

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860821

研究課題名(和文)骨破壊性疾患の新展開：間葉系幹細胞とナノファイバーシートによる関節再生医療の確立

研究課題名(英文) A novel treatment strategy aiming joint regeneration of rheumatoid arthritis and osteoarthritis by mesenchymal stem cells with nano-fiber scaffold

研究代表者

園本 格士朗 (SONOMOTO, Koshiro)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：20636914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節破壊を特徴とする関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)では、既存治療に抵抗性で関節破壊が進行する患者が多く存在するが、破壊された関節を修復する治療法は確立されていない。本研究では、関節再生には骨・軟骨への分化能を有する間葉系幹細胞(MSC)が有用と考え、MSCをポリ乳酸-グリコール酸電界紡糸ナノファイバーへ播種し(NF-MSC)、NF-MSCがラット関節炎を抑制すること、NFがMSCのサイトカイン産生能、他分化能を促進することを見出した。NFはRA、OA患者由来MSCに対しても同様の効果を発揮し、これら結果より、患者自己由来NF-MSCによる関節炎治療、関節再生治療の可能性が示された。

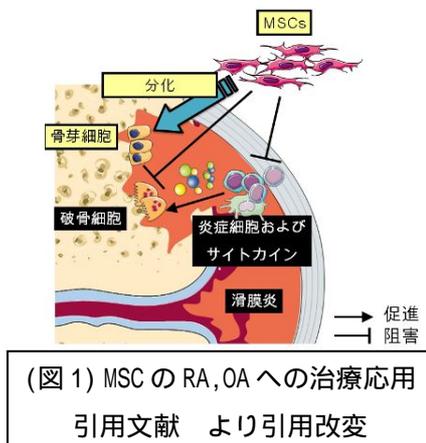
研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have immunosuppressive activity and can differentiate into bone and cartilage; and thus seem ideal for treatment of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). Here, we investigated the immunosuppressive potential, osteogenesis and chondrogenesis potentials of MSCs seeded onto nano-fiber scaffolds (NFs). Healthy donor derived human MSC seeded on NF sheet (NF-MSC) successfully suppressed the collagen induced arthritis of rats. In this context, NFs enhanced the ability of MSCs of cytokines production. Next, in vitro experiment of NF-MSC revealed that NFs stimulated the differentiation of MSCs derived from healthy as well as RA- or OA-patients into osteoblasts, chondrocytes and osteocytes. These data show the possible use of NF-MSCs for the repair of RA-affected joints.

研究分野：骨代謝

キーワード：関節再生 関節リウマチ スキャフォールド

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)は進行性の炎症による関節破壊を特徴とする慢性疾患である。RAにおいては生物学的製剤の登場により関節破壊の進展抑制は一部の患者で達成可能となったが、依然として多くの患者が治療に抵抗性で関節破壊の進行を認める。OAでは減量、運動療法などで関節破壊の進行をなるべく緩徐とすることを治療の主眼としており、関節破壊が進行した後に人工関節置換術を行われるにすぎない。以上のようにRA、OAの関節をターゲットとした治療は進行抑制にとどまり、破壊関節を修復する治療法が望まれている。このような背景の中、間葉系幹細胞(MSC)は骨芽細胞、軟骨細胞への分化能をもつ細胞集団で、関節破壊修復の可能性を持つと考えられる。MSCは同時に抗炎症作用を有し、RA動物モデルにおける関節炎抑制も多く報告されている(引用文献)。我々は健常人由来MSCがオステオプロテゲリンを分泌することで骨破壊の主役を担う破骨細胞分化を直接阻害することを初めて報告した(引用文献)。加えて我々は炎症環境がMSCの骨芽細胞分化を促進すること(引用文献)、健常人MSCが関節リウマチ動物モデルの破壊関節を再生する能力があることを見出した(図1)。以上より、関節炎抑制、骨再生を包括した治療法として、抗炎症作用、破骨細胞分化阻害作用、骨芽細胞分化能をもつMSCが適切と考えられる。



