

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390291

研究課題名(和文)多能性幹細胞由来スキャフォールドフリー三次元人工組織による骨軟骨再生

研究課題名(英文)Cartilage repair using a scaffold free tissue engineered construct derived from multipotent stem cell

研究代表者

中村 憲正(Nakamura, Norimasa)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招へい教授

研究者番号：50273719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：今までに確立したヒト滑膜間葉系幹細胞(MSC)由来三次元人工組織(Tissue Engineered Construct, TEC)を作製する技術を用いて、ウサギ胚性幹細胞由来MSCでTEC(ES-TEC)を作成した。ES-TECは軟骨分化誘導後に滑膜MSC-TEC(Sy-TEC)と比べ軟骨関連遺伝子の発現が有意に高値であった。ウサギ膝関節骨軟骨欠損へのTEC/B-TCP複合体移植を行い修復組織を検討したところES-TECでSy-TECに比しては硝子軟骨様組織による修復が促進されており、臨床応用が期待できる。またiPS細胞を用いて短期間でTECを作成する技術も開発した。

研究成果の概要(英文)：We had developed a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from synovial mesenchymal stem cells(Sy-MSC, Sy-TEC). Sy-TEC promoted cartilage repair in a porcine injury model. However, repaired cartilage by Sy-TEC has limited morphology in animal model especially in superficial zone. Embryonic stem cell(ESC) is expected as a better cell source for cartilage repair. We have made TEC derived from ESC (ES-TEC) and performed chondrogenic differentiation in vitro. Expression level of chondrogenic genes were significantly higher compared to Sy-TEC and equal to native chondrocyte. We have transplanted TEC/B-TCP complex to osteochondral defect of rabbit femoral groove, and then performed histological assessment. Repair tissue by Sy-TEC was like fibrocartilage but that by ES-TEC was hyaline cartilage like morphology at early stage following surgery. These results suggest the feasibility of ES-TEC in cartilage repair. We also succeeded in developing the TEC derived from iPS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：ES cell iPS cell stem cell 軟骨再生 Scaffold 軟骨分化 骨分化

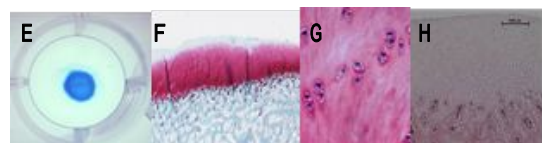
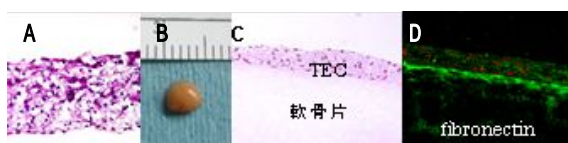
1. 研究開始当初の背景

関節内組織である関節軟骨は荷重衝撃の緩衝、関節滑動性の獲得に重要な役割を担っているが、血行に乏しく難治性の組織である。損傷部の放置は軟骨下骨病変を合併し二次性の関節症変化へと進展することも多い。全世界で変形性関節症の潜在患者数は3千万人とも推定され、有効な軟骨の治療法の開発は急務である。近年、軟骨組織を対象とした再生医療的手法を用いた新規治療法が研究されているがその成功には細胞源の確保が重要である。最近の研究により、骨髄、滑膜や脂肪由来の間葉系幹細胞(MSC)は軟骨を含む多様な細胞へ分化する能力のある細胞であることが明らかとなってきた。しかし Ex vivo で軟骨分化させた MSC 直接の移植は生体内では生着せず、これまで細胞治療を行う場合、細胞の集積の維持、細胞増殖、分化機能の安定化、さらには治療部位にかかる力学的ストレスからの保護などのために大多数の研究では生体基盤材料(スキャフォールド)が使用されてきた。しかしスキャフォールドの多くは生物(動物)材料、高分子化学材料等を含み、それらの材料の使用が生体に及ぼす影響は長期にわたっては予測しきれない問題がある。そこで我々は MSC を用いた細胞治療システムとして、スキャフォールドを使用せずに培養幹細胞が産生する細胞外マトリックスを骨格とした3次元人工組織(Tissue Engineered Construct; TEC)を開発した。我々は、二期連続した基盤研究(B)助成(16-18、19-21年度)により TEC の作成技術を確認し、さらに、TEC の軟骨修復・再生、また人工骨と TEC の三次元複合素材による骨軟骨修復・再生への有用性を証明した。要約すると、TEC はマトリックス内部に MSC が高密度で三次元に配置され(A)、培養開始時の細胞数、密度、培養期間の調整によりその大きさ、形状を自在に調節することが可能な組織である(B)。また fibronectin 等の細胞接着因子に富み、強い組織接着性を有する(C,D)。さらに TEC は分化誘導培地の培養で強い軟骨分化反応を起こし(E)、またブタの軟骨損傷に移植すると、移植後6カ月で再現性高く軟骨修復を認めた(F,G)。TEC と人工骨との複合化体を兔骨軟骨欠損に移植すると、軟骨下骨の形成と硝子様軟骨を主とした修復を認めた(H)。自身が生成した三次元細胞外マトリックス内に幹細胞が未分化な状態で分布し、かつ本研究開発技術はその独創性、有用性が高く評価され、国内外で学会賞が寄与された(国際軟骨修復学会 ICRS の Genzyme Best Poster Award (2006)および Cum Laud Award (2009)、日本整形外科基礎学会優秀ポスター賞(2006)、日本臨床バ

