

# 論文内容要旨

Magnetic Targeted Delivery of Induced Pluripotent  
Stem Cells Promotes Articular Cartilage Repair  
(磁性化 iPS 細胞を用いた関節軟骨再生の有用性)

Stem Cells International, in press.

主指導教員：安達 伸生教授  
(医歯薬保健学研究科 整形外科学)  
副指導教員：大段 秀樹教授  
(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)  
副指導教員：久保 忠彦准教授  
(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

古高 慎司

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

関節軟骨組織は自己修復能が乏しく、関節軟骨損傷は治療に苦渋することが多い。現在、臨床では骨髄刺激法や骨軟骨移植法などが行われているが、すべてを硝子軟骨で修復できない。そこで、間葉系幹細胞(MSC)や胚葉性幹細胞(ES細胞)を用いた軟骨再生医療が行われてきているが、MSCは侵襲や細胞数の問題、ES細胞は倫理的問題があるとされ、最近ではiPS細胞を用いた再生医療が盛んになっている。iPS細胞を用いた軟骨再生医療は、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法であり、十分な細胞数を得ることができる。一方で多能性の裏返しである teratoma の形成の問題がある。したがって、iPS細胞から軟骨細胞などへ分化誘導したのちに移植する方法が安全とされている。しかし、ラットのiPS細胞を分化させずにアテロコラーゲンと混合させ、関節軟骨欠損部に限局して移植すると、軟骨は再生され、teratoma 形成しないとの報告がある。一方で我々は磁性化した骨髄間葉系幹細胞を作成し、外磁場を用いて損傷部位へ効率よく細胞を集積させる細胞移植法を確立し、臨床応用している。そこで我々は、磁性化したiPS細胞を作成し、外磁場によって軟骨欠損部に限局的に輸送すると、teratoma の形成なく、軟骨再生可能との仮説を立てた。

本研究の目的は、iPS細胞の磁性化と磁性化iPS細胞の多能性の維持を検討することと、磁性化したiPS細胞を外磁場により損傷部位へ効率よく細胞を集積させ、それにより軟骨再生が可能かどうかを検討することである。

## 【方法】

ヒトiPS細胞の培養系にMRI造影剤である Ferucarbotran を添加し、磁性体を貪食、磁性化率を検討した。外磁場にて集積される磁性化iPS細胞(m-iPSC)と、集積されない非磁性化iPS細胞(non m-iPSC)を分離し、磁性体の封入を確認するために、それぞれ Berlin Blue 染色を行った。さらに、ヌードラットへの皮下移植による teratoma 形成の有無と、分化誘導により胚様体を形成させ、免疫蛍光染色( $\beta$ III-tubulin, desmin, vimentin,  $\alpha$ -fetoprotein)にて三胚葉の形成から多能性を評価した。In vivo として、ヌードラットの大腿骨滑車面に軟骨欠損を作成し、アテロコラーゲングルに包埋した磁性化iPS細胞を外磁場により軟骨欠損部に集積させた。また、コントロール群として磁性化iPS細胞を軟骨欠損部に外磁場を用いずに移植した群と、軟骨欠損部にPBSのみを移植した群を作成した。それぞれの群を4週と6週、8週で屠殺し、組織学的評価を行った。

## 【結果】

Ferucarbotran が 0.25mg Fe/ml、磁気標識する細胞数が  $1.0 \times 10^5$ /35mm dish で磁性化率が 96% と最も高かった。Berlin Blue 染色では、m-iPSC では細胞内に Ferucarbotran が封入されていたが、non m-iPSC には封入されていなかった。ヌードラットの皮下移植では、移植後7週において腫瘍形成が確認され、三胚葉が確認できたことから teratoma との形成を確認した。また、m-iPSC の分化誘導により胚様体が形成され、免疫蛍光染色にて三胚葉の形成を認めた。

m-iPS 細胞を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群では、Safranin O 染色で 2 型コラーゲンの形成を認めたが、その他の 2 群では 2 型コラーゲンの形成はわずかであった。Pineda score は、磁性化 iPS 細胞を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群が、その他の 2 群と比較し、有意に低値であった。また、抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた蛍光免疫染色では、磁性化 iPS 細胞を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群の軟骨細胞が蛍光染色された。

**【考察および結論】**

我々が確立した磁性化法にて iPS 細胞は効率よく磁性化可能であり、多能性も失われなかった。磁性化した iPS 細胞は、外磁場により軟骨欠損部に集積することが可能であり、さらに teratoma の形成なく軟骨再生が可能であった。このことから外磁場を用いた磁性化 iPS 細胞の移植は、軟骨再生に有用な方法と考えられた。