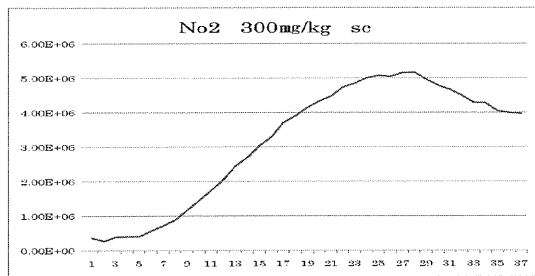
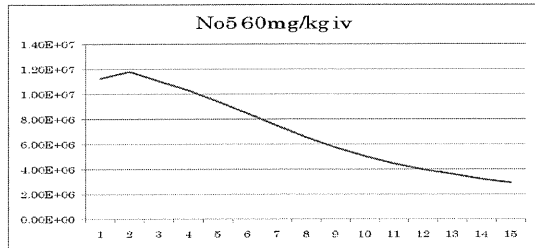


Fig. 2: 上 静脈注射 下 皮下注射

縦軸：Luminescence intensity (photons/sec・cm²)



横軸：Time (min)

4. Luc⁺細胞シートの滞在時間の評価

Luc⁺軟骨細胞シート 1 枚、Luc⁺滑膜細胞シート 1 枚の組み合わせを移植したレシピエントラット (n=4) を長期観察群として作製後、luciferin 投与後 IVIS システムを用いて Luc⁺細胞からの発光を検出し、イメージ化することで、グラフトの膝関節内滞在期間を長期に渡り測定した。

5. 細胞シート滞在時間における軟骨細胞シート、滑膜細胞シートの相互作用の評価

細胞数を可及的同数に揃えるため、Luc⁺軟骨細胞シート 1 枚の移植群 (AC-AC group n=4)、Luc⁺滑膜細胞シート 1 枚の移植群 (SY-SY group n=4)、Luc⁺軟骨細胞シート 1/2 枚と Luc⁺滑膜細胞シート 1/2 枚の移植群 (AC-SY group n=4) の 3 群を作製した。前述のとおり野生型ルイスラット

への同種移植後、IVIS システムを用いて luciferin 投与後の luciferase 発光について経時的にイメージ化するとともに発光強度のピークを測定し、軟骨細胞シート、滑膜細胞シート、両細胞併用シートの移植後膝関節内滞在時間、発光強度の推移について比較検討した。

6. 軟骨細胞シート移植による骨軟骨欠損部の組織修復効果

日本家兎による実験で修復効果をもとめている。今回ラットにおいても修復効果を組織標本の作製によって確認した。野生型 Lewis Rat の右膝大腿骨膝蓋骨面に 18G 針を用いて骨軟骨欠損を作製し細胞シートを移植した。手術後 2 週、4 週、6 週、8 週の移植部位の膝関節標本を作製した。

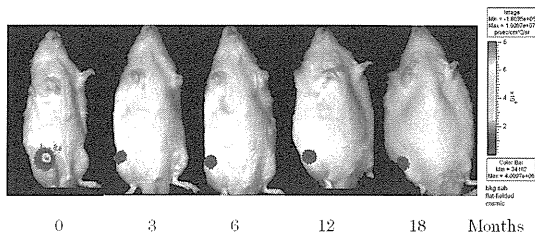
7. 細胞シート移植後の細胞シート由来細胞の局在の評価

移植細胞の局在を確認するべく、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 16 週令の LacZ Tg Lewis Rat と GFP Tg Lewis Rat の提供を受け再度移植実験を施行した。LacZ Tg Lewis Rat の膝関節より軟骨細胞、滑膜細胞を採取後東海大学で LacZ⁺軟骨細胞シート、LacZ⁺滑膜細胞シートを作製した。16 週令の GFP Tg Lewis Rat をレシピエントとして右大腿骨膝関節面に骨軟骨欠損を作製後に上記細胞シートの膝関節同種移植を試みた。

C. 結果

1. 長期観察群細胞シートの関節内滞在時間

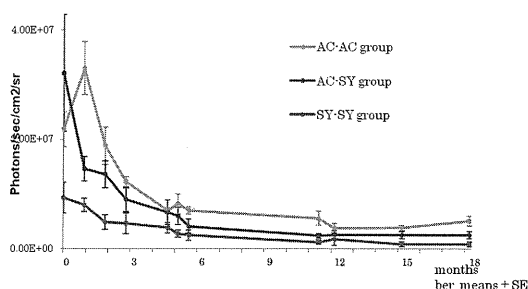
Fig. 3: 右膝から検出されたルシフェラーゼ発光の CCD 画像の経時的変化



昨年度に引き続き長期にわたる Luc^+ 細胞シートを移植した膝関節からのルシフェラーゼ発光を確認した。現在 18 カ月にわたり継続的な発光を膝関節から認めている。

2. 軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、両細胞シート併用移植による滞在期間の差の検討

Fig. 4: 3 群間におけるルシフェラーゼ発光強度の経時的変化

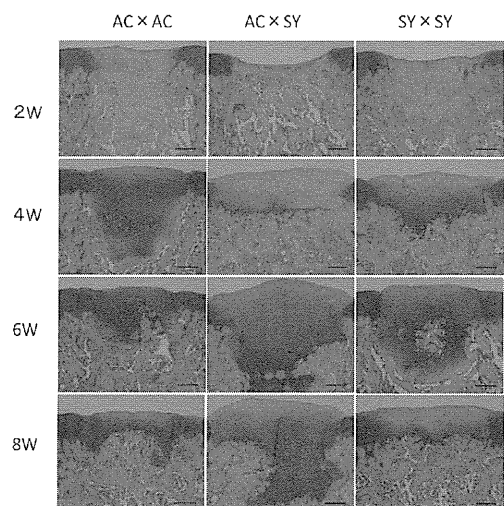


3 群の全ての個体において Luc^+ 細胞からの発光は消失することなく右膝関節より 18 カ月以上検出された。発光強度は移植後 4 週以降、軟骨細胞シート群 > 両細胞シ-

