関節軟骨細胞を用いるため非荷重部の健常軟骨組織を採取する必要がある。十分な数の軟骨細胞を得るためには、相応の正常軟骨組織を採取するか、細胞の単離後に増殖させる必要がある。しかし、軟骨組織は細胞成分に乏しいうえ、採取できる正常軟骨組織の量に限界があり、さらに増殖させた軟骨細胞は脱分化し本来の機能を失うため、治療対象となる欠損部の大きさには自ずと制限がある。そこで、極力小さな組織侵襲で採取でき、さらに十分量の細胞数確保のためには増殖させた後も分化誘導できる前駆細胞が臨床応用には望ましい。また、軟骨細胞移植では正常軟骨採取のために手術室での関節鏡手術が必要であるが、骨軟骨前駆細胞として早くから注目されてきた骨髄細胞は、外来での局所麻酔でも採取が可能である。そのうえ、骨髄細胞は培養による増殖が可能のため臨床応用に適している。いくつかの間葉系細胞マーカーが陽性で、骨、軟骨、筋肉、脂肪などに分化するため、骨髄間葉系細胞と呼ばれるようになった^{16)~19)}。また、これら骨髄間葉系細胞は、免疫抑制、線維瘢痕化抑制、アポトーシス、血管新生などに関わる液性因

子を分泌するため、自身の分化能とは別に組織修復促進効果も期待されている^{20)~22)}。1994年、Wakitaniらは家兎関節軟骨欠損モデルを用いて骨髄細胞移植の有用性を報告した¹⁷⁾。さらに、1998年に世界で初めて骨髄細胞をヒトの関節軟骨欠損の治療に応用し²³⁾、骨髄細胞を用いた軟骨欠損修復治療の臨床研究を進めている^{24)~27)}。これらに関しては後に詳しく述べる。

また骨髄細胞と同様、滑膜細胞も軟骨修復に応用可能な間葉系細胞として研究されている^{28)~30)}。Sekiyaらは、*in vitro*の実験系で滑膜細胞が増殖能と軟骨分化能において骨髄細胞より優れていることを証明した³¹⁾。関節炎を伴う関節液中に間葉系細胞が存在することはJonesらによって既に報告されていたが³²⁾、Sekiyaらは変形性膝関節症のX線重症度と関節液中の間葉系細胞数が相関し、さらにそれらが滑膜由来の細胞に類似することを示した³³⁾。このことは変形性関節症が伴う関節内組織損傷に対して、組織修復に働く細胞源が主に滑膜組織由来である可能性を示唆している。彼らは現在、関節軟骨欠損だけでなく半月板再生や変形性関節症に対する滑膜細胞を用いた治療の研究を進めている^{34) 35)}。

前臨床試験と臨床試験

実際に新規治療法を応用するには動物を用いた前臨床試験から、ヒトに対する臨床試験へと進み、その有効性や安全性の検証が求められる。

1994年Wakitaniらは、家兎関節軟骨欠損モデルを用いて骨髄細胞移植の有用性を報告した¹⁷⁾。骨髄細胞を培養し、移植直前にコラーゲン・ゲルに包埋して、家兎の膝大腿骨内側顆荷重部に作成した6×3×3mmの骨軟骨欠損部に充填した。移植2週間後の修復組織は骨軟骨欠損部全域が硝子軟骨様組織となり、その後、骨髄に接する部分から細胞の肥大化が生じ、さらに血管侵入が起こり骨に置換され関節側表面の軟骨は残った。この

