

Ⅲ. 分担研究報告

滑膜細胞との共培養法を用いた軟骨細胞シートの作製と その特性評価に関する研究

研究分担者 小久保 舞美 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
杓名 寿治 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
三谷 玄弥 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
海老原 吾郎 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
長井 敏洋 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
李 禎翼 日本学術振興会・外国人特別研究員
東海大学医学部外科学系整形外科学・客員研究員

研究要旨：

我々は細胞シートによる関節軟骨の修復再生を目指しているが、軟骨細胞は乏しい増殖能のため、組織作製まで多くの時間を要する。本研究において、シート作製までの培養期間を短くするべく、ヒト軟骨細胞をヒト滑膜細胞と共培養し、シート作製までの時間を従来の方法と比較した。また、作製した積層化細胞シートの形質発現について、real time-PCR法と免疫染色で確認した。その結果、従来の方法より早く細胞シートを作製することに成功し、積層化細胞シートの形質発現については、関節軟骨形質維持に重要な遺伝子の発現増加を確認するなど、優位な結果を得たので報告する。

A. 研究目的

関節軟骨は滑液で育てられる無血管組織である。また豊富な細胞外基質を持つため、修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足することが原因となり、自然治癒しないことが分かっている。現在、関節軟骨全層欠損においては、人工関節（TKA, UKA）骨切り術（HTO など）除去術（Debridement, 半月板除去、滑膜除去）移植術（骨軟骨移植、細胞移植）など、様々な治療法が行われている。軟骨細胞移植術においては、1994年に Brittberg ら（N Engl J Med 1994）が初めて臨床応用した自家軟骨移植法（Autologous Chondrocyte Transplantation, ACT）が周知であり、ACTによる OA の治療は欧米や韓国では臨床的に用いられている方法である。国内でも非

荷重部の関節軟骨から単離した軟骨細胞や、MSC を用いて組織工学的に軟骨を作製し、骨軟骨全層欠損例には臨床応用が開始されている。しかし、これらは外傷性の骨軟骨損傷や離断性骨軟骨炎であり、軟骨欠損範囲が元々小さな症例に適応とされており、高齢者に発生する広範な軟骨の変性と初期段階の部分欠損を伴う OA の治療には踏み込めていない。現段階において、関節軟骨部分損傷に関して、現状では明確な治療方針がなく、対症療法的（骨髄液誘導、関節内注射、抗炎症薬（内服, NSAID など）に治療されている。我々は温度応答性培養皿を使用することで、組織修復パッチとして積層化軟骨細胞シートを作製し、関節軟骨損傷に対する細胞シートによる関節軟骨の修復再生を目指している。金城らは、温度

応答性培養皿 UpCell®を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨の損傷部分に接着し組織修復作用を有することを動物実験から見出した(BBRC 2006)。単層細胞シートと積層化シートの特性を比較解析したところ、積層化シートに軟骨保護作用の優位な結果を得ている(Eur Cell Mater 2007)。しかしながら、軟骨細胞の乏しい増殖能のため、組織作製まで多くの時間を要する。Vitro で細胞増殖を促進するために、培地への成長因子の添加や、フィーダーセルの利用といった方法が取られている。一方、生体内において、関節軟骨は、滑膜が分泌する関節液から栄養を得ている。

我々は、軟骨細胞と滑膜細胞を共培養することによって、関節内部の様に、軟骨細胞が滑膜細胞から栄養の供給を受け、増殖が促進し、より短期間で確実に軟骨細胞シートを作製することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト軟骨細胞とヒト滑膜細胞

本学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと東海大学病院で ACL 再建術時に得られた 10 例 10 膝 15 歳から 42 歳 (平均 29 歳、男性 6 人、女性 4 人) の軟骨及び、滑膜組織を酵素的に分離し使用した。

軟骨細胞、滑膜細胞の分離と培養

採取した軟骨組織、滑膜組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細分し、0.4% actinase E (Kakenseiyaku Inc.)を入れた Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(D-MEM/F12; Gibco, NY,

USA)で1時間、その後0.016% Collagenase P (Roche, Mannheim, Germany) を含む DMEM/F12 で2時間、スターラーで攪拌しながら 37°C、5%CO₂ 下でインキュベートし、タンパク質分解を行った。その後 cell strainer (BD Falcon™) with a pore size of 100 µm に通し、細胞を遠沈回収した。軟骨細胞は DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) , 4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou Corp., Japan)を加えたもので維持し、滑膜細胞は DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics-antimycotic で維持した。全ての培養は 37°C ,5% CO₂ and 95% air 下で行った。初代培養、継代培養共に 10,000cells/cm² で播種し、P0 to P1 間は7日間、P1 to P2 間は5日間の培養期間で継代し P1,P2 サンプルを作製した。温度応答性インサート内で軟骨細胞のみ培養を行う群 (S 群) Companion Plate, Notched for use with Cell Culture Insert (BD Falcon™)に滑膜細胞を、インサート内に軟骨細胞を播種し、インサートを介して共培養を行う群 (C 群) を作製した。同時に温度応答性インサートを用いて共培養を行い、培養14日目に3層に積層化し、7日間培養した群 (CL 群) を作製した。全ての実験において培養は軟骨細胞の維持と同じ培地、手順で行った。

