

201106006A

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成24年 4月

## はじめに

本研究報告書は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金「再生医療実用化研究事業」に3年計画の事業として採択された「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究（H21-再生一般-008）」に関する平成23年度の研究成果報告を纏めたものです。関係者の皆様のご尽力により最終年度の平成23年度におきましても一定の成果を上げることができましたのでご報告申し上げます。最終年度に厚生労働省へヒト幹細胞臨床研究として申請し、小宮山厚生労働大臣の意見書の発出により、自己軟骨細胞シートによる臨床研究を東海大学医学部付属病院で実施するまでに至りました。これもひとえに皆様方のご指導のお蔭であると感じております。

私共は、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて報告し、修復能力に富んだ積層化軟骨細胞シートの特性を明らかにしてきました。軟骨細胞シートは強固な剛体ではありませんが、優れた接着性を有し、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクターから軟骨を保護し、サイトカインの持続的な供給源となり、さらに骨髄由来幹細胞を軟骨へ分化誘導するイニシエータとして機能しており、単なる軟骨再生というよりは、むしろ自己修復能力を向上させた効果により軟骨は修復再生されています。軟骨全層欠損と部分損傷という両タイプの軟骨損傷に対して、軟骨細胞シートは動物実験で治療効果を認めています。これは、従来の軟骨再生医療にはない治療効果であり、変形性関節症において常に混在する2種類の軟骨損傷に治療効果が見込まれるため、将来的に変形性関節症まで適用を広げられるポテンシャルを有します。

本事業は、先端医療開発特区「細胞シートによる再生医療実現化プロジェクト」（研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授）において、事業期間中（平成20～24年度）に「対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられている軟骨の再生医療を、積層化軟骨細胞シートにより速やかに実現するために必要な前臨床試験並びに臨床研究を行うものです。本研究成果が、外傷性の軟骨損傷といった限局的な軟骨病変ばかりでなく、将来的に変形性関節症の克服に僅かばかりでも貢献できることを切に願いながら、いつも研究を支えて頂いている研究分担者、研究協力者、並びに関係者の方々に深謝いたします。

平成24年4月

東海大学医学部外科学系整形外科学 准教授 佐藤 正人

# 目 次

I. 研究班の構成	1
II. 総括研究報告	
細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究 ー平成23年度総括研究報告ー 佐藤正人	3
III. 分担研究報告	
●自己細胞シート前臨床研究	
1. ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果 海老原吾郎 小久保舞美 三谷玄弥 杓名寿治 長井敏洋	11
2. 細胞シート移植後の Bioluminescence による経時的な細胞追跡に関する研究 村井邦彦 高久裕子	19
3. 自己細胞処理と安全性評価に関する研究 加藤俊一 河毛知子 渡部綾子 小林美由希	25
●同種細胞シート及び周辺技術の検討	
4. 積層化軟骨細胞シートの免疫調節効果に関する研究 加藤玲子 小久保舞美	33

5. 軟骨細胞における miR-199a-3p, miR-320c の機能 阿久津英憲 梅澤明弘 鵜養拓	41
6. 細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究 長嶋比呂志	49
7. 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に 関する研究 石原美弥 谷川待子	59
IV. 研究成果の刊行（平成 23 年度）に関する一覧表	67
V. 研究成果の刊行物・別刷	77
VI. 班会議 ー 議事録 ー	141

