

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861214

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞を用いた関節リウマチ、変形性膝関節症に対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new strategy for rheumatoid arthritis and osteoarthritis applying human mesenchymal stem cells

研究代表者

佐藤 敦 (Sato, Atsushi)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10445596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性免疫疾患である関節リウマチや変形性膝関節症に対する細胞治療が注目され、ヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSCs)はその一つである。炎症性・抗炎症性サイトカインの遺伝子解析の結果hMSCsを移植した動物マウスではIL-1、TNF alpha、IL-10およびTGF betaの減少を認め、抗炎症性のIL-4の増加を認めた。また、hMSCsがPACAPというタンパク質を介して炎症を調整する機序を報告した。さらに損傷組織を用いたmRNAのRT-PCRではケモカインCCL5とその受容体CCR1、CCR5の発現が14日目まで増加し、CCL5の慢性炎症への関与が示唆され、経時変化に対する治療も重要である。

研究成果の概要(英文)：Cell therapy for rheumatoid arthritis and osteoarthritis is becoming important recently. One of the treatment method is human mesenchymal stem cells (hMSCs). Inflammatory cytokines such as IL-1, TNF alpha, IL-10 and TGF beta, decreased and an anti-inflammatory cytokine IL-4 increased after spinal cord injury in mice transplanted hMSCs. We revealed that hMSCs regulated anti-inflammatory effect through pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP). We also reported that chemokine CCL5 and its receptor, CCR1 and CCR5, increased through 14th day after injury by RT-PCR using mRNA of injured tissues. It suggested that CCL5 was involved in chronic inflammatory phase and It was important for the treatment period.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 骨髄間葉系幹細胞 関節リウマチ

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性免疫疾患に代表される関節リウマチ、関節リウマチや半月板、軟骨損傷に起因する変形性膝関節症患者は国内で 1000 万人以上とされ社会的問題となっている。様々な治療法が確立されている一方、全ての病態を完全に治療できるものはない。近年、再生医療に代表されるヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSCs) 治療の当該疾患に対する研究も散見されるが、詳細な作用機序は今だわかっていない。臨床応用につなげるためには hMSCs の詳細な作用機序を明らかにすることは急務である。

### 2. 研究の目的

当該研究は関節リウマチ、変形性膝関節症に対する新規治療開発を最終目的として、臨床応用につなげるべく hMSCs の抗炎症作用、免疫調節作用機序を動物モデルを用いて明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

マウス関節炎モデル (HTLV-1 Tg, CIA)、半月板・軟骨損傷モデル、脊髄損傷モデルに hMSCs を投与し、投与された hMSCs がどのように炎症を抑制し、周囲組織とコミュニケーションして組織を修飾するかを免疫組織学的、免疫細胞学的手法によって解析する。

### 4. 研究成果

脊髄損傷モデルマウスに hMSCs を投与しコントロール群と比較すると下肢運動機能は有意に改善し、損傷面積は減少した (図 1)。

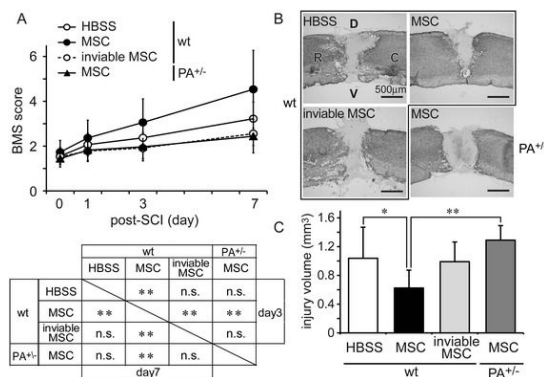


図 1. hMSC 投与による脊髄損傷後の運動機能、損傷面積

移植部での hMSC 細胞数は劇的に減少した。損傷 7 日目では移植 hMSC は損傷部へ移動していることが観察された (図 2)。

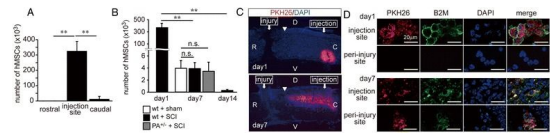


図 2. 移植 hMSC の分散

移植した hMSC はマウス *Adcyap1* の発現を誘導した。また、組織内に PACAP、PAC1R 陽性細胞を認めた (図 3)。

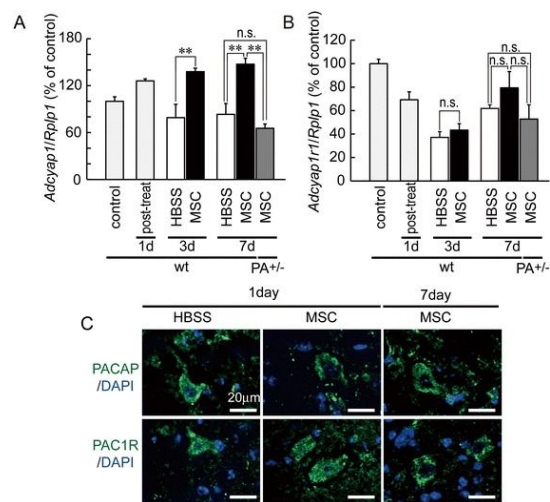


図 3. 移植 hMSC のマウス *Adcyap1* 発現誘導

移植した hMSC は炎症性サイトカインである IL-1、TNF、IL-10、TGF- $\beta$  の発現を抑制し、抗炎症性サイトカインである IL-4 の発現増加を示した (図 3)。

