

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11001

研究課題名(和文) CD271陽性骨髄幹細胞の軟骨再生能および抗炎症作用の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of CD 271+ Bone Marrow Stromal cells for the degenerative cartilage

研究代表者

宮崎 剛 (Miyazaki, Tsuyoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：80324169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本実験には手術で採取したヒト脂肪細胞からCD271陽性MSCsを抽出して用いた。ヌードラットの軟骨欠損モデルに対してCD271陽性細胞を移植した結果、高い軟骨再生能を認める結果であった。また一部雑多な細胞も含まれたprocessed lipoaspirate cellを変形性関節症モデル関節内に直接注入し、局所の抗炎症効果、変性軟骨の再生効果について検討を行った結果、早期変形性関節症軟骨に対しては軟骨再生効果を認めたが、進行期及び末期変性軟骨に対して軟骨再生効果は認められなかった。しかし、局所の抗炎症効果については早期、進行期、末期群においてコントロール群と比較して優位に抗炎症効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

より簡易な手法での変性軟骨再生とすることを最終目的に実験を行っているが、現段階では早期変形性関節症軟骨に対してはAD-MSCsの軟骨再生効果を認めたが、進行期及び末期変性軟骨に対しては軟骨再生効果は認められなかった。しかし、局所の抗炎症効果については早期、進行期、末期OAについてコントロール群と比較して優位に抗炎症効果及び疼痛発現物質の低下を認めた。これはMSCsの関節内注入療法は軟骨再生を目的とせず、除痛を目的とするものならば見込みがあるとする結果であった。

研究成果の概要(英文)：Intra-articular injection of PLA cells prevented degenerative changes in the early injection group, but had little effect in promoting cartilage repair in the late injection group. Interestingly, intra-articular injection of PLA cells resulted in suppression of inflammation and pain in both OA groups. Further studies are needed to determine the long-term effects of intra-articular injection of PLA cells in osteoarthritis. And the low angiogenic activity of CD271+ MSCs and improved early stage tissue repair of osteochondral lesions when transplanted, along with a comparable differentiation capacity along mesenchymal lineages when induced, suggests that these selected cells are a better candidate than plate adherent MSCs for the repair of cartilaginous tissue.

研究分野：整形外科分野

キーワード：変形性関節症 変性軟骨 軟骨再生 脂肪幹細胞 関節内直接注入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は厚生省国民生活基礎調査(平成 19 年)によると全国で約 2530 万人の患者がいると推測されており、年代別に見ると 40 歳代頃より発症が始まり、60 歳代女性で約 30%、80 歳代女性では 70%以上において変形性膝関節症をみとめると報告されている。今後高齢者人口はさらに増加し、令和 24 年には 65 歳以上の人口は 3878 万人と現在の約 1.4 倍に、また全人口に占める割合は 39.9%と現在の約 1.7 倍に増加することが報告されており(平成 22 年厚生省人口推計)、それに伴い将来的に現在よりも多くの変形性膝関節症患者数が発生してくると予測される。これら変性疾患は運動器障害を引き起こし、QOL の低下を招く一因となるだけでなく、現在変形性膝関節症に対して行われている人工膝関節置換術は一件あたり約 300 万円の医療費がかかるなど、医療費面からも医療コストを増加させる一因となりうる。さらに、病期が進んだ高齢者に対して手術を行っても発症前の活動性を回復することは困難であり、より若年者の初期病変に対する保存療法と発症および進行を予防することが今後重要になってくる。そこで我々は人工関節置換術に至らせないためにより初期病変から軟骨を修復し関節機能を維持するため、細胞移植を中心に Tissue Engineering を応用した軟骨再生に対する研究を予定した。

## 2. 研究の目的

これまで二次性変形性関節症モデル(軟骨欠損モデル)に対して BMSc などを用いた軟骨再生の報告は多くなされてきているが、一次性変形性関節症モデルに対しての軟骨再生に対しては否定的な意見が多い。我々は OA 自然発症モデル(一次性 OA モデル)として guinea pig を用い BMSc を採取・培養し、適切な時期にヒアルロン酸を scaffold として関節内に注入する手技で変性軟骨の再生が得られることを報告している(Sato et al. *Arthritis Res Ther*, 2012)。しかし BMSc を関節軟骨損傷部に移植した場合、BMSc 単独では軟骨組織への分化が不十分であり、TGF- $\beta$  や BMP-6 などの成長因子を投与することで細胞数が増加し、 $\alpha$ 1(I)型コラーゲンを多く発現することが報告されている。我々の研究でも移植した BMSc が細胞外基質を産生する期間は約 2 週間と短期間であることが分かっており、軟骨欠損部を修復するには、より長期間細胞外基質を産生することが重要になってくる。CD271 陽性の BMSc は成長因子を自ら発現し、細胞活性も高いため、通常の BMSc より長期間、高いレベルで細胞外基質を産生するであろうことが予測される。CD271 陽性細胞を単離し、OA の変性軟骨再生について評価している研究はこれまでに見られず、CD271 陽性細胞を軟骨再生に用いることでこれまで困難であると考えられてきた一次性 OA の軟骨組織がより早く、より多く再生できる可能性があるかと予測される。また MSCs には抗炎症作用についても定量的に評価した報告はなくこれら进行评估することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄幹細胞の採取と CD271 + 細胞の isolation と移植に伴う適切な scaffold 設定

