

総説

関節軟骨再生医療の現状と将来展望

中川 晃一

東邦大学医学部整形外科学講座 (佐倉) 教授

要約: 関節軟骨は無血管の組織であり, 細胞分裂活動に乏しいことから, 広範囲の損傷は本来の硝子軟骨としては修復されない. 関節軟骨欠損に対する再生医療として, 1994年に自家軟骨細胞を体外で培養後に損傷部に移植する自家培養軟骨細胞移植術が初めて臨床応用された. しかし, この方法は軟骨細胞を採取する手術と体外培養した細胞を移植する手術との2回の手術を要し, 医療経済的な負担が大きいという問題点がある. さらに, 移植に用いる軟骨細胞は同じ関節内 (非荷重部) の正常軟骨より採取するため, 移植可能な細胞数に限界がある. これらの問題点を克服するために, コラーゲンや多糖体, 生体吸収性人工材料などの足場材料や, 自家組織より採取した間葉系幹細胞, embryonic stem cell (ES細胞), induced pluripotent stem cell (iPS細胞) などの幹細胞を利用する, さまざまな改良法が考案されている. 本稿では, こうした軟骨再生医療の発展について解説するとともに, 当科で研究開発中の絹フィブロインを用いた軟骨再生法につき紹介する.

東邦医学会誌 61(5): 232-237, 2014

索引用語: 関節軟骨, 再生医療, 自家培養軟骨細胞移植術, 組織工学

関節軟骨はII型コラーゲンとプロテオグリカンからなる豊富な細胞外基質が特徴であり, 潤滑性や加重時の負荷吸収など, 関節機能に重要な役割を担っている. しかし, 栄養血管を有さず, また細胞密度が低いことなどから, 自己修復能力に乏しい組織である. 広範な軟骨損傷が自然治癒することなく, また, 重度の関節軟骨損傷は変形性関節症を引き起こすことが知られている. このため, 軟骨修復を目的として従来さまざまな修復法が試みられてきた. 損傷部の骨穿孔により骨髄からの間葉系細胞遊走を促すDrilling法¹⁾やMicrofracture法²⁾は, 簡便な方法で, 比較的良好な短期成績が得られている. しかし, 線維軟骨としての修復であるため, 硝子軟骨である正常関節軟骨と比べると, 力学的強度, 対摩耗性ともに劣り, 長期成績は期待できない.

軟骨欠損部をより生理的に修復することを目的として, 非加重部から複数の骨軟骨柱を採取して移植する方法 (自家骨軟骨移植術, mosaicplasty³⁾)や, 自家軟骨細胞を体外

で単層培養し増殖させた後に欠損部に移植する方法 (自家培養軟骨移植術, autologous chondrocyte implantation: ACI) が開発された⁴⁾. ACIは硝子軟骨による再生が期待できる有用な方法である一方で, 軟骨細胞を採取する手術と体外培養した細胞を移植する手術との2回の手術を要するという問題点がある. さらに, 特殊な培養設備を必要とすることから, 当初臨床応用は極めて限られた施設に制限されていた. また, 移植に用いる軟骨細胞は同じ関節内の正常軟骨 (非荷重部) より採取するため, 移植可能な細胞数には限界がある. 本稿では, ACIの現状ならびに, 現在も行われているさまざまな改良法について概説する.

自家培養軟骨細胞移植術

(autologous chondrocytes implantation: ACI)

Peterson et al. は1987年よりスウェーデンにおいてACIの臨床応用を開始した. 患者の非加重部より少量の関節軟骨を採取し, 単層培養で細胞を増殖させ, 欠損部に

