

日間の増殖培地による培養後、コロニー数のカウントを行った。カウントに際してはギムザ染色（武藤化学薬品）による染色を行った後、50個以上の細胞集団を1コロニーとし定量した。

3. Multipotent differentiation *in vitro*

軟骨分化誘導に関しては積層化培養法を用いた。各細胞を 2.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、播種後48時間まで増殖培地で培養を行い、その後は L-ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), Dexamethasone (SIGMA), human-recombinant Insulin-like Growth Factor- I (SIGMA), human-recombinant basic Fibroblast Growth Factor (Wako) を添加した分化誘導培地を用いて培養を行った。5日間の培養の後、さらに 2.5×10^4 cells/cm² の細胞を上へ播種し、同様の手順で培養を行うという操作を計2回繰り返した。骨および脂肪分化誘導に関しては、以前の報告に準じた³⁹⁾。

4. Gene expression analysis

軟骨・脂肪・骨分化能を調べるため、Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), 並びに quantitative PCR (qPCR) を行った。RT-PCR による各分化関連遺伝子の発現の確認には以下のプライマーを用いた。type I collagen (COL1A1), type II collagen (COL2A1), type X collagen (COL10A1), aggrecan (ACAN), elastin (ELN), lipoprotein

lipase (Lpl/LPL), C/EBP α (Cebpa/CEBPA), aP2 (Fabp4), Adipsin (CFD), PPAR γ (PPARGC1A), runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALPL) を用いた。qPCR には、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) の COL1A1: Hs00266273_m1, COL2A1: Hs00164099_m1, CSPG2: Hs01007933_m1, ELN: Hs00355783_m1, FBNI: Hs00171191_m1 の primer/probe set を用いた。

5. ELISA

積層化培養による軟骨分化誘導下で培養1, 3週間目に、培養上清を回収した。上清中に分泌されたプロテオグリカン, エラスチン, コラーゲンを、それぞれ BLYSCAN, FASTIN, SIRCOL assays (Biocolor) のキットを用いて定量測定を行った⁴⁰⁾。

6. *In vivo* transplantation

軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質とともにシリンジに回収し、重症免疫不全マウス (NOD/SCID) (三協) の背部皮下に1ml ずつ移植を行った。Scaffold に細胞を播種した群では、円柱上にくり抜いた pCol-HAp/ChS (Tokyo Institute of Technology), Collagen sponge (テルモ), ハイドロキシアパタイトスキャフォールド (オリンパス) に各々3カ所ずつ計1ml の細胞浮遊液を添加し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。移植後、4週目、12週及び40週目に摘出を行い、

組織学的に検討した。尚、実験動物の飼育、取り扱いに関しては横浜市立大学医学部動物実験センターの規定に基づき行った。

7. Histochemical and immunohistochemical analysis

組織切片、または培養細胞を固定した後、H&E、アルシアンブルー、エラスチカ・ワンギーソン、アリザリンレッドS、オイルレッドO（武藤化学薬品）で組織化学染色を行った。免疫組織化学染色に際しては、rabbit anti-human type I collagen monoclonal antibody (Col1) (MONOSAN), mouse anti-chicken type II collagen polyclonal antibody (Col2) (CHEMICON) を用いて 4 °C, overnight で反応させた。洗浄後、適切な動物種に対する Alexa488- and/or Cy3-conjugated 二次抗体 (1:800, Molecular Probes) を添加し、室温で 1 時間反応させた。その後 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を添加した FA Mounting Fluid (BD Biosciences) にて核染色及び封入を行い、LSM510 Laser Scanning Microscope (ZEISS) を用いて観察、画像を撮影した。

8. Statistical analysis

データは、少なくとも 3 人以上の独立した検体による実験から得た mean ± s. d. を表記した。統計学的解析には、まず 3 あるいは 4 群のデータに対し Kruskal Wallis-H test を行い、 $P <$

0.01 と判定された場合に、Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction による多重比較検定を行った。有意確率 P 値が $P < 0.001$ または $P < 0.01$ を満たす場合を統計学的有意差ありと判定した。

9. 倫理面への配慮

前述検体の供与に関して、当院の倫理委員会の承認を得て施行した。また、患者へは目的と方法、および想定される合併症とその対処法を説明し、文章による同意を得た。さらに倫理面へ配慮し、研究への参加は個人の意思を尊重した。得られたデータに関しても ID や氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った。

