

## ■原 著

## 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

三島 雅辰

## ■Original Article

## Conditioned Media of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Musculoskeletal Pain

Masatatu Mishima

## Abstract

Conditioned media from the adipose-derived mesenchymal stem cell cultures contain not only cytokines and growth factors, but also exosomes. Musculoskeletal pain in the 9 patients was treated by conditioned media. Osteoarthritis, arthritis, lumbar degenerative disc disease and meniscus tear was successfully treated by conditioned media. Conditioned media may provide more effective tool as an alternative to pharmacologic treatment for musculoskeletal pain.

**Key words** 間葉系幹細胞培養上清液, 筋骨格系, 疼痛緩和

(WAARM Journal, 2018; 1: 31-35)

## はじめに

老化とは感染症にかかりやすく、生理的機能障害が起きやすく、酸化ストレスなどの多くの環境因子に影響され易くなり<sup>1)</sup>、循環器疾患、組織損傷などの多くの病気のリスクが増加する<sup>2)</sup>。また、膝関節や腰に痛みを生じる筋骨格系疾患により運動機能障害が起き、平常通りの社会生活が営めなくなることも知られている<sup>3)</sup>。そして、これらの多くの疾患に関して間葉系幹細胞の治療効果が知られている<sup>4,5)</sup>。

筋骨格系疼痛は成人の1/3以上に発症し、原因や部位が多様であり治癒しにくい。筋骨格系疼痛は急性、慢性および神経障害性疼痛に分けられている<sup>3)</sup>。筋骨格系疼痛の治療としては通常アセトアミノフェン、非ステロイド抗炎症剤 NSAIDs が用いられ<sup>6,7)</sup>、痛みが強い場合はオピオイド<sup>8)</sup>などの抗炎症、鎮痛薬を用いている。しかしながら、これらの投薬は疼痛緩和、消失を促すが副作用が知られている<sup>9)</sup>。

間葉系幹細胞の細胞療法は筋骨格系疼痛の鎮痛効果があることが知られている<sup>10)</sup>。これは間葉系幹

細胞が多くのサイトカインや増殖因子を傍分泌し、それらのサイトカインに抗炎症効果があるからである<sup>11,12,13)</sup>。変形性関節症において、間葉系幹細胞だけでなく、その培養上清液にも疼痛緩和が報告されている<sup>14,15)</sup>。

本報告は膝、腰および肩に疼痛を認める患者9人、13部位について間葉系幹細胞培養上清液の治療効果をNRS (Numerical Rating Scale) にて評価した。その結果、間葉系幹細胞培養上清液が筋骨格系疼痛を緩和あるいは消失させることを認めたので報告する。

## 対象および方法

## 脂肪組織由来幹細胞 (AMSCs) の分離と培養

20代女性の腹部皮膚下の脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理して脂肪細胞、内皮細胞、骨細胞あるいは心筋細胞などに分化する間葉系幹細胞などを含む細胞群 (stromal vascular fraction) を自動分離濃縮装置 (米国 Cytori 社製 Celution®) により分離した。この細胞群を培

養していくと間葉系幹細胞以外の細胞が死滅する事により間葉系幹細胞のみとなり AMSCs が作成される。幹細胞の培養はプラスチック製の培養フラスコにバイオミメティクスシンパサイズ社で開発した培養液 sf-DOT を用いた。この培養液には血清や種々の成長因子は含まれていない。

#### 対象および治療方法

変形性膝関節症（4例）、肩関節炎（2例）、膝関節炎（1例）、腰痛症（2例）、椎間板ヘルニア（1例）、半月板損傷（1例）および関節リウマチ（2例）の計13部位、患者9人であり、年齢は52-73歳であった（表）。また、性別では女8人、男3人であった。これらの患者に対して、培養上清液を2.5~5ml 疼痛部位に一回投与した。

#### 疼痛の評価方法

問診による NRS の評価は培養上清液投与前、投与後15分、7日および28日経過時に行った。また、NRSにより痛みを0から11段階に分けて判定した。痛みが全くないものを0、考えるなかで最悪の痛みを10として数値化した（表）。

## 結果

変形性膝関節症4例において、AMSCs 培養上清液投与15分後では疼痛が消失した症例と疼痛緩和が見られない症例に分かれた。28日後では4例共に痛みはほぼ消失していた。

