

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18057

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を用いたインプラント周囲感染症の新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Combinational therapy with antibiotics and antibiotic-loaded adipose-derived stem cells reduce abscess formation in implant-related infection in rats

研究代表者

吉谷 純哉 (Yoshitani, Junya)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30800601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗生剤と脂肪由来幹細胞(ADSCs)のcombined therapyのインプラント周囲感染に対する治療効果を検討した。ラット大腿骨インプラント周囲感染モデルを作成し、治療効果を検討した。ADSCsの局所投与は抗菌作用を示した。またADSCsを抗生剤と併用することによりその効果はさらに強まり、抗生剤単独投与よりインプラント付着細菌数を減少させ、骨溶解を抑制し、膿瘍形成を抑制強いた。ADSCsと抗生剤のloading and combined therapyはインプラント周囲感染の新たな治療法となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪由来幹細胞を用いた新たな感染治療の開発を行った。これまで難治性であったインプラント周囲感染症において、抗生剤と脂肪由来幹細胞を併用することで従来の治療を上回る効果が得られた。この結果はScientific Reports誌に投稿しまた海外でも発表を行っており一定の評価を得ている。今後は臨床試験へ向けて、大動物での実験システムを開発し、脂肪由来幹細胞と抗生剤の合剤として製薬開発を考慮する。本研究は新たなインプラント周囲感染症治療の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the antimicrobial activity and therapeutic effect of local treatment with antibiotic-loaded adipose-derived stem cells (ADSCs) plus an antibiotic in a rat implant-associated infection model. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry revealed that ADSCs cultured in the presence of ciprofloxacin for 24 h showed time-dependent antibiotic loading. The therapeutic effects of ADSCs plus antibiotics, antibiotics, and ADSCs were compared with no treatment as a control. Rats treated with ADSCs plus ciprofloxacin had the lowest modified osteomyelitis scores, abscess formation, and bacterial burden on the implant among all groups ($P < 0.05$). Thus, local treatment with ADSCs plus an antibiotic has an antimicrobial effect in implant-related infection and decrease abscess formation. Thus, our findings indicate that local administration of ADSCs with antibiotics represents a novel treatment strategy for implant-associated osteomyelitis.

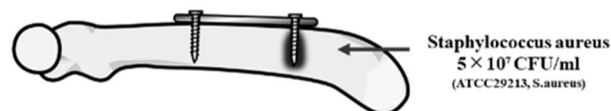
研究分野：整形外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞 インプラント周囲感染症 骨髄炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術後インプラント周囲感染症は、高齢者の健康生活維持に重大な障害を与える問題を孕んでおり医療経済の面でも問題である。しかしその治療に関して、



インプラント挿入前 インプラント設置後 1週後 感染状態

まだ画期的な方策がないのが現状で

ある。現在術後インプラント周囲感染症の治療は長期の抗生剤治療が行われている。しかしインプラント周囲感染では、抗生剤の移行性が悪くインプラントを抜去せざるを得ず治療が長期化することが問題となっている。こうした問題を解決するための新たな治療法として間葉系幹細胞の感染に対する効果に注目した。幹細胞が分化能をもつことはよく知られているが、それ以外にも炎症部位への集積能や抗菌ペプチドの分泌能が報告されている [Éva Mezey, et al. 2015.]. さらに申請者は間葉系幹細胞の1つである脂肪由来幹細胞 (Adipose derived stem cell: ADSCs) に抗生剤を含有させる事ができることを初めて発見し報告した。これにより幹細胞の炎症部位への集積性を利用し、抗生剤を効率よく局所へ移行させる治療方法を考案した。

この成果を踏まえて ADSCs と抗生剤を併用する新たなインプラント周囲感染の治療法の開発に取り組んでいる。ADSCs の細菌に対する効果は *in vitro* では明らかになりつつあるが、実際の感染に、しかもインプラント周囲感染というバイオフィーム形成が問題となる感染に対して効果があるかどうかは明らかではない。私たちが考案した幹細胞に抗生剤を含有させ投与する *combined cell therapy* がインプラント周囲感染に対して効果があるかどうかを検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットインプラント周囲感染モデルに対して抗生剤を含有した ADSCs の投与を行い、従来治療の抗生剤単独投与と比較することで、ADSCs がインプラ

