

五割以下まで抑制していた。

7. セルカルチャーインサートを用いた MLR と積層化 NHAC シートの共培養における検討

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、NHAC と同程度の抑制効果を維持していることが分かった。（図 7）

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、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 年度は主にマウス軟骨細胞を対象として検討した。まず、マウスリンパ球に対する同種軟骨細胞の影響をみたところ、陽性コントロールである MLR の細胞増殖活性に対して軟骨細胞と共培養したリンパ球の細胞増殖活性は有意に低かった。（図 1）このことから、マウス軟骨細胞は同種リンパ球の活性化（細胞増殖）をほとんど誘発しないことが示唆された。さらに、MLR とマウス軟骨細胞の共培養の結果から、マウス軟骨細胞は活性化したリンパ球の細胞増殖も抑制できることが分かった。（図 2）

一方、MSC は異種のリンパ球の活性化抑制効果を有するとの報告があり、我々もマウス MLR をヒト MSC が抑制することを確認できている。そこで、軟骨細胞でも異種リンパ球の活性化を制御可能であるか検討してみた結果、マウス MLR をウサギおよびヒトの軟骨細胞が抑制出来ることが分か

った。（図 3）これらの結果より、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示唆された。

H23 年度は対象をヒト軟骨細胞およびその積層化シートとし検討を行った。その結果、NHAC は同種 T 細胞の活性化をほとんど誘発しないことが分かった。（図 4）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 5, 6）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 7）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。

H22 および H23 年度の研究成果より、*in vitro* において同種軟骨細胞が免疫細胞の活性化を起こさないだけでなく、活性化免疫細胞に対して抑制効果を発揮することが示唆された。しかしながら、その作用機序は不明である。一方、MSC の免疫抑制効果には IL-10, HGF, TGF- β , PGE₂, IDO などの液性因子や細胞同士の接触を介しているとの報告がある。今回、セルカルチャーインサートを用いて軟骨細胞や積層化軟骨細胞シートを活性化 T 細胞と物理的に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、抑制効果の一部は液性因子の関与があると考えられる。TGF- β は軟骨分化に重要な役割を果たす因子であるが、積層化軟骨細胞シートでその発現上昇が観察さ

れていることから、軟骨細胞の免疫抑制効果への関与が考えられる候補因子の一つである。今後、TGF- β の抑制効果への関与の検討だけでなく、他の因子の関与も検討し、総合的に軟骨細胞の免疫調節効果の分子メカニズムを明らかにすることで、同種軟骨細胞を関節軟骨損傷の治療に用いることが可能であることの *in vitro* における裏付けの一旦になると考えられる。

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. 論文発表

- 1) Jung YS, Kato R, Tsuchiya T. Biodegradable Polymers Induce CD54 on THP-1 Cells in Skin Sensitization Test. *Int J Biomater.* 2011:424571-424576 (2011)
- 2) 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. 学会発表

- 1) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田譲治, 松岡厚子. *in vitro* における培養軟骨細胞の免疫応答におよぼす影響. 第24回日本軟骨代謝学会 2011年3月, 福岡.
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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 Society of Toxicology (2012.3)
- 5) 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)
- 6) 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

