

令和元年5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10885

研究課題名(和文) 週齢に応じたラット軟骨部分損傷の自然経過の差異を介入効果の指標とする検討

研究課題名(英文) Age-dependent differences in response to partial-thickness cartilage defects in a rat model as a measure to evaluate the efficacy of interventions for cartilage repair.

研究代表者

佐粧 孝久 (SASHO, TAKAHISA)

千葉大学・予防医学センター・教授

研究者番号：20312952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：部分軟骨損傷(PTCDs)を3, 6, 10, 14週齢のラット膝関節に作成し、経時的に組織学的変化を検討した。その結果、1)3週齢では正常に修復、2)6週齢では正常に近い修復、3)10週齢以上では治癒しないこと、がわかった。軟骨修復作用があるとされる間葉系幹細胞(MSCs)を14週齢モデルに投与した所、6週齢に相当する治癒が得られ、PRP投与には効果がなかった。続いてMSCs投与時期を検討した。その結果、MSCsは損傷作成時と同時投与のみが有効であった。損傷作成後1週あるいは2週での投与では治癒効果を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

部分軟骨損傷は変形性膝関節症(KOA)の大きな原因のひとつと考えられている。本研究では部分軟骨損傷に対する介入の効果を判定するために有用なモデル動物システムを構築できた。すなわち、モデル動物の週齢が高くなればなるほど介入にとってはハードルが上がり治癒困難となるのであり、介入方法の効果の強さの比較が可能となるのである。これを応用することで、現時点では開発が成功に至っていないDisease modifying OA drugsの効果判定システムとして利用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Partial thickness cartilage defects (PTCDs) were created on the medial condyle of the femur in various ages of rats. Natural healing process was examined by histologically. As results, 1) PTCDs of 3-week old rats healed with normal cartilage, 2) those of 6-week old rats healed nearly normal cartilage, and 3) those of 10 or 14 week old rats did not heal but deteriorated. Intra-articular administration of mesenchymal stem cells (MSCs) had healing effects on PTCDs of 14-week rats but platelet rich plasma (PRP) did not. In addition, administration of MSCs was only effective when they were injected at the time of PTCDs creation. One or two week delay in administration did not exhibit any healing effects.

研究分野：関節病

キーワード：軟骨損傷 動物モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における変形性膝関節症(膝 OA)患者の数は 1000 万人を超えると推定されている。高齢であるほど罹患率の上昇する本疾患の患者数は、高齢化率の上昇とともに今後も増加する一方であるとされている。患者数の増加は本邦のみならず全世界的な問題となっており、発症予防または進行抑制を可能とするような治療介入が社会的、医療経済的に求められている。これを達成するための薬剤は Disease Modifying Osteoarthritis Drugs(DMOADs)と称されており、開発が急務となっている状況にあると言える。しかしながら、これまでに世界中で多くの DMOADs 候補の臨床試験が施行されてきたのであるが、現在まで DMOADs 開発は成功には至っていない。成功しない原因として、一旦進行した軟骨変性を健全な状態に戻していくことが生物学的に非常に困難であるということが一因となっていることが考えられている。そこで多くの研究者が超早期に介入する方法に活路を見出そうとし始めた。手遅れとなる前に、すこしでも早い段階から介入することで軽度の変性を生じた軟骨を保持していこうというのである。

そのために必要となるのは(1)膝 OA の初期変化ないし初期軟骨変性を捉えるバイオマーカーの開発、(2)軟骨の初期変化に対する介入の有効性を短期間で評価できるシステムの開発、の 2 点である。これまでに我々は(1)、(2)の各々に取り組んできた。(1)については MRI による初期軟骨変性を捉えることのできる撮像方法の開発・評価に携わり、解決に近づきつつある。一方、(2)については Partial-thickness cartilage defects (PTCDs) が将来的な膝 OA 発症のリスクファクターであること、臨床において膝関節鏡手術施行時に偶発的に PTCDs が発見される頻度が非常に高いということ、の 2 点が指摘されてきていることから、PTCDs に興味を持ち、これに関する研究を施行してきた。動物研究としてラットの膝軟骨を用い、PTCDs が軟骨変性に至る経過の組織学的検討、治療のメカニズムに関する検討に取り組んできたのである。そこで、これまでのラット PTCDs 研究から得られた成果を基盤とし、これを発展させ、より体系化し、介入法の評価に使用できるようにして応用できるような研究を達成しようと考えた。

