

■原著

変形性関節症に対する間葉系幹細胞上清の治療経験：パイロットスタディ

清水 啓

要 旨

近年 PRP, 培養幹細胞などバイオセラピーによる変形性関節症の治療報告が多数認められる。今回, 培養間葉系幹細胞上清 (CM) を変形性関節症の治療に使用したので報告する。

幼児歯髄幹細胞上清 (SHED-CM), 骨髄由来幹細胞上清 (BMSC-CM) を変形性膝関節症 (膝 OA) 9 例, 変形性股関節症 (股 OA) 9 例に対し関節内に投与した。VAS (視覚的アナログスケール), KOOS (膝関節評価スコア), JHEQ (日本整形外科学会股関節疾患評価質問票) 評価を行い施行前との比較を行った。股関節 OA では CM に早期から反応し 6 か月まで除痛効果が持続した。膝 OA では疼痛改善効果があったが, 効果にばらつきがみられた。今後幹細胞上清液のサイトカイン, エクソソームの量と種類, 至適投与量につき検討を要する。

■ ORIGINAL ARTICLE

Clinical Experience of Conditioned medium from MSC for Osteoarthritis treatment: A pilot study

Kei Shimizu

Abstract

In recent years, there have been many reports of the treatment of osteoarthritis by biotherapy such as PRP and cultured stem cells. In this study, Conditioned medium of mesenchymal stem cell (CM MSC) was used for the treatment of osteoarthritis. Conditioned medium of Infant dental pulp stem cell (SHED-CM) and CM from bone marrow-derived stem cell (BMSC-CM) were administered intraarticularly to 9 patients with knee OA) and 9 patients with hip OA). VAS, KOOS, and JHEQ were evaluated and compared with before treatment. In hip OA, the patient responded to CM early and had a pain-relieving effect that lasted up to 6 months. Knee OA was effective in improving pain, but the effect was uneven. In the future, it is necessary to study the amount and type of cytokines and exosomes in CM-MSC, as well as the optimal dosage.

Key words Conditioned Medium, MSCs, Osteoarthritis, Biotherapy

(WAARM Journal, 2024; 6: 34–38)

はじめに

近年, 変形性関節症の治療としてヒト細胞由来成分を利用したバイオセラピーが注目されてきている。PRP, 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) などの臨床的な使用報告がふえつつあるが, 本邦では保険診療外 (自由診療) での治療と位置づけられている。その治療効果は比較的良好な報告が多い¹⁾が,

患者負担費用が高く対費用効果の問題や, 治療設備導入費用の問題もありその普及を妨げている。

近年安全な細胞培養法の進歩がめざましく, 間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) 培養上清 (Conditioned Medium; CM) の医学的研究, 臨床的トライアルが盛んにおこなわれてきている²⁻⁴⁾。

骨髄, 脂肪, 歯髄などの間葉系幹細胞上清には各種の幹細胞分泌因子 (サイトカイン, 成長因子など

の液性因子, エクソソームなどの細胞外因子; EV) が含まれていること¹⁻³⁾と変形性関節症の関節炎改善効果, 軟骨代謝改善効果があることが実験的に確認されてきているが^{2,3)}臨床的報告はわずかである^{4,5)}.

そこで, 今回変形性関節症 18 例に対し歯髄, 骨髓の幹細胞上清上清を使用したので報告する.

研究対象および方法

間葉系幹細胞由来上清液の選択にあたっては,

1. ドナー選択 (既往, 感染症) において感染症 (上清液) 検査が確実にされていること⁶⁾.
 2. 基礎的研究が行われていること.
 3. 上清液中の成長因子, サイトカイン, エクソソームの成分量, 分析が可能な限り行われていること).
- 以上3点を基準にした.

使用した幹細胞上清は, 幼弱歯髄幹細胞 (SHED-CM) 上清と骨髓由来幹細胞上清 (BMSC-CM) の2種類である. (表1)

1. 幼弱歯髄幹細胞上清液 (SHED-CM) 2022 年 7 月から 2023 年 6 月末までに (1) X-P 上変形性膝関節症 (OA 膝) と診断された 5 例 6 関節, (平均年齢 73.6 歳, 男 3 例, 女 2 例 Kellgren-Laurence 分類 Grade I : 2 関節, G-II : 2, G-III : 2, G-IV : 1 関節) の膝関節内に SHED-CM (KBSC 歯髄幹細胞プレミアム) を 3-5V (3-5ml) を関節内に投与した. (2) X-P 上変形性股関節症 (股 OA) と診断された 4 例 5 関節 (平均年齢 : 69.4 歳, 初期 3, 進行期 1, 末期 1) に SHED-CM を投与した. 注入量: 3-5V (1V あたり生食水 1ml で溶解) し関節内に投与した.

