

## 第4回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

### 軟骨の再生

- ◆ 日時 平成23年5月31日(火)16時～18時10分
- ◆ 場所 大会議室(管理棟3階)
- ◆ 研究責任者 整形外科学講座 教授 松末 吉隆
- ◆ 司会 病理学講座(疾患制御病理学部門) 教授 小笠原 一誠

#### 講演者と演題

1. 今井 晋二 リハビリテーション部 准教授  
「関節軟骨の修復と再生医療」
2. 日柳 章彦 動物生命科学研究センター 助教  
「iPS細胞を用いた軟骨再生医療研究とモデル動物の重要性」

#### はじめに

小笠原 一誠 (病理学講座・疾患制御病理学部門)

研究活動推進室(服部隆則副学長)による基礎医学講座と臨床医学講座が融合した学内共同研究プロジェクト推進のための第4回学内講演会を開催したので報告する。

平成23年5月31日(火)16時より大会議室(管理棟3階)で、『軟骨再生』というテーマで、今井晋二先生(リハビリテーション部准教授)、日柳章彦先生(動物生命科学研究センター 助教)に講演

いただいた。講演の内容は、各論文を参照されたい。

馬場忠雄学長はじめ基礎・臨床あわせて30名の出席があり、小松直樹先生(生命科学講座[化学]准教授)小島秀人先生(生化学・分子生物学講座[分子遺伝医学部門]准教授)などから活発な質疑がなされ、今後の新たな研究の展開や方向性についての手掛かりが得られた。

# 軟骨の修復と再生医療

## -当教室の再生医療研究の10年-

今井晋二

リハビリテーション部

## Tissue Engineering for Damaged Cartilage

Summary of Basic Research for Cartilage Regeneration of the Last 10 years

Shinji Imai

Department of Physical Medicine and Rehabilitation

**Abstract** Regeneration of articular cartilage has long been a target of challenge for the orthopaedic community. Three most important factors of the regenerated cartilage are scaffold, cell, and growth and environmental factors. As for scaffold, there still remains a controversy over which type of scaffold should be used; bio-absorbable or non-absorbable. Likewise, appropriate cell type for tissue engineering of cartilage has not yet been determined; pluripotent stem cell or mature chondrocyte. Finally, in order to control the proliferative and differentiation activities of the applied cells, appropriate growth factor should be applied, though it also remains yet undetermined. For the last 10 years, we have dedicated our basic science activities to the cartilage research in order to elucidate the characteristics of these factors pertinent to the cartilage regeneration. After summarizing of our previous research date, we demonstrate our novel attempt to treat cartilage regeneration using cynomolgus monkey model of cartilage injury

**Keyword:** cartilage, tissue-engineering, chondrocytes, stem cell,

### はじめに

滋賀医科大学整形外科講座では、2001年に松末吉隆教授が就任されて以来、「軟骨の再生医療」を研究のメインテーマに掲げている。前任の福田眞輔前教授の主なテーマはリュウマチ性脊椎症の外科的治療であり[1, 2]、筆者はこれに関連する関節炎[3, 4, 5]や神経障害[6, 7]の分野で大学院生たちと研鑽を重ねていた。当時、「軟骨再生」の研究は当教室では皆無であった。

筆者と「軟骨再生医療」との関わりは2002年にまでさかのぼる。日本学術振興会特別研究員として赴任していたアムステルダム自由大学から帰国し、大学勤務に復帰して間もない頃であった。松末教授指導で初めての大学院生である久保充彦君の研究テーマを考えてやってほしい、と松末教授から依頼された。分野は何でもよいと、非常にマイルドな指示であった。

筆者自身のアムステルダム時代までの研究テーマは「軟骨」とは無関係の「骨代謝」であり[8, 9]、当初久保君にはその仕事の手伝いをしてもらった[10]。転

機は弘前で開かれた第17回日本整形外科学会基礎学術集会で起こった。「自家軟骨移植術」を *N Eng J Med* に発表し、時代の寵児となっていた Peterson 教授が招待されていた。学会の主題は「軟骨の再生医療」であり、名だたる国内外の研究施設がしのぎを削っていた。まさにこの分野が一世を風靡するかの印象であった。

帰りのタクシーの中で発せられた「あのレベルにまで到達するには相当頑張らないとダメですね」との松末教授のコメント以降「軟骨の再生医療」が教室の研究テーマになった。久保充彦君のテーマも「軟骨の再生医療」になり、以降、筆者はこれまで10数名の大学院生と「軟骨の再生医療」について研鑽を重ねている。今回、これまでの大学院生の研究を紹介するとともに将来の展望について考察したので報告する。

### 軟骨細胞移植術と自家軟骨柱移植術

1994年、Britberg と Peterson は「自家軟骨細胞移植術」による軟骨損傷に短期治療成績を報告した[11]。

---

Received July 20, 2011

Correspondence: 滋賀医科大学リハビリテーション部 今井晋二

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 simai@belle.shiga-med.ac.jp

自己の軟骨細胞を *in vitro* で増殖させ、生体に戻すこの治療方法は日本を除く欧米の先進国では急速に普及した。しかし、最初の報告から 17 年を経て、現在ではその効果を疑問視する報告も多い。一方、当教室の松末吉隆教授は関節の非荷重部から円柱状の骨軟骨柱を採取し、軟骨欠損部に移植する自家骨軟骨柱移植術を報告した (図 1) [12]。

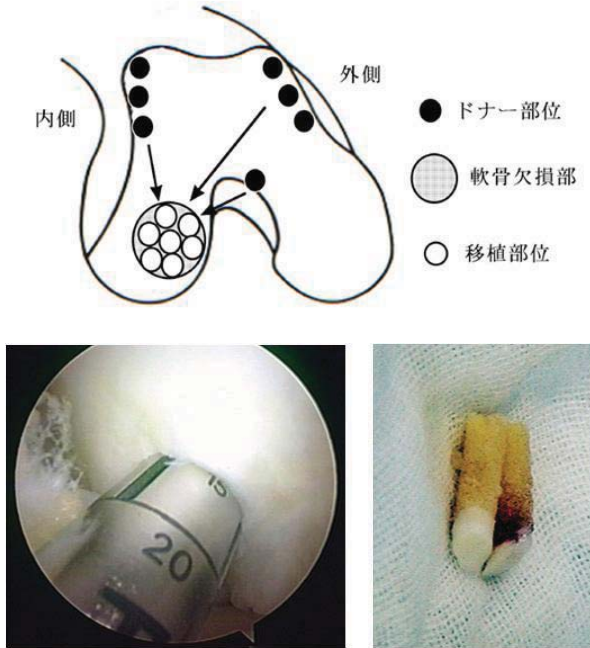


図 1. 自家軟骨柱移植術[12]

自家骨軟骨柱移植術は離断性骨軟骨炎[12]やステロイド性骨壊死[13]に対して良好な成績をおさめた。しかし、もっとも罹病率の高い変形性関節症での成功例の報告はなく、「軟骨の再生医療」が求められる所以である。

### 軟骨再生の基礎研究

軟骨の再生医療では、以前から足場 (Scaffold)、細胞、分化・成長因子の 3 つの要素の組み合わせの重要性が強調されてきた。つまり、足場 (Scaffold) では吸収性を用いるか、非吸収性を用いるか、細胞では幹細胞を用いるか、軟骨細胞を用いるか、また分化・成長因子では液性因子を用いるか、環境因子を用いるか、などである (表 1)。我々は基礎医学的アプローチでその各々の有用性について検討した。

表 1. 再生軟骨の構成要素とその可能性

|                 |              |
|-----------------|--------------|
| 1. 足場 (SAFFOLD) | 吸収性<br>非吸収性  |
| 2. 細胞           | 幹細胞<br>軟骨細胞  |
| 3. 分化・成長因子      | 液性因子<br>環境因子 |

### 1. 吸収性 Scaffold について

教室の久保は白色家兎軟骨全層欠損モデルに I 型コラーゲンからなる吸収性 Scaffold を挿入した際の修復細胞の動態を組織化学的手法で調べた。吸収性 Scaffold により間葉系幹細胞が軟骨修復の現場に動員されることを明らかにした。培養幹細胞を用いた実験でも haptotaxis というメカニズムで細胞動員されることを明らかにした (図 2) [14]。

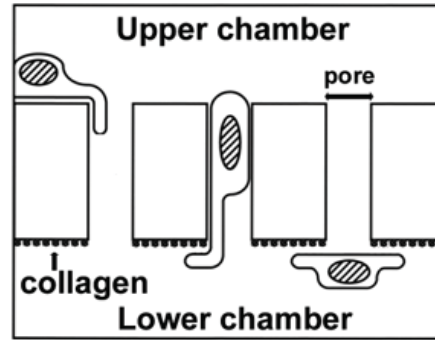


図 2. Scaffold による幹細胞動員<sup>14</sup>

更に教室の三村は、高濃度のコラーゲンに向かって間葉系幹細胞が移動する haptotaxis のメカニズムを利用して、より効率よく軟骨修復の場に動員できるように濃度勾配コラーゲン Scaffold を考案した (図 3)。濃度勾配コラーゲンの挿入で、より良質の軟骨が再生されることが組織化学的に明らかにされたが、一方で一度に動員される間葉系幹細胞の量に限りがある為に一定の大きさ以上の軟骨損傷の修復には成功できなかった[15]。

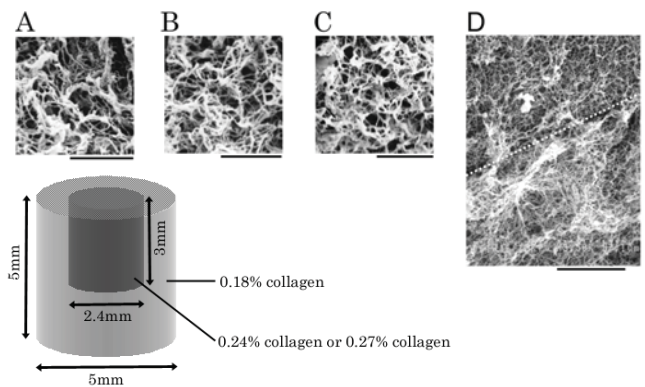


図 3. 濃度勾配コラーゲンの構造と走査電顕<sup>15</sup>

### 2. 液性分化・成長因子について

大きな軟骨欠損の修復により多くの間葉系幹細胞の動員を必要とする。教室の三村は osmic pump を利用して濃度勾配コラーゲングル (CG gel) で動員された幹細胞に BMP-2 を自動で投与できるシステムを作成した[16]。幹細胞が動員され、軟骨細胞に分化するどの段階で液性分化・成長因子である BMP-2 を投与するのが有効かを検討した (図 4)。

