

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24026

研究課題名（和文）変形性関節症の構造改善薬シーズの探索を目指した滑膜間葉系幹細胞遊走モデルの開発

研究課題名（英文）Development of a novel synovial stem cell migration model for exploring disease-modifying osteoarthritis drugs

研究代表者

遠藤 健太郎（Endo, Kentaro）

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト研究員

研究者番号：30844378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤により滑膜から関節液中へと間葉系幹細胞（MSCs）を動員することが出来れば、MSCsを移植せずに関節の再生医療が可能となる。本研究ではスクリーニングに適した新規の遊走モデルの開発、および滑膜MSCs動員因子の探索を目的とした。トランスウェルインサート上でヒト滑膜MSCsをマトリゲル+型コラーゲン混合ゲルに包埋し、生体内の環境を再現可能なモデルを開発した。本モデルにて、PDGF-BBは強い滑膜MSCs動員効果を示した。PDGF-BBをラット膝関節に注射すると、関節液中のMSCsの数が有意に増加し、PBSを注射した膝由来の細胞と比較して高い増殖能、コロニー形成能、軟骨分化能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症（OA）に対する治療法の開発は、有症状者数が多いにも関わらず根本的な治療法が存在しないため、現在社会的に喫緊の課題である。本研究では、滑膜MSCsによる内在性再生メカニズムの増強に焦点を当て、新規モデルにて滑膜MSCs動員因子のスクリーニングが可能であることを、薬液の関節内注射という低コスト・低侵襲な操作により生体内で滑膜MSCsを関節液中に動員可能であることを初めて示した。本研究の成果は、これまでのOA創薬研究には存在しなかった新たな治療アプローチを提唱するものであり、本研究の発展は極めて汎用性の高いOA治療薬の開発に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：Drugs that can induce mesenchymal stem cell (MSC) mobilization from synovium into synovial fluid will enable regenerative medicine in joints without use of exogenous MSCs. The purpose of this study was to develop a novel synovial MSC migration model suitable for screening and to explore synovial MSCs mobilization factors. Human synovial MSCs embedded in a mixture of Matrigel and type 1 collagen hydrogel were placed on a culture insert to develop a model that can recapitulated the in vivo environment. In this model, platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) strongly induced synovial MSC migration. Injection of PDGF-BB into rat knees increased colony-forming cells in the synovial fluid. These cells had a higher capacity for proliferation, colony formation, and chondrogenesis.

研究分野：整形外科学

キーワード：間葉系幹細胞 滑膜 変形性関節症 関節液 軟骨 遊走 PDGF

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (OA) に対する治療法の開発は、有症状者数が多いにも関わらず根本的な治療法が存在しないため、現在社会的に喫緊の課題となっている。これまでに申請者らは、OA 治療法の開発を目指し、滑膜間葉系幹細胞 (滑膜 MSCs) を用いた研究を世界に先駆けて実施してきた。その過程で、「滑膜 MSCs が関節内組織の損傷・炎症に応答して関節液中へ遊走し、損傷組織に接着・生着することで自然修復に寄与する」という内在性再生メカニズムの存在が示唆された。また、このメカニズムを *in vitro* で検証可能な浮遊滑膜 MSCs 遊走モデルの開発に成功し、滑膜 MSCs の遊走促進を介した OA 構造改善薬の開発が期待された。しかし、本モデルは多くの組織・培地を必要とし、再現性も低いという問題があるため、薬剤スクリーニングに対応可能な、より小規模で標準化された新たな滑膜 MSCs 遊走モデルの開発が必要であった。

2. 研究の目的

したがって本研究では、OA の構造改善薬シーズの探索を目指した新規滑膜 MSCs 遊走モデルの開発、および薬剤スクリーニングへの応用を目的とした。また、スクリーニングにて同定した滑膜 MSCs 動員因子候補の効果を *in vivo* にて検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 新規滑膜 MSCs 遊走モデルの開発

人工膝関節置換術を受ける OA 患者から滑膜 MSCs を採取・培養した。トランスウェルインサート上でヒト滑膜 MSCs をマトリゲル + I 型コラーゲン混合ゲルに包埋することで滑膜組織を模倣した。下部ウェルにポジティブコントロールとして 10%FBS を含む培地を入れ培養した。経時的に遊走した細胞数を評価した。また、OA 環境を再現するために、滑膜 MSCs を IL-1 $\beta$  あるいは TNF- $\alpha$  で前処理した条件でも遊走細胞数を評価した。

(2) 滑膜 MSCs 動員因子の探索

下部ウェルに、様々な MSCs において chemoattractant として報告のある因子 (BMP-2, HGF, IGF-1, PDGF-BB, SDF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 3) を含む培地を入れ培養した。48 時間後に遊走細胞数を評価した。最も多くの MSCs を動員した因子について、受容体発現解析や阻害実験を実施した。

