

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22677

研究課題名(和文) ヒトES細胞をソースにした、変形性関節症治療に特化した細胞製剤の開発

研究課題名(英文) Development of induced Drug-Cells for treating Arthritis (DCA) using human ES cells for osteoarthritis

研究代表者

齋藤 琢 (Saito, Taku)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではこれまでの研究代表者・分担者らが行った、変形性関節症の病態研究や、iPS・MSCの再生医療研究で培った技術と知見を活かし、ヒトES細胞をソースに、変形性関節症の治療に特化した細胞製剤 "induced Drug-Cells for treating Arthritis (DCA)" の開発に挑戦した。我々が開発した、ヒトiPS細胞から2種類の化合物を用いて軟骨前駆細胞を誘導する2C法をベースに、ヒトES細胞のDCAのプロトタイプを作成した。そして発現解析とマウスモデルへの投与実験を行い、変形性関節症モデルマウスへの投与による治療効果を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は強い痛みによって中高年のADLを著しく低下させるが、痛みの制御はしばしば困難で現在もその進行を止める術はない。最近では脂肪幹細胞の関節注射が治療の切り札として注目を集めているが、良質の細胞を安定的に供給するには困難が伴う。本研究ではiPS細胞より品質差が少ないES細胞を用いて、まずは滑膜幹細胞の分化誘導を目指し、その治療効果を検証する中でさらに治療効果の高い細胞製剤DCAの開発に挑むが、このスタイルは再生医療での革新的技術開発と平行して、関節の組織幹細胞のルーツにも迫る研究であり、困難に満ちているが成功した時の医療・医学両面での成果は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：We developed "induced Drug-Cells for treating Arthritis (DCA)" using human ES cells for osteoarthritis. Previously we reported that human iPS cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds (2C protocol). Based on this 2C protocol, we improved the culture system of human ES cells to differentiate chondrocyte. And then, we analyzed the expression markers after induced chondrocytes from human ES cells by improved 2C protocol and evaluated the effect of DCA on in vivo osteoarthritis mouse model.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 ヒトES細胞 細胞製剤の開発

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは長らく変形性関節症モデルマウスと細胞内シグナル解析技術を駆使して、変形性関節症の分子病態の解明に取り組んできたが、変形性関節症治療の新たな切り札として注目を集めている脂肪幹細胞の関節注射について2017年から研究を開始している。自家脂肪幹細胞による治療を実施しているクリニックとの共同研究では、この方法は鎮痛効果、抗炎症効果が強く、しかも長期に持続することが分かってきた。またMSCは免疫細胞の標的になりづらいことも知られており、他家のMSCをHLAのマッチングをせずに静脈投与しても問題ないことが報告されている。関節内ではさらに安全性が高いと推定され、他家脂肪幹細胞の供給を目指す企業とも共同研究を開始している。これらの細胞治療が有望であるのは間違いないが、一方で細胞の準備や供給には課題が多い。変形性関節症患者の多くは高齢であるため自家の脂肪幹細胞の増殖能が乏しく、培養増幅に難渋することも珍しくない。また他家の脂肪幹細胞の供給源は脂肪吸引で得られる組織であるが、安定した供給には課題も多く、品質やロットチェックには多大な費用を要するためコストダウンも困難である。

これらの研究とは別に、申請者らは2008年から再生医療実現化プロジェクトに参加し、ヒトiPS細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法を研究し続けてきたが、紆余曲折を経て2017年に2種類の化合物のみを用いて7-9日間で軟骨前駆細胞を誘導することに成功した(特許出願済(特願2016-163872) *Stem Cell Reports*. 13:530, 2019)。この2 compounds(2C)法による分化誘導の経過を経時的に解析したところ、1-5日目でT, MIXL1, TBX6, MEOX1などの中胚葉マーカーが順番に発現上昇し、その後SOX9やCOL2A1などの軟骨細胞マーカーの上昇がみられた。特に4日目の発現プロファイルはMSCの公開データに比較的類似していた。以上のことから、多能性幹細胞から変形性関節症の治療用の細胞製剤を生み出せないかという発想に至った。

