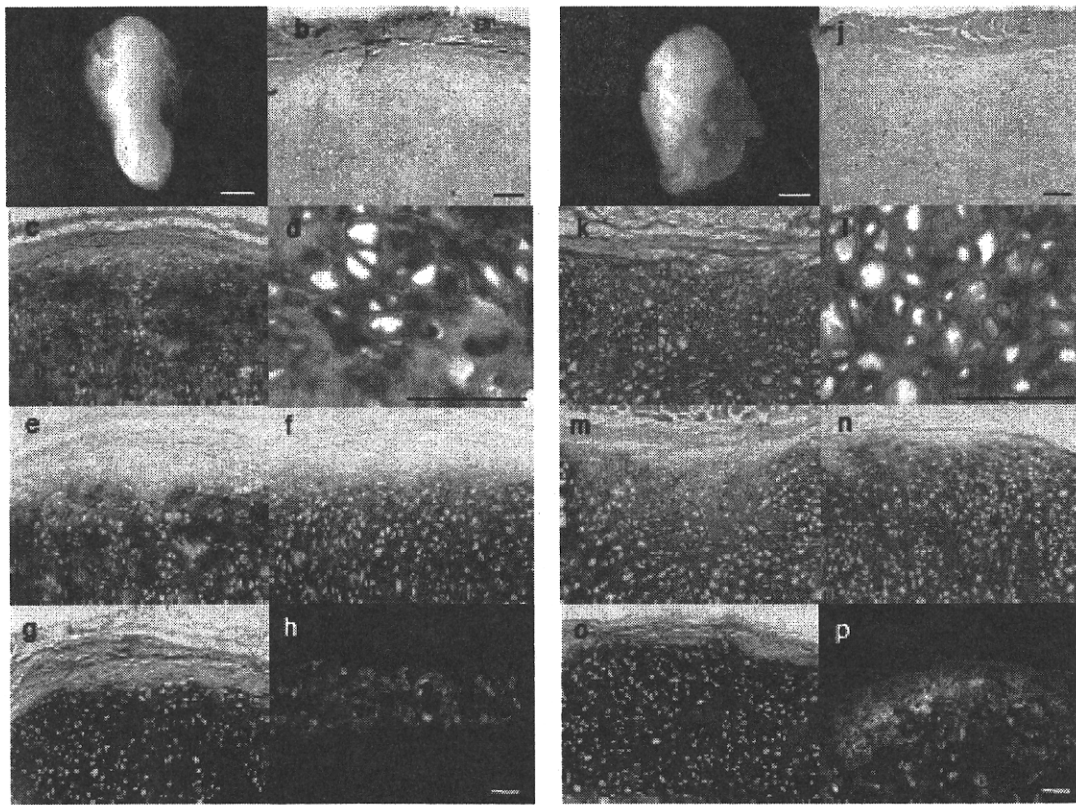


(Fig.3) In vitro multi-differentiation and self-renewal capabilities of human perichondrocytes.



(Fig.4) Elastic cartilage reconstruction capability of human perichondrocytes.

#### D. 考察

ヒト耳介軟骨組織における軟骨間葉系幹細胞の存在を明らかにすることは、耳介軟骨の発生過程や恒常性維持機構に対する理解を深めるだけでなく、弾性軟骨を対象とした質の高い再生治療を行う上で極めて重要である。我々は、ヒト耳介軟骨膜中に存在する、高い増殖能、軟骨・脂肪・骨分化能、自己複製能、組織再構築能を兼ね備えた軟骨間葉系幹細胞を初めて同定し、ヒト弾性軟骨組織を長期的に

再構築できることを明らかにした。

我々が開発したヒト弾性軟骨再構築法は、次世代の弾性軟骨再生治療の実現にとって中核的な技術となる可能性がある。

ヒト耳介などの弾性軟骨組織の臨床的再構築に使用可能な細胞源として、骨髄や脂肪組織から分離された間葉系幹細胞が重要であると考えられている。しかし、これらの間葉系幹細胞は、弾性軟骨に特徴的な細胞外マトリックスの構成成分であるプロテオグ

リカン, Col2, エラスチン産生能を有した弾性軟骨細胞への分化能が極端に低いことが, 臨床応用する上で極めて大きな障壁となっている. さらに, 骨髄由来間葉系幹細胞に関しては, 生体内に移植した後に骨化や血管侵入などの問題が発生するリスクが高いことも臨床応用を阻む理由の一つとなっている. 本研究にて新たに同定されたヒト軟骨膜中に存在する軟骨間葉系幹細胞は, 軟骨細胞への効率の良い分化能を有しており, 従来から報告されている間葉系幹細胞とは明らかに性質が異なった, より軟骨細胞系列にコミットした幹/前細胞であることが推測された. 一方, この細胞は, *in vitro* で骨・脂肪分化能を有していることや, *in vivo* で弾性線維を含まない硝子軟骨への分化能も兼ね備えていることから, 弾性軟骨細胞系列へ完全に運命決定されている前駆細胞と比較すると, より上流に位置する細胞であると考えられる. すなわち, 本幹/前駆細胞は, 細胞系譜上, 間葉系幹細胞に極めて近縁の位置にありながら, より軟骨細胞系列にコミットした軟骨幹/前駆細胞と呼ぶべき新たな細胞であると考えられる. 現時点においては, 間葉系細胞の分化系譜の詳細は不明であるが, 今後の解析によりこれらが明らかになれば, 本幹細胞の分化系譜上の位置づけが明確になるだろう. この様な理解が進むことにより, 本幹細胞が弾性軟骨再生治療にとり最も優れた細胞源であることが明らかとなるだけでなく, 硝子軟骨再生治療にお