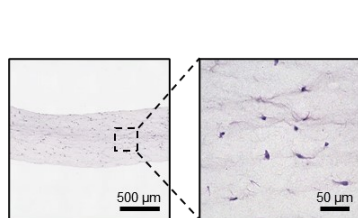
(3) 滑膜 MSCs 動員因子の効果検証

上記の最も多くの MSCs を動員した因子を、ラットの膝関節に注射した。反対側の膝には PBS を注射した。48 時間後に関節液を採取・培養し、コロニーを形成した細胞の数を比較した。また、関節液中のコロニー形成細胞を継代し、MSCs としての特性を比較した。

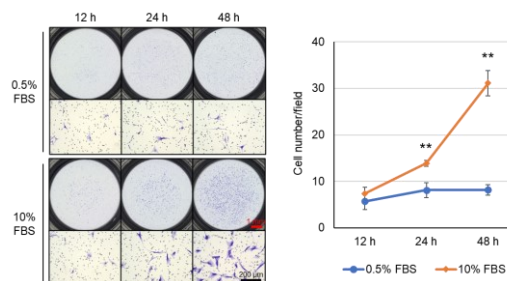
4. 研究成果

(1) 新規滑膜 MSCs 遊走モデルの開発

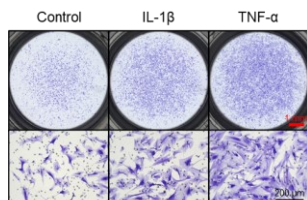
滑膜 MSCs を含むハイドロゲルを 8 $\mu$ m pore トランスウェルインサート上で固化すると、均質な細胞分布を有する組織となった (図 1)。FBS をポジティブコントロールとして遊走アッセイを実施すると、48 時間まで遊走が継続した (図 2)。また、炎症性サイトカインにより OA 環境を再現した条件では、遊走細胞数が有意に増加した (図 3)。以上より、本モデルは細胞外基質、濃度勾配、炎症応答性の観点から、生体に近い環境を再現できていると考えられた。



【図 1】ハイドロゲルの HE 染色像。滑膜 MSCs が均質に分布している様子が確認できる。



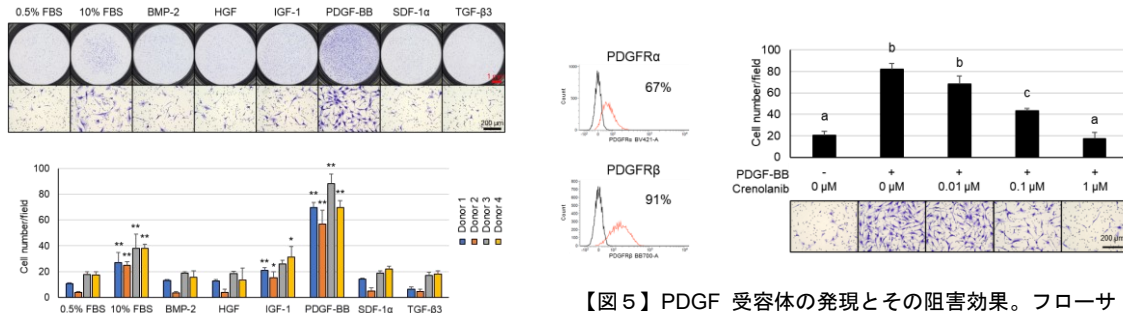
【図 2】FBS に対する遊走細胞数の経時変化。0.5%FBS と比較すると、10%FBS では経時的に遊走細胞が増加した。



【図 3】滑膜 MSCs の炎症応答性解析。OA の病態において主要な役割を果たす IL-1 $\beta$  あるいは TNF- $\alpha$  での前処理により遊走細胞数は有意に増加した。

## (2) 滑膜 MSCs 動員因子の探索

Control と比較して、10%FBS, IGF-1, PDGF-BB では有意に遊走細胞数が増加した (図4)。IGF-1 は 10%FBS と比較すると弱い動員効果を示したが、PDGF-BB は 10%FBS および他の因子と比較して強い滑膜 MSCs 動員効果を示した。ヒト滑膜 MSCs は PDGF の受容体である PDGFR $\alpha$ , $\beta$  を共に発現しており、PDGFR 阻害剤である Crenolanib の濃度依存的に PDGF-BB の動員効果は阻害された (図5)。以上より、滑膜基質中に存在する MSCs を基質外に動員させるのに十分な効果を有しているのは PDGF-BB であり、その効果にはヒト滑膜 MSCs 上に発現している PDGF 受容体が関与していると考えられた。