今回の研究では BMSc を関節外より注射器で関節内へ導入することを目的としており、scaffold は流動性のあるものが必要になってくる。流動性があるだけでなく、適度に粘性がある scaffold として、ヒアルロン酸を考慮しており、また platelet rich plasma を scaffold として同時投与することも試みる。これら scaffold と骨髄より採取した BMSc が関節軟骨細胞との共培養条件下に培養が継続し、また細胞の増殖が行えるのか、また細胞の形態として軟骨細胞へ分化誘導しうるのか確認する。BMSc はハートレー系モルモット 10 日

齡の長管骨より骨髓細胞を採取し、3週間培養により増殖させた後、scaffold、関節軟骨細胞と共培養を2週間行う。

次にこれら細胞を軟骨細胞へ分化させるため、関節軟骨細胞と共培養を行い、顕微鏡および電顕下に細胞の形態についての評価を行い、細胞外基質であるGAGの産生が行われているかどうかを35SおよびDMB assayを用いて解析する。また乳酸産生量についても測定し、正常の関節軟骨細胞と比較して細胞代謝活性がどのように変化しているか評価測定を行う。

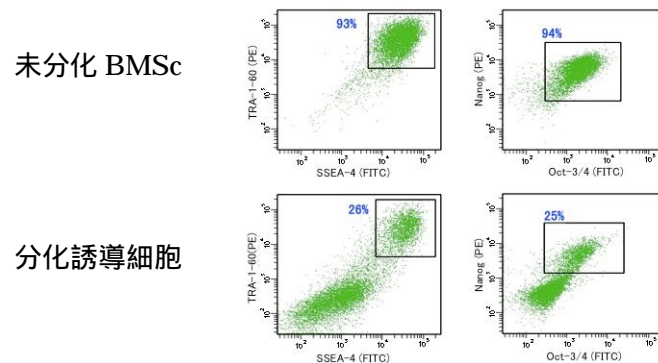


図1 培養細胞のFACS

## (2) 臨床応用に向けての条件設定

変形性関節症動物モデルを用いて膝関節内へBMScを液状のscaffoldとともに注入し、関節軟骨内への細胞の取り込みを評価する。注入する細胞にはあらかじめ蛍光標識抗体で細胞染色を行ったものを使用。次にさらに大型動物として日本白色家兎を用いて膝前十字靭帯と内側半月を切除して実験的変形性膝関節症モデルを作成する。軟骨変性を組織学的に評価し、初期変形性関節症と、進行期、末期のグループを作成し、そのモデルに対してBMScをscaffoldとともに関節内へ注入する。対照群として、実験的変形性膝関節症モデルにscaffoldのみを関節内に注入した群を作成し、関節内注入後3ヶ月にて屠殺後、膝関節軟骨において組織切片を作製しサフラニンO染色やアグリカンやコラーゲンIIの発現量について免疫染色を用いて軟骨面の状態について評価検討を行う。またCD271+細胞についても上記と同様の実験を行い軟骨形成の状態について比較検討を行う。

## (3) 大型動物、ヒトへの臨床応用、遺伝子導入による遺伝子治療

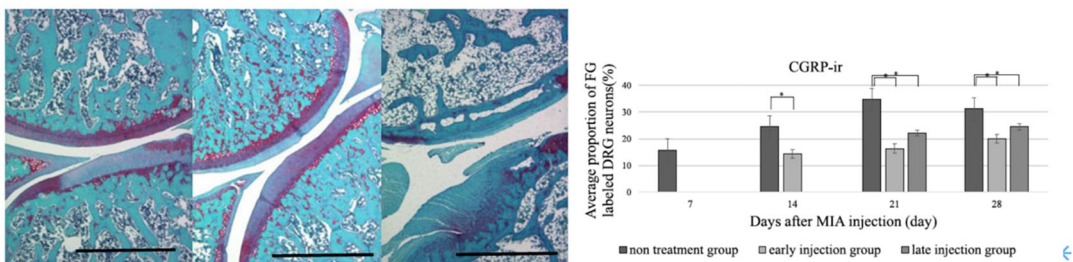
より大型の動物としてブタを用い、同様に実験的変形性関節症モデルを作成する。BMScは腸骨部より採取し培養を行った後、家兎と同様に膝関節内へBMScとscaffoldを注入し、一定期間後に軟骨表面の状態について評価検討を行う。またさらに移植後長期間経過観察することでBMScが軟骨細胞以外のものへ脱分化を起こさないか評価を行う。これら基礎的研究で安全性が確認された後に、同意を得られた場合にはヒト変形性膝関節症への投与を計画する。

