

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09618

研究課題名(和文) 軟骨再生治療への臨床応用を目指した羊膜基質コート担体の線維化抑制効果の解明と検証

研究課題名(英文) Elucidative study to clarify the antifibrotic effect of amniotic extra-cellular matrix coated scaffold in cartilage regeneration.

研究代表者

野上 真紀子 (Nogami, Makiko)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：30750202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨修復のための生体移植材料として羊膜基質コート担体(ECM-PLGA)を開発し、その生体活性や軟骨修復機序の解明により臨床応用を目指している。初年度にECM-PLGAによる抗炎症効果の証明を試みたが、ECM-PLGAはマクロファージの炎症性サイトカイン分泌を促進し、抗炎症効果は証明されなかった。一方、滑膜由来線維芽細胞がM2マクロファージとの共培養により、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞に分化することが分かった。この結果から、関節内線維化病態へのM2マクロファージの関与が示され、M2からM1へマクロファージ極性を制御することより軟骨変性進行を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト関節滑膜由来線維芽細胞がM2様マクロファージの分泌するTGF- β 1刺激により筋線維芽細胞に分化し、軟骨の線維化に関与する可能性が示唆された。肺や肝臓等の組織由来線維芽細胞では知られていたが、関節内組織である滑膜由来線維芽細胞の筋線維芽細胞分化と関節内病的線維化病態の関与を示した報告はなく、学術的に新規性がある。M2からM1へ関節内マクロファージ極性を制御すれば軟骨線維化を抑制できる可能性が示唆され、新たな治療標的となりうる。今後は、ECM-PLGAがマクロファージの極性制御を行うことで線維芽細胞の線維活性抑制に寄与するかどうかをin vitro及びin vivoで解明する予定である。

研究成果の概要(英文)：We have developed a bioactive transplant material "ECM-PLGA" for cartilage regeneration by amniotic extracellular matrix coated scaffold. Clarification of the assumed bioactive effects such as anti-inflammation and anti-fibrosis will convey its clinical application. Contrary to our expectation, ECM-PLGA activated the pro-inflammatory cytokine production of macrophages cultured upon it. Human synovial fibroblasts showed progressed fibrotic activity and transformed into α -SMA positive myofibroblast-like cells when co-cultured with M2-like macrophages. The results implied that intra-articular fibrotic pathologies, including fibrocartilage development, associate more with M2-like macrophages than M1-like macrophages. Thus, controlling the polarity of intra-articular macrophages from M2 to M1 may give a chance to inhibit the fibrocartilage production and the progression of the cartilage degeneration.

研究分野：軟骨再生

キーワード：軟骨再生 羊膜 生体材料 細胞外マトリックス 線維化抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、軟骨再生治療における新規生体移植材料として羊膜間葉系細胞 human amniotic mesenchymal cell (HAM) 由来の細胞外基質 extra-cellular matrix (ECM) を合成ポリマーからなる生体材料である poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) の 3 次元担体にコートした“ECM-PLGA”を作製し、ラットおよびサル軟骨欠損モデルで軟骨修復促進効果を示すことを報告してきた。ECM-PLGA の損傷軟骨修復効果を検証、さらに最適化し、将来的には軟骨欠損部へ“貼って治す”一期の移植材料としての臨床応用を目指している。

一般的に慢性炎症環境における損傷組織の治癒過程では、繰り返される組織の破壊と不良な組織の再生が長期に持続することで線維性組織である癒痕が産生され正常な創治癒の妨げとなることが知られている。関節軟骨損傷に惹起される慢性の関節内炎症が変性の増悪因子であることは知られているが、慢性炎症環境下における軟骨組織の破壊と線維性修復機序を治療のターゲットとする研究はほとんど行われていない。

