

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09212

研究課題名（和文）腱付着部炎に対する作製血小板の有効性に関する研究

研究課題名（英文）A study on the efficacy of platelet-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for tendinopathy in rats

研究代表者

佐藤 和毅（Sato, Kazuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：60235322

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）：ASCL血小板の抗炎症効果と組織再性能を評価するために、ratアキレス腱を切離するモデルとcollagenaseによるアキレス腱変性モデルを作成した。アキレス腱切離モデルでは、Western BlottingおよびRT-PCRでJak/Stat系のリン酸化抑制が確認され、ASCL血小板がp38を活性化することによりStat3のリン酸化を阻害した抗炎症カスケードに関わっていることが示唆された。アキレス腱collagenaseモデルでは、投与後4週でcollagen-1, collagen-3, SCX, TNCの発現量が有意に増加し、腱修復を促すbFGFとVEGFが有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用したASCL血小板は皮下脂肪組織の脂肪前駆細胞から培養された安全性が高く、均一な性質の間葉系幹細胞/間質細胞株である。細胞成分を含まないASCL血小板は他家(同種)での投与が可能であり、臨床応用において大きなアドバンテージを有する。ASCL血小板は、品質が均一でない、広範囲傷害の治療に適さないなどのPRP療法の問題点を解決し、PRPの代替えになると期待される。本研究でASCL血小板の有効性と安全性を確認したことで、今後臨床応用、そしてPRP療法のエビデンス確立に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the anti-inflammatory effects and tissue regeneration potential of ASCL platelets, a rat Achilles tendon transection model and a collagenase-induced Achilles tendon degeneration model was employed.

In the Achilles tendon transection model, Western Blotting and RT-PCR revealed suppression of Jak/Stat pathway phosphorylation, suggesting that ASCL platelets are involved in an anti-inflammatory cascade by inhibiting Stat3 phosphorylation through p38 activation.

In the Achilles tendon collagenase model, real-time PCR analysis revealed a significant increase in the expression of collagen-1, collagen-3, SCX, and TNC, which are associated with tendon repair, 4 weeks post-administration. Furthermore, cytokine release assays of ASCL platelets indicated a significant increase in bFGF and VEGF, which promote tendon repair.

研究分野：整形外科学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞株 血小板 腱付着部炎

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

テニス肘(上腕骨外側上顆炎)、ゴルフ肘(上腕骨内側上顆炎)に代表される腱附着部炎は代表的なスポーツ障害の一つである。しかし、実際にはスポーツ活動のみならず、日常生活、仕事などの反復動作・過負荷によって発症し、腱鞘炎とならび最も頻度の高い上肢疾患でもある。その病態は腱附着部の炎症、変性、微小断裂であり、臨床においては各種の保存療法、手術療法が行われているが、絶対的有効性を示す治療法は存在せず、しばしば治療に難渋している。腱附着部は他の組織と比べ血管・神経の分布が乏しいこと、したがって組織修復能が低く、腱附着部が十分に修復しないうちに加重ストレスにより損傷・変性が重症化することが難治性の原因と考えられている。

近年、欧米や本邦の一部の医療施設において、難治性腱附着部炎に対しPRPを用いた治療が行われている。PRP療法は濃縮血小板に含まれる $\alpha$ 顆粒内の様々な成長因子・生体活性物質を局所に高濃度に供給することで、変性組織の再生や損傷組織の早期修復を図る治療法である。既に腱附着部炎対しての有用性が報告され(Gautam V K, et al. J Orthop Surg, 2015, Jason L D, et al. J Shoulder Elbow Surg, 2019)、米国ではFDAに認可されている。しかし、これらの報告は「使用したら症状が改善した」という実績であり、現時点ではその作用機序等は明らかでないのが実状である。PRP療法に関する基礎研究の報告は少なく、動物実験の病理組織評価で組織修復が促進されること、また、生化学的にI型コラーゲンやtenascin(細胞外マトリクスの糖タンパク質)など一部物質が早期に発現し、発現量も多い、といった事実にとどまる(Lei Chen, et al. Cell Physiol Biochem, 2014)。

また、PRPは自己血由来であり、抽出過程での遠心分離回数や速度・時間による血小板濃縮率の違い、白血球含有の有無、活性化の有無などによって作製されるPRPの性質が均一ではない。したがって一定の治療プロトコルがなく、PRPの性質が均一ではないことがPRP治療に関するエビデンス、科学的根拠が低い一因と考えられている。

