

iPS細胞技術を使った関節軟骨損傷の再生治療法開発



医療と技術

妻木 範行*

Regenerative therapy for articular cartilage damage using iPS cell technology.

Key Words : Cartilage, Regeneration, Extra cellular matrix, iPS cells, Chondrocytes

1. はじめに

関節軟骨は各骨格コンポーネントの端を覆う、表面が滑らかな組織である。骨は関節で相対し、双方の関節軟骨が摺動することで関節運動が可能となっている。交通事故や転倒などの外傷で関節軟骨が損傷を受けると、関節可動域の低下・運動時関節痛の原因となる。軟骨は修復能に乏しいことが知られ、軟骨が損傷した状態で関節を使い続けると、損傷部の周辺に軟骨変性が広がり、二次性の変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) へと至ることが少なくない。軟骨は軟骨細胞と軟骨細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, ECM) からなる組織である (図1)。軟骨細胞は軟骨 ECM を作り、軟骨 ECM

は軟骨細胞を囲む。健全な軟骨を硝子軟骨と呼び、その軟骨 ECM はコラーゲン細線維とプロテオグリカンからなる。硝子軟骨 ECM のコラーゲン細線維は、II, IX, XI 型コラーゲン分子が会合してできている。軟骨 ECM は軟骨のメカニカルな機能 (荷重に抗し、潤滑な関節運動を担う) を果たすとともに、軟骨細胞に適切な環境を与えて軟骨細胞の性質を維持している。すなわち、軟骨細胞と軟骨細胞外マトリックスは相互に依存しており、この構造が、軟骨の修復能が乏しい理由の1つになっている。軟骨が損傷を受けると損傷部は軟骨細胞とともに軟骨 ECM を喪失する。損傷部に軟骨細胞様の細胞が遊走あるいは供給されても、適切な環境が無い状態で

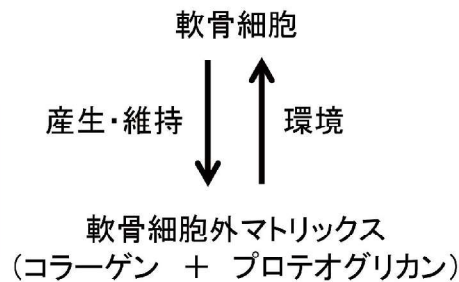
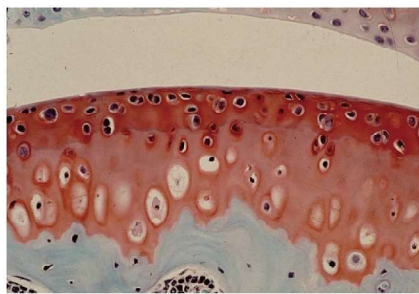


図1. 軟骨の構造。左、関節軟骨の組織像 (マウス)。軟骨細胞は、サフラニンO染色で赤く染まる軟骨細胞外マトリックス (軟骨 ECM) の中に散在している。右、軟骨細胞と軟骨細胞マトリックスの関係。軟骨細胞と軟骨 ECM は相互に依存している。軟骨の修復能が乏しい理由は、軟骨の解剖学的構造に帰される。外傷により軟骨が損傷を受けると損傷部は軟骨 ECM を喪失する。すると軟骨細胞が性質を失うため軟骨 ECM が作られなくなる、という悪循環に陥るため損傷部はほとんど自然修復されない。



* Noriyuki TSUMAKI

1964年8月生まれ
大阪大学医学部卒 (1989年)
現在、大阪大学大学院 医学系研究科
生命機能研究科 生化学・分子生物学
組織生化学 教授 医学博士
TEL : 06-6879-3321
E-mail :
tsumaki.noriyuki.med@osaka-u.ac.jp

細胞は軟骨の性質を維持できない。

そのため細胞は軟骨 ECM を作らず、損傷部は修復されない。ある程度の大きさの損傷部を硝子軟骨で修復するためには、細胞だけでなく同時に軟骨 ECM も損傷部へ供給する、即ち軟骨細胞と軟骨細胞外マトリックスからなる軟骨組織の状態で供給する必要がある。