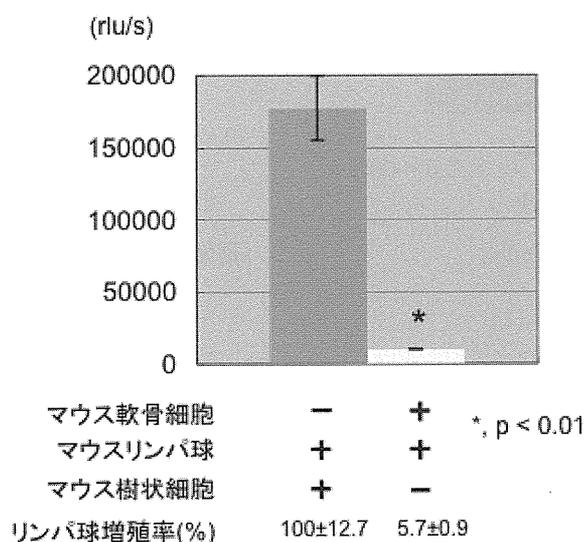


図1. マウス軟骨細胞は同種リンパ球を活性化しない

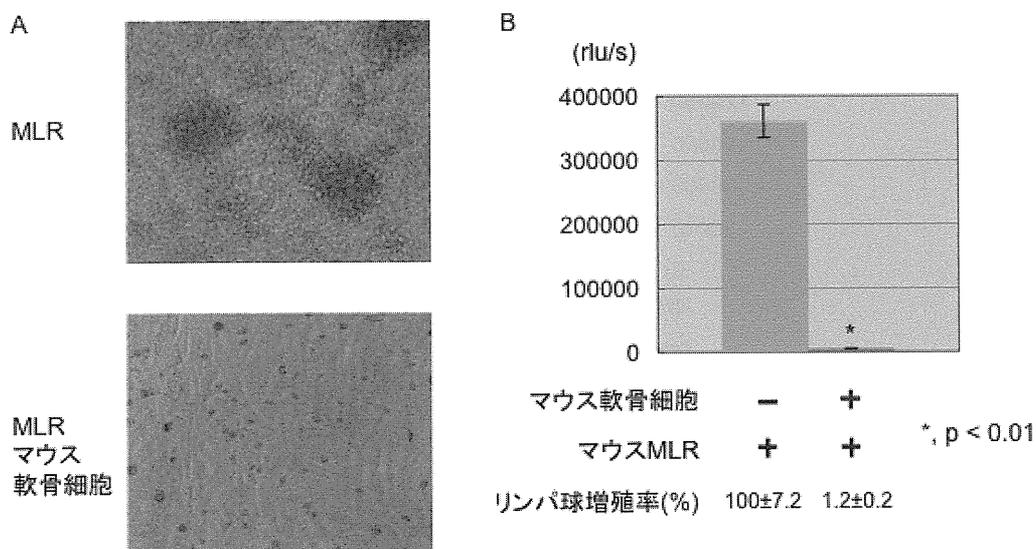


図2. マウス軟骨細胞はMLRの反応を抑制する

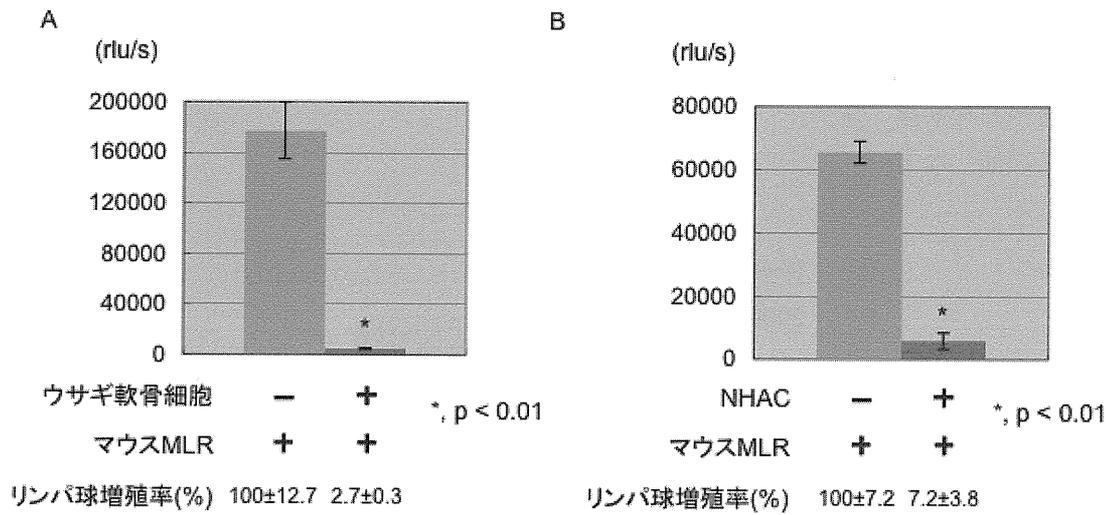


図3. ウサギおよびヒト軟骨細胞はマウス(異種)MLRの反応を抑制する

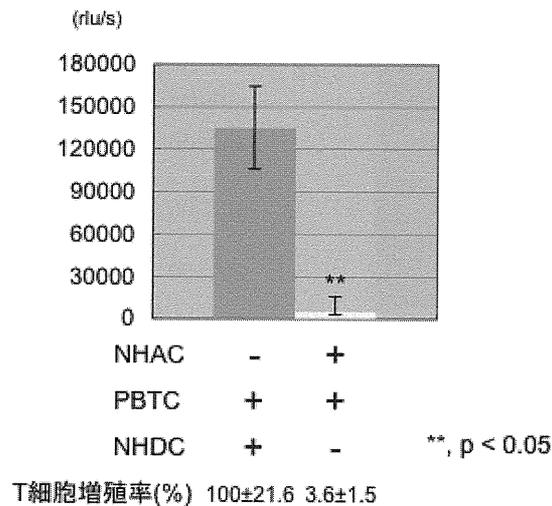


図4. NHACは同種T細胞を活性化しない

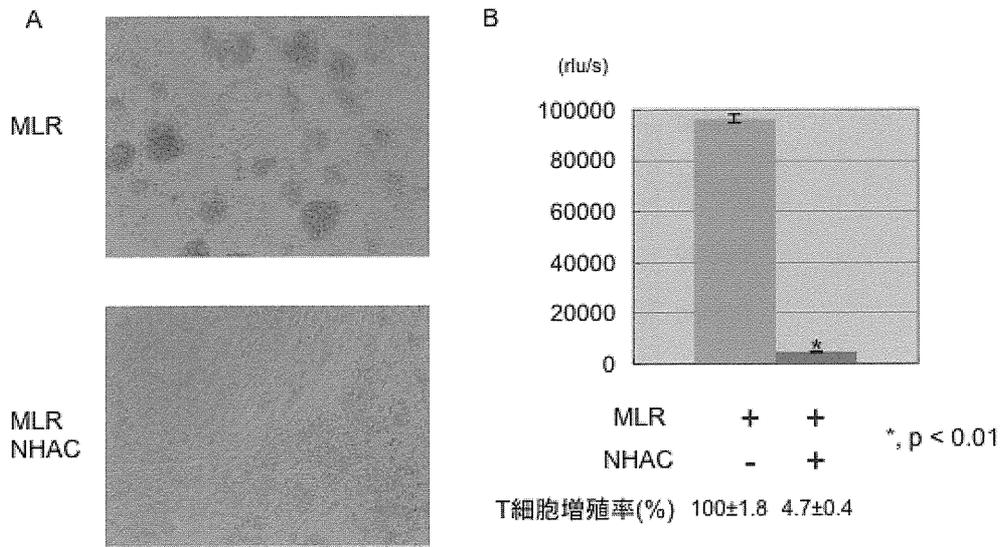


図5. NHACは同種MLRの反応を抑制する

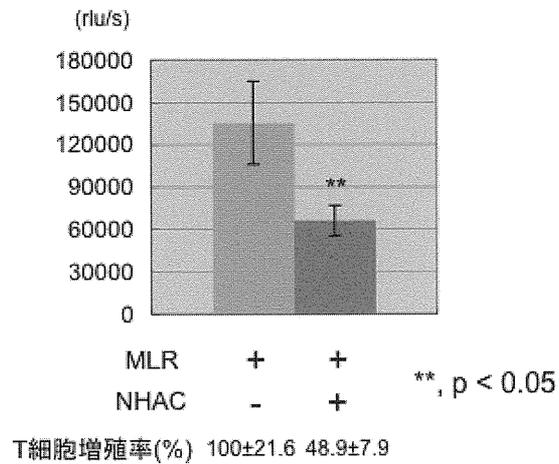


図6. NHACはセルカルチャーインサートを用いて物理的に分離したMLRの反応も抑制できる

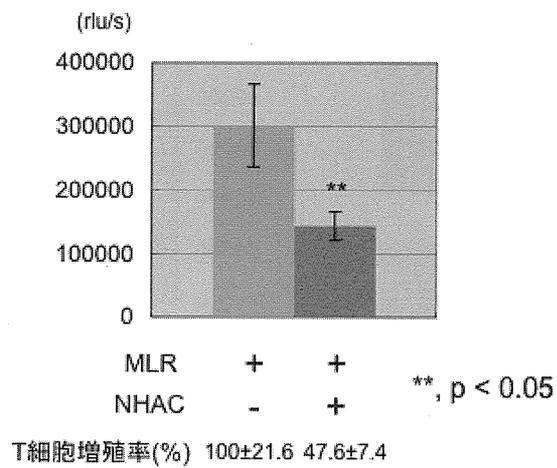


図7. 積層化NHACシートはセルカルチャーインサートを用いて物理的に分離したMLRの反応も抑制できる

共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性評価

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
	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
研究協力者	内山 善康	東海大学医学部外科学系整形外科学・准教授
	繁田 明義	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