ける細胞源としても有益であることが判明する可能性があり, 膨大なニーズのある変形性関節症などに対しても臨床適応が拡大することが期待される. さらには, 臨床応用の際に起こりうる有害事象, 例えば, 骨髄由来間葉系幹細胞で問題になっている骨組織の形成, などのリスク発生率の推測を行うための一助となるであろう.

造血幹細胞や角膜上皮幹細胞などの組織幹細胞を利用した再生医療は, 幹細胞の持つ自己複製能により成熟細胞が長期間に渡り継続的に供給されることから, 臨床的に優れた組織再構築法となることが期待されている. 我々は, 本幹細胞を積層化培養による軟骨分化誘導後に産生基質と共に皮下移植する方法により, *in vivo* においてヒト弾性軟骨組織が再構築される事を見いだした. 再構築されたヒト弾性軟骨組織は, 生体組織と同様に軟骨膜部, 軟骨実質部からなる組織構造をとる事が明らかとなった. したがって, 再構築された軟骨膜中に存在する幹/前駆細胞の自己複製による不断の細胞更新と軟骨細胞分化が期待されるため, 優れた組織維持性を有していることが大いに期待される. 実際, 移植6, 10ヶ月後の解析においても, 再構築された弾性軟骨組織は完全に維持されており, 長期形態維持性を有していることが確認されている. また, 線維性組織形成, 血管侵入や石灰化沈着は10ヶ月の間で全く見られなかったことから, 本幹細胞は弾性軟骨再生治療の実現にとり骨髄由来間葉系幹細胞

胞よりも優れた細胞源であることが推測される。小児先天奇形を対象とした弾性軟骨再生治療では、患児の一生涯に渡り軟骨組織が恒常的に維持されることが必須であるため、Serial transplantation 法などを利用して、本幹細胞の自己複製能の臨界点を明らかにしていく必要があるだろう。

従来、臨床ニーズに十分応えることができる優れた弾性軟骨再構築法は存在しなかった。唯一、臨床応用例のある耳介軟骨細胞を用いた方法でも、成熟軟骨細胞を用いているが故の組織吸収と細胞移植であるための適応限定が解決課題として残されており、小児期の先天奇形などへの臨床適応の拡大を阻んできた。しかし、我々は低侵襲操作で採取可能なヒト耳介軟骨膜から幹細胞を分離し、培養系を用いて分化誘導後、細胞を皮下注入する、という極めて簡便な細胞操作技術による弾性軟骨組織の再構築法を開発した。本法を用いれば、従来法における課題を克服できるばかりか、成長に応じた追加注入も容易に可能であるため、単純な形状の小組織の欠損に基づく小児先天奇形に対する治療戦略が確立されたといえるだろう。さらに、我々は耳介軟骨のような複雑な構造を有する大型の弾性軟骨組織を再構築するために不可欠となる足場材料の開発を行い、本幹細胞と組み合わせることによって弾性軟骨組織を再構築させることに成功した。今後、本足場材料の臨床応用の可能性が検討され、耳介軟骨などの大型で複雑な形態

に成形するための技術開発がなされれば、形成外科・美容外科領域における多種多様な臨床ニーズに合わせた弾性軟骨組織の再構築を行う上で中核技術となることが大いに期待される。

## E. 結論

我々は外耳介背面より低侵襲的に採取可能な耳介軟骨膜から、ヒト軟骨間葉系幹細胞を世界で初めて同定した。培養ヒト軟骨幹細胞は極めて高い増殖活性に加え、高い軟骨分化能を有していることが明らかとなった。さらに、本細胞を用いて臨床応用可能な細胞操作技術による弾性軟骨組織再構築法を開発した。再生弾性軟骨は、幹細胞の自己複製と分化により長期的に組織維持が期待されるものと考えられた。本研究により、耳介軟骨に存在する幹細胞を用いて、優れた再生医療を世界に先駆けて実現できるものと期待される。

## F. 参考文献

1. Chang, S.C., Tobias, G., Roy, A.K., Vacanti, C.A. & Bonassar, L.J. Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plast Reconstr Surg* 112, 793-799; discussion 800-791 (2003).
2. Beahm, E.K. & Walton, R.L. Auricular reconstruction for microtia: part I. Anatomy,