ント周囲感染の治療に与える影響を明らかにし、これまでの治療を上回る新たな治療法を開発することである。

3 . 研究の方法

まず抗生剤のADSCsに対する細胞毒性を評価するためにMTT assayを行った。抗生剤はシプロフロキサシン(CPFX)を使用しました。ADSCsを10000cells/wellの濃度で、CPFXを1.95 – 250 mg/lの濃度とした96well plateで培養した。培養は24時間及び7日間行ったものを評価した。またADSCs及びADSCs-antの骨分化能、抗菌ペプチド分泌能を評価するためQuantitative reverse-transcription (RT-q)PCRを行い、骨芽細胞文化マーカーである ALP, osteocalcin 及び抗菌ペプチドマーカーである *rat cathelicidin-related antimicrobial peptide (rCRAMP)* のmRNAの発現を評価した。

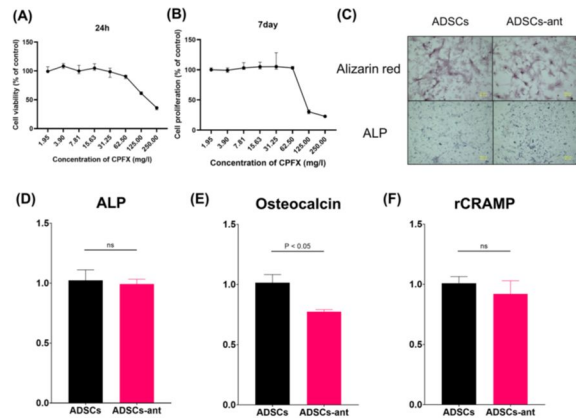
続いてADSCs及び100mg/lのCPFX含有培地で24時間処置したADSCs (以下ADSCs-ant) の骨分化能をALP染色及びAlizarin染色にて評価した。過去の報告に準じ骨分化培地で2週間培養した後に染色を行った。

ADSCs-antの細胞内CPFX含有濃度、及びその後培地を交換した後の徐放濃度を検討した。細胞内濃度及び培地内濃度を液体クロマトグラフ質量分析計にて測定した。コントロールとして過去に薬剤含有能が報告されている骨髄由来幹細胞と、plateへの薬剤接着の影響を考慮し、培地のみとしたものを検討した。さらにADSCsの抗生剤含有能をインプラント周囲感染で最も多いstaphylococcus aureus(以下s aureus)を用いたbroth microdilution methodを用いて評価した。Mueller Hinton broth培地を用いて、ADSCs-antの細胞、ADSCs-antの徐放後の培地、ADSCsの細胞のみ、培地のみを評価しました。

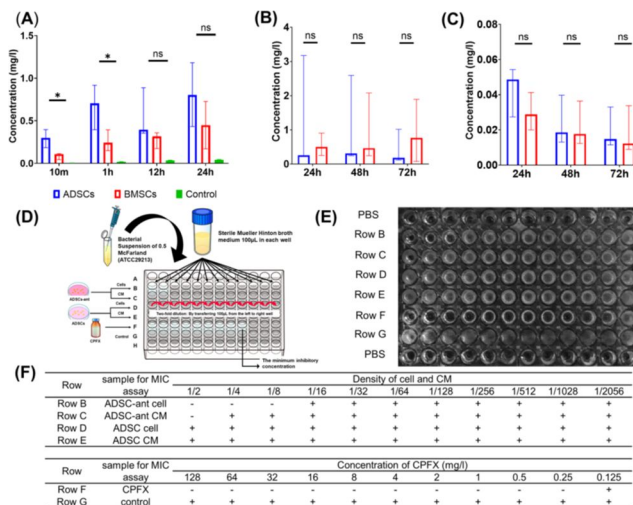
In vivoの検討では、ラット大腿骨インプラント周囲感染モデルを作成し、モデル作成1週後に4群に分類し治療を行った(無治療群、ADSCs-抗生剤投与群、抗生剤単独投与群、ADSCs群)。1週後にmodified osteomyelitis score、 μ CTによる骨溶解の解析、インプラントCFU assayをと病理解析を行い治療効果の検討を行った。

4 . 研究成果

CPFAXは濃度依存性にADSCsの増殖を抑制していた。50%阻害濃度は24時間モデルで 99.5 mg/Lであり7日間モデルで103.6 mg/Lでした。この結果をもとに、今後の検討におけるCPFAX濃度を100 mg/L と設定した。ALP染色とAlizzrin red 染色は骨分化誘導2週後に良好な染色を示していた。さらにPCRにてADSCs及びADSCs-ant両社とも骨芽細胞分化マーカーを発現しており、同等のALP mRNAレベルでしたが、osteocalcinは有意にADSCs-antで減少していた。抗菌ペプチドrCRAMPに関しては両者とも発現していた。

