

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16708

研究課題名（和文）老化細胞除去薬による変形性膝関節症由来滑膜幹細胞の高品質化と治療効果の検討

研究課題名（英文）Improvement of biological functions and therapeutic efficacy of synovial stem cells from osteoarthritis using senolytic drugs

研究代表者

遠藤 健太郎（Endo, Kentaro）

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト助教

研究者番号：30844378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：老化細胞除去薬ABT-263による変形性膝関節症（OA）患者由来滑膜間葉系幹細胞（MSCs）の高品質化を試みた。ABT-263処理により老化細胞数は減少し、コロニー形成能や軟骨分化能が向上した。しかし、一時的な増殖能の低下が見られ、より低ストレスな方法として、細胞サイズと自家蛍光に基づく分取による高品質化について検討した。結果としては、小サイズ、低自家蛍光の細胞を選択的に分取することで、コロニー形成能や軟骨分化能を大きく向上させることが可能であり、drug-freeでの高品質化に成功した。現在、本法により高品質化した滑膜MSCの機能およびOA治療効果について詳細な検討を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性疾患である変形性膝関節症（OA）は有症状者数が多いにも関わらず根本的な治療法が存在せず、対症療法が行われている。超高齢化を迎えた本邦では、OA治療法の開発は社会的に喫緊の課題である。本研究の成果は、これまでの滑膜間葉系幹細胞（MSCs）注射によるOA治療効果を老化生物学的観点から向上させることで、より患者満足度の高いOA治療法の開発につながると思われる。また、薬剤を用いない新たなMSCs純化方法により、老化細胞を除去し、MSCsを若返らせる技術を開発できたことから、膝関節を含め様々な分野でのMSCsを用いた再生医療の質の向上につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We attempted to improve quality of synovial mesenchymal stem cells (MSCs) derived from patients with knee osteoarthritis (OA) by using ABT-263, a senolytic drug. Our results showed that ABT-263 treatment reduced the number of senescent cells and improved their ability to form colonies and differentiate into chondrocytes. However, a temporary decrease in proliferative capacity was observed, so we investigated a drug-free method to sort cells based on their size and autofluorescence. MSCs with small size and low autofluorescence showed greater colony formation and chondrogenic differentiation ability than before sorting. We succeeded in a drug-free method to improve synovial MSC quality and are currently engaged in a study to evaluate the biological function and therapeutic efficacy of synovial MSCs purified by this method for OA.

研究分野：再生医療、整形外科

キーワード：細胞老化 変形性膝関節症 滑膜 間葉系幹細胞 軟骨

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性膝関節症 (OA) に対する治療法の開発は、有症状者数が多いにも関わらず根本的な治療法が存在しないため、現在社会的に喫緊の課題となっている。これまでに申請者らは、自己滑膜間葉系幹細胞 (滑膜 MSCs) の関節内注射が OA により失われた軟骨を再生可能なことを明らかにした。

(2) しかし、OA 患者由来の滑膜 MSCs には老化細胞が多量に含まれており、本来の OA 治療効果を発揮できていない可能性がある。研究代表者はこれまでに ABT-263 (抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 阻害剤) が滑膜 MSCs 中に含まれる老化細胞を除去可能である可能性を独自に見出した。

2. 研究の目的

本研究では、老化細胞除去薬である ABT-263 を用いて、OA 患者由来の滑膜 MSCs から質の悪い老化細胞のみを除去することで高品質化を試みるとともに、さらなる OA 治療効果を得られるのかどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