申請者のグループは、科学としてのスポーツ医学の一端を担う医師として、経験のみに基づく「常識」にメスを入れ、腱附着部炎治療に対する多血小板血漿の効能を科学的に明確にするために本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)脂肪由来間葉系幹細胞株から作製した血小板(ASCL血小板)の腱附着部炎に対する抗炎症作用と組織再生能を検証すること、そして(2)ASCL血小板による腱附着部炎治療のプロトコルを策定することである。

末梢血から分離したPRPは採取法が標準化されておらず一定の品質確保が難しい点が問題点として挙げられている。PRP療法の有効性の科学的根拠を明確にするためには、血小板濃縮率、白血球含有の有無、活性化の有無などの性質が均一であるPRPを作成し、その上で至適濃度、投与法を探索し、一定のプロトコルを策定する必要がある。

脂肪由来間葉系幹細胞株 ASCL (human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cell line)は本学臨床研究推進センター松原由美子特任准教授らの研究チームにより研究開発された皮下脂肪組織の脂肪前駆細胞から培養された安全性が高く、均一な性質の間葉系幹細胞/間質細胞株である。本研究では、ASCLからバイオリアクターを用いて大量生産が可能な作製血小板(ASCL血小板)を使用する。細胞成分を含まないASCL血小板は他家(同種)での投与が可能であり、臨床応用において大きなアドバンテージを有する。ASCL血小板は、品質が均一でない、広範囲傷害の治療に適さないなどのPRP療法の問題点を解決し、PRPの代替になると期待されている。

脂肪幹細胞由来であるASCL血小板は本学独自のものであり、腱附着部炎に対するASCL血小板の抗炎症作用と組織再生能を立証する実験系はこれまで報告がない。本研究は独自性・独創性が高い、臨床に直結する研究と考える。

### 3. 研究の方法

#### (1)アキレス腱切離モデルによる抗炎症効果の検証

##### ①動物モデル (In vivo 実験)

10週齢の雄Westarラットを購入し、右アキレス腱をsham、左アキレス腱の腱附着部近傍をincisionし、腱障害モデルを作製した。皮膚を閉創後に27Gの注射針を用いて、Incision部にCaCl<sub>2</sub>添加ASCL-PLC $1.0 \times 10^7$ /PBS50 $\mu$ lを投与した群とCaCl<sub>2</sub>添加PBS50 $\mu$ lを投与した対象群を比較した。投与後3日でサクリファイスし、腱切離部組織の炎症性サイトカインIL-6、IL-1 $\beta$ をRealTime PCRで測定した。投与後1週間でサクリファイスし、組織学的所見を確認した。

##### ②In vitro 実験

NIH3T3細胞をIL-6/sIL-6R(各100ng/ml)で刺激して6時間後にmRNAを回収した。コントロールをIL-6/sIL-6R<sup>-</sup>、試薬なしをIL-6/sIL-6R<sup>+</sup>とし、IL-6/sIL-6R<sup>+</sup>にPBSとASCL-PLCを添加した場合のIL-6の発現量をRealtime PCRで比較した。Western Blottingも同様に、IL-6/sIL-6R(各100ng/ml)で刺激したものと、PBSおよびASCL-PLCを投与したもので、pStat3、Stat3を

評価した。NIH3T3 を IL-6/sIL-6R (各 100ng/ml) で刺激し、6 時間後に mRNA を回収した。MAPK カスケードのどこに関与しているのかを調べるために、NIH 3T3 細胞に対してコントロールを IL-6/sIL-6R -, 試薬なしを IL-6/sIL-6R + とし、ASCL-PLC のみ、ASCL-PLC に MAPK-Inhibitor (p38, JNK, ERK) をそれぞれ添加した場合の IL-6 の発現量を Realtime PCR で比較した。

## (2) アキレス腱変性モデルによる腱修復効果の検証

### ① ASCL-PLC によるサイトカイン放出

-80°C で保存した PRP と ASCL-PLC を使用した。室温で溶解後、両者の上清中の bFGF と VEGF-A 濃度を測定した。

### ② 動物実験デザイン

腱障害を誘発するため、8 週齢のラットの両後肢に、腱変性作用を有するコラゲナーゼ 1 型を経皮的に 50  $\mu$ l (700UI) 投与した。その 2 週間後、PBS 単独 50  $\mu$ l または  $1.0 \times 10^7$  個の ASCL-PLC を含む PBS 50  $\mu$ l をそれぞれ左右の後肢に経皮的に注射し、その後 1、2、4 週目にラットを犠牲にした。両脚からアキレス腱を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋後、5  $\mu$ m で切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) またはアルシアンブルーで組織学的に染色した。染色切片は、腱修復の半定量的評価である Bonar スコアの算出に使用した。2 週目と 4 週目のサンプルは、後述するバイオメカニカルテストにも使用した。