### 2. 研究の目的

近年再生医療研究の発展は目覚ましく、2006年のiPS細胞技術の確立以降、iPSをセルソースとした研究が爆発的に行われるようになり、眼科、循環器、神経領域においては、いくつかの研究が前臨床の段階から臨床研究に移行している。一方の主役、間葉系幹細胞(MSC)の歴史は古く、長い間もっぱら組織形成のためのセルソースとして位置づけられ、MSCをいかに目的の細胞に分化させるかという研究が盛んにされてきた。しかしMSCには炎症を抑える作用があること、各組織や臓器には組織の恒常性維持に必要な組織幹細胞と呼ばれる細胞が存在していること、身体に何らかの損傷が生じると循環を経て損傷部に駆け付け修復過程に貢献する細胞がいることが分かり、これらが類似した細胞であったことから、MSCを分化誘導してから用いるのではなく、MSCをそのまま投与することで疾患を修飾、治療するという発想が生まれた。MSCの静注による脳梗塞や脊髄損傷、肝硬変、GVHDの治療など幅広い研究が進められ、一部は実用化に至っている。MSCの採取部位の検討も進み、当初は骨髄由来が主体であったが、採取に伴う侵襲を考慮し、近年は皮下脂肪由来のものが広がりをみせている。再生医療等安全性確保法の施行以後、運動器領域では変形性関節症に対する脂肪幹細胞の関節内注射による治療が広がり、関節痛を長期間強力に抑制することが分かってきた。変形性関節症は軟骨の摩耗・変性や骨棘形成、滑膜炎など多彩な病態を伴い、強い痛みによって中高年のADLを著しく低下させる。東京大学整形外科のコホート研究では変形性膝関節症の患者数は2,530万人に上り、うち780万人は痛みで日常生活に支障をきたしている。末期の患者には人工関節置換術が行われ、安定した成績を出しているが、進行期では痛みの制御が困難で進行を止める術はなく、上記の脂肪幹細胞の関節注射は切り札として注目を集めている。申請者らは自家脂肪幹細胞による治療を実施しているクリニックや、他家脂肪幹細胞の供給を目指す企業と共同研究を行っているが、変形性関節症患者の多くは高齢であるため自家の脂肪幹細胞の増殖能が乏しく、培養増幅に難渋することも珍しくない。また他家の脂肪幹細胞の供給源は脂肪吸引で得られる組織であるが、安定した供給には課題も多く、品質やロットチェックには多大な費用を要するためコストダウンも困難である。

本研究では、申請者らがこれまでの変形性関節症の病態研究や、iPS・MSCの再生医療研究で培った技術と知見を活かし、ヒトES細胞をソースに、変形性関節症の治療に特化した細胞製剤 “induced Drug-Cells for treating Arthritis (DCA)” の開発に挑戦する

### 3. 研究の方法

関節の組織幹細胞のルーツを辿る発生学的アプローチと、各種 MSC との発現プロファイル比較から、DCA の開発を進める。具体的には以下のサブテーマに分けて進めた。

(1) 関節発生過程における経時的な微小発現解析 (齋藤、河田)

間葉系組織が発生するのは胎生期 10 日以降であるが、関節組織のインターゾーン形成以降の胎生期 16 日以降の、16 日齢、18 日齢、生後 3 日齢のマウス膝関節を用いて、関節軟骨や滑膜、靭帯など関節構成細胞に分化していく発生過程をプロファイリングするために、各組織から細胞を単離し、RNA を採取し、発現マーカーを解析した。

16 日齢では各組織分離できなかったため、18 日齢と生後 3 日齢のマウス膝関節組織から組織別 RNA のプロファイリングを行った。

(2) 滑膜・骨髄・脂肪由来 MSC との発現プロファイル比較 (河田、石倉(研究協力者、大学院生))

ヒト滑膜細胞とヒト脂肪由来 MSC は、東京大学の非介入等研究倫理委員会にて承認済みである(「運動・支持組織におけるヒト組織幹細胞・成熟細胞を用いた再生医学の応用」; 審査番号 0622) に基づき、ヒトサンプルからそれぞれ細胞を単離した。ヒト骨髄 MSC はロンザ社から購入し、RNA シークエンス解析に用いた。研究代表者・分担者らが開発したヒト iPS 細胞から軟骨前駆細胞への分化誘導法 (2-compounds 法, 2C 法) の経時的な RNA シークエンスデータと照合することによって、各 MSC と 2C 法の各段階の発現マーカー、活性化シグナルの差を解析した。

(3) 変形性関節症の治療に特化した細胞製剤 “ Induced Drug-Cells

for treating Arthritis (DCA) ” の分化誘導条件の検討 (齋藤、森、石倉(研究協力者、大学院生))

品質管理で有利なヒト ES 細胞をソースに、2C 法に修正を加えるための条件検討を行った。未分化中胚葉細胞を経由して滑膜幹細胞をベンチマークに DCA のプロトタイプを作成し、発現解析、エピゲノム解析の結果から 2C 法の修正を行った。

(4) 変形性関節症モデルマウスへの投与による治療効果検証 (河田、石倉(研究協力者、大学院生))

本研究室で確立している変形性関節症モデルマウスに (3) で、より理想的なプロファイリングに近く誘導できたヒト ES 細胞由来軟骨細胞誘導株の移植を行った。

軟骨変性の進行度、軟骨・半月の再生、滑膜炎の程度を組織学的解析で検討し、痛み関連行動は Dynamic Plantar Aesthesiometer (von Frey test) による評価、foot print 解析システム Catwalk を用いた解析を行った。

#### 4 . 研究成果 (現在、データを論文化のため図表なし)

(1) 関節発生過程における経時的な微小発現解析

マウス 18 日齢と生後 3 日齢の膝関節組織から組織別 RNA のプロファイリングを行った。

RNA シークエンスのデータと 2 compounds(2C)法で分化誘導したヒト iPS 細胞とそれぞれ比較し、どのマーカー発現が十分か不十分か、経時的なデータと比較した結果を反映させたプロトコルを作成した。軟骨細胞のプロファイリングには軟骨特異的マーカー発現が足りなかったが、これは発生過程とはいえ、既に軟骨組織として成熟した組織との比較であるため、(2) に共通する結果であるが、ヒト滑膜細胞、ヒト脂肪由来 MSC、ヒト骨髄 MSC との比較プロファイリングデータから 2 compounds(2C)法のヒト ES 細胞株軟骨分化誘導方法を修正した。

