

令和元年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01396

研究課題名(和文) iPS細胞由来軟骨細胞および生体由来軟骨細胞の特性比較

研究課題名(英文) Comparative evaluation of human tissue-derived chondrocyte sheets and allogeneic chondrocyte sheets fabricated from a novel cell source, iPS cell-derived cartilaginous tissue

研究代表者

豊田 恵利子 (TOYODA, Eriko)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：90749269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自家軟骨細胞シート移植による関節治療法は、硝子軟骨による軟骨損傷の修復と安全性が確認され、優れた治療法であることが示されている。本研究は、iPS細胞から誘導した硝子軟骨様組織を自家軟骨の代わりに用いて同種軟骨細胞シート移植に応用することを目的とした。臨床用 iPS細胞由来の軟骨様組織から細胞シートを作製し、現在臨床研究中の生体軟骨由来細胞シートの特性および機能と比較し、類似した特性を示すことを確認した。さらにウサギ軟骨全層欠損モデルに異種同所性移植し軟骨修復効果を解析した結果、iPS細胞由来細胞シートの効果は生体軟骨由来の細胞シートに現状では劣っており、細胞シート作製方法の改良を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨損傷・変性をもたらす運動器障害の克服は高齢化社会において重要な課題であり、軟骨再生が可能な細胞シート治療への期待が高まっている。軟骨の細胞シート治療では同種組織の利用が可能であると考えられるが、質の良い同種細胞原料の確保が大きな課題となっていた。本研究では、同種細胞シートの原料として理論的には無限に作製できるiPS細胞由来の軟骨様組織を用いることが可能かどうかを明らかにするため、現在用いられている軟骨細胞シートと比較を行った結果、原料としての応用が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the safety and efficacy of autologous chondrocyte sheets in humans; now we are performing a clinical study using allogeneic chondrocyte sheets(PD sheets) derived from the surgical remains of polydactyly surgery. However, our research has revealed the difficulty in establishing a cell stock from the limited number of polydactyly donors as well as fluctuations in efficacy stemming from donor differences. To address such issues, we evaluated chondrocyte sheets fabricated from a novel cell source, hyaline cartilaginous tissue derived from human iPS cells. Further, we compared the in vivo efficacy of iPS cell-derived chondrocyte sheets (iPSC sheets) and human tissue-derived chondrocyte sheets. Sheets were transplanted to osteochondral defects created in rabbits immunosuppressed with tacrolimus. iPSC sheet transplantation showed no significant efficacy in vivo and may be inferior to PD sheet transplantation. Improvements to the fabrication method of iPSC sheets may be necessary.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞シート iPS細胞 軟骨再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで変形性膝関節症を含む軟骨損傷の治療方法として、軟骨細胞シートを患部に移植し被覆することにより、軟骨を修復・再生させる方法を樹立し実績をあげてきた。既に自家移植で8名の患者に臨床研究を実施し、安全性と有効性を確認している。

(2) 軟骨の再生医療の実施では軟骨細胞の入手量に制約があるため、少量の細胞でも変形性膝関節症のような広範な軟骨損傷にも対応可能な点が細胞シートの大きな利点であり、臨床研究では変形性膝関節症に対しても適応が認められた。

(3) 臨床研究で細胞原料としていた自家成人膝軟骨細胞は、体外で増殖させることが難しくオーダーメイド医療となるため、多くの患者を治療するためには同種軟骨細胞ソースの開発が必要である。そこで現在は、多指症手術時廃棄組織から得られる軟骨細胞を本治療法の細胞原料として用いる研究を実施している。多指症由来軟骨細胞は、通常3歳未満の若年ドナーから得られることから、優れた増殖能と同所性異種移植モデルにおける軟骨修復作用を示し、同種細胞シート原料として使用できることが示されている。しかし一人のドナーから得られる軟骨細胞数は有限であるため、その安定供給がドナー数に依存する点やドナーごとの有効性の違いなどが課題となっている。