### ③ 組織学的検査

踵骨とともに摘出したラットのアキレス腱に HE 染色とアルシアンブルー染色を行った。Bonar スコアは、細胞形態、コラーゲン配列、細胞性、血管性、基底質の 5 つのパラメータを用いて算出し、各パラメータを 0~3 の尺度で数値化した。

### ④ バイオメカニカルテスト

アキレス腱を踵骨とともに採取し、筋組織と腱鞘を除去した。腱と踵骨をガーゼとサンドペーパーで把持し、摩擦力を増加させた。次に、アキレス腱を鋸歯状の金属板で把持し、機械試験機に設置した。その後、腱を 50mm/s の一定速度で破断まで垂直に引っ張った。極限破壊荷重 (N) を記録した。

### ⑤ 遺伝子発現のリアルタイム RT-PCR 分析

ラットアキレス腱をホモジナイズし、RNA を抽出した。Prime Script RT Reagent Kit (を用いて一本鎖 cDNA を調製、定量的 PCR は、Thermal Cycler Dice Real-Time System と SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio 社製) を用いて行い、転写産物レベルを ddCt 法で定量した。Col-1a1、Col-3a1、Scleraxis (以下 SCX)、Tenascin C (以下 TNC) のプライマーを使用した。データは  $\beta$ -アクトニン (Actb) 発現レベルで正規化した。

## ⑦ ウェスタンブロッティング

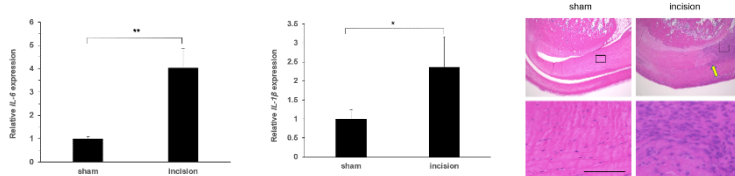
NIH3T3 細胞培養液を無血清培地に 24 時間交換した。その後、細胞を  $1.0 \times 10^7$  個の ASCL-PLC で刺激し、ASCL-PLC 刺激後 5、10、15、30、60、90 分にサンプルを回収した。ウェスタンブロッティング処理を行った。ERK1/2、p38、JNK のリン酸化の活性化を確認した。

## 4. 研究成果

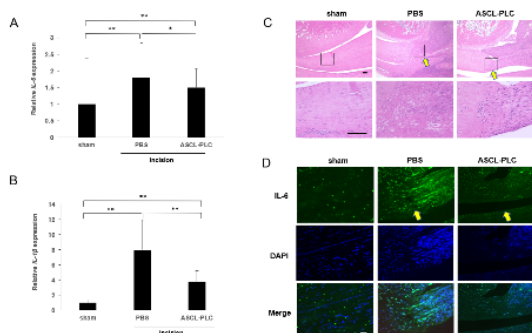
### (1) アキレス腱切離モデルによる抗炎症効果の検証

#### ① ・腱障害動物モデル

腱切離部組織の IL-6 および IL-1 $\beta$  を Realtime PCR で評価したところ、いずれも sham と比較して、炎症性サイトカインは増加し、急性期の炎症が引き起こされたことを確認した。組織学的所見では HE 染色で、sham と比較して incision 部で炎症細胞の浸潤が確認できた。



#### ・ ASCL-PLC と PBS 投与の比較実験 (In vivo)



IL-6、IL-1 $\beta$  ともに PBS 投与群と比較して、ASCL-PLC 投与群で IL-6 の発現抑制がみられた。また、投与後 1 週でサクリファイスした切離部の HE 染色では、PBS 群と比較して ASCL-PLC 群では炎症細胞の浸潤が減少していた。IL-6 免疫染色でも、ASCL-PLC 投与群では PBS 群と比較して IL-6 の発現抑制されていた。

## ②・NIH3T3 細胞での比較実験 (In vitro)

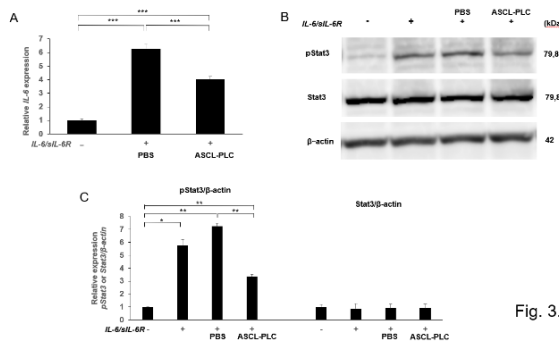


Fig. 3.