2. 関節軟骨損傷に対する再生治療の現状

損傷部が小さい場合は、軟骨下骨を穿孔して骨髓内に存在するとされるプロジェニター細胞を損傷部に取り入れるマイクロフラクチャー（骨髓刺激法）が行われる。軟骨 ECM が存在しないところに骨髓から細胞のみが導入されるので、細胞は軟骨細胞として維持されない。その細胞が損傷部に形成する組織は硝子軟骨ではなく、I型コラーゲンからなる瘢痕様組織を含む線維軟骨となる。自然治癒や骨髓刺激法で治癒が見込めない関節軟骨損傷に対して、再生治療によって修復することが期待されている。関節面の辺縁部から少量だけ採取した自家軟骨細胞や、骨髓や滑膜に存在する間葉系間質細胞を培養して増やした後に細胞移植することが行われ、良好な臨床成績が報告されている。しかし、軟骨 ECM を伴わない細胞は軟骨細胞の性質を維持できず [1]、移植部位に正常な軟骨組織を作ることは難しい。そのため長期的には変性が進む。細胞移植による修復機序は、移植した細胞が分泌する因子等がホストの細胞に働いて修復を誘導する、または炎症をコントロールする trophic effect によるパラクライン効果だと考えられている [2, 3] (図2、上段)。パラクライン効果による修復機序は修復能が限られた患者自身の細胞に依存するため、ある程度以上の大きさの欠損部に正常な軟骨を作り出すことは難しい。修復組織は正常の軟骨ではなく、線維軟骨を含むこととなる [4]。

上述のパラクライン効果とは別の修復機序として、

軟骨細胞と軟骨 ECM からなる軟骨組織である軟骨を移植し、移植した軟骨自身が修復組織を構成する修復機序があげられる (図2、下段)。モザイクプラスチックと同種軟骨移植はこの修復機序を実現している。モザイクプラスチックは関節面の荷重があまりかからない辺縁部から骨軟骨柱を採取し、欠損部に移植する。健全軟骨組織を移植するため、硝子軟骨による修復が期待できる。しかし、移植した面積と同じ面積の軟骨欠損を採取部に作るため、採取できる軟骨の量に限りがある。米国では同種若年者由来軟骨片 (DeNovo NT) の移植が行われている (<http://www.zimmer.com/medical-professionals/products/biologics-sports-medicine/denovo-nt-natural-tissue.html>)。課題として、ドナー不足と、ドナー個体間差による軟骨の活性のばらつきによる成績の不安定さが挙げられている。

3. ヒト iPS 細胞から軟骨組織を作る方法の開発

モザイクプラスチックと同種軟骨片移植は、移植物がダイレクトに修復組織を構成する治療方法であるが、ともに移植物の不足が課題である。胚性多能性幹 (ES) 細胞と人工多能性幹 (iPS) 細胞は、ほぼ無限に数を増やせる自己複製能と体のあらゆる細胞/組織になれる多能性を持つ。そのため、多能性幹細胞からほぼ無限量の軟骨を作り出すことが出来る。iPS 細胞は、ES 細胞に伴う初期胚を犠牲にする倫理的問題を持たない。我々は、移植用の硝子

