

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10465

研究課題名(和文)変形性関節症の軟骨損傷に対する脂肪由来幹細胞を用いた予防と治療に関する基礎実験

研究課題名(英文)Periodic injections of adipose-derived stem cell sheets inhibit osteoarthritis progression in an experimental rabbit model

研究代表者

加畑 多文(Kabata, Tamon)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：10334749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞は皮下脂肪組織から容易に採取可能で、小侵襲かつ大量に培養できるという利点があるため、臨床応用を目指して様々な研究が行われている。本研究では、セルシート技術を用いて大量の脂肪由来幹細胞を家兔変形性膝関節症モデルに移植することで、軟骨変性に与える影響について検討した。

実験結果から、シート移植により軟骨変性が軽減され、さらに、コラゲナーゼやアグリカナーゼ(組織を破壊する酵素のこと)の発現が有意に抑制されていた。つまり、移植した脂肪由来幹細胞が軟骨基質保護作用を持つ液性因子を分泌し、変形性膝関節症の進行を予防したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) can easily be isolated from subcutaneous adipose tissue and cultured in large quantities with a minimally invasive procedure. So, our study team has investigated them in various fields such as bones, cartilages, peripheral nerves, menisci and ligaments. The purpose of this study was to determine whether intra-articularly injected ADSC sheets inhibited articular cartilage degeneration during osteoarthritis(OA) development in a rabbit anterior cruciate ligament transection (ACLT) model.

Our study showed that the OA progression was milder in the ADSC sheets group. Furthermore, collagenases (MMP-1, MMP-13) and aggrecanase (ADAMTS-4) were less expressive in the same group. So, we suggested that the ADSCs inhibited progression of articular cartilage degeneration by secreting liquid factors having chondro-protective effects. To the best of our knowledge, our study is the first to prove the role of ADSC sheets in the treatment of OA.

研究分野：股・膝関節外科

キーワード：脂肪由来幹細胞 セルシート技術 変形性膝関節症 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は進行する軟骨変性を特徴とし、高齢者の膝や股関節等の下肢荷重関節に好発する。関節軟骨には血管が存在せず、細胞成分に乏しいため、自然治癒は期待できない。我が国では高齢化社会を迎え、変形性膝関節症(膝 OA)の患者は増加の一途であり、健康寿命や医療経済に大きな影響を与えている。膝 OA に対する手術加療は、いくつかの有効な方法が確立しているが、今後は医療経済上、効果的な予防や修復促進による重症化の阻止が求められる。近年は、幹細胞を用いた再生医療がその目的のため注目されている。脂肪組織には間葉系の脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cells: ADSCs) が含まれるが、ADSCs は皮下脂肪組織から容易に採取可能で、他の幹細胞と比較して倫理的問題が少なく、小侵襲かつ大量に培養できるという利点がある<sup>1) 2)</sup>。そのため、我々の研究チームではかねてより、骨、神経、半月板、靭帯といった分野において、ADSCs の臨床応用を目指して研究を行ってきた<sup>3) 4) 5) 6)</sup>。膝 OA に対する ADSCs の効果については、動物の膝 OA モデルに対して、ADSCs を関節内投与することで軟骨変性の改善を認めたとする少数の報告があるが、そのメカニズムについてはほとんど言及されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では膝 OA の軟骨損傷に対し、ADSCs を用いた予防・修復の可能性を検討することを目的とした。単に幹細胞の器官細胞への分化による効果を期待するだけでなく、ADSCs がもつ軟骨基質保護作用 (paracrine effect) に着目し、その効果を増強させることで、予防・修復の効率を増幅できないかと考えた。具体的には、我々の研究室より報告した ADSCs のシート化技術<sup>7)</sup>を用いることで細胞の生存率をあげ、幹細胞性や分化能を維持したまま大量の細胞を移植できるのではないかと考えた。そして ADSCs 移植がより効率よく効果を発揮できる環境や条件を見出すことで、臨床応用に向けての効率化を図ることを最終目的とした。

