

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462297

研究課題名(和文)軟骨前駆細胞を用いた変形性関節症治療法の開発

研究課題名(英文)Development of treatment for the osteoarthritis with chondroprogenitor cells

研究代表者

内尾 祐司(Uchio, Yuji)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20223547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本白色家兎変形性膝関節症モデルを作製し、軟骨前駆細胞を関節内注射して関節症性変化の評価、組織学的評価を行った。免疫抑制を行うことなく関節腔内投与を行い経過観察しているが、投与後1ヵ月を経過しても明らかな有害事象はなかった。軟骨損傷に対するRECの関節腔内注射による治療は従来報告されている間葉系幹細胞よりも高い効果を示すと推察される。軟骨損傷に対する硝子軟骨による修復や、変形性関節症の進行予防、疼痛の軽減について検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：A Japanese white person rabbit deformation properties knee arthropathy model is made, intra-articular injection does a cartilage leading cell, and, arthropathy, the value of the change and the organization scholarly value were performed. Prescription in the synovial cavity was being performed and passage was being observed, but without doing immunosuppressed even if 1 month was passed after prescription, there was no clear adverse event. You suppose to indicate the effect higher than the leaf system stem cell while treatment by an injection in the synovial cavity of REC to cartilage damage is reported in the past. It's expected to inspect about restoration by a hyaline cartilage, progress prevention of deformation properties arthropathy and reduction in sharp pain to cartilage damage.

研究分野：軟骨再生

キーワード：変形性関節症 軟骨前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は老年人口が 25%に達する超高齢社会であり、運動器の変性疾患である変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) 患者は厚生省研究班によると、有症状者が 1800 万人で、要支援・要介護者の約 1 割、約 60 万人が関節疾患で支援・介護サービスを受けている実態がある。今後予想される超高齢・人口減少社会の観点から OA をどう克服していくかは、日本の喫緊の課題の一つといえる。

また、高齢化は世界的な潮流でもあり、世界保健機関によれば 2050 年までに高齢者は倍増し、主要な健康問題のひとつに OA があると明言されている。超高齢者を抱える日本は世界のフロントランナーともいえ、その観点からも OA の克服は極めて重要な課題である。

OA の病態については、基質を分解する酵素 (Aggrecanase-1,2、Matrix metalloproteinase: MMP) による発症メカニズム (Goldring MB. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012; Chen CG, et al. *Arthritis Rheum*, 2012) や加齢変化に伴う DNA 短縮 (Harbo M, et al. *Mech Ageing Dev*, 2013)、基質産生能や成長因子に対する反応性の低下 (Scharstuhl A, et al. *Ann Rheum Dis* 2002; Davidson EN, et al. *Arthritis Res Ther* 2005.)、さらには長寿関連遺伝子とよばれる SirT1 遺伝子の発現低下と、肥大軟骨細胞への分化や基質の崩壊への関与 (Gagarina V, et al. *Arthritis Rheum*, 2010; Gabay O, et al. *Ann Rheum Dis*, 2012) などが示されつつある。

しかし、上記のような発症メカニズムが明らかになっても、250 年前も Hunter が指摘した「軟骨は一旦変性・破壊されると決して回復しない」という原理を覆す新知見は未だにでていない。このため、OA 治療では、OA 早期に対して非ステロイド性消炎剤 (NSAIDs) の内服や外用剤の貼付や関節液成分であるヒアルロン酸製剤の関節注射などの保存的治療や進行期に対して骨きり術や人工関節などの手術が行われている。これらの治療法は変性軟骨の修復・再生によって本症を治癒に導くというよりは、むしろ対症療法的であることや、残った健全軟骨組織に体重負荷を移動させたり、金属などの人工物によって破壊された関節を置換したりする、あくまでも救済手術 (salvage surgery) である。これに対して新しい薬物治療薬として Tanezumab (抗 NGF 抗体) Adalimumab (抗 TNF 抗体) Abatacept (T-cell co-stimulation modulator)、Interleukin-1 receptor antagonist などが治験段階にある (Lane NE, et al. *NEJM*, 2010; Brown MT, et al. *J Pain*, 2012; Laslett LL, et al. *Ann Rheum Dis*, 2011) もの、これらは疼痛に対する伝達阻害剤であったり、基質分解を抑制

