

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09410

研究課題名(和文) ヒト滑膜由来幹細胞による軟骨再生治療におけるbFGFの治療促進効果についての検討

研究課題名(英文) Basic fibroblast growth factor promotes regeneration of the cartilage and meniscus via synovial mesenchymal stem cells

研究代表者

平尾 眞 (Hirao, Makoto)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10527708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウス膝関節において骨軟骨欠損部にヒト滑膜由来間葉系幹細胞(MSC)の細胞凝集塊を充填すると、bFGFの添加群で有意に欠損部の軟骨基質の再生が促進された。再生領域は移植したヒト滑膜由来MSC由来の組織であることも確認できた。また免疫不全ラット膝内側半月板損傷部の修復や基質産生にヒト滑膜MSCの培養時のbFGF添加が促進的に作用することも明らかとなった。bFGFが滑膜細胞を介して半月板を再生するメカニズムが、主にERKやAktシグナル系において働くケモカインCXCL6-CXCR2経路を介したものであるということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

bFGFはすでに臨床現場で広く使用されているもので、安全性も担保されており、bFGF添加下にてのヒト滑膜由来幹細胞塊を移植することは、軟骨や半月組織再生を促進する一つの有用な方法と考えられた。半月板の再生が実現できれば、軟骨の保護作用も向上し、変形性関節症の予防や進行の抑制に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：When a cellular aggregate of human synovial membrane-derived mesenchymal stem cells (MSCs) was filled in the osteochondral defect of the mouse knee joint, a significant promotion of production and regeneration of cartilage matrix in the defect area was observed in the bFGF-treated group. The regenerated area was confirmed to be composed of tissue derived from the transplanted/filled human synovial MSCs. Additionally, it was revealed that the supplementation of bFGF during the culture of human synovial MSCs could facilitate the repair of the rat medial meniscus injury and production of matrix. The mechanism through which bFGF promotes meniscus regeneration via synovial cells has been elucidated to mainly involve the chemokine CXCL6-CXCR2 pathway that acts through the ERK and Akt signaling systems.

研究分野：関節外科 軟骨再生

キーワード：bFGF cartilage meniscus regeneration synovial MSC

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は自己修復能に乏しい難治性組織であり、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) による軟骨再生治療が注目されている。我々は軟骨再生能が旺盛な関節滑膜由来の MSC に着目し、ヒト外傷性軟骨損傷患者の臨床試験により自家滑膜移植で良好な臨床・組織学的結果を得た事を報告したが (Shimomura K et al. Am J Sports Med. 2018;46(10):2384-2393) 同時に in vitro での滑膜 MSC の増殖能・軟骨分化能においてドナー間の不均一性があることも見出した (Koizumi K et al. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(8):1413-1422)。滑膜 MSC を用いた軟骨再生治療成績の向上・安定化のためには生体内での軟骨再生に有利な滑膜 MSC の培養法や細胞選別法の確立が重要と考えられる。そこで我々は他の間葉系幹細胞の分化を促進するとの報告がある basic fibroblast growth factor (bFGF) に着目した。bFGF は MSC の細胞増殖と軟骨分化を共に促進させるというユニークな特徴を有するため、軟骨再生医療のコストや時間削減と共に品質向上にもつながる画期的な補助材料となり得ると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は滑膜 MSC の培養時の bFGF 添加がもたらす生体内での軟骨・半月板再生促進効果について検討を行い、軟骨・半月板再生医療の治療成績の向上と安定化に貢献することである。

### 3. 研究の方法

免疫不全マウスの大腿骨滑車部に微小ドリルを用いて深度・径共に 0.8mm の骨軟骨欠損を作成し、そこに bFGF (5ng/ml) 含有・不含有の培養液で培養したヒト滑膜 MSC の細胞凝集塊 ( $2 \times 10^5$  個) を移植した。8 週後に組織を回収して組織切片により生体内での軟骨組織修復能を評価した。またヒトビメンチン抗体による免疫染色により移植したヒト細胞を追跡し、移植した細胞の残存性および軟骨細胞への分化能を評価した。bFGF がヒト滑膜 MSC の間葉系幹細胞の多能性・細胞老化に及ぼす影響の検討: フローサイトメトリーで細胞表面のヒト MSC マーカー (CD44, CD90, CD105) や細胞老化マーカー (NANOG・OCT4 等) の発現を解析した。bFGF が滑膜 MSC の遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的検討を RNA シークエンス解析により行った。同様に免疫不全ラット膝を用いて内側半月板部分切除モデルを作成し、ヒト滑膜 MSC の細胞凝集塊の移植実験を行った。