ECM-PLGA は羊膜が持つ抗炎症・線維化抑制といった創傷治癒促進効果を受け継ぐと考えられ、これまでの研究結果から軟骨損傷部位において ECM-PLGA が関節内炎症の抑制と軟骨再生過程における組織の線維化抑制によって正常軟骨組織の再生を導いた可能性が示唆された。しかし、ECM-PLGA がより正常な軟骨組織の再生を促す実際の機序や、関節内のどのような細胞がそれに関与するかなどの詳細は分かっていない。従って、関節内炎症抑制が再生軟骨組織の線維化抑制とどのようなかわりを持つか、そして ECM-PLGA が実際にそのような炎症抑制や線維化抑制といった効果を持つのかどうかを検証する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は ECM-PLGA の軟骨再生治療への臨床応用を目指した線維化抑制効果の解明と検証である。

3. 研究の方法

ECM-PLGA の抗炎症作用と線維化抑制効果にかかわるエフェクター細胞として、マクロファージがどのような役割を果たすかを調べる実験(羊膜由来細胞外基質がマクロファージ分化と極性に与える影響)

- (ア) シート状 ECM-PLGA の作製：ETICHON 社製 VYCRYL KNITTED MESH を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ の大きさに切り分け、不死化ヒト羊膜間葉系細胞を播種して培養を行った。培養 3 日目に、シートを 3 枚ずつ重層してさらに 14 日間の培養を行った。30Gy 放射線照射により細胞を死滅させた後に PBS で洗浄し凍結保存した。
- (イ) ヒト静脈血由来 CD14 陽性単球の分離培養とマクロファージ分化：富山大学倫理委員会の承認に基づき、健康成人から本人の同意を得て末梢静脈血を 30ml 採血し、リンパ球分離溶液と MACS 分離装置を用いて CD14 陽性単球を分離した。50 ng/mL M-CSF を含む RPMI 培地で 5 日間マクロファージへの分化培養を行い、RPMI 培地に 10 ng/mL IFN- γ を添加してさらに 24H 培養した後に細胞を剥離し、シート状 ECM-PLGA を敷いた 4well chamber slide 上に播種した。
- (ウ) 24 時間後に培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) の発現を ELISA 法により測定した。RNA の抽出を行いマクロファージ表面抗原の遺伝子発現パターンによりマクロファージの表現型 (M1/M2) 解析をおこなった。

ヒト変形性膝関節症患者の関節軟骨における筋線維芽細胞の存在を確認する実験

- (ア) 富山大学倫理委員会の承認に基づき、当院で変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を受ける患者から、本人の同意を得て変性軟骨組織を得た。10%PFA にて固定したのち脱灰処理、パラフィン包埋を行い組織切片を作製した。
- (イ) 抗ヒト α -SMA 抗体により免疫組織化学染色を行った。

ヒト関節内の病的線維化にマクロファージが与える影響を調べる実験(ヒト滑膜由来線維芽細胞の筋線維芽細胞分化に異なる極性のマクロファージがもたらすそれぞれの作用を調べる)

- (ア) ヒト白血病由来単球系細胞株 (THP-1) を PMA 処理によりマクロファージ様に分化誘導した後、培地に 20ng/mL LPS, 20 ng/mL IFN- γ を添加し M1 様マクロファージへ、または、20 ng/mL IL-4, 20 ng/mL IL-13 を添加し M2 様マクロファージへの分化をそれぞれ促した。
- (イ) 富山大学倫理委員会の承認に基づき、当院で変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を受ける患者から、本人の同意を得て膝関節滑膜組織を採取し、コラゲナーゼ処理により線維芽細胞 (HSF) を分離し培養を行った。

