

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用」

研究分担者

赤澤智宏 東京医科歯科・大学院保健衛生学研究科 教授

研究要旨

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治療が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCsを得る際の組織採取の侵襲や、MSCsの *in vitro* における継代培養には限界があるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。本研究では、iPS細胞（iPSCs）を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。また、MSCs の移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を解析した。

様々な組織由来の iPSCs に対し、ペレット培養法による *in vitro* での軟骨分化誘導を行うことで、軟骨分化しやすい株の同定を行った。スクリーニングによって選別された iPSCs を Hanging drop 培養法で3日間培養して細胞集塊を作成し、軟骨欠損モデルラットに 1.7×10^6 cells を移植した。移植後4週でラット大腿骨を摘出し、Toluidine Blue および Safranin O で染色して軟骨分化を確認したところ、移植した MSCs とほぼ同様に iPSCs が軟骨細胞に分化したことが確認された。また、移植細胞より RNA を抽出して遺伝子の定量的解析により、Col2, Sox9 などの軟骨分化マーカーの発現が優位に上昇していることが確認された。

あらかじめ分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。

A. 研究目的

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治療

が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCs を得る際の組織採取の侵襲や、MSCs の *in vitro* における継代培養には限界が

あるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。

iPS 細胞 (iPSCs) は皮膚線維芽細胞などの体細胞に初期化因子 Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の遺伝子を導入することで樹立され、ES 細胞とほぼ同等の分化能を持った幹細胞である。iPSCs を用いて軟骨を再生することが可能となれば、侵襲性が低く、ほぼ無限に移植細胞を供給できる理想的な細胞になると考えられる。しかし、iPSCs の問題として、株間での性質の違いが指摘されている。特に分化誘導に対して抵抗性を示す iPSCs 株が残存し、移植先での腫瘍形成の原因となりうることが報告されている。iPSCs を移植する際は Nanog 遺伝子の発現を減衰させ、予め分化抵抗性の iPSCs を除去することが求められるが、iPSCs は株間の多様性が高いことから、適切な細胞株のスクリーニングが必要であると考えられる。

本研究では、iPSCs を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。予め分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。また、MSCs の移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を詳細に解析した。本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに

於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態に軟骨欠損部に 10 分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop 法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS 細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

B. 研究方法

マウス MSCs の分離・培養方法

8~12 週齢オスマウスの大腿骨・脛骨から 0.2% コラゲナーゼ処理によって骨髓細胞を抽出し、フローサイトメーター (FACS) で PDGFR (+)、Sca-1(+)、CD45(-)、Ter119(-) の MSCs を採取した。採取した細胞を 10cm ディッシュに播種し 37 5% CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。

マウス iPS 細胞の培養方法

iPSCs 培養時の Feeder として用いる SNL 細胞 (SNLCs) は、予めゼラチンコートした 10cm ディッシュに播種し、37 5% CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。Feeder として用いる前日に Mitomycin C (日本薬局方) で処理し、細胞増殖を阻害したものを Feeder として用いた。iPSCs は

37 5% CO₂ で培養し、毎日培地交換をした。本研究では A 株(MEF 由来 Nanog GFP/SOX10 DsRed-iPSCs)、B 株(MEF 由来 Nanog GFP-iPSCs)、C 株(MEF 由来 Oct GFP-iPSCs)の 3 株を用いた。

軟骨分化誘導と分化能力評価

MSCs の分化誘導の際は 3x10⁵ 個、iPSCs は 6x10⁵ 個を 15mL 遠沈管に回収し、軟骨分化誘導培地 1mL を加えて 200g で 4 分間遠心した。遠沈管を立てた状態で 37 5% CO₂ で 3 週間培養しペレットを作成した。培地交換は遠沈管内の培地の半量を吸い新しい培地を半量加え、3 日毎に行った。

軟骨組織欠損ラットへの細胞移植

Lewis ラットの膝関節部位を切開した後、膝蓋腱をずらして脱臼した。大腿骨内側顆の軟骨部位に電動ドリルで直径 1.8mm の穴をあけ、軟骨組織欠損を作成した。移植細胞がレシピエント組織に生着したことを可視化するため、移植細胞を予め赤色蛍光色素である Dil (Life Technologies) で染色した。移植の際、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作成した。Hanging drop 培養法では、MSCs 培地に 2.5x10⁵ cells/35μL の濃度の細胞懸濁液を作り、ディッシュの蓋に 35μL を滴下したものを 3 日間培養して細胞集塊を作成した。得られた細胞集塊をラットの一膝につき 4 つ移植した(1.0x10⁶ cells/knee)。

iPSCs では iPS 細胞滴(1.7x10⁶ cells/knee)を用いて細胞集塊を作成した。MSCs および iPSCs の細胞集塊を移植後、10 分間ラット膝の欠損部を上部にしたまま静置し細胞集塊を欠損部に安定させた後、膝蓋腱の位置を戻してから縫合した。

