

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659785

研究課題名(和文)一過性血管導入による革新的ヒト軟骨再構成法の開発

研究課題名(英文)Efficient cartilage generation from human progenitors by recapitulating transient vascularization

研究代表者

武部 貴則 (Takebe, Takanori)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20612625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高効率な弾性軟骨創出法の開発を目指し、まず軟骨の生理分化プロセスに必要な細胞間相互作用の解明を試みた。発生初期の耳介軟骨を独自のライブ観察系に導入しin vivoにおいて追尾定点観察を行ったところ、一過的に血液灌流が生じ血管内皮細胞が侵入することを見出した。次に、近年我々が同定したヒト軟骨前駆細胞を用いて、血管内皮細胞との共培養を行った所、in vitroで自律的に三次元組織を構築した。この三次元組織は、生体内への移植により、従来法と比べ高効率に弾性軟骨を再構築した。本技術によれば成長因子や足場材料が不要であり、安全性やコスト面で極めて有益な弾性軟骨再構築技術になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we report that avascular elastic cartilage could be efficiently regenerated from in vitro grown mesenchymal condensation by recapitulating early chondrogenesis. Combined with an intravital imaging approach, we identified the presence of endothelial cells inside the mesenchymal condensation prior to cartilage maturation. Strikingly, recreating endothelial interaction in culture enabled the recently identified adult progenitors to generate a mesenchymal condensation in vitro in a self-driven manner without any support of exogenous factors nor scaffolds. These in vitro grown 3-D condensed progenitors much efficiently reconstructed three-dimensional elastic cartilage upon transplantation compared with conventional methods. Thus, the transplantation of condensed progenitors with endothelial cells represents a promising new approach towards realizing regenerative medicine as well as studying the mechanism of vascular regression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：移植・再生医療 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域の組織変形に対し優れた弾性軟骨再生治療を開発することは、全世界で100万人以上の患者に待ち望まれている。申請者は再生医療の実現化を目指し、弾性軟骨であるヒト耳介軟骨膜に存在するヒト軟骨幹細胞の分離・培養法などの細胞操作法を確立してきた (Takebe, T., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 14479-14484, 2011)。これらの幹細胞を用いた再生治療を実現化するためには、in vitroにおいて成熟軟骨細胞へ終末分化誘導する方法論の開発が急務である。従来の培養技術では、ゲル状の軟骨様細胞が誘導されるに過ぎず、組織変形の再建術に使用可能な力学的強度を有した軟骨組織は得られない。これは関節領域における硝子軟骨の分化誘導においても、共通の未解決課題となっている。

これら従来法の課題を解決するため、申請者は生理的な軟骨分化プロセスの再現化が必要と考え、独自解析から未分化細胞からの軟骨再生過程においては、血管系細胞の侵入とそれに続く血管排除が分化過程において生じることを明らかとしている。したがって、終末分化細胞を得るためには、従来全く着目されなかった 1. 血管形成に伴う相互作用と、2. 形成された血管の排除、の両者を伴う生理分化プロセスの精緻な再現化が必須と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 発生の初期において、未分化な間葉系細胞から分化した軟骨前駆細胞が出現し、間充織凝集を経て、軟骨細胞へ分化・成熟することで、軟骨組織が形成される。しかし、軟骨前駆細胞の生理分化プロセスには未だに不明な点が多い。そこで本研究では、これまで全く未解明であった生理分化プロセスを明らかにすることを試みた。

(2) 現時点でヒト耳介由来軟骨幹細胞の純化が可能であるのは、世界で唯一、我々の研究グループのみである (Takebe, T., et al. PNAS 2011)。本研究では、一連の実験系において確立された幹細胞分離法とクローナルな解析系を発展さ

