

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890263

研究課題名（和文） 組織幹細胞を用いた軟骨再生医療の基礎的研究

研究課題名（英文） Establishment of efficient culture systems for somatic stem cells and evaluations of their potentials for articular cartilage disorders

研究代表者

寺村 岳士（TERAMURA TAKESHI）

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40460901

研究成果の概要（和文）：現在、関節軟骨損傷に対する再生医療では自家軟骨細胞が用いられているが、細胞材料としての限界から幹細胞への期待が高まっている。本研究では幹細胞の分離培養方法の開発、細胞特性の解明および多能性幹細胞の可能性に関する検討を行った。その結果、血清低減下など組織幹細胞の未分化維持および増殖に重要な因子が抽出され、これらの知見を応用する事で、多能性幹細胞から有用な細胞を選択的に誘導する方法が開発された。

研究成果の概要（英文）：Autologous chondrocyte implantation is an established technique for the repair of degenerated articular cartilage. However, because of limited properties of the chondrocyte such as senescence after in vitro propagation, application of stem cells are aspired and examined for therapies of some diseases actually. This study aimed to establish efficient method for collection and propagation of the stem cells, and to observe the properties of them as the materials for cell therapy for articular cartilage disorders. As one important result of this study, it has been elucidated that reducing serum concentration in the medium and addition of growth factors is significantly improve the stem cell self-renewal. Furthermore, it has also been demonstrated that this technique could be diverted to the efficient method for induction of mesenchymal progenitor cells, which possess a potential to differentiate to the chondrocytes, from induced pluripotent stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2009年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,350,000	705,000	3,055,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：再生医療・軟骨・組織幹細胞・分化誘導

1. 研究開始当初の背景

高齢社会の到来に伴い、変形性関節症などの関節疾患の有病率が増加している。変形性関節症では様々な要因により関節軟骨が損傷し、歩行時、加重時に疼痛を伴う事から、高齢者の生活におけるQOLを著しく低下させる要因となっている。

近年、軟骨損傷を対象とした再生医療として、培養自家軟骨移植 (Autologous Chondrocyte Implantation; ACI) が注目されている。これは、患者自身の関節非加重部から採取した軟骨細胞を体外で培養し、損傷部に移植するという治療である。様々な症例においてその有効性が示されているが、軟骨細胞は培養下で容易に脱分化し、形質が変化するなど、長期的な維持や細胞数の増幅が困難であることが報告されている。また、軟骨細胞のような体細胞は分裂回数依存的に老化するため、移植後の長期的な安定性や、軟骨マトリクス産生に関わる生理活性の変化など解明すべき課題が残る。

一方、関節軟骨に対する新しい再生医療の材料として、骨髄幹細胞、滑膜幹細胞といった組織幹細胞が注目されるようになってきた。

現在まで、再生医療を目指した組織幹細胞の分離、培養方法については広く研究されているが、各組織から高純度に再現性良く幹細胞を分離する方法、あるいは安定的に継代培養する方法については検討の余地がある。また、組織幹細胞そのものの性質についても不明な点が多く、幅広い臨床応用にむけて解決すべき点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①幹細胞の効率よい分離方法を検討し、②体外で無菌的に分離、培養された幹細胞の能力等、臨床応用の可能性について検討し、これを基に③幹細胞移植医療の臨床応用に向けて発展的な情報を探索、蓄積することである。

3. 研究の方法

実験①滑膜幹細胞の分離・培養系の開発

ウシの関節滑膜を前足部 MP 関節より無菌的に採取した。この滑膜を 0.1% コラゲナーゼで消化し、細胞液を得た。細胞液を 0、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15% FCS 添加 DMEM あるいは StemPro34SFM (Invitrogen) で 4 日間培養した。