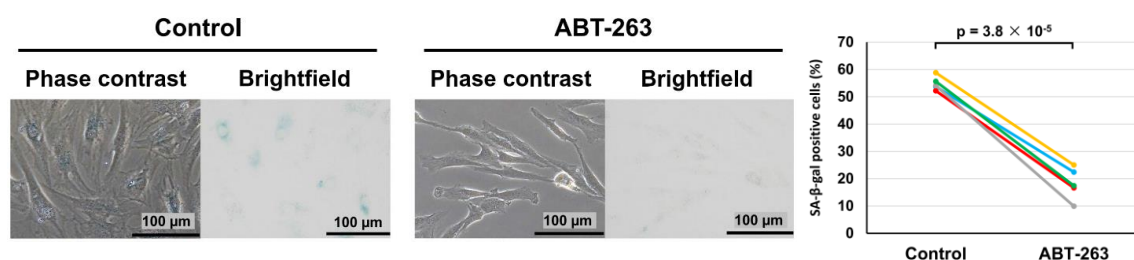
(1) OA 患者から滑膜 MSCs を分離して、ABT-263 処理・未処理で老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性 (SA- β -gal)、コロニー形成能や表面抗原、脂肪・骨・軟骨分化能などを比較した。

(2) OA 患者から滑膜 MSCs を分離して、セルソーターを用いて細胞サイズを反映する前方散乱光 (FSC) と自家蛍光を反映する FITC を元に、Large, Medium, Small に分類し、老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性 (SA- β -gal)、コロニー形成能、軟骨分化能などを比較した。

(3) OA において重要となる関節軟骨の老化についての基礎検討として酸化ストレスと炎症ストレスが軟骨細胞に与える影響についても評価した。ラット軟骨細胞を H2O2 と IL-1 β +TNF- α (IL/TNF) で処理し、老化表現型について in vitro, in vivo にて評価した。

