

令和元年6月10日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10895

研究課題名(和文) 羊膜由来細胞外基質コートPLGA担体の生物学的活性効果の検証と軟骨再生治療の応用

研究課題名(英文) Verification of the bioactive effect of human amnion-derived extracellular matrix-coated PLGA scaffold and its application for cartilage repair therapy.

研究代表者

野上 真紀子 (NOGAMI, Makiko)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：30750202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：変性軟骨の修復をめざし、ヒト羊膜細胞外基質(ECM)を生体吸収性素材にコートした新規生体移植材料ECM-PLGAの開発を行っている。今回、関節内炎症環境において羊膜ECMの持つ抗炎症効果が軟骨修復促進に寄与するという仮説を検証する実験を行った。

羊膜ECMをコートした培養皿やECM-PLGA上で滑膜線維芽細胞およびマクロファージを培養したところ、通常の培養皿と比較してより高い炎症性サイトカインの分泌を認めた。遺伝子発現解析の結果、抗炎症性マクロファージへの極性転換も認められなかった。今回の研究からはECM-PLGAの抗炎症効果を明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜は炎症抑制・創傷治癒効果に優れるとされ、再生医療分野への応用が期待される。我々が作成したECM-PLGAは過去の動物実験で優れた軟骨修復促進効果を示したが、そのメカニズムは不明である。今回in vitro実験系でECM-PLGAが軟骨欠損に伴う関節内炎症環境における抗炎症・軟骨修復に寄与する結果を期待したが、ECM-PLGAを配した培養上清中の炎症性サイトカイン分泌が高い結果となった。引き続きECM-PLGAの生体活性に関して調査を進め軟骨修復に関わるメカニズムを明らかにし、軟骨再生治療における新たな生体移植材料としてECM-PLGAの臨床応用を目指す一助としたい。

研究成果の概要(英文)：We develop a novel cell-free biological scaffold “ECM-PLGA” for cartilage repair therapy. ECM-PLGA contains amnion-derived extra-cellular matrix-coated on bioabsorbable PLGA scaffold. Amniotic membrane has been thought to have several biological activities such as wound healing and anti-inflammation effect. This study was carried out to verify the hypothesis, anti-inflammation effect brought by amniotic ECM support the better cartilage repair in chronic osteoarthritis. When cultured on amnion-ECM coated dishes and ECM-PLGA, human synovial fibroblasts and human macrophages showed higher production of inflammatory cytokines. Gene expression pattern showed no evidence of conversion from inflammatory macrophages to anti-inflammatory macrophages. In conclusion, no obvious anti-inflammatory effect was indicated from this study.

研究分野：軟骨再生医学、関節病学、膝関節外科

キーワード：軟骨再生 羊膜 生体材料 細胞外マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症では、軟骨の変性・破壊に伴う滑膜炎などの病態により関節全体の慢性炎症が持続し、患部の疼痛・骨アライメントの変化から歩行障害を来す。近年、軟骨再生治療として自己軟骨細胞移植が可能となったが、健常軟骨組織を犠牲にし、2 期的手術を要するという欠点がある。我々はこれまで、他家由来ヒト羊膜間葉系細胞 (HAM) の細胞外基質を生体吸収性の合成素材である三次元 PLGA 担体にコートした新規生体移植材料として ECM-PLGA を作製し、その細胞増殖促進効果およびラット膝関節軟骨欠損モデルにおける軟骨修復促進効果を確認した。ヒト羊膜由来細胞外基質を含む ECM-PLGA は羊膜由来生体活性成分を複合的に内含し、移植環境において羊膜が持つと言われる炎症抑制効果や創傷治癒効果を示すことが期待され、軟骨欠損部位への移植時にもこれら複数の生体活性効果が損傷軟骨の修復促進に寄与したと考察されたが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

