

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18055

研究課題名(和文)軟骨再生での間葉系幹細胞の増殖機序の解明と増殖を制御する関節内完結型治療法の発案

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of mesenchymal stem cell proliferation in cartilage regeneration and development of an intra-articular complete therapy to control proliferation

研究代表者

日山 鐘浩(Hiyama, Kanehiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90815789

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)：ラット関節炎モデルの組織学的評価ではモノヨード酢酸ナトリウム投薬後1から4日目に強い細胞分裂、増殖を認めた。チミジン・アナログ蛍光染色剤の解析で1,2日目に表層の細胞が分裂し、その分裂した細胞のうち表層に近い細胞が3,4日目にも連続して分裂していた。一部の細胞は押し出される形で深層に至り、元から深層にいる細胞、深層に移動してきた細胞は分裂が弱かった。滑膜間葉系幹細胞は表層にある場合のみ強く分裂していた。つまり、間葉系幹細胞の細胞分裂が繰り返す際には細胞因子と環境因子が影響することが示唆された。最後にCldu細胞の発色染色では細胞破壊が強く、cDNAの十分なクオリティを達成できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、軟骨と半月板の変性疾患であり、日本人の約2400万人が罹患しているといわれている変形性関節症に対する治療は鎮痛薬等の対処療法しかない中、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)の増殖のメカニズムの一端を解明したことはウイルス感染、遺伝子変異のリスクの全くない新たな軟骨・半月板再生の細胞治療並びに滑膜内MSCsの増殖を制御する関節内完結型新規治療法の開発研究の礎となり、社会的意義があったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Histological evaluation of a rat arthritis model showed strong cell division and proliferation on days 1 to 4 after sodium monoiodoacetate medication. Analysis of thymidine analog fluorescent staining agents revealed that cells in the superficial layer divided on days 1 and 2, and cells near the superficial layer of the divided cells continued to divide on days 3 and 4. Some cells were pushed out and reached the deeper layers, while cells that were originally in the deeper layers and cells that had migrated to the deeper layers divided less. Synovial mesenchymal stem cells divided strongly only when they were in the superficial layers. In other words, the results suggest that cellular and environmental factors influence the repeated division of mesenchymal stem cells. Finally, chromogenic staining of Cldu cells did not achieve sufficient quality of cDNA due to strong cell disruption.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：整形外科分野

キーワード：膝関節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、軟骨・半月板の再生治療で臨床研究が行われているものは、全て培養室での細胞の培養、増殖を必要とする方式である。また多くの基礎研究はその効率化を目指すものである。本年の日本再生医療学会総会、日整会基礎学会、国際学会の OARSI、ORS にて調査したが、関節内完結型治療法をめざした研究発表はなかった。また、Dr. De Bari 教室の出身で共同研究者である、大関信武助教と新規性について常時確認している。

他分野への波及効果として、本研究の MSCs を臓器内で増強する関節内完結型治療法は、体外での細胞培養を要さず、組織本来の幹細胞の増殖能、治癒力を増強するため、真皮・皮下組織を含めた大きな皮膚欠損などの中胚葉由来の全ての組織の欠損にもタイムラグがなく使える可能性がある。また、関節内完結型新規治療法の開発は大規模かつ安全性の高い細胞培養施設を必要としないため、高い有病率を認める変形性膝関節症の手術治療の回避にて保険診療費を抑制し、高齢化社会を迎える日本の健康寿命を延伸することが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的：

滑膜内 MSCs の増殖メカニズムの 4 次元解析による解明

滑膜内 MSCs を増殖させる関節内完結型新規治療法による軟骨再生能の評価

我々は前十字靭帯損傷などの外傷が加わると関節液内に浮遊する MSCs が増加することを示した(Koga et al. Clin Orthop Relat Res. 2014)。同様に変性疾患である変形性関節症においても変性の進行に伴い関節液内の MSCs が増加し、さらに関節内浮遊 MSCs の特徴が滑膜由来の MSCs に近い性質を示すことを報告した(Koga et al. J Orthop Res. 2012)。これらの知見はヒトにおいても MSCs の総量が足りないものの関節内組織損傷時に半月板や軟骨の治癒機構として滑膜内の MSCs の増殖が起きていいるという着想につながった。

本研究は我々の MSCs を用いた半月板再生の成功と体外での細胞の培養によるリスクという現実的な課題を原点としている。その研究中に得られた、動物での滑膜内の MSCs の増殖に基づき半月板が再生するという結果と上記のヒトにおいても軟骨損傷時に関節液内に滑膜 MSCs が増加するという知見を基盤とし、さらに後述の滑膜組織内 MSCs の時空間的増殖パターンの同定の先行実験を合わせた点で学術的独自性が担保された研究課題である。

