

25. Nieminen MT, Rieppo J, Töyräs J, Hakumäki JM, Silvennoinen J, Hyttinen MM, Helminen HJ, Jurvelin JS. T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: A comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magn Reson Med* 2001;46:487–493.
26. Xia Y, Moody JB, Burton-Wurster N, Lust G. Quantitative in situ correlation between microscopic MRI and polarized light microscopy studies of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:393–406.
27. Bashir A, Gray ML, Hartke J, Burstein D. Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med* 1999;41:857–865.
28. Nieminen MT, Rieppo J, Silvennoinen J, Töyräs J, Hakumäki JM, Hyttinen MM, Helminen HJ, Jurvelin JS. Spatial assessment of articular cartilage proteoglycans with Gd-DTPA-enhanced T(1) imaging. *Magn Reson Med* 2002;48:640–648.
29. Ishihara M, Sato M, Sato S, Kikuchi T, Fujikawa K, Kikuchi M. Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic measurement. *Jpn J Appl Phys* 2003;42:556–558.
30. Ishihara M, Sato M, Sato S, Kikuchi T, Mitani G, Kaneshiro N, Mochida J, Kikuchi M. Usefulness of the photoacoustic measurement method for monitoring the regenerative process of full-thickness defects in articular cartilage using tissue-engineering technology. *Progress in biomedical optics and imaging. Proc SPIE* 2005;5695:288–291.
31. Ishihara M, Sato M, Sato S, Kikuchi T, Mochida J, Kikuchi M. Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of biomechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2005;11:1234–1243.
32. Ishihara M, Sato M, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M. Multifunctional Evaluation of Tissue Engineered Cartilage Using Nano-Pulsed Light for Validation of Regenerative Medicine. In: Kim SI, Suh TS (editors). IFMBE Proceedings, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 14; August 27–September 1; COEX Seoul, Korea. Springer: Berlin, Heidelberg, 2006: 3187–3189.
33. Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N, Mitani G, Sato S, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M. Development of a noninvasive multifunctional measurement method using nanosecond pulsed laser for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage. *Proc SPIE* 2006;6084:60840V.1–60840V.4.
34. Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N, Mitani G, Nagai T, Kutsuna T, Mochida J, Kikuchi M. Usefulness and limitation of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and characterization using nanosecond pulsed laser. *Proc SPIE* 2007;6439:643909.1–643909.4.
35. Ishihara M, Sato M, Mitani G, Mochida J, Kikuchi M. Monitoring of extracellular matrix formation using nanosecond pulsed laser. *J Inst Elect Engrn Jpn* 2007;127-C:2166–2170.
36. Ishihara M, Sato M, Mochida J, Kikuchi M. Measurement and image engineering for fundamental technology of regenerative medicine. In: Akaike T, ed. *Regeneration Medicine 4, Bioengineering for Regeneration Medicine*. Tokyo: Corona Publishing 2007: 147–167.
37. Ishihara M, Sato M, Mochida J, Kikuchi M. Noninvasive measurement for the evaluation and validation of regenerative medicine. *J Biosci Biotechnol* 2007;85:438–441.
38. Ishihara M, Sato M, Kutsuna T, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M. Modification of measurement methods for evaluation of tissue engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser. *Proc SPIE* 2008; 6558:685805.1–685805.5.
39. Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N, Mitani G, Sato S, Mochida J. Development of a photoacoustic measurement method for the evaluation of regenerative medicine and tissue engineering for articular cartilage. *J Jpn Soc Laser Surg Med* 2005; 26:53–59.
40. Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N, Mitani G, Sato S, Mochida J. Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method. *Lasers Surg Med* 2006;38:249–255.
41. Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Kaneshiro N, Nagai T, Mitani G, Kutsuna T, Ohta N, Kokubo M, Kikuchi T, Sakai H, Ushida T, Kikuchi M, Mochida J. Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. *Med Biol Eng Comput* 2008;46:735–743.
42. Han C, Barnett B. Measurement of the rheological properties. In: Gabelnick HL, Litt M (editors). *Rheology of Biological Systems*. Illinois: Charles C. Thomas; pp. 95–217. In: Kim SI, Suh TS (editors). IFMBE Proceedings, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 14; August 27–September 1; COEX Seoul, Korea. Springer: Berlin, Heidelberg, 1973, 3187–3189.
43. Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M, Hattori H, Ishihara M, Yoshihara Y, Matsui T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS-scaffold). *J Biomed Mater Res* 2005;75B:177–184.
44. Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, Yoshihara Y, Sato M, Matsumura K, Matsui T, Takase B, Nemoto K, Ishihara M. 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* 2006; 79:25–34.

