

## シンポジウム 骨関節の再生医療の現状と展望

## 滑膜幹細胞による半月板再生\*

関矢 一郎<sup>1</sup> 宗田 大<sup>2</sup>

## 半月板損傷・疾患に対する半月板温存治療の現状

厚生省社会医療診療行為別調査によると、日本の半月板手術は年間約3万件であり、そのうち縫合術は10%以下で、切除術が90%以上を占める。半月板を広範囲に切除した場合は、変形性膝関節症が必発する。部分的に切除しても、半月板のフープ機能が破綻し、半月板が逸脱するリスクが増す。日本で、半月板損傷の機能維持治療の第1選択は半月板縫合術であるが、その適応は一般的には血行が存在する部位の変性のない縦断裂に限られる。半月板切除を受けなくても、繰り返しの外力や加齢により、半月板は逸脱、摩耗、消失し、機能が低下する。半月板の損傷や変性は若年から老年に幅広く分布しており、超高齢化社会を迎えた日本では、健康寿命を延伸させるため、半月板損傷・疾患に対する温存治療は、解決すべき重要な問題である。

## 滑膜由来のコロニー形成細胞

滑膜を酵素処理して得られる滑膜細胞を、2週間培養するとおよそ1%の細胞が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、特定の条件で培養すると、軟骨、骨、脂肪に分化し、多分化能を有することが示される。このコロニー形成細胞は特有の

**Key words:** Synovium, Mesenchymal stem cells, Meniscus, Regeneration, Synovial fluid

\*Meniscus regeneration with synovial mesenchymal stem cells

<sup>1</sup>東京医科歯科大学再生医療研究センター。Ichiro Sekiya: Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学講座運動器外科学分野。Takeshi Muneta: Department of Orthopaedic Surgery and Sports Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

利益相反申告あり

表面抗原を示し、間葉系幹細胞と呼ばれる。

私たちはこれまで、滑膜由来の間葉系幹細胞(滑膜幹細胞)は自己血清で得られる収量が多く<sup>1)</sup>、軟骨分化能力が高く<sup>2),3)</sup>、未分化な滑膜幹細胞を軟骨欠損部に移植すると軟骨が再生する<sup>4)</sup>ことを報告した。また、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、軟骨再生を促進することをウサギ<sup>5),6)</sup>やミニブタ<sup>7)</sup>のモデルで示した。

これらの成果をもとに、2008年から軟骨欠損に対する滑膜幹細胞の鏡視下移植術を開始した。特に移植術に起因すると考えられる副作用を認めず、多くの例で症状や軟骨欠損部の改善を認めている。滑膜幹細胞はすべての組織に分化する能力には劣るが、調整が容易で、安全性が高い点で、軟骨再生の細胞源として有用である。

## 半月板損傷と関節液中の間葉系幹細胞

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、コロニー形成細胞はわずかに認めるのみである。半月板損傷膝の関節液を培養するとより多くのコロニー形成細胞を認める。このコロニー形成細胞は多分化能を有し、特有の表面抗原パターンを示すことから、間葉系幹細胞の特徴を有する。関節液中の間葉系幹細胞は半月板損傷後に増加する(図1)<sup>8)</sup>。

前十字靭帯損傷膝や変形性関節症膝の関節液中には、正常膝と比較して多くの間葉系幹細胞が存在し、関節液中の間葉系幹細胞の遺伝子プロファイルは滑膜由来の間葉系幹細胞に類似する<sup>9),10)</sup>。また滑膜、前十字靭帯、半月板など関節内組織由来の間葉系幹細胞と、骨髄、皮下脂肪、骨格筋等の関節外組織由来の間葉系幹細胞を比較すると、関節内組織由来間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルは互いに類似する<sup>11)</sup>。

