

関節における人工臓器の開発研究：iPS細胞由来軟骨を用いた関節軟骨の構成

大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科組織生化学,
大阪大学WPIヒューマン・メタバース疾患研究拠点

妻木 範行

Noriyuki TSUMAKI



1. はじめに

変形性関節症(OA)の病変は、関節軟骨の損傷・変性が主である。末期の変形性関節症に対して、病変軟骨と軟骨仮骨を切除して金属とポリエチレンから成る人工関節に置換する手術が行われている。一方、体外で関節軟骨組織を用意し、それを移植して生着させる再生治療の研究開発が進められている。人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem, iPS細胞)は、自己複製能と多分化能を持ち、胚性幹細胞(embryonic stem cell, ES細胞)と異なり初期胚を犠牲にしない。軟骨細胞と軟骨細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)で構成される軟骨組織をヒトiPS細胞から作ることができ、iPS細胞由来軟骨を関節軟骨損傷部に移植することで損傷部を直接的に構成する再生治療法が研究されている。軟骨の免疫原性は低く、同種移植が可能である。非臨床試験にて有効性と安全性を検証し、臨床応用に向けた開発が進められている。

2. 変形性関節症の病変と人工関節置換術

関節は、ヒトをはじめとする動物が動くために必須の器官である。変形性関節症は、関節機能が障害される最も頻度の高い疾患である。変形性関節症の罹患頻度は年齢とともに上がり、50歳以上で2~3割の人の膝関節に変形性膝関節症病変が認められる。日本において約2,300万人に病変を認め、そのうち約1,000万人が歩行などの動作時の関節痛や歩行困難、可動域制限などの膝関節症状を呈して

いるとされる。骨は関節で相対し、その骨端は関節軟骨で覆われ双方の関節軟骨が摺動することで、滑らかな関節運動が行われている。

変形性関節症は関節全体の機能不全状態であり、関節軟骨に加えて関節を構成する各組織(軟骨下骨、靭帯、滑膜、半月板等)の異常が絡んでいる。中でも変形性関節症の病態の中心を成すのは関節軟骨の変性とされている。関節軟骨の変性が起きる原因として、さまざまな要素が考えられる。主な外的要因として、外傷が挙げられる。また、明らかな外傷の既往がないが、加齢や代謝異常によっても関節軟骨は徐々に変性する。靭帯の機能不全、関節の不安定性、膝関節の場合は半月板の機能不全、下肢のアライメント異常により、関節軟骨に過度の負荷がかかり、変性の原因となりうる。変性した軟骨を回復させる薬はない。変形性関節症に対しては、安静、筋力トレーニング、可動域訓練、消炎鎮痛剤投与などの保存療法を行う。

そして、関節軟骨の変性の程度が重度で日常生活動作に支障をきたす末期において、人工関節置換術が行われている。人工関節置換術では、変性した軟骨を軟骨下骨とともに切除し、関節軟骨の形状をした金属およびポリエチレンのコンポーネントを挿入する。病変部を切除し、金属・ポリエチレンに置き換えるため除痛効果が高く、日常生活動作(ADL)が改善する。しかし、人工関節の構造上、関節可動域は正常とならず、膝関節の場合は正座を行うのが難しい。また、金属コンポーネントと骨の接合部が経年的に緩むため、再置換のリスクを考えると若年者には適応しにくい。ポリエチレンの摩耗粉が炎症を起こし、緩みを助長する。

人工関節置換術で挿入される金属とポリエチレンのコンポーネントは非生物である。それに対して、関節軟骨病変を生体組織で治す試みが再生治療として研究開発されている。

■ 著者連絡先

大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科組織生化学,
大阪大学WPIヒューマン・メタバース疾患研究拠点
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)
E-mail. tsumaki.noriyuki.med@osaka-u.ac.jp

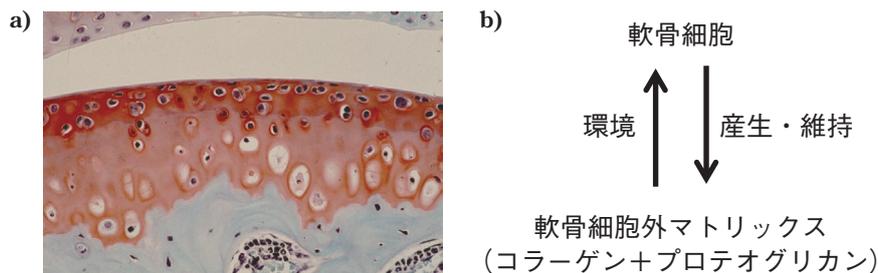


図1 関節軟骨の組織像(マウス) (a), 軟骨細胞と軟骨細胞外マトリックス(軟骨ECM)の関係 (b)