- embryology, and clinical evaluation. *Plast Reconstr Surg* 109, 2473-2482; quiz following 2482 (2002).
3. Eppley, B.L. & Dadvand, B. Injectable soft-tissue fillers: clinical overview. *Plast Reconstr Surg* 118, 98e-106e (2006).
  4. Matton, G., Anseeuw, A. & De Keyser, F. The history of injectable biomaterials and the biology of collagen. *Aesthetic Plast Surg* 9, 133-140 (1985).
  5. Nagata, S. Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part I. Grafting the three-dimensional costal cartilage framework for lobule-type microtia. *Plast Reconstr Surg* 93, 221-230; discussion 267-228 (1994).
  6. Maas, C.S., Monhian, N. & Shah, S.B. Implants in rhinoplasty. *Facial Plast Surg* 13, 279-290 (1997).
  7. Matarasso, A., Elias, A.C. & Elias, R.L. Labial incompetence: a marker for progressive bone resorption in silastic chin augmentation. *Plast Reconstr Surg* 98, 1007-1014; discussion 1015 (1996).
  8. Zeng, Y., Wu, W., Yu, H., Yang, J. & Chen, G. Silicone implants in augmentation rhinoplasty. *Aesthetic Plast Surg* 26, 85-88 (2002).
  9. Firmin, F., Sanger, C. & O'Toole, G. Ear reconstruction following severe complications of otoplasty. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* (2008).
  10. Kline, R.M., Jr. & Wolfe, S.A. Complications associated with the harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 95, 5-13; discussion 14-20 (1995).
  11. Laurie, S.W., Kaban, L.B., Mulliken, J.B. & Murray, J.E. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 73, 933-938 (1984).
  12. Skouteris, C.A. & Sotereanos, G.C. Donor site morbidity following harvesting of autogenous rib grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 47, 808-812 (1989).
  13. Whitaker, L.A., et al. Combined report of problems and complications in 793 craniofacial operations. *Plast Reconstr Surg* 64, 198-203 (1979).
  14. Berry, L., Grant, M.E., McClure, J. & Rooney, P. Bone-marrow-derived chondrogenesis in vitro. *J Cell Sci* 101 ( Pt 2), 333-342 (1992).
  15. Ma, H.L., Hung, S.C., Lin, S.Y., Chen, Y.L. & Lo, W.H. Chondrogenesis of human

- mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 64, 273-281 (2003).
16. Terada, S., Fuchs, J.R., Yoshimoto, H., Fauza, D.O. & Vacanti, J.P. In vitro cartilage regeneration from proliferated adult elastic chondrocytes. *Ann Plast Surg* 55, 196-201 (2005).
  17. Shieh, S.J., Terada, S. & Vacanti, J.P. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 25, 1545-1557 (2004).
  18. Togo, T., et al. Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction. *Lab Invest* 86, 445-457 (2006).
  19. Dickhut, A., et al. Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol* 219, 219-226 (2009).
  20. Afizah, H., Yang, Z., Hui, J.H., Ouyang, H.W. & Lee, E.H. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng* 13, 659-666 (2007).
  21. Koga, H., et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333, 207-215 (2008).
  22. Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. & Muneta, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52, 2521-2529 (2005).
  23. Langer, R. & Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* 260, 920-926 (1993).
  24. de Chalain, T., Phillips, J.H. & Hinek, A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J Biomed Mater Res* 44, 280-288 (1999).
  25. Jeon, Y.H., et al. Different effects of PLGA and chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering. *J Craniofac Surg* 18, 1249-1258 (2007).
  26. Ushida, T., Furukawa, K., Toita, K. & Tateishi, T. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant* 11, 489-494 (2002).

27. Quirici, N., et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30, 783-791 (2002).
28. Boiret, N., et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol* 33, 219-225 (2005).
29. Aslan, H., et al. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 24, 1728-1737 (2006).
30. Nimura, A., et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 58, 501-510 (2008).
31. Covas, D.T., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 36, 642-654 (2008).
32. Gojo, S., et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288, 51-59 (2003).
33. Tondreau, T., et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23, 1105-1112 (2005).
34. Bianco, P. & Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414, 118-121 (2001).
35. Macchiarini, P., et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372, 2023-2030 (2008).
36. Bosnakovski, D., et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng* 93, 1152-1163 (2006).
37. Varghese, S., et al. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* 27, 12-21 (2008).
38. Yanaga, H., et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 117, 2019-2030; discussion 2031-2012 (2006).

39. Kikuchi, K., et al. Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation. Nucleic Acids Res (2009).
40. Stock, U.A., et al. Dynamics of extracellular matrix production and turnover in tissue engineered cardiovascular structures. J Cell Biochem 81, 220-228 (2001).

G. 健康危険情報

総括研究報告書に記載の通り.