これらの知見は関節内疾患に対して滑膜が間葉系幹細胞の保存庫であることを示唆している。半月板、前

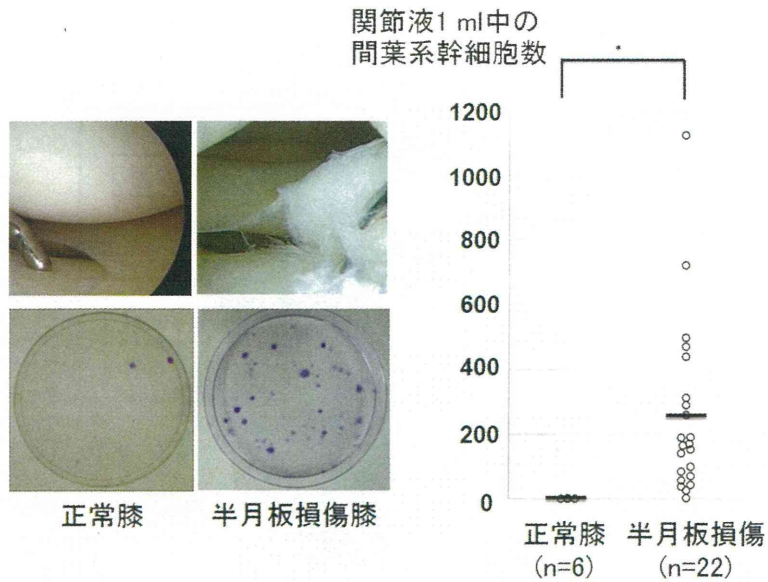


図1 関節液中の間葉系幹細胞は半月板損傷後に増加する。ヒトの正常膝と半月板損傷膝から関節液を採取し、細胞成分を14日間培養し、クリスタル・バイオレッドで染色した。正常膝からはコロニー形成細胞(間葉系幹細胞)が少数である一方、半月板損傷膝からは多数のコロニー形成細胞を認める。関節液1 mlあたりの間葉系幹細胞数は、正常膝よりも半月板損傷膝由来からのものが、有意に多い(\* p<0.01). [文献8より改変]

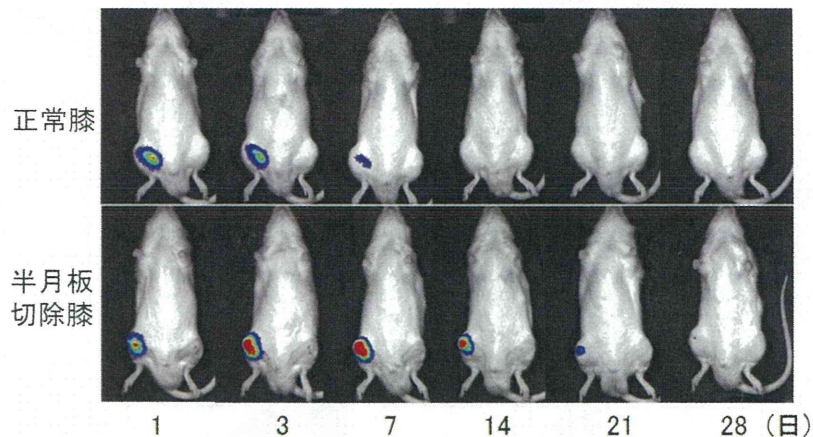


図2 膝関節に投与した滑膜幹細胞は関節外に移動しない。ラットの正常膝、および内側半月板切除膝にルシフェラーゼを発現する滑膜幹細胞を関節内注射し、移植細胞の局在を継続的に観察した。正常膝では14日の時点で検出限界(1000細胞)以下となる。半月板切除膝ではルシフェラーゼの活性が7日後に最大となり、その後減少し、28日後に検出限界(1000細胞)以下となる。[文献12より改変]

十字靭帯、関節軟骨等の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、自然修復に寄与する機序の存在が予測される。しかし関節液中に動員される絶対数が不足するため、自然修復には限界があると考えられる。そこで