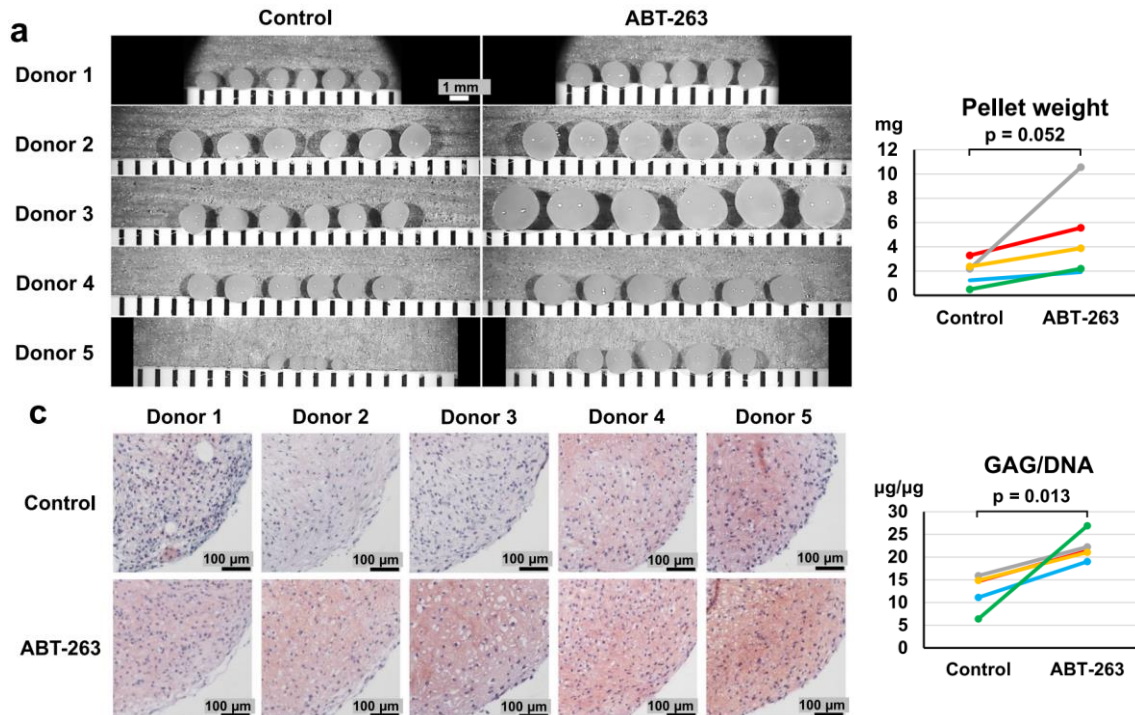
4. 研究成果

(1) ABT-263 処理群では、SA- β -gal 陽性細胞率が有意に低下し、アポトーシスが誘導された (図 1)。ABT-263 処理により、コロニー形成能が亢進し、表面抗原解析では CD34 発現が有意に低下していた。ABT-263 処理細胞は高い軟骨・脂肪分化能を示したが、骨分化能には両群で差を認めなかった (図 2)。軟骨ペレットにおいて、老化細胞関連マーカー (p16, p21) や SASP 因子 (MMP-



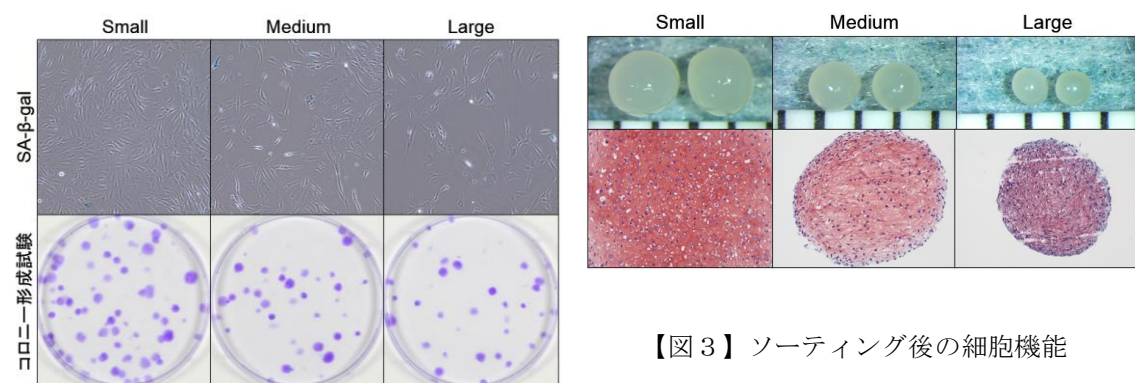
【図 1】 ABT-263 処理後の老化細胞の割合

13, IL-6) の発現は、ABT-263 処理群で有意に低下した。以上より、ABT-263 処理によって OA 由来滑膜 MSC に混在する老化細胞は選択的に除去され、コロニー形成能や多分化能が改善され、ABT-263 は効果的な OA 治療法の開発に有用であると考えられた。しかしながら、ABT-263 処理中に細胞増殖への悪影響が認められ、より細胞への影響が少ない方法の確立が望まれた。



【図 2】 ABT-263 処理後の軟骨分化能

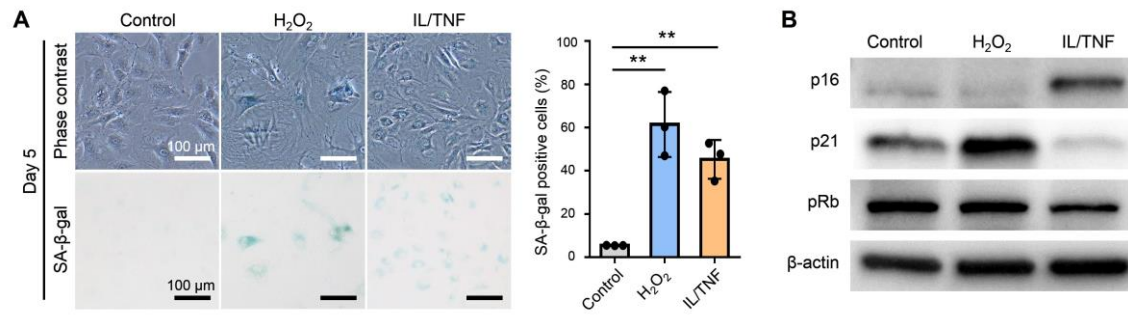
(2) 上記成果から、より細胞へのダメージが少ない方法として、細胞サイズ・自家蛍光に基づく細胞分取を実施した。Small, Medium, Large の順に SA-β-gal 活性は低くなり、コロニー形成能、軟骨分化能は高くなった (図 3)。以上の結果から、OA 患者由来の滑膜 MSCs のより細胞に優しい drug-free での高品質化に成功した。現在、本法により高品質化した細胞の OA 治療効果について詳細な検討をラット OA モデルにて評価・解析を行う予定である。



