

Mini Review

胎盤絨毛由来間葉系細胞の軟骨細胞への分化誘導

張 曉紅，伊倉宏一，高橋賢次，三鶴亜矢子，高橋恒夫

東京大学医科学研究所細胞プロセッシング(CERES)研究部門

Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta

Treatment of defects of articular cartilage remains a problem in orthopedic surgery because cartilage has little self-healing capability. Recently a new approach for repair of articular cartilage has appeared using tissue engineering to create cartilage-like tissues in a three-dimensional scaffolding with autologous chondrocytes. However, the number of autologous chondrocytes for autograft is limited. To solve this problem, mesenchymal stem cells (MSCs) sourced from bone marrow have been investigated as candidates for producing chondrocytes. One of the possible sources may be the placenta thrown away as a medical waste after the collection of cord blood. In this report, we determined the potential of chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of fetal human placenta (PDMSCs). Our results show that PDMSCs include cells which have chondrogenic differentiation potential and may serve as an alternative source of cells for repair of articular cartilage.

Rec.9/6/2004, Acc.11/4/2004, pp102-106

Xiaohong Zhang, Kouichi Igura, Kenji Takahashi, Ayako Mitsuru and Tsuneo A. Takahashi

Division of Cell Processing, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Key words mesenchymal progenitor cell, human placenta, chondrogenic differentiation, articular cartilage repair, tissue engineering

はじめに

近年 組織工学手法により失われた組織や臓器を再生して治療しようとする再生医療研究が急速に進展し、すでに臨床応用がスタートしているものもあり、社会的に大きな注目を集めている。整形外科領域においては、再生医療により自己修復能が乏しい関節軟骨の修復が期待されている。組織工学を用いての組織再生において基本となる要素は、幹細胞、細胞増殖足場、および成長因子といわれる¹⁾。幹細胞を用いての再生医療は最も期待されるものであるが、幹細胞には万能細胞である胚性幹細胞(ES細胞)に加えて、より実現化に近いものとして骨髄間葉系幹細胞などの種々の成体幹細胞がある²⁾。本稿では、再生医療応用を目指して我々が進めているヒト胎盤絨毛由来間葉系細胞を用いた研究、特に軟骨細胞への分化誘導とその臨床応用に向けた研究の概要を紹介する。

軟骨の再生医療

軟骨は無血管系の特殊な結合組織で、構成細胞である軟骨細胞と細胞間基質からなる。細胞間質は無定型なゲル状構造物とそこに埋め込まれた線維成分からなり、線維の種類、量によって軟骨組織は硝子軟骨、弾性軟骨、線維軟骨に分けられる。関節軟骨は硝子軟骨であり、その特徴的な構造から非常に自己治癒能力に乏しい組織である。すなわち関節軟骨は一度損傷を受けると、生体の中では修復されることがあっても正常な硝子軟骨に戻ることはなく、最終的に変形性関節症に進行する。これまで骨髄細胞の移植や骨膜³⁾、軟骨膜⁴⁾、自家軟骨細胞の移植⁵⁾、など様々な治療が試みられてきたが、軟骨修復を可能とする治療法が存在しなかった。最近、自家軟骨細胞をアテロコラーゲンゲル内で培養し、生体外で硝子軟骨細胞様組織を作る方法が開発された。アテロコラーゲンゲルはウシの真皮から精製