なお、MSCのヒトに対する移植の安全性が知られている一方で、MSCが移植片対宿主病を惹起するという相反する報告もあり、患者由来MSCの性質を詳細に調査することが臨床応用以前に必須である。

## 2. 研究の目的

### (1) 患者由来MSCの性質に関する研究

MSCのもつ多分化能、炎症局所における骨芽細胞分化能は健常人由来MSCでのみ確認されている。同種MSC移植の安全性は数多くの臨床試験で報告されているが血液製剤と同様、病原体の混入、拒絶反応の可能性が否定できず、自家移植が望まれる。そのため、患者由来MSCが健常人由来MSCと同等の性質をもつかにつき、in vitroで検討する。

### (2) MSC移植法の確立

MSCの経静脈投与により、ラット関節炎が抑制されると報告されている(引用文献)。一方、静脈内投与されたMSCのほとんどは肺動脈を通過できないことも知られている。すなわち、経静脈投与では有効数のMSCが関節局所に到達しないことが懸念される。関節再生を狙うためには、MSCの局所投与が望ましく、担体(ナノファイバー)に播種したMSCを関節内へ直接留置する手法を確立し、ラット関節炎に対する有効性を評価する。

### (3) ナノファイバーによるMSC分化誘導の検討

患者由来MSCを体外培養し、患者自身へ(2)の手法を用いて戻すに先立ち、担体であるナノファイバーがMSCの分化能へ与える効果を検討し、効率的な関節再生法の確立へつなげる。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者由来MSCの性質に関する研究

関節置換術予定のRA、OA患者より同意文書を取得し、手術中に破棄される骨髄液を回収し、骨髄液由来MSCを抽出した。この患者由来MSCを骨芽細胞分化培地、軟骨分化培地、

脂肪細胞分化培地で培養し、アリザリンレッド S 染色、サフラニン O 染色、オイルレッド O 染色を行い分化能につき評価する。また、骨芽細胞分化培地に IL-1 を添加した培養系でアリザリンレッド S 染色、PCR法を行い、骨芽細胞分化を評価する。

#### (2) MSC 移植法の確立

コラーゲン誘導関節炎(CIA)ラットを用いた実験を行う。ニワトリ II 型コラーゲンおよびアジュバントを用いて CIA 免疫を行い、同日、ナノファイバー (NF) に播種した MSC(NF-MSC)を移植する。対照治療として、無治療、MSC 関節内注射、MSC 腹腔内注射を行う。評価にはは関節炎スコア、X 線写真による関節破壊、血清学的評価、組織学的評価を用いる。また、NF が MSC に与える効果を評価する目的で、NF-MSC を *in vitro* 培養し、MSC のサイトカイン産生能を評価する。

#### (3) ナノファイバーによる MSC 分化誘導の検討

NF-MSC を MSC 増殖培地、骨芽細胞分化培地、軟骨分化培地で *in vitro* 培養し、von Kossa 染色、サフラニン O 染色、PCR 法で骨芽細胞分化、軟骨分化、骨細胞分化につき評価する。