滑膜幹細胞を体外で増殖させて、関節内損傷部位に移植することにより、自然治癒過程を促進できる可能性がある。



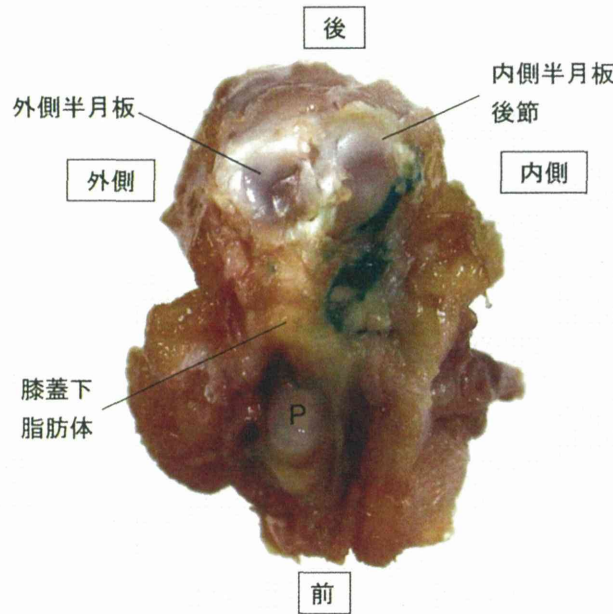


図3 関節内注射した滑膜幹細胞は半月板欠損部に効率よく接着する。ラットの内側半月板前方1/2を切除して閉創後、LacZを発現する滑膜幹細胞を関節内注射し、2週後に細胞の局在を観察した。滑膜幹細胞は半月板欠損部と関節包閉創部に観察される。[文献12より改変]

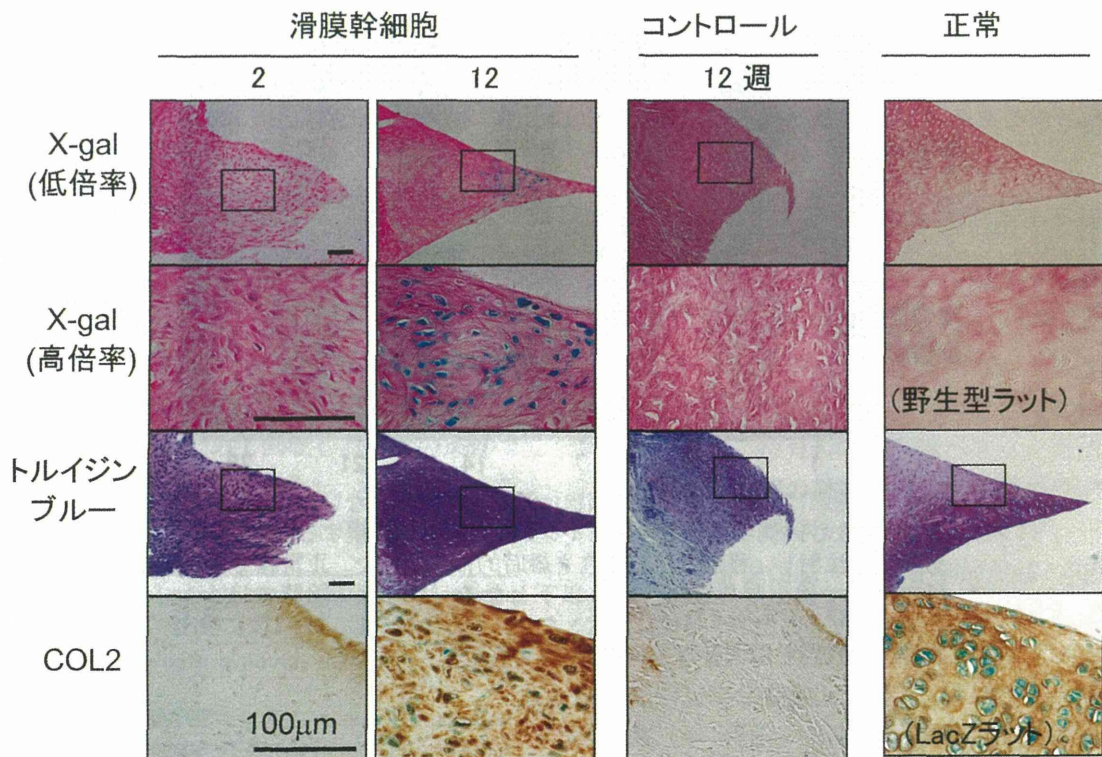


図4 滑膜幹細胞は半月板細胞に直接分化して半月板再生を促進する。ラット両膝の内側半月板前方1/2を切除して、LacZを発現する滑膜幹細胞を関節内注射し、半月板再生部を組織学的に観察した。滑膜幹細胞投与側では半月板切除部に、2週後にはすでに線維組織が観察され、12週後には半月板様組織で再生される。再生部位にはLacZ陽性細胞を多数認める。細胞を投与しないコントロール側では、2週後にはまだ半月板切除部には組織が認められず組織学的評価が不可能であり、12週後には線維組織が観察されるが2型コラーゲンの発現を認めない。[文献12より改変]

