

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19987

研究課題名(和文) ヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能を維持したまま増殖を促す培養法の確立

研究課題名(英文) Development of culture method of human synovial mesenchymal stem cells with their multi-lineage differentiation potential sustained

研究代表者

小田邊 浩二(Otobe, Koji)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・助教

研究者番号：70737288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では滑膜幹細胞の多分化能を保ったまま増殖を促す手段として、サイトカインに注目しスクリーニングおよび個別のサイトカインについてその効果を評価した。結果、IL-1b、PDGF-AA、TNFa、FGFが滑膜幹細胞の増殖を促し、かつ増殖した細胞の多分化能が保たれることが明らかとなった。成果は整形外科基礎研究の国内最大学会で採択された。また日本組織培養学会 第89回大会「滑膜幹細胞の増殖性を予測する自己血清評価法の開発(水野満、小田邊浩二他)」が奨励賞対象演題となった。以上の成果は国際学術誌に投稿され、そのうち3編がacceptされた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we screened the cytokines which effectively enhance the proliferation of synovial mesenchymal stem cells with their multi-lineage differentiation potential sustained. We concluded IL-1b, PDGF-AA, TNFa, FGF are the candidate cytokines for this purpose. We present these results in the 31st Japanese Orthopaedic Research meeting and 89th Japanese Tissue Culture Association annual meeting. We published three papers in international academic scientific journals. (Pretreatment with IL-1 enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells. Matsumura E et al. Cytotherapy. 2017 Feb., Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. Mizuno M, Otobe K et al. Stem Cell Res Ther. 2015 Dec., TNF promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. Mikio Shioda et al. PLoS one 2017)

研究分野：再生医療

キーワード：滑膜 間葉系幹細胞 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

関節症は関節痛や運動制限をもたらす生活の質に直結する。関節症の医療費は2兆3000億円に達し、また要介護となる要因の10%が関節症に起因している。関節症に対する根治的な治療法は高額な人工関節置換術以外に無いのが現状で、再生医療の開発が最も期待される分野の一つである。

滑膜は関節腔を覆う膜であり、関節腔の内部は滑膜細胞が分泌する関節液で満たされている。本研究グループではこれまで滑膜由来の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を報告し(Koga, Cell Tissue Res, 2008)、2008年より軟骨欠損に対し、自己血清で2週間培養した滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床試験を開始している。また、変形性膝関節症のリスクとなる半月板損傷に対しても、縫合術と滑膜細胞移植を組み合わせる臨床研究を2014,2015年に実施している。これらの臨床研究における多くの症例で自覚症状および画像所見上改善を見ており、関節症に見られる難治性の軟骨欠損および半月板損傷に対して極めて有効な治療法となる可能性が示されている。しかし、幹細胞の増殖能および分化能は体外で継代するうちに減少していくこと、また、ドナー間で血清および細胞に依存した増殖能の差が見られることが移植医療の適応を拡大していく上で課題となっている。

滑膜幹細胞の増殖については、関節液中に滑膜幹細胞を動員、増殖させる因子の存在が示唆されている。細胞を関節液中に動員する因子としてIL-1b、FGF-2、TGFb、PDGFなどいくつかのサイトカインが想定されており、実際にこれらの因子が滑膜幹細胞の遊走能、増殖能、分化能に影響を与えることが示唆されている。滑膜間葉系幹細胞の増殖因子を明らかにすることにより、移植もしくは自然治癒に十分な数の滑膜間葉系幹細胞を安定的に確保できる可能性がある。

また、ドナーごとの細胞および自己血清に依存した増殖能の差による不十分な細胞収量については、代替法として品質の比較的安定したウシ胎児血清(FBS)の使用が考えられるが、滑膜幹細胞に対してはFBSの増殖能は自己血清に劣るケースが多いことが示されており、またアレルギーやBSE伝播など安全性の観点等、未解決の課題を残している。本研究が進展することにより、血清中のサイトカイン濃度をスクリーニングすることによる、細胞培養開始前における自己血清の高精度な生物製品適格性判定や不適とされた自己血清の不足しているサイトカインを補充する手法の開発など、ドナーごとの細胞および血清に依存した増殖能の差による細胞収量の問題を解決し、軟骨分化能を維持したまま増殖を促す培養法の確立が期待できる。