### 4. 研究成果

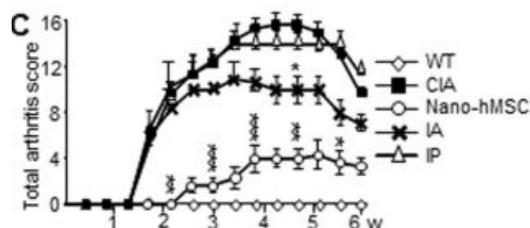
#### (1) 患者由来 MSC の性質に関する研究

RA 患者 3 例、OA 患者 3 例より MSC を抽出した。これら患者由来 MSC は骨芽・軟骨・脂肪細胞分化誘導培地により、それぞれアリザリンレッド S 陽性の骨芽細胞、サフラニン O 陽性の軟骨細胞、オイルレッド O 陽性の脂肪細胞へ分化することが確認された。炎症性サイトカインが MSC の骨芽細胞分化を促進することはすでに我々が報告したところである。今回、RA、OA 患者由来 MSC に骨芽細胞分化刺激および IL-1 を添加すると、骨芽細胞分化の master regulator である RUNX2 発現が上昇し、ALP およびアリザリンレッド S 発現が顕著となり、患者由来 MSC の骨芽細胞分化が IL-1 により強調されると考えられた。また、

我々は IL-1 による骨芽細胞分化誘導に Wnt5a/Ror2 経路が重要であることを報告しているが、健常人由来 MSC、患者由来 MSC 間で IL-1 刺激下の Wnt5a/Ror2 発現レベルの差は明らかでなく、これらを合わせると健常人由来 MSC と RA または OA 患者由来 MSC は同等の性格を持つと考えられた。これまで報告された臨床研究から MSC 同種移植の安全性は知られているが、今回の結果から、MSC 自家移植の可能性が示された。

#### (2) MSC 移植法の確立

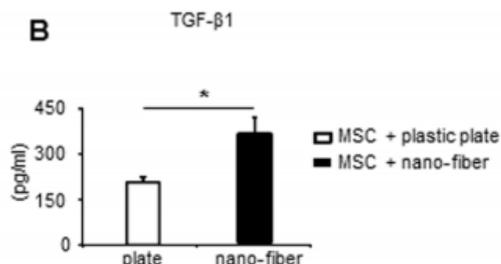
CIA ラットは、誘導(day 0)後 10-12 日で発症し、28 日後をピークとした関節炎が観察され、42 日目には、病理組織標本ならびに X 線画像にて著明な軟骨破壊、滑膜増殖、骨破壊が観察される。CIA 誘導と同時に MSC の関節内注射投与 (IA)、腹腔内注射投与 (IP)を受けた群では同様の経過をたどったが、NF-MSC 移植を受けた群では発症が 14 日目に遅延し、関節炎の程度も関節炎スコアで約 1/3 と軽微で、関節破壊も著明に抑制された(図 2)。



(図 2) Nano-MSC(NF-MSC)による CIA 抑制効果(発表論文 より抜粋)

血清学的には抗 II 型 Collagen 抗体の産生が NF-MSC で抑制され、リンパ組織の炎症性サイトカイン発現も低下していた。増殖刺激に対するリンパ球の増殖応答も NF-MSC 群で抑制されており、以上より NF-MSC は免疫抑制作用を介して CIA の関節炎、骨破壊を抑制すると考えられた。ラット足関節の検討では、IA 群、IP 群で関節に MSC が観察されなかった一方、NF-MSC 群で MSC の残存がみられた。in

in vitro 実験では、NF に播種された MSC の増殖はプラスチック培養皿に比して劣ったが、免疫抑制作用や、軟骨分化誘導作用が知られる TGF- $\beta$ 1 の産生は、NF-MSC において上昇がみられ(図 3)、炎症性サイトカインである IL-6 産生は NF-MSC で低下していた。



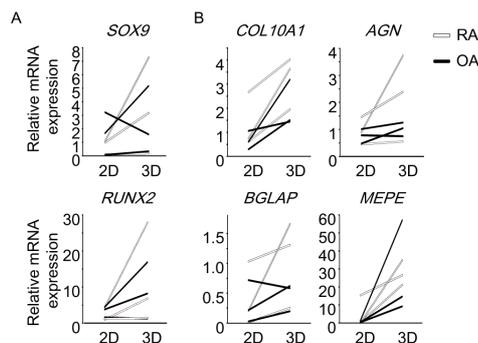
(図 3) ナノファイバーは MSC の TGF- $\beta$ 1 産生を誘導する(発表論文より抜粋)

