

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24036

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変形性関節症治療の開発

研究課題名(英文)Development of osteoarthritis treatment using spheroid type adipose derived stem cells

研究代表者

安野 翔平 (Shohei, Anno)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10847396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞(ADSC)は抗炎症作用があることが知られている。そこで、ADSCおよびADSCを細胞塊にしたスフェロイドの変形性膝関節症における軟骨損傷に対する予防効果を検証した。ラットの膝において前十字靭帯および内側半月板を切除して変形性膝関節症モデルを作製し、ADSCの細胞単独やスフェロイドを投与したところ、スフェロイド投与群では軟骨変性が有意に抑制されていた。以上からスフェロイド型のADSCは軟骨変性抑制作用を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

50歳以上では1000万人が変形性膝関節症による膝痛を経験していると報告されている。変形性関節症の治療には種々の薬物治療や手術治療がこれまでに報告されているが、疾患の主座である関節軟骨の変性の進行を予防することはできず、障害された軟骨の再生が得られるわけではない。そこで我々は、今回脂肪由来幹細胞の変形性関節症における軟骨損傷抑制効果を検証することとした。本研究の手法での軟骨損傷抑制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、脂肪由来幹細胞のスフェロイド型の局所投与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)：Adipose-derived stem cells (ADSC) are known to have anti-inflammatory effects. Therefore, we examined the preventive effect of ADSC and ADSC-generated spheroids on cartilage damage in knee osteoarthritis(OA). OA model was created by excised the anterior cruciate ligament and medial meniscus in the rat knee, and ADSC cells alone or spheroids were injected. Chondrogenesis was significantly suppressed in the spheroid-administered group. From our results, it was suggested that the spheroid-type ADSC may prevent degeneration of the cartilage in OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞 変形性関節症 軟骨損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪由来幹細胞 (ADSC) は簡便に採取でき、抗炎症作用および組織修復能を有すると報告されている。我々は関節リウマチモデルマウスにおいて ADSC の滑膜炎の抑制効果および損傷軟骨の修復効果を報告した (Ueyama H, et al. Sci Rep. 2020.)。この結果を踏まえ、変形性関節症においても、ADSC は関節軟骨変性に対して抑制効果があり、さらにスフェロイド (細胞凝集塊) 状の投与はよりその効果を高める可能性が考えられた。そこで今回 ADSC およびスフェロイドの変形性膝関節症における軟骨損傷に対する予防効果を検証するに至った。

2. 研究の目的

ADSC 単層細胞もしくはスフェロイドを変形性膝関節症モデルラットの膝関節内に局所投与し、変形性関節症予防に対する有効性を組織学的および分子細胞学的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず同種の GFP 導入ラットから分離培養した ADSC を精製培養し、(1) 単層細胞 (A 群)・(2) 3 次元培養したスフェロイド (S 群)・(3) 単層細胞にペプチドハイドロゲルを添加してゲル化 (AG 群)・(4) スフェロイドにペプチドハイドロゲルを添加してゲル化 (SG 群) を作製した。細胞数は各群 1×10^6 cells とした。また対照群として、(5) ペプチドハイドロゲルのみ (G 群) と(6) PBS (C 群) を作製した。

次に Lewis ラットの膝関節において前十字靭帯および内側半月板を切除し変形性膝関節症モデルを作製した。(1)~(6)の 6 群×各 6 匹 = 合計 36 匹に対して、それぞれの形態の細胞もしくは対照を膝関節内に関節注射した。4,8 週後に犠牲死し、組織学的な評価を行った。

なお当初はアスコルビン酸によりゲル化させる予定であったが、単層細胞では細胞シートが形成されたが、スフェロイドではアスコルビン酸を添加すると巨大化し細胞シートが作製できなかったため、単層細胞・スフェロイドともペプチドハイドロゲルによりゲル化させることとした。

4. 研究成果

(1) アポトーシスアッセイ

スフェロイド、単層細胞およびそれぞれを含むゲルをリポポリサッカライド刺激後 6,12,24,48,72 時間において、C Caspase-Glo 3/7 Assay System を用いた発光度測定によりアポトーシスを評価した。図 1 のように、いずれの時点においても単層細胞と比較してスフェロイドはアポトーシスが抑制されていたが、スフェロイド・単層細胞ともゲルを添加するとアポトーシスが促進されていることが判明した。この結果から、細胞の投与形態としては(2)スフェロイドが望ましいことが示唆された。

