

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04953

研究課題名(和文) 軟骨・半月板再生を目的とした同種滑膜間葉系幹細胞の安全性の検証

研究課題名(英文) Investigation of allogeneic synovial mesenchymal stem cells for cartilage and meniscus regeneration therapy

研究代表者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：10345291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜間葉系幹細胞を用いた再生医療をより多くのヒトに提供するためには、同種異系(アロ)滑膜間葉系幹細胞の安全性を検証し、臨床応用の可能性を検討する必要がある。今回、私たちは、前十字靭帯再建術を受ける患者の関節液に含まれるCD141+DCが滑膜由来であり、ネクローシスを起こしたアロ滑膜間葉系幹細胞を取り込むこと明らかにした。さらに、CD141+DCと生細胞あるいは死細胞との共培養の系を用いてT細胞増殖とサイトカイン産生が異なることを示した。これらの結果は、樹状細胞の死細胞貪食によるT細胞活性化ならびに生細胞による抑制のメカニズム解明に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Conflicting evidence exists regarding the immunosuppressive capacity of mesenchymal stem cells (MSCs). Our aim was to examine the effects of inducing recipient T cell responses by dead allogeneic MSCs and of suppressing the responses by living MSCs. Synovial fluid (SF) was obtained from patients who underwent knee surgeries. SF mononuclear cells were co-cultured with dead allogeneic MSCs. Immunosuppressive capacity of MSCs was verified by the addition of living MSCs to the co-culture. CD141+ dendritic cells and CD141lowCD11b+CD14+ macrophages were identified in patient SF. Dead allogeneic MSCs were taken up by synovial APCs and induced T cell proliferation and cytokine production such as granzyme B and IL-6. Addition of living MSCs counteracted T cell proliferation and granzyme B production. Dead allogeneic MSCs elicited cytotoxic T cell responses with the help of Th1 cytokines but living MSCs counteract this and direct intra-articular environment to anti-inflammatory condition.

研究分野：整形外科学

キーワード：移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでの基礎研究で、滑膜由来の間葉系幹細胞が自己血清で効率よく増殖すること(Nimura et al. *Arthritis Rheum.* 2008)、軟骨分化能が高いこと(Sakaguchi et al. *Arthritis Rheum.* 2005, Mochizuki et al. *Arthritis Rheum.* 2006, Yoshimura et al. *Cell Tissue Res.* 2007, Koga et al. *Cell Tissue Res.* 2008)、未分化な状態で軟骨欠損部に移植すると軟骨細胞に直接分化すること (Koga et al. *Stem Cells.* 2007)、細胞浮遊液を 10 分間静置すると軟骨欠損部に 60%の細胞が接着し(Koga et al. *Arthritis Res Ther.* 2008)、ブタの荷重面の軟骨欠損も再生されること(Nakamura et al. *Cytotherapy* 2012)、ブタ半月板切除モデルに移植すると半月板再生が促進されること(Hatsushika et al. *Osteoarthritis Cartilage* 2014)を報告した。2008年には自己滑膜間葉系幹細胞による軟骨再生の臨床研究を開始し、安全性を確認するとともに、多数の例で軟骨欠損部の再生、症状の改善を認めている(Sekiya et al. *CORR* 2014)。また、2014年に開始した臨床研究では、損傷部の状態が悪くて現状では縫合術の適応にならない半月板損傷に対し、縫合部に自己滑膜間葉系幹細胞を移植することにより、半月板の治癒が促進されるかを検証するなど、自己滑膜間葉系幹細胞に関しては安全性と有効性が実証されつつあるが、さらに、滑膜間葉系幹細胞を用いた再生医療をより多くのヒトに提供するために、同種異系(アロ)滑膜間葉系幹細胞の産業化を目指している。そのためには、アロ滑膜間葉系幹細胞の安全性を検証し、リスクを超えるベネフィットがあることを明らかにする必要がある。

