

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11022

研究課題名(和文)スフェロイド型脂肪由来幹細胞を用いたの新規関節炎治療法の開発

研究課題名(英文)Local transplantation of adipose-derived stem cells has a significant therapeutic effect in a mouse model of rheumatoid arthritis

研究代表者

真本 建司(Mamoto, Kenji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：10789936

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)：関節リウマチに対する新たな局所的治療として、脂肪由来幹細胞の膝関節注射の効果を検証した。リウマチモデルのマウスに対して実施した脂肪由来幹細胞の膝関節注射では、治療後の膝組織を観察すると関節炎の改善が認められた。さらに、マウス由来の脂肪由来幹細胞を、関節炎の主な原因となる滑膜細胞に対して、シャーレ内にて共培養すると滑膜細胞の増殖能および遊走能は抑制された。すなわち、滑膜細胞由来の関節炎を、脂肪由来幹細胞は制御できる可能性を示した。脂肪由来幹細胞はスフェロイド化すると抗炎症作用サイトカインのTSG-6を多く発現することもPCR法にて示した。ADSCスフェロイドは関節炎治療において有用な手段となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは滑膜増殖を病変の主座とする全身性の関節炎であり、本邦においては約70万人の患者数が存在するといわれる。治療は薬物の全身投与が主なものであるが、副作用が比較的少ないと考えられる局所投与による治療が望まれている。しかし有効な方法は未だ確立していない。そこで我々は、今回精製脂肪由来幹細胞の関節内投与における関節炎抑制効果を検討することとした。本研究の手法での関節炎治療効果が証明されれば、簡便に採取する事が可能な脂肪由来幹細胞の局所投与は、有効で安全な関節炎治療法への基礎となる可能性がある。本研究で示した、脂肪由来幹細胞の局所投与による関節炎抑制効果はその臨床応用への根拠となりえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effectiveness of adipose-derived stem cell (ADSC) for rheumatoid arthritis (RA) mice model. Intra-articular injection of ADSC demonstrated suppression of inflammation in the RA mice knees. The co-culture of mice ADSC and inflammatory synovial cells also showed therapeutic effects on inflammation. The adding of ADSC suppressed cell-proliferation and migration of synovial cells. The spheroid ADSC expressed higher level of TSG-6, anti-inflammatory cytokine, than the ADSC single cells. ADSC, especially ADSC spheroid, can be useful to treat the arthritis.

研究分野：整形外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞 関節リウマチ 組織修復 抗炎症作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ患者は本邦に約70万人程度存在するとされているが、その治療方法は薬物の全身投与が基本的なものである。副作用の観点や、患者因子により治療薬全身投与が難しい症例も存在する。関節リウマチに対する効果的な局所的治療(関節注射など)の開発が重要であるものの、局所的治療で十分な治療効果のある方法は確立されていなかった。

(2) 脂肪由来幹細胞は、整形外科領域以外では、特に再生医療領域で有効な治療効果が報告されていた。その治療効果の主体は間葉系幹細胞の働きとされる疾患障害部位の微細環境を整え、組織修復や抗炎症作用を促進させるからであると考えられてきた。しかし脂肪由来幹細胞を関節リウマチの治療として応用された研究は渉猟し得る限りなかった。

2. 研究の目的

(1) 我々は、脂肪由来幹細胞の抗炎症作用に特に注目した。関節内滑膜炎が病態の中心である関節リウマチに対しても脂肪由来幹細胞は好ましい治療効果をもたらすと仮説を立てた。脂肪由来幹細胞の全身投与に関しては、細胞の血管内注射に伴う作用に関して、副作用・倫理的な観点から臨床応用に関して疑問点があり、採用しなかった、より臨床応用に近く、より需要のある脂肪由来幹細胞の局所投与における炎症抑制効果をみることを研究の第1の目的とした。

(2) 関節リウマチは、関節内での滑膜炎が持続することで破骨細胞などを惹起させ軟骨の破壊も進行させる。変形性関節症が最も罹患数が多い関節破壊を伴う疾患であるが、関節リウマチでも同様に関節軟骨は損傷される。脂肪由来幹細胞の過去に報告されてきた組織修復能は、関節面、すなわち関節軟骨の破壊も修復する効果を併せ持つ可能性がある。そのため、関節リウマチに対する治療効果の検証に、抗炎症作用のみならず関節軟骨の状態も評価することを第2の目的とした。