滑膜組織に含まれる組織幹細胞である間

葉系幹細胞は、由来によって性質が異なるために特定のマーカー (抗原) を指標に検出を行うことは適切でないと判断した。そこで本研究では、多くの未分化な組織幹細胞に共通の性質である Hoechst 色素排出能力を指標に幹細胞の含有率を測定した。上述のとおり前培養をおこなった滑膜細胞をトリプシン-EDTA 処理により回収、洗浄後、Hoechst33342 を含む (Sigma; 最終濃度 1.8 μ g/ml) 培養液内で 90 分震盪培養を行った。その後、同細胞液を FACS-Vantage にて解析した。

同法では、一般に、高い色素排出能を有する幹細胞は非染色集団 (Side population; SP) として観察される。本研究では、検出された SP 画分をソーティングし、コロニーフォーメーションアッセイ、細胞数の測定、RT-PCR により詳細な性質の解析を行った。また、これを培養維持する系の開発と、培養幹細胞を用いた骨、筋、軟骨細胞への分化誘導を検討した。

また、培養した幹細胞をコラーゲンスキャールド包埋し、ウサギ軟骨全層欠損モデルへの移植を検討した。

実験②無血清培養系が幹細胞に与える影響の検討 (発展研究)

上記実験①にて、培養時に添加する血清の濃度と幹細胞の性質には極めて強い関連性がありうる事が示された。そこで、無血清化が他の組織幹細胞に与える影響を明らかにすることを目的に、マウス新生児由来神経幹細胞の樹立培養における無血清培養系の効果を検証した。マウス新生児 (0 日齢) より脳を回収し、血清代替品である KSR (Invitrogen) を培養液に添加した無血清培養系で 6 日間培養を行った。その後、得られた神経幹細胞を FACS、RT-PCR、Western blot、免疫染色により解析をおこなった。また、神経細胞、心筋細胞、脂肪細胞、インスリン産生細胞への分化誘導を検討した。

実験③人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの軟骨細胞の分化誘導

近年、新しい細胞材料である iPS 細胞の再生医療への利用が注目されている。

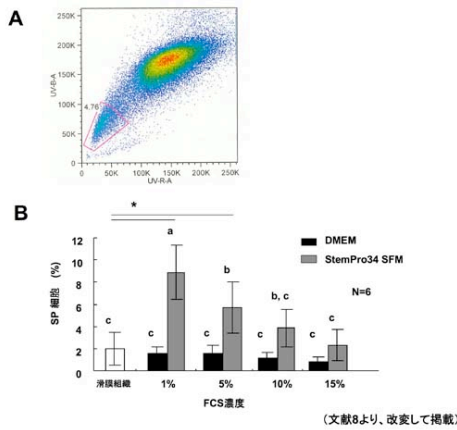
本研究では、実験①で得られた滑膜間葉系幹細胞の最適培養系および分化誘導系を応用し、iPS 細胞からの間葉系幹細胞様画分の分離および軟骨細胞の分化誘導を試みた。

コンフルエントに達したマウス iPS 細胞 (理化学研究所; iPS-MEF-Ng-20D-17) をトリプシン-EDTA で剥離し、ペトリディッシュ上で胚様体の形成を誘導した。3 日後、形成された胚様体を細胞培養用ディッシュに移

