

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09498

研究課題名(和文) CD146/271陽性脂肪幹細胞の関節内直接投与による変形性関節症治療効果の検討

研究課題名(英文) Investigation of the efficacy of direct intra-articular administration of CD146/271-positive adipose stem cells in the treatment of osteoarthritis.

研究代表者

宮崎 剛 (Miyazaki, Tsuyoshi)

福井大学・福井大学・学術研究院医学系部門(附属 病院部)・客員准教授

研究者番号：80324169

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)：OA動物モデルにCD271陽性MSCsの関節内直接投与による変性軟骨再生効果についての評価を行った。10週齢のヌードラットの膝関節にMIAを投与しOA動物モデルを作成し、投与細胞はヒト脂肪細胞から単離したAD-MSCsを用いた。表面抗原CD271を発現している細胞を分離し、CD271+ MSCsとし、分離前の全て含んだ細胞をCD271-MSCsとした。軟骨変性肉眼的スコアはCD271+群で有意に低値であった。またDRGにおける疼痛関連物質の陽性細胞割合はCD271+群で有意に低下していた。一方で膝関節滑膜におけるTNF- α とIL6の測定値はCD271-群、CD271+群ともに同程度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々はMIAを用いた軟骨変性動物モデルに対して、CD271+ MSCsを関節内に投与することで、CD271-MSCsと比較してより高い軟骨保護効果を認めただけでなく、DRGでのCGRP、substance Pの発現低下という、高い除痛効果を示す結果であった。今後、早期変性軟骨に対してこれまでDisease modifying drugが存在していない中、間葉系幹細胞の直接投与による変性軟骨再生への道が開けるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of direct intra-articular administration of CD271-positive MSCs on degenerative cartilage regeneration in an animal model of OA. 10-week-old nude rats were treated with MIA in the knee joint to create an OA animal model, and AD-MSCs isolated from human adipocytes were used as administered cells. Cells expressing the surface antigen CD271 were isolated and designated as CD271+ MSCs, and cells containing all of them before isolation were designated as CD271-MSCs. The gross cartilage degeneration score was significantly lower in the CD271+ group. The percentage of cells positive for pain-related substances in the DRG was significantly lower in the CD271+ group. On the other hand, TNF- α and IL6 measurements in the knee synovium were similar in the CD271- and CD271+ groups.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変性軟骨 間葉系幹細胞 関節内直接投与 CD271

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は厚労省国民生活基礎調査(2007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、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(2010年厚労省人口推計)、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、より簡便な手法で細胞移植を中心にTissue Engineeringを応用した軟骨再生に対する研究を進めてきた。

細胞移植による軟骨修復ではどの細胞種を使うかが問題となる。一番初めに試みられたのが自家および同種軟骨組織より採取した硝子軟骨細胞を欠損した軟骨部に移植する実験である。1968年に家兎を用いた実験系で同種軟骨細胞移植により関節軟骨再生が得られることが報告され(Lemparg, Acta Soc Med Ups. 1967)、1997年には米国食品医薬品局の認可を受け、欧米では現在2万例以上に行われている。しかし細胞の移植を伴わない軟骨修復術(mosaicplasty 法や micro fracture 法)と比較して有意な差はなく、その有効性は示せていない(Rodríguez-Merchán EC, Am J Orthop. 2012)。しかし最近ではMSCsをscaffold freeで三次元人工組織(TEC)に形成・移植することで軟骨損傷部の良好な再生が得られるとの報告もなされており、組織修復能の低下した中・高齢者においてはMSCsを用いた変性軟骨再生は従来の骨髄刺激法と比較し、より有用な治療手段になりうる。

2. 研究の目的

関節軟骨は無血管組織であり、細胞成分が少ないため自己修復能に乏しく一旦損傷すると自然修復は期待できない。損傷を放置すると高率に変形性関節症に至ることが知られている。これまでに様々な軟骨治療法が試みられてきたが、1994年にBrittbergらが自家軟骨細胞移植(ACI)を臨床応用して以来、多くの報告がなされている。ACIには大きく分けて第1-第3世代の方法がある。第1世代ACIは培養軟骨細胞を移植して自家骨膜(periosteum)で欠損部をパッチしたものの、第2世代は骨膜採取や生分解性の問題を解決するためにコラーゲンで欠損部をパッチしたものの、第3世代はコラーゲン膜に播種した培養軟骨細胞を欠損部に移植し、フィブリン糊で軟骨下骨に直接固定したものである。しかしこれら世代間での間に有意な差は見られず(Bartlett W, J Bone Jt Surg Br 2005)、従来法の限界を示した結果であった。また自己のChondrocyteを培養移植する方法では組織採取のために正常軟骨を傷つけること、中高齢者では加齢による軟骨変性のため採取できる軟骨が制限されることが問題点として挙げられる。そのため最近では間葉系細胞移植が注目されており、現在膝OAに対して上記第3世代ACIの国内治療が行われている。これまで我々はOA動物モデルを用い、BMScを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が(Sato

