

東海大学大学院令和 2 年度博士論文

関節軟骨治療に用いるヒト軟骨
細胞シートの家兎異種同所性
移植モデルによる評価

高橋 匠

・この学位申請論文は、Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

関節軟骨再生において新たな治療法や細胞ソースの研究開発が進められる中、適切な動物モデルの選定や開発が求められる。特にヒト由来細胞加工製品等の開発では、免疫不全動物モデルを用いた異種移植により最終製品を直接評価することが望ましい。関節軟骨再生の研究では家兎モデルが頻繁に用いられているが、免疫不全家兎の供給は限られている。そこで本研究では、ヒト由来軟骨細胞シートの有効性を評価することを目的とし、免疫抑制下の家兎異種同所性移植モデルの開発を行った。免疫抑制剤タクロリムス 0.8 mg/kg/day あるいは 1.6 mg/kg/day を投与した日本白色家兎の膝関節軟骨に軟骨全層欠損を作製し、人工膝関節置換術の廃棄組織より作製した積層化軟骨細胞シート (TKA シート) の異種移植を行った。4 週後の組織学的評価の結果、1.6 mg/kg/day を投与した家兎においてヒト軟骨細胞の生着が確認され、硝子軟骨と線維軟骨が混在する関節軟骨修復再生が確認された。0.8 mg/kg/day を投与した家兎においてはヒト軟骨細胞の生着は確認されなかったが、硝子軟骨による関節軟骨修復が確認され、パラクライン効果による自己修復能を促進する修復効果が示唆された。移植から 12 週後 (免疫抑制剤投与中止から 8 週後) の組織学的評価ではヒト軟骨細胞の残存は認められず炎症反応が確認され、異種移植において関節

軟骨は免疫寛容ではないことが示唆された。これらの結果から、1.6 mg/kg/day のタクロリムス投与下では生着した細胞の関節軟骨修復再生が評価可能であり、0.8 mg/kg/day のタクロリムス投与下では主にパラクリン効果による関節軟骨修復の評価が可能であることが示唆された。

これらの結果を踏まえ、新たな細胞ソースである多指症手術時の廃棄組織より作製した多指症由来軟骨細胞シート（PD シート）の本モデルによる評価を、ヒトへの同種移植による細胞生着を想定し、1.6 mg/kg/day のタクロリムス投与下で実施した。6 ドナーより作製した PD シートの異種同所性移植を行った結果、組織学的評価において硝子軟骨による関節軟骨修復再生の程度がドナーに応じて異なることが確認され、PD シートのドナー差が有効性に影響する可能性が示唆された。本研究では、家兎の異種同所性移植モデルの有用性が示され、新規細胞ソースより作製した PD シートの有効性評価に成功した。

2. 研究の背景

関節軟骨は、歩行や階段の昇降などの日常的な動作において繰り返される衝撃に耐える複雑な組織である。関節軟骨は無血管組織であることから、外傷や老化による非可逆的な損傷を受けることで変形性膝関節症(膝 OA)などの変性疾患へと進行することが多い。膝 OA は運動機能の低下に繋がる進行性の疾患であり、特に高齢化社会において社会や医療への負担が大きい。高齢者の人口増加に伴い、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）の低下や障害を持った人々の増加が懸念される。

関節軟骨の再生を通して正常な膝関節の機能を取り戻す治療法の開発は長年行われてきたが、膝 OA に対しての治療法は開発段階である。これまで骨髓刺激法；自家や他家の骨軟骨柱移植；自家軟骨培養細胞移植など

が比較的小さな軟骨欠損に対して開発されてきた。臨床研究において治療効果が確認された治療法もある一方、エビデンスは不十分であり、線維軟骨での修復や供与部位への影響が懸念される。

関節軟骨の再生を目的とした新規治療法は、スキャフォールドのみ、細胞とスキャフォールドの組み合わせ、細胞のみ（スキャフォールド・フリー）へと分類できる。我々は、1990年代に開発された日本発の細胞シート工学の技術を利用し、軟骨細胞シートの開発を進めてきた。poly (N-isopropylacrylamide)によりコーティングされた温度応答性培養インサートを用いることで、細胞外基質を保持したまま軟骨細胞を細胞シートとして回収し移植可能である。

このスキャフォールド・フリー技術を基に、積層化軟骨細胞シートの治療効果を家兎の部分欠損モデル；ラット、家兎、ミニブタの全層欠損モデルにて治療効果を確認した。その結果を踏まえ、2011年から2014年にかけて臨床研究を実施し、8人の膝OAを有する患者へ積層化軟骨細胞シートの自己移植を行い、治療法の安全性や有効性を確認した。