イオメカニクス学会研究奨励賞(2005,2009))。我々は引き続き学内倫理委員会及び臨床試験審査機関より臨床研究実施の承認を得て、平成21年度より TEC による軟骨再生の臨床研究を、大阪大学未来医療センターにて開始予定である。

一方細胞源としての MSC には、自家あるいは同種組織より採取した組織から分離、培養するために細胞数の確保に限界があること、MSC 自体の軟骨分化能に限界があり、成長因子等の分化促進因子の存在なしでは完全な硝子軟骨による修復を期待し辛いことも動物実験等により示唆されており、克服すべき問題も多い。将来的にこれらの問題の最も効率的な解決の可能性として挙げられるのが、自己複製能と多分化能を失わない究極の細胞である胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞の利用である。iPS 細胞の軟骨分化研究は未だ世界で報告はないが、ES 細胞の軟骨分化誘導研究は進んでおり、ES 細胞は MSC と同様に高密度三次元培養が軟骨分化誘導に適していることが明らかとなっている。iPS 細胞と ES 細胞の特性は理論上類似していると考えられるので、MSC に対しての場合と同様に細胞が高密度で三次元に分布する環境を提供できれば iPS、ES 細胞の軟骨再生への応用も可能となると推測することは合理的であると考えられる。このような環境の構築のためには動物由来材料や合成化合物などから構成される細胞の足場(スキャフォールド)の使用が一般的である。しかし、ヒト ES 細胞を牛胎児血清下に培養すると牛由来シアル酸がヒト ES 細胞表面に発現するという報告もあり、極めて分化能に富んだ iPS、ES 細胞を扱う場合、動物由来材料や化学合成化合物への接触は極力避けるのが望ましいと考えられる。まとめると、スキャフォールドを用いずに、細胞が高密度で三次元集積する環境創出することが望ましいわけで、その意味で我々が開発した TEC 作製技術はこれらの条件を満たしており、iPS 細胞や ES 細胞を用いた有用な軟骨移植材料となる可能性がある。

TEC 作製技術の iPS、ES 細胞への応用には、臨床応用を目指す上でヒト細胞を用いた TEC の機能解析も重要であるが、同時に適切な動物モデルによる移植実験研究が不可欠である。大阪大学未来医療センターには京都大学 iPS 細胞研究センターの協力でヒト iPS 細胞臨床研究センターが設立され、ヒト iPS、ES 細胞を用いた再生医療研究体制は整備されている。



## 2. 研究の目的

軟骨の再生医療において培養軟骨細胞に代わる細胞源として間葉系幹細胞(MSC)の有効性が近年報告されてきた。しかし MSC にも、人体組織採取の必要性和細胞数確保の限界、細胞自身の分化能の限界のため完全な硝子軟骨による修復が困難等、克服すべき問題が存在する。これらの問題の最も効率的な解決策は自己複製能と多分化能を失わない究極の細胞である胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞の利用である。これら多能性幹細胞の特性を十分に発揮させた再生医療技術の開発には幹細胞の軟骨分化の至適環境の確立のみならず、局所への細胞供給システムの確立が急務である。我々はスキヤフォールドを用いず、MSC 及び細胞自身が産生するマトリックスのみから構成される三次元人工組織(TEC)を開発した。TEC は生物、化学製剤を組織内に含まず安全性が高く、組織接着性に優れ、かつ生体内での強い軟骨分化能を持つ(1, 2)、我が国発の世界的にも独創的な軟骨再生に有用な移植組織である。本研究の目的はこの TEC 作製技術を iPS 細胞、ES 細胞に応用し、多能性幹細胞による至適な軟骨再生治療技術を確立することである。