M, et al. Arthritis Res Ther. 2012)、BMSc単独移植では軟骨組織への分化が不十分であり、分化を促すためにはTGF- β やBMP-6などの成長因子を添加する事が必要であり、さらに移植した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いる。そのため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ことが予測される。またCD271陽性細胞を単離し、OAの変性軟骨に移植を行い、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、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として予測される。またMSCs関節内直接投与による抗炎症効果について共同研究者の坂本が第一報を報告しており(Sakamoto T, et al. BMC Musculoskelet Disord. 2019)、今回さらに細胞活性の高いCD271陽性MSCsを用いた軟骨再生・抗炎症効果について検討を行うことを本実験の目的とした。

3. 研究の方法

今回はこれら一連の基礎研究を臨床応用に進めるステップとして、下記について明らかにすることを目的とした。

- ・ CD271 陽性細胞の特徴と、より効率的に軟骨細胞へ分化させる条件の検討(in vitro)
- ・ CD271陽性細胞と従来のPLA cell (AD-MSCs)を用いた場合の軟骨再生および抗炎症作用の比較検討
- ・ OA自然発症動物モデルを用いた、OA stage別の軟骨再生・抗炎症作用の比較検討
- ・ CD271陽性細胞を用いたOA自然発症モデル、軟骨欠損モデルでの軟骨再生および抗炎症作用の違い

(1) 脂肪幹細胞の採取とCD271陽性細胞のisolationとcell characterの解析

【AD-MSCs Isolation and In Vitro Proliferation】

SD ratの腹部及び背部の脂肪組織を採取した。

Collagenase処理後洗浄、cell strainer通過後の細胞を採取した。

10cm培養ディッシュに播種。3日毎に培地交換。細胞が75%コンフルエントになった時、継代した。

3週後に細胞数7.0 million に達したあとに分離凍結保存した。

【CD271+ AD-MSCs sorting】

上記で培養した細胞をMilteny AutoMACSを用いて、MSC Research Tool Box-CD271

isolation Kitを用いてCD271+ cellを分離した。

10cm培養ディッシュに播種。3日毎に培地交換。細胞が75%コンフルエントになった時、継代した。次に上記で得られた細胞の特性解析(未分化性、増殖、生存)を行った。

【表面抗原染色】 (SSEA-3, 4 & TRA-1-60, 81)

分散したAD-MSCsを 1×10^7 cells/mlの濃度でBD CytoFixTM fixation buffer で懸濁した。

1ml BD Perm/WashTM bufferに懸濁。再度遠沈後100 μ l BD Perm/WashTM bufferに懸濁した。

AD-MSCs 1×10^7 cellsあたり20 μ lの抗体液を添加して懸濁フローサイトメーターで解析、多分化性、増殖、生存についての評価も行った。

(2) OA動物モデルへの細胞移植と抗炎症効果の判定

10週齢のヌードラット(n=26)の両膝関節にMIAと逆行性トレーサーであるFluoro-Gold (FG)を

投与してOA動物モデルを作成した。モデルを未治療群と治療群に分け、治療群にはMIA投与後7日目にCD271⁺ MSCs(1×10⁷ cells)あるいはCD271⁻ MSCs(1×10⁷ cells)を両膝関節に投与した。治療介入後0、7、14、21、28日に還流固定を行い、摘出した膝関節軟骨をmacroscopic scoring system、histologic/histochemical grading systemによって評価した。疼痛評価として、DRGにおけるFG陽性細胞のうち CGRPあるいはsubstance P陽性細胞である二重標識細胞の数を測定して比較検討した。炎症評価として、膝関節滑膜のTNF- α とIL6をELISA法によって測定して比較検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪から採取した AD-MSCs の多分化能の確認

