

MLR を参考にした。NHDC の LPS による活性化においては、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ と LPS の濃度を振ったところ、濃度依存的に活性化 T 細胞から成る芽球形成が早かった。(図 1-1) また同条件の細胞増殖測定の結果 (図 1-2)、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ では培養 4 日目が培養 5 日目よりも BrdU の取り込みが高く細胞増殖が盛んであることが分かった。さらに、培養 4 日目では 1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ の取り込み量はほぼ同じだったのに対して、培養 5 日目では 1 $\mu\text{g/ml}$ に比べ、10 $\mu\text{g/ml}$ で取り込み量の低下がみられた。これは NHDC に対する LPS 処理濃度が高い程、より早期に T 細胞が活性化されるが、T 細胞の増殖には限りがあり、早期に増殖が活発である程、後期の増殖率が落ちたためと考えられる。一方、0.1 $\mu\text{g/ml}$ は培養 5 日で 1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ の培養 4 日目と同じ程度の取り込み量になっていた。LPS 処理はより低濃度でやるのが望ましいことから、以降 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS で刺激した NHDC を MLR の系に用い、T 細胞増殖は共培養 5 日目に評価することにした。

2. NHAC が同種 CD4+TC に及ぼす影響の検討

陽性コントロールである MLR に対して CD4+TC と NHAC を共培養した系では、MLR の T 細胞増殖活性を 100%とした場合、その約 3.6%の増殖活性しか観察されなかった。(図 2)

3. NHAC が MLR に及ぼす影響の検討

MLR の写真では T 細胞が芽球形成しているのに対して、MLR と NHAC の共培養

の写真では T 細胞の芽球形成はほとんど観察されなかった。(図 3.A) 一方、細胞増殖解析ではコントロールの MLR での T 細胞増殖活性を 100%とした場合、その増殖活性は 5%以下になっていた。(図 3.B)

4. セルカルチャーインサートを用いた MLR と NHAC の共培養における検討

市販 NHDC を用いた MLR は NHDC を成熟させるために MLR の 1~3 日前に播種する必要がある。しかしながら、成熟した NHDC は培養容器に強固に接着してしまうことから、同一ウェルで積層化 NHAC シートと MLR を共培養するためには、反応当日に予め NHDC を播種しておいたセルカルチャーインサート内に CD4+TC を播種し (MLR)、そのインサートを積層化 NHAC シートが静置されたウェルに入れて培養する必要がある。一方、免疫調節効果を有することが示されている間葉系幹細胞 (MSC) は、活性化 T 細胞を抑制する際、物理的接触を介する抑制と、液性因子を介する抑制があることが報告されている。さらに MSC を活性化 T 細胞とセルカルチャーインサートで物理的に分けても、その T 細胞増殖抑制効果は両者が接触する場合より低下するが、維持されていることも示されている。そこで、まず NHAC が、セルカルチャーインサートで物理的に分離されても、MLR における T 細胞の増殖を抑制できるか検討した。(図 4) その結果、やはり直接接触する条件で共培養した場合 (図 3) より抑制の程度は低下するが、MLR のみに比べて T 細胞の増殖を五割以下(48.9%)まで

抑制していた。

5. セルカルチャーインサートを用いた MLR と積層化 NHAC シートにおける共培養の検討

積層化 NHAC シートが活性化 T 細胞の増殖を抑制する能力を維持しているか検討した結果、積層化していない NHAC と同程度(47.6%)の抑制効果を維持していることが分かった。(図 5)

D. 考察

本研究では、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、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。昨年度、マウス軟骨細胞が同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の細胞増殖も抑制することを示した。そこで、今年度は対象を市販正常ヒト膝関節軟骨細胞(NHAC)にし、*in vitro* において免疫細胞に対してマウス軟骨細胞と同様に活性化抑制効果を有しているのか検討した。まず、CD4+TC に対する同種 NHAC の影響をみたところ、陽性コントロールである MLR の T 細胞増殖活性に対して NHAC と共培養した T 細胞増殖活性は 4%以下と有意に低かった。(図 2) このことは NHAC が同種 T 細胞の活性化(細胞増殖)をほとんど誘発しないことを示唆している。また、NHAC と MLR の共培養の結果から NHAC は活性化 T 細胞の増殖を抑制できることが分かった。(図 3, 4) さらに、積層化 NHAC シートでも、その抑制効果が維持されてい

ることが示された。(図 5)

以上のことから、ヒト同種積層化軟骨細胞シートの移植は、宿主の免疫細胞の活性化を惹起しないだけでなく、炎症部位における免疫細胞の活性化を抑制できる可能性が示唆された。また、セルカルチャーインサートを用いて物理的に軟骨細胞や積層化軟骨細胞シートを活性化 T 細胞と分離して培養しても、その増殖活性を半減させたことから、抑制効果の一部には液性因子の関与が示唆された。その候補因子の一つとして、MSC で抑制効果に関与が示唆されている TGF- β が考えられる。TGF- β は軟骨細胞分化に重要な役割を果たすだけでなく、積層化軟骨細胞シートでは、その発現上昇が観察されている。他の因子と協調して抑制効果を発揮している可能性はあるが、軟骨細胞や積層化軟骨細胞シートが有する活性化 T 細胞の増殖抑制効果に TGF- β が関与するかを確認するためには、共培養系上清中の TGF- β の経時的測定や、共培養系へ抗 TGF- β 抗体を添加することにより抑制効果が相殺されるかなどを検討する必要がある。

E. 結語

関節軟骨損傷の治療には自己だけでなく、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。

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

なし

2. 論文発表

1) Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, Morita R, Kato R, Okamoto F, Saeki K, Nomura M, Nojima Y, Yoshimura A. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1. *Genes Cells*. 16, 803-814 (2011)

2) Yeon Suk Jung, Kato R, Tsuchiya T. Biodegradable polymers induce CD54 on THP-1 cells in skin sensitization test. *International Journal of Biomaterials* 2011.