ECM-PLGA の関節内組織に対する炎症抑制効果について検討し、本 scaffold が軟骨修復過程に与える効果のメカニズムを解明し、軟骨損傷に対する臨床応用にむけて最適化すること。

3. 研究の方法

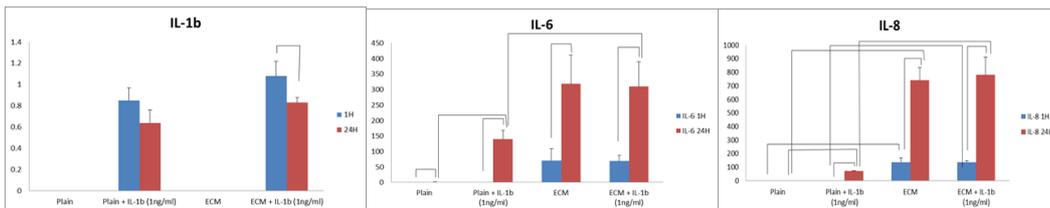
- 1) 羊膜由来細胞外基質が炎症環境に与える影響を調べるために、ヒト羊膜由来細胞外基質 (ECM) をコートした培養皿で平面培養を行ったヒト滑膜由来線維芽細胞の IL - 1 刺激に対する反応を観察する実験を行った。
 - (ア) ECM コート培養皿の作製: 不死化したヒト羊膜間葉系細胞を 6 cm 培養皿に播種培養し、コンフルエントになったところで 30Gy の放射線照射により細胞を死滅させ、PBS で洗浄後凍結保存した。
 - (イ) ヒト滑膜線維芽細胞の単離培養: 富山大学倫理委員会の承認の元、変形性膝関節症および関節リウマチに対して人工膝関節置換術を受けた患者の膝関節滑膜組織を、患者の同意に基づいて採取し、コラゲナーゼ処置により細胞分離し、10% FBS 加 DMEM 培地にて 3×10^5 個ずつ播種し培養・継代を行った。
 - (ウ) ヒト滑膜由来線維芽細胞の IL-1b 刺激に対する反応: 第 2 継代の線維芽細胞を ECM コート培養皿および対象として通常の通常の培養皿に播種し培養 3 日目に 1 ng/ml rhIL-1 を添加し 1 時間および 24 時間後に培養上清中の IL-1b, IL-6, IL-8, TNF 濃度を ELISA 法により検定した。同時に RNA を抽出し real-time RT-PCR により ADAM-TS4,5, TNF、MMP-1, MMP-3, MMP-13 の発現を解析した。
- 2) 炎症環境下での間葉系幹細胞の軟骨分化に羊膜由来細胞外基質が与える影響を調べるために、ECM-PLGA 上で滑膜由来間葉系幹細胞の三次元軟骨分化培養を行った場合の、IL-1 刺激に対する反応を観察する実験を行った。
 - (ア) ECM-PLGA の作製: 一辺 2 mm の立方体状 PLGA block (porosity 90%) に不死化したヒト羊膜間葉系細胞を播種し、10% FBS 加 DMEM 培地にて 14 日間培養した後にさらに 14 日間軟骨分化培地による培養を行い、30Gy 放射線照射により細胞を死滅させた後に PBS で洗浄し凍結保存した。
 - (イ) ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の単離培養: 富山大学倫理委員会の承認の元、変形性膝関節症および関節リウマチに対して人工膝関節置換術を受けた患者の膝関節滑膜組織を、患者の同意に基づいて採取し、コラゲナーゼ処置により細胞分離し、20% FBS 加 MEM 培地にて 1×10^3 個ずつ播種し 14 日後に初回継代を行った。
 - (ウ) 15ml ポロプロピレンチューブを用いて ECM-PLGA に 2×10^5 個の滑膜由来間葉系幹細胞を播種し 0.1 ng/ml または 1 ng/ml IL-1b を添加した培地で軟骨分化培養を 21 日間行った。RNA を抽出し軟骨分化マーカーの発現を解析した。
- 3) 羊膜由来細胞外基質の生体活性がマクロファージを介した細胞間シグナルに依存している可能性が高いと考え、マクロファージ分化に羊膜細胞外基質がどのように関わっているかを調べる実験を行った。
 - (ア) シート状 ECM-PLGA の作製: ETICHON 社製 VYCRYL KNITTED MESH を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ の大きさに切り分け、不死化ヒト羊膜間葉系細胞を播種して培養を行った。培養 3 日目に、シートを 3 枚ずつ重層してさらに 14 日間の培養を行った。30Gy 放射線照射により細胞を死滅させた後に PBS で洗浄し凍結保存した。
 - (イ) ヒト静脈血由来 CD14 陽性単球の分離培養とマクロファージ分化: 富山大学倫理委員会の承認に基づき、健康成人から本人の同意を得て末梢静脈血を 30ml 採血し、リンパ球分離溶液と MACS 分離装置を用いて CD14 陽性単球を分離した。50 ng/mL M-CSF を含む RPMI 培地で 5 日間マクロファージへの分化培養を行い、RPMI 培地に 10 ng/mL IFN を添加してさらに 24H 培養した後に細胞を剥離し、シート状 ECM-PLGA を敷いた 4well chamber slide 上に播種した。24 時間後に上清中の炎症性サイトカイン (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF) の発現を ELISA 法により測定した。RNA の抽出を行いマクロファージ表面抗原の遺伝子発現パターンによりマクロファージの表現型