- a)：軟骨細胞は、サフラニンO染色で赤く染まる軟骨ECMの中に散在している。
 b)：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、軟骨細胞が軟骨の性質を失い軟骨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くなる。

る。体外で関節軟骨組織を用意し、それを移植して生着させて関節軟骨を構成する再生治療は、関節という器官への人工臓器による治療法と捉えることが可能である。その観点から、本稿では関節軟骨の再生治療について紹介する。

3. 軟骨の構造

骨は、軟骨細胞と軟骨ECMで構成される組織である(図1)。軟骨細胞が軟骨ECMを作る。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。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、軟骨細胞の性質を維持する役割を果たす。よって、関節軟骨変性・損傷を治療するために、体外で用意すべき組織は、軟骨細胞と軟骨ECMの両方で構成されている必要がある。

4. 関節軟骨損傷に対する再生治療とその修復機序

関節軟骨の損傷部が小さい場合は、骨髄刺激法による治療が行われている²⁾。これは、軟骨下骨を穿孔して骨髄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方法である。細胞治療としては、関節面の辺縁部から少量だけ採取した自家軟骨細胞や、骨髄や滑膜に存在する間葉系細胞を培養して増やした後に細胞移植が行われ、良好な臨床成績が報告されている。細胞移植による修復機序については、移植した細胞が修復組織を作ることを示す証拠は乏しく、移植細胞が分泌する因子等が患者(ホスト)の細胞に働いて修復を誘導する trophic effect が考えられている³⁾(図2上段)。骨髄刺激や trophic effect による細胞治療の修復機序は、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硝子軟骨を作り出すことは難しい。それは、軟骨ECMを伴わない細胞は軟骨細胞の性質を維持できないためである。よって、

長期的には修復組織の変性が進行する。

trophic effectとは別の修復機序として、軟骨細胞と軟骨ECMからなる軟骨組織を用意し、移植した軟骨自身が修復組織を直接的に構成するという機序がある(図2下段)。モザイクプラスチックと同種軟骨移植は、このような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組織を採取し、欠損部に移植する。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のが課題である。

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⁴⁾。これは、亡くなった小児の軟骨を採取して小片化し、必要量を同種移植する。課題として、ドナー不足と、ドナー個体間の差による軟骨の活性のばらつきから成績の不安定さが挙げられている。

よって、モザイクプラスチックと同種軟骨片移植では、ともに移植物の不足が課題である。ES細胞と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もつ。そのため、多能性幹細胞からは、理論上はほぼ無限量の軟骨を作り出すことができる。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。移植用の軟骨組織をiPS細胞から作り出す研究が行われている^{5)~7)}。

5. iPS細胞

ヒトの発生は、1個の細胞である受精卵が分裂を繰り返すとともに、全身を構成する種々の系譜の体細胞に分化する過程である(図3)。受精卵が細胞分裂を始めてから数日のうちは、細胞は均一で、体のあらゆる組織の細胞になり得る pluripotency (多能性)をもつ。発生が進むにつれて細胞は特定の組織に向けて分化し、それとともに多能性が失