## 4. 研究成果

平成29年度より3カ年の計画で「CD271陽性骨髓幹細胞の軟骨再生能および抗炎症作用の基礎的研究」を行った。実験結果は以下の通りである。

実験初期段階では骨髓幹細胞(BMSc)を使用していたが、CD271陽性細胞の含まれる割合が脂肪組織の方が50倍程度高く、途中より脂肪由来MSCs(AD MSCs)を用いた。また現段階でCD271陽性細胞はヒトの抗体しか無く、術中に採取したヒト脂肪細胞から磁気ビーズを用いてCD271陽性AD-MSCsを抽出して実験に用いた。MSCsには抗原性が無いと言

うことが一般的であるが、念のためヌードラットの軟骨欠損モデルを用いて検討を行い、CD271 陽性細胞において高い軟骨再生能を認める結果であった (引用文献 )。それに先立ち、脂肪組織より抽出した平面培地に接着性のある細胞(大部分が AD-MSCs といえるが、一部雑多な細胞も含まれており processed lipoaspirate cell: PLA cell とした)細胞を通常ラットの变形性関節症モデルに直接注入し、局所の抗炎症効果、変性軟骨の再生効果について検討を行った。その結果早期变形性関節症軟骨に対しては AD-MSCs の軟骨再生効果を認めたが、進行期及び末期変性軟骨に対しては軟骨再生効果は認められなかった。しかし、局所の抗炎症効果については早期、進行期、末期 OA についてコントロール群と比較して優位に抗炎症効果及び疼痛発現物質の低下を認めた。それらより、MSCs の関節内直接注入は軟骨再生よりも疼痛抑制及び局所の抗炎症効果について効果を認めるということが分かった。この結果は PLA cell の直接注入では早期の変性には効果があるが、進行した関節症に対しても高い抗炎症効果を有する結果であった (引用文献 )。



PLAcell+control 早期OA 末期OA DRGにおけるCGRP発現

図2 文献2より引用。左図においては末期OAにおいては軟骨再生を認めず、右グラフにおいてはコントロール群(PBS注入群)と比較して早期、末期OA群両方で有意にDRGにおける疼痛サイトカインの発現が低下している。

#### 引用文献

Kohli N, Al-Delfi IRT, Snow M, Sakamoto T, Miyazaki T, Nakajima H, Uchida K, Johnson WEB.

CD271-selected Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue Enhance Cartilage Repair and Are Less Angiogenic Than Plastic Adherent Mesenchymal Stem Cells. Sci Rep. 2019 Feb 28;9(1):3194. doi: 10.1038/s41598-019-39715-z.

Sakamoto T, Miyazaki T, Watanabe S, Takahashi A, Honjoh K, Nakajima H, Oki H, Kokubo Y, Matsumine A.

Intraarticular Injection of Processed Lipoaspirate Cells Has Anti-Inflammatory and Analgesic Effects but Does Not Improve Degenerative Changes in Murine Monoiodoacetate-Induced Osteoarthritis.

BMC Musculoskelet Disord. 2019 Jul 19;20(1):335. doi: 10.1186/s12891-019-2710-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohli N, Al-Delfi IRT, Snow M, Sakamoto T, Miyazaki T, Nakajima H, Uchida K, Johnson WEB.	4. 巻 28;9(1)
2. 論文標題 CD271-selected mesenchymal stem cells from adipose tissue enhance cartilage repair and are less angiogenic than plastic adherent mesenchymal stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SCIENTIFIC REPORTS	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39715-z.	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 Sakamoto T, Miyazaki T, Watanabe S, Takahashi A, Honjoh K, Nakajima H, Oki H, Kokubo Y, Matsumine A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Intraarticular injection of processed lipoaspirate cells has anti-inflammatory and analgesic effects but does not improve degenerative changes in murine monoiodoacetate-induced osteoarthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord	6. 最初と最後の頁 335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2710-1	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本 拓己, 宮崎 剛, 本定 和也, 中嶋 秀明, 大木 央, 小久保 安朗, 松峯 昭彦
2. 発表標題 間葉系細胞の関節内direct transplantation による除痛効果 MIA 関節内注入動物モデルによる検討
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 T.Sakamoto, T.Miyazaki, S.Watanabe, A.Takahashi, K.Honjoh, H.Oki, Y.Kokubo, A.Matsumine
2. 発表標題 Intraarticular injection of mesenchymal stem cells has further anti-inflammatory effects than prevents degenerative changes in rat knees with monoiodoacetate-induced osteoarthritis
3. 学会等名 The Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting (ORS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----