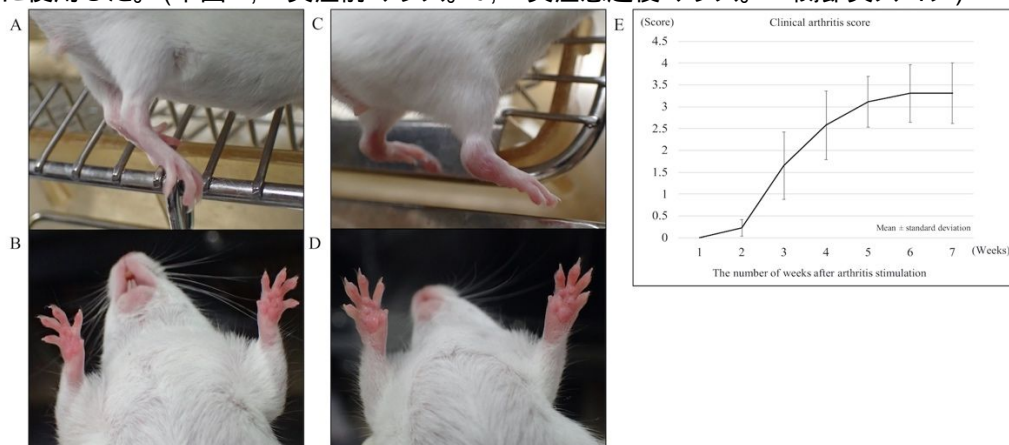
3. 研究の方法

(1) 動物実験モデルとして、過去に関節リウマチ疾患として確立されている SKG マウスを用いた。遺伝子ミュータントマウスであり、ラミナリンなどの外部刺激を加えると自己免疫が惹起されて、関節リウマチに酷似した病態を再現することが可能である。このマウスを用いて、脂肪由来幹細胞を同種マウスから作成し、膝関節内に注射し2週間後の膝関節を組織学的に評価することで治療効果を見た。組織学的評価としては HE 染色、safranin-O 染色、F4/80 染色、CD4 染色を実施した。関節内投与としては、通常の脂肪由来幹細胞の細胞懸濁液、脂肪由来幹細胞を3次元培養した細胞塊であるスフェロイド、比較のためのコントロール(細胞なし)の3種類を用いた。これらで比較し、治療効果を評価した。

(2) 細胞実験として、脂肪由来幹細胞を動物実験同様、細胞懸濁液 or スフェロイドに区別して評価した。関節リウマチの炎症の原因である滑膜細胞に対する治療的効果を検証するために、脂肪由来幹細胞を炎症を惹起させた滑膜細胞と共培養し、滑膜細胞の遊走能および増殖能を評価した。遊走能は transwell membrane が付属したチャンバーを用意し、微細孔を超えて郵送してくる細胞数をカウントした。増殖能は CCK-8 キットを用いて吸光度で増殖能として評価した。さらに、細胞の遺伝子発現を評価するために RT-PCR を行い、脂肪由来幹細胞の遺伝子発現、及び脂肪由来幹細胞の治療効果を検証するため、脂肪由来幹細胞で治療した炎症刺激後マクロファージの炎症性サイトカインの発現を評価した。