### 2. 研究の目的

PTCDs を治療させることのできる治療法は DMOADs となり得る。DMOADs 候補となる介入法を効率よく比較評価できるような系が必要とされている。介入の評価には in vivo の系が必須である。こうしたことから、PTCDs に対する介入の効果を標準化して比較評価できる系を作成しようと考えた。そのために様々な週齢のラットを用意し、これまでに確立した PTCDs のモデル動物を作成し、経時的な変化を組織学的により詳細に調べることとした。これまでの結果から、想定されるのは週齢が上がるほど軟骨の自然修復の程度が悪くなるということであった。従ってその程度をスケール(指標)として用いることで、PTCDs に対する治療介入を施行した場合、その効果がどの程度であるかの評価が可能となる。すなわち、例えば 10 週齢のラットにある介入をした場合、6 週齢のラットに相当する治癒が見られたなどといった具合に表現できるようになる。または組織学的評価スコアを作成し、点数として評価することもできる。また、どの時点で評価を施行することが適切であるかも同時に検討することとした。なるべく短期に評価が定まる方がより好ましいということになる。

### 3. 研究の方法

様々な週齢、すなわち 3, 6, 10, 14 週齢のラットの膝関節に PTCDs を作成し、1 日後、1, 2,

4, 12 週経過時の損傷部の組織学的な変化を検討することとした。損傷の作成方法はこれまでに我々が確立したモデル作成法に従った。すなわち改変した眼科角膜手術用のメスを用い、深さ 100  $\mu\text{m}$  で膝関節の運動方向に一致させた線状の PTCD を大腿骨内側顆軟骨に作成する。各経過時にラットを屠殺し、PTCD を含む大腿骨内側顆を採取し、固定後にサフラン-0 による染色、タイプ II コラーゲンに対する免疫染色を施行し、組織学的な評価を施行する。組織学的評価法は Namba らが用いた評価法を改変した Modified Namba スコアを用いることとした。

次いで、上述の検討から治癒しにくいということが明らかになった週齢のラットを対象とし PTCDs を作成し、それに対して介入を施行し、どの程度の治療効果があるかを判定することとした。介入としてはこれまでに軟骨全層損傷: Full-thickness cartilage defects (FTCDs) に対して有効性があるとされている間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) と Platelet rich plasma (PRP) の関節内投与を選択した。投与量は先行研究に従い決定した。MSCs が確実に調整できたことは、FACS による細胞表面マーカーでの確認、ならびに軟骨、骨、脂肪細胞への分化誘導を行い、各細胞への分化能を有していることの 2 つの検討により確認することとした。

次いで、介入の至適実施時期を検討するために、PTCDs 作成直後、作成後 1 週間、作成後 2 週間で、MSCs を関節内投与し、PTCDs の治癒の程度に差異があるかを検討した。また、投与する MSCs を蛍光標識し、関節内のどの組織に分布するかも検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) 各週齢のラットの軟骨の自然修復の状況を組織学的に検討した結果、3 週齢ラットでは 4 週経過時に軟骨が正常組織で修復されていた、6 週齢ラットでは正常類似組織で修復された、10 週齢、14 週齢のラットでは修復が得られず、4 週から 12 週にかけて変性が進行していた、ことがわかった。このことから 10 週齢以上のラットでは自然治癒が望めないことがわかり、治癒せしめるためには何等かの介入が必要であることがわかった。
- (2) 評価時期としては PTCDs 作成後 4 週時点が適切であることもわかった。すなわち、組織学的スコアからみた場合、1 日経過時ではどの群間にも差を認めず、1 週および 2 週経過時には一部の群間に有意差が生じ、4 週経過時には 10 週齢 14 週齢間以外の群間すべてに有意差がみられ、12 週経過時にも同様の結果であった。このことから 4 週経過した時点で、3 週齢ラット、6 週齢ラット、10 週齢以上のラット間で明らかな治癒能力の差が生じ、その後の経過をみてもこの差異が変わることはなく、3 週齢のみが明らかに自然修復能を持つことがわかった。こうした結果はこの過程を評価するために用いた組織学的スケールである Modified Namba スコアが有用であったことも示している。
- (3) 次いで MSCs、PRP を 14 週齢ラット PTCDs モデルの関節内に投与し、介入の効果を評価した。その結果、MSCs 投与にて 6 週齢ラットの自然経過に相当する治癒の得られること、PRP 単独投与にはあまり効果のないことがわかった。また、MSCs と PRP を併用投与しても MSCs 単独投与の効果を増強することもなかった。
- (4) 続いて MSCs 投与の時期について検討を施行した。同様の実験系にて損傷作成直後と作成後 1 週、2 週で投与する場合を比較した。その結果、MSCs が軟骨修復に働くのは損傷作成時と同時に投与する場合のみであることがわかった。また、MSCs を関節内に投与をすると滑膜の増生が起こることがわかった。さらには、標識した MSCs の分布を調