ラット大腿骨の摘出および組織染色

移植後 2 週あるいは 4 週のラット大腿骨を摘出し、凍結ブロックを作成した。12μm の厚さで薄切し、トルイジンブルーおよびサフランin 0 で染色した。また、移植した Dil(+) の局在は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS MVX10) で観察した。

C . 研究結果

軟骨分化に適した iPSCs のスクリーニング

iPSCs は株によって分化能が異なるという問題点があり、再生組織に応じた細胞株の選定が必要である。そこで本研究では、3 株の iPSCs (A 株, B 株, C 株) における *in vitro* での軟骨分化能を評価した。始めに、各 iPSCs をそれぞれ軟骨誘導培地にてペレット培養し、作製したペレットのパラフィン切片をトルイジンブルーとサフランin 0 で組織学的に評価した。その結果、軟骨ペレットの染色によって、A 株由来のペレットでは染色性が見られなかったが、B 株由来のペレットが MSCs ペレットと同様に軟骨様の染色が確認された。なお、C

株由来の細胞はペレットを形成せず染色像が得られなかった(図 1A)。

次に、各ペレットの RNA を回収し未分化マーカー-Nanog と軟骨分化マーカー-Col2a1・Aggrecan・Sox9 の発現量を解析した。軟骨分化誘導法が既に確立されている MSCs を陽性対象として比較した。B 株の iPSCs は軟骨分化誘導によって Nanog が減衰し、Col2a1 の発現が増加することが確認された(図 1B)。以上の結果から、3 株の中で B 株が軟骨分化能が高く、移植後の腫瘍化の可能性が低い iPSCs であることが示唆された。

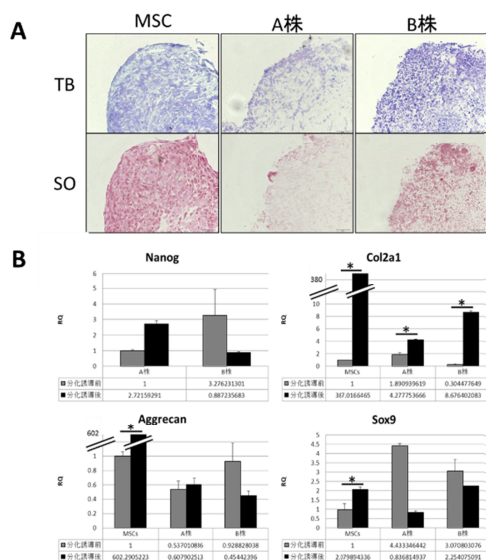


図 1 MSCs ペレットと各 iPSCs ペレットの染色像および定量的 RT-PCR A) マウス MSCs 及びペレット形成をした A 株 B 株のマウス iPSCs ペレットを、トルイジンブルー (TB) とサフラニン O (SO) で染色した。B) A 株・B 株の Nanog 発現量と、各軟骨分化マーカー発現量を比較した。(*P<0.05)

Hanging drop 培養による Nanog 発現量の解析

ラット組織への細胞移植の際には、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防

ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作製・移植を行った(図 2A)。iPSCs を予め軟骨誘導培地にて Hanging drop 培養を行い、その際の Nanog の発現解析を経時的に行った。使用した iPSC 細胞は前述のスクリーニングで選出した B 株の iPSC 細胞を用いた。Hanging drop 前後における Nanog の発現を定量的 PCR によって解析した結果、Hanging drop 培養前の Nanog の発現量に対して Hanging drop 培養 1 日以降で Nanog 発現量が減少する傾向がみられた。これらの結果から、Hanging drop 培養法を用いることで腫瘍化の原因になりうる Nanog 遺伝子の発現を低下させる事が確認された(図 2B)。

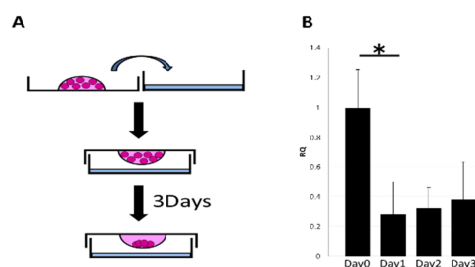


図 2 Hanging Drop 培養法による Nanog 発現の低下 A) Hanging drop 培養法, B) B 株 iPSC 細胞の未分化維持培養時・Hanging Drop 培養 1 日・2 日・3 日それぞれの Nanog 発現量を比較した。(*P<0.05)

MSCs を用いた軟骨組織再生

マウス骨髄より純化した MSCs を用いて、ラット軟骨組織の再生が可能かどうかを確認した。ラット軟骨欠損部に移植した Dil(+)-MSCs は、移植後 2 週および 4 週で生体内での生着が確認された。さらに、細胞移植を行わなかったモデルと比較して軟骨再生能力が高く、移植後 4 週では軟骨

細胞様の染色像が確認された(図3)。これらの実験により、マウス細胞をラット軟骨欠損部に移植する系を確立し、MSCsの軟骨再生への関与を直接的に解析することが可能となった。

