

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の
開発と臨床応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関矢 一郎

平成26(2014)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	関矢 一郎	東京医科歯科大学 再生医療研究センター	教授
研究分担者	宗田 大	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	教授
研究分担者	森尾 友宏	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学	准教授
研究分担者	清水 則夫	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ウイルス治療学	准教授
研究分担者	赤澤 智宏	東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 分子生命情報解析学	教授

目 次

I . 総括研究報告

- 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用……………7
研究代表者 関矢 一郎
(東京医科歯科大学 再生医療研究センター 教授)

II . 分担研究報告

- 1 . 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用……………21
分担研究者 宗田 大
(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 教授)
- 2 . 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用……………27
分担研究者 森尾 友宏
(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 准教授)
- 3 . 細胞製剤の品質・安全保証に関する研究……………31
分担研究者 清水 則夫
(東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ウイルス治療学 准教授)
- 4 . 幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用……………39
分担研究者 赤澤 智宏
(東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 分子生命情報解析学 教授)

III . 研究成果の刊行に関する一覧表……………47

IV . 研究成果の刊行物・別刷……………55

. 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究代表者

関矢一郎 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 教授

研究要旨

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態ですべて軟骨欠損部に10分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作製し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を本課題では検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、ピッグにおいても軟骨再生に有効であった。DNA損傷応答の評価系、DNA損傷を誘導する分子の評価系、腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞22検体を検証し、明らかな腫瘍化の徴候がないことを明らかにした。これまでに開発したマイコプラズマ検査系は17種類のマイコプラズマを5 cfu/reactionの感度で検出可能なこと、我々の開発したTMDU法は現在汎用されているマイコプラズマ検出キットよりも優れていること、DNAウイルス13種類の自動検査が可能であることを確認した。軟骨欠損モデルラットに軟骨分化能が高いiPS細胞を移植し、軟骨細胞に分化することを確認した。

これらの研究成果をもとに、今後有効で効率よく安全な軟骨再生医療の臨床応用を目指す。

A. 研究目的

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態状態で軟骨欠損部に 10 分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop 法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作製し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS 細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞はその高い軟骨分化能により軟骨再生における有用な細胞源として期待される。臨床応用に向けて、限られた細胞数で、より効率よく移植、再生するためには、移植操作、細胞の軟骨分化能などを改善することが必要である。間葉系幹細胞を 3 次元培養し集合体とすることがひとつの解決策として考えられる。今回、ヒトへの臨床応用に向け、滑膜間葉系幹細胞集合体移植をピッグで検討した。

(2) 変異細胞評価

滑膜由来間葉系幹細胞の品質管理・品質

保証系を確立することを目的とした。特に変異細胞の検出、変異を誘導する培養系の識別を目的として研究を行った。

(3) 感染症検査

生体には細菌・真菌・ウイルスなど多くの微生物が持続感染しているため、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは微生物汚染の問題を回避するには不十分であり、患者に投与する最終製品を全数検査して治療の安全性を担保することが必要である。本年度は、これまでに開発したマイコプラズマ検査系のバリデーション試験と現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キットとの比較試験、およびキアゲン社の QIASymphony を用いたウイルス・検査系の自動化を目指した研究開発を実施した。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

本研究では、iPS 細胞を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPS 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。予め分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することを目指す。

B. 研究方法

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

マイクロミニピッグの滑膜間葉系幹細胞 2.5×10^5 個を 35 μ L の培養液に懸濁し、hanging drop 法で 3 日間培養し、集合体を形成させた。マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と、大腿骨内顆にそれぞれ $6 \times 6 \times 1.5$ mm 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、16 個ずつ移植した。移植細胞を追跡するため、GFP を発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。

(2) 変異細胞評価

1) 腫瘍化代替指標の定量的解析：p16 メチル化定量的 PCR

培養された間葉系幹細胞から常法に従って核酸を抽出し、リアルタイム PCR 機にてメチル化断片の定量的解析を行った。パッセージ 0 から 2 を含む合計 22 検体にて検討を行った。

2) DNA 損傷応答の解析

過剰増殖刺激などで誘導される AID (activation induced deaminase) をリアルタイム PCR で定量化した。また、DNA 損傷応答としての ATM, P53 のリン酸化は、それぞれの分子に対するリン酸化特異的抗体を用いて、組織切片を用いて免疫組織染色を行った。

3) 大動物移植モデルを用いた病理組織学的解析

ミニブタにおける移植モデルを用いて、滑膜由来間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移

植した。さらに組織切片を採取し、HE 染色を行って組織形成や、細胞浸潤、悪性化などを検討した。

(3) 感染症検査

1) TMDU 法によるマイコプラズマの検出

本学で開発した 142 種類のマイコプラズマ属が検出可能なマルチプレックス PCR 検査系により、マイコプラズマ属の 16S リボソーム・23S リボソームおよびそれらのスペーサー領域に設定したプライマー・プローブ (合計 15 種類) を使用し、マイコプラズマゲノムの当該領域を増幅した。

2) MycoSEQ によるマイコプラズマの検出

核酸抽出および検出操作を MycoSEQ (Lifetechnologies) の説明書に従って行った。

3) 添加回収試験の実施方法

マイコプラズマ試験法開発の標準細胞として採用されている CHO 細胞 DG44 株と添加する指標マイコプラズマとして Mycoplasma orale (E3329121020) を使用した。

4) QIASymphony を使用した検査の自動化
QIASymphony DSP DNA Minikit192 Version1 と LightCycler480 qPCR を使用した。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

1) マウス MSCs の分離・培養方法

マウス的大腿骨・脛骨からコラゲナーゼ処理によって骨髄細胞を抽出し、フローサ

イトメーター (FACS) で PDGFR (+)、Sca-1(+), CD45(-)、Ter119(-)の MSCs を採取した。

2) マウス iPS 細胞

A 株 (MEF 由来 Nanog GFP/SOX10 DsRed-iPSCs)、B 株 (MEF 由来 Nanog GFP-iPSCs)、C 株 (MEF 由来 Oct GFP-iPSCs) の 3 株の iPS 細胞を検討した。

3) 軟骨分化誘導と分化能力評価

MSCs の分化誘導の際は 3×10^5 個、iPSCs は 6×10^5 個を 3 週間ペレット培養した。

4) 軟骨組織欠損ラットへの細胞移植

Lewis ラットの膝関節に 1.8mm の軟骨組織欠損を作成し、DiI で染色した細胞塊を移植した。

5) ラット大腿骨の摘出および組織染色

移植後 2 週及び 4 週時にラット大腿骨を摘出し、凍結ブロックを作成し、トルイジンブルーおよびサフラニン O 染色で評価した。

C. 研究結果

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

滑膜間葉系幹細胞集合体は、容易にピッグ膝の軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植 4 週後に良好な軟骨の再生が得られた。GFP 陽性細胞の集合体は、4 週後に再生軟骨部に生着しているのを確認した。

(2) 変異細胞評価

1) p16 メチル化定量的 PCR

1/10,000 細胞のレベルでの p16 メチル化を検出できるようになり、ヒト滑膜間葉系幹細胞集合体は 22 検体すべてで陰性であった。

2) DNA 損傷修復応答

AID は 21 検体で陰性であり、1 検体は検出感度以下の陽性であった。

3) 病理組織学的解析

滑膜間葉系幹細胞移植群 7 匹で検討を行ない、軟骨基質の豊富な産生を認め、異型細胞は皆無であった。

(3) 感染症検査

1) マイコプラズマ検出の感度検定

17 種類のマイコプラズマ属の菌種について、5 ~ 1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行ない、n=3 の実験で、すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。

2) キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に Mycoplasma orale 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では 20 μ g、QIAGEN 法では 12 μ g であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

3) MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN法およびprepSEQによりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。シグナル強度は QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が 3 倍以上高く、良好に検出された。

4) TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN法およびprepSEQにより指標となるマイコプラズマ (*Mycoplasma orale*) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。シグナル強度は抽出法による差はほとんど観察されなかった。

5) MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、マイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの T_m 値が中間段階になり判定に迷う場合があった。

6) ウイルス検査系の自動化

検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能であり、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的データを得ることが可能であった。

(4) iPSC 細胞の軟骨分化

軟骨分化に適した iPSCs のスクリーニング

3 株の iPSCs (A 株, B 株, C 株) における *in vitro* での軟骨分化能を評価した。B

株が軟骨分化能が高かった。

Hanging drop 培養による Nanog 発現量の解析

Hanging drop 培養法前の Nanog の発現量に対して Hanging drop 培養 1 日以降で Nanog 発現量が減少する傾向がみられた。Hanging drop 培養を用いることで腫瘍化の原因になりうる Nanog 遺伝子の発現を低下させる事が確認された。

MSCs を用いた軟骨組織再生

マウス MSCs をラット軟骨欠損部に移植する系を確立し、MSCs の軟骨再生への関与を直接的に解析することを可能とした。

iPSCs を用いた軟骨組織再生

ラット軟骨欠損モデルに対し、マウス iPSCs の移植を試みた。移植後 4 週の関節を取り出し、組織切片を作成して解析した結果、移植細胞全体が軟骨細胞様の染色像を示した。また、移植組織から細胞を回収し、遺伝子発現解析を行った結果、未分化状態の B 株よりも Nanog の発現は減少し、軟骨分化マーカーの発現が上昇していることを確認した。

