

～変形性関節症に対する間葉系幹細胞の治療効果～

Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis

Éva Kriston-Pál et al. (2017) *The Canadian Journal of Veterinary Research*

«Intro»

- ・変形性関節症（OA）は、滑膜炎、軟骨欠損、靭帯損傷、骨棘形成、関節腔の狭窄を兆候とする進行性変性疾患である
- ・これらにより痛みや関節の硬さが増し、跛行や生活の質の低下がみられる
- ・本研究では、イヌの OA に対して脂肪由来間葉系幹細胞（AT-MSCs）とヒアルロン酸投与の効果を検討する

«AT-MSCs»

- ・ドナー：健康な MIX 犬、♀
- ・避妊手術の際に脂肪を採取し、AT-MSCs を培養（培養の流れ：脂肪をコラーゲン処理し SVF を回収⇒DMEM/F12 培地に SVF を播種⇒80%コンフルまで AT-MSCs 培養）
 - ※SVF（間質血管細胞群）：脂肪組織を酵素処理することで得られる、脂肪細胞以外の細胞群
SVF の中に脂肪由来幹細胞が含まれる
- ・骨細胞分化能、脂肪細胞分化能、軟骨細胞分化能をそれぞれ検査
- ・表面マーカーの検査
- ・0.5%ヒアルロン酸溶液で懸濁し、肘関節腔内に投与（ $12 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^6$ cells）

«Patient selection»

- ・39 の肘関節（30 頭の犬）で実験
- ・肘の形成不全と軟骨退化に対して、抗炎症剤やヒアルロン酸注入といった対処療法に効果を示さず跛行や痛みを示す犬
- ・5 頭の犬は股関節異形成もしくは椎間板ヘルニアも治療のために鎮痛剤を投与されていたため除外された
- ・うち 6 頭は期間中、幹細胞投与とは関係のない疾患により死亡した
- ・投与前の 10 日間抗炎症剤（カルプロフェンもしくはメロキシカム）が投与された
- ・健康状態を評価するために獣医師から飼い主への聞き取り調査が行われた（投与 6,9,12 か月後）
- ・1 頭から投与前と投与 12 か月後に関節鏡検査でバイオプシーによりサンプル採取した

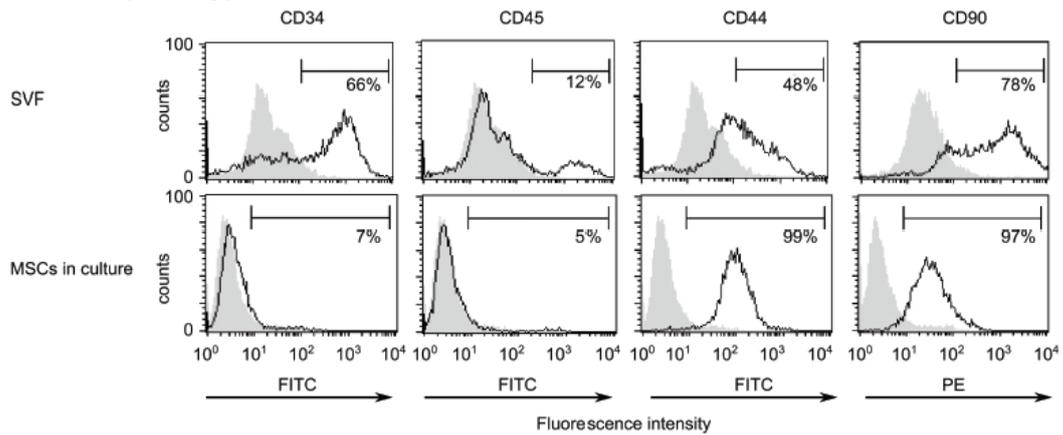
《結果》

●表面マーカー (Figure.1-A)

