

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07297

研究課題名(和文)軟骨細胞シートの軟骨再生機序を基盤とする軟骨損傷治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for cartilage defects based on molecular mechanisms of hyaline cartilage regeneration promoted by chondrocyte sheets.

研究代表者

豊田 恵利子 (TOYODA, Eriko)

東海大学・医学部・特任准教授

研究者番号：90749269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞シート移植による関節治療は、通常自然修復しない硝子軟骨の再生が確認された画期的な治療法である。硝子軟骨の修復・再生には軟骨細胞シートから分泌される因子が寄与していると考えられており、軟骨細胞シートが産生する因子の網羅的な解析から、軟骨再生効果と産生量が相関する4つの因子を同定した。これらの因子には軟骨損傷治療薬としての可能性があることから、本研究では、各因子の硝子軟骨再生効果における機能を明らかにするため、軟骨分化に対する作用および平面培養時の細胞機能に対する作用を解析し、これらの因子がそれぞれ異なる方向に軟骨細胞分化を修飾することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨が損傷し痛みを生じる変形性膝関節症の罹患率は高く、高齢者の健康寿命を縮める要因となっており、低侵襲の治療法開発が喫緊の課題である。しかし、変形性膝関節症をはじめとする軟骨損傷に対する修復効果が実証され、臨床応用された薬剤はない。

細胞シートによる関節軟骨再生では、硝子軟骨による再生が得られており、この作用機序を模倣し硝子軟骨再生に関わる因子を薬剤として応用することで変形性膝関節症の軟骨欠損に対しても有効な新規治療法につながる可能性がある。本研究は、同定された硝子軟骨再生にかかわる因子の作用機序を応用した軟骨再生促進薬の開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Chondrocytes obtained from juvenile polydactyly patients (PD cells) are a promising allogeneic cell source for cartilage regeneration. PD sheets, that fabricated from PD cells, have demonstrated hyaline cartilage regeneration in rat and rabbit xenogeneic osteochondral defect model and patients with osteoarthritis in clinical trial. So far, protein factors secreted from PD sheets are thought to contribute to the hyaline cartilage regeneration. We had identified some proteins that their amount of secretion correlated with the efficacy of PD sheets. To clarify the function of these factors in the hyaline cartilage regeneration, we analyzed mode of action of 4 protein factors on chondrogenic differentiation of PD cells and effect on cell properties during PD sheet fabrication.

Our results suggests that factor A can promoted chondrogenic redifferentiation, support the proliferation of PD cells and be involved in the maintenance of chondrogenic potential during fabrication of PD sheets.

研究分野：運動器疾患の再生医療および軟骨損傷治療薬の開発

キーワード：再生医療 細胞シート工学 硝子軟骨 軟骨分化

1. 研究開始当初の背景

軟骨は無血管組織であり、他の組織と異なり一度損傷すると自然に再生することはほとんどない。関節軟骨の再生効果を狙った化合物や軟骨栄養因子の軟骨損傷治療薬としての応用が盛んに研究されているが、これまでのところ軟骨再生効果が実証された薬剤はない。このため、変形性膝関節症や外傷性軟骨損傷に対する根本的な治癒が可能な治療法として、再生医療による軟骨再生に期待が寄せられている。

これまでに、他家細胞から作製した細胞シートの臨床応用を目指し、多指症患者手術時廃棄組織由来軟骨細胞から作製した細胞シート (PD シート) の異種同所性移植モデルにおける硝子軟骨修復効果を確認した (Toyoda et al., IJMS, 2020)。PD シートの臨床研究は、第 1 種再生医療等提供計画の承認をうけ、患者への移植が進められている。