D. 考察

(1) 滑膜間葉系幹細胞集合体特性解析

ピッグにおいても、家兎同様に滑膜間葉系幹細胞の集合体を移植した時に良好な軟骨再生が得られ、ヒトへの臨床応用が期

待された。

(2) 変異細胞評価

本研究では滑膜由来間葉系幹細胞に焦点を絞って、変異細胞検出と、DNA 損傷の程度の評価に取り組んだ。今までの世界的な報告からも、間葉系幹細胞からの腫瘍発生の報告は皆無（1 例の報告は細胞の contamination とされる）である。本研究は従って、間葉系幹細胞の安全性についての基盤的データを供給するものであり、また今後の培養系開発にあたっての、安全な手技の選択という面で有用になるものと考えている。

(3) 感染症検査

1) TMDU 法によるマイコプラズマ検出の感度検定

TMDU 法によるマイコプラズマ検出においては、遺伝子配列からは 142 種類のマイコプラズマを特異的に検出できることが示されている。日本・欧州・米国薬局方に記載されているマイコプラズマ属の菌種は合計 9 種類であるが、すべて今回使用した 17 種類の中に含まれるため、TMDU 法は 3 極薬局方の検出要件を満たしていると考えられる。

2) マイコプラズマ検出における MycoSEQ と TMDU 法の比較

一般に汎用されているリアルタイム PCR を応用したマイコプラズマ検査キット MycoSEQ と我々が開発した TMDU 法との比較

試験を行ったところ、抽出時間が TMDU 法の方が 2 時間早く抽出でき、最終産物を検査する場合には非常に有利であると考えられる。

3) ウイルス検査系の自動化

本研究により、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用して確認された。今後は、RNA ウイルスとマイコプラズマ測定の可否・プログラムの最適化を進める必要がある。

(4) iPS 細胞の軟骨分化

本研究では軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング方法を開発し、予め細胞集塊を形成する過程で Nanog 遺伝子を低下させ、安全で効果的な iPSCs 移植治療の可能性を示した。スクリーニングで用いたペレット培養法は、*in vivo* における軟骨分化を *in vitro* で疑似化したものであり、iPSCs 株のスクリーニングとして有用であると期待される。また、移植前に細胞集塊を形成する際、未分化 iPSCs を軟骨分化誘導培地で 3 日間培養したが、より長期間分化誘導をかけた iPSCs を用いれば、*in vivo* での更なる軟骨分化誘導が期待できると考えられる。

E. 結論

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、ピッグにおいても軟骨再生に有効であった。

DNA 損傷の評価系（及び DNA 損傷を誘導する分子の評価系）腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞 22 検体にて検証した。その結果、調製細胞においては DNA 損傷が最小限であり、また明らかな腫瘍化の徴候が認められないことが明らかになった。

これまでに開発したマイコプラズマ検査系は 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。我々の開発した TMDU 法は、現在汎用されているマイコプラズマ検出キット（MycoSEQ: Lifetechnologies）よりも優れていた。また、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることを確認した。

軟骨欠損モデルラットにマウスの MSCs および iPSCs を移植し、軟骨細胞様の分化を確認することに成功した。

F . 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G . 研究発表

1. 論文発表

Atesok K, Doral MN, Bilge O, **Sekiya I.** Synovial stem cells in musculoskeletal regeneration. J Am Acad Orthop Surg. 2013 Apr;21(4):258-9. doi: 10.5435/JAAOS-21-04-258. No abstract available. PMID:23545732

Ichinose S, Tagami M, **Muneta T,** Mukohyama H, **Sekiya I.** Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. Med Mol Morphol. 2013 Mar;46(1):24-33. doi: 10.1007/s00795-012-0005-9. Epub 2013 Jan 17. PMID:23325551

Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, **Sekiya I, Muneta T.** Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb 1;431(1):52-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094. Epub 2013 Jan 3. PMID:23291184

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, **Morio T,** Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. Cancer Sci. 104:703-10, 2013.

Sugtita S, Ogawa M, **Shimizu N, Morio T,** Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. Ophthalmology. 120:1761-8, 2013.

Ito K, **Shimizu N,** Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. Internal Medicine. 52(2):201-11 (2013)

Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y,

Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, **Morio T, Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.

Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. Journal of the Neurological Sciences 324, 190-194(2013)

Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ.:

EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. blood 121: 4512-4520(2013)

関矢一郎 :

滑膜幹細胞による軟骨再生医療の開発 : 今日の新移 Vol127.No1 : P53-60

中村智祐、**関矢一郎、宗田 大**、小林英司 : 滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生治療 : ミニプラモデルでの検討 CLINICAL CALCIUM23 巻 12 巻 p49-57

関矢一郎 :

関節軟骨損傷 スポーツ整形外科マニュアル p194-196

関矢一郎 :

変形性膝関節症 スポーツ整形外科マニュアル p197-200

宗田 大 :

膝屈筋腱を用いた double-bundle reconstruction I - 4 つ折半腱様筋腱を用い経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔を作製する 2 重束 ACL 再建術 整形外科最少侵襲手術ジャーナル 66 : 57 66、2013.2

宗田 大 :

VIII . 靭帯再建術後再断裂に対する Revision Surgery 「再再建術と私のポイント」

膝靭帯手術のすべて MDICAL VIEW 2013.4.10 p.385-389

宗田 大 (総監集) :

ひざ痛を治す 別冊 NHK きょうの健康 2013.6.25 発行

関矢一郎 :

手術でひざの痛みを改善する 別冊 NHK きょうの健康 ひざ痛を治す p66-79 2013.6.25 発行

関矢一郎 :

すり減った軟骨を再生させる新しい治療に期待、 別冊 NHK きょうの健康 ひざ痛を治す、 p80-80 2013.6.25 発行

宗田 大 :

膝前十字靭帯再建術 : ハムストリング腱使用例 臨床スポーツ医学臨時増刊号「関節鏡視下手術と術後リハビリテーション」 Vol.30: p104-107, 2013.7.15 発行

宗田 大 :

膝蓋腱炎 (ジャンパー膝) の治療 upda 【特集】腱・付着部症の最近の展開 整形災害外科 55:p1371 1376 2013.10.1 発行

北條浩彦、**清水則夫** :

基本編 - 原理と基本知識 - リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー / プロブの設計手順 マルチプレックスの場合 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p72-74 2013 発行

清水則夫、渡邊健、外丸靖浩 :

実践編 - プロトコールを中心に - 章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査

原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全
実験ガイド 最強のステップ UP シリー
ズ:p192-202

2. 学会発表

a) 国際学会発表

Ichiro Sekiya

Arthroscopic transplantation of synovial
MSCs for cartilage regeneration
Sportsclinic Germany
Hannover, Germany, 2013.9.30

Ichiro Sekiya

Arthroscopic transplantation of synovial
MSCs for cartilage regeneration
Maartenskliniek
Woerden, Netherlands, 2013.10.2

Ichiro Sekiya

Cartilage and meniscus regeneration with
synovial stem cells
Symposium on Materials and
Regenerative Medicine ,taipei, TAIWAN,
2013.11.30

Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta

Arthroscopic Transplantation of synovial
MSCs for cartilage regeneration
International Cartilage Repair Society
2013.9.15. Izmir, Turkey

Nobutake Ozeki, Ichiro Sekiya, Kunikazu
Tsuji, Tomoyuki Saito, Takeshi Muneta
Weekly intraarticular injections of synovial
mesenchymal stem cells delay cartilage
degeneration through trophic factors in a
rat osteoarthritis model
11th International Society for Stem Cell
Research, Annual Meeting
2013/6/12-15, USA

Nobutake Ozeki, Ichiro Sekiya, Kunikazu
Tsuji, Tomoyuki Saito, Takeshi Muneta
Weekly intraarticular injections of synovial
mesenchymal stem cells delay cartilage
degeneration through trophic factors in a
rat osteoarthritis model
International conference of cartilage repair
2013/9/15-18, Turkey

Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Kondo
S, Saito R, Yanagisawa K,
Tabuchi T, Nagata T, Obara M, Okuaki T,
Koga H, Tsuji K, Takeshi Muneta
Comparison of MRI T1rho mapping and
histology for normal and torn menisci in a
pig model.

11th International cartilage repair society
annual meeting
2013/9/15-18, Turkey

Mio Udo, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Takeshi Muneta

Evaluation of a rat arthritis model induced
by various doses of monoiodoacetic acid
11th International cartilage repair , society
annual meeting
2013/9/15-18,

Toshifumi Watanabe, Takeshi Muneta,
Nicholas Dunbar, Alex Iorgulescu, Scott A
Banks

Intraoperative Joint Gap Affects
Postoperative Knee Kinematics in
Posterior-Stabilized TKA
26th ISTA2013, 2013.10.16-19, USA

Miyoko Ojima, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Takeshi Muneta

Human mesenchymal stem cells in
synovial fluid increase in the knee after
harvest of synovium
11th International cartilage repair , society
annual meeting
2013/9/15-18, Izmir, Turkey

b) 国内学

関矢一郎 :

滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟
骨再生

変形性膝関節症に対する私たちの取り組
み.