## I. 研究班の構成

研究班の構成

	研究者名	所属研究機関・役職	専門	分担研究項目
研究代表者	佐藤 正人	東海大学医学部外科学系 整形外科学・准教授	整形外科学 軟骨再生医療	研究統括・ 研究計画立案 臨床研究
研究分担者	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 自己細胞移植の検討
	杓名 寿治	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 光を用いた細胞シート の評価技術
	海老原吾郎	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 自己細胞移植の検討
	長井 敏洋	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 軟骨再生医学
	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	化学	軟骨再生医学、 分子生物学的解析評価、 CPC での細胞培養
	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	造血幹細胞移 植、 再生医療	細胞処理と安全性評価 に関する研究
	阿久津英憲	国立成育医療研究センタ ー研究所 生殖細胞医療 研究部・室長	産科婦人科学	臨床研究アドバイザー、 同種細胞移植へ向けた 検討
	長嶋比呂志	明治大学農学部生命科学 科発生工学研究室・教授	発生工学	大型動物実験、 同種細胞の保存法に関 する研究
	石原 美弥	防衛医科大学校医用工学 講座・教授	光応用技術 軟骨特性評価	光を用いた細胞シート の評価技術
	村井 邦彦	自治医科大学麻醉科学集 中治療医学講座・非常勤 講師	麻醉科学	細胞シート移植後の動 態評価、 Bioluminescence によ る経時的評価
加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究 所・医療機器部・主任研 究官	分子生物学、 免疫学	同種軟骨細胞移植の免 疫反応に関する研究	

研究班の構成

研究協力者	伊藤 聡	東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生	整形外科学	軟骨再生医学、 動物実験
	鷓養 拓	東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生	整形外科学	同種細胞移植へ向けた 検討
	小林美由希	東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生	整形外科学	細胞処理と安全性評価 に関する研究
	河毛 知子	東海大学医学部外科学系 整形外科学・研究員	細胞培養	細胞処理と安全性評価 に関する研究
	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系 整形外科学・研究員	細胞培養	細胞処理と安全性評価 に関する研究
	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター 一研究所 生殖細胞医療 研究部・部長	産科婦人科学	臨床研究アドバイザー、 同種細胞移植へ向けた 検討
	谷川 待子	防衛医科大学校医用工学 講座・研究員	光応用技術 細胞培養	光を用いた細胞シート の評価技術
	高久 裕子	自治医科大学麻酔科学集 中治療医学講座・大学院 生	麻酔科学	細胞シート移植後の動 態評価、 <b>Bioluminescence</b> によ る経時的評価
経理事務局	石田 秀一	東海大学伊勢原研究推 進部伊勢原研究業務 課・課長		経理事務

## II. 総括研究報告



## 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

### － 平成23年度 総括研究報告 －

研究代表者 佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学・准教授

研究要旨：変形性関節症において常に混在する軟骨部分損傷（軟骨内に留まる損傷）と全層欠損（軟骨下骨まで達する損傷）の両タイプの軟骨損傷に対して、我々は軟骨細胞シートによる修復・再生効果を動物実験で確認してきた。本研究事業では、軟骨細胞シートの安全性を証明するために各種研究を実施し、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、関節軟骨の再生医療の実現を目指している。本研究事業の柱は2つある。「自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究」「同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究」であるが、それぞれに対して研究分担者、協力者の方々と共に実施した内容を、今年度研究報告としてまとめる。特筆すべきは、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成23年3月3日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請し、同年10月3日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認されたことである。現在までに2例の患者に臨床応用し、現在のところ経過は良好である。

#### 【研究分担者】

三谷玄弥：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

杳名寿治：同・講師

海老原吾郎：同・助教

長井敏洋：同・助教

小久保舞美：同・特定研究員

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

阿久津英憲：国立成育医療研究センター研究所 生殖細胞医療研究部・室長

長嶋比呂志：明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授

石原美弥：防衛医科大学校医用工学講座・教授

村井邦彦：自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・非常勤講師

加藤玲子：国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官

#### 【研究協力者】

伊藤聡：東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生

鶴養拓：同・大学院生

小林美由希：同・大学院生

河毛知子：同・研究員

渡部綾子：同・研究員

梅澤明弘：国立成育医療研究センター研究所 生殖細胞医療研究部・部長

谷川待子：防衛医科大学校医用工学講座・研究員

高久裕子：自治医科大学麻酔科学集中治療  
医学講座・大学院生

#### A. 研究背景と目的

変形性関節症をはじめとする運動器疾患は、生命を直接脅かすものではないために、癌や心臓疾患など生命に直接関わる疾患と比べるとやや軽視されてきた。しかし、日常生活動作(ADL)を下げるばかりか、生活の質(QOL)の低下も招き、人的社会的損失は計り知れないものがある。平成20年度版高齢社会白書によると、我が国の65歳以上の高齢者人口は過去最高の2,746万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も21.5%となり、未曾有の超高齢化社会が到来した。そして健康寿命を縮める原因（要支援となる原因）の第1位が関節疾患20.2%（平成19年国民生活基礎調査）であると報告されている。

