

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04958

研究課題名(和文) ヒトiPS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軟骨再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of cartilage regeneration technology by scaffold-free three-dimensional artificial tissue derived from human iPS cells

研究代表者

中村 憲正 (Nakamura, Norimasa)

大阪大学・国際医工情報センター・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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から神経堤を介して誘導したMSC(iNCMSC)のin vitroの解析から、iNCMSCはヒト骨髄由来MSCと比較し、同等もしくはより高い骨分化能、軟骨分化能を有することが示唆された。iNCMSCを高密度培養することで得られる人工組織(iNCMSC-TEC)を作成し、免疫不全ラットの軟骨欠損部に移植した場合、滑膜間葉系幹細胞移植由来TEC移植の際に認められた骨軟骨組織の形成は起こらなかった。骨軟骨修復へのiNCMSCの有用性にはさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節軟骨は血管に乏しい組織であるため、一度損傷すると自発的な修復が起こりにくい組織としても有名である。そのため、軟骨治療に対して過去にはさまざまな治療法が検討されてきた。今回のiNCMSCを用いた研究の結果では、iNCMSCはin vitroでは高い軟骨分化能を示したことから軟骨治療において有用な治療オプションにはなりうるが、in vivoでの結果を踏まえ、臨床応用までにはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The analysis of MSCs derived from human iPS cells via neural crest (iNCMSCs) in vitro suggested that they have equal or higher osteogenesis and chondrogenesis potential compared to human bone marrow-derived MSCs. An artificial tissue (iNCMSC-TEC) obtained by high-density culture of iNCMSC was prepared, and this artificial tissue had chondrogenic potential when cultured in chondrogenic condition in vitro. However, transplantation of iNCMSC-TEC into an immunodeficient rat cartilage defect did not result in the formation of cartilage, suggesting that it may not be possible to measure the true therapeutic effect in the xenograft test.

研究分野：軟骨再生

キーワード：iPS細胞 間葉系幹細胞 軟骨再生 人工組織

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

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、難治性組織である軟骨組織を対象に再生医療的手法による治療法研究が広まっているがその成功には細胞源の確保とともに移植先での細胞の物理的安定性、分化機能の安定化を保障する再生医療材料の開発が重要である。

本研究にあたり、我々もMSC、ES細胞、およびiPS細胞を用いて様々な再生医療研究開発を行ってきた。その主たるものとして、三次元人工組織(Tissue Engineered Construct; TEC)の開発がある。再生医療材料の多くは細胞の集積の維持、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、生物材料、高分子化学材料を含有し、それらが長期にわたり生体に及ぼす影響は予測しきれない問題がある。そこで我々はMSCを用いた細胞の足場(スキャフォールド)を使用せず培養幹細胞が産生する細胞外基質を骨格とした三次元人工組織(Tissue Engineered Construct; TEC)を開発した。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(図1A)、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り、fibronectin等の細胞接着因子に富み、強い組織接着性を有する。また、滑膜MSCを用い作成したTECは大型動物研究により軟骨修復に対する有用性を確認した(図1B)。本研究は引き続き厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究へ移行し、現在、臨床試験が大阪大学医学部附属病院にて開始されている(図1C;ヒト臨床研究第一例、TEC移植後1年の組織増、サフラニンO陽性の軟骨用組織にて修復されている組織像)。

一方、細胞源としてのMSCには、①組織から分離するために細胞数の確保に限界がある、②MSC自体の軟骨分化能に限界があり完全な硝子軟骨による修復を期待し辛い等、克服すべき問題も多い。その効率的な解決の可能性として自己複製能と多分化能を失わないES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞の利用がある。我々は近年ES細胞から胚様体形成を経てMSC様の細胞に分化誘導する方法を報告した。本法を用いて家兎ES細胞より誘導したMSC(ES-MSC)からTEC(ES-TEC)を作成し、骨軟骨欠損に移植したところES-MSC由来TECは移植後1か月でトルイジンブルー濃染される硝子軟骨組織を形成し(図2)、1か月で硝子軟骨により修復した。一方で滑膜MSC由来TEC移植では染色性は低く、軟骨形成に2か月以上を要しかつ修復組織も完全な硝子軟骨とは言い難く、滑膜由来に比してES-TECの軟骨修復能の高さが示された。また網羅的遺伝子解析により、ES-MSCの遺伝子プロファイルは未分化状態では滑膜MSCとの間に相違があるものの軟骨分化誘導後には近似収束することが判明し、ES-MSCは分化と共にその安全性も滑膜MSCと同水準に高まる可能性がある。本結果は、多能性幹細胞であるiPS細胞由来のTEC(iTEC)が安定して作成できれば、従来の滑膜MSC由来TECの性能を凌駕した再生医療材料となる可能性を示唆するものである。