広範囲の半月板欠損に対して、欧米や韓国ではすでにアロの半月板移植が行われている。半月板の血管内皮と滑膜には HLA クラス I およびクラス II が発現しているが(Khoury et al. *J Orthop Res* 1993)、滑膜間葉系幹細胞は、少なくとも初代培養の時点ではクラス II を発現しておらず、レシピエントの T 細胞に直接抗原提示する可能性は低い。しかし、継代や培養条件によりクラス II の発現や共刺激分子の発現がどのように変化するかは未だ明らかでない。International Society for Cellular Therapy (ISCT)では、間葉系幹細胞を臨床応用する際は、HLA クラス II や血液型抗原を発現していないものを使用すべきであるという声明を発している(Dominici et al. *Cytotherapy* 2006)。アロ滑膜間葉系幹細胞を臨床応用する場合はクラス II や共刺激分子の発現の有無を明らかにする必要がある。

間葉系幹細胞には、T 細胞の増殖や樹状細胞の成熟を抑制する効果があるという研究が、骨髄由来のものに関して報告されている。この特性を活かした医薬品として、同種骨髄間葉系幹細胞 Prochymal®が既に米国 Osiris 社から薬事申請され、2012年5月にカナダで承

認されている。対象は 2015年の時点では小児ステロイド抵抗性急性 GvHD のみである(Le Blanc et al. *Lancet* 2008)。国内においては日本ケミカルリサーチ社が Osiris 社から技術導入し、成人を含む急性 GvHD を適応症として、Prochymal®の第□/□相試験を実施している。Osiris 社では Prochymal®を半月板部分切除後の患者の関節内に投与する第□/□相試験も実施し、その結果を 2014年に報告している(Vangsness et al. *J Bone Joint Surg Am.* 2014)。間葉系幹細胞は *in vitro* では免疫抑制効果があるという一方で、アロに移植されるとむしろ免疫原性を示すようになるという報告もある(Technau et al. *Cytotherapy* 2011, Chen et al. *Stem Cells.* 2007;)。

以上のことから、研究代表者らは、滑膜の間葉系幹細胞の研究を続けてきたが、免疫学的な基礎的検討が不十分であると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、滑膜間葉系幹細胞を用いた再生医療をより多くのヒトに提供するために、アロ滑膜間葉系幹細胞の安全性を検証し、臨床応用の可能性を検討することである。そのために、アロ滑膜間葉系幹細胞の特性を明らかにし、レシピエントの免疫細胞によるアロ滑膜間葉系幹細胞の認識機構を *in vitro* の実験で明らかにする。

3. 研究の方法

手術で廃棄される滑膜から滑膜間葉系幹細胞を培養し、その特性を解析する。また、滑膜間葉系幹細胞を移植する関節内の免疫細胞やサイトカイン環境を明らかにする。これらの予備実験ののち、アロ滑膜間葉系幹細胞と関節液から分離した単核球を混合培養し、アロ抗原がレシピエントの抗原提示細胞に提示されるか否かを、*in vitro* の実験で検証する。

アロ滑膜間葉系幹細胞の特性解析

アロ滑膜間葉系幹細胞は安定供給を目的に、継代して細胞数を確保することを検討している。私たちのこれまでの研究では、培地に増殖因子 FGF-2 等を添加することにより、軟骨分化能を維持しながら細胞の回収量が増えることを確認している(未発表データ)。骨髄由来の間葉系幹細胞では、FGF-2 を添加して培養することにより、HLA クラス II の発現が誘導されるという報告もある(Tarte et al. *Blood* 2010, Bocelli-Tyndall et al. *Arthritis Rheumatism* 2010)。HLA クラス II や共刺激分子 CD40, CD80, CD86 の発現はアロ滑膜間葉系幹細胞の抗原性に影響するため、FGF-2 の添加や継代回数が、これらの発現の有無や発現強度に影響するかを調べる。

関節液に含まれる免疫細胞の解析

関節内に投与されたアロ滑膜間葉系幹細胞が抗原提示されるには、まず、レシピエントの抗原提示細胞に取り込まれる必要がある。研究代表者らは、膝前十字靭帯再建術を受ける患者さんの関節液中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析し、マクロファージや T 細胞が含まれることを確認している。本研究では、アロ滑膜間葉系幹細胞移植の適応を検討している変形性膝関節症や半月板損傷患者で、関節液に含まれる免疫細胞の存在比や成熟および活性化状態をフローサイトメトリーで解析し、アロ滑膜間葉系幹細胞の抗原性や免疫抑制作用を検証する *in vitro* 実験系を確立するための予備実験とする。