関節炎3例において、投与後15分で疼痛が消失していた2例では、その後28日経過しても痛みは感じられなかった。NRS値10を示した他の1例では、投与後15分から28日まで軽度ながら痛みが見られたが、つらい痛みは軽減されていた。

腰痛症2例では培養上清液投与15分後では疼痛緩和や消失が認められたが、7日以降では投与前のNRS値に戻っていた。

椎間板ヘルニアは1例であるが、投与15分後に疼痛は消失し、その後28日経過しても疼痛は認められなかった。

半月板損傷は1例であるが、AMSCs 培養上清液投与後15分で疼痛は消失するが、その後軽度だがNRSの上昇が見られたが痛みを感じる程度である。

関節リウマチ2例において、AMSCs 培養上清液投与15分から24時間後までは疼痛緩和が見られたが、7、28日後ではほぼ投与前のNRS値に戻っていた。

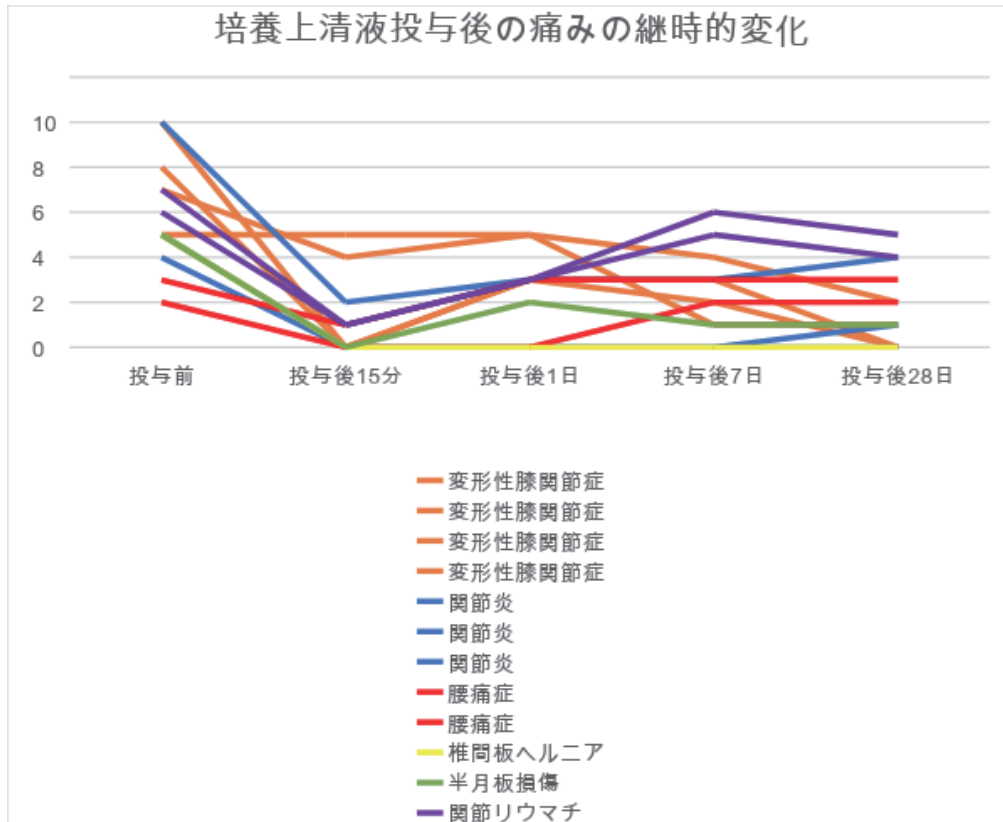
これらの結果をまとめると、ほとんど全ての例（13例中12例）で培養上清液投与15分後には疼痛緩和や消失が認められた。そして、28日後において疼痛がほとんど感じられないか消失していたのは13例中7例、変形性膝関節症3例、関節炎2例、椎間板ヘルニア1例および半月板損傷1例見られた。関節リウマチでは培養上清液投与15分後では疼痛緩和は著明であったが、28日後ではほぼ投与前に戻っていた（表、グラフ）。

