

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04152

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞を用いた変形性関節症に対する細胞治療開発

研究課題名(英文) Development of cell-based therapy for osteoarthritis using dedifferentiated fat cells

研究代表者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：現在、変形性関節症(OA)に対して間葉系幹細胞(MSC)の関節内注射が行われ、一定の有効性が確認されている。脱分化脂肪細胞(DFAT)は少量の成熟脂肪細胞から調製できるMSCに類似した多能性細胞である。本研究は、OAに対するDFAT細胞治療の可能性を検討した。その結果、DFATは炎症性サイトカイン刺激により免疫制御、抗炎症、軟骨保護に作用する遺伝子の発現が増加することや、滑膜線維芽細胞からの軟骨基質分解酵素の発現を抑制することを明らかにした。またOAモデル動物に対してDFAT関節内注射を行うと、軟骨変性を抑制できることを明らかにした。本研究によりOAに対するDFAT細胞治療の有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DFATは少量の脂肪組織から均質なMSC用細胞を大量製造できるユニークな技術である。OA患者からも安定的に調製できるため、既存のMSCなどの治療用細胞に比べ、安全性、コスト面で優位性が高いと考えられる。本研究はOAに対するDFAT細胞治療の有効性と推定される作用機序を初めて明らかにした。OAに対して行われている人工関節置換術は優れた治療法であるが、若年、中年OAでは推奨されず、またその侵襲性の高さから手術に踏み切れない患者も多く存在する。DFATを用いた細胞治療は、このようなOA患者に対する有効な治療戦略となる可能性がある。本研究成果は高齢化社会における健康寿命延伸に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intra-articular injection of mesenchymal stem cells is known to have a therapeutic potential for osteoarthritis (OA) of the knee. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells are multipotent cells that have a characteristic similar to mesenchymal stem cells (MSCs). In this study, we investigated the possibility of cell therapy using DFAT cells for OA. We found that DFAT cells expressed several immunomodulatory, anti-inflammatory, and cartilage-related genes in response to inflammatory cytokines. DFAT cells also suppressed the expression of a cartilage matrix-degradation enzyme gene from synovial fibroblasts. We demonstrated that intra-articular injection of DFAT cells inhibit cartilage degeneration in the animal model of OA. Our results indicated the effectiveness of DFAT cell-based therapy for treating OA.

研究分野：再生医学

キーワード：脂肪細胞 変形性膝関節症 脱分化脂肪細胞 細胞治療 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(knee osteoarthritis: OA)は、日本には850万人の患者がいると推定され、中高年者の日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)の障害を起こす最大の原因となっている。OAの治療は主に薬物療法や運動療法といった対症療法が行われ、65歳以上の患者では人工関節置換術の適応となる。これらの治療法は軟骨を再生させたり、変性の進行を抑制する効果はない。近年より積極的な治療法として培養軟骨細胞や間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)を用いた軟骨再生医療が行われ、その有効性が実証されている[1]。MSCはその軟骨分化能に加え、免疫制御能や抗炎症作用を有することから、より進行した病態であるOAに対しても治療効果が期待されている。実際、骨髄MSCや脂肪組織由来MSC(adipose-derived stem cells: ASC)の関節内投与による臨床研究が行われ、人工関節置換術までの期間を延長できるなど一定の有効性と安全性が確認されている[2]。一方、OA患者から採取調製されたMSCは健常者に比べその性能が低下していることが指摘されている。したがってOAに対する細胞治療を普及させるためには、より品質が安定した細胞ソースの確立が望まれる。

研究代表者らは、成熟脂肪細胞を天井培養法という方法で培養することによって得られる細胞群(脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells: DFAT)が、MSCに類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした[3]。DFATはドナー年齢や基礎疾患に影響されず、少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞が調製できることから、DFATはOAの新たな治療用細胞として期待できる。また研究代表者らは、人工膝関節置換術を受けた患者の膝関節周囲に存在する膝蓋下脂肪体(intrapatellar fat pad: IFP)からもDFATが安定的に調製できることを確認している。関節滑膜に由来するMSCやIFPに由来するASCは軟骨分化能が高いことが報告されていることから、IFPに由来するDFATも軟骨分化指向性が高く、OA治療用細胞として優れた特性を有していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究は、OA治療用細胞としてのDFATの特性を明らかにするために、ヒトDFATのOAの病態生理に係わる作用をin vitroで検討した。またOAモデル動物に対するDFAT関節内投与実験を行い、その治療効果を検討した。これらの研究を通じて、OAに対するDFATによる細胞治療の有用性を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) OAの病態生理に対するヒトDFATの作用メカニズム解析

OA患者から調製したDFATの形質解析

日本大学医学部附属板橋病院にて人工膝関節置換術を受ける患者を対象に、皮下脂肪組織(subcutaneous fat tissue: SC)、膝蓋下脂肪体(intrapatellar fat pad: IFP)の提供を受けた。皮下脂肪組織から皮下脂肪由来DFAT(SC-DFAT)および脂肪由来幹細胞(ASC)を調製し、膝蓋下脂肪体から、膝蓋下脂肪体由来DFAT(IFP-DFAT)を調製し、その形質や多分化能を比較検討した。またそれぞれの細胞を炎症性サイトカインであるTNF α やIFN γ で刺激し、免疫制御、抗炎症、鎮痛などに作用するサイトカイン群の発現変化をリアルタイムRT-PCR法を用いて比較解析した。