C. 研究結果

High proliferative capacity of human perichondrocytes

我々は高い増殖能、多分化能、自己複製能、組織再構築能などの幹細胞としての特徴を有する細胞集団は耳介軟骨膜部に存在するものと仮定した。これらの仮説を実証するため、小耳症患者から摘出した残存耳介軟骨を対象として、ヒト弾性軟骨組織における幹/前駆細胞の分離・同定を試みた。残存耳介軟骨を提供した患者の性別に偏りはなく、平均年齢は 10.6 ± 1.4 歳であった。残存耳介軟骨を外科的に摘出後、軟骨膜部、軟骨-軟骨膜移行部、軟骨実質部の三層に分離し、各々から単離した細胞をそれぞれ培養した

(Fig.1a). まず各層由来細胞の増殖能を比較するため、低密度培養 (52 cells/cm²) によるクローン性コロニー形成能の解析を行った。培養 4 週後、各細胞からクローン性コロニーが形成された (Fig.1b)。形成されたクローン性コロニー数は、播種細胞 500 個あたり軟骨膜細胞で 23.9±4.5 個、軟骨膜-軟骨移行部細胞で 9.9±6.8 個、軟骨細胞で 2.3±0.4 個であり、軟骨膜細胞は他と比べて極めて高いコロニー形成能を有していた (Fig.1c)。軟骨膜細胞の長期的な増殖能を継代培養系で解析した。形態学的には、各層由来細胞は長期培養後 (12w~) には扁平化し、線維芽細胞様の形態を有するようになった (Fig.1d)。196 日間にわたって 14 回の継代培養を行った結果、9.42×10³ 個の軟骨膜細胞は、1.20×10²⁷ 個まで約 1.27×10²² 倍に増殖した。一方、9.42×10³ 個の軟骨細胞は、1.26×10²⁴ 個まで約 1.30×10¹⁹ 倍に増殖した。すなわち、軟骨膜細胞は軟骨細胞に比べ約 949 倍の子孫細胞を生み出す能力を有していることが判明し、有意に高い増殖活性をもつことが明らかとなった (Fig.1e)。

In vitro elastic cartilage differentiation potential of human perichondrocytes

軟骨膜細胞の弾性軟骨への分化能を評価することを目的として、積層化培養法を用いて軟骨細胞への分化誘導を行った (Fig.2a)。軟骨膜細胞は積層化を行うことによって、プロテオ

グリカン、Type II collagen(Col 2)を産生する軟骨細胞へ分化することが確認された (Fig.2b)。軟骨膜細胞から分化した軟骨細胞は種々のムコ多糖類を分泌するようになり、培養液は高い粘性を有する基質様性状へと変化した。

軟骨細胞への分化能を定量的に検討するため、リアルタイム PCR を用いた弾性軟骨分化関連遺伝子の発現変化を解析した。軟骨膜細胞を積層化培養することにより、弾性軟骨に特徴的な基質である versican(*CSPG2*), elastin (*ELN*), alpha 1 type II collagen (*COL2A1*), fibrillin 1 (*FBN1*) 遺伝子の発現レベルは、各々 4.2 倍, 9.6 倍, 2.1 倍, 17.2 倍に著明に上昇することが確認された (Fig.2d-g)。一方、軟骨膜部に特徴的な alpha 1 type I collagen(*COL1A1*) の発現は 0.18 倍に低下した (Fig.3c)。ELISA を用いて、弾性軟骨組織の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能の解析を行ったところ、積層化した軟骨膜細胞においては各々 17.5±4.3, 235.6±19.9, 61.8±7.5 μg/ml の基質産生が確認された。驚くべき事に、この基質産生能は、同様に積層化した軟骨細胞のプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能 (各々 19.0±1.3, 234.0±16.3, 55.8±4.9 μg/ml) と同等であることが判明した (Fig.2h-j)。*In vitro* multi-differentiation and self-renewal capabilities of human perichondrocytes