## 3. 研究の方法

24 匹の日本白色家兔の両膝に、前十字靭帯切離術を施行して膝 OA モデルを作成した。軟骨変性は術後 4 週以降にみられることが過去の報告からわかっている<sup>8)</sup>。

同時に家兔の肩甲間部から採取した脂肪より自家 ADSCs を培養し、over confluent 状態にする。アスコルビン酸を添加し、さらに 1 週間培養することで ADSCs のコラーゲン分泌が増強され、ADSCs シートが完成する<sup>7)</sup>。完成したシートはスクレイパーでシャーレより容易に剥離可能で、PBS で洗浄した後、各種移植に利用できる。シートの強度についてまだ詳細な評価は出来ていないが、5 ml のシリンジでシートを吸引し、14 ゲージ針を用

いて膝関節内へ注射移植した後も、シートの原型は保たれたままであったことを確認している (図 1)。

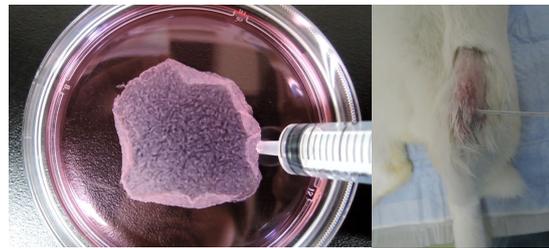


図 1 左: ADSCs シート 右: 14 ゲージ針で関節内注射

OA 変化が起こりはじめる術後 4 週から 1 週おきに関節内注射を行った。右膝には ADSCs シートを (ADSC sheets 群) 左膝には液体窒素処理により ADSCs を死滅させたシートを注射した (コントロール群)。術後 6 週・8 週・10 週・12 週の時点で 6 匹ずつ家兔を安楽死させ、摘出した大腿骨顆部を肉眼的 (India ink 染色、Macroscopic OA score<sup>9)</sup>) 組織学的 (Safranin O 染色、OARSI OA score<sup>10)</sup>) 免疫組織化学的 (MMP-1・13, ADAMTS-4) として DiI labeling で比較検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 肉眼的評価

摘出した大腿骨顆部の軟骨変性 (図 2 白矢印) から、Macroscopic OA score を判定した (図 3)。術後 6 週の Macroscopic OA score は、ADSC sheets 群が 2.2 点、コントロール群が 3.7 点、術後 8 週では、ADSC sheets 群が 2.5 点、コントロール群が 4.2 点、術後 10 週では、ADSC sheets 群が 3.2 点、コントロール群が 5.0 点であり、いずれも ADSC sheets 群で有意に軟骨変性が抑制されていた。術後 12 週でも ADSC sheets 群が 5.3 点、コントロール群が 6.0 点と、ADSC sheets 群で優れている傾向にはあったが、有意差は認めなかった。

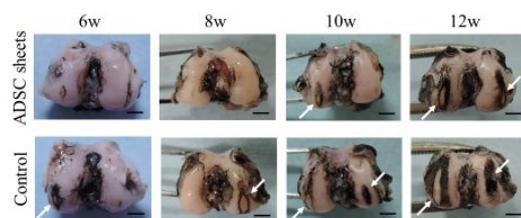


図 2 大腿骨顆部 (India ink 染色)

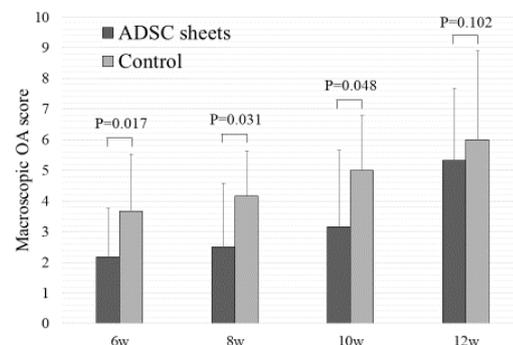


図 3 Macroscopic OA score

## 2) 組織学的評価

軟骨変性部の切片より、OARSI OA score の判定を行った(図4)。術後6週のOARSI OA scoreは、ADSC sheets群が11.5点、コントロール群が19.2点、術後8週ではADSC sheets群が12.2点、コントロール群が22.7点、術後10週ではADSC sheets群が16.8点、コントロール群が27.0点、術後12週ではADSC sheets群が24.7点、コントロール群が31.0点であり、いずれもADSC sheets群で有意に低値を示していた。