### 4. 研究成果

マウス膝関節において骨軟骨欠損部にヒト滑膜 MSC の細胞凝集塊を充填すると、bFGF の添加群で有意に欠損部の軟骨基質の産生・再生が促された。再生領域は移植・充填したヒト滑膜由来幹細胞由来の組織であることも確認できた。またラット膝内側半月板損傷部の修復や基質産生にヒト滑膜 MSC の培養時の bFGF 添加が促進的に作用することも明らかとなった。bFGF が滑膜細胞を介して半月板を再生するメカニズムが、主に ERK や Akt シグナル系において働くケモカイン CXCL6-CXCR2 経路を介したものであるということが明らかになった。これらが活性化することによって、周囲の滑膜組織からの半月板欠損部への移行、細胞増殖、軟骨細胞系への分化が促進され、結果的に半月板組織の再生が促されたものと考えられる。bFGF 添加下に培養したヒト滑膜由来幹細胞塊を移植することは、軟骨・半月板組織再生を促進する一つの有用な方法と考えられた。半月板の再生が実現できれば、軟骨の保護作用も向上し、変形性関節症の予防や進行の抑制にも寄与することが期待される。

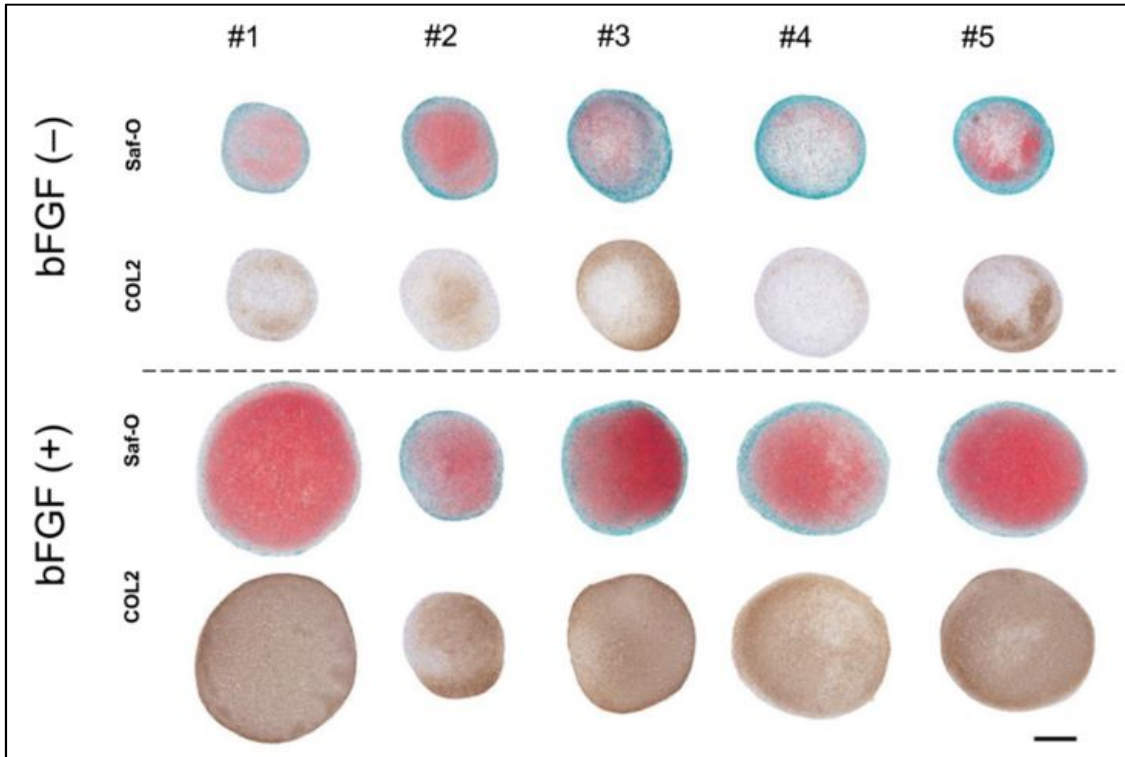


図 1 : 滑膜細胞の in vitro のペレット培養にて、bFGF 添加群で有意に軟骨基質生産が促進されることが確認された。

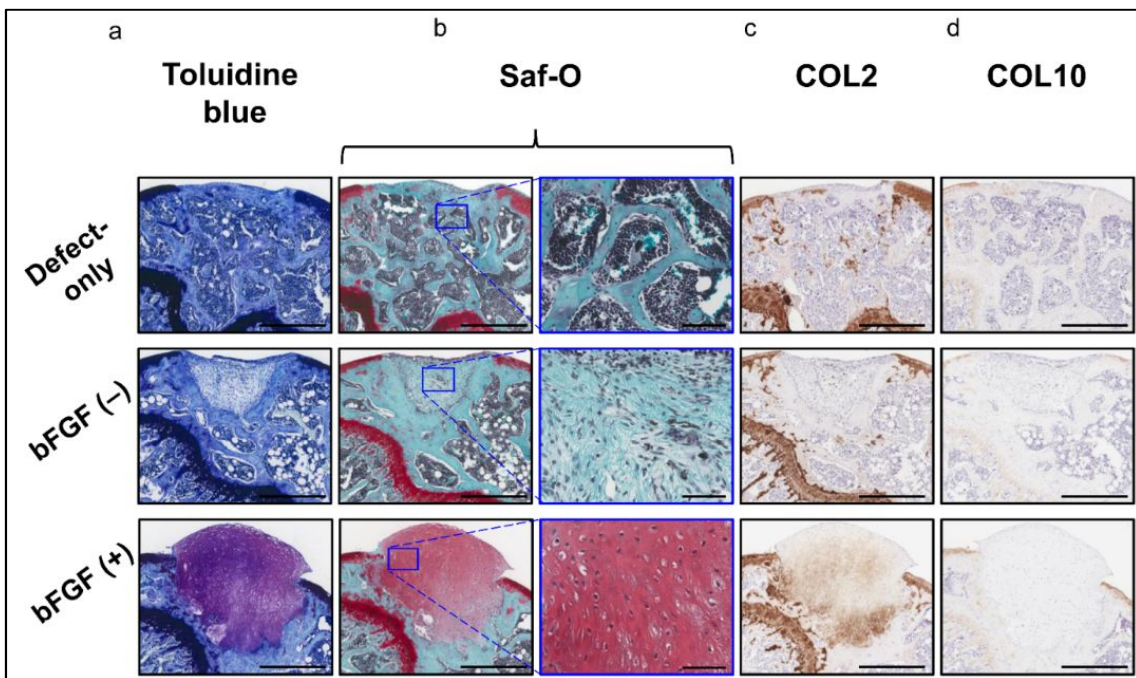


図 2 : 免疫不全マウス膝を用いた in vivo の実験にて、ヒト滑膜組織由来の細胞が bFGF 添加にて有意に軟骨・軟骨下骨欠損部分の補填・軟骨基質再生に貢献していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanamoto T, Hikida M, Sato S, Oyama S, Tachi Y, Kuroda S, Mazuka T, Ebina K, Nakai T, Nakata K.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Integrin 2 1 plays an important role in the interaction between human articular cartilage-derived chondrocytes and atelocollagen gel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81378-2.	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 -

1. 著者名 Okamura G, Ebina K, Hirao M, Chijimatsu R, Yonetani Y, Etani Y, Miyama A, Takami K, Goshima A, Yoshikawa H, Ishimoto T, Nakano T, Hamada M, Kanamoto T, Nakata K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Promoting Effect of Basic Fibroblast Growth Factor in Synovial Mesenchymal Stem Cell-Based Cartilage Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22010300.	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 -

1. 著者名 Otani S, Kanamoto T, Oyama S, Yamakawa S, Shi W, Miyazaki R, Aihara M, Oka S, Kuroda S, Nakai T, Takenaka K, Sato Y, Tsukamoto M, Tsujii A, Ebina K, Okada S, Nakata K.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Meniscus surface texture is associated with degenerative changes in biological and biomechanical properties.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16206-2.	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 -

〔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
研究分担者	蛸名 耕介 (Ebina Kosuke)  (70612076)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）  (14401)	

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