関節内のサイトカイン環境

樹状細胞は炎症環境にて成熟樹状細胞になり、強力な抗原提示細胞としてアロ抗原を提示すると予想される。一方、未熟樹状細胞は免疫寛容を誘導し、免疫系の恒常性維持に関与していることが報告されている (Johnson et al. *Ann NY Acad Sci.* 2013)。従って、移植されたアロ滑膜間葉系幹細胞の作用機序を検証する上で、関節内のサイトカイン環境を把握することは重要である。研究代表者らは、膝前十字靭帯再建術を受ける患者さんの、術前および術後のサイトカインを定量し、IL-1、IL-6 といった炎症性サイトカインが、術後有意に上昇していることを確認している (未発表データ)。本研究では、半月板損傷患者の術前の炎症性サイトカインを定量し、健康人ボランティアと比較する。また、受傷から術前までの期間と関節内炎症性サイトカイン値の相関を調べることにより、患者の関節内の炎症状態を判断する材料とする。

関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証

アロ滑膜間葉系幹細胞のアロ抗原が、レシピエントの抗原提示細胞に提示されるか否かを検証するため、アロ滑膜間葉系幹細胞と関節液から分離した単核球を混合培養し、 ^3H -thymidine の取り込みで細胞の増殖を定量する。アロ滑膜間葉系幹細胞は関節液中の抗原提示細胞に取り込まれないと stimulator として機能しない。効率よく抗原提示細胞に取り込ませるため、#1 アロ滑膜間葉系幹細胞にアポトーシスを誘導して死細胞を用いる、#2 関節液単核球に含まれる抗原提示細胞を成熟させるために、関節内のサイトカイン環境を再現するような、炎症性サイトカインを反応系に添加することも検討する。また、単核球に含まれる T 細胞 (responder) の増殖を検出するには、responder の数も重要なファクターとなる。関節液に含まれる T 細胞の数

が少ない場合は、#3 関節液の単核球から T 細胞を単離して反応に追加することも検討する。さらに、#4 アロ滑膜間葉系幹細胞を過剰に加えると、逆に免疫抑制効果が検出できるかも検討する。

4. 研究成果

平成 27 年度は、アロ滑膜間葉系幹細胞の特定解析、関節液に含まれる免疫細胞の解析、関節内のサイトカイン環境、関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証を実施した。滑膜間葉系幹細胞における HLA クラス I およびクラス II 分子の発現を調べたところ、クラス I は発現しているがクラス II は発現していないことが分かった。拒絶反応は抗原提示細胞によるアロ抗原の提示と T 細胞の活性化によって起こる免疫応答であるので、関節液に含まれる樹状細胞 (DC) および T 細胞の存在比や活性化状態をフローサイトメトリーで解析した。術前の関節液には CD4、CD8 いずれの T 細胞も存在し、CD8T 細胞の方が多く、活性化初期マーカーの CD69 を発現していた。DC は CD141+DC、CD1c+DC が存在し、前者は術後減少し ($p < 0.05$) 後者は術後増加した ($p, 0.01$)。

CD141+DC は末梢血には僅かしか存在しないが、関節液中には単核球の数%を占めるほど存在した。CD141+DC はネクローシスを起こした細胞を CD8T 細胞にクロスプレゼンテーションするという報告がある。そこで、関節液の単核球と蛍光ラベルしたアロ滑膜間葉系幹細胞を共培養し、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、生きた細胞は取り込まれなかったが、ネクローシスしたアロ滑膜間葉系幹細胞は CD141+DC に取り込まれることがわかった。また、IFN- と IL-2 の存在下で共培養すると、CD8T 細胞の増殖が確認できた。これらの結果から、ネクローシスを起こしたアロ滑膜間葉系幹細胞は関節内の CD141+DC によりクロスプレゼンテーションされる可能性が示唆された。

