Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-01

Attenuation of Knee Osteoarthritis Progression in Mice through Polarization of M2 Macrophages by Intra-Articular Transplantation of Non-Cultured Human Adipose-Derived Regenerative…

鎌田, 紘平

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2024-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第8779号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490004

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Attenuation of Knee Osteoarthritis Progression in Mice through Polarization of M2 Macrophages by Intra-Articular Transplantation of Non-Cultured Human Adipose-Derived Regenerative Cells

ヒト由来非培養脂肪幹細胞の関節内投与による M2 マクロファージの極性とマウス変形性膝関節症の抑制

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
(指導教員：黒田　良祐教授)

鎌田　紘平

【目的】

近年、脂肪幹細胞を用いた再生治療が注目されているが、その一種である Adipose-derived regenerative cells（ADRC）は、コラゲナーゼ消化により脂肪組織から得られる非培養性の異種または混合細胞集団である。ADRC は、下肢の慢性潰瘍、虚血性心筋症、四肢虚血などの治療においても使用されており、さらに変形性関節症（OA）の治療でも ADRC の関節内投与の有効性が報告されているが、変形性関節症の抑制効果やそのメカニズムについては明らかになっていない。一方で、近年、滑膜におけるマクロファージの OA 発症・抑制機序への関与が注目されている。マクロファージは、組織損傷や炎症を促進する炎症性サイトカインを放出する M1 マクロファージと、組織のリモデリングを促進し炎症を抑制する抗炎症性サイトカインを放出して創傷治癒に関わる M2 マクロファージに分類される。滑膜マクロファージの偏極は、OA を早期に予防・治療するのに適した治療標的とされ、いくつかの in vitro の研究では、多血小板血漿（PRP）や間葉系幹細胞による M2 マクロファージの促進が報告されている。しかし、脂肪由来間質血管細胞群（Stromal Vascular Fraction：SVF）や ADRC がマクロファージの極性化に及ぼす影響を評価した研究はほとんどない。したがって、本研究の目的は、ADRC の関節内移植による OA 進行に対する治療効果を評価し、ADRC の OA 治療効果のメカニズムである可能性のあるマクロファージ偏極化に対する効果を解明することとした。

【対象と方法】

ADRC の採取

変形性膝関節症の治療のために ADRC の関節内注射を受けた患者から同意のもと余った細胞分画を実験に使用した。全身麻酔下で脂肪吸引を行い、採取された脂肪組織から血液と脂肪の破片を除去しコラゲナーゼ処理を経て ADRC を精製した。

[in vivo]

OA モデルの作成

12 週齢の BALB/c ヌードマウスの右膝内側半月板を不安定化させ OA を誘導した。同時に ADRC を 2.0×10^4 cells/6 μL/膝で移植し、対照群には PBS 6 μL を注射した。術後 4 週および 8 週で膝関節を採取した。

組織学的解析

マウスの膝関節を矢状面で 6μm の厚さの切片とし、ヘマトキシリンエオジン染色、サフラニン O ファストグリーン二重染色を行った。組織学的な OA の程度は OARSI cartilage OA histopathology-grading system で評価を行った。免疫組織染色では、膝関節軟骨で MMP-13、ADAMTS-5、IL-6、Type 2 collagen、IL-1β、膝関節内滑膜で iNOS（M1 マクロファージマーカー）、CD206（M2 マクロファージマーカー）、膝関節全体でヒト核抗原の発現を評価した。

[in vitro]

マクロファージの調製および共培養

マウスのマクロファージ細胞株を入手し培養した。ADRC のマクロファージ極性へのパラクライン効果を確認するために、トランスウェル共培養システムを使用してマクロファージ細胞と ADRC を 2 日間共培養した。コントロール群、IFN-γ + LPS で刺激を行った M1 偏極群、M1 偏極刺激の上に ADRC との共培養を行った M1 偏極＋ADRC 群、ADRC との共培養のみ行った ADRC 群、IL-4 で刺激を行った M2 偏極群の 5 グループに分けられた。

蛍光免疫染色

マクロファージ極性を視覚化するために、各グループで iNOS（M1 マクロファージマーカー）および CD206（M2 マクロファージマーカー）の多重蛍光免疫染色を行い評価した。

統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 9 を使用した。得られたデータは、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて分布の正規性を検証され、データが正規分布している場合、one-way ANOVA が実施され、post-hoc の比較試験として Tukey-Kramer 検定が使用された。データが正規分布でない場合、Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc の比較試験として Bonferroni-Dunn 検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