また、我々は健康人皮膚細胞からレトロウイルスベクターにより3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)を導入樹立したiPS細胞株253G1を理研cell bankより入手し、iPS細胞からのMSC誘導研究を開始した。ES細胞と同様に胚様体より誘導培養後、CD44, 73, 105のMSCマーカーでソーティングしてiPS細胞由来MSC(iMSC)樹立に成功した(図3A)。樹立直後のiMSCはMSCマーカー陽性で、骨・軟骨・脂肪への分化能を有した(図3B)。しかしこの形質は継代と共に変化し、次第にコロニー形成する小型の細胞が増大し(図3C)、またOct3/4, Sox2, Klf4の3因子は全て再活性化した(図3D)。本結果により253G1株より誘導されたiMSCは継代と共により未分化な状態の細胞が混入し、間葉系細胞の形質維持が困難であることが判明した。レトロウイルス使用では3因子はゲノムに取り込まれる(ゲノミックiPS)ため、培養と共に再活性化する機会が高いと考えられ、ゲノム外への3因子導入等、他の手法により樹立されたiPS細胞株の使用も考慮する必要性が示唆された。

図1



図2

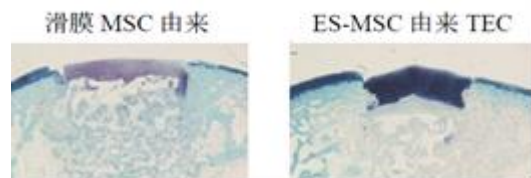
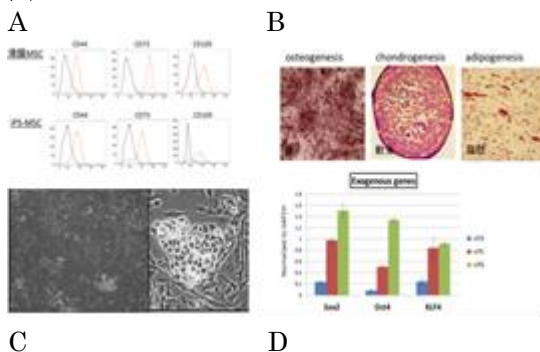


図3



2. 研究の目的

軟骨再生医療においても人工多能性幹(iPS)細胞は究極の細胞源として注目されているが、その臨床応用には細胞の確実な分化制御法に加え、安定した移植技術の確立が必須である。我々は滑膜および胚性幹(ES)細胞由来間葉系幹細胞(MSC)を用い、細胞と細胞自身が産生する細胞外基質から構成される三次元人工組織(TEC)を開発した。TECは、組織接着性に優れ安定した移植が容易で、かつ強い軟骨分化能を持つ国際的にも独創的な再生医療材料であり、臨床応用も開始されている。本研究の目的はTEC 作製技術をiPS 細胞に応用し、臨床応用を視野に入れた再生医療材料(iTEC)を開発することである。本研究の成功にはヒトiPS 細胞より再現性高く形質の安定したMSC への分化誘導が必須でありiPS細胞より間葉系細胞への分化誘導研究における問題点を検証し、解決して長期にわたり形質を維持できる間葉系細胞株(iMSC)を樹立する。ヒトiPS細胞から誘導された間葉系細胞由来TEC製造技術を確立し、その安全性、有効性を軟骨損傷の動物モデル(Xenograft model)にて検証する。

3. 研究の方法

1) episomal iPS細胞株の維持技術確立及び、iMSCへの分化誘導最適化

従来のフィーダー細胞(SNL 76/7 feeder cell)共培養法に加え、フィーダーフリーで安定的に培養できる系を検討した。episomal iPS細胞(409B2株)を理化学研究所から供与を受け、コーティング剤・Laminin-511 E8フラグメント(iMatrix, ニッピ)と多能性幹細胞用人工培地・mTeSR(ベリタス)を用いた。

