



Heterogeneous Cells as well as Adipose-Derived Stromal Cells in Stromal Vascular Fraction Contribute to Enhance Anabolic and Inhibit Catabolic Factors in Osteoarthritis

安喰, 健祐

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8887号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490112>

※ 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

Heterogeneous Cells as well as Adipose-Derived Stromal Cells in Stromal Vascular Fraction Contribute to Enhance Anabolic and Inhibit Catabolic Factors in Osteoarthritis

脂肪由来幹細胞だけでなく間質血管細胞群の異種細胞は、変形性関節症における同化作用増強と
異化作用抑制に寄与する

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)

安喰 健祐

【背景】

間質血管細胞群 (SVF)および SVFを培養することで得られる脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) は、脂肪組織から比較的大量かつ容易に採取でき、高い組織修復能や分化能を示すことから再生医療において有用である。ADSC は純粋な脂肪組織由来幹細胞であり、骨髄由来幹細胞 (BMSC) と比べ低侵襲で採取でき、同等の治療効果が得られると報告される。また SVF は基礎研究において ADSC と同等の効果があると報告される。さらに SVF は脂肪組織を機械的および酵素的に消化することで得られるため、ADSC に比べ培養を行う必要がなく、ワンステップで再生治療への使用が可能である。臨床研究においては、変形性関節症 (OA) に対する SVF の優れた治療効果が報告されている。

SVF は、ADSC、マクロファージ (MΦ)、線維芽細胞などの異種細胞から構成されているが、SVF に含まれる ADSC の割合は、1%~16%と報告される。したがって、SVF のパラクリン効果には ADSC 以外の異種細胞群の機能が関与している可能性が考えられているが、その詳しい作用機序は不明である。SVF に含まれる異種細胞の中で、MΦは OA 治療のターゲットとして近年注目されており、MΦは炎症誘発型 (M1) と抗炎症型 (M2) へ分極する。抗炎症型である M2 MΦは、transforming growth factor (TGF)- β や interleukin (IL)-10 などの成長因子、抗炎症性サイトカインを分泌し軟骨形成や創傷治癒に重要な役割を果たす。以前の報告では、MΦは SVF の約 20%を占め、その MΦの多くが M2 表現型であるとされる。したがって、SVF に含まれる M2 MΦは、軟骨細胞に対する SVF の治療において重要な役割を果たす可能性がある。しかし、SVF や SVF 中の MΦの軟骨細胞に対するパラクリン効果についての報告は少なく、詳細なメカニズムは不明である。

そこで本研究の目的は、ウサギ OA モデルにおける SVF および SVF に含まれる異種細胞の治療効果を、対照群および ADSC 含有量を調整した ADSC 群と比較することにより調査検討することとした。

【対象と方法】

24 週齢の雄 New Zealand white rabbits に対し前十字靭帯切除を行い、8 週経過したものをウサギ OA モデルとした。ウサギ肩甲骨間を切開し脂肪組織を採取、採取した脂肪組織から過去の報告に従って SVF を単離、SVF を培養することで ADSC を得た。Colony forming unit-fibroblast assay を行い、SVF に含まれる ADSC は約 10%と定義した。ウサギから分離した SVF と ADSC を OA 発症後の膝に自家移植し、対照群 (アルブミン)、低用量 ADSC (lADSC ; 1×10^4 ADSC) 群、高用量 ADSC (hADSC ; 1×10^5 ADSC) 群、SVF (1×10^5 SVF) 群を作成、OA 発症後 8 週および 12 週で膝関節を採取した。

肉眼的評価を Osteoarthritis Research Society International (OARSI) macroscopic scoring にて、組織学的評価にサフラニン O 染色を行い OARSI cartilage histopathology scoring にて関節軟骨破壊の評価を、HE 染色を行い Modified OARSI synovitis scoring にて滑膜炎の評価を行った。免疫組織学的評価を軟骨において Collagen type II (Collagen II), SRY box (SOX)-9, matrix metalloproteinase (MMP)-13、滑膜において CD86 (M1 MΦマーカー)、CD163 (M2 MΦマーカー)

カー) の発現を評価した。RT-PCR では軟骨における Collagen II、SOX-9、MMP-13、滑膜における TGF- β 、IL-10、MMP-13 の mRNA 発現量を測定した。