## 考察

筋骨格系は身体の運動に関係する骨とそれに付随する筋組織、腱、靭帯および結合組織などである。筋骨格系疼痛は急性（発症から3か月以内）、慢性および神経障害性に分けられる。本報告は筋骨格系の慢性疼痛に対しての間葉系幹細胞培養上清液の治療効果である。筋骨格系の急性疼痛は主に急性炎症や外傷性が原因であり、侵害受容器でその痛みを感

表 筋骨格系疾患患者の培養上清液投与前と後のNRS (Numerical Rating Scale) の評価

現病	年齢 (性別)	疼痛部	投与前	投与後15分	投与後1日	投与後7日	投与後28日
変形性膝関節症	65 (F)	右膝	7	4	5	4	2
変形性膝関節症	65 (F)	左膝	5	5	5	1	1
変形性膝関節症	66 (F)	右膝	10	0	3	3	0
変形性膝関節症	66 (F)	左膝	8	0	3	2	0
関節炎	73 (F)	右肩	5	0	0	0	0
関節炎	52 (M)	左肩	10	2	3	3	4
関節炎	73 (F)	右膝	4	0	0	0	1
腰痛症	54 (M)	腰	3	1	3	3	3
腰痛症	66 (F)	腰	2	0	0	2	2
椎間板ヘルニア	38 (M)	腰	5	0	0	0	0
半月板損傷	67 (F)	右膝	5	0	2	1	1
関節リウマチ	60 (F)	右膝	7	1	3	6	5
関節リウマチ	60 (F)	左膝	6	1	3	5	4



グラフ

じる。慢性疼痛は関節部の退行性病変, がん痛, あるいは急性疼痛が治癒されない場合で起きる<sup>3)</sup>。筋骨格系疼痛の原因は炎症反応であり, 持続的な炎症は末梢や中枢神経感作に関連している。関節の滑膜では多数の末梢神経が分布しており, この部位の炎症を抑えることは重要なことである。変形性関節症の発症には炎症媒介因子 inflammatory mediator の慢性的な発現が重要な役割を演じている<sup>16,17)</sup>。そして, 関節部の疼痛とその強さに炎症性サイトカイン interleukin (IL-1, IL-2, IL-6) が関係しており<sup>18,19)</sup>, TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子) は神経障害性疼痛の進行と関係しているとの報告がある<sup>20,21,22)</sup>。間葉系幹細胞はこれら炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ を抑制する事により疼痛緩和する<sup>23)</sup>。変形性関節症の間葉系幹細胞投与だけでなく, その上清液でも疼痛緩和が報告されている<sup>14,15,24)</sup>。そして, 間葉系幹細胞<sup>24,25)</sup>あるいはその培養上清液<sup>26)</sup>は炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ を抑制し関節痛の消炎効果のみならず酸化ストレスの減少, 軟骨細胞の増殖を促し変形性関節症の治療効果が報告されている。

今回の試験結果から, 変形性膝関節症 4 例において培養上清液投与後 15 分では疼痛が消失した症例と疼痛緩和が見られない症例があった。しかし, 28 日後では 4 例共に痛みはほぼ消失していた。この事

は培養上清液に含まれている種々サイトカインや増殖因子により, 障害を受けた靭帯, 軟骨あるいは滑膜が投与後 28 日には治癒した可能性が考えられる。

また, 筋骨格系疼痛と神経血管障害は重要な相関があり, 培養上清液には多くのサイトカインや増殖因子を含み<sup>11,12,13)</sup>血管形成誘導, 抗線維化, 抗アポトーシス作用による神経損傷治癒を含めた種々の組織障害保護に関係している<sup>27,28)</sup>。また, 変形性関節症患者に脂肪組織由来間葉系幹細胞培養上清液を投与することにより, P53 がん抑制遺伝子をアセチル化することにより老化を抑制し酸化ストレスの減少, 軟骨細胞の分裂を促進させるとの報告もある<sup>26)</sup>, その上, 培養上清液には細胞外小胞も含まれており<sup>29,30)</sup>, 免疫反応, 抗炎症反応, 血管新生に関する細胞間コミュニケーションに重要な役割を担っている<sup>31,32,33)</sup>。これらエクソソームを含む細胞外小胞も神経血管障害治癒に作用して疼痛が消失したと考えられる。