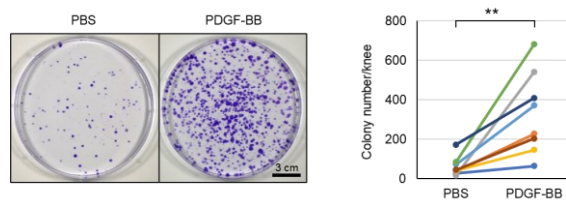


【図4】滑膜 MSCs 動員因子の探索。PDGF-BB は 10%FBS や他の因子と比較して、強力な滑膜 MSCs 動員効果を有していることが明らかとなった。

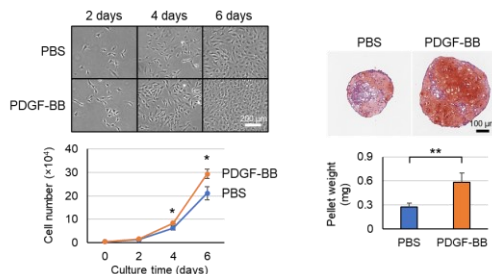
【図5】PDGF 受容体の発現とその阻害効果。フローサイトメトリー解析にて、PDGFR $\alpha$ , $\beta$  の発現が認められた。また、PDGFR 阻害剤の濃度依存的に、PDGF-BB により遊走される細胞数が減少した。

## (3) 滑膜 MSCs 動員因子の効果検証

ラットの膝関節に PDGF-BB あるいは PBS を注射し、48 時間後に関節液を回収した。PDGF-BB により関節液中の colony-forming cells は約 5 倍に増加した (図6)。一方で、滑膜炎スコアには差は認められなかった。PBS および PDGF-BB 注射膝の関節液から採取したコロニー形成細胞の性状を比較したところ、共に MSC マーカーである CD44, CD90, CD105 の発現が認められたが、PDGF-BB により関節液中に動員された細胞は高い増殖能、コロニー形成能、軟骨・脂肪分化能を有していた (図7)。以上より、PDGF-BB は滑膜炎を起こすことなく関節液中の MSCs の数・質を向上させることが可能であった。ヒト OA 滑膜においては PDGFR+ cells の多い血管周囲から分離した MSCs は高い増殖能・軟骨分化能を示すことから、PDGF-BB により動員された MSCs は血管周囲由来であると考えられた。これまで関節液中の MSCs 数を増やす方法は物理的・高侵襲な報告しかなかったが、本研究では薬理的・低侵襲な方法を初めて開発することに成功した。



【図6】関節液中のコロニー形成細胞のクリスタルバイオレット染色像とカウント結果。PDGF-BB の関節内注射により、関節液中のコロニー形成細胞の数が約 5 倍に増加した。



【図7】関節液中コロニー形成細胞の増殖能と軟骨分化能。PDGF-BB により関節液中に動員された細胞は、PBS を注射した膝由来の細胞と比較して有意に高い増殖能を示した。また、軟骨ペレットはサフラニン O に濃染され、有意に湿重量が増加した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Naoto, Endo Kentaro, Komori Keiichiro, Ozeki Nobutake, Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Kohno Yuji, Tsuji Kunikazu, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase in Knees with Degenerative Meniscus Injury after Arthroscopic Procedures through the Endogenous Effects of CGRP and HGF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-020-10047-0	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 Endo Kentaro, Horiuchi Kiyotaka, Katano Hisako, Ozeki Nobutake, Sakamaki Yuriko, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Intra articular Injection of PDGF-BB Explored in a Novel in Vitro Model Mobilizes Mesenchymal Stem Cells From the Synovium Into Synovial Fluid in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and 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) 10.1007/s12015-021-10156-4	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 Horiuchi Kiyotaka, Ozeki Nobutake, Endo Kentaro, Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Akiyama Masako, Tsuji Kunikazu, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Thawed cryopreserved synovial mesenchymal stem cells show comparable effects to cultured cells in the inhibition of osteoarthritis progression in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89239-8	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤健太郎, 堀内聖剛, 片野尚子, 大関信武, 関矢 一郎
2. 発表標題 PDGF-BBの関節内注射は間葉系幹細胞を滑膜から関節液中へ動員させる
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 直人, 遠藤健太郎, 小森啓一郎, 大関信武, 水野満, 河野佑二, 片野尚子, 辻邦和, 古賀英之, 大川淳, 関矢一郎
2. 発表標題 変性半月板断裂膝の関節液中間葉系幹細胞は内在性CGRPとHGFを介して手術後に増加する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内聖剛, 大関信武, 水野満, 遠藤健太郎, 片野尚子, 辻邦和, 古賀英之, 大川淳, 関矢一郎
2. 発表標題 変形性関節症膝における滑膜幹細胞の関節内注射：ラットモデルでの解凍直後細胞と再培養細胞の比較
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------