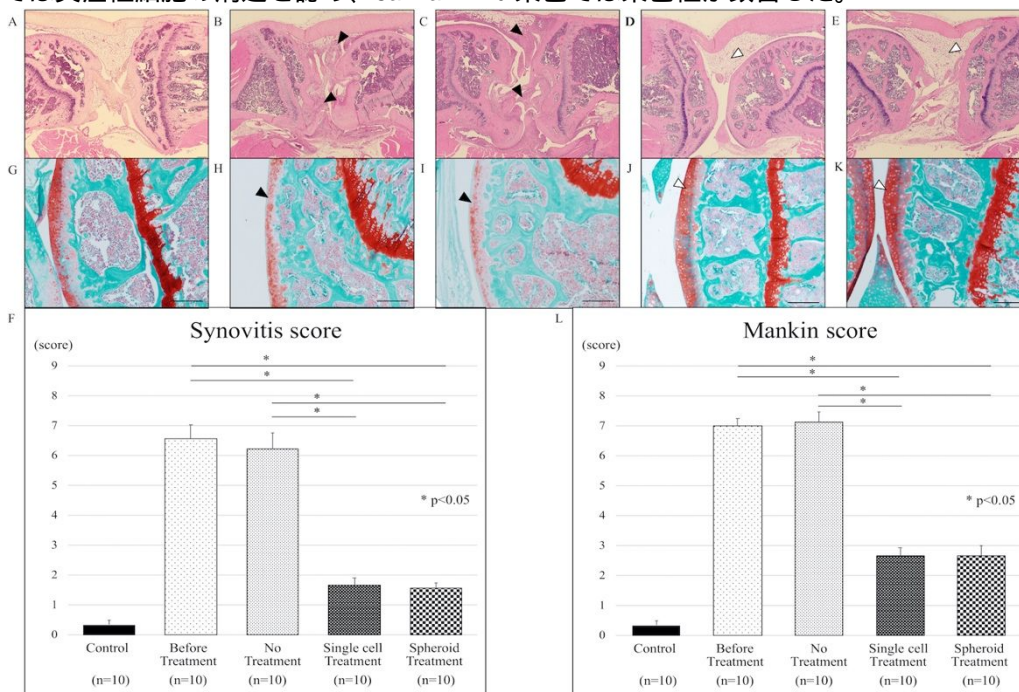
4. 研究成果

(1) 炎症を惹起させた SKG マウスは、過去の報告通り、四肢関節の腫脹及び発赤を認めた。外観上の腫脹をスコアリングした関節炎スコアを採点し、一定の炎症を超えたマウスを動物実験に使用した。(下図 A,B 炎症前マウス。C,D 炎症惹起後マウス。E 関節炎スコア)

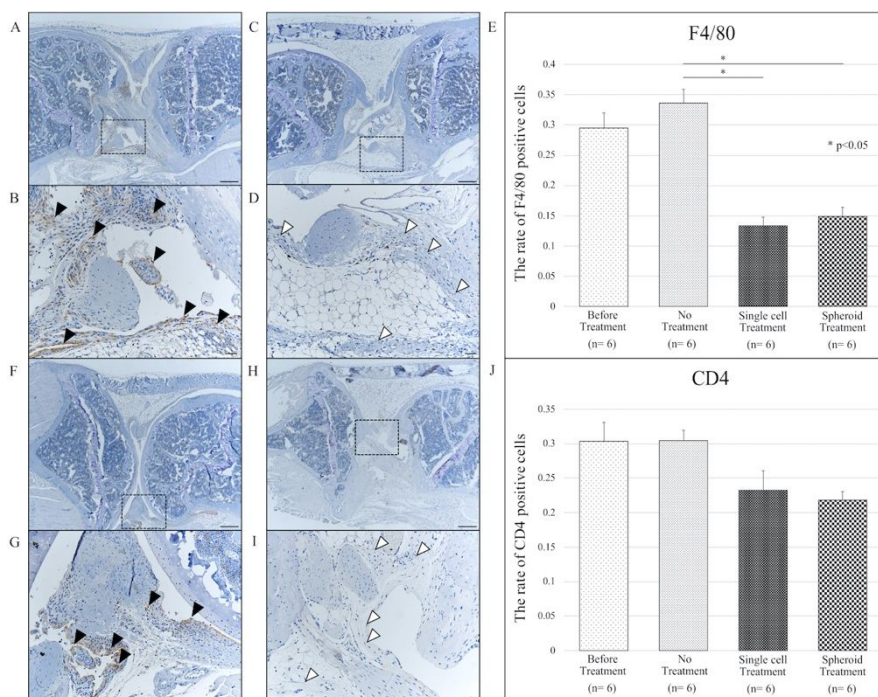


(2) 炎症を惹起させたマウスに脂肪由来幹細胞を両膝の関節内に注射し(1×10^4 cells/膝 or スフェロイド 1000 個/膝)、2週間後に犠牲死させ膝組織を回収し、その組織を HE 染色及び

Safranin-O染色で評価。HE染色は滑膜炎スコアを定量的評価し、Safranin-O染色はMankin scoreを定量的評価した。(下図 A,G 無刺激マウス、B,H 炎症惹起マウス C,I 炎症後・無治療マウス D,J 脂肪由来幹細胞(細胞懸濁液)治療後マウス E,K 脂肪由来幹細胞(スフェロイド)治療後マウス F 滑膜炎スコア L Mankin score) 炎症惹起後マウス膝組織は炎症性細胞の増生が認められたが、脂肪由来幹細胞で治療すると細胞懸濁液もしくはスフェロイドどちらであっても HE 染色では炎症性細胞の消退を認め、Safranin-O 染色では染色性が改善した。