H. 研究発表

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録       なし
3. その他             なし



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法の開発

- 「軟骨間葉系幹細胞」関節軟骨欠損症治療法の開発 -

研究協力者 水野 満

研究分担者 谷口 英樹

#### 研究要旨

我々は、ヒト耳介軟骨膜に存在する「軟骨間葉系幹細胞」を同定しており、臨床応用することを目的に検証を行っている。本細胞は、多分化能力を備えていることから、関節軟骨における膝関節症を対象とした治療法に有用であるかを検証した。関節軟骨欠損症モデル犬を作製し、同一個体犬の耳介軟骨膜から採取した細胞を用いて、関節軟骨欠損部位に移植する研究を行った。その結果、「軟骨間葉系幹細胞」を関節欠損部に移植した群では、関節軟骨の再生が認められた。今後、移植条件を再検討し、症例数を重ねる必要があるものの、採取が容易な本細胞は、膝関節症など関節疾患にとって有効な治療法になり得ると思われる。

#### A. 研究目的

軟骨組織は血管に乏しく生体内で自然に再生しにくい組織のため、関節表面の軟骨が損傷すると変形性関節症へと移行する。特に膝関節は加齢やスポーツなどにより損傷を受けやすく、高齢者に多く発症が認められる。日本だけでも放射線学的に診断される膝変形性関節症の患者数は2530万人いると試算があるにも関わらず、根本的な治療法がない。現在の変形性関節症の標準的な治療法は骨髄刺激法(欠損が線維軟骨で修復され、治癒効果が不確実)や、モザイクプラスチック法(高い外科的正確性

と、正常組織に損傷を生じる必要がある)が提唱されているが、治癒効果の面で課題が残っている。

治癒効果を向上させるために、自己細胞を用いて欠損組織を再生する組織再生医療が注目され、軟骨細胞を利用した治療法が考案された。しかし、正常軟骨組織を傷害して細胞を得ることから、罹患部位をさらに障害する必要があるなどの課題が指摘されている。そこで近年、他の細胞供給源として様々な自己細胞が提唱され、臨床研究がなされている。しかし、候補のひとつである骨髄由来間葉系幹細胞は、採取部位である腸骨への侵襲が大きく、軟骨への分

化能が低いいため骨へ分化転換してしまうことから実用化への可能性は極めて低い。脂肪由来幹細胞もまた、軟骨への分化能は低く臨床応用には不向きである。また、他の間葉系幹細胞と比較して高い軟骨分化能を有することから、滑膜由来幹細胞を用いた軟骨再生治療が行われており、良好な成績を挙げている。だが、細胞採取のために関節鏡手術が必要であり、侵襲が大きい。これらの背景は、現状では多くの方法が考案されながらも低侵襲かつ治癒効果の高い治療法の確立がなされていないという側面を示すものとなっている。

そこで、われわれはヒトにおける関節軟骨欠損治療法の開発の一環として、モデル動物としてイヌを用いた。イヌの耳介軟骨から軟骨幹/前駆細胞が分布する軟骨膜を分離、培養し、培養後の軟骨膜細胞をイヌ膝関節欠損症モデルに移植し、その生体反応を検討する。

## B. 研究方法

### 1. イヌ耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

#### ①試験動物

健康なイヌ、ビーグル (TOYO Beagle)、5ヶ月齢の雄3頭を用いた。

#### ②麻酔処置

獣医師指導のもと、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号、最終改正平成

18年6月2日法律第50号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示第88号)、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006年6月1日)を遵守した麻酔処置を実施した。

いずれの手術日も、動物は前日から一夜絶食後、麻酔前処置(硫酸アトロピン:田辺製薬(株)、再移植手術時はジアゼパム:大洋薬品工業(株)を併用)を施し、軟骨摘出手術時はペントバルビタールナトリウム(20~30 mg/kg)を静脈内投与し、術中の麻酔深度を適度に維持する。再移植手術時は塩酸ケタミン(ケタラール筋注用、第一三共(株))と5%ブドウ糖液(日本薬局方、(株)大塚製薬工場)を1:50の割合に混合(0.1%液)し、微量点滴により術中の麻酔深度を適度に維持する。術前及び術後管理として感染防止目的で抗生物質[必要に応じて結晶ペニシリンGカリウムと硫酸ストレプトマイシン(明治製菓(株))の混合液は術中に術部に適量を滴下する。また、アジスロマイシン(ファイザー製薬(株))は手術前日に1回、術後2日間の計3日間、1日1回経口投与する]を処置する。術部は、消毒薬(イソジンなど、明治製菓(株))を1日1回の割合で術部表層の癒合を確認できるまで塗布する。

#### ③軟骨膜組織の分離

全個体について、外耳介(両側)を手術により採取し、無菌的に皮膚を剥

離する(fig.1)。脂肪や血管、他の組織をハサミで取り除き、軟骨組織から鑷子を用いて軟骨膜を剥離し、軟骨と軟骨膜を分けた。

## 2. イヌ耳介軟骨膜細胞の培養

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、0.2% Collagenase type II (SIGMA)に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は100 $\mu$ mのCell Strainer(BD Falcon)で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)した。上清を除去後、10% Fetal Bovine Serum(gibco), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium(SIGMA; 以下D-MEM/F-12)で洗浄し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(FALCON)あるいは60 mm 細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。細胞は気相条件を37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington)を含有するD-MEM/F-12(SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で20~30分静置し、1% Antibiotic Antimycotic

