

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月20日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16676

研究課題名(和文) ヒト滑膜幹細胞の関節リウマチにおける病態への関与および特性の解明

研究課題名(英文) Analysis of human synovial mesenchymal stem cell in rheumatoid arthritis patients

研究代表者

小田邊 浩二 (OTABE, Koji)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：70737288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ由来の滑膜幹細胞について、変性性膝関節症由来の滑膜幹細胞と比較し、増殖能・分化能・表面抗原プロファイルの評価を行った。結果、関節リウマチ由来滑膜幹細胞は変形性膝関節症由来滑膜とほぼ同等の増殖能を有し、コロニー形成能、分化能、表面抗原発現パターンも類似していた。また、関節リウマチも変形性膝関節症と浮遊滑膜培養モデルにおいて滑膜幹細胞のコロニー形成能および細胞の性質の違いについて検討した。収量の検体間差が関節リウマチ群で大きかった一方で、平均収量、軟骨分化能、表面抗原については差を認めなかった。成果は査読付きの国際雑誌に2編原著論文として採択された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症および関節リウマチ症例の滑膜幹細胞の増殖能・分化能の違いを明らかにすることが、関節リウマチにおける滑膜炎による関節破壊の病態生理の解明や滑膜幹細胞による再生医療の安全性と治療効果を増幅させる手法の開発に有用である。また関節リウマチ患者に滑膜幹細胞治療を応用する道を開くだけでなく、既存の対象患者に対する移植医療においても培養滑膜幹細胞の品質評価や細胞収量および分化能・移植後の拒絶・炎症反応等、安全性の問題の解決につながる。さらに、幹細胞の増殖・分化を促すサイトカインの解明は、炎症時の滑膜間葉系幹細胞の挙動解明の助力となり、さらには関節内組織損傷における自然治癒過程の解明にも役立つ。

研究成果の概要(英文)：Synovial mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis patients osteoarthritis patients had similar proliferation property, colony formation property, differentiation capacity, and surface antigen profiles. In suspended synovial tissue culture model, synovial mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis patients and osteoarthritis patients had similar average cell yield, cartilage differentiation property and surface antigen profile, though the cell yield variation was larger among rheumatoid arthritis than osteoarthritis. Both results were reviewed and accepted in the international scientific journal.

研究分野：整形外科

キーワード：再生医療 滑膜幹細胞 増殖能 分化能

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

1. 研究開始当初の背景

関節症は関節痛や運動制限をもたらす生活の質に直結する。関節症の医療費は2兆3000億円に達する。また近年の統計では要介護となる最大要因が運動器疾患由来となっており、心疾患や脳血管障害、がんによるものを超えている。中でも関節症は要介護要因の10%を占めている。関節症に対する根治的な治療法は高額な人工関節置換術以外に無いのが現状で、再生医療の開発が最も期待される分野の一つである。

滑膜は関節腔を覆う膜であり、関節腔の内部は滑膜細胞が分泌する関節液で満たされている。関節症で障害される軟骨・半月板は再生能が低いのにに対し、滑膜組織は再生能が高い。これは滑膜組織中にコロニー形成能、多分化能を示す滑膜間葉系幹細胞が豊富に存在し、恒常性の維持と組織損傷時の自然修復に寄与するためと考えられている。

申請者はこれまで滑膜由来の未分化な滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植すると軟骨・半月板が再生することを報告し(Koga, Cell Tissue Res, 2008, Horie, Stem Cells, 2009)、2008年以降、軟骨欠損や半月板損傷に対し、自己血清で2週間培養した滑膜間葉系幹細胞を関節鏡視下で移植する臨床試験を開始している。移植の結果、多くの症例で自覚症状および画像所見上改善を見ており、関節症に見られる難治性の軟骨・半月板欠損に対して根治的かつ極めて有効な治療法となる可能性が示されている。