2013.4.20 日本リウマチ学会、京都

関矢一郎 :

滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療
の実際 特に安全性の観点から

2013.5.23 日本整形外科学会総会、広島

関矢一郎 :

自己血清で増殖させた体性幹細胞による
関節軟骨・半月板再生医療
2013.5.22 JMS 社内講演会 広島

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013.5.29 第4回関節治療研究会 東京

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生：基礎
から臨床まで現状と展望
2013.6.20 JOSKAS 札幌

関矢一郎：
滑膜幹細胞による半月板治癒促進
2013.6.20 JOSKAS 札幌

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013.7.14 第26回日本臨床整形外科学会
浜松

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013.7.27 第23回膝肩スポーツの会 名
古屋

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療の
開発
2013.9.12 山梨運動器再生セミナー 甲
府

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療
2013.10.10 BioJapan 2013 横浜

関矢一郎：
滑膜幹細胞による半月板再生
2013.10.18 日整会基礎 幕張

関矢一郎：
滑膜幹細胞による関節軟骨・半月板再生医
療の開発
2013.10.11 東大 臨床研究者育成プログ
ラム 東大

関矢一郎：

滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生医療
2013.10.12 整形外科初期研修セミナー
富浦

関矢一郎：
滑膜幹細胞による関節軟骨・半月板再生医
療の開発
2013.10.28 第28回新潟移植再生研究会
新潟

関矢一郎：
体性幹細胞による軟骨・半月板の再生医療
基礎から臨床まで
2013.11.14 東京医科歯科大学大学院ボー
ダレス講義 東京医科歯科大学

関矢一郎：
滑膜由来の間葉系幹細胞による軟骨・半月
板再生
2013.11.16 第25回日本臨床検査医学会
東京医科歯科大学

関矢一郎：
滑膜間葉幹細胞による関節軟骨・半月板再
生
2013.12.2 新技術説明会 市ヶ谷

関矢一郎：
関節軟骨障害治療 2013 指定発現：Stem
Cell 治療
2013.12.7 膝関節フォーラム 高田馬場

関矢一郎：
滑膜幹細胞による軟骨・半月板再生
2013.12.16 第60回山陰整形外科集談会
松江

宗田 大：
人工膝関節後の痛みとその対応
第43回日本人工関節学会 ランチョンセ
ミナー
2013.2.23 滋賀医科大学

宗田 大：
膝のスポーツ外傷と障害
第29回埼玉・県南東部整形外科勉強会
2013.3.8 獨協医科大学越谷医療センタ
ー大関覚

宗田 大：

症例から学ぶ膝関節外科

2013.5.26 第86回日本整形外科学会学術総会ランチョンセミナー、広島

宗田 大：

スポーツ復帰への膝外傷・障害の治療

2013.5.30 第3回大分膝関節疾患研究会、大分

宗田 大：

滑膜間葉幹細胞移植による関節構成体の再生医療の実現化

第36回大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー

2013.6.4 第36回大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー東京医科歯科大学

宗田 大：

ACTIYAS デザイン～開発背景からコンセプト～

2013.7.13 ACTIYAS セミナー KYOCERA

辻邦和、片桐洋樹、中村香織、**関矢一郎**、

宗田 大：

前十字靭帯再建術の手術侵襲に伴う関節疼痛の重症度は、術後の関節液中のCD105陽性細胞数に逆相関する

2013.2.7-8 第6回日本運動器疼痛学会神戸

中村香織、辻邦和、片桐洋樹、井上牧子、Kahaer Abula、**関矢一郎**、**宗田 大：**

前十字靭帯再建術後の関節疼痛の重症度は術後関節液中のCD105陽性細胞と逆相関する

2014.2.28-3-1 第27回日本軟骨代謝学会京都

中村智祐、望月智之、二村昭元、**宗田**

大、秋田恵一：

前十字靭帯脛骨側付着部の解剖学的研究 外側半月板から連続する線維構造。

中村智祐、**関矢一郎**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、古賀英之、堀江雅史、大川淳、**宗田 大：**

解剖学的二重束前十字靭帯再建術における移植腱の太さが及ぼす影響。

2013.03 第86回日本整形外科学術集会広島

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、**関矢一郎：**

解剖学的2重束ACL再建術における大腿骨孔位置が移植腱張力変化及び膝制動性に与える影響

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、大川淳、**関矢一郎：**

二重束ACL再建術における大腿骨孔位置が移植腱張力変化および膝制動性に与える影響。

2013.03 第86回日本整形外科学術集会広島

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、**関矢一郎：**

ACL再建術 one bundle から two bundle 同一施設での outcome の比較

1重束及び2重束ACL再建術の前向き無作為化比較試験の長期成績。

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

古賀英之、**宗田大**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、**関矢一郎：**

逸脱外側半月板に対する鏡視下半月板制動術の短期成績。

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田 大**、**関矢一郎**、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

人工膝関節全置換術において後十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田 大**、**関矢一郎**、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

ロボット支援モジュール式人工膝関節の
キネマティクス
2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田 大、関矢一郎**、古賀英之、
堀江雅史、中村智祐
新しい日本人向け後方安定型人工膝関節
の短期成績
2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

Kahaer Abula, **宗田 大**, 宮武和正, 山田
淳, 松倉遊, 井上真紀子, 大川淳, **関矢
一郎**, 辻邦和 :
内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制
的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を
予防する
2013.10.17 日整会基礎学会 千葉幕張

Kahaer Abula, **宗田 大**, 宮武和正, 山田
淳, 松倉遊, 井上真紀子,
大川淳, **関矢一郎**, 辻邦和
内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制
的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を
予防する
2014.3.1 日本軟骨代謝学会 京都

森尾友宏 :
易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤
としての原発性免疫不全症
2013.10.25. 平成 25 年度遺伝子病制御研
究所研究集 北海道、

森尾友宏 :
免疫細胞培養ガイドライン(免疫治療関連
6 学会合同策定)について: 医療機関・研
究施設に求められる基準
2013.8.24. 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研
究会学術集会 名古屋

今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉佑規
乃、新井文子、中澤温子、伊藤守、
清水則夫、藤原成悦 :
難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性
疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤
の評価研究
2013.11 日本ウイルス学会 神戸

清水則夫 :
再生医療におけるウイルス・マイコプラズ
マ安全性検査系の開発
2013.9 第 14 回日本医薬品等ウイルス安
全性研究会 東京

須藤絵里子グレース、馬淵洋、小柳明日香、
大関信武、**宗田大、関矢一郎、
赤澤智宏** :
マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治
療の有効性の検討
2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京
都

馬淵洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、
宗田 大、関矢一郎、赤澤智宏 :
組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析
2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会
京都

H . 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得
該当無し

2.実用新案登録
該当無し

3.その他
該当無し

． 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
分担研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究分担者

宗田 大 東京医科歯科大学・大学院・運動器外科学 教授

研究要旨

滑膜間葉系幹細胞はその高い軟骨分化能により軟骨再生における有用な細胞源として期待される。臨床応用に向けて、限られた細胞数で、より効率よく移植、再生するためには、移植操作、細胞の軟骨分化能、などを改善することが必要である。間葉系幹細胞を3次元培養し集合体とすることがひとつの解決策として考えられる。以前我々は、日本白色家兎において、集合体移植によって軟骨再生が良好な結果が得られたことを報告した。今回、ヒトへの臨床応用に向け、滑膜間葉系幹細胞集合体の大動物における *in vivo* の軟骨分化を検討した。

2.5x10⁵のマイクロミニピッグの滑膜間葉系幹細胞を35μLの培養液に懸濁し、hanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と大腿骨内顆に6x6x1.5mm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、16個移植した。細胞を移植しない群を対照とした。移植細胞を追跡するため、GFPを発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。移植後4週の肉眼的検討をおこなった。

3日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体は、大きさが約1mmで、容易には壊れず扱うことが可能であった。滑膜間葉系幹細胞集合体では、*in vivo*では、集合体は、容易に骨軟骨欠損部へ接着させることが可能であった。移植後4週の移植した群で、大動物でも、肉眼的に良好な軟骨の再生が得られた。現在4週での組織学的検討、12週での肉眼的、組織学的検討を施行している。

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が容易で、効率的に軟骨欠損部に接着させることが可能で、また軟骨分化能が高いことから、軟骨再生に有用である。

A . 研究目的

間葉系幹細胞はその多分化能により再生医療の細胞源として期待されている。特に滑膜由来の間葉系幹細胞は、高い軟骨分化能と増殖能から、軟骨再生医療の魅力的な細胞源である。我々は、以前に、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%の滑膜幹細胞を軟骨欠損部に接着させることが可能で、軟骨修復を促進させることができることを報告している。この方法は、scaffold を使わず関節鏡を用いて移植が可能な低侵襲な方法で、有用である。しかし、細胞移植操作時に移植細胞がみえず、10 分ですべての細胞が接着するわけではないことから、移植時に無駄にしてしまう細胞がある。臨床応用を考えると、得られ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。間葉系幹細胞を 3 次元培養し集合体とすることがひとつの解決策として考えられる。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期待される。これまで我々は、日本白色家兎における集合体移植群で良好な軟骨再生が得られたことを報告している。今回、ヒトへの臨床応用にむけて、大動物における滑膜間葉系幹細胞集合体の *in vivo* の軟骨分化能を検討した。