3. 学会発表

1) 加藤玲子, 齋島由二, 長谷川千恵, 松岡厚子 「異なる表面処理を施したチタンプレート上で培養したヒト間葉系幹細胞のタンパク質発現解析」第33回日本バイオマテリアル学会 (2011. 11)

2) 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子 「チタン系金属, 合成高分子等の医用材料上で培養した CHL 細胞の細胞毒性および遺伝毒性」第33回日本バイオマテリアル学会 (2011. 11)

3) Kato R, Haishima Y, Hasegawa C, Matsuoka A. Comparison of protein expression profiles in human mesenchymal stem cells cultured on surface-modified titanium with chemical treatments. The 51st Annual Meeting of the Societ

y of Toxicology (2012.3)

4) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Okada E, Matsuoka A. Cytotoxicity studies in A549 cells cultured on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3)

5) 宮島敦子, 酒井恵子, 河上強志, 加藤玲子, 松岡厚子, 尾崎正康, 宇佐見誠, 伊佐間和郎「A549細胞を用いたナノマテリアルの in vitro 生体影響評価系の検討」日本薬学会 第132年会 (2012.3)

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

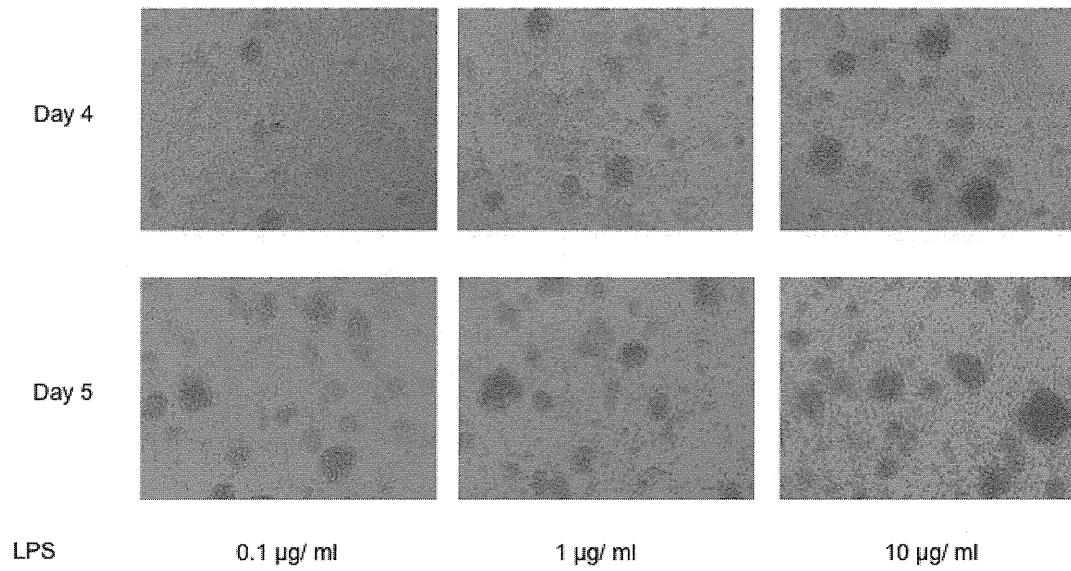


図1-1. MLRIにおけるNHDC刺激LPS濃度検討 -写真-