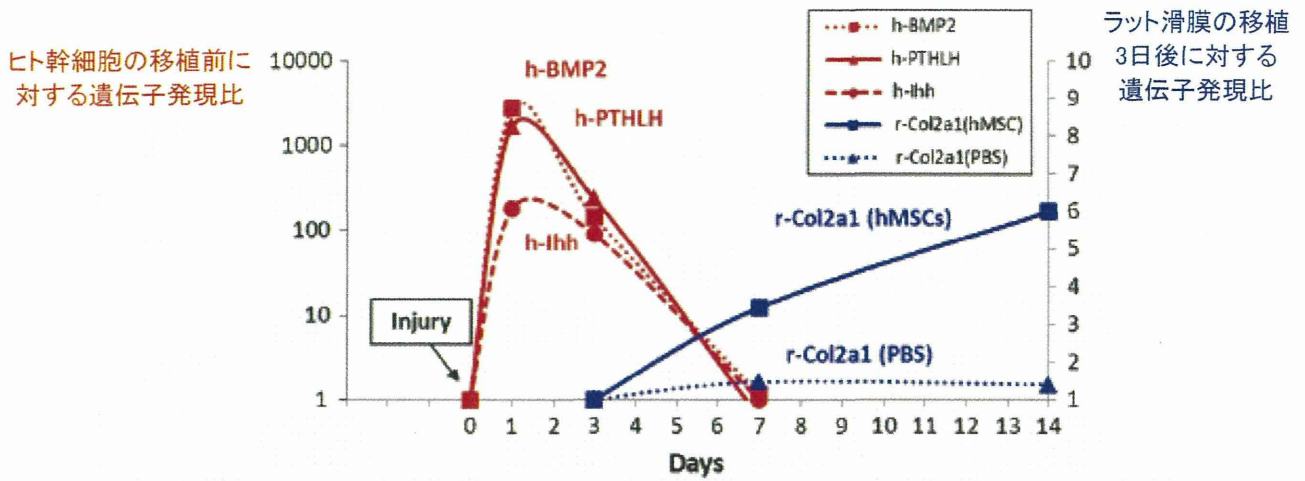


図5 間葉系幹細胞は栄養因子も産生する。ラットの内側半月板1/2を切除後、ヒトの間葉系幹細胞を関節内に投与し、切除部位周囲の滑膜を採取し、ヒトの遺伝子発現と、ラットの遺伝子発現を網羅的に解析した。投与したヒトの間葉系幹細胞は軟骨基質の産生を促進する機能を有する bone morphogenetic protein 2 (BMP2)の発現が1000倍以上増加した。さらに parathyroid hormone-like hormone (PTH1H)や Indian hedgehog (Ihh)の発現も増加した。ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を投与したものは、投与しないもの(PBS)と比較して、ラットの2型コラーゲンの発現が増加した。[文献13より改変]

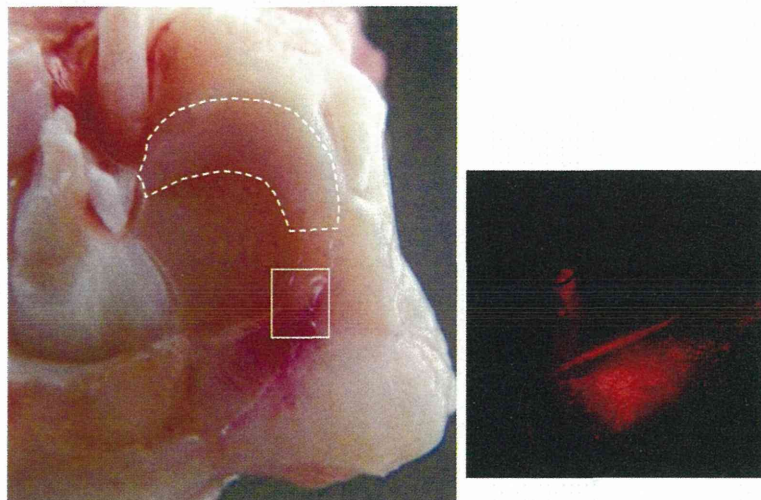


図6 ウサギモデルでも滑膜幹細胞は半月板欠損部に生着する。ウサギの内側半月板前方1/2を切除後、DiIで標識した滑膜幹細胞を関節内注射し、2週後に観察した。点線は残存内側半月板を、実線は右図で拡大した領域を示す。半月板欠損部はすでに周囲の滑膜組織と連続し、蛍光を当てるとDiIが観察される。[文献14より改変]