温度応答性培養皿

細胞シート作製のための培養皿として、Cell Seed 社の温度応答性インサートを使用する。これは、UpCell[®]同様、温度応答性ポリマー(PIPAAm)をインサートのメンブレン表面に固定化したインサートで、これにより器材表面は 32°Cを境に可逆的に疎水性(細胞接着表面)から親水性(細胞遊離表面)に変化する。そのため、トリプシン等、細胞に損害を与える酵素を一切用いることなく、温度を 20°C~25°Cにして 10 分~30 分待つだけで無傷な細胞がシート状に回収することができる。回収した細胞シートは細胞外マトリックスを保持しているため、移植の際に縫合が一切不要である。また、細胞外に発現しているタンパク質なども低損傷のため、細胞シート同士を重ねた 3D 培養も容易である。現在、角膜再生シート、口腔粘膜再生シート、心筋再生シートといった多方面での臨床応用が期待されている器材である。

評価

増殖能、形質発現に関して、それぞれ以下の方法で比較検討した。

- ① S 群、C 群の軟骨細胞増殖度を経時的 (培養 3,5,7,9,11,14 日目) に MTT Assay で計測した。
- ② 播種からサンプリングまで、培養期間を合わせた S 群、C 群、CL 群と単層培養後トリプシン処理をして回収したエンザイム処理細胞群 E 群を加えた 4 群の各々の mRNA を Type2collagen(COL2),SOX9, MMP3,

MMP13, Type1collagen(COL1), Type27collagen(COL27), ADAMTS5, Aggrecan-1(AGC1), TIMP-1, Fibronectin-1(FN1)について評価した。normalize samples として、Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

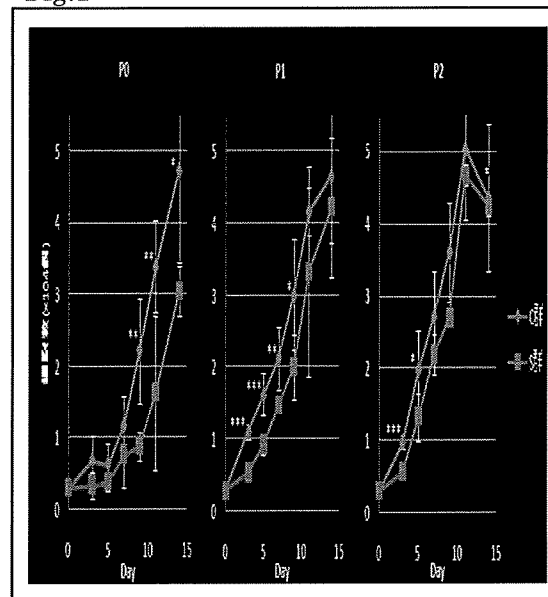
- ③ 積層化軟骨シートの COL2 及び、接着因子 FN1, Integrin α 10(IN α 10)の局在について、免疫染色で確認した。

C. 結果

1. MTT Assay

滑膜細胞との共培養によって、S 群と比較して C 群の細胞増殖度は継代数に関わらず優位に増加し、培養 3 日目で 2.23 倍以上の細胞数を示し、11 日目にプラトーに達した。初期播種量が 1×10^4 cells/cm² の場合、P0 では平均 2 週間、P1、P2 では平均 1 週間より短時間で軟骨細胞シートの作製が可能であった。(Fig.1)

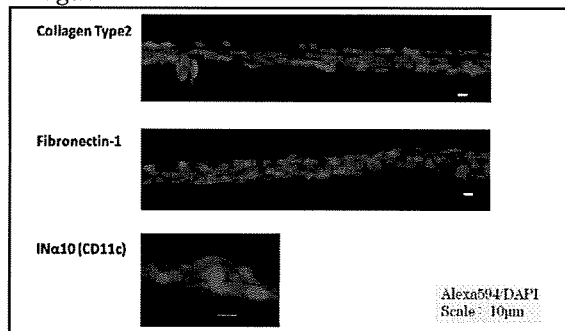
Fig.1



2. 免疫組織染色

CL 群の組織染色において、FN1, IN α 10 の強発現を確認した。(Fig.2)

