

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16975

研究課題名(和文) 腱縫合モデルへの間葉系幹細胞移植効果の解明 — 抗炎症効果の視点から —

研究課題名(英文) Mesenchymal Stem Cell Transplantation Effects on Tendon Suture Models - From the Perspective of Anti-inflammatory Effects-

研究代表者

渋谷 陽一郎 (Shibuya, Yoichiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50783883

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)：手指屈筋腱損傷後、機能にしばしば制限が残る。本研究では、過去に我々が開発したマウスアキレス腱縫合モデルに対し、間葉系幹細胞の一種であるヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)を移植し、その効果を解析した。hASC移植群では対照群に比し機能的改善が観察された。組織学的には、hASC移植群はコラーゲン線維密度が有意に高く、異所性軟骨形成が有意に少ない結果を得た。遺伝子発現解析では、hASC移植群において、術後7日目に炎症低減を示唆する結果が、また術後6週目にコラーゲン関連遺伝子群の発現が対照群に比し有意に高い結果が得られた。急性期における炎症低減により、質的・機能的に良好な治癒が得られることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、腱損傷モデルにおいて、脂肪由来幹細胞の持つ抗炎症/免疫調整効果の解析を行った報告はなかった。手指屈筋腱損傷では、上述のように、機能予後が悪い例が少なくない。脂肪由来幹細胞移植によりこれらが改善すれば、これまで機能障害が残存した患者の福音となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：After hand flexor tendon injury, function often remains limited. In this study, we analyzed the effects of transplantation of human adipose-derived stem cells (hASCs), one of the mesenchymal stem cells, into our previously developed mouse Achilles tendon suture model. hASC transplantation group showed functional improvement compared to the control group. Histologically, the hASC transplant group had significantly higher collagen fiber density and significantly less ectopic cartilage formation. Gene expression analysis showed that the hASC transplantation group showed significantly higher expression of anti-inflammatory gene on postoperative day 7 and significantly higher expression of collagen-related genes on postoperative week 6 than the control group. The results suggest that the reduction of inflammation in the acute phase leads to better qualitative and functional healing.

研究分野：形成外科学、創傷外科学、再生医学

キーワード：腱縫合モデル 間葉系幹細胞 脂肪由来幹細胞 抗炎症効果

1. 研究開始当初の背景

手指屈筋腱損傷では十分な腱強度回復までに要する約 3 か月の間に周囲組織との癒着や再断裂、関節拘縮が生じることで、機能的予後が悪い例をしばしば経験する。現在の臨床における治療体系は手術と後療法からなる。後療法としては固定法、早期運動療法などが行われている。これまでの約 40 年間は、上述の治療体系の範疇で、術式の改良やリハビリプロトコルの改良が行われてきたが、開発はプラトー相に達している。このため、さらなる合併症の低減を実現するに、研究代表者は再生医療技術との融合という、新たなアプローチに注目してきた。

近年、幹細胞を利用した再生医療研究が飛躍的に進展してきていた。骨髄由来間葉系幹細胞に続き、ヒト皮下脂肪組織においても、2001 年、Zuk らにより多分化能を有する幹細胞の存在が報告された¹⁾。この脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, ASC) の分化能は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) とは異なり限定的ではあるものの、骨芽細胞、軟骨、脂肪細胞、末梢神経、横紋筋、腱、平滑筋細胞、心筋、肝細胞等へ、胚葉を超えた分化誘導が可能であるため注目されてきた。間葉系幹細胞は多分化能による再生効果の他にも、種々のサイトカインをパラクラインすることによる抗炎症 / 免疫調整効果が注目されている。

我々は、臨床における腱縫合+後療法を模したマウスアキレス腱縫合モデル (mAT モデル) を開発²⁾し、脂肪由来幹細胞の移植効果を報告してきた。また、過去の腱縫合モデルにおける研究から、この間葉系幹細胞の持つ抗炎症/免疫調整効果に注目してきた。

2. 研究の目的

過去の研究において、mAT モデルにヒト間葉系幹細胞を異種移植した際に、炎症低減が示唆される定性的データを得ていたが、定量が出来なかった。本研究では、mAT モデルにヒト間葉系幹細胞を異種移植した際に、抗炎症効果と機能の改善がみられる、との仮説を定量的に検証することであった。

3. 研究の方法

mAT モデルにヒト MSC を異種移植し、経時的に組織学的、分子生物学的解析を行い、抗炎症効果の視点から MSC 移植効果を解明する計画を立てた。臨床応用の障壁低減のため、当初、移植用 MSC として造血幹細胞移植後ステロイド抵抗性急性 GVHD に対し既に保険適応となっている他家骨髄由来 MSC 製剤である テムセル HS 注を有力候補とした。しかし予定した細胞は供給が受けられず、hASC を新たに候補とした。ヒト皮下脂肪組織より間質血管細胞群を調製し、3 継代を行って移植用 hASC 細胞を調製、移植実験用マウスは野生型のものを準備した。マトリゲルを担体として hASC を培養用培地と混合して移植する hASC 移植群と、対照群としてマトリゲルに培養用培地のみを混合して移植する群を設け、移植し、術後の機能評価として、足関節可動域評価、アキレス腱使用再開までの期間の評価を行った。術後 6 週時点での組織学的評価として、過去の我々の予備的検討における治癒過程でみられ、また先行研究においても腱治癒過程では避けられないと報告されている異所性軟骨形成³⁾ 領域をアルシアンブルー染色切片において定量し、また、マッソントリクローム染色切片においてコラーゲン密度の定量を行った。また遺伝子発現解析として、術後 7 日における抗炎症マーカー *Tgf-β1*、術後 6 週における *Coll1a1*、*Coll1a2*、*Col3a1* の発現解析を行った。

