

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18493

研究課題名（和文）軟骨分化誘導させた脂肪由来幹細胞シートによる変形性膝関節症の軟骨再生

研究課題名（英文）Cartilage regeneration of knee osteoarthritis by adipose-derived stem cell sheet induced to cartilage differentiation

研究代表者

上野 琢郎（Ueno, Takuro）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80800622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：日本白色家兎の膝OAモデルで、自家末梢血から生成した多血小板血漿（PRP）を用い脂肪由来間葉系幹細胞（ADSC）の軟骨形成細胞へ分化誘導を評価した。その結果、ADSCの軟骨分化を示唆する遺伝子発現（Collagen II, Sox 9 and Aggrecan）を有する軟骨形成細胞への分化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症に対しては現在有効と考えられる手術加療がいくつか確立しているものの、医療経済の観点からも、今後は予防や修復促進による重症化の阻止が急務である。本研究では脂肪由来幹細胞を用いた再生医療の観点から軟骨修復の方法を模索した。本研究ではin vitroでの研究に留まっているが、今後のin vivoでの研究による評価で軟骨再生の可能性が示唆されれば、変形性膝関節症の治療に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the induction of differentiation of ADSC into chondrogenic cells using PRP generated from autologous peripheral blood in a knee OA model of a Japanese white rabbit. As a result, chondrogenic cells with gene expression (Collagen II, Sox 9 and aggrecan) was confirmed; that suggested differentiation into chondrogenic cells.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪由来幹細胞 多血小板血漿 軟骨再生 脂肪由来幹細胞シート 軟骨形成細胞シート

1. 研究開始当初の背景

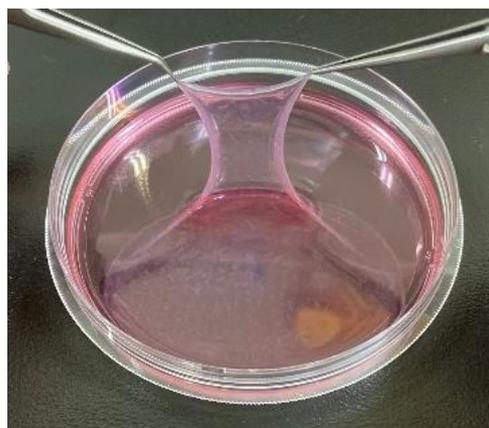
変形性関節症は、高齢者の膝・股関節などの下肢荷重関節に好発する進行性の関節軟骨変性を特徴とする。関節軟骨には栄養血管が存在せず、細胞成分に乏しいため、自然治癒は期待出来ない。我が国では超高齢化社会を迎え、変形性膝関節症(膝 OA)の患者は増加の一途を辿っており、健康寿命や医療経済にも大きな影響を与えている。膝 OA に対しては現在有効と考えられる手術加療がいくつか確立しているものの、医療経済の観点からも、今後は効果的な予防や修復促進による重症化の阻止が急務である。近年、再生医療分野においては、幹細胞を用いた治療が注目を集めている。脂肪組織には間葉系の脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cells : ADSCs)が含まれている。ADSCs は皮下脂肪組織から採取できるため比較的低侵襲で倫理的な問題が少なく、容易・かつ多量に採取可能で、優れた増殖能と多分化能を持つという利点を有しており、我々の研究チームでは以前から、骨、神経、半月板、靭帯等の分野で、その臨床応用を目指した研究を行ってきた。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 の関節内投与により軟骨変性の改善を認めた報告もあるが、その具体的な機序についてはほとんど言及されていない。申請者の研究室では、これまでに、機序が単なる ADSCs の軟骨細胞への分化によるものではなく、ADSCs が分泌する成長因子に伴う軟骨基質保護作用(paracrine effect)が大きく関与していることを報告してきた。予備実験として行った DiI labeling による ADSCs の細胞動態解析では、幹細胞の関節内の滑膜及び後方の関節包への生着は確認できたものの、軟骨分化を認めず、それどころか経時的な細胞数の減少を認めた。これは、ADSCs が軟骨に分化し、関節面に生着するには何らかの追加要素が必要であることを示唆している。Phuc Van Pham らの報告(Stem Cell Res Ther 2012)ではマウス研究において 15v/v%多血小板血漿(PRP : Platelet-rich plasma)を含む培地で1週間培養を行った ADSCs では、通常の 10%FBS を含む培地での培養と比較し、細胞増殖の促進、軟骨形成に必要な col-II、Sox9、及びアグリカンの遺伝子発現の増加、軟骨再生の阻害作用を持つ VEGF の分泌の下方調節を認めた。PRP を用いて ADSCs を軟骨形成能を持つ軟骨形成細胞へ分化誘導し、申請者の研究室で開発した技術でシート化した「軟骨形成細胞シート」を用いた膝 OA の関節軟骨再生の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、日本白色家兎の膝 OA モデルで、末梢血から生成した PRP を用い ADSCs を軟骨細胞へ分化誘導を行う。その後シート化技術を用いて軟骨細胞をシート化した軟骨形成細胞シートを関節内に移植し、変性した関節軟骨がどの程度再生されるのか検討する。軟骨形成細胞へと分化させた ADSCs のシートが生着するにあたり、周囲へ分泌される各種液性因子を評価し、関節軟骨再生の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