Solution(SIGMA)を添加したD-MEM/F-12 medium(SIGMA)を加え、ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は1200 cells/cm<sup>2</sup>の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

## 3. 積層化培養と軟骨分化誘導

耳介軟骨膜由来細胞の軟骨細胞への分化誘導は積層化培養と分化誘導培地によって軟骨細胞へ分化誘導を行った。軟骨細胞はin vitroにおける二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟骨分化誘導が試みられてきた。そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後2日間、10% Fetal Bovine Serum(gibco), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加したD-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養し、細胞の接着を促した後、軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。軟骨分化誘導培地は、1% Antibiotic

Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate(WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor I (SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor(科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とし、血清は用いなかった。軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後、別に用意した細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し、上から播種し積層化した。2層目を播種後、1層目と同様に2日間は10% Fetal Bovine Serum(gibco), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養を行い、その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し、計3層に重層化した。なお、細胞の培養はすべて、気相条件を37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で行った。

#### 4. 軟骨細胞、軟骨膜細胞のコロニー形成能

軟骨/軟骨膜細胞の第2継代の細胞から、各500 cellsを6 well plate dish (BD Falcon)の各wellに播種し、2週間培養を行い、各細胞が形成したコロニーの平均を測定した。2週間後に100%エタノールで10分間固定を行い、20倍希釈したギムザ染色液で各wellの染色を行った。

#### 5. 関節軟骨の欠損作製

1.②と同じ手順で麻酔導入を行い、耳介を摘出したビーグルの片膝関節

に軟骨欠損を作製した。軟骨欠損は外科的手術により軟骨荷重部に直径5 mmのパンチにて作製した (fig.4)。移植後はボルヒールを用いて移植部位を被覆した。

#### 6. 軟骨膜細胞の移植

実験に使用したイヌは5ヶ月齢の雄ビーグル (TOYO Beagle) を用いた。実験動物の飼育はボゾリサーチセンターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

分化させた各細胞は、セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離した。剥離した細胞は15ml tube(BD Falcon)に回収し、最大速度で遠心を行いペレット状にし、移植を行った。移植後3カ月目に摘出を行い、組織学的に検討した。

#### 7. 組織化学染色

移植後3ヶ月目に摘出した組織は、10%ホルマリン溶液(Wako)を用いて、室温で24時間以上浸漬固定した。その後、パラフィンで包埋し、組織包埋ブロックを作成した。組織包埋ブロックを5μmの厚さに薄切し、組織切片を作成した。作成した組織切片をキシレン、エタノールで処理しパラフィンの除去を行った後、Hematoxylin-Eosin染色を行った。

### C. 研究結果

1. イヌ耳介軟骨から軟骨細胞、軟骨膜細胞の分離、初代培養  
イヌの耳介(fig.1)から軟骨/軟骨膜

組織を分離し、イヌにおいても、ヒト軟骨/軟骨膜細胞と同様の分離、培養法で初代培養を行うことに成功した(Fig.2).

## 2. 軟骨細胞, 軟骨膜細胞のコロニー形成能

ついで、われわれは軟骨膜細胞に未分化な細胞が存在することをヒトでの先行研究で示したが、イヌにおいても同様の傾向を示すか検証を行った。

耳介軟骨から分離した軟骨細胞のコロニー形成能は  $15 \pm 2.309$  であったが、軟骨膜細胞のコロニー形成能は  $55 \pm 4.359$  と非常に高い値を示した(Fig3-table).

## 3. 関節軟骨における欠損作製時 / 移植後の所見

正常関節軟骨(fig4-1a)に欠損を作製(fig4-1b)し、対照群(処置無し)と移植群で比較を行った。関節摘出時の対

照群(fig4-2 黒矢印)では、欠損部の治癒は認められなかった。移植群では(fig4-2 白矢印)では、移植部と辺縁部の整合性に若干の不合が認められるものも、欠損部の治癒が認められた。

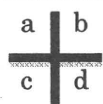
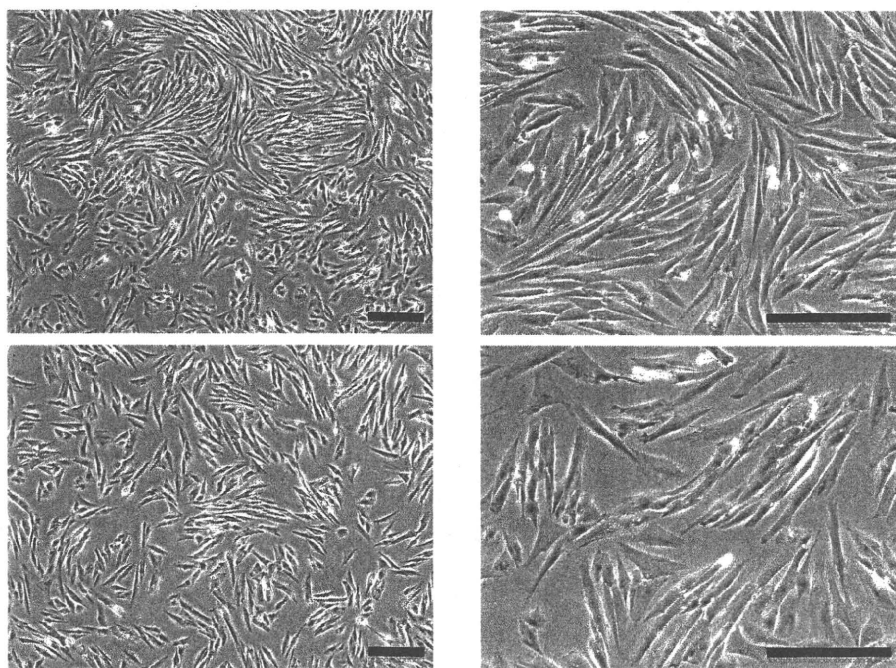
## 4. 組織化学染色

