

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17993

研究課題名(和文)「抗菌薬含有脂肪由来幹細胞シート」を用いたバイオフィーム感染症への応用

研究課題名(英文) Application of antibiotic-loaded adipose-derived stem cells sheet to biofilm infection

研究代表者

山室 裕紀 (Yamamuro, Yuki)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30844328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪由来幹細胞(ADSCs)を用いた人工関節周囲感染(PJI)に対する新たな治療法を検討した。そこで独自のシート化技術を併用し、「抗菌薬含有ADSCsシート」による治療の確立、さらに投与方法の違いによる抗菌効果を検討した。シート化に関しては技術的な問題から一定量の抗菌薬を含有させ、さらに安定した作成には継続した研究が必要であった。投与方法の違いを検討した結果、ADSCsと抗菌薬の静脈内投与はPJIモデルラットに対して、体重の早期回復、細菌数の減少、骨密度減少の抑制を示し、強い抗菌効果を認めた。この抗菌効果には、抗菌ペプチド(カテリシジン)の発現量増加に関連している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ADSCsが抗菌薬の抗菌効果を妨げず、増強させること、そのメカニズムとして感染局所のカテリシジン発現の増加が寄与している可能性を強調しており、PJIに対する新しい細胞ベースの治療戦略を提供できる可能性がある。さらに従来の抗菌薬治療では効果が不十分な人工関節周囲感染患者に、応用できる可能性を示唆するものであった。今後も引き続き、他菌種や抗菌薬含有脂肪由来幹細胞での研究を進めるとともに、安定化した抗菌薬含有ADSCsシート作成、さらにその応用に向けて研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a new treatment method for periprosthetic joint infection (PJI) using adipose-derived stem cells (ADSCs). First, we established a treatment using "antibiotic-loaded ADSCs sheets" in combination with our original sheet technology, and then investigated the antibacterial effect of different administration methods. There were many difficulties in creating a sheet of ADSCs containing a certain amount of antibiotics due to technical problems, and furthermore, continuous research was necessary to create a stable sheet. In the study of different administration methods, ADSCs and intravenous antibacterial therapy showed a strong antibacterial effect on PJI model rats, with early recovery of body weight, reduction in bacterial counts, and suppression of bone mineral density loss. The antibacterial effect may be related to increased expression of cathelicidin.

研究分野：整形外科

キーワード：人工関節周囲感染 脂肪由来幹細胞 抗菌ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

人工関節周囲感染(PJI)は、インプラントを感染源とするバイオフィーム感染症であり、長期に及び抗菌薬投与、インプラントを温存し感染を鎮静化する有効な治療法は未確立である。しかし、実臨床では抗菌薬耐性化の問題や、QOL や ADL 保持のためインプラント抜去の困難な症例に直面することも多い。そのため非抗菌薬的アプローチかつインプラントを温存した状態でバイオフィーム感染症を鎮静化させる治療開発が課題である。そこで我々は免疫系の賦活化と調整作用や抗菌ペプチド分泌能を介した微生物の抗菌作用を有する脂肪由来幹細胞(ADSCs)に着目した。脂肪由来幹細胞(ADSCs)を含む幹細胞は、抗菌薬と併用静注することでバイオフィーム感染症や感染に伴う敗血症に対する有効なアプローチとなる可能性が示唆されている。これまで申請者は、ADSCs が、1. 抗菌薬を含有・徐放すること、2. バイオフィーム産生菌のメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)に対する殺菌効果があること、3. バイオフィーム形成阻害効果を有する抗菌ペプチド(カテリシジン)を分泌することを明らかにした。しかし、PJI に対する ADSCs 治療への応用は十分に評価されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ADSCs を用いたインプラント周囲感染に対する新たな治療法を検討することである。その一つとして細胞をシート化し密に集合させることで、抗菌薬担持量を増やし、尚且つ抗菌ペプチド分泌能も高められると考えた。独自のシート化技術を併用し、抗菌ペプチド分泌能を有する「抗菌薬含有 ADSCs シート」によるバイオフィーム感染症治療の確立を目的とした。さらに ADSCs の投与方法の違いによるバイオフィーム感染症への抗菌効果を検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) MSSA 感染 PJI モデルラットの作成