せて、ヒト軟骨幹細胞を起点とした軟骨組織構築過程における血管系細胞との時空間的相互作用を独自のライブ観察系により解析を行う。得られた細胞動態の再現化を目指し、足場材料によることなく血管内皮細胞を三次元的に配置し、ヒト軟骨前駆体を作成する。さらに、血管排除に関わる細胞外マトリクス分子等を組み合わせることにより、一過的に血管構造を導入し、三次元的なヒト弾性軟骨再構成を可能とする培養系を構築する。それらの相互作用を再現化することによる高効率な弾性軟骨創出法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) クラニアルウインドウを用いた共焦点顕微鏡による追尾観察

6週齢のNOD/SCIDマウスを、三協ラボサービス株式会社より購入した。購入したマウスは、横浜市立大学 先端医科学研究センター 共同研究支援部門動物実験センター内において飼育・維持され、これらを用いた動物実験に関しては、横浜市立大学福浦キャンパス動物実験指針に則って行った。クラニアルウインドウ作製は主にYuanらの方法に従って行った。作成されたクラニアルウインドウマウスにケタラール・キシラジン混合麻酔を腹腔内投与後、GFP-mouse (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP))(日本 SLC)の未成熟な軟骨組織や細胞の観察を行った。観察には、共焦点顕微鏡(Leica)を用いた。

### (2) 三次元組織化の誘導

24-well plateにMatrigelを添加し、インキュベーター内で30分静置した。1.0x10<sup>5</sup> cells/mlの軟骨膜細胞、HUVECの各細胞懸濁液を混合し、細胞をウェルに播種した。誘導した三次元組織をクラニアルウインドウ内に移植し、肉眼および共焦点顕微鏡によるライブイメージングを実施するとともに、移植15、30、60日後に摘出し、組織化学染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 軟骨形成プロセスの追尾定点観察

E17.5のEGFP遺伝子改変マウスの耳介軟骨をクラニアルウインドウ内に移植し、共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングを行うことで、軟骨前駆細胞が成熟軟骨細胞に分化するまでの追尾観察を行った。肉眼観察で、移植後1、2日目に、移植片の血管とホストマウスの血管の吻合が起き始めていることを確認できた。しかし、移植後5日目以降は、完全に血管が吻合していることが確認された。移植後5日目から血管が徐々に退行していき、移植後11日目には、ほぼ完全に血管が移植片から退行していた (Fig.1A,B)。tetramethylrhodamine-conjugated dextran と mouse specific CD31 (mCD31) antibody を血管内に投与することでマウスの血管内皮細胞と血流を可視化したところ、移植後3日目に、血流を有した血管が移植した耳介軟骨に侵入していることが確認できた。移植後7日目には、一部の血管内皮細胞だけ残し、血管網は退行していた (Fig.1B)。同時に、円形の形態をしている軟骨前駆細胞が、軟骨細胞と同様な敷石状の形態へと変化していた。移植後10日目には、移植した耳介軟骨からは血管が完全に退行した (Fig.1C)。移植後20日目に、軟骨組織を包むように血管を有した軟骨膜組織を形成し、軟骨組織を構成する細胞は敷石状の形態を示した (Fig.1C,D)。さらに、血管退行が開始する移植後5日目以降から、移植した発生初期の耳介軟骨が成長していくことが確認でき、軟骨前駆細胞の活発な増殖が示唆された。

血管内皮細胞を支持している基底膜の構成タンパク質であるラミニン、血管内皮細胞マーカーであるmCD31により、E18.5、P0、P2、P10、P30の発達段階の耳介軟骨をクリオスタットで凍結組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。E18.5の段階で、ラミニン、mCD31を発現する細胞が軟骨形成予定部位に存在していた。P0では、E18.5と比較して血管が多く存在し、P2で最も多くの血管を確認できた。一方で、P10では、血管をわずかに観察することができたが、P30では全く観察することは出来なかった。