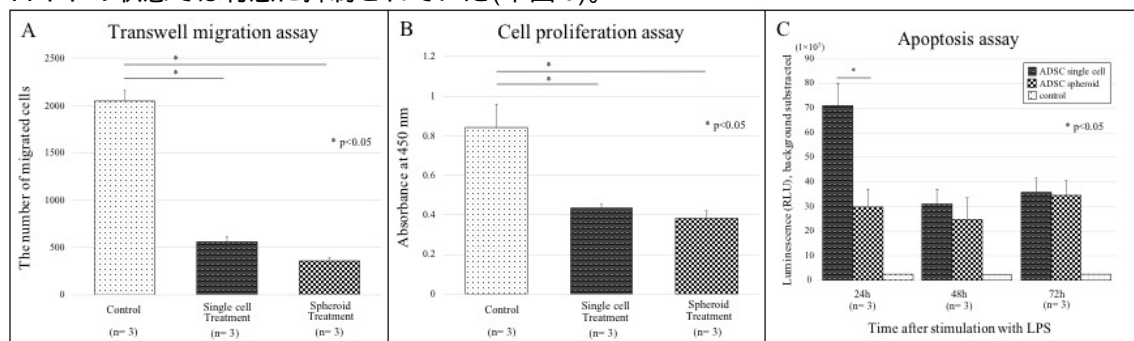


(3) 同様に、脂肪由来幹細胞で治療した膝組織を F4/80 および CD4 で免疫染色を実施した。F4/80 陽性細胞の数は脂肪由来幹細胞で治療した後、減少していた。脂肪由来幹細胞による炎症性細胞(マクロファージおよび T 細胞)の関節内遊走の抑制が示唆された。(下図 A,B F4/80 免疫染色 炎症刺激後に F4/80 陽性細胞を認める C,D 脂肪由来幹細胞治療後には陽性細胞が減少 F,G CD4 免疫染色 炎症刺激後に CD4 陽性細胞を認める H,I 脂肪由来幹細胞治療後には陽性細胞が減少 E 定量評価にて統計学的有意差をもって陽性細胞が減少した)

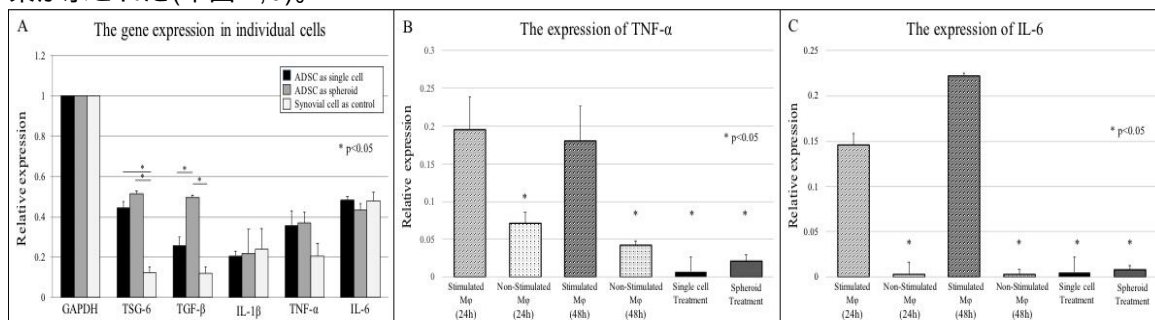


(4) 滑膜細胞の遊走能および増殖能に対する、脂肪由来幹細胞の治療的効果の評価を行った。さらに脂肪由来幹細胞の形状(細胞懸濁液 or スフェロイド)別のアポトーシスの比較を実施した。脂肪由来幹細胞を共培養することで、炎症惹起させた滑膜細胞の遊走能は細胞懸濁液およびス

フェロイドでもコントロールに比べ有意に抑制された。細胞懸濁液とスフェロイドでの差はなかった(下図 A)。滑膜細胞の増殖能も、脂肪由来幹細胞で共培養することで、コントロールに比べ有意に抑制された(下図 B)。脂肪由来幹細胞のアポトーシスは、細胞懸濁液の状態よりスフェロイドの状態では有意に抑制されていた(下図 C)。



