

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03803

研究課題名（和文）新規腱韧带再生医療に向けた高機能韧带節細胞誘導法の開発

研究課題名（英文）Establishment of induction protocols for a functional syndetome aiming to develop a novel treatment for tendon and ligament regeneration

研究代表者

池谷 真（Ikeya, Makoto）

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：腱・韧带は再性能に乏しい組織であるため、障害が起こると放置しても治らない。iPS細胞などの幹細胞から腱・韧带組織を誘導し、損傷部位を補填する方法が1つの手段として考えられるが、これまで腱・韧带細胞を誘導するロバストな方法は存在しなかった。申請者らは2018年に、世界で初めてヒトiPS細胞から韧带細胞の前段階の細胞である韧带節細胞を誘導するプロトコルの開発に成功した。本研究では、この細胞を将来の再生医療に応用するため、目的外細胞の混入を最小限にするための高効率誘導法の開発、誘導過程での動物由来成分の排除、動物移植による生体内機能の証明を行い、全て良好な結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究提案では、生体内で韧带としての本来の機能を有する、腱・韧带移植治療に資する韧带節細胞の誘導法、精製法、拡大培養法を開発することを目的とした。本申請の基盤となる韧带節誘導法は申請者らのグループが独自に開発した技術であり、また多能性幹細胞から誘導した韧带節細胞を使った治療法開発はこれまで前例がなかった。本研究成果は、これまで自家腱移植による手術適応となっていた前十字韧带断裂や高齢者に好発する肩胛板断裂などといった腱韧带損傷に対し、新しい高機能の治療オプションの提示を可能とし、さらに、高齢のため自家組織の採取困難といった理由から手術適用とならなかった患者に対しての適用拡大を可能にする。

研究成果の概要（英文）：Since tendons and ligaments are tissues with poor regenerative ability, they hardly heal once left untreated. One of the possible options is to induce tendon/ligament tissue from pluripotent stem cells and fill the damaged area with them. However, there has been no robust method for inducing tendon/ligament cells. In 2018, we succeeded to develop the world's first protocol for inducing syndetome cells, which are the precursor of tendon/ligament cells, from human iPS cells. In order to apply the cells to future regenerative medicine, in this application, we have developed a highly efficient induction method to minimize the contamination of unwanted cells, eliminated animal-derived components during the induction process, and estimated in vivo function by animal transplantation, and obtained expected results.

研究分野：整形外科学

キーワード：韧带節細胞 韧带再生 多能性幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年のスポーツ人口の増加に伴い、腱・靭帯損傷の症例数は年々増加傾向にあり、前十字靭帯損傷だけでも国内で年間約 5 万件もの症例があるとされている。また高齢者に好発する肩腱板断裂は、50 歳以上では 25%に上るとされ、そのうち 30%程度が手術を受けている。

一旦損傷を受けた腱・靭帯は放置しても治ることはほぼなく、よって自家腱などを用いた再建術が実施される。しかし、健康腱の採取による当該部位の運動機能低下や、高侵襲性から合併症のリスク、高齢者からの採取困難といった問題があり、これに代わる新たな治療法の開発が望まれている。近年では人工材料を用いた人工腱・靭帯の開発研究が進められてきたが、十分な力学的特性を備えた人工材料は開発されておらず、また人工物を使用する限り、生体親和性の改善にも限度があった。上述の問題点の解決策の1つとして、iPS 細胞のような多能性幹細胞から靭帯組織を作製し、再生医療に利用することが考えられるが、多能性幹細胞から靭帯への誘導法はこれまで確立されていなかった。

2018 年、我々のグループは、世界で初めて体節中胚葉を経由した段階的誘導法により靭帯の前駆細胞である靭帯節細胞をヒト iPS 細胞から誘導する方法の確立に成功した(図 1)。しかし、その誘導法による誘導効率は 70%前後であり、また生体内での機能は未検討という課題が残されていた。このため、将来的に移植治療の細胞源としての応用を考えた場合、誘導法、精製法、拡大培養法などを科学的に開発し、生体内機能を証明する研究が必須と考えられた。