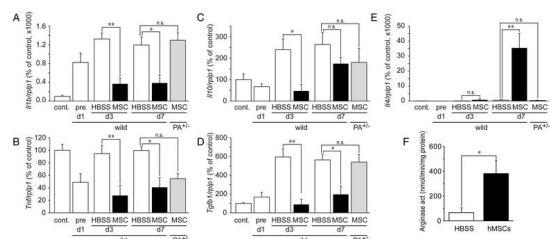


図 4. 移植 hMSC によるマウス炎症性サイトカインの減少

ヒト BDNF、NT3 は損傷後 3 日に増加した。NGF、TSG-6、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$  は損傷後 7 日に増加した。IFN- $\gamma$  に暴露された hMSCs では ADCYAP1 と ADCYAP1R1 の発現が認められた (図 5)。

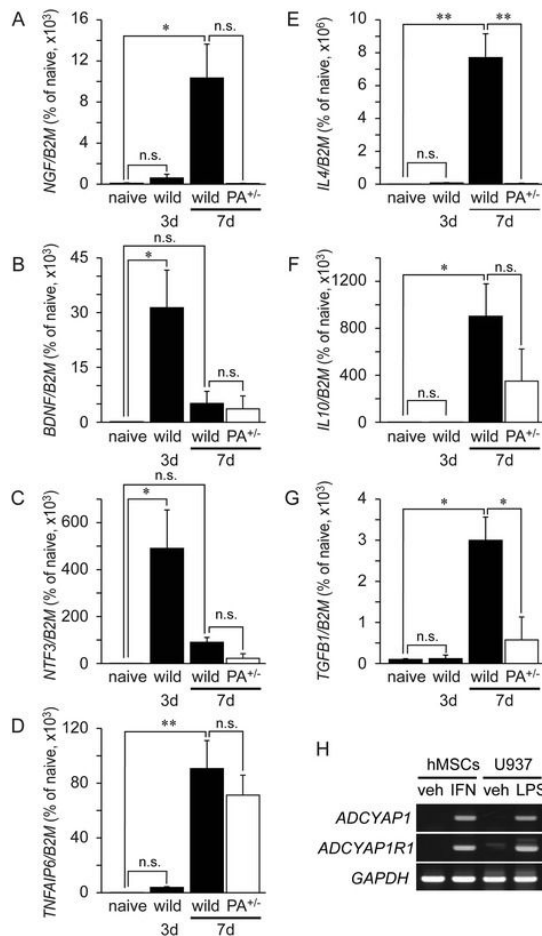


図5. hMSCs 移植後のヒト遺伝子発現

さらに損傷組織を用いて mRNA を抽出し RT-PCR にてケモカイン (CCL2、CCL5、CCL7、CXCL1、CXCL2、CX3CL1) および受容体 (CCR1、CCR2、CCR3、CCR5、CXCR2、CX3CR1) の発現を調べたところ、ケモカイン CCL2、CCL7、CXCL1、CXCL2、CX3CL1 とそれらの受容体 CCR2、CXCR2、CX3CR1 の発現は損傷後3日目まで最大となり14日目にかけて低下した。一方で CCL5 とその受容体 CCR1、CCR5 の発現は14日目まで増加し、CCL5 の慢性炎症への関与が示唆された。今後急性期から慢性期における経時的な変化に対する治療戦略についても研究を進める必要がある。

### 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4件)

Hiroshi Takagi, Soshi Asai, Sato Atsushi, Kawashima Fumiyoshi, Kanzaki Koji, Inagaki Katsunori. Kinematics analysis of different types of prosthesis in total knee arthroplasty with a navigation system. Showa Univ J Med Sci 29(3) 289-296 2017.9. ISSN 0915-6380 (査読あり)

Hiroshi Takagi, Soshi Asai, Atsushi Sato, Masahiko Maekawa, Fumiyoshi Kawashima, Koji Kanzaki. Case series report of navigation-based in vivo knee kinematics in total knee arthroplasty with a gradually reducing femoral radius design. Annals of Medicine and Surgery 17 33-37 2017.5. ISSN 2049-0801 ELSEVIER London (査読あり)

