

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20991

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来軟骨前駆細胞による新規骨欠損治療法の開発

研究課題名(英文) Treatment of bone defects using cartilaginous particles produced from human-induced pluripotent stem (iPS) cell derived expandable limb bud mesenchymal cells

研究代表者

依光 正則 (Yorimitsu, Masanori)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：70907930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究協力者である宝田剛志教授は以前、ヒトiPS細胞から、Paired related homeobox 1 (PRRX1)を高発現し、高い軟骨分化能を有し、拡大培養可能な肢芽様間葉系細胞を製造するプロトコルを開発している。SCIDラットの骨欠損モデルを作成し、この肢芽様間葉系細胞から作成した硝子軟骨様組織体を充填し経時的な画像評価と採取した骨の組織学的評価を行ったところ、骨形成が進行おり内軟骨性骨化と自家骨への置換が生じていた。また、BMPとTGF $\beta$ を多量に含む培地で作成した肢芽様間葉系細胞由来の硝子軟骨様組織体はより骨形成を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開放骨折などの外傷や、骨腫瘍・骨髄炎に対する治療としての切除により、大腿骨などの長管骨の骨欠損がしばしば発生する。骨欠損に対する治療としていくつかの治療法があるが、いずれも採骨部の変形や疼痛、感染、神経血管障害などの合併症のリスクがある上、治療可能距離に限界がある。今回の方法に基づき骨欠損に対して内軟骨性骨化を誘導し治療することができれば、低侵襲で簡便な治療法となり、患者負担の軽減、入院・治療期間の短期化、治療費用の軽減、社会復帰の早期化が達成できる。

研究成果の概要(英文)：Professor Takeshi Takarada, a collaborator on this study, previously developed a protocol for producing expandable limb-bud-like mesenchymal cells that express high levels of Paired related homeobox 1 (PRRX1), have high chondrogenic differentiation potential from human-induced pluripotent stem (iPS) cells, and can be expanded cultured. The bone defect model of SCID rats was created and filled with hyaline cartilaginous-like tissue prepared from this expandable limb-bud-like mesenchymal cells. Evaluation of images over time and histological evaluation of the harvested bone revealed progressive osteogenesis, enchondral ossification, and replacement with autologous bone. In addition, expandable limb-bud-like mesenchymal cells-derived hyaline cartilaginous-like tissue prepared in a medium containing high amounts of BMPs and TGF $\beta$  was found to promote osteogenesis.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨欠損 iPS細胞 軟骨前駆細胞 内軟骨性骨化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、骨粗鬆症による骨折に伴う骨欠損や骨腫瘍、骨髄炎などが増加し、骨移植を必要とする症例が増加している。骨欠損に対する治療として、骨誘導能などの活性を保ったまま移植可能で免疫反応も生じない自家骨移植が最も行われているが、自家骨移植には患者自身の腸骨や腓骨などの健常組織から海面骨を採取する必要があり、採取部の変形や疼痛、感染、神経血管障害などの合併症のリスクがある上、採取量と治療可能距離に限界がある。自家骨移植だけでは治療困難な骨欠損(≧5cm)は巨大骨欠損と定義されており、巨大骨欠損に対する治療としては血管柄付き骨移植、Ilizarov法、Masquelet法などが挙げられるが、いずれも治療期間が長期に渡ることや手術手技の難易度の高さ、治療可能距離の限界、複数回の手術が必要なこと、自家骨移植も併用する必要があることなどが問題点として残っており、未だgold standardとしての確立はされていない。以上のことから低侵襲で簡便な治療法を開発することにより、患者負担の軽減、入院・治療期間の短期化、治療費用の軽減、社会復帰の早期化の達成が望まれている。

また、骨欠損治療や骨再生において、間葉系幹細胞(MSC)を骨芽細胞に分化させて骨再生を図る研究がなされてきたが期待された程の効果は得られず、MSCを軟骨細胞へ分化させて軟骨内骨化(二次性骨形成)により骨再生を誘導する研究が進められている。しかし、MSCは患者によって分化能に差があること、採取の侵襲や培養期間が必要なため早期の移植は困難なことが欠点として挙げられる。その点、iPS細胞であれば他家からの移植も可能であり、iPS細胞を軟骨細胞へ分化させてストック化し、それをを用いて軟骨内骨化により骨再生を誘導することが可能となれば、必要時にほぼ全ての患者に使用することが可能となる。

### 2. 研究の目的

従来のヒトiPS細胞から硝子軟骨組織体を作り出す技術(Stem cell reports, 4, 404-418, 2015)では、中間段階としての前駆細胞が規定されておらず、同技術では中間段階での拡大培養/品質管理ができず、硝子軟骨組織体の大量生産やサイズ制御、再現性が難しい。この点、研究協力者である室田剛志教授が開発した細胞源は、中間段階の前駆細胞の段階で拡大培養(10週間で1015倍/液体要素ストック化/目印分子(CD90陽性CD140B陽性CD82陰性)による前向き品質管理が可能であるため、大量生産性/安定性に優れ、特にinputの細胞数を固定できるため、組織サイズの均一性を実現でき、細胞懸濁液として人工骨などの足場材料に注入して移植することや将来的には骨欠損部に合わせた最適な形状の軟骨様組織体を移植可能と考えられた。