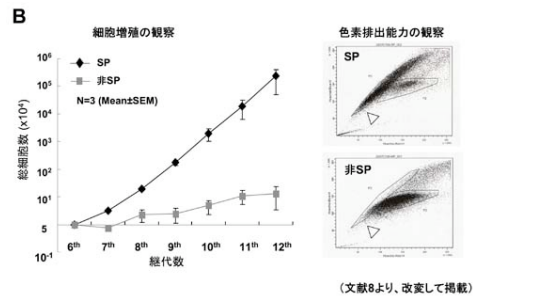
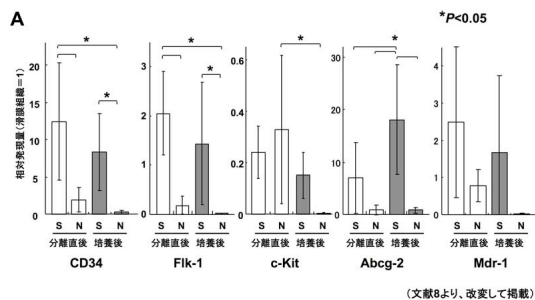
し 10^{-6} M のレチノイン酸 (RA) を添加した 10%FCS-DMEM で 8 日間培養した。8 日後、トリプシン処理にて全細胞を回収し、5%FCS-DMEM に懸濁した後、ゼラチンコートをした培養用ディッシュで 1 時間培養した。その後、上清を除去し、血清低減培養液 (MesenPro RS; Invitrogen) に 10ng/ml の bFGF を添加した間葉系間細胞用培地で培養を行った。コンフルエントに達した間葉系幹細胞様細胞は RT-PCR、Western blot、FACS、免疫染色により特性解析を行うとともに、軟骨細胞への分化誘導を検討した。

4. 研究成果

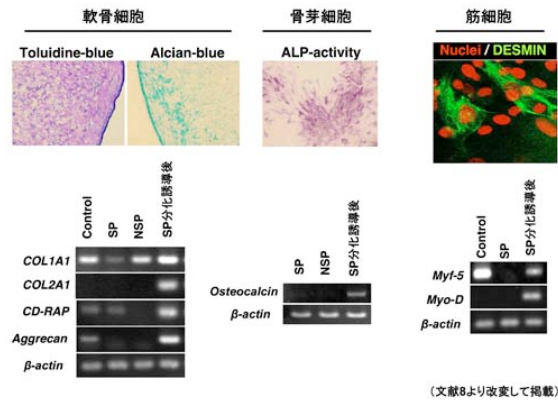
実験①: FACS 解析により、ウシ関節滑膜組織中に SP 画分が存在することが示された (図 1-A)。基礎培養液に DMEM あるいは StemPro 34SFM を使用し、様々な血清濃度で前培養を行った後、SP 画分の存在量を測定したところ、添加する血清濃度が SP 画分の量に直接影響しており、0.5%以下の血清濃度は間葉系細胞の接着増殖を支持できないが、5%以上の血清濃度では SP 画分が有意に減少することが明らかとなった (図 1-B)。



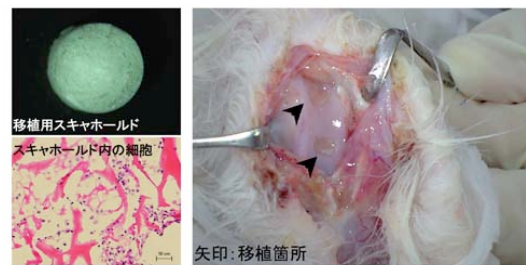
このことから、本研究では血清濃度 1%を最適濃度と設定し、SP 画分の解析を行った。SP 画分では幹細胞/前駆細胞マーカーである CD34、c-Kit、Flk-1 および色素排出能力関連遺伝子 Abcg-2、Mdr-1 を強く発現しており、幹細胞の存在が示唆された (図 2-A)。そこで SP 細胞をソーティングし、最適条件であった 1%FCS-StemPro 34SFM での長期培養を行った。その結果、同条件では培養細胞の色素排出能力が維持され、また、幹細胞マーカーの発現と高い増殖能力が維持されることが明らかとなった (図 2-B)。



同条件で継代培養により増殖した SP 細胞は多分化能を有しており、分化誘導によって Desmin 陽性筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へと分化した (図 3)。以上の性質から、本研究で用いた方法は滑膜組織から幹細胞画分を選択的に回収できる方法であり、また、本研究で開発された培養条件は分離幹細胞の増殖培養に有効であることが示された。