佐藤 敦、高木 博、浅井聡司、加藤 慎、古屋貴之、前川勝彦、川島史義、中田規之. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査. Peospective investigation DVT/PE after TKA using contrast enhanced CT and venous ultrasonography 臨床整形外科 51 2 191-196 2016.2.25. ISSN 0557-0433 (査読あり)

Tsumuraya T\*, Ohtaki H\*, Song D, Sato A, Watanabe J, Hiraizumi Y, Nakamachi T, Xu Z, Dohi K, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S. Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). J Neuroinflammation. 2015 Feb 22;12:35. doi: 10.1186/s12974-015-0252-5. (査読あり)

あり)

[学会発表](計 12件)

佐藤 敦、浅井聡司、川島史義、前川勝彦、加藤 慎、古屋貴之、奥茂敬恭、大熊公樹、大池 潤、星野雄志、富田一誠、高木 博. エドキサバン使用例での下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査 第48回日本人工関節学会(東京 2018.2.24.)

Yagura K, Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Watanabe J, Miyamoto K, Tanaka S, Hiraizumi Y, Kanzaki K, Honda K.

Gene and cellular localizations of chemokines and their receptors after spinal cord injury (SCI) in mice.

Neuroscience 2017 Washington DC, USA (国際会議) 2017/11/11~2017/11/15

Yagura K, Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Watanabe J, Hiraizumi Y, Honda K.

Expression patterns and distributions of chemokines and their receptors after spinal cord injury (SCI) in mice. The 5th Annual Meeting of the International

Cytokine and Interferon Society (ICIS2017) Kanazawa, Japan (国際会議) 2017/10/29~2017/11/2

佐藤 敦、浅井聡司、川島史義、前川勝彦、加藤 慎、古屋貴之、奥茂敬恭、高木 博. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査 - 一次的両側TKAと片側TKAの比較 - 第9回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 JOSKAS2017(札幌 2017.6.23.)

Atsushi Sato, Soshi Asai, Fumiyoshi Kawashima, Masahiko Maekawa, Shin Kato, Takayuki Koya, Naoki Okuma, Takayuki Okumo, Jun Oike, Yushi

Hoshino, Kazunari Tomita, Hiroshi Takagi The incidence of DVT/PE between one-staged bilateral and unilateral TKA using contrast enhanced CT and venous ultrasonography in Japanese patients 2017 Asia-Pacific knee Arthroscopy and Sports Medicine Society (APKASS) (Seoul, 2017.4.28-29)

佐藤 敦、浅井聡司、加藤 慎、古屋貴之、前川勝彦、川島史義、中田規之、高木 博. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査 - エノキサパリン使用例の検討 - 第46回日本人工関節学会(大阪 2016.2.26.)

Atsushi Sato, Soshi Asai, Shin Kato, Takayuki Koya, Masahiko Maekawa, Fumiyoshi Kawashima, Noriyuki Nakada, Hiroshi Takagi.

Prospective Investigation for DVT/PE after Primary TKA using Contrast Enhanced CT and Venous Ultrasonography in Japanese Patients. 28<sup>th</sup> Annual Congress International Society for Technology in Arthroplasty ISTA2015 (Vienna 2015.9.30-10.3.)

大滝博和, 圓谷智海, 徐枝芳, 渡邊潤, 佐藤敦, 平泉裕, 橋本均, 塩田清二

ヒト骨髄間葉系幹細胞はPACAPを介して脊髄損傷後の炎症を調節する。第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会大会(東京)" 2015 2015/7/17-2015/7/18 東京工業大学

佐藤 敦、浅井聡司、加藤 慎、古屋貴之、前川勝彦、川島史義、中田規之、高木 博. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査 - 未分画ヘパリンとエノキサ

パリンの比較 - 第 7 回 JOSKAS 第 7 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (札幌 2015.6.18.)

佐藤 敦、高木 博、浅井聡司、加藤 慎、古屋貴之、前川勝彦、川島史義、中田規之、渥美 敬. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節置換術後の血栓症精査. 第45回日本人工関節学会 (福岡 2015.2.27.)

佐藤 敦、浅井聡司、加藤 慎、古屋貴之、前川勝彦、川島史義、中田規之、高木 博. 下肢静脈エコー/造影CTを用いた人工膝関節弛緩術後の血栓症精査に関する前向き研究. JOSKAS2014 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (広島 2014.7.25.)

Sato A, Asai S, Kato S, Koya T, Maekawa M, Kawashima F, Nakada N, Takagi H. Prospective Investigation DVT/PE After TKA Using Contrast Enhanced CT and Venous Ultrasonography In Japanese Patients. Pan Pacific Orthopaedic Congress (Hawaii, 2014.7.16-19.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 敦 (SATO, ATSUSHI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10445596

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大滝 博和 (OHTAKI, HIROKAZU)