バイオフィームを形成しやすいとされる Methicillin-resistant Staphylococcus aureus 株(MSSA: ATCC 29213)を使用した。MSSA を Tryptic Soy Broth 培地に塗布し、MSSA のコロニーを 5 mL の Tryptic Soy Broth 中で、37°Cの振盪培養器にて一晚培養した。この培養液を Tryptic Soy Broth で希釈し、37°Cで再培養した。感染を確立するために、直径 1.2mm の医療用キルシュナーワイヤー(K-wire)を MSSA とともに一晚培養して金属表面へ細菌を付着した。本実験には、12 週齢の Wistar ラットの片膝を使用した。術前に腹腔内麻酔をし、Medial para-patella アプローチで展開し膝関節を露出した。大腿骨顆間部を 18 ゲージの針でリーミングし、準備した直径 1.2mm の K-wire(前述)を右大腿骨遠位部に逆行性に挿入し、MSSA 感染 PJI モデルラットを作成した。

### (2) ADSCs の作成 (抗菌薬(CPFX)含有 ADSCs シートの作成)

ADSCs は、12 週齢の Wistar ラットの鼠径部脂肪組織から、既報の方法により ADSCs を分離し、第 3 継代を使用した。なお ADSCs は、フローサイトメトリー解析により CD90+の表現マーカーを持つ細胞が多かった。第 3 継代の ADSCs( $1 \times 10^5$  cells/ml)を CPFX(100 mg/l)と 24 時間共培養し抗菌剤(CPFX)含有 ADSCs を作成した。そこから 1 週間培養し、over confluent 状態にし、アスコルビン酸(Ascorbate-2-phosphate)を添加し、さらに 1 週間培養することで抗菌剤(CPFX)含有 ADSCs シートを作成することとした。

### (3) MSSA 感染 PJI モデルラットへの抗菌効果の検討

ラットを無作為に割り付け、No treatment 群: 無治療群(n=6)、Antibiotics 群: 抗菌薬群(ciprofloxacin [3.0mg/kg/day b.i.d.]; n=6)、ADSCs with antibiotics: ADSCs・抗菌薬併用群(ciprofloxacin [3.0mg/kg/day b.i.d.] + ADSCs [ $5.0 \times 10^5$  cells 術後 30 分, 6 時間, 18 時間 b.i.d.]; n=6)の 3 群に分類した。評価項目は、体重変化 Modified Rising スコア、 $\mu$ CT、インプラントの CFU assay、病理組織 膝関節内組織のサイトカイン・カテリシジンの mRNA 発現とした。感染症に対する全身反応を定量的に測定するために、体重変化率を術前の体重を基準に算出した。手術日、術後 1、3、7、14 日に体重を測定した。局所の感染所見は、3 人の評価者が Modified Rising スコアを用いて視覚的にスコアリングした。インプラント周囲の骨に与える影響を評価するために  $\mu$ CT を用いてラットの K-wire 周辺の大腿骨の骨密度 (BMD)を計測し、骨形態を 3 次元(3D)で可視化した。インプラントのバイオフィーム内細菌数を定量評価するために、過去の報告に基づき超音波処理後の CFU assay によって決定した。膿瘍形成を評価するために、摘出した大腿骨はヘマトキシリン・エオジンで染色し、病理組織評価した。Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR)を用いて、感染局所の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1b)やラット由来カテリシジン (rCRAMP)の mRNA 発現を測定した。すべての値をハウスキーピング遺伝子(GAPDH)で正規化し、2<sup>-Ct</sup> 法を用いて相対的な遺伝子発現量を算出した。すべての連続変数は、Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性を評価した。データが正規分布している場合は、結果を平均値  $\pm$  SD で表した。データは、SPSS 27.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)を用いて解析した。3 つのグループ間の比較は、ANOVA を用いて行い、その後 Tukey multiple means post-test を行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