ことは移植片の未分化な骨髄細胞が、周囲の環境によって内軟骨性骨化と類似した経過をとっていると考えられる。

Wakitaniらは、1998年に世界で初めてこの方法をヒトの関節軟骨欠損の治療に応用した²⁴⁾。2例のヒト膝蓋骨軟骨欠損症患者から、手術3週間前に腸骨から骨髄液を採取し、接着細胞を培養・増殖させ、移植前にコラーゲン・ゲルに包埋した。軟骨欠損部には軟部組織を搔破し軟骨下骨にドリリングを行い、細胞を包埋したコラーゲン・ゲルを置き、脛骨から採取した本人の骨膜を、その骨形成層を移植片側に向けてカバーした。2例とも術後7～8週の関節鏡では、軟骨組織の修復を認め、臨床症状の改善は顕著だった。しかし、この研究では細胞を移植しないコントロール群との比較がなく、臨床症状の改善が細胞移植によるものかを判断することが困難であった。

そこで、Wakitaniらは内側型変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術 (high tibial osteotomy: HTO) を予定していた24例を対象に、骨髄細胞移植の治療介入の有効性を検討した³⁶⁾。コラーゲン・ゲル担体のみの移植 (コントロール群) と骨髄細胞を含むコラーゲン・ゲルの移植 (細胞移植群) をそれぞれ12例ずつ行い、両群を比較した。手術後約1年半の臨床成績では両群とも術前に比べて有意に改善したが、両群間での改善度に差はなかった。同意が得られた症例で関節鏡下の組織生検を行い、修復組織を20点満点で評価したところ、移植後7週では細胞治療群で9.8点、コントロール群で7.8点、42週でもそれぞれ15.4点と10.7点であり、細胞治療群が有意に良好だった。臨床成績に差が認められなかったのは、HTOのみでも臨床症状が改善されるためであると考えられる。今後長期の経過で、臨床成績

に差が出る可能性が考えられる。さらにKurodaら²⁶⁾やWakitaniら²⁵⁾により、自己骨髄細胞移植の有効性についての報告がなされている。

また安全面でいうと細胞移植によるこの方法は、早くから骨髄細胞の造腫瘍性の問題が示唆されていた。2005年にRubioらがヒト脂肪由来幹細胞を長期間培養すると癌化することを報告したが³⁷⁾、この論文はデータの再現性がなく2010年8月に撤回されている。腫瘍形成の可能性については長期の安全性を示すことが重要であるが、Wakitaniらが行った1998年1月から2008年12月までの10年11カ月間に実施された自己骨髄細胞移植41例45膝で、平均観察期間6年3カ月の経過では、少なくとも局所の感染も腫瘍形成も認められていない²⁷⁾。

このように、骨髄細胞移植の有効性や安全性が明らかになった。さらに臨床において広く受け入れられるために、侵襲の大きい従来の関節切開から関節鏡下で細胞を移植し手術侵襲を低減することを目指している。骨髄細胞の関節内注射が関節軟骨損傷に有効であることは動物実験ですでに報告されている³⁸⁾。その結果を踏まえ、我々は関節軟骨欠損に対する関節鏡視下の骨髄刺激法に関節内注射による自己骨髄細胞移植を併用した治療法の臨床試験を開始した (2013年11月)。この臨床研究は、多施設共同非盲検ランダム化並行群間比較試験として行われ、西日本を中心とする8施設が参加している。この方法の有効性が明らかになれば、低侵襲関節軟骨修復の開発につながり、世界各国で広く用いられる安全で汎用性の高い関節軟骨再生治療法になる可能性がある。

細胞医療のインフラ整備

細胞医療を実現するための整備も進められている。通常、治療に使用する細胞を培養するために

HTO : high tibial osteotomy (高位脛骨骨切り術)