## 関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨の役割

関節軟骨の再生医療は、無血管組織であること、軟骨細胞の培養が比較的容易であったことなどから再生医療の第一世代というようない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すでに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な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。それは真の関節軟骨の再生が、想像以上にむずかしいことが明らかになってきたため、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。

われわれは組織工学的に構築した種々の軟骨組織を用いて、関節軟骨の修復・再生に関する基礎的研究を行い、その治療効果を動物実験で確認してきた。たとえば「スキャフォールドと培養軟骨細胞とで作製した組織工学的軟骨に関する研究」<sup>1,2)</sup>、「スキャフォールドを用いず旋回培養法により作製した組織工学的軟骨に関する研究」<sup>3-5)</sup>、ならびに「軟骨細胞シートによる軟骨修復・再生に関する研究」<sup>6-11)</sup>などである。これら一連の研究により、軟骨下骨に達するような骨軟骨損傷（軟骨全層欠損）の場合は、関節軟骨の浅層部分のみを組織工学的軟骨でおおおうことができれば、修復機転で動員される骨髄由来細胞と組織工学的軟骨との相互作用により、良好な軟骨修復再生がもたらされることを確認した。

軟骨細胞シートは、温度応答性培養皿を用いて作製する。この培養皿は、独自のナノ表面設計により温度応答性ポリマーを器材表面に固定化することで、器材表面は32℃を境に可逆的に疎水性（細胞培養時）と親水性（細胞シート回収時）に変化できる。この特性により、トリプシンなど細胞に損傷を与える酵素を一切用いることなく、温度を20~25℃にして10~30分程度まつだけで、無傷な細胞と細胞外マトリックスがシート状に回収可能となる。温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートは、通常の培養皿で得られる培養細胞とはやや異なる特性を有し、軟骨修復に適している。3層に積層化した軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果をわれわれははじめて報告し<sup>6)</sup>、細胞シートの特性を明らかにしてきた<sup>7,8)</sup>。作製した軟骨細胞シートそのものは力学的には脆弱ではあるが、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する。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であるとともに、骨髄由来幹細胞の軟骨分化を促進するイニシエータとしても機能しており、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る効果により、軟骨は修復・再生されている。さらに従来再生医療が適用とされてきた軟骨全層欠

損ばかりでなく、修復困難と考えられてきた軟骨部分損傷（軟骨下骨に達しない軟骨内損傷）に対しても、細胞シートの治療効果を動物実験で確認した。これにより、変形性関節症において常に混在しながら存在する軟骨全層欠損と軟骨部分損傷の両タイプの軟骨損傷に対して、細胞シート工学という日本発のオリジナルな技術により治療できる可能性がある。変形性関節症の治療にまで踏み込んだ再生医療の実現を、われわれは目指している。

## 文献

- Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M et al: Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* **75**: 177-184, 2005
- Sato M, Ishihara M, Ishihara M et al: Effects of growth factors on heparin-carrying polystyrene-coated atelocollagen scaffold for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* **83**: 181-188, 2007
- Nagai T, Furukawa KS, Sato M et al: Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. *Tissue Eng Part A* **14**: 1183-1193, 2008
- Nagai T, Sato M, Furukawa KS et al: Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A* **14**: 1225-1235, 2008
- Kutsuna T, Sato M, Ishihara M et al: Noninvasive evaluation of tissue-engineered cartilage with time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Tissue Eng Part C Methods* **16**: 365-373, 2010
- 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
- Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M et al: Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* **13**: 87-92, 2007
- Mitani G, Sato M, Lee JI et al: The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol* **9**: 17, 2009
- Sato M, Ishihara M, Furukawa K et al: Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. *Med Biol Eng Comput* **46**: 735-743, 2008
- Sato M: Cell sheet technologies for cartilage repair. *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues*, ed by Archer C, Ralphs J, Woodhead Publishing, Cambridge, CRC Press, Florida, p251-265, 2010
- 国際出願番号: PCT/JP2006/303759, 出願日: 2006年2月28日, 出願人: (株)セルシード, 東海大学, 発明者: 佐藤正人, 坂井秀昭