研究要旨：関節軟骨部分損傷では修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足するため自然治癒しないことがわかっている。我々は温度応答性培養皿 UpCell™ を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨損傷部分に接着し組織修復に寄与することを、動物実験で確認し、その特性解析から、軟骨保護作用を有していることを確認した。また、温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養法により、細胞増殖能に個体差の大きいヒト細胞によって、より短期間で軟骨細胞シートを回収することを報告した。今回、2種類の細胞を非接触状態で培養できるという、インサートの特性を生かし、ヒト軟骨細胞を同種の凍結滑膜細胞を用いて共培養を行い、その増殖能の変化と作製したシートの特性評価を比較検討した。その結果、同種異関節由来の滑膜細胞との共培養法においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することが可能であり、自己由来細胞の共培養法と同様に軟骨細胞シートの特性を維持していた。

A. 研究目的(自己由来細胞共培養)

関節軟骨は滑液で育てられる無血管組織である。また豊富な細胞外基質を持つため、修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足することが原因となり、自然治癒しないことが分かっている。現在、関節軟骨全層欠損においては、人工関節(TKA, UKA)骨切り術(HTOなど)除去術(Debridement, 半月板除去、滑膜除去)移植術(骨軟骨移植、細胞移植)など、様々な治療法が行われている。軟骨細胞移植術においては、1994年にBrittbergら(N Engl J Med 1994)が初めて臨床応用した自家軟骨移植法(Autologous Chondrocyte Transplantation, ACT)が周知であり、ACTによるOAの治療は欧米や韓国では臨床的に用いられている方法である。国内でも非

荷重部の関節軟骨から単離した軟骨細胞や、MSCを用いて組織工学的に軟骨を作製し、骨軟骨全層欠損例には臨床応用が開始されている。しかし、これらは外傷性の骨軟骨損傷や離断性骨軟骨炎であり、軟骨欠損範囲が元々小さな症例に適応とされており、高齢者に発生する広範な軟骨の変性と初期段階の部分欠損を伴うOAの治療には踏み込めていない。現段階において、関節軟骨部分損傷に関して、現状では明確な治療方針がなく、対症療法的(骨髄液誘導、関節内注射、抗炎症薬(内服, NSAIDなど))に治療されている。我々は温度応答性培養皿を使用することで、組織修復パッチとして積層化軟骨細胞シートを作製し、関節軟骨損傷に対する細胞シートによる関節軟骨の修復再生を目指している。金城らは、温度

応答性培養皿 UpCell®を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨の損傷部分に接着し組織修復作用を有することを動物実験から見出した(BBRC 2006)。単層細胞シートと積層化シートの特性を比較解析したところ、積層化シートに軟骨保護作用の優位な結果を得ている(Eur Cell Mater 2007)。

軟骨の培養時には、軟骨細胞の増殖能が乏しく、また、単層培養を行うと急速に脱分化するため、組織作製までの培養時間をできる限り短くすることが必須となる。一般に *in vitro* で細胞増殖を促進するために、培地への成長因子の添加や、フィーダーセルの利用といった方法が取られている。一方、生体内において、関節軟骨は、滑膜が分泌する関節液から栄養を得ている。

我々は、軟骨細胞と滑膜細胞を共培養することによって、関節内部の様に、軟骨細胞が滑膜細胞から栄養の供給を受け、増殖が促進し、より短期間で確実に軟骨細胞シートを作製することを自己由来軟骨細胞、滑膜細胞を共培養することによって可能とした。

無血管組織である軟骨は免疫原性が低いとみられており、将来、同種細胞での軟骨再生を目標とし、今回、他家由来細胞を共培養することによって、自己由来と同様に軟骨細胞の増殖を促すことが可能か検討した。

B. 研究方法(自己由来細胞共培養)

ヒト軟骨細胞とヒト滑膜細胞

本学臨床研究審査委員会の承認を得て、

患者同意のもと東海大学病院で ACL 再建術時に得られた 10 例 10 膝 15 歳から 42 歳（平均 29 歳、男性 6 人、女性 4 人）の軟骨及び、滑膜組織を酵素的に分離し使用した。

軟骨細胞、滑膜細胞の分離と培養

採取した軟骨組織、滑膜組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細分し、0.4% actinase E (Kakenseiyaku Inc.) を入れた Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(D-MEM/F12; Gibco, NY, USA)で1時間、その後0.016% Collagenase P (Roche, Mannheim, Germany) を含む DMEM/F12 で 2 時間、スターラーで攪拌しながら 37°C、5%CO₂ 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) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) , 4 日目以降はさらに 50μg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou Corp., Japan)を加えたもので維持し、滑膜細胞は DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics-antimycotic で維持した。全ての培養は 37°C ,5% CO₂ and 95% air 下で行った。初代培養、継代培養共に 10,000cells/cm² で播種し、P0 to P1 間は 7 日間、P1 to P2 間は 5 日間の培養期間で継代し P1,P2 サンプルを作製した。温度応答性インサート内で軟骨細胞のみ培

養を行う群（S 群） Companion Plate, Notched for use with Cell Culture Insert (BD Falcon™)に滑膜細胞を、インサート内に軟骨細胞を播種し、インサートを介して共培養を行う群（C 群）を作製した。同時に温度応答性インサートを用いて共培養を行い、培養 14 日目に 3 層に積層化し、7 日間培養した群（CL 群）を作製した。全ての実験において培養は軟骨細胞の維持と同じ培地、手順で行った。

温度応答性培養皿

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する。これは、UpCell®同様、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。現在、角膜再生シート、口腔粘膜再生シート、心筋再生シートといった多方面での臨床応用が期待されている器材である。

評価

増殖能、形質発現に関して、それぞれ以下の方法で比較検討した。

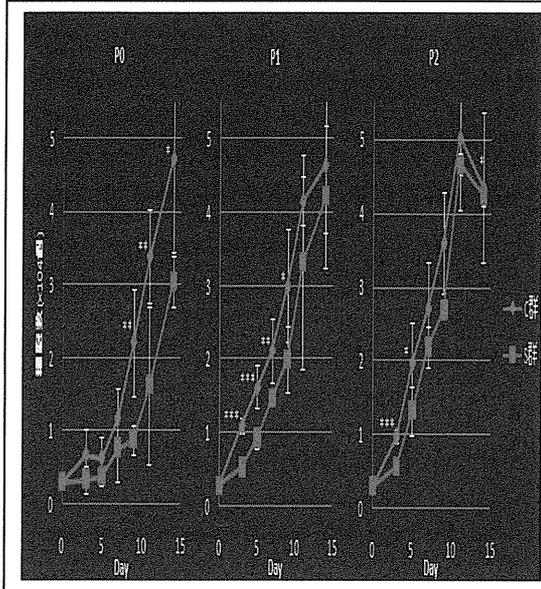
- ① S 群、C 群の軟骨細胞増殖度を経時的（培養 3,5,7,9,11,14 日目）に MTT Assay で計測した。
- ② 播種からサンプリングまで、培養期間を合わせた S 群、C 群、CL 群と単層培養後トリプシン処理をして回収したエンザイム処理細胞群 E 群を加えた 4 群の各々の mRNA を Type2collagen(COL2), SOX9, MMP3, MMP13, Type1collagen(COL1), Type27collagen(COL27), ADAMTS5, Aggrecan-1(AGC1), TIMP-1, Fibronectin-1(FN1)について評価した。normalize samples として、Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を用いた。
- ③ 積層化軟骨シートの COL2 及び、接着因子 FN1, Integrin α 10(IN α 10)の局在について、免疫染色で確認した。