B . 研究方法

マイクロミニピッグの滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。2.5x10⁵ の滑膜間葉系幹細胞を 35 μ L の培養液に懸濁し、hanging drop 法で、3 日間培養し、集合体を形成させた。*in vivo* の検討のため、マイクロミニピッグの膝蓋大腿関節の大腿骨側と、大腿骨内顆にそれぞれ 6x6x1.5mm 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、16 個ずつ移植した。細胞を移植しない群を対照とした。移植細胞を追跡するため、GFP を発現するマイクロミニピッグの滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。

C . 研究結果

3 日間培養した滑膜間葉系幹細胞集合体は、大きさが約 1mm で、容易には壊れず扱うことが可能であった。

in vivo 研究で、集合体は、容易に軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植翌日に移植細胞が軟骨欠損部に残存し、軟骨欠損部以外には細胞を認めなかった。移植 4 週後に移植群で良好な軟骨の再生が得られた。GFP 陽性細胞の集合体を 16 個移植し、4 週後に再生した軟骨には、GFP 陽性細胞をみとめた。現在 4 週での組織学的検討、12 週での肉眼的、組織学的検討を施行している。

D. 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。

以前の我々が報告した日本白色家兔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 low density で移植した群で、良好な軟骨の再生が得られており、GFP 陽性の滑膜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 陽性細胞を認めた。

本研究では、大動物においても、同様に集合体を移植した時に良好な軟骨再生が得られ、ヒトへの臨床応用が期待される。我々はすでに、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。10 症例の平均で、passage 0 で 5000 万細胞を得ることができ、約 280mm² の軟骨欠損部へ移植している。今回のマイクロミニピッグの 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、16 個の集合体(4 万細胞)を 36mm² の欠損部へ移植し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。

E. 結論

滑膜間葉系幹細胞集合体は、移植操作が

容易で、効率的に軟骨欠損部に接着させることが可能で、また軟骨分化能が高いことから、軟骨再生に有用な細胞源であると考えられる。大動物でも軟骨再生の可能性が示唆され、今後ヒトへの応用が期待できる。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ichinose S, Tagami M, **Muneta T**, Mukohyama H, Sekiya I. Comparative sequential morphological analyses during *in vitro* chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. *Med Mol Morphol*. 2013 Mar;46(1):24-33. doi: 10.1007/s00795-012-0005-9. Epub 2013 Jan 17. PMID:23325551

Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, **Muneta T**. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 1;431(1):52-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094. Epub 2013 Jan 3. PMID:23291184

中村智祐、関矢一郎、**宗田 大**、小林英司：滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生治療：ミニブタモデルでの検討
*CLINICAL CALCIUM*23 巻 12 巻 p49-57
宗田 大：

膝屈筋腱を用いた double-bundle reconstruction I - 4 つ折半腱様筋腱を用い経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔を作製する 2 重束 ACL 再建術
整形外科最少侵襲手術ジャーナル 66 : 57
66、2013.2

宗田 大 :

VIII . 靭帯再建術後再断裂に対する Revision Surgery 「再再建術と私のポイント」
膝靭帯手術のすべて
MEDICAL VIEW 2013.4.10 p.385-389

宗田 大 (総監集) :

ひざ痛を治す
別冊 NHK きょうの健康 2013.6.25 発行

宗田 大 :

膝前十字靭帯再建術 : ハムストリング腱使用例
臨床スポーツ医学臨時増刊号 「関節鏡視下手術と術後リハビリテーション」
Vol.30: p104-107, 2013.7.15 発行

宗田 大 :

膝蓋腱炎 (ジャンパー膝) の治療 upda
【特集】腱・附着部症の最近の展開
整形災害外科 55 : p1371 1376 2013.10.1
発行

2.学会発表

a)国際学会発表

Ichiro Sekiya,**Takeshi Muneta**
Arthroscopic Transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration
International Cartilage Repair Society
2013.9.15.Izmir, Turkey

Nobutake Ozeki,Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model

11th International Society for Stem Cell Reseach, Annual Meeting
2013/6/12-15,USA

Nobutake Ozeki,Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model
International conference ofcartilage repair
2013/9/15-18,Turkey

Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Kondo S, Saito R, Yanagisawa K, Tabuchi T, Nagata T, Obara M,Okuaki T, Koga H, Tsuji K, **Takeshi Muneta**
Comparison of MRI T1rho mapping and histology for normal and torn menisci in a pig model.
11th International cartilage repair society annual meeting
2013/9/15-18,Turkey

Mio Udo,Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**
Evaluation of a rat arthritis model induced by various doses of monoiodoacetic acid
11th International cartilage repair ,society annual meeting
2013/9/15-18,

Toshifumi Watanabe,**Takeshi Muneta**, Nicholas Dunbar, Alex Iorgulescu, Scott A Banks
Intraoperative Joint Gap Affects Postoperative Knee Kinematics in Posterior-Stabilized TKA
26th ISTA2013,2013.10.16-19,USA

Miyoko Ojima, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**
Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee after harvest of synovium

11th International cartilage repair , society
annual meeting
2013/9/15-18, Izmir, Turkey

b)国内学会発表

宗田 大 :

日本関節鏡膝スポーツ医学会 (JOSKAS) ガ
イドライン策定委員会
東京医科歯科大学 委員長
日本内視鏡学会理事

宗田 大 :

人工膝関節後の痛みとその対応
第 43 回日本人工関節学会 ランチョンセ
ミナー
2013.2.23 滋賀医科大学

宗田 大 :

膝のスポーツ外傷と障害
第 29 回埼玉・県南東部整形外科勉強会
2013.3.8 獨協医科大学越谷医療センター
大関賞

宗田 大 :

症例から学ぶ膝関節外科
2013.5.26 第 86 回日本整形外科学会学術総
会ランチョンセミナー、広島

宗田 大 :

スポーツ復帰への膝外傷・障害の治療
2013.5.30 第 3 回大分膝関節疾患研究会、
大分

宗田 大 :

滑膜間葉幹細胞移植による関節構成体の再
生医療の実現化
2013.6.4 第 36 回大学院医歯学総合研究
科 大学院セミナー

宗田 大 :

ACTIYAS デザイン～開発背景からコンセプ
ト～
2013.7.13 ACTIYAS セミナー KYOCERA

辻邦和、片桐洋樹、中村香織、関矢一郎、
宗田 大 :

前十字靭帯再建術の手術侵襲に伴う関節疼
痛の重症度は、術後の関節液中の CD105 陽
性細胞数に逆相関する
2013.2.7-8 第 6 回日本運動器疼痛学会神
戸

中村香織、辻邦和、片桐洋樹、井上牧子、
Kahaer Abula、関矢一郎、**宗田 大 :**
前十字靭帯再建術後の関節疼痛の重症度は
術後関節液中の CD105 陽性細胞と逆相関す
る
2014.2.28-3-1 第 27 回日本軟骨代謝学会
京都

中村智祐、望月智之、二村昭元、**宗田 大**、
秋田恵一：
前十字靭帯脛骨側付着部の解剖学的研究
外側半月板から連続する線維構造。

中村智祐、関矢一郎、柳下和慶、渡邊敏
文、望月智之、古賀英之、堀江雅史、大
川淳、**宗田 大 :**
解剖学的二重束前十字靭帯再建術における
移植腱の太さが及ぼす影響。
2013.03 第 86 回日本整形外科学術集会
広島

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏
文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、関
矢一郎：
解剖学的 2 重束 ACL 再建術における大腿骨
孔位置が移植腱張力変化及び膝制動性に与
える影響

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏
文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、大
川淳、関矢一郎：
二重束 ACL 再建術における大腿骨孔位置が
移植腱張力変化および膝制動性に与える影
響。
2013.03 第 86 回日本整形外科学術集会
広島

古賀英之、**宗田 大**、柳下和慶、渡邊敏文、
望月智之、堀江雅史、中村智祐、関矢一
郎：

ACL 再建術 one bundle から two bundle 同一施設での outcome の比較

1 重束及び 2 重束 ACL 再建術の前向き無作為比較試験の長期成績.

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

古賀英之、**宗田大**、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、関矢一郎：

逸脱外側半月板に対する鏡視下半月板制動術の短期成績.