関節軟骨の欠損を作製し、骨部分の損傷には至らずに軟骨のみが欠損していることを fig.5-A に示した。関節軟骨の荷重部位に欠損を作製し、いずれの処置もせず3ヶ月後に組織切片を作製したものを対照群(fig.5-B)とした。対照群では、骨部分の関節軟骨が欠損したままであり、治癒も認められなかった。細胞移植群(fig.5-C)では5.で示した方法を基に移植を行った。対照群と比較して、細胞移植群では関節軟骨の再生が認められた。

(Fig.1) 耳介軟骨からの軟骨膜細胞, 軟骨細胞の分離



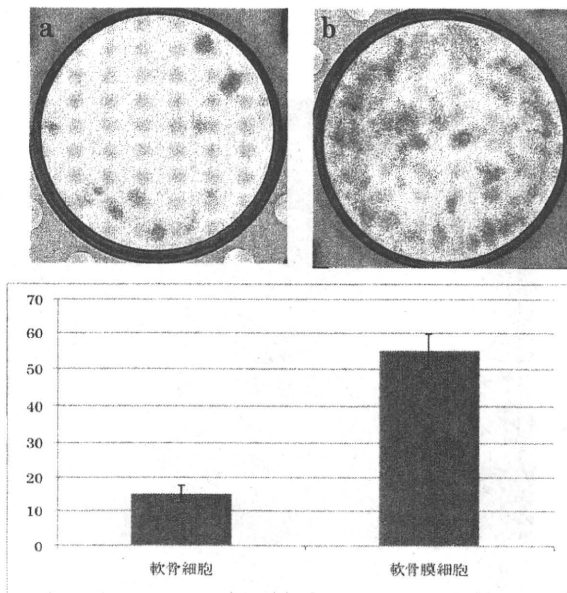
(Fig.2) 耳介軟骨から分離した軟骨細胞, 軟骨膜細胞



Scale Bar : 200  $\mu$  m

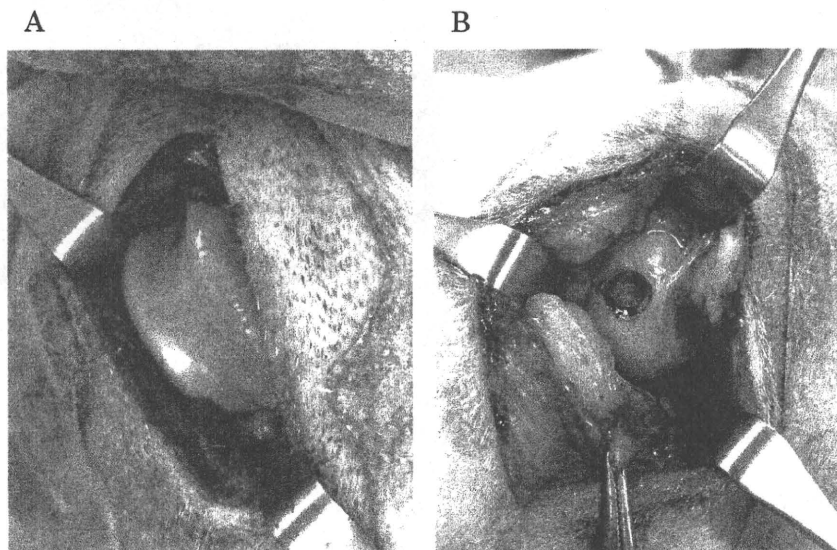
- a) 耳介軟骨から分離した軟骨細胞 第2継代
- b) 耳介軟骨から分離した軟骨細胞 拡大像 第2継代
- c) 耳介軟骨から分離した軟骨膜細胞 第2継代
- d) 耳介軟骨から分離した軟骨膜細胞 拡大像 第2継代