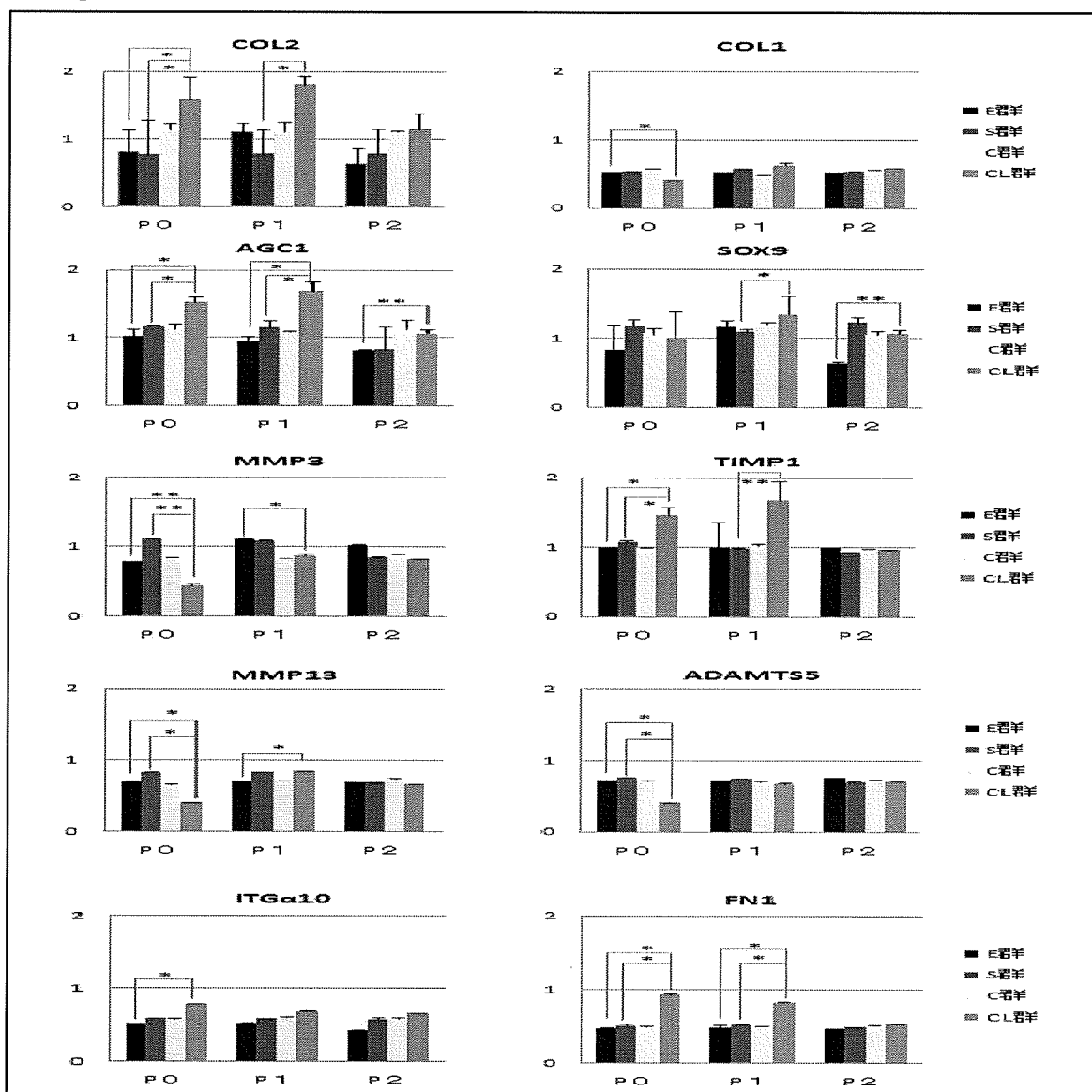
Fig.2



3. Real time PCR

mRNA 値は共培養積層化細胞シート (CL 群) では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1 等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。その差は S 群と比較し、COL2 は平均 1.91 倍、AGC1 は平均 1.35 倍、TIMP1 は 1.37 倍の増加であった。一方 COL1、MMP3、MMP13、ADAMTS5 は 0.8 以下に抑制された。(Fig.3)

Fig.3



D. 考察

正常関節内において、滑膜は、関節液を分泌し、関節軟骨へ栄養を運んでいる。RA、OAの In Vitro モデルとして、炎症性滑膜細胞と正常軟骨細胞の共培養法が用いられており、その細胞相互作用が数多く報告されている。今回我々は、慢性炎症のない滑膜組織から採取された滑膜細胞とインサートを介して共培養を行った。その結果、滑膜細胞との共培養による細胞増殖活性は継代数に関わらず有意に増加し、より短期間で軟骨細胞シートを作製することが可能であった(Fig.1)。これは、栄養供給の良いインサートを使用し、共培養を行うことで、滑膜細胞の軟骨細胞増殖にプラスになる液性因子のみを軟骨細胞に作用させることができ、その結果、軟骨細胞の増殖促進につながったと推察された。

