

博士論文

ブタ関節軟骨欠損モデルにおける
iPS 細胞移植を用いた関節再生の評価

宇都 さくら

目次

1. 要旨	4
2. 序文	5
3. 方法	1 2

試薬と抗体

動物

細胞

試薬の調製

フィーダー細胞の作製

マウス iPS 細胞の培養

ミニブタ骨髄幹細胞の単離、培養

ミニブタ iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞の培養

マウス iPS 細胞、ミニブタ MSC、およびミニブタ iPS 細胞の軟骨分化誘導培養

Total RNA の抽出と鋳型 cDNA の合成

RT-PCR および realtime RT-PCR による分化マーカーの発現測定

マウス iPS 細胞のマウス関節軟骨欠損モデルへの移植

ミニブタ関節軟骨欠損モデル移植用足場素材の作製

ミニブタ MSC および iPS 細胞、ヒト iPS 細胞のミニブタ膝関節軟骨欠損モデルへの移植

血液所見による血中薬物濃度および全身状態の評価

組織学的評価

4. 結果 3 4

マウス iPS 細胞のコラーゲン 3 次元包埋培養による遺伝子発現変化

マウス iPS 細胞の関節軟骨欠損モデルへの移植

ミニブタ iPS 細胞のコラーゲン 3 次元包埋培養による遺伝子発現変化

ミニブタ iPS 細胞の関節軟骨欠損モデルへの移植

ヒト iPS 細胞のミニブタ関節軟骨欠損モデルへの移植

5. 考察と結論 4 4

6. 謝辞 5 8

引用文献 5 9

図と図説 7 6

要旨

軟骨は自己修復能力及び身体における割合の低い組織であり、軟骨の欠損で生活の質が低下する。組織工学を用いた軟骨再生医療が開発されているが、その細胞源とされる軟骨細胞や骨髄間葉系幹細胞には大量培養時に細胞の劣化などの課題がある。前述の課題を持たない細胞として ES 細胞や iPS 細胞があるが、ES 細胞には生命倫理の課題がある。本研究では残る iPS 細胞の可能性を探索した。iPS 細胞を分散後にコラーゲンゲルに混和するだけで未分化性が弱くなることが示された。また変形性膝関節症の動物モデルを作製し同部位へ未分化 iPS 細胞を移植したところ iPS 細胞由来の再生軟骨が認められ、iPS 細胞が軟骨再生医療における細胞源として有望であることが示された。

序文

軟骨は生活の質を維持する上で重要な役割を果たす組織である。軟骨が欠失する要因は先天性疾患である小耳症から加齢性疾患である変形性関節症までと多岐にわたる。しかし、軟骨は自己修復能力の低い組織であるため[19, 26, 27, 33, 73, 74]、欠失に対しては自家組織移植あるいは人工物の移植が必要となるため治療に難渋する。例えば、小耳症に対しては従来、肋軟骨の移植を行ってきたが、この治療法には術後胸郭に変形を残すという問題点があった。一方の変形性関節症に対する治療法は人工関節置換術などである。いずれにせよ、軟骨という臓器そのものを治す根本的な治療はこれまでにはなかった。しかし、近年、修復できなかった軟骨を再生させる方法として、組織工学を応用した軟骨再生医療が開発された。

再生医療では、疾患や手術などで失われた臓器やその機能を、幹細胞などの細胞を用いて組織工学などを活用することで再構築することを指す。軟骨再生医療においては細胞源として、成熟細胞（軟骨細胞）、間葉系幹細胞、および多能性幹細胞の3つが挙げられる。成熟細胞（軟骨細胞）を用いる方法としては、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社による自家軟骨細胞を単離してアテロコラーゲンに包埋培養し、小型の関節軟骨損傷部に移植する“JAC”が既に製品化されており、また、われわれのグループは自家軟骨細胞を培養してア

テロコラーゲンに包埋し、ポリ乳酸製の足場素材に浸透させて鼻背に移植する
“インプラント型再生軟骨”を開発した。間葉系幹細胞を *in vivo* に移植して、
再生軟骨を形成した報告については、ウサギ関節軟骨欠損モデルへ未分化な滑
膜由来間葉系幹細胞を移植して再生軟骨の形成を観察した報告がある[29]。また、
滑膜由来間葉系幹細胞で3次元再構築物”TEC”を作製し、ブタの関節軟骨欠損
モデルに移植して、再生軟骨の形成を観察した報告もある[55]。これらの細胞
を組織工学における細胞源として使用するに当たり、問題となるのは、軟骨細
胞においては継代培養に伴い軟骨特性を失う脱分化[27,68]であり、そのため、
十分な軟骨細胞数を確保するのが困難であることが挙げられる。もう一つの細
胞源である間葉系幹細胞においては、細胞採取時における侵襲や増殖培養に伴
う多分化能や増殖速度の低下が課題である[25]。

以上を考慮すると、軟骨再生医療においても、細胞源として多能性幹細胞
を活用することを検討する価値はある。多能性幹細胞には1981年に樹立された
胚性幹細胞(ES細胞)[8]と、2006年に樹立された人工多能性幹細胞(iPS細胞、
induced pluripotent stem cell)がある(Takahashi et al, Cell, 2006)。iPS細胞の
作出以前は、ES細胞を再生医療の細胞源として活用しようとした研究が盛ん
に行われてきた[7, 12, 39, 57, 58, 64, 70]。そのため、多能性幹細胞の多分化能や
幹細胞特性の多くはES細胞の研究によって理解されてきた。

まずは、軟骨細胞への分化制御についてであるが、ES 細胞を *in vitro* で軟骨細胞へ分化させた報告は多くみられる[49, 70]。しかしその多くは軟骨細胞の分化マーカーの遺伝子発現の上昇を示しているものの、これらの報告は蛋白レベルや組織学的に十分な軟骨の細胞外基質を産生するものではなかった。一方、ES 細胞を分散させてコラーゲンゲルに混和し、*in vivo* の環境に移植した報告がある[64]。この報告では、前述の処理をしたマウス ES 細胞を免疫抑制剤投与下のラットの関節軟骨欠損モデルに移植しており、その結果、ES 細胞由来の再生軟骨を形成している。すなわち、*in vivo* 環境下、特に関節腔内に置くことで、骨髄や滑液より分化誘導に必要な生理学的刺激や膝関節の屈伸運動などの機械的刺激により ES 細胞が軟骨組織に分化するのを観察している。ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊より樹立することから、自家移植が不可能であり、移植は異種ないし同種に限られてしまう。このため、ES 細胞移植においては免疫抑制剤の使用が不可避である。免疫抑制剤投与下では、移植物が容易に生着するため、移植後の細胞の挙動に対して正確な評価がなされているとはいえない。

それに対し、iPS 細胞は成熟した細胞から多能性感細胞を樹立することができるため、自家移植が可能である。そのため、iPS 細胞の作出以来、軟骨再生医療における細胞源として iPS 細胞の可能性が論じられるようになった。動物実験レベルでも、自家移植ないし、MHC が一致する他家移植が可能な iPS 細胞を免

疫が正常な動物に移植することで、正常免疫下における移植された iPS 細胞の挙動を正確に評価できると考えられる。

しかしながら、iPS 細胞を *in vivo* に移植した実験の多くは奇形腫を形成している[31、38、44、49、60、61]。iPS 細胞の腫瘍化の可能性を排除し、さらに移植した細胞の分化と組織再生を確実に誘導するために最適なものは、移植前の、*in vitro* の段階で対象組織を再生・成熟させることである。iPS 細胞を *in vitro* で対象の組織細胞にまで分化させて同系移植をし、移植片の生着と機能付与に成功した報告は複数ある。これらの報告は、網膜、脊髄および心筋が挙げられる。網膜については、Takahashi らがサル iPS 細胞を樹立し、さらにサル iPS 細胞を網膜上皮細胞への分化誘導に成功したことを報告している。さらにこの網膜上皮細胞をサルへ自家移植したところ、移植片が半年以上生存し続けたことをも報告されている。この報告については、厚労省の承認のもと、世界初の iPS 細胞の臨床応用に向けて準備が進められている。脊髄については、Tsuji らがマウス iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導をかけて、脊髄損傷モデルマウスへ移植したところ、移植した細胞の生着と脊髄機能の回復を確認したと報告している。また Kawamura らはヒト iPS 細胞を心筋へ分化誘導をかけて、心筋梗塞モデルブタに移植したところ、移植した細胞の生着と心機能の改善を確認したと報告している[17, 22, 32, 49, 63]。しかし、対象組織への分化誘導および組織形成に

は莫大な費用と手間および期間や非常に高度な技術を要する上に、いずれも細胞を注入する細胞療法やシート状の細胞を貼付する治療であり、関節損傷のような軟骨組織の3次元的な再建を要する組織の再生では、組織の生存性が懸念され、中心壊死などを引き起こしかねないため不向きである。むしろ、移植前には未熟であっても生存性の高い十分量の組織を得て、腫瘍化を回避するための必要最小限の移植前処置を行い、かつ移植後の細胞環境を追求する方が重要であると筆者は考えた。これらを満たす条件が明らかになれば、安全でかつ高効率な iPS 細胞を用いた軟骨再生治療を容易に提供できることになる。

生体内における腫瘍細胞は、周囲より制御を受けることなく過増殖する。また、腫瘍細胞は悪性度が進むにつれて分化度が低下し、細胞としての性質が幹細胞に近づく。実際に、多能性幹細胞を、多能性を維持したまま移植すると腫瘍化を起こす[31, 47]。従って多能性幹細胞を移植するに当たり、腫瘍化の危険性を回避するためには多能性を失わせることが重要になると思われる。腫瘍化の制御に当たっては、多能性幹細胞の多能性維持と細胞間接着因子との関係を利用することが適切と考えられる。多能性幹細胞は E-cadherin などの細胞間接着因子により多能性を維持しているといわれている[46, 51, 57, 75]。したがって、多能性幹細胞を分散、コラーゲンへの包埋後に *in vivo* へ移植した文献を併せて参照すると逆に、細胞を分散させて E-cadherin などによる細胞間接着を強制的

に切断し、ハイドロゲルに包埋することで細胞の分散状態を維持することは幹細胞の多能性を失わせると考えられる。筆者は、移植する多能性幹細胞の腫瘍化を回避する必要最低限の処理は細胞間接着を切断することと仮説し、切断状態を維持するために医療用のハイドロゲルとして広く用いられているコラーゲンゲルを活用することを検討した。本研究の目的は、自家移植あるいはそれに類する同系（純系）移植が可能な多能性幹細胞である iPS 細胞を、細胞分散やコラーゲンゲル包埋などの最小限の細胞処理の後、特異的な分化誘導をかけることなく、軟骨部に直接投与することのみで、軟骨や骨などといった関節を構成する組織に分化しうることを明らかにし、iPS 細胞が軟骨再生医療における細胞源として有望であることを示すことである。そのため、本研究ではまずマウスおよびミニブタ iPS 細胞を、分散させてコラーゲンゲルに混和することにより、iPS 細胞の多能性を抑制しうることを、in vitro の培養系を活用し、多能性マーカー遺伝子および初期中胚葉系マーカー遺伝子、軟骨分化マーカー遺伝子の発現の推移を評価し確認した。ついで、マウスおよびミニブタ iPS 細胞を、作出したそれぞれの同系動物ないしそれに準ずる動物における関節軟骨欠損モデルに移植し、組織像による再生軟骨および再生骨の形成を確認した。また、ミニブタモデルにおいてはホストとドナーの性別を分けて、Y 染色体の有無を蛍光 in situ-hybridization で検出し、ドナー由来の組織であることを確認した。

最後に、ヒト iPS 細胞における可能性を検証するため、ヒト iPS 細胞を免疫抑制剤投与下のオスのミニブタ関節軟骨欠損モデルへ移植し、再生軟骨の形成を確認した。これらの結果を併せて iPS 細胞が軟骨再生医療における細胞源として有望であることを確認した。

方法

試薬と抗体

COMPLETE ES CELL MEDIA W/ 15% FBS SERUM AND LIF、STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic (OKSM) Lentivirus Reprogramming Kit は Millipore (マサチューセツ、アメリカ合衆国) より購入した。高グルコース Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液、Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 GlutaMAX supplement (DMEM/F12 GlutaMAX)、非必須アミノ酸 (NEAA)、2-メルカプトエタノール、Knockout Serum Replacement (KSR)、サイバークリーン、トポベクター、Minimum Essential Media (MEM)、TryPLE Select、ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン B 溶液、トリプシン・EDTA 溶液、L-グルタミン、抗 GFP ウサギ血清は Life Technologies (カリフォルニア、アメリカ合衆国) より購入した。MSCGM Bullet Kit は Lonza (バーゼル、スイス) より購入した。マウントクイックは大同産業 (東京 日本)より購入した。

MEM α 、リノール酸、BSA、アスコルビン酸、デキサメタゾン、DMEM、、亜セレン酸塩、トランスフェリン、マイトマイシン C、ゼラチン Type B、SSC バッファーは Sigma Aldrich (ミズーリ、アメリカ合衆国) より購入した。ギ酸、クエン酸三ナトリウム二水和物、TGF β 3、キシレン、過酸化水素水、メタノー

ル、エタノール、イソプロパノール、クロロホルム、KCL、Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) 阻害剤 Y-27632、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液、ペプシン、1 N 塩酸、ホルムアミドは和光純薬（大阪、日本）より購入した。GFP 標識ブタ Y 染色体プローブはクロモソームサイエンス（北海道、日本）より購入した。

3%アテロコラーゲンインプラントは高研（東京、日本）より購入した。ノボリン R はノボノルディスクファーマ（東京、日本）より購入した。フィブラストスプレーは科研製薬（東京、日本）より購入した。PrimeScript RT-PCR Perfect Real Time, TaKaRa Ex Taq Hot Start Version、アガロースはタカラバイオ（滋賀、日本）より購入した。Isogen、エタ沈メイト、One Step Ladder, 6x Loading Buffer Triple Dye、50xTAE Buffer はニッポンジーン（大阪、日本）より購入した。10%正常ヤギ血清はニチレイバイオサイエンス（東京 日本）より購入した。HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体は Thermo Fisher Scientific (マサチューセツ、アメリカ合衆国) より購入した。DAB 及び VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI は Vector Laboratories (カリフォルニア、アメリカ合衆国) より購入した。ヘマトキシレンおよびエオジンはサクラファインテックジャパン（東京、日本）より購入した。セルバンカーは三菱化学メディアエンス（東京、日本）より購入した。ES/iPS 細胞剥離液（CTK 溶液）および

ES/iPS 細胞凍結保存液（ガラス化法）はリプロセル（神奈川、日本）より購入した。

ソムノペンチルは共立製薬（東京 日本）より購入した。生理食塩水は大塚製薬（東京 日本）よりアトロピン硫酸塩注は田辺三菱製薬（大阪 日本）、キシロカインゼリーはアストラゼネカ（大阪 日本）、セラクターはバイエル薬品（大阪 日本）より購入した。フローセンは武田薬品（大阪、日本）より購入した。プログラフはアステラス製薬（東京 日本）、タクロリムスはファイザー（東京 日本）、ビクタスは DS ファーマ（大阪 日本）より購入した。

動物

8 週齢の DBA マウスおよび C57BL/6 マウス、妊娠 ICR マウスは日本クレア（東京、日本）より購入した。約 6 か月齢のクラウン系ミニブタはジャパンファーム（鹿児島、日本）より購入した。

細胞

マウス iPS 細胞は、多能性マーカーである *Nanog* のプロモーター領域に EGFP を導入した株（ASP0001 iPS-MEF-Ng-20D-17）（以後 *Nanog* GFP iPS と呼ぶ）を独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター（茨城県、日本）より購入した。*Nanog* GFP iPS 細胞は、マウス胎児線維芽細胞にレトロウイルスで山中 4 因子（*Oct3/4*、*klf4*、*c-myc*、*sox2*）を導入して樹立したものであった。ほ

ば全身の組織細胞において CAG プロモーターにより EGFP を発現し、緑色蛍光を呈するグリーンマウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131Osb) の体細胞より樹立した iPS 細胞 (以後グリーンマウス iPS と呼ぶ) は東京大学医科学研究所 ERATO 中内幹細胞制御プロジェクトのご厚意により供与していただいた。グリーンマウス iPS 細胞は成獣の骨髓血球系細胞にレトロウイルスで山中 4 因子を導入して樹立したものであった。ヒト iPS 細胞 (HPS0002) は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (茨城県、日本) より購入した。

クラウン系ミニブタ iPS 細胞はクラウン系ミニブタ線維芽細胞に STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic (OKSM) Lentivirus Reprogramming Kit を用いて山中 4 因子を導入して作製した iPS 細胞を使用した。