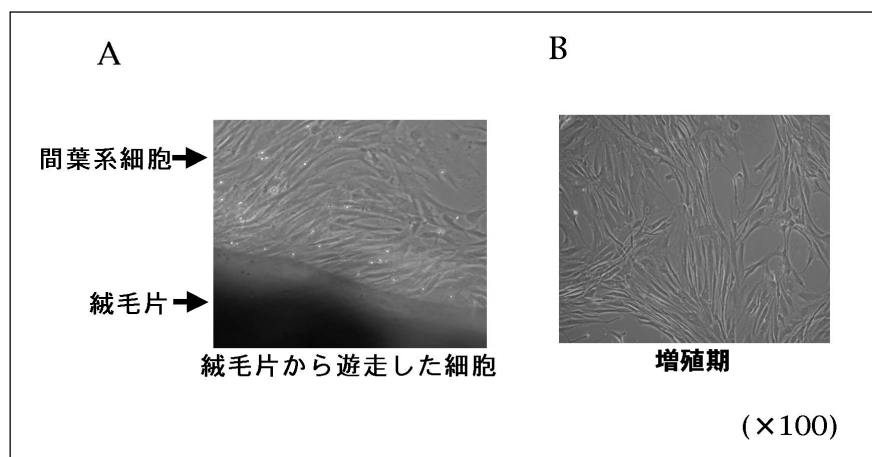


図1

A: Explant培養法により絨毛組織から out-growth した間質細胞。

B: 増殖中ヒト胎盤絨毛由来間質細胞。

されたI型コラーゲンであり,抗原性を有する末端のテロペプチドが取り除かれており,免疫応答が極めて少ないとされる。軟骨欠損修復における術後の短期成績は比較的良好であった^{6,7)}。しかし,この治療法においてもいくつかの問題が存在する。すなわち非荷重部の大腿骨顆の中部,あるいは外側から採取可能な軟骨細胞の数には限界があること,軟骨採取と移植の二度の手術が必要となることなどである⁸⁾。この問題を解決するには,移植細胞として自己の軟骨細胞以外で軟骨細胞分化能を有する細胞,すなわち骨髄間葉系細胞などの成体幹細胞が細胞ソースとして期待される。

ヒト胎盤と再生医療

再生医療の細胞ソースとして,ヒト胚性幹細胞の樹立や,最近の幹細胞研究の飛躍的な進展がみられる一方で,倫理における問題,移植時の免疫反応の回避,安定した供給の可能性,など様々な問題がある。医療廃棄物として処理された胎盤は,倫理面や安全面において,その利用に比較的問題が少ない細胞ソースである。胎盤と臍帯に含まれている臍帯血は豊富に造血幹・前駆細胞を含み,白血病等の治療のために移植されており,大きな実績が得られている。その保存施設,すなわち臍帯血バンクにおいては,移植において必要となる臍帯血の主要組織適合抗原(HLA)を含む多くの情報が得られ管理されている。したがって,臍帯血を採取した後の胎盤から間葉系細胞を採取培養して臨床に用いる時には,必要となる感染症,遺伝性疾患の有無等の情報はすでに保存されている臍帯血から得ることが可能である。臍帯血は組織学的に胎児側の細胞であるので,同じ胎盤絨毛由来間葉系細胞母体側の細胞を含まずに単離できれば,移植が必要な患者と軟骨へ誘導する細胞のHLAを合わせることにより,移植時の免疫反応をさらに回避できることが期待される。我々は研究室に構築した臍

帯血バンクシステムを利用して,臍帯血が提供された胎盤から胎盤絨毛由来間葉細胞を分離,培養,保存するシステムを構築すべく研究を進めている。

胎盤と間葉系細胞

ヒト胎盤は,胎児と母体由来の組織からなり,胎児由来の組織は主に絨毛板と絨毛,母体由来組織は脱落膜から構成される。胎盤は胎生期に胚ないし胎児に酸素や栄養物質を供給し,炭酸ガスや老廃物の排泄を行う機能を果たす器官である。また,各種ホルモンを分泌し内分泌腺として機能している。胎児の出生後,排出された胎盤の重さは約500gであり,毛細血管や結合組織で充たされている。

最近,臍帯血,臍帯の細胞に分化能がある間葉系細胞が存在していることが報告されてきている^{9,10)}。前述のように臍帯血バンクにはHLAを含め胎児側の情報が保管されているので,我々の研究室では出産後に得られる胎盤の中の絨毛組織に着目してきた。これまで我々は絨毛由来の間葉系細胞が,脂肪細胞,骨芽細胞,神経系細胞へ分化することを確認してきた¹¹⁾。胎盤絨毛由来間質細胞から軟骨細胞への分化誘導能と,軟骨細胞の供給源としての可能性について考察する。