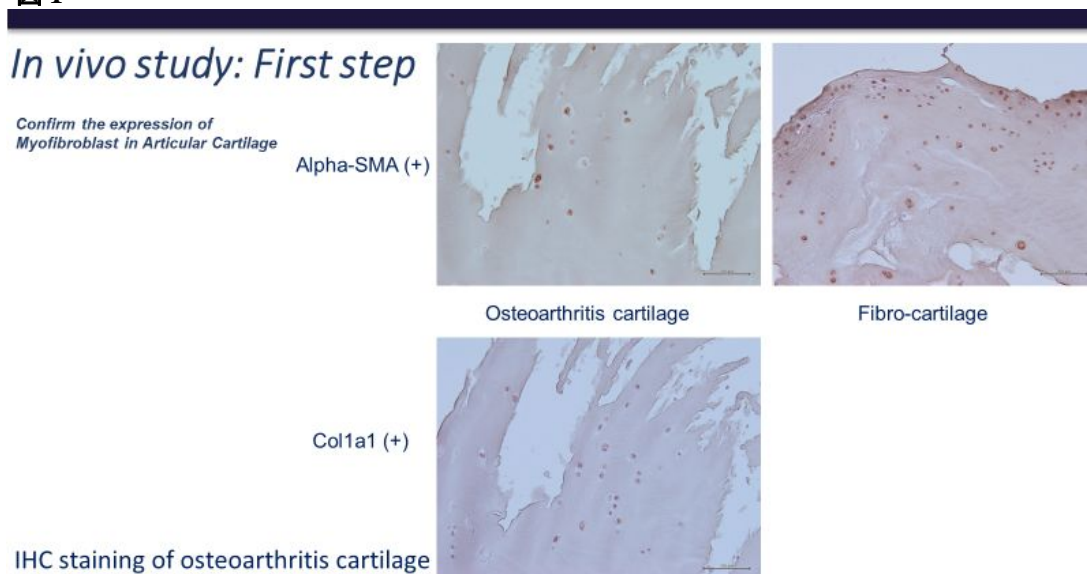
(ウ) 24 well プレートに HSF を播種し、インサートを用いて M1 または M2 様マクロファージとそれぞれ 72 時間または 144 時間共培養を行った。培養後、HSF を回収し α -SMA 陽性細胞率を flow cytometry により確認した。それぞれの細胞集団ごとに RNA の抽出を行い、線維化マーカー (α -SMA, COL1A1, CTGF, TGF- β 1) および抗線維化マーカー (MMP-1) の発現を real time RT-PCR により調べた。

4. 研究成果

ECM-PLGA 上で播種・培養した場合、コントロールである通常の培養皿上での培養時と比較して、マクロファージマーカーの遺伝子発現量が M1, M2 に関わらず全体に低く、極性を示す M1/M2 比についてもマーカー毎のばらつきが大きく信頼しうるデータが得られなかった。したがってマクロファージの極性を判断するに至っていない。さらに、培養上清中の炎症性サイトカインの分泌量は ECM-PLGA 群で有意に多い結果であった。ECM-PLGA が炎症タイプ (M1) マクロファージを抗炎症タイプ (M2) に極性転換させて炎症性サイトカインの分泌を減少させることで線維化抑制につながるとする我々の仮説と異なる結果で、ECM-PLGA 上で培養することでマクロファージの脱分化などが起こっている可能性が考えられたが検証に至っていない。

変形性膝関節症患者の関節軟骨組織の免疫組織化学染色により α -SMA 陽性細胞が存在することを確認した。(図 1)

