

図1 細胞シート工学を応用した関節軟骨修復・再生

われわれは温度応答性培養皿を用いて、酵素を用いずに非侵襲的に整形外科領域の種々の細胞をシート状に回収し、さらに積層化にも成功している。細胞シートは、優れた接着性とバリア機能を有し、損傷部からのプロテオグリカン流出を阻止し、関節液中の破壊因子から損傷部を保護し、成長因子の持続的供給源としても機能するため、良好な修復再生効果が期待できる。

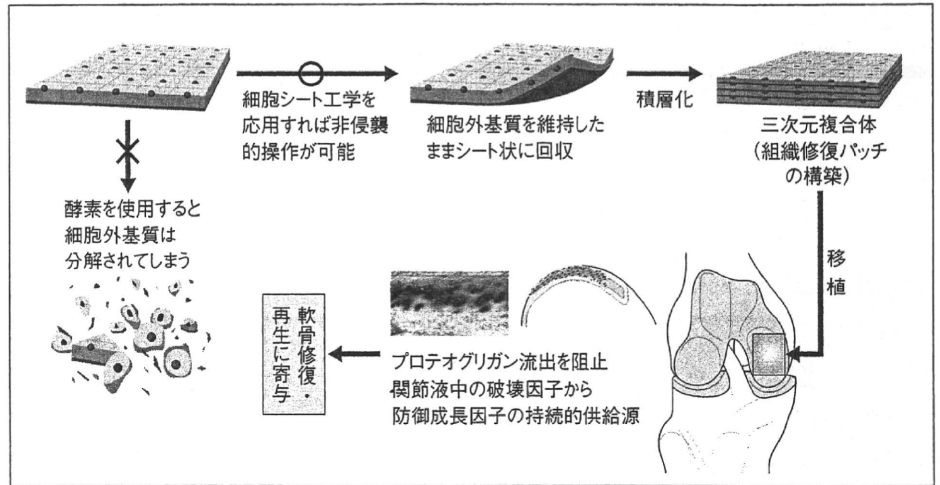
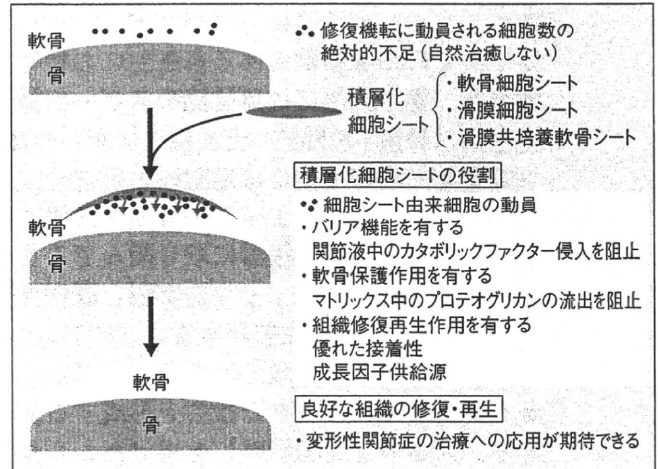
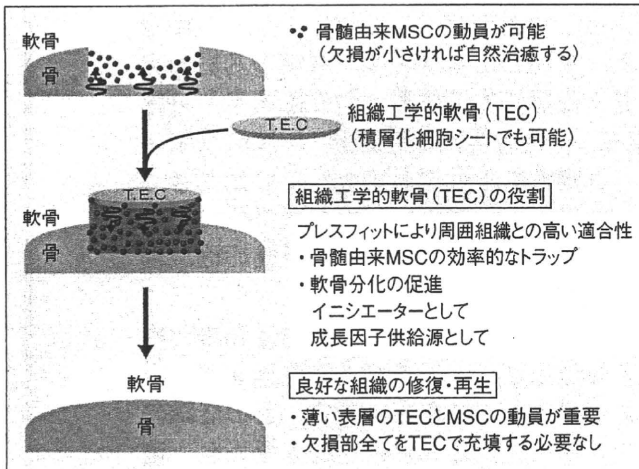


図2 関節軟骨損傷の修復・再生機序

A 関節軟骨全層欠損の修復・再生機序。軟骨全層欠損の場合、表層部分のみを組織工学的に作製した薄い軟骨で置換さえすれば、良好な修復・再生が生じることを動物実験で確認し、報告してきた。そして、移植する組織工学的軟骨をさらに薄くして行って、3層の積層化軟骨細胞シートでも軟骨再生が可能であることを、ウサギとミニブタの動物実験で確認した。

B 関節軟骨部分損傷の修復・再生機序。軟骨部分損傷に治療効果があることが確認されたのは、世界で初めてであり、変形性関節症のように2種類の軟骨損傷、すなわち軟骨全層欠損と部分損傷が常に混在する疾患に対する治療効果が期待できる。



tion of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. Spine 28 : 548-553, 2003

- Sato M et al : Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold). Med Biol Eng Comput 41 : 365-371, 2003
- Kaneshiro N et al : Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. Biochem Biophys Res Commun 349 : 723-731, 2006
- Kaneshiro N et al : Cultured articular chondrocyte sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. Eur Cells and Mater 13 : 87-92, 2007

- Nagai T et al : Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. Tissue Eng Part A 14 : 1183-1193, 2008
- Nagai T et al : Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. Tissue Eng Part A 14 : 1225-1235, 2008
- Sato M et al : Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. Med Biol Eng Comput 46 : 735-743, 2008
- Mitani G et al : The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. BMC Biotechnol 9 : 17, 2009
- Sato M : Cell sheet technologies for cartilage repair. Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues, Woodhead Publishing, 251-265, 2010

関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発

李 禎 翼^{1,2)} 佐藤 正 人¹⁾ 三 谷 玄 弥¹⁾
持 田 讓 治¹⁾

抄録：自家軟骨細胞移植法は骨軟骨損傷の治療に臨床応用されているが、高齢者の広範囲病変には適応困難であることや体外培養期間が長いなど、解決すべき点がある。日本白色家兎を用いて採集量に制限のある軟骨細胞に高度な増殖能と軟骨細胞への分化能を保有する滑膜細胞を加えたスフェロイド細胞移植体を新規に作製した。本法により短期間のうちに多量の移植体の準備が可能となり、臨床へのより効率的な応用が期待できる。