試薬の調製

0.1%ゼラチン液は、ゼラチン Type B 5.0 g を蒸留水 500 mL に溶解後、オートクレーブ滅菌 (121°C 20 分) した 1%ゼラチンストック液を蒸留水で 10 倍希釈後、オートクレーブ滅菌して調製した。この 0.1%ゼラチン液をポリスチレンディッシュ内の底面を覆うように添加し、37°Cインキュベーター内で 30 分以上静置したディッシュをゼラチンコートディッシュとした。ゼラチンコートディッシュ内に残存するゼラチン液は使用直前に除去した。

MEF 培地は、高グルコース DMEM 500 mL に FBS 50 mL、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 5 mL を加えて調製した。

ミニブタ iPS 細胞培地は、DMEM/F12 Glutamax 500 mL にペニシリン・ストレプトマイシン溶液 6 mL、KSR 100 mL、NEAA(x100) 6 mL、0.1 M 2-メルカプトエタノール 600 μ L、500 ng/mL bFGF 溶液 600 μ L を加えて調製した。

ヒト iPS 細胞培地は、DMEM/F12 Glutamax 415 mL にペニシリン・ストレプトマイシン溶液 5 mL、KSR 75 mL、NEAA(x100) 5 mL、0.1 M 2-メルカプトエタノール 500 μ L、500 ng/mL bFGF 溶液 500 μ L を加えて調製した。

軟骨分化誘導培地は、MEM α 50 mL にペニシリン・ストレプトマイシン溶液 500 μ L、3500 μ g/mL グルコース、6.25 μ g/mL インスリン、6.25 μ g/mL トランスフェリン、6.25 ng/mL 亜セレン酸塩、5.33 μ g/mL リノール酸、1.25 mg/mL ウシ血清アルブミン、10 ng/mL TGF β 3、100 nM デキサメタゾン、50 μ g/mL アスコルビン酸リン酸を加えて調製した。

フィーダー細胞の作製

妊娠 12 日目の ICR マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、70%エタノールにて腹部を清拭ののち清潔操作にて開腹し、妊娠子宮を全適し、氷上で PBS にて 4 回洗浄した。その後子宮を切開して胎嚢を摘出し、同様に PBS で 2 回洗浄後、胎嚢を切開して胎児を摘出し、胎盤を切除した。残った胎児を PBS にて 2 回洗浄

し頭部、尾部、四肢および胸郭・腹部臓器を除去した。残った体壁を細切し、0.05%トリプシン・EDTA で 37°C30 分振盪後、MEF 培地を 2 倍量投与して中和した。その後細胞懸濁液を 100 μ mセルストレーナー (BD ファルコン、ニュージャージー アメリカ合衆国) でろ過し、ろ液を 410g、5 分間遠心して得られたマウス胎性線維芽細胞 (MEF) を胎児 1 匹あたり 10cm ポリスチレンディッシュ (BD ファルコン) 1 枚の割合で、MEF 培地 10 mL に懸濁し播種した。5%CO₂、37°Cの環境下でコンフルエントになるまで 3 日間培養した。マイトマイシン C 処理した 2 継代以内の MEF をフィーダー細胞として使用した。なお、マイトマイシン C 処理の方法は以下の通りである。コンフルエントになった MEF にマイトマイシン C を 10 μ g/mL になるように培地に添加し、37°C、5%CO₂ 環境下で 90 分インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し新たにマイトマイシン C を含まない MEF 培地を 10 mL 加えて 37°C5%CO₂ 環境下で 2 時間インキュベートし、これをフィーダー細胞とした。作製したフィーダー細胞は使用するまで細胞凍結保存液 (セルバンカー) に懸濁し、-80°C保存した。

マウス iPS 細胞の培養

マウス iPS 細胞の播種に先立ち、ゼラチンコートディッシュに MEF 培地にてフィーダー細胞を播種し、37°C5%CO₂ 環境下で 1 晩インキュベートした。翌日、

冷凍保存したマウス iPS 細胞を解凍し、前日に準備したフィーダー細胞上に COMPLETE ES CELL MEDIA W/ 15% FBS SERUM AND LIF にて 37°C5%CO₂ 環境下で培養した。培地は毎日交換し、概ね 3 日毎に継代をおこなった。なお、継代操作は以下の手順でおこなった。PBS による 2 回の洗浄ののち、0.5×のトリプシン・EDTA を室温で 30 秒作用させてから一旦酵素を除去し、さらに室温で 2 分経過してから 5 倍量の血清入りの培地で回収し、20 回のピペッティングののち、100g 1 分間の遠心にて回収し、新たに前日に準備しておいたフィーダー細胞培養シャーレ上に継代した。(スプリット比 1:3~1:10)

ミニブタ骨髄幹細胞の単離、培養

ミニブタの実験は倫理委員会の実験計画承認のもと実施した。(承認番号：医-P10-009)

6 か月齢の雄性クラウン系ミニブタを深麻酔後に 1 M KCL の静注にて安楽死させた。その後、脛骨、大腿骨、上腕骨および橈骨を摘出した。骨表面を 1% ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン添加 PBS で 3 回洗浄後、ダイヤモンドカッティングマシン (EXAKT ノルダーシュテット ドイツ) にて骨を適当な大きさに切断し、骨髄を露出させた。鋭匙による搔爬にて骨髄を回収し、抗生剤入り培地 (DMEM, 1%ペニシリン・ストレプトマイシン) に懸濁させセルストレーナーでろ過後、500g 5 分間の遠心後、間葉系幹細胞増殖培地

(MSCGM)に再懸濁し、コラーゲンコートディッシュ (Iwaki, 東京 日本)に播種し、5%CO₂、37°Cの環境下で培養した (播種密度=50 万 cells/cm²)。48 時間後に PBS による 2 回の洗浄を経て培地交換し、接着した細胞を骨髄幹細胞 (MSC) とした。培地は週 2 回交換し、MSC はコンフルエントに到達した段階で 2 回の PBS 洗浄を経て接着細胞剥離液 (TrypLE Select) を 37°C15 分作用させて等量の DMEM を加え、500g 5 分間遠心後に回収した。回収した MSC は使用するまで細胞凍結保存液 (セルバンカー) に懸濁し-80°C保存した。

ミニブタ iPS 細胞の培養

培養に先立ち、マウスの iPS 細胞と同様に前日にゼラチンコートディッシュにフィーダー細胞を MEF 培地にて播種した。翌日に液体窒素中で保存したミニブタ iPS 細胞を解凍し、ミニブタ iPS 培地で前日に準備したフィーダー細胞上に播種した。培地は毎日交換し、概ね 5 日毎継代した。継代操作は以下の手順でおこなった。ROCK 阻害剤(Y27632)を 10 μM で添加し、37°C5%CO₂ 環境下で 2 時間インキュベートした。PBS にて 2 回洗浄後、CTK 溶液添加にて 3 分 37°C5%CO₂ 環境下でインキュベートし一旦 CTK 液回収後、さらに 2 分 37°C5%CO₂ 環境下でインキュベートし、5 倍量の血清入り培地で回収後、200g 3 分で遠心し、新たに前日に準備しておいたフィーダー細胞培養シャーレ上に継代した。(スプ

リット比 1:3~1:5)

ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞の培養は、使用する培地がヒト iPS 細胞培地になる以外はミニブタ iPS 細胞の培養と同様にした。

マウス iPS 細胞、ミニブタ MSC、およびミニブタ iPS 細胞の軟骨分化誘導培養

継代時と同様の方法で Nanog GFP iPS 細胞とミニブタ MSC およびミニブタ iPS 細胞を回収し、それぞれの細胞に 3%アテロコラーゲンおよび MEM を加え、 1×10^7 細胞/mL の細胞濃度のアテロコラーゲン懸濁液を調製した（懸濁液に含まれるアテロコラーゲン濃度は 1%）。この懸濁液を $22 \mu\text{L}$ ずつ 15mL コニカルチューブ（BD ファルコン）に分注し、フラッシュにて軽く遠心後、 37°C で 2 時間インキュベートしてゲル化させた。軟骨分化誘導培地をそれぞれ 1.5mL ずつ添加し、 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養した。培地交換は培養期間中に週 2 回実施し、毎回半量(0.75 mL)を交換した。マウス iPS 細胞は軟骨分化誘導前の維持培養時、軟骨分化誘導開始直後（懸濁液のゲル化直後）、軟骨分化培養 1 週間の時点で、ミニブタ MSC および iPS 細胞は共に軟骨分化誘導培養前の維持培養時、軟骨分化培養開始直後（懸濁液のゲル化直後）、軟骨分化誘導 1 週間、2 週間および 3

週間の時点でサンプリングし(n=3)、遺伝子発現解析のために Total RNA を抽出した。

Total RNA の抽出と鋳型 cDNA の合成

サンプリングした細胞より Isogen を用いて Total RNA を抽出した。具体的には、サンプリングした細胞 60~300 万数に対し 1 mL の ISOGEN を加え、ピペティングまたはセルスクレーパーを用いて十分に細胞を溶解させた後、溶液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、21G の注射針を付けた 2.5 mL シリンジで 10-20 回強く吸引・吐出を繰り返しホモジナイズした。その後 200 mL のクロロホルムを加え、10-15 秒間ボルテックスした後、室温で 5 分間静置し、12000g、15 分間、4°C で遠心した。遠心により分離した水層を新しい 1.5 mL エッペンチューブに移し、400 μ L の 2-プロパノールおよび細胞数の少ないサンプルにはさらに 1 μ L のエタ沈メイトを加え、ボルテックスした後、室温で 10 分間静置または 4°C で終夜静置した。そして 12000g、10 分間、4°C で遠心後、上清をデカンテーションし、チューブの底に残ったペレットに 500 μ L の 70% エタノールを加えてボルテックスした。7500g、5 分間、4°C 遠心後、上清をデカンテーションし、フタを空けた状態でエッペンドルフチューブをキムタオル上で約 15 分間静置してチューブ内に残存したエタノールを風乾させた。チューブ内に得られ

た RNA ペレットに 20 μ L の DEPC 水を加え、ピペティングにより溶解させた。この溶液を Total RNA サンプルとした。サンプル中の RNA 濃度は吸光光度法で定量した。以上の方法で抽出した Total RNA を鋳型とし、PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)を用いて cDNA を合成した。具体的な方法は、1 μ g の Total RNA に 5XPrimeScript Buffer 4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L、Oligo dT Primer 1 μ L、および DEPC 水を全量が 20 μ L になるよう添加し、反応液を調製した。この反応液を Veriti サーマルサイクラー (Life Technologies カリフォルニア、アメリカ合衆国) で 37°C15 分間、続いて 85°C5 秒間の逆転写反応をおこない、鋳型 cDNA を合成した。

RT-PCR および realtime RT-PCR による分化マーカーの発現測定

軟骨分化誘導したマウス iPS 細胞のサンプルは、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version を用いて RT-PCR をおこなった。PCR 反応条件は、98°C 10 秒間 1 サイクル、55°C30 秒間、72°C1 分間 30 サイクルでおこなった。PCR プロダクトは 6x Loading Buffer Triple Dye に混和し、泳動バッファーとして 1xTAE、ラダーとして One Step Ladder を用いて 2%アガロースゲルで 100V 30~40 分間電気泳動をおこなった。泳動が終了したゲルをエチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター(AE-6933FXES プリントグラフ ATTO,東京、

日本)で撮影をおこない、バンドを確認した。

ミニブタ MSC および iPS 細胞を軟骨分化誘導したサンプルは、Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG w/ROX を用いて realtime RT-PCR をおこなった。realtime RT-PCR 条件は、7500 Fast リアルタイム PCR システム(Life Technologies カリフォルニア、アメリカ合衆国) を使用し、60°C1 分間、95°C10 分間 1 サイクル、95°C15 秒間、60°C1 分間 40 サイクルでおこない、5-6 段階の希釈系列で作製したスタンダードサンプルで検量線を作成することで各サンプルの遺伝子発現量を定量した。またハウスキーピング遺伝子である *βActin* の発現量をサンプル間の補正に使用した。なお、PCR に使用したプライマーは以下の通りである。

mouse *Gapdh*

F: 5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'

R: 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA -3'

mouse *Col2a1*

F: 5'- GGCAAAGATGGCTCTAATGG -3'

R: 5'- CGTCGTGCTGTCTCAAGGTA -3'

mouse *Aggrecan*

F: 5'- TCACTGTTACCGCCACTTTCC -3'

R: 5'- TGCTGCTCAGATGTGACTGC -3'

mouse *Sox9*

F: 5'- CGCTCGCAATACGACTACGC-3'

R: 5'- TAGAGCCCTGAGCCCTGGCC-3'

mouse *Nanog*

F: 5'- AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3'

R: 5'- CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG-3'

mouse *Oct3/4*

F: 5'- AAAAAGCAGGCTCCACCTTCCCATGGCTGGACACC-3'

R: 5'- AGAAAGCTGGGTTGATCAACAGCATCACTG AGCTTC-3'

mouse *Sox2*

F: 5'- AAAAAGCAGGCTTGTATAACATGATGGAGACGG-3'

R: 5'- AGAAAGCTGGGTTTCACATGTGCGACAGGGGCAGT-3'

mouse *Brachyury*

F: 5'- GCTTCAAGGAGCTAACTAACGAG-3'

R: 5'- CCAGCAAGAAAGAGTACATGGC-3'

mouse *Pdgrfb*

F: 5'- ACCTAGTCGACCACCTTTGTTCTGACCTGCTC-3'

R: 5'- TTCGTGGATCCATGGTGATGCTCTCGCCCT-3'

mouse *Hand1*

F: 5'- GATGGGACTGGAGAAGACCA-3'

R: 5'- GAAGTCAGATGCTCAAGGGG-3'

pig *BETA ACTIN*

F: 5'- AAGCCAACCGTGAGAAGATG-3'

R: 5'- GTACATGGCTGGGGTGTTG-3'

pig *COL1A1*

F: 5'- CCAAGAGGAGGGCCAAGAAGAAGG-3'

R: 5'- GGGGCAGACGGGGCAGCACTC-3'

pig *COL2A1*

F: 5'- GCACGGATGGTCCCAAAG-3'

R: 5'- CAGCAGCTCCCCTCTCAC-3'

pig *SOX9*

F: 5'- GCTCACCAGACCTTGAGGAG-3'

R: 5'- CTTGGAATGTGGGTTCGAGT-3'

pig *AGGRECAN*

F: 5'- TCCGCTCCTTGTCGCTTT-3'

R: 5'- TTTGCTTTGGCGTTTGAGG-3'

pig *NANOG*

F: 5'- CCGAAGCATCCATTTCCAGCG-3'

R: 5'- GGTATTCTGTACTGGCTGAGCC-3'

マウス iPS 細胞のマウス関節軟骨欠損モデルへの移植

移植に先立ち、移植物として用いるマウス iPS 細胞のアテロコラーゲン懸濁液を調整した。方法は軟骨分化誘導培養時とほぼ同じだが、細胞濃度を 10^6 細胞/mL、 10^7 細胞/mL、 10^8 細胞/mL の三段階に振った。コントロールは細胞を混和しないアテロコラーゲンの移植および欠損部に何も充填しないものとした。

なお、ホストとドナーの組み合わせは細胞の遺伝的背景とホストの遺伝的背景が最も近くなるように設定した。Nanog GFP iPS 細胞は遺伝的背景が 75%DBA、12.5%C57BL/6、12.5%129S4 であったため、ホストは DBA とした。

また、グリーンマウス iPS 細胞は、遺伝的背景が C57BL/6 であったため、ホストを C57BL/6 とした。これらの組み合わせは、増殖速度などの性質のやや異なる iPS 細胞の移植後の挙動を比較することを意図して決定した。8週齢のオスのマウスに生理食塩水で 15 倍希釈したソムノペンチルを腹腔内に注射し、十分に麻酔をかけた。左側下肢の剃毛及び 70%エタノール噴霧による清拭ののち、

膝部分を皮膚切開し膝蓋骨を外側へ脱臼させて大腿骨膝蓋骨溝を露出した。露出した膝蓋骨溝に、大腿骨の長軸に対し凡そ 45° になるように歯科用ラウンドバーにて 1mm の欠損を形成し、用意した移植物を充填した。その後、膝蓋骨を整復し、4-0 ナイロンで大腿直筋と腓腹筋を縫合することで固定した。これに続き皮膚を 4-0 ナイロンで縫合して創を閉鎖し、動物の覚醒を確認して手術を終了した。なお、Nanog GFP iPS 細胞は 2 回繰り返し実験を行い、またグリーンマウス iPS 細胞は 3 回繰り返し実験を行った。動物は移植後 2 週、4 週および 8 週でソムノペンチル原液を 0.1mL 腹腔内投与して安楽死させてから回収し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に 4°C で一晩漬けて固定し、PBS に置換した。

