

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09513
研究課題名(和文) 関節炎モデルを用いた間葉系幹細胞の疼痛抑制と軟骨保護機能に関わる分子機構の解明
研究課題名(英文) Elucidate the molecular mechanism of pain suppression and cartilage protection by mesenchymal stem cells in a rabbit arthritis model
研究代表者
市堰 徹 (ICHISEKI, Toru)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：30307631
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)：軟骨損傷動物モデルで骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)の修復・予防効果および疼痛抑制効果について研究をおこなった。損傷した軟骨組織にBM-MSCのホーミングに関わる因子の発現を認めた。また、軟骨保護因子であるTNF- α induced protein 6(TSG6)の発現増加および脊髄後角における疼痛関連因子であるCalcitonin gene related peptide(CGRP)の発現が抑制された。BM-MSCのin vitroによる研究からストレス耐性も確認できた。本研究から、損傷部位におけるBM-MSCの軟骨保護および疼痛抑制効果が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の現在、変形性関節症の罹患率は非常に増加している。本疾患の予防や、本疾患による疼痛改善は、今後も高齢化が進む日本において最重要課題である。今回の研究からBM-MSCの関節内投与および経静脈投与により損傷した軟骨組織へのMigration/Homingを認め、疼痛改善効果も確認できた。本研究結果は、今後の再生医療や予防医学を含むBM-MSCの治療方法の応用に非常に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effects of MSCs on the prevention of cartilage damage and pain suppression were investigated in an animal model. Expression of C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), which is involved in homing of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs), was observed in injured cartilage tissue, suggesting that homing to cartilage tissue is expected. Expression of TNF- α induced protein 6 (TSG6), a chondroprotective factor released from BM-MSCs, was also observed in damaged cartilage. In addition, treatment with BM-MSCs suppressed the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the dorsal horn of the spinal cord. BM-MSCs also maintained mitochondrial function and showed sufficient ATP production under hypoxic stress conditions that induced osteocyte death. This suggests that BM-MSCs are sufficiently effective against hypoxic conditions in tissues such as cartilage and bone tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 ホーミング 軟骨 モノヨード酢酸 CXCL12/CXCR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 OA は加齢という防ぎようのない、誰にでも訪れる老化現象により起こる疾患である。高齢化社会が急速に進んでおり、それに伴い患者数は増加の一途をたどっている。OA の病態が進んでしまうと人工関節置換術や骨切り術といった外科的治療に頼らざるを得ない。治療は長期にわたる患者への苦難に加え、医療費ならびに労働経済学的な社会的損失も多大である。一方、関節分野における間葉系組織幹細胞 MSC を用いた治療では、軟骨再生に主眼が置かれ、scaffold (足場) を使用した外科的手法の検討が行われている。最も重要な課題である OA の予防や低侵襲性治療に関してはこれまで報告がない。

先行研究において、モノヨード酢酸 MIA 誘発ウサギ関節炎モデルを用いた BM-MSC の関節内注入による痛み伝達に機能するカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の減少と、抗炎症・軟骨保護因子である tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG6) の増加など BM-MSC の疼痛抑制と軟骨保護効果を報告した (Ichiseki et al. Int J Mol Sci 2018)。また、ステロイド誘発大腿骨壊死ウサギモデルを用いて経静脈的全身投与された BM-MSC の骨傷害部位への集積 homing/migration と骨壊死阻止機能を初めて報告した (Ueda S, Shimasaki M, Ichiseki T. BMC Musculoskel Dis 2017)。さらに、経静脈投与による関節炎部位への BM-MSC の homing/migration も確認しており、投与回数増加に比例した関節炎軽減効果の増大も確認している。その臨床応用に向け、「BM-MSC の関節軟骨傷害部での疼痛抑制、軟骨損傷阻止・機能保護と関節炎部への集積にはどのような分子機構が働いているのか？」が重要な学術的問いとなった。

2. 研究の目的

代表者は、(1) ウサギ MIA 関節炎モデルを用い骨髄由来間葉系組織幹細胞 (BM-MSC) の単回関節内注入による疼痛抑制因子と軟骨保護因子の増加、(2) BM-MSC の経静脈投与による骨・軟骨損傷部位への MSC の集積と傷害抑制機能を報告した。その OA の予防と低侵襲性治療への臨床応用に向け、関節軟骨傷害部での BM-MSC の疼痛抑制、軟骨損傷阻止・機能保護と関節炎部への集積に関わる詳細な分子機構の解明が緊急の研究課題となった。本研究では、MIA 関節炎モデルを用い BM-MSC の関節内ならびに経静脈投与により変動する遺伝子発現プロファイリングを、RNA sequencing 法と遺伝子パスウェイ解析の応用により非治療群との比較検討で選出し、培養関節軟骨再細胞を用いた *in vitro* の実験と 遺伝子発現修飾 BM-MSC 投与による *in vivo* の実験で検証する。