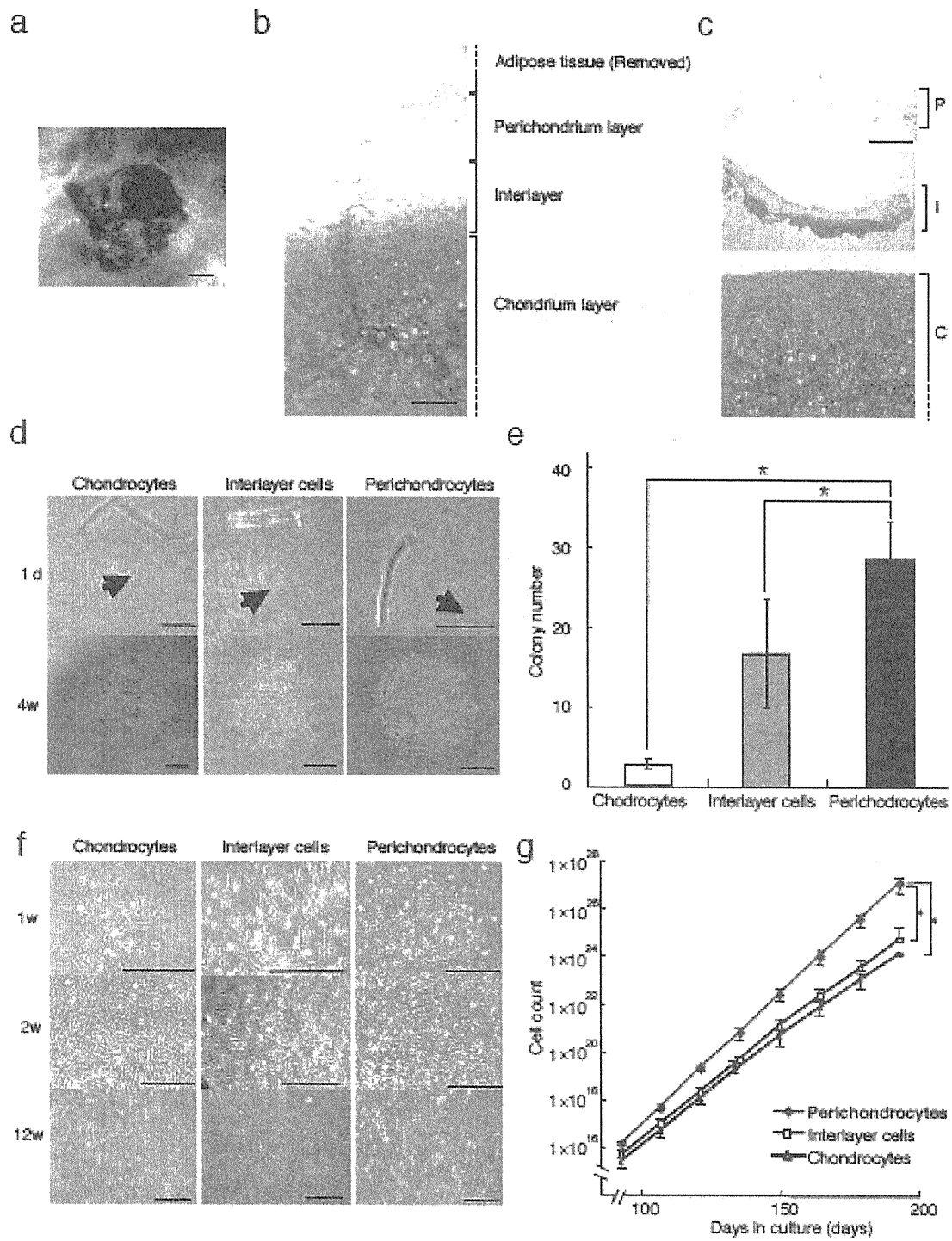
軟骨細胞への分化能に加え、軟骨膜細胞の脂肪および骨分化能の有無を検討した。脂肪分化誘導培地による3週間の培養により、軟骨膜細胞は卵円形の形態に変化し、Oil Red Oにて染色される脂肪滴を形成することが確認された。また、骨分化誘導培地による3週間の培養により、軟骨膜細胞はAlizarin Red Sにて染色されるCaを多量に産生することが確認された (Fig.3a 右)。軟骨細胞を対象として同様の分化誘導を行ったところ、脂肪滴形成もCa沈着も認めなかったことから、軟骨膜細胞のみが軟骨分化能に加え脂肪・骨への多分化能をもつ事が示された (Fig.3a 左)。

長期間にわたって、多分化能を有した幹/前駆細胞が自己複製により維持されていることを証明するため、継代培養を行った軟骨膜細胞を対象として多分化能の解析を行った。第3継代、7継代、10継代培養後の各軟骨膜細胞は、細胞化学染色、RT-PCRの結果より何れも軟骨、脂肪、骨への多分化能を維持していたことから、これらの細胞のうち少なくとも一部は自己複製能を有している事が示唆された (Fig.3b,c)。