日本白色家兔の肩甲間部より採取した皮下脂肪組織(右図左)より得られた ADSCs を培養する。また末梢血を 20ml 採取し(右図右)、250×g で 10 分間の遠心分離を行い、その血漿分画について、さらに 1000×g で遠心分離を行い、下層に 20%CaCl₂ を加えたものを活性化 PRP と定義し(1)、使用した。第 3 継代目の ADSCs の培養培地に PRP を 15v/v% の濃度で含有させた培地で 1 週間培養し、over confluent 状態とし、アスコルビン酸(Ascorbate-2-phosphate)を添加する。さらに 1 週間培養を行い、ADSCs のコラーゲン分泌が増強させることで PRP を添加した ADSCs シートを作成する(右図下)。通常の ADSCs のみ、ADSCs シート、PRP 培地培養 ADSCs、PRP 培地培養 ADSCs シートの 4 群について、遺伝子学的な発



現について quantitative Real-time PCR を用いて評価を行った。今回、軟骨細胞の増殖や軟骨形成に必要と報告されている collagen type 2, Sox 9, Aggrecan についての発現量の評価を行った。

4. 研究成果

通常の ADSCs のみ(ADSC 群)、ADSCs シート(ADSC sheet 群)、PRP 培地培養 ADSCs(ADSC+PRP 群)、PRP 培地培養 ADSCs シート(PRP -ADSC sheet 群)の 4 群について、各群 5 検体について quantitative real-time PCR 法を用いて遺伝子発現量を評価し、比較検討を行った。評価方法としては Kenneth らの報告に従い、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて評価を行った。

Collagen type 2 では ADSC 群に比較して ADSC sheet 群では 1.87 ± 0.42 倍、ADSC+PRP 群では 5.65 ± 4.34 倍、PRP-ADSC sheet 群では 7.24 ± 3.46 倍の発現を認めていた。

Sox 9 については ADSC 群に比較して ADSC sheet 群では 6.07 ± 5.60 倍、ADSC+PRP 群では 9.27 ± 5.15 倍、PRP-ADSC sheet 群では 8.77 ± 8.65 倍の発現を認めていた。

Aggrecan では、ADSC 群に比較して ADSC sheet 群では 3.36 ± 1.76 倍、ADSC+PRP 群では 6.47 ± 5.43 倍、PRP-ADSC sheet 群では 5.99 ± 3.99 倍の発現を認めていた。

Collagen type 2, Sox 9, Aggrecan のいずれの群においても、ADSCs 単独群よりも発現量の上昇傾向にあるものの、いずれの群間においても、有意な差を認めるには至っていない。(p>0.05)