In vitro では、 1×10^5 cells の軟骨細胞をチューブ内で遠心して作成したペレットを、SVF または IADSC と分離共培養し 3 週間後ペレットサイズを評価した。さらに培養液中の TGF- β と IL-10 濃度を ELISA 法で評価した。また SVF に含まれる M Φ 分極を F4/80 (汎 M Φ マーカー) と CD86 および CD163 による二重蛍光免疫染色を行い評価した。グループ間の統計学的検討は Tukey' s テストを使用し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

肉眼的評価では OA 発症後 8 週および 12 週において SVF 群は対照群および IADSC 群と比較して OA の進行が抑制され OARSI スコアは有意に低かった。SVF、h ADSC 群間には有意差はなかった。組織学的には OA 発症後 8 週、12 週にて SVF 群で対照群および IADSC 群と比較して OA の進行および滑膜炎が有意に抑制され Modified OARSI スコアは有意に低かった。SVF 群と h ADSC 群に有意差は認めなかった。免疫組織学的には SVF 群は OA 発症後 8 週および 12 週において対照群、IADSC 群と比較して有意な Collagen II、SOX-9 の発現増加を認め、MMP13 発現は有意に低下していた。SVF、h ADSC 群間で有意差はなかった。また滑膜組織免疫染色では OA 発症後 8 週において SVF 群で対照群および IADSC 群に比べ、抗炎症性 M2 表現型である CD163 が有意に多く発現しており、M1/M2 比は有意に低かった。SVF、h ADSC 群間には有意差は認めなかった。RT-PCR では、OA 発症後 8 週、12 週において SVF 群で対照群、IADSC 群に比べ軟骨における Collagen II、SOX-9 の発現増加、MMP-13 の発現低下、滑膜における TGF- β 、IL-10 の発現増加、MMP-13 の発現低下を認めた。いずれも SVF、h ADSC 群間で有意差は認めなかった。

In vitro では分離共培養において SVF 群は対照群、IADSC 群に比べ有意に軟骨ペレットサイズは大きく、培養液中の TGF- β 、IL-10 濃度は高かった。SVF の二重免疫蛍光染色では、SVF 中の M Φ は M1 M Φ より M2 M Φ の数が有意に多かった。

【考察】

本研究では SVF 群は OA 発症後 8 週間および 12 週間において肉眼的、組織学的、免疫組織化学的に対照群および SVF と同量の幹細胞量を含む IADSC 群より有意に OA 進行を抑制していた。また RT-PCR では軟骨および滑膜において有意に同化因子の増加および異化因子の低下を認めていた。そしてそれら SVF の治療効果は hADSC 群と比較しても同等であった。また滑膜では SVF 群において、対照群および IADSC 群に比べ滑膜炎は有意に改善、M1/M2 比は有意に減少しており M Φ 分極は抗炎症性の M2 が有意であった。SVF に含まれる M Φ の約 70%は、TGF- β や IL-10 を分泌する抗炎症性 M Φ であると報告される。本研究でも in vitro での二重免疫蛍光免疫染色では SVF 中に抗炎症性 M Φ マーカーである CD163 陽性細胞が有意に多く認められ、分離共培養の SVF 群の培養液中では有意に TGF- β および IL-10 の濃度が高く軟骨ペレットサイズも有意に大きかった。したがって SVF に含まれる抗

炎症性 MΦ は SVF のパラクライン効果に関与している可能性が示唆された。

SVF 治療効果は ADSC の作用のみならず、異種細胞として含まれる抗炎症性 MΦ が TGF- β や IL-10 を放出し、滑膜組織の MΦ が抗炎症性へ誘導された結果、膝関節内の恒常性が改善し軟骨保護へと作用し、lADSC より優位かつ hADSC と同等の効果が得られた可能性が考えられた。