ミニブタ関節軟骨欠損モデル移植用足場素材の作製

ミニブタ関節軟骨欠損モデルに移植する再生組織の足場素材作製のため、6 か月齢雄性クラウン系ミニブタ右後脚関節部を卓上型マイクロフォーカス X 線 CT システム inspeXio SMX-90CT (島津製作所、京都、日本) を用いて撮影した。記録された画像データをもとに、欠損を作製する脛骨前内方に半径約 10 mm、高さ 4 mm の扇状をした作製予定の欠損形状をした 3 次元モデルの造形データを構築した。(図 2 B、C) この 3 次元モデルの造形データを用いて、 β TCP モデルを作製し、さらに表面に PLLA 多孔体を熱圧着し、再生軟骨組織の足場

素材となる構造体を作製した。(図 2 D)

ミニブタ MSC および iPS 細胞、ヒト iPS 細胞のミニブタ関節軟骨欠損モデルへの移植

移植に先立ち、移植物を調整した、細胞とアテロコラーゲンとの懸濁液作製方法は軟骨分化誘導培養時と同等だが、ゲル化の前に足場素材への浸透を行った。ここでの足場素材は β TCP の上に熱圧着した PLLA とし、PLLA に細胞とアテロコラーゲンの混和物を浸透させてからゲル化させて移植物とした。なお、細胞濃度は MSC では 10^8 細胞/mL、iPS 細胞では 10^7 細胞/mL とした。また、コントロールとして β TCP のみを準備した。

移植に先立ち、麻酔時の嘔吐を予防するためミニブタは前日より絶食させた。また、ヒト iPS 細胞を移植するに当たり、異種免疫を抑制するためにタクロリムス製剤を術前 5 日前より血中濃度 35~50ng/mL を維持するように経口投与した。麻酔前投薬として 1 mL/10 kg 体重のセラクタールと 1 mL /個体のアトロピンを後頸部に筋肉注射し、一旦ケージ内に戻し傾眠傾向になるのを待った。その後、4 mL /10 kg 体重でソムノペンチルを腹腔内注射して導入麻酔とした。手術室搬入後、十分な麻酔と筋弛緩が得られたことを確認して気管内挿管にて気道確保をし、フローセン酸素混合気体吸入にて手術期の麻酔を維持した。右側膝部を

剃毛および 70%アルコール、イソジンにて清拭ののち皮膚切開にて膝関節を露出し、膝蓋骨を外側へ脱臼させ脛骨前内方を露出させた。ここへ 1/4 相当部にマイセル・マレットにて骨軟骨欠損を形成し、同部位に移植物をチタンメッシュプレートにて固定した。その後膝蓋骨を整復し、創を閉鎖して覚醒を確認して手術を修了した。なお、繰り返し実験は 2 回行った。動物は移植後 2 週および 4 週、8 週に体重や創部の発赤、腫脹、創部異常、および術肢への荷重のかけ方や起立時や歩行時の様子などの臨床所見を回収し、8 週目に移植時と同様に十分な麻酔をかけたのち、1 M KCL の静脈内投与にて安楽死をさせ、サンプルを回収し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液中に 4℃で総日数 6 日間漬けて固定し、PBS に置換した。途中、肉眼所見回収およびダイヤモンドカッティングマシン (EXAKT) による薄切を挟んだ。なお、ヒト iPS 細胞を移植した動物のみ移植後 4 週間でサンプルを回収した。

なお発赤、腫脹、創、荷重はスコアリング評価を行った。評価方法は以下の通りである。

発赤

grade0:なし

grade1:局所軽度

grade2:局所高度

grade3:広範囲軽度

grade4:広範囲高度

腫脹

grade0:なし

grade1:軽度

grade2:中等度

grade3:高度

grade4:非常に高度

創

grade0:創し開、出血、組織壊死、排膿のいずれも認めない

grade1:創し開、出血のいずれかを認める

grade3:創し開、出血、組織壊死のいずれかを認める

grade4:創し開、出血、組織壊死、排膿のいずれも認める

荷重

grade0:起立時および歩行時に左右差を認めない

grade1:起立時または歩行時の術肢への荷重の回避が軽度である

grade2:起立時または歩行時の術肢への荷重の回避が高度である

grade3:起立は可能だが、歩行を拒むまたは不能である

grade4:起立を拒むまたは不能である

血液所見による血中薬物濃度および全身状態の評価

ヒト iPS 細胞のミニブタ関節軟骨欠損モデルへの移植に対しては、移植直前および安楽死直前に採血を行い、血中タクロリムス濃度測定については SRL（東京 日本）に解析を依頼し、全血測定および血清生化学測定については三菱化学メディエンス（東京 日本）に依頼した。なお、基準値については、ジャパンファーム クラウン研究所より公開されている、正常な個体の平均値のうち、移植に供した個体の月齢に最も近い物を採用した。

組織学的評価

マウスサンプルは Morse 液（10%クエン酸三ナトリウム、22.5%ギ酸）にて脱灰後、パラフィン包埋後に薄切した。ミニブタサンプルは薄切片を同様に Morse 液にて脱灰し、パラフィン包埋後に薄切した。切片はキシレン、アルコールシリーズにより脱パラフィン後、各染色に供した。ヘマトキシリン・エオジン染色は、5 分間ヘマトキシリンに浸漬後に 5 分間流水洗浄し、その後 5 分間エオジンに浸漬した。続いて水中に浸漬して過剰な色素を洗い流し、アルコール、キシレンシリーズで脱水後にマウントクイックにて封入した。 GFP 免疫組織

化学染色にあたっては、0.1%トリプシン/PBS 溶液で 37°C20 分浸漬にて抗原賦活後、PBS に 5 分浸漬を 2 回繰り返して洗浄した。次に 0.3%過酸化水素/メタノール溶液に室温 15 分浸漬にて内因性ペルオキシダーゼ除去 PBS に 5 分浸漬を 2 回繰り返して洗浄した。続いて 10%ヤギ正常血清を 10 分間室温で作用させてブロッキングを行い PBS に 5 分浸漬を 2 回繰り返して洗浄した。1 次抗体は 1:100 に希釈した抗 GFP ウサギ血清を 4°C一晩作用させ、2 次抗体は 1:6 で希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を室温で 60 分作用させた。抗体の希釈溶媒は 1%BSA/PBS 溶液とし、ネガティブコントロールは正常ウサギ IgG 抗体とした。PBS に 5 分浸漬を 2 回繰り返して洗浄し、DAB を室温で 5 分作用させてヘマトキシリンで軽く核染色後、流水洗浄にて余剰染料を落とし、アルコール、キシレンシリーズにて脱水後マウントクイックにて封入した。蛍光 in-situ hybridization は 2X SSC に室温で 5 分浸漬後、98°Cで 10 分湯煎にてエージングした。その後 PBS 浸漬にて放冷し、0.2%ペプシン/0.1N 塩酸を 37°C30 分で湿潤箱にてアプライし、DNA を変性した。アルコールシリーズにて脱水した。続いてプローブをアプライし、カバーガラスをにて封入してハイブリオーブン（タイテック、埼玉 日本）にて 85°Cで 10 分プローブを変性させ、37°C湿潤箱で一晩インキュベートした。翌日 2X SSC に 5 分浸漬にてカバーガラスを静かに剥がし、50%ホルムアミド/2xSSC 溶液に 37°C20 分浸漬後、1x SSC に 15 分室温で浸漬し

VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI にて封入した。切片の観察はオールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス、大阪 日本）および光学顕微鏡(オリンパス、東京 日本) 蛍光顕微鏡（ライカ、ヴェッツラー ドイツ）で行った。

結果

マウス iPS 細胞のコラーゲン 3 次元包埋培養による遺伝子発現変化

マウス iPS 細胞が分散されたのちにコラーゲン包埋 3 次元培養されることで多能性が低下することを検証するために、平面培養時、3 次元培養開始時、および分化誘導時におけるマウス iPS 細胞の遺伝子発現を比較した。多能性の維持に関与するとされる *nanog* [37] の遺伝子発現は、平面培養時に比べ、3 次元包埋培養を行うと次第に低下し、分化誘導後ではさらに著しい低下がみられた。

(図 3 *nanog*)。多能性マーカーである *oct3/4*, *sox2* [61] も、分化誘導により発現低下が観察された (図 3 *oct3/4*, *sox2*)。それに対し、初期中胚葉マーカーである *brachyury* [7] は分化誘導後に発現上昇が見られた (図 3 *brachyury*)。一方、中胚葉系のマーカーのうち、血管系マーカー *pdgfr* [67] や循環系マーカー *hand1* [52] は発現上昇が見られなかった (図 3 *pdgfrb*, *hand1*)。軟骨への分化に関しては、軟骨分化マーカーである *col2* [70] や *sox9* [70] の遺伝子発現は分化誘導に反応して上昇が見られた (図 3 *col2*, *sox9*)。しかし、同じく軟骨分化マーカーである *aggrecan* [70] の発現の上昇は、観察期間内では認められなかった (図 3 *aggrecan*)。以上よりマウス iPS 細胞を分散させてコラーゲンに包埋すると速やかに多能性が減少し、また 1 週間の軟骨分化誘導を経て中胚葉系、特に血管系や循環器系ではなく、軟骨への分化が誘導されることが示された。しかし、同

時に1週間の分化誘導だけでは多能性マーカーの完全な消失や *aggrecan* の発現亢進には至らず、軟骨分化誘導は十分ではないと思われた。

マウス iPS 細胞の関節軟骨欠損モデルへの移植

マウス iPS 細胞が、分散ならびにコラーゲン包埋処理の後、マウスの関節軟骨欠損部に移植されることにより、軟骨への分化がさらに促進され、関節軟骨欠損モデルの組織が修復されるか否かを検索した。マウス iPS 細胞を Nanog GFP iPS 細胞、移植するマウスを DBA とする組み合わせ、およびグリーンマウス iPS 細胞と C57BL6 の組み合わせ、の 2 つの組み合わせを検討した。移植後 8 週の観察期間中、Nanog GFP iPS 細胞/DBA の組み合わせでは一部腫瘍形成を認めた (図 4 A、B)。細胞播種密度が 10^8 細胞/ mL の移植では、腫瘍は移植後 4 週で 50%、移植後 8 週で 100% の割合で形成が見られた (表 1)。 10^7 細胞/ mL の移植では移植後 8 週で 50% の割合で見られ、 10^6 細胞/ mL の移植では全く見られなかった (表 1)。 10^8 細胞/ mL では移植後 4 週ですでに 50% で見られたことから、移植した細胞の濃度が高くなると早期に腫瘍化する危険性があることが示された (表 1)。腫瘍は充実性であり、腹部臓器圧排に至る増大を呈していた。病理組織学的検索では、未熟な三胚葉由来の組織が見られたため、腫瘍は未熟奇形腫と考えられた (図 4 C、D)。

グリーンマウス iPS 細胞/C57BL6 の組み合わせにおいては、腫瘍は認められず(表 1)、詳細に関節形態を組織学的に評価することができた。移植物のない、関節軟骨欠損を作製したのみのサンプルでは、移植後 2 週で明らかであった欠損が 8 週を経過しても残存しており、一部修復されている領域も線維性組織で覆われていた。アテロコラーゲンのみを移植した群においても、同様に移植後 2 週で明らかであった欠損がその後も残存し、修復部位は線維性であった。iPS 細胞移植群においては移植後 2 週で欠損部が明らかだったが、8 週では修復が進み、 10^6 細胞/ mL 移植では骨組織による修復が進んでいた。また、 10^7 細胞/ mL 移植や 10^8 細胞/ mL 移植では 8 週は欠損部の形態が不明瞭となり、また軟骨組織による修復も観察された(図 5)。欠損部の修復に関与した細胞を同定するために、グリーンマウス iPS 細胞で恒常発現している GFP に対して免疫組織化学染色を行ったところ、再生組織において GFP 陽性の軟骨細胞と骨芽細胞が確認され、移植した iPS 細胞が再生部位に残存し、組織修復に寄与したことが示された(図 6)。

ミニブタ iPS 細胞のコラーゲン 3 次元包埋培養による遺伝子発現変化

そこで、動物種を大型動物に変更し、同様な実験を試みた。ミニブタ iPS 細胞を用い、分散後、コラーゲン包埋による 3 次元培養を行い、ミニブタ iPS 細

胞の平面培養時、3次元培養開始時、および分化誘導時における遺伝子発現を比較した。なお、比較対象としてミニブタ MSC を用いて同様の検討を行った。

まず、MSC においては多能性マーカー遺伝子である *NANOG* は、分化培養後、発現は上昇傾向を示したものの、一週間以降発現は低下し、3週間では平面培養における発現レベルに近づいた (図7 *NANOG*)。軟骨分化マーカー遺伝子である *SOX9* の発現は3次元培養開始時より上昇し、1週間培養時にピークを迎え、低下する傾向を示した (図7 *SOX9*)。同様に軟骨分化マーカー遺伝子である *COL2* の発現は3次元培養開始時より上昇し1週間培養後までほぼ同じ発現レベルを維持した (図7 *COL2A1*)。軟骨の後期分化マーカーである *AGGRECAN* の発現は3次元培養開始時より発現が上昇し、2週間でピークを示した (図7 *AGGRECAN*)。以上より MSC はコラーゲン包埋により多能性マーカー遺伝子は減少傾向を示し、逆に軟骨分化マーカー遺伝子の発現上昇を認めたことより、軟骨への分化誘導が示された。

ミニブタ iPS 細胞の3次元培養において、多能性マーカー遺伝子である *NANOG* の発現が分化誘導により経時的に低下したことが観察された (図8 *NANOG*)。軟骨の分化に関しては、軟骨分化マーカー遺伝子である *SOX9* や *COL2* の発現が軟骨分化誘導によって著明に上昇することはなかったが (図8 *SOX9*, *COL2A1*)、同じく軟骨分化マーカーである *AGGRECAN* は分化誘導3

週目に発現の上昇が観察された(図 8 *AGGRECAN*)。以上より、3 週間の 3 次元培養によりミニブタ iPS 細胞の多能性は失われたことが示された。同時に、軟骨への分化誘導は *SOX9* や *COL2* の発現の上昇が不十分であったものの、*AGGRECAN* の発現が 3 週目で上昇したことから、ミニブタ iPS 細胞における軟骨への分化誘導効果が示された。

ミニブタ iPS 細胞の関節軟骨欠損モデルへの移植

上記の結果に基づいて、ミニブタ iPS 細胞がマウス iPS 細胞と同様に関節軟骨欠損モデルを修復できるか否かを検索するために、ミニブタ iPS 細胞を分散後にアテロコラーゲンに包埋し、人工骨 β TCP と複合化して再生関節を作製するとともに、ミニブタ脛骨関節部に前内側関節面の 4 分の 1 を欠損する欠損モデルを作製し、同部位に再生関節を移植した。比較対象として MSC を同様に処理したものを移植し、さらに陰性コントロールとして β TCP のみを移植した。

移植後、2 週、4 週、8 週で臨床症状を評価し、体重および手術部位の発赤、腫脹、し開、排膿および術肢への荷重を評価した。

陰性コントロールとした β TCP のみの移植の個体では、順調に体重が増加し、移植手術が健康への影響がなかったことが示された (図 9 weight)。腫脹や発赤は移植直後では広範囲に高度に見られたが、その後経時的に改善したことが

ら、移植手術が大きな感染や炎症、腫瘍形成を助長することがなかったことが示された（図9 swelling, reddening）荷重については移植直後から2週にかけては術肢を床から浮かせるなどして荷重を回避する個体が見られたが、移植後4週までに術肢を床につけるなど、軽度に荷重を回避する程度になった（図9 loading）。手術創についても観察期間を通してし開や排膿などの異常は見られなかった（図9 wound）。比較対象としたMSC移植では、 β TCPを移植した個体と同様に順調に増加した（図9 weight）。腫脹や発赤は β TCP移植と同様に経過したことからMSC移植が大きな感染や炎症、腫瘍形成を助長することがなかったことが示された（図9 swelling, reddening）。荷重については移植直後から2週にかけては術肢を床から浮かせるなどして荷重を回避する個体が見られたが、移植後4週までに術肢を床につけるなど、軽度に荷重を回避する個体ばかりになった（図9 loading）。手術創についても観察期間を通してし開や排膿などの異常は見られなかった（図9 wound）。ブタiPS細胞移植では、体重の推移は β TCP移植やMSC移植と同様に推移したことから、iPS細胞移植が健康状態を大きく阻害することがなかったことが示された（図9 weight）。腫脹や発赤も β TCP移植やMSC移植と同様に推移したことから、iPS細胞移植が大きな感染や炎症、腫瘍形成を助長することがなかったことが示された（図9 swelling, reddening）。荷重については、iPS細胞移植群は、移植直後から2