2. 骨髓由来幹細胞上清 (凍結乾燥ベラルーシ骨髓由来幹細胞上清: BMSC-CM/FD) を 2023 年 1 月から 6 月末まで (1) OA 膝 4 例 4 関節 (平均年齢 75.0 歳, K-L 分類 Grade II : 1 例, III : 3 例) にを 2

-4V (1V あたり生食 2ml で溶解し関節内に投与. (2) 股関節 OA 5 例 5 関節 (男 1 例, 女 4 例, 平均年齢 69.4 歳. X-P 病期: 初期; 2 例, 進行期: 3 例) に 2-4V (1V あたり生食 2ml で溶解) を関節内に注入した.

膝関節への関節内注入法は傍膝蓋外側, 主な変形のある関節 (内側, 外側大腿脛骨関節) にエコーガイド下, 局所麻酔先行注入し 25G 針にて注入した.

膝関節評価法: 施行前, 施行前, 術後 1, 4, 8, 12, 24 週時に VAS 平均値の推移, VAS 改善率を求め VAS 平均値は統計学的評価 (t 検定) を施行した. KOOS TOTAL を施行後 4, 8, 12, 24 週に評価し改善率を比較した. 股関節への関節内注入法はエコーガイド下に股関節前側方から 22G カテラン針使用し関節注を行った. 股関節評価法は施行前, 施行後 1, 4, 8, 12, 24 週時に VAS 平均値の推移, VAS 改善率を求め VAS 平均値は統計学的評価 (t 検定) を施行した. JHEQ 評価を施行後 4, 8, 12, 24 週に行い改善率を比較した. 早期除痛例の調査: 投与後 1 週の時点で VAS 変化 20 以下に減少, VAS 改善率 30% 以上, VAS5 以下, が得られた場合を早期除痛が得られたと判定し症例数に対する割合を求めた.

結果

(1) SHED-CM 膝 OA (図 1)

VAS の変化では施行後 1 週の早期に改善例が 3 例 3 関節 (50%) に認められた. VAS 平均値 (平均), VAS 改善率 (平均) では経過とともに減少傾向が認められたが統計学的有意差はなかった. KOOS (Total) の改善率では施行後改善率は施行後 4 週, 24 週で平均 7, 2% であり改善度は低かった.

表1 今回用いた幼弱歯髄幹細胞と骨髓由来幹細胞上清液の比較

幹細胞上清の種類	幼弱歯髄幹細胞 (SHED)	骨髓由来幹細胞 (BMSC)
商品名	KBSC 歯髄幹細胞プレミアム	ベラルーシ骨髓幹細胞由来上清凍結乾燥
基礎的研究	あり	あり
作成施設	大阪再生医療センター	ベラルーシ国立幹細胞センター
ドナーの年齢	5-8 歳	20 代
感染症検査 (ドナー)	採取時施行	採取時施行
サイトカイン検査	β -NGF VEGF HGF	BDNF, HGF, bFGF, GF-1: 含まれず
エクソソーム分析	なし	あり (1ml あたり 1360 億個の粒子数)

β -NGF (神経成長因子), VEGF (血管内皮細胞増殖因子), HGF (肝細胞増殖因子), BDNF (脳神経由来栄養因子), bFGF (線維芽細胞増殖因子), GF-1 (インスリン様成長因子)