一方で関節リウマチにおいては、病的に増殖した滑膜が骨軟骨破壊に関与していることが示されており(McInnes IB, N Engl J Med. 2011)、その機序としてIL-1b、IL-6、TNF等の炎症性サイトカインが滑膜から分泌され、マクロファージ、好中球、マスト細胞、破骨細胞が関与し、病的滑膜の増殖、プロテアーゼ等マトリクス分解酵素の産生促進が起こることが挙げられている。

しかし、滑膜細胞による関節再生・関節破壊の相反する生理作用をスイッチング制御するメカニズムについては殆ど解明されておらず、そのことが関節リウマチの病因病態の解明や再生医療の適応拡大を行う上で解決すべき課題となっている。

これまでの研究成果として、申請者はH27-28に科研費の助成を受けた研究課題「ヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能を維持したまま増殖を促す培養法の確立」の成果として、滑膜間葉系幹細胞のサイトカインに対する反応性を網羅的に解析し、候補となるサイトカインの候補を絞り込み、特にIL-1b、FGF-2、TGFb、PDGF等のサイトカインが滑膜間葉系幹細胞の遊走能、増殖能、分化能に与える影響を示した。

具体的には、滑膜間葉系幹細胞はIL-1b存在下で活発に増殖しかつ多分化能は保持されること、また滑膜間葉系幹細胞はFGF受容体を有し、FGF-2存在下で滑膜間葉系幹細胞は濃度依存性に増殖し、かつ多分化能を保持していることを成果として示してきた。

本研究ではこれらの解析結果を推し進めて変形性膝関節症および関節リウマチ患者由来の滑膜間葉系幹細胞の比較を行う。具体的には前研究課題で得られた知見に基づき、滑膜間葉系幹細胞の挙動の違いや多分化能の差異等を評価する。

本研究の進展により、滑膜炎を伴う関節リウマチで関節破壊の病態生理に滑膜間葉系幹細胞が関与する仕組みの解明や、滑膜間葉系幹細胞による再生医療の安全性と治療効果を増幅させる手法の開発、関節リウマチにおいて、滑膜間葉系幹細胞をターゲットとした新薬の開発等に結び付くと見込まれる。

関節リウマチ膝における滑膜の先行研究は存在するが、我々は正常膝、外傷膝、変形性膝関節症膝の滑膜間葉系幹細胞の基礎研究および臨床応用に関して豊富な知見と実績をもっており、なおかつ滑膜間葉系幹細胞の観点から関節リウマチの病態解明および治療法探索に踏み込む先行研究は殆どないのが現状であり、本研究の新規性・独創性は極めて高い。

また、これまで開発されてきた滑膜間葉系幹細胞を用いた再生医療の適応は外傷・初期変形性膝関節症における軟骨・半月板損傷と限られており、滑膜に関節破壊の原因となる炎症の主座がある関節リウマチについては、再生医療を必要とする運動機能の低下がありながら滑膜間葉系幹細胞利用の有効性や安全性について、未解決の課題を残している。

本研究が進展することにより、自家軟骨移植や骨髄間葉系幹細胞移植といった他の再生医療でも解決をみていない、関節リウマチ患者に滑膜間葉系幹細胞治療を応用する道を開くだけでなく、既存の対象患者に対する移植医療においても培養滑膜間葉系幹細胞の品質評価や細胞収量および分化能・移植後の拒絶・炎症反応等、安全性の問題の解決につながり、引いては万人に適応可能となる運動器再生医療の確立が期待できる。

2. 研究の目的

滑膜間葉系幹細胞は増殖・軟骨分化能が高く、私たちは2008年から滑膜間葉系幹細胞を用いた軟骨・半月板再生を目的とする再生医療の臨床研究を実施し、その安全性と有効性を示してきた。一方で関節リウマチにおいて、異常増殖した滑膜は関節炎の主座となり、炎症性サイトカインやプロテアーゼの産生等を介して関節リウマチにみられるような骨軟骨組織のびらん、破壊の病態に寄与していると考えられている。