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田大**、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

人工膝関節全置換術において後十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田大**、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks

ロボット支援モジュール式人工膝関節のキネマティクス

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、**宗田大**、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐

新しい日本人向け後方安定型人工膝関節の短期成績

2013.6.20-22 5th JOSKAS 札幌

Kahaer Abula、**宗田大**、宮武和、山田淳、松倉遊、井上真紀子、大川淳、関矢一郎、辻邦和：

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2013.10.17 日整会基礎学会 千葉幕張

Kahaer Abula、**宗田大**、宮武和正、山田淳、松倉遊、井上真紀子、大川淳、関矢一郎、辻邦和：

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2014.3.1 日本軟骨代謝学会 京都

須藤絵里子グレース、馬淵洋、小柳明日香、大関信武、**宗田大**、関矢一郎、

赤澤智宏：

マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の有効性の検討

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

馬淵洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、**宗田大**、関矢一郎、赤澤智宏：

組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究分担者

森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授

研究協力者

沢辺元司 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科分子病態検査学 教授

渡邊 健 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 特任助教

研究要旨

滑膜由来間葉系幹細胞を用いて、変異細胞検出法にての検討を継続した。ATM, p53 のリン酸化、AID の発現検出は完成し、検体数を増やして解析した結果、DNA 損傷の程度は最小限であることが確認された。腫瘍化前段階を検出する系としてのメチル化 p16 リアルタイム PCR 系は 1/10,000 レベルで検出可能となったが、本法においてもメチル化 p16 陽性細胞は認められなかった。また、大動物移植モデルを用いて病理学的検討を行い、病的細胞がないことを確認した。集合体として培養した間葉系幹細胞 22 検体では大きな DNA 損傷や変異細胞を認めなかった。

A. 研究目的

滑膜由来間葉系幹細胞の品質管理・品質保証系を確立することを目的とした。特に変異細胞の検出、変異を誘導する培養系の識別を目的として研究を行った。体細胞由来の間葉系幹細胞では、実際に変異細胞を生じ、それが培養により蓄積し、生存することは極めて稀とされるが、iPS 細胞からの再生医療が進展する中、その解析は参照細胞として重要である。

腫瘍化における代替指標の高感度検出系、DNA 損傷程度の推測系、大動物モデルでの病理学的解析系を立ち上げることにより、低侵襲軟骨再生の品質評価を行うことが具体的な目的である。

B. 研究方法

- 1) 腫瘍化代替指標の定量的解析：
p16 メチル化定量的 PCR
培養された間葉系幹細胞から常法に従い

核酸を抽出し、バイサルファイト処理後、メチル化塩基配列特異的プライマ - 及び検出用プローブを用いて、リアルタイム PCR 機にてメチル化断片の定量的解析を行った。パッセージ0 から 2 を含む合計 22 検体にて検討を行った。

2) DNA 損傷応答の解析

DNA 損傷応答を検出することで、潜在的に DNA に傷が入りやすい培養系や試薬系を検出することを継続して試みた。具体的には過剰増殖刺激などで誘導される AID (activation induced deaminase) をリアルタイム PCR で定量化した。また、いわゆる DNA 損傷応答としての ATM, P53 のリン酸化は、それぞれの分子に対するリン酸化特異的抗体を用いて、組織切片の免疫組織染色を行った。

3) 大動物移植モデルを用いた病理組織学的解析

ミニブタにおける移植モデルを用いて、滑膜由来間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植した。さらに組織切片を採取し、HE 染色を行って組織形成や、細胞浸潤、悪性化などを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、再生医療用の組織を用いて検討を行うものであり、解析にあたっては最小限のサンプル量で行えるように留意し、十分な説明と同意のもとで実施した。また

「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」として倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) p16 メチル化定量的 PCR

検出法のさらなる改良と変更の結果、現時点では 1/10,000 細胞のレベルでの p16 メチル化を検出できるようになった。合計 22 検体を用いて検討したが、全検体において陰性であることが検証された。

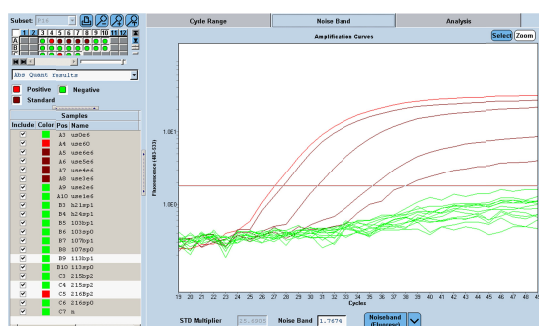


図 1 メチル化 p16 定量系を用いた検証

U2OS(p16 メチル化陽性ヒト骨肉腫細胞株)と SaOS2(p16 メチル化陰性ヒト骨肉腫細胞株)を様々な割合で混在させ、DNA を抽出し、それを用いて検量線を作成した。その結果 1:10,000 のレベルで検出可能であった。緑に示す線は実検体であり、すべて陰性であった。

2) DNA 損傷修復応答

AID も 22 検体で検討し、1 検体で検出感度以下の陽性 (38 サイクル以降での立ち上

がり) 検体があったが、それ以外はすべて陰性であった。ATM, p53 リン酸化については、10 検体の解析が終了し、12 検体のブロック作製が終了しているが、今のところ反応したとしても極めて軽微であることが明らかになった。

3) 病理組織学的解析

コントロール 7 匹、間葉系幹細胞移植群 7 匹で検討を行った。滑膜幹細胞移植群では滑膜細胞の著明な増殖、軟骨増生が認められ、異型細胞は皆無であった。

D. 考察

本研究では滑膜由来間葉系幹細胞に焦点を絞って、変異細胞検出と、DNA 損傷の程度の評価に取り組んだ。今までの世界的な報告からも、間葉系幹細胞からの腫瘍発生の報告は皆無(1 例の報告は細胞の contamination とされる)である。本研究は従って、間葉系幹細胞の安全性についての基盤的データを供給するものであり、また今後の培養系開発にあたっての、安全な手技の選択という面で有用になるものと考えている。今後感度を上げれば上げるほど、p16 のメチル化が検出されたり、変異が検出されたりという可能性があるが、あくまで最終製品の標準規格ではなく、基礎的なデータとして蓄積されていくことが重要と考えている。

実調製細胞での臨床検査という点では、

karyotyping や免疫不全マウスへの移植実験で、担保されていくと思われる。いずれにせよ新しい技術による検証データが蓄積し共有されることが期待される。

E. 結論

DNA 損傷の評価系(及び DNA 損傷を誘導する分子の評価系)、腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞 22 検体にて検証した。その結果、調製細胞においては DNA 損傷が最小限であり、また明らかな腫瘍化の徴候が認められないことが明らかになった。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, **Morio T**, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 104:703-10, 2013.

Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, **Morio T**, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K,

Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M,
Mochizuki M.

Use of a comprehensive polymerase chain
reaction system for diagnosis of ocular
infectious diseases.

Ophthalmology. 120:1761-8, 2013.

2. 学会発表

森尾友宏：

易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤
としての原発性免疫不全症

平成 25 年度遺伝子病制御研究所研究集会、
2013.10.25. 北海道、

森尾友宏：

免疫細胞培養ガイドライン（免疫治療関連
6 学会合同策定）について：医療機関・研
究施設に求められる基準

第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会
2013.8.24. 名古屋

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書**

細胞製剤の品質・安全保証に関する研究

分担研究者

清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 准教授

研究要旨

本学で開発したマイコプラズマ検査系の実用化とウイルス検査系の自動化に関する取り組みを行った。マイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される：TMDU 法)は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/ reaction の感度で検出可能なことが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (Mycoseq: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIA Symphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることを、模擬サンプルを使用した実験により確認した。

A . 研究目的

再生医療に使用する細胞製剤は、生体材料から得た組織・細胞を培養することにより調製し、生きた状態で投与されるため、原材料あるいは最終製品を滅菌処理することにより安全性を確保することは事実上不可能である。したがって、再生医療を実用化するためには、微生物汚染の問題を克服し、安全な治療用細胞製剤を供給する体制を整えることが極めて重要である。生体には細菌・真菌・ウイ

ルスなど多くの微生物が持続感染しているため、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは微生物汚染の問題を回避するには不十分であり、患者に投与する最終製品を全数検査して治療の安全性を担保することが必要と考えている。 本分担研究では、 1 . ヒトに持続感染することが知られているウイルスを主とした検査対象ウイルスのリストアップ 2 . それらを網羅的に検出可能な検出系の作成 3 . 関節関連組織及び滑

膜由来間葉幹細胞の微生物検査データの蓄積、4. 検査系の自動化 5. 滑膜由来間葉幹細胞を使用した軟骨再生医の微生物安全検査法の確立を目的に研究を行っている。本年度は、これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から142種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される:TMDU法)のバリデーション試験(今回は感度検定試験)と、現在汎用されているリアルタイムPCR法を応用したマイコプラズマ検出キット(MycoSEQ:Lifetechnologies)との比較試験、およびキアゲン社のQIASymphonyを用いたウイルス・検査系の自動化を目指した研究開発を実施した。

B. 研究方法

1. TMDU法によるマイコプラズマの検出

核酸の抽出は、使用したQIAGEN社のキットの説明書に従って実施した。マイコプラズマの検出は、本学で開発した142種類のマイコプラズマ属が検出可能なマルチプレックスPCR検査系により、マイコプラズマ属の16Sリボソーム・23Sリボソームおよびそれらのスペーサー領域に設定したプライマー・プローブ(合計15種類)を使用し、マイコプラズマゲノムの当該領域を増幅した。

・核酸抽出: QIAampMinElute virus spin kit (QIAGEN: 以下QIAGEN法と記載)