以上より、NF は MSC のサイトカイン産生を調整し、それらを局所にとどめることで、CIA 関節炎へ効果を発現すると考えられた。

### (3) ナノファイバーによる MSC 分化誘導の検討

NF へ、健康人由来 MSC を播種し(NF-MSC)、in vitro にて培養を行った。骨芽細胞分化培養では、石灰化を示す von Kossa 染色が 28 日目に強陽性となり、骨芽細胞分化がうかがわれた。また、軟骨分化培養においても 28 日目に、プロテオグリカン産生を評価するサフラニン O 染色にて強陽性となり、軟骨分化と考えられた。以上の結果は、NF は培養皿と同様に、MSC の培養担体として使用可能であることを示す。一方で、分化刺激のない MSC 増殖培地で NF-MSC を培養したところ、28 日目にサフラニン O 染色陽性、56 日目に von Kossa 染色陽性となった。一般的なプラスチック培養皿に MSC を播種し培養を行ったが、サフラニン O 染色、von Kossa 染色ともに陰性であった。免疫組織化学または real time PCR 法で評価したところ、骨関連マーカー(Runx2、Osteocalcin、Dmp-1、MEPE)、軟骨関連マ-

ーカー(II 型 collagen、SOX9、COL10A1)の上昇がみられた。これは、骨芽・骨・軟骨分化が起こっていることを示し、NF 自体が MSC の分化を誘導したことを示す。次に、RA・OA 患者由来 MSC を NF に播種し同様に培養したところ、骨関連マーカー、軟骨関連マーカーがほぼ全例で上昇した(図 4)。



(図 4) ナノファイバーは MSC の分化を誘導する(発表論文より抜粋) \*2D; 培養皿, 3D; NF-MSC

これは、NF の持つ MSC の分化誘導能は、健康人由来 MSC 同様、患者由来 MSC にもみられることを示す。さらに、乳酸による MSC の増殖阻害、アポトーシス阻害、骨芽細胞関連遺伝子誘導が観察され、NF に含有される乳酸が MSC の分化誘導に寄与している可能性が示唆された。以上の結果は、乳酸含有 NF と将来の患者自身の MSC を用いた関節再生の可能性をうかがわせるものである。

### <引用文献>

Sonomoto K, Yamaoka K, Zhang X, Tanaka Y. Mesenchymal stem cells: A new treatment tool for rheumatoid arthritis. Inflammation and Regeneration. 査読有, Vol. 32, 2012, 188-192

Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, Kurihara R, Nakano K, Saito K, Okada Y, Chiba K, Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. Arthritis Rheum. 査読有, 63, 2011,

1658-67

Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum*, 査読有, 64, 2012, 3355-3363  
doi: 10.1002/art.34555.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Sonomoto K, Yamaoka K, Kaneko H, Yamagata K, Sakata K, Zhang X, Kondo M, Zenke Y, Sabanai K, Nakayamada S, Sakai A, Tanaka Y. Spontaneous Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Nano-Fiber Scaffold. *PLOS ONE*, 査読有  
2016 Apr 7;11(4):e0153231.  
doi: 10.1371/journal.pone.0153231.

Zhang X, Yamaoka K, Sonomoto K, Kaneko H, Satake M, Yamamoto Y, Kondo M, Zhao J, Miyagawa I, Yamagata K, Fukuyo S, Okada Y, Tanaka Y. Local delivery of mesenchymal stem cells with poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold suppress arthritis in rats. *PLOS ONE*, 査読有  
2014 Dec 4;9(12):e114621.  
doi:10.1371/journal.pone.0114621.