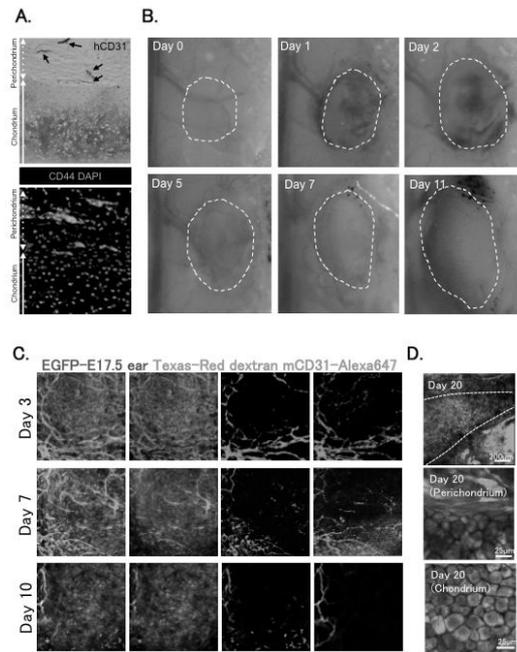


Fig.1 軟骨形成プロセスの追尾観察

### (2) 血管内皮細胞との共培養による軟骨前駆細胞の三次元組織化

軟骨前駆細胞と内皮細胞との相互作用を再現することによる、足場材料や成長因子を使わない三次元培養系を開発した。ヒト軟骨前駆細胞とHUVECをマトリゲル上で共培養すると、播種後12時間で細胞が少しずつ凝集していき、48時間後には直径約3mmの三次元構造を自律的に形成した (Fig.2A)。また、あるd、e、fの固さを有したゲルに播種したときに、軟骨前駆細胞が凝集した (Fig.2B)。この三次元組織は、一定の力学強度を有しており、形状を崩すことなく、薬さじですくい上げることでマウスのクラニアルウインドウ内に移植することが可能であった。肉眼で、E17.5のマウスの未成熟な耳介軟骨を移植した時と同様に、移植3日後に、移植片への血流が再開し始めたことを観察した。移植10日後には、完全にHUVECとマウスの血管が吻合することで、移植片内に血管網が構築されていることが確認でき、一過的な血管侵入を再現することが出来た (Fig.2C)。血管侵入している部位を追尾観察していくと、移植30日後では、血管網が完全に無くなり、軟骨前駆細胞は、軟骨細胞と同様な敷石状の形態に変化していた。ライブイメ