関節軟骨部分損傷では修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足するため自然治癒しないことがわかっている。金城らは温度応答性培養皿アップセルを用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨の損傷部分に接着し組織修復作用を有することを動物実験から見出し(BBRC 2006)、その特性解析において、単層細胞シートと積層化シートの特性を比較解析したところ、積層化シートに軟骨保護作用の優位な結果を得ている(Eur Cell Mater 2007)。今回、共培養積層化細胞シート (CL群) では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。またその差はP0,P1において明らか

であった。CL群ではAGC1, TIMP1の高発現、MMP3, MMP13, ADAMTS5の抑制がP1までは優位に見られたものの、P2においては他の2群と同等の発現となった。しかし、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)。

一般に軟骨細胞はその増殖過程で軟骨固有の性質を失い、繊維芽細胞様に変化する。この変化には、プロテオグリカン産生が低下、分泌コラーゲンの2型から1型への変化を伴う。Yoonらは第3継代までは2型コラーゲンが測定でき、第4継代目以降からは典型的な脱分化の状況となったと報告した。今回、mRNA比較においてCL群において、AGC1, TIMP1といった関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3, MMP13, ADAMTS5といったカタボリックファクターの発現はP1までは優位に抑制された。これは、積層化によって、軟骨細胞に適した培養環境を作り出すことができたことと推察される。これは、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)ことから推察される。しかしながら、P2においては他の2群と有意な差は得られなかった。これは、単層培養で継代を重ねたことにより、いくつかの軟骨細胞が脱分化への傾向を示したと考えられる。この結果はさらに、これからの臨床応用に向け、初期培養細胞が最も適しているということをも示唆している。

パッチとして移植した細胞シートの接着性を免疫染色にて行った結果、シート全体

に強く FN の発現が見られたことから、移植部分に細胞シートが接着し、修復に関与する可能性が示唆された。(Fig.2)

温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養では、液性因子を介した細胞間相互作用により、より早く軟骨細胞シートを作製でき、また積層化によって軟骨分化並びに形質維持に重要な遺伝子の増加を認め、接着性とバリア機能に優れた軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。滑膜細胞との共培養法は増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能にし、軟骨細胞シートを積層化することによって、より軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naoshi O, Masato S, Kiminori U, Mami K, Takayuki B, Kayoko T, Makoto U, Koji K and Joji M. Jyellyfish mucin may have potential disease-modifying effects on osteoarthritis. BMC Biotechnology 2009, 9:98 Epub 2009.December 8.

2. 学会発表

- 1) 小久保舞美、佐藤正人、太田直司、坂

井秀昭、持田讓治. 滑膜細胞との共培養法を用いた短期間での軟骨細胞シートの作製とその特性評価. 第 53 回日本リウマチ学会総会 2009 年 4 月、東京

- 2) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規, 持田讓治. クラゲ由来ムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会 2009 年 4 月、東京
- 3) 小久保舞美、佐藤正人、三谷玄弥、内山善康、繁田明義、沓名寿治、太田直司、海老原吾郎、持田讓治. 同種異関節における細胞相互作用の検討～共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性～. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11 月、横浜
- 4) 佐藤正人, 三谷玄弥, 沓名寿治, 長井敏洋, 海老原吾郎, 太田直司, 小久保舞美, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 持田讓治関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨 (軟骨細胞シート/プレート) の役割. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11 月、横浜
- 5) 長井敏洋, 佐藤正人, 沓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 小久保舞美, 持田讓治抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 (Bevacizumab) による軟骨修復効果. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11 月、横浜
- 6) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規 持田讓治クラゲムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第 24 回日本

整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11
月、横浜

- 7) Kokubo, M; Sato, M; Mitani, G;
Kutsuna, T; Ohta, N; Ebihara, G;
Sakai, H; Mochida, J. Evaluation of
characteristics of chondrocyte sheet
constructed of cultured chondrocytes
using co-culture method with
synovial cells. 56th Annual Meeting
of the Orthopaedic Research Society
2010 年 3 月、ニューオリンズ
- 8) Naoshi Ohta, Masato Sato, Kiminori
Ushida, Mami Kokubo, Takayuki
Baba, Kayoko Taniguchi, Makoto
Urai, Koji Kihira, Joji Mochida.
Jellyfish mucin may have potential
disease modifying effects of
osteoarthritis of the knee. 56th
Annual Meeting of the Orthopaedic
Research Society 2010 年 3 月、ニュー
オリンズ
- 9) 小久保舞美、佐藤正人、三谷玄弥、内
山善康、繁田明義、沓名寿治、太田直
司、海老原吾郎、持田讓治. 同種異関
節由来細胞間共培養法を用いた軟骨細
胞シートの作製とその特性. 第 9 回再
生医療学会 2010 年 3 月、広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

自己細胞処理と安全性評価に関する研究

研究分担者 加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授
研究協力者 安藤 潔 東海大学医学部内科学系血液内科学・教授
宮地 勇人 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学・教授
中村 嘉彦 東海大学医学部附属病院細胞移植再生医療科・室長補佐
佐藤 忠之 東海大学伊勢原校舎教育・研究支援センター・技師補