C. 結果(自己由来細胞共培養)

1. MTT Assay

滑膜細胞との共培養によって、S 群と比較して C 群の細胞増殖度は継代数に関わらず優位に増加し、培養 3 日目で 2.23 倍以上の細胞数を示し、11 日目にプラトーに達した。初期播種量が 1×10^4 cells/cm² の場合、P0 では平均 2 週間、P1、P2 では平均 1 週間より短期間で軟骨細胞シートの作製が可能であった。(Fig.1)

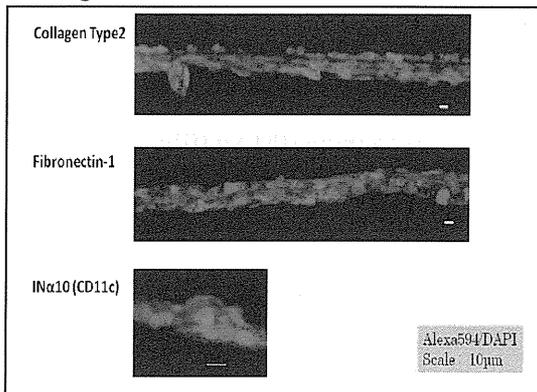
Fig.1



2. 免疫組織染色

CL 群の組織染色において、FN1, IN α 10 の強発現を確認した。(Fig.2)

Fig.2

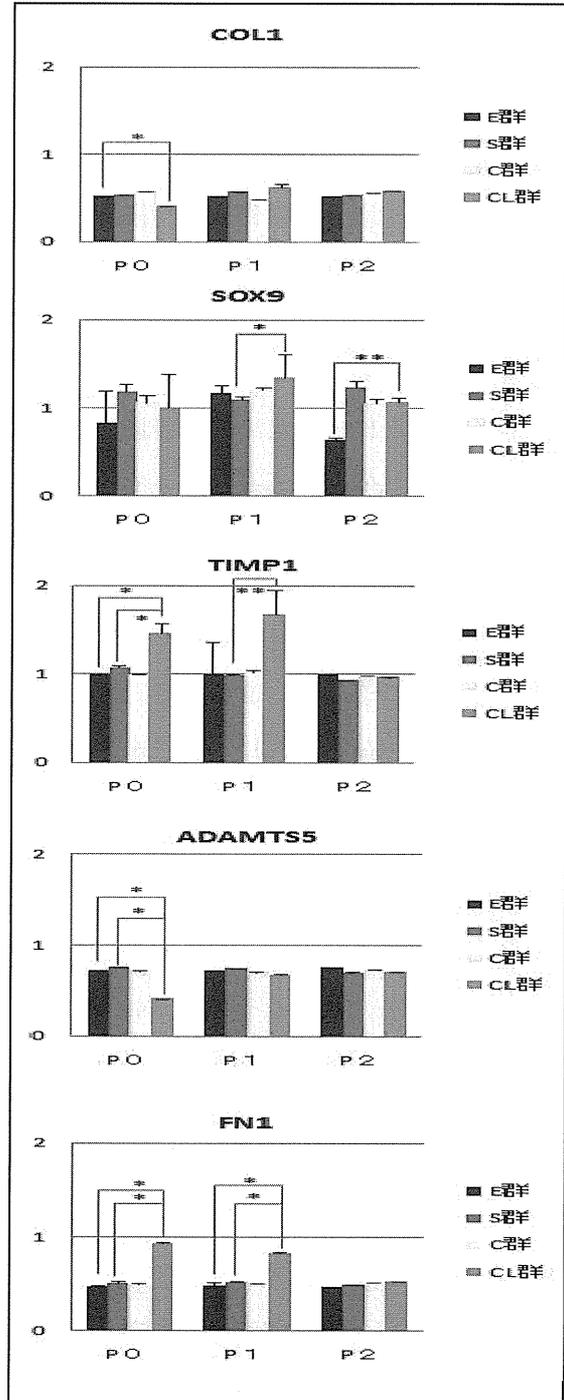


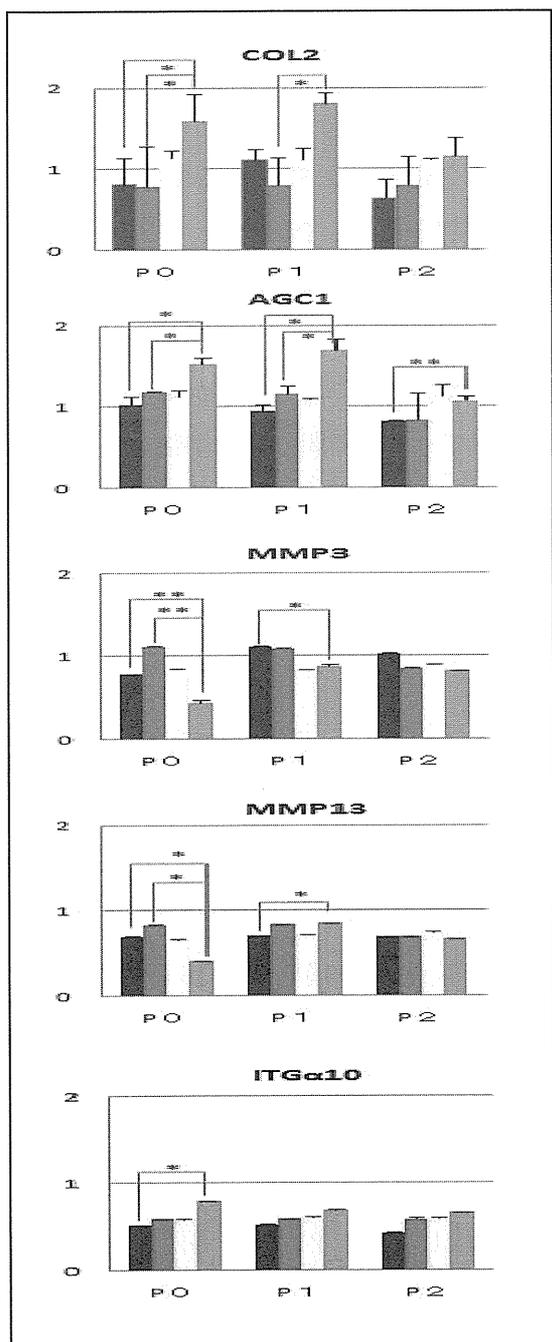
3. Real time PCR

mRNA 値は共培養積層化細胞シート (CL 群) では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1 等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。その差は S 群と比較し、COL2 は平均 1.91 倍、AGC1 は平均 1.35 倍、TIMP1 は 1.37 倍の増加であっ