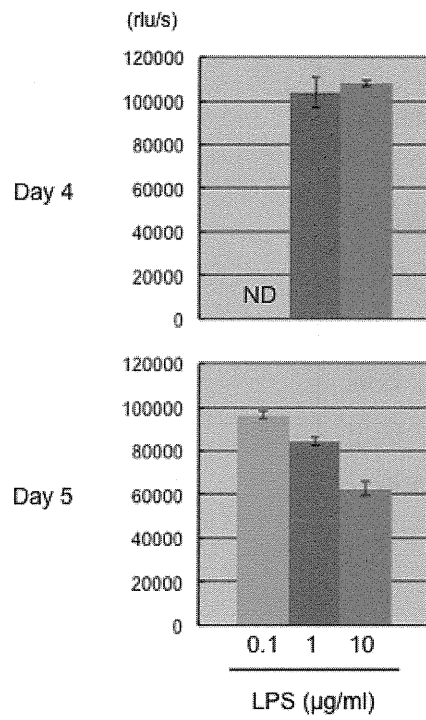


図1-2. MLRIにおけるNHDC刺激LPS濃度検討 -T細胞の増殖-

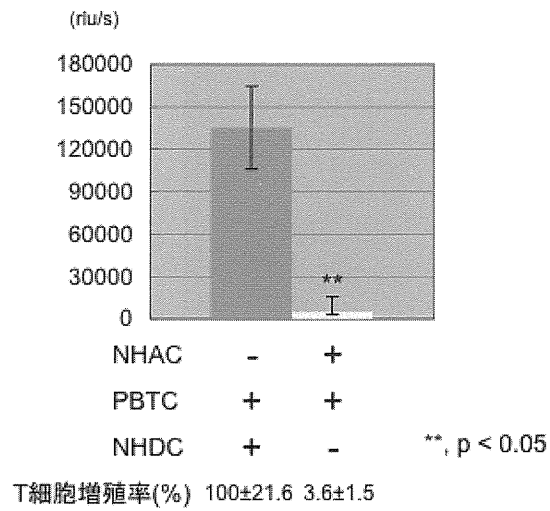


図2. NHACは同種T細胞を活性化しない

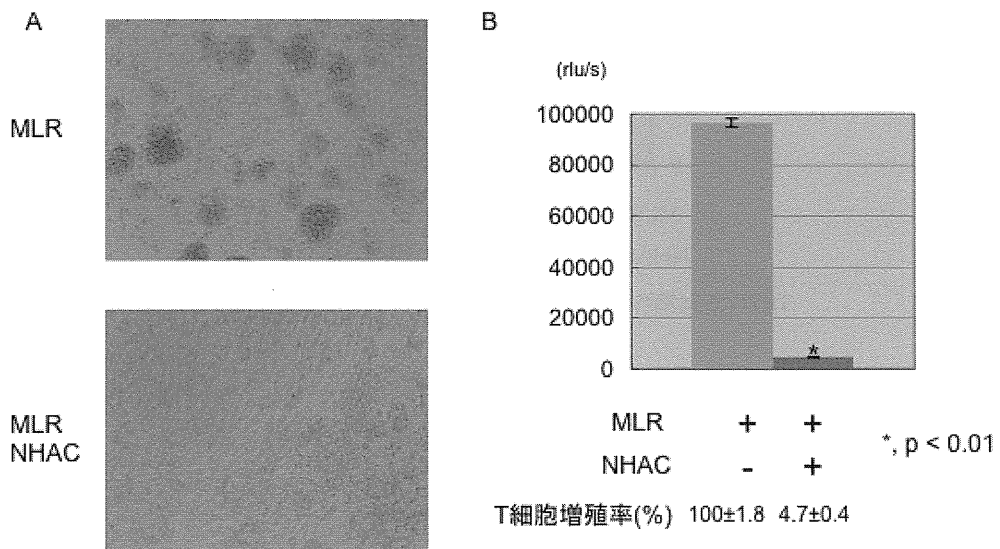


図3. NHACは同種MLRの反応を抑制する

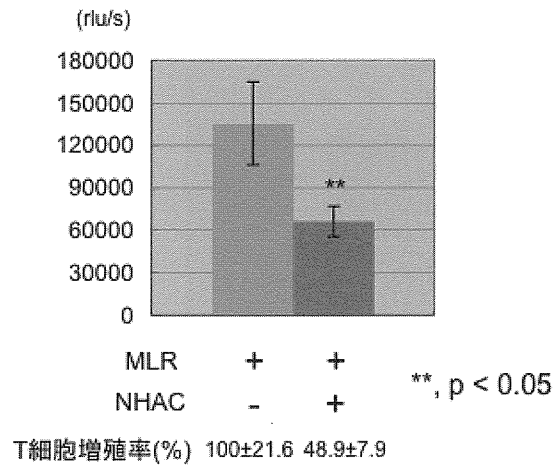


図4. NHACはセルカルチャーインサートを用いて物理的に分離したMLRの反応も抑制できる

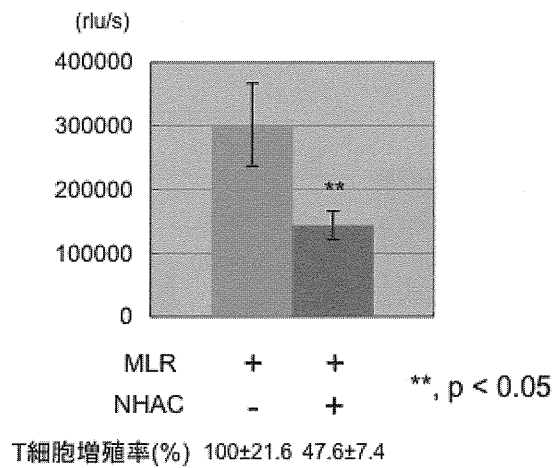


図5. 積層化NHACシートはセルカルチャーインサートを用いて物理的に分離したMLRの反応も抑制できる

軟骨細胞における miR-199a-3p, miR-320c の機能

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
生殖・細胞医療研究部 生殖技術研究室・室長
研究協力者 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
研究協力者 鵜養 拓 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生

研究要旨：miRNA は 22 塩基前後の小さな RNA であり翻訳を抑制することにより遺伝子発現を制御し個体の成長、分化、アポトーシスに関与している。また miRNA は臓器特異的にも発現が認められており軟骨特異的に発現しているものも報告されている。我々は以前軟骨細胞において年齢と共に発現が上昇・減少していく 3 種類の miRNA を同定した。本研究では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幼弱性に関与していると考えられた。