次にこのfeeder less培養したepisomal iPS細胞を用いて胚様体を介した間葉系幹細胞(MSC)様細胞の誘導方法の検討を行った。基礎培地(DMEM, aMEM, DMEM/F-12)や血清(FBS, KSR)、成長因子(bFGF, EGF, PDGF)での培養を施行し、最適な胚様体形成培地を検討した。また、feeder lessのiPS細胞から得られたiMSCのMSCマーカー、多能性マーカーの発現及び分化能を調べた。

2) ヒトiPS細胞から神経堤を介して誘導したMSC(iNCMSC)の作成

京都大学iPS細胞研究所よりヒトiPS細胞由来神経堤細胞の提供を受け、その細胞を血清培地で培養する事でiNCMSCを誘導した。また、iNCMSCのMSCマーカー、多能性マーカーの発現を調べた。

3) iNCMSC由来TECの開発

iNCMSCs由来TECの作成は従来の滑膜MSC由来TECと同様に初期細胞密度 4×10^5 cells/cm²、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(iNCMSC-TEC)を得た。iNCMSC-TECを用いてin vitroでの骨、軟骨分化能及びin vivoで軟骨修復能を検討した。in vitroで分化試験は、培養2週間のiNCMSCを使用し、軟骨培養試験ではserum freeのpellet cultureを行い、分化因子にはTGF β 3とBMP2を使用した。in vivo実験ではラット骨軟骨欠損モデルを用い移植無のEmpty群、ヒト骨髄MSC移植群を設けiNCMSC-TEC群と比較検討した。

4. 研究成果

1) episomal iPS細胞株の維持技術確立及び、iMSCへの分化誘導最適化

episomal iPS細胞(409B2株)は、安定的にfeeder lessでchemical definedにiPS細胞を維持することが可能であった。

次に、培地検討において、5%FBS, 5% KSR含有DMEM/F-12に10ng/mL bFGFを添加した培地で安定的に胚様体が形成可能で、その後の接着培養によるMSC様細胞の誘導効率も格段に高かった。一方、bFGF不含の物や、FBSのみの使用では胚様体形成能が悪く、誘導MSCも増殖性を有さない老化した細胞が得られた。栄養因子・成長因子過剰な人工培地からの急激な環境変化によるストレスだと考察された。上記手法で誘導したMSC(iMSC)は早期に間葉系幹細胞マーカーの発現の有した一定のポピュレーションに収束し、2か月以上維持培養が可能であった。また長期培養により細胞老化を起し、腫瘍細胞のような異常な増殖能を示すことは無かった。また、feeder lessのiPS細胞から得られたiMSCは、CD44, CD73, CD90, CD105が陽性の純度が高く、多能性マーカー(TRA-1-60, Oct3/4, Nanog, Sox2, Lin28a)の発現消失および減少が確認された。一方で、このiMSCは、それぞれの系列への分化能は有するものの生体から採取したMSCと比較すると、その分化能は低かった。

2) ヒトiPS細胞から神経堤を介して誘導したMSC(iNCMSC)の作成

神経堤細胞を血清培地で培養後1-2週以内にMSCマーカー(CD44, 73, 105)陽性かつ神経堤マーカー(CD271)陰性の細胞集団が再現性高く得られることがわかり、さらに多能性マーカー(TRA-1-60, Oct3/4, Nanog, Sox2, Lin28a)の発現は著しく消失していることから安全性についても鑑みられた。

3) iNCMSC由来TECの開発

In vitroにおいて、骨分化誘導により早期でのALP発現上昇、その後の石灰化基質の沈着を認め、骨分化関連遺伝子の発現上昇も認めた。

また、軟骨分化試験では、TGF β , BMP2シグナルによりサフラニン0陽性、2型コラーゲンリッチな硝子軟骨様組織が形成され、培養日数に伴う軟骨分化の関連遺伝子、GAG量の上昇を認め、軟骨様の組織を形成することも確認された(図4)。しかし、iNCMSC-TECを免疫不全ラット軟骨欠損部に移植した群では、欠損部に線維組織が充填され、軟骨下骨のリモデリングが著しく阻害されて