関節炎 3 例において, 投与後 15 分で疼痛が消失していた 2 例では, その後 28 日経過しても痛みは感じられなかった。NRS 値 10 を示した 1 例では, 投与後 15 分から 28 日まで軽度ながら痛みが見られたが, つらい痛みは軽減された。ラットの肩にモノヨード酢酸を投与して作った関節炎動物モデルを用いて, 間葉系幹細胞を関節内に注入すると中枢感作



を抑制し、抗炎症因子および軟骨組織の防御因子 TSG-6 が発現したとの報告がある<sup>13)</sup>。

本試験では椎間板ヘルニア患者は1例であるが、幹細胞培養上清液投与後15分で痛みは消失し、その後28日においても疼痛は感じられていない。この結果から、椎間板ヘルニア患者の疼痛はほぼ全快したと考えられる。腰痛および椎間板ヘルニアの患者33人を対象として、間葉系幹細胞投与後6年間の追跡調査した報告がある。その結果、ほとんどの患者に腰痛の軽減あるいは消失が認められた。また、椎間板ヘルニアの患者20人中17人には椎間板膨隆が縮小していたとしている<sup>34)</sup>。

本試験結果からは、関節リュウマチ2例は、培養上清液投与後15分から24時間までは疼痛緩和効果が見られたが、7日ではほぼ投与前の痛みに戻っており、その後も痛みは継続していた。関節リュウマチは変形性関節症と異なり、老化とは関係なしに若年期にも発症する。自己免疫疾患として、関節リュウマチ、全身性強皮症 systemic sclerosis, 全身性エリマトーデス (SLE) が知られており、これら疾患に対して間葉系幹細胞療法は効果があるとしている<sup>35)</sup>。関節リュウマチ患者48人に間葉系幹細胞を静脈投与6か月後においても良好な結果を得ている<sup>36)</sup>。

変形性関節症や関節リュウマチのような筋骨格系疼痛に対して、非ステロイド性抗炎症薬 NSAIDs (ボルタレン, ロキソプロフェンなど) あるいはオピオイドが用いられる<sup>6,7,9)</sup>。非ステロイド性抗炎症薬はシクロオキシゲナーゼ (COX) を抑制して侵害受容性および中枢性疼痛に対して作用することが報告されている<sup>6)</sup>。間葉系幹細胞も COX を抑制して炎症性サイトカインの分泌を抑制しているとの報告がある<sup>37)</sup>。そして、非ステロイド性抗炎症薬は内服後早いものでは10分から鎮痛効果が見られる。今回は培養上清液局所注入後15分において、1例を除いた12例で鎮痛効果が見られた。実際は、培養上清液局所注入後数分でその鎮痛効果が見られた例もある。これは NSAIDs の内服と培養上清液の局所注入の差であると考えられる。

非ステロイド性抗炎症薬の疼痛緩和は内服後およそ7時間でその効果が無くなるが、培養上清液では7日以上効果が認め、28日経過時でも疼痛が消失している例も見られた。

このことから、通常使用されているボルタレン, ロキソプロフェンなど非ステロイド性抗炎症薬と比較して培養上清液は優れた新治療薬であると考えられる。また、NSAIDs 内服には消化器系, 循環器あるいは

腎臓の副作用が知られている<sup>7)</sup>。強い鎮痛作用を持つオピオイドも睡眠障害, 鬱, 嘔吐あるいは便秘などの副作用が知られている<sup>9)</sup>。しかし、培養上清液に含まれているものはサイトカインや増殖因子であり、細胞成分を含まない安全性が高いものであり、変形性関節症あるいは関節炎など筋骨格系疾患に優れた新治療薬と考えた。