これまでの研究から、軟骨細胞シート移植による硝子軟骨での修復・再生においては、細胞シートから分泌される液性因子を介した作用が重要であることが示唆されていた。そこで、細胞シートの軟骨再生促進作用にかかわる因子を同定することを目的として、異種同所性移植モデルにおいて高い軟骨修復効果を示した細胞シートと効果が低かった細胞シートの分泌因子を 1000 種類以上のタンパク質の相対量を測定可能な人工核酸アプタマー技術 SOMAmer® を用いて網羅的に解析し、軟骨修復・再生作用が高い細胞シートが特徴的に分泌している因子 (有効性相関因子) を複数同定した (図 1)。これらの因子のエンリッチメント解析を行った結果、血管新生や Skeletal system development に関与する因子が多く、硝子軟骨再生促進作用への寄与が想定される因子が抽出されていることを確認している。一方で、これらの因子の中には軟骨関連の報告がほとんどない因子も含まれており、その作用機序や硝子軟骨再生促進作用への寄与の確認には至っていない。

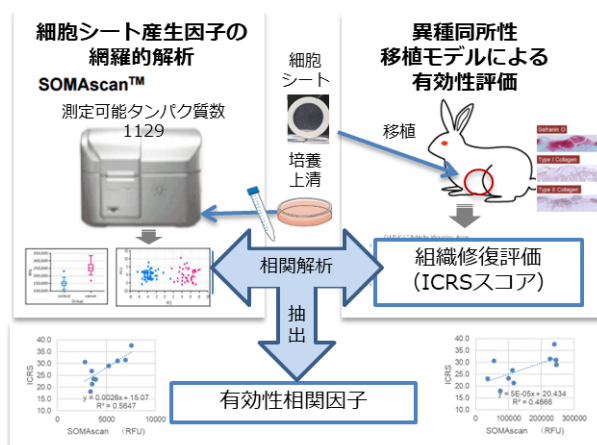


図1 細胞シートの有効性相関因子の同定

2. 研究の目的

軟骨細胞シート移植による関節治療は、通常自然には修復することのない軟骨の硝子軟骨での再生が確認された画期的な治療法である。軟骨細胞シートによる硝子軟骨の修復・再生には細胞シートが分泌する因子が寄与すると考えられ、軟骨損傷治療薬としての可能性があることから、硝子軟骨再生促進作用と産生量に相関がみられる液性因子の解析を行ってきた。本研究では、有効性相関因子の軟骨組織における機能を解析することにより、細胞シートの硝子軟骨再生促進作用に寄与する因子とその作用機序を明らかにし、細胞シートの作用機序を模した関節軟骨修復促進薬の開発につなげることを目的とする。

細胞シートの有効性相関因子として同定された因子 (図 1) の中から軟骨における機能未知な因子について、硝子軟骨再生促進作用に寄与する因子 (軟骨再生因子) であるかを明らかにする。具体的には、①有効性相関因子過剰発現細胞シートの解析により、有効性への関与を明らかにする。②有効性相関因子の軟骨特異的ノックアウトマウスを作製し、骨格系の発生や OA 誘発に対する感受性を解析する。③軟骨損傷モデルに有効性相関因子の関節内投与を行い、軟骨修復効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 有効性相関因子の細胞シート産生量の確認

細胞シートの有効性因子の産生量を ELISA により解析した。

(2) 有効性相関因子の再生軟骨組織での発現確認

PD シートの同所性異種移植モデルにおいて再生した硝子軟骨組織とその周辺における有効性相関因子の局在及び発現を免疫染色等により解析した。

(3) 有効性相関因子の軟骨分化能に対する作用の解析

軟骨分化に対する作用を解析するため、初代軟骨細胞のペレット培養による軟骨分化誘導を行った。遺伝子導入および導入細胞の選択が困難であったため、組み替えタンパク質を外部から添加することにより、各因子の軟骨分化に対する作用を解析した。軟骨分化は、凍結切片の組織学的評価 (サフラニン O 染色、トルイジンブルー染色、HE 染色)、軟骨マーカー遺伝子の発現解析 (RT-PCR) により解析した。

(4) 有効性相関因子のノックダウンの軟骨分化能に対する作用

軟骨細胞シートにおいて、RNA 干渉法により有効性関連因子をノックダウンし、軟骨分化に対する作用を解析した。軟骨分化の解析は組織学的解析および遺伝子発現解析により行った。