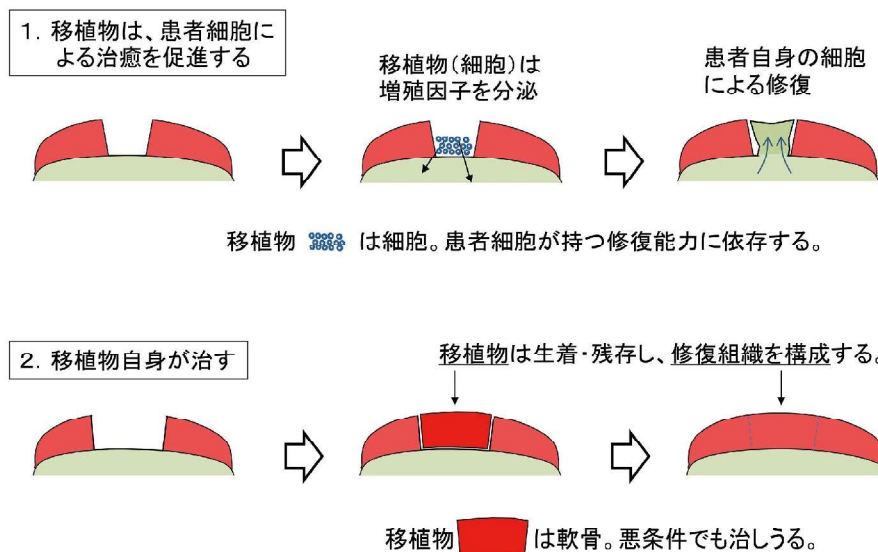
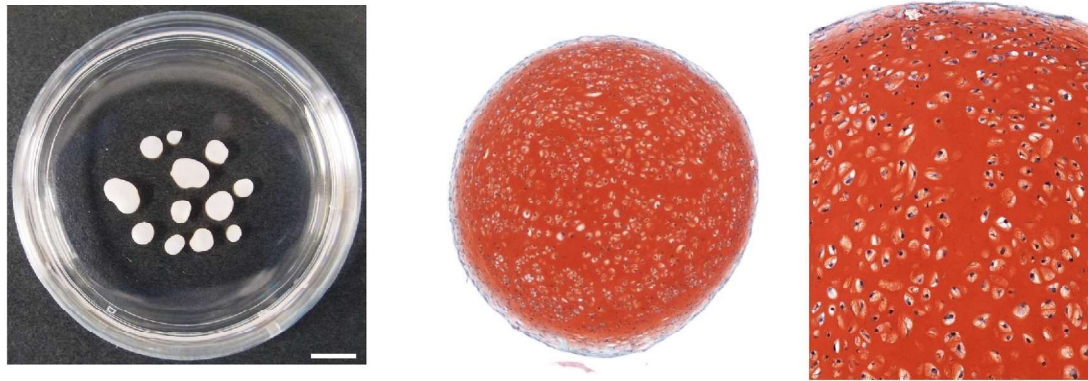


図2. 移植により関節軟骨欠損を再生する2つの修復機序。



A. ヒト iPS 細胞由来硝子軟骨の外見

B. ヒト iPS 細胞由来硝子軟骨の組織像

図 3. ヒト iPS 細胞から作った軟骨組織。

ヒト iPS 細胞を軟骨細胞に分化誘導した後に 3 次元培養することによって、軟骨細胞に細胞外マトリックスを作らせて硝子軟骨を作る。

A. ヒト iPS 細胞由来硝子軟骨の外見。直径 2-3 mm の軟骨片に見える。Bar, 5 mm。

B. ヒト iPS 細胞由来硝子軟骨の組織像 (左) とその拡大像 (右)。サフランニン O 染色で赤色に染まる軟骨マトリックス中に軟骨細胞が散在する。

軟骨組織を iPS 細胞から作る方法を開発している。

c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2 の 4 因子を皮膚線維芽細胞などの体細胞に導入することで細胞核の初期化を起し、ES 細胞に相当する自己複製能と多能性を持つ iPS 細胞が、2006 年にマウス細胞で、2007 年にヒト細胞で [5] 山中教授らにより開発された。我々は、軟骨発生の知識を応用し、iPS 細胞から軟骨組織を作る方法を開発した。できた軟骨組織は直径 1-3 mm の白色の球形で、硝子軟骨に相当する組織であった (図 3) [6-8]。毒性と造腫瘍性を評価する非臨床安全性試験を行った後、限局した膝関節軟骨損傷の患者に対して、iPS 細胞由来軟骨を移植する再生治療の臨床研究を行っている (<https://jrct.niph.go.jp/cn-latest-detail/jRCTa050190104>)。