する薬剤であり、変性・破壊された軟骨を修復・再生させるものではない。すなわち、OA 治療の主眼はこれまで多くが基質分解への抑制にあつて、基質合成の促進や細胞による組織修復を図ることに主眼が置かれていなかった。

一方、われわれはこれまで若年者の外傷や離断性骨軟骨炎による軟骨損傷に対して、軟骨を採取し生体外で軟骨細胞を単離しアテロコラーゲンに包埋して培養軟骨を作製して移植するという自家軟骨細胞移植術について基礎・臨床研究を進めてきた (Uchio Y, et al. *J Biomed Material Res*, 2000; Ochi M, Uchio Y, et al. *Artificial Organ*, 2001; *J Bone Joint Surg-Br*, 2002)。その良好な中長期成績 (Adachi N, et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013)、および治験結果 (Tohyama H, et al. *J Orthop Sci*, 2009; Takazawa K, et al. *J Orthop Sci*, 2012) によって、本法は 2013 年 4 月に保険収載となり臨床で応用されつつある。しかし、この方法は若年者の軟骨損傷に対しては健全な若年者の軟骨を用いることで生物学的治癒を図ることができるものの、変性疾患である OA では軟骨細胞の生物学的活性は低下していると考えられることから、本法は OA では適応とされていない。これに対して、骨髄間葉系細胞から軟骨分化誘導によって実験的には軟骨再生を図る方法はあるものの、これでは肥大軟骨細胞に最終分化 (軟骨内骨化) するため (Mobasher A. *Vet J*, 2012) 軟骨内骨化の危険が払拭できるまでは、これを臨床で用いることはできないと考える。

そこで、われわれは軟骨の発生過程において出現する軟骨前駆細胞 (chondroprogenitor cell; CPC) (Dowthwaite GP, et al. *J Cell Sci*, 2004.) に着目し、この細胞を OA に対する細胞治療に応用することを考えた。本細胞は OA においても軟骨表層に出現することが知られ、女性では I 型コラーゲン発現が高いとされる (Myers SR, et al. *Wound Repair Reg*, 2007) もの、どのような形質をもった細胞であり、OA 発症との関連や OA 修復になぜ CPC が動員されないか、などの疑問は明らかではない。

また、軟骨から CPC を分離し軟骨欠損部に移植する方法は Williams R らによって報告されている (PloS ONE, 2010) が、その CPC は幼弱ヤギから採取したものであり、移植対象も幼弱ヤギの関節軟骨欠損例への pilot study である。また、同報告ではヒト OA 軟骨から CPC を分離したとしているが、軟骨組織として形成させてはならず、その後の報告は同施設からはでない。

2. 研究の目的

OA 軟骨から CPC を単離し、OA の病態形成に関わる役割を解明するとともに分化誘導による新しい関節軟骨治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

これまで、ウサギ軟骨を用いた軟骨前駆細胞 CPC の単離を行い Wistar 系ラット (10 週令) および日本白色家兔 (体重 2kg) を用いて、ネンブタール腹腔内注射あるいはケタミン筋肉注射で安楽死させた後、ラットおよびウサギ関節軟骨を採取して、pronase および collagenase で細胞を細胞外基質から単離し、Fibronectin をコートした培地に播種し 20 分置き、上澄みを取り除いて、DMEM 培地で継代培養する。12 日後、細胞数が 32 以上のコロニーを選択・採取し、transforming growth factor 2, Fibroblast growth factor-2 を添加した培地で培養する。

Flow cytometry : 5 代経代培養後、PBS で洗浄して CD105-FITC、CD166-RPE、CD44-FITC および CD29-FITC あるいは CD49e-FITC で 4、1 時間培養した後、細胞を遠心して、ラベルされた細胞を Flow cytometry に掛け、Fluorescently Activated Cell Sorting (FACS) 解析を行う。

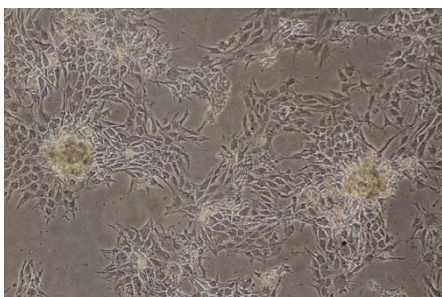
その後、軟骨分化能、脂肪分化能、骨化を探索中するとともに、ヒト OA 軟骨を用いた軟骨前駆細胞の単離とその形質の探索および OA 軟骨 (細胞) に対する CPC の影響を研究した。当大学医の倫理委員会の承認の下、変形性膝関節症あるいは変形性股関節症に対して人工膝関節全置換術および人工関節全置換術を受けた患者から切除した関節から軟骨を採取し、軟骨前駆細胞 CPC を分離した。