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。経過中に発光強度が特に増加する個体はなかった。

3. ラット膝関節同種移植後の組織像の経時的変化

Fig. 5: 細胞シート膝関節同種移植後の組織像の経時的変化



3 群とも移植後 6~8 週にかけて軟骨再生が盛んであった。滑膜細胞シートのみ群では線維軟骨化が他の群より早期にみられた。

D. 考察

初年度には Luc^+ 細胞シートのラット間同種膝関節移植後の IVIS による計測方法を luciferin の投与方法を含めて構築し、次年度の実際の計測にすみやかに移行できた。次年度、3 年度を通じて細胞シート由来移植細胞の 18 カ月以上の関節内滞在を BLI によってすべての個体において確認した。

レシピエントラットは生後 4 週時に移植を行っているため、ラットの寿命が 2 年から 2 年半程度であることを鑑みると細胞シート由来の移植細胞が移植後生涯生存することが予想された。移植後 Luc⁺細胞は移植した膝関節内にとどまり、他に移動しないことを BLI によって視覚的に確認した。さらに移植後に膝関節の腫瘍化を認めた個体はなかった。軟骨細胞シートと滑膜細胞シートの移植後滞在時間に関する併用の効果について、細胞シート移植後 3 週間後、軟骨細胞シート、滑膜細胞シート、両シート併用群のルシフェラーゼの発光強度は安定して経過した。BLI の発光強度は半定量的に標的の細胞数に比例するが、今回の発光強度の推移からは、18 カ月の測定期間においてある特定の移植群で明らかな細胞増殖、あるいは細胞死を示すような発光強度の変化を認めないと考えられた。

移植後の経時的な標本作製からラット膝関節同種移植においては 6~8 週において軟骨再生が盛んであることが示唆されたため、移植細胞のこの時期の局在を同定するべく現在 LucZ Tg Lewis Rat と GFP Tg Lewis Rat 間の移植実験を進行している。移植細胞の長期の生存が確認されたため、抗 LucZ 抗体による局所の確認の他、生存細胞による細胞融合の有無について抗 LacZ 抗体と抗 GFP 抗体に異なる色の 2 次抗体を用いた検出を試みる予定である。

E. 結論

ラットを用いた細胞シートの同種膝関節

移植後、細胞シート由来の細胞の関節内滞在を 18 カ月の長期にわたり確認した。

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) Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur cells materials J.* 2010 Jan;19, 13-21.

2) 高久裕子, 村井邦彦, 鶴養拓, 伊藤聡, 小久保舞美, 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.

3. 学会発表

1) 村井邦彦, 鈴木英雄, 五十嵐孝, 瀬尾憲正, 酒井大輔, 中井知子, 中村嘉彦, 持田讓治. 椎間板ヘルニアの新治療に向けた基礎的研究 - 椎間板髄核細胞の特異的免疫特性について. 第23回日本ペインクリニック学会東京地方会 2009年2月, 東京.

2) 村井邦彦, 酒井大輔, 中井知子, 中村嘉彦, 持田讓治. 椎間板ヘルニアの新治療

に向けた基礎的研究 - 椎間板髄核細胞の特異的免疫特性について - . 第38回日本脊椎脊髄病学会2009年4月, 神戸. 日本脊椎脊髄病学会誌 20 s298, 2009.

3) 村井邦彦, 酒井大輔, 中井知子, 中村嘉彦, 持田讓治. 椎間板ヘルニアにおける免疫機能の関与. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 2009年9月, 横浜. 日本整形外科学会誌 83; s1212, 2009.

4) 高久裕子, 村井邦彦, 鶴養拓, 伊藤聡, 小久保舞美, 持田讓治, 佐藤正人. 細胞シート膝関節移植後の Bioluminescence Imagingを用いた移植細胞の追跡. 日本再生医療学会2011年3月, 東京.

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

培養軟骨細胞シートの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 河毛 知子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
渡部 綾子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
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

研究要旨:東海大学で開発された培養軟骨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、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。その結果安全性に問題ないことが確認された。

A. 研究目的

東海大学医学部外科学系整形外科学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為、学内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。

また、培養軟骨細胞シートの安全性を確認することを目的に安全性試験を実施した。薬食発法第0208003号第4章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、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こと。」を確認するために Comparative Genomic Hybridization (CGH)解析を行った。また、移植した培養軟骨細胞シートが生体内で腫瘍化しないことを確認する為、免疫不全マウスを用いて造腫瘍性否定試験を行った。

B. 研究方法

1. 再生医療の臨床応用に向けて

〈学内の評価体制〉

東海大学においては医学部付属病院の細胞移植再生医療科にセルプロセッシング室、安全性評価室を置き、臨床検査科、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。

〈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、COL1の発現により確認する系を立ち上げた。

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 細胞純度測定試験

フローサイトメトリーにより、細胞純度

測定試験の系を立ち上げた。

⑤ 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を立ち上げた。

⑥ マイコプラズマ

培養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。

⑦ ウイルス否定試験

培養細胞中の諸種のウイルス(HBV、HCV、HIV、HTL-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。