いた(図5)。残存細胞は継時的に追跡すると消失していき、Ki67などの増殖マーカーの発現も認められなかったことから腫瘍形成などはなかった。

神経堤発生経路を介することで多能性幹細胞から容易なステップで安全性、純度が高いMSC様細胞を得ることが可能であった。神経堤由来MSCは*in vitro*では骨発生、軟骨発生の様式を見せたが、*in vivo*における自発的な骨発生、軟骨発生は生じなかった。しかし、*in vitro*で適切なコントロールをすれば硝子軟骨を形成する能力は有しており、人工軟骨組織作製の細胞財源としては有用である可能性が示唆された。

図 4

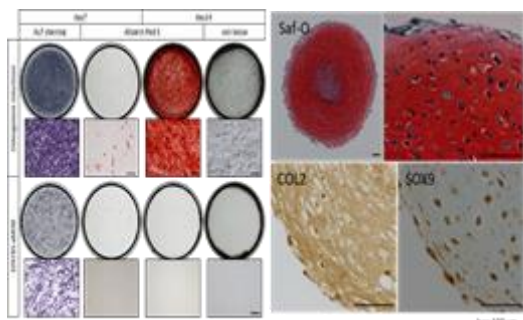
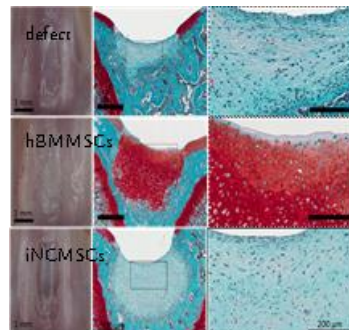


図 5



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 26 件)

1. Fernandes TL, Nakamura N, Bueno DF. . et.al: Human Synovial MSC Good Manufacturing Practices for Articular Cartilage Regeneration. *Tissue Eng. Part C* (査読有)2018 11 9.
2. Shimomura K, Rothrauff BB, Nakamura N,.et.al: Enhanced Repair of Meniscal Hoop Structure Injuries Using An Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct. *Biomaterials* (査読有)2018 11 13;192:346-354
3. Roffi A, Nakamura N, Filardo G. et.al: Injectable Systems for Intra-Articular Delivery of Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Treatment: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* (査読有), 2018 10 25;19(11). pii: E3322
4. Shimomura K., Hamamoto S, Yoshikawa H, Nakamura N. Meniscal Repair and Regeneration: Current Strategies and Future Perspectives. *J. Clin. Orthop.* (査読有) *Trauma* 2018, 9:247-253.
5. Shimomura K, Yoshikawa H, Nakamura N. et.al: First-in-human pilot study of implantation of a scaffold-free tissue-engineered construct generated from autologous synovial mesenchymal stem cells for repair of knee chondral lesions. *Am J Sports Med.* (査読有) 2018 8;46(10):2384-2393.
6. Shimomura K., Ando W., Nakamura N. et.al:Scaffold-free tissue engineering for injured joint surface restoration. *J. Exp Orthop.* (査読有) 2018 5;5(1):2.
7. Fernandes TL, Nakamura N, Bueno DF. et.al: Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem Cell Rev.* (査読有) 2018 5 4.
8. Scotti C, Gobbi A, Nakamura N, Peretti GM. et.al: Stem Cells for Cartilage Regeneration: A Roadmap to the Clinic.:*Stem Cells Int.* 2018 4 11;2018:7348560.
9. Tsujii A, Hiramatsu K, Nakamura N, Mitsuoka T. et.al: Long-term results of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for cartilage defects in the patella: two case reports with more than 18 years of follow-up. *J. Orthop. Sci.* (査読有) 2018 2 14. pii: S0949-2658(18)30036-8
10. Chijimatsu R, Nakamura N, Yoshikawa H. et.al: Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro. *Cytotechnology*, (査読有) 2018 70(2):819-829
11. Goldhahn S, Takeuchi R, Nakamura N, Sawaguchi T, et.al.: Responsiveness of the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) and the Oxford Knee Score (OKS) in Japanese patients with high tibial osteotomy. *J Orthop Sci.* (査読有)2017 9;22(5):862-867.
12. Ikeda Y, Sakaue M, Nakamura N, et.al.: IGF-1 Gene Transfer to Human Synovial MSCs Promotes Their Chondrogenic Differentiation Potential without Induction of the Hypertrophic Phenotype.: *Stem Cells Int.* 2017(査読有);2017:5804147.
13. Woodmass JM, LaPrade RF, Nakamura N, Krych AJ. et.al: Meniscal Repair: Reconsidering Indications, Techniques, and Biologic Augmentation. *J Bone Joint Surg Am.* (査読有)2017

7;99(14):1222-31.