4. 研究成果

Fibronectin 処理後の CPC

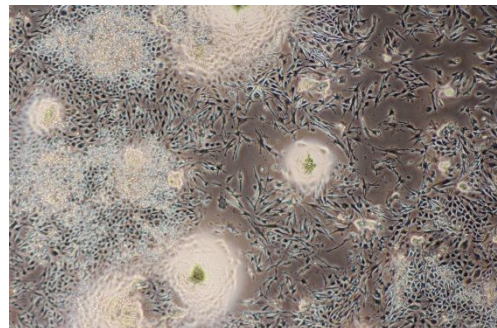
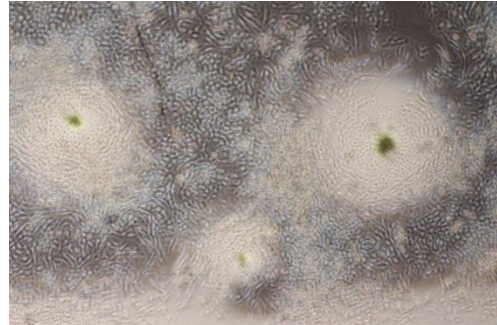


BSA 処理群処理後の CPC



その形質を FACS によって探索し、CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, CD166, Stro1 では陰性で、CD90 (Thy1) だけはほんのわずかに陽性細胞が検出できた。この陽性細胞の増殖能は低かった。

このため、若年者の骨髄から軟骨前駆細胞 CPC を作製し、



これをウサギ変形性膝関節症モデルに関節内注射して、関節症性変化の評価、組織学的評価を行った。本法は免疫抑制を行うことなく関節腔内投与を行い経過観察しているが、投与後 1 ヶ月を経過しても明らかな有害事象はなかった。軟骨損傷に対する CPC の関節腔内注射による治療は従来報告されている間葉系幹細胞よりも高い効果を示すと推察される。軟骨損傷に対する硝子軟骨による修復や、変形性関節症の進行予防、疼痛の軽減について検証する予定である。

CPC の OA に関する研究は少なく、ましてや CPC と OA の病態形成に係る役割を明らかにした研究はない。また、分化・増殖させた CPC を関節内注射させたり、これによって作製した培養軟骨によって変性した OA 軟骨を修復・再生させたりする試みもこれまでない。CPC を OA 発症と治療の新しい role player とすることで、分解・変性抑制薬を用いる消極的治療から修復・再生への積極的治療に転換できる可能性がある。また、細胞治療は注射などの保存的治療ができ、手術的治療を回避でき医療費・経済損失の低減にも寄与できる。したがって、本法によって変形性膝関節症の発症を防ぎ、かつ軟骨再生が可能となれば、超高齢社会を支える高齢者に福音となるため、本法を開発する臨床的意義はきわめて大きいと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

内尾祐司 OA の早期診断・治療の意義 .
Bone 32:23-26,2018 .

[学会発表] (計 4件)

内尾祐司: 変形性関節症に対する保存療法の有効性と課題. 第 130 回日本関節病学会. 愛媛, 2018 年 4 月

内尾祐司: 変形性関節症治療の新たな選択肢 ~ 患者から求められる治療とは ~. 神奈川西湖地区整形外科講演会秋季講演会. 神奈川, 2017 年 11 月

内尾祐司: 変形性関節症に対する保存療法の有効性と課題. 第 45 回日本関節病学会. 東京, 2017 年 11 月

内尾祐司: 膝関節痛を科学する。 - 病態解明と治療戦略 . 第 15 回北海道関節疾患研究会. 札幌, 2017 年 4 月

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/orthop/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内尾 祐司 (Uchio, Yuji)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 20223547

(2) 研究分担者

熊橋 伸之 (Kumashashi, Nobuyuki)
島根大学・医学部・講師
研究者番号: 00457178

桑田 卓 (Kuwata, Suguru)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 80509000

(3) 連携研究者 なし

()
研究者番号:

(4) 研究協力者 なし

()