・PCR装置: LightCycler480 (ロッシュ)
・PCR反応: 95 10分処理の後、95 15秒, 60 60秒の反応を45サイクル
・PCR試薬: PCR試薬: AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)
・プライマー: 通常の合成DNAを使用
・プローブ: Taqman Probeを使用
・バリデーションに使用したマイコプラズマ(17種類) Mycoplasma arginine, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Mycoplasma hyorhinis, Mycoplasma lipophilum, Mycoplasma orale, Mycoplasma pneumonia, Mycoplasma primatum, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma synoviae, Ureaplasma urealyticum, Acholeplasma laidlawii, Spiroplasma citri

2. MycoSEQによるマイコプラズマの検出

マイコプラズマ検出キットとして発売されているMycoSEQ (Lifetechnologies) は以下の2つのコンポーネントからなる。

・MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit (PCR assay用)
・PrepSEQ Nucleic Acid Extraction Kit (核酸抽出用)

核酸抽出および検出操作はMycoSEQの説明書に従って行った。

3 . 添加回収試験の実施方法

添加回収試験の実施に当たってはマイコプラズマ試験法開発の標準細胞として採用されている CHO 細胞 DG44 株と添加する指標マイコプラズマとして *Mycoplasma orale* (E3329121020)を使用した。

4 . QIASymphony を使用した検査の自動化

使用キット : QIASymphony DSP DNA Minikit192 Version1

qPCR: LightCycler480 (ロッシュ)

・検査対象ウイルス種

HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19(PVB19), ADV の 13 種類

・PCR 反応 : 95 10 分処理の後、95 15 秒,60 60 秒の反応を 45 サイクル。

・PCR 試薬 : AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)

・プライマー・プローブ : 固相化 DNA ウイルス検出ストリップ (日本テクノサービス) を使用

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じるような研究は実施しなかった。

C . 研究結果

1 . マイコプラズマ検出の感度検定

方法に記した 17 種類のマイコプラズマ属

の菌種について、5 ~1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行った。その結果、n=3 の実験で、17 種類すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。したがって、TMDU 法は最低 5 cfu/reaction の検出感度を持つことが示された。

2 . キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に *Mycoplasma orale* 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では 20 μ g、QIAGEN 法では 12 μ g であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

3 . MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ によりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 31.25 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 31.64 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が

3倍以上高く、良好に検出された。

4. TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ により指標となるマイコプラズマ (*Mycoplasma orale*) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 35.63 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 34.98 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は抽出法による差はほとんど観察されなかった。

5. MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

MycoSEQ は SYBR Green のダイシグナル法であるため、Cp 値 36 付近で陰性コントロールからでもシグナルが検出されることがあり、PCR 反応後にメルティング解析 (T_m 値の測定) を行ったうえで陽性が陰性かの判定を行うことになっている。この現象は我々の実験においても図 1 のようなシグナルが観察されている。

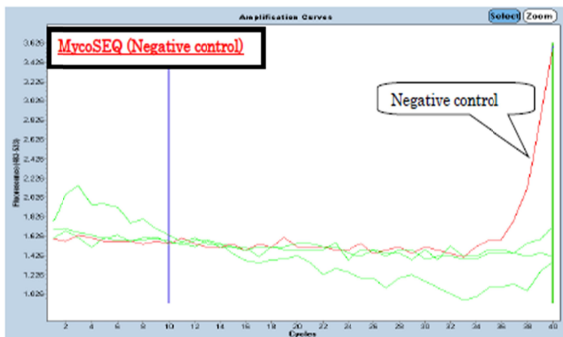


図 1 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性コントロールで出現するシグナル

このような擬陽性反応がでるため、MycoSEQ によりマイコプラズマを検出する際には T_m 値解析により真の陽性シグナルか否かを検証することが推奨されている。図 2 に T_m 値解析の結果を示す。

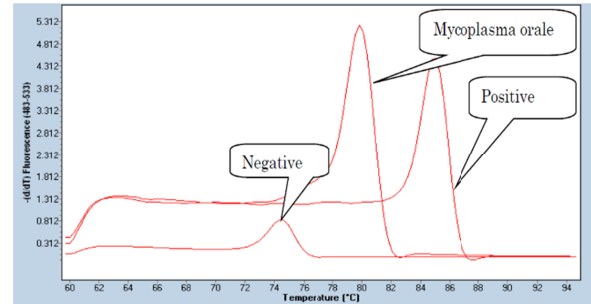


図 2 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に出現したシグナルの T_m 値解析結果

この結果のように陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、図 3 のようにマイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの T_m 値が中間段階になり判定に迷う場合が少なくない。

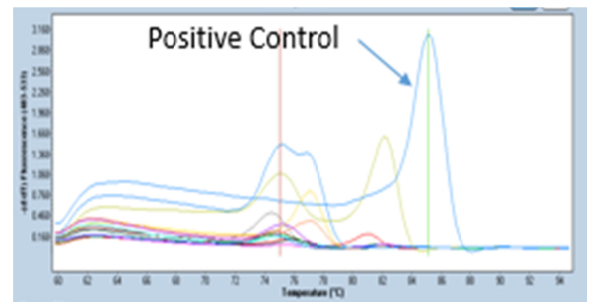


図 3 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性サンプルで見られた中間的 T_m 値を示すシグナルの例

6. ウイルス検査系の自動化

ウイルス検査系の自動化を目指し、固

相化ストリップと QIASymphony を使用し、被験ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA 0.5 µg に各ウイルスのスタンダードを 10~10000 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作製し実験を行った。

その結果、検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能なこと、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的データを得ることが可能であることが示された。

D. 考察

1. TMDU 法によるマイコプラズマ検出の感度検定

TMDU 法によるマイコプラズマ検出においては、遺伝子配列からは 142 種類のマイコプラズマを特異的に検出できることが示されている。この性能を実証するため 17 種類のマイコプラズマ属 (Acholeplasma, Spiroplasma, Ureaplasma を含む) の菌株を使用し、検出可能なことが実証され、またいずれの菌種についても 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。日本・欧州・米国薬局方に記載されているマイコプラズマ属の菌種は合計 9 種類であるが、すべて今回使用した 17 種類の中に含まれるため、TMDU 法は 3 極薬局方の検出要件を満たし

ていると考えられる。

2. マイコプラズマ検出における MycoSEQ と TMDU 法の比較

一般に汎用されているリアルタイム PCR を応用したマイコプラズマ検査キット MycoSEQ と我々が開発した TMDU 法との比較試験を行ったところ、抽出時間が TMDU 法の方が 2 時間早く抽出でき、最終産物を検査する場合には非常に有利であると考えられる。また、MycoSEQ を使用した添加回収試験において、QIAGEN 法で回収した DNA を使用した場合の方が prepSEQ で回収した DNA を使用した場合に比べ、Cp 値は変わらないもののシグナルが 3 倍以上高かったのは、prepSEQ で抽出した DNA 量が QIAGEN 法で抽出した DNA 量よりも多いことが影響している可能性が考えられた。しかし、TMDU 法でマイコプラズマの検出を行った際にはシグナルの高さはほとんど変わらず、TMDU 法の方がサンプルの量の変動に対する許容性が高いためと考えられる。本研究でも確認されたように、MycoSEQ では、陰性サンプルを測定した場合でも 36cycle 以降にシグナルの立ち上がりが観察されることがあり、しかも Tm 値解析でもそのシグナルが陽性を示すのか陰性を示すのかを確定できないことが経験される。MycoSEQ では検出に SYBR Green を使用しているためそのような問題を回避することは容易ではないが、その点我々の開発した TMDU 法では検出に蛍光プローブをしているため、MycoSEQ で

観察されるようなシグナルの立ち上がりは全くなく、結果の判定がより正しく行えると考えている。一方、これまでに得られている結果では、MycoSEQ と TMDU 法の間では検出感度・直線性・特異性においてほぼ同様な性能であるとの結果が蓄積されている。どちらの方法も 3 極薬局方の 9 種類のマイコプラズマ種をもれなく検出できることも確認されており、現時点では TMDU 法は実用化するために十分な性能を持つと判断している。今後は、我が国の公的機関からリリースされる予定のマイコプラズマの標準品を使ったバリデーションを行い、実用化するに足る十分な性能を持つことをデータにより明確に示していくことが重要である。

3. ウイルス検査系の自動化

QIAGEN 社と共同研究契約を締結し、QIAsymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進めている。本研究により、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用して確認された。今後は、RNA ウイルスとマイコプラズマ測定可否、プログラムの最適化を進める必要がある。さらに、実用化を目指し実際のサンプルの測定によるデータ取得を進める予定である。

E. 結論

これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される：TMDU 法)は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (MycoSEQ: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、我々の開発した TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIAsymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用した実験により確認した。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G . 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, **Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.:

Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. Journal of the Neurological Sciences 324, 190–194(2013)

Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ.:

EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. Blood 121: 4512-4520(2013)

Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. Respiration, [Epub ahead of print] (2013)

Ito K, **Shimizu N**, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.:. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. Internal Medicine. 52(2):201-11 (2013)

北條浩彦、**清水則夫** :

基本編 - 原理と基本知識 -

リアルタイム PCR を使った解析の基本
10 プライマー/プローブの設計手順 マルチプレックスの場合
原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p72-74 2013 発行