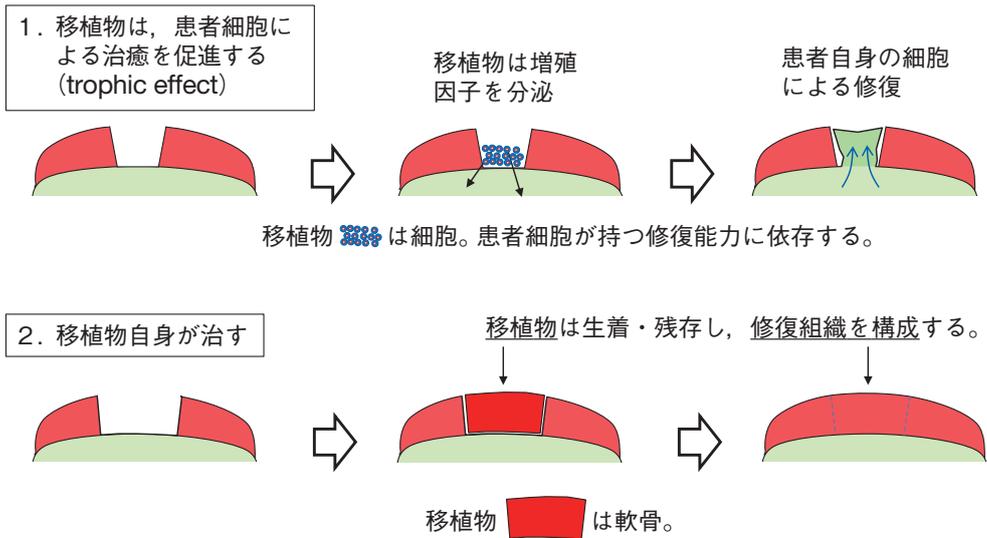


図2 移植により関節軟骨欠損を再生する2つの修復機序

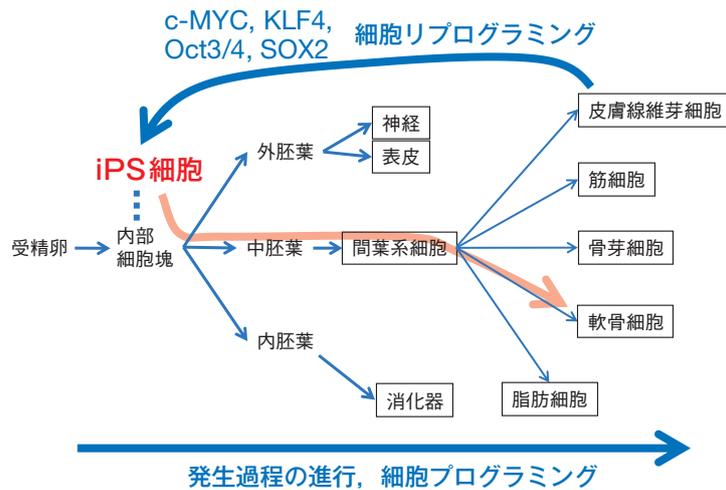


図3 受精卵からの発生

左から右に向かって発生が進む。左から右に進むのが細胞プログラミングで、右から左に進めるのが細胞リプログラミングである。

われる。

皮膚線維芽細胞に c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2 の4因子を導入することで、多能性をもつiPS細胞ができることを、2007年にヒト細胞を用いて報告された⁸⁾。iPS細胞はES細胞用の培地で、ES細胞と同様に多能性と自己複製能を維持したまま培養できる。目的の臓器・組織の細胞を大量に作製できるため、ES細胞とiPS細胞は再生治療への応用が期待されている。ES細胞は、受精卵から数日経て作られる胚盤胞の中の多能性をもつ細胞の塊(内部細胞塊)から作られる細胞株である。iPS細胞には、初期胚を犠牲にして作製するというES細胞に伴う倫理的な問題がない。皮膚の線維芽細胞や血液細胞からiPS細胞を作り、iPS細胞

を増やした後に、目的の細胞、例えば軟骨細胞に分化させることで、細胞移植による再生治療が可能となる。

6. ヒトiPS細胞から軟骨組織を作製する方法の開発と同種移植

発生研究において、初期胚から軟骨細胞が分化する過程で働く因子が明らかにされてきた。iPS細胞の分化ステージは初期胚に相当するので、これら軟骨分化に重要な因子を培地に加えることで、iPS細胞を軟骨細胞誘導誘導することができる。我々はヒトiPS細胞から軟骨細胞を分化誘導した後に、さらに3次元培養に移行することでiPS細胞由来軟骨細胞にECMを作らせて自らの周囲に蓄積させ、

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

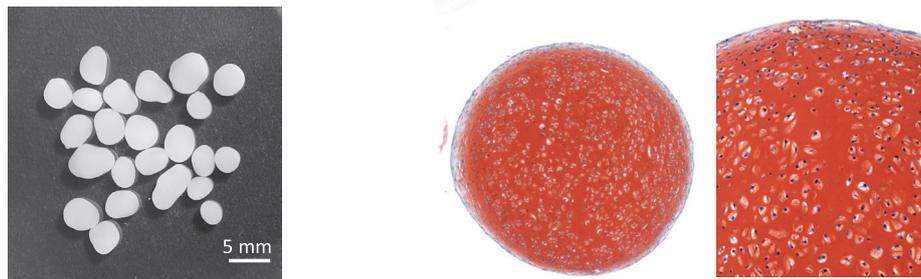


図4 ヒトiPS細胞から作製した軟骨組織

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ECMを作らせて硝子軟骨を作製する。

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

軟骨組織を作る方法を開発した。できあがった軟骨組織(iPS細胞由来軟骨)は直径2～3 mmの白色の球形で、硝子軟骨に似た組織であった(図4)^{5), 9), 10)}。