関節軟骨の再生医療は、軟骨細胞の培養が比較的容易であったため、再生医療の第1世代というような言われ方をされた時期もあった。そして軟骨の再生医療は1990年前半から海外で実施、報告され、米国をはじめとする諸外国では既に2万例に近い手術症例の蓄積がある。しかしながら、その対象疾患は小さな軟骨の外傷性病変であり、再生医療が真に必要とされる変形性関節症の治療には20年近く経過した現在でも、いまだに到達する気配すら感じられない。それは、“軟骨もどき”はできても真の関節軟骨を作ることが、想像以上に難しいことが明らかになったため、今まさに軟骨再生医療を実現するためのブレイクスルーが待望されている。

本研究事業では、先端医療開発特区「細

胞シートによる再生医療実用化プロジェクト」(研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授)において「事業期間中（H20~24年度）に対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられている関節軟骨の再生医療を、積層化軟骨細胞シートにより速やかに実現するために必要な前臨床試験並びに臨床研究を行うものである。

#### B. 研究課題

##### 【1】自己細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究とそのための前臨床研究

- (1) ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請と承認（東海大学）
- (2) ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果（東海大学）
- (3) 細胞シート移植後のBioluminescenceによる経時的な細胞追跡に関する研究（自治医科大学）
- (4) 自己細胞処理と安全性評価に関する研究（東海大学）

##### 【2】同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究

- (1) 積層化軟骨細胞シートの免疫調節効果に関する研究（国立医薬品食品衛生研究所）
- (2) 軟骨細胞における miR-199a-3p, miR-320c の機能に関する研究（国立成育医療研究センター研究所、東海大学）
- (3) 細胞シートの凍結保存ならびに低

温保存に関する研究（明治大学）

- (4) 超音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に関する研究（防衛医科大学校）

研究課題毎の役割としては、今年度は、分担、研究協力者を下記のようなグループに分け、研究代表者統括下に、各研究課題を鋭意継続中であるが、必要に応じてグループ間でも討議を行い、人的交流をグループ間で行いながら、効率的な研究が実施できるような体制を整えている。分担研究報告は上述の課題毎に報告する。

1. 「ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果」に関する研究グループ

研究分担者 海老原 吾郎（東海大学）  
研究分担者 小久保 舞美（東海大学）  
研究分担者 三谷 玄弥（東海大学）  
研究分担者 杓名 寿治（東海大学）  
研究分担者 長井 敏洋（東海大学）

2. 「細胞シート移植後の Bioluminescence による経時的な細胞追跡」に関する研究グループ

研究分担者 村井 邦彦（自治医科大学）  
研究協力者 高久 裕子（自治医科大学）

3. 「自己細胞処理と安全性評価」に関する研究グループ

研究分担者 加藤 俊一（東海大学）  
研究協力者 河毛 知子（東海大学）  
研究協力者 渡部 綾子（東海大学）  
研究協力者 小林 美由希（東海大学）

4. 「積層化軟骨細胞シートの免疫調節効果」に関する研究グループ

研究分担者 加藤 玲子（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究分担者 小久保 舞美（東海大学）

5. 「軟骨細胞における miR-199a-3p, miR-320c の機能」に関する研究グループ

研究分担者 阿久津 英憲（国立成育医療研究センター研究所）  
研究分担者 梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）  
研究協力者 鶴養 拓（東海大学）

6. 「細胞シートの凍結保存ならびに低温保存」に関する研究グループ

研究分担者 長嶋 比呂志（明治大学）

7. 「超音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価」に関する研究グループ

研究分担者 石原 美弥（防衛医科大学校）  
研究協力者 谷川 待子（防衛医科大学校）

## C. 研究結果

### 【1】自己細胞シートによる再生医療を目的とした臨床研究とそのための前臨床研究

東海大学医学部では既に持田讓治教授を研究責任者とする「自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究」が厚生労働省の承認を得てヒト幹細胞臨床研究を平成20年度より実施しており、これらのノウハウを投入し、適切な前臨床研究を実施してヒト幹細胞臨