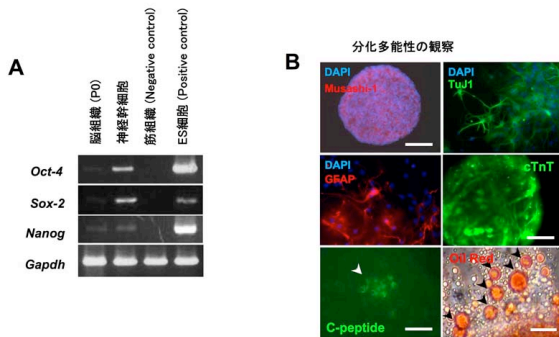
次に、滑膜幹細胞を用いた運動器再生医療モデルとして、ウサギ関節軟骨全層欠損モデルの作成とコラーゲンスキャホールドを用いた細胞移植を検討した。前述したとおり、コラーゲナーゼ処理により滑膜組織から細胞液を調整し、血清低減培養液で前培養を行った。その後、細胞をスキャホールドに埋入し、軟骨欠損部へ自家移植を行った (図 4)。



しかし、1ヶ月後の組織学的解析の結果、一部の個体で繊維性組織による軟骨欠損部の被覆を認めた。移植時にスキャホールドを固定する目的で使用したフィブリン糊が繊維化に寄与した可能性、あるいは手術時に滑膜組織や関節包を障害し、一部が癒着することで今回の事例に結びついた可能性があり、今後の検討課題である。

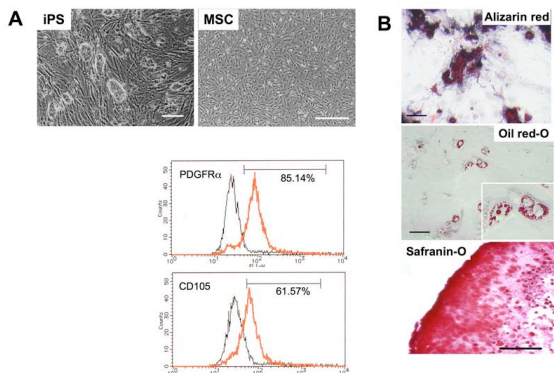
(文献8より、改変して掲載)

実験②: KSR を使用した無血清培養により、神経幹細胞を効率よく樹立する事が可能であった。興味深いことに、得られた神経幹細胞のコロニーには多能性幹細胞マーカーである Oct-4 あるいは Nanog を発現する細胞が含まれている事が明らかになった (図 5-A)。また、分化誘導により拍動性の心筋細胞、脂肪細胞、インスリン産生細胞へと分化する能力を有していることも明らかとなった (図 5-B)。この事から、同法は未分化性の高い組織幹細胞の維持にも優れた効果を発揮することが示唆された。



TuJ, GFAP; 神経細胞マーカー. cTnT; 心筋細胞マーカー. C-peptide; インスリン産生細胞マーカー. Oil-Red O; 脂肪細胞マーカー. (文献4より改変して掲載)

実験③: RA 添加にて iPS 細胞を分化誘導することで、心筋細胞、肝細胞様細胞、神経細胞、上皮様細胞など多様な細胞が出現した。今回目的とした間葉系幹細胞 (MSC) は繊維芽細胞様の形態を示し、培養ディッシュに高い接着性を示す。そこで、全細胞をディッシュ上で短時間培養し、その後速やかに上清を除去する事で MSC 様細胞のみを濃縮することを試みた。本研究では、1 時間の培養によって線維芽細胞の形態を示す細胞を選択的に分離する事ができ、これらの細胞は PDGFR α 、CD105、Vimentin といった MSC マーカーを発現していることが明らかとなった (図 6-A)。分離した MSC 様細胞は血清低減化培養液に bFGF を添加した条件で効率よく増殖させることが可能であった。さらに、iPS 細胞由来 MSC 様細胞を分化誘導することで、軟骨細胞を分化誘導することが可能であった (図 6-B)。本研究では、一連の研究成果を応用することで iPS 細胞から MSC 様細胞および軟骨細胞を分化誘導することに初めて成功した。