ヒト胎盤絨毛由来間質細胞の同定

母親からインフォームドコンセントを得て,正期産後に娩出された胎盤を用いた。胎児側絨毛からの間葉系細胞の単離は,臍帯と羊膜,絨毛板を除去した後,絨毛から切り出した組織片をメスで1~2mm立方の小片にし,その組織を培養皿上に乗せて,培地(DMEM(low glucose)+10%FBS)を添加,植え付けた組織の周辺部から細胞をout-growthさせるExplant培養法で行った。単離した細胞は線維芽細胞様の形態を示し(図1),この細胞を増幅させFACSで細胞表面抗原を解析した。ヒアルロン酸レセプターCD44,T

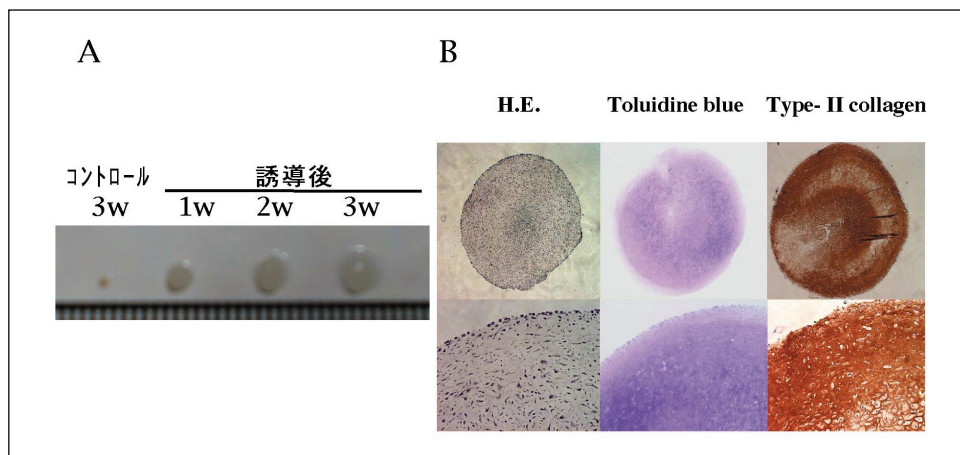


図2

A: 誘導後のペレットの外観。誘導後ペレットのサイズは大きくなり、透明感が増加した。コントロール：誘導因子を除く培地で培養。

B: 誘導3週目のペレットのパラフィン包埋切片をHematoxylin Eosin(H.E.), トルイジンブルー染色, Type-II コラーゲン免疫染色を行った。

