

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462288

研究課題名(和文) CD271陽性骨髄幹細胞を用いた変形性関節症に対する軟骨再生治療の試み

研究課題名(英文) Therapeutic effect of CD271 + BMSc and hyaluronic acid injection for the animal model of spontaneous osteoarthritis

研究代表者

宮崎 剛 (Miyazaki, Tsuyoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：80324169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HAの軟骨修復効果について、HA+BMSCs群では他の3群と比較して、mankin scoreは有意に改善していた。蛍光標識された細胞は、PBS+hBMSCsではほとんど取り込まれなかったが、HA+BMSCs群ではOA軟骨表層を中心に取り込まれていた。WB法を用いた半定量解析でも、HA+BMSCs群では基質中の2型コラーゲン量が増加していた。

HAは病的な関節軟骨に速やかに浸透し長期間残存するため、変性軟骨の修復と除痛に働いていると考えられた。またBMScを変性軟骨部に効果的に定着させており、流動性に富むscaffoldとしての役割を認めた。

研究成果の概要(英文)：At 5 weeks post transplantation, partial cartilage repair was noted in the HA-MSC group but not in the other groups. Examination of CFDA-SE-labeled cells demonstrated migration, differentiation, and proliferation of MSC in the HA-MSC group. There was strong immunostaining for type II collagen around both residual chondrocytes and transplanted MSCs in the OA cartilage.

This scaffold-free and technically undemanding technique appears to result in the regeneration of articular cartilage in the spontaneous OA animal model. Although further examination of the long-term effects of transplantation is necessary, the findings suggest that intra-articular injection of HA-MSC mixture is potentially beneficial for OA.

研究分野：整形外科学領域

キーワード：変形性膝関節症 軟骨再生

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(平成 19 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、平成 54 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(平成 22 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、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(mosaic plasty 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。

細胞の増殖と分化は通常、相反するものであるため、増殖させると脱分化してしまうことが多い。関節軟骨再生を目的とした場合、移植用細胞が十分量採取できず、細胞を増殖させる必要があるが、採取した自己軟骨細胞を増殖させた場合、容易に脱分化するため、増殖にも限界がある。

その問題を解決する手段として、増殖させたのちでも分化を誘導することのできる前駆細胞が注目されている。現在国内では体性幹細胞、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いた軟骨再生の研究が行われている。今回我々は体性幹細胞を使用し、その中でも特に表面抗原 CD271 陽性細胞に着目して研究を行っている。CD271 陽性細胞は骨髄もしくは吸引脂肪由来の MSCs のマーカーとしてよく知られており、分離後の CD271 陽性細胞は、プラスチック接着法で分離した MSCs と比較して 50% 高い増殖能が示されており、また 200 倍多い colony-forming unit fibroblast (CFU-F) 活性がみられる(陰性細胞にはみられない)ことが示されている。また、分離後の CD271 陽性の BMSc において、growth factor の分泌量が有意に高いことも示されており、今後の軟骨再生医療をより促進させる細胞源のひとつとして着目し研究を行っている。

2. 研究の目的

変形性関節症は高齢者人口の増加により初期病変も含めると膨大な患者数が存在するものと思われる。現在変性疾患に対しては外科的治療に重点が置かれる傾向にあるが、一方国内では骨髄間葉系幹細胞(BMSc)、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞を用いた軟骨再生の研究が進められている。骨髄間葉系幹細胞(BMSc)は採取が容易であり、臨床応用されやすい細胞源として臨床応用が進

められている。今回我々は BMSc の中でも特に増殖能や growth factor の分泌量、細胞活性が高いと最近注目されている CD271(LNGFR)陽性細胞を用いて、これまで適応ではない変性疾患で損傷した軟骨病変に対して、さらに簡便で効率のよい手法での軟骨再生の基礎的研究を計画した。

3. 研究の方法

HA と BMSCs の関節内注入の有効性に関して

1. ヒト OA 軟骨細胞を用いた in vitro での HA、BMSCs との共培養による細胞代謝活性の解析

人工膝関節置換術時に切除した OA 軟骨から軟骨細胞を採取。in vitro での HA、CD271+BMSCs との共培養による細胞代謝活性の解析を行った。

2. 膝 OA 自然発症動物モデル(ハートレー系モルモット)を用いた組織学的検討

3, 7, 9, 12 か月齢のハートレー系モルモットの膝関節内に CFDA-SE cell tracer kit にて緑色の蛍光を発するよう に labelling した CD271+BMSCs をヒアルロン酸および他の担体と混入、関節内注入。注入後 1, 3, 5, 9 週目に膝関節軟骨を採取。組織学的検討を行った。

【骨髄幹細胞の採取と CD271⁺細胞の isolation と移植に伴う適切な scaffold 設定】

今回の研究では BMSc を関節外より注射器で関節内へ導入することを目的としており、scaffold は流動性のあるものが必要になってくる。流動性があるだけでなく、適度に粘性がある scaffold として、ヒアルロン酸を考慮しており、また platelet rich plasma を scaffold として同時投与することも試みた。これら scaffold と骨髄より採取した BMSc が関節軟骨細胞との共培養条件下に培養が継続し、また細胞の増殖が行えるのか、また細胞の形態として軟骨細胞へ分化誘導しうる

のか確認した。BMSc はハートレー系モルモット 10 日齢の長管骨より骨髄細胞を採取し、3 週間培養により増殖させた後、scaffold、関節軟骨細胞と共培養を 2 週間行った。