た。一方 COL1、MMP3、MMP13、ADAMTS5 は 0.8 以下に抑制された。(Fig.3)

Fig.3





D. 考察（自己由来細胞共培養）

正常関節内において、滑膜は、関節液を分泌し、関節軟骨へ栄養を運んでいる。RA,OAの *in vitro* モデルとして、炎症性滑膜細胞と正常軟骨細胞の共培養法が用いられており、その細胞相互作用が数多く報

告されている。今回我々は、慢性炎症のない滑膜組織から採取された滑膜細胞とインサートを介して共培養を行った。その結果、滑膜細胞との共培養による細胞増殖活性は継代数に関わらず有意に増加し、より短期間で軟骨細胞シートを作製することが可能であった(Fig.1)。これは、栄養供給の良いインサートを使用し、共培養を行うことで、滑膜細胞の軟骨細胞増殖にプラスになる液性因子のみを軟骨細胞に作用させることができ、その結果、軟骨細胞の増殖促進につながったと推察された。

関節軟骨部分損傷では修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足するため自然治癒しないことがわかっている。金城らは温度応答性培養皿アップセルを用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨の損傷部分に接着し組織修復作用を有することを動物実験から見出し(BBRC 2006)、その特性解析において、単層細胞シートと積層化シートの特性を比較解析したところ、積層化シートに軟骨保護作用の優位な結果を得ている。(Eur Cell Mater 2007)今回、共培養積層化細胞シート (CL群) では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。またその差はP0,P1において明らかであった。CL群ではAGC1, TIMP1の高発現、MMP3, MMP13, ADAMTS5の抑制がP1までは優位に見られたものの、P2においては他の2群と同等の発現となった。しかし、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)。

一般に軟骨細胞はその増殖過程で軟骨固有の性質を失い、繊維芽細胞様に変化する。この変化には、プロテオグリカン産生が低下、分泌コラーゲンの2型から1型への変化を伴う。Yoonらは第3継代までは2型コラーゲンが測定でき、第4継代目以降からは典型的な脱分化の状況となったと報告した。今回、mRNA比較においてCL群において、AGC1, TIMP1といった関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3, MMP13, ADAMTS5といったカタボリックファクターの発現はP1までは優位に抑制された。これは、積層化によって、軟骨細胞に適した培養環境を作り出すことができたかと推察される。これは、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)ことから推察される。しかしながら、P2においては他の2群と有意な差は得られなかった。これは、単層培養で継代を重ねたことにより、いくつかの軟骨細胞が脱分化への傾向を示した。と考えられる。この結果はさらに、これからの臨床応用に向け、初期培養細胞が最も適しているということをも示唆している。

パッチとして移植した細胞シートの接着性を免疫染色にて行った結果、シート全体に強くFNの発現が見られたことから、移植部分に細胞シートが接着し、修復に関与する可能性が示唆された。(Fig.2)

E. 研究目的(他家由来細胞共培養)

温度応答性インサートを使用した滑膜

細胞との共培養では、液性因子を介した細胞間相互作用により、より早く軟骨細胞シートを作製でき、また積層化によって軟骨分化並びに形質維持に重要な遺伝子の増加を認め、接着性とバリア機能に優れた軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。滑膜細胞との共培養法は増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能にし、軟骨細胞シートを積層化することによって、より軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。

F. 研究方法 (他家由来細胞共培養)

ヒト軟骨細胞とヒト滑膜細胞

本学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと東海大学病院で肩関節制動術時に得られた13例13膝19歳から36歳(平均29歳、男性11人、女性2人)の軟骨滑膜細胞は、ACL再建術時に採取した10例10膝15歳から42歳(平均29歳、男性7人、女性3人)の滑膜組織を酵素的に単離後継代し、P0、P1、P2各点で凍結保存した細胞を用いた。

軟骨細胞、滑膜細胞の分離と培養

採取した軟骨組織、滑膜組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細分し、0.016% Collagenase Type I (Worthington, NJ, USA)を含むDMEM/F12で2時間、スターラーで攪拌しながら37℃、5%CO₂下でインキュベ

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) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)、4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou Corp., Japan)を加えたもので維持し、滑膜細胞は DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics-antimycotic で維持後凍結し、各継代数において凍結保存したものを解凍して使用した。全ての培養は 37°C ,5% CO2 and 95% air 下で行った。初代培養、継代培養共に 10,000cells/cm2 で播種し、P0 to P1 間は 7 日間、P1 to P2 間は 5 日間の培養期間で継代し P1,P2 サンプルを作製した。

温度応答性インサート内で軟骨細胞のみ培養を行う群 (S 群) Companion Plate, Notched for use with Cell Culture Insert (BD Falcon™)に滑膜細胞を、インサート内に軟骨細胞を播種し、インサートを介して共培養を行う群 (C 群) を作製した。同時に温度応答性インサートを用いて共培養を行い、培養 14 日目に 3 層に積層化し、7 日間培養した群 (s) CL 群) を作製した。全ての実験において培養は軟骨細胞の維持と同じ培地、手順で行った。

評価

増殖能、形質発現に関して、それぞれ以

下の方法で比較検討した。

- ① S 群、C 群の軟骨細胞増殖度を経時的（培養 3,5,7,9,11,14 日目）に MTT Assay で計測した。
- ② 播種からサンプリングまで、培養期間を合わせた S 群、CL 群自己細胞間で共培養を行い CL 群と同様に積層化させた(s)CL 群の 3 群間をの各々の mRNA を Type2collagen(COL2), SOX9, MMP3, MMP13, Type1collagen(COL1), Type27collagen(COL27), ADAMTS5, Aggrecan-1(AGC1), TIMP-1, Fibronectin-1(FN1)について評価した。normalize samples として、Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を用いた。
- ③ 積層化軟骨シートの COL2 及び、接着因子 FN1 の局在について、免疫染色で確認した。