OA の進行

ADRC 群の大腿骨内顆と脛骨内顆の OARSI スコアは、手術後 4 週間および 8 週間において、control 群よりも有意に低かった。

OA 関連マーカー

手術後 4 週間および 8 週間において、ADRC 群では Type 2 collagen 陽性細胞数の割合が有意に高く、一方で MMP-13、ADAMTS-5、IL-6、および IL-1β 陽性の軟骨細胞数の割合が control 群と比較し有意に低かった。

移植された ADRC の運命

ヒト核抗原は移植後 1 週間で主に膝蓋上嚢および膝蓋下脂肪体の滑膜組織に発現を認められたが、移植後 4 週間では発現を認めなかった。

滑膜評価

滑膜の炎症を表す細胞層は control 群において ADRC 群よりも 4 週、8 週ともに有意に厚く、IL-1β 陽性細胞数の割合も 4 週、8 週ともに control 群において ADRC 群よりも有意に高かった。滑

膜における iNOS 陽性細胞数の割合は control 群において ADRC 群よりも高く、CD206 陽性細胞数の割合は ADRC 群において control 群よりも高かった。

共培養：蛍光免疫染色

M1 偏極+ADRC 群において iNOS 陽性細胞数の割合は M1 偏極群よりも低い傾向があったが差は有意ではなかった。ADRC 群の CD206 陽性細胞数の割合は control 群、M1 偏極群、M1 偏極+ADRC 群より有意に高かった。M1 偏極 ＋ADRC 群の CD206 陽性細胞数の割合は、M1 偏極群よりも高い傾向があったが、差は有意ではなかった。

【考察】

本研究の主な発見は、ヒト ADRC の関節内移植により OA モデルマウスにおける OA の進行が抑制されること、またそのメカニズムとして、移植された ADRC が関節の滑膜に移動し、滑膜マクロファージに作用し M2 マクロファージの極性化を誘導することで軟骨を分解する酵素や炎症性サイトカインの産生を抑制する役割を果たす可能性があることである。

近年、OA 治療における脂肪由来間質血管細胞群（SVF）移植の利点を調査する臨床研究が増加しているが、自家脂肪由来 SVF 移植が OA の進行に及ぼす影響に関する基礎研究はまだ少ない。過去に、未培養の脂肪由来 SVF の関節内移植は、前十字靭帯切断（ACLT）ウサギモデルで OA の進行を抑制し、ACLT ウサギから採取した軟骨細胞を SVF と物理的な接触がない条件で共培養すると、軟骨細胞の生存率が高く、軟骨合成酵素の発現が増加し、軟骨分解酵素の発現が低下したと報告されている。これらの結果や本研究の結果から、SVF からの可溶性因子が軟骨細胞に対して保護効果を発揮し、OA 症状の改善に寄与できる可能性が示唆された。

本研究では、移植された細胞が関節内滑膜に取り込まれていることが考えられ、CD206 陽性の M2 様マクロファージの数が増加し、iNOS 陽性の M1 様マクロファージが減少したことが滑膜で観察された。つまり、ADRC の移植によるマクロファージ偏極化を介した免疫調整が、ADRC を移植されたマウスの OA 抑制に寄与した可能性がある。また、本研究の共培養の結果からは、ADRC とのトランスウェル共培養により、M2 マーカーである CD206 に陽性のマクロファージの割合が有意に増加したが、M1 誘導の条件では有意な変化は認められなかった。この結果から、ADRC はマクロファージの表現型の変化を M2 様の表現型に向けて促進できる可能性があり、ADRC からの可溶性因子がマクロファージの表現型の変化を促進していることが示唆された。

【結論】

ヒト ADRC の関節内移植は、マウス OA モデルにおいて OA の進行を抑制した。これは ADRC から分泌される可溶性因子による滑膜のマクロファージの極性の調整が関与している可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 3350 号	氏 名	鎌田 紘平
論文題目 Title of Dissertation	ヒト由来非培養脂肪幹細胞の関節内投与による M2 マクロファージの極性とマウス変形性膝関節症の抑制 Attenuation of Knee Osteoarthritis Progression in Mice through Polarization of M2 Macrophages by Intra-Articular Transplantation of Non-Cultured Human Adipose-Derived Regenerative Cells		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 松岡 広 副 査 Vice-examiner 児玉 裕三 副 査 Vice-examiner 宮西 正寛		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【目的】

近年、脂肪幹細胞を用いた再生治療が注目されているが、その一種である Adipose-derived regenerative cells(ADRC)は、コラゲナーゼ消化により脂肪組織から得られる非培養性の混合細胞集団で、変形性関節症(OA)の治療でも、ADRC の関節内投与の有効性が、報告されているが、変形性関節症の抑制効果やそのメカニズムについては明らかになっていない。