(東海大学整形外科・佐藤正人)

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23年9月29日 14:00～17:00

場所：霞が関ビル 35F 東海大学学友会館 相模の間

出席者：阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、石原美弥（防衛医科大学校）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、長嶋比呂志（明治大大学）、前原美樹（明治大学）、村井邦彦（自治医科大学）、林克之（DNAチップ研究所）、平賀育英（DNAチップ研究所）、伊東紀子（DNAチップ研究所）、佐藤正人（東海大学）、鶴養拓（東海大学）、小林美由希（東海大学）、小久保舞美（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：渡部綾子、河毛知子

#### 1. 開会

研究代表者あいさつ

#### 2. 研究報告会

##### (1) 「概要説明」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

関節軟骨は、外傷や加齢、遺伝的要素、力学的ストレスなど多種の要因により細胞周囲の微小環境変化やプロテオグリカンの流出、コラーゲン線維網の破綻等により変性し、変形性関節症を発症する。また、外傷によりOAの発症率は40%と上がり、外傷後のカタボリックファクターを抑制することがOAの予防に繋がると考えられる。

軟骨の全損欠損は骨髄由来のMSCから修復が見込めるが、初期から中期の段階でOAの治療を行いたいと考えている。その治療は、修復機構を考慮した再生医療であるべきであるということが本研究の概要である。

自己移植では臨床応用まで進んでいる。次のステップとして、同種の細胞ソースを見つけて検討して行きたいと考えており、同種の細胞ソースとして多指症の検体を検討中である。多指症の検体は採取出来る軟骨量は多くないが、P3まで培養を続けると80倍近くまで増殖し、その幼若性により軟骨細胞の特性を維持することが期待できるものである。しかし、安定供給の問題や、遺伝的な問題等が考えられるため、安全性の評価を重要視して研究を進めていきたいと考えている。

今回の細胞シートの作製に当たり、より良い細胞シートを短時間で作製する為、滑膜との共培養法を採用している。また、共培養することでTGF-βに富んだシートが作製できるということも分かっている。安全性に関しては、CGH解析、造腫瘍性否定試験を実施した。CGH解析により、軟

骨細胞は P6 まで継代を重ねても異常は見られなかった。造腫瘍性否定試験でも、腫瘍形成は確認されなかった。

## (2) 「ヒト幹細胞臨床研究への申請状況」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

自己移植で行う「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」は、ヒト幹細胞臨床研究へ申請をし、第 65 回科学技術審議会科学技術部会にて 8 月 26 日に承認された。

ヒト幹指針は H22 年 11 月 1 日全部改定され、評価指標として「関節軟骨再生に関する評価指標」が定められた。

### <質疑応答>

長嶋：多指症検体は P3 で増殖するというのは、P3 で増殖能が上がるということでしょうか。

→元々、小さい検体なので、P3 まで継代をしないと必要な細胞数が得られません。通常、軟骨は P3 では脱分化してしまうと言われておりますが、多指症の軟骨はその幼若性により軟骨特性を維持しています。

