

京都大学	博士（医科学）	氏名	武井 義明
論文題目	Quality assessment tests for tumorigenicity of human iPS cell - derived cartilage (iPS 細胞由来軟骨の造腫瘍性評価手法の確立)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>関節軟骨は再生能力に乏しい組織であり、外傷や変性等で損傷すると自然には治癒せずに、関節機能の障害を引き起こす。人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から作製した軟骨（以下、iPS 細胞由来軟骨）は硝子軟骨様の特性を持ち、その移植は損傷軟骨を再生する治療法の候補の 1 つである。iPS 細胞由来軟骨の作製には、リプログラミングによる iPS 細胞の樹立に加えて、その軟骨への分化誘導に至る長い培養期間を要する。そのため臨床応用を目指す上で、iPS 細胞由来軟骨の造腫瘍性リスクを評価する必要がある。そこで、本研究では iPS 細胞由来軟骨を構成する細胞の増殖特性を解析し、造腫瘍性細胞の混在リスクを評価する手法を確立した。</p> <p>増殖特性の違いによる造腫瘍性細胞の検出感度を確認するために、造腫瘍性を持つことが知られている HeLa 細胞を iPS 細胞由来軟骨に添加した後に、酵素処理により単離回収した細胞の増殖速度を評価した。その結果、150mg の iPS 細胞由来軟骨に 100 細胞の HeLa 細胞を添加した群で、増殖速度の上昇が認められた。他方、150mg の iPS 細胞由来軟骨に HeLa 細胞を添加しなかった群では増殖速度の上昇は認められなかった。この結果から、iPS 細胞由来軟骨に混在し得る造腫瘍性細胞が HeLa 細胞と同程度の増殖速度を示すと仮定した場合、その混在量は 100 細胞/150mg 未満であることが推定された。さらに、iPS 細胞由来軟骨から単離回収した細胞を長期間培養したところ、造腫瘍性を持たない正常二倍体細胞の特徴である増殖停止と細胞老化マーカーの上昇を示すことが確認できた。</p> <p>次に、免疫不全ラットの膝関節に作製した骨軟骨欠損部に HeLa 細胞を移植し、腫瘍形成を認めない細胞数を調べたところ、1 膝あたり 10,000 細胞以下の HeLa 細胞を移植した場合に腫瘍形成を認めなかった。この結果から、免疫不全ラットの膝関節がヒトの膝関節と同等の環境を持つと仮定し、iPS 細胞由来軟骨に混在する造腫瘍性細胞が HeLa 細胞と同程度の腫瘍形成能を有すると仮定した場合、腫瘍形成を認めない造腫瘍性細胞の上限は 1 膝あたり 10,000 細胞であることが示唆された。</p> <p>即ち、iPS 細胞由来軟骨に混在し得る造腫瘍性細胞は 100 細胞/150mg 未満であり、1 膝あたり 10,000 細胞以下の造腫瘍性細胞の移植は腫瘍形成を認めないという結果から、1 膝あたり最大 15g までの iPS 細胞由来軟骨の移植が許容されると考えた。ただし、この造腫瘍性細胞の混在リスク評価の解釈は、「iPS 細胞由来軟骨に含有される造腫瘍性細胞が HeLa 細胞と同程度の増殖速度と腫瘍形成能を示す」、「免疫不全ヌードラットの膝関節がヒトの膝関節と同等の環境」という仮定の下に成立するため、臨床応用において移植する iPS 細胞由来軟骨の量は、他の造腫瘍性リスク評価の結果も併せて総合的に、慎重に決定する必要がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

関節軟骨損傷を再生する新たな治療法として iPS 細胞由来軟骨移植を臨床応用するためには、その造腫瘍性について十分に検証する必要がある。本研究は iPS 細胞由来軟骨移植の造腫瘍性評価のうち、形質転換細胞の混在による腫瘍形成リスクについて検証した。

まず、iPS 細胞由来軟骨に混在し得る形質転換細胞数を、増殖特性解析により評価した。150mg の iPS 細胞由来軟骨に陽性対照として HeLa 細胞を 100 細胞添加した群では単離回収した細胞の増殖速度の上昇を認めたのに対し、HeLa 細胞を非添加の群ではその増殖速度の上昇を認めなかったことから、iPS 細胞由来軟骨に混在し得る形質転換細胞数は 100 細胞/150mg 未満と推定された。

さらに、iPS 細胞由来軟骨から単離回収した細胞を増殖が停止するまで培養し、増殖限界と細胞老化を示す細胞であることを確認した。

他方、免疫不全ラットの膝関節骨軟骨欠損に種々の細胞数の HeLa 細胞を移植する実験を行い、膝関節で腫瘍を形成しない形質転換細胞数は 1 膝あたり最大 10,000 細胞と推定した。

以上の結果から腫瘍形成リスクを検討し、1 膝あたり最大 15g までの iPS 細胞由来軟骨の移植が許容されると考えた。

以上の研究は iPS 細胞由来軟骨移植における腫瘍形成リスクに対して新たな評価手法を提供し、軟骨再生医療の臨床応用の推進に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）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 4 年 10 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、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