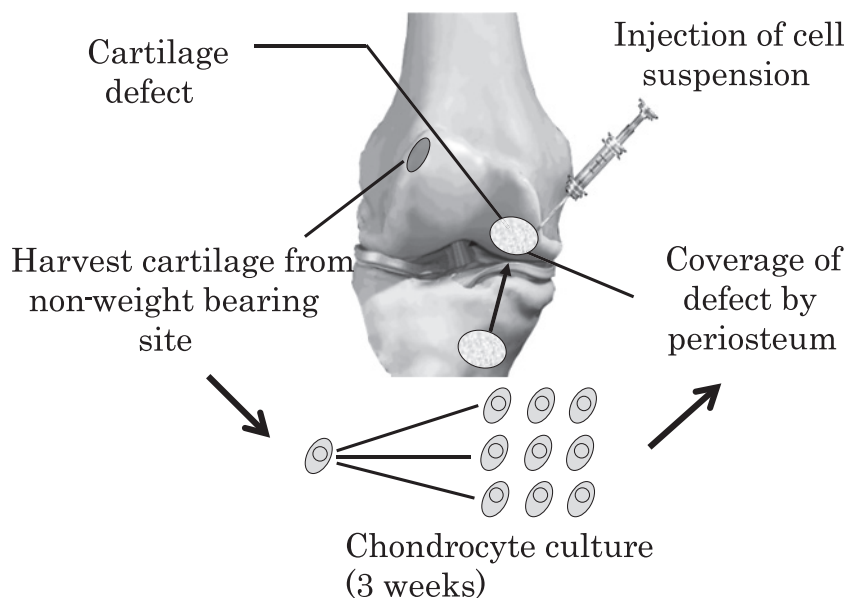


Fig. 1 Outline of the procedure for autologous chondrocyte implantation (ACI)

Table 1 Comparison of mosaicplasty and ACI

	Mosaicplasty	ACI
Defect size	1.0-4.0 cm ²	2.0-12.0 cm ²
Number of procedures	1	2
Periosteum	Not required	Required
Harvest site	Large	Small
Pain at donor site	3%	0%
Osteochondral defect	Acceptable	Bone graft needed
Cell culture facility	Not required	Required

ACI: autologous chondrocyte implantation

達着した骨膜下にその細胞を注入するという方法である (Fig. 1)。1994年、Brittberg et al. はこれらの初期症例 23 例の良好な治療成績を報告し⁴⁾、この報告を機に ACI は世界的に注目されるようになった。1995年より米国 Genzyme 社 (Genzyme Corp., Cambridge, MA, USA) が Carticel[®] として事業化して症例を重ね、またドイツやイスラエルでは他社により同様なサービスが開始された。日本でも 1999年より千葉大学において Carticel[®] の臨床試験が行われ、良好な成績が得られた^{5,6)}。しかし、価格や輸送等の問題により、保険診療として厚生省 (当時) に認可されるには至らなかった。

ACI の適応は、15~50 歳までの有痛性の膝関節全層軟骨欠損患者である。ACI は軟骨細胞を必要に応じて増殖することが可能なため、特に広範な軟骨欠損を有する症例に有用とされる。Mosaicplasty では 1.0~4.0 cm² の欠損が適応 (最大で 8.0 cm²) なのに対し、ACI は 2.0~12.0 cm² (最大で 16.0 cm²) が適応とされている。大腿骨顆部または膝蓋大腿関節面の軟骨欠損症例が適応であり、離断性骨

軟骨炎による骨軟骨欠損も含まれるが、骨欠損の深さが 8 mm までの症例に限定される。それ以上の場合は、第一段階として骨移植を行ってから ACI を施行するか、mosaicplasty が推奨される。靭帯損傷は ACI の術前、または ACI と同時に修復、再建することが必要である。関節軟骨欠損症例に対する手術的治療に際しては、mosaicplasty と ACI の両術式の特徴 (Table 1) をよく理解した上で、適応が決定されるべきであろう^{7,8)}。

足場材料による ACI の改良

ACI の問題点としては、骨膜の採取と縫着が必要であることや、軟骨細胞が浮遊液として移植されること (細胞漏出の危険があり、また移植部の細胞密度が不均一となる⁹⁾) などが挙げられる。これらを改良する目的で、軟骨細胞の培養に足場材料が利用されるようになった。まず臨床に応用されたのは、ブタ由来の I/III 型コラーゲン膜である¹⁰⁾。I/III 型コラーゲン膜を緻密層と粗な層の 2 層構造を持つように改良し、粗な層に軟骨細胞を播種して移植する方法がドイツの Verigen 社 (Verigen AG, Leverkusen, Germany) により開発され、ACI 原法と同等の良好な臨床成績が報告された (matrix-induced autologous chondrocyte implantation : MACI)¹¹⁾。コラーゲン以外にもヒアルロン酸やキトサン等の多糖体や、poly L-lactic acid (PLLA)、polyglycolic acid (PGA) 等の生体吸収性人工材料等など、多くの足場材料が ACI に応用されている。