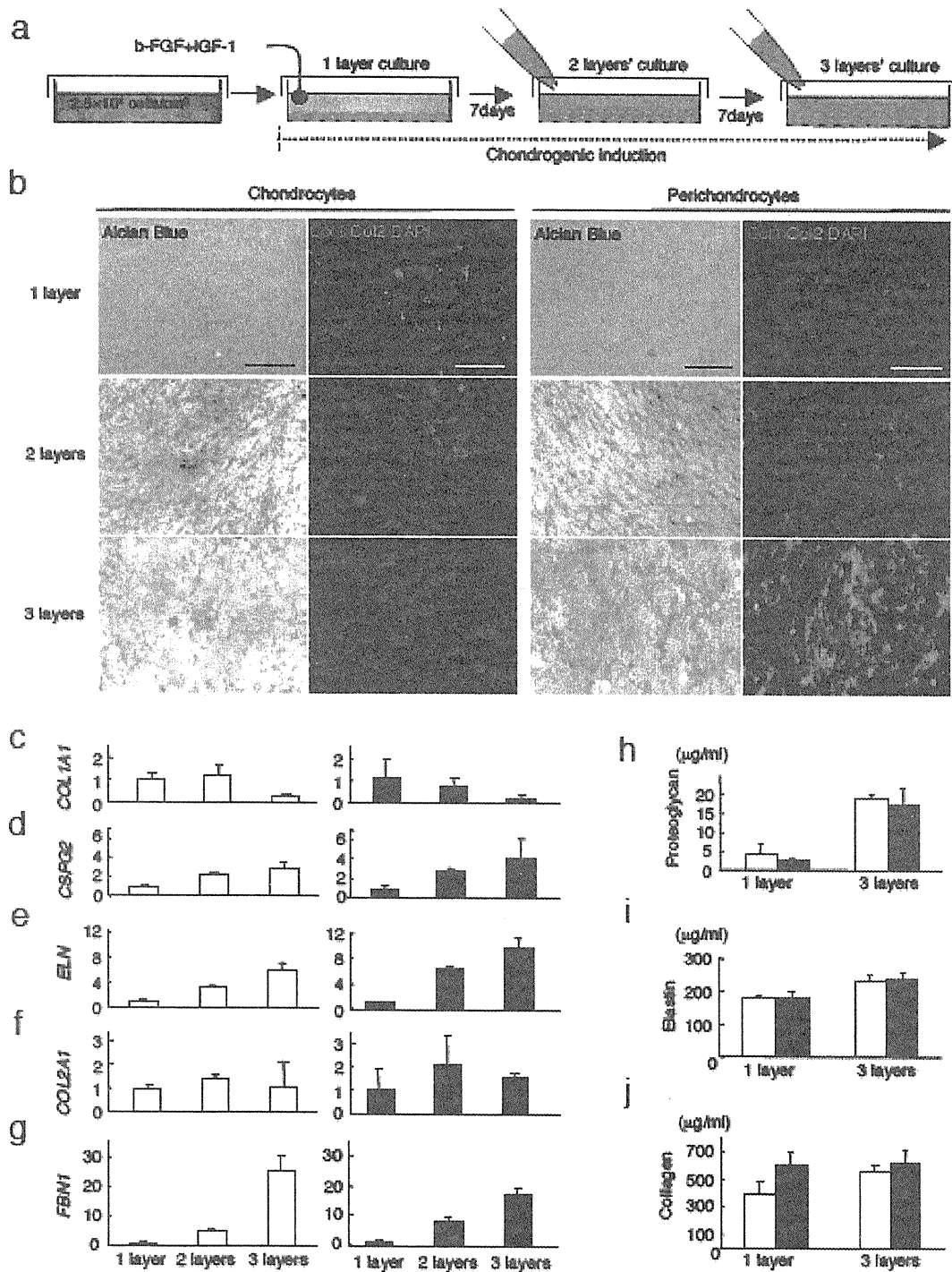
In vivo tissue reconstruction capability of human perichondrocytes

我々は高い軟骨細胞への分化能や自己複製能などの特徴を有している軟骨膜細胞を用いれば、*in vivo*において優れた弾性軟骨再構築法を新規開発できるものと考えた。このアプロ