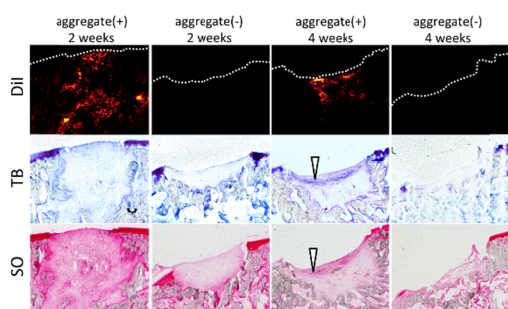


図3 マウス MSCs を軟骨欠損モデルラットに移植

移植後2週および4週のラット軟骨欠損部をトルイジンブルー・サフラニンOで染色した。軟骨様細胞(矢尻)

iPSCs を用いた軟骨組織再生

マウス iPSCs を用いた軟骨組織の再生能力を調べるため、ラット軟骨欠損モデルに対し、マウス iPSCs の移植を試みた。マウス MSCs の移植結果から、移植後4週で軟骨細胞様の分化が確認されたため、iPSCs の移植に関しても移植後4週の観察を行った。移植後4週の関節を取り出し、組織切片を作製して解析した結果、移植細胞全体が軟骨細胞様の染色像を示した(図4A)。また、移植組織から細胞を回収し、遺伝子発現解析を行った結果、未分化状態のB株よりもNanogの発現は減少し、軟骨分化マーカーの発現が上昇していることが確認された(図4B)。以上の結果から、iPSCs を移植することで *in vivo* において

軟骨分化が進み、軟骨再生を促していることが示唆された。

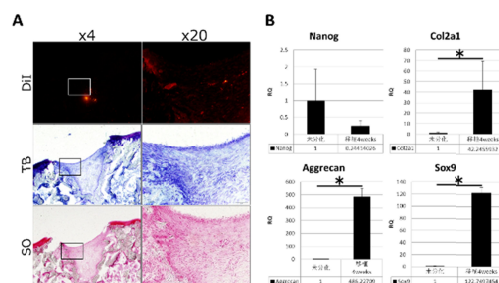


図4 移植マウス iPSCs(B株)の染色像および定量的 RT-PCR
移植後4週のラット軟骨欠損部をトルイジンブルー・サフラニンOで染色した。移植細胞を採取し、定量的 RT-PCR で各マーカーの解析をした。
(*P<0.05)

D. 考察

研究では、MSCs で既に確立されている軟骨移植技術を iPSCs に応用し、軟骨再生を試みた。iPSCs による組織再生は、未分化状態の iPSCs の残存が腫瘍化の原因とされており、さらに iPSCs の株ごとに分化能が異なることが実用化に向けた障壁となっていた。これらの問題をクリアするために、本研究では軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング方法を開発し、予め細胞集塊を形成する過程で Nanog 遺伝子を低下させ、安全で効果的な iPSCs 移植治療の可能性を示した。スクリーニングで用いたペレット培養法は、*in vivo* における軟骨分化を *in vitro* で疑似化したものであり、iPSCs 株のスクリーニングとして有用であると期待される。また、移植前に細胞集塊を形成する際、未分化 iPSCs を軟骨分化誘導培地で3日間培養したが、よ

り長期間分化誘導をかけた iPSCs を用いれば、*in vivo*での更なる軟骨分化誘導が期待できると考えられる。

本研究では、移植直前に予め軟骨分化誘導培地での培養をした後に欠損部への移植を行ったため、細胞が分化もしくは形質転換し、腫瘍が形成されなかった可能性も考えられる。過去の報告で、MSCs が産生される TGF- β が免疫寛容に寄与していることが報告されているが、軟骨欠損モデルラットへのマウス MSCs およびマウス iPSCs の移植が可能だった理由として、移植細胞が産生する TGF- β が関与しているかもしれない。

今後は、SCID マウスを用いて免疫拒絶の影響を最低限にし、軟骨再生能をより長期に解析することが期待される。患者自己 MSCs による軟骨再生治療はすでに臨床で行われているのに対し、iPSCs による軟骨再生は未だに基礎研究の段階である。本研究により、より安全な軟骨移植治療の実現化に向けた技術開発が発展することを期待する。

E. 結論

本研究では、軟骨欠損モデルラットにマウスの MSCs および iPSCs を移植し、軟骨細胞様の分化を確認することに成功した。*in vitro* と *in vivo* での軟骨分化誘導能力には相関があり、この知見を利用した安全な軟骨再生治療の実現が可能になると

考えられる。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

学会発表

国内学会発表

須藤絵里子、馬淵洋、小柳明日香、大関信武、宗田大、関矢一郎、

赤澤智宏：

マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の有効性の検討

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

馬淵洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、宗田大、関矢一郎、**赤澤智宏：**

組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析

2014.3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し