日本で初めて保険診療として厚生省 (当時) に認可されたのは、ウシ I 型コラーゲンから作られたアテロコラーゲンを足場材料として用いる方法である¹²⁾。開発者の越智ほかにより、広島大学を中心とした他施設臨床試験が行わ

れ¹³⁾, 2013年より(株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング(J-TEC社; 蒲郡)によりJACC[®]として事業化された。この方法の特長は, アテロコラーゲンゲル内で3次元培養されることで軟骨細胞が脱分化することなく本来の形質を維持していることと, 細胞が浮遊液ではなくゲル状で移植されるため, 骨膜下から漏出・脱落することなく移植部に留まる点である。日本国内においてACIがようやく保険診療として認可されたことで, 今後軟骨再生治療がますます広まることが期待される。

幹細胞を利用した軟骨再生法

ACIは正常関節軟骨組織から分離した細胞を移植に用いるため, 利用できる細胞数に限界がある。この細胞数の問題を解消するために, 幹細胞を利用した軟骨再生法の研究が多くなされている。軟骨再生に用いられる幹細胞としては, まず胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)が挙げられる。しかし, 倫理的な問題から, 自身の間葉組織(骨髄, 滑膜, 脂肪など)に由来する体性幹細胞である間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)が利用されることが多い。最近, 体細胞由来の人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)を軟骨再生に応用する基礎研究もみられるようになった¹⁴⁾。間葉系幹細胞の利用は, 骨髄由来のものがすでに臨床に応用され, 長期成績も報告されている¹⁵⁾。近年は, 特に滑膜由来の間葉系幹細胞が軟骨再生に有用であることが示され, 注目されている。

Sakaguchi et al. はさまざまな組織由来の幹細胞の中で滑膜由来細胞が最も軟骨形成能に優れていることを示した¹⁶⁾。この性質を関節軟骨修復に応用し, 軟骨欠損に対する自家細胞移植術に滑膜細胞を利用する試みがなされ^{17, 18)}, すでに臨床応用も始まっている。滑膜細胞の軟骨分化に関するほとんどの報告では, 滑膜由来の幹細胞(stem cells), 前駆細胞(progenitor cells), 間葉系細胞(mesenchymal cells)といった呼び名で, 分離培養した細胞が用いられている。一方, 滑膜細胞を分離培養せずに, 滑膜組織をそのままゲルに包埋して培養(explant culture)またはヌードマウス皮下に移植して, 軟骨への分化を解析した報告も散見される^{19, 20)}。これらの結果は, 滑膜組織内の特定の細胞群(幹細胞)のみが軟骨に分化するのではなく, 滑膜細胞自体に軟骨分化能があることを示している。滑膜細胞は軟骨損傷のある関節内より容易に採取することができることから, 軟骨再生に利用する細胞として有用かつ実践的であると思われる。

広範囲軟骨欠損に対する軟骨再生の試み

ACIの限界として, 広範囲の軟骨欠損には対応できない点が挙げられる。広範囲欠損では, 骨膜や培養軟骨細胞(または間葉系幹細胞)を含んだ足場材料欠損部に移植す

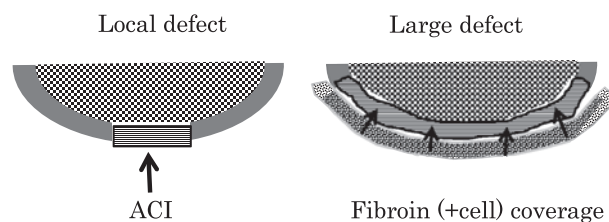


Fig. 2 Autologous chondrocyte implantation (ACI) for local defects and fibroin coverage for large defects.