* The development of cellular spheroids using synovial cells and chondrocytes for the autologous chondrocyte implantation

Key words : autologous chondrocyte implantation, ACI 自家軟骨細胞移植法, synovial cells 滑膜細胞, cellular spheroids 細胞スフェロイド

はじめに

1994年 Brittberg らが発表した¹⁾ 自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation, ACI) 法は、すでに全世界で2万例以上の骨軟骨損傷患者に臨床応用された実績がある。しかし、患者の正常軟骨部から採取できる移植用の関節軟骨細胞の採集量には制限があり、広範囲の病変は適用外で、さらに培養による準備期間が約4週間と長いなど、なお改善すべき点がある。

また、高齢者の場合、再生能が乏しい軟骨細胞 (AC) は培養増殖能が低く、広範囲な病変の治療は困難であった。一方、高い増殖能をもつ滑膜由来細胞 (SY) には間葉系幹細胞 (以下 MSC) の

存在と軟骨細胞への分化能が報告されている³⁾。

今回、われわれは、浮遊状態で AC と SY からなる混合細胞を振とう培養する新たな培養法を開発し、多量の細胞移植体を短期間で準備することを可能とした。本研究の目的は、この軟骨滑膜混合細胞移植体の性状を経時的に観察、分析し、新規 ACI 法としての応用可能性を明らかにすることである。

材料および方法

本研究は東海大学医学部動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

1. 軟骨細胞滑膜由来細胞の分離・培養

ウサギ (n=4, Japanese White Rabbit, 1 kg ±

1) 東海大学医学部外科学系整形外科学 2) 建国大学医生命科学研究院医生命科学科 [連絡先; 〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143, 東海大学医学部外科学系整形外科学, 佐藤正人, TEL 0463-93-1121 (内線, 2320)] Jeong Ik LEE, Masato SATO, Genya MITANI and Joji MOCHIDA

200 g, 雌) 膝関節から採取した細胞の培養は Mitani らの方法⁸⁾ に準じて行った。ウサギの膝から軟骨組織および滑膜組織を採集し、細切した組織は 1.25% トリプシン (Invitrogen Co.) および、0.5% コラゲナーゼ I (collagenase class I: Worthington, Biochemical Co.) 溶液により 2 段階消化して単離した。各細胞は、DMEM/F-12 培地 (Gibco. Co.) で非動化した 10% の Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone), 1% の抗菌剤 / 抗真菌剤混合物 (Anti-Anti: Invitrogen Co.) および 50 $\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸 (ビタミン C 注 10%PB, Nissin Pharma Inc.) で調製された増殖用培地を用いて polystyrene 制培養皿 (表面面積; 500 cm^2 , Corning) にて各細胞は $2.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。培地交換は週 2 回行い、90% のコンフルエントに達した段階で継代培養を実施した。各継代過程において、SY と AC の培養日数あたり継代増殖率を算出した [(回収時細胞数 / 播種時細胞数) / 培養日数]。統計学的検討は、Student's t 検定を用いて $P < 0.05$ を有意差ありとして検定した。

2. 蛍光試薬による標識および細胞スフェロイドの作製

蛍光顕微鏡にて経時的にスフェロイドの形態を追跡するため PKH 染色キット (Sigma Co.) を用いて、AC は赤色蛍光 (MINI26), SY は緑色蛍光 (MINI67) で蛍光標識した。

その後、増殖用培地中で AC と SY の含有条件を変えて、細胞数の和が $6.0 \times 10^6 / 5 \text{ ml}$ となるように調製した (図 1a~c)。

直径 60 mm の細胞非接着性培養皿 (Hydro-Cell™, CellSeed Co.) に各細胞懸濁液を入れて、振とう培養用シェーカー (モデル名: ダブルシェーカー NR-3, TAITEK Co.) にて平面円形の流動 (70 rpm) を与えながら振とう培養によるスフェロイド培養を行い、37°C, 5%CO₂ の条件下のインキュベーターの中で 3~5 日間 (125 時間) 培養を維持した。

3. 細胞スフェロイドの性状分析

各条件の細胞材料懸濁液からなる細胞スフェロイドの形成過程を、蛍光顕微鏡 (IX-70 型倒立顕微鏡, Olympus) を用いて経時的に観察した。

細胞スフェロイドは、4% のパラホルムアルデヒド溶液とスクロース溶液に浸漬した後、凍結切片とした。作製した切片は hematoxylin and eosin (H & E) 染色, toluidine blue 染色および safranin O 染色を行い、さらに、Collagen type 1, 2 に対する抗体 (Anti-hCL (I), Anti-hCL (II), Daiichi Fine Chemical Co.) と ABC (avidin-biotin peroxidase complex, DAKO Japan Co.) 法による酵素抗体法にて免疫組織化学的染色を行って鏡検した。

分子生物学的な検討 (RT-PCR) として、検査資料 (n=4) として上記の各条件の細胞材料懸濁液 (スフェロイド培養開始時の day 0) と 3 日間スフェロイド培養して回収した細胞スフェロイド (day 3) を、Dnase digestion と spin column purification 過程を含む SV Total RNA Isolation System kit (Promega) を用いて RNA を抽出した。

各 primer (図 2b) を用いて抽出した各 RNA は TaqManRT reagents (Applied Biosystems) と random-hexamer によって cDNA 化した。内在性のコントロール (internal standard) として 18S ribosomal RNA (Applied Biosystems) を用いた。Taq-Man universal PCR master Mix (Applied Biosystems) と ABI SDS7300 (40 cycles under standard thermal conditions; Applied Biosystems) によって反応させ、day 0 と day 3 において各遺伝子の RNA レベルの発現を 3% NuSieve 3:1 アガーロスゲル (Lonza) にて電気泳動し、ethidium bromide で染色した後、densitograph system (ATTO Biotechnologies) によって、各増幅バンドを撮影した。