図 1

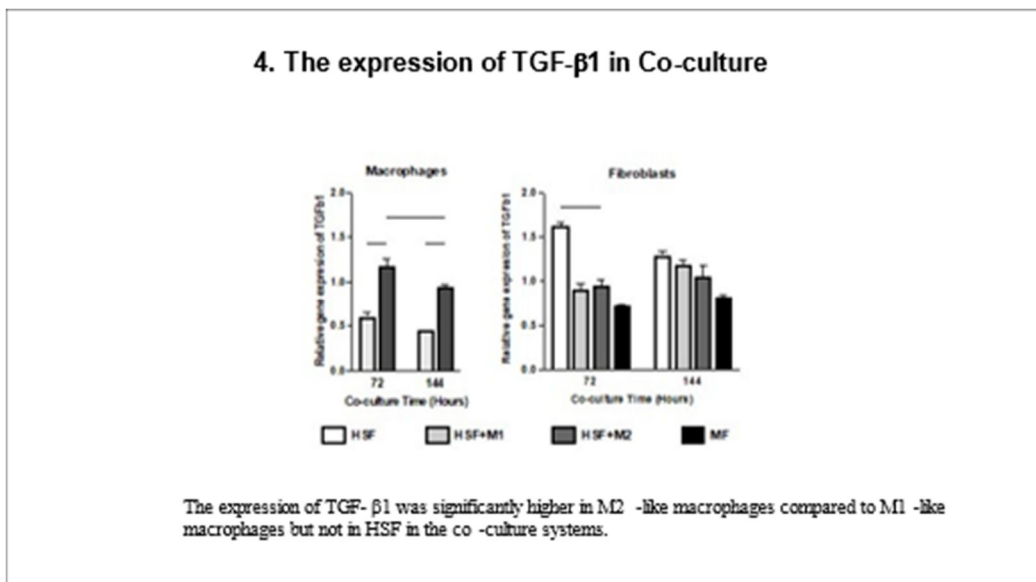
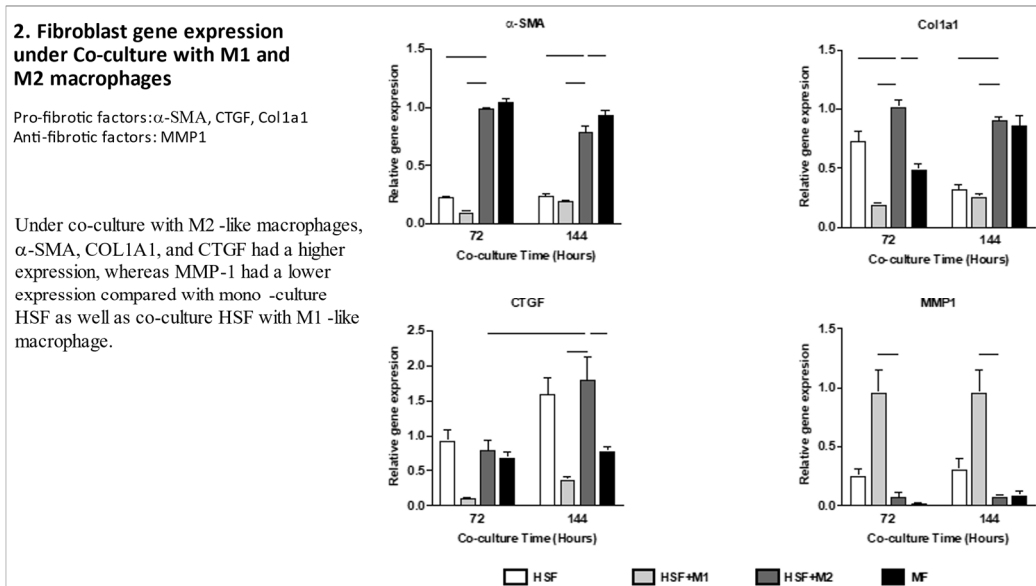
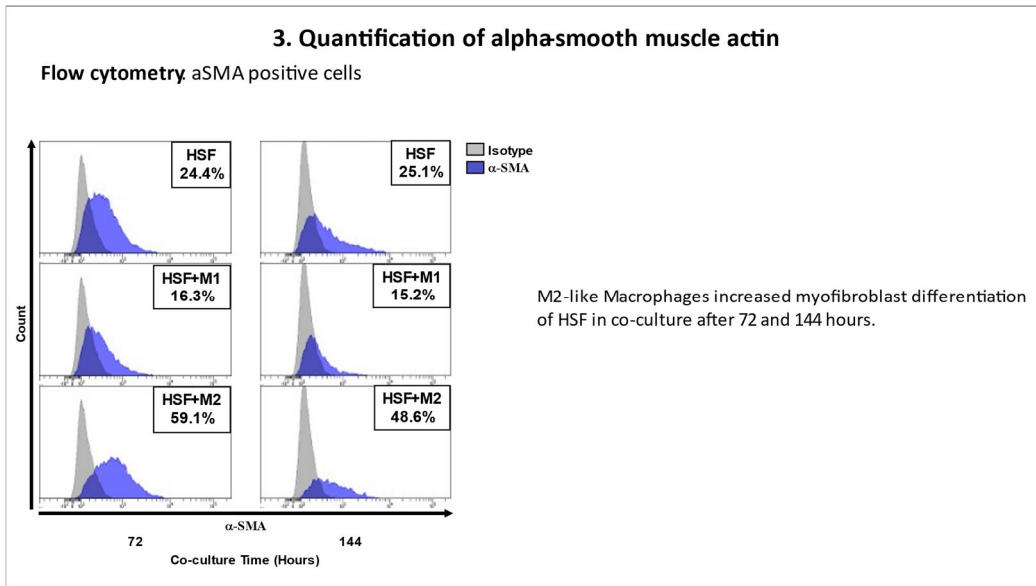


