

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03804

研究課題名（和文）変形性膝関節症患者に対する脂肪組織由来再生細胞移植の有効性・機序解明に関する研究

研究課題名（英文）Therapeutic effect of adipose-derived stromal vascular fraction on osteoarthritic chondrocytes

研究代表者

黒田 良祐（Kuroda, Ryosuke）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80379362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,100,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪組織由来再生細胞（Adipocyte Derived Regenerative Cells; ADRCs, Stromal Vascular Fraction; SVF）の変形性膝関節症（膝OA）治療有効性の機序を考察することを目的とし、*in vitro*での機序解明、臨床応用での有効性評価を行った。ではADRCsに含まれるM2マクロファージがSmad2/3リン酸化を介して関与することが確認され、ではADRC 1回注射と2回注射の有効性比較で、いずれもMRI評価・臨床スコアの改善を確認し、高度変形に対しては2回注射が優れる結果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪幹細胞の変形性膝関節症治療に対する有用性は報告されているが、その機序は不明な点も多かった。脂肪幹細胞に含まれるM2マクロファージがSmad2/3リン酸化を介して関与する、という本研究で解明された機序は、今後臨床における治療法の向上に寄与するものであり学術的意義が高いものとする。また臨床試験における高度変形膝を有する患者には脂肪幹細胞1回注射よりも2回注射が有効である結果をうけて、実際の個々の患者における治療の適応がより明確になる、という点で社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Basic study aimed to investigate the therapeutic effect of heterogeneous cells in adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) on chondrocytes. Chondrocytes (1×10^5 cells) were seeded in culture plates, and co-cultured with SVF (1×10^5 cells) or ADSC (1×10^4 cells) on cell culture inserts. The findings including RT-PCR, immunohistochemical staining of macrophages, and western blotting of smad2/3 pathway suggested that the paracrine effect of heterogeneous cells including anti-inflammatory macrophages in SVF partly supports the regeneration of chondrocytes through TGF- β -induced Smad2/3 phosphorylation. Clinical study aimed to compare the clinical and radiological outcomes between the single and twice SVF cell injection for knee osteoarthritis (OA) patients. . Based on clinical score and MRI findings concluded that the twice injections could be required for satisfactory treatment of patients with severe varus knee alignment.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織から得られる脂肪組織由来再生細胞 (Adipocyte Derived Regenerative Cells; ADRCs, Stromal Vascular Fraction; SVF) や ADRCs を培養することで得られる脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipocyte Derived Stem Cells; ADSCs) は、比較的容易に得られる再生医療の媒体として期待されている。

近年 ADRCs/ADSCs の変形性膝関節症 (膝 OA) 患者への臨床応用が注目を集めており、その有効性の報告も散見されるようになってきている。特に ADRCs は ADSCs やマクロファージを含む複数の細胞で構成される細胞群であるが、脂肪組織の機械的または酵素的処理によって one-step で精製できるため、ADSCs と比較して培養を要さず簡便に分離可能である点で優れている。しかし、ADRCs の膝 OA への作用機序においては不明な点も多く、今後治療拡大を考えると大きな障壁となる可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト ADRCs が膝 OA 軟骨に及ぼす影響について *in vitro* 共培養において分子生物学的に詳細に検討し、膝 OA 患者に対する ADRCs 治療の有効性評価を臨床スコア・MRI にて行い、さらに治療前後における関節液のサイトカインを解析することにより ADRCs の効果を検討することで、ADRCs の膝 OA 治療への有効性とその機序を考察することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

軟骨細胞は膝 OA 患者の切除軟骨組織からコラゲナーゼ処理によって分離した。ADRCs は吸引脂肪組織から酵素処理によって精製し、ADRCs を培養した 4 継代目の細胞を ADSCs とした。Colony forming unit-fibroblast assay を行い、ADRCs に含まれる ADSCs は約 10% と定義した。軟骨細胞を 1×10^5 cells 播種し、インサートを隔てて ADRCs 1×10^5 cells または ADSCs 1×10^4 cells を播種した。48 時間培養後、軟骨細胞の増殖能を WST-8 cell counting kit で評価した ($n = 5$)。軟骨細胞上の Collagen、TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) -3、MMP (matrix metalloproteinases) -13 の発現レベルを RT-PCR 法で評価した ($n = 5$)。培養液中の TGF- β 、IL-10、IL-6、IL-1 の濃度を ELISA 法で評価した ($n = 5$)。ADRCs に含まれる F4/80 陽性細胞の内、CD86 陽性細胞と CD163 陽性細胞の比率について蛍光組織染色法 ($n = 5$) と Flow cytometry ($n = 4$) で評価した。軟骨細胞と ADRCs の共培養に Smad2 リン酸化阻害剤 (SB203580) または Smad3 リン酸化阻害剤 (SIS3) を加え、48 時間培養後に軟骨細胞の Smad2 と Smad3 のリン酸化をウエスタンブロッティング法で評価した ($n = 6$)。同様に Smad リン酸化阻害剤を加えた RT-PCR 法で、Collagen II、TIMP-3、MMP-13 の発現を評価した ($n = 8$)。 1×10^5 cells の軟骨細胞ペレットを作成し、同様の環境下で 3 週間培養後にペレットの大きさを評価し ($n = 5$)、断面をトルイジンブルー染色した。