本研究の目的は変形性膝関節症および関節リウマチ症例の滑膜間葉系幹細胞の遺伝子・タンパク発現プロファイルや増殖能・分化能の違いを明らかにすることであり、これによって関節リウマチにおける滑膜炎による関節破壊の病態生理の解明や滑膜間葉系幹細胞による再生医療の安全性と治療効果を増幅させる手法の開発に貢献することである。

3. 研究の方法

変形性膝関節症および関節リウマチ患者由来の滑膜間葉系幹細胞の増殖能と軟骨分化能の違いを評価する。また促進するサイトカインおよび培養環境の最適化を通じて、滑膜間葉系幹細胞の特性に基づいた革新的な再生医療技術を開発する。具体的には 1. 関節リウマチ由来の滑膜間葉系幹細胞の増殖・軟骨分化能の評価、2. 関節リウマチ由来の滑膜間葉系幹細胞の遺伝子発現および表面抗原発現プロファイルの評価といった課題を達成する。

4. 研究成果

関節リウマチ由来の滑膜間葉系幹細胞について、変形性膝関節症由来の滑膜間葉系幹細胞と比較し、増殖能・分化能・表面抗原プロファイルの評価を行った。

人工膝関節置換術中に得られる関節リウマチ関節液および滑膜を使用した(n=10)。関節液は 1.5ml を 4 倍希釈して 1.0ml ずつ 60cm² dish-6 枚に播種、滑膜は酵素処理後の有核細胞を 10⁴ 個ずつ 60cm² dish-6 枚に播種した。それぞれ 14 日間培養し、3 枚を crystal violet 染色でコロニー形成を確認し、残りの 3 枚の細胞数を評価した後、継代して多分化能と表面抗原を解析した。

結果、14 日間培養後、関節液および滑膜由来の回収細胞はいずれもコロニーを形成した。関節液 1ml あたりの回収細胞数は $6.9 \pm 4.8 (\times 10^5)$ 個/ml で、滑膜有核細胞を 1dish あたり 10⁴ 個ずつ播種した場合の回収細胞数は $5.4 \pm 1.0 (\times 10^5)$ 個/dish (n=10) であった。各々の回収細胞数の関連を解析すると、両者は正の相関を示した(R²=0.64)。また両者とも回収細胞は多分化能を有し、表面抗原マーカーも滑膜間葉系幹細胞と一致した。

まとめると、関節リウマチ由来滑膜間葉系幹細胞は変形性膝関節症由来滑膜とほぼ同等の増殖能を有し、コロニー形成能、分化能、表面抗原発現パターンも類似していた。

変形性膝関節症膝と同様に、炎症がコントロールされた関節リウマチ膝も滑膜間葉系幹細胞による軟骨・半月板再生医療の適応になりうるが、収量のばらつきが問題であった。本研究で、関節液中の滑膜間葉系幹細胞収量が、滑膜幹細胞収量の指標になると考えられた。培養期間や継代数を事前に調整することにより、関節リウマチ膝の滑膜から十分な細胞数の確保が可能になる。成果は査読付きの国際雑誌に原著論文として採択された(Stem Cell Res Ther.) (2017)。

また、膝関節液中の滑膜間葉系幹細胞の動態について、われわれは半月板や靭帯損傷膝では滑膜から滑膜間葉系幹細胞が関節液中に動員され修復に寄与することを報告した。この動態を実証すべく、培養液を満した滅菌ボトル内に浮遊させた滑膜から静置したディッシュ上に滑膜間葉系幹細胞のコロニー形成を検証するための浮遊滑膜培養モデルを考案し、変形性膝関節症でこれを示した。

本研究では関節リウマチでも変形性膝関節症と同様に本モデルで滑膜間葉系幹細胞のコロニーが形成されるのか、また形成されるのであれば得られた滑膜間葉系幹細胞に変形性膝関節症との違いがあるのか、について検討した。