ることが困難なためである。広範囲欠損に対する軟骨再生をめざして, 東邦大学では, 京都大学や信州大学と共同で絹フィブロインを利用した軟骨再生の研究を行っている。Kachi et al. は, 繭糸由来のフィブロインタンパク上において, 軟骨細胞の細胞凝集体形成能と細胞移動能を有することを見いだした²¹⁾(両者を合わせて「cell delivery 機能」と命名)。さらに, フィブロインスポンジ内では, 凝集体となった軟骨細胞は良好な基質形成することが示された^{22, 23)}。この性質を利用して, 広範囲軟骨欠損に軟骨細胞(または間葉系幹細胞)を播種したフィブロインスポンジを貼り, そこから供給された細胞により軟骨を再生する方法を考案した²⁴⁾。フィブロインのcell delivery機能の詳細な機序はまだ不明であるが, 現在それを解明する基礎研究も続けられている²⁵⁾。

さらに, より簡便な方法として, 広範囲軟骨欠損部に骨髄穿孔(microfracture法)を行ってその上をフィブロインスポンジで被覆する実験(イヌ)を行ったところ, 骨髄内からの間葉系幹細胞による軟骨組織形成が促進されることが明らかとなった²⁶⁾。絹フィブロインには軟骨細胞の分化を維持しながら, 被覆した軟骨欠損部へ修復に必要な細胞を供給する効果があると考えられる。フィブロイン被覆法は, いわば「細胞を貼って治す」再生治療であり, 従来の「細胞を埋め込んで治す」軟骨再生法とはコンセプトが異なるものである(Fig. 2)。今後, 従来の軟骨再生法では対応できなかった広範囲欠損に応用できるよう, さらに研究を進めていきたい。

まとめ

ACIによる軟骨再生は有用な方法であり, 足場材料を用いるなど種々の改良が加えられて現在に至っている。今後は, 各種幹細胞の利用や, 細胞供給法の工夫など更なる研究開発を行うことで, より広範囲の欠損にも対応が可能になると期待される。

文献

- 1) Magnuson PB: Technic of debridement of the knee joint for arthritis. *Surg Clin North Am*: 249-266, 1946
- 2) Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, et al.: Microfracture

- technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Oper Tech Orthop* **7**: 300–304, 1997
- 3) Matsue Y, Yamamoto T, Hama H: Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* **9**: 318–321, 1993
 - 4) 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
 - 5) 中川晃一, 渡辺淳也, 和田佑一: 臨床に向けた応用-単層培養を用いた自家培養軟骨移植術. *関節外科* **25**: 47–56, 2006
 - 6) Moriya T, Wada Y, Watanabe A, et al: Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: Histology, biochemistry, and MR imaging. *J Orthop Sci* **12**: 265–273, 2007
 - 7) Peterson L: International experience with autologous chondrocyte transplantation. Insall JN, Scott WN (Eds) *Surgery of the Knee* (3rd ed.) p314–356. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2001
 - 8) Hangody L: Mosaicplasty. Insall JN, Scott WN (Eds) *Surgery of the Knee* (3rd ed.) p357–360. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2001
 - 9) Sohn DH, Lottman LM, Lum LY, et al: Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res* (394): 254–262, 2002
 - 10) Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al: The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee* **11**: 51–55, 2004
 - 11) Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, et al: Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* **87**: 640–645, 2005
 - 12) 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
 - 13) Tohyama H, Yasuda K, Minami A, et al: Atelocollagen-associated autologous chondrocyte implantation for the repair of chondral defects of the knee: A prospective multicenter clinical trial in Japan. *J Orthop Sci* **14**: 579–588, 2009
 - 14) Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y, et al: Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model. *Biomed Res* **34**: 281–288, 2013
 - 15) 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
 - 16) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* **52**: 2521–2529, 2005
 - 17) Ando W, Tateishi K, Hart DA, et al: Cartilage repair using an *in vitro* generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **28**: 5462–5470, 2007
 - 18) 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
 - 19) Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, et al: Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* **42**: 2631–2637, 1999
 - 20) Shintani N, Hunziker EB: Chondrogenic differentiation of bovine synovium: Bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor β 1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis Rheum* **56**: 1869–1879, 2007
 - 21) Kachi ND, Otaka A, Sim S, et al: Observation of chondrocyte aggregate formation and internal structure on micropatterned fibroin-coated surface. *Biomed Mater Eng* **20**: 55–63, 2010
 - 22) Aoki H, Tomita N, Morita Y, et al: Culture of chondrocytes in fibroin-hydrogel sponge. *Biomed Mater Eng* **13**: 309–316, 2003
 - 23) Kawakami M, Tomita N, Shimada Y, et al: Chondrocyte distribution and cartilage regeneration in silk fibroin sponge. *Biomed Mater Eng* **21**: 53–61, 2011
 - 24) 平方栄一, 富田直秀, 玉田 靖, ほか: ウサギ膝蓋骨全範囲の骨軟骨欠損に対するフィブロインスポンジ被覆法による早期組織修復. *日整会誌* **87**: S1320, 2013
 - 25) Otaka A, Kachi ND, Hatano N, et al: Observation and quantification of chondrocyte aggregation behavior on fibroin surfaces using Voronoi partition. *Tissue Eng Part C Methods* **19**: 396–404, 2013
 - 26) 中川晃一: フィブロインの cell delivery 機能を利用した若年者重度関節症に対する新しい治療法の開発. 平成 25 年度厚生労働省科学研究費補助金総括研究報告書, 2014