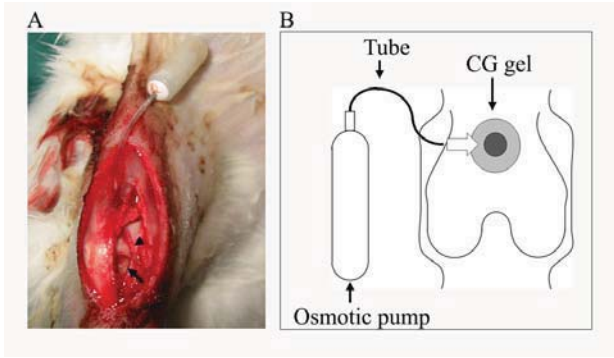


図4. 自動成長因子投与システムとその設置<sup>16</sup>

その結果、液性成長因子は幹細胞が動員されるごく初期に投与した時に最も効率よく軟骨細胞に分化することが判明した[16]。

### 3. 骨髄由来未分化間葉系幹細胞について

大きな軟骨欠損の修復には大量の骨髄由来幹細胞が必要であるとのこれまでの結果を踏まえて、あらかじめ骨髄内で幹細胞を刺激すれば良好な軟骨修復を得られるのではないか、との仮説が得られた。教室の西澤は軟骨欠損に前もって骨髄内に basic FGF を投与することにより骨髄由来未分化幹細胞を活性化すると軟骨欠損作成後、より早期に倍近い量の骨髄由来未分化幹細胞が動員されることを明らかにした(図5)[17]。損傷軟骨の再生も非常に良好であった。

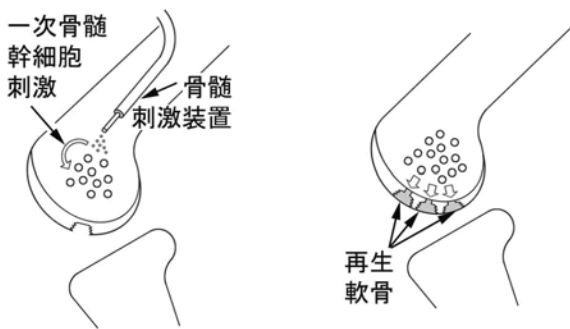


図5. 骨髄由来幹細胞刺激システムと軟骨再生[17]

### 4. 環境因子、特に力学的刺激について

軟骨の再生を促すには、軟骨細胞による器質産生を活性化しなければならない。器質産生は軟骨細胞の置かれている環境、特に力学的環境に大きく影響される。これまで多くの研究者が2次元単層培養軟骨細胞でこれを調べてきた。一方で軟骨細胞は単層培養するだけで急速に脱分化することが知られている。特に成長因子との相互作用では一定の見解が得られていない。教室の安藤は3次元下に軟骨を培養し、力学的に刺激するシステムを考案した(図6)[18]。3次元培養で軟骨の分化度を維持した状況では、これまで以上に力学的刺激が有効である一方、成長因子投与で分化度の低い細胞比率が増えると、かえって力学的刺激の効果が低くなることも判明した。

この結果では再生過程にある軟骨では、分化度が低

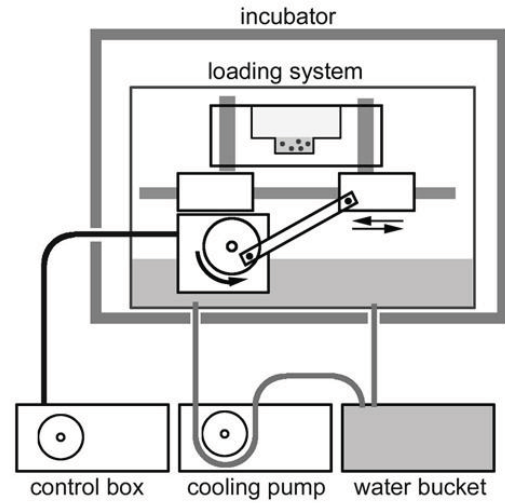


図6. 3次元培養軟骨刺激装置<sup>18</sup>

い為に力学的刺激による刺激効果が低いことになる。

教室の塩路は、力学的刺激を加えると軟骨細胞から interleukin (IL)-4 が分泌されること、また力学的刺激がなくても IL-4 投与だけで器質産生が活性化されることを明らかにした[19]。一方、軟骨細胞自身も IL-4 受容体を発現し、paracrine loop を形成していることが判明した。直接、力学的刺激を受けていない軟骨細胞も IL-4 を介して力学的環響に係わる情報を共有していることが判明した(図7)。

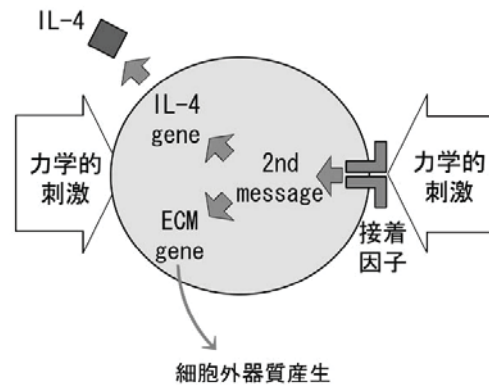


図7. 力学的刺激による IL-4 産生活活化[19]

### 5. 成熟軟骨と軟骨細胞について

軟骨は恒常的に軟骨器質の異化と産生を繰り返す、その形態を維持している。移植手術などの環境変化は器質産生を低下させることが知られている。親水性の高いヒアルロン酸やアグリカンなどの器

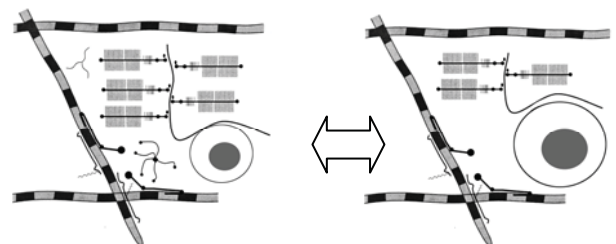


図8. 低浸透圧ストレスとその回復[20]

質が減少すると、細胞外環境は低浸透圧になる。低浸透圧ストレスは細胞の膨大を介し、細胞死を引き起こす。このような状況は軟骨移植などの特殊な状況に限らず関節炎や変形性関節症でも起こりえる。教室の磯矢は低浸透圧ストレスに対して軟骨細胞から外向き Cl<sup>-</sup> イオンチャンネルを介し、膨大化した細胞のサイズ小さくする機構「調節性細胞縮小」のあることを明らかにした(図8) [20]。

教室の奥村は、更に調節性細胞縮小がチロシンキナーゼを介したエネルギー依存性の能動的細胞活動であることを明らかにした[21]。すなわち、伸展ストレスは細胞骨格などを介し、チロシンキナーゼの活性化を引き起こす。次に軟骨細胞から外向き Cl<sup>-</sup> イオンチャンネルが活性化され、最終的に水分子を駆出することにより細胞サイズが減少する(図9)。この機構は軟骨移植の成否に影響するだけでなく、変形性関節症の病態にも重要である。教室の熊谷はこの細胞防御的な機構の破綻と変形性関節症の病因について研究を重ねている。

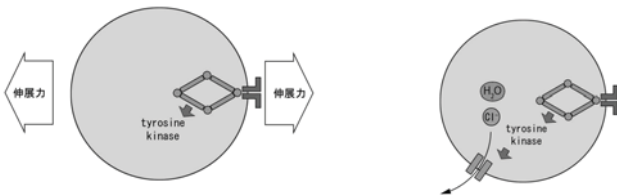


図9. 調節的細胞縮小とチロシンキナーゼ[21]

## 6. 非吸収性コラーゲン(成熟軟骨)について

軟骨再生医療の手法としては Ex vivo で完全に近い軟骨組織を再生してから、軟骨損傷部位に移植する方法の可能性もある。通常の培養器では軟骨細胞はガラスやポリカーボネートなどの培養器素材に接着してしまう。よって、通常の培養器を用いる2次元培養下では軟骨細胞は急速に脱分化し、器質産生能を失う。

教室の上中は、細胞接着を許さないセラミック製半透膜上で軟骨細胞を培養することにより、軟骨細胞に分化度を維持しながら、軟骨器質産生させるシステムを構築した[22]。もちいる細胞種は成熟軟骨であるので液性成長因子[16]よりも力学的環境因子の方が有用と考えた。しかし、器質産生中の軟骨細胞に3次元培養装置(図6)を適応することは不可能であるので超音波力学的刺激(LIPUS刺激)でこれを代替した。

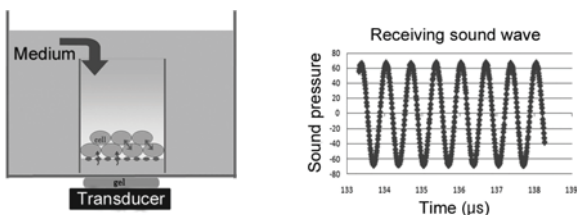


図10. セラミック半透膜培養システムと transducer からの超音波刺激装置[22]

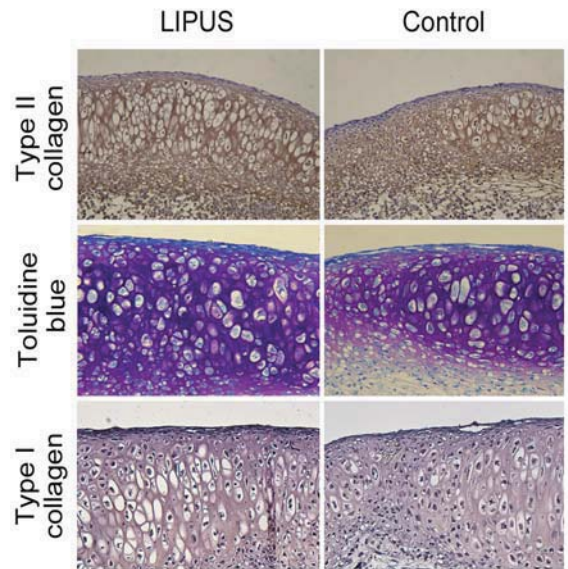


図11. Ex vivo での軟骨再生と LIPUS 刺激

セラミック製半透膜培養システムと超音波力学的刺激(LIPUS刺激)の組み合わせは、これまでに例を見ない良好な軟骨組織を ex vivo で再生することに成功した(図11)。教室の尾田はこれを生体に戻すべく in vivo での研究を重ねている。