(4) 2015年にiPS細胞から軟骨様組織を誘導する方法が京都大学iPS細胞研究所(CiRA)より報告され、iPS細胞由来軟骨様組織を動物モデルで軟骨欠損部に移植することで軟骨損傷が修復できることが報告された(Yamashita *et al.* Stem Cell Reports, 2015)。CiRAで作製されたiPS細胞由来軟骨様組織(iPS-Cart)は生体由来の軟骨とほぼ等しい細胞特性を示しており、生体由来の軟骨の代わりに軟骨細胞シートの原料として使用できる可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究ではiPS-Cart由来軟骨細胞と生体由来の軟骨細胞を機能性、安全性において比較し、細胞シートによる軟骨再生医療への応用の可否を検討する。軟骨細胞は存在する部位や発生・成長の時期により、軟骨前駆細胞、増殖軟骨細胞、静止期軟骨細胞、肥大軟骨細胞など、分化ステージの異なる細胞が存在し得るが、iPS-Cartから調整された細胞がどのような軟骨細胞に相当するかは明らかではない。iPS-Cartを細胞ソースとして応用することを考えた場合は、これまでに用いられてきた生体由来の軟骨細胞とその特性および機能の同等性が確認されることが重要である。

(2) 我々はこれまでに生体から調整した軟骨細胞(成人膝軟骨細胞、多指症由来軟骨細胞)およびこれらから作製した軟骨細胞シートの特性解析(増殖性、脱分化、遺伝子発現、マーカー発現、産生因子、免疫修飾能等)疾患動物モデルでの軟骨修復・再生促進作用を明らかにしてきており、iPS-Cart由来軟骨細胞とこれらの生体由来軟骨細胞の特性を比較し、同等性および差異を明らかにすることで、iPS-Cartの細胞シート原料としての適性を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS-Cart由来細胞の特性解析

iPS細胞からの軟骨様組織の作製を京都大学iPS細胞研究所(CiRA)が行い、保温状態で東海大学へ輸送後、これまで膝関節軟骨組織や、多指症由来軟骨組織から軟骨細胞を調整したのと同様の方法で、酵素的に分散し細胞を凍結保存する。iPS-Cart由来軟骨細胞の増殖能、脱分化、各種軟骨マーカー発現等を解析し、これまでに得られた成人膝軟骨細胞、多指症由来軟骨細胞の特性と比較することにより、生体由来軟骨細胞との同等性および差異を明らかにする。

#### (2) iPS-Cart由来軟骨細胞シートの特性解析

各継代数におけるiPS-Cart由来軟骨細胞から、温度応答性インサートを用いて細胞シートを作製し、組織学的解析、遺伝子発現解析、細胞表面マーカーの発現、産生因子等を解析し、成人膝軟骨細胞シートおよび多指症由来軟骨細胞シートの特性と比較する。iPS-Cart由来軟骨細胞の特性がどちらの生体由来軟骨細胞に近いのかどうか明らかにする。また、軟骨再生修復に寄与する特性を有するかどうかを明らかにする。

#### (3) iPS-Cart由来軟骨細胞シートの軟骨損傷修復作用のin vivo評価

家兔膝軟骨全層欠損モデルは、ウサギ同種軟骨細胞シートの有効性を評価してきたモデルであり、現在は、免疫抑制剤投与下で異種であるヒトの膝軟骨細胞シート、多指症由来軟骨細胞シートの軟骨再生・修復能を評価することが可能となっている。治療効果が確認できれば、iPS-Cart由来細胞の細胞シート用細胞ソースとしての適性が明らかとなることから、iPS-Cart由来細胞シートが、成人膝軟骨細胞シートと同様に軟骨損傷治療効果を示すかどうか明らかにする。iPS-Cart由来細胞シートを、免疫抑制剤投与下で家兔軟骨全層欠損モデル(直径5mm、深さ3mmの自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を作製する)に移植し、軟骨損傷修復作用を確

認する。有効性の評価としては、患肢重量配分比の推移、ICRS grading system による組織学的評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) iPS-Cart を酵素分散し調製した細胞は活発な増殖能を示し、温度応答性培養皿で培養することにより、成人膝軟骨細胞および多指症由来軟骨細胞と同様に剥離可能な細胞シートを形成した。組織染色の結果、多指症由来軟骨細胞シートと同様に重層化した構造を示した。サフラニン0とII型コラーゲンの染色は認めず、アグリカン、フィブロネクチン、I型コラーゲンでの染色を認め、これらの特性は成人膝軟骨細胞シート、多指症由来軟骨細胞シートと同様であった。細胞シート1枚あたりの細胞数は $2.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 個であり、成人膝軟骨細胞シートおよび多指症由来軟骨細胞シートとほぼ同等であった。