(M1/M2) 解析をおこなった。

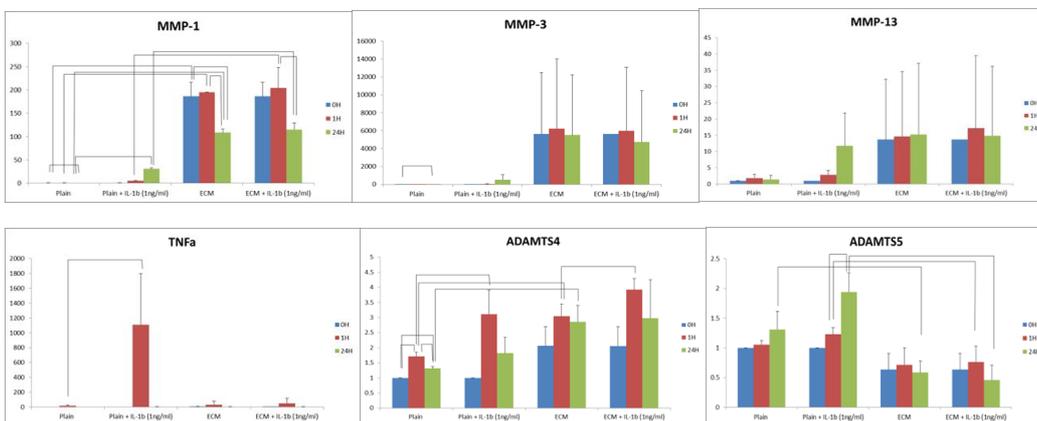
4. 研究成果

1) 滑膜由来線維芽細胞の羊膜 ECM に対する炎症抑制実験

培養上清中の炎症性サイトカイン分泌 (ELISA): ECM コートしていない培養皿 (Plain) に比べて、ECM コートした培養皿 (ECM) ではより高濃度の炎症性サイトカインの分泌 (IL-6, IL-8) が認められた。この結果は IL-1 刺激の有無とは関係がなく、ECM に対する線維芽細胞接着に伴う反応であると考えられた。