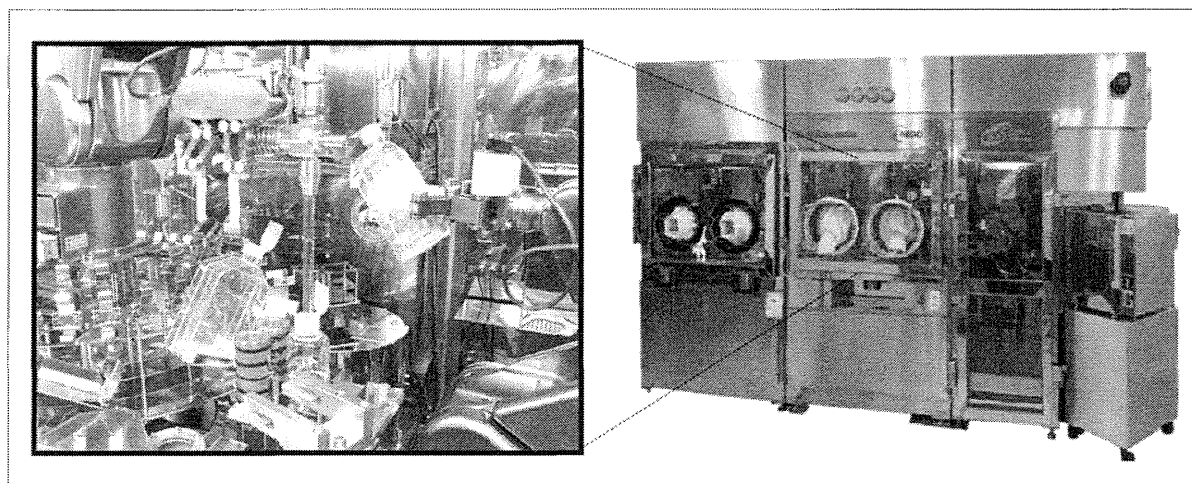


図 川崎重工業株式会社と共同で開発した自動細胞培養装置 (R-CPX)

2台のロボットアームを中心に培地の交換や継代などの操作が自動化されている。海外での市場拡大を期待し、今年9月にはタイ王国のチュラロンコン大学医学部に設置された。

(筆者提供)

は、ヒト移植用細胞培養施設 (cell processing center : CPC) が利用される。CPC は非常に高度なクリーン環境が必要なため、数億円の初期投資や年間数千百万円の維持費用がかかる。さらに高度な技術者も必要で、運営には大きな努力を要する。そこで、CPC を必要とせず、操作の自動化を目的として、川崎重工業株式会社と共同で自動細胞培養装置 (R-CPX : 図) を開発し、大阪大学医学部附属病院未来医療センター (Medical Center for Translational Research : MTR) に設置している。また海外への市場拡大を期待して、今年9月にタイのチュラロンコン (Chulalongkorn) 大学医学部内にも R-CPX が導入され、関節軟骨欠損に対する細胞治療の実証実験を計画している。R-CPX は、2台のロボットアームを中心に培地の交換や継代などの操作も自動化されている。また、R-CPX 内部は過酸化水素蒸気による滅菌が可能で、内部を常に高いクリーン度に保つ

ことができ、複数患者の細胞培養もコンピュータ制御され交差感染も防止できる。

また、このようなハード面での整備に加え、施設間の細胞培養の委託システムの構築も進めている。細胞の委託システムが構築されれば、CPC がない施設でも細胞治療を行うことが可能であり、逆に、これまで CPC を備えていてもシーズ不足で十分に運用されていなかった施設の活性化 (各地域での細胞治療の HUB として運用) も可能である。これらインフラの整備によって、関節軟骨のみならずあらゆる細胞医療が促進されると考えられる。

■ おわりに ~今後の展開~

今年4月、わが国の整形外科領域における初めての細胞治療として、ACI が保険取載された。Chesterman による家兎同種軟骨細胞移植から半世紀²⁾、Brittberg のヒト ACI から約 20 年³⁾、日

CPC : cell processing center (ヒト移植用細胞培養施設), R-CPX : 自動細胞培養装置
MTR : Medical Center for Translational Research, ncRNA : non-coding RNA

