

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18530

研究課題名(和文)変形性膝関節症に対するPLA cellsによる軟骨保護・抗炎症効果の基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental study on the chondroprotective and anti-inflammatory effects of PLA cells on osteoarthritis of the knee

研究代表者

坂本 拓己 (Sakamoto, Takumi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：40634837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)患者は高齢人口の増加により初期病変も含めると膨大な患者数となり、健康寿命延伸のため解決すべき課題である。国内では膝OAに対する軟骨再生治療は、骨髄間葉系幹細胞(BMSCs)、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いて研究が行われているが、今回我々は、BMSCsよりもさらに簡便に入手可能で細胞活性の高い、脂肪組織由来のprocessed lipoaspirate cell (PLA cell)を用いて、PLA cellの関節内直接注入による早期および進行期膝OAに対する軟骨再生・保護効果ならびに、抗炎症・除痛効果について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では二次性関節症動物モデルのPLA cell関節内注射が早期注射群では関節軟骨の残存をもたらしたが後期注射群では軟骨の残存はなかった。炎症性サイトカインの減少、疼痛関連物質の減少は、早期注射群および後期注射群の両群において、PLA cell関節内注射後に観察された。このことはPLA cellを用いたOA治療において、OAに対する軟骨再生・保護効果は早期のOAにしか見込めず、それよりも抗炎症・除痛効果において有用である事を示す結果であった。これはMIA誘発変形性関節症動物モデルにおける軟骨変性および疼痛減少に対するPLA cell関節内注射の治療効果を比較する最初の報告である。

研究成果の概要(英文)：With the increase in the elderly population, the number of patients with knee osteoarthritis (knee OA), including those with early onset, is enormous, and this is a problem that must be solved to extend healthy life expectancy. In Japan, cartilage regeneration therapy for knee OA using bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), embryonic stem cells (ES cells), and induced pluripotent stem cells (iPS cells) has been investigated, and now we have developed a method using processed fat-derived products that are even easier to obtain and have higher cellular activity than BMSCs In this study. Using adipose-derived processed adipose adsorbed cells (PLA cells), which are more readily available and have higher cellular activity than BMSCs, we investigated the effects of direct intra-articular injection of PLA cells on cartilage regeneration and protection, anti-inflammation and pain relief in early and advanced stages of knee OA.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 軟骨

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(膝 OA)患者は高齢人口の増加により初期病変も含めると膨大な患者数となり、健康寿命延伸のため解決すべき課題である。国内では膝 OA に対する軟骨再生治療は、間葉系幹細胞(MSCs)、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いて研究が行われており、また自家培養軟骨移植を用いた臨床研究も 2018 年秋から進行中であるが、先行研究においては進行した膝 OA に対する十分な治療効果は示されていない。これまで我々の研究では、初期膝 OA 動物モデルに MSCs の関節内直接投与を行うことで、関節軟骨の再生・保護効果を認めるものの、進行した膝 OA に対する軟骨再生・保護効果は示せなかった。しかし局所での抗炎症・除痛効果においては、進行期膝 OA 群においても早期膝 OA 群と同等の結果が得られる可能性が示せた。今回我々は、MSCs よりもさらに簡便に入手可能な脂肪組織から得た processed lipoaspirate cells (PLA cells)を用い、膝 OA に対する軟骨再生・保護効果および、抗炎症・除痛効果についての基礎的研究を計画した。また発展的内容として、より細胞活性の高い adipose derived CD271 陽性 MSCs についても検討を行う予定とした。

2. 研究の目的

変形性膝関節症(膝 OA)は吉村らの ROAD study 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%以上において膝 OA をみとめると報告されている。2042 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 28 年厚労省人口推計)、膝 OA 患者は高齢人口の増加により初期病変も含めると膨大な患者数となり、健康寿命延伸のため解決すべき課題である。