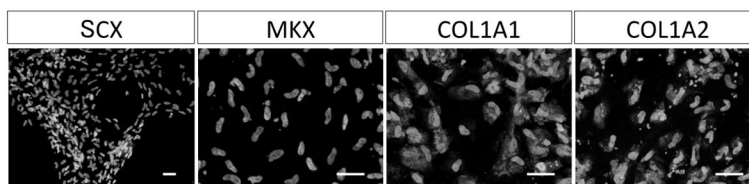


図 1 分化後細胞の免疫染色による特性評価
分化後の靭帯節細胞は、SCXやMKXといったマーカーの発現を有す。bar. = 50um

2. 研究の目的

本研究提案では、生体内で靭帯としての本来の機能を有する、腱・靭帯移植治療に資する靭帯節細胞の誘導法、精製法、拡大培養法を開発することを目的として設定した。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、本研究では下記の 5 項目を研究の方法として提案した。

- 靭帯節誘導法からの動物由来成分の排除
- 分化誘導効率の向上
- 靭帯節細胞の濃縮法の開発
- 立体的靭帯組織構築・成熟化
- 移植による生体内機能の検証

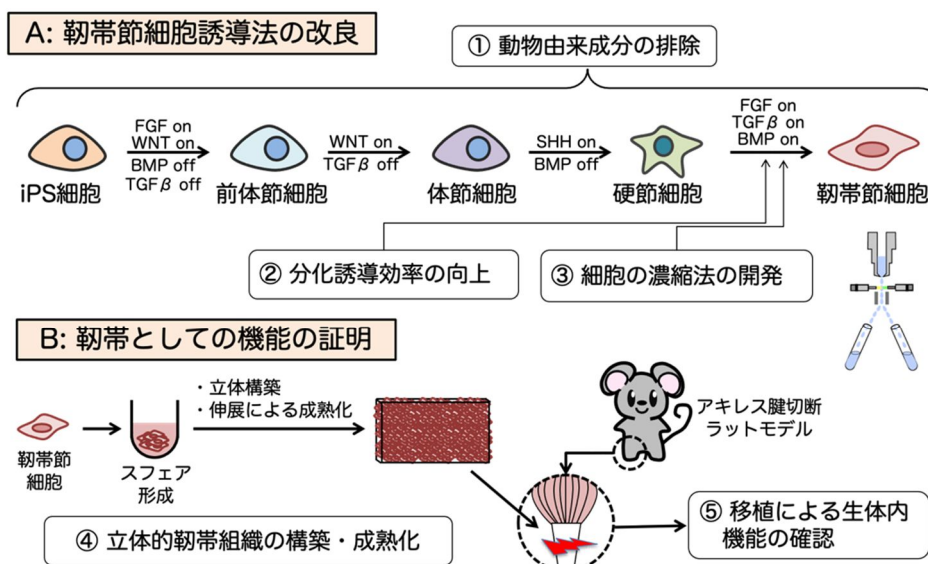


図2 研究の概要

4. 研究成果

靭帯節誘導法からの動物由来成分の排除

iPS 細胞維持培養時のフィーダー細胞、分化誘導時のマトリゲルおよびウシ血清アルブミンの排除を行なった。フィーダー細胞についてはフィーダーフリー iPS 細胞を使用することで排除し、マトリゲルについては iMatrix へと置き換え、ウシ血清アルブミンについてはそれを含まない

市販培地である AK03N(味の素)を基礎培地として使用した。結果として、全ての置換が成功し、動物由来成分の排除に成功した。

分化誘導効率の向上

添加物の最適化を行った。具体的には、TGF β 3、FGF8、BMP7の濃度や添加時期を検討するミニスクリーニングを実施し、誘導日数の短縮および靭帯節マーカー陽性率70%以上を目指した。その結果、特に硬節から靭帯節細胞の誘導日数が21日間から8日間に短縮され、また誘導効率も靭帯節細胞のマーカー陽性率が80-90%程度と想定目標よりも良い結果を得ることに成功した。この高効率の誘導は、6つの異なるiPS細胞株でも確認されたため、本研究で、高効率かつロバスタな、動物由来成分を含まない誘導法の開発に成功した。

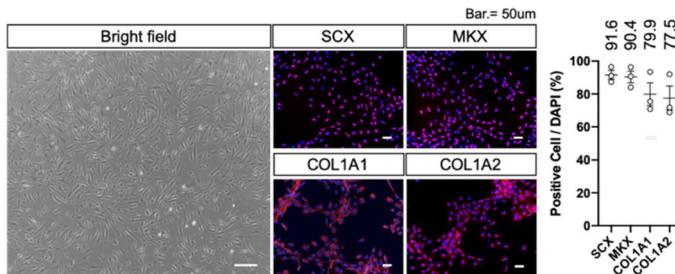


図3 新規誘導法で誘導された靭帯節細胞の多くはSCX、MKX、COL1A1、COL1A2などの靭帯節細胞マーカーを発現する。

靭帯節細胞の濃縮法の開発

既存の靭帯節細胞の表面抗原マーカー、および網羅的遺伝子発現解析から新たに見出した表面抗原マーカーの市販抗体を購入し、靭帯節細胞の濃縮を試みたところ、いくつか有望な抗体が見つかった。しかし、この分化誘導法の変更で90%近く靭帯節細胞が誘導できることが分かってきたため、これ以上のFACSによる濃縮については一旦 pending とし、体内での機能検証に注力した。