結果

1. 培養日数あたり継代増殖率

ウサギ 1 膝から AC は平均 850.92×10^4 個, SY は平均 593.32×10^4 個が回収された。

12~13 日間の細胞増殖の継代培養期間中に AC は 2 回, SY は最大 4 回まで継代ができ、細胞スフェロイドの作製には、第 3 継代目の AC と第 5 継代目の SY を用いた。培養日数あたり平均継代増殖率は、AC は 0.51 ± 0.11 , SY は 0.96 ± 0.29 であり、有意に SY で高かった (図 2a)。

2. 細胞スフェロイドの作製および分析

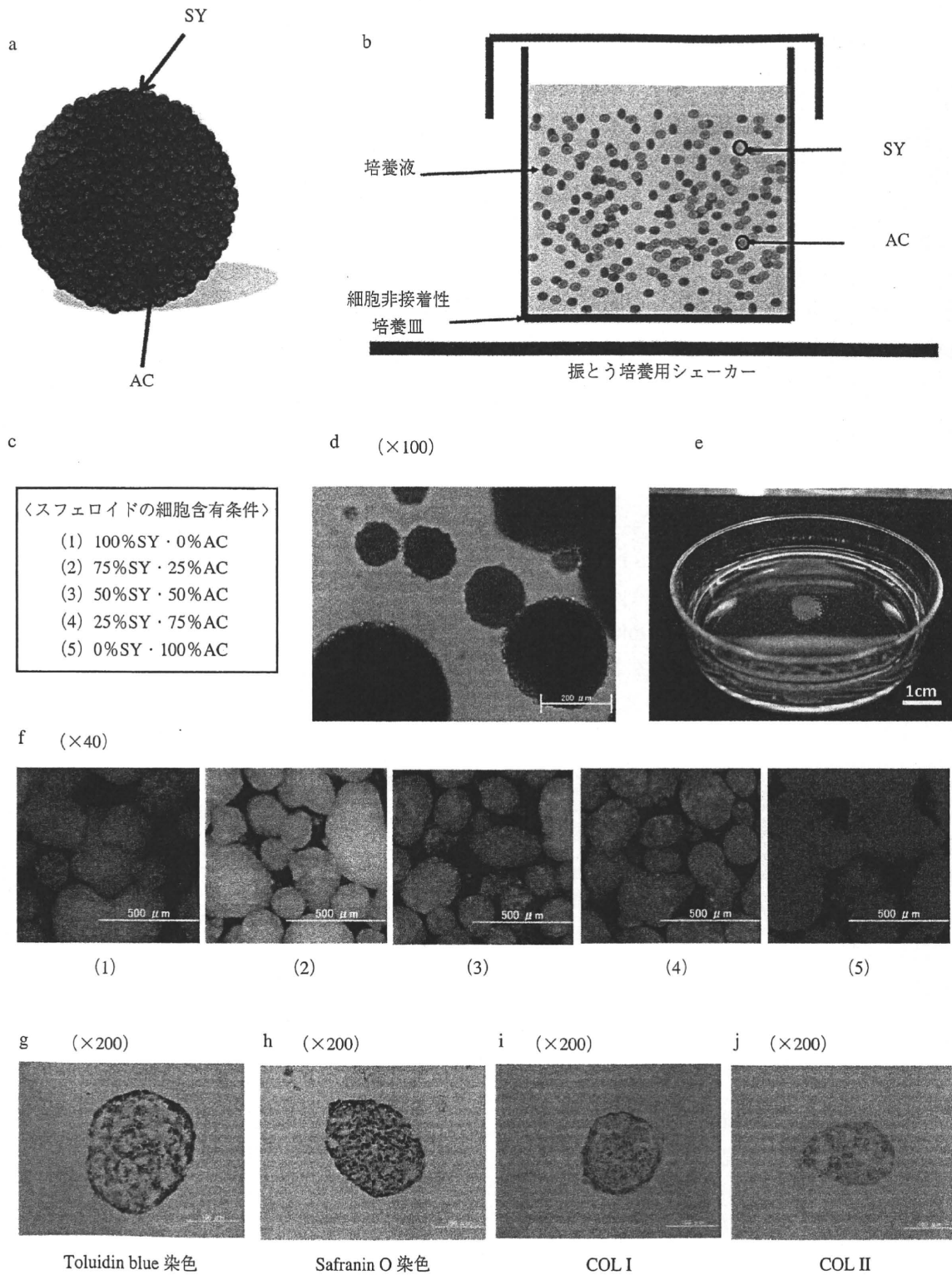


図1 細胞スフェロイド

a, b: 細胞スフェロイドおよびスフェロイド培養の模式図 (SY: 滑膜由来細胞, AC: 軟骨細胞),
 c: スフェロイドの細胞含有条件,
 d: 細胞スフェロイド作製後の顕微鏡下観察像,
 e: 肉眼的な観察所見,
 f: 各細胞スフェロイドの蛍光顕微鏡下観察像,
 g~j: 胞含有の条件 75%SY・25%AC で作製した細胞スフェロイドの組織学的検討

ACおよびSYは、振とう運動による持続的な反復により培養容器の底部にとどまらず、培養液中に浮く懸濁状態で維持でき、振とう初期段階に現れた小さいサイズの混合細胞塊を中心として多数の細胞同士が迅速に接着するようになり、経時的に細胞スフェロイドが成長した。5つの細胞含有条件のすべてにおいて細胞スフェロイドの作製が可能であった(図1d~f)。混合細胞塊は、スフェロイド培養開始12時間後から肉眼的にも観察可能であった。

振とう培養開始125時間後には細胞スフェロイドは凝縮して輪郭が滑らかになった。細胞スフェロイドのサイズは、小さいものは直径が $250 \pm 100 \mu\text{m}$ 、大きいものは $700 \pm 250 \mu\text{m}$ 程度であった(図1d,f)。

図1g~jに、細胞含有条件を75%SY・25%ACとして作製した細胞スフェロイドの染色像を代表例として示すが、細胞含有条件とtoluidine blue染色による異染性の程度との関連性は認められず、いずれも局所的な異染性を示した(図1g)。Safranin O染色の結果も同様にすべての細胞スフェロイドの内部では全体的な染色陽性を認めず、局所的に乏しい染色性を示した(図1h)。

