

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19552

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の抗炎症性サブセットの同定と臨床応用を目指した誘導法の開発

研究課題名（英文）Identification of anti-inflammatory subsets of MSCs and their clinical application

研究代表者

齋藤 琢（SAITO, Taku）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30456107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞はリンパ球の増殖、活性を抑え、過剰な炎症を制御する作用を有することから、変形性関節症を始め、幅広い疾患の治療に用いられている。一方、関節内の滑膜には多種多様な線維芽細胞が存在し、中には関節の炎症を抑制する作用を有するサブセットがいることも想定されてきた。本研究では、手術の際に得られるヒト変形性関節症患者の滑膜検体を解析し、滑膜線維芽細胞のサブセットの中に、免疫細胞の過剰な活動を抑制する作用を有するサブセットを同定した。このサブセットは内皮細胞と共通のマーカーを発現しており、T細胞の増殖を抑制することが分かった。現在はこのサブセットを人為的に誘導する条件を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節の恒常性維持や変形性関節症の病態を握る鍵は滑膜であることが分かっており、また我々のこれまでの研究によって、間葉系幹細胞を用いた変形性関節症治療の作用点は滑膜であることも明らかとなっている。滑膜がどのように関節を維持しているかを知る手がかりが明らかとなったことで、間葉系幹細胞を用いた治療を改善させる余地が生まれたほか、新たな変形性関節症の治療法開発に繋がる可能性も期待される。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells have been used in the treatment of a wide range of diseases, including osteoarthritis, due to their ability to suppress the proliferation and activity of lymphocytes and to control excessive inflammation. Meanwhile, it has been hypothesized that within the synovium of joints, various subsets of fibroblast-like cells exist, some of which have the ability to suppress joint inflammation. In this study, analysis of synovial samples obtained during surgery from osteoarthritis patients revealed the identification of a subset of synovial fibroblasts that possess the ability to suppress excessive activity of immune cells. This subset expresses common markers with endothelial cells and was found to inhibit the proliferation of T cells. Currently, efforts are underway to investigate the conditions for inducing this subset artificially.

研究分野：整形外科

キーワード：整形外科 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は軟骨の摩耗などを主体として緩徐に進行していく関節の退行性疾患であり、高齢女性の大半が罹患する common disease である。痛みによって中高年の生活の質を悪化させるが、病態を制御しうる本質的な治療法はない。我々は関節がどのような仕組みで維持されるかを研究する過程で、過度な力学的負荷が NF- $\kappa$ B の過活性を介して軟骨を変性させるメカニズムを解明してきた (Nat Commun10:1442, 2019, Nat Commun. 7:13336, 2016, Nat Med. 16:678-86, 2010)。その後の研究で、正常な関節ではこのような軟骨細胞の炎症を抑制する機構が作動しており、その関節内の炎症調節機構には滑膜に存在する細胞が深く関わっていること、その破綻が変形性関節症に繋がることを突き止め、現在も解析を続けている。類似のことを示唆する研究も徐々に増えてきており、線維芽細胞やマクロファージなどのうち、関節内環境を悪化させる方向に関与するサブセットについては報告が相次ぐ一方で、恒常性維持に貢献するサブセットについては不明のままである。本研究では、この滑膜在住の細胞で、炎症を抑制的に制御する細胞を synovium-resident anti-inflammatory cell と仮称する。

間葉系幹細胞は脂肪や骨髄など成体の体組織から採取可能な組織幹細胞であり、古くから骨や軟骨を作り出す細胞源として研究されてきたが、リンパ球の増殖、活性を抑え、過剰な炎症を制御する作用を有すること、特段の危険性もないことから、移植片対宿主病や脊髄損傷など幅広い疾患に対して用いられている。変形性関節症に対する関節内投与についても広がりを見せており、申請者らも臨床・非臨床の両面で研究を行ってきた。関節内に投与された間葉系幹細胞は、軟骨や半月板を再生する「組織修復作用」と関節内の炎症を抑制する「抗炎症作用」の両方で変形性関節症患者の症状改善に寄与するとされる。しかし我々の臨床研究によって、構造上の改善がないのに症状が改善する患者が多数いることが分かった (Regen Ther. 14:332-340, 2020)。またラット変形性関節症モデルを用いて行った実験では、間葉系幹細胞の作用点は滑膜であり、滑膜に生着し、線維芽細胞様に変化する中で滑膜の構造を改変させ、徐々に症状を改善させる治療であることが明らかになりつつある (投稿準備中)。成人の体組織から培養増幅できる間葉系幹細胞の起源として、組織内の線維芽細胞の中の未分化性が高い一群が想定されており、投与された間葉系幹細胞が組織内に存在する線維芽細胞に交じって組織の恒常性維持に関与するのは考えにくいことではない。しかしながら、間葉系幹細胞の中でどのような性質のものが治療効果が高いかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト手術検体やマウス変形性関節症モデル検体をシングルセル解析によって解析し、synovium-resident anti-inflammatory cell の正体に迫るとともに、間葉系幹細胞の中で抗炎症作用の強いサブセットの絞り込みを進める。前者を特徴づけるシグナルを利用することで、synovium-resident anti-inflammatory cell の特性を有する細胞製剤の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