本では Wakitani らが行った動物実験から 24 年経過し⁴⁾, Ochi らによるヒト ACI の報告から 10 年以上が経過している⁵⁾。関節軟骨疾患はその性質上、治療評価に長期間を要することは避けられず、その間に科学技術の進歩や医療経済などが大きく変化する可能性がある。この 10 年を見ても iPS 細胞の出現で医療業界が大きく変革されたといわれている³⁹⁾。関節軟骨疾患の研究分野でも、細胞内シグナル分子や non-coding RNA (ncRNA) の研究、低分子化合物の開発、Drug Delivery System の研究などで目覚ましい発展を遂げている。

今後このような日進月歩の科学技術から有望なシーズを探し、費用対効果を含めたエビデンスレベルの高い臨床研究によって個々に検証することがますます重要になってくると考えられる。また、これらの臨床研究で明らかになった問題点やニーズを、基礎研究や前臨床試験に反映させる(いわゆる apply back, clinical research cycle などのトランスレーショナルリサーチの概念)ことにより、研究分野全体としても費用対効果が高く、より効率の良い研究が進められると考えられる。また再生・細胞医療を広く普及させるためには、ドラッグラグやデバイスラグなど法的な問題も含めたインフラ整備への努力も、より一層求められると考えられる。

文 献

- 1) Hunter W : Of the structure and disease of articulating cartilages. *Philosophical Transactions* **42** : 514-521, 1743.
- 2) Chesterman PJ, Smith AU : Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* **50** : 184-197, 1968.
- 3) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331** : 889-895, 1994.
- 4) Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, et al : Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* **71** : 74-80, 1989.
- 5) Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, et al : Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* **84** : 571-578, 2002.
- 6) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ : Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **75** : 532-553, 1993.
- 7) Dell'Accio F, Vincent TL : Joint surface defects : clinical course and cellular response in spontaneous and experimental lesions. *Eur Cell Mater* **20** : 210-217, 2010.
- 8) Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al : The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* **7** : 208-218, 1989.
- 9) Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, et al : Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* **85-A** (Suppl 3) : 109-115, 2003.
- 10) Lohmander LS : Tissue engineering of cartilage: do we need it, can we do it, is it good and can we prove it? *Novartis Found Symp* **249** : 2-10 ; discussion 10-16, 170-174, 239-141, 2003.
- 11) Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, et al : A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee : Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* **13** : 203-210, 2006.
- 12) Zheng MH, Willers C, Kirilak L, et al : Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) : biological and histological assess-

- ment. *Tissue Eng* **13** : 737-746, 2007.
- 13) Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, et al : Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **15** : 610-619, 2007.
 - 14) Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, et al : Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med* **36** : 235-246, 2008.
 - 15) Vavken P, Gruber M, Dorotka R : [Tissue engineering in orthopaedic surgery--clinical effectiveness and cost effectiveness of autologous chondrocyte transplantation]. *Z Orthop Unfall* **146** : 26-30, 2008.
 - 16) Caplan AI : Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9** : 641-650, 1991.
 - 17) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **76** : 579-592, 1994.
 - 18) Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, et al : The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* **170** : 73-82, 2002.
 - 19) Gao J, Caplan AI : Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Chir Organi Mov* **88** : 305-316, 2003.
 - 20) Caplan AI, Dennis JE : Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* **98** : 1076-1084, 2006.
 - 21) Ko IK, Kean TJ, Dennis JE : Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells. *Biomaterials* **30** : 3702-3710, 2009.
 - 22) Kean TJ, Duesler L, Young RG, et al : Development of a peptide-targeted, myocardial ischemia-homing, mesenchymal stem cell. *J Drug Target* **20** : 23-32, 2012.
 - 23) Wakitani S, Goto T, Young RG, et al : Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* **4** : 429-444, 1998.
 - 24) Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, et al : Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae : two case reports. *Cell Transplant* **13** : 595-600, 2004.
 - 25) Wakitani S, Nawata M, Tensho K, et al : Repair of articular cartilage defects in the patellofemoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation : three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* **1** : 74-79, 2007.
 - 26) Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, et al : Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* **15** : 226-231, 2007.
 - 27) Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al : Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* **5** : 146-150, 2011.
 - 28) Koga H, Muneta T, Ju YJ, et al : Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* **25** : 689-696, 2007.
 - 29) 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.
 - 30) Ando W, Tateishi K, Katakai D, et al : In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells : biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A* **14** : 2041-2049, 2008.
 - 31) Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, et al : In vitro chondrogenesis of human synovium-de-

