

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10463

研究課題名(和文) 膝関節内を模倣する浮遊滑膜幹細胞遊走モデルの開発

研究課題名(英文) Development of a suspended synovium culture model mimicking inside of the knee joint

研究代表者

片野 尚子 (KATANO, Hisako)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：50376620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節内投与により滑膜から間葉系幹細胞を動員する薬剤の開発は関節内組織損傷軽症例に対する有望な治療法になりうる。私たちは膝関節内を模倣する浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを開発し、滑膜から関節液中に幹細胞が直接動員されることを明らかにした。また膝蓋上嚢滑膜と膝蓋下脂肪体の比較により、関節液中に動員する間葉系幹細胞の主要な源は線維性滑膜であることを示した。さらに、本遊走モデルに関節リウマチ患者の滑膜を検体として用いると、動員される幹細胞の収量に変形性膝関節症患者の滑膜と比較してばらつきが大きいことを明らかにした。本モデルは関節内に滑膜由来幹細胞を誘導する薬剤開発スクリーニングとしての応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Drugs that induce mesenchymal stem cells (MSCs) from the synovium can be a promising treatment for mild tissue injury. We developed a suspended synovium culture model. Fibrous synovium was found to release greater numbers of MSCs than adipose synovium. Mobilization of MSCs from the synovium was demonstrated using a suspended synovium culture model in RA. This model can be a valuable tool to screen drugs which induce mobilization of MSCs from the synovium into synovial fluid in the knee joint.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

滑膜は関節腔を覆う膜であり、膝関節内では軟骨・半月板以外を覆い、その内部は滑膜細胞が分泌する関節液で満たされている。この滑膜組織自体の再生能力は高く、滑膜組織をコラゲナーゼ処理して培養すると1つの細胞由来と考えられる細胞集団(コロニー)を形成する。この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である。間葉系幹細胞は生体の恒常性を維持し、組織損傷時の自然修復に寄与するものと考えられる。

私たちはこれまで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こと(Koga et al. Stem Cells 2007)、同様に半月板欠損部に移植すると半月板が再生すること(Horie et al. Stem Cells 2009)を報告し、臨床応用を開始している。その開発過程において、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、ほとんど細胞のコロニーを認めない一方で、前十字靭帯(Morito et al. Rheumatology 2008)、関節軟骨(Sekiya et al. J Orthop Res. 2012)、半月板損傷(Matsukura et al. Clin Orthop Relat Res, 2013)後には多数のコロニー形成細胞を認め、これらのコロニー形成細胞は滑膜由来の間葉系幹細胞に特性が類似することを報告している。また体外で増殖させた滑膜幹細胞を前十字靭帯(Morito et al. Rheumatology 2008)、関節軟骨(Koga et al. Cell Tissue Res. 2008)、半月板損傷(Horie et al. Stem Cells 2009)の損傷動物モデルに関節内投与すると、損傷組織の修復が促進することを明らかにしている。

これらのことは、前十字靭帯、関節軟骨、半月板などの関節内組織が損傷されると、滑膜から間葉系細胞が関節液中に動員され、損傷部位に接着し、自然修復する機構の存在を予測させるものであるが、これまで直接、このことを示す報告はなかった。しかし、特定のサイトカイン・薬剤によって滑膜から関節液中に十分な数の間葉系幹細胞が動員出来るならば、滑膜を採取し体外で増殖させる手技を不要とし、滑膜幹細胞を誘導する関節注射によって十分な数の滑膜幹細胞を損傷組織に誘導し、軟骨・半月板損傷を修復できる可能性がある。

私たちは関節内組織損傷時に滑膜から間葉系幹細胞が関節液を介して損傷部に遊走される現象を模倣して、浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを開発した。これは、密閉ボトル内の底に培養皿を置き、培養液を満たした後に採取した滑膜組織を吊るすものである。これまで2週間の培養で滑膜組織から遊走した細胞は培養皿に接着し、コロニーを形成することを確認している。このモデルにより、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、自然修復する機構の存在を明らかにすることが可能となる。また染色によりコロニー形成能を容易に定量的に評価できることから、本モデルを96ウェルプレ-

トにダウンサイジングすることによって、コロニー形成を促進するサイトカイン・薬剤のスクリーニングが可能となり、関節内注射による再生医療の開発に結び付けることができる。