A. 研究目的

変形性関節症（以下 OA）は関節の軟骨が変性や消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。厚生労働省国民生活基礎調査によると要支援患者の原因疾患第 1 位は関節症である。OA は直接生命を脅かす疾患ではないが ADL に著しい障害を及ぼし健康寿命に多大な影響を与えている。疫学調査などから OA は遺伝的因子と環境因子の相互作用により発症する多因子遺伝病、生活習慣病であることが明らかとなっている。また、最近では遺伝子の上流で発現を制御している MicroRNA（以下 miRNA）についても注目されている。miRNA は 20 塩基前後の 1 本鎖ノンコーディング RNA であり翻訳を抑制することにより遺伝子発現を制御している。我々は以

前軟骨細胞において年齢と共に発現が上昇・減少していく 3 種類の miRNA を同定した。本研究では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。

B. 研究方法

患者

東海大学医学部付属病院臨床研究審査委員会承認のもと 2010 年 4 月～2011 年 6 月の期間東海大学病院で変形性膝関節症と診断され人工膝関節置換術施行された患者 17 例（60 歳～79 歳 平均 73.35 歳）、前十字靭帯損傷と診断され前十字靭帯再建術を施行された 3 例（15～31 歳 平均 22 歳）、2010 年 1 月～2010 年 2 月に国立生育医療

研究センター研究所で多指症と診断され形成術を施行された6例（11ヶ月～1歳1ヶ月 平均1歳1ヶ月）の軟骨組織を使用した。

軟骨細胞の分離と培養

採取した軟骨組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細分し 0.05% collagenase TYPE1(Washington, New Jersey, USA)含有ダルベッコ変法イーグル培地 F12(F12/DMEM; Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)にて4時間の酵素処理を行った。酵素処理を行った軟骨組織を cell strainer (BD Falcon TM) with a pore size of 100 μm に通し細胞を遠沈回収した。軟骨細胞は 1×10^4 cells/cm² で播種 DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)の培地を使用し培養、4日目以降はさらに 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid (Wako junyakukougyou Corp. Japan)を加えたもので維持した。全ての培養は 37 度、5% CO₂、95% O₂ の条件下で行った。

cDNA 合成

培養した軟骨細胞を PBS で 2 回洗浄後 700 μl の QIAzol Lysis Regent(QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA) で溶解し miRNeasy minikit (QIAGEN)を用いてプロトコール通りに RNA を抽出。miScript Reverse Transcription kit(QIAGEN)を使用し抽出した RNA のうち 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と

miScript RT Buffer 4 μl , miScript Reverse Transcriptase Mix 1 μl , RNase Free Water を混ぜ 37 度で 60 分、95 度で 5 分置いて作製した。

Real time PCR

miRNA 確認用 PCR は miScript Primer Assay kit(QIAGEN), miScript SYBR Green PCR kit (QIAGEN) を用いて QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 25 μl , miScript Universal Primer 5 μl , miScript Primer Assay 5 μl , RNase Free Water 適量, template cDNA を混ぜ 95 度 15 分、94 度 15 秒、55 度 30 秒、70 度 30 秒 (40 サイクル) 95 度 15 秒、60 度 30 秒、95 度 15 秒(dissociation step)の条件で行った。計算は Glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を用いて標準化し、発現量を $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 値で求めた。

遺伝子発現確認用の PCR は SYBER GREEN Master Mix 12.5 μl , Primer Front 0.5 μl , Primer Reverse 0.5 μl , cDNA 1 μl , DW 10.5 μl を混ぜ 50 度 2 分、95 度 10 分、95 度 15 秒、60 度 1 分 (60 サイクル) 95 度 15 秒、60 度 30 秒、95 度 15 秒(dissociation step)の条件で行った。計算は Glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いて標準化し $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 値を求めた。Real time PCR では aggrecan, ADAMTS5, Type 1 collagen, Type2 collagen, SOX9, MMP3, MMP13 の遺伝子発現を確認した。Real time PCR で用いたプライマーは table1 で示した配列を

使用した。(Table. 1)

MTT assay

Make 10X stock solution by dissolving 4mg/ml in DMEM High Glucose1×(Invitrogen), cartilage cells were seeded into 24-well plates at 4.0×10^4 cells/cm². Before adding MTT solution, remove DMEM medium completely and wash with PBS one time. Add 500 μ l of MTT solution to each in 24 well plate. Incubate for 2 hours at 37 °C in dark. After incubation, remove MTT solution; add 300 μ l of DMSO to each well. Transfer 100 μ l of above to each well in 96 well plate, measure absorbance at 590 nm.

miRNA の過剰発現

QIAGEN 社製合成 2 本鎖 RNA (Syn-rno-miR-199a-3p miScript miRNA Mimic, Syn-rno-miR-193b miScript miRNA Mimic, Syn-rno-miR-320c miScript miRNA Mimic) を用いて 24 well プレートに 10×10^4 で播種後 2nM の溶液とし 6 時間 37 度、5% CO₂、95% O₂ の条件で培養した。

miRNA の発現抑制

QIAGEN 社製 Anti-hsa-miR-199a-3p miScript miRNA inhibitor, Anti-hsa-miR-193b miScript miRNA inhibitor, Anti-hsa-miR-320c miScript miRNA

inhibitor を用いて 24 well プレートに 10×10^4 cells/cm² で播種後 20 nM の溶液とし 6 時間 37 度、5% CO₂、95% O₂ の条件で培養した。