床研究を目指す。

### （１） ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請と承認（東海大学）

我々は、２種類の免疫不全マウスへのヒト軟骨細胞、滑膜細胞の移植により、造腫瘍性を否定し、CGH解析においては過継代細胞においても CNV は認めなかった。さらに CPC において実際に細胞シートの試験製造を患者組織の持込みから、最終製品完成までの各工程での品質管理検査を各工程で管理検査を実施し品質に問題ないことを確認した。

以上より、有効性と安全性は十分担保されると判断し、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成 23 年 3 月 3 日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請し、同年 10 月 3 日に厚生労働大臣の「ヒト幹細胞臨床研究について」の意見書の発出（厚生労働省発医政 1003 第 3 号）をもって、同年 11 月 29 日に第 1 例目の臨床研究を開始した。現在 2 例を実施中であるが、いずれも経過は良好である。

### （２） ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果（東海大学）

以前、我々は家兎関節軟骨部分損傷を用いた研究で、表層部のみを積層化軟骨細胞シートで覆うことにより、良好な組織修復をもたらすことを報告した。今回我々は、大型動物であるミニブタ軟骨細胞を用いて軟骨細胞シートの修復再生効果を確認するため、ミニブタ関節軟骨全層欠損モデルで関節軟骨の修復再生に関する実験を行った。

積層化細胞シート移植群では組織学的に safranin-o の染色性及び、周辺組織との integration も良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていた。しかし、一部の症例で家兎での実験時には見られなかったような、safranin-o の染色性が乏しい組織で修復される現象を見出し、それらの軟骨下骨の修復状況はいずれも不良であった。以上の結果から積層化軟骨細胞シートは関節軟骨修復に寄与すると考えられるが、動物実験モデル、培養条件、移植条件等はさらなる検討を要すると考えられる。

本研究結果は Biomaterials 誌 2012 に掲載された。

### （３） 細胞シート移植後の

#### Bioluminescence による経時的な細胞追跡に関する研究（自治医科大学）

軟骨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、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 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートに最適化された。評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定した。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用群の 3 群において Luc<sup>+</sup> 細胞からの発光は消失することなく 18 カ月以上検出された。発光強度は移植 4 週以降、軟骨細胞シート群 > 両細胞シート併用群 > 滑膜細胞シート群の順に強く発光する経過を示した。

#### （４）自己細胞処理と安全性評価に関する研究（東海大学）

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、通常の培養期間を超えて過継代培養した細胞について、細胞形態観察、CGH解析、及び、培養軟骨細胞シートを免疫不全マウスに移植することにより造腫瘍性の確認試験を検討した。評価プロトコールとしての *moving average* と *ADAM2 threshold* の変化を精査、確認し、その結果、*CNV* は認めず安全性に問題ないことが確認された。

#### 【２】同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究

##### （１）積層化軟骨細胞シートの免疫調節効果に関する研究（国立医薬品食品衛生研究所）

温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨シートによる関節軟骨修復再生効果を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。しかしながら、同種軟骨細胞が宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はない。そこで本研究では、同種軟骨細胞および同種積層化軟骨細胞シートが免疫系に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、同種軟骨細胞は免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを認めた。そこで、同種軟骨細胞をシート化し積層化した後も同様の機能を維持しているか検討したところ、積層化軟骨細胞シートは活性化 T 細胞増殖抑制効果を維持していることが確認できた。これらのことより、関節軟骨損傷の治療に同