⑧ 無菌性試験

培養上清及び洗浄液を用いて細菌培養を行い、無菌試験法を行う系を立ち上げた。また、最終洗浄液においては、メンブランフィルター法を用いた無菌試験の系を外部試験委託先にて立ち上げた。

〈資料と試料の保管〉

一連の作業工程については、それぞれ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。

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、CGH解析により安全性の評価を実施した。また、最終製品が患者に適応された場合の製品の造腫瘍性を可能な限りの確に評価する為に、マウスへ培養細胞を移植し、造腫瘍性の確認試験を実施した。

① 細胞形態観察、CGH解析

本院臨床研究審査委員会の承諾のもと、人工関節置換術（4検体）、前十字靭帯再建術（4検体）、多指症手術（8検体）の際に得られた軟骨組織を解析に用いた。それぞれの軟骨細胞について、第6継代(P6)まで培養を行い、第2・4・6継代(P2・P4・P6)の細胞からDNAを抽出した。ゲノムDNAコピー数異常を検索するため、第2継代(P2)と第4継代(P4)・第6継代(P6)それぞれについてCGH解析を用いて評価した。また、培養中に細胞形態の観察を実施した。

② 第1回目造腫瘍否定試験

免疫不全マウスの皮下に培養軟骨細胞シート(1.6×10^6 cells/sheet/匹)、培養軟骨細胞シート(1.6×10^6 cells/sheet/匹)+培養滑膜細胞(1.6×10^6 cells/sheet/匹)を200 μ Lの生理食塩水に懸濁した状態で2群に分けて注入した。評価は、9週、12週、24週の期間で観察し、移植部位を病理組織学的に観察した。

③ 第2回目造腫瘍否定試験

WHOの基準に則り、免疫不全マウスの皮下に培養軟骨細胞(1×10^7 cells/匹)、培養軟骨細胞(1×10^7 cells/匹)+培養滑膜細胞(1×10^7 cells/匹)を移植した。Sham群も作製し、計3群とした。3週、12週、24週まで観察をし、移植部皮膚、主要臓器、血清を摘出した。移植部皮膚を病理組織学的に評価した。

C. 結果

1. 再生医療の臨床応用に向けて

<CPCにおける試験製造並びに特性評価>

人工関節置換術により患者同意のもと採取した軟骨細胞及び滑膜細胞を用いて試験製造（2例）を実施した。後述の①～⑧の試験を実施し、規格値を定めた。

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、COL1 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がないことを確認した。

③ 細胞数測定試験及び生細胞率測定試験

細胞数測定試験では、細胞シート1枚当たり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 5×10^4 cells 以上を規格値とした。生細胞率測定試験では、1シートあたり80%以上であることを確認し、それを規格値とした。

④ 細胞純度測定試験

酵素処理した軟骨細胞をフローサイトメトリーで測定し、COL2:20%以上、CD81:70%以上、CD90:30%以上、CD146:5%以上、CD49a:50%以下、GD2:50%以下、Proteoglycan:10%以上であることを確認した。

また、血管系細胞の混入を否定するため、CD31、およびCD45陽性率を確認し、CD31は陽性率5%以下であること、また、CD45は陽性率10%以下であることを確認した。

⑤ 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し、規格値は Negative とした。

⑥ マイコプラズマ試験

マイコプラズマ試験が、リアルタイムPCR法で定量的測定が可能で、培養法と関連していることが確認し、規格値は Negative とした。

⑦ 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、規格値は Negative とした。

⑧ 無菌性試験

培養上清及び洗浄液の細菌培養により無菌性試験を行えることが示された。最終洗浄液においては、メンブランフィルター法を用いた無菌試験の系を外部試験委託先にて立ち上げ、培地適合性試験より抗生剤の影響を受けずに無菌試験を実施することが示された。

規格値は Negative とした。

2. 安全性評価

① 細胞形態観察、CGH解析

P2からP6まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった(図1)。CGH解析では、プローブ10pt毎に Moving Average (移動平均)の値を算出してライングラフ化し可視化した(図2)。差異を検出するアルゴリズムとして Aversion Detection Method-2(ADM2)Threshold 10を用いて解析を行った。同一人物のP2

から抽出した DNA をリファレンスとし、P2 から P4、P2 から P6 の培養を経てもコピー数の異常(aberration)は認められなかった。

② 第 1 回目造腫瘍性否定試験

移植 9 週目において外観及び摘出した移植部皮下組織には移植した細胞は確認出来なかった（図 3）。

9 週、12 週、24 週いずれの期間においても肉眼的所見で転移や腫瘍形成は確認されなかった。移植細胞は肉眼的所見においても染色組織学的においても確認出来なかった。

③ 2 回目造腫瘍性否定試験

移植 1 週目において外観からの観察でも移植部の膨隆が確認できた（図 4）。しかし移植 3 週目になると外観からの観察では移植部の膨隆は確認できなかった（図 5）。しかし、移植後 3 週目の解剖時に移植部皮下組織を摘出すると肉眼的所見でも移植細胞は顕著に確認された（図 6）。移植後 12 週目の剖検時に移植細胞は、肉眼的所見で確認出来た個体と出来なかった個体があった。しかし、3 週、12 週とも免疫組織学的に移植細胞の残存は確認されたが、腫瘍形成は認められなかった。経過観察（24 週目）では、病理組織学的にも移植した細胞は認められなかった。移植部皮下組織の SafraninO 染色の結果を図 7 に、トルイジンブルー染色の結果を図 8 に、HE 染色の結果を図 9 に示す。