国内では膝 OA に対する軟骨再生治療は、骨髄間葉系幹細胞(BMSCs)、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いて研究が行われており、また自家培養軟骨移植を用いた臨床研究も 2018 年秋から進行中であるが、先行研究においては進行した膝 OA に対する十分な治療効果は示されていない。これまでの我々の研究では、初期膝 OA 動物モデルに MSCs の関節内直接投与を行うことで、関節軟骨の再生・保護効果を認めるものの、進行した膝 OA に対する軟骨再生・保護効果は示せなかった。今回我々は、BMSCs よりもさらに簡便に入手可能で BMSCs よりも細胞活性の高い、脂肪組織由来の processed lipoaspirate cell (PLA cell)を用いて、PLA cell の関節内直接注入による早期および進行期膝 OA に対する軟骨再生・保護効果ならびに、抗炎症・除痛効果について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には変形性関節症動物モデルを用いた。モデルは SD ラット(12 週齢)の膝関節内に軟骨の解糖系を抑制して OA 変化を生じる mono iodoacetate (MIA)を関節内投与し作成した。MIA は濃度依存性及び注入後の期間を調節することにより変形性関節症のグレードをコントロールすることが可能である。MIA 注射のみを行った群を非治療介入群、MIA 注射後 7 日目に PLA cell を関節内注入(1×10^7 cells)したものを早期治療介入群、MIA 注射後 14 日目に PLA cell を関節内注入(1×10^7 cells)した群を後期治療介入群として下記項目について検討を行った。また PLA cell は、SD ラットの皮下脂肪を採取し、3 継代培養したものをを用いた。

(1) PLA cell の cell character の特定

表面抗原解析を CD29、CD31、CD90.1 について fluorescence activated cell sorting (FACS) instrument を用いて解析した。

(2) 変形性関節症グレード別の PLA cell 関節内直接注入後の軟骨再生保護効果・抗炎症効果

HE 染色、サフラニン O 染色を用いて評価し、膝関節の炎症の程度を膝関節滑膜の炎症性サイトカイン(TNF- α)についてウエスタンブロットを用いて半定量的に比較検討した。

(3) 変形性関節症グレード別の PLA cell 関節内直接注入後の除痛効果

膝関節に由来する第 3-5 腰椎後根神経節(DRG)における疼痛関連物質(CGRP、Substance P)の

発現を逆行性神経トレーサーである Fluoro-Gold との二重免疫染色を用いた陽性細胞率およびウエスタンブロットを用いた半定量評価を行い、除痛効果について各群間で比較検討した。

4. 研究成果

- (1) CD29 は 99.0% positive、CD90 は 99.7% positive、CD31 は 99.7% negative であり、今回実験で用いた細胞のほぼ全てが Adipose derived-MSCs と同様の表面抗原パターンを呈していた。当初脂肪組織から得られた plastic adherent な細胞を PLA cell としたが、PLA cell は単一な MSCs ではなく multipotent な stem cell を含んだヘテロな細胞集団と考えていたが、そのほぼ全てが AD-MSC と同様の特徴を有する結果であった。
- (2) 後期治療介入群においては MIA 注射後 21 日、28 日で関節軟骨は完全に消失する一方、早期治療介入群では MIA 注射後 21 日、28 日でも軟骨は残存していた（図 1）。また膝関節滑膜の TNF- α は早期治療介入群、後期治療介入群ともに、非治療介入群と比較して減少しており、OA のグレードによらず PLA cell 注入による抗炎症効果を認めた。
- (3) 第 3-5 腰椎 DRG における CGRP、SP の免疫染色は早期治療介入群、後期治療介入群ともに、非治療介入群と比較して有意に減少しており、PLA cell の関節内直接投与によって関節痛の抑制が生じている結果であった（図 2）。また DRG における CGRP のウエスタンブロットでも同様の結果を示した。

