

滑膜幹細胞を用いた軟骨再生医療

東京医科歯科大学
再生医療研究センター、
応用再生医学分野（兼任）

関矢 一郎 教授

■半月板損傷の現状

厚労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、そのうち半月板を温存する縫合術は約10%で、切除術が約90%を占めています。しかし、半月板を広範囲に切除すると、変形性膝関節症が必発します。半月板損傷の機能維持治療の第一選択は半月板縫合術なのですが、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（円周方向の断裂）に限られています。また修復術の適応が限定されているにも関わらず、約30%は再断裂し、再手術が必要となります。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といえます。

■滑膜幹細胞の特性

同一ドナーから骨髓液、滑膜、骨膜、脂肪、筋肉を採取し、間葉系幹細胞を分離・増殖させ、同数の細胞を21日間ペレット培養させると、滑膜由来のものが最も大きい軟骨塊を形成しました¹⁾。同様のことは、ヒトのほかにラット²⁾、ウサギ³⁾、ブタ⁴⁾でも示されており、滑膜由来の間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）が半月板再生の間葉幹細胞源として優れていることを示唆しました。

また、自己血清で十分な数の間葉系幹細胞を確保することができるのか検討するために、膝前十字靱帯再建術を行なう方から血液を採取し、血清を分離しました。10%自己血清を用いて14日間培養すると、滑膜幹細胞は9人の方、すべてから1000万細胞以上採取することができました。⁵⁾

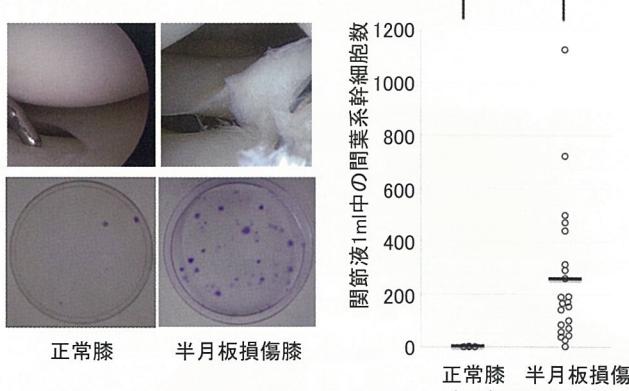


図1 関節液中の間葉系幹細胞は半月板損傷後に増加する。
ヒトの正常膝と半月板損傷膝から関節液を採取し、細胞成分を14日間培養し、クリスタル・バイオジッドで染色した。関節液1mlあたりの間葉系幹細胞数は、正常膝よりも半月板損傷膝由来からのものが、有意に多い(*p<0.01)。(9)より改変)

滑膜を酵素処理して得られる滑膜細胞を、14日間培養するとおよそ1%の細胞がコロニーを形成します（図1）。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わかりました。

■動物モデルでの検討

ラットで半月板を切除した膝の関節内に、ルシフェラーゼを発現する滑膜幹細胞の浮遊液を注射し、移植細胞の局在を経時的に観察したところ、投与した滑膜幹細胞は関節内に留まり、他の組織に移動するような現象はみられませんでした（図2）。また、LacZを全身性に発現するラットから得られた滑膜幹細胞を関節内注射し、2週間後に細胞の局在を観察すると、滑膜幹細胞は半月板欠損部と関節包閉創部に観察され、半月板欠損部に効率よく接着していることが確認できます。4週後、コントロールでは半月板が欠損したままですが、滑膜幹細胞を投与したものは半月板様組織が形成されていました（図3）。滑膜幹細胞投与側では12週後には再生半月板に2型コラーゲンの発現やLacZ陽性細胞を多数認められ、滑膜幹細胞が直接半月板細胞に分化することが示されました（図4）。一方、細胞を投与しないコントロール側では、12週後でも線維組織は観察されますが、2型コラーゲンの発現は認められませんでした。

より臨床に近いモデルとして、血行が乏しい半月板の部位に断裂を作成し縫合後、滑膜幹細胞浮遊液を縫合部に10分間静置すると、滑膜幹細胞は半月板損傷部と周囲の滑膜に接着し、周囲の滑膜組織の誘導を促し、治癒を促進することをミニブタのモデルで示しました。