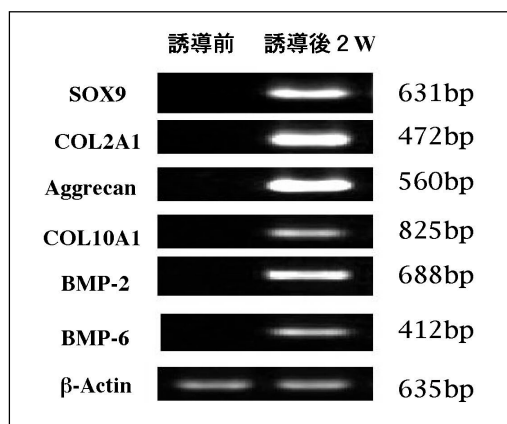


図3 RT-PCRによる誘導前後(2週目)のペレットの軟骨細胞分化に関連する遺伝子の発現

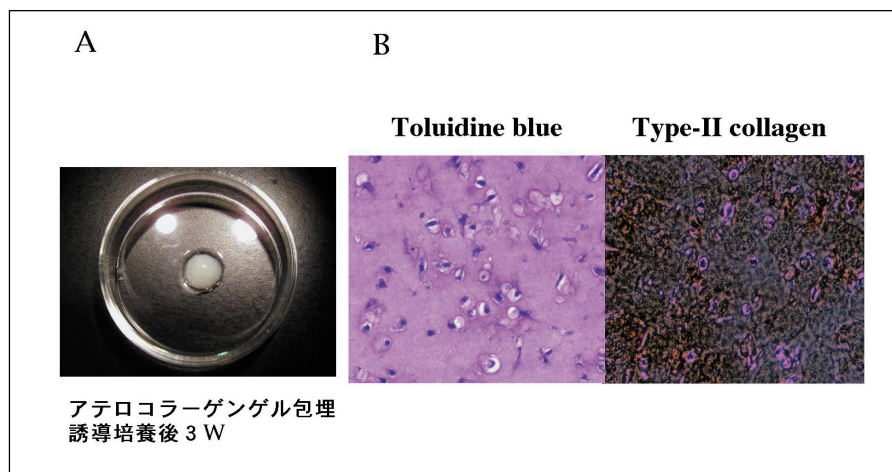


図4 アテロコラーゲンゲル包埋培養

A: アテロコラーゲンゲル中で分化誘導3週目。ゲルは白色化し、一定の硬度を示した。

B: パラフィン包埋切片をトルイジンブルー染色, Type-II コラーゲンに対して免疫染色を行い、陽性を示した。

リンパ球や神経細胞に発現するCD90, 骨髄由来間葉系幹細胞のマーカーであるCD73およびCD105(エンドグリン), ほとんどの細胞に発現しているHLA-class Iを発現していた。一方, 接着分子CD31(PECAM-1), 造血幹細胞マーカーであるCD34やCD133, 白血球の共通抗原であるCD45, アンジオポエチンのレセプターで血管内皮細胞に発現しているTIE-, マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に発現しているHLA-DRは発現していなかった。

ヒト胎盤絨毛由来間質細胞の軟骨細胞への分化誘導

我々はこれまで報告されている骨髄由来間葉系細胞を軟骨細胞へ分化誘導するpellet法を改変して¹²⁾, 胎盤絨毛由来間葉系細胞から軟骨細胞への分化誘導を試みた。胎盤から胎児側の絨毛を切り取り, Explant法で細胞を単離して増幅し, 2×10^5 /ペレットの細胞濃度で, 誘導因子として骨形成誘導因子bone morphogenetic protein-(BMP-2), transforming growth factor- β 3(TGF- β 3), 軟骨細胞外のマトリックスの合成を促進させるdexamethasone, ascorbate-2-phosphate, proline, pyruvate, 血清の代替としてITS+Premix (insulin, transferrin, selenious acid, BSA, l linoleic acid)を添加したDMEM(high-glucose)を用いて3週間培養した。誘導後1週間でペレットは大きさを増し, 透明感が増加した(図2)。誘導3週目のペレットのバラファン包埋切片を作り, 酸性粘液多糖類を検出するトルイジンブルー染色, および軟骨特異的マーカーであるⅡ型コラーゲンで免疫染色した。図2に示されるように, トルイジンブルーで赤紫色に染色され, またⅡ型コラーゲン免疫染色は陽性であった。次に誘導前の細胞と誘導後2週目の細胞からmRNAを抽出し, RT-PCRで誘導前後の遺伝子発現を検討した(図3)。Ⅱ型コラーゲンの転写因子SOX9, Ⅱ型コラーゲン, 軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグリカン, 肥大化軟骨細胞から分泌されるⅡ型コラーゲン, 骨形成因子BMP2, 6の遺伝子の発現がみられた。これらの結果は骨髄間葉系細胞を軟骨細胞へ分化誘導する時にみられる結果と一致している¹³⁾。以上のことから, 胎盤胎児側絨毛由来間葉系細胞には軟骨細胞に分化誘導しうる細胞が存在していると考えられる。

アテロコラーゲンをを用いた軟骨様組織の作成

単層培養で得られた細胞を用いての軟骨細胞移植の欠点は, 移植された細胞が軟骨欠損部位に留まることが難しい点にある。この欠点を補う方法として, 自家軟骨細胞を採取後, アテロコラーゲンゲルに包埋培養し, この生体外で