以下のサブテーマに分けて研究を遂行した。

- (1) マウス滑膜の synovium-resident anti-inflammatory cell の同定
- (2) ヒト滑膜の synovium-resident anti-inflammatory cell の同定
- (3) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の anti-inflammatory subset の同定

- (1) マウス滑膜の synovium-resident anti-inflammatory cell の同定

正常マウスおよび変形性関節症モデルマウス、高齢マウスの膝関節から滑膜を採取し、酵素処理して細胞を単離し、フローサイトメトリーにて PDPN, FAP, THY1 や CD68, F4/80, CX3CR1 などの発現を調べ、線維芽細胞や組織マクロファージの比率を把握した上で bulk RNA シーケンス、シングルセル RNA シーケンスを行い、発現プロファイルを基にサブセットに分けて解析を行った。

- (2) ヒト滑膜の synovium-resident anti-inflammatory cell の同定

(1)と同様の解析をヒトでも実施した。関節鏡視下で行う前十字靭帯再建術や半月板縫合術のほか、人工膝関節置換術で得られる滑膜切除サンプルを用いて解析を行った。サンプル解析に必要な倫理申請は事前に通してあり、同意の得られた患者について解析を行った。まず組織学的な解析と bulk RNA シーケンスは 50 症例で実施し、大まかな傾向を調べた後、典型的な 5 例についてシングルセル RNA シーケンスを実施した。

- (3) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の anti-inflammatory subset の同定

自家脂肪由来 MSC を用いた治療を行っている共同研究先のクリニックから余剰細胞を提供

してもらい、シングルセル RNA シーケンスを実施した。多施設研究として倫理委員会の承認は得ており、細胞の提供は患者の同意を得た上で行った。

#### 4. 研究成果

マウスの各種モデルの解析では、最も未分化性の高い線維芽細胞はサブライニング領域にわずかに存在しているほか、ライニング層にも抗炎症、軟骨保護作用を有するサイトカインを発現する線維芽細胞が豊富に存在していた。これらのサブセットは加齢による変化は比較的マイルドなものにとどまったが、新たに高齢特有のサブセットが出現した。また変形性関節症モデルを作成しても特有のサブセットが出現したが、これらの起源をトラジェクトリー解析や RNA ヴェロシティ解析によって調べると、上記2つの未分化性の高いサブセットのいずれかに由来することが分かった。現時点では、高齢や変形性関節症モデルに特有のサブセットがどのように関節の変化に関わるか、またどれくらいのエフェクトサイズを発揮するかまでは特定できていないが、上記2つのサブセットが関節の状態に応じた応答を担っていることは間違いなく、既知の関節保護因子の発現レベルとも照合すると、ライニング層のサブセットが関節の恒常性維持に対してより直接的に作用していることが推定された。