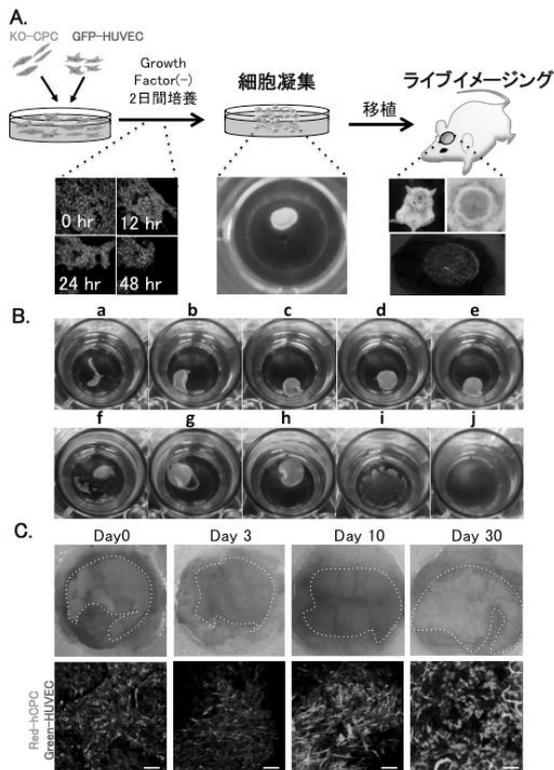


Fig.2 血管化軟骨移植による弾性軟骨の創出

ーシング解析でも同様に、移植 3 日後には HUVEC が血管網を構築し、移植 30 日後には完全に退行することが確認できた。移植した三次元組織が軟骨組織を形成したか、組織学的解析により確認したところ、血管が侵入していた移植 3 日後ではアルシアンブルー染色により染色されることはなかったが、移植 15 日後では一部分が青く染色された。血管の完全に退行した移植 30 日後には、一部が濃い青色に染色されており、移植 60 日後には、移植した三次元組織の大部分がアルシアンブルー染色により濃青色に染色された。このことから、軟骨前駆細胞と HUVEC を共培養することで構築した三次元組織が、プロテオグリカンを産生する軟骨組織を形成したことが確認できた。また、移植 30 日後の段階で、サフラニン O 染色でも軟骨が再構築していること確認でき、エラスチカ・ワンギーソン染色により形成した軟骨は弾性軟骨であることが確認できた。免疫組織化学染色により、再構築した軟骨は、アグリカン陽性である軟骨組織を包み込むように、型コラーゲン陽性である軟骨膜組織を有していることが示された。また、hCD31 の免疫組織化学染色により、再構築した

軟骨膜組織に血管内皮細胞が存在していることが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Mitsuru Mizuno, Shinji Kobayashi, Takanori Takebe, Hiroomi Kan, Yuichiro Yabuki, Takahisa Matsuzaki, Hiroshi Y. Yoshikawa, Seiichiro Nakabayashi, Lee JeongIk, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi. Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage. *Stem Cells*, 32(3)、査読有、2014 Mar、816-821

DOI : 10.1002/stem.1529

Takanori Takebe\*, Ran-Ran Zhang, Hiroyuki Koike, Masaki Kimura, Emi Yoshizawa, Masahiro Enomura, Keisuke Sekine, Hideki Taniguchi\*: Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols*, 査読有、9(2)、2014 Feb、396-409(\*:Correspondence)

DOI : 10.1038/nprot.2014.020

Takanori Takebe\*, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, Hideki Taniguch\*: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 査読有、499、2013、481-484(\*: Correspondence)

DOI : 10.1038/nature12271

他 17 件、計 20 件

〔学会発表〕(計 50 件)

武部貴則、吉川洋史、谷口英樹：臓器原基創出法を活用した多細胞系からなる複雑な立体組織の人為的構成 第 13 回日本再生医

療学会 Mar.4-6, 2014 国立京都国際会館  
(京都府) シンポジウム、招待講演

Mizuno M, Takebe T, Kobayashi S, Lee S, Jo YH, Lee JI, Taniguchi H: Phenotypic comparison of canine articular and auricular derived chondrocytes for cartilage reconstruction. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep.2-6, 2013 Kyoto, Japan.

Takebe T, Kobayashi S, Mizuno M, Suzuki H, Chang Yu-Min, Yoshizawa E, Maegawa J, Taniguchi H.: Transient vascularization directs intrinsic cartilage formation from human progenitors. International Society for Stem Cell Research 11<sup>th</sup> annual meeting. Boston, USA, Jun 12-15, 2013 (Poster)

武部貴則、小林眞司、谷口英樹：ヒト耳介由来軟骨前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発。第12回日本再生医療学会シンポジウム「組織幹細胞の最前線」Mar 21-23, 2013 パシフィコ横浜(神奈川県)

Mizuno M, Kobayashi S, Takebe T, Suzuki H, Murata S, Yabuki Y, Hiroto K, Yasumura K, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstitution of Articular(joint) cartilage defects by auricle(ear) derived stem/ progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012

武部貴則、小林眞司、矢吹雄一郎、鈴木啓、水野満、安村和正、広富浩一、鄭允文、前川二郎、谷口英樹：ヒト耳介軟骨膜由来幹/前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発 第11回日本再生医療学会 Jun.12-14, 2012 パシフィコ横浜(神奈川県)

国際・国内学会合わせ、他44件、計50件

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

名称：生物学的組織に血管系を付与する方法

発明者：武部貴則、谷口英樹、高橋禎暢

権利者：同上

種類：特願

番号：2013-153056

出願年月日：2013.7.23

国内外の別：国内

他4件、計5件

取得状況(計1件)

名称：軟骨細胞の調製方法

発明者：武部貴則(50%)、谷口英樹(35%)、小林眞司(15%)

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2014/57673

取得年月日：2014.3.20

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais ei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20612625

(2) 研究分担者

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70292555

小林 眞司 (KOBAYASHI, Shinji)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：90464536