・SVF (間質血管細胞群) : CD44⇒48%、CD90⇒78%

・MSCs (AT-MSCs) : CD44⇒99%、CD90⇒97%

A. Immunphenotypic characterization



※間葉系幹細胞の表面マーカー：ポジティブマーカー⇒CD44、CD90

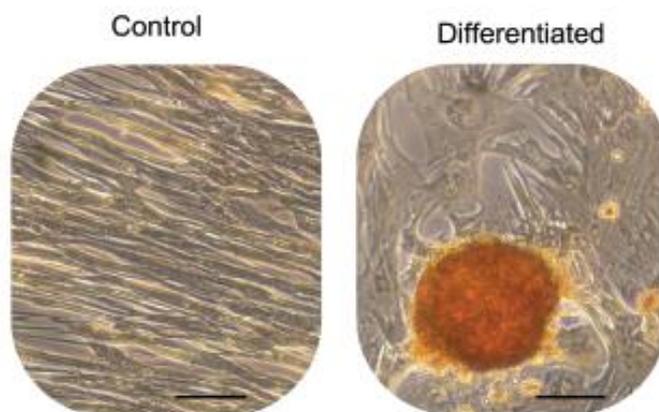
ネガティブマーカー⇒CD34、CD45

●分化能

・骨細胞分化能 (Figure.1-B) : Alizarin Red で細胞外カルシウムを染色

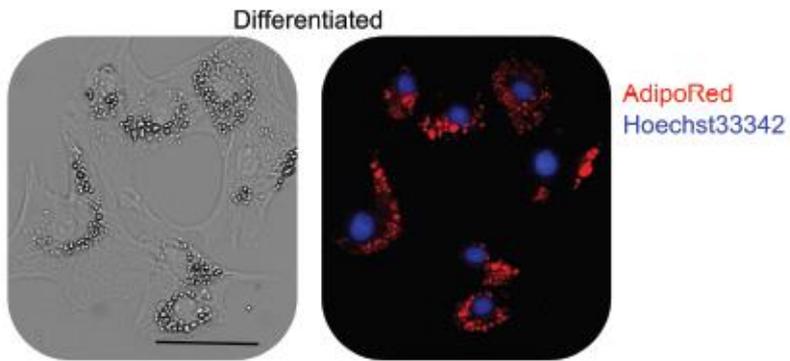
⇒Day21：細胞外カルシウムの染色を確認 (図右)

B. Osteogenic differentiation



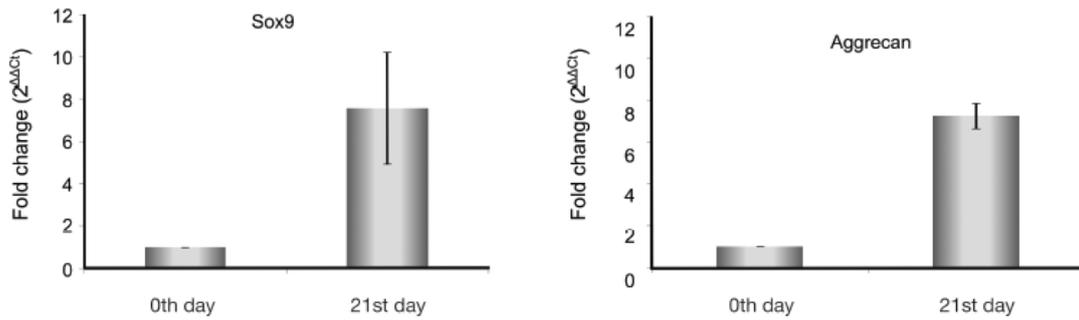
- 脂肪細胞分化能 (Figure.1-C) : AdipoRed で脂肪滴を染色
 ⇒Day4 : 脂肪滴を赤色の染色で確認

C. Adipogenic differentiation



- 軟骨細胞分化能 (Figure.1-D) : Sox9 と aggrecan の mRNA 発現
 ⇒Day21 : Sox9 (図左) と aggrecan (図右) で mRNA 発現
 ※Sox9、aggrecan : 軟骨細胞に存在するタンパク質