(文献1より、改変して掲載)

総括: 本研究において、軟骨再生医療の材料として注目されている滑膜組織から幹細胞を分離し、その性質の一部を明らかにした。また、滑膜幹細胞を分離抽出後に効率よく培養する系を開発した。移植試験では検討の余地を残したが、今回見出された血清低減化による幹細胞の維持は神経幹細胞においても有効であり、多分化能生性神経幹細胞の存在を示唆する成果に結びついた。

さらに、一連の研究で得られた知見を応用する事で、次世代の再生医療材料である人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から関節軟骨再生に有用な幹細胞分化誘導することに成功した。

以上のとおり、本研究計画を通して得られた成果は幹細胞培養の基盤形成に関わる情報を含み、幹細胞を用いた新しい再生医療技術の開発にも充分寄与しうることを示している。

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 8 件)

1. Teramura, T, Onodera, Y, Mihara, T, (他 3 名, 6 番目): Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse induced pluripotent stem cells. Cellular Reprogramming, 2010 (in press). (査読: 有)
2. Onodera, Y, Teramura, T, Ozawa, M, (他 7 名, 10 番目): Differentiation diversity of mouse parthenogenetic embryonic stem cells in chimeric mice. Theriogenology, 2010 (in press). (査読: 有)
3. Miki, Y, Teramura, T, Tomiyama, T, (他 4 名, 2 番目): Hyaluronan reversed proteoglycan synthesis inhibited by mechanical stress: possible involvement of antioxidant effect. Inflamm Res, 2009 (in press). (査読: 有)
4. Takehara, T, Teramura, T, Onodera, Y, (他 6 名, 2 番目): Potential existence of stem cells with multiple differentiation abilities to three different germ lineages in mouse neurospheres. Stem Cells Dev 18:1433-1440, 2009. (査読: 有)
5. Teramura, T, Onodera, T, Murakami, T, (他 12 名, 1 番目): Mouse androgenetic embryonic stem cells differentiated to multiple cell lineages in three embryonic germ layers in vitro. J Reprod Dev 55:283-292, 2009. (査読: 有)

6. Takehara, T, Teramura, T, Onodera, Y, (他7名, 2番目): Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells. Mol Hum Reprod 14:627-634, 2008. (査読: 有)
7. Kakegawa, R, Teramura, T, Takehara, T, (他8名, 2番目): Isolation and culture of rabbit primordial germ cells. J Reprod Dev 54:352-357, 2008. (査読: 有)
8. Teramura, T, Fukuda, K, Kurashimo, S, (他5名, 1番目, 2番目): Isolation and characterization of side population stem cells in articular synovial tissue. BMC Musculoskelet Disord 9:86, 2008. (査読: 有)

[学会発表] (計4件)

1. 寺村岳士. 多能性幹細胞からの軟骨細胞分化誘導とウサギを用いた移植モデルの開発 (シンポジウム). 日本整形外科学会基礎学術集会. 平成21年11月5日. パシフィコ横浜.
2. 寺村岳士. 人工多能生幹細胞 (iPS細胞)からの軟骨細胞の分化誘導 (口演). 日本軟骨代謝学会. 平成21年3月6日. 名古屋国際会議場.
3. 寺村岳士. 多能性幹細胞からの軟骨細胞分化誘導とウサギを用いた移植モデルの開発 (口演). 日本再生医療学会総会. 平成21年3月5日. 東京国際フォーラム.
4. 寺村岳士. 組織幹細胞を用いた再生医療 (パネルディスカッション). 日本関節病学会. 平成20年11月7日. 神戸国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 間葉系幹細胞または軟骨細胞の製法ならびに発癌性の抑制方法.

発明者: 寺村岳士、福田寛二、小野寺勇太.

権利者: 学校法人 近畿大学

種類: 特願

番号: 2009-164182

出願年月日: 平成21年7月10日

国内外の別: 国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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