D. 結論

培養期間を超えて培養した細胞の形態に異常は認められなかった。

CGH とは、これまで特に遺伝子異常の集積の結果として起こるガンに関して、ゲノムワイドの解析により新たな遺伝子の増幅や欠失を検出するために有用な解析法で、疾患の遺伝子異常や健常人のハプロタイプ型の検出にも用いることが可能である。今回我々は Moving Average 10pt、Aberration Defection Method-2、Threshold 10 の条件で評価し、軟骨細胞は過継代によるコピー数の異常が生じないことを確認した。この設定値が過継代細胞の安全性を確認するのに適したものであるかを判断するため、異なる Threshold の設定で解析を施行した。その結果、moving average の異常を認めていた。しかし、これらのサンプルに、追加実験として dye swap を施行したところ、moving average の異常は確認できなかった。よって異なる設定において検出された結果はすべて、擬陽性であることが確認できた。

今回の設定は、継代した細胞間で起こった確実な変化をとらえ、同時に擬陽性を排除する目的としては、十分なものであったと考えるが、今後同様な目的で CGH を施行する場合、dye swap などの追加実験を施行することで、Threshold を下げた設定も選択し得ると考える。

また、CGH 解析は少量の DNA から解析が可能であり、同一人物をリファレンスとして用いることで、継代異常の検知に有用な安全性評価の手法であることが示唆され

る。

造腫瘍性否定試験では、第 1 回目では実際に臨床応用で移植する培養軟骨細胞シートと同じものを、同じ細胞数で作製し免疫不全マウス皮下へ移植したが、移植後 9 週目ですでに消失してしまった。それを踏まえた上で、次に第 2 回造腫瘍否定試験として、WHO の基準に細胞数を合わせて、剖検も 3 週、12 週に実施した。その結果、肉眼的所見で移植した細胞の残存が消失している個体もあったが、残存が確認できる個体もあった。残存が確認出来た個体の移植部皮膚の病理標本を SafraninO 染色およびトルイジンブルー染色することにより残存していた細胞が軟骨細胞であることが確認出来た。また、HE 染色により残存した細胞が腫瘍化していないことが確認出来た。第 2 回造腫瘍性否定試験の移植後 24 週目までの経過観察群では、移植した軟骨細胞の残存は確認出来なかった。これにより、培養軟骨細胞を生体内へ移植すると、個体差はあるが分解されることが示唆される。以上の結果によって培養軟骨細胞シートが造腫瘍性を持たないことが確認出来た。

今回の造腫瘍化否定試験により、培養軟骨細胞シートの造腫瘍性が否定された。このことから培養軟骨細胞シートを用いた軟骨再生は安全であると示唆される。

培養軟骨細胞シートの安全性と東海大学の CPC において関節軟骨細胞シートの作製をヒト幹細胞指針に則り実施することが可能であることが確認され、厚生労働大臣の意見書（厚生労働省医政 1003 第 3 号）

を受け、現在臨床研究を実施している。

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. 論文発表

- 1) 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. Epub 2009 Feb 12.
- 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. Epub 2009 Mar 18.
- 3) 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. 2010 Jan;45(1):69-77.

4) 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.

5) 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.

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) Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro

H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S, Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. Int J Hematol. 2010 Mar;91(2):350-1.

8) Oshima K, Hanada R, Kobayashi R, Kato K, Nagatoshi Y, Tabuchi K, Kato S; for the Hematopoietic Stem Cell Transplantation Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia: An analysis of 18 Japanese cases. Pediatr Transplant. 2010 Aug;14(5):657-63.

9) Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. Blood. 2010 Apr 1;115(13):2723-4.

10) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective

- study. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1369-76.
- 11) Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplantation* 2011 Mar;46(3):416-25.
- 12) Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Ogawa A, Nakajima K, Kato S. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2839-46.
- 13) Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, Horii M, Ishihara T, Isobe K, Isozaki M, Itoh J, Itoh Y, Okada Y, McIntyre BA, Kato S, Asahra t. Methodological development of a clonogenic assay to determine progenitor cell potential. *Circ Res*. 2011 Jun 24;109(1):20-37.
- 14) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, Kato S, Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jul;46(7):1023-5. doi: 10.1038/bmt.2010.224. Epub 2010 Sep 27.
- 15) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N, Kato S, Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Aug;46(8):1148-50. doi:10.1038/bmt.2010.241. Epub 2010 Oct 18
- 16) Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Brit J Haematol*, 2011 Aug; 154(3):363-72. doi: 10.1111/j.1365-2141.
- 17) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan: The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec; 17(12):1814-21.

Epub 2011 May 25.

18) Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011 Sep 15; 118(11):2941-50. Epub 2011 Jul 6.

19) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-90. Epub 2011 Jul 14.

20) Kawaguchi AT, Aokawa J, Yamada Y, Yoshiba F, Kato S, Kametani Y. Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Antigen-Presenting Cells in Mice. *Artif Organs*. 2011 Jul 25. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01269.x.

21) Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone Marrow Transplantation of Unwashed Cord Blood Using Reduced-Intensity Conditioning Treatment: A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Aug 23. [Epub

ahead of print]

22) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]

23) Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Oct 28. doi: 10.1002/pbc.23384. [Epub ahead of print]

24) Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S. High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow*

Transplant. 2011 Dec 23. [Epub ahead of print]

25) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. Blood. 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]

26) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S, Shiraishi K, Minemura T, Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. Biol Blood Marrow Transplant. 2012 Jan 13[Epub ahead of print]

G. 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

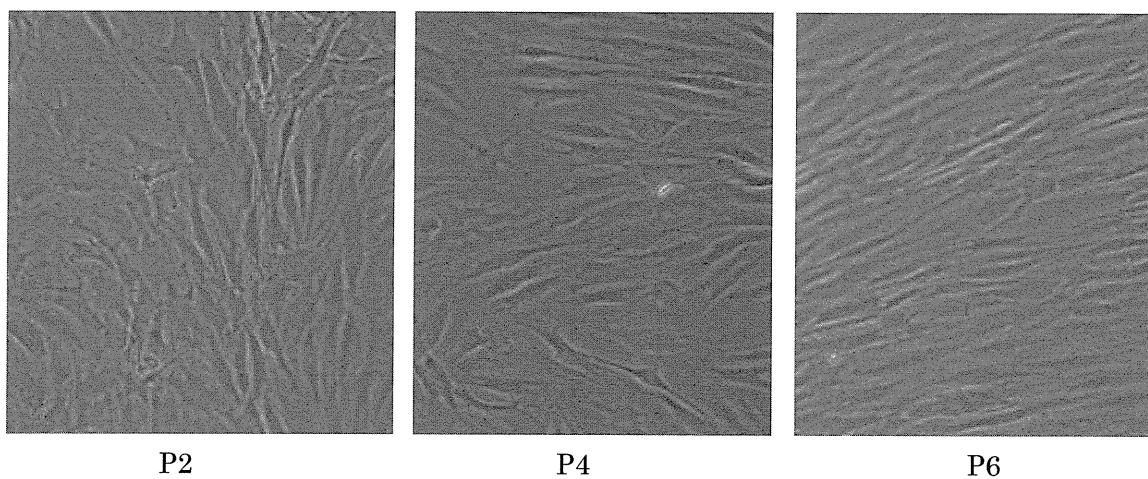
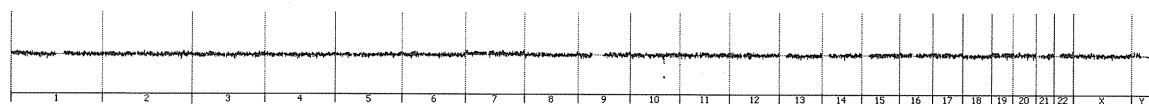


図 1 細胞形態観察

TKA-AC P4・P2



TKA-AC P6・P2

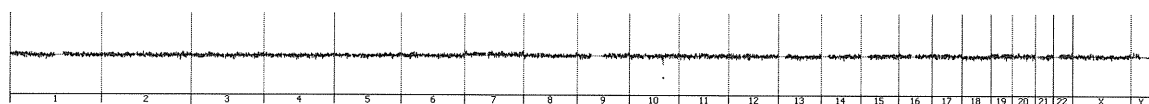


図 2 Genome View

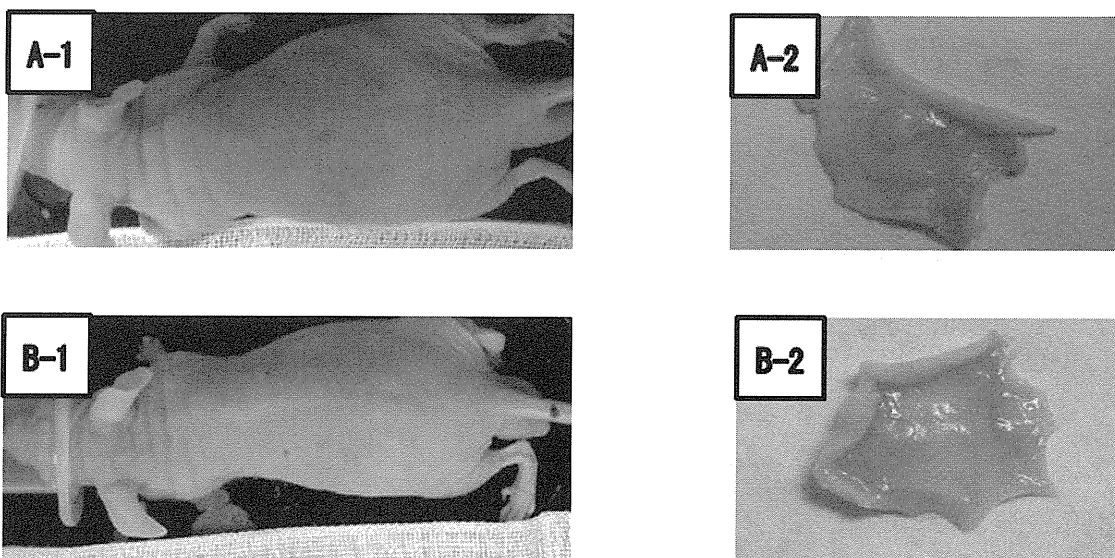


図 3 第 1 回目造腫瘍性否定試験 移植後 9 週目移植部外観と移植部皮膚
(A-1 : AC 群外観、A-2 : AC 群移植部、B-1 : AC+SY 群外観、B-2 : AC+SY 群移植部)