マクロファージは、組織損傷や炎症を促進する M1 マクロファージと、組織のリモデリングを促進する M2 マクロファージに分類される。しかし、ADRC がマクロファージの極性化に及ぼす影響を評価した研究は見当たらない。

以上から、本研究の目的は、ADRC の関節内移植による OA 進行に対する治療効果を評価し、その作用機序として可能性のあるマクロファージ偏極化に対する効果を解明することとした。

【対象と方法】

ADRC の採取

変形性膝関節症の治療のために採取された ADRC について、その余剰の細胞を患者同意の上、提供を受け本実験に使用した。

[in vivo]

OA モデルの作成

12 週齢の BALB/c ヌードマウスの右膝内側半月板を不安定化させ OA を誘導した。同時に ADRC を 2.0×10^4 cells/6 μL/膝で移植し、対照群には PBS 6 μL を注射した。術後 4 週および 8 週で膝関節を採取した。

組織学的解析

組織学的な OA の程度は OARSI cartilage OA histopathology-grading system にて評価した。免疫組織染色では、MMP-13、ADAMTS-5、IL-6、Type 2 collagen、IL-1ß、iNOS(M1 マクロファージマーカー)、CD206(M2 マクロファージマーカー)、ヒト核抗原に対する抗体を用いた。

[in vitro]

マクロファージの調製および共培養

パラクライン効果を確認するために、トランスウェル共培養システムを使用した。コントロール群、IFN-γ + LPS で刺激を行った M1 偏極群、M1 偏極刺激の上に ADRC との共培養を行った M1 偏極+ADRC 群、ADRC との共培養のみ行った ADRC 群、IL-4 で刺激した M2 偏極群の 5 群を実施した。

蛍光免疫染色

マクロファージ極性を評価するため各グループで iNOS(M1 マクロファージマーカー)および CD206(M2 マクロファージマーカー)の多重蛍光免疫染色を行い評価した。

統計学的解析

データが正規分布している場合、one-way ANOVA を実施、post-hoc の比較試験として Tukey-Kramer 検定を使用した。データが正規分布でない場合、Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc の比較試験として Bonferroni-Dunn 検定を用いた。

【結果】
OA の進行
ADRC 群の大腿骨内顆と脛骨内顆の OARSI スコアは control 群よりも有意に低かった。

OA 関連マーカー
ADRC 群では Type 2 collagen 陽性細胞割合が有意に高く、一方で MMP-13、ADAMTS-5、IL-6、および IL-1β 陽性の軟骨細胞数の割合が control 群 と比較し有意に低かった。

ADRC 生着部位
ヒト核抗原は移植後 1 週間で主に膝蓋上嚢および膝蓋下脂肪体の滑膜組織に発現を認められたが、 移植後 4 週間では発現を認めなかった。

滑膜評価

滑膜の炎症を表す細胞層は control 群において ADRC 群よりも有意に厚く、IL- 1β 陽性細胞数の割合も control 群において ADRC 群よりも有意に高かった。滑膜における iNOS 陽性細胞数の割合は control 群において ADRC 群よりも高く、CD206 陽性細胞割合は ADRC 群において control 群よりも高かった。

共培養:蛍光免疫染色

M1 偏極+ADRC 群において iNOS 陽性細胞数の割合は M1 偏極群よりも低い傾向があったが有意ではなかった。ADRC 群の CD206 陽性細胞数の割合は control 群、M1 偏極群、M1 偏極 +ADRC 群より有意に高かった。M1 偏極 + ADRC 群の CD206 陽性細胞数の割合は、M1 偏極群 よりも高い傾向があったが有意ではなかった。

【考察】

本研究の主な発見は、ヒト ADRC の関節内移植により OA モデルマウスにおける OA の進行が抑制されること、またそのメカニズムとして、移植された ADRC が関節の滑膜に移動し、滑膜マク ロファージを M2 偏極化することで軟骨を分解する酵素や炎症性 サイトカインの産生を抑制する役割を果たす可能性があることである。

過去の報告や本研究の結果から、SVF からの因子が軟骨細胞に対して保護効果を発揮し、OA 症状を改善する可能性が示唆された。 本研究では、共培養にて、M2 様マクロファージ数の増加と M1 様マクロファージの減少が観察されたことから、ADRC からの可溶性因子がマクロファージ偏極化を介して OA 抑制に寄与した可能性がある。

【結論】

ヒト ADRC の関節内移植は、マウス OA モデルにおいて OA の進行を抑制した。これは ADRC から分泌される可溶性因子による滑膜のマクロファージの極性の調整が関与している可能性が示唆 された。

ADRC の OA への効果の機序について、重要な知見を得たものとして、価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。