長嶋：培養によりフェノタイプが変わってしまう恐れがありますが、バリテーション等をきちんとしないといけないのではないのでしょうか。

→後ほど発表される伊東さんからも報告がございますが、バリテーションは行っております。

石原：小久保さんが考案された滑膜細胞との共培養法では、フィーダー細胞として滑膜細胞が役割を果たしているのでしょうか。

→その通りです。滑膜細胞と共培養をすることで、ヒトの膝と同じ状態にし、より良い培養軟骨細胞シートが短期間で作製出来るようになりました。

## (3) 「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（国立医薬品食品衛生研究所）

積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を用いた再生医療の将来的な普及には同種細胞の移植が必須になると考えられる。しかしながら同種細胞移植には免疫拒絶の問題が懸念されるため、本研究において同種軟骨細胞がアロリンパ球に与える影響について *in vitro* で検討している。これまでに間葉系幹細胞(MSC)を軟骨細胞に分化させて、活性化 T 細胞と共培養すると MSC 同様、活性化 T 細胞を抑制するという報告はある。そこで本研究では、生体内で既に分化した軟骨細胞に焦点をおいて検討している。昨年度までに、マウス細胞を用いたリンパ球混合培養反応(MLR)において、マウス軟骨細胞だけでなく異種であるウサギ軟骨細胞およびヒト軟骨細胞(NHAC)が活性化 T 細胞の増殖を抑制することを確認している。今年度は、まず市販ヒトリンパ球と市販ヒト

樹上細胞(NHDC)を用いての MLR の条件検討をし、反応系を確立した。さらに、ヒト軟骨細胞(NHAC)がヒト細胞での MLR に与える影響の検討を行った。MLR の系に NHAC を共培養させる時期を MLR 開始と同時および T 細胞の活性化が始まっている培養 2 日目からの 2 点で検討した。その結果、培養 4 日目で MLR のみだと顕微鏡観察下において、活性化された T 細胞が増殖している様(ブラスト)が多く観察され、BrdU の取り込みを指標とした細胞増殖解析においても、T 細胞活性化が確認されたのに対して、NHAC を MLR 初日から共培養した場合はブラストの形成は見られず、BrdU の取り込みも抑制されることがわかった。培養 5 日目でも同様の傾向が見られた。また、MLR 2 日目から NHAC を共培養した系でも、培養 4 日目および培養 5 日目ともに、NHAC が T 細胞の増殖を抑制していることがわかった。つまり十分に活性化した T 細胞の増殖も NHAC が抑制できることが分かった。

今後は、再現性の確認と TGF- $\beta$  の測定、積層化軟骨シートでも同様の作用を維持しているのか検討する。

<質疑応答>

佐藤：これまで市販の細胞同士の MLR 実験はなかったのですね。

→市販細胞同士での MLR をやった論文は今のところ見つけられませんでした。販売元へ確認したところ、市販ヒト T 細胞と NHDC を、MLR を行う目的で使用されている研究は知らないとのことでした。

佐藤：LPS で刺激するのは何故でしょうか。

→樹状細胞をより活性化するためです。

村井：MLR 2 日目から NHAC を共培養した系では、抑制はしていましたが、ブラストが少し残っていましたね。やはり、少しは出てしまうのでしょうか。

→再現性をみる必要はありますが、ブラストが出来なかった時期から NHAC を共培養し始めているので、そのブラストが少し増えてしまっている可能性はあります。しかしながら、抑制していることは確かで、MLR のみの結果より 10 倍は抑制しています。

佐藤：TGF- $\beta$  を測れば、その点もよく分かってくるかと思うのですが。

→そうですね。まず、TGF- $\beta$  と抑制効果の関係を検討したいと思います。

#### (4)「アレイ CGH 解析における軟骨細胞の評価」

研究協力者 伊東紀子 (DNA チップ研究所)

軟骨細胞を移植する際にアレイ CGH 解析が安全性の一つの指標となるのか検討した。アレイ CGH とは、テストサンプル・リファレンスサンプルを別々に Cy5/Cy3 でラベル化し、マイクロアレイ上で競合ハイブリダイゼーションを行う手法である。全プローブの蛍光強度の Log<sub>2</sub>Ratio をプロットすると、テストサンプルに増殖があれば+方向へプロットされ、テストサンプルに欠失が

あれば一方方向へプロットされる。全プローブの Log<sub>2</sub>Ratio を Moving Average により可視化し、ADM2 解析によりアベレーションの領域を検出する。