平成 28 年度は、関節液の免疫細胞の解析、関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証、アロ抗原提示時のサイトカイン解析、ラット半月板切除モデルへの滑膜幹細胞移植・移植後の関節および免疫系組織の解析の検討を実施した。はじめに、前十字靭帯再建術をうける患者の術前および術後関節液中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析し、関節液に存在する CD11c+/HLA-DR+ のほとんどの細胞はある程度の CD141 を発現しているが、CD141^{bright} 細胞については、CREC9A を発現するものの、CD86 は低発現であること等の結果から、関節液中の CD141 + 樹状細胞が滑膜に由来したものであることを明らかにした。一方、CD141⁺ および CD1c⁺ 樹状細胞以外の CD11c+/HLA-DR+ 細胞は CD11b、CD14 とともに陽性であり、マクロファージサブセットであることを示した。

関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証では、滑膜間葉系幹細胞をあらかじめ PKH67 でラベリングした後、凍結融解により得られた死細胞を、CD141+ 樹状細胞と CD141^{low}CD11b⁺CD14⁺マクロファージの含まれる分画と一晚共培養し、CD141+細胞の核の中に死細胞の蛍光が認められることを再確認した。さらに、関節液の単核球とアロ滑膜幹細胞の混合培養により産生されるサイトカイン定量を実施した。

平成 29 年度は、前年度に引き続き、関節液の免疫細胞の解析、関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証を実施した。

はじめに、膝前十字靭帯再建術をうける患者の術前および術後関節液中の CD11c/HLA-DR 陽性細胞を CD141 と CD1c で展開した。その中で、CD1c+ 樹状細胞、CD141+ 樹状細胞、CD141^{low}/CD11b⁺/CD14⁺ マクロファージに着目し、その存在比や活性化状態を、術前と術後 3(4)日で比較したところ、CD1c+ 樹状細胞の細胞数は、術前が有意に高く、CD141+ 樹状細胞、CD141^{low}/CD11b⁺/CD14⁺ マクロファージの細胞数は、術後が有意に高かった。

次いで、関節液の免疫細胞によるアロ抗原提示の検証では、CD141 + 樹状細胞には死細胞を取り込み T 細胞へ抗原提示する機能があることから、関節液から分離し、VPD450 でラベルした単核球(抗原提示細胞および T 細胞が含まれる)とアロ滑膜幹細胞の死骸を混合培養する系を構築した。具体的には、あらかじめ、アロ滑膜幹細胞の死骸を一晚混合培養し、さらに 6 日間培養することによって、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の増殖が検出された。しかし、単核球における主要な CLEC9A 陽性細胞の画分は術前後で異なっていた。さらに、共培養 7 日後の Granzyme B 産生量は有意に低く、IL-6 産生量は有意に高いことを確認した。一方、患者由来関節液における炎症誘発性サイトカイン IL-6 を術前、術後 3(4)日、術後 14 日で比較すると、術後 3(4)日で有意に高く、術後 14 日は有意に低くなっていた。これらの結果は、樹状細胞の死細胞貪食による T 細胞活性化ならびに生細胞による抑制のメカニズム解明に役立つと考えられた。

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)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

関矢 一郎、宗田 大 ヒト幹指針開始前から再生医療新法に至る整形外科領域の再生医療 その進捗と今後の展望 滑膜幹細胞による軟骨・半月板を対象とした再生医療、日本整形外科学会雑誌、91(4):223-227、2017

関矢 一郎、【OA の最新治療-関節再生を目指して-】 滑膜由来幹細胞移植による

半月板再生、分子リウマチ治療、10(2):71-74、2017

関矢 一郎、【診断と治療の ABC[122]変形性関節症】(第 5 章)外科療法 再生医療 滑膜幹細胞移植、最新医学(別冊変形性関節症)、226-233、2017