研究要旨：

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、学内のプロジェクト研究チームによる総合的な研究体制を構築し、細胞シートをGMPに準拠して体外で作製するために必要な設備面、技術面、人員面での検討を行った。

ヒト細胞シートの安全性評価として、培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、培養期間を超えて培養した細胞について、細胞形態観察、染色体異常の有無、造腫瘍性の確認試験等を検討した。

CPCにおける試験製造並びに特性評価として、CPCで作製した培養軟骨細胞シートに関して、性状確認試験、物理的構造確認試験、細胞数測定試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマDNA定量、ウィルス否定試験、無菌性試験等の評価系を構築した。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、学内のプロジェクト研究チームによる総合的な研究体制を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 学内の評価体制

東海大学においては医学部附属病院の細胞移植再生医療科にセルプロセッシング室（室長：加藤俊一）、安全性評価室（室長：安藤 潔）をおき、臨床検査科（科長：宮地勇人）、教育・研究支援センターなどの協力のもと、再生医療の臨床応用を実施する体制が整備されている。

2. 安全性評価

培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、培養期間を超えて培養した細胞について、細胞形態観察、染色体異常の有無、造腫瘍性の確認試験等を検討した。

3. CPCにおける試験製造並びに特性評価

① 性状確認試験

細胞表面マーカーにより培養前後における細胞の性状の変化について確認試験の系を立ち上げた。

② 物理的構造確認試験

細胞シートの物理的構造確認試験の系を立ち上げた。

③ 細胞数測定試験

培養前後における細胞数の測定の系を立ち上げた。

④ エンドトキシン試験

培養上清中のエンドトキシンを日本薬局方に準じて測定する系を立ち上げた。

⑤ マイコプラズマ DNA 定量

培養細胞中のマイコプラズマをリアルタイム PCR 法にて定量的に測定する系を立ち上げた。

⑥ ウイルス否定試験

培養細胞中の諸種のウイルス（HBV、HCV、HIV、HTLV-1）についてリアルタイム PCR 法にて測定する系を立ち上げた。

⑦ 無菌性試験

培養上清を用いて細菌培養を行い、無菌性試験を行う系を立ち上げた。

4. 資料と試料の保管

一連の作業工程の資料についてはそれぞれの担当者により作業記録が作成され、作業工程毎に定められた試料の保存も実施した。

C. 結果

1. 安全性評価

試験製造検討事項として、目的外形質転換の可能性を否定するため、NOGマウスまたはヌードマウスの皮下へ培養細胞を移植し造腫瘍性試験が可能であることが判明した。また、核型試験として G-Band 解析、M-Fisf 解析の実施が可能であることが判明した。

2. CPC における試験製造並びに特性評価

① 性状確認試験

培養後における細胞の関節軟骨としての

性状を保持していることを、軟骨細胞外基質の特異的マーカーとして COL2, AGC, 転写因子として SOX9、細胞シートの接着因子として FN, ITG a10 の発現により確認した。

② 物理的構造確認試験

顕微鏡検査で細胞シートが一様に作製され、低温処理によって温度応答性培養皿から容易に剥離し、積層化細胞シートの作製工程に問題ないことを確認した。

③ 細胞数測定試験

細胞シート 1 枚あたりに含有される細胞数を確認し、細胞シート形成に十分な量であることを確認した。

④ エンドトキシン試験

培養上清中のエンドトキシン測定が可能であることが確認された。

⑤ マイコプラズマ DNA 定量

マイコプラズマのリアルタイム PCR 法による定量的測定が可能で、培養法などと相関があることが確認された。

⑥ ウイルス否定試験

培養細胞中から諸種のウイルス（HBV、HCV、HIV、HTLV-1）の測定が可能であることが示された。

⑦ 無菌性試験

培養上清の細菌培養により無菌性試験を行えることが示された。

3. 資料と試料の保管

一連の作業工程の作業記録の作成や、作業工程毎に定められた試料の保存を GMP 準拠で行うことには膨大な時間と労力が必要であった。

D. 結論

東海大学の CPC において関節軟骨細胞シートシートの作製を GMP 基準に準じて実施することが可能であることが確認された。しかし、GMP に準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

E. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

F. 研究発表

1. 著書

- 1) 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針。「腎移植のすべて」高橋公太編集、2009,pp506-507.
- 2) 加藤俊一、矢部普正編。「小児の造血細胞移植」、医薬ジャーナル社、東京、2010、pp1-107.

2. 論文発表

- 1) Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients

with acute leukemia. Blood. 2009 Feb 19;113(8):1631-8.

- 2) Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. Int J Hematol. 2009 Apr;89(3):374-82.
- 3) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Apr;15(4):439-46.
- 4) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. Bone Marrow Transplant. 2009 May 11.