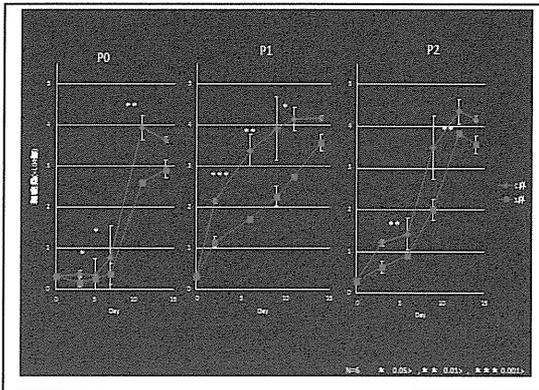
G. 結果（他家由来細胞共培養）

1. MTT Assay

S 群と比較して C 群の細胞増殖活性は全ての継代数において培養 3 日目に約 2 倍と優位に増加し、早いもので 11 日目にコンフルエントに達した。

その結果、P0 細胞で平均 2 週間早く軟骨細胞シートを作製することが可能であった。(Fig.1)

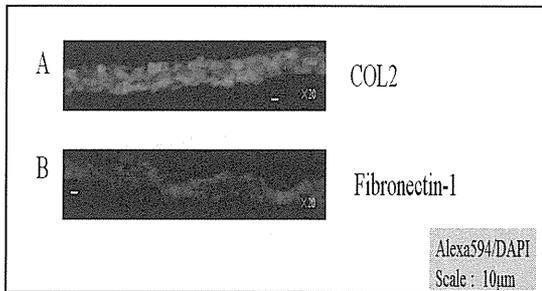
Fig.1



2. 免疫組織染色

免疫組織染色では、CL 群において、COL2、FN の発現がシート全体で確認された。(Fig.2)

Fig.2



3. real-time PCR

mRNA の発現量は、CL 群は S 群と比較し、COL2, AGC1, SOX9, TIMP1 といった、関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3, MMP13, ADAMTS5 の発現は 0.8 以下に抑制された。その値は (s)CL 群と同等の値であった。(Fig.3)

Fig.3

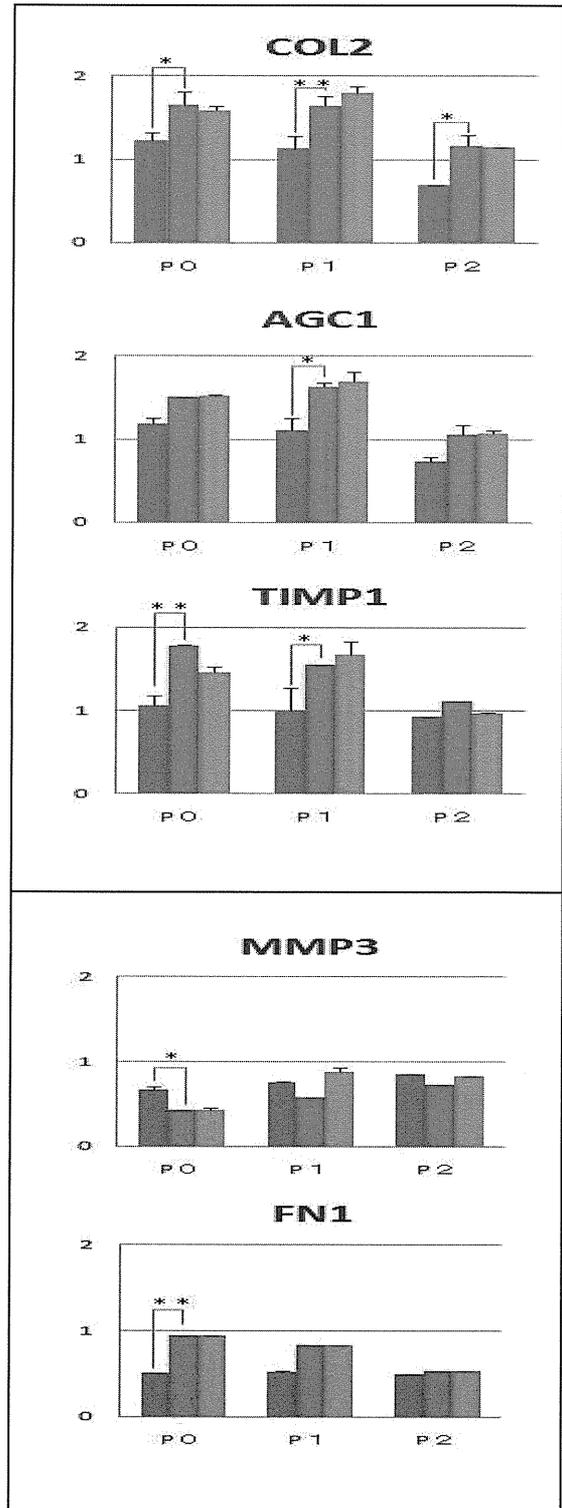
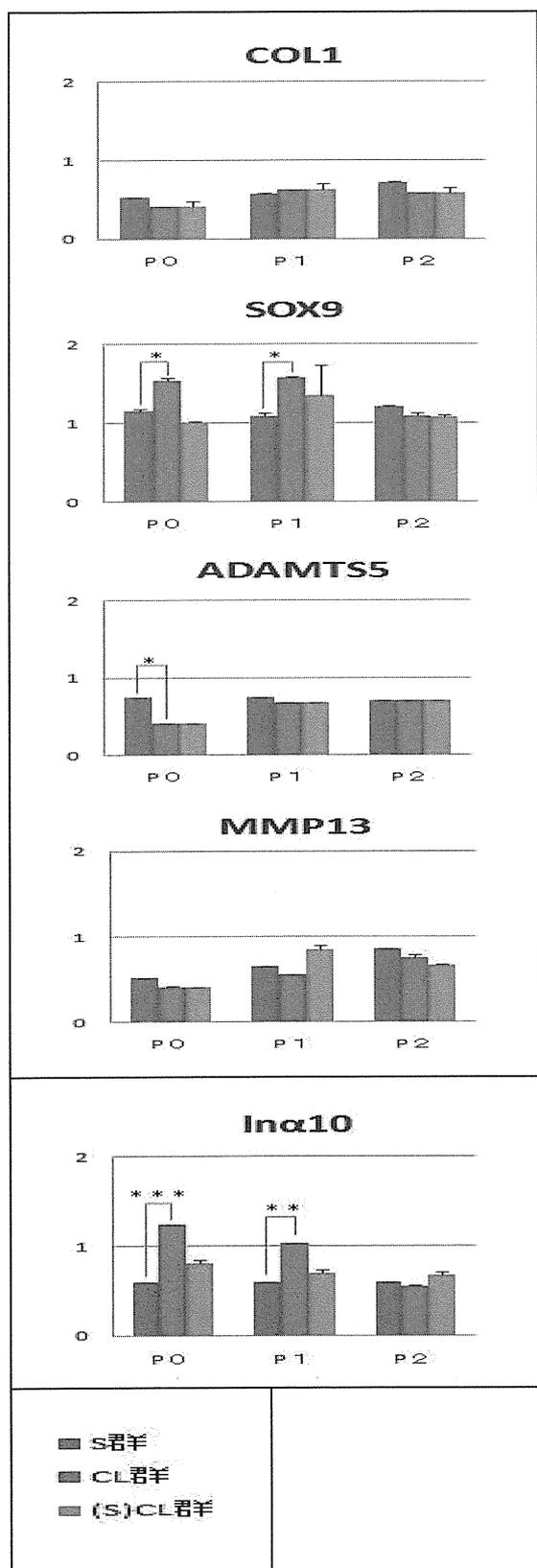