Collagen type 1, 2に対する免疫組織化学的染色の結果(図1i,j)では、両者の細胞スフェロイド内部にて部分的な発現が認められた。

各条件の細胞スフェロイドを対象に実施したmRNAレベルのCollagen type 1, 2の発現は、すべての細胞含有条件において確認できた(図2b)。

考 察

本研究では、ACIへ利用可能な新規移植体を作製するために、採集量に制限があるACと同時にSYを採択して混合細胞スフェロイドを形成し用いた。現況ではACIにACとSYがともに移植体として研究され利用するようになりつつあり、AC¹⁰⁾、SY¹³⁾を用いるACIの研究では、細胞単独の移植のさまざまな不利な点が明らかになり、最近では体外培養時に各細胞と組織再生用基材のスキヤフォールドを利用して移植体を構築した後移植する方法が主流である^{2,6)}。特にSYは、個体年齢と関係なく優れた増殖能を表し、MSCの局

在も確認されている。さらに、軟骨細胞への容易な分化能から最近多く研究されるようになってきた³⁾。しかし、現在までACとSYを混合した細胞移植体の例はなく、われわれの本研究が初めての報告である。

種類の異なる細胞同士が混在する構造物を構築することは困難であるが⁴⁾、本研究の作製法ではスフェロイド培養初期では細胞同士の接触の機会が多く細胞同士の塊を形成しやすくなり、振とう培養から起きる培養液の流動は、細胞スフェロイドの構造をより緻密にする。この人為的に与える力によって、混合細胞の移植体の作製にいたった。

培養日数当たりSY、ACの平均継代増殖率は、およそ2倍程度SYが有意に高く、12日間の継代培養期間中、理論的にSYが $1024 (2^{10})$ 倍多い増殖量が獲得可能である。実際の細胞スフェロイド作製に用いた継代培養で増幅されたSY、ACは、初代培養時の播種した細胞より、それぞれ50~100倍、10~20倍の増殖が可能であった。

形態学および組織学的な検討の結果、toluidine blue染色では異染性は弱く、safranin O染色性も乏しかった結果とCollagen type 1, 2の免疫組織化学的染色の結果、発現には多少程度の差はあったものの、すべての細胞スフェロイドにおいて確認できたことから考えると、移植前の細胞スフェロイドは、体外の*in vitro*の環境でのスフェロイド培養の期間が短時間であったため、構成する各細胞は完全に軟骨細胞および軟骨様組織として形質発現していないものと推測できる。これと同様に軟骨組織の分化度を示すCollagen type 1, 2に対する分子生物学的検討の結果、短期間の培養期間中の混合細胞塊の性状は経時的にもその様態もさまざまであったことから、分化と脱分化した細胞が混在する細胞スフェロイドの内部の状況の軟骨分化程度を評価することは困難であった。

一方、われわれは今までも組織工学的手法による軟骨再生に適した担体作製に関する研究⁷⁾、至適細胞外環境の構築に関する研究¹²⁾、組織工学的に作製した軟骨の同種移植による軟骨再生に関する研究¹¹⁾、ならびに人工材料のスキヤフォールドを使用しない軟骨細胞シート⁵⁾および再生軟骨