2. 研究の目的

私たちは膝の関節液中に存在する間葉系幹細胞が滑膜幹細胞に特性が類似し、靭帯・軟骨・半月板損傷後に増加することを明らかにしたが、関節液中に幹細胞の動員を促す薬剤があれば、軽度の軟骨・半月板欠損に対しては、薬剤投与により修復の促進が期待でき、これは変形性膝関節症の予防薬にもなりうる。本研究では、膝関節内を模倣する浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを開発することにより、関節内投与により滑膜から幹細胞を動員する薬剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

遊走滑膜幹細胞を関節内損傷部に動員しうる新規治療法を開発するため、はじめに、ボトルサイズの浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを作成し、ついで、使用する組織の特性に関する解析を行い、更に96ウェルプレートの規模にダウンサイジングした、膝関節内を模倣する浮遊滑膜幹細胞遊走モデルの開発を行う。

(1) ボトルサイズの浮遊滑膜幹細胞遊走モデルの作成

関節内組織損傷時に滑膜から間葉系幹細胞が関節液を介して損傷部に遊走される現象を模倣した浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを開発する。密閉ボトル内の底に培養皿を置き、培養液を満たした後に採取した滑膜組織を吊るし、2週間の培養で滑膜組織から遊走した細胞は培養皿に接着し、コロニーを形成することを確認する。また染色によりコロニー形成能を定量的に評価する。さらに、このモデルにより、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、自然修復する機構の存在を明らかにする。

(2) 使用する組織の特性解析

2014年、2015年に私たちの研究グループが実施した半月板損傷を対象として滑膜幹細胞移植によって半月板の治癒促進を期待する臨床研究において、原料となる滑膜の性状にばらつきがあることが明らかとなっていたことから、浮遊滑膜幹細胞遊走モデルに使用する組織として、どのような組織が適しているかどうかを検討する。具体的には、変形性膝関節症の線維性滑膜と脂肪性滑膜、さらに、関節リウマチの滑膜との比較を行う。

4. 研究成果

本研究では、関節内組織損傷軽症例に対する薬剤の開発を目指し、膝関節内を模倣する浮遊滑膜幹細胞遊走モデルの開発を行った。

27年度は、浮遊滑膜幹細胞遊走モデルの作成、ならびに線維性滑膜と脂肪性滑膜のどちらが主要な細胞源であるかの検討を行った。使用するヒト組織は、本学倫理委員会の承認後、人工膝関節置換術を施行する患者の同意を得て、置換術後に廃棄される滑膜組織を使用した。はじめに、浮遊滑膜産生細胞培養モデルの作成として、滅菌ボトル内に培養用ディッシュを置き培養液で満たし約1gの滑膜をディッシュに接触しないように浮遊させ、7日間培養器内で維持しディッシュ内の細胞を解析した。次いで、2種の滑膜の比較として、膝蓋上嚢滑膜（線維性滑膜）と膝蓋下脂肪体（脂肪性滑膜）を浮遊させ、7日後比較した。

その結果、20数例のほぼすべての滑膜から、ディッシュ上には、紡錘形の細胞から構成される多数のコロニーを認めた。このコロニー形成細胞はCD44(+), 73(+), 90(+), 105(+), 34(-), 45(-)であり、軟骨・骨・脂肪分化能を有していることを確認した。また、滑膜約1gから得られたコロニー数は、線維性滑膜のコロニー形成数が高かった。上記モデルにより、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞が直接動員されることを初めて示すことできた。また、関節液中に動員する間葉系幹細胞の主要な源は線維性滑膜であることが推察できた。

28年度は、浮遊滑膜幹細胞遊走モデルを用いて、1) 滑膜から間葉系幹細胞が動員されるかどうか、2) 線維性滑膜と脂肪性滑膜で差があるかどうか、の検討をまとめ、査読付き論文(Arthroscopy-The Journal Of Arthroscopic And Related Surgery : IF 3.7)で発表した。変形性膝関節症患者の全人工膝関節置換術施行時に得られた2種の滑膜の比較では、膝蓋上嚢滑膜（線維性滑膜）と膝蓋下脂肪体（脂肪性滑膜）を浮遊させ、7日後のコロニー数の比較(N=6)の結果、全例で、線維性滑膜の方が脂肪性滑膜よりも多くのコロニー形成を認めた($p < 0.05$ by Wilcoxon signed rank test)。浮遊滑膜モデルにより、膝関節内では、膝蓋下脂肪体よりも骨や関節包に隣接する線維性滑膜の方が、表面積が大きく、本研究結果から関節液中に動員する間葉系幹細胞の主要な供給源は線維性滑膜と推察された。本結果は、滑膜幹細胞を用いた薬剤開発において直接貢献しうるデータとなった。すなわち、使用する組織の特性が薬剤スクリーニングの奏功に大きく影響することから、組織の特性解析に関する十分な検討が本研究開発に必須であることが明らかになった。そのことから、主な細胞源となる滑膜の提供者となる患者の病状、例えば、関節リウマチの滑膜においても変形性膝関節症の滑膜と同様に扱うことができるかどうかについての検討が必要であると考えられた。

