

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	ES 細胞/iPS 細胞を用いた関節軟骨損傷に対する再生医療の基礎的研究	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部附属病院 高度先端総合医療センター再生医療部 寺村 岳士 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

高齢社会の到来に伴い、変形性関節症の有病率が増加しており、その治療は大きな社会的問題となっている。関節内組織である軟骨は、荷重ストレスの緩衝や滑動性の付与に重要な役割を担っている。過度の物理的ストレス、外傷や免疫性疾患などで大きく損傷した場合、他の組織とは異なり自己修復を殆ど期待できないことから、重篤な運動機能障害に直結する。関節軟骨損傷に対する再生医療としては、自己軟骨細胞あるいは間葉系幹細胞 (MSCs) が考えられているが、いずれも増殖限界や採取数、細胞の品質が不安定である等の問題があり、新たな移植用細胞源の開発が求められている。

ES細胞、iPS細胞は多能性幹細胞と呼ばれ、細胞移植医療用資源として有利な性質を多く有している。これを安全かつ効果的に使用するためには目的の細胞に『分化誘導』することが必要であるが、神経細胞や心筋細胞など一部の細胞を除き、誘導方法が確立されておらず、運動器再生医療において有用な軟骨細胞や間葉系幹細胞 (MSCs) を効率的に誘導する方法については殆ど研究がなされていない。特に、軟骨細胞は発生学的にMSCsに由来することが知られていることから、高純度の軟骨再生を得るためには効果的なMSCs誘導方法が必須である。そこで本研究ではMSCs誘導に焦点を当て、効果的な分化誘導法の開発と運動器再生医療領域における多能性幹細胞の臨床的価値を正確に評価することを目的に、1)ウサギES細胞を用いたモデル研究、2)ヒトiPS細胞を用いた非臨床応用研究を計画した。

2. 研究経過及び成果

ウサギES細胞は、その幹細胞学的特性がヒトES細胞、ヒトiPS細胞に類似しており、同種移植が可能であることからヒト多能性幹細胞モデルとして極めて有用である。そのため、研究1としてウサギES細胞を用いたモデル研究を実施した。研究1では、第一段階として、①ウサギES細胞がヒトES細胞と同様の未分化維持機構を有することを確認する実験を行った。現在、多能性幹細胞の未分化維持機構にはLIF-JAK/Stat3経路に依存するNaive型とbFGF-MEK/Erk, Activin/Nodal経路に依存するPrimed型が存在しており、ヒトES/iPS細胞は後者の性質を示すことが明らかとなっている。ウサギES細胞を各シグナル伝達経路の阻害剤 (Jak阻害剤、MEK阻害剤、ALK阻害剤) で処理したところ、Jak阻害剤の影響を受けず、MEKあるいはALKの阻害によって大きく未分化性を損なうことが示された。これにより、ウサギES細胞がヒトES/iPS細胞と同様の経路で維持されていることが実験的に確認され、従来示唆されていたように、ヒトモデルとして有用であることが証明された。次に、第二段階として、②ウサギES細胞から胚様体形成を介してMSCsを誘導出来るかどうかを検討した。胚様体を培養することでVimentin強陽性の線維芽細胞様細胞が多数出現し、これを限外希釈培養するとコロニーを再形成するMSCs候補細胞が得られた。細胞表面マーカーの発現解析を行ったところ、これらの細胞はCD29、CD90、CD105、CD271、CD140aといったMSCsマーカーを発現していた。さらに、分化誘導時の条件を、培養環境中の酸素濃度に着目し検討したところ、酸素1%の極低酸素条件において、未分化細胞選択的に増殖の停止あるいは細胞死の進行が生じることが観察され、残存したMSCsが骨、軟骨、脂肪への高い分化能力を示すことが明らかとなった。このことから、極低酸素培養はMSCsの選択的誘導方法として極めて有効であることが証明された。次に、③同法で誘導したMSCsが実際に組織再生に寄与するかを、膝関節軟骨損傷モデルへの細胞移植を通じて検討した。移植から1ヶ月にかけて、移植細胞の現象は認められたものの、軟骨組織への残存が見られた。移植後1ヶ月の検体からES細胞由来細胞のみを取り出して遺伝子解析を行ったところ、軟骨組織に特徴的な遺伝子発現を示すことを確認した。以上より、移植細胞は軟骨再生に寄与し、生着後、軟骨細胞として振る舞うことが証明された。本研究成果は原著論文として投稿し、既に受理されている。

次に、研究2として、実際にヒト多能性幹細胞からもMSCsの作成が可能であることを確認するため、ヒトiPS細胞からのin vitro、in vivoでのMSCsの分化誘導法の確立を実施した。研究1で用いた方法を使用し、

ヒトiPS細胞から実際にMSCsの誘導を行ったところ、ヒトiPS細胞においてもMSCsマーカーCD29、CD90、CD105、CD271、CD140aを発現し、骨、軟骨、脂肪に分化するMSCsが得られることが明らかとなった。また、本研究ではヒトiPS細胞を免疫不全マウスに移植し体内でMSCsを誘導できることを明らかにした。本研究成果は特許として申請するとともに、学会発表を行った。

以上の研究を通して、多能性幹細胞からMSCsを誘導する方法が開発され、かつヒトiPS細胞にも応用可能であることが示された。これまでに、培養環境の検討による極めて選択的なMSCs分化誘導法は存在していなかったことから、本研究成果は多能性幹細胞の応用に大きく寄与すると考えられる。

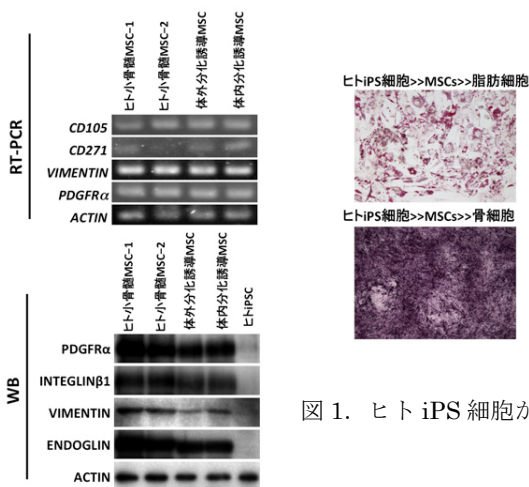


図 1. ヒト iPS 細胞から in vitro (体外)、in vivo (体内) で分化誘導した MSCs

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究を通してMSCsの選択的誘導方法が開発された。本法は機能的なMSCsを得るのに有用であるが、MSCsの出現頻度を向上させるものであるかは不明である。そのため、本条件がMSCsの出現という現象にどのように影響しているのかを確認する必要がある。また、分化誘導系の改良という観点から、様々な分化誘導因子がMSCsの出現頻度や後の性質に与える影響を観察し、最適な誘導条件の決定を目指すとともに、本研究を通して作成したin vivo 誘導MSCs、ヒト正常BMMSCsとの網羅的な比較を実施する必要がある。加えて、iPS細胞特有の問題であるウイルスベクターの再活性化に起因する未分化細胞の再出現を制御する機構の解明と、これを応用した分化誘導方法の開発にも着手する予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Cell Transplantation	雑誌	印刷中、未定
日本軟骨代謝学会	口頭	平成 24 年 3 月 10 日