当初の目的である抗菌薬含有 ADSCs のシート化に関しては技術的な問題から一定量の抗菌薬を含有させ、さらに安定した作成には難しく継続した研究が必要であった。投与方法を変更し、ADSCs と抗菌薬併用静注療法も同時に検討してきた。観察期間中すべてのラットは生存した。体重変化に関しては、術後早期には 3 つの群ともに体重が減少した。すべての群で体重変化の最下点は術後 7 日目であったが、術後 7、14 日において 3 群のうち ADSCs with antibiotics 群で有意に小さかった。ADSCs with antibiotics 群は、ベースラインへの早期回復を認めた ( $p < 0.001$  vs No treatment 群;  $p = 0.009$  vs Antibiotics 群)。感染局所の評価では、ADSCs with antibiotics 群で modified rissing score が最も低かったが、Antibiotics 群と ADSCs with antibiotics 群で有意な差は認めなかった ( $p < 0.001$  vs No treatment 群;  $p = 0.359$  vs Antibiotics 群)。 $\mu$ CT による BMD 評価では、No treatment 群で  $506.6 \pm 12.7$  mg/cm<sup>3</sup>、Antibiotics 群では  $516.2 \pm 23.1$  mg/cm<sup>3</sup>、ADSCs with antibiotics 群では  $589.2 \pm 46.8$  mg/cm<sup>3</sup> であった。ADSCs with antibiotics 群で有意に高い BMD を維持した。3D  $\mu$ CT 画像では、No treatment 群及び Antibiotics 群で、大腿骨遠位部に Osteolysis と骨膜性骨新生を認めた。CFU assay は、No treatment 群で  $150.7 \pm 72.1 \times 10^4$  CFU/ml、Antibiotics 群で  $55.0 \pm 72.1 \times 10^4$  CFU/ml、ADSCs with antibiotics 群で  $17.0 \pm 15.3 \times 10^4$  CFU/ml であり、ADSCs with antibiotics 群で有意な減少を認めた ( $p = 0.013$  vs No treatment 群;  $p = 0.024$  vs Antibiotics 群)。病理組織評価は、No treatment 群で骨の不連続と骨膜下膿瘍を認め、Antibiotics 群で厚みのある骨膜、不均一な骨髄を認めた。ADSCs with antibiotics 群では、薄い骨膜、均一な骨髄の残存を認めた。Real time RT-PCR では、ADSCs with antibiotics 群で rCRAMP が有意に増加した ( $p = 0.002$  vs No treatment 群;  $p = 0.049$  vs Antibiotics 群)。TNF- $\alpha$  と IL-6 の発現は、ADSCs with antibiotics 群は No treatment 群と比較して有意に低かった (TNF- $\alpha$ ,  $p = 0.010$  vs No treatment 群; IL-6,  $p = 0.010$  vs No treatment 群) が、Antibiotics 群と有意な差は認めなかった。IL-1 $\beta$  の発現は 3 群で有意差はなかった。ADSCs と抗菌薬の併用療法が抗菌薬単独よりも MSSA 感染 PJI モデルラットに対して体重減少からの早期回復、インプラント周囲の細菌数の減少、インプラント周囲の骨密度減少の抑制を認め、強い抗菌効果を示した。この強い抗菌効果には、感染局所でのカテリシジンの発現増加が関連している可能性がある。本研究の成果は、従来の抗菌薬治療では効果が不十分な PJI 患者に、応用できる可能性を示唆するものであった。今後も引き続き、他菌種や抗菌薬含有 ADSCs での研究を進めるとともに、安定化した抗菌薬含有 ADSCs シート作成、さらにその応用に向けて研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山室裕紀
2. 発表標題 Combined Therapy of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Antibiotics has a Good Antibacterial Effect for Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus in a Rat Periprosthetic Joint Infection Model
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山室裕紀
2. 発表標題 人工関節周囲感染ラットに対する脂肪由来間葉系幹細胞と抗生剤併用療法の抗菌効果
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 山室裕紀
2. 発表標題 抗菌ペプチド分泌能を有する脂肪由来幹細胞を用いた 人工関節周囲感染症への応用
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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