## サル軟骨損傷モデルと再生医療

### 1. サル軟骨損傷と軟骨再生モデル

これまでの細胞レベルでの基礎的成果を再生医療に反映するには、霊長類での軟骨損傷モデルの作成と再生医療の適用が試されなければならない。以前から一般的に提唱されている軟骨再生の各々の構成要素に(表1)、当教室におけるこれまでの細胞レベルの知見を当てはめてみた(表2)。

表2. 再生軟骨の構成要素とこれまで知見

|                |      |                         |
|----------------|------|-------------------------|
| 1. 足場(SAFFOLD) | 吸収性  | 幹細胞の動員・分化 [14, 15]      |
|                | 非吸収性 | 成熟軟骨細胞の機能維持 [22]        |
| 2. 細胞          | 幹細胞  | 量依存的に軟骨修復可能 [17]        |
|                | 軟骨細胞 | 軟骨の構造維持 [20, 21]        |
| 3. 分化・成長因子     | 液性因子 | 幹細胞の動員期に有効 [16]         |
|                | 環境因子 | 成熟軟骨細胞の器質産生に有効 [18, 19] |

その結果、量依存的に軟骨の修復が可能、すなわち沢山あればそれだけ大きな軟骨の修復が可能な幹細胞と幹細胞の動員・分化に有利な吸収性 scaffold の組み合わせで軟骨再生を試みた。

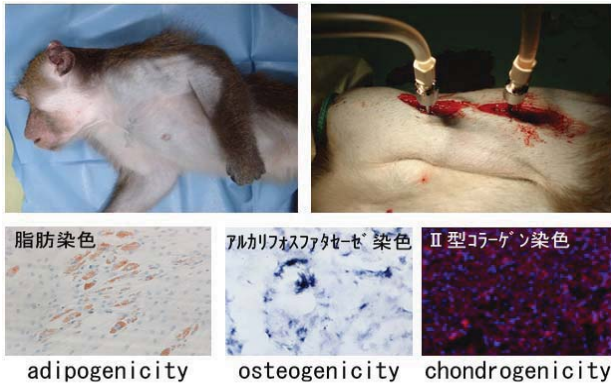


図 1 2. サル MSC の採取と pluripotency

滋賀医科大学動物生命科学研究センターの鳥居隆三教授のご協力の下に、同センターで計画的人工繁殖されたカニクイザルを実験に供した (図 1 2)。

未分化間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は、骨髄から最も潤沢に採取することができる。MSC は滋賀医科大学病理学講座の小笠原一誠教授のご協力の下に上腕骨骨髄より採取した。採取、精製した細胞からは脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞が分化誘導され細胞の多機能性 (pluripotency) が証明された (図 1 2)。

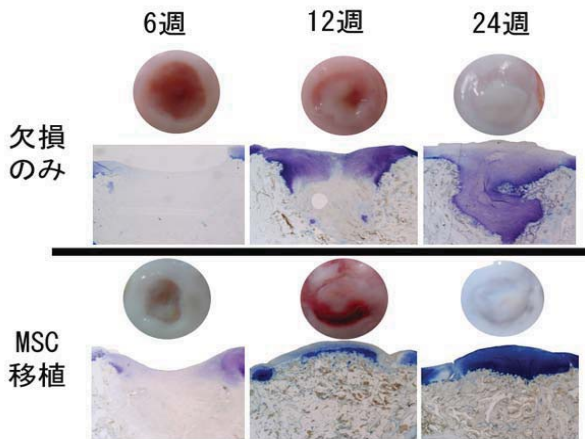


図 1 3. サル軟骨損傷と MSC による修復

教室の荒木は、平均年齢 6.5 歳の雄カニクイザル (BW: 3.75-4.9kg) 18 頭の膝関節に自然修復しない 3mm 径と 5mm 径の軟骨欠損を作成した。欠損部を放置したコントロール群と吸収性コラーゲン scaffold に MSC を包埋した construct を移植した実験群を作成し、6, 12, 24 週 (各 n=4) で組織学的に評価した。MSC 移植群ではより良好な軟骨修復が認められた (図 1 3)。

## 2. サル腱板附着部軟骨損傷モデル

腱板断裂や五十肩に代表される上肢関節疾患は、ヒトと四足歩行動物では関節機能が大きくことなる為、霊長類での疾患モデルが不可欠である。代表的な五十肩の病理は、最新の画像診断技術を持ってしても描出しえず、その病理は明らかにされていない。腱板附着部の微小損傷とその後の修復に伴う線維化がその病理とされているが、実験的にこれを再現するにはサル疾患

モデルを必要とする。

柔軟性と強靭性の両立が要求される腱附着部にも関節軟骨と同じく II 型コラーゲンとプロテオグリカンに富む軟骨組織が介在している (図 1 4)。この為、関節軟骨と同じく退行性変性を受ける。その自然修復の成功のカギは骨髄からの修復組織の侵入の如何によるとされる。

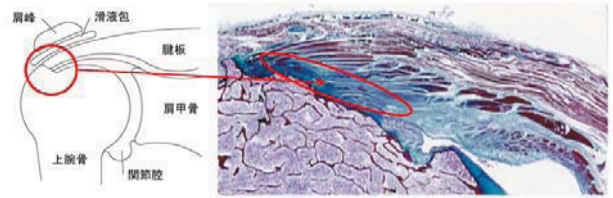


図 1 4. 肩腱板附着部軟骨

教室の上羽は雄カニクイザル (BW: 3.75-4.9kg、平均年齢 6.5 歳) の肩関節棘上筋附着部に幅 4mm と 8mm の実験的欠損を作成した [23]。4mm 欠損では 6 週目では欠損部は肩峰下滑液包由来の細胞による肉芽組織で満たされていた。12 週では血管新生も豊富に見られ、24 週では修復されていた。一方、8mm 欠損では肉芽組織形成の後の血管新生が不十分で、24 週では再断裂を起こしていた (図 1 5)。

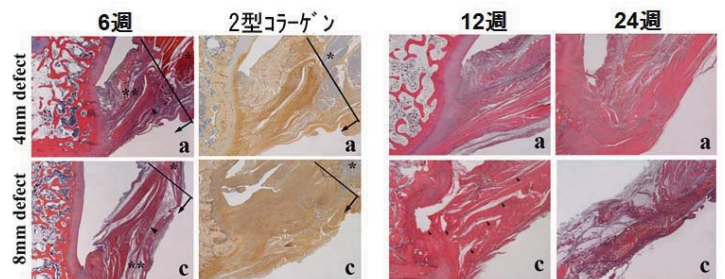


図 1 5. サル腱板の断裂と自然修復モデル

これまで損傷腱板の自然修復の過程を霊長類で証明した報告はない。一連の経過は五十肩の疾患モデルとして今後、治療的介入の実験を予定している。一方、断裂の拡大した 8mm 欠損モデルでは、損傷附着部に骨髄との交通を作成すると修復されることが確認された。骨髄由来の MSC が参加し、修復反応が増強されたとの仮説に至った。この仮説が正しいならば、精製 MSC の注入で腱板断裂が修復されるはずであり、新たな治療方法の開発に直結する。現在、鋭意研究遂行中である。