この準備状況(細胞源の開発と、安定的で高品質な軟骨様組織体の形成)を踏まえて、本研究ではSCIDラットの大腿骨骨欠損モデルにヒトiPS細胞由来の肢芽様間葉系細胞を人工骨と共培養後に移植、もしくは軟骨様組織体を移植して欠損部を充填し、内軟骨骨化(および自家骨への置換)を誘導し骨欠損を治療することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)研究協力者の開発した方法[1, 2]を使用して、ヒトiPS細胞由来の肢芽様間葉系細胞を樹立し、継代培養により増やした。

(2)全身麻酔下にSCIDラットの大腿骨に外側からアプローチし、骨欠損モデルを作成した。骨欠損部にヒトiPS細胞由来の軟骨様組織体を移植し充填する群と何も充填しない群を作成し、術後4, 8, 12週で全身麻酔下に画像検査(単純X線検査、マイクロCT検査)で骨形成の進行度を評価し、画像撮影後に安楽死させ大腿骨を採取した。採取した大腿骨は組織学的評価(顕微鏡検査、特殊染色、免疫染色)により軟骨内骨化の状態と自家骨への置換の有無を解析し、バイオメカニクス試験により骨強度を評価した。また、培地中のBMPやTGF $\beta$ 等の量を変更し、骨形成に差が発生するか検討した。

### 4. 研究成果

BMPとTGF $\beta$ の含有量を増やした培地で作製した軟骨様組織体のサイズは通常の培地で作製した軟骨様組織体よりも大きく肥大化しており、免疫染色ではX型コラーゲンが陽性であった。また、移植後8週目の $\mu$ CT画像では骨欠損部の骨化が多く、骨欠損部の骨密度(BMD)も高かった。(図1)組織学的評価では通常の培地で作製した軟骨様組織体を移植した群と比較して、サフラニン0陽性領域が小さく、ヒトビメンチン陽性細胞の数が少なかった。(図2)

したがって、培地中のBMPとTGF $\beta$ を増やすことで、軟骨内骨化において重要な役割を担う肥大型軟骨細胞への分化を誘導し、内軟骨性骨化を促進できることが示唆された。ExpLBM由来の軟骨組織体の移植は、侵襲を加えることなく内軟骨性骨化による骨再生を誘導できる新しい骨再建法となる可能性がある。

移植後8週目  
骨密度  
(g/mm<sup>2</sup>)

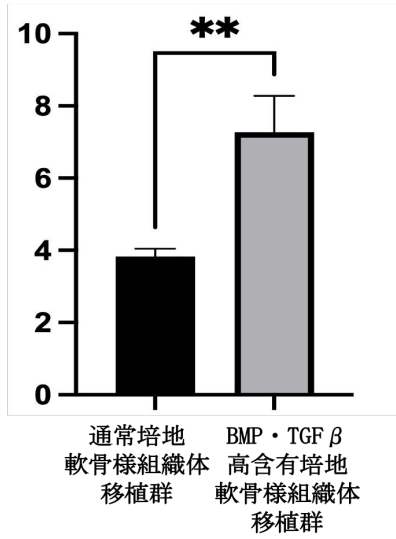


図1

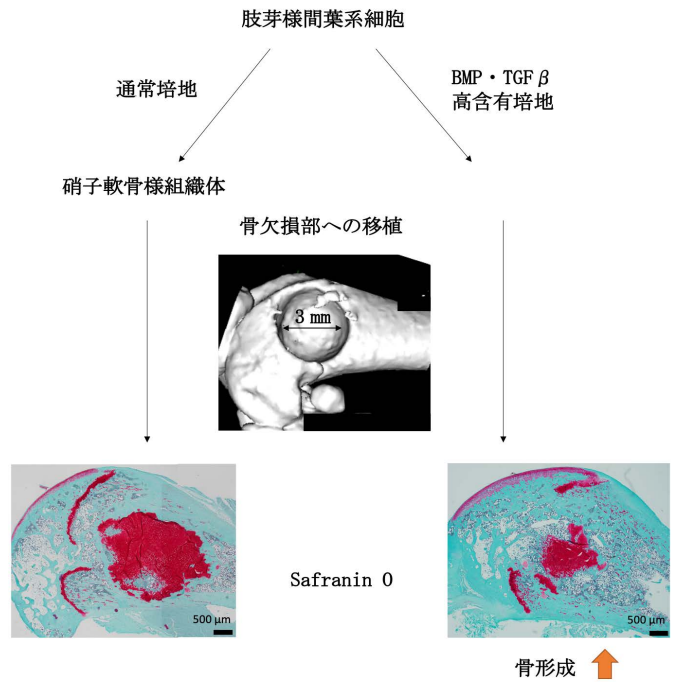


図2

<引用文献>

- [1] Yamada D, Nakamura M, Takao T, et al. Nature Biomedical Engineering. 2021.
- [2] Takao T, et al. STAR Protoc. 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohei Sato
2. 発表標題 Treatment of bone defects using cartilaginous particles produced from human-induced pluripotent stem (iPS) cell derived expandable limb bud mesenchymal cells (ExpLBM)
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society ORS 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	宝田 剛志  (Takarada Takeshi)		

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