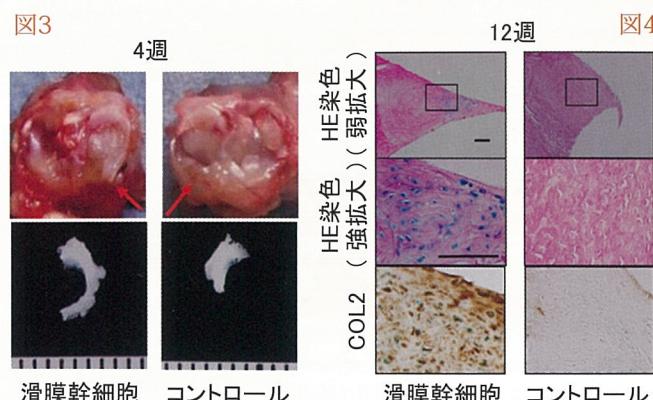
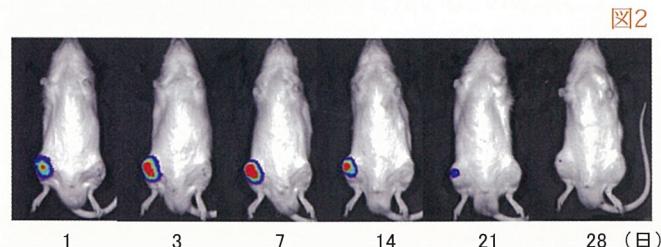


図5



板がscaffoldの機能を果たし、滑膜幹細胞投与により半月板機能が再獲得されることを期待しています。次は半月板が周囲にずれて逸脱したケースに対して、鏡視下手術を組み合わせて、半月板を再生させる臨床研究を予定しています。半月板の機能低下は日本に2500万人近くいる変形性膝関節症の大きな要因ですが、滑膜幹細胞は関節軟骨の再生にも有用であり⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾、最終的には外科的手術を組み合わせて滑膜幹細胞移植による変形性膝関節症の再生医療の開発を目指しています。

参考文献:

- 1)Sakaguchi Y, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52: 2521-2529, 2005
- 2)Yoshimura H, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007; 327: 449-62.
- 3)Koga H, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333: 207-215, 2008
- 4)Nakamura 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* 14: 327-338, 2012
- 5)Nimura A, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 2008;58:501-10.
- 6)Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect
Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, Suzuki S, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I.
Arthritis Res Ther. 2008;10(4):R84.
- 7)Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins.
Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, Tsuji K, Sekiya I.
Osteoarthritis Cartilage. 2010 Oct;18(10):1300-9.
- 8)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.
Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E.
Cytotherapy. 2012 Mar;14(3):327-38.
- 9)Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury.
Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I.
Clin Orthop Relat Res. 2014 May;472(5):1357-64



関矢 一郎

Ichiro Sekiya

東京医科歯科大学

再生医療研究センター センター長
応用再生医学分野 教授

■半月板再生医療への臨床応用

これまでの基礎研究の成果をもとにして、従来であれば切除術の適応となる損傷半月板に対して縫合術を行い、さらに滑膜間葉系幹細胞を関節鏡下で移植する臨床研究を2013年より開始し、これまでに5例の移植を終了しました(図5)。本法は半月板縫合と細胞移植の2つの関節鏡視下手術を組み合わせたものです。

まず、縫合術の約2週間前に末梢血を採取し、細胞培養に必要な自己血清を用意します。次いで、半月板縫合術を行い、同時に滑膜を約0.5g採取し、直ちに手術室と同じフロアにあるセルプロセッシングセンターに搬送します。搬入後、酵素処理によって細胞を分離し、10%自己血清含有培地にて採取した滑膜細胞を14日間培養します。培養液に成長因子は添加していません。約0.5gの滑膜と約70mLの自己血清から14日間で平均5000万細胞を採取することができます。2度目の手術において、この細胞の浮遊液をシリジに充填し、関節鏡視下で半月板縫合部に10分間静置し、移植します。この方法は動物血清や人工素材を必要とせず、低侵襲で実施することが利点です。

滑膜幹細胞の調製にあたっては工程に沿った規格試験を実施しています。自己血清に対しては培養開始までに、指標細胞を用いた細胞増殖性試験を実施し、ウイルス・マイコプラズマ検査により陰性であることを確認します。もう一つの原料である滑膜については細胞調製施設搬入時に受入検査として無菌試験とウイルス・マイコプラズマ検査により陽性検体を排除します。培養開始後は細胞移植前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、基準への適合性を確認します。

■おわりに

私たちは半月板縫合後の治癒促進を目的として、滑膜幹細胞を移植する臨床研究を開始しました。この中には半月板の変性が強く、癒合するだけでは半月板機能が改善する可能性の低いものも含まれていますが、変性半月