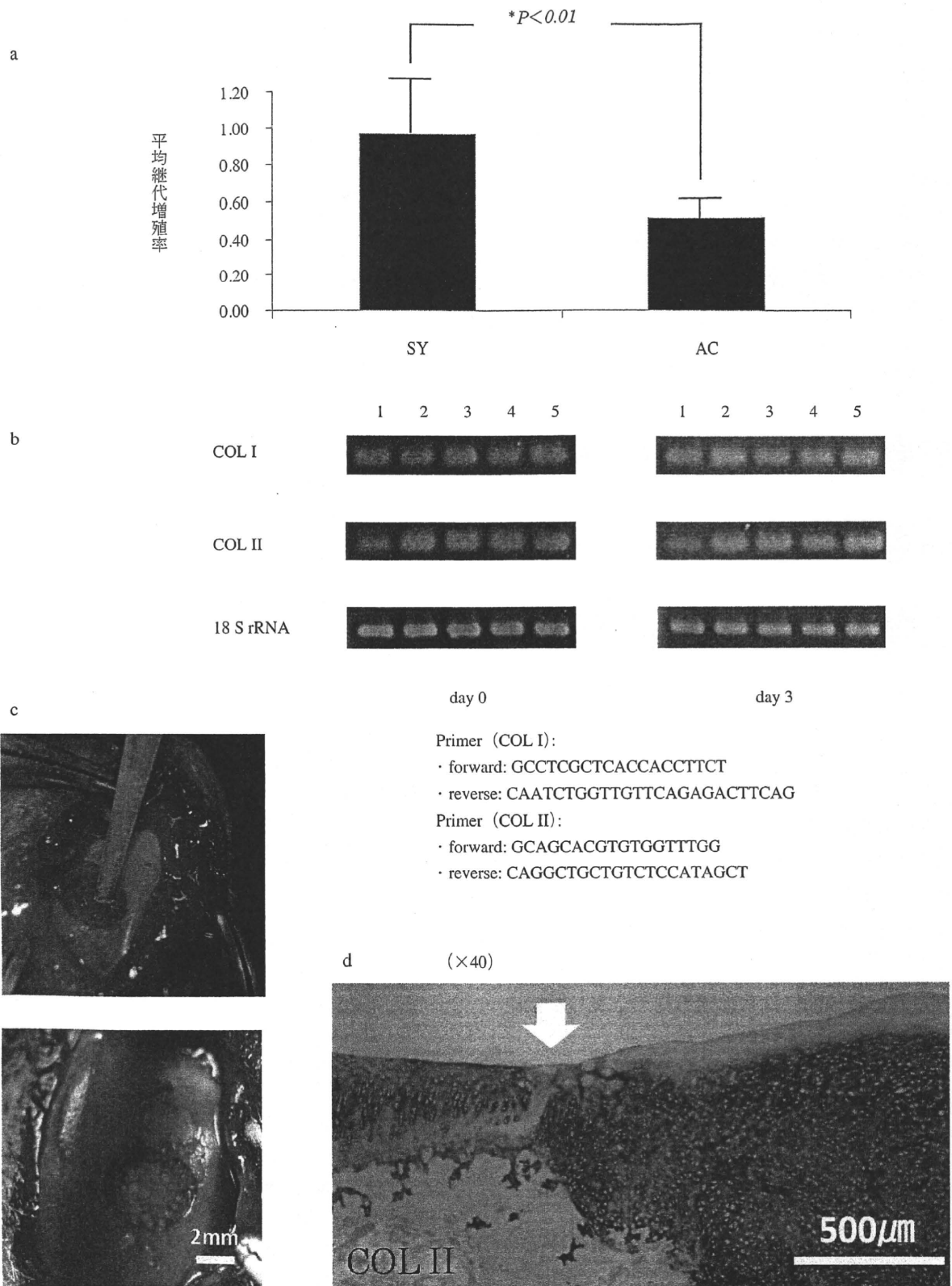


図2 結果

- a: 培養日数当たり SY と AC の平均継代増殖率 [(回収時細胞数 / 播種時細胞数) / (培養日数)],
- b: 細胞スフェロイドの作製過程における遺伝子発現 (RT-PCR),
- c: 細胞スフェロイド移植の実際,
- d: 移植後4週における組織学的検討 (Collagen type II による免疫組織染色)

plateによる軟骨修復・再生に関する研究⁹⁾などの成果から、軟骨損傷を治療するためには、損傷部位へ動員されるMSCの存在と組織修復・再生に必要な最小限の軟骨誘導イニシエーターの存在が必須条件であること、すなわち組織工学的軟骨の存在が重要であることを見出している。われわれの見解から推察すると、本研究の細胞スフェロイドでは、ACが軟骨誘導イニシエーターとしてSY由来のMSCと協働する。軟骨修復・再生に必要な最小の解剖的かつ生理学的な単位の細胞スフェロイドを治療単位として大量に移植することで広範囲の病変部においても最大の治療効果が期待できる。しかも、軟骨下骨まで到達しない部分欠損は、骨髄からのMSCの動員も少なく、その結果、組織修復・再生が十分ではなく、不完全な治療となる場合が多いが、今回の細胞スフェロイドは、上記の条件を満たすため、良好な軟骨修復・再生が期待できる。さらに、患者の正常軟骨部からの採取に制限のあるACの部分的な代替としてSYを用いることで移植体作製が容易となり、低侵襲での組織採取とその効率的な活用法として期待できる。

現在、ウサギの移植予備実験(図2c)において75%SY・25%ACで構成した条件の細胞スフェロイドの結果が良好な結果を得ている。この細胞スフェロイドの移植による移植後4週における欠損部位の組織学的な検討の結果(図2d)では、正常軟骨部位と移植部位の再生軟骨組織間の良好な接合と強く染色されたCollagen type 2の存在が確認され、移植部位は軟骨様形質を発現した組織で修復・再生されていた。

今後、さらに長期移植後の全層欠損モデルの結果や部分損傷モデルにおける治療効果を明らかにする予定である。

結 語

スフェロイド作製法により、ACIの新規移植体の作製が可能となった。ACとSYからなる本細胞スフェロイドは、高い増殖率を示すSYをACの部分的な代替として用いることで、短期間での大量作製が可能であった。新規移植体は今後ACIにおいて低侵襲での組織採取とその効率的な活用

法として期待できる。

文 献

- 1) Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., et al.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 331: 889-895, 1994.
- 2) Chiang, H. and Jiang, C.C.: Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J. Formos. Med. Assoc.*, 108: 87-101, 2009.
- 3) De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., et al.: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, 44: 1928-1942, 2001.
- 4) Green, J.B.: Sophistications of cell sorting. *Nat. Cell Biol.*, 10: 375-377, 2008.
- 5) Kaneshiro, N., Sato, M., Ishihara, M., et al.: Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349: 723-731, 2006.
- 6) Koga, H., Engebretsen, L., Brinchmann, J.E., et al.: Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 17(11): 1289-1297, 2009.
- 7) Masuoka, K., Asazuma, T., Hattori, H., et al.: Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res., B Appl. Biomater.*, 79: 25-34, 2006.
- 8) Mitani, G., Sato, M., Lee, J.I., et al.: The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol.*, 9: 17, 2009.
- 9) Nagai, T., Sato, M., Furukawa, K.S., et al.: Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng. Part A*, 14: 1225-1235, 2008.
- 10) Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., et al.: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of carti-

- lage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 84: 571–578, 2002.
- 11) Sato, M., Asazuma, T., Ishihara, M., et al.: An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. *Spine*, 28: 548–553, 2003.
- 12) Sato, M., Ishihara, M., Kaneshiro, N., et al.: Effects of growth factors on heparin-carrying polystyrene-coated atelocollagen scaffold for articular cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 83: 181–188, 2007.
- 13) Yokoyama, A., Sekiya, I., Miyazaki, K., et al.: In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res.*, 322: 289–298, 2005.

VI. 班會議 一議事錄一

議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業

【細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究】第1回班会議

日時：平成22年11月26日 14:00～17:00

場所：霞が関ビル35F 東海大学学友会館 諏訪の間

出席者：嶽北和宏（厚生労働省）、阿久津英憲（国立成育医療センター）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、村井邦彦（自治医科大学）、佐藤正人（東海大学）、鵜養拓（東海大学）、田中麻衣子（東海大学）、河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：河毛知子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告会

(1) 「本プロジェクト概要説明」 研究代表者 佐藤正人（東海大学）

- ・ミニブタ軟骨全損欠損を積層化細胞シートによって治療効果を確認した。
- ・細胞シートは部分欠損になぜ効果があるのか。
欠損は骨髄まで達していないので、治癒効果は骨髄由来のものではないと考えられ、シートから放出させるものによるのではないかと考えられ、検討をしている。
- ・同種細胞ソースとして、多指症のYub軟骨細胞の増殖性の高さにより有望
- ・明治大学において細胞シートの保存法を検討して頂いている。
- ・自治医科大学において細胞シートが移植部位の関節内にとどまり、全身の他部位へ移動することなく、局所で治癒に関連していることを証明して頂いている。
- ・国立薬品食品研究所では同種細胞移植の可能性を検討するため、免疫抑制効果に関しての研究をして頂いている。
- ・防衛医科大学では細胞シートの非侵襲的特性評価の研究をして頂いている。
- ・東海大学では、細胞シートの液性因子について研究を進めている。