滑膜線維芽細胞との共培養実験

OA患者または健常者に由来する滑膜線維芽細胞をTNF α 刺激し、発現亢進する炎症性サイトカインの遺伝子発現変化を評価した。またOA患者から調製したSC-DFAT、IFP-DFATとTNF α 刺激した滑膜線維芽細胞とのトランスウェルを用いた間接的共培養を行い、滑膜線維芽細胞から

の炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素などの発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量評価した。

(2) 変形性膝関節症モデルを用いた DFAT の治療効果

動物実験は日本大学動物実験委員会の承認(承認番号:第 AP17M001 号、第 P17M034 号)を得て行った。膝前十字靭帯切離と内側半月板切除によるラット OA モデルを作成し、経時的に膝関節軟骨の変形の程度を評価した。この OA モデル作成 1 週間後に膝関節内にラット皮下脂肪由来 DFAT(1×10^6 cells)(DFAT 群)または PBS(Control 群)を 1 週間毎に計 4 回関節内投与した(各群 $n=10$)。OA 作製 5 週間後に、両群の膝関節軟骨の変性の程度を肉眼的および組織学的に評価した。軟骨変性の程度は Mankin's score および OARSI score を用いて定量評価した。

4. 研究成果

(1) OA の病態生理に対するヒト DFAT の作用メカニズム解析

OA 患者から調製した DFAT の形質解析

OA 患者から調製した SC-DFAT、IFP-DFAT、ASC は共に CD73、CD90、CD105 陽性で脂肪、骨、軟骨への多分化能を有し、MSC の最小基準を満たすことが明らかになった。また軟骨分化能の比較を行った結果、ペレット培養にて分化誘導した軟骨様細胞塊の組織学的検討では、軟骨特異的プロテオグリカンである Aggrecan の発現程度は IFP-DFAT で高い傾向にあり、また硝子軟骨の細胞外マトリックスの主成分である II 型コラーゲン遺伝子(COL2A1)の発現は、SC-DFAT に比べて IFP-DFAT で有意に高かった。以上の結果より、IFP-DFAT は高い軟骨分化指向性を示すことが明らかになった。上記細胞(SC-DFAT、IFP-DFAT、ASC)を $TNF\alpha$ や $IFN\gamma$ で刺激し、各種遺伝子発現変化を比較検討した結果、これらの炎症性サイトカイン刺激により、各細胞共に PTGS2、TNFAIP6、BMP2 といった免疫制御、抗炎症、軟骨保護に働く遺伝子の発現が増加することが明らかになった。IFP-DFAT と SC-DFAT との比較では、IFP-DFAT では PRG4 の基礎発現が高く、SC-DFAT では BMP6 の基礎発現が高いことが明らかになった。DFAT 間でも脂肪細胞の採取部位によって軟骨関連遺伝子の基礎発現に差異があることが明らかになった。

滑膜線維芽細胞との共培養実験

OA 患者由来滑膜線維芽細胞、健常者由来滑膜線維芽細胞ともに $TNF\alpha$ 刺激により IL-6、IL-8、MMP9、ADAMTS4 などの炎症性サイトカインやマトリックス分解酵素遺伝子の発現が亢進することが明らかとなった。SC-DFAT、IFP-DFAT との共培養実験では、両細胞ともに滑膜線維芽細胞からの軟骨基質分解酵素 ADAMTS4 の発現を有意に抑制する効果が示された。一方、滑膜線維芽細胞からの IL-6 などの炎症性サイトカインの発現に関しては、SC-DFAT、IFP-DFAT とともに共培養による明らかな抑制効果が認められなかった。以上の結果より、DFAT は滑膜線維芽細胞に作用し軟骨変性抑制作用を示すことが示唆された。

(2) 変形性膝関節症モデルを用いた DFAT の治療効果

膝前十字靭帯切離と内側半月板切除によるラット OA モデルを作成し、経時的に膝関節軟骨の変形の程度を評価した。その結果、モデル作製 5 週間後より肉眼的、組織学的に硝子軟骨の変性・消失が認められ、13 週間以上にわたって変性が持続することを確認した。この OA モデル作成 1 週間後に膝関節内にラット DFAT(DFAT 群)または PBS(Control 群)を 1 週間毎に計 4 回関節内投与し、5 週間後に両群の膝関節軟骨の変性の程度を肉眼的および組織学的に評価した。その結果、Control 群に比べ DFAT 群では、大腿骨および脛骨の関節軟骨の変性が抑制される傾向が

認められ、軟骨変性評価スコアである Mankin ' s score および OARSI score の有意な低下を認めた。以上の結果よりラット OA モデルに対する DFAT 関節内投与は軟骨変性を抑制する効果があることが示された。これらの実験データを元に DFAT の OA 治療効果およびその作用機序に関する特許出願を行った。