- 5) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. Bone Marrow Transplant. 2009 Sep 21.
 - 6) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. Pediatr Blood Cancer. 2010 Feb;54(2):299-306.
 - 7) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Dec;15(12):1603-8. Epub 2009 Oct 4.
 - 8) 田淵 健、気賀沢寿人、吉見礼美、熱田由子、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊地 陽、小林良二、土屋 滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺 新、加藤俊一 小児期造血幹細胞移植全国集計（1983～2005）—細胞源ドナー別移植成績 日本小児血液学会雑誌 2009;23: 142-154.
 - 9) 加藤俊一. 小児期に造血幹細胞移植を受けた長期生存者におけるQOL評価法ガイドライン作成に向けて. 日本小児血液学会雑誌,2009;23:161-164.
 - 10) 渡辺 新、掛江直子、坂本なほ子、加藤俊一. 同胞小児ドナーになることの正確な理解に役立つ年齢群別パンフレットの作成. 日本小児血液学会雑誌,2009;23:155-160.
- 3.学会発表
- 1) Takakura H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Yanagimachi N, Yabe M, Yabe H, Tanaka A, Kato S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Inborn Errors in Metabolism (IEM) - A single institute experiences – The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. 2009 Sep.26-27, Nagoya.
 - 2) 加藤俊一. 多様化する造血細胞移植. 第51回日本小児血液学会総会. 2009年11月、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許：第 4437335 号

名称：「ヒト未分化造血幹細胞およびそ
の分離方法ならびに分離装置」

発明者：加藤俊一、中村嘉彦

取得日：平成 22 年 1 月 15 日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

同種細胞処理と安全性評価に関する研究

研究分担者 阿久津英憲 国立成育医療センター研究所生殖・細胞医療研究部 室長
研究協力者 田中麻衣子 東海大医学部医学科 整形外科学 研究員

研究要旨：細胞シートによる関節軟骨修復・再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、特に同種細胞ソースの性質評価に関する解析を行った。

同種ヒト細胞シートの安全性評価として、若年ヒト軟骨、滑膜細胞等の初代細胞株の開発研究を行い、初期形質を評価するとともに体外培養環境下での形質転換やゲノム安定性を評価するための基盤解析系を構築する。本年度は、多指症検体を用いて関節軟骨の細胞ソースとしての検討を行うとともに、希少組織である滑膜組織由来細胞の樹立システムの構築をおこなった。

A. 研究目的

研究代表者である佐藤らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、特に同種細胞移植のための技術開発研究を目的とし、特に細胞ソースの選定と体外培養系での細胞性質とゲノム安定性を含め総合的に軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するため同種移植細胞ツールを開発していく。

B. 研究方法

分担研究者らは国立成育医療センター・倫理委員会（受付番号 25, 26, 27, 49, 55, 全て平成 15 年、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認）にて、承認を受けたヒト組織（成育バイオリソース：臍帯、羊膜、胎盤、子宮内膜、指、眼球、軟骨等）の間葉系細胞を単離、培養を行っている。それらの遺伝子発現プロファイリングなど細胞の規格化に関与する研究成果の蓄積は既に行われ、世界的に

見ても希少な小児や周産期組織に由来する膨大な質の高い細胞ライブラリーが“成育バイオリソース”として整備されており、極めて重要なバイオリソースを有している。

1. 細胞ソースの開発研究

当センターでは、倫理的手続きを経たヒト細胞リソースを保有しており、若年者の軟骨組織に由来した細胞を得られる。特に、先天性異常の多指症の治療により採取可能な関節部組織を対象に軟骨及び滑膜組織由来細胞株の樹立を行う。得られた組織を解剖学的及び組織学的に選択採取し各組織で無菌的に細断処置し初期培地（10%FBS in DMEM）で 37°C, 5% CO₂ in air 環境下で培養を行う。今年度は、組織選択及び安定的な初期培養設定を構築する。

ヒト細胞に対する倫理面での配慮

国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及

び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

国立成育医療センター倫理審査委員会：
<http://www.ncchd.go.jp/rinri/rinri.htm>

C. 結果

1. 細胞ソースの開発研究

先天性異常の多指症の治療により採取可能な関節部組織は比較的関節軟骨組織を保存しているケースが確認できた。特に、関節軟骨部から初代細胞株がえられており、安定的に若年者の軟骨組織に由来した細胞を得られる可能性が示唆された。しかし、関節部の滑膜組織は顕微鏡的観察により認められる微小な組織であり、滑膜組織由来細胞株の樹立のためには技術的な更なる検討が必要であることが判明した。若年者の関節部組織由来細胞は分化能や増殖性から同種移植用の細胞ソースで非常に重要であることから更なる開発研究を進め、安全、安心な再生医療を目指し本研究を進めていく。