清水則夫、渡邊 健、外丸靖浩 :

実践編 - プロトコールを中心に -
章 遺伝子量解析

15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査
原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p192-202

2. 学会発表

今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉佑規乃、新井文子、中澤温子、伊藤守、

清水則夫、藤原成悦 :

難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究
2013.11 日本ウイルス学会 神戸

清水則夫 :

再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発
2013.9 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 東京

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3.その他
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究分担者

赤澤智宏 東京医科歯科・大学院保健衛生学研究科 教授

研究要旨

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治療が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCsを得る際の組織採取の侵襲や、MSCsの *in vitro* における継代培養には限界があるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。本研究では、iPS細胞（iPSCs）を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。また、MSCsの移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を解析した。

様々な組織由来の iPSCs に対し、ペレット培養法による *in vitro* での軟骨分化誘導を行うことで、軟骨分化しやすい株の同定を行った。スクリーニングによって選別された iPSCs を Hanging drop 培養法で3日間培養して細胞集塊を作成し、軟骨欠損モデルラットに 1.7×10^6 cells を移植した。移植後4週でラット大腿骨を摘出し、Toluidine Blue および Safranin O で染色して軟骨分化を確認したところ、移植した MSCs とほぼ同様に iPSCs が軟骨細胞に分化したことが確認された。また、移植細胞より RNA を抽出して遺伝子の定量的解析により、Col2, Sox9 などの軟骨分化マーカーの発現が優位に上昇していることが確認された。

あらかじめ分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。

A. 研究目的

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治療

が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCsを得る際の組織採取の侵襲や、MSCsの *in vitro* における継代培養には限界が

あるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。

iPS 細胞 (iPSCs) は皮膚線維芽細胞などの体細胞に初期化因子 Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の遺伝子を導入することで樹立され、ES 細胞とほぼ同等の分化能を持った幹細胞である。iPSCs を用いて軟骨を再生することが可能となれば、侵襲性が低く、ほぼ無限に移植細胞を供給できる理想的な細胞になると考えられる。しかし、iPSCs の問題として、株間での性質の違いが指摘されている。特に分化誘導に対して抵抗性を示す iPSCs 株が残存し、移植先での腫瘍形成の原因となりうることが報告されている。iPSCs を移植する際は Nanog 遺伝子の発現を減衰させ、予め分化抵抗性の iPSCs を除去することが求められるが、iPSCs は株間の多様性が高いことから、適切な細胞株のスクリーニングが必要であると考えられる。

本研究では、iPSCs を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。予め分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。また、MSCs の移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を詳細に解析した。本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに

於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態に軟骨欠損部に 10 分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop 法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS 細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

B. 研究方法

マウス MSCs の分離・培養方法

8~12 週齢オスマウスの大腿骨・脛骨から 0.2% コラゲナーゼ処理によって骨髓細胞を抽出し、フローサイトメーター (FACS) で PDGFR (+)、Sca-1(+), CD45(-)、Ter119(-) の MSCs を採取した。採取した細胞を 10cm ディッシュに播種し 37 5% CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。

マウス iPS 細胞の培養方法

iPSCs 培養時の Feeder として用いる SNL 細胞 (SNLCs) は、予めゼラチンコートした 10cm ディッシュに播種し、37 5% CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。Feeder として用いる前日に Mitomycin C (日本薬局方) で処理し、細胞増殖を阻害したものを Feeder として用いた。iPSCs は

37 5% CO₂ で培養し、毎日培地交換をした。本研究では A 株(MEF 由来 Nanog GFP/SOX10 DsRed-iPSCs)、B 株(MEF 由来 Nanog GFP-iPSCs)、C 株(MEF 由来 Oct GFP-iPSCs)の 3 株を用いた。

軟骨分化誘導と分化能力評価

MSCs の分化誘導の際は 3x10⁵ 個、iPSCs は 6x10⁵ 個を 15mL 遠沈管に回収し、軟骨分化誘導培地 1mL を加えて 200g で 4 分間遠心した。遠沈管を立てた状態で 37 5% CO₂ で 3 週間培養しペレットを作成した。培地交換は遠沈管内の培地の半量を吸い新しい培地を半量加え、3 日毎に行った。

軟骨組織欠損ラットへの細胞移植

Lewis ラットの膝関節部位を切開した後、膝蓋腱をずらして脱臼した。大腿骨内側顆の軟骨部位に電動ドリルで直径 1.8mm の穴をあけ、軟骨組織欠損を作成した。移植細胞がレシピエント組織に生着したことを可視化するため、移植細胞を予め赤色蛍光色素である Dil (Life Technologies) で染色した。移植の際、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作成した。Hanging drop 培養法では、MSCs 培地に 2.5x10⁵ cells/35μL の濃度の細胞懸濁液を作り、ディッシュの蓋に 35μL を滴下したものを 3 日間培養して細胞集塊を作成した。得られた細胞集塊をラットの一膝につき 4 つ移植した(1.0x10⁶ cells/knee)。

iPSCs では iPS 細胞滴(1.7x10⁶ cells/knee)を用いて細胞集塊を作成した。MSCs および iPSCs の細胞集塊を移植後、10 分間ラット膝の欠損部を上部にしたまま静置し細胞集塊を欠損部に安定させた後、膝蓋腱の位置を戻してから縫合した。

ラット大腿骨の摘出および組織染色

移植後 2 週あるいは 4 週のラット大腿骨を摘出し、凍結ブロックを作成した。12μm の厚さで薄切し、トルイジンブルーおよびサフランin 0 で染色した。また、移植した Dil(+) の局在は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS MVX10) で観察した。

C . 研究結果

軟骨分化に適した iPSCs のスクリーニング

iPSCs は株によって分化能が異なるという問題点があり、再生組織に応じた細胞株の選定が必要である。そこで本研究では、3 株の iPSCs (A 株, B 株, C 株) における *in vitro* での軟骨分化能を評価した。始めに、各 iPSCs をそれぞれ軟骨誘導培地にてペレット培養し、作製したペレットのパラフィン切片をトルイジンブルーとサフランin 0 で組織学的に評価した。その結果、軟骨ペレットの染色によって、A 株由来のペレットでは染色性が見られなかったが、B 株由来のペレットが MSCs ペレットと同様に軟骨様の染色が確認された。なお、C

株由来の細胞はペレットを形成せず染色像が得られなかった(図 1A)。

次に、各ペレットの RNA を回収し未分化マーカー-Nanog と軟骨分化マーカー-Col2a1・Aggrecan・Sox9 の発現量を解析した。軟骨分化誘導法が既に確立されている MSCs を陽性対象として比較した。B 株の iPSCs は軟骨分化誘導によって Nanog が減衰し、Col2a1 の発現が増加することが確認された(図 1B)。以上の結果から、3 株の中で B 株が軟骨分化能が高く、移植後の腫瘍化の可能性が低い iPSCs であることが示唆された。

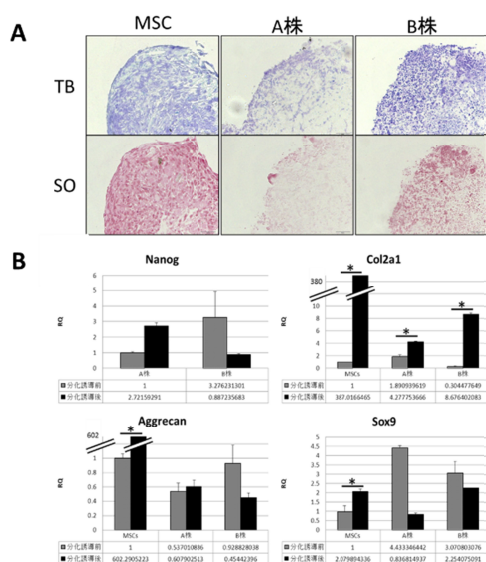


図 1 MSCs ペレットと各 iPSCs ペレットの染色像および定量的 RT-PCR A) マウス MSCs 及びペレット形成をした A 株 B 株のマウス iPSCs ペレットを、トルイジンブルー (TB) とサフラニン O (SO) で染色した。B) A 株・B 株の Nanog 発現量と、各軟骨分化マーカー発現量を比較した。(*P<0.05)

Hanging drop 培養による Nanog 発現量の解析

ラット組織への細胞移植の際には、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防

ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作製・移植を行った(図 2A)。iPSCs を予め軟骨誘導培地にて Hanging drop 培養を行い、その際の Nanog の発現解析を経時的に行った。使用した iPSC 細胞は前述のスクリーニングで選出した B 株の iPSC 細胞を用いた。Hanging drop 前後における Nanog の発現を定量的 PCR によって解析した結果、Hanging drop 培養前の Nanog の発現量に対して Hanging drop 培養 1 日以降で Nanog 発現量が減少する傾向がみられた。これらの結果から、Hanging drop 培養法を用いることで腫瘍化の原因になりうる Nanog 遺伝子の発現を低下させる事が確認された(図 2B)。