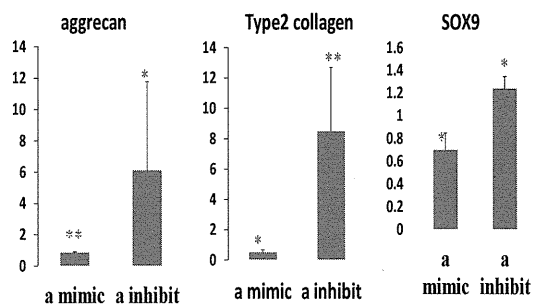
Statistical analysis

Real time PCR、MTT assay の統計学的評価は多重検定のノンパラメトリック法である STEEL 検定を用いた。

C. 結果

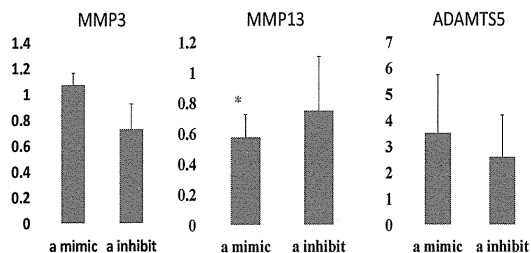
年齢と共に発現が上昇していく miR-199a-3p は mimic 群で aggrecan, Type2 collagen, SOX9 の発現が減少し、反対に inhibit 群では発現が上昇していた。

miR-199a-3p

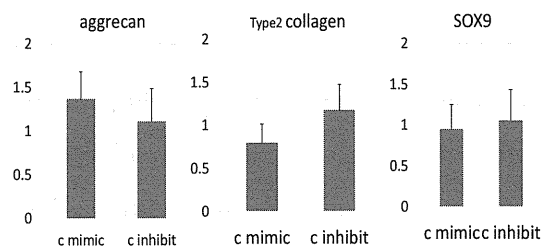


Catabolic factor である MMP3, MMP13, ADAMTS5 などでは mimic 群・inhibit 群両群において有意差を認めるものはなかった。

miR-199a-3p



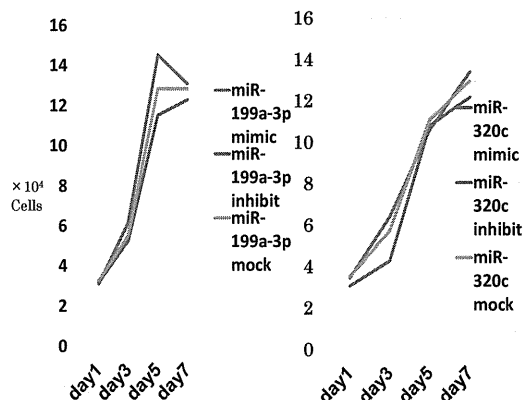
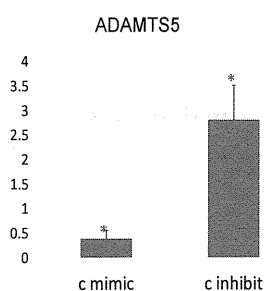
miR-320c



年齢と共に発現が減少していく miR-320c は mimic 群で ADAMTS5 の発現が減少し、inhibit 群で発現が上昇していた。

2 種類の miRNA と細胞増殖能を評価するため MTT assay を行ったところ両群共に有意差を認めなかった。

miR-320c



anabolic factor である aggrecan, Type2 collagen, SOX9 などでは mimic 群・inhibit 群両群において有意差を認めるものはなかった。

D. 考察

miRNA は 22 塩基前後の non-coding RNA でありターゲットとする mRNA の非翻訳部である 3' 末端と結合する。miRNA は転写後抑制や mRNA 変性を誘導し遺伝子発現を調整することにより細胞増殖、分化、発育、腫瘍形成に関与している。Lee らにより最初の miRNA が報告されて以来数百もの miRNA が植物や動物などで発見されている [1]。

また、miRNA は臓器や組織での分化や成長に重要な役割を果たしており、軟骨特異的に発現する miRNA についての報告もされている [2]。

miR-199a は Wnt の canonical 経路の receptor であり軟骨分化の制御に重要で BMP2 シグナルに関与している遺伝子である Fzd6(frizzled homolog6), Id4(inhibitor of DNA binding)などの遺伝子を target にしている可能性がある [3-6]。また、BMP 下流の mediator である Smad1 転写因子を抑制することにより早期軟骨分化を抑制しているとの報告がある [7-10]。

Edward らはマウス関節軟骨細胞を用いた実験モデルにおいて miR-199a 発現亢進群ではコントロール群と比べ Col2A1, COMP, SOX9 の発現が低下しており、反対に発現抑制群でこれらの発現が上昇しているとの報告をした [7]。これらの報告は今回 PCR の結果とも矛盾していなかった。Real time PCR の結果から、miR-199a は aggrecan, Type2 collagen, SOX9 などの anabolic factor を制御することで軟骨発育や軟骨代謝に関与している可能性が考えられた。

miR-320c は糖尿病などとの関係性が報告されているが軟骨との関連は今まで報告されていない [11]。

OA における軟骨の変性、破壊には蛋白分解酵素が関与し、なかでも活性の発現に 2 価金属イオンを必要とするアグリカナーゼが重要とされている。アグリカナーゼは関節軟骨の主要構成要素であるアグリカン