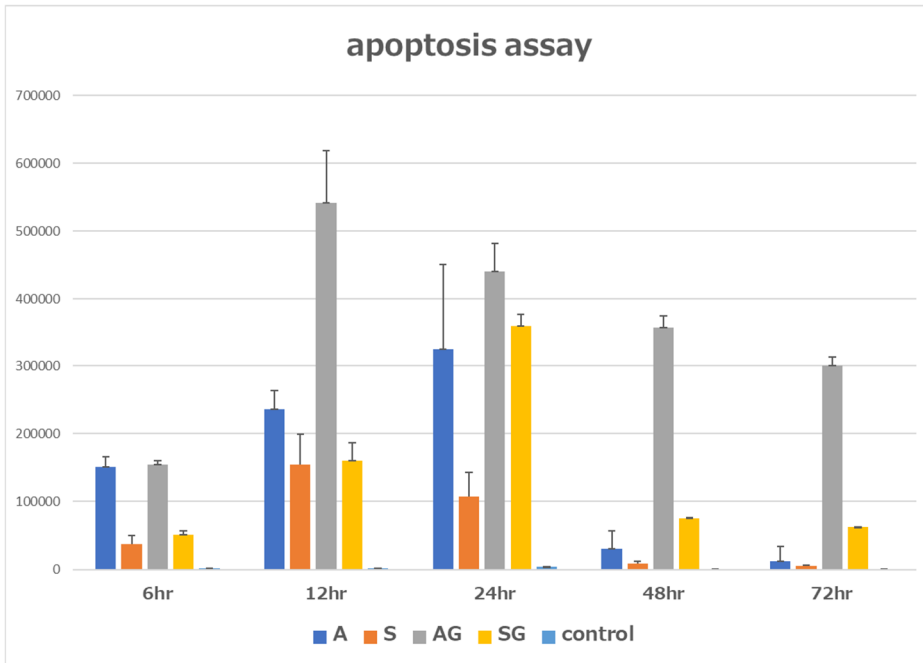


図 1 各細胞におけるアポトーシスアッセイ

(2)組織学的評価

各細胞もしくは対照を関節注射後 4,8 週に犠牲死し、組織学的な評価を行った。8 週時点における代表的な墨汁染色後のマクロ写真およびヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を図 2-1 に示す。また各群の関節軟骨変性評価である Mankin score を図 2-2 に示す。4,8 週時点において単層細胞やゲル添加群と比較して、(2)スフェロイド投与群では軟骨変性が有意に抑制されていた。以上からスフェロイド型の ADSC は軟骨変性抑制作用を有することが示唆された。

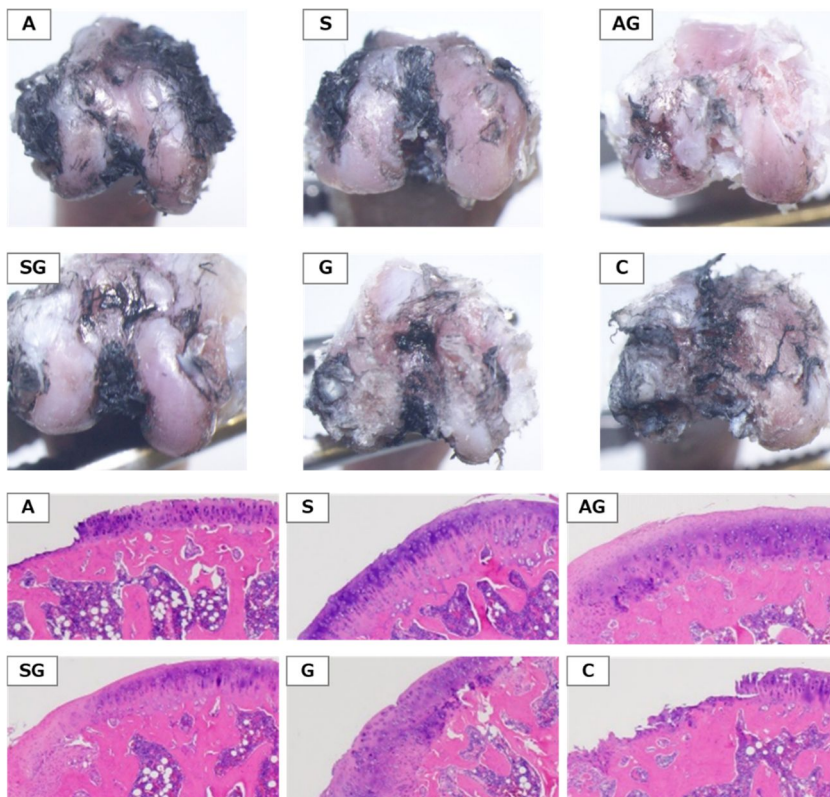


図 2-1 8 週時点におけるマクロ写真と HE 染色

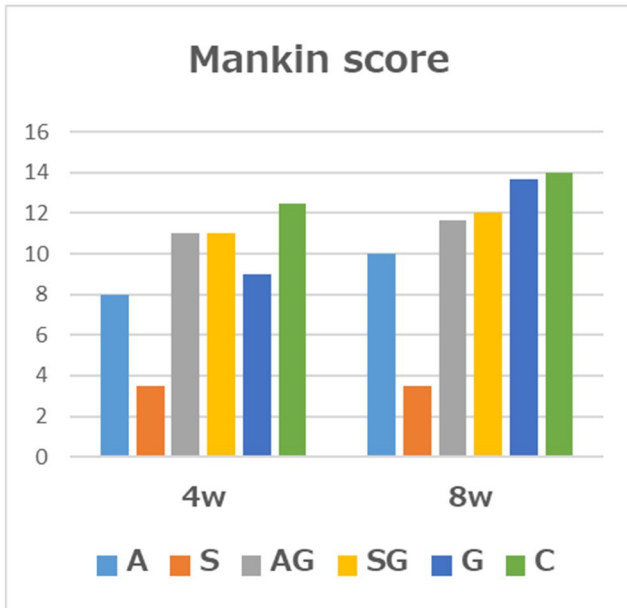


図 2-2 4,8 週時点における Mankin score (n=36)

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