【図 3】 ソーティング後の細胞機能

(3) どちらのストレスも SA-β-gal の発現を有意に亢進させた。H2O2 処理群では、細胞の大型化、細胞増殖の停止、γ-H2AX および p21 発現の上昇、GAG 産生能の低下が認められた。一方 IL/TNF 処理群では、p16 や SASP 因子 (MMP-13, ADAMTS-5, MCP-1 など) の発現増加と GAG 分解の促進が認められた (図 4)。in vivo 実験において H2O2 注射群では、軟骨変性や SASP にほとんど変化は見られなかった。IL/TNF 注射群では、軟骨変性が進行し、p16 や SASP 因子陽性の軟

骨細胞の割合が増加した。以上の結果から、酸化ストレスと炎症ストレスが軟骨細胞老化に及ぼす影響は大きく異なることが示された。OA 進行において特に重要な SASP の誘導については、酸化ストレスより炎症ストレスが支配的なドライバーであると考えられた。



【図 4】 In vitro での評価 (A) SA-β-gal 染色、(B) 老化マーカー発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miura Yugo, Endo Kentaro, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Clearance of senescent cells with ABT-263 improves biological functions of synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-022-02901-4	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 Fujii Shunichi, Endo Kentaro, Matsuta Seiya, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Comparison of the yields and properties of dedifferentiated fat cells and mesenchymal stem cells derived from infrapatellar fat pads	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 611～619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.11.006	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 Tanimoto Takahiro, Endo Kentaro, Sakamaki Yuriko, Ozeki Nobutake, Katano Hisako, Mizuno Mitsuru, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Human synovial mesenchymal stem cells show time-dependent morphological changes and increased adhesion to degenerated porcine cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20386-2	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 Fujii Shunichi, Endo Kentaro, Ozeki Nobutake, Sakamaki Yuriko, Kohno Yuji, Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Tsuji Kunikazu, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison of adhesion of thawed and cultured synovial mesenchymal stem cells to the porcine meniscus and the relevance of cell surface microspikes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12860-022-00456-z	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 Furuoka Hideto, Endo Kentaro, Sekiya Ichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in number in response to synovitis and display more tissue-reparative phenotypes in osteoarthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-023-03487-1	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 Ozeki Nobutake, Mizuno Mitsuru, Yanada Shinobu, Okada Takuya, Kubota Rei, Kushida Yoshihisa, Furuoka Hideto, Endo Kentaro, Katano Hisako, Nakamura Kentaro, Ohya Shoji, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cell Transplantation Suppresses Inflammation Caused by Synovial Harvesting and Promotes Healing in a Micro Minipig Repaired Meniscus Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 470 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2023.01.012	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 Miura Yugo, Endo Kentaro, Sekiya Ichiro	4. 巻 88
2. 論文標題 Histological and biochemical changes in a rat rotator cuff tear model with or without the subacromial bursa	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 102370 ~ 102370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2024.102370	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 -