Present Status and Future Direction of Regenerative Medicine for Articular Cartilage

Koichi Nakagawa

Professor, Department of Orthopaedic Surgery (Sakura), School of Medicine,
Faculty of Medicine, Toho University

ABSTRACT: Because hyaline cartilage has a poor intrinsic capability for self-repair, there is no established method to repair a large full-thickness defect in articular cartilage. Cultured autologous chondrocyte implantation (ACI) was first used clinically in 1994. However, ACI is a two-step laboratory-dependent procedure that is costly and has a high risk for contamination. In addition, only a limited number of cells are available for implantation. To solve these problems, researchers have attempted to use scaffolds of many types (collagen, polysaccharide, and artificial bioabsorbable materials). Considerable recent attention has focused on stem cells, including autologous mesenchymal cells, embryo stem cells (ES cells), and induced pluripotent stem cell (iPS cells). This review describes the current status and future direction of regenerative medicine for articular cartilage.

J Med Soc Toho 61 (5): 232–237, 2014

KEYWORDS: articular cartilage, regenerative medicine, autologous chondrocyte implantation (ACI), tissue engineering

中川晃一教授 略歴



1990年 千葉大学医学部卒業，整形外科学教室入局
 1993～1997年 千葉大学大学院医学研究科 博士課程
 2002年2月 米国ラッシュ医科大学整形外科 research fellow
 2003年7月 同 instructor
 2005年1月 千葉大学医学部整形外科 助手，助教
 2009年12月 千葉大学大学院医学研究院整形外科 講師
 2010年4月 東邦大学医療センター佐倉病院整形外科 准教授（病院）
 2012年1月 同 教授（病院）
 6月 東邦大学医学部整形外科学講座（佐倉）教授
 2014年6月 東邦大学医療センター佐倉病院 院長補佐併任
 同 医療連携・患者支援センター長併任
 現在に至る

受賞など

1997年度（財）日本スポーツ治療医学研究会研究助成，1998年度（財）猪之鼻奨学会研究補助金，2001年度（財）日本リウマチ財団米国派遣研修医助成，2001年 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) Young Investigator Award，2006年千葉スポーツ医学研究会学会賞，2006年 Chiba Neuroresearch Meeting 学会奨励賞，2007年 International Cartilage Repair Society (ICRS) Best Rated Abstract，2009年度（社）日本損害保険協会交通事故医療研究助成，2009年度（財）内視鏡医学研究振興財団研究助成，2009年度（財）中富健康科学振興財団研究助成，2010年度（社）農協共済総合研究所 JA 共済交通事故医療研究助成，2010年度（財）千葉県体育協会千葉県スポーツドクター協議会研究助成

専門

膝関節外科，スポーツ医学

資格

日本整形外科学会専門医（リウマチ医，スポーツ医，運動器リハビリテーション医），日本体育協会公認スポーツドクター，日本リウマチ学会専門医・指導医

学会の役職

日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（Japanese Orthopaedic Society of Knee, Arthroscopy and Sports Medicine：JOSKAS）評議員，日本整形外科スポーツ医学会代議員，日本リウマチ学会評議員，日本関節病学会評議員，日本運動器科学会評議員，日本肥満治療学会評議員，千葉医学会評議員，Journal of Orthopaedic Science Editorial Board Member

特許

2013年 特許第5373427号（滑膜細胞および細切軟骨片の軟骨修復における使用）