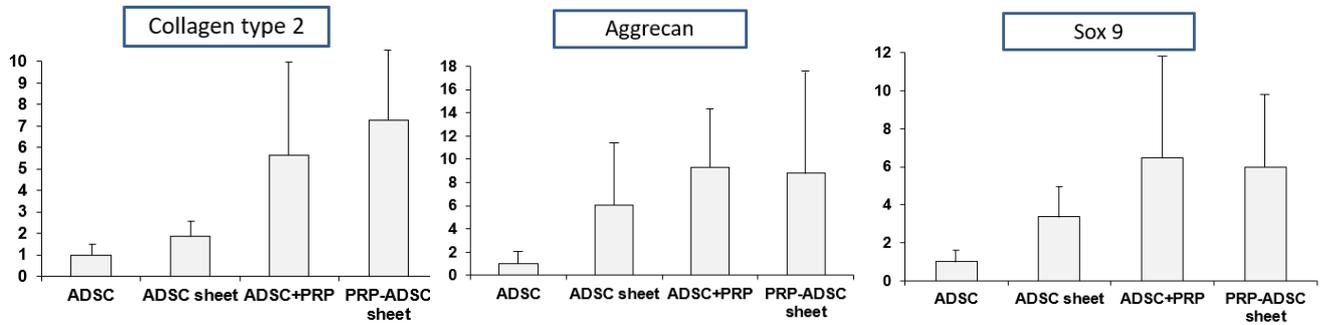


Fig.1 quantitative real-time PCR の結果

<考察>

ADSCs の OA に対する効果については、日本家兎、豚、ラットなどの膝 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 2-5)、そのメカニズムに関しては未だ議論の分かれるところで、明確な解明には至っていない。

過去の報告によると、PRP には数多くの成長因子が含まれており、PRP 単独での治療効果も報告があるが、その要因としてはこの成長因子が高濃度で含有されていることが一因とされている。6. 7)。他の報告では ADSCs は培養培地に VEGF-A の発現増加・分泌し、軟骨細胞の増殖を阻害するのみならず、プロテオグリカン合成などを低下させることで、アポトーシスを増加させ、その結果として移植を行った ADSC の欠損部に軟骨組織が成長して入り込む様子が認められなかったと報告されている 8)。

PRP と ADSCs の併用による治療効果の報告も散見されるが、本研究においては、ADSCs の *in vitro* での軟骨細胞への分化について評価を行っている。本研究において、いずれの遺伝子発現でも過去の報告 9)と同様に PRP を使用したことにより発現増加を認めているが、サンプル数の少なさからか、有意な差にまでは至っていない。

しかし、現段階で得られた傾向としては、15v/v%PRP 培地での培養により得られた遺伝子発現はアスコルビン酸を加え、シート化を行っても下ならず、軟骨形成に必要な細胞特性は維持したままであり、シートの特性である、多量の細胞担持の可能性を加味すれば、関節内注射によりその治療効果は期待できる。

<今後の展望>

本研究では現在のところ *in vitro* での研究に留まっているが、今後、PRP-ADSC sheet 群での VEGF-A の分泌低下が生じるかの確認のための ELISA 法や、コラゲナーゼ(MMP-1.MMP-13)、アグリカナーゼ(ADAMTS-4)の発現を *in vitro* で調査したのち、*in vivo* では実際に 4 群について、前十字靭帯(ACL : anterior cruciate ligament)切離術を施した外傷性膝 OA モデルに対して 6.8.10.12 週モデルを作成し、実際に軟骨変性に対して与える変化を Macroscopic な評価(India ink 染色 : OARSI score 評価)、組織学的評価(Safranin O 染色)、免疫組織化学染色(MMP-1.MMP-13.ADAMTS-4)での評価を行う予定としており、実際の治療効果について評価を行う。また、DiI labeling を行うことで、実際の注射された細胞群の動態を確認することで、その生着についても評価を行う。今後の *in vivo* での研究による評価で軟骨再生の可能性が示唆されれば、変形性関節症の治療に

貢献できると考える。

<引用文献>

- 1) W-T Jia 1, C-Q Zhang, J-Q Wang, Y Feng, Z-S Ai et al. The prophylactic effects of platelet-leucocyte gel in osteomyelitis: an experimental study in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br.* 2010 Feb;92(2):304-10.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Borrione P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F: Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil* 2010, 89:854-861.
- 7) Yu W, Wang J, Yin J: Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci* 2011, 121:176-180.
- 8) Lee CS, Burns OA, Raghuram V, Kalisvaart J, Boyan BD, Schwartz Z: Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2012, 3:35.
- 9)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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