ADRCs の関節内注射によって治療した内反膝 OA 患者 54 名 (54 膝) を対象とした。初回注射の 1 年後、臨床成績が悪い患者には 2 回目の注射を行い、1 回注射群は 30 名、2 回注射群は 24 名であった。WOMAC スコアを、治療前、初回注射後 3 か月、6 か月、1 年、2 年で評価した。MRI による軟骨の T2 マッピング値を、治療前、初回注射後 1 年、2 年で評価した。術前 hip-knee-ankle (HKA) 角を評価した。

4. 研究成果

ADRCs 群では他群と比較して軟骨細胞の増殖能が上昇しており、RT-PCR 法では軟骨細胞上の Collagen II、TIMP-3 の発現が高く、MMP-13 の発現は低かった。ELISA 法では ADRCs 群の培養液で TGF- β と IL-10 の濃度が高く、IL-6 と IL-1 の濃度が低かった。

蛍光組織染色法および Flow cytometry では ADRCs に含まれる F4/80 陽性細胞の内、CD163 陽性細胞の比率は CD86 陽性細胞の比率よりも高かった (図 1)。

ウエスタンブロッティング法では ADRCs 群で軟骨細胞の Smad2 と Smad3 のリン酸化が認められ、Smad2 リン酸化阻害剤および Smad3 リン酸化阻害剤によってリン酸化は抑制された (図 2)。

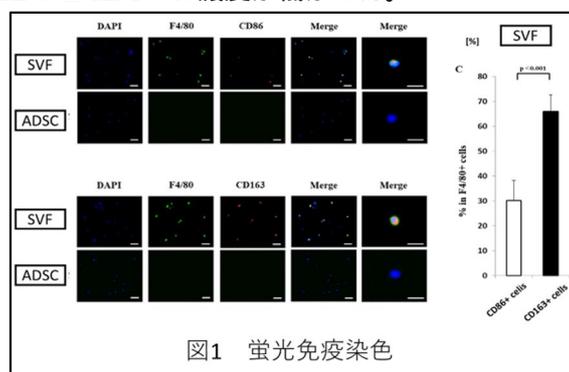


図1 蛍光免疫染色

また、RT-PCR 法では ADRCs 群で認められた Collagen II、TIMP-3 の上昇と、MMP-13 の低下は Smad リン酸化阻害剤によって抑制された (図 3)。

ペレット培養では、ADRCs 群でペレットは大きくなり、Smad リン酸化阻害剤によって抑制された。トリイジンブルー染色ではいずれも良好に染色された。

本研究の結果から、軟骨細胞に対する ADRCs のパラクライン効果には ADSCs 以外の構成細胞も関与しており、特に抗炎症性マクロファージが関与している可能性が示唆された。また ADRCs は TGF- β による Smad2/3 リン酸化を介して、軟骨細胞の再生促進と変性抑制に作用する可能性が示唆された。

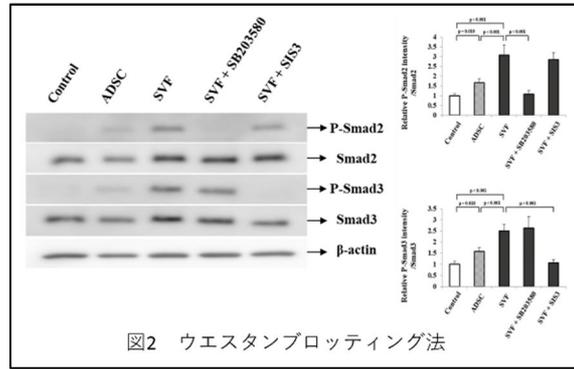


図2 ウェスタンブロッティング法

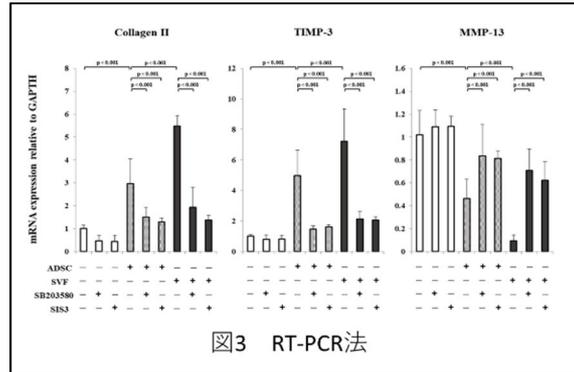


図3 RT-PCR法

WOMAC スコアは 1 回注射群では 3 か月、6 か月、1 年、2 年で有意に改善し、2 回注射群でも 2 年で有意な改善が認められた。1 回注射群は 2 回注射群よりも 3 か月、6 か月、1 年での WOMAC スコアが有意に優れていた (図 4)。