関矢 一郎、【再生医療の基礎と臨床】半月板の再生医療、BIO Clinica、32(10):978-982、2017

大関 信武、宗田 大、齋藤 知行、関矢 一郎、滑膜間葉系幹細胞の定期的関節内投与は変形性膝関節症の進行を抑制する、再生医療、16(3):241-248、2017

関矢 一郎、膝関節内病変に対する細胞治-その理論的根拠と基礎から臨床への展開、関節外科、36(12):31-41、2017

Matsumura E, Tsuji K, Komori K, Koga H, Sekiya I, Muneta T, Pretreatment of IL-1 β enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 19(2):181-193,2017
doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.004

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Komori K, Fujii S, Otabe K, Horie M, Koga H, Tsuji K, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Muneta T, Sekiya I. Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Stem Cell Res Ther. 8(1):115,2017
doi: 10.1186/s13287-017-0572-8

Shioda M, Muneta T, Tsuji K, Mizuno M, Komori K, Koga H, Sekiya I. TNF α promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. PLoS One. 12(5):e0177771,2017
doi:10.1371/journal.pone.0177771

Inoue M, Muneta T, Ojima M, Nakamura K, Koga H, Sekiya I, Okazaki M, Tsuji K. Inflammatory cytokine levels in synovial fluid 3, 4 days postoperatively and its correlation with early-phase functional recovery after anterior cruciate ligament reconstruction: a cohort study. J Exp Orthop. 2016,3(1):30
doi: 10.1186/s40634-016-0067-z

〔学会発表〕(計 11 件)

関矢 一郎、間葉系幹細胞による変形性膝

関節症(半月板・軟骨)の再生医療、再生医療産学官連携シンポジウム、日本橋三井ホール(中央区)2017

関矢 一郎、膝痛を再生医療で治す！アカデミアの挑戦、DIA 日本年会、東京ビックサイト(江東区)2017

関矢一郎、変形性膝関節症の定量評価と再生医療、日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会(山形市)2017

Miyoko Ojima, Kunikazu Tsuji, Koji Otabe, Masafumi Horie, Hideyuki Koga, Ichiro Sekiya, and Takeshi Muneta Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of stem cell antigens in synovial mesenchymal stem cells. Osteoarthritis Research Society International, March31-April3, 2016, Amsterdam Netherlands

Kaori Nakamura, Kunikazu Tsuji, Hiroki Katagiri, Makiko Inoue, Miyoko Ojima, Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta Dynamic analysis of inflammatory cells in synovial fluid after index anterior cruciate ligament reconstruction surgery. Osteoarthritis Research Society International, March31-April3, 2016, Amsterdam Netherlands

辻 邦和、尾島美代子、小田遼浩二、堀江雅史、古賀英之、関矢一郎、宗田 大 滑膜由来間葉系幹細胞を特徴付ける表面抗原の網羅的解析日本運動器移植、再生医学研究会、宇部、2015年

尾島美代子、辻邦和、小田遼浩二、堀江雅史、古賀英之、関矢一郎、宗田 大 細胞剥離法の差異が滑膜由来間葉系幹細胞の表面抗原解析の結果に及ぼす影響 日本運動器移植、再生医学研究会、宇部、2015年

辻 邦和、尾島美代子、小田遼浩二、堀江雅史、古賀英之、関矢一郎、宗田 大 滑膜由来間葉系幹細胞を特徴付ける表面抗原の網羅的解析

軟骨代謝学会、広島、2016年

宇土美於、辻邦和、大関信武、星野傑、山崎勇大、関矢一郎、宗田大
モノヨード酢酸によるラット関節炎モデルにおいて間葉系幹細胞投与は疼痛を軽減する。
日本運動器疼痛学会、名古屋、2015年

星野傑、辻邦和、宇土美於、宗田大

ラット変形性膝関節疼痛モデルの膝関節・膝周囲組織の脊髄後根神経節での組織学的検討
日本運動器疼痛学会、名古屋、2015年

金民大、辻邦和、関矢一郎、大川淳、宗田大
滑膜間葉系幹細胞の増殖におけるPDGFシグナルの細胞内伝達経路の解析
日本整形外科学会基礎学術集会、富山、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)
東京医科歯科大学・統合研究機構・教授
研究者番号：10345291

(2)研究分担者

辻 邦和 (TSUJI, Kunikazu)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：20323694