4. 研究成果

(1) 有効性相関因子の産生量の確認

PD シートの有効性相関因子として遺伝子発現および産生量の双方で正の相関が認められた 8 つ因子のうち、液性因子である 4 つの因子 (A, B, C, D) について ELISA により細胞シートの培養上清中への産生が確認された。

(2) 有効性相関因子の修復組織における局在の解析

ラット異種同所性移植モデルにおいて、膝関節に作製した軟骨全層欠損部に細胞シートを移植し、形成された硝子軟骨において、これらの因子の局在を免疫組織化学染色により解析した。軟骨発生に関係する因子 (A, B, C) は、ラットの軟骨、ラットの成長板および修復組織の軟骨細胞において発現が認められ、細胞外マトリクスにも分布が認められた。軟骨における機能未知の因子 D についても、硝子軟骨組織中の軟骨細胞において発現が確認された。

(3) 有効性相関因子の軟骨分化能に対する作用の解析

異種同所性移植モデルにおける細胞シート移植による硝子軟骨再生において、細胞シート移植後 4 週では、硝子軟骨が移植された細胞シートに由来していることが確認されている。そこで、有効性関連因子が、細胞シートの軟骨再分化を促進するか解析した。脱分化した軟骨細胞に軟骨分化誘導刺激を加え、有効性相関因子の発現変動の解析を行った。その結果、有効性相関因子のうち、A, B, D の 3 つの因子は再分化により発現が減少、C は増加しており、移植前の細胞シートの状態と関節内における軟骨再分化時でその産生量に変化していた。

有効性相関因子が細胞シートの軟骨再分化においてオートクラインに作用し、軟骨分化を促進するか確認するため、ペレット培養により軟骨分化誘導を行い、各因子を添加し、軟骨分化に対する作用を解析した。その結果、検討した 4 つの因子のうち、B は BMP により誘導される軟骨分化を抑制した (図 2)。A および C の 2 つの因子が軟骨分化誘導培地により誘導される軟骨分化を促進した (図 3)。これらの因子は、関節内における細胞シートの軟骨再分化時に局所における軟骨アナボリック因子として作用している可能性が示唆された。