【BMSc Isolation and In Vitro Proliferation】

腸骨翼および長管骨から 10ml の骨髄液を 0.5ml heparin+ のシリンジに採取
PBS を用いて、洗浄、遠心
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
3 週後に細胞数 7.0 million に達したあとに分離凍結保存

【CD271⁺ BMSc Isolation and In Vitro Proliferation】

腸骨翼および長管骨から 10ml の骨髄液を 0.5ml heparin+ のシリンジに採取
PBS を用いて、洗浄、遠心
Miltenyi AutoMACS を用いて、MSC Research Tool Box-CD271 isolation Kit を用いて CD271+cell を分離
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
3 週後に細胞数 7.0 million に達したあとに分離凍結保存

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。

【細胞の用意】

ディッシュからハートレー系モルモット BMSc のコロニーを剥がす
細胞懸濁液を遠心洗浄後、37℃、2%CO₂ 条件下でゼラチンコートしたディッシュで 2 時間培養 (MEF をできる限り除く)
浮遊しているハートレー系モルモット

BMSC 細胞塊を回収後、遠沈をかける
Trypsin を用いて細胞を単細胞に分離後洗
浄、遠沈を 2 回繰り返す
最後に細胞数をカウントし、染色へ

【表面抗原染色】(SSEA-3,4 & TRA-1-60,81)
分散したハートレー系モルモット BMSc を
 1×10^7 cells/ml の濃度で BD CytoFix™
fixation buffer で懸濁
室温に 20 分間放置の後 2,400rpm で 5 分間
遠心後、上清を吸引除去
1ml BD Perm/Wash™ buffer に懸濁。再度遠
沈後 100 μ l BD Perm/Wash™ buffer に懸濁。
BMSc 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、未分化性、
増殖、生存について評価

次にこれら細胞を軟骨細胞へ分化させる
ため、関節軟骨細胞と共培養を行い、顕微
鏡および電顕下に細胞の形態についての評価を
行い、細胞外基質である GAG の産生が行われ
ているかどうかを ^{35}S および DMB assay を用
いて解析した。また乳酸産生量についても測
定し、正常の関節軟骨細胞と比較して細胞代
謝活性がどのように変化しているか評価測
定を行った。

4 . 研究成果

ヒアルロン酸(HA)は関節潤滑性の改善、抗
炎症・鎮痛作用、関節痛の抑制といった症状
を軽減させる作用とともに一部報告では軟
骨変性の抑制や、軟骨の修復を促進させると
いった disease-modifying 効果もあるとさ
れている。これまでの報告でも効果があると
する論文と OA 自然経過には影響を及ぼさな
い、もしくは促進するとの報告もある。今回
HA の治療効果について OA 動物モデルを用い
て検証を行った。次に一次性および二次性変
形性関節症動物モデルを用い、ヒアルロン酸

の関節内注入による除痛効果について検討
を行い、BMSc の関節内直接注入における軟骨
修復効果に HA が及ぼす影響についても検討
を行った。

結果として、後根神経節 (DRG)における
Substance P の陽性細胞割合は PBS 投与側に
おいて 14.9%であるのに対し、HA 群では 8.2%
に減少しており、CGRP においても同様の結果
が得られた。HA 群において DRG での疼痛関連
因子の発現は減少しており、HA によって変形
性関節症に対する徐痛効果が得られ結果で
あった。

次に BMSc の軟骨修復効果について、
HA+BMSc 注入群では他群と比較して、mankin
score は有意に改善していた。蛍光標識され
た BMSc は、PBS+BMSc の関節内注入群ではほ
んど取り込まれなかったが、HA+BMSc 群で
は変性軟骨の表層を中心に取り込まれてい
た。WB 法を用いた半定量解析でも、HA+BMSc
群では基質中の 2 型コラーゲン量が増加して
いた。HA と共に BMSc を投与した群では投与
した BMSc はより深くより長期間変性軟骨部
に留まることがわかった。また変性軟骨内に
移動した BMSc はその場で type collagen
を産生していることもわかった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 宮崎 剛, 坂本拓己, 本定和也, 竹浦直
人, 佐藤充彦, 内田研造. 変形性関節症動
物モデルにおけるヒアルロン酸の治療効果.
第 89 回日本整形外科学会学術総会,
2016.05.12-15, パシフィコ横浜(神奈川県
横浜市)

2) 坂本拓己, 宮崎 剛, 本定和也, 高橋
藍, 北出 誠, 中嶋秀明, 内田研造. MIA 関
節内注入 OA モデルに対する間葉系幹細胞移

植を用いた変形性関節症予防効果と疼痛関連因子の免疫組織学的評価. 第 89 回日本整形外科学会学術総会, 2016.05.12-15, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3) 宮崎 剛, 内田研造, 坂本拓己, 本定和也, 犬飼智雄, 馬場久敏. 変形性関節症自然発症動物モデルに対するヒアルロン酸関節内注入後の痛みの評価 後根神経節における免疫組織学的検討 . 第7回日本運動器疼痛学会, 2014.10.25-26, A N A クラウンプラザホテル宇部(山口県宇部市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI Tsuyoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病院部) ・ 講師

研究者番号 : 80324169

(2)研究分担者

坂本 拓己 (SAKAMOTO Takumi)

福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病院部) ・ 助教

研究者番号 : 40634837