

令和元年6月28日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10918

研究課題名(和文) 手術を伴わない低侵襲な関節軟骨修復を実現する再生医療技術の基礎的研究

研究課題名(英文) Research for low-invasive articular cartilage regeneration

研究代表者

高尾 昌人 (Takao, Masato)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30263536

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)：イヌ膝関節に対し滑膜由来の間葉系幹細胞(以下SMSC)とヒアルロン酸(以下HA)の関節内注射を行った。ビーグル成犬の24膝関節を注射回数により3群に分けた(Group1：乳酸リンゲル液1mlを単回注射、Group2：SMSC5×10<sup>6</sup>乗個+0.01%HA1mlを単回注射、Group3：SMSC5×10<sup>6</sup>乗個+0.01%HA1mlを1週間おきに3回注射)。全例、大腿骨内側顆に径4mmの軟骨欠損を作製し、7週後にSMSCとHAの混入製剤を関節内注射した。その結果、Group2とGroup3はGroup1と比較して良好な治療成績が得られたが、Group2とGroup3の間には差がなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、関節軟骨損傷モデルに対して間葉系幹細胞の関節内注射を行い、良好な軟骨再生を得たという基礎的研究の報告が散見される。しかしそれらの研究において、関節内注射の回数は様々であり、一定の見解はない。本研究の結果から、関節軟骨損傷に対する間葉系幹細胞の関節内注射において、単回投与と複数回投与の間に治療成績の差はない可能性が示唆された。すなわち、今後間葉系幹細胞を用いた再生医療が現実となった際、患者に対する不要な侵襲を避けるための根拠となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Twenty-four knees of 12 adult beagle dogs were randomly assigned to either group 1 (a single injection of 1 ml lactated Ringer's solution), group 2 (a single injection of 5×10<sup>6</sup> cells synovium-derived MSCs (SMSCs) with 1 ml 0.01% hacid (HA)), group 3 (while 3 times injection group had a single injection of 5×10<sup>6</sup> cells SMSCs with 1 ml 0.01% HA.) A partial thickness cartilage defect with 4 mm was created on medical femoral condylar. Group 2 and 3 were significantly greater than that of group 1. However, there was no significant difference between the group 2 and group 3.

研究分野：整形外科

キーワード：関節軟骨 再生医療 間葉系幹細胞 ヒアルロン酸 関節内注射

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

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨損傷の根治的な治療手段として再生医療が注目されている。間葉系幹細胞(以下MSC)は、軟骨を含む様々な間葉系組織への多分化能を持ち、軟骨再生医療の細胞源として注目されている。中でも滑膜由来のMSC(以下SMSC)は軟骨分化能が最も高く、軟骨再生に有用な細胞源であると考えられている。しかし、現時点で報告されている軟骨再生の方法の殆どは、細胞源である自家組織の採取や細胞移植のために手術を必要とする。そのため臨床応用において、患者に与える侵襲が問題点となる。

近年、MSCは多分化能の他にも様々な能力を持つことが明らかになってきた。軟骨損傷が存在する関節内にMSCを注射すると、MSCは細胞間のシグナル伝達を介して軟骨損傷部位へ遊走・集積する。また、MSCはそれ自体が免疫調整能を持ち、同種移植を行っても拒絶反応を起こさないという研究結果が多数報告されている。MSCのこれらの特性を利用して、同種MSCの関節内注射により拒絶反応を起こすことなく軟骨再生が可能となれば、軟骨損傷に対する低侵襲な治療法を確立できる可能性がある。また、ヒアルロン酸(以下HA)は抗炎症作用・軟骨保護作用を持ち、変形性関節症に対する注射用製剤として広く用いられてきた。近年、HAは細胞保護作用を持つことが判明し、MSC移植における有用な担体として注目されている。