(Fig.3) 耳介軟骨由来軟骨細胞,軟骨膜細胞の Colony 形成能



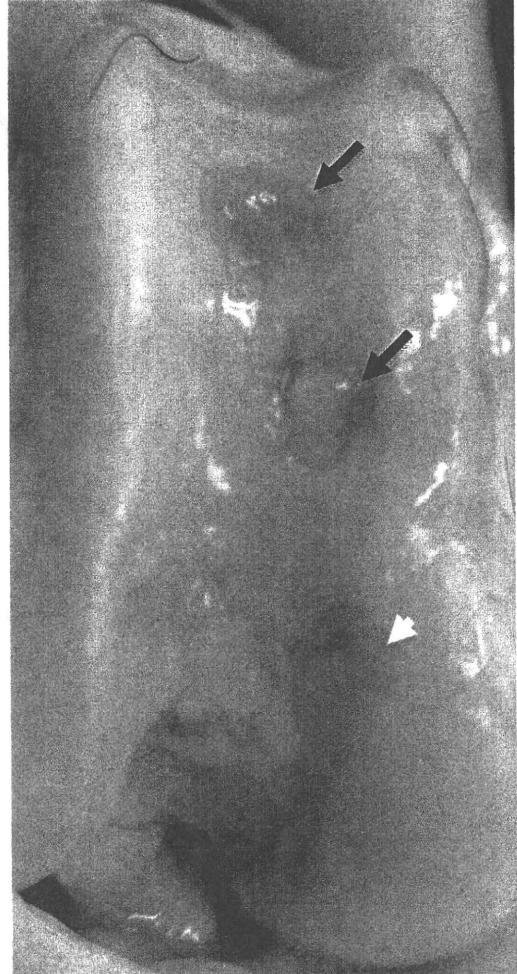
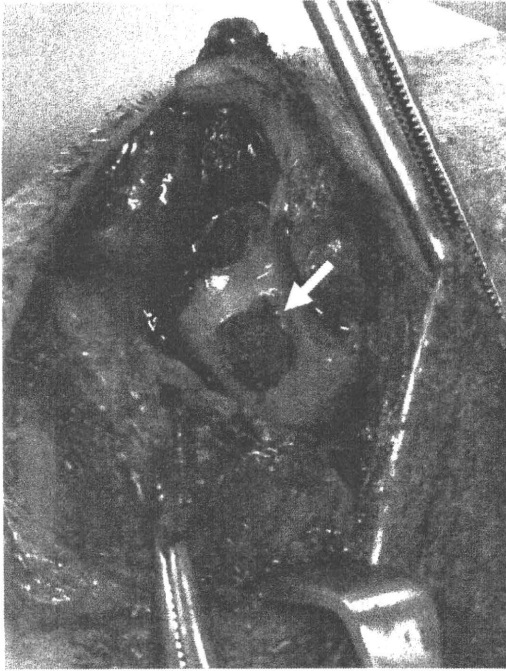
a)軟骨細胞の Colony 形成能  
b)軟骨膜細胞の Colony 形成能  
table) 両群の比較

(Fig.4-1) 関節軟骨欠損の肉眼的所見



A)欠損作製前  
B)欠損作製時

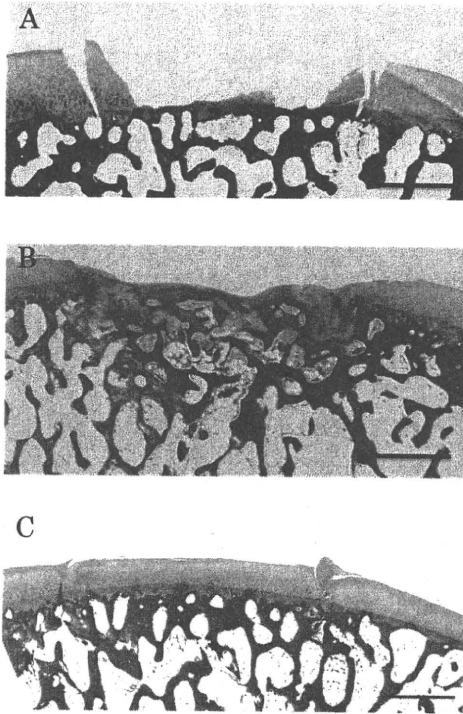
(Fig.4-2) 関節軟骨欠損の肉眼的所見



- 白矢印) 関節軟骨欠損部位への細胞移植
- 黒矢印) 欠損作製から3ヶ月後の対照群
- 白矢頭) 欠損作製から3ヶ月後の細胞移植群



(Fig.5) 組織化学染色



- A : 関節軟骨欠損  
B : 対照群  
C : 細胞移植群

Scale bar : 1mm

#### D. 考察

軟骨組織は血管に乏しく生体内で自然に再生しにくい組織のため、関節表面の軟骨が損傷すると変形性関節症へと移行する。特に膝関節は加齢やスポーツなどにより損傷を受けやすく、高齢者に多く発症が認められる。日本だけでも放射線学的に診断される膝変形性関節症の患者数は2530万人いると試算があるにも関わらず、根本的な治療法がない。現在の変形性関節症の標準的な治療法は骨髄刺激法（欠損が線維軟骨で修復され、治療効果が不確実）や、モザイクプラスチック法（高い外科的正確性と、正常組織に損傷を生じる必要がある）が提唱されているが、治療効果の面で課題が残っている。また、再建さ