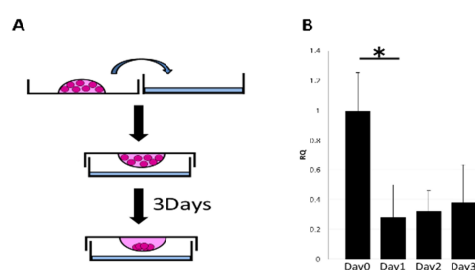


図 2 Hanging Drop 培養法による Nanog 発現の低下 A) Hanging drop 培養法, B) B 株 iPSC 細胞の未分化維持培養時・Hanging Drop 培養 1 日・2 日・3 日それぞれの Nanog 発現量を比較した。(*P<0.05)

MSCs を用いた軟骨組織再生

マウス骨髄より純化した MSCs を用いて、ラット軟骨組織の再生が可能かどうかを確認した。ラット軟骨欠損部に移植した Dil(+)-MSCs は、移植後 2 週および 4 週で生体内での生着が確認された。さらに、細胞移植を行わなかったモデルと比較して軟骨再生能力が高く、移植後 4 週では軟骨

細胞様の染色像が確認された(図3)。これらの実験により、マウス細胞をラット軟骨欠損部に移植する系を確立し、MSCsの軟骨再生への関与を直接的に解析することが可能となった。

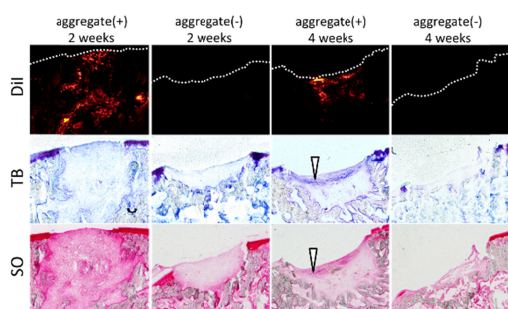


図3 マウス MSCs を軟骨欠損モデルラットに移植

移植後2週および4週のラット軟骨欠損部をトリイジンプルー・サフラニンOで染色した。軟骨様細胞(矢尻)

iPSCs を用いた軟骨組織再生

マウス iPSCs を用いた軟骨組織の再生能力を調べるため、ラット軟骨欠損モデルに対し、マウス iPSCs の移植を試みた。マウス MSCs の移植結果から、移植後4週で軟骨細胞様の分化が確認されたため、iPSCs の移植に関しても移植後4週の観察を行った。移植後4週の関節を取り出し、組織切片を作製して解析した結果、移植細胞全体が軟骨細胞様の染色像を示した(図4A)。また、移植組織から細胞を回収し、遺伝子発現解析を行った結果、未分化状態のB株よりもNanogの発現は減少し、軟骨分化マーカーの発現が上昇していることが確認された(図4B)。以上の結果から、iPSCs を移植することで *in vivo* において

軟骨分化が進み、軟骨再生を促していることが示唆された。

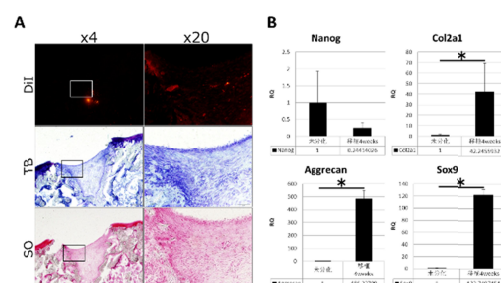


図4 移植マウス iPSCs(B株)の染色像および定量的 RT-PCR

移植後4週のラット軟骨欠損部をトリイジンプルー・サフラニンOで染色した。移植細胞を採取し、定量的 RT-PCR で各マーカーの解析をした。(* $P < 0.05$)

D. 考察

研究では、MSCs で既に確立されている軟骨移植技術を iPSCs に応用し、軟骨再生を試みた。iPSCs による組織再生は、未分化状態の iPSCs の残存が腫瘍化の原因とされており、さらに iPSCs の株ごとに分化能が異なることが実用化に向けた障壁となっていた。これらの問題をクリアするために、本研究では軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング方法を開発し、予め細胞集塊を形成する過程で Nanog 遺伝子を低下させ、安全で効果的な iPSCs 移植治療の可能性を示した。スクリーニングで用いたペレット培養法は、*in vivo* における軟骨分化を *in vitro* で疑似化したものであり、iPSCs 株のスクリーニングとして有用であると期待される。また、移植前に細胞集塊を形成する際、未分化 iPSCs を軟骨分化誘導培地で3日間培養したが、よ

り長期間分化誘導をかけた iPSCs を用いれば、*in vivo*での更なる軟骨分化誘導が期待できると考えられる。

本研究では、移植直前に予め軟骨分化誘導培地での培養をした後に欠損部への移植を行ったため、細胞が分化もしくは形質転換し、腫瘍が形成されなかった可能性も考えられる。過去の報告で、MSCs が産生される TGF- β が免疫寛容に寄与していることが報告されているが、軟骨欠損モデルラットへのマウス MSCs およびマウス iPSCs の移植が可能だった理由として、移植細胞が産生する TGF- β が関与しているかもしれない。

今後は、SCID マウスを用いて免疫拒絶の影響を最低限にし、軟骨再生能をより長期に解析することが期待される。患者自己 MSCs による軟骨再生治療はすでに臨床で行われているのに対し、iPSCs による軟骨再生は未だに基礎研究の段階である。本研究により、より安全な軟骨移植治療の実現化に向けた技術開発が発展することを期待する。

E. 結論

本研究では、軟骨欠損モデルラットにマウスの MSCs および iPSCs を移植し、軟骨細胞様の分化を確認することに成功した。*in vitro* と *in vivo* での軟骨分化誘導能力には相関があり、この知見を利用した安全な軟骨再生治療の実現が可能になると

考えられる。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

学会発表

国内学会発表

須藤絵里子、馬淵洋、小柳明日香、大関信武、宗田大、関矢一郎、

赤澤智宏：

マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の有効性の検討

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

馬淵洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、宗田 大、関矢一郎、**赤澤智宏**：

組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Atesok K, Doral MN, Bilge O, <u>Sekiya I.</u>	Synovial stem cells in musculoskeletal regeneration.	J Am Acad Orthop Surg.	21	258-9	2013
Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, <u>Morio T.</u> Teraoka H, Mizutani S.	Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks.	Cancer Sci.	104	703-10	2013
Sugita S, Ogawa M, <u>Shimizu N,</u> <u>Morio T.</u> Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M.	Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases.	Ophthalmology.	120	1761-8	2013
Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, <u>Shimizu N.</u> Huang G, Yu Q,	EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity.	Blood	121	4512-20	2013

Chng WJ.					
関矢一郎	滑膜幹細胞による軟骨再生医療の開発	今日の移植	27(1)	53-60	2014
中村智祐 関矢一郎 宗田 大 小林英司	滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生治療：ミニプタモデルでの検討	CLINICAL CALCIUM	32(12)	49-57	2013
宗田 大	膝屈筋腱を用いた double-bundle reconstruction I - 4つ折半腱様筋腱を用い経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔を製作する2重束 ACL 再建術-	整形外科最少侵襲手術ジャーナル	66	57-66	2013
宗田 大	膝蓋腱炎（ジャンパー膝）の治療 update	整形災害外科	51	1371-6	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関矢一郎	関節軟骨損傷	福林 徹 (監修) 篠塚昌述 (編集)	スポーツ 整形外科 マニュアル	中外 医学社	東京	2013	194-96
関矢一郎	変形性膝関節症	福林 徹 (監修) 篠塚昌述 (編集)	スポーツ 整形外科 マニュアル	中外 医学社	東京	2013	197-200
宗田 大	VIII 靭帯再建術 後再断裂に対す る Revision Surgery「再再建 術と私のポイン ト」	越智 光夫	膝靭帯手術 のすべて	メジカ ルビュ ー社	東京	2013	385-9
宗田 大	運動でひざの痛 みを楽しむ	宗田 大 (総監修)	別冊NHKき ょうの健康 ひざ痛を治 す	NHK 出版	東京	2013	34-50
関矢一郎	手術でひざの痛 みを改善する	宗田 大 (総監修)	別冊NHKき ょうの健康 ひざ痛を治 す	NHK 出版	東京	2013	66-79
関矢一郎	すり減った軟骨 を再生させる新 しい治療に期待、	宗田 大 (総監修)	別冊NHKき ょうの健康 ひざ痛を治 す	NHK 出版	東京	2013	80
宗田 大	膝前十字靭帯再 建術:ハムストリ ング腱使用例	臨床スポ ーツ医学編集 委員会	関節鏡視下 手術と術後 リハビリテ ーション	文光堂	東京	2013	104-7
北條浩彦、 清水則夫	プライマー/プ ロープの設計手 順 マルチプレ ックスPCR の場 合	北條浩彦	原理からよ くわかるリ アルタイム PCR 完全実 験ガイド	羊土社	東京	2013	72-4

清水則夫 、 渡邊健、 外丸靖浩	ウイルス感染症 を診断する ウ イルスゲノムの 定性的検査と定 量的検査	北條浩彦	原理からよ くわかるリ アルタイム PCR 完全実 験ガイド	羊土社	東京	2013	192-202
-------------------------------	--------------------------------------------------	------	--------------------------------------------	-----	----	------	---------