ガン DNA と正常 DNA を混合したサンプルでは、ガン DNA 比率 34.5%で検出出来た。

東海大学から依頼を受けたサンプルは同一人物の P2 と P4、P2 と P6 での変化を解析したが、多指症検体、膝検体（青年期、高齢者）どのサンプルにおいても変化は見られなかった。

変化がある場合の例として、正常 DNA と骨肉腫 DNA の比較を、同プラットフォームを用いてアレイ CGH 解析を行った。ADM2 解析の結果、19 の領域で変化が検出された。9 番染色体ではガン抑制遺伝子のホモ欠失が認められた。Dye swap を行ったところ、反転した結果となり再現性が確認された。

まとめとして、アレイ CGH 法は微細なゲノム異常を捉えられることが分かった。

<質疑応答>

河毛：アジレント社が提供しているガン DNA が 34.5%から検出出来るというのは、ADM2 解析はいくつで行われたのでしょうか。

→ADM2 解析は行われていないという回答を Agilent 社から頂いています。

佐藤：確認ですが、Moving average は可視化したものなのですよね。そこからコピー数は分かるのですか？

→可視化したものという認識でよろしいと思いますが、基線から 0.58 ポイント以上変化していた場合は、変化領域とっていいと思います。ただしテストサンプルとリファレンスサンプルが別個人だった場合、リファレンスゲノムに CNV があるため正確なコピー数判定は難しいというのが現状です。

佐藤：Moving average は何ポイントでしょうか。

→10 ポイントです。60 万プローブを圧縮し、移動平均 10 ポイントで見ているのでかなり細かく見ていると言うことが出来ると思います。

長嶋：健常人での変異の評価というのはされているのでしょうか。

→CNV でかなりの研究がされています。CNV 解析では CNV 領域のプローブを密に搭載したアレイを用います。コピー数異常は 300~500 領域ほど検出されます。

阿久津：CGH のプラットフォームが決まりそうですね。実際に、最終製品検査で、今回行なった様にトリプル系で結果の確認を行なっていますが、一回でもよいのではないのでしょうか。トリプルで行う必要性があるのでしょうか。

→今回は、ADM2 のスレッショールドを幾つにするか決める必要がありトリプルで行いました。今回決めた 10 で行くとするなら、一回でもよいのではないかと思います。

阿久津：この実験系を軟骨の安全性の指標としていったらよいのではないのでしょうか。

佐藤：ケースバイケースになると思いますので、今回の我々の実験系では、この結果でやっていきたいと思います。

阿久津：臨床に応用する場合一番厳しい条件がいいのではないのでしょうか。

佐藤：通常、軟骨細胞は過継代することはありませんが、多指症の検体は P3 程度まで継代が必要な為に安全性の確認実験として行いました。多指症の検体でも一番厳しい ADM2=10 で変化が見られなかったのが同種の細胞ソースの評価法として使えるのではないかと考えております。

#### (5) 「関節軟骨に発現するマイクロ RNA」

研究協力者 鷗養拓 (東海大学)

変形性関節症(OA)は ADL に多大な影響をもたらす。

軟骨細胞において加齢により発現が変動していく miRNA について、miR-199a-3p, miR-193b は発現が上昇し、miR-320c は下がる傾向にあることを前回報告した。

今回は、TKA サンプル 17 例を用い、Mimic 群と Inhibit 群で、リアルタイム PCR と MTT Assay で評価を行なった。miR-199a-3p, miR-193b は COL2、AGC1、SOX9 などの anabolic Factor を抑制しており、軟骨細胞の老化に関与する可能性が考えられた。特に、miR-193b は inhibit 群で細胞増殖が上昇しており、細胞増殖に影響を与えている可能性が示唆された。miR-320c は catabolic Factor である ADAMTS5 の発現を抑制しており、軟骨代謝に影響を与えている可能性が示唆され、軟骨細胞の幼若性に関与する可能性が考えられた。