具体的には関節リウマチ(n=8)および変形性膝関節症(n=6)の人工膝関節置換術後に得られる滑膜を使用し、本モデルを作成した。各検体 6 ボトルずつ培養し、7 日間培養した 3 ボトルにてコロニー形成を評価、14 日間培養した別の 3 ボトルにて、細胞数を評価後、多分化能および表面抗原を比較検討した。結果、7 日間培養後、変形性膝関節症ではすべてコロニー形成良好であったのに対し関節リウマチでは形成不良な検体も認められた。14 日間培養後の滑膜 1g あたりの収量は関節リウマチ $260 \pm 200 (\times 10^3)$ 個、変形性膝関節症 $240 \pm 70 (\times 10^3)$ 個で有意差はなかった(p=0.95)。関節リウマチ群では検体間差が大きかった(F 検定、p=0.02)。継代して増殖させた細胞は、軟骨分化、脂肪分化、石灰化、それぞれ両群とも良好で、軟骨ペレットの湿重量は関節リウマチ 4.6 ± 1.1 mg、変形性膝関節症 4.4 ± 0.9 mg で有意差はなかった(p=0.53)。また表面抗原も、CD44、CD73、CD90、CD105、CD45 の発現率は同等であった。

まとめると、関節リウマチでも変形性膝関節症と同様に浮遊滑膜培養モデルで滑膜間葉系幹細胞のコロニーが形成され、損傷時など自然修復機構が働くことが示唆された。収量の検体間差が関節リウマチ群で大きかった一方で、平均収量、軟骨分化能、表面抗原については差を認めなかった。

われわれは以前の研究で初代滑膜間葉系幹細胞の収量、軟骨分化能が関節リウマチと変形性膝関節症で同等であったと報告したが、本研究はそれを支持する結果となった。関節リウマチも変形性膝関節症と同様に浮遊滑膜培養モデルで滑膜間葉系幹細胞のコロニーが形成され、損傷時など自然修復機構が働くことが示唆された。収量の検体間差が関節リウマチ群で大きかった一方で、平均収量、軟骨分化能、表面抗原については差を認めなかった。成果は査読付きの国際雑誌に原著論文として採択された。(BMC Musculoskeletal Disorders) (2018)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

.Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.

Kohno Y, Otabe K, Sekiya I et al.

Stem Cell Res Ther. 2017 May 16;8(1):115.

doi: 10.1186/s13287-017-0572-8. 査読あり

.Comparison of mesenchymal stem cells obtained by suspended culture of synovium from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

Yuji Kohno, Koji Otabe, Ichiro Sekiya et al.

BMC Musculoskeletal Disorders 2018 19:78

doi: 10.1186/s12891-018-1998-6 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

.第32回日本整形外科学会基礎学術集会

浮遊滑膜培養で幹細胞の収量はOA由来よりもRA由来で検体間差がある(会議録)

Author: 河野 佑二(東京医科歯科大学再生医療研究センター), 水野 満, 片桐 健太, 小田邊 浩二, 大関 信武, 片野 尚子, 小森 啓一郎, 古賀 英之, 辻 邦和, 松本 幹生, 金子 晴香, 高澤 祐治, 宗田 大, 大川 淳, 関矢 一郎 査読あり

.第33回日本整形外科学会基礎学術集会

関節リウマチ膝で関節液中の間葉系幹細胞数は滑膜幹細胞収量の指標になる(会議録)

Author: 河野 佑二(東京医科歯科大学再生医療研究センター), 水野 満, 小田邊 浩二, 大関 信武, 片野 尚子, 古賀 英之, 辻 邦和, 金子 晴香, 高澤 祐治, 大川 淳, 関矢 一郎 査読あり

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小田邊 浩二

ローマ字氏名: (OTABE, Koji)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 統合研究機構

職名: 助教

研究者番号(8桁): 70737288

(2) 連携研究者

研究者氏名: 関矢 一郎

ローマ字氏名: (SEKIYA, Ichiro)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 統合研究機構

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10345291

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。