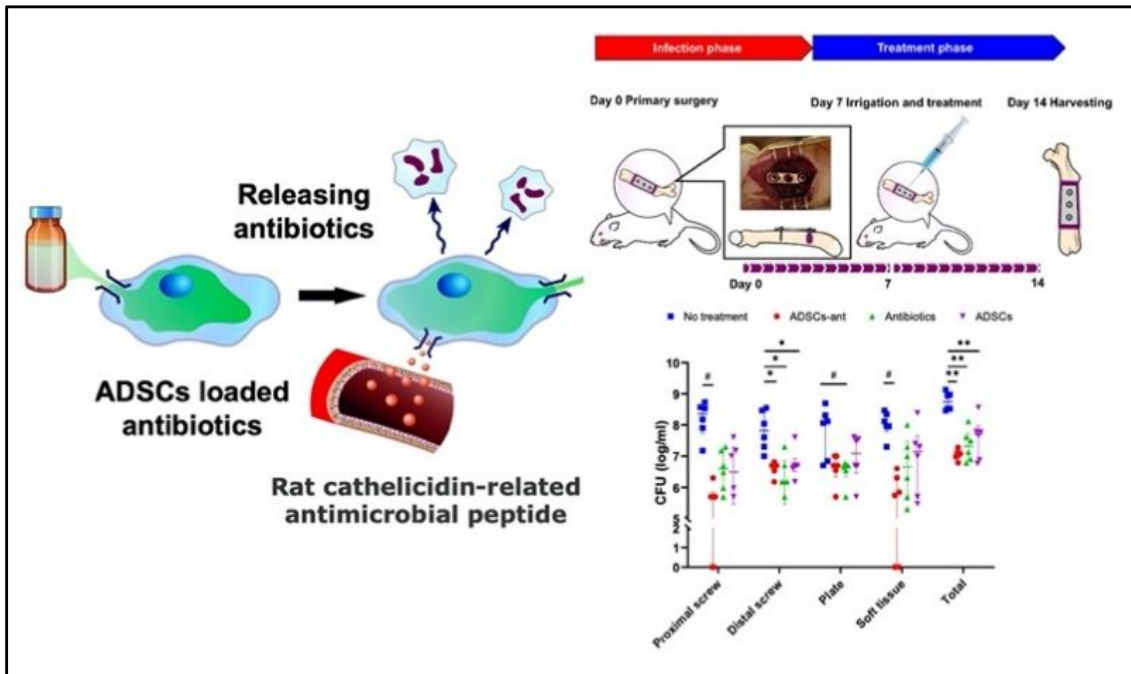


またADSCsは経時的な抗生剤含有を示した。BMSCsも同様に抗生剤含有を示したが、10分、1時間の段階では有意にADSCsの抗生剤含有能が高い結果となった。徐放において培地内には72時間後も微量の抗生剤が認められた。しかしながら24時間後には細胞内含有量は著明に低下していた。またADSCsに含有されたCPFAX濃度はS.aureusのMICを上回る濃度であった



in vivo において Modified osteomyelitis score は ADSCs-抗生剤群で有意に低かった。CFU assay では抗生剤群、ADSCs 群、ADSCs-抗生剤群は有意に CFU が低下していたが、ADSCs-抗生剤群が最も CFU が低下していた。大腿骨の病理学的検討では全体に対する abscess の割合を検討した。ADSCs-抗生剤群では有意に abscess の占める面積が最も減少していた。【結語】ADSCs の局所投与は抗菌作用を示した。また ADSCs を抗生剤と併用することによりその効果はさらに強まり、抗生剤単独投与よりインプラント付着細菌数を減少させ、骨溶解を抑制し、膿瘍形成を抑制強いた。ADSCs と抗生剤の loading and combined therapy はインプラント周囲感染の新たな治療法となり得る。

これらの結果は第 133 回中部日本整形外科災害外科学会にて報告し学会奨励賞を受賞している。また American academy of orthopaedic surgeons 2020 annal meeting においても発表した。また英語論文として 2020 年 Scientific Reports 誌に掲載されている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshitani Junya, Kabata Tamon, Arakawa Hiroshi, Kato Yukio, Nojima Takayuki, Hayashi Katsuhiro, Tokoro Masaharu, Sugimoto Naotoshi, Kajino Yoshitomo, Inoue Daisuke, Ueoka Ken, Yamamuro Yuki, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Combinational therapy with antibiotics and antibiotic-loaded adipose-derived stem cells reduce abscess formation in implant-related infection in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68184-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉谷純哉
2. 発表標題 抗生剤処理した脂肪由来幹細胞を 使用するインプラント周囲感染の 新しい治療法の開発
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitani Junya
2. 発表標題 Combinational therapy with antibiotics and antibiotic-loaded adipose-derived stem cells reduce abscess formation in implant-related infection in rats
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons - AAOS
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------