<質疑応答>

阿久津：目的として、3 つのターゲット遺伝子をドナー-grafts として使用しているが、DNA か miRNA かどちらで考えているのでしょうか。

→miRNA で考えています。

阿久津: vitro で継代して軟骨を分化させて、脱分化させてみて機能解析をしてはどうでしょうか。

佐藤：脱分化させたときに、miRNA がどのような動きになるか調べるのは興味深いと思います。

阿久津： vitro での加齢となりますが、継代したものは軟骨形成が難しいかもしれません。

長嶋：臨床では P0,P1 で使用しますよね。エピジェネティックな転写制御にも関わっているのではないのでしょうか。P1 にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を入れて細胞を活性化するやりかたもあります。トリコスタチン等なら IPS での使用実績もあり、ヒトに応用出来る可能性があります。

加藤：miR-の数字は、DNA 上のロケーションに関係するものなのではないのでしょうか。

林：いいえ、違います。発見された順番です。若い数字ほど、論文も多くあります。

佐藤：クラスタリングは可能でしょうか。

林：DNA 上の位置情報があるので可能です。社に戻れば確認が出来ますので、後日打ち合わせを



お願いいたします。

加藤：22 ベースくらいで、どの程度存在するのでしょうか。

林：1 つの mi-RNA でも、数百から数千アタックする部分が出てくるものもありますが、実際のどの部分に作用しているかは、分かっていません。

#### (6)「光音響法による関節軟骨の評価法」

研究分担者 石原美弥 (防衛医科大学校)

関節軟骨の診断では、レントゲンや MRI 等が行われているが、何れも軟骨機能(力学特性、組織性状、摩擦係数)を正確に評価する事はできていない。再生医療では、治療前と治療後で同じ計測ができること、手術中もテーラーメイド診断が望ましい。

光/レーザー光診断を用いる利点として、照射条件に制限はあるが安全で正確、小型、シールド不要、他部位、他科領域で用いることができることが挙げられる。

軟骨の力学特性を非侵襲で測定を出来ないか、検討をした。光のエネルギーを応力波発生で測定する光音響法に着目した。パルスレーザー照射による超音波の減衰から、軟骨の力学特性である粘弾性を測定した。臨床応用のため、小型で可搬、簡便計測が出来るシステムを開発した。

生体への安全性は、レーザー光を使用し、超音波が発生する条件で、軟骨細胞の増殖活性に影響しないか確認を行った。スキャホールド有りで作製した軟骨細胞で測定した結果、レオメーターでの測定結果と同等( $R^2 > 0.9$ )の結果が得られた。

原理実証は、白色家兎に対する疑似軟骨再生医療での評価を行った。酵素処理でモデルを作り相対データが得られた。

今後、これらを踏まえて Outerbridge 分類より詳細に分類をしたい。

軟骨の機能回復についても評価すべきで、細胞シートの臨床研究では、術前と術後での評価を行う予定である。

コラーゲンの評価については、COL1、COL2、エラスチンは自家蛍光物質であり、3次元データが得られるので検討している。

#### <質疑応答>

河毛：シート単独では測定出来ないのは何故でしょうか。

→ある程度の厚さが無いと音響しないので細胞シートの厚さでは測定できませんので、移植した後であれば測定が可能です。

村井：摩擦係数について触れていましたが、評価は出来るのでしょうか。

→軟骨表面の凹凸に光を当てて散乱すれば評価できるかもしれませんが、摩擦係数と相関が得られればよいのですが、いろいろと難しいところがあります。

(佐藤補足) 一概に言えないのです。それは、プロテオグリカンの流出により摩擦係数が上がってしまうということもある為です。

阿久津：光音響法での軟骨の測定では、奥の骨の影響は出ないのでしょうか。

→骨は硬さが違うので問題ありません。超音波は物の界面で反射する為、軟骨部だけを測定出来ます。

(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

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究は、本年度が最終年度となりますが、今後も継続していきたいと考えております。フォーメーションの維持もお願いしたいと思っております。

また、報告書については、今年度分と全体で2本となりますので、宜しくお願い致します。

### 5. 閉会

以上