## 3. 研究の方法

### 1) ES-MSC 由来 TEC の開発

共同研究者の寺村らが確立したウサギ胚性幹細胞(ES 細胞)から分離された間葉系幹細胞(eMSCs)を用いた(Cell Transplant 2012)。eMSCs 由来 TEC(eTEC)の作成は従来の滑膜 MSC(sMSC)由来 TEC(sTEC)と同様に初期細胞密度  $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、アスコルビン酸存在下で平面培養を行い、その後細胞と培養皿の境界にずり応力を発生させ、細胞-マトリックス複合体を浮遊培養とし3次元化組織を得た。eTEC を用いて in vitro での軟骨分化能および in vivo で軟骨修復能を sTEC と比較した。in vivo 実験では骨軟骨欠損モデルを用い、TEC / TCP 人工骨複合体を作製してこれを移植した。

### 2) iPS-MSC 由来 TEC の開発

共同研究者の寺村らが確立したヒト iPS 細胞から誘導された間葉系幹細胞(eMSCs)を用いた。sTEC と同様に初期細胞密度  $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、アスコルビン酸存在下で平面培養を行い、その後細胞と培養皿の境界にずり応力を発生させ、細胞-マトリックス複合体を浮遊培養とし3次元化組織を得た。

## 4. 研究成果

### 1) ES-MSC 由来 TEC の開発

sTEC と同様に、eTEC では1型コラーゲンやフィブロネクチンに富み、2型コラーゲンの発現は認めなかった。in vitro 軟骨分化で eTEC は軟骨関連遺伝子の発現が sTEC に比して有意に高値であった。in vivo では sTEC 移植群に比して硝子軟骨様組織での修復が促進されていた。eTEC は sTEC より高い軟骨分化特性を有し、生体移植後はより早期の

軟骨修復を可能にした。さらに eTEC は MSCs 移植時に懸念される軟骨下骨の過形成を抑制した。ES 細胞の軟骨再生治療への有用性が示唆された。

### 2) iPS-MSC 由来 TEC の開発

iPS 細胞由来 MSC の至適培養条件を検討したところ、酸素濃度 20%ではより未分化な細胞が増殖し、紡錘形の細胞が占める割合が減少した。酸素濃度を 5%、1%で維持培養を行ったところ、1%群で紡錘形細胞の維持が最もよく、増殖に関しても 20%と比較し劣ることはなかった。iPS 細胞由来 MSC を高密度培養すると培養後3日でハンドリング可能なシート状組織が作成され、滑膜間葉系幹細胞由来 MSC-TEC と比較し、短期間で TEC を形成した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計19件)

1. Moriguchi Y, Tateishi K, Nakamura N, et al. Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model.: Biomaterials. (査読有) 2013 Mar;34(9):2185-93.

2. Nakamura N Platelet-rich plasma added to the patellar tendon harvest site during anterior cruciate ligament reconstruction enhanced healing. J Bone Joint Surg Am. (査読有)2013 May 15;95(10):942

3. Nakamura N. Frictional properties of articular cartilage-like tissues repaired with a mesenchymal stem cell-based tissue engineered construct. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. (査読有) 2013 Jul;2013:401-4

4. Ando W, Yoshikawa H, Nakamura N, et al.: Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells. European Cells and Materials (査読有) 2012 Vol. 24 292-307

5. Yoshida K, Higuchi C, Nakamura N, et al.: Treatment of Partial Growth Arrest Using an In Vitro-generated Scaffold-free Tissue-engineered Construct Derived From Rabbit Synovial Mesenchymal Stem Cells. J Pediatr Orthop. (査読有) 2012 Apr;32(3):314-21

6. Ando W, Heard BJ, Nakamura N, et al.: Ovine synovial membrane-derived mesenchymal progenitor cells retain the phenotype of the original tissue that was exposed to in-vivo inflammation: evidence for a suppressed chondrogenic

differentiation potential of the cells. *Inflamm Res.* (査読有) 2012 Jun;61(6):599-608.