3. 研究の方法

MIA 関節炎モデルを用い BM-MSC の関節内ならびに経静脈投与により変動する遺伝子発現プロファイリングを、RNA sequencing 法と遺伝子パスウェイ解析の応用により非治療群との比較検討で選出する。この解析で発現が大きく変化していた特異的遺伝子が、どのようなパスウェイに関わっているかを探し出し、予防・治療への機序解明へ繋げる。RNS-sequencing・遺伝子パスウェイで選別された遺伝子群を、培養関節軟骨再細胞を用いた *in vitro* の実験と遺伝子発現修飾 BM-MSC 投与による *in vivo* の実験で検証する。

4. 研究成果

新型コロナウイルス (COVID-19) の流行により、RNA-sequencing の業者への委託が困難となり、*in vitro* および *in vivo* によるタンパク発現解析中心の実験系に大幅な変更を行った。

(1) ホーミングに関与する因子として報告されているケモカインおよびレセプターである C-X-

C motif chemokine ligand 12 (CXCL12)およびC-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)について検討した。まずホーミングにこれらの因子が関与していることを確認するために、家兔の骨格筋に損傷を引き起こし全身投与した骨髄間葉系幹細胞 (BM-MS C) がホーミングすることを確認した。骨格筋損傷周囲における CXCL12 が発現しており、ホーミングした BM-MS C は CXCL12 周囲に移動していることが確認できた。また、ホーミングした BM-MS C において CXCR4 が発現していることが確認できた。したがって、BM-MS C の全身投与後のホーミングに CXCL12/CXCR4 axis が関与していることが示唆された。これらのことを踏まえて、モノヨード酢酸 (MIA) を 2 mg 関節内に投与する軟骨損傷モデルで修復・予防効果および疼痛抑制効果について検討を加えた。骨格筋組織と同様に損傷した軟骨組織に CXCL12 の発現が認められた。局所投与及び経静脈投与でも同様に軟骨組織への BM-MS C の Migration を認めていることが確認でき、同機序でのホーミングが期待できる結果となった。BM-MS C から発現していると考えられる軟骨保護因子である TNF-induced protein 6 (TSG6) の発現を多数認めることを確認した。疼痛関連に関しては脊髄後角における Calcitonin gene related peptide (CGRP) の抑制が確認できたことから BM-MS C の投与による疼痛抑制が示された (図 1)。

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MS C) の組織修復および抗炎症作用を介した、さまざまな疾患の予防および治療における有効性について、先行研究にて報告した骨壊死の予防と治療に焦点を置き、骨細胞死を誘導する因子として知られているグルココルチコイド投与および低酸素ストレスに対する BM-MS C のストレス耐性を検討した。マウス骨細胞 (MLO-Y4) および骨髄由来マウス MSC を、*in vitro* でデキサメタゾン (Dex)、1% 酸素の低酸素、またはその両方に曝露した。ミトコンドリア膜電位、酸化ストレスマーカー (8-OHdG)、アポトーシス阻害分子であるカスパーゼ-3、-9、エネルギー合成タンパクである ATP シンターゼ (ATP5A) および抗アポトーシスタンパク質 (XIAP) を免疫蛍光法とウェスタンブロットの両方で分析した。デキサメタゾンまたは低酸素への曝露により、MLO-Y4 はミトコンドリア膜電位、ATP5A の低下、および 8-OHdG、切断型カスパーゼ、および XIAP の上方制御を示した。しかし、MSC ではデキサメタゾンと低酸素の両方に曝露した場合でも、ミトコンドリア膜電位は維持されていたが、アポトーシス促進分子または抗アポトーシス分子には有意な変化は見られなかった。デキサメタゾン、低酸素症、またはその両方による曝露による影響は、BM-MS C では見られなかった。グルココルチコイド投与と低酸素環境の二重ストレスに曝された骨細胞細胞では、ミトコンドリアを介して骨細胞死が誘導された。対照的に、同じストレスに曝された MSC はミトコンドリア機能が維持され、酸化ストレスの抑制および生存能を示した (図 2)。したがって、生体内で骨細胞死を引き起こすのに十分なストレスのかかる条件下でも、間葉系幹細胞の機能は維持できると考えられ、骨壊死の場合には骨内移植を組み込んだ予防および治療戦略が有望である可能性があることが示唆された。