1. 著者名 Yagi Misaaki, Endo Kentaro, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of the effects of oxidative and inflammatory stresses on rat chondrocyte senescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-34825-1	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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 三浦 雄悟, 遠藤 健太郎, 大関 信武, 片野 尚子, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 老化細胞除去による、質の高い滑膜間葉系幹細胞の作製
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木 美咲, 遠藤 健太郎, 小森 啓一郎, 大関 信武, 水野 満, 片野 尚子, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 酸化ストレスと炎症ストレスが軟骨細胞の老化に与える影響の比較
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古岡 秀人, 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルにおける関節液中間葉系幹細胞の数・質的变化の解析
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松多 誠也, 遠藤 健太郎, 大関 信武, 水野 満, 片野 尚子, 関矢 一郎
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルへ投与後のヒト滑膜・脂肪由来間葉系幹細胞の液性因子発現の比較
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 俊一, 遠藤 健太郎, 小森 啓一郎, 大関 信武, 水野 満, 片野 尚子, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 膝蓋下脂肪体由来の脱分化脂肪細胞と間葉系幹細胞の特性の比較
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本 貴大, 遠藤 健太郎, 大関 信武, 水野 満, 片野 尚, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 滑膜間葉系幹細胞の損傷軟骨への接着におけるmicrospikesの役割の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松多 誠也, 遠藤 健太郎, 大関 信武, 水野 満, 片野 尚子, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルへ投与後のヒト滑膜・脂肪由来間葉系幹細胞の液性因子関連遺伝子発現の比較
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古岡 秀人, 遠藤 健太郎, 大関 信武, 片野 尚子, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢 一郎
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルにおける関節液中間葉系幹細胞の数・質的变化の解析
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 老化軟骨・半月板細胞を標的とした変形性膝関節症治療薬の開発
3. 学会等名 第13回Orthopedic Research Club (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松多 誠也、遠藤 健太郎、大関 信武、水野 満、片野 尚子、古賀 英之、関矢 一郎
2. 発表標題 滑膜間葉系幹細胞は脂肪間葉系幹細胞よりも変形性膝関節症モデルへ注射後に高いIPRG4 発現を示す
3. 学会等名 第38回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 四十物 佑介、遠藤 健太郎、大関 信武、水野 満、片野 尚子、古賀 英之、関矢 一郎
2. 発表標題 ラット半月板自然修復過程における老化細胞およびリプログラミング因子の評価
3. 学会等名 第38回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関矢 一郎、古賀 英之、片野 尚子、水野 満、遠藤 健太郎、大関 信武、吉井 俊貴
2. 発表標題 細胞移植による半月板温存治療
3. 学会等名 第38回日本整形外科基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Endo, Ichiro Sekiya
2. 発表標題 Piperlongumine Attenuates Osteoarthritis Progression By Clearing Senescent Chondrocytes And Meniscus Cells
3. 学会等名 ORS 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hideto Furuoka, Kentaro Endo, Ichiro Sekiya
2. 発表標題 Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in number in response to synovitis and display more tissue-reparative phenotypes in osteoarthritis
3. 学会等名 ORS 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuki Hidaka, Kentaro Endo, Ichiro Sekiya
2. 発表標題 Single-cell RNA Sequencing Analysis Of Human Synovial And Adipose Mesenchymal Stem Cells For Knee Osteoarthritis Treatment
3. 学会等名 ORS 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 Piperlongumineは老化軟骨・半月板細胞を除去することで変形性膝関節症の進行を抑制する
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 日高由貴, 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 シングルセルRNA解析によるヒト滑膜および脂肪由来間葉系細胞のサブセット比較
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 遠藤健太郎、片野尚子、水野満、大関信武、関矢一郎
2. 発表標題 滑膜由来間葉系幹細胞を用いた治療開発の現状と今後の展望
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 遠藤 健太郎, 日高由貴, 関矢 一郎
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencingによるヒト滑膜・脂肪間葉系幹細胞のサブセット解析
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 四十物佑介, 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 ラット半月板自然修復過程における細胞老化の役割の検討
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 児玉隼人, 遠藤 健太郎, 関矢 一郎
2. 発表標題 急性期炎症膝においてマクロファージが滑膜間葉系幹細胞の数および機能に与える影響
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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