以上のように、各大学、機関において連携を密にして、細胞シートの臨床応用に関しての一連の研究を実施している。

<質疑応答>

阿久津：細胞シートで検討しているのは、軟骨細胞由来のものだけか、それ以外のものがあるならば、有効な細胞シートの評価を、そうではない細胞シート（例えば皮膚の細胞シートなど）をコントロールとして、比較検討して使えるのではないか。

→現在、細胞シートは関節由来細胞の軟骨と滑膜だけで検討している。

長嶋：液性因子について、多く分泌する、もしくはより少なく分泌する因子のように比較すればどの液性因子が影響しているのか比較できるのではないか。

→miRNA レベルで検討している結果を加味して、その点も盛り込んでいきたい。

嶽北：力学的強度についての検討はしているのか。

→細胞シート自体に力学特性を期待するようなものではなく、永久的に残存するものではないと考えているので、力学的検討はしていない。

(2)「軟骨細胞シートの共培養について」佐藤正人（東海大学）

- ・ 個体差のないシートの作製を目指す

 培地への成長因子添加やフィーダー細胞などを検討する。

- ・ 滑膜細胞との共培養により 3 週間で確実にシートを作製できる。

<質疑応答>

阿久津：共培養というのは一緒になってしまっているのか。

→インサートを使っているので別々になっている。

嶽北：フィーダーもプライマリーのものであるのか。

→プライマリーのものも使用しているが、そうでなくても効果はある。軟骨細胞と滑膜細胞で別々のヒトのものであっても大丈夫である。

阿久津：滑膜細胞を使用すると増殖はそんなに良いのか、また、フィーダーとして滑膜細胞を株化出来ないのか、そして滑膜細胞はどのようなものが良いのか。

→滑膜細胞と多指症の細胞で培養すれば、より増殖は早いかも知れない。株化については、滑膜細胞は様々なものが集まっているので、プロパティの決定は出来にくく、株化は難しいと考えられる。また、液性成分が富んでいるのは軟骨細胞である。滑膜細胞はどのようなものが良いかについては、現時点で詳細には答えられないが、P1、P2 でも結果は出てきている。

阿久津：フィーダーとして滑膜を使用する場合、不死化されていないと、毎回培養するこ

とになり、条件が一定にならず、手技的なものも求められるのではないか。

佐藤：フィーダーに関しては移植する培養細胞と同様に審査において重要なポイントとなり得るか。

嶽北：製品として、滑膜+軟骨と両方の細胞を入れた場合は、品質においてキャラクターの確立されたものが望ましい。またプライマリーで作成した場合のフィーダー細胞も 3T3 細胞と同じような審査が製品の審査中において必要になる。フィーダー細胞の品質は均一にした方がよい。

(3)「細胞シート移植後の動態—Ivis での評価」分担研究者 村井邦彦（自治医科大学）

・細胞シートを膝関節に移植し、BLI を用いて動態を経時的に追う。

シート移植後ルシフェリンを皮下投与して計測した結果 day0～day84 まで発光が計測された。移植グラフトは移植後 4-8week で消失するものと考えられてきた、しかし、今回の実験ではより長く生着していることが示唆された。

3 か月ではげっ歯類では骨化していた為、より早い段階での評価が必要だと考えられる。

<質疑応答>

佐藤：グラフで補正していないというのは、移植直後に上昇していることを指しているのか、また骨化してしまったものに関して細胞シートはどこにいったのかが免疫染色等で同定できると面白い。

→ルシフェリンが移植直後に安定しているかが確かでないが、発光強度が細胞数と比例関係であるのは確かである。細胞シートについては表層に移植したのは確かなのですが。

阿久津：ヒトでも骨化してしまうのか。

→ラットで行った為であると考えられる。骨膜移植を併用する再生医療では、組織の過形成や一部骨化したという報告はあるが、ヒトでは一般的ではない。

河毛：げっ歯類は骨化しやすいのか。

→一般的にげっ歯類は内軟骨性骨化が生じ易い。ウサギ以上の大型の動物を使えば大丈夫である。また defect も小さい為には骨化したのではないか。

長嶋：骨化すると動きにくくなるのか。

→動きについては問題はなかった。ウサギに関して脚への体重のかけ方を測定したが時間が経つと両足同じように体重をかけるようになる。ラットやマウスの体の構造上、後ろ足の軟骨に特別負荷がかからないのではないか。

(4)「細胞ソースの検討—マイクロアレイ解析」研究協力者 鶴養拓（東海大学）

多指症・前十時靭帯損傷・変形性膝関節症の患者由来の軟骨細胞を遺伝子解析を行うことで軟骨細胞の幼若性を担保する要因に関しての検討や将来的な同種細胞ソースとしての検討を行うために多指症・ACL損傷・変形性膝関節症の手術時に得られた軟骨を採取し、遺伝子発現（以下 GE）及び miRNA 発現解析をマイクロアレイにて行った。Yub・ACL・TKA と段階的に変動する遺伝子を抽出し、同様に miRNA でもマイクロアレイ施行し Yub・ACL・TKA 間で GE と miRNA 共通に変動する遺伝子を抽出した。

hsa-miR-c は Yub・ACL・TKA と年齢に伴い発現が上昇する遺伝子を制御していた。一方、hsa-miR-a、hsa-miR-b の 2 つの miRNA は年齢に伴い発現が低下している遺伝子を制御するため軟骨の幼若性に関与している可能性が示唆された。

<質疑応答>

阿久津：ACL の軟骨は正常なのか。

→20-30代の外傷で発症した患者由来の軟骨で、損傷部位とは別の部位の軟骨で、手術の際に再建靭帯を通す部位での軟骨なので、正常軟骨としてコントロールに使っている。