週にかけては術肢を床から浮かせるなど、荷重を回避する個体が見られたが、移植後 8 週までには、すべての個体が軽度に荷重を回避するようになり、この傾向は足場のみを移植する陰性コントロールや MSC 移植群と同等であった (図 9 loading)。手術創についても観察期間を通してし開や排膿などの異常は見られなかった (図 9 wound)。以上より移植手術がブタの健康を害することや、感染や腫瘍形成を助長することがなかったことが示された。

サンプル回収時の肉眼所見は、 β TCP 移植では、移植部位における組織修復は十分ではなく、さらに対合する大腿骨関節軟骨の欠損もあったことから、変形性関節症を惹起したことが示された (図 10 A、B)。MSC 移植では移植部位に組織形成があったこと、対合する大腿骨関節軟骨の欠損が軽度であったことから、惹起される変形性関節症は軽度になることが示された (図 10 C、D)。iPS 細胞移植では移植部位の組織形成が見られ、さらに対合する大腿骨関節軟骨の欠損は見られなかったことから、変形性関節症を惹起されなかったことが示された (図 10 E、F)。以上より、 β TCP 移植や MSC 移植により変形性関節症が惹起されたのに対して、iPS 細胞移植では組織修復が観察され、変形性関節症は惹起されなかった。

組織学的解析において、正常な関節では軟骨と骨とが隣接する構造が観察された (図 11 A)。 β TCP 移植では、移植部の骨と隣接する部位には線維性

組織のみが観察され、再生軟骨の形成は観察できなかった (図 1 1 B)。MSC 移植では、移植部位の骨に相当する領域では海綿骨の密度の増加が観察され、軟骨相当部位では再生軟骨の形成も確認された (図 1 1 C)。iPS 細胞移植では移植部位の骨に相当する領域では、MSC 移植と同様に海綿骨の密度の増加が観察され、軟骨相当部位では軟骨様組織の形成が観察された (図 1 1 D)。再生された軟骨組織が移植した iPS 細胞由来か否かを検索するため、ミニブタ iPS 細胞がメスの新生仔由来であり、移植したミニブタがオスであることを活用し、GFP 標識ブタ Y プローブを用いて蛍光 in situ -hybridization 法による細胞識別を行った。正常な関節軟骨においては GFP が核を染色した DAPI と重なって観察され、いずれの細胞もオス由来であることを確認した (図 1 2 A、B) 一方の iPS 細胞移植における再生軟骨には GFP が検出されず、メス由来、すなわち移植したブタ iPS 細胞由来であることが示された (図 1 2 C、D)。

ヒト iPS 細胞のミニブタ関節軟骨欠損モデルへの移植

マウスやミニブタ iPS 細胞と同様にヒト iPS 細胞も分散後にコラーゲンゲルへ混和し、関節軟骨欠損部に移植することで再生軟骨へ分化するか否かを検索した。ヒト iPS 細胞を分散後にアテロコラーゲンに包埋し、人工骨 β TCP と複合化して再生関節を作製するとともに、ミニブタ脛骨関節部に前内側関節面の 4

分の1を欠損する欠損モデルを作製し、同部位にヒト iPS 細胞由来再生関節を移植した。移植したミニブタにおける異種免疫を抑制するためには移植前後で免疫抑制剤タクロリムスが必要であり、投与したタクロリムスが予定通りの血中濃度を維持していることが重要であるため、血中タクロリムス濃度を測定した。結果、タクロリムス製剤投与後6日目に相当する移植日およびサンプルを回収した移植後1ヶ月後の両方において当初の予定の範囲内である30~50 ng/mLにあることを確認した(図13 タクロリムス血中濃度)。また、タクロリムス製剤の重篤な副作用として重度の感染症や肝機能および腎機能障害があるため、これらの出現には注意を払う必要がある。このために、タクロリムス製剤投与後6日目に相当する移植日およびサンプルを回収した移植後1ヶ月後の両方において血液検査を行った。結果、極軽度の肝機能障害がみられる程度であることが示された(図13血液所見)。以上より、タクロリムス製剤は予定通り血中に移行したこと、重篤な副作用は起こらなかったことが示された。

移植後、体重は β TCPやミニブタMSCおよびiPS細胞移植と同様に順調に増加した(図14 weight)。腫脹、発赤については、ミニブタ細胞移植時と同様に術後の期間が経過するにつれて軽快した(図14 swelling, reddening)。荷重については、移植直後は術肢への荷重を高度に回避していたが、4週までに軽度に回避する程度になった(図14 loading)。手術創はし開や排膿などの問

題なく経過した (図 1 4 wound)。以上よりヒト iPS 細胞移植がミニブタの健康を害することなく、感染や腫瘍形成などを助長することもなかったことが示された。

サンプルの肉眼所見において、移植部に修復組織の形成が確認され、また対合する大腿骨関節軟骨の欠損はほとんど観察されなかったことから変形性関節症を惹起されなかったことが示された (図 1 5 A, B)。また組織学的所見によりヒト iPS 細胞移植でも一部ではあるが再生軟骨も確認された (図 1 5 C, D)。以上の所見より、ヒト iPS 細胞もマウスやミニブタの iPS 細胞と同様に、分散後にコラーゲンゲルに混和し、関節軟骨欠損部に移植されると再生軟骨を形成することが示された。

考察と結論

多能性幹細胞を分散およびコラーゲンへの包埋による分散状態の維持により、多能性幹細胞の多能性を抑制するものであることが文献より示唆されていることから[46、51、57、64、75]、iPS 細胞は分散とコラーゲンへの包埋という最低限の処理のみで軟骨分化誘導培地で軟骨へ分化させられると考えられた。

マウス iPS 細胞を分散後コラーゲングルに混和し、*in vitro* の検討として軟骨分化誘導培地で培養したところ、1 週間の培養により、多能性マーカー遺伝子の発現が低下し、初期中胚葉マーカー遺伝子や軟骨分化マーカー遺伝子の発現が亢進することが明らかとなった。しかし、多能性マーカー遺伝子の完全な発現消失には至らず、また一部軟骨分化マーカー遺伝子の発現が認められなかった。Soncin らの報告では、ES 細胞の分化時に E-cadherin の発現が低下し、細胞間接着が失われるとしている[57]。Zhang らの報告では、iPS 細胞の心筋への分化時に細胞間接着が失われ、これにより E-cadherin の発現が低下するとしている[75]。この報告では、この現象に続いて中胚葉系マーカー遺伝子である brachyury などの発現が上昇し、また多くの多能性マーカー遺伝子の発現が低下したとしている。Redmer らの報告では E-cadherin は ES 細胞で発現が高く、多能性の維持やリプログラミングにおいて重要な役割を担い、E-cadherin の阻害が ES 細胞の分化を惹起するとしている[51]。Phadke らはまた、合成生体材

料の使用による 3 次元培養により幹細胞の分化に必要な細胞外環境を模倣することができる」と報告している[46]。Liu らの報告では、iPS 細胞を分散後にコラーゲンゲル上に播種することで MSC 様の細胞に分化させることができたとしている[34]。これらを併せて考えると、マウス iPS 細胞を分散後にコラーゲンゲルに混和し、*in vitro* で分化誘導刺激を加える方法は iPS 細胞に未分化性を失わせ、軟骨分化に一定の効果は得られるもののその効果は十分ではなく、成熟した軟骨へ分化させるためには改善の余地があることが明らかとなった。

Wakitani らの報告や Nakajima らの報告では、マウス ES 細胞をコラーゲンゲルに混和し、シクロスポリン投与により異種免疫を抑制したラットの関節軟骨欠損モデルに移植したところ、4 週間で膝関節の屈伸運動による機械的刺激が重要な役割を果たすことでマウス ES 細胞が再生軟骨に分化したとしている[]。この先行研究を受けて、次にマウス iPS 細胞を同様に分散してアテロコラーゲンに混和し、*in vivo* の検討として iPS 細胞の遺伝的背景に最も近い系統のマウスの関節軟骨欠損モデルに移植した。一部の iPS 細胞ロットでは腫瘍形成を認めた。病理学的診断により、iPS 細胞移植でみられることの多い成熟奇形腫よりも悪性度の高い未熟奇形腫であることが明らかになった。観察期間内において腫瘍の発生は Nanog GFP iPS 細胞を移植した群にのみみられ、発生する時期は早くても移植後 4 週であり、また細胞濃度が 10^7 細胞/ mL 以上の移植にのみ

見られた。細胞が腫瘍化した原因の1つとして、Nanog GFP iPS 細胞とグリーンマウス iPS 細胞の2ロット間における細胞特性の違いが考えられる。Nanog GFP iPS 細胞とグリーンマウス iPS 細胞の培養において継代頻度が異なった。Nanog GFP iPS 細胞の増殖は相対的に早く、2日おきに継代を行った。一方のグリーンマウス iPS 細胞では細胞の増殖は相対的に遅く3日から4日おきに継代した。Nanog GFP iPS 細胞はマウス胎児線維芽細胞由来であり、グリーンマウス iPS 細胞は成獣の骨髄血球系細胞由来であるが、両ロットともレトロウイルスにより山中4因子と呼ばれる *Oct3/4*、*C-Myc*、*Klf4*、*Sox2*を導入して樹立されていた。Tsuji らの報告では、マウス iPS 細胞由来の二次神経球の腫瘍化はマウス iPS 細胞を樹立した細胞の系列に依存すると報告しており、このことを考え併せると、Nanog GFP iPS 細胞はグリーンマウス iPS 細胞と比較して腫瘍化しやすさや、分化誘導のかかりにくさなど何かしらの細胞特性を保有していたと考えられる。Nanog GFP iPS 細胞が腫瘍化したもう一つの原因として、ホストとドナーの遺伝的背景の軽度の不一致による微弱な拒絶反応が考えられる。Nanog GFP iPS 細胞の遺伝的背景は75% DBA であり、残りは12.5% C57BL/6、12.5% 129S4 であり、またホストは DBA であった。Rakoff-Nahoum や Coussens が言及しているように、炎症反応が癌化に重要な役割を担うことが広く理解されている。Rakoff-Nahoum はまた、免疫反応や組織修復反応による炎症がホ

ホストの組織修復や腫瘍化に関わるシグナル因子やシグナル経路を増幅させることで腫瘍化を惹起すると言及している。Goulmy らの報告から、わずかな組織不適合移植により GVHD という、いわば一種の慢性炎症が惹起されることを併せて考慮すると、ホストとドナーの遺伝的背景の軽度の相違が軽度の慢性的な炎症反応を惹起し、これにより腫瘍化をもたらすシグナル経路やシグナル因子が増幅されて、ドナー細胞が腫瘍化したことが考えられる。また、腫瘍形成が 4 週目以降にみられる原因として、iPS 細胞が軟骨に分化するのに要する期間が考えられる。Bilousova らの報告では、マウス iPS 細胞を *in vitro* で軟骨分化誘導かけるにあたり、2 日間の胚様体形成に続き 4 週間の 3 次元培養を行ったとしている。Wakitani らの報告や Nakajima らの報告では、マウス ES 細胞をラット関節軟骨欠損モデルに未分化のままコラーゲンゲルに混和して移植し、シクロスポリン投与にて異種免疫を抑制したところ 4 週間で ES 細胞由来の再生軟骨を確認したとしている [39, 64]。これらを併せて考えると、未分化なマウス iPS 細胞は *in vivo* の環境下で軟骨細胞に 4 週間以内に分化するものと考えられ、4 週間以内に軟骨細胞に分化できない細胞が残存する場合は腫瘍化する可能性が高まることが考えられる。

また、腫瘍形成を認めなかったサンプルでは、コントロールと比較して移植した細胞濃度依存的に関節形態の修復が促進された。グリーンマウス iPS 細胞

を移植したサンプルにおいて再生組織は GFP 陽性であり、ドナー由来であることが示された。移植局所の組織を修復するほどに分化したドナー由来細胞は前述の腫瘍化した条件を考慮すると、細胞の特性として腫瘍化しにくく、分化誘導がかかりやすいものであり、移植後 4 週間以内に分化誘導因子や刺激を十分に受けることができ、その間ホストより腫瘍化を惹起するほどの炎症性の因子を受けないことがなかつたと考えられる。また、ES 細胞を用いた Nakajima らの報告ではラットの尾を移植後 1 週より 3 週間ケージの天井に設置した滑車に固定しており、3 週間は移植局所には体重による荷重はかかっているが[39]、本実験では、膝関節の屈伸運動に加えて荷重による機械的刺激を許容したことで、腫瘍化が一層抑制され、細胞が成熟した再生組織を形成し、欠損した組織を修復したと考えられた。

以上の結果より、小型動物であるマウスにおいて iPS 細胞を分散後にコラーゲンゲルに混和し、至適条件を保有した細胞が *in vivo* の環境内に移植されて所定の期限内に十分な分化誘導刺激を受け取ることで、標的の細胞に成熟することが示された。

この結果を踏まえて次の段階では大型実験動物であるミニブタの実験系に移行した。使用したミニブタは近交系で維持繁殖されているクラウン系ミニブタである。クラウン系ミニブタは主要組織適合遺伝子複合体(MHC)ハプロタイプ

が大きく 2 系統に分かれており、同一 MSC ハプロタイプの個体間であれば同系移植が行えると考えられている[10, 28, 35, 53, 56]。また、体格が成獣で 30 kg と小柄であることに加え耳介が大きいことため耳介からの血管確保が比較的容易であり、性格は温順で人に馴れやすいことから取り扱いやすく本研究に適した動物である。ミニブタの細胞の *in vitro* の検討では、マウス iPS 細胞における検討と同様に分散後コラーゲンゲルに混和し、軟骨分化誘導培地で培養した。培養期間はマウス iPS 細胞における *in vitro* の検討よりも長い 3 週間とし、1 週間ごとに遺伝子を回収し、mRNA の発現の変化を評価した。その結果、コントロールとして用いた MSC の 3 次元培養では、*SOX9* や *COL2* および *AGGRECAN* などの軟骨分化マーカーの発現上昇が確認された。iPS 細胞の 3 次元培養では、多能性マーカーである *NANOG* の発現の速やかな低下が確認されたが、*SOX9* や *COL2* および *AGGRECAN* などの軟骨分化マーカーの発現は不安定であり、軟骨細胞への分化は不十分であった。しかしながら、マウス iPS 細胞における検討と同様に、ミニブタ iPS 細胞を分散後にコラーゲンゲルに混和することで多能性マーカー遺伝子の発現を低下させられることが示された。同時に *in vitro* の環境において不安定ながらある程度は軟骨分化誘導をかけられることが示された。マウスの実験系を参照すれば、ミニブタ iPS 細胞を同様に分散後コラーゲンゲルに混和し、*in vivo* の環境下に置くことでより成熟した軟骨へ分化でき

る可能性が示唆された。ここで、ミニブタの *in vivo* の実験系では、より臨床で遭遇する変形性膝関節症に近づけるように、関節軟骨欠損を大型にし、脛骨膝関節内側に形成した。また、骨欠損に対しては足場素材に人工骨である β TCP を採用した。さらに、軟骨部においては細胞投与時の足場素材として生体内吸収素材であるポリ乳酸 (PLLA) の多孔体を採用した。PLLA を β TCP に熱圧着させることで固定しこれにアテロコラーゲンに混和した細胞を浸透させ、 37°C 湿潤環境下で 2 時間インキュベートすることでアテロコラーゲンをゲル化させてから移植に供した。ミニブタ iPS 細胞の細胞濃度はマウスの *in vivo* における検討の結果を踏まえて、腫瘍化のリスクの低い 10^7 細胞 / mL とした[69]。また、ミニブタの MSC の細胞濃度は、組織幹細胞であることから多能性幹細胞と比較して分化段階が進んでいることを考慮し、耳介軟骨細胞移植時の至適細胞濃度である 10^8 細胞/mL とした。なお、コントロールとして β TCP のみを移植した。結果、 β TCP のみの移植では、移植部直上の肉芽が観察されず、対合する大腿骨関節軟骨の欠損がみられた。また β TCP の吸収と新生骨による置換がみられたものの、再生軟骨の形成は見られなかった。以上の結果より β TCP のみの移植では再生軟骨を得ることはできず、むしろ変形性関節症の発症を惹起するものであることが示された。MSC の移植では移植部直上に組織形成を観察し、対合する大腿骨関節軟骨の変性及び損失も軽度なものとなった。また、