(2) 滑膜・骨髄・脂肪由来 MSC との発現プロファイル比較

ヒト滑膜細胞とヒト脂肪由来 MSC は東京大学の非介入等研究倫理委員会にて承認済みである(「運動・支持組織におけるヒト組織幹細胞・成熟細胞を用いた再生医学の応用」; 審査番号 0622) に基づき、ヒトサンプルからそれぞれ細胞を単離し、ヒト骨髄 MSC はロンザ社から購入し、RNA シークエンス解析に用いた。

2 compounds(2C)法で軟骨分化誘導したヒト ES 細胞のプロファイリングは、研究代表者・分担者らがすでにヒト iPS 細胞で結果を得ているデータ(背景の項目で前述)と等しく、ヒト MSC の公開データに比較的類似していた。

(3) 変形性関節症の治療に特化した細胞製剤 “ Induced Drug-Cells

for treating Arthritis (DCA) ” の分化誘導条件の検討

2 compounds(2C)法で軟骨分化誘導したのプロファイリングデータとヒト滑膜細胞を 2 C 法で

軟骨分化誘導したデータを比較検討し、プロトコルの修正を行った。

ほぼ、修正をする必要がなかったため、既存の2C法をヒトES細胞の軟骨誘導法とし、In Vitro/Ex Vivo 培養を行い、組織学的解析(ペレット培養のサフラニンO染色、免疫染色)、リアルタイム RT-PCR による発現マーカー解析、ウエスタンブロットでのタンパク発現解析をおこなったところ、成熟した軟骨塊を得ることができた。

#### (4) 変形性関節症モデルマウスへの投与による治療効果検証

(1)-(3)データから得られた結果をもとに、修正を加えた、分化プロトコルで軟骨分化誘導できたヒト ES 細胞株を OA 治療細胞製剤とし、変形性関節症モデルマウスの関節への投与実験を行った。

関節炎モデルにおける軟骨破壊の初期段階(手術後8週間後)にヒトES細胞を一定の数になるよう希釈し、膝関節内に10  $\mu$ l を注入し、コントロールは細胞なし希釈液とした。

経時的に、軟骨変性の進行度、軟骨・半月の再生、滑膜炎の程度を組織学的解析、X線解析、Dynamic Plantar Aesthesiometer( von Frey test )による評価、foot print 解析システム Catwalk を用いた、痛み関連行動解析を行っている。

現在、上記の解析結果をまとめ、ヒトES由来軟骨分化誘導細胞製剤の効果を論文発表できるよう、まとめている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Lucas S?bastien, Primbs Tatjana, Knipfer Lisa, Wirtz Stefan, Kadono Yuhō, Saito Taku, Tanaka Sakae, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115335 ~ 115335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okada Keita, Mori Daisuke, Makii Yuma, Nakamoto Hideki, Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chang Song Ho, Taniguchi Yuki, Kobayashi Hiroshi, Semba Hiroaki, Takeda Norihiko, Piao Wen, Hanaoka Kenjiro, Nagano Tetsuo, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- $\kappa$ B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62463-4	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 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Onodera Shoko, Tani Shoichiro, Lai Jenny, Azuma Toshifumi, Xin Xiaonan, Lichtler Alexander C., Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Chung Ung-il, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chijimatsu Ryota, Nakamoto Hideki, Maenohara Yuji, Amakawa Masahiro, Miyake Yoshihide, Yamanaka Hiroyuki, Iba Kousuke, Yamashita Toshihiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of EP4-selective agonist KAG-308 suppresses mouse knee osteoarthritis development through reduction of chondrocyte hypertrophy and TNF secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56861-6	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 SUGIMOTO Hikaru, MURAHASHI Yasutaka, CHIJIMATSU Ryota, MIWA Satoshi, YANO Fumiko, TANAKA Sakae, SAITO Taku	4. 巻 41
2. 論文標題 Primary culture of mouse adipose and fibrous synovial fibroblasts under normoxic and hypoxic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 43～51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.43	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 Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Mori Daisuke, Chijimatsu Ryota, Maenohara Yuji, Nakamoto Hideki, Mori Yoshifumi, Makii Yuma, Oichi Takeshi, Taketo Makoto Mark, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 21
2. 論文標題 Wnt/ -catenin signaling contributes to articular cartilage homeostasis through lubricin induction in the superficial zone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2041-5	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2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態と治療法開発
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態と治療法の開発
3. 学会等名 第68回東日本整形災害外科学会(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部整形外科  
<http://www.u-tokyo-ortho.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	河田 学  (Kawata Manabu)  (10803174)	東京大学・医学部附属病院・登録研究員   (12601)	
研究分担者	森 大典  (Mori Daisuke)  (60835354)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員   (12601)	

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