3. 研究の方法

ラット (Wistar rat, 雄, 8 週齢) の膝に低用量 (0.2mg) の炎症誘導因子・モノヨード酢酸ナトリウム (MIA) を関節内投与 (day0) として炎症を惹起し、組織学的評価を行なった。

ラット (Wistar rat, 雄, 8 週齢) の膝で分裂時に DNA に取り込まれる、チミジン・アナログ蛍光染色剤の Cldu を炎症誘発後 1, 2 日目に投与し、続いて Idu を炎症誘発後 3, 4 日目に投与し、細胞分裂を時系列的に評価した。Day5, 14 にラットを安楽死させ膝関節を採取し全関節パラフィン切片を作製した。day5 の膝関節液を回収し、その浮遊細胞をスライドグラス上で 12 時間のみ培養した。ヘマトキシリン・エオジン染色およびサフラニン O 染色で組織評価を行い、免疫染色にて膝関節内における標識細胞の局在、および day5 の関節液内の標識細胞の有無を評価した。

4. 研究成果

我々は本研究の滑膜組織内 MSCs の時空間的増殖パターンの検討において以下の事象を明らかにした。ラット (Wistar rat, 雄, 8 週齢) の膝に低用量 (0.2mg) の炎症誘導因子・モノヨード酢酸ナトリウム (MIA) を関節内投与 (day0) として炎症を惹起した。組織学的評価ではモノヨード酢酸ナトリウム投薬後 1 から 4 日目に強い分裂、増殖を認めた。分裂時に DNA に取り込まれる、チミジン・アナログ蛍光染色剤の Cldu を炎症誘発後 1, 2 日目に投与し、続いて Idu を炎症誘発後 3, 4 日目に投与し、細胞分裂を時系列的に評価した。Day5 までに増殖した細胞に標識をつけた。Day5, 14 にラットを安楽死させ膝関節を採取し全関節パラフィン切片を作製した。また day5 の膝関節液を回収し、その浮遊細胞をスライドグラス上で 12 時間のみ培養した。ヘマトキシリン・エオジン染色およびサフラニン O 染色で組織評価を行い、免疫染色にて膝関節内における標識細胞の局在、および day5 の関節液内の標識細胞の有無を評価した。1, 2 日目に表層の細胞が分裂し、その分裂した細胞のうち表層に近い細胞が 3, 4 日目にも連続して分裂していた。一部の細胞は押し出される形で深層に至り、元から深層にいる細胞、深層に移動してきた細胞は

分裂が弱かった。滑膜間葉系幹細胞は表層にある場合のみ強く分裂していることが分かった。つまり、間葉系幹細胞の細胞分裂が繰り返す際には細胞因子と環境因子が組み合さって選択されていることが示唆された。分裂にてチミジン・アナログ蛍光染色剤の Cl du を吸収した細胞のフローサイトメトリーを用いた、ソーティング解析を試みたが、チミジン・アナログ蛍光染色剤の発色の為の抗体により細胞破壊が強く、フローサイトメトリーによるソーティング後にリアルタイム PCR を行ったところ、cDNA の十分なクオリティを達成できない事が証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 石黒 啓輝, 石畑 知沙, 日山 鐘浩, 松山 嘉彦, 望月 智之	4. 巻 46
2. 論文標題 リバー型人工肩関節再置換術を施行した解剖学的人工関節置換術後・後方脱臼の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肩関節	6. 最初と最後の頁 228-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 日山 鐘浩, 望月 智之	4. 巻 46
2. 論文標題 Augmented baseplate を用いたRSA を施行した高齢者の前方脱臼による関節窩骨折例の短期成績	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肩関節	6. 最初と最後の頁 463-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Hoshino Takashi, Nakagawa Yusuke, Inomata Kei, Ohara Toshiyuki, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Hiyama Kanehiro, Saito Ryusuke, Mochizuki Tomoyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Effects of different surgical procedures for meniscus injury on two-year clinical and radiological outcomes after anterior cruciate ligament reconstructions. -TMDU MAKs study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 199 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.12.010	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 高桑 拓也, 山口 玲子, 日山 鐘浩, 望月 智之	4. 巻 97
2. 論文標題 多発性骨端異形成症に続発した肩関節症に対しシステムレス人工関節全置換術を施行した1例(会議録)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1042-1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.12.010	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 0件）

1. 発表者名 吉原 有俊、片桐 洋樹、中川 裕介、日山 鐘浩、宮武 和正、中村 智祐、辻 邦和、関矢 一郎、大川 淳、古賀 英之
2. 発表標題 ラット膝関節炎モデルにおいて増殖した滑膜細胞は軟骨表面に移動する - 関節内組織幹細胞の探求 -
3. 学会等名 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〕

-

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