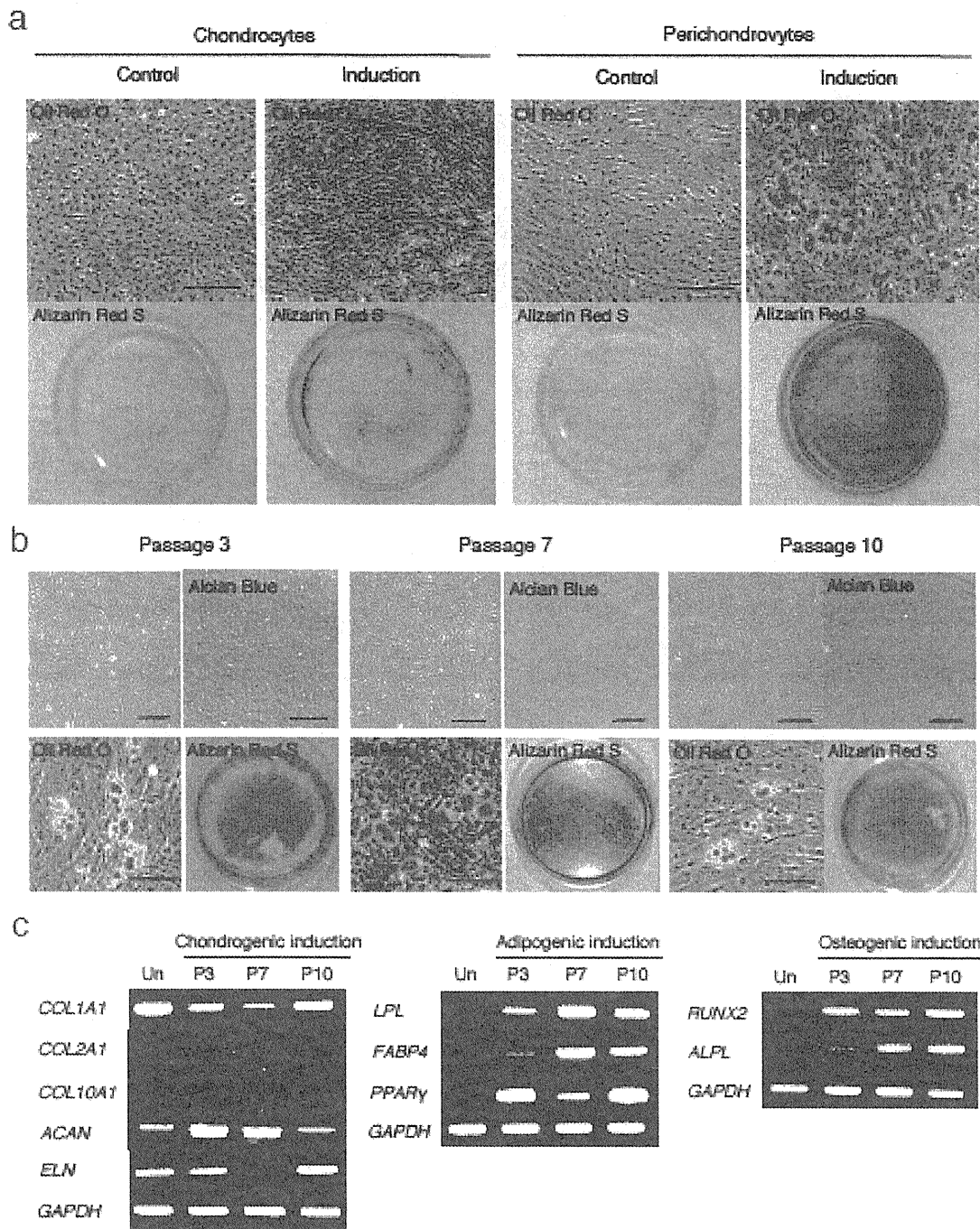
ーチの実現可能性を検討するため、ヒト軟骨膜細胞を軟骨分化誘導の後、粘性を帯びた培養上清とともに重症免疫不全マウスの皮下に移植した。尚、比較のためヒト軟骨細胞についても同様の手順で移植を行った。軟骨膜細胞は、移植3ヶ月目に軟骨様組織形成した (Fig.4a,i)。組織学的解析から、軟骨膜細胞は、軟骨細胞と同様に *in vivo*で成熟軟骨細胞へと分化し、その産生基質であるプロテオグリカンや弾性線維に富む弾性軟骨組織を再構築することが判明した (Fig.4b-g,j-o)。一方、免疫組織化学染色からは軟骨膜細胞より再構築された組織においてのみ、Col 2陽性弾性軟骨組織の周囲をType I collagen (Col 1)陽性の膜様組織が被覆していることが確認された (Fig.4h,p)。長期間に渡って再構築組織が維持されていることを示すため、軟骨膜細胞を移植後6ヶ月並びに10ヶ月目に摘出した組織においても同様の解析を行った。いずれの時点においても摘出組織はCol 1陽性膜様組織で被覆されており、成熟軟骨細胞とその産生基質から構成される弾性軟骨組織であることが判明した (。一方、腫瘍形成や、骨髄由来間葉系幹細胞で見られる様な線維性組織形成、血管侵入や石灰化沈着は全く観察されなかった。これらの結果から、軟骨膜細胞は *in vivo*で生体組織と同様に軟骨実質部、軟骨膜部からなる組織構造を持つ弾性軟骨組織を長期的に再構築することが判明した。