7.Oya K, Aok S, Nakamura N, et al: Morphological Observations of Mesenchymal Stem Cell Adhesion to a Nanoperiodic-Structured Titanium Surface Patterned Using Femtosecond Laser Processing. *Jpn. J. Appl. Phys.* (査読有) (2012) 51:125203-1-7.

8.Lee DS, Moriguchi Y, Myoui A, Yoshikawa H, Hamaguchi S. Efficient modification of the surface properties of interconnected porous hydroxyapatite by low-pressure low-frequency plasma treatment to promote its biological performance. *Journal of Physics D: Applied Physics*(査読有) 2012 Sep;45(37):1-5.

9.Kawato Y, Yoshikawa H, Myoui A. Nkx3.2 promotes primary chondrogenic differentiation by upregulating col2a1 transcription. *PLoS One.* (査読有) 2012;7(4):e34703. Epub 2012 Apr 12.

10.Yokoi M, Myoui A, (他 12 名 8 番目) et al. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. *J Tissue Eng Regen Med.* (査読有) 2012 Jul;6(7):550-8.

11.Ren LM, Toda M, Arahira T, Yoshikawa H, Myoui A. A comparative biomechanical study of bone ingrowth in two porous hydroxyapatite bioceramics. *Applied Surface Science.* (査読有) 2012 Feb

12.Ren LM, Arahira T, Toda M, Yoshikawa H, Myoui A. Biomechanical evaluation of porous bioactive ceramics after implantation: micro CT-based three-dimensional finite element analysis. *J Mater Sci Mater Med.* (査読有)2012 Feb;23(2):463-72.

13.Nansai R, Suzuki T, Shimomura K, Ando W, Nakamura N, Fujie H. Surface Morphology and Stiffness of Cartilage-like Tissue Repaired with a Scaffold-free Tissue Engineered Construct. *J Biomech Sci Eng.* (査読有)6(1), 40-48, 2011

14.Nakamura N., Takeuchi R., Sawaguchi T., Ishikawa H., Saito T., Goldhahn, S. Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS). *J Orthop. Sci.* (査読有) 2011 Sep;16(5):516-23

15.Hiramatsu, K., Sasagawa, S., Outani, H., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest,*

(査読有) 121:640-657, 2011.

16.Ikegami, D., Iwai, T., Ryo, S.I., Gu, N., Sugiyama, T., Oh, I., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Identification of small molecular compounds and fabrication of its aqueous solution by laser-ablation, expanding primordial cartilage. *Osteoarthritis Cartilage,* (査読有)19:233-241, 2011.

17.Lee DS, Moriguchi Y Okada K, Myoui A, Yoshikawa H, Hamaguchi S. Improvement of Hydrophilicity of Interconnected Porous Hydroxyapatite by Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment. *Plasma Science, IEEE Transactions.* (査読有) 2011 Nov; 39(11): 2166-2167.

18. Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Tamai N, Shi K, Hashimoto J, Yoshikawa H, Myoui A. Nkx3.2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2011 Dec 9;416(1-2):205-10.

19.Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Kohda H, Kita K, Kanamoto T, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials.* (査読有) 2010 Nov;31(31):8004-11. Epub 2010 Jul 31.

[学会発表](計 14 件)

1. Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2013, San Antonio, January 26, 2013 Moriguchi Y, Teramura T, Hasegawa H, Sakaue M, Chijimatsu R, Sugita N, Koizumi K, Yoshikawa H, Myoui A, Nakamura N Development of Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct (TEC) with Chondrogenic Differentiation Capacity Using Rabbit Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells

2. 11th International Cartilage Repair Society 2013, Izmir, September 12, 2013 Shimomura K, Moriguchi Y, Ando W, Nansai R, Fujie H, Horibe S, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Comparison of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate-based biphasic implant for osteochondral repair.