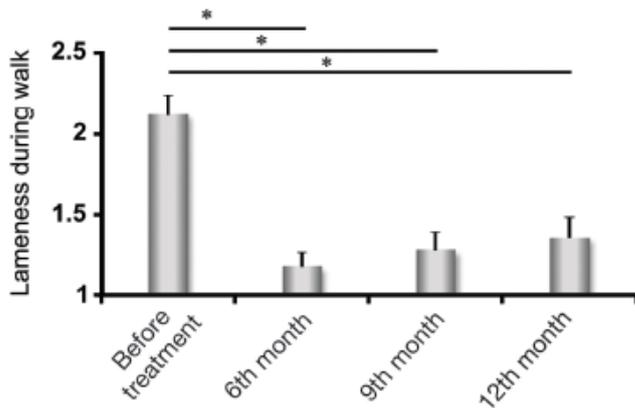
D. Chondrogenic differentiation



●跛行

- ・AT-MSCs 投与、1 年後に飼い主への聞き取り調査で 31/39 肘関節で十分な効果がみられた
- ・歩行中の跛行具合 (Figure.2-A) : 投与前に比べて、6,9,12 カ月後の全てで跛行の減少がみられた

A. Effect of MSCs on dogs' lameness



●関節鏡検査

- ・投与 12 カ月後に軟骨の再生が確認された (Figure.2-B)

B. Arthroscopic assessment

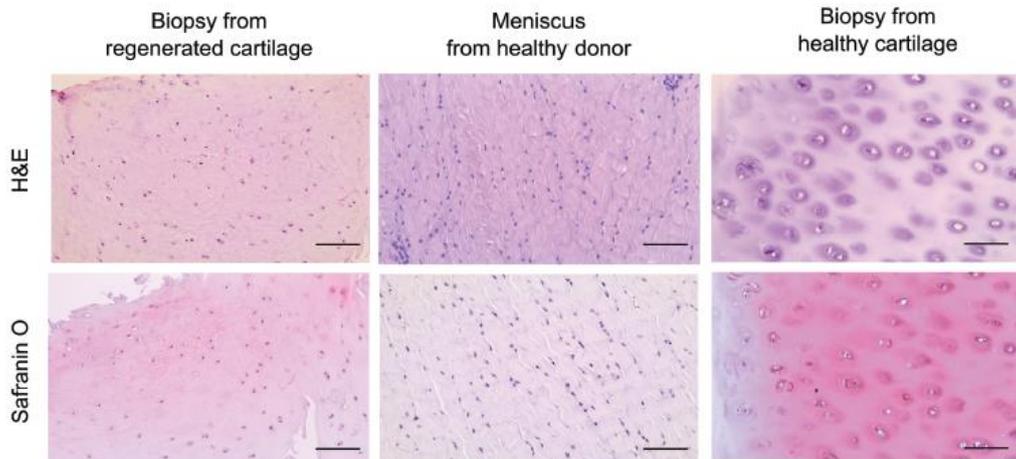


●組織学的検査

- ・HE 染色 : (Figure.2-C 上段左) 再生軟骨では硝子様軟骨の繊維組織がみられた
- ・HE 染色 : (Figure.2-C 上段右) 硝子軟骨 (= 健常関節)
- ・HE 染色 : (Figure.2-C 上段中央) 再生軟骨は半月板でよくみられる線維軟骨に似ていた
- ・サフラン O 染色 : 再生軟骨 (Figure.2-C 下段左) と健常な硝子軟骨 (Figure.2-C 下段右) は繊維軟骨 (Figure.2-C 下段中央) に比べてグリコサミノグリカン (GAG) が多くみられた

※GAG : 軟骨構成成分のひとつ

C. Histologic analysis



《まとめ》

- ・関節腔内への AT-MSCs 投与により患者の状態の著しくかつ持続した改善がみられた
- ・跛行は他の薬剤の使用もなく投与 3 か月後には改善し（data not shown）、少なくとも 1 年間は改善の状態が続いた
- ・幹細胞の投与後、腰（4 症例中 3 症例）、肩（2 症例中 2 症例）膝（3 症例中 3 症例）、飛節（3 症例中 3 症例）の関節で状態の改善がみられた（data not shown）
- ・副作用はほとんどなかったが、39 の関節のうち 2 つの関節で数日間の腫れがみられた

《原文アクセス》

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5220603/>