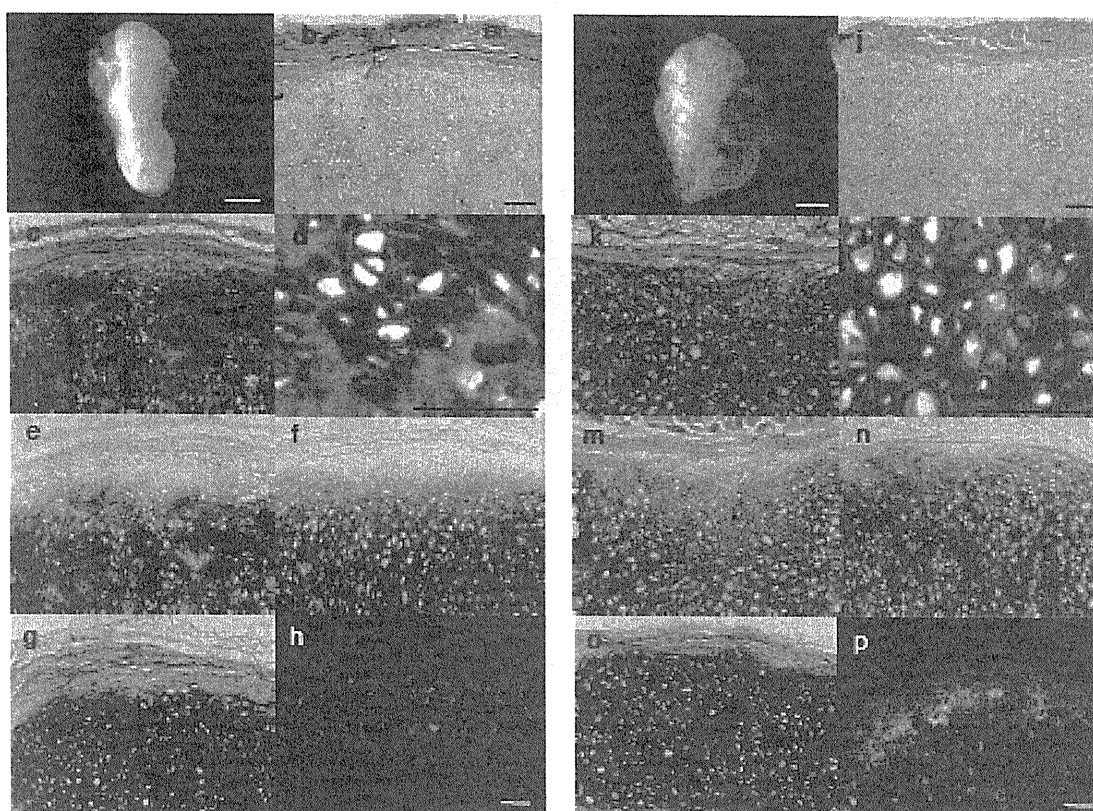
(Fig.1) High proliferative capacity of human perichondrocytes



(Fig.2) In vitro chondrogenic potential of human perichondrocytes.



(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幹/前駆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

幹/前駆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、Col 2, 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^{17,18}. 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幹/前駆細胞は、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/前駆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/前駆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³⁴. 我々は、本幹/前駆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/前駆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/前駆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/前駆細胞を分離し、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/前駆細胞と組

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、ヒト軟骨幹/前駆細胞を世界で初めて同定した。培養ヒト軟骨幹/前駆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/前駆細胞を用いて、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 なし

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
分担研究報告書

「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法の応用
- 「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
分担研究者 谷口英樹

研究要旨

われわれは、ヒト耳介軟骨膜に未分化な細胞が存在することを同定しており、軟骨膜細胞を臨床応用することを目標に様々な検証を行っている。この項では弾性軟骨である耳介軟骨膜細胞が、異種軟骨組織である関節軟骨を対象とした細胞移植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、犬の耳介軟骨膜から採取した細胞を関節軟骨欠損部位に自家移植することで硝子軟骨への分化と関節軟骨の再構築を検証した。その結果、軟骨様組織の再構築を確認し、その再構築組織中に弾性線維の消失を認めたことから硝子軟骨への分化が示唆された。同時に関節軟骨欠損症モデル犬における移植実験においては同時期に作製した対照群と比較して関節軟骨の再生が認められ、治癒効果が高いと考えられた。

A. 研究目的

病気や老化、激しい運動などにより関節軟骨の損傷が発生する。関節軟骨に損傷を受けると、軟骨組織は治癒能を有さないことから関節炎や変形性膝関節症などの二次変性疾患へと進行する。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2530万人いると試算もあり、治療対象となる患者数は相当数に及ぶだろう。従来の軟骨修復プロトコルは骨髄刺激法

