

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16647

研究課題名(和文)変形性関節症に対する間葉系幹細胞の軟骨変性抑制効果と疼痛軽減の作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of mesenchymal stem cells to suppress cartilage degeneration and reduce pain in osteoarthritis

研究代表者

宇土 美於 (Udo, Mio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50783495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット膝OAモデルに滑膜間葉系幹細胞(MSCs)を関節内投与評価した。ラットの104間葉系幹細胞は、臨床的にヒトの 3×10^7 間葉系幹細胞に相当します。外傷後変形性膝関節症モデルの1、2、3週間後に、間葉系幹細胞(104、105、106細胞)または生理食塩水を膝関節に注射しました。組織学的評価では、大腿骨の104を除くすべての間葉系幹細胞グループが、ACLT後12週間でコントロールと比較して有意に改善された。ACLT後12週間の104および105間葉系幹細胞グループとACLT後6、8、10、および12週間の106間葉系幹細胞グループの体重分布はコントロールグループよりも有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動器の障害が超高齢化社会に及ぼす影響は多大であり、変形性膝関節症(膝OA)はその代表疾患である。膝OAの主訴は関節痛だが、保存的治療法の効果は限定的である。軟骨変性を抑制する事は出来ていないのが現状である。本研究ではラットを用いて、ヒト膝OAを模したモデルを作成し、次世代治療薬としての滑膜間葉系幹細胞(MSCs)を関節内投与し、評価した。さらに膝OAの軟骨変性抑制効果と疼痛コントロールの新しい治療戦略を検討した。臨床的に実行可能な数の間葉系幹細胞は、関節軟骨の変性を軽減し、外傷後変形性膝関節症モデルの痛みを軽減することがわかりました。細胞数を増加すると、関節軟骨を変性からさらに保護しました。

研究成果の概要(英文)：Synovial mesenchymal stem cells (MSCs) were evaluated for intra-articular administration in a rat knee OA model. Rat 104 mesenchymal stem cells are clinically equivalent to human 3×10^7 mesenchymal stem cells. One, two, or three weeks after the post-traumatic knee osteoarthritis model, mesenchymal stem cells (104, 105, 106 cells) or saline were injected into the knee joint. Histological evaluation showed that all mesenchymal stem cell groups except 104 in the femur were significantly improved 12 weeks after ACLT compared to controls. The weight distribution of the 104 and 105 mesenchymal stem cell groups 12 weeks after ACLT and the 106 mesenchymal stem cell groups 6, 8, 10, and 12 weeks after ACLT was significantly higher than that of the control group.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 幹細胞治療

1. 研究開始当初の背景

運動器の障害が超高齢化社会に及ぼす影響は多大であり、変形性膝関節症(膝 OA)はその代表疾患である。膝 OA は罹患者も多く、広く一般的に知られている主な症状として関節炎と関節液の貯留、各ステージにおける関節痛があり、痛みにより罹患者は種々の程度に日常生活を妨げられ、社会生活に支障を生じ、医療支援の大きな原因となる。膝 OA の主訴は関節痛だが、保存的治療法の効果は限定的である。病態の発生、進行に影響する因子として、関節内の炎症、メカニカルストレスが関与するが、病態の進行予防、関節軟骨の治療の面ではその病態には不明な点も多く、関節痛の詳しい機序や疼痛コントロール法は明らかでない、また軟骨変性を抑制する事は出来ていないのが現状である。現在ある治療法では軟骨変性予防は困難であり、疼痛軽減効果は不十分である。その背景として関節内の炎症、メカニカルストレスが病態の発生、進行に影響を与えていると考えられているが、治療法の開発という点では**軟骨摩耗の進行や疼痛発現機序の解明は限定的である事**が挙げられる。一方、MSCs は軟骨保護・再生作用、抗炎症作用を持つとされており、再生医療に用いられている。我々の教室では動物モデルを使用した研究で MSCs を投与することで軟骨再生や半月板再生を促進する事を報告し、臨床研究も実施している。

2. 研究の目的

本研究ではラットを用いて、ヒト膝 OA を模したモデルを作成し、次世代治療薬としての滑膜間葉系幹細胞 (MSCs) を関節内投与し、評価した。さらに膝 OA の軟骨変性抑制効果と疼痛コントロールの新しい治療戦略を検討する事である。