そこで、29年度は、関節リウマチ(RA)

の滑膜においても変形性膝関節症の滑膜と同様に本モデルでコロニー形成されるかどうか、また形成されるのであれば得られたMSCsにOAとの違いがあるかどうか、について検討した。関節リウマチ患者(n=8)と変形性膝関節症患者(n=6)の全人工膝関節置換術施行時に得られた2種の滑膜の比較では、7日間培養後、OAでは全てにコロニーが形成されたのに対し、RAではコロニー形成不良な検体も認めた。また、14日培養後の滑膜1gあたりの収量は、RA 260 ± 200 ($\times 10^3$)個、OA 240 ± 70 ($\times 10^3$)個で、両群に有意差はなかったが($p=0.95$)、RA群では検体間のばらつきが大きく分散分析で有意差を認めた($p=0.02$)。一方、継代増殖させた細胞は、両群とも分化誘導培地による分化は良好であり、軟骨ペレットの湿重量にも有意差はなかった($p=0.53$)。さらに、表面抗原の発現も同等であった。これらの結果から、収量のばらつきが容認できる条件においては、浮遊滑膜幹細胞遊走モデルにRA滑膜を検体として用いることが可能であり、RA患者に対して関節内に滑膜由来幹細胞を誘導する薬剤開発スクリーニングとしての応用が可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Koga H, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Sekiya I, Comparison of mesenchymal stem cells obtained by suspended culture of synovium from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. BMC Musculoskelet Disord. 査読有, 19, 79, 2018, DOI: 10.1186/s12891-018-1998-6

Kenta Katagiri, Yu Matsukura, Takeshi Muneta, Nobutake Ozeki, Mitsuru Mizuno, Hisako Katano, Ichiro Sekiya, Fibrous synovium releases higher numbers of mesenchymal stem cells than adipose synovium in a suspended synovium culture model., Arthroscopy, 査読有, 33, 800-810, 2017, DOI: 10.1016/j.arthro.2016.09.033

[学会発表](計5件)

河野 佑二、水野 満、片桐 健太、小田 遼 浩二、大関 信武、片野 尚子、小森 啓一 郎、堀江 雅史、辻 邦和、松本 幹生、金子 晴香、高澤 祐治、宗田 大、関矢 一 郎、浮遊滑膜培養モデルにおける関節リウマチ膝および変形性関節症膝の滑膜幹細胞、第30回日本軟骨代謝学会、みやこメッセ(京都市)2017

Yuji Kohno, Mitsuru Mizuno, Kenta Katagiri, Koji Otabe, Nobutake Ozeki, Hisako Katano, Keiichiro Komori, Masafumi Horie, Kunikazu Tsuji, Mikio Matsumoto, Haruka Kaneko, Yuji Takazawa, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, Harvested cell number varies greater in RA than in OA after a suspended synovium culture, Orthopaedic Research Society (ORS) 2017 Annual Meeting (国際学会), San Diego Convention Center, 2017 年

Kenta Katagiri, Takeshi Muneta, Koji Otabe, Yu Matsukura, Hisako Katano, Ichiro Sekiya, Fibrous Synovium Releases Higher Number Of MSCs Than Adipose Synovium in a Suspended Synovium Culture Model, Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting(国際学会), Florida(米国), 2016 年

片桐健太、松倉 遊、宗田 大、大関信武、水野 満、小田邊浩二、片野尚子、古賀英之、辻 邦和、関矢一郎、線維性滑膜は脂肪性滑膜よりも多くの間葉系幹細胞を動員する：浮遊滑膜モデルによる解析、第29回日本軟骨代謝学会、広仁会館（広島県、広島市）2016年

片桐 健太、宗田 大、松倉 遊、辻 邦和、大川 淳、関矢 一郎、浮遊滑膜産生細胞培養モデルによる解析、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、富山国際会議場（富山県、富山市）2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

片野 尚子 (KATANO, Hisako)
東京医科歯科大学・統合研究機構・助教
研究者番号：50376620

(2)研究分担者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)
東京医科歯科大学・統合研究機構・教授
研究者番号：10345291