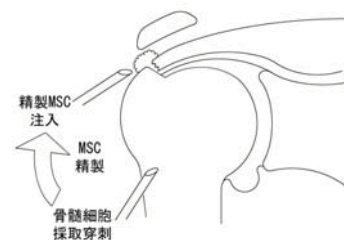


図 1 6. サル腱板モデルと MSC 注射治療

## 文献

- [1] Omura K, Hukuda S, Katsura K, Saruhashi Y, Imanaka T, Imai S. Evaluation of posterior long fusion versus conservative treatment for the progressive rheumatoid cervical spine. *Spine*. 27: 1336-1345, 2002.
- [2] Mori K, Imai S, Omura K, Saruhashi Y, Matsusue Y, Hukuda S. Clinical output of the rheumatoid cervical spine in patients with mutilating-type joint involvement: For better ADL and longer survival. *Spine*. 35: 1279-1284, 2010.
- [3] Omura K, Imai S, Maeda T, Hukuda S. Prolonged and increasing expression of Fos-related antigens in the hippocampus of adjuvant arthritic rats. *J Rheum*. 25: 936-944, 1998
- [4] Takase T, Imai S, Maeda T, Inoue K, Hukuda S. Influence of retinyl acetate on osteochondral junction chondrocytes in C3H and balb mice. *J Rheum*. 26: 156-165, 1999.
- [5] Kikkawa M, Imai S, Maeda T, Hukuda S. Altered Postnatal Expression of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) In Rat Perthes' Disease-like Lesion. *J Bone Miner Res*. 15: 111-119, 2000.
- [6] 李 方祥、福田眞輔、今井晋二、前田敏博. ラット腰椎後縦靭帯における侵害受容線維と交感神経の関わり. *Calcitonin gene-related peptide と tyrosine hydroxylase の免疫組織化学と免疫電顕による考察*. 日関外誌. 15: 187-202, 1996.
- [7] Tarumoto R, Murakami M, Imai S, Maeda T, Hukuda S. A morphometric analysis of protein gene product 9.5-, substance P-, and Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive innervation in the shoulder of the Japanese macaque. *J Shoulder Elb Surg*. 7: 522-528, 1998.
- [8] Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, Lakso M, Rauvala H. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated Heparin-binding Growth-associated Molecule (HB-GAM). *J Cell Biol*. 143: 1113-1128, 1998.
- [9] Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Büki K, Matsusue Y, Väänänen HK, Rauvala H. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone*. 44: 785-794, 2009.
- [10] Kubo M, Takase T, Matsusue Y, Rauvala H, Imai S. Articular cartilage degeneration and de-differentiation of chondrocytes by the systemic administration of retinyl acetate –ectopic production of osteoblast stimulating factor-1 by chondrocytes in mice. *Osteoarthr Cartilage*. 10: 968-976, 2002.
- [11] Brittberg M, Lindahl A, Nisson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 331: 889-95, 1994.
- [12] Matsusue Y, Hama H, Yamamuro T. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*. 9: 318-21, 1993.
- [13] Nakagawa Y, Matsusue Y, Nakamura T. Osteochondral graft transplantation for steroid-induced osteonecrosis of the femoral condyle. *Lancet*. 362: 362-402. 2003.
- [14] Kubo M, Imai S, Fujimiya M, Isoya E, Ando K, Matsusue Y. Exogenous Collagen Augments Repair of Full-thickness Cartilage Defect by Facilitating Mesenchymal Cell Recruitment.-Detailed Cellular Events during Cartilage Repair- *Acta Orthop*. 78: 845-55, 2007.
- [15] Mimura T, Imai S, Kubo M, Isoya E, Ando K, Matsusue Y. A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair. *Osteoarthr Cartilage*. 16: 1083-1091, 2008.
- [16] Mimura T, Imai S, Okumura N, Li L, Nishizawa K, Kubo M, Mori K, Matsusue Y. Spatiotemporal Control of Proliferation and Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells for Repair of Articular. *J Biomed Mater Res A*. [in press]. 2011
- [17] Nishizawa K, Imai S, Mimura T, Kubo M, Araki T, Shioji S, Takemura N, Matsusue Y. In-advance trans-medullary stimulation of the bone marrow enhances spontaneous repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Cell Tissue Res*. 34: 371-379, 2010
- [18] Andou K, Imai S, Isoya E, Kubo M, Mimura T, Shioji S, Ueyama H, Matsusue Y. Effect of dynamic compressive loading and its combination with growth factor on the chondrocytic phenotype of three-dimensional scaffold-embedded chondrocytes. *Acta Orthop* 80: 724-733, 2009
- [19] Shioji S, Imai S, Andou K, Matsusue Y. Extracellular and Intracellular Mechanisms of Mechano-transduction in 3-dimensionally Embedded Rat Chondrocytes [submission]
- [20] Isoya E, Toyoda F, Imai S, Okumura N, Kumagai K, Omatsu-Kanbe M, Kubo M, Matsuura H, Matsusue Y. Swelling-Activated Cl<sup>-</sup> Current in Isolated Rabbit Articular Chondrocytes : Inhibition by Arachidonic Acid. *J Pharmacol Sci*. 109: 293-304, 2009
- [21] Okumura N, Imai S, Toyoda F, Isoya E, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y. Regulatory role of tyrosine phosphorylation in the swelling-activated chloride current in isolated rabbit articular chondrocytes. *J Physiol*. 587: 3761-3776, 2009.
- [22] Uenaka K, Imai S, Andou K, Matsusue Y. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promoted Matrix Synthesis of Scaffold-free Cartilage Produced in High Density Static Semi-open Culture System. *J Orthop Sci*. 15: 816-824, 2010.
- [23] Ueba H, Imai S, Araki T, Ishigaki H, Nishizawa K, Mimura T, Ogasawara K, Matsusue Y. Spontaneous healing of rotator cuff and its enhancement by transosseous passageway in animal model of cynomolgus monkey [submission]

## 和文抄録

軟骨の再生医療では足場 (Scaffold)、細胞、分化・成長因子の3つの要素が重要である。Scaffoldでは吸収性を用いるか、非吸収性を用いるか、細胞では未分化間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) を用いるか、軟骨細胞を用いるか、分化・成長因子では液性因子を用いるか、環境因子を用いるか、が未解決であった。我々はその各々の有用性について検討し、吸収性 Scaffold は幹細胞の動員と分化誘導に優れていること、また非吸収性 Scaffold では成熟軟骨細胞の機能維持に適していることを明らかにした。細胞については、MSC を用いると量依存的な軟骨修復が可能であること、また軟骨細胞を用いると軟骨の構造維持に有用であることが判明された。分化・成長因子に関しては多くの液性因子は MSC の動員期に有効であるが、力学的刺激などの環境因子は成熟軟骨細胞の器質産生に有用であることが示唆された。以上より量依存的に軟骨の修復が可能な MSC と MSC の動員・分化に有利な吸収性 scaffold の組み合わせが再生医療に最も適して

いるとの結論に達した。骨髄より採取した MSC から脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞が分化誘導され細胞の多機能性 (pluripotency) が証明された。MSC と吸収性 scaffold の組み合わせでカニクイサル軟骨損傷モデルに適用したところ良好な軟骨の再生を得ることができた。

キーワード 再生軟骨、未分化間葉系幹細胞、力学的刺激、多機能、サル軟骨損傷モデル



# 軟骨再生医療と動物モデルの重要性 -カニクイザル iPS 細胞の戦略的応用-

日柳 章彦, 鳥居 隆三

動物生命科学研究センター

## Cartilage Tissue Engineering and Animal Model

### Cynomolgus Monkey and iPS cells as a Safety and Efficacy Model for Cartilage Repair

Akihiko Kusanagi and Ryuzo Torii

Research Center for Animal Life Science

#### Abstract

Articular cartilage has a limited capacity for self-repair because of lack of nerves, blood vessels, and lymphatic tissues. Autologous chondrocytes implantation (ACI) is the first cell therapy for cartilage repair, however the efficacy of ACI is still unknown. We have developed a novel engineered cartilage implantation technique utilizing an autologous chondrocytes seeded in a 3 dimensional (3D) collagen based hydrogel/sponge and bioreactor, and preclinical studies using miniature swine model had shown the safety and efficacy. Based on the results of 6 months animal study, phase I clinical trial for FDA approval had initiated and proved the safety of engineered cartilage implantation and currently phase III clinical trial has been started in USA. ACI using patient's own cells will not cause immune rejection, however biopsy of healthy articular cartilage would make an additional damages to patients and harvested chondrocytes have a limited proliferation capacity since those cells are final differentiated cells. Recent stem cell studies for cartilage repair have shown promising results and mesenchymal stem cells (MSCs) and iPS cells have the potential to become a universal resource for cartilage cell therapy. Prior to the use of such iPS cells and MSCs based therapy, preclinical assessment of their safety and efficacy are essential and non-human primates (NHP) serve as valuable animal model for human disease and biomedical research. We have started to evaluate the potential of chondrogenesis from cynomolgus monkey iPS cells and confirmed 3 dimensional culture would enhance chondrogenic differentiation from iPS cells. This preliminary result would support the capability for cartilage repair using iPS cells and an additional gene profiling and preclinical in vivo evaluation will be needed for the safety and efficacy in NHP model for the clinical application.

**Keyword:** Tissue engineering, Cartilage repair, iPS cells, Cynomolgus monkey, Cell therapy

#### はじめに

関節軟骨は神経、血管、リンパ組織に乏しい組織として知られており、一度損傷を受けると自己再生することは難しい[1, 2, 3, 4]. 様々な関節軟骨治療が試みられているが、根本的な治療法は確立されておらず、再生医療技術を用いた軟骨再生医療の開発が望まれている. 自家軟骨細胞移植法 (autologous chondrocytes implantation: ACI) は、1994年に Britberg らによって開発され、現在までに唯一アメリカ・食品安全医薬局 (Food and Drug Administration: FDA)にセカンドライン

トリートメントとして認可を受けた細胞注入療法である[5]. ACI は、体外で患者自身の軟骨細胞を培養し、患者の脛骨より得られた骨膜下に移植する方法として開発され、一定の臨床的な効果が報告されている[6, 7]. しかしながら、ACIによる臨床効果に疑問を呈す報告もあり、再生医療技術を用いたさらなる開発が望まれている[8, 9]. 筆者は、2001年より2010年まで、アメリカにおいて細胞療法および幹細胞を用いた軟骨再生医療開発に携わって来た. 今回は、アメリカの再生医療技術開発で経験した基礎研究、動物実験および臨床

---

Received August 10, 2011

Correspondence: 滋賀医科大学動物生命科学研究センター 日柳 章彦

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 kusanagi@belle.shiga-med.ac.jp

応用の知見を紹介する。また、近年の再生医療研究において、京都大学、山中伸弥教授らが開発した人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞を用いた細胞療法が注目を集めている[10, 11]。滋賀医科大学・動物生命科学研究センターでは、鳥居隆三教授を中心として、カニクイザル胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞および iPS 細胞を樹立し、ヒトに最も類似する前臨床モデルであるカニクイザルを用いた幹細胞研究が盛んに行われている。筆者は 2010 年より滋賀医科大学に赴任し、鳥居隆三教授の元、カニクイザル ES/iPS 細胞を用いた再生医療研究に着手している。今回、ES/iPS 細胞を用いた軟骨再生医療への試みとモデル動物としてのカニクイザルの重要性に関しても報告する。

## 関節軟骨の生物学的特徴と軟骨治療

関節を構成する骨端は、関節軟骨に覆われており、関節軟骨を構成する硝子軟骨は白色の光沢を有し、表層—中間層—深層—石灰化層の 4 層の層状構造をとる (図 1)。石灰化層は軟骨下骨と強固に連結している。関節軟骨は 80% の水分、20% の細胞外基質とわずかな軟骨細胞により構成される [12]。軟骨細胞は細胞外基質内の小窩 (lacuna) に存在し、球形の場合が多いが、大きさ・形態・微細構造は一様ではない。中間層および深層の軟骨細胞は、表層の細胞に比べ、良く発達した粗面小胞体とゴルジ装置を持ち、プロテオグリカンやコラーゲンなどの軟骨基質成分を旺盛に合成・分泌している。軟骨基質はコラーゲン (乾燥重量の 60%) とプロテオグリカン (乾燥重量の 10%) から構成され、コラーゲンは主に II 型であり、プロテオグリカンは 95% のグリコサミノグリカンと呼ばれる多糖類 (GAG) と 5% のタンパク質から出来ている。プロテオグリカンは大量の水分子を保持し、コラーゲンは構造性タンパク質として軟骨の形態を維持する。骨とは異なり、軟骨基質内にはアパタイトの結晶は存在せず、多量の水分子を保持し粘弾性で、関節におけるクッションとしての役割を担う。