14. [Chijimatsu R](#), Ikeya M, [Nakamura N](#), et.al.: Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair.: *Stem Cells Int.* (査読有) 2017;1-19
15. Shimomura K, Moriguchi Y, [Nakamura N](#), et.al: Comparison of 2 Different Formulations of Artificial Bone for a Hybrid Implant With a Tissue-Engineered Construct Derived From Synovial Mesenchymal Stem Cells: A Study Using a Rabbit Osteochondral Defect Model. : *Am J Sports Med.* (査読有)2017 3;45(3):666-75
16. Lyman S, [Nakamura N](#), Farr J, et al.Cartilage Repair Innobation at a Standstill; methodologic and regulatory pathways to break free. : *J Bone Joint Surg Am.* (査読有) 2016 8;03(9):98-113.
17. Koizumi K, Ebina K, [Yoshikawa H](#), [Nakamura N](#), et.al.:Synovial mesenchymal stem vells from osteo- or rheumatoid arthritis joints exhibit good potensial for cartilage repair using a scaffold-free tissue engineering approach. *Osteoarthritis Cartilage* (査読有) 2016 8;24(8):1413-22
18. Krych A. J., Gobbi A., [Nakamura N](#), et.al. : Articular Cartilage Solutions for the Knee: Presenti Challenges and Future Direction. *J. ISAKOS.* (査読有) 2016;1;93-104
19. Yasui Y, [Chijimatsu R](#), [Nakamura N](#), et.al.:Preparation of Scaffold-free Tissue Engineered Construct Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells under Low Oxygen Tension Enhances their Chondrogenic Differentiation Capacity. *Tissue Eng. Part A.* (査読有) 2016 3;22(5-6):490-500
20. [Fujie H](#), Nansai R, [Nakamura N](#), et.al. : Zone-specific integrated cartilage repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from allogenic synovial mesenchymal stem cells: Biomechanical and histological assessments. : *J Biomech.* (査読有) 2015 11 26;48(15):4101-8.
21. [Fujie H](#), Oya K, [Nakamura N](#), et.al. : Stem cell-based self-assembled tissues cultured on a nano-periodic-structured surface patterned using femtosecond processing: *Int h Automation Technology.* (査読有) 2015 ;10:55-61.
22. Hiramatsu K, Yonetani Y, [Nakamura N](#), [Yoshikawa H](#), Hamada M, et.al:Deep peroneal nerve palsy with isolated lateral compartment syndrome secondary to peroneus longus tear: a report of two cases and a review of the literature. : *J Orthop Traumatol.* (査読有) 2016 6;17(2):181-5.
23. Scotti C, Gobbi A, [Nakamura N](#), et al.:Cartilage Repair in the Inflamed Joint: Considerations for Biological Augmentation Toward Tissue Regeneration. : *Tissue Eng Part B Rev.* (査読有) 2016 4;22(2):149-59.
24. [Chijimatsu R](#), Kunugiza Y, [Nakamura N](#), [Yoshikawa H](#) et.al. : Expression and Pathological effects of periostin in human osteoarthritis cartilage. : *BMC Musculo-skeletal Disorder.* (査読有) 2015 8;16:215.
25. Shimomura K, Bean AC, [Nakamura N](#), Tuan R, et.al:In vitro Repaair of Meniscal Radial Tear Using Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold. : *Tissue Engineering PartA.* (査読有)2015 7;21(13-14):2066-75
26. Gobbi A, Chaurasia S, [Nakamura N](#), et.al. : Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation versus Multipotent Stem Cells for the Treatment of Large Patellofemoral Chondral Lesions: A Non-randomized Prospective Trial. *cartilage.* (査読有) 2015 4;6(2):82-97

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔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・国際医工情報センター・招へい教授

研究者番号：50273719

(2) 研究分担者

千々松 良太 (TIDIMATU Ryouta)

東京大学・医学系研究科・常勤研究員

研究者番号：60803210

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

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

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

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

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。