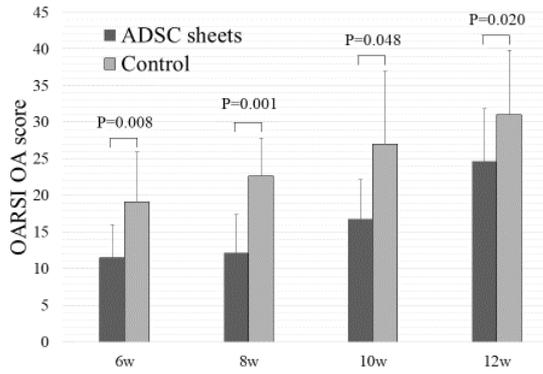


図4 OARSI OA score

## 3) 免疫組織化学的評価

軟骨変性部の切片に免疫染色を行い、陽性細胞数の評価を行った。MMP-1陽性細胞の割合は、ADSC sheets群が36.4%、コントロール群が61.6%(図5)、MMP-13陽性細胞の割合は、ADSC sheets群が17.4%、コントロール群が39.6%(図6)、ADAMTS-4陽性細胞の割合は、ADSC sheets群が31.3%、コントロール群が57.1%であり(図7)いずれもADSC sheets群で有意に発現が抑制されていた。

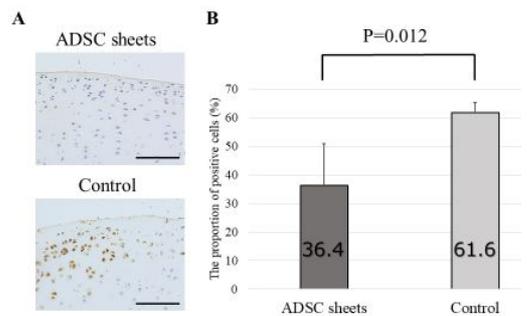


図5 MMP-1

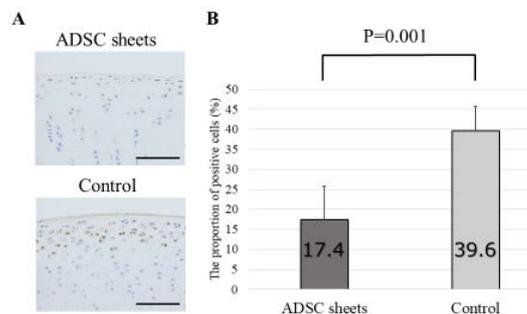


図6 MMP-13

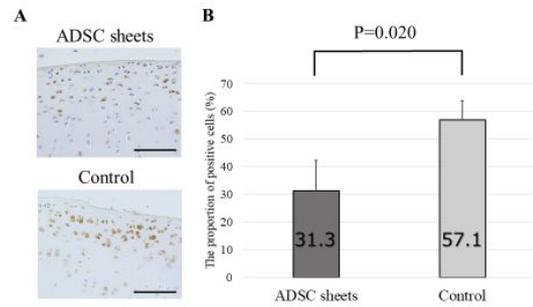


図7 ADAMTS-4

## 4) DiI labeling

DiI labelingによる細胞動態解析では、ADSC sheets群で関節内の滑膜や後方の関節包へ生着したADSCsを認めた(図8 白矢印)。

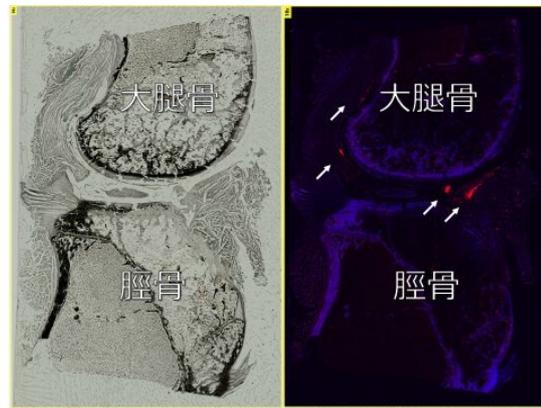


図8 DiI labeling

## < 考察 >

過去の報告によると、セルシートは1型コラーゲンからなる biological scaffold を持つことで、細胞同士の接着を保ち、細胞外基質を損傷することなく移植することが可能とされている<sup>11)12)</sup>。それに伴い、細胞の生存率が上がり<sup>13)</sup>、大量の細胞を移植することができ<sup>14)</sup>、幹細胞性や分化能を維持することが可能<sup>15)</sup>とされている。

ADSCsのOAに対する効果については、家兔<sup>1)16)</sup>、豚<sup>17)</sup>、ラット<sup>18)</sup>等の膝OAモデルに対して、関節内投与を行うことで軟骨変性を抑制したとの報告があるが、そのメカニズムについては議論の分かれるところである。

本研究では、ADSC sheets群でOA変化の進行が抑制されていた。さらに、同群でコラーゲナーゼ(MMP-1・MMP-13)やアグリカナーゼ(ADAMTS-4)の発現が有意に抑制されていた。以上より、ADSCsシート移植により大量のADSCsが関節内の滑膜や靭帯に生着し、軟骨基質保護作用を持つ液性因子を分泌することで、軟骨変性の進行を抑制したと考えられる。

## < 今後の展望 >

本研究では、ADSCsによる膝OAの“予防”について示すことが出来たが、“治療”にまでは至らなかった。膝OAの治療のためには、ADSCsが軟骨に分化し関節面に生着する必

要があると考え、そのためには何らかのサポートが必要と考える。具体的には軟骨への分化誘導をかけた後に、シート化技術を併用すれば、さらに良い成績が得られるのではないかと考えている。

#### <引用文献>

- 1) Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015 Sep 3; 16:236.
- 2) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr; 7(2):211-28.
- 3) Sukanuma S, Tada K, Hayashi K, et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. *J Orthop Sci.* 2013 Jan; 18(1):145-51.
- 4) Nomura I, Watanabe K, Matsubara H, et al. Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation during distraction osteogenesis in rats. *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Dec; 472(12):3798-806.
- 5) Kosaka M, Nakase J, Hayashi K, et al. Adipose-Derived Regenerative Cells Promote Tendon-Bone Healing in a Rabbit Model. *Arthroscopy.* 2016 May; 32(5):851-9.