## 参考文献

- 1) Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann NY Acad Sci.* 1100:1-13 (2007)
- 2) Reed MJ, Edelberg JM. Impaired angiogenesis in the aged. *Knowledge Sci Aging Knowledge Environ.* 2004:pe7 (2004)
- 3) Labusca L, Zugun-Eloae F, Mashayekhi K. Stem cells for the treatment of musculoskeletal pain. *World J Stem Cells.* 7:96-105 (2015)
- 4) de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cell as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Current Pharm Des.* 19:2459-2473 (2013)
- 5) Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int.* 2014:951512 (2014)
- 6) Atzeni F, Masala IF, Sarzi-Puttini P. A review of chronic musculoskeletal pain: central and peripheral effects of diclofenac. *Pain Ther.* Doi:10.1007 (2018)
- 7) Greig SL, Ganock-Jones KP. Loxoprofen: a review in pain and inflammation. *Clin Drug Investig.* 36:771-781 (2016)
- 8) Fujii T, Takana K, Orita S, et al. Progressive change in joint degeneration in patients with knee or hip osteoarthritis treated with fentanyl in randomized trial. *Yonsei Med J.* 55:1379-1385 (2014)
- 9) Yamada M, Matsumura C, Jimaru Y, et al. Effect of continuous pharmacist interventions on pain control and side effect management in outpatients with cancer receiving opioid treatments. *Biol Pharm Bull.* 41:854-863 (2018)
- 10) Carstairs A, Genever P. Stem cell treatment for musculoskeletal disease. *Curr Opin Pharmacol.* 16:1-6 (2014)
- 11) García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 10:1453-68 (2010)
- 12) Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20:419-427 (2009)
- 13) Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem cells.* 25:2896-2902 (2007)

- 14) Borakati A, Mafi R, Mafi P, et al. A systematic review and meta-analysis of clinical trials of mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther.* 13:215-225 (2018)
- 15) Mardones R, Jofre CM, Tobar L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of hip osteoarthritis. *J Hip Preserv Surg.* 4:159-163 (2017)
- 16) Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, et al. Interleukin 1 suppresser expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increased type I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest.* 82:2026-2037 (1988)
- 17) Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE, et al. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44:585-594 (2001)
- 18) Doss F, Menard J, Hauschild M, et al. Elevated IL-6 levels in synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. *Scand J Rheumatol.* 36:136-139 (2007)
- 19) de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, et al. Cytokines and pain. *Rev Bras Anestesiol.* 61:255-259, 260-265, 137-142 (2011)
- 20) Leung L, Cahill CM. TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *J Neuroinflammation.* 7:27 (2010)
- 21) Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA) : a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology.* 41:329-337 (2002)
- 22) Schaible HG. The role of TNF-alpha as pain mediator. *Z Rheumatol.* 69:237-239 (2010)
- 23) Ghanman S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 1: 2 (2010)
- 24) Muñoz-Criado I, Meseguer-Ripolles J, Mellado-López M, et al. Human suprapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells induce chondrogenesis and cartilage repair in model of severe osteoarthritis. *Stem Cells Int.* 2017:4758930 (2017)
- 25) Tanaka Y, Sonomoto K, Kondo M, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment and repair of inflammatory arthritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai kaishi.* 38:86-92 (2015)
- 26) Platas J, Guillen MI, del Caz MD, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 8:1703-1717 (2016)
- 27) Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 11:1198-1211 (2005)
- 28) Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther.* 7:131 (2016)
- 29) Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther.* 23:812-823 (2015)
- 30) Keshtkar S, Asarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 9:63 (2018)
- 31) Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200:373-383 (2013)
- 32) Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 18:13-24 (2016)
- 33) Yang Y, Hong Y, Cho E, et al. Extracellular vesicles as a platform for membrane-associated therapeutic protein delivery. *J Extracell Vesicles.* 7: 1440131 (2018)
- 34) Centeno C, Markle J, Dodson E, et al. Treatment of lumbar degenerative disc disease-associated radicular pain with culture-expanded autologous mesenchymal stem cells: a pilot study on safety and efficacy. *J Transl Med.* 15:197 (2017)
- 35) Franceschetti T, De Bari C. The potential role of adult stem cells in the management of the rheumatic diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 9:165-179 (2017)
- 36) Alvaro-Gracia JM, Jover JA, Garcia-Vicuna R, et al. Intravenous administration of expanded allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611) : results of a multicenter, dose escalation, randomized, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 76:196-202 (2017)
- 37) Yang HM, Song WJ, Li Q, et al. Canine mesenchymal stem cells treated with TNF-a and IFN-  $\gamma$  enhance anti-inflammatory effects through the COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway. *Res Vet Sci.* 119:19-26 (2018)