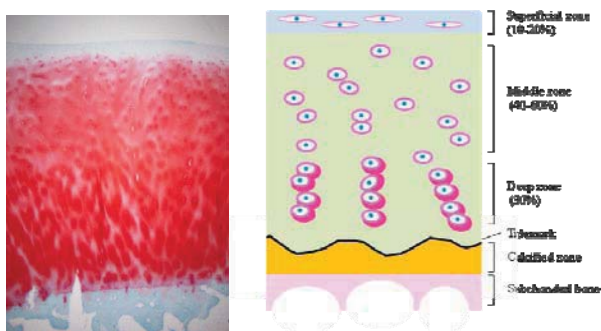


図 1. ヒト関節軟骨組織 (SAF-O 染色) と構造

関節軟骨は他の組織に比較して、細胞密度が非常に低く (4% 程度)、血管・神経・リンパ組織を欠くことから、一度損傷を受けると二度と元に硝子軟骨に再生

する事はない。現在、軟骨損傷に対する一般的治療法であるマイクロフラクチャー手術は、損傷部位除去後に、軟骨下骨部位に小孔を多数開けることによって、出血による癒痕形成を促す。しかしながら、マイクロフラクチャー手術によって再生される繊維軟骨は、硝子軟骨とは生化学的および力学的に大きく異なり、数年後に軟骨損傷が再発する例が多く、軟骨損傷の根本的な治療ではない。また、軟骨細胞は、体外で長期間 2 次元培養を行うと繊維軟骨様に脱分化することが知られており、脱分化した軟骨細胞を 3 次元培養状態へ戻すと元の硝子軟骨の特性を取り戻す事が可能であることも報告されている [13]。このように体外で軟骨細胞を培養する場合、バイオマテリアルや合成ポリマー素材を用いて 3 次元培養することが軟骨細胞の特性維持に重要であり、様々なマテリアルを用いた軟骨の 3 次元培養技術が軟骨損傷へ応用可能であるとの報告がある。しかし、実際に臨床応用まで至った軟骨再生医療技術はいまだ無く、筆者が中心となり開発に携わった Histogenics 社 (USA, Boston) の NeoCart® は、ウシ由来 I 型コラーゲンスポンジ・ハイドロゲルとバイオリクターを用いて engineered cartilage を体外で作製し、生体接着剤を用いて移植を行う新規の軟骨再生医療技術である (図 2)。現在 FDA Phase III 臨床試験が全米 25 箇所で行われており、最も臨床応用に近い 3 次元バイオマテリアルを用いた軟骨再生技術として注目を集めている。

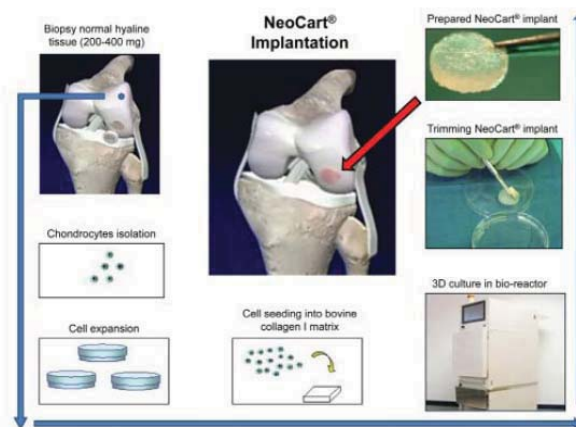


図 2. Engineered cartilage (NeoCart®) による軟骨再生

## 軟骨再生

### 1. 再生医療と Tissue Engineering

体外の培養系で体の組織構造を再生させる研究領域は Tissue Engineering (組織工学) と呼ばれ、Langer と Vacanti によって 1993 年の Science 誌に発表された概念である [14、図 3]。再生医療を現実化する Tissue engineering には、細胞 (細胞、幹細胞)、細胞の足場となる scaffold、そして細胞の分化・増殖のための成長因子・サイトカインが必要であると定義されている。

Tissue Engineering の最大の利点は、細胞注入療法で課題となっている細胞の流出や壊死による細胞の損失を克服出来ることであり、細胞注入やサイトカイン療法では治療し得ない先天性疾患などの欠損部位に対する治療を可能とすることである。しかし、実際には scaffold 内に十分な細胞数を播種することは困難であり、また移植後の足場が分解した後の空間は細胞数が少なく大量の線維性結合組織で埋められてしまう問題もある。よって、筆者が取り組んできた軟骨などの細胞がまばらな組織の作製意外には応用が難しいのも事実であった。筆者は幸運にも、Tissue engineering の概念を唱えた Robert S. Langer 教授の研究室(マサチューセッツ工科大学、化学工学部)に 2006 年より 2010 年まで在籍し、最先端の再生医療研究に触れる機会を得た。そこで、ヒト ES 細胞のバイオマテリアルを用いた生殖細胞の分化誘導研究や、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨再生研究に携わることが出来た。

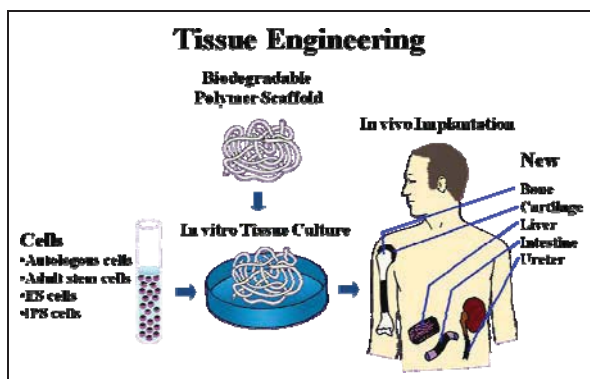


図 3. Tissue Engineering の概念

## 2. Tissue Engineering を用いた軟骨再生医療

Tissue engineering 技術を用いた軟骨再生医療技術の開発を目指し、現行の細胞注入療法である ACI が持つ多くの問題点を克服していく戦略を立てた。ACI の持つ問題としては、患者由来の自家軟骨細胞を 2 次元培養で増殖時に、硝子軟骨細胞から繊維軟骨細胞軟骨細胞へ脱分化がおこる点である。繊維軟骨細胞を移植すれば、治療目的である硝子軟骨では無く、マイクロフラクチャーの結果同様に繊維軟骨が形成されるのは当然であり、それを防ぐためには体外での 3 次元培養は必須と考えた (図 4)。



図 4. コラーゲンゲル・スポンジによる 3 次元培養

移植の際、軟骨浮遊液を骨膜下に注入するため、重力によって細胞は底へ沈殿し、細胞の偏りが出来る。目的とする再生軟骨は、本来の関節軟骨同様に均一な軟骨細胞の分布が必要となる。細胞注入後に、骨膜縫合部位はフィブリン糊で接着されるが、フィブリン糊による接着は非常に弱く、簡単に縫合部位の隙間から細胞が漏れ出ることが予想される。また、骨膜の縫合にはマイクロサージェリーのような繊細で多数の縫合が必要とされ、縫合に掛かる手間と時間の問題および習得の難しさなどにより、北米の整形外科医の間では評判が良くない。よって、筆者らは縫合を必要としないより強力な生体接着剤を考案した (図 5)。ACI による移植の際、脛骨面の骨膜を採取し、損傷部へ縫合するが、骨膜自身が過形成を起こし、再度関節鏡により治療が必要になる例も多く、骨膜自身が副作用の原因を作っているとも考えられており、また単純に骨膜の採取に伴う患者へのダメージを考慮し、骨膜を使用せず、生体接着剤でフィルム状の物理的なバリアーを形成させることも考案した (図 6)。

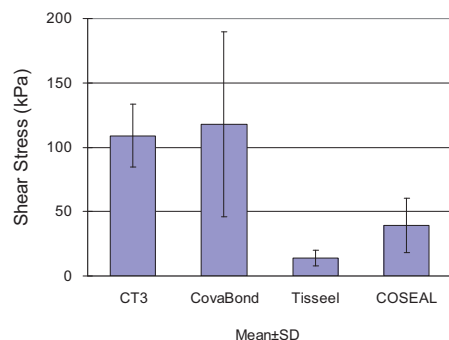


図 5. 生体接着剤の開発

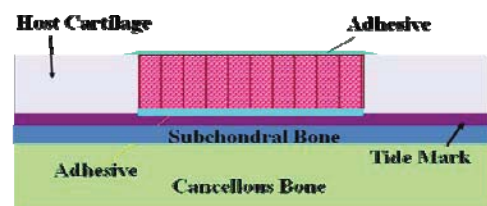


図 6. 生体接着剤による物理的バリアー

また、FDA への申請を考慮すると、幹細胞から軟骨細胞の分化・増殖にサイトカインや成長因子を使用することで、安全性の懸念から認可のハードルが上がってしまう可能性がある。そこで、まずは幹細胞の利用ではなく、患者自身の非荷重部の健康な関節軟骨細胞を利用することとした。我々の身体は、常に重力に伴う何かしらの物理的な刺激にさらされており、関節を構成する軟骨細胞は、その物理的刺激により活性化を受けるとの報告がある[15]。よって、筆者らは、3次元バイオマテリアルに患者由来軟骨細胞を播種し、歩行時に膝関節内に生じる程度の静水圧を発生させるバイオリクター装置 (Tissue Engineering Processor: TEP、

高木産業株式会社)を、ハーバード大学医学部の水野秀一博士および高木産業と共に共同開発した。バイオリアクターによる力学的刺激で細胞自身にサイトカインや成長因子を作らせて、軟骨細胞の活性化を図ることを目指したのである(図6)。まず、培養する患者自身の軟骨細胞が播種されたコンストラクトはディスポーザブル・カルチャーユニットの中で培養される。このバイオリアクターは、静水圧を発生させると共に、パフュージョン機能を持ち、培養液の交換を自動で行うことができる。また、インキュベーターとしても機能し、酸素および二酸化炭素濃度などのガスのコントロールも可能である。それら静水圧、ガス濃度、温度、培養液の交換などを全て、コンピューター制御でコントロール可能であり、また運転のデータもサーバーに記録可能で、Good manufacturing practice (GMP) 対応の機器として開発されている(図7)。

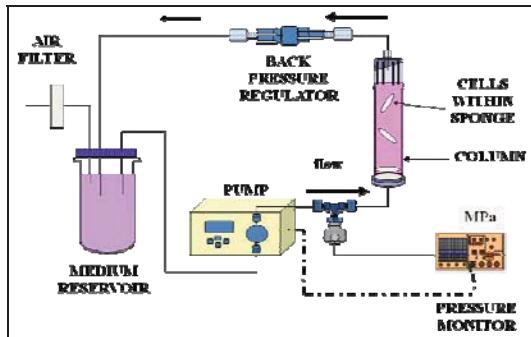


図6. 静水圧を発生するバイオリアクターの原理



- Bioreactor's Functions:**
- Computerized automated system
  - Hydrostatic fluid pressure
  - Medium perfusion
  - Gas concentration
  - Algorithm of culture conditions
  - Disposable culture unit

