

京都大学	博士（医学）	氏名	阿部 健吾
論文題目	Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect (霊長類モデルにおける同種 iPS 細胞由来軟骨の関節軟骨欠損への生着)		
(論文内容の要旨) 関節軟骨は骨の末端を覆い、関節の動きを滑らかにする潤滑剤の役割を担っている。関節軟骨は乏血行性のため、一度損傷すると自然修復をほとんど期待できない。限局した関節軟骨欠損を放置すると、周囲軟骨にも広範に変性を引き起こし、関節痛・運動能力の低下をきたして変形性関節症に至ることが少なくない。自己複製能と多能性を持つ iPS 細胞からは、品質の均一な移植用の軟骨をほぼ無限に作製できる。同種 iPS 細胞由来軟骨組織を関節軟骨損傷部に移植する治療法が研究開発されているが、その再生機序はよくわかっていない。また、移植軟骨内の軟骨細胞は細胞外マトリックスに囲まれているため、免疫細胞は軟骨細胞に接触しない。そのため、同種移植であっても免疫反応を起こしにくいと考えられるが、その詳細は不詳である。軟骨欠損に対する同種 iPS 細胞由来軟骨移植の有用性と免疫反応を評価するため、ヒト白血球抗原 (HLA) と類似する主要組織適合性複合体 (MHC) をもつ霊長類動物モデルを用いて実験した。EGFP を恒常的に発現する同種カニクイザル iPS 細胞から軟骨を作製し、MHC 不一致のカニクイザルの膝関節軟骨に作った欠損部位に免疫抑制剤を使用せずに移植した。移植後 4 週において、欠損が骨髄に達する骨軟骨欠損では移植物の直下でリンパ球が集簇し免疫反応をきたした。一方、欠損が軟骨内にとどまる軟骨内欠損ではリンパ球の集簇を認めなかった。軟骨内欠損においては、移植物が骨髄に曝露されないため、免疫反応が抑制されたと考えた。この結果を踏まえ、軟骨内欠損モデルに同種サル iPS 細胞由来軟骨移植試験を行った。同種 iPS 細胞由来軟骨を移植した軟骨移植群と、コントロールとして移植を行わない軟骨欠損群を設定し、術後 4 週と 4 ヶ月に犠死し、各群 3 頭ずつ解析した。移植物の生着評価と免疫組織化学解析に加えて、軟骨移植群の同種 iPS 細胞由来軟骨組織と軟骨欠損群の欠損部修復組織を採取し、single cell RNA-sequence (scRNA-seq) 解析を行い、細胞レベルでの発現遺伝子を比較した。軟骨移植群は軟骨欠損群に比べ、修復組織のサフラニン O 染色陽性率が有意に高かった ($p < 0.01$)。軟骨欠損群は I 型コラーゲン陽性の線維軟骨組織で修復された一方で、軟骨移植群は II 型コラーゲン陽性の硝子軟骨組織で修復され、ホスト関節軟骨との癒合を認めた。また、抗 GFP 抗体による免疫染色で修復軟骨組織内の細胞の GFP 発現を認め、移植組織が生着していることを確認した。scRNA-seq 解析では、軟骨移植後組織のほぼ全ての細胞が <i>COL2A1</i> を発現し、 <i>COL1A1</i> を発現しなかった。軟骨欠損群の修復組織では大部分の細胞が <i>COL1A1</i> を発現し、 <i>COL2A1</i> を発現しなかった (2 群間の発現変動解析: <i>COL2A1</i> ($p = 1.33 \times 10^{-56}$)、 <i>COL1A1</i> ($p = 8.89 \times 10^{-21}$))。また、移植後の軟骨表層には PRG4 発現が誘導され、SIK3 による制御を示唆する結果を得た。霊長類モデルにおいて術後 4 ヶ月時点で良質な移植軟骨組織の生着と関節軟骨様構造を認めたことから、同種 iPS 細胞由来軟骨移植は軟骨内欠損に対する新たな治療選択肢となり得ると考える。			

(論文審査の結果の要旨)

関節軟骨は修復能に乏しく、損傷すると自然には治癒しない。本研究では EGFP を恒常的に発現する同種カニクイザル iPS 細胞から軟骨を作製し、MHC 不一致のカニクイザルの膝関節軟骨欠損部位に免疫抑制剤を使用せずに移植した。移植後 4 週において、骨軟骨欠損では移植物の直下でリンパ球が集簇し免疫反応をきたした。一方、移植物が骨髄に曝露されない軟骨内欠損では、免疫反応が抑制された。この結果を踏まえ、軟骨内欠損モデルに同種サル iPS 細胞由来軟骨移植試験を行った。軟骨移植群は移植を行わない軟骨欠損群に比べ、修復組織のサフラニン O 染色陽性率が有意に高かった ($p < 0.01$)。軟骨欠損群は I 型コラーゲン陽性の線維軟骨組織で修復されたが、軟骨移植群は II 型コラーゲン陽性の硝子軟骨組織で修復され、ホスト関節軟骨との癒合を認めた。また、免疫染色で修復軟骨組織内の細胞の EGFP 発現を認め、移植組織が生着していることを確認した。シングルセル RNA シーケンス解析では、軟骨移植後組織のほぼ全ての細胞が *COL2A1* を発現し、*COL1A1* を発現しなかった。移植後の軟骨表層には PRG4 発現が誘導され、SIK3 による制御を示唆する結果を得た。

以上の結果から、同種 iPS 細胞由来軟骨が軟骨内欠損に生着し、関節軟骨として機能することが示唆された。

以上の研究は関節軟骨損傷に対する同種 iPS 細胞由来軟骨移植の有効性と作用機序の解明に貢献し同治療方法の臨床応用、実用化に向けた研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 5 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降