立体的靭帯組織構築・成熟化

将来的な医療応用を目指し、スフェア化した靭帯節細胞を立体構築することで、靭帯様の組織を構築できないか試みた。主に、スフェアの形成方法、スフェア同士の接着性の有無、立体構築後の循環培養による成熟化の3項目を検討した。スフェア形成については低接着プレートを使用し、播種細胞数をコントロールすることで、スフェアの構造を作ること成功した。しかしスフェア同士の接着性に課題があり、スフェアから立体を構築することは困難であった。そこで、立体構築は一旦 pending とし、靭帯節細胞そのものの再生医療応用の可能性を、体内で検証した。

移植による体内機能の検証

もともとの計画では体内で立体構築した靭帯組織を、ラットのアキレス腱切断モデルに移植することで靭帯組織の再生を促し、体内機能を検証する予定であった。しかし体内での立体構築でスフェア同士の接着が困難であるという結果が得られたため、計画を変更し、マトリゲルと靭帯節細胞を混ぜた混合液をラットのアキレス腱切断モデルの断裂箇所に移植することで、靭帯節細胞そのものが持つ靭帯再生能力を検証した。歩行時の機能回復をキネマトレサーによる歩行解析とアキレス機能インデックスによる行動解析で検証し、また組織学的評価としてコラーゲン等の細胞外マトリクスタンパクの抗体染色やトリクローム染色、組織配向性を検証したところ、移植群は非移植群と比べて有為に組織像も機能も回復が早まっていることが分かった。

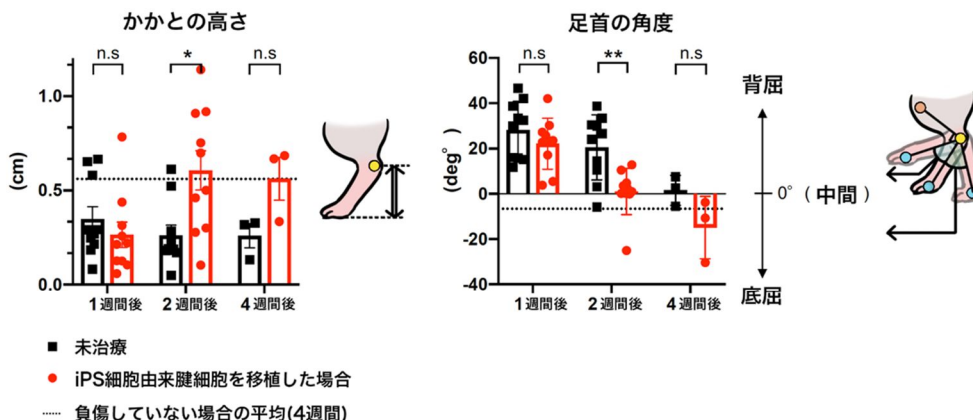


図4 移植後のラットの運動学的評価

トレッドミルを歩行させた移植後1週間、2週間、4週間のラットのかかとの高さ(左)と足首の角度(右)。移植後1週間と2週間:n=10、移植後4週間:n=3。点線は負傷していないラットの平均値を示す。*: P < 0.05, **: P < 0.01, n.s.: not significant (有意差なし)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakajima Taiki, Nakahata Akihiro, Yamada Naoki, Yoshizawa Keiko, Kato Tomoaki M., Iwasaki Mio, Zhao Chengzhu, Kuroki Hiroshi, Ikeya Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Grafting of iPS cell-derived tenocytes promotes motor function recovery after Achilles tendon rupture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25328-6	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 Nakajima Taiki, Ikeya Makoto	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of pluripotent stem cell based human tenocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 38~46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12702	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto Ikeya
2. 発表標題 Achilles tendon recovery using iPSC-derived Syndetome (tenocytes).
3. 学会等名 CiRA 2022 International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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 分 担 者	上谷 大介 (Kamiya Daisuke) (30462675)	京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	趙 成珠 (Zhao Chengzhu) (50778678)	京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員 (14301)	

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