以上から、われわれはHAを担体とした同種SMSCの関節内注射は、関節軟骨を再生する低侵襲手技となり得ると考えた。しかし、この方法には二つ問題点がある。第一に、HAは高い粘度を持つため、高濃度HAにMSCを混入すると、MSCの遊走能が阻害される可能性がある。第二に、軟骨損傷に対してMSCを注射する場合、どの程度の細胞数が最適なのか、現時点で明らかではない。そこでわれわれは、HAを担体とした同種SMSCの関節内注射が軟骨損傷を再生し得るか調査するため、イヌ関節軟骨欠損モデルを用いて予備実験を行った。その際、移植細胞数とHA濃度の条件を複数設定し(細胞数: $0.5 \times 10^5$ 個・ $5 \times 10^6$ 個・ $5 \times 10^7$ 個、HA濃度:0%(リンゲル液のみ)・0.01%・0.1%・0.5%)、その組み合わせにより軟骨損傷の治療成績に差が生じるか否かを調査した。その結果、SMSC混入製剤の関節内注射により関節軟骨再生が可能であること、4mm×4mm大の軟骨損傷に対してはSMSC  $5 \times 10^6$ 個+HA濃度0.01%(通常のHA製剤は1%)の組み合わせが最も有効であること、イヌに対して同種SMSCを関節内注射しても拒絶反応を起こさないことが明らかになった。

以上のように、SMSCとHAの関節内注射は軟骨損傷に有効であることが申請者らの研究で示唆されたが、基礎研究レベルにおいていくつか未解明の事項が残されており、また臨床応用への展開に関しても検討すべき事項は多い。本研究計画では、これらの事項を解明し、「手術を伴わない低侵襲軟骨再生医療」を実現するための基盤研究を行う。

## 2. 研究の目的

研究期間内には以下のことを明らかにする。

1. HA濃度の変化がSMSCの遊走能に与える影響を明らかにする。細胞遊走能測定キットを用いて、異なるHA濃度における細胞の遊走能を測定する。
2. 軟骨欠損面積に応じて再生に必要な移植細胞数も変化するかどうかを明らかにする。イヌ後肢膝関節に異なる大きさの関節軟骨欠損を作製して、それぞれにおける治療成績を比較する。
3. SMSCの同種移植が安全に行えるかどうか明らかにする。臨床使用にあたり、同種SMSCが安全であることを検証するため、腫瘍形成試験・微生物検出検査を行う。

## 3. 研究の方法

HA濃度がSMSCの遊走に与える影響の検討

高濃度のHAにMSCを混入すると、MSCの遊走が阻害される可能性がある。しかし、HA濃度とMSCの

遊走との関係について具体的に調査した報告は過去にない。そこで本実験では、細胞遊走能測定キットを用いて、異なるHA濃度における細胞の遊走を測定し、HA濃度が高くなるとSMSCの遊走能が阻害されるかどうか明らかにする。実験は以下の手順で行う。

1. 培地にHA溶液（濃度 0%（リンゲル液のみ）・0.01%・0.1%・0.5%）を混入し、シャーレにそれぞれ満たす。サンプル数はそれぞれ5例とする。
2. 細胞遊走能測定キット（Wound Healing アッセイ：細胞の運動能評価）をシャーレ内に設置し、 $5.0 \times 10^6$  cells/mLのSMSCを含んだ細胞混入液を、70  $\mu$ L/wellでキット内に播種する。
3. 一定時間後にキットを除去し、細胞の遊走を経時的に記録する。この結果を分析し、HA濃度が細胞の遊走能に与える影響を明らかにする。

軟骨欠損面積の大きさに応じて再生に必要な細胞数が変化するかを検討

これまでの予備実験の結果から、4 mm×4 mm大の軟骨損傷に対してSMSC  $5 \times 10^6$  個+HA 0.01%の組み合わせが最も有効であることが明らかになった。しかし、軟骨欠損面積が変化すると再生に必要な移植細胞数が変化するかについては明らかにされていない。本実験では、イヌ両後肢膝関節に異なる大きさの関節軟骨欠損を作製し、それぞれにおける治療成績を比較する。これにより、欠損面積が大きくなると再生に必要な細胞数が変化するかを明らかにする。実験は以下の手順で行う。