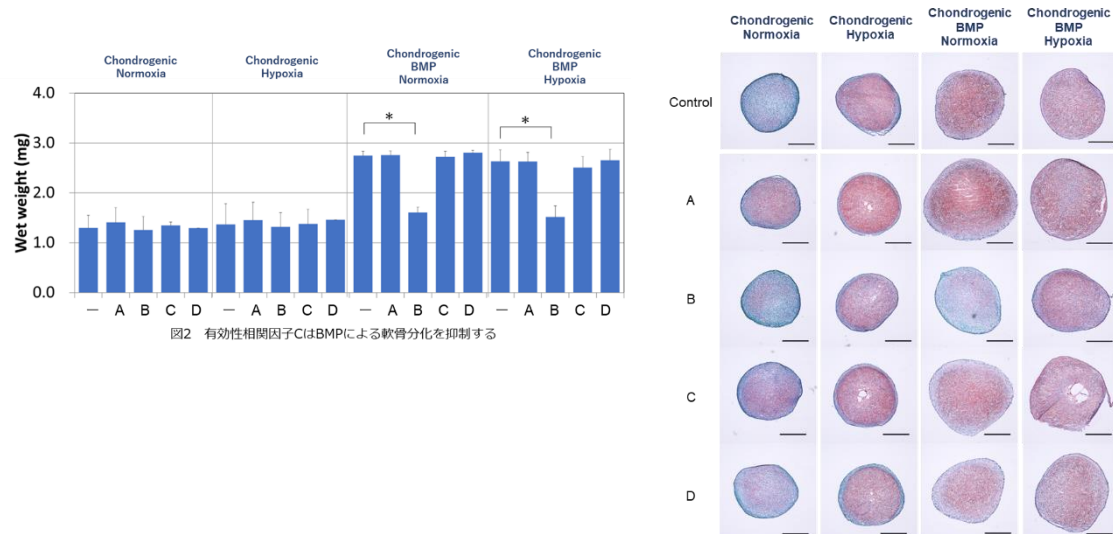


図2 有効性相関因子CはBMPによる軟骨分化を抑制する

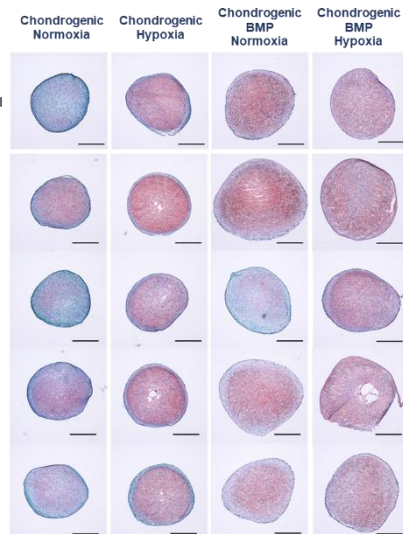


図3 有効性相関因子A,Bは軟骨分化を促進する

(4) 有効性相関因子のノックダウンの軟骨分化能に対する作用

研究申請時には、軟骨再生に寄与する因子を同定後、関節発生や関節疾患における機能の解析を目的として、ノックアウトマウスの作製を計画していたが、軟骨修復促進作用が示唆された 2 つの因子は、いずれも全身性遺伝子ノックアウトマウスの解析がすでに行われており、組織発生における変化や関節炎への感受性については既報があることから、ノックアウトマウスの作製については中止し、細胞シートにおける有効性関連因子の発現が、細胞シートの軟骨分化能に与える影響を RNA 干渉法により解析した。A および C の 2 つの遺伝子のノックダウンを行った結果、両因子のノックダウンにより PD 細胞の増殖が抑制された。さらに、細胞シートから分散した細胞を軟骨分化誘導したところ、A をノックダウンした細胞では、軟骨マーカー遺伝子の発現が抑制され、軟骨分化能が低下した。軟骨細胞は平面培養により脱分化することが知られており、本因子は、脱分化の抑制に関与することで、有効性と相関した可能性が示唆された。これらの結果から、有効性相関因子 A は、細胞シートの増殖促進、脱分化の抑制、軟骨損傷部への移植後は軟骨再分化の促進により、有効性に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toyoda Eriko, Maehara Miki, Watanabe Masahiko, Sato Masato	4. 巻 22
2. 論文標題 Candidates for Intra-Articular Administration Therapeutics and Therapies of Osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3594ー
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hamahashi Kosuke, Toyoda E, Ishihara M, Mitani G, Takagaki T, Kaneshiro N, Maehara M, Takahashi T, Okada E, Watanabe A, Nakamura Y, Matoba R, Takagi T, Akutsu H, Umezawa A, Kobayashi H, Akamatsu T, Yamato M, Okano T, Watanabe M, Sato M	4. 巻 7
2. 論文標題 Polydactyly-derived allogeneic chondrocyte cell-sheet transplantation with high tibial osteotomy as regenerative therapy for knee osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1ー
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-022-00272-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 多指症由来軟骨細胞シートが産生する有効性関連因子の軟骨分化誘導における発現調節
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 同種細胞シートの原料細胞評価指標としての遺伝子発現解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 同種細胞シート移植による硝子軟骨組織再生に寄与する分子機序の解明
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 同種細胞シートの有効性予測指標の探索
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 同種細胞シートの有効性関連因子の軟骨分化における機能解析
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊田恵利子
2. 発表標題 同種細胞シート有効性関連因子のオートクライン作用の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 軟骨細胞シートのマーカー遺伝子探索方法及び軟骨細胞シートのマーカー遺伝子探索装置、並びに軟骨細胞シートの評価方法及び軟骨細胞シートの評価装置、並びに軟骨細胞シート、軟骨細胞シートの製造方法	発明者 佐藤 正人, 豊田恵利子, 的場 亮, 野中謙, 飯島 寛	権利者 学校法人東海大学・株式会社DNAチップ研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-202431	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/

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
研究分担者	佐藤 正人 (Sato Masato) (10056335)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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
---------	---------