- rived mesenchymal stem cells : optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* **97** : 84-97, 2006.
- 32) Jones EA, English A, Henshaw K, et al : Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* **50** : 817-827, 2004.
- 33) 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* **30** : 943-949, 2012.
- 34) 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.
- 35) Katagiri H, Muneta T, Tsuji K, et al : Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun* **435** : 603-609, 2013.
- 36) Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al : Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* **10** : 199-206, 2002.
- 37) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al : Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* **65** : 3035-3039, 2005.
- 38) McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, et al : Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* **27** : 1552-1561, 2011.
- 39) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1** : 39-49, 2007.

骨・軟骨再生

自家培養軟骨移植による 軟骨再生治療と 磁気ターゲティングによる 新たな治療開発

広島大学大学院医歯薬保健学研究院統合健康科学部門医学分野整形外科

亀井 豪器, 安達 伸生, 越智 光夫

KEY WORDS

- 広範囲軟骨損傷
- 培養軟骨移植術
- 磁性化幹細胞
- 外磁場装置

Autologous chondrocyte
implantation and new therapy
with application of magnetic
targeting for large cartilage
defect and osteoarthritis.

Goki Kamei (助教)

Nobuo Adachi (准教授)

Mitsuo Ochi (教授)

I. 培養軟骨細胞移植

1994年, Brittbergらが単層培養を利用した培養自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation; ACI) についてはじめて報告した¹⁾。2~9年の追跡調査可能であった94例につき, 良好な成績であったことを報告しているが, この方法では, 浮遊液の状態で軟骨細胞が移植されているため, パッチした骨膜から軟骨細胞が漏出してしまふ可能性がある, 単層培養により軟骨細胞が脱分化してしまう, また移植された軟骨細胞が均一に分布するの, といった問題点があった。Ochiらは, 再生医療の基礎である足場としてアテロコラーゲンゲルに着目した。

アテロコラーゲンゲルは, 抗原性を有する末端のテロペプチドが除去されているため, 免疫応答がきわめて少なく安全性が高い。また, その構造も非常に密なメッシュ状であり, 細胞培養の足場として最適と考えられる。また, アテロコラーゲンゲル内で培養すると, 軟骨細胞は, 脱分化することなく, 形質を保ったまま増殖することができ, 周囲にコンドロイチン硫酸やII型コラーゲンなどの細胞外基質を産生することが確認されている²⁾。自家軟骨細胞をアテロコラーゲンゲルに包埋し, 培養を行う三次元培養方法により作製した軟骨様組織を移植する方法を世界に先駆けて開発し, 1996年より臨床応用を開始している³⁾⁴⁾。以後, 良好