長嶋：変動一貫性で抽出された遺伝子と液性因子で同じものはあるのか。

→注目しているのは免疫抑制因子だが今回の結果では同じものはなかった。

阿久津：ACL と TKA だけで、つまり膝関節由来のものだけで発現の比較をしてみてもどうか。調べた遺伝子について軟骨に影響すると明らかになっていないものならば、バリテーションが必要であり、定量的な確認も必要である。

嶽北：移植用細胞 GAG などの発現パターンはどのような挙動を示したのか、また cell ソースに関連する話はあるのか。ひっかけてきた遺伝子はこれからどのようにしてゆくの。

→3種の遺伝子で機能的に評価する。これからについては miR-a などそれぞれでマスターとして効いている遺伝子を確認してゆく。

阿久津：miRNA が制御している遺伝子のターゲットは文献なりで出てきているのか。

→出てきていないが、これからノックダウンするなりして研究してゆく。

阿久津、村井：知られていない遺伝子の場合、軟骨分化について関り重要な役割を果たすということを示すことや、評価を遺伝子レベルだけするのは難しい。Vitro の系に組み込んでどのような挙動を示すか検討してはどうか。

嶽北：どのような細胞ソース（どのようなマーカーがどの程度発現している細胞）を目指しているのか設定した上で、それを達成できる遺伝子を調べた方が良いのではないのか。

→目標設定を行う必要がある。

(5)「細胞シートの凍結および低温保存へのチャレンジ」研究協力者 前原美樹(明治大学)

- ・凍結における細胞の生存性は細胞内氷晶形成がネックになっている。
- ・低温における保存は物理的ダメージ回避に有効とかがえられるが、その際に使用する抗酸化剤の EGCG はコラーゲン架橋を促進するため、細胞シートのプロパティが改変される可能性があり、この辺りを今後検討する必要がある。
- ・今後は CAS 冷凍の可能性を検討する。マイナス 20℃でも不凍状態で保存できるのは利点と考える。

<質疑応答>

村井：保存時に氷晶化を抑えるのは内膜の保持に重要だからという考えで良いのか。

→氷晶化も膜の維持両方が重要であり、オルガネラ構造の維持も非常に重要なこと。液相のままの保存であれば物理的変化のストレスが抑えられるかもしれない。

嶽北：ヒトで十分に安全性を検討した保存剤はあるのか？理想としては、製品のパッケージを開けてすぐに使えるような(洗浄不要のもの)保存剤が理想と考えられるがそういったものはあるのか。

→グリセロール、プロパンジオールなど一般的に使われている。ポリリジンも食品の保護剤として使われている。

佐藤：大変重要なポイントであり、臨床現場ですぐに使用可能なもので検討する方が望ましい。

阿久津：どの保存法が一番有用なのか。

→すべての可能性がある。

阿久津：それでは既に臨床応用されているものが良いのではないか。

佐藤：同種細胞シート移植を考えた場合、保存方法はどうか、その際のパッケージングや開封時の使用方法など実際に即したもので、検討して行ければと思います。

(以上敬称略)

3. 総合討論

本事業に関する活発な意見交換がなされました。

4. 事務連絡

次回は1月下旬～2月上旬に開催予定、後日調整して連絡いたします。

5. 閉会

以上

議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業

【細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究】第2回班会議

日時：平成23年1月28日 14:30～17:30

場所：霞が関ビル 35F 東海大学学友会館 諏訪の間

出席者：田邊裕貴（厚生労働省）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、前原美樹（明治大学）、佐藤正人（東海大学）、鶴養拓（東海大学）、浜橋恒介（東海大学）、伊藤聡（東海大学）、渡部綾子（東海大学）、河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：河毛知子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告会

(1) 「培養軟骨細胞の免疫調節効果に関する研究」

研究分担者 加藤玲子（国立医薬品衛生研究所）

・間葉系幹細胞（MSC）の免疫制御システムに関する研究について

同種（マウス）MSC（mMSC）でのマウス活性化リンパ球の増殖抑制確認

異種（ヒト）MSC（hMSC）でも抑制効果を示すのかの確認検討

in vitro においては mMSC だけでなく、異種である hMSC にもマウス活性化リンパ球増殖抑制効果が確認された。

・培養軟骨細胞での検討

マウスリンパ球混合培養にアロの培養軟骨細胞を共培養したところ、リンパ球の増殖が抑制された。このことから、培養軟骨細胞は MSC と同様に活性化リンパ球の増殖を抑制することが示唆された。さらに、異種であるヒト培養軟骨細胞でも同様の効果が見られた。

今後、ウサギの軟骨細胞やシート化した培養軟骨細胞でも抑制効果を検討する。

<質疑応答>

佐藤：今回のように軟骨細胞が活性化リンパ球の細胞増殖を抑制できることを示した論文が既に存在するのか。

→MSC を軟骨細胞に分化させたもので同様の結果を示す論文はあるが、もともと軟骨細胞であったものでは、報告はないと理解している。また、免疫原性が低いこと、つまりアロの細胞を積極的に活性化させていないことと、免疫細胞の活性化を抑制することは、今のところ同じメカニズムであるかどうかは分かりません。

佐藤：軟骨細胞シートから TGF- β や PGE2 の分泌が確認されていることや、免疫細胞の活性化を抑制することが知られている MSC では、抑制効果を媒介しているのは MSC が分泌する免疫抑制物質であるとの報告があるが。

→軟骨細胞もリンパ球の増殖抑制を行う際に免疫抑制物質を出しているのではないかと推測されます。しかしながら、免疫原性が低いのは免疫抑制物質を分泌しているからであるとは、現段階では明言できません。

阿久津：ヒト間葉系幹細胞でスキッドマウスを用いて筋肉を作製した。これは免疫拒絶をされなかった為と考えられるので、今回の発表と同じことが言えるのかも知れない。

(2) 「細胞シートの凍結および低温保存へのチャレンジ：第二回報告」

研究協力者 前原美樹（明治大学）

・凍結保存 ガラス化法→Slow-vitrification 法

ガラス化法の凍害保護剤として用いたカルボキシル化ポリリジン (PLL) の検討。PLL は毒性が少なく、食品添加物としても利用されている不凍ポリアミノ酸であり、凍結安定化効果を持っている。