### 半月板前方2分の1切除モデルに対する滑膜幹細胞の関節内投与

ラットの半月板を切除した膝関節内に、滑膜幹細胞の浮遊液を関節内注射すると、細胞は関節内にとどまり、他の組織に移動するような現象を認めない(図2)。関節内注射した細胞は半月板欠損部に効率よく接着し

(図3)、半月板の再生を促進する(図4)。ラットモデルの場合、注射して12週経過後も、半月板再生部に標識した細胞を認め、注射した細胞が直接半月板細胞に分化することが示される<sup>13)</sup>。ヒトの間葉系幹細胞をラットの半月板を切除した膝関節内に注射するモデルの解析により、間葉系幹細胞はBMP2等の軟骨基質の産生を促進するような栄養因子も産生することが示



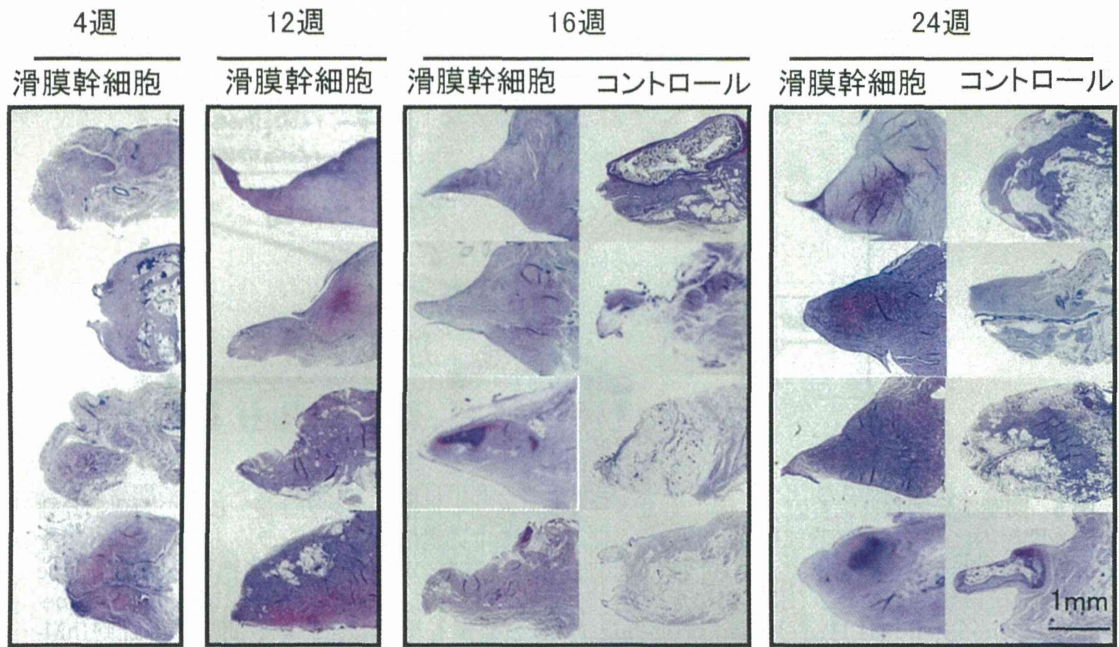


図7 ウサギモデルでも滑膜幹細胞は半月板再生を促進する. ウサギの両膝の内側半月板前方1/2を切除して, 滑膜幹細胞を関節内注射し, 半月板再生部を組織学的に観察した. 4匹の結果をすべて示す. 細胞を投与しないコントロール側は, 4週および12週では, まだ半月板切除部には組織が認められず組織学的評価が不可能であった. 各時期において, 滑膜幹細胞投与側は, コントロール側よりも, 半月板再生が促進されていた. [文献14より改変]

