

令和 5 年 6 月 21 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：2020～2022

課題番号：20K22996

研究課題名（和文）変性半月板断裂膝中の関節液に存在する間葉系幹細胞の遊走を促進する因子の探索

研究課題名（英文）Investigation for factors that promote the migration of mesenchymal stem cells present in the synovial fluid in the knees with degenerative meniscus injury

研究代表者

渡部 直人（Watanabe, Naoto）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40882030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：半月板変性断裂に対し半月板修復術と滑膜採取を行い、2週後に関節液を採取した。対象は7例（男性6名、女性1名）で年齢 48 ± 9 歳である。関節液の抗体アレイを行った。関節液を2週間培養後、コロニー形成数をカウントした。各蛋白濃度とコロニー数との相関関係を解析し、 $r=0.70$ 以上の相関を示し、かつ $p=0.05$ 未満となる蛋白として、calcitonin gene-related peptide (CGRP)とhepatocyte growth factor (HGF)が同定された。Migration assayで、CGRPとHGFは用量依存性、相加性に遊走細胞数を増加させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはこれまで、膝関節内組織損傷後や半月板手術後に関節液中のコロニー形成細胞数が増加すること、及びこれらの細胞は滑膜由来の間葉系幹細胞に類似することを報告した。これらは関節内の組織損傷や手術の刺激により関節液中の蛋白濃度が変化し、滑膜から間葉系幹細胞が動員される機序の存在を示唆する。膝の手術後、内在性のCGRPとHGFのシグナルは独立に作用し、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞を動員することが本研究から示唆される。これを立証するためにはin vivoモデルを用いて各蛋白が滑膜から関節液中に間葉系幹細胞を動員するか更に検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Subjects were 7 patients with degenerative meniscus injury who underwent meniscal repair and synovial MSC transplantation. Synovial fluid (Pre) was aspirated from knees before harvest of synovium and meniscus repair. After 2 weeks, synovial fluid (Post) was aspirated again before transplantation of synovial MSCs. The synovial fluid was plated and cultured for 2 weeks to count the colony formation. The other half was used for antibody array analysis, and the correlation coefficients between the signal intensity and colony number were measured in 503 factors.

Greater numbers of colonies from synovial fluid (Post) were demonstrated. Of the 503 factors, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and hepatocyte growth factor (HGF) had high correlation coefficients between colony number and expression level. Both CGRP and HGF promoted migration of synovial fluid MSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

半月板は膝関節内にある三日月状の線維軟骨であり、クッションの機能を有する。加齢等に伴う変性半月板断裂は外傷性のものとは異なり、縫合手術単独では十分な治療効果を認めないことが報告され、半月板部分切除が行われてきたが、部分切除も関節への接触圧を増やすため、最終的に変形性膝関節症を引き起こす (Herrlin SV et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2013)。

申請者の所属研究室では、これまで膝関節滑膜由来の未分化な間葉系幹細胞(滑膜幹細胞)を動物モデルの軟骨・半月板欠損部に移植するとそれらが再生することを報告し(Koga H et al. *Cell Tissue Res*, 2008; Horie M et al. *Stem Cells*, 2009)、2008年以降、難治性の軟骨欠損や半月板損傷に対し、自己血清で2週間培養した滑膜幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床研究と治験を行ってきた。多くの症例で自覚症状および画像所見上改善を認め、本法が根治的かつ極めて有効な治療法となる可能性が示されている (Sekiya I et al. *Clin Orthop Relat Res*, 2015; Sekiya I, Watanabe N et al. *Cell Transplantation*, 2019)。

これと並行して、当教室ではこれまで、膝関節内組織損傷後や半月板手術後に関節液中の細胞数が増加すること、及びこれらの細胞は滑膜由来の間葉系幹細胞の特性を有することを報告してきた(Matsukura Y et al. *Clin Orthop Relat Res*, 2014)。また、申請者は、変性半月板断裂膝の関節液の中間葉系幹細胞は術後に増加するが、外傷性半月板損傷患者の関節液中間葉系幹細胞と比較すると細胞数の増加が少ないが、一方で細胞数には個体間で差があることを報告した。これらの結果は、関節内の組織損傷や手術の刺激により、何らかの因子の増減を起こし、それを介して、滑膜から間葉系幹細胞が動員される機序の存在を示唆するが、この機序は明らかになっていない。本研究の核心を成す学問的問いはこの機序に関与する因子を同定することであり、それにより、関節液中の幹細胞の動員を促す新たな治療薬の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変性半月板断裂に対する修復術の前後で採取した関節液に含まれる細胞数と蛋白濃度を比較することによって、関節液に存在する間葉系幹細胞の遊走を促進する因子を同定し、間葉系幹細胞が増加する機序を解明することである。