T2 マッピングは両群とも 2 年で有意な改善を認めた (図 5)。また、初回注射後 1 年の大腿骨内側では、1 回注射群の方が 2 回注射群よりも軟骨の状態が優れていた。

術前 HKA 角は 1 回注射群で 185.9°、2 回注射群で 188.1° で有意な差を認め、術前 HKA 角と初回注射後 1 年の WOMAC スコアとの間、および大腿骨内側の T2 マッピング値との間に有意な相関を認めた (図 6)。

本研究の結果から、ADRCs の関節内注射は膝 OA の治療に有効であるが、高度の内反膝では 1 回の注射では不十分である可能性が示唆された。

治療前後での関節液中のサイトカインの計測に関しては検体が十分に収集できず、今後の研究でさらなる機序の解明を行う予定である。

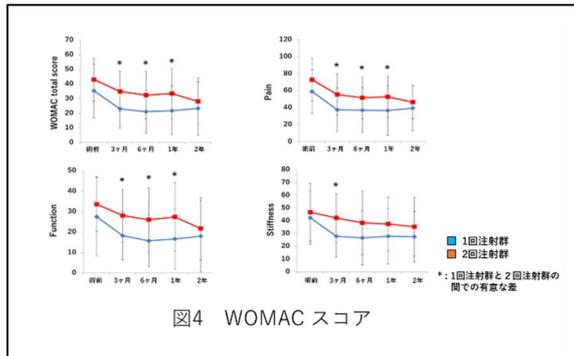


図4 WOMAC スコア

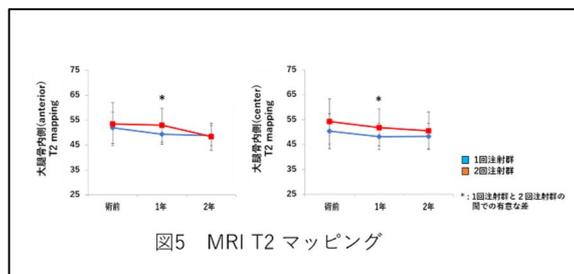


図5 MRI T2 マッピング

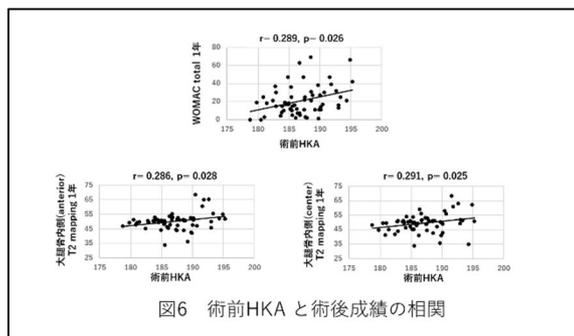


図6 術前HKA と術後成績の相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Masahiro, Matsumoto Tomoyuki, Hayashi Shinya, Hashimoto Shingo, Nakano Naoki, Maeda Toshihisa, Kuroda Yuichi, Takashima Yoshinori, Kikuchi Kenichi, Anjiki Kensuke, Ikuta Kemmei, Onoi Yuma, Tachibana Shotaro, Matsushita Takehiko, Iwaguro Hideki, Sobajima Satoshi, Hiranaka Takafumi, Kuroda Ryosuke	4. 巻 237
2. 論文標題 Paracrine effect of the stromal vascular fraction containing M2 macrophages on human chondrocytes through the Smad2/3 signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 3627 ~ 3639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30823	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田雅広、松本知之、林 申也、松下雄彦、傍島聡、平中崇文、黒田良祐
2. 発表標題 脂肪組織由来間質血管細胞群の軟骨細胞への作用機序の検討
3. 学会等名 中部日本整形外科災害外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田雅広、松本知之、林 申也、中野直樹、前田俊恒、黒田雄一、高島良典、菊池健一、安喰健祐、生田健明、尾ノ井勇磨、立花章太郎、松下雄彦、岩畔英樹、傍島聡、黒田良祐
2. 発表標題 変形性膝関節症に対する 脂肪組織由来間質血管細胞群の関節内注射における1回注射群と2回注射群での治療成績の検討
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田雅広、松本知之、林 申也、中野直樹、前田俊恒、黒田雄一、高島良典、菊池健一、安喰健祐、生田健明、尾ノ井勇磨、立花章太郎、松下雄彦、岩畔英樹、傍島聡、平中崇文、黒田良祐
2. 発表標題 脂肪組織由来間質血管細胞群の軟骨細胞への作用機序の検討
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 壺坂正徳、松本知之、傍島聡、松下雄彦、岩畔英樹、黒田良祐
2. 発表標題 変形性膝関節症に対する脂肪組織由来間質血管細胞群関節内注射の短期成績の報告
3. 学会等名 日本関節病学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	松下 雄彦 (Matsushita Takehiko) (40467650)	神戸大学・医学研究科・特命准教授 (14501)	
研究分担者	松本 知之 (Matsumoto Tomoyuki) (50546588)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	岩畔 英樹 (Iwaguro Hideki) (60366002)	獨協医科大学・医学部・非常勤講師 (32203)	

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