ヒトiPS細胞由来軟骨は胎児期の軟骨に相当する性質をもち、接触させておくと融合する性質をもつ¹¹⁾。そして、ヒトiPS細胞由来軟骨をミニブタ関節軟骨欠損に移植すると、欠損を埋めて荷重を支えることが判明した。

患者自身の皮膚細胞や血液細胞からiPS細胞を作り、それを目的の細胞・組織に分化誘導すれば自己の移植用細胞を用意することが可能であるが、コストがかかる。そこで、免疫反応を起こしにくいHLA(ヒト白血球抗原)タイプをもつ方々から採取し、あらかじめiPS細胞を作ってストックするプロジェクトが進められている。その一方で、軟骨は免疫原性が低いと考えられ、海外では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、レシピエン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ないことがある。ヒトiPS細胞由来軟骨も細胞はECMに取り囲まれて、血管を欠く(図4)。

我々は、移植された同種軟骨が免疫反応を起こさずに生着するかを調べるため、カニクイザルを用いて実験を行った。カニクイザルは、ヒトと似た主要組織適合抗原の構造をもつ。カニクイザルiPS細胞を軟骨組織へ分化誘導し、MHC(主要組織適合遺伝子複合体)ミスマッチのサルは膝関節軟骨に欠損を作って同種移植した。その際、免疫抑制剤を投与しなかった。軟骨欠損が軟骨下骨を貫いて骨髓に達する欠損(骨軟骨欠損)に移植した場合は、移植軟骨周囲にリンパ球が集簇し、免疫反応が起きることが分かった¹²⁾。しかし、移植物は生存・存在し続け、拒絶には至ら

なかった。一方、軟骨欠損が軟骨下骨に達せずに軟骨内にとどまる欠損(軟骨内欠損)に移植した場合は、リンパ球の集簇は起きず、免疫反応は起きなかった(図5)。移植軟骨は生着して関節面を構成し、周囲のホスト軟骨と融合した。また、移植をしないと欠損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を防いだ。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、移植軟骨の遺伝子発現プロファイルと正常関節軟骨のそれは似ていた¹²⁾。これらの結果から、同種iPS細胞由来軟骨は軟骨内欠損に移植した場合、少なくとも4か月のあいだ生着して再生組織を直接構成し、周辺軟骨の変性を防いで、関節軟骨として機能しうることが判明した。骨軟骨欠損への適応については、今後の検討が必要である。

iPS細胞はいくらでも細胞数を増やすことができるので、1種類のiPS細胞から軟骨を作ることによって均質な軟骨を大量に作製することができ、それを全ての患者に同種移植する治療アプローチが可能である。

7. 同種iPS細胞由来軟骨を用いた臨床研究

iPS細胞由来軟骨の製造は、長期の培養を伴うため、その間、細胞の品質を管理する必要がある。また、造腫瘍性をはじめとする安全性試験を慎重に行う必要がある。有効性と安全性¹³⁾を検証した非臨床試験の結果を受け、限局した膝関節軟骨損傷に対して同種iPS細胞由来軟骨を移植する再生治療の臨床研究を計画した。これは厚生科学審議会において再生医療等提供基準に適合すると認められ、臨床研究を行っている¹⁴⁾。