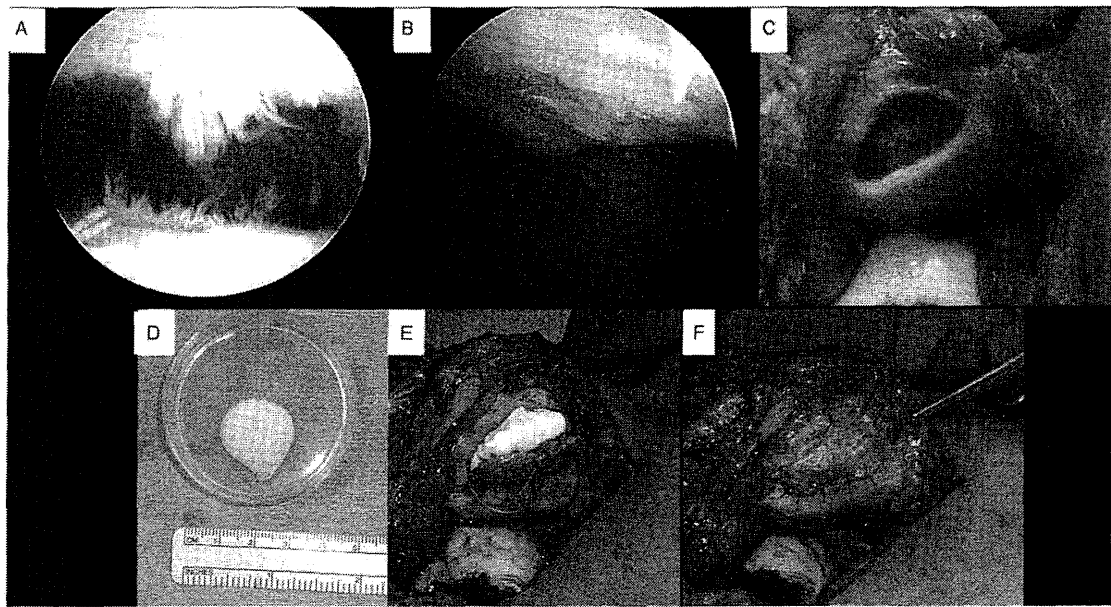


図1. 培養軟骨移植

A: 関節鏡；移植前, B: 関節鏡；術後1年, C: 移植時；損傷軟骨搔爬後, D: アテロコラーゲン包埋培養軟骨, E: 培養軟骨移植, F: 骨膜縫合後

な成績をおさめており、以下にその概要を示す。

2002年～2011年に、広島大学病院にて軟骨損傷に対しアテロコラーゲン包埋培養軟骨細胞移植を行った48例のうち、46例で術後1年以上経過観察が可能であった。男性31例、女性15例、手術時年齢は13～45歳(平均26.5歳)、症例の内訳は、外傷による軟骨損傷28膝、離断性骨軟骨炎12膝、骨壊死3膝、反復性膝蓋骨脱臼2膝、多発性骨端軟骨異形成症1膝であった。軟骨損傷の部位は大腿骨内側顆22膝、大腿骨外側顆16膝、膝蓋骨7膝、大腿骨滑車部1膝であった。軟骨損傷の範囲100～900mm²(平均334mm²)であり、術後経過観察期間は1～8.5年(平均3.8年)であった。Lysholm scoreは術前69.2点～術後93.0点と有意に改善し、術後最終の関節鏡所見ではICRS scoreは7～12点(平均10.7点)；grade II (nearly normal) 以上の良好な軟骨再生を示

していた(図1)。MRIでの再生軟骨の評価をmodified MOCART scoreを用いて行った。術前平均9.6点から最終経過観察時平均71.6点と有意に改善し、多くの症例で術後早期は周囲健全部軟骨より高輝度であったが、経時的に周囲健全部軟骨に近似した輝度に推移していった。また術後1年時のInternational cartilage repair society II scoreのoverall scoreは平均70.1点と良好な軟骨再生を示していた。本法は、広島大学病院を含む全国の5施設で臨床治験を終了し、2012年7月に厚生労働省より製造販売承認され、2013年4月に保険収載される予定である。