ヒト滑膜の解析については、まず人工膝関節置換術を施行した50症例の解析から、これらが組織学的にも発現解析的にも大きく2つの群に分けられ、片方は炎症の特性が強く、もう片方は線維化の特性が目立った。全例 RNA シーケンスを実施したところ、遺伝子発現の傾向からも同様に炎症群と線維化群に大別され、前者は炎症や免疫細胞に関連した遺伝子が、後者は線維形成や細胞外基質産生、myofiber などに関連した遺伝子が著明に増加していた。これらは全員人工膝関節置換術を受けた患者であるが、術前の痛みのスコアをみると線維化群の方が有意に痛みが少なかったことが分かった。炎症群、線維化群それぞれ2名ずつの滑膜サンプルを用いてシングルセル解析を行ったところ、滑膜線維芽細胞は主に3つのサブセットに大別されたが、そのうちの1つ、血管内皮細胞と共通のマーカーを発現するサブセットの比率が線維化群に多いことが分かった。この線維芽細胞サブセットをFB-S1とするが、FB-S1は線維基質タンパクの遺伝子を豊富に発現しているほか、WNTシグナル抑制分子の遺伝子も高発現していた。このほかの線維芽細胞サブセット、FB-S2、FB-S3はいずれもサイトカインやケモカインの遺伝子を豊富に発現しており、マクロファージや樹状細胞との相互作用も強く推定されたが、FB-S1はそのような連関は推定されず、免疫細胞を介して炎症を惹起する能力は低いと考えられた。一方でFB-S1は制御性T細胞を有意に誘導することが分かり、免疫制御と線維化の両面から変形性関節症の関節を程良く落ち着かせることに貢献することが想定された。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞についてもシングルセル解析を行った。細胞培養皿上の対数増殖期にあるヒト脂肪由来間葉系幹細胞、および蛍光ラベルしたのちラット関節内に投与し、3日後に回収したヒト脂肪由来間葉系幹細胞を解析に供した。サブセットを複数検出したが、細胞培養皿上のヒト脂肪由来間葉系幹細胞については滑膜線維芽細胞の中で関節環境の改善に貢献しうるサブセットのマーカーを発現するサブセットは見いだせなかった一方、ラット関節から回収したヒト脂肪由来間葉系幹細胞についてはそのようなサブセットマーカーを発現する群が検出された。現在、細胞内シグナルの解析を進めており、関節の恒常性維持と、治療効果の高い細胞調整法の開発を継続している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagata Kosei, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Runx2 and Runx3 differentially regulate articular chondrocytes during surgically induced osteoarthritis development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33744-5	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 -
1. 著者名 Hojo Hironori, Saito Taku, et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111315 ~ 111315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111315	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 -
1. 著者名 Tachibana Naohiro, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 RSPO2 defines a distinct undifferentiated progenitor in the tendon/ligament and suppresses ectopic ossification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 2138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abn2138	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 -
1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Saito Taku, Schett Georg, Zaiss Mario M., Tanaka Sakae	4. 巻 23
2. 論文標題 Inflammatory Arthritis and Bone Metabolism Regulated by Type 2 Innate and Adaptive Immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031104	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 Mori Yoshifumi, Oichi Takeshi, Enomoto-Iwamoto Motomi, Saito Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Automatic Detection of Medial and Lateral Compartments from Histological Sections of Mouse Knee Joints Using the Single-Shot Multibox Detector Algorithm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CARTILAGE	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) 10.1177/19476035221074009	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 Kaneko Taizo, Horiuchi Keisuke, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Nagata Kosei, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Inui Hiroshi, Moro Toru, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 40
2. 論文標題 Regulation of osteoarthritis development by ADAM17/Tace in articular cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01278-3	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 Chijimatsu Ryota, Miwa Satoshi, Okamura Gensuke, Miyahara Junya, Tachibana Naohiro, Ishikura Hisatoshi, Higuchi Junya, Maenohara Yuji, Tsuji Shinsaku, Sameshima Shin, Takagi Kentaro, Nakazato Keiu, Kawaguchi Kohei, Yamagami Ryota, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 12
2. 論文標題 Divergence in chondrogenic potential between in vitro and in vivo of adipose- and synovial-stem cells from mouse and human	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & 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/s13287-021-02485-5	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 Nakamoto Hideki, Katanosaka Yuki, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Omata Yasunori, Maenohara Yuji, Murahashi Yasutaka, Kawaguchi Kohei, Yamagami Ryota, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Taniguchi Yuki, Kanagawa Motoi, Naruse Keiji, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 73
2. 論文標題 Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid Channel 2 in the Induction of Lubricin and Suppression of Ectopic Endochondral Ossification in Mouse Articular Cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1441 ~ 1450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41684	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子機序
3. 学会等名 第49回日本関節病学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態からみたPRP/APSと幹細胞治療
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 関節軟骨の維持機構
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞を用いた変形性関節症治療
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症における骨・軟骨連関
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科  <a href="http://www.u-tokyo-ortho.jp/">http://www.u-tokyo-ortho.jp/</a></p>
---

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	小俣 康德  (Omata Yasunori)  (40570734)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授    (12601)	

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