(5) 脂肪由来幹細胞の発現遺伝子、および炎症刺激後のマクロファージと脂肪由来幹細胞を共培養させた後のマクロファージ由来の炎症性サイトカインを RT-PCR で評価。脂肪由来幹細胞由来遺伝子は、抗炎症性サイトカインである TSG-6 が多く発現しており、特にスフェロイドでは細胞修復に参与する TGF- β が多く発現していた(下図 A)。マクロファージを炎症刺激させた後に脂肪由来幹細胞を共培養させると、マクロファージ由来の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6)は有意に治療前に比べ減少していた。かつ無治療の場合は減少を認めず、脂肪由来幹細胞の治療効果が示された(下図 B,C)。



< 引用文献 >

1. Keystone, E. C. et al. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum.* 50, 400-11 (2004).
2. Nam, J. L. et al. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1113-36 (2017).
3. Miyazaki, Y. et al. Dexamethasone inhibition of TGF beta-induced cell growth and type II collagen total RNA expression through ERK-integrated AP-1 activity in cultured rat articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartilage.* 8, 378-85 (2000).
4. Baer, P. C. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J. Stem Cells.* 6, 256-65 (2014).
5. Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* 45, e54 (2013).
6. Takeda, K. et al. Mesenchymal Stem Cells Recruit CCR2. *J. Immunol.* 200, 1261-9 (2018).
7. Zheng, C. X. et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy. *Sci. Rep.* 8, 5215 (2018).
8. Yan^{ez}, R. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells.* 24, 2582-91 (2006).
9. Choi, E. W. et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum.* 64, 243-53 (2012).

10. Choi, E. W. et al. Effects of Transplantation of CTLA4Ig-Overexpressing Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Mice With Sustained Severe Rheumatoid Arthritis. *Cell. Transplant.* 25, 243-59 (2016).
11. Zhang, L. et al. Use of immune modulation by human adipose-derived mesenchymal stem cells to treat experimental arthritis in mice. *Am. J. Transl. Res.* 9, 2595-607 (2017).
12. González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D. & Delgado, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 60, 1006-19 (2009).
13. Lopez-Santalla, M. et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate experimental autoimmune arthritis by inducing an early regulatory innate cell signature. *Immun. Inflamm. Dis.* 4, 213-24 (2016).
14. Yan, M. et al. Intra-Articular Injection of Human Synovial Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells in Murine Collagen-Induced Arthritis: Assessment of Immunomodulatory Capacity In Vivo. *Stem Cell. Int.* 2017, 9198328 (2017).
15. Ozeki, N. et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthr. Cartilage.* 24, 1061-70 (2016).
16. Zhou, Y., Chen, H., Li, H. & Wu, Y. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 1073-84 (2017).
17. Sakaguchi, N. et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 426, 454-60 (2003).
18. Hata, H. et al. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 114, 582-8 (2004).
19. Kobayashi, K. et al. Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis. *Inflamm. Res.* 55, 335-41 (2006).
20. Bárdos, T., Kamath, R. V., Mikecz, K. & Glant, T. T. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am. J. Pathol.* 159, 1711-21 (2001).
21. Mittal, M. et al. TNF -stimulated gene-6 (TSG6) activates macrophage phenotype transition to prevent inflammatory lung injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E8151-E8158 (2016).

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 1件）

1. 著者名 Ueyama Hideki, Okano Tadashi, Orita Kumi, Mamoto Kenji, Sobajima Satoshi, Iwaguro Hideki, Nakamura Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Local transplantation of adipose-derived stem cells has a significant therapeutic effect in a mouse model of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 対応なし(電子公開)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60041-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上山秀樹、岡野匡志、荻久美、中村博亮
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞のリウマチ性関節炎モデルマウスに対する関節炎抑制効果の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadashi Okano, Kentaro Inui, Hideki Ueyama, Kumi Orita, Tatsuya Koike and Hiroaki Nakamura
2. 発表標題 Adipose Derived Stem Cell Suppressed Synovial Inflammation and Repaired Cartilage Destruction in Rheumatoid Arthritis Model Mice
3. 学会等名 American College of Rheumatology/ARHP Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上山秀樹、岡野匡志、荻久美、中村博亮
2. 発表標題 マウス由来脂肪由来幹細胞の滑膜細胞に対する抗炎症作用の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2019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	乾 健太郎 (Inui Kentaro) (00291592)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	伊井 正明 (Ii Masaaki) (10442922)	大阪医科大学・研究支援センター・講師 (34401)	削除：2019年9月13日
研究分担者	折田 久美 (荻久美) (Orita Kumi) (40748597)	大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員 (24402)	
研究分担者	岡野 匡志 (Okano Tadashi) (50754826)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	