種積層化軟骨細胞シートを使用出来る可能性が示唆された。

##### （２）軟骨細胞における *miR-199a-3p*, *miR-320c* の機能（国立成育医療研究センター研究所、東海大学）

以前報告した年齢と共に変動していく *miRNA* のうち *miR-199a-3p*, *miR-320c* の 2 種類の *miRNA* について機能解析を行ったので報告する。Real time PCR において *miR-199a-3p* の *mimic* 群では *Type 2 collagen*, *aggrecan*, *SOX9* の発現が減少していた。一方、*miR-320c* の *mimic* 群では *ADAMTS5* の発現が減少しており、*inhibit* 群では *ADAMTS5* の発現が上昇していた。*MTT assay* では *miR-193b inhibit* 群でコントロール群に比べ有意に上昇しており細胞増殖能にも影響を与えている可能性が示唆された。今回われわれが同定した *miRNA* のうち *miR-199a-3p* は *anabolic factor* を制御することにより軟骨細胞の加齢や老化に関与し、*miR-320c* は *catabolic factor* を制御することにより軟骨細胞の脆弱性に関与していると考えられた。

##### （３）細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究（明治大学）

哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等の凍結保存に実績のあるガラス化法に改良を加え、細胞シートのガラス化保存に成功した。細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、軟骨細胞シートの凍結に取り組んだ。前年度までに開発した方法に改良を加え、実用性の高いガラス化保存法の開発に成功した。脆弱な構造体である細胞シートに亀裂や破断

を生じることなく凍結融解を行い得ることが、ウサギ軟骨細胞シートを用いて確認された。さらに、ガラス化状態で細胞シートを長期保存するための、パッケージング法も開発した。以上の結果より、細胞シートの臨床応用に際して、シートを用時調製することに加えて、今後は凍結保存シートの利用を視野に入れることを目指していく。

#### （４）光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に関する研究（防衛医科大学校）

軟骨細胞シートによる関節治療の評価には、シートの移植前後で同じ手法で測定し、同じパラメータで評価する必要がある。我々が独自に開発した光音響原理に基づく力学特性計測法は、対象の組織に害がない非侵襲的で、繰り返し計測が可能であることから、その評価法になりうる。そこで、既に我々が構築したプロトタイプ装置を用いて、関節鏡視下にて軟骨シート移植前の移植部位の計測をした。その結果、正常部と変性部を対象にした測定値より、軟骨細胞シートによる関節治療の評価法としての可能性が確認できた。

#### D. 結論

本研究事業の 2 つの大きな課題である「自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究」並びに「同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究」は何れも、当初の予想以上の成果が得られた。特筆すべきは、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成 23 年 3 月 3 日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省

へ申請し、同年 10 月 3 日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認されたことである。現在までに 2 例の患者に臨床応用し、現在のところ経過は良好である。

#### E. 倫理面への配慮

東海大学では臨床研究審査委員会並びに医の倫理委員会を設けており、厳格な審査の上に臨床研究を行っている。厚生労働省が定めた「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究対象者に対してのインフォームドコンセント、患者の権利、守秘義務、プライバシーの保護に十分に留意している。本研究内容に関しては平成17年から臨床研究審査委員会の承認の下、東海大学においてヒトサンプルを用いた臨床研究を実施している。また、動物実験においては、東海大学動物実験委員会並びに共同研究施設での動物実験施設主催の動物実験講習会に本プロジェクトの動物実験担当研究員は全員受講し、動物実験に関する理念：3Rの原則を理解し、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保育並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、動物愛護の精神に基づいた十分な配慮がなされている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 著書

1) 佐藤正人：運動器疾患の予防と治療，3. 変形性膝関節症の早期診断と治療の進歩，軟骨機能診断システムによる治療効果判定。財団法人 長寿科学振興財団，97-107，2011.03.

## 2. 論文発表

1) 佐藤正人：関節軟骨を機能に基づいて正しく評価するために。HUMAN SCIENCE 22(2)，13-17，2011.04.

2) 佐藤正人：関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨の役割。整形外科 62(6)，550，2011.06.

3) Sato M，Ishihara M，Kikuchi M，Mochida J：A diagnostic system for articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation. Lasers in Surgery and Medicine 43，421-432，2011.06.

4) 佐藤正人，石原美弥，三谷玄弥，杵名寿治，菊地眞，持田讓治：ナノ秒パルスレーザーによる鏡視下関節軟骨の機能評価。整形・災害外科 54(7)，839-843，2011.06.

5) Sato M，Ishihara M，Kikuchi M，Mochida J：The influence of Ho:YAG laser irradiation on intervertebral disc cells. Lasers in Surgery and Medicine 43(9)，921-926，2011.10.