しかしながら、自己移植には採取と移植で2度の手術を有することや細胞ソースが限られることから治療法としての制約がある。そこで我々は、新たな細胞ソースを用いた同種移植を目的とした軟骨細胞シートの開発も行ってきた。軟骨再生治療における細胞ソースとして骨髄、脂肪、滑膜などの組織から間葉系幹細胞を単離し、軟骨細胞へ分化させた状態あるいは未分化な状態で、スキャフォールド・フリーあるいはスキャフォールドや成長因子などとの組み合わせで用いられている。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞より作製された硝子軟骨様組織も軟骨再生治療で期待されている。その一方で、我々は自施設で入手可能な多指症手術時の廃棄組織より軟骨細胞を単離し、多指症由来軟骨細胞シート（PDシート）の研究開発

を行ってきた。新たな細胞ソースの検討における前臨床試験は極めて重要であり、ヒト細胞加工製品等の開発においては最終製品を直接動物モデルで評価することが望ましい。

そこで本研究では、ヒト軟骨細胞シートの前臨床試験に用いることが可能な異種同所性移植モデルの開発を目的とした。家兎は系統学的および解剖学的にも齧歯類と比べてヒトに近く、膝関節軟骨に細胞シート 1 枚を移植できる大きさの軟骨全層欠損が作製可能である。人工膝関節置換術 (TKA) 時の廃棄組織より TKA シートを作製し、臓器移植などに用いられる免疫抑制剤タクロリムスを投与した日本白色家兎の軟骨全層欠損へ移植した。初めにタクロリムス濃度と評価期間を検討し、ヒト軟骨細胞の生着および関節軟骨修復再生の評価を行った。次に、本モデルの有用性を確認するため、異なるドナーより作製した PD シートの評価を実施した。

3. 考察

軟骨細胞シート移植による硝子軟骨の再生治療は、膝 OA に対して長期に渡り治療効果を示す有効な治療法となる可能性がある。異なる細胞ソースより作製した軟骨細胞シートの安全性と有効性を担保するため、ヒト由来軟骨細胞シートを直接評価が可能な前臨床試験モデルが望まれる。本研究では、家兎の異種同所性移植モデルを用いた TKA シート移植により、ヒト由来軟骨細胞シートを直接評価することが可能であることを確認した。さらに、PD シートの有効性評価が可能であることを示し、PD シートのドナー差が有効性に影響する可能性があることを確認した。

TKA シートは軟骨細胞シートの接着性に重要な fibronectin を発現しており、軟骨同化因子である $\text{TGF}\beta\text{-1}$ と MIA を産生していた。また、軟骨細胞シートの 3 次元培養法により、TKA シートの硝子軟骨形成能を確認し

た。遺伝子発現解析の結果、COL2A1 と SOX9 の発現が 3 次元培養により有意に上昇していることが確認され、組織学的評価では、3 次元培養により作製した組織の Safranin O の強い染色性と Toluidine blue の異染色性が確認された。

本モデルの条件検討として、0.8 mg/kg/day あるいは 1.6 mg/kg/day のタクロリムス投与下の日本白色家兎に軟骨全層欠損を作製し、TKA シート 1 枚を縫合なしで移植した。移植から 4 週後に 1.6 mg/kg/day のタクロリムスを投与した群でヒト軟骨細胞の生着および修復再生軟骨が確認され、疼痛評価および組織学的評価において有意な改善が確認された。我々が知る限り、家兎の膝関節軟骨へのヒト軟骨細胞の生着を確認し、生着した軟骨細胞が形成した再生軟骨の特性解析を報告したのは初である。組織学的評価の結果、再生した軟骨は硝子軟骨と線維軟骨が混在していたが、本研究で用いた軟骨が膝 OA や高齢な患者から採取したことが起因していると考えられる。タクロリムス投与による有害事象が確認されたが、患肢荷重配分比は以前の報告と同様な結果であった。

0.8 mg/kg/day のタクロリムスを投与した移植群では、移植後 4 週ではヒト軟骨細胞の生着はほとんど確認されなかったが、硝子軟骨での修復や疼痛評価と組織学的評価における改善が認められた。この結果は軟骨細胞シートが産生する液性因子のパラクライン効果が寄与していると考えられる。ブタの異種同所性移植モデルによる虚血性心筋症に対する細胞シートの効果は、細胞の残存は認められず主にパラクライン効果による修復であると考察されている。移植した細胞の拒絶反応と並行して、パラクライン効果により活性化されたレシピエント細胞により硝子軟骨修復が促されると推察される。本モデルはタクロリムス投与量の違いにより、生着したドナー由来の移植細胞による軟骨修復再生効果あるいはレシピエント