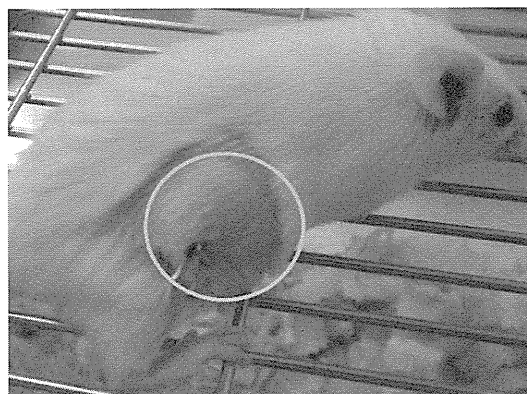


図4 第2回目造腫瘍性否定試験 移植1週目 外観

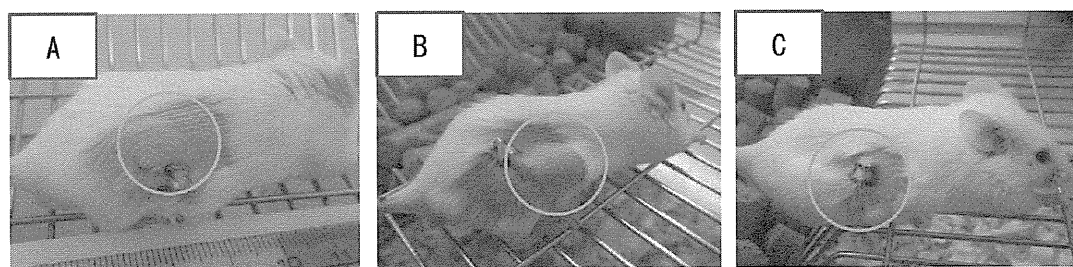


図5 第2回目造腫瘍性否定試験 移植3週目外観

(A : AC 群、B : AC+SY 群、C : Sham 群)

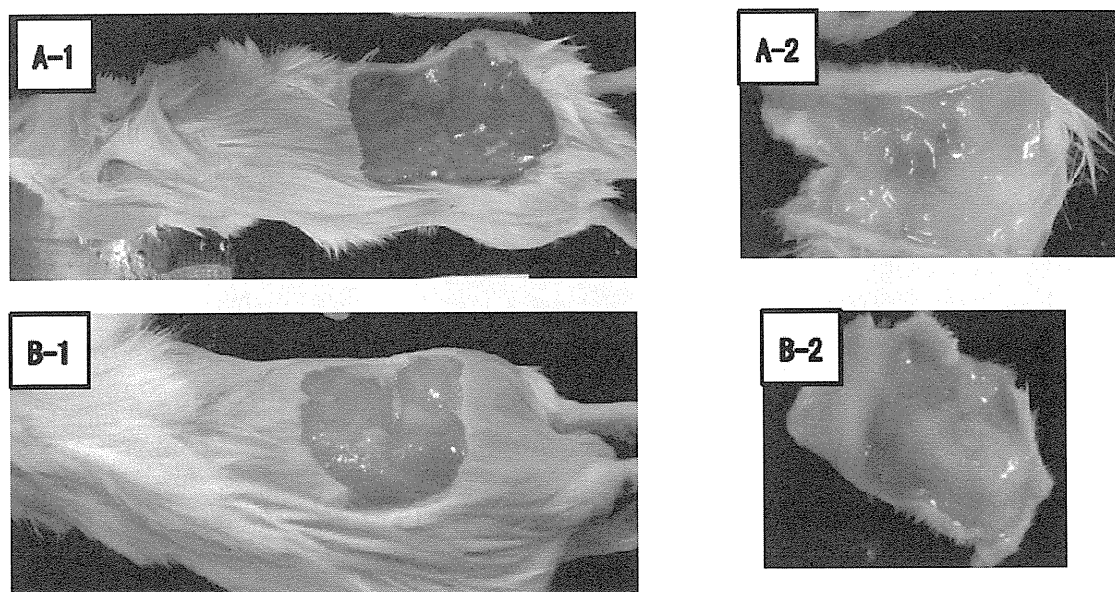


図6 第2回造腫瘍性否定試験 移植後3週目 移植部皮膚

(A-1 : AC 群外観、A-2 : AC 群移植部、B-1 : AC+SY 群外観、B-2 : AC+SY 群移植部)