6) Lee JI，Sato M，Kim HW，Mochida J：Transplantation of scaffold-free spheroids composed of synovium-derived cells and chondrocytes for the treatment of cartilage defects of the knee. European Cells and Materials 22，275-290，2011.11.

7) 長井敏洋，佐藤正人，持田讓治：抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体投与によ

る関節軟骨修復。リウマチ科 46(4)，406-414，2011.

8) 高久裕子，村井邦彦，鶴養拓，伊藤聡，小久保舞美，小林英司，竹内護，持田讓治，佐藤正人：ラット膝関節内へ移植した細胞シートの Bioluminescence による経時的評価。臨床整形外科 47(1)，27-31，2012.01.

9) 佐藤正人，石原美弥，菊地眞，持田讓治：レーザー・光技術の整形外科領域への応用と展望。O plus E 34(2)，139-144，2012.01.

10) Ebihara G，Sato M，Yamato M，Mitani G，Kutsuna T，Nagai T，Ito S，Ukai T，Kobayashi M，Kokubo M，Okano T，Mochida J：Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. Biomaterials 33(15)，3846-3851，2012.02.

## 3. 学会発表

1) 佐藤正人：【教育研修講演】関節治療の現状と軟骨再生医療への期待。神奈川県臨床整形外科医会，横浜，2011.06.

2) 佐藤正人：【教育研修講演】変形性膝関節症に有効な治療薬 - クラゲ由来ムチンとヒアルロン酸を中心に -。第24回日本臨床整形外科学会学術集会，長崎，2011.07.

3) 佐藤正人：細胞シートによる軟骨再生医療を目指して。JSPS「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員シンポジウム「オールジャパンで目指す再生医療実用化」，東京，2011.07.

4) 佐藤正人：【ランチョンセミナー】ヒト幹細胞臨床研究への取組み方 - 軟骨細胞シートの事例から -。第26回日本整形外科学会基礎学術集会，群馬，2011.10.

5) 佐藤正人, 三谷玄弥, 金城永俊, 長井敏洋, 杓名寿治, 高垣智紀, 伊藤聡, 鶴養拓, 小久保舞美, 持田讓治: 細胞シートによる関節治療を目指したトランスレーショナルリサーチ. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

6) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 伊藤聡, 鶴養拓, 持田讓治: ウサギ膝関節前十字靭帯切離モデルを用いた抗VEGFヒト化モノクローナル抗体投与による軟骨変性予防効果の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

7) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鶴養拓, 長井敏洋, 杓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治: 積層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

8) 佐藤正人: 【特別講演】変形性膝関節症の診断と治療の進展. 第11回湘南西部リウマチ性疾患症例検討会, 神奈川, 2011.11.

9) Nagai T, Sato M, Ukai T, Kobayashi M, Mochida J : Prevention of osteoarthritis by administration of anti-VEGF antibody Bevacizumab. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, 2012.02.

10) Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Nagai T, Kokubo M, Mochida J : Analysis of functions of miR-199a-3p and miR-320c in chondrocytes. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, 2012.02.

11) 小林美由希, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 鶴養拓, 伊藤聡, 長井敏洋, 持田

讓治 : CGH(Comparative Genomic Hybridization)を用いた培養軟骨細胞の安全性評価. 第25回日本軟骨代謝学会, 愛知, 2012.03.

12) 佐藤正人: 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨再生医療. 第3回スーパー特区シンポジウム「細胞シートによる再生医療実現プロジェクト」, 東京, 2012.03.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許

1) 出願人: 株式会社セルシード, 学校法人東海大学, 発明者: 佐藤正人, 坂井秀昭, 発明の名称: 培養細胞シート、製造方法及びその利用方法, 出願番号: 特許出願 2011-175368, 出願日: 2011.7.25, 公開番号: 特許公開 2011-224398, 公開日: 2011.11.10.

2) 出願人: 学校法人明治大学, 学校法人東海大学, 株式会社バイオベルテ, 発明者: 長嶋比呂志, 佐藤正人 外4名, 発明の名称: 凍結細胞シートの製造方法, 出願番号: 特許出願 2011-260318, 出願日: 2011.11.29.