コントロールと同様に β TCP の新生骨による置換がみられ、一部に再生軟骨の形成を認めた。また、腫瘍形成個体も認められなかった。以上の結果より、MSC の移植では腫瘍形成がなく、安全に変形性関節症の発症の抑止に一定の効果が得られたことが示された。さらにミニブタ iPS 細胞移植では、移植部直上の組織形成が観察され、対合する大腿骨関節軟骨の変性及び損失も非常に軽度なものとなっていた。また、 β TCP の新生骨による置換がみられ、さらに一部に非常に旺盛な再生軟骨の形成を認めた。FISH にてブタ Y 染色体を検出し、再生軟骨がホストであるオス由来か、ドナーであるメス由来かを判別したところ、Y 染色体を検出しなかったことから、この再生軟骨はメス由来であり、メス新生仔の細胞から樹立した iPS 細胞由来であることが示された。また MSC 移植と同様に腫瘍形成個体も見られなかった。MSC 移植と比較して iPS 細胞移植は、細胞濃度が 10 倍低いにも関わらずより旺盛な軟骨形成を生じ、また腫瘍形成を認めなかった。Khoo らの報告では、ヒトの骨髄幹細胞は継代が進むと徐々に細胞形態が変化し、それに比例して徐々に増殖能の低下や多能性マーカー遺伝子の発現の低下がみられたとしている[25]。また、Khoo らの報告では P1 と比較して、P6~P8 でこの傾向がみられたとしている[25]。継代に伴う MSC の多能性低下を考慮し、本実験で使用したミニブタ MSC は P0 で回収後に一旦凍結保存し、P1 で播種および回収しており、継代数の若い細胞を移植に供した。しかしなが

ら、MSCは組織幹細胞であり多能性幹細胞であるiPS細胞よりも分化段階が進んでおり、また若い継代数の細胞を使用したとはいえやはり、P0よりも徐々に多能性の低下は進んでいたと考えられる。また、ミニブタMSCおよびミニブタiPS細胞の両者の移植においても腫瘍化しなかった要因は、マウスの体重は25gほどであるのに対してミニブタの体重は15~20kgほどであり、より荷重による機械的刺激がかかる環境にあったことが考えられる。ミニブタiPS細胞移植では、細胞濃度が腫瘍化のリスクの低い、軟骨分化誘導のかかりやすいものであったことも要因と考えられる。

マウスiPS細胞とヒトiPS細胞はコロニーの形態や培養の方法など根本的に性質が異なる。マウスiPS細胞はより初期の状態である“ナীব iPS細胞”と呼ばれており、キメラ動物を作製することができる。かたやヒトなどのiPS細胞はマウスと比較して初期化状態がやや劣り、“プライム iPS細胞”と呼ばれ、多くはキメラ動物を作製することができない[10,11, 15]。“ナীব iPS細胞”に近いヒトiPS細胞の樹立が報告され始めているが、それでもなおヒトiPS細胞は“ナীব iPS細胞”ではない[11]。従って、ヒトiPS細胞での実験系に移行する前に、別途“プライム iPS細胞”における同系移植の実験系を立てる必要があると考えられた。そこで新たな実験系として大型動物であるミニブタより“プライム iPS細胞”を樹立した。樹立したミニブタiPS細胞のコロニー

形態や培養方法はヒト iPS 細胞におおかた類似していた。しかし、ヒト iPS 細胞で見られるような、隣り合うコロニー同士の接触により ES 細胞様のコロニー形態が崩れる傾向は見られず、分化誘導がかかりにくい iPS 細胞であることが示唆された。

さらに、ミニブタ実験では大型動物であることを活用するために、臨床で遭遇しやすい脛骨前内側面に大型欠損を作製した。

これらのミニブタ iPS 細胞の抱える課題と、欠損の規模を拡大したことによるハードルを克服するためには足場素材を付与するなどして移植した細胞が最大限分化誘導刺激を受けられる位置に移植し固定することが必要と考えられた。このために、人工骨である β TCP と、これに熱圧着した PLLA を足場素材とし、コラーゲンゲルに混和した iPS 細胞を PLLA に浸透させて移植した。結果、ミニブタ iPS 細胞移植では、腫瘍形成が見られず、また旺盛な再生軟骨の形成が見られた。

ヒト iPS 細胞移植では、移植する細胞濃度をミニブタ iPS 細胞移植と同様にして、腫瘍化のリスクが低くかつ再生軟骨を形成する可能性の高い、 10^7 細胞/mL とし、移植前の細胞の処理や移植物の調整を同様にした。また、異種免疫抑制のためにタクロリムス製剤を投与した。タクロリムス製剤の投与容量および用法は薬剤の添付文書および Kawamura らおよび Meltzer ら、Sahara ら、

Shoji ら、Warneck らの報告を参照し、術前 5 日前から血中濃度 35~50 ng/mL を維持するように経口投与した。タクロリムス製剤を投与したブタはいずれも投与期間中問題なく製剤を摂取し、血液所見上、タクロリムス製剤の血中濃度は移植時よりサンプル回収時に至るまで目標の血中濃度を維持したことが示された。また、タクロリムス製剤使用時における注意事項として、腎および肝障害や重篤な感染症などが挙げられるが、臨床所見として乏尿や黄疸、鼻汁や重篤な発赤・腫脹等は見られず、血液所見でも軽度の肝機能障害を認めるのみであり、白血球増加などの炎症所見やクレアチニンの上昇などの腎機能障害を示唆する所見は見られなかった。回収したサンプルでは、移植部直上に肉芽の形成が観察され、対合する大腿骨関節軟骨の変性及び損失も非常に軽度なものとなっていた。また、 β TCP の新生骨による置換がみられ、さらに一部ながら再生軟骨の形成を認めた。また腫瘍形成個体は確認されなかった。以上の結果によりタクロリムスの投与により異種免疫が抑制され、移植したヒト iPS 細胞が局所に生存して再生軟骨を形成したことが示された。また、ヒト iPS 細胞においても、マウスやミニブタの iPS 細胞と同様に分散後、適切な細胞濃度でコーゲンゲルに混和し、in vivo の環境に置くことで十分な分化誘導の刺激を受けることができ、また荷重などの機械的刺激を受けることで強固に分化誘導刺激を受け、移植局所に適した再生組織を形成することができることが示された。

Nakajima らの報告ではラットの関節軟骨欠損モデルにマウス ES 細胞を混和したハイドロゲルを移植し、膝関節の屈伸運動を自由にさせた際に、シクロスポリン投与下にて移植後 4 週間で再生軟骨を確認している[39]。Oldershaw らの報告にある *in vitro* のヒト ES 細胞の軟骨分化誘導法も 2 週間で終了している[45]。また、Koyama らの報告ではヒト iPS 細胞を *in vitro* の環境において 2~3 週間で軟骨に分化させることができるとしている[30]。これらを併せるとヒト iPS 細胞の移植において 4 週間の経過観察で十分 *in vivo* の環境にて再生軟骨を得ることができると考えられる。ミニブタ iPS 細胞移植と比較して再生軟骨の形成量が低かった原因として、Kawamura らの報告や Swijnenburg らの報告にあった通り、タクロリムス単剤による免疫抑制が不十分であったため、移植したヒト iPS 細胞の一部が宿主であるミニブタの免疫系により排除された可能性が示唆される[22,58]。マウス iPS 細胞を *in vivo* の環境に移植した検討において、腫瘍を形成したロットでは、移植後 4 週を経過してから出現したことを併せて考慮すると、ヒト iPS 細胞を移植したミニブタの組織像に確認された、軟骨に分化していないヒト iPS 細胞は 4 週間以降も宿主の免疫による排除を逃れ続けられた場合、腫瘍化のリスクを孕んだ細胞であった可能性が示唆される。そのためには、造腫瘍性の低く分化誘導のかかりやすいと考えられる、質の高い、きちんとリプログラミングされた iPS 細胞の選択、分化誘導などの、

最適な移植前の細胞処理法の探索、分化誘導効率を上昇する因子の探索と特定、移植時の足場素材の改善などを進める必要性が示された。Polanco らの報告では、iPS 細胞移植に当たり細胞数が一定数をこえると奇形腫形成効率が上がるとされている[47]。また Tsuji らの報告では事前に安全ではないと評価されたロットの iPS 細胞由来の分化細胞を移植しても腫瘍化するとあり、移植時の至適条件の検討や細胞の選別の重要性が示されている[63]。また、Qin らや Ohm ら、Ghosh らの報告では、iPS 細胞は癌細胞とがん遺伝子の発現パターンが類似しているとあり、また Apostolou らの iPS 細胞の樹立と腫瘍形成はリプログラミングの観点で類似しているという報告もあり、この観点からも iPS 細胞が癌化の危険性を有することが示されている[2, 12,42, 48]。さらに、Griscelli らや Polanco らの transgene のサイレンシングが不十分な iPS 細胞は腫瘍化のリスクがあるという報告があり、腫瘍形成の回避のためには“質の高い” iPS 細胞の樹立が重要である[14, 47]。Kawamura らの報告に iPS 細胞の完全なリプログラミングには p 53 のサイレンシングが重要とあるなど[23]、“質の高い” iPS 細胞の樹立への段取りは着々と進んでいる。安全で高効率の iPS 細胞を用いた再生医療の実現に向けて現在様々な努力がなされており、臨床応用に最も近い組織は網膜や、心臓、脊髄である。今後の目標は、iPS 細胞を用いた軟骨再生医療を安全かつ高効率なものとし、また適用範囲を関節軟骨に止まらず顔面軟骨な

どに拡大することである。そのための検討課題として腫瘍化を可能な限り回避する方法の追求や、再生組織の量や局在の向上を目指す必要があると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ひとかたならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学分野 口腔外科学講座 高戸 毅教授に篤く御礼申し上げます。また、がん研究会がん研究所病理部 高澤 豊 主任研究員、東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 中内 啓光 教授、ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト 正木 英樹 研究員および 小林 俊寛 研究員 には本研究を進める上で大変貴重なご助言、ご協力をいただき心より感謝申し上げます。また、研究・実験を進めて行くにあたり、さまざまな御助言、御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄付講座 星 和人特任准教授をはじめ、同講座の皆様、口腔外科学教室の皆様、そして、家族、友人、といった多くの方々に支えていただきました。本稿を終えるに当たり、深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Amano K, Hata K, Sugita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein. *Mol Biol Cell* 20:4541-4551. (2009)
2. Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*. 502 (7472):462-471. (2013)
3. Bilousova G, Jun du H, King KB, De Langhe S, Chick WS, Torchia EC, Chow KS, Klemm DJ, Roop DR, Majka SM. Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both in vitro and in vivo. *Stem Cells*. 29(2):206-216. (2011)
4. Chen Z, Zhao T, Xu Y. The genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Protein Cell*. 3(4):271-277. (2012)
5. Coussens LM & Werb Z Inflammation and cancer. *Nature* 420.19/26 (2002)
6. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 102(10):3837-3844. (2003)

7. Evans AL, Faial T, Gilchrist MJ, Down T, Vallier L, Pedersen RA, Wardle FC, and Smith JC Genomic Targets of Brachyury (T) in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 7: e33346. (2012)
8. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819):154-156. (1981)
9. Fodor WL Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reproduct Med Biol* 1:102 (2003)
10. Fujishiro S, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y Generation of Naive-Like Porcine-Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development. *Stem Cells Dev*. 22(3): 473–482. (2013)
11. Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R,

- Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells. *Nature*. 504(7479):282-286. (2013)
12. Ghosh Z, Huang M, Hu S, Wilson KD, Dey D, Wu JC. Dissecting the oncogenic and tumorigenic potential of differentiated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. *Cancer Res*. 71(14):5030-5039. (2011)
13. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg F, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, Van Houwelingen H, and Van Rood JJ Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 334:281-285 (1996)
14. Griscelli F, Féraud O, Oudrhiri N, Gobbo E, Casal I, Chomel JC, Bièche I, Duvillard P, Opolon P, Turhan AG, Bennaceur-Griscelli A. Malignant germ cell-like tumors, expressing Ki-1 antigen (CD30), are revealed during in vivo differentiation of partially reprogrammed human-induced pluripotent stem cells. *Am J Pathol*. 180(5):2084-2096. (2012)
15. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 143(4):508-525.

(2010)

16. Hatsushika D, Muneta T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *J Orthop Res.* 31(9):1354-1359. (2013)
17. Homma K, Okamoto S, Mandai M, Gotoh N, Rajasimha HK, Chang YS, Chen S, Li W, Cogliati T, Swaroop A, Takahashi M. Developing rods transplanted into the degenerating retina of Crx-knockout mice exhibit neural activity similar to native photoreceptors. *Stem Cells.* 31(6):1149-1159.(2013)
18. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Mukohyama H, Sekiya I. Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. *Med Mol Morphol.* 46(1):24-33. (2013)
19. Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, Nagata S, Takato T, Hoshi K The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. *Curr Aging Sci* 3:26-33. (2010)

20. Juan Carlos Polanco and Andrew L. Laslett Safety Assessment of Reprogrammed Cells Prior to Clinical Applications: Potential Approaches to Eliminate Teratoma Formation. *Pluripotent Stem Cells Chapter 25* (2013)
21. Kanazawa S, Fujihara Y, Sakamoto T, Asawa Y, Komura M, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med.* 7(1):1-9. (2013)
22. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* 126: S29-S37 (2012)
23. Kawamura T, Suzuki, J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JCI. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature.* 460(7259):1140-1144. (2009)
24. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB,

- Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 203(5):1235-1247. (2006)
25. Khoo ML, Shen B, Tao H, Ma DD. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17(5):883-896. (2008)
26. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage. *J Biomed Mater Res A* 97:186-192. (2011)
27. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. BMP-2 embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and triiodothyronine--a new protocol for three-dimensional in vitro culture of human chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods* 18:374-386. (2012)
28. Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, Lefor AT. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res.* 1(1):8. (2012)

29. Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, von der Mark K, Sekiya I. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells*. 25(3):689-696. (2007)
30. Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 22(1):102-113. (2013)
31. Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, Okita K, Noma H, Sawamura Y, Teramoto I, Narita M, Sato Y, Ichisaka T, Amano N, Watanabe A, Morizane A, Yamada Y, Sato T, Takahashi J, Yamanaka S. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(51):20569-20574. (2013)
32. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment

- epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One*. 7(5):e37342. (2012)
33. Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UL, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* 92:1273-1282. (2010)
34. Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, Gronowicz GA, and Kuhn LT One-Step Derivation of Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells on a Fibrillar Collagen Coating. *PLoS ONE* 7 e33225 (2012)
35. Meltzer AJ, Veillette GR, Aoyama A, Kim KM, Cochrane ME, Wain JC, Madsen JC, Sachs DH, Rosengard BR, Allan JS Donor brain death inhibits tolerance induction in miniature swine recipients of fully MHC-disparate pulmonary allografts. *Am J Transplant*. 12(5):1290-1295. (2012)
36. Menendez S, Camus S, Izpisua Belmonte JC. p53: guardian of reprogramming. *Cell Cycle*. 9 (19):3887-3891. (2010)
37. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K,

- Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642. (2003)
38. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H & Yamanaka S Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotech* 27 743-745 (2009)
39. Nakajima M, Wakitani S, Harada Y, Tanigami A, Tomita N. In vivo mechanical condition plays an important role for appearance of cartilage tissue in ES cell transplanted joint. *J Orthop Re.* 26:10-17. (2008)
40. Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* 23(1):70-80. (2013)
41. Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K, Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS One* 8:e53771. (2013)

42. Ohm JE, Mali P, Van Neste L, Berman DM, Liang L, Pandiyan K, Briggs KJ, Zhang W, Argani P, Simons B, Yu W, Matsui W, Van Criekinge W, Rassool FV, Zambidis E, Schuebel KE, Cope L, Yen J, Mohammad HP, Cheng L, Baylin SB. Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cancer Res.* 70(19):7662-7673. (2010)
43. Okamoto S, Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(12):8785-8790. (2011)
44. Okita K, Ichisaka T and Yamanaka S Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-317 (2007)
45. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, Brison DR, Hardingham TE, Kimber SJ. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 28(11):1187-94. (2010)
46. Phadke A, Chang CW, and Varghese S Functional Biomaterials for Controlling Stem Cell Differentiation Biomaterials as Stem Cell Niche. *Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomater* 2:19-44 (2010)

47. Polanco JC, Ho MS, Wang B, Zhou Q, Wolvetang E, Mason E, Wells CA, Kolle G, Grimmond SM, Bertonecello I, O'Brien C, Laslett A Identification of unsafe human induced pluripotent stem cell lines using a robust surrogate assay for pluripotency. *Stem Cells*. 31(8):1498-1510. (2013)
48. Qin H, Blaschke K, Wei G, Ohi Y, Blouin L, Qi Z, Yu J, Yeh RF, Hebrok M, Ramalho-Santos M. Transcriptional analysis of pluripotency reveals the Hippo pathway as a barrier to reprogramming. *Hum Mol Genet*. 21(9):2054-2067. (2012)
49. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, Lammi MJ. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *Int J Biochem Cell Biol*. 45(8):1802-1812. (2013)
50. Rakoff-Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med* 79:123-130. (2006)
51. Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W and Besser D E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* 12:720-726 (2011)
52. Risebro CA, Smart N, Dupays L, Breckenridge R, Mohun TJ, Riley PR.

- Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development* 133:4595-4606. (2006)
53. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, Oku M, Okumi M, Nishimura H, Oriyanhan W, Tasaki M, Scalea J, Wada H, Bando T, Date H, Yamada K. Beneficial effects of perioperative low-dose inhaled carbon monoxide on pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine. *Transplantation*. 90(12):1336-1343. (2010)
54. Seki T, Yuasa S and Fukuda K Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 4:Unit4A.3. (2011)
55. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Kohda H, Kita K, Kanamoto T, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 31(31):8004-8011. (2010)
56. Shoji T, Sahara H, Muniappan A, Guenther DA, Houser SL, Pujara AC, Bravard MA, Wain JC, Sachs DH, Madsen JC, Allan JS. An MHC class II disparity raises the threshold for tolerance induction in pulmonary

- allografts in miniature swine. *Transplant Proc.* 38(10):3268-3270. (2006)
57. Soncin F and Ward CM The Function of E-Cadherin in Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal. *Genes* 2:229-259 (2011)
58. Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, Cao F, Ransohoff K, Sheikh AY, Haddad M, Connolly AJ, Davis MM, Robbins RC, Wu JC. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(35):12991-12996 (2008)
59. Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, Wakitani S. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. *J Biosci Bioeng.* 103(1):98-100.(2007)
60. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872. (2007)
61. Takahashi K, Yamanaka S Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676. (2006)

62. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 31:4506-4516. (2010)
63. Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(28):12704-12709. (2010)
64. Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A. Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13:331-336. (2004)
65. Warnecke G, Avsar M, Steinkamp T, Reinhard R, Niedermeyer J, Simon AR, Haverich A, Strüber M. Tacrolimus versus cyclosporine induction therapy in pulmonary transplantation in miniature swine. *Eur J Cardiothorac Surg.* 28(3):454-460. (2005)

66. Wei Y, Zeng W, Wan R, Wang J, Zhou ., Qiu S, and Singh SR
Chondrogenic Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells from
osteoarthritic Chondrocytes in Alginate Matrix. *Eur Cell Mater* 23:1-12
(2012)
67. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Pericyte-specific expression of PDGF
beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta
receptor signaling. *Mol Neurodegener* 5:32 (2010)
68. Yamaoka H, Nishizawa S, Asawa Y, Fujihara Y, Ogasawara T, Yamaoka
K, Nagata S, Takato T, Hoshi K Involvement of fibroblast growth factor 18
in dedifferentiation of cultured human chondrocytes. *Cell Prolif* 43:67-76.
(2010)
69. Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. The
application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for
cartilage tissue engineering and its suitable conditions. *J Biomed Mater
Res A*. 93(1):123-132. (2010)
70. Yamashita A, Nishikawa S, Rancourt DE Identification of Five
Developmental Processes during Chondrogenic Differentiation of
Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 5:e10998. (2010)

71. Yan C, Wang Y, Shen XY, Yang G, Jian J, Wang HS, Chen GQ, Wu Q
MicroRNA regulation associated chondrogenesis of mouse MSCs grown on
polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials* 32:6435-6444. (2011)
72. Yanagisawa H, Hoshi K, Asawa Y, Ejiri S, Kozo Sato and Ozawa H
Matrix remodeling and cytological changes during spontaneous cartilage
repair. *J Electron Microsc (Tokyo)* 61: 237–248 (2012)
73. Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nagata S,
Takato T, Hoshi K Application of floating cells for improved harvest in
human chondrocyte culture. *Biomed Res* 33:281-289. (2012)
74. Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Sanshiro K, Nagata S,
Takato T, Hoshi K The optimal conditions of chondrocyte isolation and its
seeding in the preparation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng
Part C Methods* 16:1461-1469. (2010)
75. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR,
Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ,
Jalife J, Kamp TJ Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac
differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich
method. *Circ Res* 111:1125-1136. (2012)

76. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao RC. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*. 23(5):925-933. (2009)

図と図説

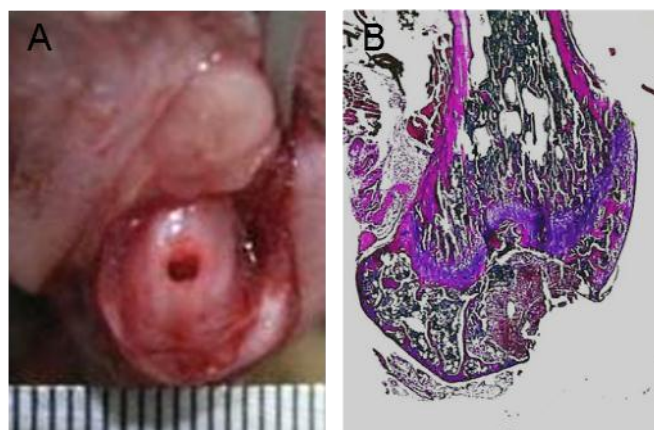


図1：マウスの関節軟骨欠損モデル

マウスの左側膝蓋骨溝に1 mm 径の歯科用ラウンドバーにて幅および深さ1 mm の欠損を形成した(A)。大腿骨膝蓋骨溝に形成した欠損の矢状断組織像 (B)。

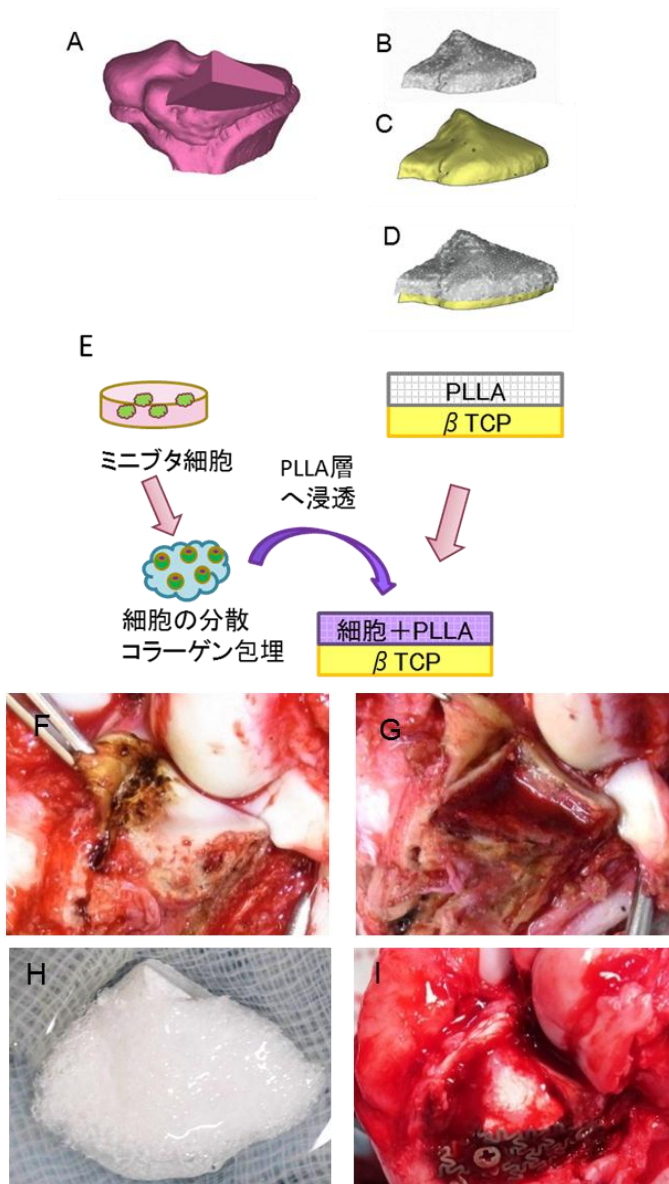


図 2 : ブタの関節軟骨欠損モデルの作製

ミニブタの右脛骨前内側1/4相当部に軟骨欠損モデルを設計し(A)、欠損の形態に合わせて β TCP(B)、PLLA(C)を作製し、これらを熱圧着した(D)。細胞は分散後、コラーゲンに包埋し PLLA 層に浸透させた(E)。6 ヶ月齢ミニブタの膝蓋骨を外側へ脱臼させたのち、内側半月板を反転させて脛骨前内側面を露出させた(F)。続いて脛骨前内側 1/4 相当部に扇形の欠損を形成した。深さは成長軟骨を超える深さとした(G)。完成した移植体(H)。移植体は欠損にチタンメッシュプレートにて固定した(I)。その後、半月板および膝蓋骨を整復・固定し閉創して手術を終了した。

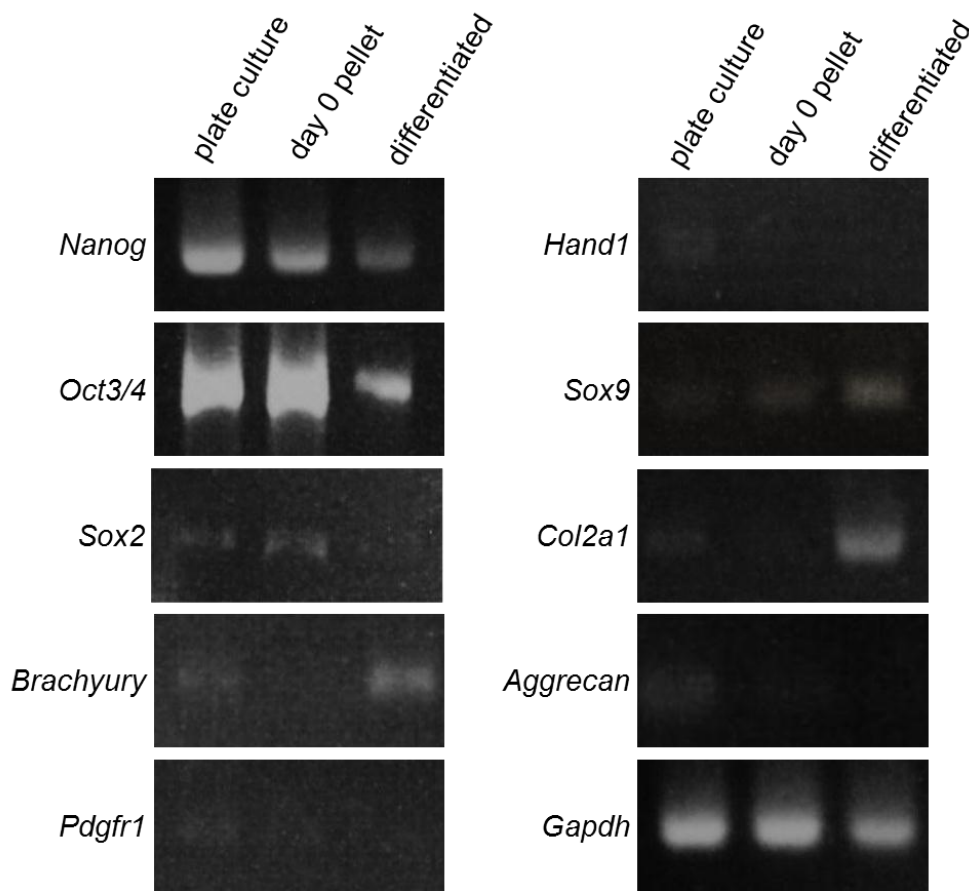


図3：マウス iPS 細胞の軟骨分化誘導培養時の遺伝子発現の推移
 維持培養していたマウス iPS 細胞を回収後、アテロコラーゲンに混和し 3 次元培養による軟骨分化誘導を行い、各タイムポイントにおける遺伝子発現の推移を評価した。多能性マーカー遺伝子のひとつである *Nanog* は day0 の段階で発現が低下した。その他の多能性マーカーである *Oct3/4*、*Sox2* の発現も 1 週間の分化誘導の間に低下した。また、初期中胚葉系マーカーである *Brachyury* の発現が上昇したことから、中胚葉系への分化誘導に成功していること、さらに循環器系の発生初期に発現が上昇する *Pdgfr1* や *Hand1* の発現が上昇しなかったこと、軟骨分化初期マーカーである *Sox9* の発現が上昇していること、軟骨分化マーカーである *Col2a1* の発現が上昇していることから、軟骨への分化誘導に一定の効果が得られたことが示された。しかしながら、もう一方の軟骨分化マーカーである *Aggrecan* の発現の上昇がみられなかったことから、成熟した軟骨への分化誘導は不十分であったことが示された。2 例実施し、すべてに同様な所見を認めた。

Implant	Donor/Host	2 wks	4 wks	8 wks
None	Actin GFP iPS/C57BL6	0/3	0/3	0/3
	Nanog GFP iPS/DBA	0/2	0/2	0/2
Collagen	Actin GFP iPS/C57BL6	0/3	0/3	0/3
	Nanog GFP iPS/DBA	0/2	0/2	0/2
10 ⁶ cells/mL	Actin GFP iPS/C57BL6	0/3	0/3	0/3
	Nanog GFP iPS/DBA	0/2	0/2	0/2
10 ⁷ cells/mL	Actin GFP iPS/C57BL6	0/3	0/3	0/3
	Nanog GFP iPS/DBA	0/2	0/2	1/2
10 ⁸ cells/mL	Actin GFP iPS/C57BL6	0/3	0/3	0/3
	Nanog GFP iPS/DBA	0/2	1/2	2/2

表 1 : マウス iPS 細胞移植における腫瘍形成
腫瘍形成は Nanog GFP iPS 細胞移植群にのみ見られ、また細胞濃度
が 10⁷ 細胞/mL 以上 移植後 4 週間以上経過した個体に見られた。

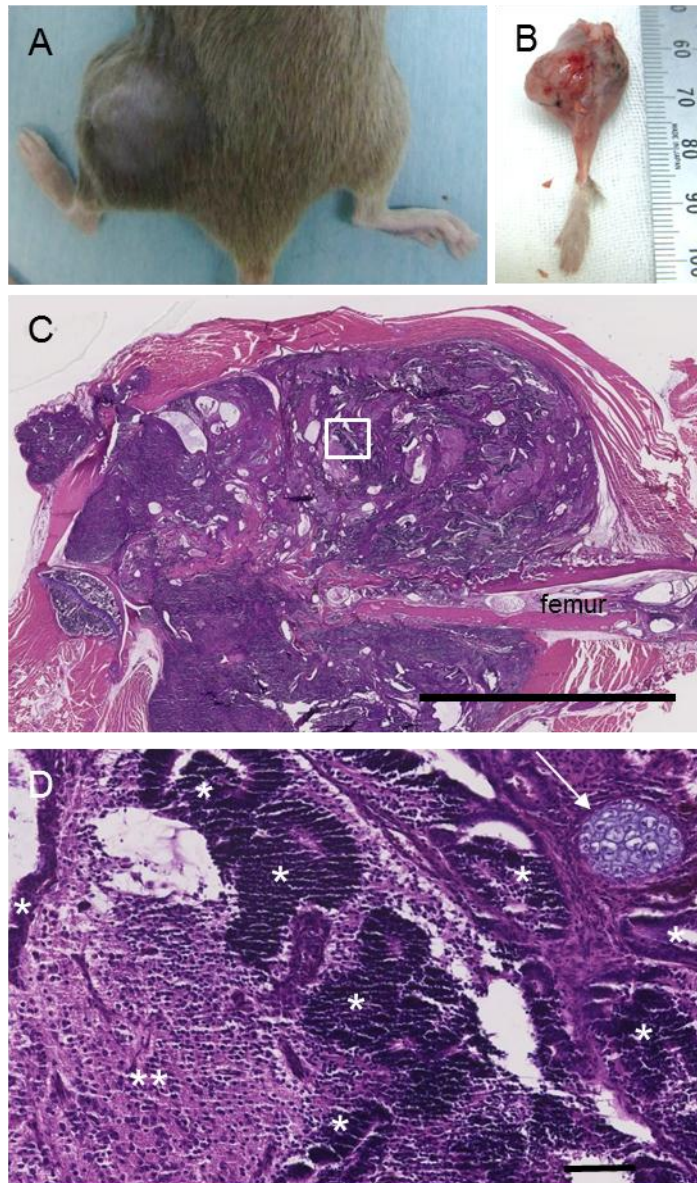


図4：Nanog GFP iPS 細胞を移植後に腫瘍形成したマウスの所見
 腫瘍は弾性硬として左側大腿部に触知した。腫瘍は周囲の組織を圧排して増殖していた(A, B)。ヘマトキシリン・エオジン染色後(C, D)、上皮成分(*)および未熟な間葉系成分(**)および未熟な軟骨(矢印)がみられ、病理組織学的に未熟奇形腫と診断された。