Fig.3



H. 考察（他家由来細胞共培養）

正常関節内において、滑膜は、関節液を分泌し、関節軟骨へ栄養を運んでいる。RA、OAのin vitro モデルとして、炎症性滑膜細胞と正常軟骨細胞の共培養法が用いられており、その細胞相互作用が数多く報告されている。今回我々は、慢性炎症のない滑膜組織から採取された凍結滑膜細胞とインサートを介して共培養を行った。その結果、滑膜細胞との共培養による細胞増殖活性は継代数に関わらず有意に増加し、より短時間で軟骨細胞シートを作製することが可能であった(Fig.1)。これは、軟骨細胞が関節内の軟骨組織のように、通常の培地だけでは得られない、滑膜細胞から分泌される栄養分を、インサートを介して得ることで、その結果、軟骨細胞の増殖促進につながったと推察された。

今回、共培養積層化細胞シート（CL群）では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1 等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。またその差はP0,P1において明らかであった。CL群ではAGC1, TIMP1の高発現、MMP3, MMP13, ADAMTS5の抑制がP1までは優位に見られたものの、P2においては他の2群と同等の発現となった。しかし、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)。

一般に軟骨細胞はその増殖過程で軟骨固有の性質を失い、線維芽細胞様に変化する。この変化には、プロテオグリカン産生が低下、分泌コラーゲンの2型から1型への変

化を伴う。

Yoonらは第3継代までは2型コラーゲンが測定でき、第4継代目以降からは典型的な脱分化の状況となったと報告した。今回、mRNA比較においてCL群において、AGC1, TIMP1といった関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3, MMP13, ADAMTS5といったカタボリックファクターの発現はP1までは優位に抑制された。これは、積層化によって、軟骨細胞に適した培養環境を作り出すことができたと推察される。

これは、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)ことから推察される。しかしながら、P2においては他の2群と有意な差は得られなかった。これは、単層培養で継代を重ねたことにより、軟骨細胞が脱分化への傾向を示したと考えられる。これらの結果は臨床応用に向け、初期培養細胞が最も適しているということをも示唆している。

細胞シートの接着性を免疫染色にて行った結果、シート全体に強くFNの発現が見られたことから、移植部分に細胞シートが接着し、修復に関与する可能性が示唆された。(Fig.2)

温度応答性インサートを使用した同種異関節由来滑膜細胞との共培養法においても、液性因子を介した細胞間相互作用により、より早く軟骨細胞シートを作製することができ、また積層化によって軟骨分化並びに形質維持に重要な遺伝子の増加を認め、接着性とバリア機能に優れ

た軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。同種異関節由来滑膜細胞との共培養法は自己由来細胞の共培養法と同様に、増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能にし、積層化細胞シートの遺伝子発現は自己由来細胞の共培養法で作製したものと同等の発現であった。この結果から、臨床応用へ向け、アロの細胞を用いることで、低侵襲でACIを実行することができるということが推察された。

I. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

J. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohta N, Sato M, Ushida K, Kokubo M, Baba T, Taniguchi K, Urai M, Kihira K, Mochida J. Jyellyfish mucin may have potential disease-modifying effects on osteoarthritis. BMC Biotechnology 2009, 9:98, 2009.

2) Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Kokubo M, Ebihara G, Ohta N, Mochida J. Intravenous administration of anti-vascular endothelial growth factor humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair. Arthritis Res Ther. 12(5):R178, 2010.

2. 学会発表

- 1) 小久保舞美, 佐藤正人, 太田直司, 坂井秀昭, 持田讓治. 滑膜細胞との共培養法を用いた短期間での軟骨細胞シートの作製とその特性評価. 第53回日本リウマチ学会総会 2009年4月, 東京.
- 2) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規, 持田讓治. クラゲ由来ムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第53回日本リウマチ学会総会 2009年4月, 東京.
- 3) 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治. 同種異関節における細胞相互作用の検討～共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性～. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月, 横浜.
- 4) 佐藤正人, 三谷玄弥, 杓名寿治, 長井敏洋, 海老原吾郎, 太田直司, 小久保舞美, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 持田讓治. 関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨（軟骨細胞シート/プレート）の役割. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月, 横浜.
- 5) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 小久保舞美, 持田讓治. 抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 (Bevacizumab)による軟骨修復効果. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月, 横浜.
- 6) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規, 持田讓治. クラゲムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月, 横浜.
- 7) Kokubo M, Sato M, Mitani G, Kutsuna T, Ohta N, Ebihara G, Sakai H, Mochida J. Evaluation of characteristics of chondrocyte sheet constructed of cultured chondrocytes using co-culture method with synovial cells. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2010年3月, ニューオリンズ.
- 8) Ohta N, Sato M, Ushida K, Kokubo M, Baba T, Taniguchi K, Urai M, Kihira K, Mochida J. Jellyfish mucin may have potential disease modifying effects of osteoarthritis of the knee. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2010年3月, ニューオリンズ.
- 9) 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治. 同種異関節由来細胞間共培養法を用いた軟骨細胞シートの作製とその特性. 第9回再生医療学会 2010年3月, 広島.
- 10) 小久保舞美, 佐藤正人, 持田讓治. 関節軟骨細胞の初代培養における Ascorbic acid の影響. 第54回日本リウマチ学会, 口演 W-2-K-5, 神戸, 2010.
- 11) 三谷玄弥, 小久保舞美, 佐藤正人, 持田讓治. ヒト膝関節内組織における Tenomodulin, Scleraxis の発現状況. 日本膝関節学会 (JOSKAS) 雑誌, 査読無, (1884-8842) 第35巻4号, Page136[II-3-O-38-2], 2010.
- 12) Lee J, 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 小久保舞美, 持田讓治. 滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移植体による軟骨再生効果. 第

25 回日本整形外科学会，日本整形外科学会雑誌，査読無，(0021-5325)84 巻，8PageS1060[1-4-14]，2010.