[学会発表](計 17 件)

Xiangmei Zhang, Yamaoka, K., Sonomoto, K., Kaneko, H., Satake, M., Yamamoto, Y., Kondo, M., Jidong Zhao, Miyakawa, I., Yamagata, K., Fukuyo, S., Okada, Y., Tanaka, Y. Mesenchymal stem cells in combination with nano-fiber scaffold suppressed arthritis in rats  
第 42 回 日本臨床免疫学会(2014/9/25-27, 東京、新宿)

園本 格士朗, 山岡 邦宏, 兼子 博章, 山本 由香, 佐竹 真, 張 香梅, 田中 良哉  
乳酸含有ナノファイバーは間葉系幹細胞の分化を誘導する  
第 32 回日本骨代謝学会(2014/7/24-26, 大阪、大阪)

園本 格士朗, 山岡 邦宏, 兼子 博

章, 山本 由香, 佐竹 真, 張 香梅, 田中 良哉  
ナノファイバーは間葉系幹細胞の骨軟骨分化を促進する  
第 1 回日本骨免疫会議(2014/7/6, 沖縄、名護)

Xiangmei Zhang, Yamaoka, K., Sonomoto, K., Kaneko, H., Satake, M., Yamamoto, Y., Kondo, M., Jidong Zhao, Fukuyo, S., Okada, Y., Tanaka, Y. A novel delivering system of mesenchymal stem cells using nano-fiber scaffold for treatment of rheumatic arthritis  
第 35 回 日本炎症・再生医学会(2014/7/4-5, 沖縄、名護)

Xiangmei Zhang, Yamaoka, K., Sonomoto, K., Kaneko, H., Satake, M., Yamamoto, Y., Kondo, M., Jidong Zhao, Miyakawa, I., Yamagata, K., Fukuyo, S., Okada, Y., Tanaka, Y. A novel delivering system of mesenchymal stem cells using Nano-fiber scaffold for treatment of rheumatic arthritis  
第 58 回 日本リウマチ学会(2014/4/24-26, 東京、品川)

園本 格士朗, 山岡 邦宏, 兼子 博章, 山本 由香, 佐竹 真, 張 香梅, 田中 良哉  
間葉系幹細胞とナノファイバーによる関節リウマチ、変形性関節症の骨、軟骨再生  
第 58 回 日本リウマチ学会(2014/4/24-26, 東京、品川)

Xiangmei Zhang, Yamaoka, K., Sonomoto, K., Kaneko, H., Satake, M., Yamamoto, Y., Kondo, M., Jidong Zhao, Yamagata, K., Fukuyo, S., Okada, Y., Tanaka, Y. New immunotherapy method of mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis models by nano-fiber scaffold  
第 42 回 日本免疫学会(2013/12/11-13, 千葉、千葉)

Xiangmei Zhang, Yamaoka, K., Sonomoto, K., Kaneko, H., Satake, M., Yamamoto, Y., Kondo, M., Jidong Zhao, Yamagata, K., Fukuyo, S., Tanaka, Y. Mesenchymal stem cells as an ideal cell therapy tool for rheumatoid arthritis in combination with nano-fiber scaffold  
第 41 回 日本臨床免疫学会(2013/11/27-29, 山口、下関)

園本 格士朗 , 山岡 邦宏 , 張 香梅 ,  
兼子 博章 , 佐竹 真 , 山本 由香 , 田  
中 良哉

Nano fiber scaffold による骨軟骨分化誘導  
第 34 回 日本炎症・再生医学会(2013/7/2-3,  
京都、京都)

Xiangmei Zhang , Yamaoka, K. , Sonomoto,  
K. , Kaneko, H. , Satake, M. , Yamamoto,  
Y. , Kondo, M. , Jigong, Zhao. , Fukuyo,  
S. , Okada, Y. , Tanaka, Y.

Suppressive effect of mesenchymal stem  
cells with nano-fiber

scaffold in collagen-induced arthritis

第 2 回 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会合  
同国際会議(2013/5/28-6/1, 兵庫、神戸)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

園本 格士朗 SONOMOTO, Koshiro

産業医科大学 医学部 非常勤医師

研究者番号 : 20636914