引用文献

1. Burke J, Hunter M, Kolhe R, Isaacs C, Hamrick M, Fulzele S (2016) Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. Clin Transl Med 5 (1):27.
2. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, Tenen A (2016) Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. BMC Musculoskelet Disord 17:230.
3. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol 215 (1):210-222.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Soejima Kazutaka, Kashimura Tsutomu, Kazama Tomohiko, Matsumoto Taro, Nakazawa Hiroaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells on Formation of Basement Membrane after Cultured Epithelial Autograft on Artificial Dermis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 983e ~ 992e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.0000000000005514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Lan, Fukuda Noboru, Otsuki Tomoyasu, Tanaka Sho, Nakamura Yoshihiro, Kobayashi Hiroki, Matsumoto Taro, Abe Masanori	4. 巻 8
2. 論文標題 Increased Complement 3 With Suppression of miR 145 Induces the Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 255-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.012327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chen Lan, Fukuda Noboru, Matsumoto Taro, Abe Masanori	4. 巻 43
2. 論文標題 Role of complement 3 in the pathogenesis of hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 255 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0371-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Takehiro, Kishimoto Toshifumi, Leszczynski Pawel, Sadakane Koichiro, Kenmotsu Takahiro, Watanabe Hirofumi, Kazama Tomohiko, Matsumoto Taro, Yoshikawa Kenichi, Taniguchi Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Construction of 3D Cellular Composites with Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Endothelial Cells by Use of Optical Tweezers in a Natural Polymer Solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1759 ~ 1759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma12111759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujimaki Hiroshi, Matsumine Hajime, Osaki Hironobu, Ueta Yoshifumi, Kamei Wataru, Shimizu Mari, Hashimoto Kazuki, Fujii Kaori, Kazama Tomohiko, Matsumoto Taro, Niimi Yosuke, Miyata Mariko, Sakurai Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Dedifferentiated fat cells in polyglycolic acid-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 240 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Hideyo, Hirai Ryoji, Matsumoto Taro, Oshima Takeshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Development of a rat model of patulous eustachian tube by mandibular nerve resection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 821 ~ 829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakuma Toshiyuki, Matsumoto Taro, Kazama Tomohiko, Tokuhashi Yasuaki	4. 巻 78
2. 論文標題 Analysis of Cell-To-Cell Interactions between Intervertebral Nucleus Pulposus Cells and Dedifferentiated Fat Cells Using a Coculture System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nihon University Medical Association	6. 最初と最後の頁 285 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4264/numa.78.5_285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Manabu, Matsumoto Taro, Kikuta Shinsuke, Ohtaki Munenori, Kano Koichiro, Taniguchi Hiroaki, Saito Shu, Nagaoka Masahiro, Tokuhashi Yasuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets contributed to cartilage repair in the rat osteochondral defect model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopedic Science	6. 最初と最後の頁 688-696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Enshi, Matsumoto Taro, Kazama Tomohiko, Kano Koichiro, Tokuhashi Yasuaki	4. 巻 493
2. 論文標題 Transplantation of dedifferentiation fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.09.101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松本太郎
2. 発表標題 脱分化脂肪細胞を用いた血管再生細胞治療
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高綾乃, 土方浩平, 加藤礼保納, 植草省太, 金田英秀, 上原秀一郎, 松本太郎, 越永従道
2. 発表標題 ヒト神経芽腫細胞株におけるヒト脱分化脂肪細胞を用いた分化誘導の検討
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀
2. 発表標題 ANCA関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)治療の開発
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻村勉, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎
2. 発表標題 糖尿病ラットを用いた脱分化脂肪細胞 (DFAT) 投与による皮弁生着域拡大効果に関する検討
3. 学会等名 第11回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明
2. 発表標題 人工真皮移植時のヒトDFATの血管新生効果-免疫不全マウスによる実験的検討-
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akita D, Tsukimura N, Kazama T, Arai Y, Matsumoto T, Honda M
2. 発表標題 Enhanced periodontal regeneration by mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells transplantation
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本太郎
2. 発表標題 脱分化脂肪細胞による細胞治療の実用化
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷本浩二, 松本太郎, 長岡悠紀, 風間美奈子, 風間智彦, 山元智衣, 長岡正宏, 斉藤修, 徳橋泰明
2. 発表標題 膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞の形質および機能解析
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山潤志, 小山公行, 風間智彦, 松本太郎, 徳橋泰明
2. 発表標題 ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植方法による治療効果の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本太郎
2. 発表標題 成熟脂肪細胞の脱分化技術を利用した再生医療
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 変形性関節症の予防又は治療剤、及び変形性関節症の予防または治療用薬物組成物	発明者 松本太郎, 遠藤則行, 風間智彦	権利者 学校法人 日本 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-206493	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

脱分化脂肪細胞を細胞源とする再生医療
www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/dfat.html#about

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	李 ヨキン (LI Yuxin) (30599048)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	風間 智彦 (KAZAMA Tomohiko) (80525668)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
研究分担者	中山 漣志 (NAKAYAMA Enshi) (40793401)	日本大学・医学部・助手 (32665)	