3. 研究の方法

体重 270~285g の合計 24 匹の 8 週齢のオスのウイスターラット (非近交系: チャールズリバーラボラトリーズジャパン、神奈川、日本) を実験に使用した。すべての動物の管理と実験は、本学動物倫理委員会のガイドラインに従って実施されました。この研究は、本学の倫理審査委員会によって承認されました。

滑膜 MSC の準備

滑膜組織は、ウイスターラットの膝関節から採取された。採取した滑膜組織を細かく切り刻み、コラゲナーゼで 3 時間消化した。細胞を完全培地 (Invitrogen; 10% ウシ胎児血清; Invitrogen; ペニシリン、ストレプトマイシン、およびアンホテリシン B; Invitrogen) に播種し、5% CO₂ とともに 37 °C でインキュベートしました。14 日後、細胞をトリプシンで回収し、0 代継代として細胞凍結培地で -80 °C で保存しました。その後、細胞を解凍し、70% サブコンフルエンスまで培養した。20 μL の生理食塩水 (PBS) に継代 3 または 4 での 104、105、106 滑膜 MSC の細胞懸濁液を調製した。

PTOA モデル

ACLT によって作成された PTOA のラットモデルを使用した。ラットは ACL の外科的切除を受けた。イソフルランを使用した麻酔下で手術は行われた。ラットの右膝関節の内側に傍膝蓋皮膚切開を行い、内側関節包を切開した。膝蓋骨が横方向に脱臼した後、ACL が露出され、#11 外科用ブレードを使用して完全に切断されました。ACL の完全な切断はラックマンテストと前方引き出しにより確認した。関節軟骨は変性変化がないことを確認しました。内側関節包と皮膚は、3-0 縫合糸 (Mersilk; Ethicon) にて閉創した。ラットはケージの中で自由に動くことができた。

滑膜 MSC の注射

滑膜 MSC (104、105、106 : 20 μ LPBS) または 20 μ L の PBS (対照群) を、ACLT の 1、2、および 3 週間後に右膝関節に注射した。

軟骨変性の評価

肉眼的および組織学的評価のために、すべてのグループを術後 12 週間で屠殺した。ACL 機能は、屠殺時にラックマンテストと前方引き出しにより確認した。肉眼的観察のために、大腿骨顆および脛骨プラトーを墨汁で染色した。マクロ写真は、オリンパス MVX 10 (オリンパス、東京、日本) を使用して撮影された。組織学的検査では、大腿骨顆と脛骨軟骨を 4%パラホルムアルデヒドで 7 日間固定し、20%エチレンジアミン四酢酸溶液で 21 日間脱灰した後、パラフィンワックスに包埋した。標本は矢状面で 5 μ m で切断された。切片はサフラニン 0 とファストグリーンで染色された。大腿骨内側顆と内側脛骨プラトーの両方の中心からの代表的な切片を評価した。軟骨の変化は、OARSI スコアリングシステムを使用して評価されました。3 人の独立した観察者が盲検法でスコアを評価した。

静的体重負荷試験

静的体重負荷試験は、ラットが静止しているときの ACLT 側 (右) と反対側の後肢の間の体重分散を評価した。各ラットの後肢の両方の荷重分散を測定し、その後、ACLT 側の後肢の体重を両後肢の体重で割った。体重負荷分散改善率は、ACLT 前の ACLT 側の荷重分散と術後 1 週間の荷重分散の割合の差を ACLT 側の荷重分散の割合の差で割ったものとして計算されました。MSC 移植後に ACLT 側の荷重分散率が回復すると、荷重分散改善率が高まる。

4 . 研究成果

脛骨および大腿骨の関節軟骨の肉眼的評価

対照群では、肉眼的観察により、内側脛骨プラトーおよび内側大腿骨顆の変性が示され、軟骨表面の一部が侵食を示した。対照群では、墨汁染色でいくつかの点状のくぼみが観察された。104 MSC グループでは、内側大腿骨顆および内側脛骨プラトーの軟骨表面の一部に光沢がありました。105 および 106MSC グループでは、軟骨表面は内側大腿骨顆および内側脛骨プラトーで光沢がありました。屠殺時の ACL 機能の欠如と解剖時の ACL 再生の欠如はすべての膝で確認されました。

軟骨変性の組織学的評価

対照群では、関節表面の構造が大腿骨顆で損なわれ、サフラニン 0 染色により、脛骨プラトーの軟骨下骨が露出し、関節軟骨のプロテオグリカン含有量の喪失していた。104 MSC グループでは、