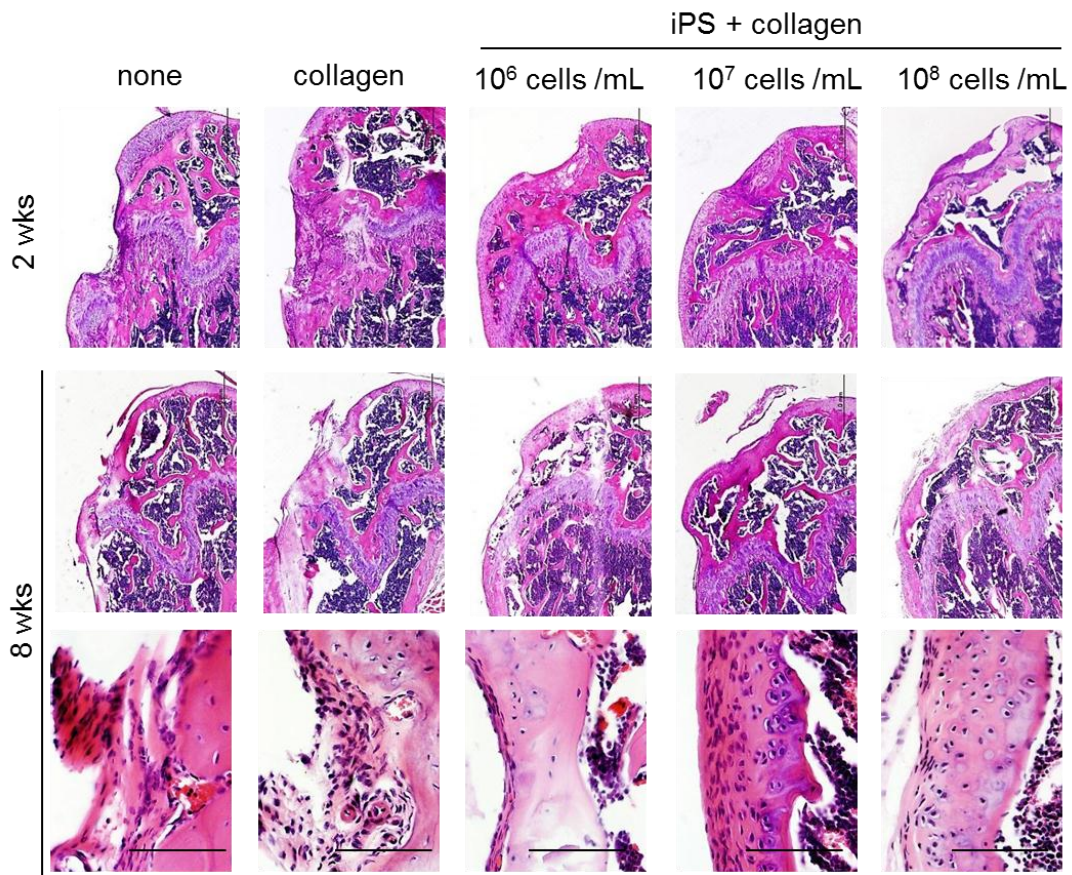


図5：マウスサンプルのヘマトキシリン・エオジン染色像
 腫瘍形成を認めなかったサンプルに対して組織切片作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。欠損部に何も移植しなかったサンプルとアテロコラーゲンのみを移植したサンプルでは、移植後8週間を経過しても再生軟骨の形成を確認できなかった。一方、マウスiPS細胞移植サンプルでは、細胞濃度依存的に関節形態の修復が促進された。一部再生軟骨の形成も確認され、その量・質ともに細胞濃度依存的に向上したことが示された。3例実施し、すべてに同様な所見を認めた。

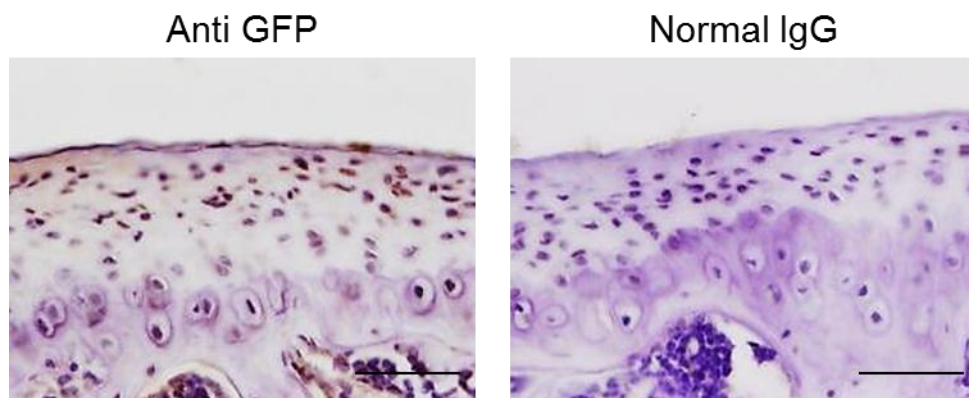


図6：グリーンマウス iPS 細胞移植サンプルの GFP 免疫組織化学染色
グリーンマウス iPS 細胞を移植し、軟骨修復を認めたサンプルに対して、
修復した軟骨組織がホスト由来かドナー由来かを確認するために GFP 免
疫組織化学染色を行った。結果、再生軟骨は GFP が特異的に陽性であり、
ドナーであるグリーンマウス iPS 細胞由来の再生軟骨が形成されたことが
示された。3 例実施し、すべてに同様な所見を認めた。

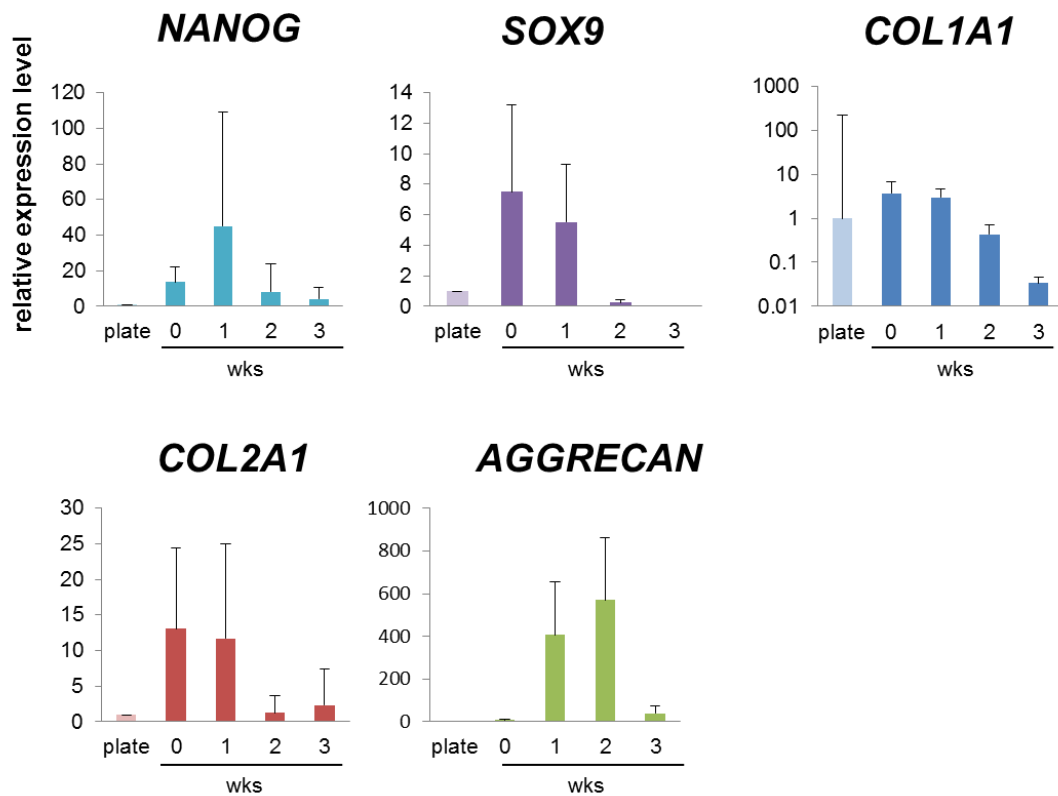


図7：ブタ MSC の軟骨分化誘導培養時の遺伝子発現の推移
 ミニブタ MSC を3次元培養にて軟骨分化誘導をおこない、各タイムポイントにおける遺伝子発現の推移を評価した。ミニブタ MSC については初期軟骨分化マーカーである *SOX9* の発現上昇に引き続き軟骨分化マーカーである *COL2A1* や *AGGRECAN* の発現上昇がみられることから、軟骨分化への運命づけがなされたことが示された。各値は3例の平均値、エラーバー：標準偏差

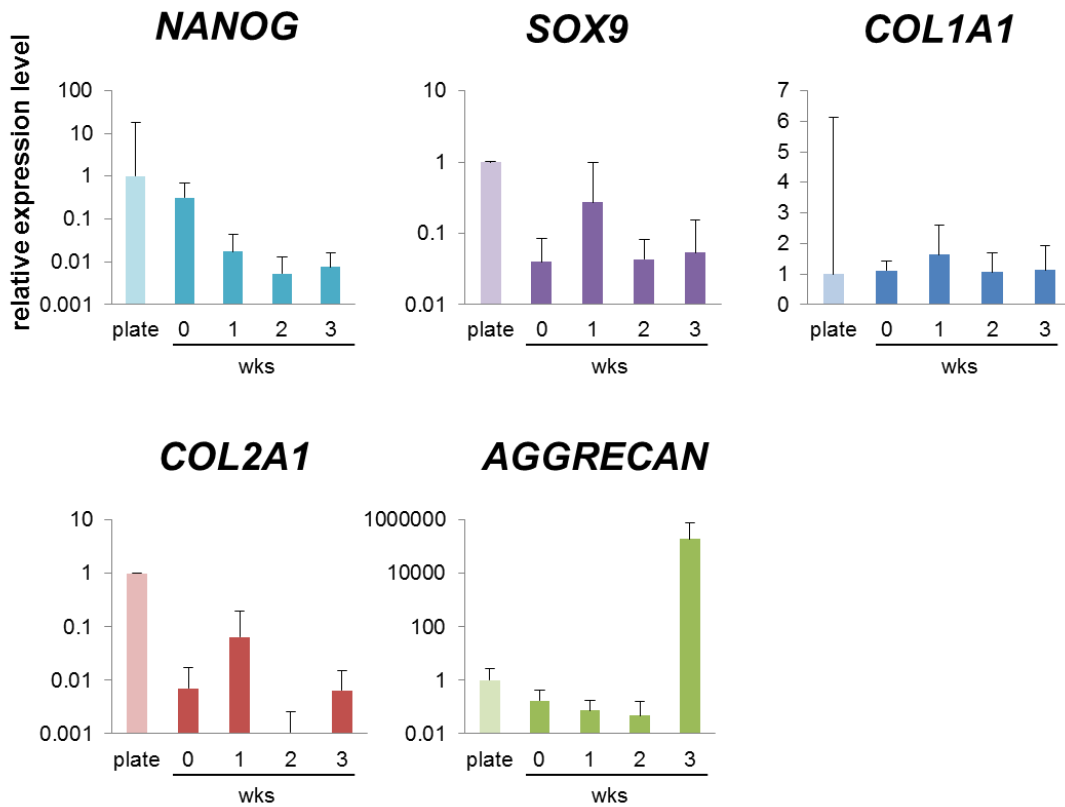


図8 ブタ iPS 細胞の軟骨分化誘導培養の遺伝子発現の推移

ミニブタ iPS 細胞を 3 次元培養にて軟骨分化誘導をおこない、各タイムポイントにおける遺伝子発現の推移を評価した。ミニブタ iPS 細胞については 3 次元培養後速やかに多能性マーカーである *NANOG* の発現の低下が認められたことから iPS 細胞を分散しコラーゲンゲルに混和する環境が、多能性の低下をもたらしたことが示された。一方、軟骨分化マーカーである *SOX9*、*COL2A1*、*AGGRECAN* の発現の上昇は不安定であり、3 次元培養のみでは不十分に軟骨分化誘導がかかることが示された。各値は 3 例の平均値、エラーバー：標準偏差

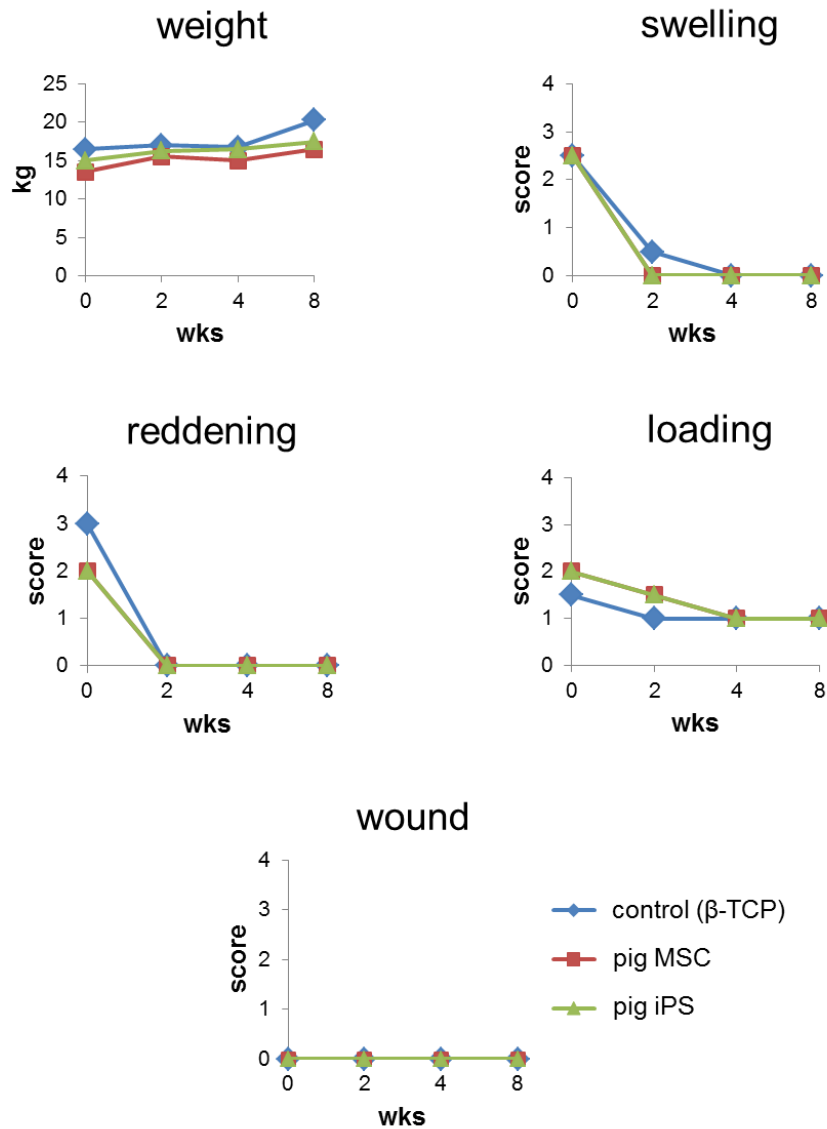


図9：ブタ細胞を移植したブタの経過観察期間における臨床所見経過の推移

体重は特に異常なく推移した。術野の発赤、腫脹は大きな問題なく経過し、次第に軽快した。荷重についても移植後時間が経過するごとに軽快したが、術前と同等になることはなかった。手術創についてはし開や排膿などの大きな問題なく経過した。各値は2例の平均値

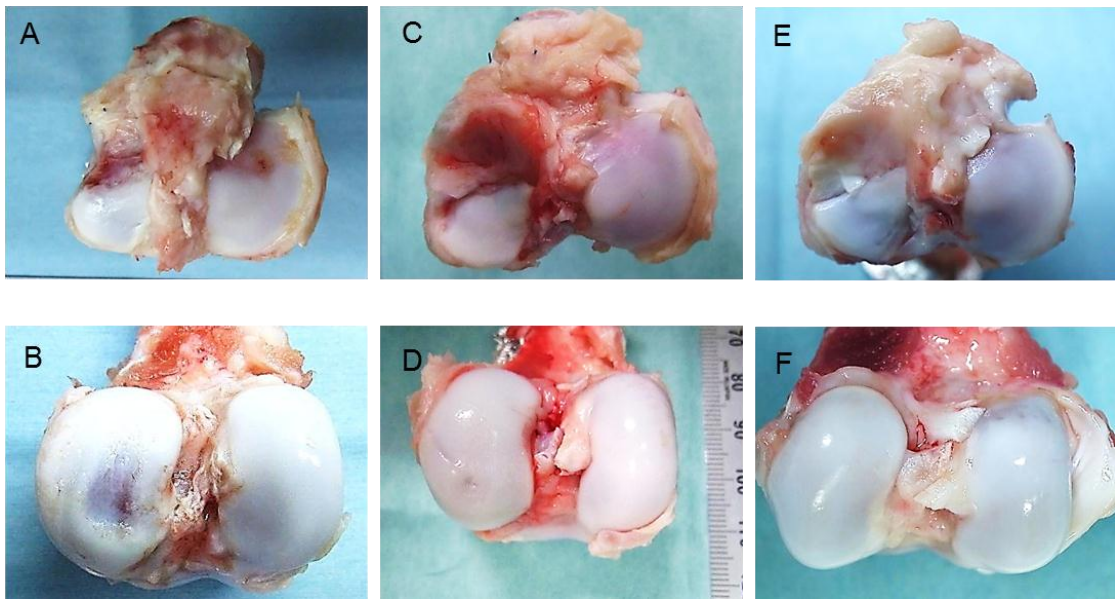


図 10：回収したブタサンプルの肉眼所見

対照群である β TCP だけの移植では、(A, B) 移植部直上に肉芽の形成は観察されず、対合する大腿骨関節軟骨の欠損がみられた。ミニブタ MSC 移植では、(C, D) 移植部直上肉芽の形成が観察され、対合する大腿骨関節軟骨の欠損は軽度になった。ミニブタ iPS 細胞移植(E, F)では、移植部直上肉芽の形成が観察され、大腿骨関節軟骨の変性や損傷も非常に軽度になった。2 例実施し、すべてに同様な所見を認めた。