さらに、幹細胞の増殖・分化を促すサイトカインの解明は、炎症時の滑膜間葉系幹細胞

の挙動解明の助力となり、さらには半月板、前十字靭帯、関節軟骨などの関節内組織損傷における自然治癒過程の解明にも役立つと考えられ、本研究の結果が整形外科学だけでなく、他分野の基礎研究・再生医療研究に応用されるなどの波及効果が大きい期待できる。本研究の進展により、細胞増殖および軟骨分化を促進するサイトカイン濃度・培養環境の最適化が可能となり、滑膜組織から軟骨分化能の高い間葉系幹細胞を安定的かつ効率的に得る手法の開発に結び付くと見込まれる。

### 2. 研究の目的

- 1.滑膜幹細胞の増殖・軟骨分化を促すサイトカインのスクリーニングおよび至適濃度の特定を行う。
- 2.サイトカイン投与後の増殖能・分化能の変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

滑膜幹細胞の増殖と軟骨分化を促進するサイトカインおよび培養環境の最適化を通じて、滑膜間葉系幹細胞の特性に基づいた革新的な再生医療技術を開発する。具体的には1.滑膜間葉系幹細胞の増殖・軟骨分化を促す薬剤のスクリーニング、2.サイトカイン投与後の増殖能および分化能の評価、2つの課題を達成する。これらの課題を達成することにより、滑膜幹細胞の収量を安定させるだけでなく、炎症時の間葉系幹細胞の挙動解明に結びつき、半月板、前十字靭帯、関節軟骨などの関節内組織損傷における自然治癒過程の解明およびその阻害因子の同定にも大いに貢献できる。

#### (1)滑膜間葉系幹細胞の増殖・軟骨分化を促す薬剤のスクリーニング

健常ボランティアより採取した血清で細胞増殖能の高いものと低いものを探し、両者のサイトカイン発現プロファイルの違いを、複数のサイトカイン濃度を同時に解析できるプロテインアレイキットで網羅的に比較し、滑膜間葉系幹細胞の増殖・軟骨分化を促す特定の因子を絞り込む。

#### (2)P0 ヒト滑膜幹細胞に対するサイトカイン添加による増殖能および軟骨分化能の評価

ヒト膝関節滑膜を採取し、それを酵素処理後播種して容器の底面に接着する細胞を抽出する。2週間後接着して、コロニーを形成する細胞の、間葉系幹細胞としての特性である増殖・多分化能・細胞表面抗原の発現パターンを評価する。さらに(1)のスクリーニングで絞り込まれたサイトカインを培地に添加し、コロニー形成能・多分化能・表面抗原パターンの変化を評価する。

### 4. 研究成果

本研究では滑膜幹細胞の多分化能を保ったまま増殖を促す手段として、サイトカイン

に注目しスクリーニングおよび個別のサイトカインについてその効果を評価した。スクリーニング実験結果から IL-1b (図 1) が滑膜間葉系幹細胞の遊走能・増殖能を修飾することが分かった。また、サイトカイン処理を行った後も骨・軟骨・脂肪細胞に分化する能力を保持していることが確かめられており、これらのサイトカインが多分化能を損ねない幹細胞の増殖促進薬剤として利用できる可能性が十分見込める。

この他、PDGF-AA (図 2)、TNFα (図 3) が滑膜幹細胞の増殖を促し、かつ増殖した細胞の多分化能が保たれることが明らかとなった。成果は整形外科基礎研究の国内最大学会 (第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会「TNFα は滑膜幹細胞の増殖を促進する (塩田幹夫、小田邊浩二他)」、「IL-1b の前投与による滑膜幹細胞の増殖・軟骨分化能の検討 (松村恵津子他)」で採択された。また日本組織培養学会第 89 回大会「滑膜幹細胞の増殖性を予測する自己血清評価法の開発 (水野満、小田邊浩二他)」で PDGF-AA の滑膜幹細胞に対する増殖促進効果が確認され、奨励賞対象演題となった。以上の成果は国際学術誌に投稿され、そのうち 3 編が既に accept された。残りのテーマについても revision 投稿中であり、近日 accept される見込みである。