4. iPS 細胞由来軟骨の同種移植について

個々の患者それぞれの iPS 細胞を作って目的の組織細胞へ分化誘導するのは時間と費用がかかるため、一般的な医療として実現することは難しい。その一方、軟骨は免疫原性が低く、海外では HLA ミスマッチで免疫抑制剤を使用せずに同種移植が行われている。移植軟骨の免疫原性が低い理由として、軟骨組織は無血管で、かつ軟骨細胞は ECM に取り囲まれているため、ホストの免疫担当細胞であるリンパ球や樹状細胞が移植された軟骨の中の軟骨細胞

に接触する状況に無いことが考えられている。

我々は、ヒトと似た主要組織適合抗原の構造を持つ霊長類であるカニクイザルを用いて、生体内で同種軟骨が免疫反応/免疫拒絶を起こすかどうかを調べた。同種カニクイザル iPS 細胞を軟骨組織へ分化誘導し、MHC ミスマッチのサルの上肢関節軟骨に欠損を作って移植した。免疫抑制剤を使用しなかった。その結果、軟骨欠損が軟骨下骨を貫いて骨髓に達する場合 (骨軟骨欠損) は、拒絶はされなかったが、移植軟骨周囲にリンパ球が集簇した [9]。一方、軟骨欠損が軟骨下骨を貫かず軟骨内にとどまる場合は (軟骨内欠損)、移植軟骨は生着し、リンパ球の集簇は起きず、免疫反応は惹起されなかった (図 4)。移植軟骨は周囲のホスト軟骨 (サル軟骨) と癒合し、関節面を構成していた。また、iPS 細胞由来軟骨を移植をしないと欠損部位の周囲の軟骨は変性するのに対し、軟骨移植をした場合は周辺軟骨の変性が起きなかった。移植軟骨を取り出して単一細胞レベルの網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、移植した軟骨の遺伝子発現プロファイルは正常関節軟骨のそれに似ていた [10]。これらの結果から、軟骨内欠損に移植した同種 iPS 細胞由来軟骨は生着して再生組織を直接構成し、周辺軟骨の変性を防ぎ、そして関節軟骨として機能することが判明した。