図7. バイオリアクターの機能

## NeoCart®による軟骨再生治療

筆者は Histogenics 社 立ち上げ 当時 から、FDA 認可 を 目指 した 軟骨 再生 プロジェクト に 参画 し、軟骨 細胞 の 3 次元 培養 および バイオリアクター の 開発 と 培養 条件 の 最適 化 など の 基礎 研究 に 携わ った。体 外 で の 実験 データ を 元 に、ミニブタ を 用 いた 前 臨床 試験 の 企画、新 規 移植 方法 開発、外科 手術、組織 病理 学 的 解析 を 担当 した。前 臨床 試験 の データ は、FDA に 審査・認可 を 受けて、安全 性 試験 である FDA Phase I 臨床 試験 の 終了 まで を 担当 した の で 紹介 する。

## 1. NeoCart®, in vitro Data

ウシ由来 I 型 コラーゲン ゲル・スポンジ の 生体 適合 性 評価 を 評価 する ため、ブタ 由来 軟骨 細胞 を コラーゲン ゲル・スポンジ へ 播種 し、バイオリアクター を 用 いて 静水 圧 刺激 し (6 日間) その 後 の カルチャー デッシュ ユー 内で 静置 培養 (12 日間) し、18 日間 の 培養 実験 を 行 った。培養 後 の サンプル は PBS で 洗浄 し、Live/dead 染色 により 軟骨 細胞 の 生存 率 を 蛍光 顕微鏡 で 観察 した。その 結果、多く の 生細胞 (緑 蛍光) が 観察 され、死 細胞 (赤 蛍光) は、ほとん ど 確認 され なかった (図 8)。

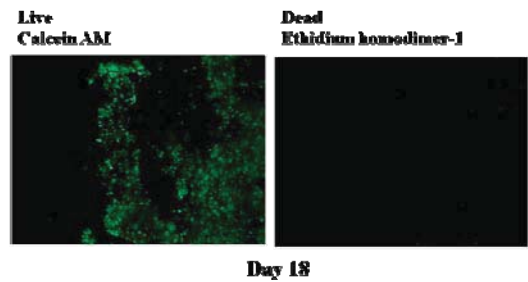


図8. Engineered cartilage の 生存 率 データ

次に、バイオリアクター の 培養 条件 最適 化 の 実験 を 行 った。結果 として、0.5MPa cyclic (1Hz) の 条件 で 7 日間 加圧 培養 を 行 い、その 後 14 日間 静置 培養 (計 3 週間) を 行 う こと により 細胞 増殖 と 軟骨 基質 の 蓄積 の 最適 化 が 行 われた (図 9, 10, 11)。

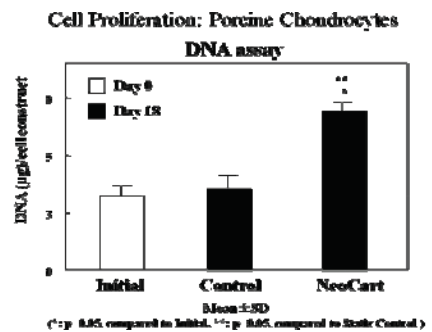


図9. 静水圧による細胞増殖能の上昇

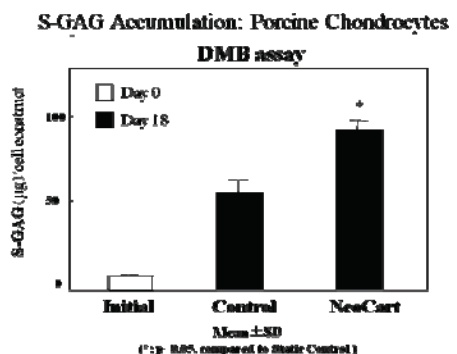


図10. 静水圧による GAG 蓄積の上昇

**Safranin O staining: S-GAG**

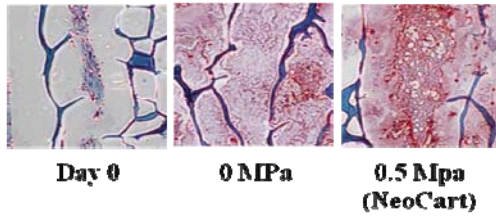


図 11. GAG 蓄積の組織像 (SAF-O 染色)

**2. 軟骨損傷モデル動物作製と前臨床試験**

体外で Engineered cartilage (NeoCart®) を作製する培養条件が最適化された後、その Engineered cartilage の体内における安全性と有効性を評価するために、ミニブタを用いた前臨床試験を行った (図 11). いくつかの先行していた再生医療ベンチャー企業が、FDA の軟骨治療の治験で失敗しており、その主な原因は誤った軟骨損傷モデル動物の選択であった。体外で様々なマテリアルを用いて Engineered cartilage を作製することは、実験的に不可能なことではない。しかし、その作製した Engineered cartilage を、動物実験を用いて体内で安全性・有効性評価するのは非常に難しい、なぜならば有効な軟骨損傷モデル動物が存在しないからである。骨・軟骨再生の研究では、マウス・ラットからのステップアップの実験としてウサギを用い報告が多いが、その理由はサイズが手頃であり、経済的にも利点があるからである。しかし、ウサギの膝関節軟骨は非常に小さく、また軟骨も薄い、そして術後に足をキッキングするため、移植部位が外れやすく、骨欠損を伴わない純粋な軟骨損傷モデルとしては適してはいないとの結論を我々は出した。ミニブタを軟骨損傷モデルとして選択した理由は、以下の通りである。軟骨の厚さが 1-2mm と中型動物では比較的厚く、FDA が要求した骨欠損を伴わない純粋な軟骨欠損部位を作製出来る。膝関節のサイズが関節鏡観察にも適応内であり、リハビリテーションプログラムを考慮した際に、術後あまり活発に運動しない動物であることも考慮した。また経済的な面から考慮してもウマなどと比較すると安価である。実験動物で唯一二足歩行を行い、ヒトも最も近いと考えられるサルを用いる事も考えたが、その時点では経済的な理由で断念せざるを得なかった。



Kusanagi et al., Trans ORS., 2005

図 12. ミニブタを用いた前臨床試験

FDA への申請に向けた長期 Good Laboratory Practice (GLP) 基準の前臨床試験を行う前に、幾つものモデルスケールの Non-GLP 前臨床試験を行い、ミニブタの軟骨の損傷に対する治癒の程度や反応を徹底的に調べた。NeoCart®移植後の膝の固定法の検討やその影響なども最適化された後、6ヶ月における GLP 前臨床試験が行われた。コントロールとして、無処置群と scaffold 移植群を設定し、NeoCart®と比較を行った。全群において、移植 2 週間後に関節鏡による観察を行い、移植 6 ヶ月後に動物は安楽死され、組織学的な解析が行われた。

**Experimental Design**

Animals: 12-16 months, castrated male, Yucatan miniature swine

| Group                          | Number of Sites | Arthroscopic Evaluation      | Histological Evaluation |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------|
| Untreated Control (Right knee) | 16 Sites        | 2 weeks post defect creation | 7 months                |
| Scaffold Implant (Right knee)  | 16 Sites        | 2 weeks post implantation    | 7 months                |
| NeoCart Implant (Left knee)    | 16 Sites        | 2 weeks post implantation    | 6 months                |

図 13. 動物実験の実験計画

移植 2 週間後の関節鏡診断の結果より、無処置群においては、軟骨欠損が確認され、scaffold 単独および NeoCart®移植群においては、移植部位に薄い膜状構造の形成が確認された (図 14). 組織学的観察結果より、NeoCart®移植群においては、周りの組織と類似した硝子軟骨様の再生 (強い GAG と II 型コラーゲン蓄積) が確認された。それに対して、無処置群においては、欠損部は繊維軟骨様の再生 (GAG 蓄積が弱く、I 型コラーゲンの蓄積) が確認された。scaffold 移植群の結果は、硝子軟骨と繊維軟骨の再生が入り交じった中間的なものであった (図 14). Pineda および Wakitani らの組織学的スコアリング [16, 17] によって評価を行った結果、NeoCart®移植群は、コントロール二群と比較して有意的に優れた軟骨再生が観察された (図 14).

**Arthroscopic and Histological Evaluation**

| Evaluation                            | Arthroscopic Evaluation (2 wks post-Op) | Saf-O Staining Red: S-GAG (6/7 mo post-Op) | Collagen VII Type I: FITC, Type II: Texas-Red (6/7 mo post-Op) |
|---------------------------------------|---|--|--|
| Untreated Control (Right knee)        |   |  |  |
| Scaffold Implant Control (Right knee) |   |  |  |
| NeoCart Implant (Left knee)           |   |  |  |

H: Host cartilage; B: Subchondral bone; D: Precreated defect; S: Scaffold alone; E: Engineered cartilage; A: avascular; B: vascular

図 14. 関節鏡および組織学的評価

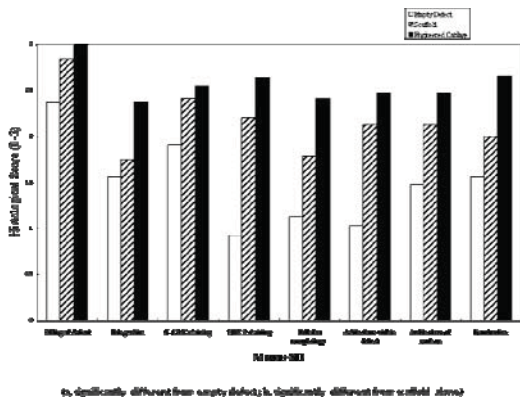


図 15.組織学的評価

### 3. NeoCart® 治験、安全性の証明

ミニプタを用いた6ヶ月間の前臨床試験 (GLP) の結果が FDA に認められた後、安全性評価の為に FDA Phase I 臨床試験が北米三箇所で開始された (図 16)。計 10 人の患者がリクルートされ、Non-randomized の治験として行われた。動物実験では、一部で使用された縫合も、臨床試験においては行われず、生体接着剤のみで NeoCart® の損傷部への接着は行われた。Phase I 臨床試験において、NeoCart® 移植による副作用は確認されず、移植を受けた患者の生活の質が向上し、再生軟骨を示す MRI 診断像も観察された (図 17, 18)。