PBS 群と ASCL-PLC 群で RealtimePCR で比較したところ、PBS と比較して、ASCL-PLC 投与で IL-6 発現量が抑制された。Western Blotting も同様に、PBS および ASCL-PLC 群で pStat3、Stat3 を評価したところ、PBS 群では pstat3 の発現量に差は見られなかったが、ASCL-PLC 群では pStat3 の発現量が低下し、Jak/Stat 経路で、stat3 のリン酸化を抑制していることが示唆された。

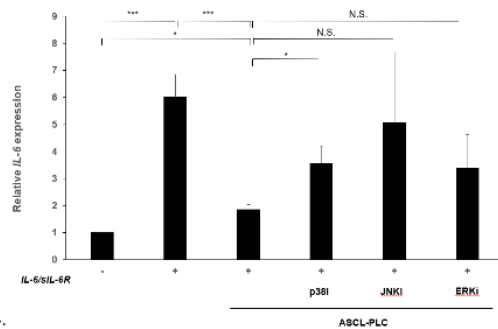


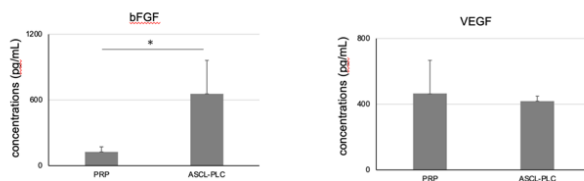
Fig. 4.

同様に、NIH3T3 を IL-6/sIL-6R で刺激し、コントロールを IL-6/sIL-6R -, 試薬なしを IL-6/sIL-6R + とし、ASCL-PLC のみ、および ASCL-PLC に MAPK-Inhibitor (p38, JNK, ERK) をそれぞれ添加した場合の IL-6 の発現量を Realtime PCR で比較した。MAPK-Inhibitor のうち、p 38 を添加した場合のみ、通常の ASCL-PLC を添加したものと比較して IL-6 の発現抑制効果が減じた。

## (2) アキレス腱変性モデルによる腱修復効果の検証

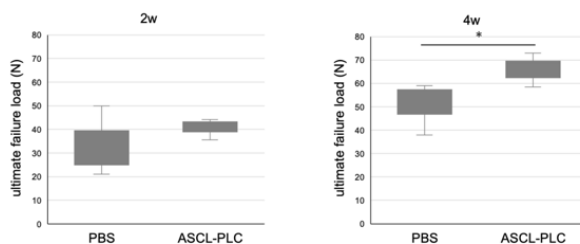
### 凍結保存した ASCL-PLC は解凍後もサイトカイン放出活性を維持する

ASCL-PLC は、ASCL を血小板誘導条件下で刺激することにより調製した。従来の PRP も記載されたように調製された [17]。PRP と ASCL-PLC を凍結保存した後、両方の調製物を解凍し、サイトカイン放出を促進するために CaCl<sub>2</sub> で 15 分間刺激した。その後、腱の修復に機能する VEGF と bFGF のレベルを両サンプルで測定した。ASCL-PLC と PRP は同等レベルの VEGF を放出したが、ASCL-PLC は PRP よりも有意に高いレベルの bFGF を放出した。



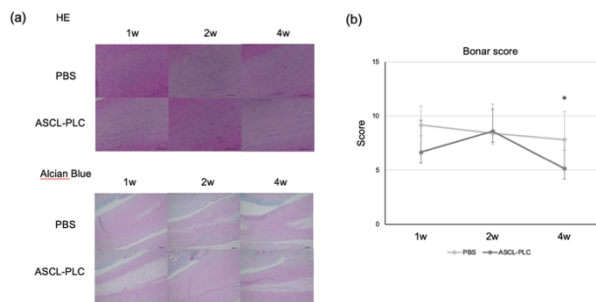
### ASCL-PLC 処理により、コラゲナーゼ処理したラットアキレス腱の最大強度が増加した