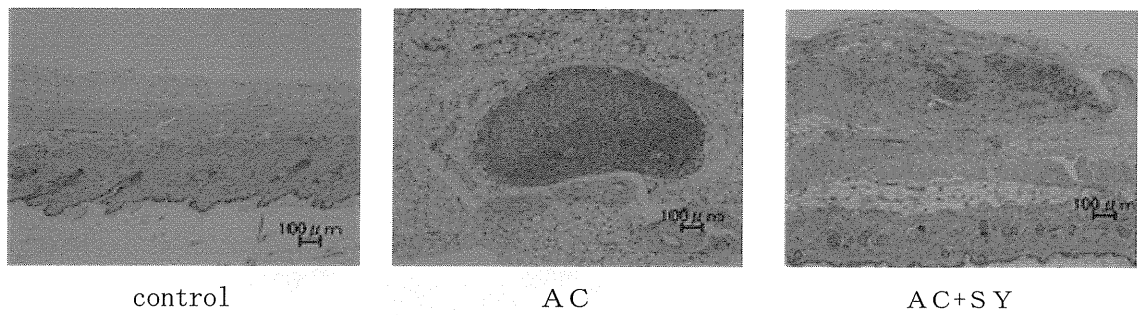


図7 第2回造腫瘍否定試験 移植後12週 SafuraninO染色

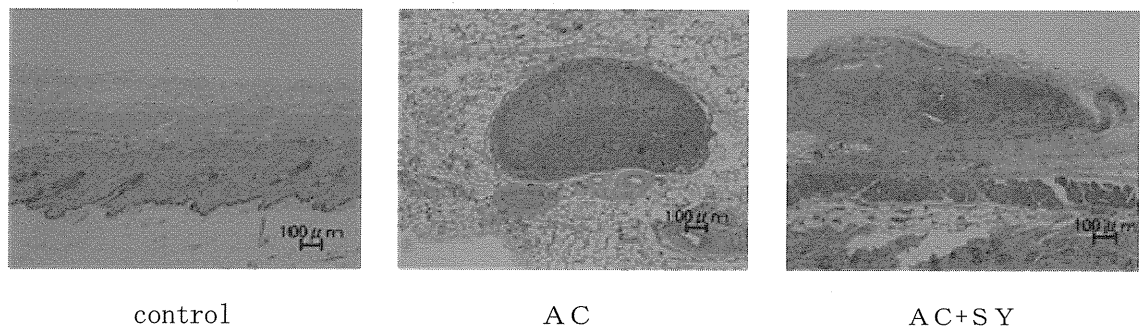


図8 第2回造腫瘍否定試験 移植後12週 トルイジンブルー染色

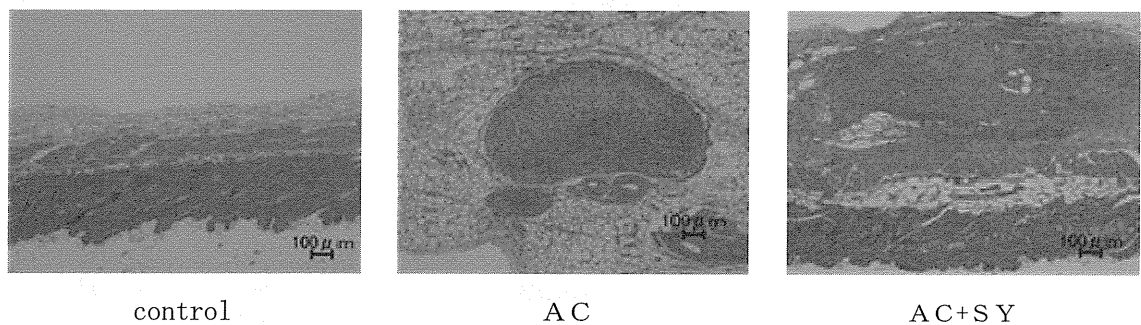


図9 第2回造腫瘍否定試験 移植後12週 HE染色

同種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・医療機器部・主任研究官
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

研究要旨：本研究代表者の東海大学佐藤正人准教授らによって、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が明らかにされてきているが、この技術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積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、培養軟骨細胞およびその積層化シートが免疫系に与える影響を *in vitro* で検討した。H22年度は検討対象を主にマウス軟骨細胞にし、*in vitro* でマウスリンパ球の活性化（細胞増殖）におよぼす影響を検討した。その結果、軟骨細胞は同種だけでなく異種リンパ球の活性化も抑制することが確認できた。H23年度は検討対象をヒトにして検討を行ったところ、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。さらに、積層化軟骨細胞シートも活性化 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。

A. 研究目的

関節軟骨再生修復を目指して、これまでに積層化軟骨シートを用いた動物実験や自己積層化軟骨細胞シートを用いた臨床研究が、本研究代表者の東海大学佐藤正人准教授らによって進められてきているが、この技術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、移植した細胞が生体内で免疫反応においてどのような挙動を示すかは不明である。そこで本研究では *in vitro* において軟骨細胞および積層化軟骨細胞シートが免疫系にどのような影響を与えるかを検討することを目的とした。

間葉系幹細胞（MSC）は数々の報告から、免疫原性が低く、免疫細胞（T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞）の活性化や成熟を抑制する効果があることが示されている。

実際、白血病の治療において骨髄幹細胞の移植時に懸念される副作用である移植片対宿主病(GVHD)の治療に、その免疫抑制効果を期待して MSC が用いられている。一方、軟骨細胞は間葉系幹細胞から分化した細胞であることから、免疫抑制効果を維持している可能性がある。これまでに、*in vitro* で MSC から分化させた軟骨細胞が免疫抑制効果を維持していることが示されているが、生体内ですでに分化している軟骨細胞が同種異系（アロ）反応にどのような挙動を示すか確認した報告はない。

H22年度はまず、*in vitro*においてマウス軟骨細胞が同種リンパ球の活性化に及ぼす影響を検討し、さらにヒト・ウサギ軟骨細胞が異種（マウス）リンパ球の増殖反応にどのような影響を及ぼすかの検討もおこなった。H23年度は検討対象をヒトにして、

ヒト軟骨細胞およびその積層化細胞シートがヒトT細胞およびヒトT細胞とヒト樹上細胞によるリンパ球混合培養(MLR)における活性化T細胞の細胞増殖におよぼす影響を検討したのであわせて報告する。

B. 研究方法

細胞の培養

マウス軟骨細胞 C57BL/6 (H-2^b)及びウサギ軟骨細胞（日本白色家兎）は東海大学医学部整形外科学教室より譲渡してもらった。いずれも、DMEM/F12 (GIBCO 社)に 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社)、1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社) および 50 μ g/ml ascorbic acid (和光純薬工業社)を加えた培地で培養した。

正常ヒト膝関節軟骨細胞(NHAC-kn)は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社)より購入し、Chondrocyte Basal Medium (CBM)に Supplements and Growth Factorsを加えた培地(CGM)で培養した。

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)は日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c (H-2^d)から骨髄細胞を回収し、溶血させた後 Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (Peprotech 社)を入れた Advanced PRMI に 1% FBS を加えた培地で一日おきに培地交換をし、培養 6 日目に 100 ng/ml Lipopolysaccharides (Sigma 社)で刺激を与え一晩培養した後、洗浄しガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