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし



### Ⅲ. 分担研究報告

## ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた 軟骨細胞シートの修復再生効果

研究分担者 海老原 吾郎 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教  
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  
三谷 玄弥 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師  
杓名 寿治 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師  
長井 敏洋 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教

研究要旨：関節軟骨は血液供給がなく、細胞密度が低いため自己修復能力が極めて低い組織であり、広範囲な損傷を受けると自然治癒は困難である。軟骨損傷に対する治療は、軟骨細胞移植術、モザイク形成術、**microfracture** 法などがその代表であるが、近年の組織再生工学の進歩とともに様々な細胞移植による関節軟骨欠損修復法が研究されている。そこで我々は温度応答性培養皿をもちいて積層化軟骨細胞シートを作製し軟骨損傷の修復再生に関する基礎的研究を行ってきた。以前、我々は家兎関節軟骨部分損傷を用いた研究で、表層部のみを積層化軟骨細胞シートで覆うことにより、良好な組織修復をもたらすことを報告した。本研究ではミニブタ関節軟骨全層欠損モデルで関節軟骨の修復再生に関する実験を行い、積層化細胞シート移植群では組織学的に **safranin-o** の染色性及び、周辺組織との **integration** も良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていた。しかし、一部の症例で家兎での実験時には見られなかったような、**safranin-o** の染色性が乏しい組織で修復される現象を見出し、それらの軟骨下骨の修復状況はいずれも不良であった。以上の結果から積層化軟骨細胞シートは関節軟骨修復に寄与すると考えられるが、動物実験モデル、培養条件、移植条件等はさらなる検討を要する。

### A. 研究目的

関節軟骨は緻密なコラーゲンネットワークとプロテオグリカンからなる細胞外基質を特徴とする硝子軟骨であり、荷重による力学的負荷に対して強い耐性を持つ組織である。しかし、血液供給がなく、細胞密度が低いため自己修復能力が極めて低い組織であり、広範囲な損傷を受けると自然治癒は困難である。特に荷重部の軟骨損傷は放置されると 2 次的に周囲の軟骨変性も惹起し、最終的には日常生活に大きな障害が出現することが多い。そこで以前より、関節軟骨損傷に対する治療は盛んに行われ、軟骨細胞移植術 (Brittberg et al., 1994)、モザイク形成術 (Matsusue et al., 1993)、

### **microfracture** 法 (Steadman et al., 1999)

等がその代表であり、比較的安定した治療成績が報告されている。しかし、一方で治療成績不良例に関する報告も散見されている (Minas and Peterson., 1999; Peterson et al., 2002; Henderson et al., 2003; Marlovits et al., 2004; Ochi et al., 2002)。

軟骨細胞移植術は、1994 年に Brittberg と Peterson ら (Brittberg et al., 1994) により報告され、全世界で既に 2 万例以上に行われているが、本手術手技の最大の問題点は、1 か所の傷を治すために軟骨採取部と骨膜採取部の 2 か所を犠牲にする点にある。また、骨膜の過形成や周辺組織との適合性等の問題も報告されている (Ochi et al.,

2002)。モザイク形成術においても健全部軟骨を使用するため採取可能なドナーの数に限界がある事、採取部の障害に関する長期経過観察の必要性などの問題点が指摘されている (Matsusue et al., 1993)。マクロフラクチャー法は骨髄から間葉系細胞の遊走を促すことにより軟骨再生を行うものであるが、再生される組織は主に硝子軟骨に比べて力学的強度の弱い線維軟骨であることが知られている (Gilbert., 1998)。

我々は、スキャフォールドを用いずに、短期間の培養で作製でき、接着性に富む積層化軟骨細胞シートを温度応答性培養皿を用いて作製し (図 1 a,b)、積層化軟骨細胞シート移植による関節軟骨の変性抑制効果を報告してきた (Kaneshiro et al., 2006; Sato et al., 2008; Mitani et al., 2009)。温度応答性培養皿を用いた再生医療の研究は現在、血管上皮細胞、角膜細胞、肝細胞、腎細胞や心筋細胞など、多方面でおこなわれている。なかでも心筋細胞や角膜細胞シートは既に臨床応用もされている (Nishida et al., 2004)。