II. 磁気ターゲティングによる新たな軟骨再生治療

コラーゲンゲル包埋自家軟骨細胞移植には、採取可能な軟骨片に制限があること、2段階手術であること、関節

切開が必要であること、限局した軟骨欠損部位に対してのみ適応可能であること、現時点では高齢者、変形性膝関節症に対して適応がないことなどの問題点がある。このように、現在の培養軟骨細胞移植では、広範囲の軟骨損傷を有する変形性膝関節症の患者の治療を行うことは困難である。そこでわれわれは比較的容易に採取・培養可能な間葉系幹細胞に着目した。Pittengerらがヒト骨髓から幹細胞を抽出し、*in vitro*でさまざまな間葉系細胞に分化することを証明して以来、間葉系幹細胞は間葉系組織修復における有力な細胞源として注目されている⁹⁾。現在までに、間葉系幹細胞を関節内に注入し、軟骨修復を得られたとするさまざまな報告があるが、幹細胞を関節内に注入するのみでは、欠損部に効率的に細胞を集めることは困難であり、軟骨再生のためにはより多くの細胞を必要とする。しかし、関節内に注入し、拡散する細

胞数が多くなると、瘢痕を生じるなどの合併症が報告されている⁶⁾。そのため、われわれは骨髄間葉系幹細胞をMRI造影剤にて磁気標識した後(磁性化幹細胞)に関節内に注入し、外磁場装置を用いて効率的に軟骨欠損部に細胞を誘導・集積させる新しい細胞デリバリーシステムを考案し、研究を行っている。

Ⅲ. 磁性化幹細胞の軟骨分化能

培養して得られた間葉系幹細胞とMRI造影剤であるフェルカルボトラン(粒子径約50nm)を24時間共培養することにより、磁性体を幹細胞内に取り込ませることが可能である。*in vitro*において、ArbabらがMRI造影剤は幹細胞への細胞毒性はなく、また幹細胞の軟骨分化を阻害しないことを報告している⁷⁾。しかし、磁場をかけた磁性化幹細胞の軟骨分化を評価した報告はなく、磁場(1.5テスラ/10分)をかけた磁性化幹細胞、磁性化幹細胞と通常の幹細胞(非磁性化)の3群で検討した。それぞれ 2×10^5 個の細胞を21日間のペレット培養後に、サフラニンO染色、トルイジンブルー染色、RT-PCR(タイプIIコラーゲン、アグリカン、sox9)により評価した。軟骨分化能は3群で有意差はなく、磁性化・磁場による軟骨分化能への影響は認めなかった。

Ⅳ. 磁場装置・動物実験

当科では、直径60cmの円盤状の装置に最大0.6テスラの磁場を発生させることが可能であり、最大の特徴としては流す電流を変化させることで磁場

の強さを変えることが可能な、可変式外磁場装置を開発し、研究を行ってきた。まず、当科のKobayashiらは、ブタの凍結膝関節を用いて、関節鏡下に骨髄間葉系幹細胞のデリバリーが可能かどうかの検討を行った。磁気標識した幹細胞が外磁場に誘導され、軟骨欠損部に集積する様子を確認し、また90分経過した後の関節鏡所見でも、注入時に集積した幹細胞が軟骨欠損部位に接着している様子を確認した。関節鏡下に細胞を関節内に注入し、外磁場をかけることにより軟骨欠損部へ効率的に細胞を誘導し、欠損部に細胞をとどめることが可能であることを証明した⁸⁾。また、変形性膝関節症患者への応用を考え、*in vitro*においてこのデリバリーシステムの評価を行った。人工膝関節置換術患者の同意を得て変性軟骨を含む骨軟骨片を採取し、組織培養フラスコの側面に貼り付け、前十字靭帯再建術患者から得た磁性化骨髄由来幹細胞を外磁場下に変性軟骨の表面に誘導し、その状態を6時間維持した。その後、軟骨分化培地を用いて3週間培養し、軟骨の表面性状をサフラニンO染色、タイプIIコラーゲン染色で評価した。変性軟骨の表層に細胞外器質が生成されていることが確認され、変形性膝関節症に対する治療方法になる可能性が示唆された⁹⁾。しかし、臨床応用を考えた場合、外磁場装置はより小さく、1点で磁場が強くなっている構造が望まれる。前述の外磁場装置は直径60cmと大きく、また細胞を確実に軟骨損傷部位に集積させるためには磁場が弱く、発生部位の磁束密度傾斜が弱かった。超伝導バルク磁石システムを用いて、先端の直径が10cmと小型化に成功しており、また最高磁場が中心で