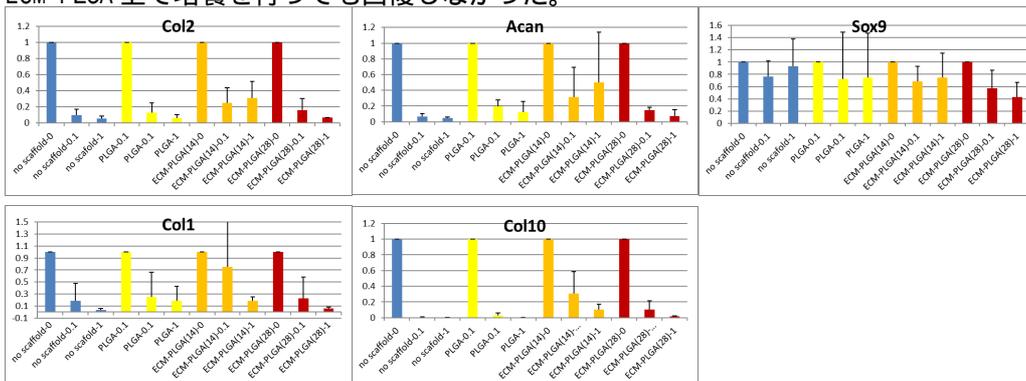


線維芽細胞の基質分解遺伝子発現 (real-time RT-PCR): ECM をコートした培養皿では MMP-1, 3, 13, ADAMTS-4 といった軟骨分解酵素の遺伝子発現が亢進した。



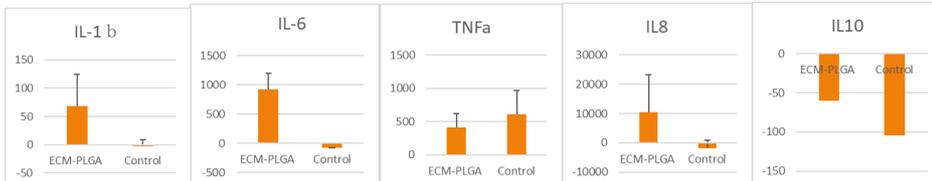
2) 炎症環境下での滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨分化過程に ECM-PLGA が与える影響

21 日間の軟骨分化培養を行ったものの軟骨様組織塊形成は得られなかった。定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行ったが、IL-1 の添加による軟骨分化マーカーの発現抑制は ECM-PLGA 上で培養を行っても回復しなかった。



3) 羊膜 ECM がマクロファージ炎症性サイトカイン分泌に与える影響

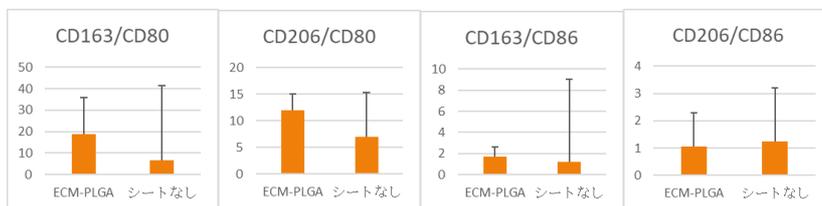
ECM-PLG シート上でマクロファージの培養を行い上清中の炎症性サイトカインの濃度を ELISA 法により計測したところ、ECM-PLGA とマクロファージを共培養した方が、マクロファージ単独で培養を行った場合よりも IL-1b および IL-6 の濃度が高い結果となった。



ECM-PLGA 共培養によるマクロファージ極性誘導

炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) のマーカー遺伝子である CD80、CD83 および 抗炎症性マクロファージ (M2) のマーカー遺伝子である CD163、CD206 の発現比 (M2/M1