(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。従来の軟骨修復プロトコルに反応しなかった患者に対し、自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation : ACI) などの細胞を用いた再生医療技術を実施する。

ACIは、症候性全層関節軟骨欠損や離弾性骨軟骨炎の症例で、優れた臨床結果が報告されている。一方で、ACIは自家関節軟骨細胞を正常組織から取得する必要があるなど、自家

関節軟骨細胞の採取時における過大な侵襲が解決課題とされている。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ることや、すでに進行した変形性膝関節症の患者から分離した細胞は軟骨分化能や増殖能が低下していることが指摘されている。そのため、本来治療対象であるはずの慢性炎症を有する患者における応用はさらなる検証の必要があるだろう。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。

最近、我々は耳介軟骨由来軟骨幹／前駆細胞(cartilage stem/progenitor cells : CSPCs)を発見した。CSPCs は、耳介軟骨組織で発見された組織由来幹／前駆細胞であり、顎顔面外傷などを対象とした弾性軟骨再生治療法の新規細胞ソースとして発見された。耳介軟

骨において、CSPCs は軟骨膜層に存在し、生後の形態維持に寄与していることが示唆されており、生理的な軟骨組織の維持に貢献している。また、CSPCs が、高い軟骨分化能を有することや、皮下移植により軟骨を再構築する能力を有することが明らかになっており、高いコロニー形成能および長期培養後の形態や増殖能に変化が認められないこともわかっている。以上のことから、CSPCs を用いた硝子軟骨再生治療法の開発により、これまで問題視されていた従来治療法の過大な侵襲を克服出来るばかりか、幹細胞を用いることによる様々な利点も期待出来る革新的な技術となりうる。しかし、CSPCs は耳介軟骨の前駆細胞であり、異種軟骨組織である硝子軟骨への分化能を有するかは明らかになっていない。

そこで、われわれは CSPCs が全層関節軟骨欠損の再構築能を有すること、硝子軟骨への分化能を有することを検証した。本研究では、関節軟骨への移植を行うことから、関節面が大きいイヌを実験動物として選択した。そのため、まずヒトと同様に、イヌ軟骨膜細胞中に増殖活性の高い細胞が含まれることを確認する。そして、移植後、弾性線維の有無により異種軟骨組織である硝子軟骨への分化を評価する。高い軟骨分化能を有し、疾患部の病態に関わらず一定の質の細胞を得ることが出来る CSPCs の関節軟骨再生療法への有用性を示す。

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: オリエンタル酵母), 5ヶ月齢の雄5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をした. 麻酔前処置 (ミダゾラム(0.3mg/kg, i.s.): 富士製薬を投与し, 鎮静を確認した後, 鎮痛薬としてレペタン(0.01mg/kg, i.v.): 大塚製薬を投与. 次いで麻酔の導入を行った. 麻酔導入薬は, プロポフォール(0.5mg~3.5mg/kg, i.v.): 丸石製薬にて行った. 麻酔深度が適正になったことを確認し, 麻酔は気管挿管を行った後, イソフルラン(0.1%~2%)により維持した. 術中は疼痛反応の確認のため, 心電図にモニタリングを行い, 術中の麻酔深度を適度に維持した. 術後の疼痛管理は, レペタン(0.01mg/kg, i.v.): 大塚製薬により行った.

術前及び術後管理として感染防止目

的で抗生物質[セファゾリン(10~30mg/kg)術後2日間の計3日間, 1日1回皮下注射する]を投与した. 術部は, 消毒薬 (イソジン, 明治製菓株) を1日1回, 術部表層の癒合を確認できるまで塗布した.

③軟骨膜組織の分離

全個体について, 外耳介を手術により採取し, 無菌的に皮膚を剥離する. 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 CSPCs 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 (Worthington)に懸濁・振蕩し, 基質を分解し細胞を分離した. その際, 軟骨膜組織と軟骨膜は2時間振蕩した. 各組織の細胞懸濁液は100 μ mのCell Strainer(BD Falcon)で濾過し, 遠心分離(1500 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)した. 上清を除去後, 血清(濃度や種類は検討条件による), 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 $^{\circ}$ 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 (BD FALCON)あるいは60 mm 細胞培養

ディッシュ(BD FALCON)に播種した。細胞は気相条件を 37°C, CO₂ 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/cm² 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. Colony Forming Unit Assay

コロニー形成能を調べるために, 細胞を 10 cells/cm² の濃度で 6 well plate (BD Falcon)に 3well ずつ播種した。2 週後, 単細胞から構成されたクローナルなコロニーをカウントした。カウントされた全てのコロニーは 100 細胞以上で構成されたコロニーである。

