

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

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、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。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。

軟骨再生医療における細胞源として、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。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、軟骨細胞や間葉系幹細胞における、増殖培養に伴う細胞品質の低下がある。このため、軟骨細胞や間葉系幹細胞を細胞源としては、再生組織の大型化を図ることは困難である。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。軟骨細胞への分化制御については、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。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。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膝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 細胞は自家移植が不可能であり、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幹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。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は、最適なのは、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、網膜、脊髄および心筋が挙げられ、網膜については厚労省の承認のもと、世界初の臨床応用に向けて準備が進められている。しかし、網膜などの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る。これらの方法を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に用いる場合、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。

生体内において腫瘍化する細胞は周囲の制御を受けることなく過増殖する。また、腫瘍の悪性度が進むと、細胞の分化度が低下し、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。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。したがって、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ーラ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、細胞分散やコーラ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、関節欠損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。マウス iPS 細胞の検討では、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、また一部の軟骨分化マーカー遺伝子の発現が認められなかった。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。

ミニブタ iPS 細胞の *in vitro* の検討では、培養期間は 3 週間とし、1 週間ごとに遺伝子を回収した。多能性マーカーの発現の速やかな低下が確認されたが、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。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。マウス iPS 細胞移植では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 以上の移植群にのみ見られた。また、腫瘍形成を認めなかったサンプルでは、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。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、関節軟骨欠損を脛骨膝関節内側に大型に形成した。また、骨欠損に対しては足場素材に人工骨である  $\beta$  TCP を採用し、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。 $\beta$  TCP のみの移植では高度に惹起されていた変形性関節症がミニブタ iPS 細胞移植においては軽減され、また一部再生軟骨の形成が観察された。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ミニブタ関節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。

iPS 細胞移植による再生医療を実現するためには解決すべき問題がまだ残っている。導入遺伝子の発現消失が不十分な 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。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。