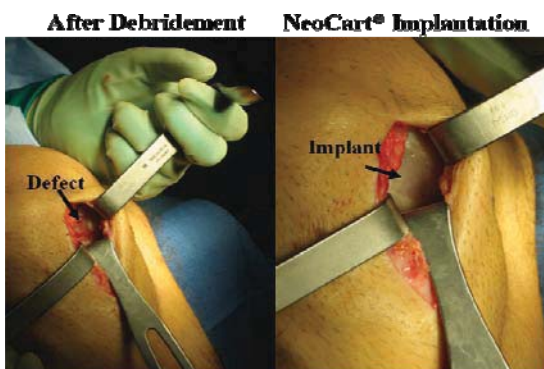


図 16. NeoCart® 移植 (Phase I)

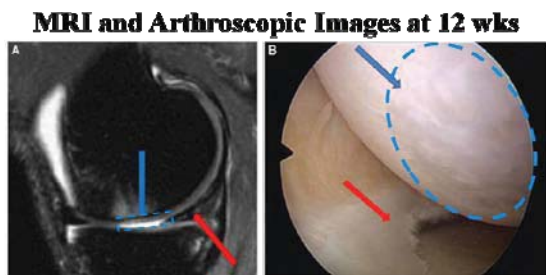


図 17. NeoCart® 移植 12 週後の MRI および関節鏡像

TABLE 2  
Clinical Outcomes After NeoCart Implantation\*

| Assessments                                      |          | Case No. |       |       |        |       |       |       |       |
|--|----------|----------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
|  |          | 1010     | 3001  | 3002  | 3003   | 3004  | 3006  | 3007  | 3008  |
| Visual analog scale                              | Baseline | 5.92     | 3.35  | 1.48  | 1.33   | 0.47  | 6.78  | 0.47  | 6.87  |
|  | 6 weeks  | 2.31     | 0.95  | 0.68  | 0.79   | 0.40  | 4.16  | 1.14  | 2.23  |
|  | 3 months | 0.41     | 1.66  | 0.46  | 0.34   | 0.20  | 6.47  | 5.27  | 2.03  |
|  | 6 months | 0.81     | 1.14  | 0.34  | 0.47   | 0.74  | 5.93  | 2.15  | 0.81  |
|  | 1 year   | 0.00     | 1.08  | 0.54  | 0.07   | 0.34  | 4.59  | 0.27  | 0.13  |
| Range of motion, deg                             | Baseline | 0.00     | 1.02  | 0.95  | 0.00   | 0.82  | 2.30  | 0.20  | 0.30  |
|  | 6 weeks  | 144      | 126   | 137   | 115    | 117   | 130   | 130   | 125   |
|  | 3 months | 140      | 115   | 125   | 125    | 105   | 120   | 125   | 135   |
|  | 6 months | 130      | 125   | 130   | 130    | 115   | 125   | 130   | 135   |
|  | 1 year   | 136      | 140   | 125   | 135    | 115   | 125   | 135   | 135   |
| International Knee Documentation Committee score | Baseline | 140      | 135   | 130   | 135    | 120   | 125   | 135   | 135   |
|  | 6 weeks  | 145      | 135   | 125   | 135    | 130   | 135   | 140   | 145   |
|  | 3 months | 13.79    | 68.97 | 68.97 | 75.86  | 68.60 | 25.29 | 80.46 | 52.87 |
|  | 6 months | 22.78    | 48.28 | 29.89 | 43.68  | 38.62 | 6.90  | 42.53 | 37.93 |
|  | 1 year   | 45.78    | 64.37 | 65.52 | 68.97  | 54.02 | 13.79 | 49.43 | 50.57 |
| 2 years  | 6 months | 56.32    | 68.97 | 73.56 | 73.56  | 64.37 | 33.23 | 59.77 | 65.52 |
|  | 1 year   | 72.00    | 89.66 | 87.36 | 100.00 | 62.07 | 34.94 | 62.07 | 81.61 |
|  | 2 years  | 73.56    | 85.06 | 77.01 | 100.00 | 72.41 | 49.43 | 59.77 | 93.10 |

\*NeoCart from Histogenics Corporation.

図 18. NeoCart® Phase I の結果まとめ

NeoCart® の安全性を証明する Phase I 臨床試験は成功を収め、現在、FDA Phase III 臨床試験が全米 25 箇所で行われている。Phase I 臨床試験の 2 年間のフォローアップ結果は、移植を担当した Oregon Health and Science University の Crawford 医師により報告されている [18]。

### ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨再生

自家軟骨細胞を軟骨治療に用いる問題として、パイオプシーによる新たな軟骨損傷作製があげられる。また最終分化した軟骨細胞の増殖能には限界があり、損傷部位に対して必要とする細胞数の確保が難しい。筆者は、マサチューセッツ工科大学、Langer 研究室においてヒト間葉系幹細胞と吸収性ポリマー・バイオリアクターを用いた軟骨再生プロジェクトに参加したので、その研究成果を紹介する [19]。十分な増殖能を維持する幹細胞を軟骨細胞へ分化誘導が出来れば、軟骨採取に伴う問題を解決出来る。よって、我々はヒト間葉系幹細胞を用いて検討を行った。既存の再生軟骨用の scaffold は、力学的特性が非常に弱いため、体内の硝子軟骨と同等な力学的特性を持つ scaffold 開発を同時に目指し、吸収性ポリマーであるポリプロラクトン (PCL) 繊維 scaffold (3D-woven PCL) を開発し、バイオリアクターを併用し、再生軟骨を作製した (図 19)。

### hMSC in 3D-woven PCL using bioreactor

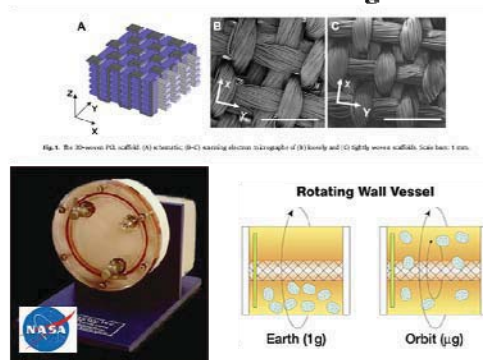


図 19. hMSC in 3D-woven PCL/Bioreactor

3D-woven PCL 繊維の目を細かく編んだ scaffold の方が、緩く編んだものよりも有意に強固な力学的特性が確認され、またバイオリクターで培養を行うことによりその力学的特性は有意に上昇することが確認された (図 20). 生化学的な評価結果より、バイオリクターによる物理的な刺激が細胞増殖とコラーゲン産生を有意に活性化し、一方 GAG の蓄積に関してはバイオリクターを用いない静置培養に利点がある結果が得られた (図 21). この結果は、我々が NeoCart® 開発時のバイオリクターで経験した結果と同様であった。また、組織学的解析も、生化学的解析と同様な結果が得られた (図 22). 以上の結果より、3D-woven PCL scaffold は、軟骨基質である GAG や II 型コラーゲンの蓄積に有効であり、またバイオリクターによる力学的な刺激が細胞増殖とコラーゲン産生に有意に効果的である事が示唆された。特に整形外科領域の治療に必要とされる人工材料は、置換される骨、軟骨、靭帯などのように非常に強固結合組織としての力学的特性が要求され、かつ体内で周囲の組織・細胞と融合する際、非常に長い時間がかかる。本研究で開発した 3D-woven PCL は非常に強固な力学的特性を持ち、また長い間をかけて体内で吸収されるため (体内で約 2 年間)、臨床応用において非常に有効であると考えられる。

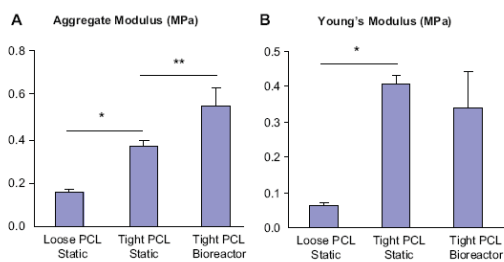


図 20. 力学的評価結果

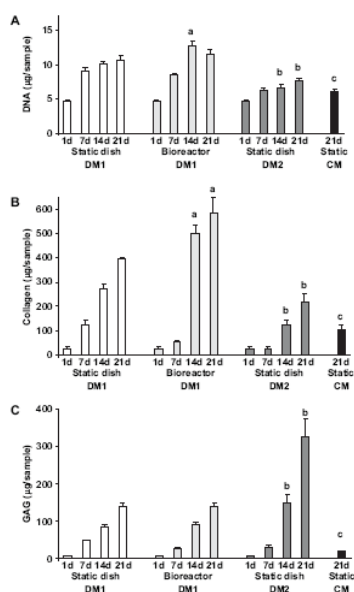


図 21. 生化学的評価結果

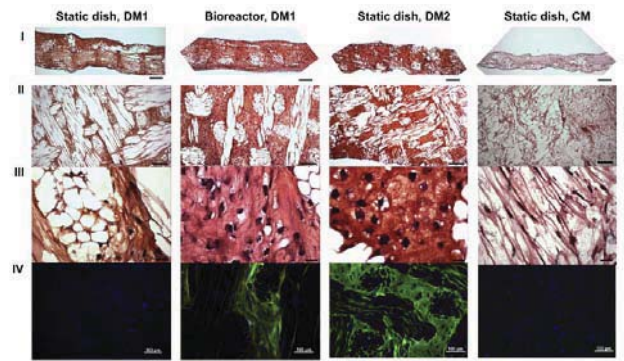


図 22. 組織学的評価(I-III: SAF-O, IV: COL2A IHC)

## iPS 細胞を用いた軟骨再生医療

iPS 細胞を用いた再生医療応用は、ES 細胞が持つ倫理・免疫拒絶の問題、また間葉系幹細胞が持つ限定された増殖能の問題を打破すると考えられる。しかし、iPS 細胞の癌化が医療応用への最大の懸念材料となっており、iPS 細胞を医療へ応用するには、まず動物モデルを用いた安全性・有効性評価が必須であり、最もヒトに近いとされるサルを用いた実験系の開発が急務となる。しかし、免疫不全マウスなどとは異なり、サルを移植モデルと考えた場合、免疫拒絶の問題から自家移植に限定され、実験内容も限定される。その免疫拒絶の問題を打破するのが、筆者が所属する滋賀医科大学動物生命科学センターが開発中の MHC ホモ接合体カニクイザルコロニーである。MHC ホモ個体間における移植が可能であるので、様々な条件で移植の検定が可能となり、再現性が高く、質の高い動物実験が行うことが期待されている。2009 年に、鳥居教授を中心として、HMC ホモカニクイザル成体皮膚より得られた線維芽細胞から山中 4 因子を用いたレトロウイルス法によりカニクイザル iPS 細胞株が樹立された (図 23). 筆者は現在、カニクイザル iPS 細胞より軟骨細胞の分化誘導と軟骨再生医療への応用へ取り組んでおり、その基本コンセプトと予備実験の結果を紹介する。