4. 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 2.5×10⁴ cells/cm² 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% 各種血清(種類は検討条件による), 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 5×10⁴ cells/cm² 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% 各種血清(種類は検討条件による), 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す、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、CO₂濃度5%に設定したインキュベーター内で行った。

5. ELISA

軟骨細胞およびCSPCsの単層培養下、積層化培養による軟骨分化誘導下培養3週間目の培養皿からPapain Extraction Reagent (Sigma-Aldrich product)を用い、細胞外に分泌されたproteoglycan/ glycosaminoglycanを回収するために、65°C 3時間反応させた。抽出されたproteoglycan/ glycosaminoglycanは、BLYSCAN assays (Biocolor Ltd., Belfast, North Ireland)キットを用いて定量測定を行った。

6. 関節軟骨の欠損作製とCSPCsの移植

1.□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4 mmのパンチにて作製した。移植後はボルヒール(秋田住友ベーク)を用いて移植部位を被覆した。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。実験動物の飼育は本学実験動物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。

分化させた細胞は、セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離し、1.5 mL tube (Eppendorf)に回収し、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、蟻酸により脱炭処理を行い、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5mmの厚さに薄切を行い、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脱パラフィン処理の後、蒸留水で洗浄した。Hematoxylin-Eosin(HE), safranin O (Saf-O), elastica van gieson (EVG)染色をそれぞれ実施した。

8. 免疫組織化学染色

7.で作製した薄切スライドを用いて、脱パラフィン作業を行った。抗原はクエン酸緩衝液(関東化学)に浸し、121°C、15分間熱処理により賦活化され、protein block serum free (Dako)により、1 hour、室温でブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体をそれぞれ抗ヒトコラーゲン type II マウスポリクローナル抗体(Millipore, 500倍希釈)、抗ヒトエラスチンマウスモノクローナル抗体(abcam, clone no. ba-4, 1:250)をprotein block serum free (Dako)にそ

れぞれの濃度で希釈し、2時間、4°Cで反応させた。ネガティブコントロールのスライドは、マウス IgG1 抗体 (Dako, 1:200) を使用した。一次抗体反応の後、0.01% tween TBS により、抗体を3回洗浄した。洗浄の後、二次抗体反応を行った。二次抗体には、Chemmate Envision HRP-polymer (Dako) を使用した。二次抗体を室温にて1時間反応させ、再度洗浄を行った。発色は、DAB+ solution (Dako) を用いた。核染色は Hematoxylin により行った。それぞれのサンプルは BIOREVO (BZ-9000, キーエンス) により観察した。

9. 弾性線維残存の定量

同一個体の耳介軟骨、関節軟骨、再構築軟骨の組織切片は elastica van gieson (EVG) により、各組織に含まれる弾性線維が黒く染色された。各スライドを BIOREVO (BZ-9000, キーエンス) を用いて画像を取得し、輝度100以下のピクセル数を抽出した。比較するサンプルスライドは、すべて同時に染色した。

C. 研究結果

1. 耳介軟骨と軟骨膜の分離と培養

外耳介を手術により採取し、無菌的に皮膚を剥離した (figure 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。それぞれが分離出来ていることを figure

1b,c に示した。

分離した軟骨膜細胞は線維芽細胞様の形態をしていた (figure 1e)。一方で軟骨細胞はそれと異なる形態を示していた (figure 1d)。

2. 高い増殖能とコロニー形成能を有する CSPCs

我々は、CSPCs が高い増殖能を有し、自己複製能を有することを確認した。それぞれ培養後1日目、培養7日目、培養14日後を示している。

イヌにおいてもヒトで分離した細胞と同様に高い増殖能を有する細胞が存在するかを明らかにするために、イヌ由来軟骨細胞と CSPCs 間で Colony forming unit assay (CFU-assay) を行い、検証を行った (figure 2a-c)。その結果、CSPCs の CFU は $9.22 (SD \pm 3.15)$ 、軟骨細胞は $3.11 (SD \pm 1.29)$ であり、CSPCs は高いコロニー形成能を有していることが示された (figure 2c)。

3. 移植2ヶ月後の肉眼所見、組織学的所見

軟骨再構築の肉眼所見ならびに、組織像を figure 3 に示した。肉眼所見においては、対照群 (figure 3a) で欠損が認められるのに対し、移植群 (figure 3b) では軟骨様組織の再構築が認められた。それぞれの HE 像を figure 3c,d に示した。対照群では、軟骨組織の欠損が認められ、移植群では再構築された軟骨様組織が確認された。さらに、Safranin O 染色により、再構築され