れた組織の長期形態維持性が不安定であることや組織採取量に制限があることなどが克服しがたい臨床的課題であった。治療効果を向上させるために、自己細胞を用いて欠損組織を再生する組織再生医療が注目され、軟骨細胞を利用した治療法が考案された。しかし、正常軟骨組織を傷害して細胞を得ることから、罹患部位をさらに障害する必要があるなどの課題が指摘されている。そこで近年、他の細胞供給源として様々な自己細胞が提唱され、臨床研究がなされている。しかし、候補のひとつである骨髄由来間葉系幹細胞は、採取部位である腸骨への侵襲が大きく、軟骨への分化能が低いため骨へ分化転換してしまうことから実用化への可能

性は極めて低い。脂肪由来幹細胞もまた、軟骨への分化能は低く臨床応用には不向きである。また、他の間葉系幹細胞と比較して高い軟骨分化能を有することから、滑膜由来幹細胞を用いた軟骨再生治療が行われており、良好な成績を挙げている。だが、細胞採取のために関節鏡手術が必要であり、侵襲が大きい。これらの背景は、現状では多くの方法が考案されながらも低侵襲かつ治癒効果の高い治療法の確立がなされていないという側面を示すものとなっている。

こういった問題を解決するべく、軟骨細胞へ分化しうる幹細胞に関する研究が広く行われている。われわれは、ヒト耳介軟骨膜細胞中に軟骨幹/前駆細胞を同定し、その臨床応用を目指している。関節軟骨再生に弾性軟骨由来の軟骨幹/前駆細胞を用いることの利点は、その未分化性にある。間葉系幹細胞や脂肪組織由来幹細胞は以前より軟骨分化を含めた多分化能が報告されており、特に間葉系幹細胞は椎間板再生や関節軟骨再構築に関して臨床応用が試みられている。しかしその一方で、多分化能のために予期せぬ骨分化や脂肪分化をきたす可能性と危険性は回避できない。その一方、軟骨幹/前駆細胞は多分化能がわれわれの先行研究で確認されているものの、間葉系幹細胞などからはいわゆる下流の細胞であり、軟骨分化へある程度特化していると想像される。そのため、その他の幹細胞を用いる場合と

比べると骨分化や脂肪分化の可能性より低い。弾性軟骨から硝子軟骨である関節軟骨への分化能を有すると想定した。本研究では、その仮説を立証するための研究成果を示した。今後は、耳介由来弾性軟骨膜細胞に加え、より多くの細胞が得られる耳介由来弾性軟骨細胞を培養した群の移植も行い、詳細に比較するために、評価項目として、特殊染色/免疫染色など追加し、弾性軟骨特有の蛋白である **Elastin** や関節軟骨特有の蛋白である **Lubrcin, Collagen Type X** の発現やその局在を評価していきたい。

#### E. 結論

今回われわれは、弾性軟骨である耳介軟骨膜から採取した軟骨膜細胞を異種軟骨組織である関節軟骨の欠損症治療法の細胞源として臨床応用するにあたって、関節軟骨欠損を作製したイヌを用いて軟骨膜細胞の分離、培養法、移植法の検証を行った。

軟骨膜細胞の関節軟骨欠損部位に移植したところ、組織学上硝子軟骨様の組織が認められた(n=1)。この結果は、従来の変形性関節症の治療法に新しい技術を提供する画期的な結果かもしれない。

今後は例数を重ねるとともに、硝子軟骨特異蛋白の発現の有無を評価する必要性がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書における記載の通りである。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」

を用いた軟骨再生療法の開発

・細胞調製センターにおける臨床応用へ向けた研究・

分担研究者 前川二郎

研究協力者 矢吹雄一郎

#### 研究要旨

われわれは、本学付属病院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、Good Manufacturing practice (以下GMP)に準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその報告が必要となる。現在、それらプロトコールの作成に加え、大動物(イヌ)における耳介軟骨・軟骨膜細胞培養とそれらの軟骨再構築能の検討を行っている。また、医薬品を用いた軟骨分化誘導に関して検討を行っている。現在、それぞれの研究・検討を進めている段階であり、今後さらなる条件検討と例数を重ねる必要がある。

#### A. 研究目的

再生医学の概念は1990年代より広まり、その概念は定着して久しいと言える。しかしその一方で、現状で臨床応用に至っている技術はごく一部である。2009年11月、本学付属病院は病院内に再生細胞治療センター(cell processing center: 以下CPC)を建設・設置を開始した。その後、2010年10月頃よりCPC内の機材の試運転やシュミレーションテストなどを開始している。当院CPCは同区画内に作業スペースを2カ所設計しており、それぞれCP1とCP2としている。CP1にはクラス100の空気清浄度を保持できるアイソレー

ター(Cell Processing work station system; SANYO)を設置している。

われわれは、当CPCとアイソレーターを利用し、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、GMPに準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその報告が必要となる。現在、基礎実験としては2つの項目に関して行っている。まず、大動物(イヌ)における耳介軟骨・軟骨膜細胞培養とそれらの軟骨再構築能の検討を行っている。そして、医薬品を用いた軟骨分化誘導に関しても検討を行っている。そ