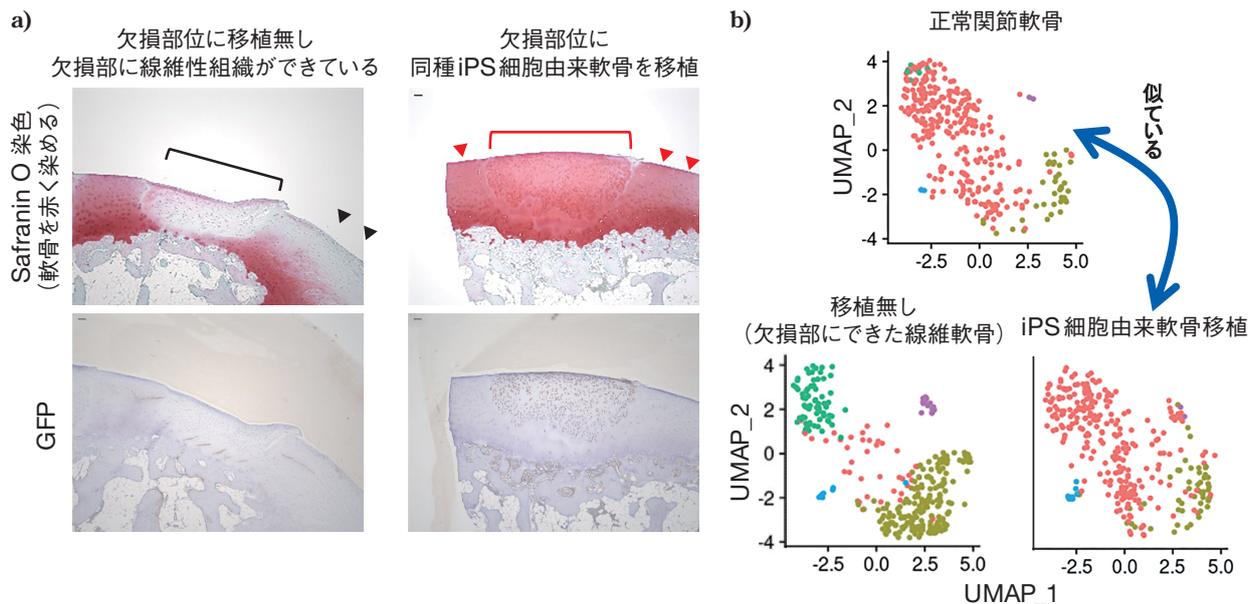


図5 カニクイザル膝関節軟骨内欠損に同種iPS細胞由来軟骨を移植後17週(文献12を改変)

- a) : 上段左, 移植しないと欠損部は線維組織で埋まり(□), 周辺の軟骨は変性する(▶)。上段右, 移植物は生着し(□), 周囲の軟骨変性は起きない(▶)。下段右, 再生組織はGFPを発現していた。すなわち, 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。本解析により, 発現プロファイルにもとづき細胞が5つのクラスターに分類された。正常関節軟骨と移植後のiPS細胞由来軟骨は, 主に赤色(●)で示されたクラスターの細胞で構成されていた。一方, 軟骨内欠損部にできた線維軟骨は, 主に緑色(●)と黄土色(●)で示されたクラスターの細胞で構成されていた。

謝辞

本研究は, 日本学術振興会科学研究費助成事業(23H03029), 日本医療研究開発機構(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た。

利益相反の開示

妻木範行:【研究費・寄附金】旭化成株式会社

文献

- Muraki S, Akune T, Oka H, et al: Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis and knee pain in Japanese men and women: a longitudinal population-based cohort study. *Arthritis Rheum* **64**: 1447-56, 2012
- 井植栄二, 津村 弘監: 標準整形外科 第15版. 医学書院, 東京, 2023
- Caplan AI: Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int* **2015**: 628767, 2015
- Zimmer Biomet: DeNovo® NT Natural Tissue Graft. <http://www.zimmer.com/medical-professionals/products/biologics-sports-medicine/denovo-nt-natural-tissue.html> Accessed 5 Nov 2024
- Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, et al: Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports* **4**: 404-18, 2015
- Yamada D, Nakamura M, Takao T, et al: Induction and expansion of human PRRX1 limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng* **5**: 926-40, 2021
- Nakamura A, Murata D, Fujimoto R, et al: Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biofabrication* **13**, 2021
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-72, 2007
- Yamashita A, Yoshitomi H, Kihara S, et al: Culture substrate-associated YAP inactivation underlies chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **10**: 115-27, 2021
- Yamashita A, Morioka M, Kishi H, et al: Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* **513**: 507-11, 2014
- Chen X, Yamashita A, Morioka M, et al: Integration Capacity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage. *Tissue Eng Part A* **25**: 437-45, 2019
- Abe K, Yamashita A, Morioka M, et al: Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun* **14**: 804, 2023
- Takei Y, Morioka M, Yamashita A, et al: Quality assessment tests for tumorigenicity of human iPS cell-derived cartilage. *Sci Rep* **10**: 12794, 2020
- 臨床研究等提出・公開システム. <https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCTa050190104> Accessed 5 Nov 2024