比)について ECM-PLGA を置かないコントロールと比較したところ、両群間の M2/M1 比に有意差を認めなかった。



これらの一連の *in vitro* 実験の結果から ECM-PLGA は滑膜由来線維芽細胞及び、マクロファージとの接着培養系において炎症性サイトカイン分泌を亢進させ、炎症環境下での軟骨分化においても明らかな分化促進効果を示さなかった。マクロファージ極性を有意に抗炎症型 (M2) に誘導することも明らかにはならなかった。これらから考察されることは、羊膜由来 ECM の炎症抑制には従来考えられているよりもさらに複雑な過程が存在し、その 1 過程において接着した細胞に対しては炎症促進に働くのかもしれないという事である。今後は *in vivo* 実験において実際の関節液中の炎症反応の解析などを行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Makiko Nogami, Tomoatsu Kimura, Shoji Seki, Yoshito Matsui et al. A Human Amnion-Derived Extracellular Matrix-Coated Cell-Free Scaffold For Cartilage Repair: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Tissue Engineering: Part A* 査読の有無 巻 22、発行年 2016、最初と最後の頁 680~688、国際共著 該当しない DOI; 10.1089/ten.tea.2015.0285 オープンアクセスとしていない
- 2) Makino H, Seki S, Yahara Y, Shiozawa S, Aikawa Y, Motomura H, Nogami M, Watanabe K, Sainoh T, Ito H, Tsumaki N, Kawaguchi Y, Yamazaki M, Kimura T. A selective inhibition of c-Fos/activator protein-1 as a potential therapeutic target for intervertebral disc degeneration and associated pain. *Scientific Report*. 査読 有 2017 Dec 5;7(1):16983. doi: 10.1038/s41598-017-17289-y. オープンアクセスである
- 3) Motomura H, Seki S, Shiozawa S, Aikawa Y, Nogami M, Kimura T. A selective c-Fos/AP-1 inhibitor prevents cartilage destruction and subsequent osteophyte formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読 有 2018 Mar 4;497(2):756-761. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.147. オープンアクセスではない

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 野上 真紀子 木村 友厚 関 庄二 吉田 淑子 元村 拓 岡部 素典 相古 千加 二階堂 敏雄 軟骨再生治療における羊膜由来細胞と細胞外マトリックスの有用性 第 16 回 日本再生医療学会 2017 年 3 月 8 日 仙台国際センター
- 2) 野上真紀子、下条竜一、峯 隼人、元村 拓、松下 功、平岩利仁、木村友厚：患者立脚型評価による TKA 術後成績調査の意義 第 129 回中部日本整形災害外科学会，2017.10.6. 富山
- 3) 野上真紀子、下条竜一、峯 隼人、元村 拓、松下 功、平岩利仁、木村友厚：2 期的両側 TKA において 1 膝目の経験は 2 膝目の患者満足度に貢献するか 第 48 回日本人工関節学会，2018.2.23. 東京
- 4) 野上真紀子、下条竜一、峯 隼人、元村 拓、松下 功、平岩利仁、木村友厚：2 期的両側 TKA における手術間隔が患者立脚型評価成績に及ぼす影響 第 49 回日本人工関

節学会, 2019.2.15-16.東京

- 5) 頭川峰志, 長田龍介, 牧野紘士, 野上真紀子, 関 庄二, 岡部泰典, 吉田淑子, 木村友厚. 家兔趾屈筋腱修復後の腱周囲の癒着防止に対するハイパードライヒト乾燥羊膜の効果. 第33回日本整形外科学会基礎学術集会 2018 Oct 11-12; 奈良.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: 羊膜間葉系幹細胞の調製方法および単離された羊膜間葉系幹細胞集団

発明者: 二階堂 敏雄、吉田 淑子、岡部 泰典、小池 千加、野上 真紀子、木村 友厚、野口 誠、津野 宏彰、竹田 裕治

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 6243738

取得年: 登録 2017年11月17日 / 発行 2017年12月6日

国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 木村 友厚

ローマ字氏名: KIMURA, tomoatsu

研究協力者氏名: 関 庄二

ローマ字氏名: SEKI, shoji

研究協力者氏名: 箭原 康人

ローマ字氏名: YAHARA, yasuhito

研究協力者氏名: 岩崎 真美

ローマ字氏名: IWASAKI, mami

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。