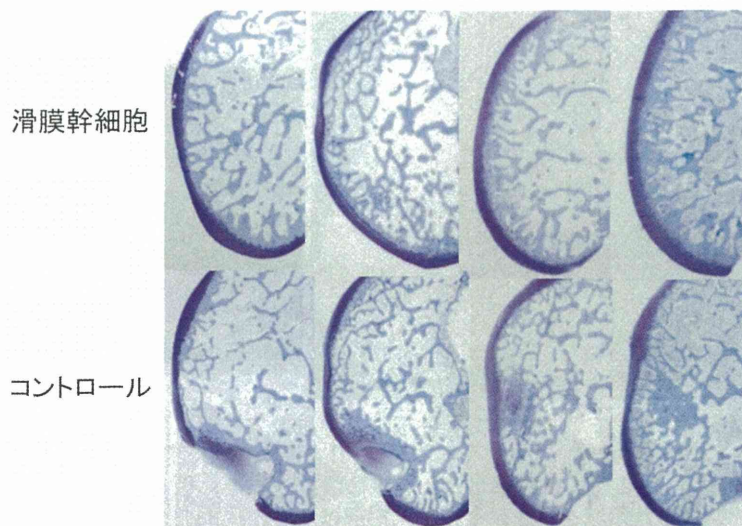


図8 滑膜幹細胞は軟骨変性を抑制する. ウサギの両膝の内側半月板前方1/2を切除して, 滑膜幹細胞を関節内注射し, 24週後に大腿骨内顆を組織学的に観察した. 矢状断切片をトルイジン・ブルー染色し, 4匹の結果をすべてペアにして示す. すべてのウサギで, 滑膜幹細胞投与側は, コントロール側よりも骨・軟骨が良好に示されている. [文献14より改変]

される(図5)<sup>13)</sup>. ウサギの半月板を切除して, 膝関節内に滑膜幹細胞の浮遊液を関節内注射すると, 滑膜幹細胞が半月板欠損部に効率よく接着し(図6), 半月板

の再生を促進し(図7), 隣接軟骨の変性を抑制する(図8)<sup>14)</sup>. 同様のことはブタのモデルでも再現される<sup>15)</sup>.

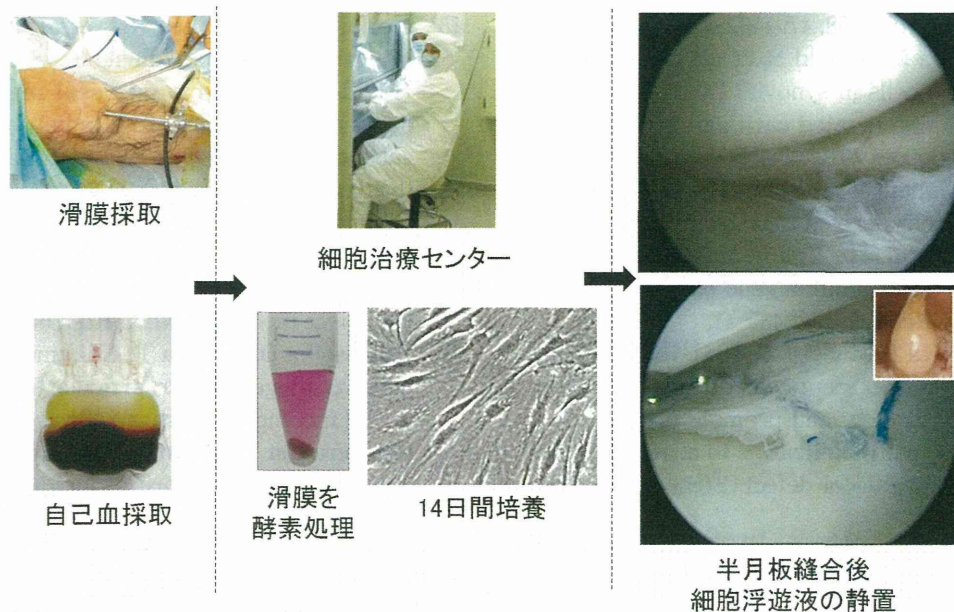


図9 現在実施中の細胞治療(半月板縫合後の滑膜幹細胞投与). 滑膜を酵素処理後, 自己血清を用いて14日間, 細胞治療センターで滑膜幹細胞を培養する. 半月板縫合術の適応を拡大し, 縫合後に滑膜幹細胞の浮遊液を10分間静置し, 半月板損傷部に接着させる. 半月板縫合術の成績向上を期待する.

また半月板断裂についても, ブタの半月板に縦断裂を作成し, 縫合後, 滑膜幹細胞を関節内投与すると, 修復が促進される(未公表データ).