(2) 成人膝軟骨細胞シートおよび多指症由来軟骨細胞シートは、TGF- $\beta$ 1、MIAなど軟骨栄養因子を分泌することを報告している。4ロットのiPS-Cart由来細胞シートの産生量を解析した結果、TGF- $\beta$ 1の産生量はほぼ同等であったが、軟骨マーカーであるmelanoma inhibitory activity(MIA)の産生量が劣る傾向を示した。

(3) iPS-Cart由来細胞シートを分散しFACS解析を行ったところ、CD44/CD81/CD90/CD105陽性、CD31/CD45陰性であり、これらのマーカーの発現は成人膝軟骨細胞シートおよび多指症由来軟骨細胞シートと同様であった。

(4) iPS-Cart由来細胞シートにおけるアグリカン、タイプIIコラーゲン、SOX9の発現は、iPS-Cartと比べ減少しており、細胞シート作製過程の平面培養による脱分化は成人膝軟骨組織と同様に認められた。また、iPS-Cart由来細胞シートのSOX9、インテグリン-10の発現は成人膝軟骨細胞シートより減少し、タイプIコラーゲンの発現が高くなっており、脱分化がより進行している可能性が示唆された。成人膝軟骨細胞シートは生体内に移植後硝子軟骨様組織を形成することを動物実験で確認していることから(Takahashi *et al*, JTERM 2018)、細胞シートの段階での脱分化形質は必ずしも有効性の低下を意味しないことから、動物モデルにおける有効性評価を行った。

(5) 将来的に臨床応用可能なHLAホモ接合体ドナー由来iPSC細胞1231A3株由来iPS-Cartの使用が可能となったことから、これまでに確立した方法により改めて1231A3株由来iPS-Cartから細胞シートを作製し、同様の特性を示すことを確認した。さらに家兎膝軟骨全層欠損モデルへの同所性異種移植により有効性評価を行った。比較対照として多指症由来軟骨細胞シートを用い、同時に評価を行った。組織学的評価の結果、多指症由来軟骨細胞シートでは、非治療群に対して有意なスコアの改善を認めたと、iPS-Cart由来軟骨細胞シート移植群では改善が認められず、修復組織はI型コラーゲンの染色性のみ確認され、硝子軟骨での修復が得られていなかった。

(7) 現状の方法で作製したiPS-Cart由来細胞シートは、異種同所性移植モデル評価の結果軟骨再生効果が多指症由来細胞シートに劣ることが示された。生体由来軟骨細胞シートより、平面培養中の脱分化が急速に進む可能性が示唆され、iPS-Cart由来細胞シート作製方法の改良が必要であった。現在培養方法の改良を進めている。

#### <引用文献>

- Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, Matsuda S, Tsumaki N, Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015; 10;4(3):404-18.
- Takahashi T, Sato M, Toyoda E, Maehara M, Takizawa D, Maruki H, Tominaga A, Okada E, Okazaki K, Watanabe M, Rabbit xenogeneic transplantation model for evaluating human chondrocyte sheets used in articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12(10):2067-2076.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

- 高橋匠、佐藤正人、豊田恵利子、前原美樹、和才志帆、森岡美帆、山下晃弘、妻木範行、渡辺雅彦 同種軟骨細胞シートの新規細胞ソースiPS細胞由来軟骨様組織での検討 第32回日本軟骨代謝学会 2019
- 高橋匠、佐藤正人、豊田恵利子、前原美樹、森岡美帆、山下晃弘、妻木範行、渡辺雅彦 ヒ

ト iPS 細胞由来軟骨様組織から作製した軟骨細胞シートの特性評価 第 30 回日本軟骨代  
謝学会 2017  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 正人

ローマ字氏名：SATO, Masato

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10056335

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：妻木 範行

ローマ字氏名：TSUMAKI, Noriyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。