- 6) Toratani T, Nakase J, Numara H, et al. Scaffold-Free Tissue-Engineered Allogenic Adipose-Derived Stem Cells Promote Meniscus Healing. *Arthroscopy.* 2017 Feb; 33(2):346-354.
- 7) Fang X, Murakami H, Demura S, et al. A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. *PLoS One.* 2014 Feb 19; 9(2):e88874.
- 8) Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, et al. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996 Jun; 4(2):87-98.
- 9) Inoue A, Takahashi KA, Arai Y, et al. The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Arthritis Rheum.* 2006 Jan; 54(1):264-70.
- 10) Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Jan; 14(1):13-29.
- 11) Wei F, Qu C, Song T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol.* 2012 Sep; 227(9):3216-24.
- 12) Kato Y, Iwata T, Morikawa S, et al. Allogeneic Transplantation of an Adipose-Derived Stem Cell Sheet Combined With Artificial Skin Accelerates Wound Healing in a Rat Wound Model of Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes.* 2015 Aug; 64(8):2723-34.
- 13) Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, et al. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cadiovasc Res.* 2011 Aug 1; 91(3):483-91.
- 14) Ishida O, Hagino I, Nagaya N, et al. Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy in a porcine model of chronic heart failure. *Transl Res.* 2015 May; 165(5):631-9.
- 15) Yu J, Tu YK, Tang YB, et al. Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials.* 2014 Apr; 35(11):3516-26.
- 16) Desando G, Cavallo C, Sartoni F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther.* 2013 Jan 29; 15(1):R22.
- 17) Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One.* 2017 Apr 18; 12(4):e0176107.
- 18) Sato M, Uchida K, Nakajima H, et al. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012 Feb 7; 14(1):R31.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