D. 結論

同種移植用の細胞シートソースとして若年性の多指症由来組織は非常に有用であることが示唆された。今後は、移植に必要な細胞数や性質を保持する細胞を得るために安定的な培養環境を整備し、特に滑膜由来組織細胞株の獲得を目指し同種細胞移植細胞シートソース開発研究を展開していく。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) Mhendra Rao、(訳) 三浦巧、阿久津英憲:「アメリカにおける細胞治療システムの課題」医学のあゆみ, 229(9):679-680, 2009.
- 2) 阿久津英憲、梅澤明弘:第5章 細胞周辺環境のための培養技術 6. フィーダーレイヤー, 遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術, 田畑泰彦(編集)メディカルドゥ, 354-357, 2009.
- 3) 阿久津英憲、佐藤星子:「生殖とiPS細胞」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 16(3):241-250, 2009.
- 4) 阿久津英憲、近澤奈々、梅澤明弘:「クローン胚・ES細胞と生殖医療」Pharma Medica, 27(5):57-61, 2009.
- 5) 阿久津英憲、梅澤明弘:第3章 病態解明 1. ES細胞の病態解明への応用,

幹細胞の分化誘導と応用・ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-, エヌ・ティー・エス, 413-423, 2009.

2. 論文発表

- 1) Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res.* 2009; 315(16):2727-2740.
- 2) Ito C, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T, Toshimori K. Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum Reprod.* 2009; 24(10):2588-2595.
- 3) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2009; 19(3):480-493.
- 4) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells.* 2009; 14(12):1395-404.
- 5) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* 2009; 5(5):491-503.
- 6) Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation.* 2009; 78(2-3):137-42.

- 7) 阿久津英憲、梅澤明弘：「ヒト由来フィーダー細胞の確立」再生医療 日本再生医療学会雑誌, 8(2):57-62, 2009.

2.学会発表

- 1) 阿久津英憲：「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第 8 回日本再生医療学会総会シンポジウム 35～69
- 2) 阿久津英憲：「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月 23～26 日, 2009.
- 3) 阿久津英憲：「Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low temperature medical experiments」第 36 回日本低温医学会総会・学術集会シンポジウム 2, 11 月 27～29 日, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による経時的評価 に関する研究

研究分担者 瀬尾 憲正 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・教授
研究協力者 村井 邦彦 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・非常勤講師

研究要旨：

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うために、BLI (Bioluminescence Imaging)法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、luciferase 遺伝子を発現する細胞シートを作製・移植し、更に関節内に移植された細胞シートに最適化された評価方法の検討を行った。

BLI 法では luciferin-luciferase 反応を利用するため基質となる luciferin を十分にグラフトに届ける必要があるが、関節内に細胞シートを移植した場合に最適な luciferin の投与経路・投与量は明らかにされていない。このため、luciferase Tg ラットから細胞シートを作製して同種同系 Lewis ラットに移植し、静脈内・皮下・関節内投与の測定結果を同一個体中で経時的に比較することにより、細胞シートに対する最適な評価系を決定した。

さらにこの評価系を用いて、移植された細胞シートの長期的な評価を開始した。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートの移植後に動物を生かしたまま経時的にグラフトの動態を評価するために、経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、動物モデルにおける BLI (Bioluminescence Imaging)法による評価系を決定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 研究チームの構成

東海大学においては研究統括者の佐藤正人らが自治医科大学から提供された luciferase Tg ラット組織より細胞シートを作製し、自治医科大学にて移植を行った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（瀬尾憲正教授）らが luciferase

Tg ラットより採取した細胞シートの材料を提供した。また、関節内に移植された細胞シートに対する BLI 法による最適な評価系を決定した。

2. 細胞シートの作製・移植

自治医科大学において先端医療技術開発センター先端治療開発部門（小林英司教授）より同部門で開発した luciferase Tg Lewis ラットの提供を受け、ラットを犠牲死して膝関節および股関節より軟骨・滑膜組織を採取し、東海大学にて酵素処理後に発光する細胞シートを作製した。自治医科大学でレシピエントとして野生型 Lewis ラットに膝軟骨損傷モデルを作製し、細胞シートを同種同系移植した。

3. BLI 法による評価法の決定

静脈内・皮下・膝関節内に投与量の異なる luciferin を投与した場合の BLI の測定結

果を同一個体の中で比較することにより、luciferin の至適投与量と測定値のピークタイム・ばらつきなどの投与方法の特性を検討した。これにより最適な評価法を決定した。

4. グラフトの長期的評価の開始

移植したグラフトを対象に BLI 法を定期的に用いることで細胞シートの長期的な動態評価を開始した。

C. 結果

1. 細胞シートの作製・移植

今回のグラフトは luciferase Tg ラット由来であったが、温度応答性培養皿 UpCell を用いて 6 ウェルプレートにて軟骨・滑膜それぞれ 6 枚ずつの細胞シートを作製することができた。これらは移植に用いることのできる品質であり、luciferin を加えることで全てのシートが発光することが確認された。