### 計画中の細胞治療

軟骨再生の臨床研究の成果や一連の基礎研究に基づき, 半月板縫合術の適応を拡大して, 再断裂のリスクの高い半月板損傷や変性した半月板に対して縫合術を行い, さらに滑膜幹細胞を投与することにより, 半月板縫合術の成績を向上させることを期待する臨床研究を私たちは2014年7月に開始した(図9). 滑膜幹細胞の調整に関しては, これまで軟骨再生の際に行ってきた方法とほぼ同様である. 滑膜幹細胞の投与により, 半月板を温存する治療の発展を期待している.

### 文 献

- 1) 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* 2008; 58: 501-10.
- 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* 2005; 52: 2521-9.
- 3) 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* 2008; 333: 207-15.
- 4) 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* 2007; 25: 689-96.
- 5) 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* 2008; 10: R84.
- 6) Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, et al. Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 1300-9.
- 7) 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: 327-38.
- 8) Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, et al. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res* 2014; 472: 1357-64.
- 9) Morito T, Muneta T, Hara K, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intraarticular ligament injury in humans. *Rheu-*



## シンポジウム 運動器再生医療研究の最先端

## 滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順\*

関矢 一郎<sup>1</sup> 清水 則夫<sup>2</sup> 森尾 友宏<sup>3</sup> 宗田 大<sup>4</sup>

## はじめに

軟骨組織は細胞密度が低く、血行を欠くことから、再生能力が低い。そのため軟骨欠損部に対して細胞成分を補うことが、再生させるための手段のひとつになる。細胞源として間葉系幹細胞は有用であるが、なかでも滑膜由来のものは軟骨分化能が高く<sup>1),2)</sup>、自己血清を用いて優れた増殖を示す<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>、軟骨修復を促進させることが実験的に示されている<sup>5)</sup>。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本学で2008年より開始した。本稿では細胞調製を中心に紹介する。

## 自己血清の調製

滑膜を採取する数日前に末梢血を採取し、自己血清を用意する。自己血清の調製には市販されている血液成分分離バッグであるセルエイドを用いている。これは採血バッグ、保存バッグおよび予備バッグ等からなる(図1)。末梢血を採取後、ビーズが封入してある採

血バッグを室温で30分間振盪する。その後、採血バッグ・予備バッグ・保存バッグを重ね遠心カップにセットし、2000gで7分間の遠心分離を行い、血餅と血清に分離する。遠心分離した採血バッグを加圧し、連結チューブを介して血清のみを保存バッグに移し、シール密封して切り離し、血清のみを保存する。この血液成分分離バッグは採血から血清分離まですべての操作を閉鎖式に行うことが可能であり、清潔操作で簡単にでき有用である。約200mlの末梢血から平均約70mlの血清を採取できる。

## 滑膜組織の採取

局所麻酔による膝関節鏡検査を手術室で行い、膝関節内を評価した後に、鋭匙鉗子で滑膜採取する。脂肪性滑膜は採取しやすいが、線維性滑膜のほうが収率がよい<sup>6),7)</sup>。その一部を細菌培養試験と後述するウイルス・マイコプラズマ試験に使用する。

## 細胞治療センターでの調製

採取した滑膜の処理は清潔度の高い細胞治療センターで行う(図2)。本学の細胞治療センターはISO9001の認定を受けている。滑膜組織の重量を測定後、酵素処理を行い、有核細胞数をカウントし、10%自己血清を用いて培養を開始する。培養液に成長因子を全く添加していない。

## ウイルス・マイコプラズマ試験

移植する細胞やその浮遊液に混入が懸念されるウイルスとして、HBV、HCV、HIV、HTLV-1等がある(表1)。ウイルスの増殖には細胞への感染が必須であるが、多くのウイルスは細胞特異性が強くウイルスを組織培養により検出することは容易でなく、いまだ *in vitro* での感染増殖系がないウイルスも多い。私たちはひとつのPCR反応系に複数のプライマーを同時に

**Key words:** Cartilage, Regeneration, Synovium, Mesenchymal stem cells

\*Procedure of cartilage regenerative medicine with synovial mesenchymal stem cells

<sup>1</sup>東京医科歯科大学再生医療研究センター。Ichiro Sekiya: Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学。Norio Shimizu: Department of Virology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

<sup>3</sup>東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター。Tomohiro Morio: Center for Cell Therapy, Tokyo Medical and Dental University Hospital

<sup>4</sup>東京医科歯科大学大学院運動器外科学。Takeshi Muneta: Department of Joint Surgery and Sports medicine, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University  
利益相反申告なし



図1 血液成分分離バッグ(セルエイド). ①採血, ②振盪, ③血清分離の3ステップで, 閉鎖式に血清分離が可能である.