正常ヒト樹状細胞(NHDC)は Lonza 社より購入し、LGM-3 にインターロイキン-4(IL-4)と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をそれぞれ最終濃度 50 ng/ml になるように添加した培地に懸濁し、各反応に必要な播種した状態で 2~3 日培養した。リポ多糖 (LPS)で刺激する際は使用日の前日に添加して一晩培養後洗浄した細胞を実験に使用した。

マウスリンパ球は日本チャールズリバー(株)より購入した C3H (H-2^k)の脾臓をすりつぶし溶血させた後、Advanced PRMI (GIBCO 社)に 1% FBS を加えた培地に懸濁したものを実験に用いた。

ヒト抹消血由来 CD4+T 細胞 (CD4+TC) は Lonza 社より購入し、反応当日に細胞融解後、LGM-3TM に再懸濁して、各反応に必要な数播種した。

全ての培養は 37 $^{\circ}$ C , 5% CO₂ 下で行った。

積層化軟骨細胞シートの作製

まず単層のシートを作製するため、Cell Seed 社の温度応答性インサート(4.2cm²)に NHAC (2.1 x 10⁵ cells)を播種し、2~3 週間培養した。細胞外マトリックスを十分に発現した状態の単層シートを 3 層重ねあわせ、さらに 7~10 日間培養し、積層化軟骨細胞シートを作製した。

混合リンパ球培養反応 (MLR)

マウス細胞による MLR

96 well plate の各ウェルにマウス脾臓細胞 (2 x 10⁵ cells)とガンマ線照射した BMDC (3.3 x 10⁴ cells)を共培養した。

ヒト細胞による MLR

各ウェルにあらかじめ播種していた NHDC（96 ウェル: 3×10^4 cells, 12 ウェル インサート: 1.1×10^5 cells）と CD4+TC（96 ウェル: 2×10^5 cells, 12 ウェル インサート: 7.1×10^5 cells）とを共培養した。

マウスリンパ球と軟骨細胞の共培養

軟骨細胞(2×10^4 cells)が播種された各ウェルにリンパ球(2×10^5 cells)を撒き、共培養を行った。MLR を陽性コントロールとした。

CD4+TC と NHAC の共培養

NHAC（96 ウェル: 2×10^4 cells, 12 ウェル インサート: 7.1×10^4 cells）が播種された各ウェルに CD4+TC を撒き（96 ウェル: 2×10^5 cells, ウェル インサート: 7.1×10^5 cells）、共培養を行った。MLR を陽性コントロールとした。

マウス細胞による MLR と軟骨細胞の共培養

ガンマ線照射した軟骨細胞が播種された各ウェルに上述した条件の MLR を共培養した。MLR のみをコントロールとした。

ヒト細胞による MLR と NHAC の共培養 - 96 ウェル -

NHAC (2×10^4 cells)が播種された各ウェルに先述した条件の MLR を共培養した。MLR のみをコントロールとした。

MLR と NHAC もしくは積層化軟骨細胞シートとの共培養 - 12 ウェル インサート -

12 ウェルに NHAC を 2.2×10^5 cells 播種、もしくは積層化軟骨細胞シートを敷き、その上に 12 ウェル インサート内に播種

した NHDC と CD4+TC による MLR を共培養した。12 ウェル インサート内での MLR のみをコントロールとした。

セルカルチャーインサートはポアサイズ $0.4 \mu\text{m}$ で 12 ウェルタイプの Nunc 社製を使用した。

細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-deoxyuridine 化学発光キット (Roche 社) を用いて測定した。培養 3, 4, 5 日目に各ウェルに BrdU を加え 8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BrdU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。なお 12 ウェル インサート内の MLR では BrdU 取り込み量測定直前にピペッティングし浮遊している T 細胞を回収し 96 ウェルへ移した後、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

C. 結果

1. マウス軟骨細胞が同種リンパ球に及ぼす影響の検討

同種反応陽性コントロールである MLR では高い細胞増殖活性が観察されたのに対して (図 1: 青色バー)、マウスリンパ球とマウス軟骨細胞を共培養した系では、MLR の細胞増殖活性を 100%とした場合、その約 6%の活性しか観察されなかった。(図 1: 黄色バー)

2. 同種軟骨細胞がマウス MLR に及ぼす影響の検討

MLR とマウス軟骨細胞を共培養した結果、MLR のみの写真ではリンパ球が芽球形成（リンパ球が活性化し増殖）しているのに対して、MLR と軟骨細胞の共培養の写真ではほとんどリンパ球が増殖している像は観察されなかった。（図 2.A）また、細胞増殖解析の結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を 100%とした場合、共培養系でのリンパ球の増殖率は 1%前後になっていた。（図 2.B）

3. 異種軟骨細胞がマウス MLR に及ぼす影響の検討

1) ウサギ軟骨細胞の場合

マウス MLR とウサギ軟骨細胞を共培養した結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を 100%とした場合、約 3%まで抑制されていた。（図 3.A）

2) ヒト軟骨細胞の場合

マウス MLR とヒト軟骨細胞を共培養した結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を 100%とした場合、7%前後まで抑制されていた。（図 3.B）

4. 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 4%弱の増殖活性しか観察されなかった。（図 4）

5. 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 細胞の芽球形成像はほとんど

観察されなかった。（図 5.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 5.B）

6. 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。このことから、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。ちなみに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おり、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。セルカルチャーインサートを用いた MLR と NHAC の共培養の結果（図 6）、やはり直接接触する条件で共培養した場合（図 5）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