本研究では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した。これは、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。

さらにそれら細胞シートは軟骨細胞の正常な phenotype を維持する事、proteoglycan の流出や catabolic factors の流入を防御していることを家兎を用いた実験で報告している (Kaneshiro et al., 2006)。本研究の目的は、大型動物であるミニブタ関節軟骨全層欠損モデルを用いて、積層化軟骨細胞シートの組織修復再生効果を検討することである。

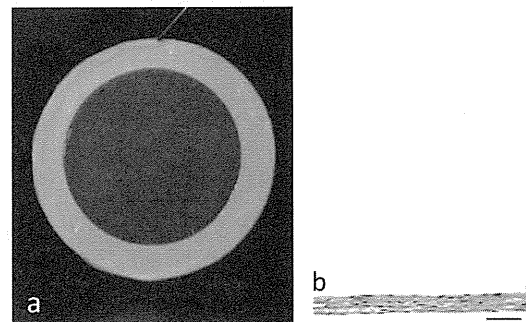


図 1

## B. 研究方法

### 温度応答性培養皿

温度応答性培養皿(provided by CellSeed, Tokyo, Japan)の作製方法を簡潔に述べると IPAAm モノマー溶液を培養皿に塗布後、直ちに電子線を照射して表面に N-イソプロピルアクリルアミドポリマー(PIPAAm)を固定化する。照射後、冷蒸留水で培養皿を洗浄し、残存モノマーおよび培養皿に結

合していない PIPAAm を取り除き、ethylene oxide gas を用いて消毒する。

#### 軟骨細胞の採取方法と分離、培養方法

5 頭のミニブタ（月齢 7-8 か月、体重 21.3-21.5kg）の膝関節の大腿側より軟骨細胞を採取した。採取した軟骨細胞は佐藤らの方法により 0.4%Pronase E (Kakenseiyaku Inc.)を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (D-MEM/F12; Gibco, NY, USA) に 1 時間、5mg/ml collagenase type 1/CLS1 (Worthington Inc., Lake wood, NJ)を含んだ DMEM/F12 に 4 時間、スターラーで攪拌しながら 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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) と 1% antibiotics -antimycotic (GIBCO, NY, USA) , 50μg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou Corp., Japan)を加えたもので 1 週間維持した。その後、軟骨細胞(50,000 cells/cm<sup>2</sup>)を温度応答性培養皿 (Size: 4.2cm<sup>2</sup> , provided by CellSeed, Tokyo, Japan)に播種し、軟骨細胞が confluence に達したら 25°Cの環境下で 30 分おき、金城らの報告に準じてシートを採取した。

#### 軟骨細胞増殖能

前述した方法で単離培養した軟骨細胞

(3.0 × 10<sup>4</sup> cells) を 24 well plate 上で培養し、MTT assay を用いて吸光度を培養 3, 5, 7 日目に測定した。

#### 軟骨細胞シートの移植方法

移植前に 0.2 mg/kg dormicum (Midazolam 5 mg/1 ml, Astellas Pharma, Tokyo, Japan) と 40 μg/kg medetomidine (Domitor 1 mg/ml, Meiji Seika Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan) を筋肉注射し、吸入麻酔には isoflurane, dinitrogen monoxide, oxygen を用いた。

12 頭のミニブタの左膝を移植群、右膝をコントロール群とした。両群とも Biopsy punch を用いて両側膝関節の大腿骨内顆非荷重部に直径 6mm、深さ 5mm の軟骨欠損を作製し、左膝にのみ積層化軟骨細胞シートを移植した。

軟骨組織の採取は 3 週間後に行い 4% PFA で 1 週間固定し、K-CX Decalcifying Solution (Fujisawa Pharmaceutical, Japan) で 1 週間かけて脱灰した。標本はパラフィンに埋め込み断面を safranin-o 染色した。

軟骨の組織学的評価として ICRS grading system 及び軟骨下骨の評価として ICRS remodeling system を用いた。

(表 1)