これまでも関節液中の因子を網羅的に探索した先行研究(Brophy RH et al. *Am J Sports Med*, 2017)はあるが、変性半月板断裂患者の関節液と、外傷性半月板損傷患者あるいは健常者の関節液とを比較し、変性半月板断裂患者で上昇している因子を報告するにとどまる。それに対し本研究は、医師主導治験の参加者という厳密な適格基準を満たす病態の同一個体から採取した半月板手術前後の関節液を比較し、量的に変化する因子を見つけ出す独自戦略であり、探索結果に影響を与える個体差、性差、年齢などによる生理的变化を除外できる点で優れている。また、培養後のコロニー数から元の関節液中の滑膜幹細胞の数を測定する手法を用いて、細胞数と因子濃度の相関の強弱を確認することにより、根拠に基づいた候補因子の絞り込みが可能である点にオリジナリティがある。さらに、今回、開発する *in vitro* 遊走能アッセイを用いて候補因子の検証ができれば、半月板再生機序の解明、ひいては早期変形性膝関節症の治療薬開発が可能となる。

3. 研究の方法

術前後の関節液中に含まれる細胞を培養し、コロニー形成能を測定する。また、術後関節液中の蛋白の抗体アレイを行い、培養後細胞数(コロニー数)と相関の高い蛋白を解析する。上記2つの実験結果を総合し、コロニー数と相関の高い因子を同定する(図2)。

次に、同定した因子を用いて migration assay を行い(図3)、患者の関節液中間葉系幹細胞の遊走能が、同定した因子によって上昇するかを検証する。具体的には、因子の濃度依存性に関節液中の間葉系幹細胞がチャンバーのメンブレン孔を抜けて能動的に遊走するかを確認する。アッセイの条件検討・最適化は令和2年度から実施する。

4. 研究成果

半月板変性断裂に対し半月板修復術と滑膜採取を行い、2週後に関節液を採取した。対象は7例(男性6名、女性1名)で年齢 48 ± 9 歳である。採取した関節液の半分を用いて抗体アレイを行い、507種類の蛋白の濃度を測定した。また関節液の半분을ディッシュ上に播種し、2週間培養後、コロニー形成数をカウントした。各蛋白濃度とコロニー数との相関関係を解析し、 $r=0.70$ 以上の相関を示し、かつ $p=0.05$ 未満とな

る蛋白を同定した。その蛋白について migration assay を行い、径 8 μm の孔を通過してチャンバー間を遊走した細胞数をカウントした。条件を満たす蛋白は 3 種あり、入手可能なものは calcitonin gene-related peptide (CGRP) と hepatocyte growth factor (HGF) であった。Migration assay で、CGRP と HGF は用量依存性に遊走細胞数を増加させ、negative control と比較し 10-8M の CGRP と 10 ng/ml の HGF では遊走細胞数が有意に多かった ($p < 0.05$)。さらに CGRP と HGF は相加的に遊走細胞数を増加させた。膝の手術後、内在性の CGRP と HGF のシグナルは独立に作用し、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞を動員することが本研究から示唆される。

Watanabe Naoto, Endo Kentaro, Komori Keiichiro, Ozeki Nobutake, Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Kohno Yuji, Tsuji Kunikazu, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro
Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase in Knees with Degenerative Meniscus Injury after Arthroscopic Procedures through the Endogenous Effects of CGRP and HGF
Stem Cell Reviews and Reports, 2020 に掲載。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Naoki, Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Watanabe Naoto, Koga Hideyuki, Yoshii Toshitaka, Yagishita Kazuyoshi, Okawa Atsushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Wear rate and osteolysis in two types of second-generation annealed highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty: A retrospective comparative study with a minimum of five years	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 103147 ~ 103147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2021.103147	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 Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Watanabe Naoto, Koga Hideyuki, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 32
2. 論文標題 Difference in tapered wedge stem alignment between supine and lateral position in cementless total hip arthroplasty via modified Watson-Jones anterolateral approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology	6. 最初と最後の頁 497 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00590-021-03001-4	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 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 該当する
1. 著者名 Ozeki Nobutake, Kohno Yuji, Kushida Yoshihisa, Watanabe Naoto, Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Masumoto Jun, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Synovial mesenchymal stem cells promote the meniscus repair in a novel pig meniscus injury model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 177 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24846	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Naoto, Miyatake Kazumasa, Takada Ryohei, Ogawa Takahisa, Amano Yusuke, Jinno Tetsuya, Koga Hideyuki, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 The prevalence and treatment of osteoporosis in patients undergoing total hip arthroplasty and the levels of biochemical markers of bone turnover	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone & Joint Research	6. 最初と最後の頁 873 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1302/2046-3758.1112.BJR-2022-0252.R1	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Naoto, Takada Ryohei, Ogawa Takahisa, Miyatake Kazumasa, Hirao Masanobu, Hoshino Chisato, Jinno Tetsuya, Koga Hideyuki, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 108
2. 論文標題 Short stature and short distance between the anterior acetabular rim to the femoral nerve are risk factors for femoral nerve palsy following primary total hip arthroplasty using the modified Watson-Jones approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 103351 ~ 103351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2022.103351	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 該当する

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡部直人
2. 発表標題 人工股関節全置換術の術中骨折を予見する因子の探索
3. 学会等名 日本人工関節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部直人
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 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 渡部直人
2. 発表標題 磁気共鳴画像にて両側短内転筋のびまん性信号変化を伴った化膿性恥骨結合炎の1例
3. 学会等名 日本股関節学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Naoto Watanabe
2. 発表標題 The amount of collagen is not related to mechanical properties in high hydrostatic pressure-decellularized menisci and freeze-thawed menisci
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020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

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