α -SMA は組織の線維化や瘢痕形成に関わるとされる筋線維芽細胞の代表的なマーカーであり、変性軟骨では組織の線維化が生じていることを示す結果であると考えられる。

ヒト白血病由来単球細胞株である THP-1 細胞を M1/M2 様マクロファージに分化誘導し、ヒト滑膜由来線維芽細胞 (HSF) と共培養を行ったところ、M2 様マクロファージとの共培養で α -SMA 陽性 HSF 細胞数増加を認めた (図 2)。この環境で HSF による線維化マーカー (α -SMA, COL1A1, CTGF) の mRNA 発現は亢進し、抗線維化マーカー (MMP-1) の発現は減少した (図 3)。M2 様マクロファージでは TGF- β 1 の発現が著明に亢進していたが、HSF での発現上昇は見られなかった (図 4)。M1 様マクロファージとの共培養では、これらの変化は見られなかった。

この結果から、関節内線維化病態には M1 ではなく M2 マクロファージがより深く関わっていることが示され、THP-1 細胞から分化誘導した M2 様マクロファージは、培養上清中への TGF- β 1 分泌を介して、共培養した HSF を α -SMA 陽性細胞に変化させることで線維化活性を促進したと考えられた。マクロファージは局所環境によって自らの極性を変化させることが知られており、M2 から M1 へ関節内マクロファージの極性をコントロールすることより軟骨変性進行を抑制できる可能性が示唆された。

今後は、ECM-PLGA がマクロファージの極性コントロールを行っているかどうかの検証と、実際にそれが HSF の線維化活性の抑制に寄与しているかどうかを in vitro 及び in vivo で解明する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Koike Nobuyuki, Sugimoto Jun, Okabe Motonori, Arai Kenichi, Nogami Makiko, Okudera Hiroshi, Yoshida Toshiko	4. 巻 71
2. 論文標題 Distribution of amniotic stem cells in human term amnion membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 66~76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfab035	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 -
1. 著者名 Zukawa Mineyuki, Okabe Motonori, Osada Ryusuke, Makino Hiroto, Nogami Makiko, Seki Shoji, Yoshida Toshiko, Kimura Tomoatsu, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of hyperdry amniotic membrane in preventing tendon adhesion in a rabbit model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2021.03.005	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 -
1. 著者名 Sugimori Kazuhito, Gejo Ryuichi, Nogami Makiko, Mine Hayato, Kimura Tomoatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of complete and incomplete subscapularis tendon tear on preoperative magnetic resonance imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2021.02.009	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 -
1. 著者名 野上 真紀子, 下条 竜一, 峯 隼人, 川口 善治.	4. 巻 72
2. 論文標題 変形性関節症重症度による化膿性膝関節炎の難治性予測.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床整形外科	6. 最初と最後の頁 1041-1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 野上真紀子, 下条竜一, 峯 隼人, 川口善治	4. 巻 51
2. 論文標題 1膝目TKAの早期患者立脚型評価成績が2期的両側TKAの手術間隔に及ぼす効果.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本人工関節学会誌	6. 最初と最後の頁 259-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野上真紀子, 下条竜一, 峯 隼人, 松下 功, 川口善治.
2. 発表標題 1 膝目 TKA の早期患者立脚型評価成績が 2 期的両側 TKA の手術間隔に及ぼす効果.
3. 学会等名 第51回日本人工関節学会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 野上 真紀子、下条 竜一、峯 隼人、川口 善治
2. 発表標題 TKA術後5年までの患者立脚型評価の経時的推移と年齢による影響の検証
3. 学会等名 第52回日本人工関節学会
4. 発表年 2021年~2022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	関 庄二 (Seki Shoji) (00432112)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	牧野 紘士 (Makino Hiroto) (50816022)	富山大学・附属病院・医員 (13201)	

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