同種軟骨片移植ではドナー間で軟骨の品質が不均一なことが課題として挙げられている。一方、iPS

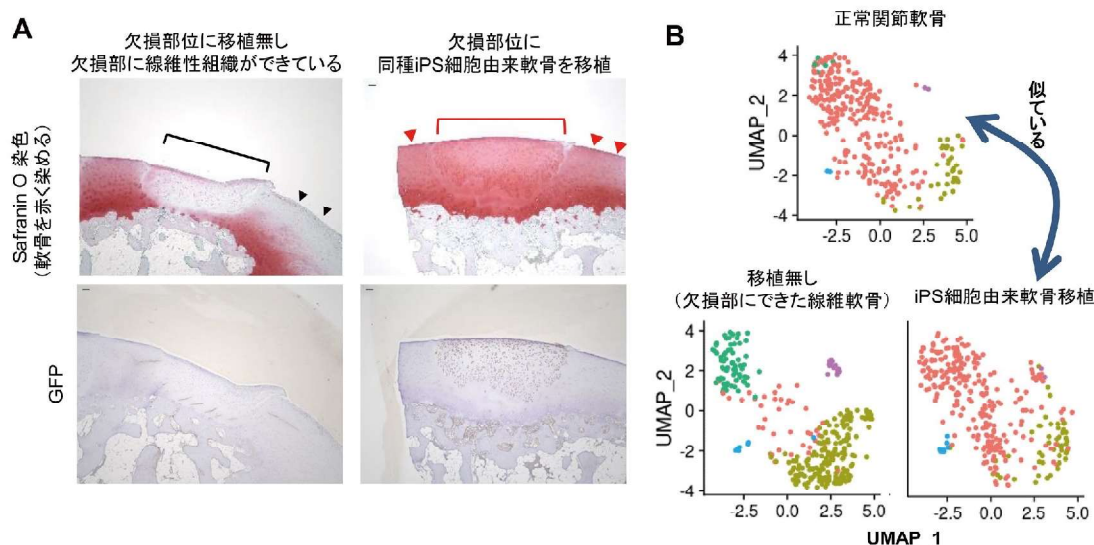


図 4. サル膝関節軟骨内欠損に同種 iPS 細胞由来軟骨を移植後 17 週。
 A. 上段、左、移植しないと欠損部は線維組織で埋まり (黒角括弧)、周辺の軟骨は変性する (黒矢頭)。右、移植物は着生し (赤角括弧)、周囲の軟骨変性は起きない (赤矢頭)。下段右、再生組織は GFP を発現していた。即ち、移植した軟骨であった。
 B. シングルセル RNA シーケンス解析。移植後 17 週の iPS 細胞由来軟骨のトランスクリプトームプロファイルは正常関節軟骨のそれに似ていた。
 Abe, K., et al., Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun*, 2023. 14(1): p. 804. を改変

細胞は自己複製を持つためいくらかでも増やせるので、1 種類の iPS 細胞から均質な軟骨を大量に作る事が出来、それを全ての患者に同種移植する治療アプローチが考えられる。

5. おわりに

軟骨発生における細胞分化の制御機構が分子レベルで明らかにされてきた。関節軟骨損傷は自然治癒せず、その再生治療法の開発が期待されている。細胞移植、同種軟骨移植、iPS 細胞由来軟骨の移植などの治療方法が行われ、あるいは研究開発の途上にある。iPS 細胞は発生初期に相当する分化段階の細胞であり、軟骨細胞分化制御機構の知識を活用することで軟骨へと分化誘導することができる。今後、より良好な治療成績と治療の汎用性を得るために、再生の機序とともに同種移植時に起きる免疫反応の理解を深めることが重要だと考える。

謝辞

本研究は、日本学術振興科学研究費補助金 (23H03029)、AMED 橋渡し研究プログラム (JP23ym 0126127)、AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム (JP23bm 1223014)

の支援を受けて行われました。

文献

1. von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., and Müller, P., Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267: p. 531-532, 1977.
2. Ansboro, S., Roelofs, A.J., and De Bari, C., Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both? *Curr Opin Rheumatol*, 29(2): p. 201-207, 2017.
3. Caplan, A.I., Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*, 2015: p. 628767, 2015.
4. Nixon, A.J., Begum, L., Mohammed, H.O., Huibregtse, B., O'Callaghan, M.M., and Matthews, G.L., Autologous chondrocyte implantation drives early chondrogenesis and organized repair in extensive full- and partial-thickness cartilage defects in an equine model. *Journal of orthopaedic research* :

- official publication of the Orthopaedic Research Society*, 29: p. 1121-1130, 2011.
5. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5): p. 861-872, 2007.
 6. Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S., and Tsumaki, N., Generation of Scaffoldless Hyaline Cartilaginous Tissue from Human iPSCs. *Stem Cell Reports*, 4(3): p. 404-418, 2015.
 7. Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., and Tsumaki, N., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*, 513(7519): p. 507-511, 2014.
 8. Yamashita, A., Yoshitomi, H., Kihara, S., Toguchida, J., and Tsumaki, N., Culture substrate-associated YAP inactivation underlies chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 2020.
 9. Okutani, Y., Abe, K., Yamashita, A., Morioka, M., Matsuda, S., and Tsumaki, N., Generation of Monkey Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage Lacking Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on the Cell Surface. *Tissue Eng Part A*, 28(1-2): p. 94-106, 2022.
 10. Abe, K., Yamashita, A., Morioka, M., Horike, N., Takei, Y., Koyamatsu, S., Okita, K., Matsuda, S., and Tsumaki, N., Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun*, 14(1): p. 804, 2023.