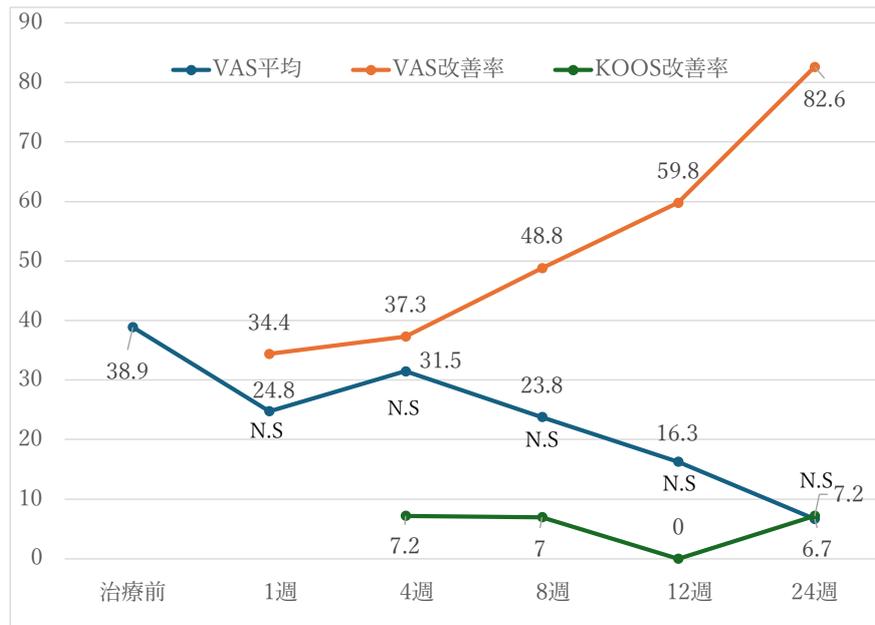


図1 変形性膝関節症（膝 OA）に対する幼児歯髄幹細胞上清（SHED-CM）の効果 VAS 平均と VAS 改善率（%），KOOS 改善率（%）を比較したグラフである。

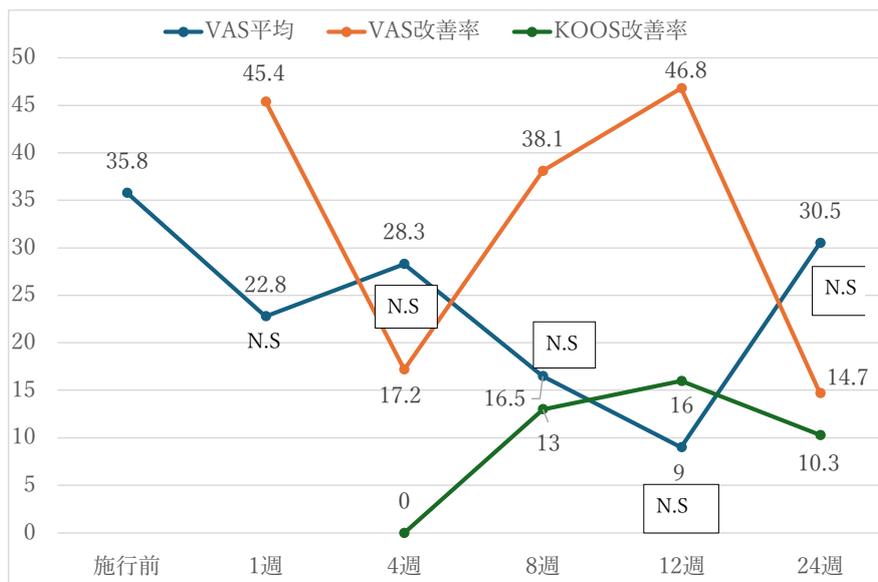


図2 変形性膝関節症（膝 OA）に対する骨髄由来幹細胞上清 BM-MSCs CM/FD の効果 VAS 平均& VAS 改善率（%），KOOS 改善率（%）を示したグラフである。

(2) BMMSC-CM 投与後，膝 OA (図 2)

VAS 変化は施行後早期改善例が 2 例，50% に認められた。VAS 平均値，VAS 改善率ともに低下傾向を認めたが有意差は認められなかった。KOOS は施行後 8 週以降改善傾向を認めた。

(3) SHED-CM 股関節 OA (図 3)

VAS の変化では早期疼痛改善例が 3 例（60%）であり，施行後 8 週目までは有意差をもって VAS 平均値，VAS 改善率，JHEQ 改善率が改善した。

(4) BMSC-CM 股関節 OA (図 4)

VAS 変化では施行後全例早期改善が認められた。VAS 平均値，改善率ともに施行後 24 週まで改善した（統計学的有意差あり）。JHEQ 改善率は 4 週目に 17.3%，24 週目に 16.5% であった。早期改善例は膝，股関節とも施行後 1 週では 72，2% であった。

考 察

未分化幹細胞（MSC）由来幹細胞上清（CM）は幹細胞から分泌される蛋白成分^{2,8,13)}，サイトカイン，エクソソームなどが豊富に含まれており^{7,9,10,14,15)}，