の分解に寄与しており、ノックアウトマウスの研究から ADAMTS-5 がとりわけ重要であることが明らかにされている [12]。

PCR の結果より miR-320c は mimic 群で ADAMTS5 発現が抑制され、inhibit 群で ADAMTS5 が上昇していたことから ADAMTS5 を介して軟骨細胞の代謝に影響を与えている可能性が考えられた。

E. 結論

今回の結果から miR199a-3p, miR-320c の今後の有用性としては軟骨変性のマーカーや軟骨移植時のドナー組織としての評価などに有用であると考えられた。

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. 参考文献

1. B.P Lewis, C.B Burge, D.P Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell120(2005)15-20.
2. E.A Lin, C.J Liu, MicroRNAs in skeletogenesis. Frontiers in Bioscience 14(2009)2527-2764.
3. J Chimal-Monroy, J.A Montero, Y Ganan, D Macias, J.A Garcia-Porrero, J.M Hurle. Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass cultures. Dev Dyn,

224(2002)314-320.

4. V.L Church, P Francis-West, Wnt signalling during limb development. *Int J DEV Biol.* 46(2002)927-936.

5. C Hartmann, C.J Tabin, Wnt-14 plays a Pivotal Role in Inducing Synovial Joint Formation in the Developing Appendicular Skeleton. *Cell.* 104(2001) 341-351.

6. M Lako, S Lindsay, P Bullen, D.I Wilson, S.C Robson, T Strachan. A novel mammalian wnt gene, WNT8B, shows brain-restricted expression in early development, with sharply delimited expression boundaries in the developing forebrain. *Hum Mol Gnet*7(1998)813-822.

7. E.A Lin, L Kong, X.H Bai, Y Luan, C.J Liu. miR-199a, a Bone Morphogenic Protein 2-responsive MicroRNA, Regulates Chondrogenesis via Direct Targeting to Smad1. *The Journal of Biological Chemistry* 284(2009)11326-11335.

8. M.N Poy, L Eliasson, J Krutzfeldt, S Kuwajima, X Ma, P.E Macdonald, S Pfeffer, T Tuschl, N Rajewsky, P Rorsman, M Stoffel. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432(2004)226-30.

9. D Chen, M Zhao, S.E Harris, Z Mi. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci*9(2004)349-358.

10. D Chen, M Zhao, G.R Mundy. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(2004):233-241.

11. H.Y Ling, H.S Ou, S.D Feng, X.Y Zhang, Q.H Tuo, L.X Chen, B.Y Zhu, Z.P Gao, C.K Tang, W.D Yin, L Zhang, D.F Liao. CHANGES IN microRNA(miR) PROFILE AND EFFECTS OF miR-320 IN INSULIN-RESISTANT 3T3-L1 ADIPOCYTES. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 36(2009)e32-e39

12. M.K Majumdar, R Askew, S Schelling, N Stedman, T Blanchet, B Hopkins, E.A Morris, S.S Glasson. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56:11(2007):3670-3674

H. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

1) Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.

2) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H,

- Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 1, Article number: 68
- 3) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram.* 2011;13(4):361-370.
- 4) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem.* 2011;286 (23):20345-20353.
- 5) Nishino K, Toyota M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 2011;7 (5):e1002085.
- 6) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylIGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 2011;11:22.
- 7) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11593-11603.
- 8) Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells.* 2011;16(1):1-11.
- 9) 阿久津英憲, 草川森士, 梅澤明弘:「ヒトES細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫, 41(4):68-72, 2011.
- 10) 三浦巧, 阿久津英憲:「目で見る生殖と再生 iPS細胞 (図説)」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18 (3):232-236, 2011.
- 11) 阿久津英憲, 佐藤俊, 秦健一郎:「ARTによる出生時の問題 児のエピジェネティクス異常との関連」臨床婦人科産科, 65(6):770-776, 2011.
3. 学会発表

- 1) Akutsu H. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16th May, 2011.
 - 2) 阿久津英憲：「エピゲノムの基礎知識」エピゲノムワークショップ（座長；河野友宏、阿久津英憲）第52回日本哺乳動物卵子学会，大田原，5月21日，2011年
 - 3) 阿久津英憲：「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第84回大会，東京，5月28日，2011年
 - 4) 阿久津英憲：「難治性疾患に挑む ES/iPS 細胞の可能性」小児交互性片麻痺親の会2011年度全体会，大阪，8月6日，2011年
 - 5) Akutsu H. “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization”, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13th Sep, 2011.
 - 6) 阿久津英憲：「ヒト ES/iPS 細胞の疾患モデリング研究への応用」岐阜大・岐阜薬科大連携脳卒中・ALS セミナー，岐阜，10月20日，2011年
 - 7) 阿久津英憲：「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所，つくば，11月7日，2011年
 - 8) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作製技術の報告（米国）について」第64回生命倫理専門調査会，中央合同庁舎第4号館第2特別会議室，1月17日，2012年
 - 9) 阿久津英憲：「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第15回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会，厚生労働省 17階 専用第18-20会議室，1月25日，2012年
 - 10) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作成技術について～SCNT法による3倍体 ES 細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会（第80回），文部科学省16階 特別会議室，1月25日，2012年
 - 11) 阿久津英憲：「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオロジクスフォーラム第9回学術集会，東京 タワーホール船堀，2月22日，2012年
- I. 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