細胞へのパラクライン効果による軟骨修復効果の二通りの影響をそれぞれ評価することが可能であり、軟骨細胞シートの関節軟骨修復再生における作用機序の解明に有用なモデルであると考えられる。

本モデルが長期的な関節軟骨修復再生を評価することが可能かさらに検討した。細胞が生着し細胞外基質を産生することで、免疫抑制剤の投与を中止しても問題ないと仮定した。しかしながら、移植から 12 週後（免疫抑制剤投与を中止して 8 週後）の組織学的評価において拒絶反応が起きていることが確認された。関節軟骨は比較的免疫寛容であることで知られているが、これまで様々な報告がある。家兎の関節軟骨部位へブタ軟骨細胞を異種移植したところ、24 週後の評価で免疫拒絶はなかったとの報告がある。一方で、同様な実験で免疫拒絶が報告されていることや、ヒト軟骨細胞をミニブタへ異種移植した実験やヒト骨軟骨柱 *biphasic composite constructs* を家兎へ異種移植した実験では免疫拒絶が報告されている。多くの研究から異種移植には免疫抑制が必要であることが報告されていることから、関節軟骨も異種移植においては免疫寛容ではないことが示唆される。

タクロリムス投与の影響により、体重減少や自傷行為などの有害事象が観察された。生化学的マーカーの血中濃度評価では腎機能や肝機能の異常は確認されなかったが、有害事象の発生頻度を考慮してタクロリムス投与は 4 週間が限界であった。一方、タクロリムス投与による膝 OA の進行を抑制する効果や軟骨組織の細胞外基質を保護する作用が、*in vitro* や *in vivo* の実験で確認されている。タクロリムスの筋肉内投与のみによる本モデルでの軟骨修復効果は確認されなかったが、細胞シート移植の軟骨修復再生効果をタクロリムス投与が助長する可能性はある。これらの制限を踏まえ、我々は長期的な評価が可能なラットの異種同所性移植モデルも検

討し、TKA シートと滑膜由来細胞シートの評価が可能であることをこれまで報告してきた。家兎の膝関節と比較してラットの関節は小さいが、関節軟骨修復の長期的評価には免疫不全ラットが適していると考えられる。

本モデルにより、ヒト軟骨細胞シートの評価が可能であることが確認できたことから、PD シートの *in vivo* 評価を同様に実施した。これまでヒト軟骨細胞移植の研究で、細胞のトラッキングを行っている研究は少ない。同種骨軟骨柱移植の研究では、大腿骨の軟骨組織より採取し培養した軟骨細胞の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションと核型解析により、移植から 29 年後でもドナー軟骨細胞が生存し機能していることを報告している。同研究グループは、同種骨軟骨柱移植の複数の症例で、3 年後に例外なくドナー軟骨細胞の生着を報告している。これらの報告から、PD シートの同種移植では、パラクライン効果による軟骨修復と並行して移植した軟骨細胞が長期に渡り生着する可能性があることから、本研究では 1.6 mg/kg/day のタクロリムスを投与したモデルを用いた。6 ドナーより作製した PD シートは、いずれも軟骨欠損部位に生着したことが確認された。しかしながら、組織学的評価の結果、修復再生軟骨の特性はドナーにより異なり、強い COL2 の染色性を示す硝子軟骨による組織修復が確認されたドナーもある一方、強い COL1 の染色性を示す線維軟骨による組織修復が確認されたドナーもあった。この結果から、PD シートはドナーに応じて硝子軟骨修復再生効果が異なることが示唆された。これらの結果を踏まえ、我々は PD シートの遺伝子発現解析および液性因子の解析より、本モデルにより評価した *in vivo* の有効性との相関を示す遺伝子や液性因子の同定を行ってきた。今後は、本モデルにより PD シートのパラクライン効果による軟骨修復効果や、生着した軟骨細胞の軟骨修復再生効果の作用機序を解明することが期待される。

4. 結論

本研究では、ヒト由来軟骨細胞シートが直接評価可能な家兎の異種同所性移植モデルの開発を行った。TKA シートの異種移植の結果、タクロリムス 1.6 mg/kg/day 投与においてヒト細胞の生着が確認され、関節軟骨の組織修復再生が評価可能であった。また、0.8 mg/kg/day 投与においてヒト細胞の生着は確認されなかったが、関節軟骨の組織修復が確認され、レシピエント細胞へのパラクライン効果による軟骨修復効果が確認できることが示唆された。1.6 mg/kg/day 投与で本モデルにより PD シートを評価した結果、ドナー由来の細胞の生着が確認された一方で、多指症ドナーに応じで PD シートの有効性が異なる可能性が示唆された。本モデルは、ヒト軟骨細胞シートやヒト細胞加工製品等の開発に貢献することが期待される。