13) 三谷玄弥，佐藤正人，小久保舞美，宿南知佐，持田讓治. 再生医療に向けた前十字靭帯、滑膜由来細胞シートの検討. 第 25 回日本整形外科学会，日本整形外科学会雑誌，査読無，(0021- 5325)84 巻 8 号，PageS1219[2-3-5]，2010.

14) 海老原吾郎，佐藤正人，小久保舞美，三谷玄弥，伊藤聡，太田直司，長井敏洋，杓名寿治，持田讓治. 積層化軟骨細胞シートの液性因子の解析. 第 25 回日本整形外科学会，日本整形外科学会雑誌，査読無，(0021-5325)84 巻 8 号，PageS1059[1-4-11]，2010.

15) 長井敏洋，佐藤正人，杓名寿治，小久保舞美，海老原吾郎，太田直司，持田讓治. 抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体 (Bevacizumab) 投与による骨軟骨修復効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会，日本整形外科学会雑誌，査読無，(0021-5325)84 巻 8 号，PageS1062 [1-4-18]，2010.

16) 小久保舞美，佐藤正人，内山善康，繁田明義，持田讓治. 関節軟骨細胞初代培養時の ascorbic acid の影響. 第 25 回日本整形外科学会，日本整形外科学会雑誌，査読無，(0021-5325)84 巻 8 号，PageS1142[1-Pd-14]，2010.

17) Kokubo M，Sato M，Mitani G，Uchiyama Y，Handa A，Kutsuna T，Hamahashi K，Ohta N，Ebihara G，Itoh S，Ukai T，Sakai H，Mochida J. Evaluation

of characteristics of chondrocyte sheets using co-culture method with allogeneic synovial cells. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.01, Long Beach.

18) Toshihiro N, Sato M, Kutsuna T, Itoh S, Kokubo M, Mochida J. Repair of articular cartilage with anti- VEGF antibody bevacizumab. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.01, Long Beach.

19) 長井敏洋，佐藤正人，杓名寿治，海老原吾郎，伊藤聡，小久保舞美，鶴養拓，持田讓治. 血管新生阻害剤(Bevacizumab)静脈内投与による関節軟骨修復の検討. 第 10 回日本再製医療学会総会，2011 年 3 月，東京.

20) 浜橋恒介，佐藤正人，小久保舞美，三谷玄弥，長井敏洋，海老原吾郎，杓名寿治，持田讓治. 積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討. 第 10 回日本再製医療学会総会，2011 年 3 月，東京.

21) 高久裕子，村井邦彦，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. 第 10 回日本再製医療学会総会，2011 年 3 月，東京.

22) 伊藤聡，佐藤正人，小久保舞美，鶴養拓，長井敏洋，三谷玄弥，持田讓治. 家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討. 第 10 回日本再製医療学会総会，2011 年 3 月，東京.

23) 小久保舞美，佐藤正人，内山善康，繁

田明義, 伊藤聡, 鶴養拓, 持田讓治. 軟骨細胞初代培養時におけるアスコルビン酸の影響とその添加時期の検討. 第9回再生医療学会 2011年3月, 福岡.

24) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田讓治, 松岡厚子. *in vivo* における培養軟骨細胞の免疫反応におよぼす影響. 第9回再生医療学会 2011年3月, 福岡.

25) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鶴養拓, 長井敏洋, 沓名寿治, 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, 2011年10月, 群馬.

26) 佐藤正人, 三谷玄弥, 金城永俊, 長井敏洋, 沓名寿治, 高垣智紀, 伊藤聡, 鶴養拓, 小久保舞美, 持田讓治関. 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 2011年10月, 群馬.

27) Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Nagai T, Kokubo M, Mochida J. Analysis of functions of miR-199-3p and miR320-c in chondrocytes. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2012 2012年2月, サンフランシスコ.

28) 小林美由紀, 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, 2012年3月, 愛知.

K. 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

MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism

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

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs of ~22 base pairs that regulate gene expression. We harvested cartilage tissue from patients with polydactylism, anterior cruciate ligament injury, and osteoarthritis undergoing total knee arthroplasty and used microarrays to identify miRNAs whose expression is upregulated or downregulated with age. The results were assessed by real-time PCR and MTT assay in a mimic group, in which synthetic double-stranded RNA from the isolated miRNA was transfected to upregulate expression, and in an inhibitor group, in which the miRNA was bound specifically to downregulate expression. The expression of two miRNAs (miR-199a-3p and miR-193b) was upregulated with age and that of one miRNA (miR-320c) was downregulated with age. A real-time PCR assay showed that type 2 collagen, aggrecan, and SOX9 expression were downregulated in the miR-199a-3p mimic group but was upregulated in the inhibitor group. Similar results were observed for miR-193b. By contrast, ADAMTS5 expression was downregulated in the miR-320c mimic group and upregulated in the inhibitor group. Cell proliferative activity was upregulated significantly in the miR-193b inhibitor group compared with the control group. We believe that miR-199a-3p and miR-193b are involved in the senescence of chondrocytes, and miR-320c is involved in the juvenile properties of chondrocytes.

A. 研究目的

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded noncoding RNAs of ~22 base pairs that regulate gene expression by repressing translation. In 1993, the first miRNA, lin-4 was discovered in nematodes, and subsequent studies have shown that miRNAs regulate ~30% of all human genes.¹ miRNA is transcribed initially from miRNA genes into a long primary transcript (pri-miRNA), which is then cleaved by Drosha to produce precursor miRNA (pre-miRNA). The

pre-miRNA is then transported to the cytoplasm using exportin-5, and there it is cleaved by Dicer to yield miRNA. The miRNA then combines with an argonaute protein to form RISC, which sequence-specifically recognizes and represses the translation of target RNAs.² Abnormalities in cartilage development have been observed in Dicer gene dysfunction models, and miRNA is known to play a key role in cartilage differentiation.³ miRNA plays a key role in differentiation and growth in organs