高木 知治, 前田亨, 大森 隆昭, 土屋 弘行

CS型TKAにおいてインサートが前後安定性に与える影響 - KS measure®(十字靭帯機能検査機器)を用いた屍体研究 - . *JOSKAS* 42: 264-265, 2017.

高木 知治, 加畑 多文, 梶野 良知, 井上大輔, 山本 崇史, 大森 隆昭, 土屋 弘行  
変形性股関節症に対するエコーガイド下関節内ステロイド投与の臨床効果. *Hip Joint* 43: 995-997, 2017.

Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, Maeda T, Kajino Y, Iwai S, Fujita K, Hasegawa K, Inoue D, Sugimoto N, Tsuchiya H.

The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015 Sep 3; 16:236.  
DOI: 10.1186/s12891-015-0701-4.

Kabata T, Maeda T, Kajino Y, Hasegawa K, Inoue D, Yamamoto T, Takagi T, Ohmori T, Tsuchiya H.

Iodine-Supported Hip Implants: Short Term Clinical Results  
*Biomed Res Int.* 2015; 2015:368124.

DOI: 10.1155/2015/368124.

〔学会発表〕(計3件)

Takagi T, Kabata T, Kajino Y, Taga T, Inoue D, Yamamoto T, Ohmori T, Yoshitani J, Ueno T, Tsuchiya H  
Periodic injections of adipose-derived stem cell sheets inhibit osteoarthritis progression in an experimental rabbit model.  
AAOS 2018 annual meeting (2018年国際学会)

高木 知治, 加畑 多文, 林 克洋, 楯野 良知, 多賀 正, 井上 大輔, 山本 崇史, 大森 隆昭, 吉谷 純哉, 上野 琢郎, 土屋 弘行  
脂肪由来幹細胞シートによる軟骨保護効果-家兔変形性膝関節症モデルにおける検討-  
第32回 日本整形外科学会基礎学術集会(2017年)

Takagi T, Kabata T, Kajino Y, Taga T, Hasegawa K, Inoue D, Yamamoto T, Ohmori T, Yoshitani J, Ueno T, Tsuchiya H  
Periodic Injections Of Adipose-Derived Stem Cells Sheet Inhibit Osteoarthritis Progression In An Experimental Rabbit Model.  
18<sup>th</sup> EFORT Congress (2017年国際学会)

〔図書〕(計3件)

加畑 多文: 自己血輸血. 今日の整形外科治療指針第7版. 18-19 (土屋弘行・紺野慎一・田中康仁・田中栄・松田秀一編: 医学書院, 東京, 2016)

加畑 多文: 人工股関節全置換術後の大腿骨骨折. 今日の整形外科治療指針第7版. 754-755 (土屋弘行・紺野慎一・田中康仁・田中栄・松田秀一編: 医学書院, 東京, 2016)

加畑 多文, 高木 知治: 身体障害者手帳・身体障害者認定等. 第8章 医療文章を書く. 膠原病・リウマチ・アレルギー研修ノート. 131-133 (上阪等・渥美達也・亀田秀人・中島裕史・藤本学・山口正雄編: 診断と治療社, 東京, 2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

**6. 研究組織**

(1)研究代表者

加畑 多文 (KABATA, Tamon)

金沢大学・附属病院・准教授  
研究者番号: 10334749

(2)研究分担者

高木 知治 (TAKAGI, Tomoharu)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号: 40749173

林 克洋 (HAYASHI, Katsuhiko)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号: 80507054

方 向 (HOU, Kou)  
金沢大学・医学系・博士研究員  
研究者番号: 20750350

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし