

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K17990  
研究課題名（和文）老化細胞の排除と滑膜幹細胞注射の組み合わせによる効率的な変形性膝関節症治療の開発  
  
研究課題名（英文）Development of efficient treatment of knee osteoarthritis by the combination of senolytic drug and synovial stem cell injection  
  
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・プロジェクト助教  
  
研究者番号：30844378  
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）：変形性膝関節症（OA）モデルにて、老化軟骨細胞数およびsenescence-associated secretory phenotype（SASP）因子の発現が経時的に増加することを明らかにした。老化細胞除去薬ABT-263により滑膜幹細胞注射の効果が増強されるか現在解析中である。同時に、OAでは半月板老化が起きていることを明らかにし、老化半月板細胞除去薬を発見した。また、OA患者由来滑膜幹細胞中に混入した老化細胞をABT-263により除去可能なこと、さらに増殖能や多分化能が向上することを明らかにした。

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。本研究の成果は、これまでの滑膜幹細胞注射によるOA治療効果を老化生物学的観点から向上させることで、より効率的なOA治療法の開発につながる。また、OA発症・進行において非常に重要な半月板を標的とした新しい創薬アプローチにより、OA創薬研究に新規展開をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study showed that the number of senescent chondrocytes and the expression of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factor increased over time in a rat osteoarthritis (OA) model. We are currently analyzing whether the therapeutic effect of synovial stem cells is enhanced by the combination with ABT-263. At the same time, we found that meniscus cells also underwent cellular senescence in OA, and discovered a drug that can selectively remove senescent meniscal cells. We also found that ABT-263 can remove senescent cells in synovial stem cells derived from OA patients and improve their biological functions.

研究分野：整形外科学

キーワード：細胞老化 間葉系幹細胞 変形性膝関節症 関節軟骨 半月板 滑膜 老化細胞除去薬 ABT-263

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。

(2) 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MSC)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、「定期的に滑膜MSCを関節内注射すれば、OAの進行が抑制されるが、1回だけの注射では十分な効果を示さない」という問題が明らかとなった。

(3) 多くのOA患者に滑膜MSCの関節内注射を実用的な治療として提供するためには、1回だけの注射でも十分な効果が得られるよう、注射前に関節内環境を改善する必要があると考えられた。

(4) 近年、OAの進行とともに蓄積した老化軟骨細胞が、関節軟骨の恒常性維持・再生に悪影響を与えており、それを老化細胞除去薬であるABT-263により排除することで関節内環境が改善し、OAの進行が抑制されることが報告されている。

### 2. 研究の目的

したがって本研究では、老化軟骨細胞の排除と滑膜MSCの単回関節内注射の組み合わせによるOA治療効果の増強を検討し、より効率的なOA治療の開発を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

(1) ラット膝OAモデルを作成し、経時的に膝関節を回収した。老化マーカーであるp16, p21の免疫染色により、老化軟骨細胞数を比較した。加えて、senescence-associated secretory phenotype factor (SASP因子)であるIL-6, MMP-13の免疫染色も実施し、老化軟骨細胞が増加する時期を検討した。

(2) 老化細胞の排除と滑膜MSCの単回注射を組み合わせた際に、滑膜MSCのOA治療効果が増強されるかどうかを検討する。コントロール群、ABT-263投与群、滑膜MSC注射群、ABT-263投与+滑膜MSC注射群の4群に分けて実験を行った。OAラットに対し、ABT-263処理を2週間実施した後に、100万個の滑膜MSCを単回注射する。MSC投与から4週間後に膝関節を回収し、老化細胞数、SASP因子発現、軟骨基質染色を実施した。

(3) OAモデルにおいて半月板にも老化細胞の存在が認められたため、老化半月板細胞の検証も実施することとした。過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)により細胞に酸化ストレスを生じさせることで人工的にラット老化半月板細胞を誘導し、様々な濃度の様々な薬剤への感受性を正常半月板細胞と比較した。効果の認められた薬剤について、ヒトOA患者由来半月板細胞への影響も検討した。

(4) OAでは滑膜にも老化細胞が蓄積し、滑膜MSC培養の際に老化細胞が混入することが問題となったため、OA患者由来滑膜MSCに対するABT-263の効果を調べることとした。ABT-263

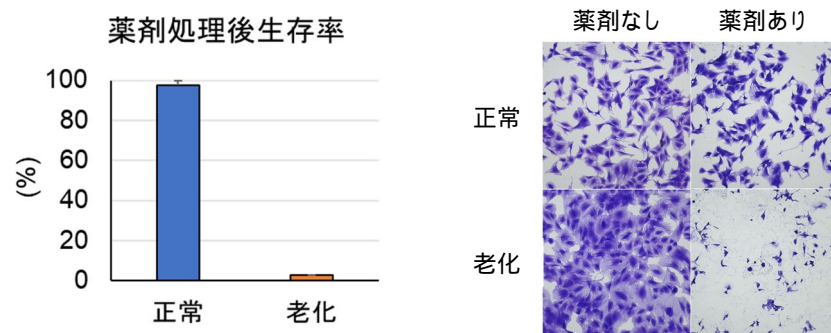
処理・未処理でコロニー形成能や表面抗原、脂肪・骨・軟骨分化能を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) OA 進行に伴って、関節軟骨において経時的に老化細胞数および senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子である IL-6 や MMP-13 の発現が増加することを明らかにした。

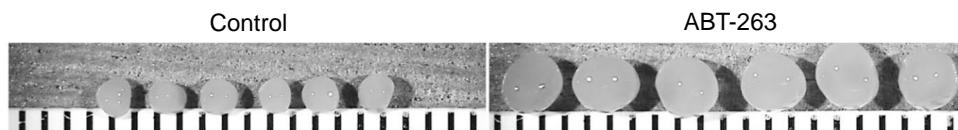
(2) 現在、膝関節軟骨組織の解析中である。今後 RNA-seq 等も組み合わせて詳細な評価を行うことを予定している。

(3) ラット老化半月板細胞に特異的に細胞死を誘導可能な薬剤を発見した(図1)。この薬剤はヒト OA 患者由来半月板細胞においても、効率的に老化細胞を除去可能であることを明らかにした。現在、本薬剤の in vivo での治療効果を検証中である。



【図1】老化半月板細胞除去薬

(4) ABT-263 処理により、SA- $\beta$ -gal 染色に陽性を示す老化細胞の割合は有意に低下した。またコロニー形成能、増殖能、多分化能が有意に向上し、OA 患者由来の滑膜 MSC の高品質化に成功した(図2)。



【図2】ABT-263 処理の有無による軟骨分化能の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Miura Yugo, Endo Kentaro, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Clearance of senescent cells with ABT-263 improves biological functions of synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research and Therapy	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/s13287-022-02901-4	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦雄悟、遠藤健太郎、小森啓一郎、大関信武、片野尚子、関矢一郎
2. 発表標題 老化細胞除去薬ABT-263による変形性膝関節症由来滑膜間葉系幹細胞の高品質化
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 三浦雄悟、関矢一郎、遠藤健太郎
2. 発表標題 老化細胞除去薬ABT-263による変形性膝関節症由来滑膜間葉系幹細胞の高品質化
3. 学会等名 第12回 Orthopedic Research Club
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

応用再生医学分野 研究テーマ  
<https://www.tmd.ac.jp/grad/rege/theme/>

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