約6テスラと強力な磁場装置を開発し、研究を行っている。操作性が向上し、磁束密度傾斜が強いため、関節軟骨欠損部位に集中して誘導させることが可能となってきた。

現在、この外磁場装置・ミニブタを用いて動物実験を行っている。この治療方法は、磁性化幹細胞を軟骨欠損部に生着させることをコンセプトとしており、*ex-vivo*では前述のように細胞接着性を確認したが、実際の臨床では関節屈伸、荷重により細胞が剥がれることが懸念される。そのため、われわれは関節鏡下に軟骨損傷部を確認し、外部から軟骨損傷部に向けて磁場をあて、磁気標識した細胞を注射し、約10分間磁場をあて細胞を集積させ、その後、磁場を除去し、生理食塩水環流下でも細胞が欠損部から離れないことを確認している(図2)。また、細胞注射後1週における鉄染色、DiI染色評価で、注射した細胞が軟骨損傷部に集積していることも確認した。現在、磁性化幹細胞+外磁場装置使用群、通常幹細胞注射群、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)注射群の3群を比較検討している。6、12週の時点で関節鏡評価、12、24週の時点で組織評価を行い、磁性化幹細胞+外磁場装置使用群は他2群と比較し良好な軟骨再生を示しており¹⁰⁾、今後、広範囲軟骨損傷、変形性関節症の新たな治療方法の1つになると考えている。

文 献

- 1) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331: 889-895, 1994

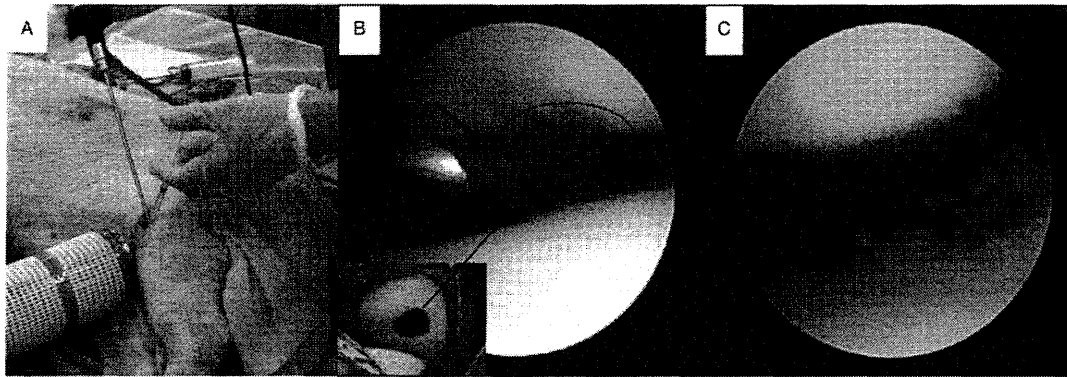


図2. ミニブタ実験

A : 外観, B : 磁性化幹細胞注射時, C : 磁性化幹細胞集積後

- 2) Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, et al : Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 50 : 138-143, 2000
- 3) Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, et al : Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 84 : 571-578, 2002
- 4) Ochi M, Uchio Y, Tobita M, et al : Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 25 : 172-179, 2001
- 5) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
- 6) Agung M, Ochi M, Yanada S, et al : Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14 : 1307-1314, 2006
- 7) Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, et al : Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed* 18 : 553-559, 2005
- 8) Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, et al : A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair. *Arthroscopy* 24 : 69-76, 2008
- 9) Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, et al : Augmentation of degenerated human cartilage *in vitro* using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device. *Arthroscopy* 25 : 1435-1441, 2009
- 10) Kamei G, Ochi M, Kobayashi T, et al : Articular cartilage repair with magnetic mesenchymal stem cells. *Am J Sports Med* (in press)