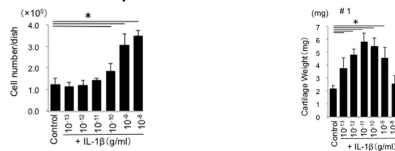


図 1. IL-1b は濃度依存性に滑膜幹細胞の増殖を促し、また比較的低濃度では軟骨分化能を高める。(Matsumura et al. Cytotherapy 2017 より)

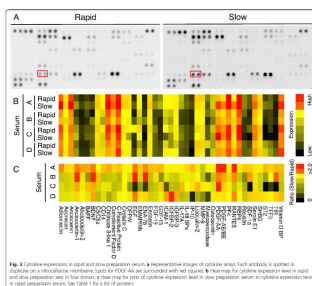


図 2. 全血から自己血清を抽出する際に、全血を採取後 4 で 24 時間保存してから抽出した方が、採取直後に抽出するよりもサイトカイン濃度が増加し、特に PDGF-AA の濃度の違いが細胞増殖能に大きな影響を与えることが

分かった。(Mizuno et al. Stem Cell Research and Therapy 2015 より)

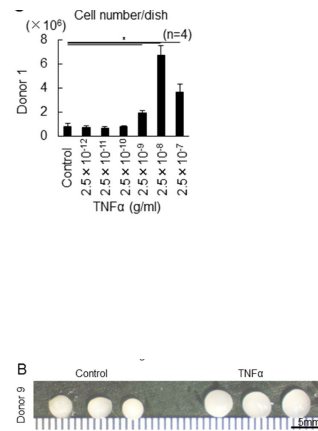


図 3. TNFα 処理により、滑膜幹細胞の増殖能は増大した。その一方で軟骨分化能はコントロール群と比較し低下していなかった。(Shioda et al. PLoS One 2017 より)

## 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 3 件)

Shioda M, Muneta T, Tsuji K, Mizuno M, Komori K, Koga H, Sekiya I. TNF promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. PLoS One. 査読有 2017 May 18;12(5):e0177771. doi: 10.1371/journal.pone.0177771.

Matsumura E, Tsuji K, Komori K, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Pretreatment with IL-1 enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 査読有 2017 Feb;19(2):181193. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.004.

Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Matsumoto Y, Fujii S, Ozeki N, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Matsuyama A, Sekiya I. Platelet derived growth factor (PDGF)AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 査読有 2015 Dec 10;6:243. doi: 10.1186/s1328701502392.

〔学会発表〕(計 3 件)

塩田幹夫 TNFα は滑膜幹細胞の増殖

を促進する 第 31 回日本整形外科学会  
基礎学術集会 2016 年 10 月 13 日-14 日  
福岡国際会議場 福岡県福岡市

松村恵津子 IL-1beta の前投与による滑  
膜幹細胞の増殖・軟骨分化能の検討 第  
31 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2016 年 10 月 13 日-14 日 福岡国際会議  
場 福岡県福岡市

水野満 滑膜幹細胞の増殖性を予測する  
自己血清評価法の開発 日本組織培養学  
会 第 89 回大会 2016 年 5 月 25 日-26  
日 千里ライフサイエンスセンター 大  
阪府大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 遼 浩二 (OTABE, Koji)  
東京医科歯科大学・再生医療研究センタ  
ー・助教  
研究者番号：70737288

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)  
東京医科歯科大学・再生医療研究センタ  
ー・教授

研究者番号： 10345291

宗田 大 (MUNETTA, Takeshi)  
東京医科歯科大学・運動器外科学・教授  
研究者番号： 50190864

### (4) 研究協力者

( )