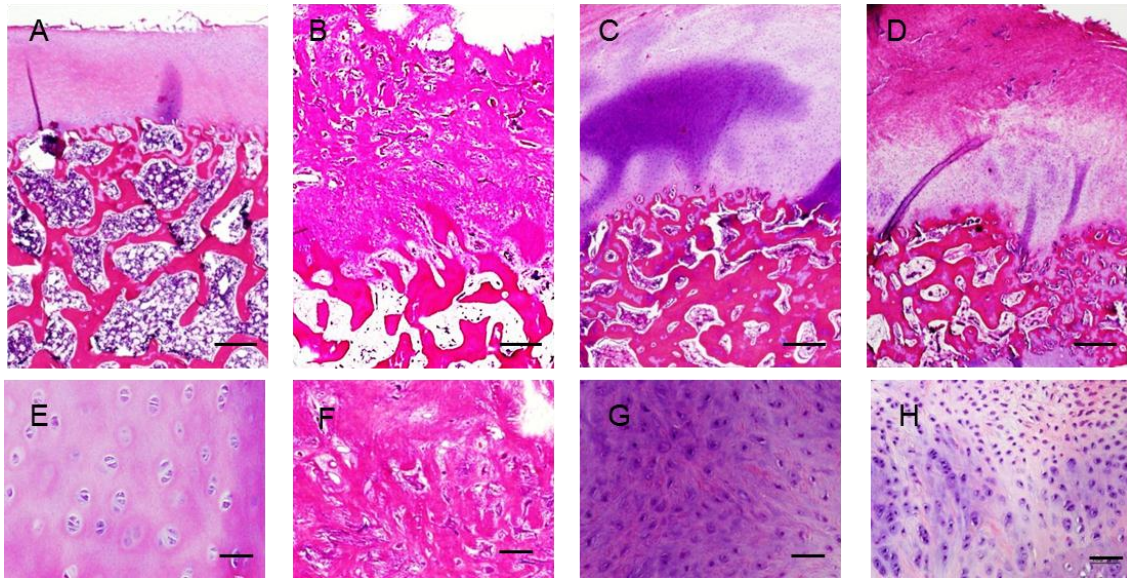


図 1 1 : 回収したブタサンプルのヘマトキシリン・エオジン染色組織像

正常な関節軟骨(A, E)の組織像を示す。β TCP 移植サンプル(B, F)では、再生軟骨の形成を認めなかった。ミニブタ MSC 移植サンプル(C, G)では、一部旺盛な再生軟骨の形成を認めた。ミニブタ iPS 移植サンプル(D, H)では、一部非常に旺盛な再生軟骨の形成を認めた。2 例実施し、すべてに同様な所見を認めた。scale bar: A, D は 1 mm、E, H は 100 μm

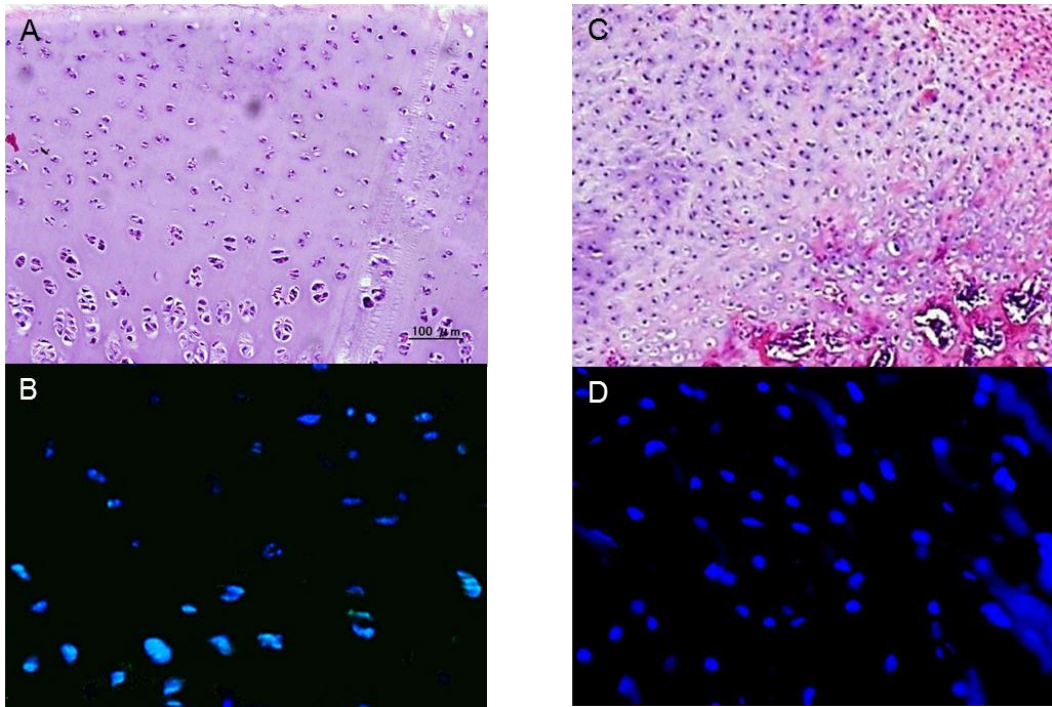
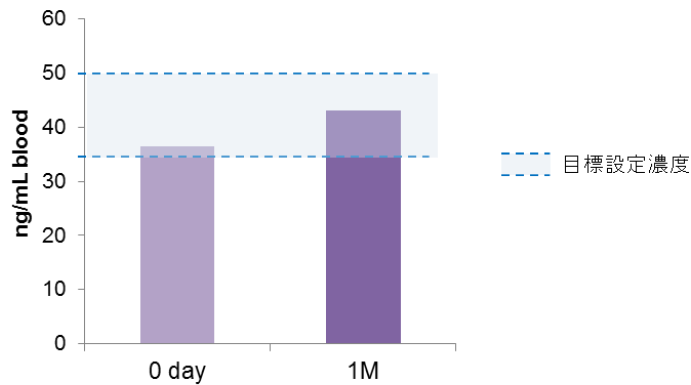


図 1.2 : 回収したブタサンプルにおけるブタ Y 染色体プローブを用いた蛍光 in-situ hybridization 解析

雄性ミニブタの正常な関節軟骨のヘマトキシリン・エオジン染色像(A)と蛍光 in situ-hybridization 所見(B)。正常な軟骨細胞にブタ Y 染色体に結合した GFP 標識プローブが検出された。ミニブタ iPS 細胞移植サンプルの再生軟骨のヘマトキシリン・エオジン染色像(C)と蛍光 in situ-hybridization 所見(D)。再生軟骨に GFP 標識ブタ Y 染色体プローブが検出されず、再生軟骨は雌性ミニブタより樹立したミニブタ iPS 細胞由来であることが示された。2 例実施し、すべてに同様な所見を認めた。

タクロリムス血中濃度



臨床検査値

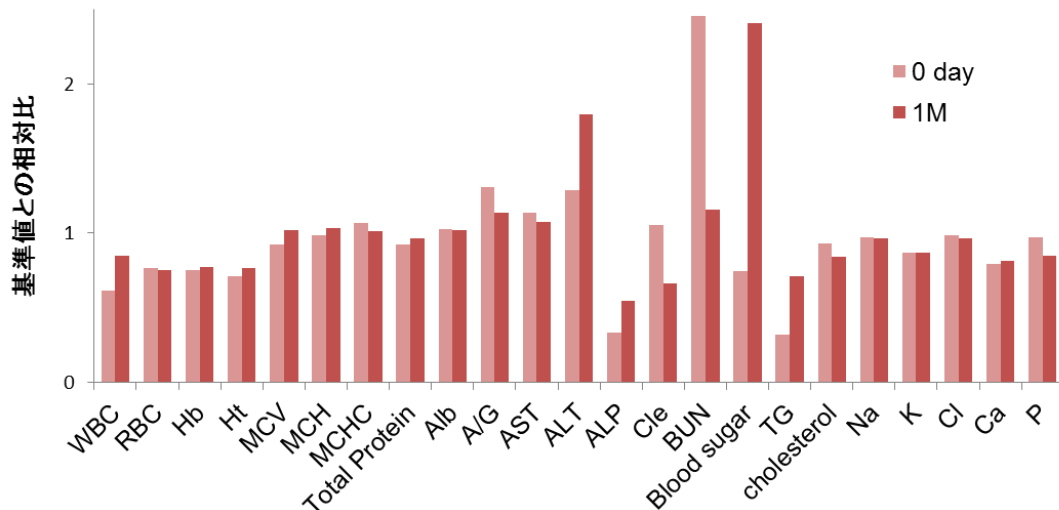


図 1 3 : ヒト iPS 細胞を移植したブタの臨床検査値

タクロリムス製剤は血中濃度が 35~50 ng/mL を維持するように術前 5 日前より経口投与した。期間中、ミニブタは問題なく投与された薬剤を摂取したが、血液検査結果からも薬剤が血中へ移行していることが示され、また移植時およびサンプル回収時において所定の血中濃度の範囲内を推移したことが示された。

また、タクロリムス製剤投与にあたり特に注視すべきは感染と肝機能障害や腎機能障害であるが臨床検査値上、ごく軽度の肝機能障害がみられる程度であったことが示された。各値は 2 例の平均値

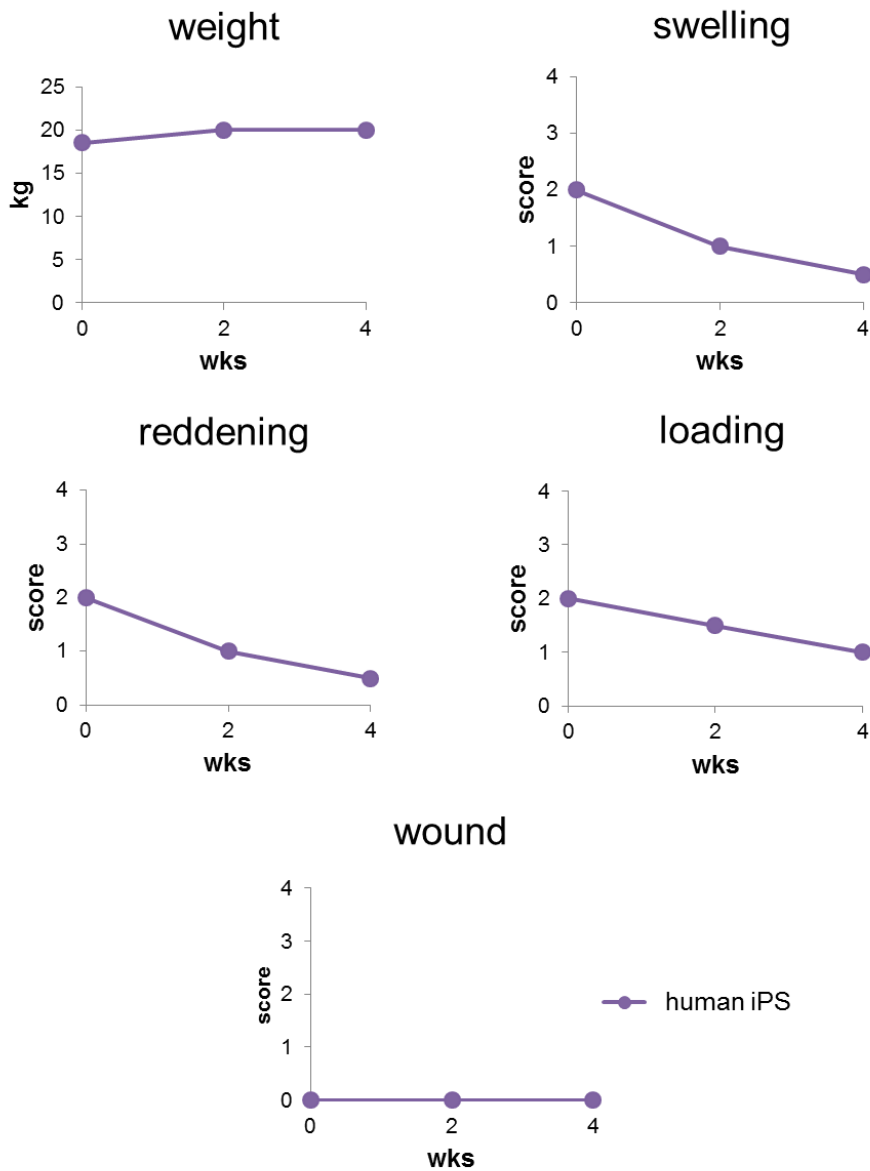


図 1 4 : ヒト iPS 細胞を移植したブタの経過観察期間における臨床所見経過の推移

体重は大きな異常なく推移した。術野の発赤や腫脹は大きな問題なく、時間の経過とともに軽快した。術肢への荷重も時間の経過とともに軽快したが、術前と同等になることはなかった。手術創についてはし開や排膿などの問題なく経過した。

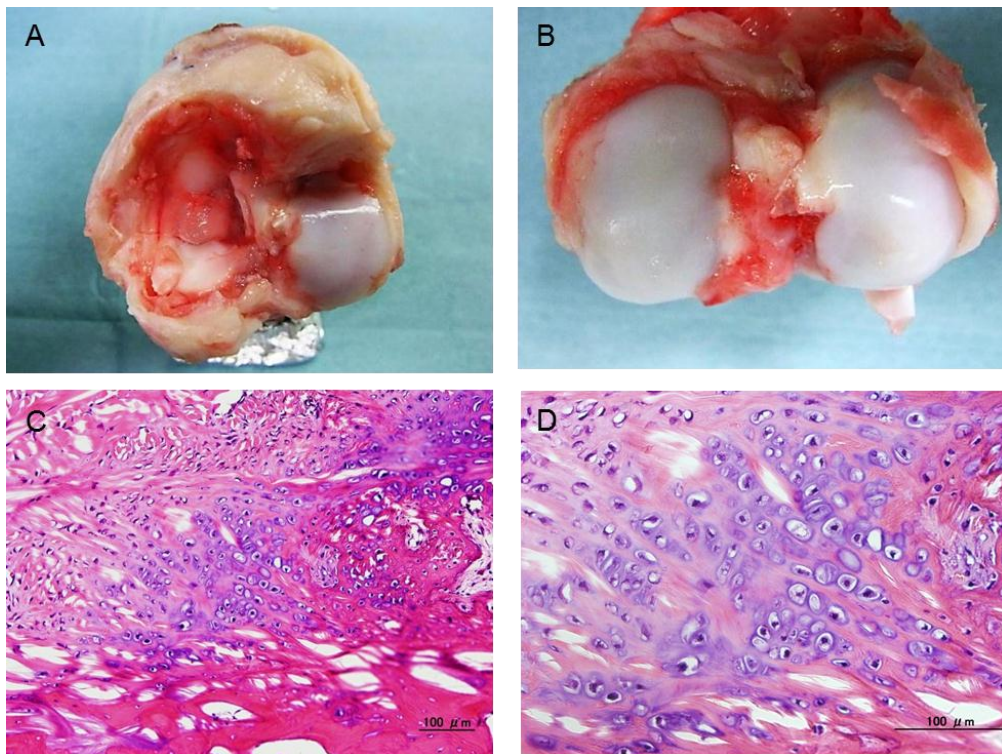


図15：ヒト iPS 細胞を移植したブタのサンプル
肉眼所見(A, B)を示す。移植部直上の肉芽形成が認められ、対合する大腿骨関節軟骨の欠損は非常に軽度であった。ヘマトキシリン・エオジン染色像(C)と同図内の枠部位の拡大像(D)を示す。ごく一部ではあったが、再生軟骨の形成が認められた。2例実施し、すべてに同様な所見を認めた。