1. ビーグル犬5匹10膝を対象とする。両後肢膝関節に対し、関節軟骨欠損の作製と滑膜の採取を関節鏡視下に行う。軟骨欠損の大きさは、6 mm×6 mm：5膝、8 mm×8 mm：5膝とする。
2. 軟骨欠損作製から7週後、同種SMSC  $5 \times 10^6$  個+HA 0.01%の混入製剤を、エコーガイド下に関節内注射する。これらの犬は全て、麻酔覚醒後からの跛行・膝に対する特別な行動・その他の健康状態について、経時的に観察し評価する。
3. 全個体とも関節内注射後12週で安楽死させ、両膝を採取して欠損部の肉眼的・顕微鏡的評価を行う。その結果を、これまでに行った4 mm×4 mmの群と比較し、欠損面積の変化により再生に必要な細胞数が変化するかを明らかにする。

同種SMSCにおける腫瘍形成及び微生物を介した感染に関する安全性の検討

多くの基礎研究において、MSCは免疫調整能を持ち同種移植が可能であると報告されている。これまでの結果でも、全例において、拒絶反応を疑う所見はなかった。しかし、軟骨への分化過程で細胞が悪性形質転換する可能性は否定できない。また、マイコプラズマを含む感染症の危険性を排除する必要がある。臨床使用にあたり、同種SMSCの安全性を検証するため、腫瘍形成試験・微生物検出検査を行う。

1. CytoSelect 96-well 悪性形質転換アッセイ軟寒天コロニー形成試験キット（コスモバイオ）を用い、製剤として使用予定のSMSCが悪性形質転換しないかどうか、蛍光検出系または比色検出系を選択して検出する。
2. 細胞培養液の上清を採取・保管し、マイコプラズマ検出PCR kit・バクテリア検出PCR kitで培養環境の汚染の有無を確認する。

#### 4. 研究成果

HA濃度がMSCの遊走能に与える影響を調査するため、細胞遊走能測定キットを用いて、異なるHA濃度における細胞の遊走を測定した。結果、HA 溶液（濃度 0%（リンゲル液のみ）・0.01%・0.1%・0.5%）の各濃度において、細胞の遊走能に差は見られなかった。このため、予備実験段階で仮定していた「高濃度のHA にMSC を混入するとMSC の遊走が阻害される可能性がある」という仮説の証明には至らなかった。

そこで、イヌ膝関節に対し SMSC と HA の関節内注射を行った。ビーグル成犬の 24 膝関節を注射

回数により3群に分けた(Group1:乳酸リンゲル液 1ml を単回注射、Group2:SMSC5×106 乗個 + 0.01%HA1ml を単回注射、Group3:SMSC5×106 乗個 + 0.01%HA1ml を1週間おきに3回注射)。全例、大腿骨内側顆に径4mmの軟骨欠損を作製し、7週後にSMSCとHAの混入製剤を関節内注射した。その結果、Group2とGroup3はGroup1と比較して良好な治療成績が得られたが、Group2とGroup3の間には差がなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

・Orhopaedic Research Society (ORS) Annual meeting 2017

「Are Multiple Intra-articular Injections of Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells with HA more effective than Single Injection for Articular Cartilage Defects?」

Maya Kubo, Masato Takao, Shinya Miki, Hirotaka Kawano

・第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017

「関節軟骨損傷に対する滑膜由来間葉系幹細胞とヒアルロン酸の複数回関節内注射は単回関節内注射より有効か」

久保摩耶、高尾昌人、三木慎也、河野博隆

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔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:河野 博隆

ローマ字氏名:Kawano Hirotaka

所属研究機関名:帝京大学

部局名:医学部

職名:教授

研究者番号(8桁):20345218

研究分担者氏名:宮本 亘

ローマ字氏名：Miyamoto Wataru

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医療技術学部

職名：準教授

研究者番号(8桁): 30437553

研究分担者氏名：三木 慎也

ローマ字氏名：Miki Shinya

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：助手

研究者番号(8桁): 70647982

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。