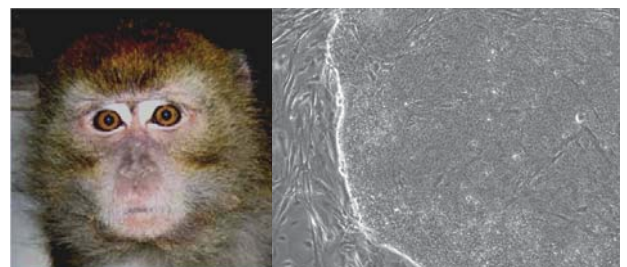


図 23. カニクイザル成体皮膚由来 iPS 細胞

### 1. サル軟骨損傷モデルの重要性

サルは実験動物において唯一の二足歩行を行う動物であり、解剖学的にみても、サイズの違いはあるもののサルの膝関節は最もヒトの膝関節と類似している (図 24). 特に創薬の安全性試験の標準的なモデル動

物であるカニクイザルを用いた軟骨再生の研究は、今後益々重要になっていくと考えられる[20]。すでに滋賀医科大学整形外科講座の松末吉隆教授らは、軟骨再生の研究にカニクイザルを使用されており、良好な結果を得ている。解剖学的、生理内分泌学的にヒトとの類似性は高いカニクイザルであるが、軟骨再生の研究に際し一点だけ注意すべきなのは、関節軟骨の厚さであろう。ウサギよりは厚いものの、大腿顆の厚さは1mm以下であり関節軟骨に欠損を作製する際は、骨軟骨欠損に限定されることも考慮に入れ、目的に応じた損傷モデルの検討が必須となる。なぜならば、臨床においては骨欠損を伴う軟骨治療においては、軟骨部位の骨化は懸念すべき副作用であり、長期に渡る観察と評価が骨軟骨欠損を行った動物では非常に重要となる。

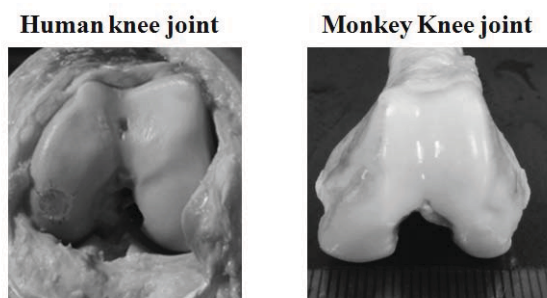


図 24. ヒト膝関節とカニクイザル膝関節

## 2. カニクイザル iPS 細胞の 3 次元培養

まず滋賀医科大学動物生命科学センターにおいて樹立済みのカニクイザル iPS 細胞が軟骨細胞へ誘導可能かどうかを確かめるため、1 週間胚葉体形成による浮遊培養によってランダムな分化を誘導した iPS 細胞を 1.5%アガロースゲル内に播種した (図 25)。2 週間血清添加培地 (DMEM/F12, 10%FBS, 1%ITS, 1%P/S) で培養した。また、低酸素状態がヒト軟骨細胞の体外培養において GAG 蓄積に効果があることから、5%酸素濃度の条件において培養する群も作製し、検討を行った。

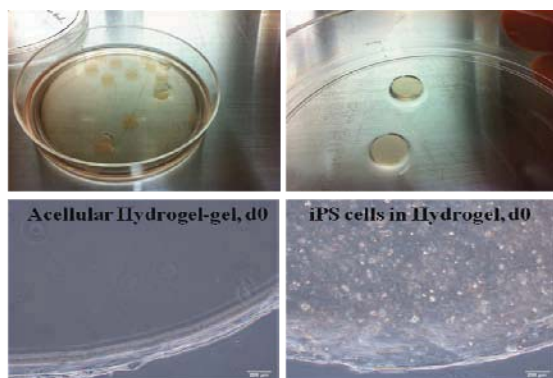


図 25. カニクイザル iPS 細胞のアガロースゲルによる 3 次元培養

アガロースゲルを用いた iPS 細胞の 3 次元培養を 2 週間行ったところ、培養開始直後では確認されなかった軟骨基質である GAG の蓄積が、トルイジンブルー染色により明らかとなった (図 26)。また、軟骨細胞は硝子軟骨の特異的な構造である軟骨基質に囲まれた軟骨小腔内に数個で存在している訳であるが、アガロースゲル内の iPS 細胞もトルイジンブルー陽性の GAG に囲まれた軟骨小腔が観察され、形態学的には軟骨細胞と酷似していた。次に、2 週間の 3 次元培養後のアガロースゲル内 iPS 細胞から total RNA を抽出し、軟骨分化マーカー遺伝子の mRNA の発現を確認した所、アガロースゲル内において 3 次元培養を行った iPS 細胞で軟骨分化マーカー遺伝子の発現が確認された。現時点ではタンパクレベルの確認はまだであるが、少なくとも現在樹立しているカニクイザル iPS 細胞を軟骨細胞へ分化誘導可能であると示唆される結果が得られた。今後はサイトカイン・成長因子の添加による更なる効率的な軟骨細胞への分化誘導条件を検討し、更にレポーター遺伝子や細胞表面マーカーの利用なども取り入れてより未分化な iPS 細胞を含まない安全な iPS 細胞由来再生軟骨を用いた安全性および有効性確認のための動物実験を計画している。

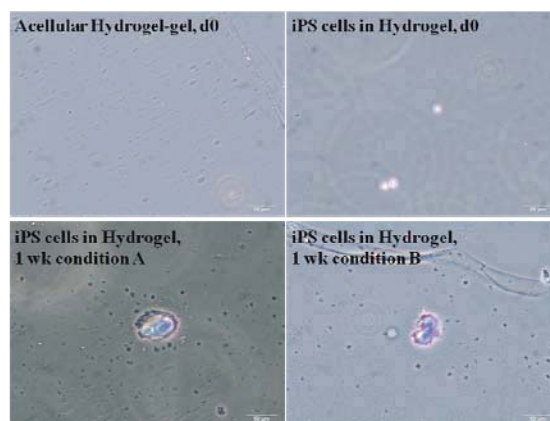


図 26. GAG の検出 (トルイジンブルー染色)

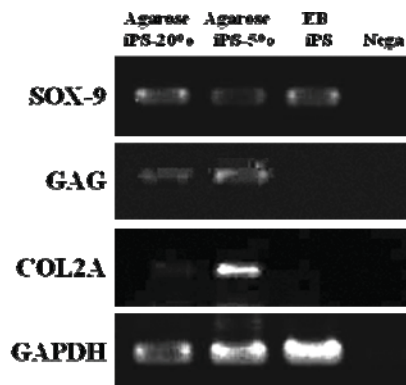


図 27. RT-PCR



## 文献

- [1] Hunter W. On the structure and diseases of articulating cartilage. *Philos Trans R Soc London*. 42: 514-521, 1743
- [2] Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*. 28(4):192-202, 1998
- [3] Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*. (402):21-37, 2002
- [4] Shelbourne KD, Jari S, Gary T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(Suppl 2):8, 2003
- [5] Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation technique and long term follow-up. *Injury*, 39:S40-S49, 2008
- [6] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 14:889-895, 1994
- [7] Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18:434-447, 2010
- [8] Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grøntvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*. Mar;86-A(3):455-64, 2004
- [9] Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89:2105-2112, 2007
- [10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25;126(4):663-76, 2006.
- [11] 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*. 30;131(5):861-72. 2007
- [12] Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology*, 37:129-140, 2000
- [13] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30:215-224, 1982
- [14] Langer R & Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 260:920-926, 1993
- [15] Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J Cell Physiol*. 193(3):319-27, 2002
- [16] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 76(4):579-92, 1994
- [17] Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)*. 143(4):335-40, 1992
- [18] Crawford DC, Heveran CM, Cannon WD, Foo LF, Potter HG. An autologous cartilage tissue implant NeoCart for treatment of grade III Chondral injury to the distal femur: Prospective clinical safety trial at 2 years. *Am J Sports Med*. 37(7):1334-43. 2009
- [19] Valonen PK, Moutos FT, Kusanagi A, Moretti MG, Diekmann BO, Welter JF, Caplan AI, Guilak F, Freed LE. In vitro generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult human stem cells and 3D-woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials*. (8):2193-200. 2010
- [20] Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res*. 9(3):330-40, 1991

## 和文抄録

関節軟骨は神経、血管、リンパ組織に乏しい組織として知られ、一度損傷を受けると自己再生しない。自家軟骨細胞移植法（ACI）は軟骨治療初の細胞療法だが、その効果は疑問視されている。そこで我々は自家軟骨細胞を3D コラーゲン・スポンジに播種し、バイオリアクターを用いることにより、新たなエンジニアード軟骨移植法を開発した。ミニブタを用いた前臨床試験において、安全性と有効性を示し、その結果を元にFDAにおける臨床試験が始まり、現在、全米においてPhase III 臨床試験の最中である。ACI法は、患者の健康な軟骨採取を必要とするが、軟骨採取は無用な軟骨損傷を作る恐れもあり、かつ軟骨細胞は増殖能にも限界がある。近年の幹細胞研究の成果により、幹細胞の軟骨再生への利用も大いに期待され、間葉系幹細胞やiPS細胞の利用も考えられている。しかし、iPS細胞は癌化の恐れも報告され、臨床応用にはまず前臨床モデルで安全性と有効性を確認することが必須である。よりヒトに近い非ヒト類人猿を用いた前臨床モデルはヒトの疾病モデルや生物医学研究に非常に重要である。我々は、カニクイザル iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導能を評価し、予備実験において3次元培養が軟骨細胞分化誘導に有効であることを示す結果を得た。臨床応用のためには、今後より詳細な体外での検討とカニクイザル個体を用いた安全性・有効性評価が必須であるが、今回の結果は、iPS 細胞が軟骨再生医療へ有効である可能性を示唆している。

キーワード：組織工学、軟骨再生、iPS 細胞、カニクイザル、細胞療法