4. 研究成果

アキレス腱の使用は、hASC 移植群では対照群よりも早期に観察された (図 1 左)。hASC 移植群は対照群に比べて足首の底屈可動域が有意に大きかった (図 1 右)。組織学的解析では、hASC 移植群はコラーゲン線維の密度が有意に高く (図 2 右)、異所性軟骨形成の面積が有意に少なかった (図 2 左)。また、hASC 移植群では、術後 7 日目に *Tgfβ1* (図 3)、術後 6 週目に *COL1A1*、*COL1A2*、*COL3A1* (図 4) の発現が対照群に比べて有意に高かった。

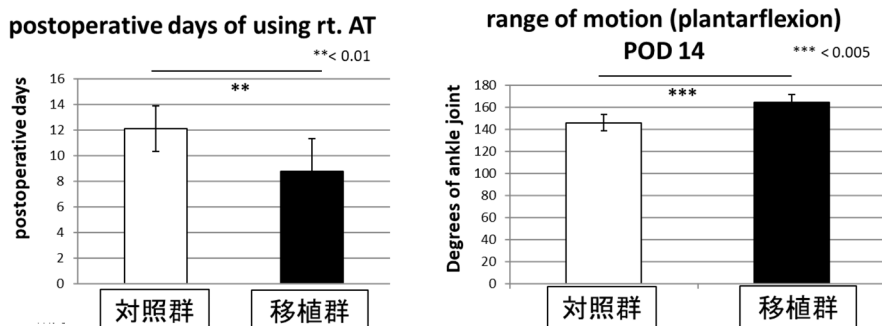


図 1

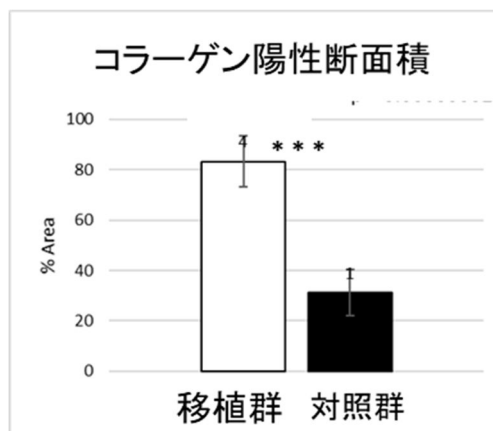
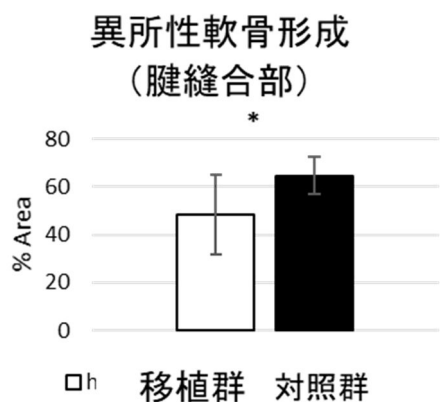


図 2

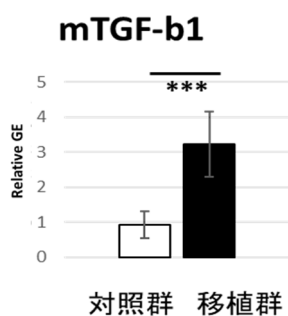


図 3

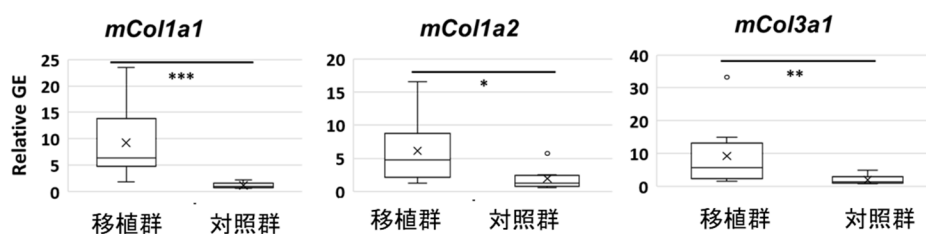


図 4

以上から、hASC は、我々の mAT モデルに移植を行うと、急性期の炎症を改善させ腱組織をより良質に治癒させることが示唆された。

引用文献

- 1) Zuk PA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
- 2) Yoichiro Shibuya, et al. A novel postoperative immobilization model for murine Achilles tendon sutures. *Lab Anim.* 50(4):308-11. 2016
- 3) Rooney P, et al. Endochondral ossification and de novo collagen synthesis during repair of the rat Achilles tendon. *Matrix.*12(4):274-81. 1992

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渋谷陽一郎、Akishige Hokugo、高山祐三、佐々木薫、佐々木正浩、相原有希子、Reza Jarrahy、Ichiro Nishimura、関堂充、木田泰之
2. 発表標題 ヒト脂肪由来幹細胞移植はマウスアキレス腱モデルの急性期炎症を抑制し治癒を促進する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shibuya, Yoichiro, Hokugo, Akishige, Takayama, Yuzo, Imai, Yukiko, Sasaki, Kaoru, Lin, Zhixiang, Oshima, Junya, Sasaki, Masahiro, Aihara, Yukiko, Sekido, Mitsuru, Jarahy, Reza, Nishimura, Ichiro, Kida, Yasuyuki S
2. 発表標題 HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELL TRANSPLANTATION ACCELERATES HEALING OF MURINE ACHILLES TENDON MODEL
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渋谷 陽一郎、今井 裕季子、林 智翔、佐々木 薫、明星 里沙、大島 純弥、佐々木 正浩、相原 有希子、Hokugo, Akishige, 木田 泰之、関堂, 充
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞を利用した再生戦略腱再生時の抗炎症/免疫調整作用の考察
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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