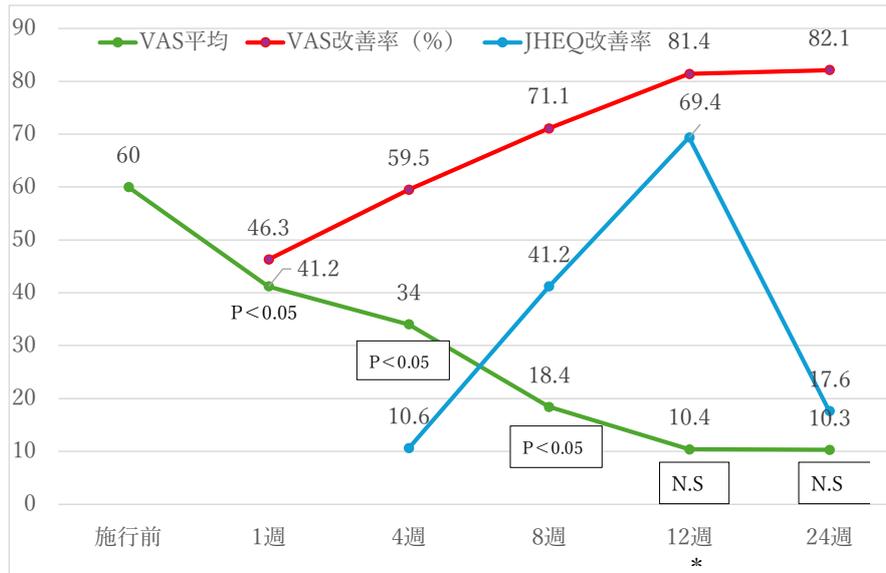


図3 変形性股関節症(股OA)に対する幼児歯髄幹細胞上清(SHED-CM)の効果 VAS平均とVAS改善率(%), JHEQ改善率を示したグラフである。

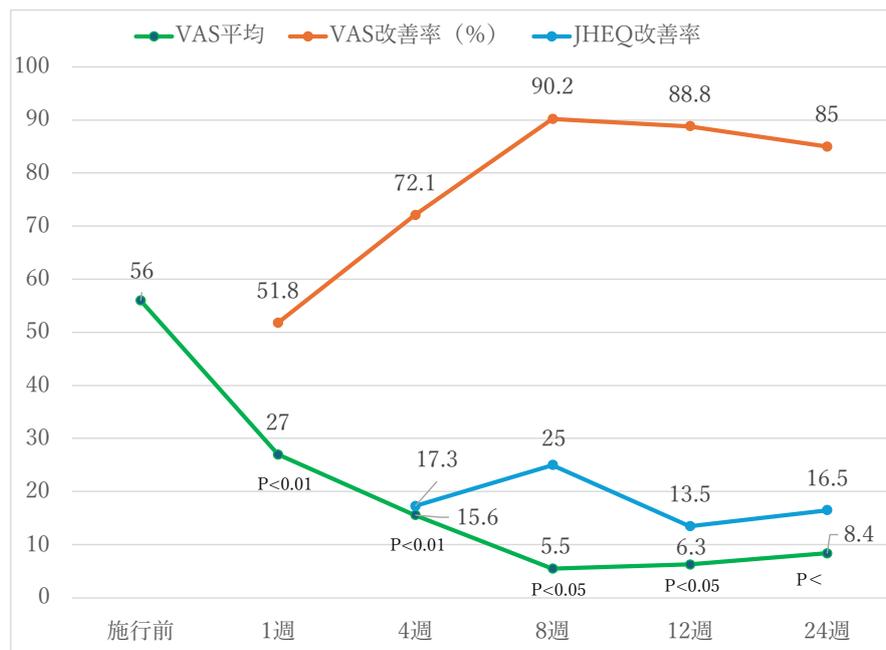


図4 変形性股関節症(股OA)に対する骨髄由来幹細胞上清(BM-MSCs CM/FD)の効果 VAS平均とVAS改善率(%), JHEQ改善率(%)を示したグラフである。

基礎的研究に於いて軟骨再生, 関節炎抑制効果が確認されている。変形性関節症の軟骨変性に対する幹細胞上清の研究は, 骨髄由来, 脂肪由来, 歯髄由来などの報告がある。Mushamadら¹¹⁾は幼児歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)にて, Chenら¹²⁾は骨髄由来培養上清(BMSC-CM)で, Manferdiniら¹³⁾は脂肪幹細胞由来培養上清(ADSc-CM)での実験的研究を報告している。いずれもOA軟骨の変性防止効果, 免疫調節作用, 抗炎症作用が確認されている。現時点で関節疾患への臨床的使用についての報告は

ほぼ見当たらず, Rokosowithら⁴⁾によると変形性関節症に対する幹細胞上清MSC-CMの臨床的研究トライアルが報告されているが未発表な状況である。MSC-CMを臨床的に使用する場合は製造, 輸送などのコストも低く保存が容易であるため外来診療での使用が容易であることが挙げられる^{1,6,8)}。本来液状であるCMは冷蔵庫の保存で約4週, フリーザー(-20度)で約6か月の保存が可能である^{4,8)}。今回使用したBMSC-CMは凍結乾燥化した製剤を使用しており保存, 管理が簡便であった。幹細胞上