作成した軟骨様組織を軟骨欠損部位に移植する方法である⁶⁾。アテロコラーゲンは前述のように免疫反応が極めて低いとされ, またすでに形成外科領域では臨床に用いられている安全性の高いコラーゲンである。我々は胎盤胎児側絨毛由来間質細胞がアテロコラーゲンゲル内で培養が可能か, また生体外で軟骨様組織の作製が可能か検討した。絨毛由来間質細胞を上述のように単離, 増殖させ, アテロコラーゲンに包埋し, ペレット誘導培養法と同じ条件で培養した。培養3週後, パラファイン包埋切片を観察したところ, 形態学的に胎盤由来間葉系細胞は軟骨細胞様の円形の三次元構造をとり, また周囲にⅡ型コラーゲンやコンドロイチン硫酸などの細胞外基質を産生しており, 軟骨様組織であることが確認された(図4)。このように胎盤由来間葉系細胞はアテロコラーゲン包埋誘導培養により軟骨様組織に分化誘導しうるということが明らかとなった。

今後の展望

上述のように胎盤胎児側絨毛由来間葉系細胞には軟骨細胞へ分化誘導し得る細胞が存在すること, その細胞はアテロコラーゲンに包埋して誘導培養することにより軟骨様組織を作製できることが確認された。ヒト胎盤は倫理面な問題も少ない上に, 大量の間葉系細胞を得ることが可能であり, また遺伝子導入もしやすい特徴を持ち¹⁴⁾, 間葉系細胞の研究に使いやすい細胞といえる。しかし, 軟骨細胞へ誘導したヒト胎盤由来間葉系細胞を実際に治療に用いるには, 移植されたヒト胎盤由来間葉系細胞の*in vivo*における挙動の詳細を明らかにし, またヒト胎盤由来間葉系細胞はヘテロな細胞集団と考えられることから, 軟骨細胞への分化能を持つ細胞の純化を進めている。

おわりに

21世紀に入って高齢化は深刻な社会問題になってきており, 加齢に伴い, 変形性関節症と関節リウマチに伴う軟骨損傷の患者はますます増加していくと予想され, 軟骨再生医療は整形外科領域において重要な課題である。我々は臍帯血バンクのシステムを利用し, 胎盤絨毛由来間質細胞を用いて, 治療に有効な細胞を安全に, また安定して臨床に供することができるようなシステムを構築することを目的として研究を進めている。

文 献

- 1) Langer R, Vancanti JP: Tissue engineering. Science, 260: 920-926, 1993.
- 2) Blau HM, Brazelton TR, Weiman JW: The evolving concept of a stem cell. Cell, 105: 829-841, 2001.

- 3) Hoikka VEJ, Jaroma HJ, Ritsila VA: Reconstruction of the patellar articulation with periosteal graf. *Acta Orthop Scand*, 61: 36-39, 1990.
- 4) Amiel D, Coutts RD, Abel M, Stewart W, Harwood F, Akeson WH: Rib perichondrial graft for the repair of full-thickness articular-cartilage defect. *J Bone Joint Surg*, 67A: 175-180, 1985.
- 5) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl Med*, 331: 889-895, 1994.
- 6) Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, Kurioka H, Katsube K: Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res*, 50: 138-143, 2000.
- 7) Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Wasa J: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defect of the knee. *J Bone Joint Surg(Br)*, 84: 571-578, 2002.
- 8) 越智光夫, 安達伸生: 組織工学的手法を用いた関節軟骨再生. *再生医療*, 2: 27-31, 2003.
- 9) Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh ST, Chen TH: Isolation of multipotent mesenchymal stem cell from umbilical cord blood. *Blood*, 103: 1669-1675, 2004.
- 10) Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN: Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21: 105-110, 2003.
- 11) Igura K, Zhang XH, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA: Isolation and Characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6: 543-553, 2004.
- 12) Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B: BMP-2 induction and TGF-1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J cell Biochem*, 81: 284-294, 2001.
- 13) Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop D: In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular event during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4397-4402, 2002.
- 14) Zhang XH, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N: Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Microbiol Immunol*, 47(1): 109-116, 2003.