べたところ滑膜組織に分布することがわかった。

以上(1)から(4)の結果が得られたことにより、週齢に応じた PTCDs の自然治癒の程度を介入効果の程度を判定するためのラットを用いた系が完成したといえる。実際に介入の効果も比較検討することができた。本系を用いることにより、PTCDs の治療に用いられるような分子、それは DMOADs の候補分子ともいえるのであるが、対象分子の有用性を比較的短期間にスクリーニングできるものと考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Akatsu Y, Enomoto T, Yamaguchi S, Tahara M, Fukawa T, Endo J, Hoshi H, Yamamoto Y, Sasaki T, Takahashi K, Akagi R, Sasho T. Age-dependent differences in response to partial-thickness cartilage defects in a rat model as a measure to evaluate the efficacy of interventions for cartilage repair. *Cell Tissue Res.* (査読あり) 2019 Feb; 375(2):425-435. doi: 10.1007/s00441-018-2914-y.
2. Enomoto T, Akagi R, Ogawa Y, Yamaguchi S, Hoshi H, Sasaki T, Sato Y, Nakagawa R, Kimura S, Ohtori S, Sasho T. Timing of Intra-Articular Injection of Synovial Mesenchymal Stem Cells Affects Cartilage Restoration in a Partial Thickness Cartilage Defect Model in Rats. *Cartilage.* (査読あり) 2018 Jul 1:1947603518786542. doi: 10.1177/1947603518786542. [Epub ahead of print].
3. Endo Jun, Akagi Ryuichiro, Muramatsu Yuta, Watanabe Atsuya, Akatsu Yorikazu, Fukawa Taisuke, Tahara Masamichi, Yamaguchi Satoshi, Sasho Takahisa. Comparative Analysis of Gene Expression between Cartilage and Menisci in Early-Phase Osteoarthritis of the Knee. An Animal Model Study *Journal of knee surgery* (査読あり) 2018 7: 664-669. doi: 10.1055/s-0037-1606549
4. Ikegawa N, Sasho T, Yamaguchi S, Saito M, Muramatsu Y, etc. Identification of genes required for the spontaneous repair of partial thickness cartilage defects in immature rats. *Connect Tissue Res* (査読あり)2016; 57: 190-9. doi: 10.3109/03008207.2015.1121250.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Enomoto Takahiro, Ryuichiro Akagi, Satoshi Yamaguchi, Yusuke Sato, Ryosuke Nakagawa, Seiji Kimura, Yuya Ogawa, Aya Sadamasu, Takahisa Sasho. Difference in cartilage restoration by the time of intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells in partial thickness cartilage defect model of rats. Orthopaedic Research Society 2018.
2. 榎本隆宏、赤木龍一郎、山口智志、佐藤祐介、中川量介、木村青児、小川裕也、貞升彩、大鳥精司、佐粧孝久 ラット部分軟骨損傷に対する間葉系幹細胞関節内投与の遅れが軟骨修復に与える影響  
第 31 回日本軟骨代謝学会 2018
3. 榎本隆宏、赤木龍一郎、佐藤祐介、中川量介、木村青児、小川裕也、佐粧孝久 ラット部分軟骨損傷に対する間葉系幹細胞投与時期に違いが軟骨修復に与える影響  
日本整形外科基礎学術集会 2017

〔その他〕

ホームページ等: <https://www.m.chiba-u.jp/dept/musculoskeletal/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。