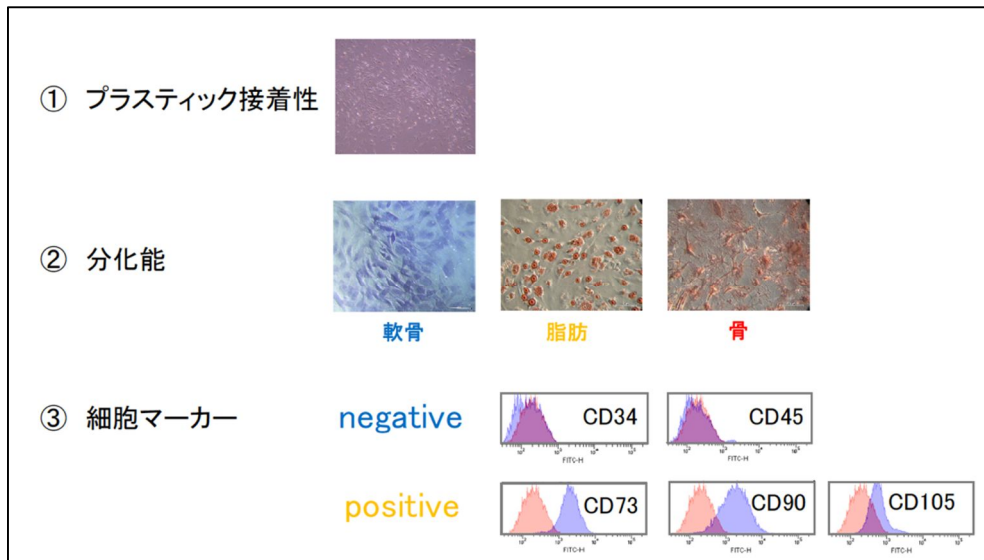


図1 分離細胞の cell character check

脂肪より単離した細胞のうち、Plate adherent である細胞を3継代培養し細胞を分離した結果、軟骨・脂肪・骨分化能があることを確認した。細胞マーカーのうち CD73, CD90, CD105 の陽性および CD34, CD45 陰性を確認することで実験に使用する細胞が幹細胞であることを確認した。次に表面抗原 CD271 を発現している細胞を磁気ビーズ法で分離し、CD271⁺ MSCs とし、CD271 分離前の全て含んだ AD-MSCs を CD271⁻ MSCs とした。(図1)

(2) AD-MSCs(CD271^{+/+})細胞を OA 動物モデル関節内注入後の関節軟骨の肉眼的評価

軟骨変性肉眼的スコアは MIA 投与後 28 日では CD271⁻群で 3.8 あったのに対して、CD271⁺群では 3.0 と CD271⁻群で有意に低値であった。(図2)

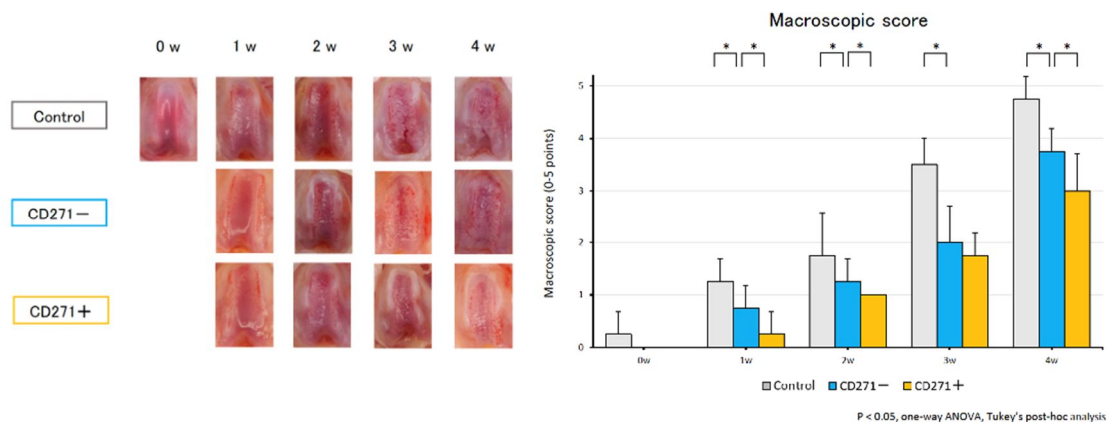


図2 control 群および治療群における肉眼所見と macroscopic score

また DRG における疼痛関連物質の陽性細胞割合は、CGRP、substance P とともに CD271⁺群で有意に低下していた。一方で膝関節滑膜における TNF- α と IL6 の測定値は CD271⁻群、CD271⁺群ともに同程度であった。

今回我々は、MIA を用いた軟骨変性動物モデルに対して CD271⁺MSCs を関節内に投与することで、CD271⁻MSCs と比較してより高い軟骨保護効果を認めただけでなく、DRG での CGRP、substance P の発現低下という高い除痛効果を示す結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田 泰善, 宮崎 剛, 坂本 拓己, 中嶋 秀明, 松峯 昭彦
2. 発表標題 CD271陽性間葉系幹細胞の関節内direct transplantationによる抗炎症・除痛効果の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田 泰善, 宮崎 剛, 坂本 拓己, 中嶋 秀明, 松峯 昭彦
2. 発表標題 CD271陽性間葉系幹細胞とPLA細胞の関節内direct transplantationによる抗炎症・除痛効果の検討
3. 学会等名 第36回日本整形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
研究分担者	内田 泰善 (Uchida Taizen) (60838704)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・医員 (13401)	削除：2020年10月12日

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