The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	多能性幹細胞を用いた軟骨再生治療
Author(s)	千々松, 良太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61869
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　千々松　良太　　）	
論文題名	多能性幹細胞を用いた軟骨再生治療 (Cartilage repair using pluripotent stem cells)

論文内容の要旨

関節軟骨は荷重衝撃の緩衝、関節の滑動性に重要な役割を担うが、血行に乏しい組織で、損傷した場合は既存治療で十分な修復を得られない現状にある。新たな治療法として、生体から採取した軟骨細胞や間葉系幹細胞(MSC)を用いた細胞治療研究が行なわれているが、これら生体由来細胞は採取に侵襲が伴うことや生体外培養での性質変化など、治療に用いるには制限のある細胞源と考えられる。そこで近年、低侵襲かつ無限の増殖能を有する多能性幹細胞（ES、iPS細胞）が新たな細胞源として有望視されている。これまでの報告で多段階で綿密な誘導系により多能性幹細胞から軟骨細胞を作出できる事が知られていたが、その造腫瘍性や再現性については十分に解析されていない。一方、異なるアプローチとして多能性幹細胞から増殖能と間葉系細胞への分化能を有するMSC様の細胞を誘導する手法が報告されており、未分化細胞の除去や、間葉系幹・前駆細胞の純化が望める手法として着目されている。これら多能性幹細胞由来MSC様細胞はin vitroで軟骨分化能を有する事が知られていたが、損傷した軟骨の治療への応用については知見が乏しい。本研究では多能性幹細胞を用いた軟骨再生治療の応用への可能性を評価するため、これまで報告があった多能性幹細胞由来MSC様細胞（以後MSC様細胞）に着目し、それらの軟骨細胞分化能、軟骨組織修復能を検討した。

最初に、以前報告があるウサギES細胞およびそれから樹立したMSC様細胞(rES-MSC)について、生体で損傷した軟骨の再生における効果をはじめて解析した。中動物のウサギを用いる研究では、小動物の試験では解析できない治療効果が検証可能である。rES-MSCはヒト多能性幹細胞での報告と同様に、胚様体を血清培地で接着培養する事により樹立された株を使用した。in vitroで軟骨分化能を評価したところ、rES-MSCは生体の滑膜組織より培養した滑膜由来MSCより高い軟骨分化能を有する事が明らかになり、さらにrES-MSCを軟骨疾患モデルに移植した場合、生体滑膜由来MSCよりも優れた軟骨組織修復能を有する事が明らかになった。これらの結果からMSC様細胞が生体で軟骨再生を起こす事が明らかになり、著者が行なった中動物での多能性幹細胞由来MSC様細胞の有用性がはじめて示された。しかし、この手法をヒトiPS細胞に応用したところ、増殖能や細胞純度が十分なMSC様細胞が樹立可能であったものの、in vitroでの軟骨分化能は生体MSCと比較すると低く、軟骨疾患モデルへの移植試験に用いるには不適当と判断した。ここで用いたヒト多能性幹細胞からのMSC様細胞誘導法は血清培地を用いるだけの簡便な手法であるが、多能性幹細胞の自発的な分化に依存した方法で、再現性に問題がある。そこで一貫性のある結果を得るためには間葉系細胞の発生を考慮した誘導系が必要であると考えた。初期胚の胚様の中でも神経堤細胞はiPS細胞から高い効率で誘導可能であるだけでなく、増幅培養が可能である事が知られていた。この神経堤細胞は間葉系細胞への分化能を有するが、その軟骨分化能は詳細には研究されておらず、軟骨疾患への治療研究も未だ検討されていなかった。そこで著者はヒトiPS細胞から神経堤細胞を経由して誘導したMSC様細胞(iNCMSC)に着目し、その軟骨分化能、軟骨修復能を評価した。iNCMSCはin vitroでの分化誘導で軟骨細胞分化、軟骨特異的細胞外基質の産生を示し、in vitroでコントロールする事で比較的簡便に軟骨組織形成を誘導できる事が明らかになった。この結果は軟骨組織を供給する治療において、神経堤細胞を経由する軟骨細胞誘導法が有用な手法である事を示唆している。その一方で、iNCMSCを分化誘導無く免疫不全ラット膝軟骨欠損へ移植した場合、iNCMSCはin vivo環境では軟骨細胞への分化を示さないことがわかった。対照として移植したヒト骨髄由来MSCは移植後軟骨修復を示したのに対し、神経堤由来MSC様細胞は全く異なる挙動を生体内で示し、in vitroでの軟骨分化能とin vivoでの軟骨修復能が必ずしも相関しないことが明らかになった。

MSC様細胞を用いた軟骨再生治療研究では多能性幹細胞由来MSCが、生体由来MSCより優れた細胞治療になる可能性を示した。軟骨細胞の発生学的な見地から誘導系を構築することが最も再現性高い手法であると考えられるが、中胚葉を介した経路を用いると誘導系が複雑である。それに対し、本研究で着目した神経堤細胞を経由するMSC様細胞誘導法は、簡便で再現性高く軟骨細胞/組織を獲得できる有用な手法である事が明らかになり、軟骨疾患に対する細胞治療に大きく貢献できる細胞源であると考えられた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　千々松　良太　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	石井 優
	副 査	教授	長澤 丘司
	副 査	教授	山下 俊英
	副 査	准教授	村瀬 剛

論文審査の結果の要旨

難治性の軟骨疾患に対する細胞治療では生体から採取した軟骨細胞を移植する治療が行われているが、利用可能な軟骨細胞の量には制限がある。申請者は多能性幹細胞から軟骨細胞を効率よく安定的に誘導するため、神経堤細胞を介する間葉系細胞の誘導法に着目し、それらの軟骨細胞分化、軟骨組織形成の誘導方法を検討した。多能性幹細胞から軟骨細胞および軟骨組織を得る手法として中胚葉を介した経路が先行して研究されているが、プロトコルが複雑で再現性にも問題が指摘されている。申請者の研究では、神経堤細胞を経由する手法でも中胚葉を経由する手法と同等の軟骨細胞誘導、軟骨組織形成が可能であることが明らかになり、さらには簡便で再現性の高いプロトコル作成にも成功した。このことは多能性幹細胞を用いた軟骨疾患治療に新たな知見をもたらすものである。以上のことから、本研究は博士の学位に値すると認める。