腱損傷をモデル化するために、ラットアキレス腱の in vivo コラゲナーゼ処理を用いた。そのため、ラットアキレス腱にコラゲナーゼを経皮的に注射し、2 週間後に同様に ASCL-PLC または PBS を損傷部位に注射した。次に、2 週間後または 4 週間後に腱の最大筋力を測定したところ、ASCL-PLC または PBS 投与 4 週間後の筋力は、対照群に比べて ASCL-PLC 群で有意に高いことがわかった。

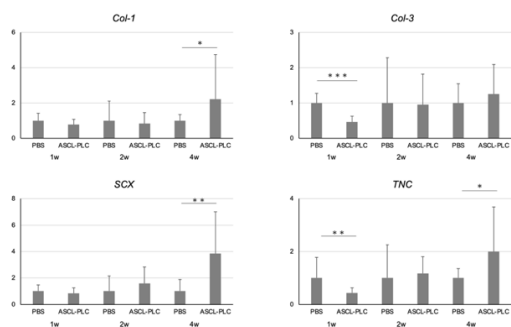


次に、腱の組織学的パラメータを半定量的に解析した。上記と同様に、ラットアキレス腱のコラゲナーゼ処理 2 週間後に ASCL-PLC または PBS を投与し、その後 1、2、4 週間後にそれらの腱から組織切片を作製し、HE およびアルシアンブルー染色を行った。組織学的解析の結果、ASCL-PLC

で処理したアキレス腱には、免疫細胞の浸潤などの異種移植片反応は認められなかった。次に、5つの組織学的パラメータ（すなわち、細胞形態、コラーゲン配列、細胞性、血管性、および基底物質）を評価し、それらを半定量的にスコア化して Bonar スコアを算出した。治療後4週間で、ASCL-PLC 治療は PBS 治療と比較して、これらのパラメータに基づく Bonar スコアを有意に改善した。

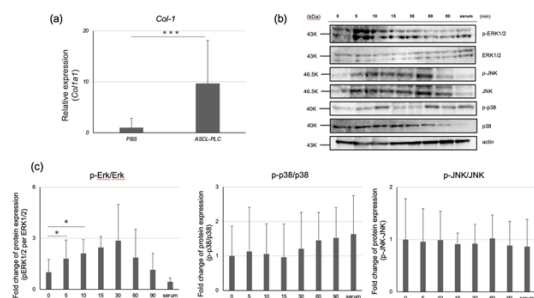


ASCL-PLC 投与は、in vivo でコラーゲナーゼ処理したアキレス腱の腱関連遺伝子発現を増加させた。ラットアキレス腱のコラーゲナーゼ処理2週間後に ASCL-PLC または PBS を投与し、ASCL-PLC または PBS 投与1、2、4週間後のアキレス腱における腱修復関連因子、Col-1a1、Col-3a1、Scleraxis（以下 SCX）、Tenascin C（以下 TNC）の発現を realtime PCR 法で解析した。Col-3a1 と TNC は PBS 投与群で1週間後に有意に高値を示したが、Col-1a1、SCX、TNC は ASCL-PLC 投与群または PBS 投与群で4週間後に有意に高値を示した。



ASCL-PLC は線維芽細胞 NIH3T3 細胞における腱関連遺伝子発現を刺激する。最後に、線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて、ASCL-PLC 処理によって伝達されるシグナルを定義するために in vitro 解析を行った。そのために、NIH3T3 細胞を ASCL-PLC で24時間処理した後、全 RNA を抽出した。その結果、COL-I 遺伝子の発現は、PBS 処理サンプルに比べ、ASCL-PLC 処理サンプルで有意に上昇していることが観察された。

次に、ASCL-PLC で処理した NIH3T3 細胞から様々な時点でライセートを調製し、ERK1/2、p38、JNK を含む MAPK 経路の様々なコンポーネントの活性化を示すリン酸化を検出するためにウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングの半定量的解析により、ASCL-PLC を添加して培養した NIH3T3 細胞では、ERK1/2 のリン酸化が有意に上昇したが、p38 と JNK のリン酸化は上昇しなかった。



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
研究分担者	鳥居 暁子  (Torii Akiko)  (40594536)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	
研究分担者	宮本 健史  (Miyamoto Takeshi)  (70383768)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授   (17401)	

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