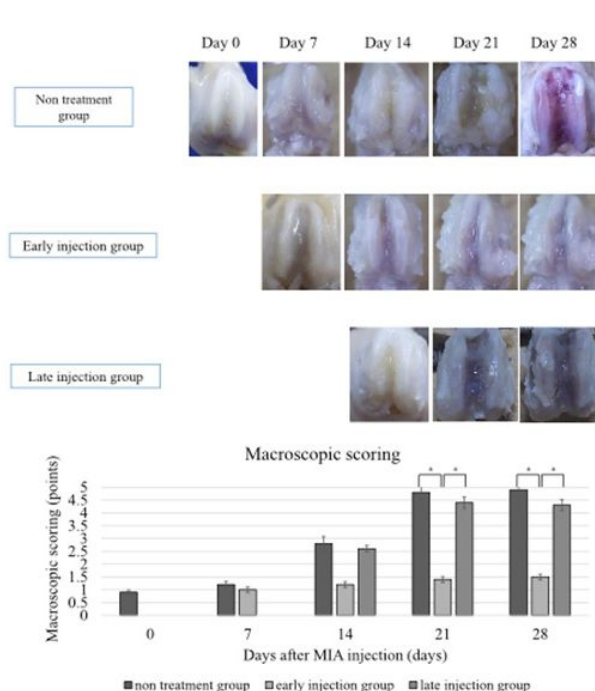


図 1

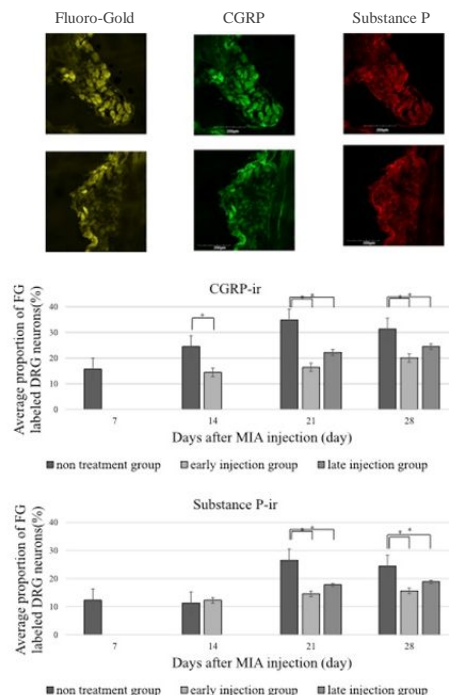


図 2

今回の研究では MIA 誘発変形性関節症動物モデルの PLA cell 関節内注射が早期注射群では関節軟骨の残存をもたらしたが後期注射群では軟骨の残存はなかった。炎症性サイトカインの減少、疼痛関連物質の減少は、早期注射群および後期注射群の両群において、PLA cell 関節内注射後に観察された。このことは PLA cell (AD-MSCs) を用いた OA 治療において軟骨再生を中心に検討が行われてきたが、OA に対する軟骨再生・保護効果は早期の OA にしか見込めず、それよりも抗炎症・除痛効果において有用である事を示す結果であった。これは MIA 誘発変形性関節症動物モデルにおける軟骨変性および疼痛減少に対する PLA cell 関節内注射の治療効果を比較する最初の報告である。

本研究の主な所見は以下の通りである。1) PLA cell 関節内注射は早期注射群では変性変化を予防したが後期注射群では軟骨再生効果は示さなかった。2) PLA cell 関節内注射は、早期および後期注射群において、DRG における疼痛関連因子の発現の減少をもたらした。つまり変形性関節症への PLA cell 関節内注射は、早期注射群と後期注射群の両方で疼痛抑制効果を有した。3) PLA cell 関節内注射は、変形性関節症の滑膜における TNF- α の発現抑制と関連していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Takumi, Miyazaki Tsuyoshi, Watanabe Shuji, Takahashi Ai, Honjoh Kazuya, Nakajima Hideaki, Oki Hisashi, Kokubo Yasuo, Matsumine Akihiko	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 Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 335-345
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 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takumi Sakamoto,
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 ORS 2019 Annual Meeting（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
---------------------------	-----------------------	----

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