図 1 BM-MS C の投与による疼痛抑制効果

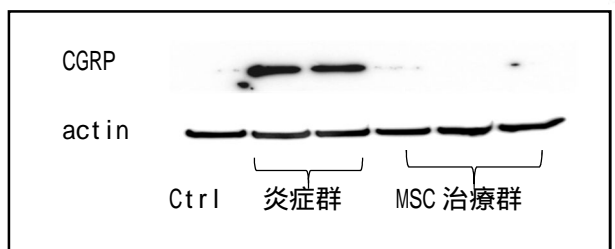
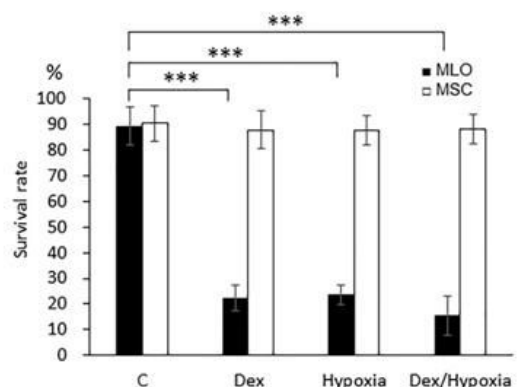


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 M. Shimasaki, S. Ueda, T. Ichiseki, H. Hirata, N. Kawahara, Y. Ueda	4. 巻 18
2. 論文標題 Resistance of bone marrow mesenchymal stem cells in a stressed environment - Comparison with osteocyte cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 1375-1381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijms.52104	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 S. Ueda, T. Ichiseki, M. Shimasaki, H. Hirata, N. Kawahara, Y. Ueda	4. 巻 1
2. 論文標題 Glucocorticoid-induced osteocytic cell death in a hypoxic environment is associated with necroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Chem (ISSN: 2673-6411)	6. 最初と最後の頁 98-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biochem1020009	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 植田修右, 市堰 徹, 兼氏 歩	4. 巻 40
2. 論文標題 ステロイド関連骨壊死に対する病態研究の最新情報	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 関節外科	6. 最初と最後の頁 1261-1265
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 平田寛明, 川原範夫
2. 発表標題 ストレス環境下骨細胞壊死における酸化ストレスとミトコンドリア障害の関与と予防
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 平田寛明, 相馬大輔, 川原範夫
2. 発表標題 ミトコンドリア転写因子 A によるストレス環境下骨細胞壊死の予防
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田寛明, 市堰 徹, 植田修右, 相馬大輔, 川原範夫
2. 発表標題 低酸素環境下ステロイド添加骨細胞におけるタウリンの効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 館 慶之, 平田寛明, 市堰 徹, 兼氏 歩, 川原範夫
2. 発表標題 変形性膝関節症に対する自家脂肪組織由来微小細断脂肪組織片 (MFAT) 投与の短期成績
3. 学会等名 第137回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 平田寛明, 相馬大輔, 兼氏 歩, 川原範夫
2. 発表標題 肩腱板断裂に対する病態研究とその予防
3. 学会等名 第137回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 館 慶之, 平田寛明, 市堰 徹, 川原範夫
2. 発表標題 家脂肪組織由来微小細断脂肪組織片(Micro-Fragmented Adipose Tissue:MFAT)を用いた変形性膝関節症に対する治療の短期成績
3. 学会等名 第49回北陸リウマチ・関節研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧 康彦, 福 淳史, 中村有香, 谷田育宏, 野崎香於利, 市堰 徹, 石垣靖人, 下平滋隆, 大澤 敏, 川原範夫
2. 発表標題 温度応答性培養皿Cepallet R によって作製された脂肪由来幹細胞シートの走査型電子顕微鏡での形態学的な観察
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福 淳史, 瀧 康彦, 中村有香, 谷田育宏, 野崎香於利, 市堰 徹, 石垣靖人, 下平滋隆, 大澤 敏, 川原範夫
2. 発表標題 SphereRing R を用いて脂肪由来幹細胞より形成されたスフェロイドの解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 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	島崎 都 (SHIMASAKI Miyako) (00440511)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	

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	上田 善道 (UEDA Yoshimichi) (50271375)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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