3. 11th International Cartilage Repair Society 2013, Izmir, September 12, 2013 Moriguchi Y, Shimomura K, Teramura T, Ando W, Sakaue M, Hasegawa H, Sugita N, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N Development of scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) with chondrogenic differentiation capacity using rabbit embryonic stem cell-derived mesenchymal

stem cells.  
4.11th International Cartilage Repair Society 2013, Izmir, September 12, 2013 Moriguchi Y, Sugita N, Hasegawa H, Chidimatsu R, Koizumi Y, Yasui H, Yoshikawa H, Nakamura N Effect of preservation conditions of human synovial mesenchymal stem cell (MSC) derived tissue engineered construct (TEC) on its chondrogenic differentiation.  
5.11th International Cartilage Repair Society 2013, Izmir, September 12, 2013 W. Ando, Y. Moriguchi, R. Nansai, R. Chijimatsu, K. Shimomura, H. Yoshikawa, H. Fujie, N. Nakamura, Abnormalities in the superficial zone of repair cartilage using a tissue engineered construct (TEC) derived from mesenchymal stem cells  
6. Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2012, San Francisco, February 5, 2012 Shimomura K, Moriguchi Y, Ando W, Nansai R, Susa T, Imade K, Mochiduki S, Fujie H, Kita K, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N Osteochondral repair using a novel biphasic implant made of scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and hydroxyapatite-based artificial bone.  
7. International Cartilage Repair Society 2012, Montreal, May 12, 2012 Moriguchi Y, Shimomura K, Teramura T, Ando W, Sakaue M, Hasegawa H, Sugita N, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N Development of scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) with chondrogenic differentiation capacity using rabbit embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells.  
8. International Cartilage Repair Society 2012, Montreal, May 12, 2012 K. Shimomura, K. Kita, T. Kanamoto, N. Nakamura, S. Miyamoto, T. Mae, T. Matsuo, H. Yoshikawa, K. Nakata Prostaglandin E2 upregulation by cyclic compressive loading on 3-D tissue of human synovial fibroblasts via COX-2 and IL-1 receptor signal pathway.  
9. International Cartilage Repair Society 2012, Montreal, May 12, 2012 Shimomura K, Moriguchi Y, Ando W, Nansai R, Susa T, Imade K, Mochizuki S, Fujie H, Kita K, Mae T, Nakata K, Yoshikawa H, Nakamura N Osteochondral repair using a novel biphasic implant made of scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and hydroxyapatite-based artificial bone.  
10. International Society for the Study of the Lumbar Spine 2012, Amsterdam, May 28,

2012 Moriguchi Y, Ikuta K, Iwasaki M, Yoshikawa H, Nakamura N Tissue engineered construct (TEC) prevents disc degeneration after nucleotomy in a rat model.

11. World Forum for Spine Research 2012, Helsinki, June 20, 2012 Moriguchi Y, Ikuta K, Nakamura N Tissue engineering construct (TEC) prevents disc degeneration after nucleotomy in a rat model

12. 3rd TERMIS Congress, Vienna, September 8, 2012 Moriguchi Y, Ikuta K, Nakamura N Tissue engineering construct (TEC) prevents disc degeneration after nucleotomy in a rat model

13. Nakamura N, Stem cell therapy in Orthopaedics. The 8th International Forum on Orthopaedic Sports Medicine and Arthroscopic Surgery, April 28, 2011, Shanghai, China

14. Nakamura N, Synovial stem cell-based therapy in chondral lesions. 1st Annual Congress on Stem Cell Research September 28, 2011, Spanca, Turkey

〔産業財産権〕  
出願状況（計2件）

名称：多能性幹細胞由来間葉系幹細胞による3次元人工組織の作成とそれをういた骨軟骨再生治療

発明者：吉川秀樹、中村憲正、下村和範、森口悠、千々松良太、安井行彦

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：2013-12630

出願年月日：2014/1/25

国内外の別：国外

名称：骨軟骨再生のためのスキャフォールドフリー自己組織化三次元人工組織と人工骨複合体

発明者：中村憲正

種類：特許

番号：PCT/JP2012/008410

取得年月日：H23/8/30

国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 憲正 (NAKAMURA Norimasa)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招へい教授

研究者番号：50273719

(2) 研究分担者

名井 陽 (MYOUI Akira)

大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10263261

藤江 裕道(FUJIE Hiromichi)  
首都大学東京・システムデザイン学部・教授  
研究者番号：20199300

星 和人(HOSHI Kazuto)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授(移行)  
研究者番号(30344451)

寺村 岳士(TERAMURA Takeshi)  
近畿大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40460901

福田 寛二(FUKUDA Kanji)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：50201744

吉川秀樹(YOSHIKAWA Hideki)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：60191588

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：