【結語】

ウサギ OA モデルに対する SVF の治療効果は、対照群および同量の幹細胞量を含む lADSC よりも有意に優れ、hADSC と比べても同等であった。SVF に含まれる異種細胞中の抗炎症性 MΦ は、成長因子や抗炎症性サイトカインの分泌により膝関節恒常性改善と軟骨保護に寄与した可能性が考えられた。本研究により SVF の OA 加療における作用機序の一端が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3382 号	氏 名	安喰 健祐
論 文 題 目 Title of Dissertation	脂肪由来幹細胞だけでなく間質血管細胞群の異種細胞は、 変形性関節症における同化作用増強と異化作用抑制に寄与する Heterogeneous Cells as well as Adipose-Derived Stromal Cells in Stromal Vascular Fraction Contribute to Enhance Anabolic and Inhibit Catabolic Factors in Osteoarthritis		
審 査 委 員 Examiner	主 査 青井 貴之 Chief Examiner 副 査 上田 佳秀 Vice-examiner 副 査 溝渕 知司 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景と目的】 間質血管細胞群 (SVF)および SVF 培養で得られる脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) は、脂肪組織から大量かつ容易に採取でき再生医療に有用である。SVF は脂肪組織の酵素的処理で得られ、ワンステップで再生治療へ使用可能である。臨床研究において、変形性関節症 (OA) に対する SVF の優れた治療効果が報告される。SVF は、ADSC、マクロファージ (MΦ)、線維芽細胞などの細胞から構成され、SVF に含まれる ADSC の割合は 1~16%と報告される。したがって、SVF のパラクリン効果には ADSC 以外の細胞の機能が関与する可能性があるがその作用機序は不明である。SVF に含まれる ADSC 以外の細胞の内、MΦは OA 治療のターゲットとして注目される。抗炎症性の機能を有する M2 MΦは、transforming growth factor (TGF)- β や interleukin (IL)-10 などの成長因子、抗炎症性サイトカインを分泌し軟骨形成や組織治癒に重要な役割を果たす。MΦは SVF の約 20%を占めその MΦの多くが M2 であるとされ、M2 MΦは軟骨細胞に対する SVF の治療に重要な役割を果たす可能性がある。そこで本研究では、ウサギ OA モデルにおける SVF および SVF に含まれる ADSC 以外の細胞の治療効果を、対照群および ADSC 含有量を調整した ADSC 群と比較検討することとした。

【方法】 24 週齢の雄ウサギに前十字靭帯切除を行い、8 週経過したものをウサギ OA モデルとした。肩甲骨間脂肪組織を採取し、SVF を単離、SVF を培養することで ADSC を得た。SVF に含まれる ADSC 量は約 10%と定義した。OA 発症後の膝に対照群、低用量 ADSC (lADSC ; 1×10^4 ADSC) 群、高用量 ADSC (hADSC ; 1×10^5 ADSC) 群、SVF (1×10^5 SVF) 群を自家移植し、8 週および 12 週で膝関節を採取した。肉眼的評価、組織学的評価 (Safranin-O, HE 染色)、免疫組織学的評価を軟骨 (Collagen II, SOX-9, MMP-13)、滑膜 [CD86 (M1 MΦ)、CD163 (M2 MΦ)] の発現により評価した。Real Time-PCR では軟骨 (Collagen II, SOX-9, MMP-13)、滑膜 (TGF- β , IL-10, MMP-13) の発現を評価した。In vitro では、軟骨ペレットと SVF および lADSC の分離共培養によるペレットサイズ、培養液中の TGF- β と IL-10 濃度を ELISA 法で評価した。また SVF に含まれる MΦを F4/80 と CD86 および CD163 による二重蛍光免疫染色を行い評価した。グループ間の統計学的検討は Tukey's テストを使用、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】 本研究では OA 発症後 8 および 12 週において、SVF 群は肉眼的、組織学的、免疫組織化学的に対照群および SVF と同量の幹細胞量を含む lADSC 群よりも有意に OA 進行を抑制していた。また RT-PCR では軟骨および滑膜において有意に同化因子の増加および異化因子の低下を認めた。またそれら SVF の治療効果は hADSC 群と比較し同等であった。滑膜では SVF 群において、対照群および lADSC 群に比べ滑膜炎は有意に改善、M1/M2 比は有意に減少し MΦ分極は抗炎症性の M2 が優位であった。In vitro の実験において、分離共培養の培養液中の TGF- β および IL-10 の濃度が SVF 群で有意に高く、軟骨ペレットサイズも増大していた。二重蛍光免疫染色では SVF 中に抗炎症性作用を有するとされる CD163 陽性の M2MΦを有意に多く認めた。

【考察及び結論】 本研究ではウサギ OA モデルに対する SVF の治療効果は、対照群および同量の幹細胞量を含む IADSC よりも有意に優れ、hADSC と比べても同等であった。SVF に含まれる ADSC 以外の細胞中の抗炎症性 MΦ は、成長因子や抗炎症性サイトカインの分泌により膝関節恒常性改善と軟骨保護に寄与したものと考えられた。

本研究は、OA 治療において近年注目される SVF について、抗炎症性 MΦ など ADSC 以外の細胞に着目し、従来明らかにされていなかった作用機序の一端をウサギ OA モデルにより明らかとした初めての報告であり、SVF などによる細胞治療が将来的に OA における治療成績を向上させる可能性を示すものとして価値ある業績であると認める。

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。