サフラニン 0 染色は、表層および中間層でわずかに減少しましたが、大腿顆の深層では失われませんでした。関節表面の構造は損なわれておらず、サフラニン 0 染色は脛骨プラトーでは影響を受けなかった。105 および 106MSC 群では、大腿顆部でサフラニン 0 染色が関節軟骨の一部でわずかに減少したが、関節表面の形状が維持された。脛骨プラトーではサフラニン 0 染色でほとんど変化が見られなかった。組織学的評価は、12 週間ですべての MSC 注射群 (104、105、および 106) の脛骨プラトーで OARSI スコアが有意に改善されていた。大腿骨の 104 の MSC グループを除くすべての MSC グループの OARSI スコアは、ACLT 後 12 週間で対照グループと比較して有意に改善されていた。大腿顆では、平均スコアは対照群で 12.6 ± 3.2 、104 MSC 群で 5.5 ± 3.5 、105 MSC 群で 4.4 ± 2.8 、106 MSC 群で 3.3 ± 2.6 でした (PBS 対 105 : $P = 0.04$ 、PBS vs 106 : $P = 0.02$ 、その他の比較群 : $P > 0.05$)。脛骨プラトーでは、平均スコアは、対照群で 6.9 ± 2.3 、104 MSC 群で 2.0 ± 0.1 、105 MSC 群で 1.8 ± 0.4 、および 106 MSC 群で 1.5 ± 0.2 でした (PBS 対 104 : $P = 0.01$ 、PBS vs 105 : $P = 0.02$ 、PBS vs 106 : $P = 0.02$ 、その他の比較群 : $P > 0.05$)。痛みの軽減を評価するための体重負荷分布改善率の分析

体重負荷分布の改善率は、手術後 12 週間で、対照群よりも 104、105、および 106 MSC 群で有意に高かった (104 MSC 群 : $p = 0.049$; 105 MSC 群 : $p = 0.013$; 106MSC 群 : $p = 0.028$) ; 手術後 6、8、10、12 週間で 106 MSC 群の方が対照群よりも高かった (6 週間 : $p = 0.050$; 8 週間 : $p = 0.012$; 10 週間 : $p = 0.022$)。統計的に有意ではありませんが、104 および 105 MSC の体重負荷分布改善率は、術後 6、8、および 10 週間で対照群よりも高くなる傾向がありました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宇土 美於、林 将也、吉村 英哉、高橋 徹、柳澤 克昭、日山 鐘浩、荻内 隆司、星野 明穂	4. 巻 44
2. 論文標題 動脈損傷を伴う前脛骨筋内血腫にウロキナーゼを用いた筋内血腫溶解療法を行いコンパートメント症候群を起こした1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOSKAS	6. 最初と最後の頁 594-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 宇土 美於、朱 寧進	4. 巻 44
2. 論文標題 Opening-wedge HT0術後のjoint line coverage angle(JLCA)変化量は術前臥位JLCAと相関する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOSKAS	6. 最初と最後の頁 490-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 柳澤 克昭、林 将也、荻内 隆司、吉村 英哉、高橋 徹、宇土 美於、日山 鐘浩、吉原 有俊、山下 理子、星野 明穂	4. 巻 44
2. 論文標題 脛骨粗面滑車間距離の大きな反復性膝蓋骨脱臼に対する検討 内側膝蓋大腿靭帯単独再建例と脛骨粗面移行同時施行例との比較	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOSKAS	6. 最初と最後の頁 370-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hoshino Takashi, Tsuji Kunikazu, Onuma Hiroaki, Udo Mio, Ueki Hiroko, Akiyama Masako, Abula Kahaer, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshihumi, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki, Muneta Takeshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	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） 10.1186/s12891-018-2221-5	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 該当する

1. 著者名 Inomata Kei, Tsuji Kunikazu, Onuma Hiroaki, Hoshino Takashi, Udo Mio, Akiyama Masako, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Time course analyses of structural changes in the infrapatellar fat pad and synovial membrane during inflammation-induced persistent pain development in rat knee joint	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	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) 10.1186/s12891-018-2391-1	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 該当する

1. 著者名 Onuma Hiroaki, Tsuji Kunikazu, Hoshino Takashi, Inomata Kei, Udo Mio, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Fibrotic changes in the infrapatellar fat pad induce new vessel formation and sensory nerve fiber endings that associate prolonged pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1296 ~ 1306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24580	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------