細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命学科発生工学研究室 教授

研究要旨：東海大学で開発され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ができるであろう。

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の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの凍結保存法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞（株式会社プライマリーセル）を 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI で温度応答性培養皿（Up cell; cell seed 社）にて 3 週間培養し、薄層（1 層）形成を確認した後に Cell shifter (cell seed 社) を用いて 3 層に積層化し、1 週間追加培養した。

2. 細胞シートの凍結保存

前年までと同じく、MVC ガラス化法 (Kuwayama et al., 2005) を改変して、細胞シートの凍結保存に適用した。細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には 10% DMSO および 10% ethylene glycol を、ガラス化液

には 20% DMSO および 20% ethylene glycol を用いた。さらに、細胞非浸透性の凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5M sucrose および 10% ポリリジン誘導体（カルボキシル基導入ポリリジン）を加えた。用いるガラス化液の量を最小化し（特許出願）ガラス化の際は、細胞シートを液体窒素蒸気中に保持した（新規法）。比較の目的で、シートを培養するシャーレ内の培地をガラス化液（約 2ml）で置換してガラス化する方法（従来法）も試行した。融解は細胞シートを 38.5℃ の加温盤上に静置して行った。引き続きシートを 1M、0.5M、0M sucrose を含む 20mM HEPES 緩衝 TCM199（20% FBS 添加）に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

融解後の細胞シートをコラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

また、ガラス化・融解後の細胞シートの表面微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

C. 結果

1. ガラス化された細胞シートの形態変化と細胞生存性

前年度に液体窒素ガス中で細胞シートをガラス化することで、シート構造の亀裂や破断を防ぐことが出来ることを見出した。非浸透性凍害保護剤としてポリリジン誘導体(PLL)の有無がシート構造の保護および細胞生存性に及ぼす影響をさらに詳細に検討した。

表 1 に示す通り、3 種のロットの細胞を用いて実験を行った。10%PLL 存在下でガラス化を行った場合、供試した合計 8 例のシート全てが損傷なく融解後に回収された。細胞シートの構成細胞の生存性は、非ガラス化試料と同等であった(90.7% vs 95.2%)。一方、PLL 非存在下で細胞シートのガラス化を行った場合は、実験に供した 8 例中 7 例(87.5%)が、融解時には著しい損傷（亀裂・破断）を受けていた（図 1）。ただし、PLL 非存在下でガラス化を行った場合も、細胞生存性の低下は見られなかった(91.3%)。

従来法においても、ガラス化液中に PLL を含む場合は、実施した 2 例中 2 例とも細胞シートの亀裂・破損は起こらなかったが、融解後の細胞の生存性はやや低下する傾向であった(78.8%)。一方、PLL を含まない場合には、ガラス化時に亀裂が生じ、シートの損傷は避けられないことが明らかとなった（表 2）。

2. パッケージング法によりガラス化され

た細胞シートの生存性

ガラス化した細胞シートの保管を考慮し、パッケージング法を開発した。ガラス化液には 10%PLL を含む液を用いた。表 3 に示す通り、合計 3 例のシートをガラス化した結果、全例が亀裂・破断なく融解・回収された。融解後の細胞生存率は高く保たれていた(87.2%)。

3. ガラス化された細胞シート表面および断面構造の走査型電顕像

図 2 に示す様に、PLL 存在下でガラス化された細胞シートの表面及び断面構造の走査型電顕像は、非ガラス化試料と比較して差は無かった。パッケージング法および従来法でガラス化されたシートに関しても、シート構造の破綻は見られず、非ガラス化との差は無かった。シートの上面（重層化の培養時に cell shifter に接していた面）には、軟骨と思われる顆粒状構造の形成が認められた（黄色矢印部分）。下面（培養時にディッシュに接していた面）は、上面よりも繊維状組織が密になっていることが分かった。

D. 考察

前年度には PLL 存在下において、液体窒素ガス中で細胞シートをガラス化し得ることを見出した。今年度は、3 種のロットの細胞シートを用いて実験を反復し、再現性高くシートをガラス化できることが確認された。さらに、細胞シートをパッケージングした状態でガラス化する方法も開発した。

凍結細胞シートの臨床応用に際しては、保存中の安定性や汚染防止の観点から、適当な素材で被覆すること、すなわちパッケージングが必要であろう。本研究では、試験段階として市販のポリ塩化ビニリデン製ラップ（食品用）を用いて、細胞シートのガラス化を行った。パッケージング法においても、ガラス化状態が安定で、かつ融解時に氷晶形成が起こらないことから、この方法は十分に機能的であると判断された。今後は、よりパッケージングに適した素材の探索と、実用的なパッケージング工程や器材の開発が重要であろう。

本研究の結果を総合すると、以下の点が明らかとなった。

- 1) ポリリジン誘導体を非浸透性凍害保護剤に用いることでガラス化状態が安定し、ガラス化・融解に伴うシートの破損が顕著に抑制される。
 - 2) 液体窒素蒸気中でシートを保存することにより、シートの破損を回避することができる。
 - 3) 作製したシートに重層化のムラや欠損孔がある場合は、ガラス化時にシートに亀裂が生じる可能性があるが、良好な構造を持ったシートであれば、本研究で開発した方法により再現性高くガラス化することが可能である。
 - 4) パッケージングを伴う方法においても、細胞シートのガラス化が可能である。
- またこの方法には、脆弱な細胞シートを保護する効果もあると考えられる。

E. 結論

本研究より、細胞シートの臨床応用実現化において、シートの長期間保存の可能性が示された。今後は凍結保存後のシートの機能解析が必要である。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) Nagashima H, Matsunari H, Umeyama K: Creation and conservation of genetically modified pigs: applications to genetic disease model and xenotransplantation. In: The Minipig in Biomedical Research. Edited by McAnulty PA, Dayan AD, Ganderup NC, Hastings KL: CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 2011: 415-430.
- 2) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H. Cloning of homozygous α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Xenotransplantation. Edited by Miyagawa S: InTech, Rijeka, Croatia; 2012: 37-54.