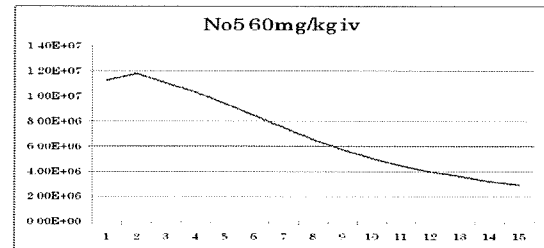
2. BLI 法による評価法の決定

① 静脈内投与

正確に静脈内に投与された場合のピークタイムは 3～4 分であり、1 匹ずつ素早く測定する必要があることが確認された。今回は陰茎静脈を投与経路に用いて単回投与を行ったが、注入時に針の先端が動くことにより薬液の一部が血管外に注入されるケースがあり、この場合はピークが二相性となり luciferin の投与量が不足した。尾静脈などへの血管確保も検討すべきである。

Fig. 1: iv 成功例

縦軸: Luminescence intensity (photons/sec · cm²)

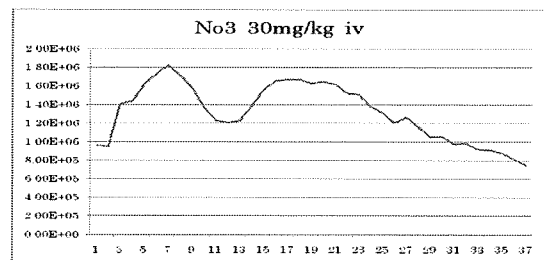


横軸: Time

(min)

Fig. 2: iv 失敗例

縦軸: Luminescence intensity (photons/sec · cm²)



横軸: Time

(min)

② 皮下投与

Luciferin の皮下投与時の bioavailability は約 13% であることと血流豊富な組織での皮下投与量は静脈内投与量の 5 倍と設定している文献があることから、本研究での皮下投与量を静脈内投与量の 5 倍の 150mg/kg, 300mg/kg と設定した結果、150mg/kg は不足であることが示された。発光のピークタイムは 25 分前後であった。

Fig. 3: 移植された細胞シートの発光 (day 4)

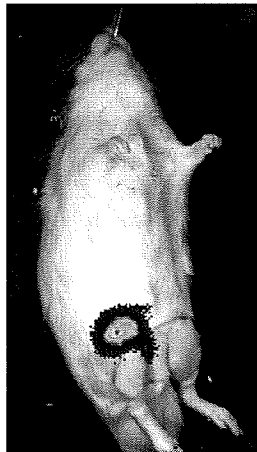
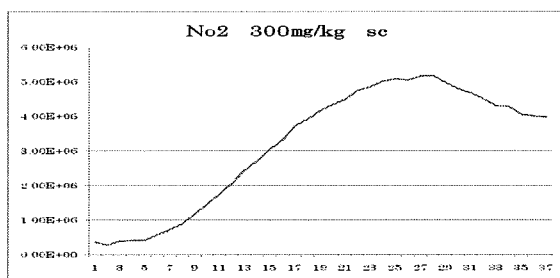


Fig. 4: sc 成功例

縦軸: Luminescence intensity (photons/sec · cm²)

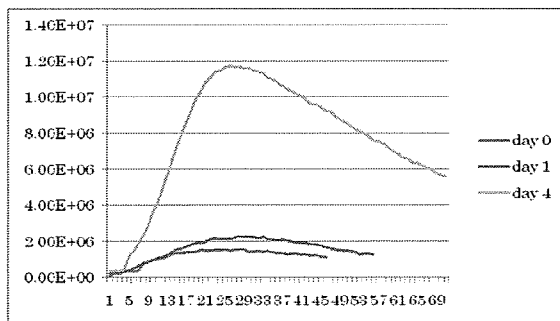


横軸: Time

(min)

Fig. 5: 移植後の細胞シートの動態

縦軸: Luminescence intensity (photons/sec · cm²)



横軸: Time

(min)

③関節内投与

移植直後は投与した薬液が縫合部から

漏れ出すことが確認されたため最初の7日間は関節内投与を行わないこととした。しかし、縫合部が治癒したのちは関節内投与が最も luciferin の使用量を少なく抑えることができるため、皮下投与との相関性は引き続きの検討課題である。

④移植後の細胞シートの動態

Fig. 5 に示す通り、同じ luciferin の投与条件において、luminescence intensity が増加傾向を示した。このことは細胞シートが生着し、細胞の viability が活性化したことを裏付けるものと考えられる。

D. 結論

温度応答性培養皿 UpCell を用いて luciferase Tg ラット由来の発光する細胞シートを作製することができた。luciferase の投与経路はラットでは皮下投与が優れており、最適な投与量を 300mg/kg と決定した。しかし、luciferin 試薬は 1g あたり約 15 万円と高価であるためコスト上の問題があり、ウサギなどの中動物に用いるには静脈内投与や関節内投与が最適である可能性がある。

移植したグラフトは生着しつつあると考えられることから、引き続き長期的に動態を評価しているところである。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。