清の変形性関節症への治療の具体的な方法を検討する場合、その投与方法（関節内、全身投与、投与量、投与回数（単回、複数回）、は未知数である。今回の結果より変形性関節症にたいする上清液治療では短期の関節炎抑制、除痛効果が期待できる。また股関節 OA の反応がよく、膝関節で反応が低い（ノンレスポンド）ケースがあったが、その理由として投与容量が少なかった可能性が否めない。関節が大きな膝関節に対しては今回使用した幹細胞上清では容量が少なかった可能性がある。初期効果が低いケースやリバウンドが起こった場合は、反復投与が試みられるべきかもしれない（佐藤、私信による）。間葉系幹細胞、幹細胞上清の治療の場合、OA の治療上エクソソームの重要性が強調されてきている⁹⁾が、市販されている幹細胞上清のサイトカイン、エクソソームの定量分析、成分分析は義務化されておらずその報告は取り扱い業者によりまちまちである。上清液の種類により含まれるサイトカイン、成長因子、エクソソームの量と種類が異なる。より効果を高めるためには OA 治療に有効性の高いエクソソーム含有量の多い幹細胞上清の使用が望まれるが、内容が詳細であれば至適投与量が明らかになりやすく、投与量の調整や複数回投与などの治療上の工夫が可能となるためその影響は大きい。エクソソームが含有されていることもあり感染症検査の徹底⁶⁾、義務化など安全性に留意した製品化、使用する治療者側の厳しく真摯な態度が望まれる¹⁶⁾。

謝辞：今回の論文作成にあたり佐藤 茂先生に貴重なご示唆をいただきました。文面にて深謝いたします。

引用文献

- 1) Lopa S, Colombini A, Moretti M, Silva L, et al. Injectable mesenchymal stem cell-based treatment for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. *Knee Surgery Sports Arthroscopy*. 2019; 27: 2003-2020.
- 2) 佐藤 茂, 劉效蘭. 間葉系幹細胞による治療と抗老化. *WARM Journal*, 2018; 1: 1-20.
- 3) 佐藤 茂, 劉效蘭. 培養間葉系幹細胞は他の細胞に分化して病気を治すのかー心筋梗塞, アルツハイマー病, 変形性関節症. *WAARM Journal*, 2023; 5: 33-47.
- 4) Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, et al. Conditioned Medium-Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Reviews and Reports*. 2023; 19: 1185-1213.
- 5) 三島雅辰. 筋骨格系疼痛に対する間葉系幹細胞培養上清液の治療効果. *WAARM Journal*. 2018; 1: 31-35.
- 6) 佐俣文平. メーカーの取り組むべきヒト幹細胞由来上清液の製造規格について. *WAARM Journal*, 2023; 5: 48-51.
- 7) Pawian, JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*. 2014. Article ID 965849, 14P.
- 8) Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ et al: Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures; The next generation for regenerative medicine. *Jornal of Tossue Engineering and Regenarative medicine*, 13(4): 569-586.
- 9) Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, et al MSC Exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, Attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*, 2018; 156: P16-27.
- 10) Mianehsaz E, Mirzaei HR, Hamblin MR, et al. Mesenchymal Stem Cell derived exosomes: new therapeutic approach to osteoarthritis? *Stem Cell Research & Therapy*, 2019; 10: 340.
- 11) Muhammad SA, Nordin N, Hustin P, Protective effects of stem cells from exfoliated deciduous teeth derived conditioned medium on osteoarthritic chondrocytes. *PLOS ONE*, 15(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0238449> Sep,4 2020
- 12) Chen W, Sun Y, Gu X et al. Conditioned medium of mesenchymal stem cell delays osteoarthritis progression in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis, and enhancing autophagy. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019 Sep; 13(9): 1618-1628.
- 13) Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, et al. Lack of anti-inflammatory and anti-catabolic effects on basal inflamed osteoarthritic chondrocytes or synoviocytes by adipose stem cell-conditioned medium. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2015; 23: 2045-2057.
- 14) JR Ferreria, et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 2018; 9: article 2837.
- 15) JK Bar, et al. Dental Pulp Stem Cell-Derived Secretome and Its Regenerative Potential. *Int, J Med. Sci*. 2021; 22: 12018.
- 16) エクソソーム等の調整・治療に対する考え方。一般社団法人日本再生医療学会, 2021年3月10日。