ガラス化する時に PLL(+)と(-)で検討した結果、(-)では破損したが、(+)では intact

Slow-vitrification と PLL を組み合わせることによって細胞シートはガラス化状態で保存できる。

・低温保存 4℃

RPMI1640 と HFDM-1 (ヒト繊維芽細胞増殖用合成培地) と RPMI1640+suppli の 3 種の培地を用いて、軟骨細胞を培養した。3 週間の期間では、低温化で細胞の生存率を高く維持した。

<質疑応答>

佐藤：京都大学の先生が絡むのはどちらの系ですか。PLL はとても良い結果を得られそうな印象を受けました。どの方法が一番手ごたえはありそうですか。

→京都大学の先生から分与して頂いているのは PLL です。手ごたえについては、今回は

シートでは n が少ないですし、低温の方では培養細胞しか検討していないのでどれとも言い難いです。

阿久津：シートの機能解析はとても重要です。佐藤先生の方で確立されているので、是非検討を進めてください。

佐藤：明治大学ではヒトの細胞の受け入れは可能ですか。

→確認します。

加藤：3種の培養液であまり差が見られなかったように思いますが、3週間も持つのはアスコルビン酸による影響でしょうか、それとも軟骨細胞特有の現象でしょうか。PLL 100%ではだめなのか。

→アスコルビン酸はコラーゲンを成熟させる効果があるので、その効果の為かも知れない。PLL については、DMSO は無くても大丈夫であり、ガラス化に PLL 100%は論文上では、カルボキシル化が 65%が良いという報告があり、同じ条件で実験を行った。しかし、シートでは検討していない。

佐藤：阿久津先生の方では保存に何を使っているのか。

(阿久津) →ヒト iPS 細胞、ES 細胞ではゼノフリーとしても販売されている一般的なもので、緩慢凍結法です。ガラス化は、手間が掛かるのであり、世界的には特に日本で盛んに行われている。生殖補助医療分野ではガラス化法がスタンダードです。

河毛：前回までの報告でも凍害保護剤は PLL を使っていたのか。

→使用していた。初めは PLL が高分子なので脱水の効果を期待していた。

(3) 「共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性」

研究分担者 小久保 舞美 (東海大学)

・軟骨だけの培養だと培養期間が安定しなかったが、滑膜を共培養することで、2~3週間で安定的に培養が出来た。

・同種異関節共培養 (肩と膝) では、MTT でも PCR も共培養した方が単層よりも良かった。

・インサートを使用することで Fibronectin が中まで染まる。

<質疑応答>

阿久津：細胞の量は。また、それでどのくらいシートが作れるのか。

→軟骨 1g と滑膜 3g で 24 枚くらいのシートが出来る。

阿久津：プライマリーなのか継代したものなのか。

→プライマリーを用いている。P2 で活性は落ちてくるのに対して、多指症の細胞は P2、P3 でも活性が落ちない。

阿久津：滑膜はフィーダーの為だけに採ってきているのか。

→伊藤が滑膜の移植について発表します。

(4) 「本プロジェクトの概要説明」

研究代表者 佐藤 正人（東海大学）

- ・自己→ヒト幹→一刻も早く臨床応用したい→同種へ
- ・細胞シートにおいて軟骨細胞シートは上皮系以外の細胞で初めての試みである。
- ・2種の全損欠損と部分損傷の両方で有効であると動物で確認されている。
- ・従来の治療法について

自己培養軟骨細胞移植：ACI

骨膜と軟骨と健常部二か所を犠牲にし、培養も1ヵ月～かかる。

- ・OAの治療へ踏み込んだ再生医療

<質疑応答>

田邊：臨床応用したいものは積層化シートなのか。継代数、移植後の増殖、残存について。造腫瘍については。

→三次元培養に近い積層化シートを臨床応用を目指している。プライマリーでシート化する。移植後は増殖せず、残存はIvisで約3ヵ月で最終的にはほとんどが置き換わる。造腫瘍についてはマウスで見えています。

田邊：同種について。同種、異種どちらが免疫抑制するのか。

(加藤) →どちらも免疫抑制が見られる。

田邊：同種は他の企業がついてバックアップして製品であると言ってしまえば倫理面でかなり有利な方向へ進む。海外では製品としてなっているものも多い。感染や残存で問題がなければすぐに実用化できるのではないかと。

田邊：多指症で問題はあるのか。

(阿久津) →ないでしょう。

田邊：サイトカインは。

→TGF- β とPGE2が免疫抑制効果を発揮している。

(5)「家兎膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞と滑膜細胞移植による治療効果の検討」

研究協力者 伊藤 聡 (東海大学)

・フィーダーとして使っていた滑膜も一緒に移植したらどうかの検討

・荷重のかけ方

Defectのみではday28までみても38%までしか回復しなかったが、それ以外の軟骨細胞シート群や滑膜とのコンビネーション群では回復した。細胞の移植は疼痛軽減効果がある。

・染色

滑膜のみ移植した群では表層だけ繊維性に置き換わっていたが、内部は修復されていた。

<質疑応答>

佐藤：今回の結果から、軟骨に滑膜も加えたほうが良いと思うか。

→1ヵ月しかまだ結果を見ていないが、defectに滑膜を充填して軟骨細胞シートで覆った方が結果を見ても良さそうに見える。

佐藤：滑膜のみで行っている大阪大学の問題点として、表層が線維性のものに置き換わってしまうというものがあるが。

→今回の結果を見ても表層が線維性のものに置き換わっているものが見られた。軟骨細胞シートだと表層が線維性のものに置き換わるものはなかった。

佐藤：滑膜180万はどこからきた数字なのか。

→関矢先生の論文から、ウサギの膝の容積比とヒトの膝で比較して決定した。

田邊：シートは何層なのか。

→3層です。軟骨は三次元培養をしないと軟骨のフェノタイプを維持できないので3層にした。

田邊：滑膜はペレットにする時に何か混ぜているのか。