図2 本学の細胞治療センター. ISO9001を取得している.

表1 再生医療材料への混入が懸念されるウイルス17種類

<b>DNA ウイルス:</b>	
B型肝炎	HBV
単純ヘルペス	HSV1, 2
サイトメガロ	CMV
エプスタイン・バール	EBV
帯状疱疹	VZV
ヒトヘルペス	HHV6, 7, 8
パルボ	PVB19
ポリオーマ	JCV, BKV
<b>RNA ウイルス:</b>	
C型肝炎	HCV
<b>レトロウイルス:</b>	
	HIV1, 2
	HTLV1, 2

17種類のウイルスをマルチプレックスPCR法によりルーチンで検査している.

使用することで複数の遺伝子領域を同時に増幅するマルチプレックスPCR法により, 17種類のウイルス同時検出系による検査を施行している<sup>8)</sup>. 自動核酸抽出装置を使用し検体から核酸を抽出し, リアルタイムPCR機を使用し2時間以内に検査を完了する. 同様の方法でマイコプラズマ検査も施行している. 遺伝子配列から142種類のマイコプラズマ種が検出可能と推定され, 欧州薬局方記載の9種類が検出できることを実証している.

### 細胞移植

培養12日目に培養細胞の一部を抽出し, 細胞数算定, 細胞生存率, 無菌試験, ウイルス・マイコプラズマ試験, エンドトキシン試験を行い, 基準を満たしていることを確認後, 13日目に入院して, 14日目に細胞移植を行う. 移植は手術室で, 腰椎麻酔後, 関節鏡視下で行う. 細胞移植する軟骨の目的箇所を真上に向けて(図3), 還流液を排出し, 細胞浮遊液を目的箇所に静置し(図4), 10分間この肢位を保持する. 移植後は特に外固定を行わず, 翌日より可動域運動を開始し, 数日後に退院とする. 2週後より部分荷重, 6週後より全荷重開始としている.

### 染色体検査

細胞移植した全例に染色体検査を行っているが(図5), これまで染色体異常を生じた例はない. 私たちの方法は初代培養細胞のみを使用しているので, 染色体異常を生じる確率は低いものと考えられる.





図3 滑膜幹細胞移植の様子. 軟骨欠損部を真上に向けて関節鏡で観察しながら細胞浮遊液を静置する.



図4 細胞浮遊液を軟骨欠損部に静置する際の鏡視像



図5 移植する滑膜幹細胞の染色体像. 初代培養細胞のみを使用するので染色体異常を生じるリスクはきわめて低い.

### 移植後経過

大腿骨顆部軟骨欠損に対して関節鏡視下で移植を行ない、2年以上経過した10例の細胞培養に関する結果は、平均0.5gの滑膜組織から、14日間培養後、少なくとも3400万細胞、平均して5800万細胞を回収した。ほぼすべての例で症状や軟骨欠損部の改善を認め

た(図6)。特に移植術に起因すると考えられる副作用を認めていない。詳細な臨床成績は現在解析中である。

### 最後に

鏡視下滑膜幹細胞移植術は鏡視下で可能であり、手術創は関節鏡の挿入孔のみである(図7)。人工素材や



図6 軟骨欠損に対する滑膜幹細胞移植前後の関節鏡像



図7 滑膜幹細胞移後の手術創。関節鏡の通常の挿入孔2カ所のみである。

成長因子が不要で、自己血清を用いて14日間で十分な細胞数を確保でき、細胞治療のなかでは安価に実施しうる利点がある。本治療法は現時点で長期成績や比較研究がないことから、有効性に関する検討がさらに必要と考えている。

### 文 献

- 1) 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: 2521-9.
- 2) 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* 2008; 333: 207-15.
- 3) 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* 2008; 58: 501-10.
- 4) 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* 2008; 10: R84.
- 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. *Cytherapy* 2012; 14: 327-38.
- 6) Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 843-53.
- 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* 2008; 58: 1389-98.
- 8) Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, et al. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. *Ophthalmology* 2013; 120: 1761-8.