2. 論文発表

- 1) Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A,

- Nakauchi H, Nagashima H: The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. *Transgenic Research* 2011, DOI 10.1007/s11248-011-9561-3.
- 2) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H : Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Molecular Reproduction and Development* 2011, 79:218-228.
- 3) Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kroner C, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritz K, Gruber AD, Wolf E: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *Journal of Molecular Medicine* 2011. DOI10.1007/s00109-011-0839-y.
- 4) Klymiuk N, Böcker W, Schönitzer V, Bähr A, Radic T, Fröhlich T, Wünsch A, Keßler B, Kurome M, Schilling E, Herbach N, Wanke R, Nagashima H, Mutschler W, Arnold GJ, Schwinzer R, Schieker M, Wolf E: First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB Journal* 2011, 26:1086-1099.
- 5) Kemter E, Lieke T, Kessler B, Kurome M, Wuensch A, Summerfield A, Ayares D, Nagashima H, Baars W, Schwinzer R, Wolf E: Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* 2011, 19:40-51.
3. 特許出願
特願2011-260318
「凍結細胞シートの製造方法」
4. 学会発表
国際学会
- 1) Bahr A, Burck L, Wunsch A, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Seissler J, Klymiuk N, Wolf E: Establishment of LEA29Y transgenic donor pigs for xenotransplantation. In: *Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.*
- 2) Bahr A, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: Determination of transgene integration loci by inverse PCR for multi-transgenic pig breeding. In: *Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.*
- 3) Klymiuk N, Wunsch A, Wallner K, Burkhardt K, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Wolf E: Efficient targeting

of genomic loci in the pig and production of knockout pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

4) Klymiuk N, W. B, T. R, Bahr A, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Herbach N, Nagashima H, Schwinzer R et al: Tet-controlled transgene expression in large animal models. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

5) Matsunari H, Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S, Iwai S, Medin JA, Watanabe M, Umeyama K, Sato Y, Nakano K, Maehara M, Nagashima H, Kobayashi E: A challenge to developing humanized kidney using porcine renal Anlagen as scaffold. In: Swine in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

6) Umeyama K, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Takeuchi Y, Honda K, Yokoo T, Nagashima H: Development of genetically modified pigs suitable for diabetes and its complications research. In: Swine in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

7) Renner S, Braun C, Klymiuk N, Blutke A, Herbach N, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Puk O, Nagashima H et al: Phenotypic characterization of diabetic

INSC94Y transgenic pigs. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

8) Renner S, Klymiuk N, Streckel E, Braun C, Landbrecht-Schessl C, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Aigner B et al: Transgenic pigs expressing the mutant insulin C93S for the study of pancreatic beta cell dysfunction. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

9) Kawano H, Ezoe K, Kagawa N, Yabuuchi A, Ochiai K, Nagashima H, Osada H, Aono F, Takehara Y, Kato O: hHg is critical for the uterine decidual response in mice. In: 16th World Congress on In Vitro Fertilization: 10-13 Sep 2011; Tokyo.

10) Honda K, Takeuchi Y, Matsuda T, Kanai T, Maehara M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Establishment of in vitro fertilization protocol using cryopreserved epididymal sperm for proliferation of genetically modified pigs. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.

11) Maehara M, Honda K, Nakano K, Matsunari H, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Hagiwara Y, Sasayama N,

- Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: In vitro-maturation/fertilization derived porcine morulae can give rise to efficient piglet production following vitrification by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 12) Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification (HFV) method: a novel high performance embryo cryopreservation method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 13) Nakano K, Matsunari H, Maehara M, Takeuchi Y, Ogawa B, Matsuda T, Kanai T, Honda K, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta A, Takahashi M, Nagashima H: High performance cryopreservation of porcine embryos by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 14) Klymiuk N, Wuensch A, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: GalT-KO/CD46/hTM triple-transgenic donor animals for pig-to-baboon heart transplantation. In: Joint Congress CTS-IXA 2011: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.
- 15) Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K: Prevention of hyper-acute pulmonary xenograft dysfunction using GalT-KO swine in an ex-vivo lung perfusion model. In: CTS-IXA 2011 Joint International Congress: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.
- 16) Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Gungör T, Richter A, Klymiuk N, Nagashima H, Wolf E: Embryos produced by serial nuclear transfer can be improved by treatment with histone deacetylase inhibitors. In: 38th Annual Conference of International Embryo Transfer Society: 7-10 Jan 2012; Phoenix, USA.
- 17) Takeuchi H, Enomoto H, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing Kusabira-Orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: 2012 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society: 4-7 Feb 2012; San Francisco, California, USA.

国内学会