

## PROTOCOL

- I. Baseline acquisition of the hyperspectral image for setting exposure time and gain after dark-current and thermal noise correction.  
\*Sample: culture dish filled with culture medium as background
- II. General microscopic observation.  
\*Phase contrast image or differential interference contrast image
- III. Determination of arbitrary intracellular and/or extracellular regions for spectral acquisition.
- IV. Hyperspectral image acquisition under the set exposure time and gain.
- V. Marked (stained) microscopic observation to visualize distribution the specific region (nuclear, subcellular organelle and extracellular matrix)  
\*Example: Hoechst stain (nuclear), Cell mask stain (whole cell), PKH stain (cell membrane)
- VI. Determination of the particular spectrum for creation of database
- VII. Spectral database creation under biological understanding condition



Fig.2 Primary cartilage cells obtained from a knee joint of Japanese White rabbit cultured for monolayer in an incubator with air containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. A: differential interference contrast image B: image stained with Cell mask, C: image stained with Hoechst

## 4. CONCLUSION

We have successfully developed the hyperspectral imaging system for acquiring spectrum of cells itself used in regenerative medicine. The system finally allowed to acquire 5 dimensional (x, y, z, time, wavelength) data sets. We enabled to confirm spectrum of autofluorescence of collagen, absorption of specific molecules in the cultural medium and increase of scattering signal due to cell components (data not shown) although detail analyses have not been performed.

## REFERENCES

1. Ishihara, M., Iwasa, M., Doshida, M., Kikuchi, M., "Cellular functional image using hyperspectral technology for application to regenerative medicine," Proc. SPIE 7179, 7179E (2009).
2. Siddiqi AM, Li H, Faruque F, Williams W, Lai K, Hughson M, Bigler S, Beach J, and Johnson W. "Use of hyperspectral imaging to distinguish normal, precancerous, and cancerous cells," Cancer 114(1), 13-21 (2008)

3. Araki, R., Jincho Y., Hoki Y., Nakamura M., Tamura C., Ando S., Kasama Y., and Abe, M., "Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells," STEM CELLS 28, 213-220 (2010)

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mr. Isao Bansaku, Ms. Machiko Tanikawa and Ms. Yoshine Mayumi for their important contributions to the experiments. Development of the hyperspectral imaging system has been supported by Dr. Minoru Doshida (Electronic Systems Research Center, Technical Research & Development Institute, Ministry of Defense).

This study was partially supported by Health and Labour Sciences Research Grants Research on Regenerative Medicine for Clinical Application.

Authors appreciate the fruitful discussions about the application to regenerative medicine with Prof. Junya Toguchida, MD, PhD. (Institute for Frontier Medical Sciences & Center for iPS Research and Application Kyoto University).

新しい医療技術

## 軟骨再生医療に有効な光技術

石原美弥\* 菊地 眞 佐藤正人\*\*  
沓名寿治 三谷玄弥 持田讓治

要旨：再生医療で重要な役割を果たす周辺工学技術の一つに、細胞・組織の機能を評価する計測技術が挙げられる。われわれは、生体に安全なレーザー光を用いて簡便に力学特性や細胞外マトリックスの性状を評価できる計測技術を開発している。組織工学的手法を用いて作製した軟骨を対象にした実験結果を基に軟骨再生医療の評価法として開発技術の有効性を検証した。

再生医療は失われた臓器・組織・器官の再生や機能の回復を目的とした医療で、先端医療として着目されており、典型的な融合境界領域として医学・生物学・工学の連携によって実現可能となる医療である。

再生医療で重要な役割を果たしている周辺工学技術に、計測・イメージング技術が挙げられる。再生した細胞・組織の形態と機能の評価は、再生組織の一部あるいはすべてをサンプルとして提供しないのでできる非侵襲的方法で行う必要がある。同時に、評価すべきパラメーターとして再生医療の正当性や有効性を正確に判断するための指標を的確に選択する必要がある。的確な指標でないと、組織工学的手法を用いて組織を構築する過程における移植の至適なタイミングが決められな

い。

日常生活動作 (ADL) を下げ、生活の質 (QOL) の低下も招く変形性関節症をはじめとする運動器疾患の新しい治療として、軟骨再生医療が着目されている。軟骨の再生医療は 1990 年代前半から海外で実施・報告され、米国をはじめとする諸外国では既に 2 万例に近い手術症例の蓄積がある。しかし、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は未だ実施されていない。

関節軟骨の修復・再生に最適な組織工学的軟骨の開発が最重要課題であることは明らかであるが、同時に軟骨再生医療にとって重要な評価パラメーターを適切に評価することも軟骨再生医療実現のための重要課題である。軟骨再生医療では組織工学的手法で細胞外マトリックスの成熟を促し、力学機能を回復し再建させる。すなわち、重要な評価パラメーターの 1 つは力学特性を表すパラメーターとなる。また、関節軟骨の再生医療では、本来の硝子軟骨組織に再生されるのではなく、線維軟骨組織として再生されてしまうことがしばしば問題となっている。

こうした問題を未然に防止するためのモニタリ

\* Miya ISHIHARA et al, 防衛医科大学校, 医用工学講座

\*\* Masato SATO et al, 東海大学医学部, 外科学系整形外科学

Optical technology in regenerative medicine of articular cartilage

Key words : Photoacoustic, Autofluorescence, Articular cartilage

ングとして、軟骨組織を構成するコラーゲンの自家蛍光の測定は、軟骨組織の生化学的組成に関する成熟度の指標となる可能性がある。軟骨再生医療の評価には形態情報も重要であるが、力学特性やコラーゲン組成に関する情報の方が、よりニーズを満たしたパラメーターとなる。

光/レーザー光技術は医療現場に優位に持ち込め、広く有効に活用できる。これは次のような特長を持つことによる。

- 経ファイバー的・経内視鏡的に生体へアプローチが可能
- 傷害性のない光・レーザー光を選択することで、非侵襲的な診断が可能
- 高い空間分解能、および、高い時間分解能の微細治療・診断が可能

光/レーザー光を用いると形態情報だけでなく、物理学的・生化学的な情報の取得も可能で、選択的かつ特異的な作用を可能にする。このような特長は軟骨再生医療の評価にも有用である。アメリカなどで研究開発が進んでいるMRIを用いた軟骨の評価方法や、日本やヨーロッパで臨床応用が開始されている超音波に比べて、レーザー光を用いる利点は、上記に挙げた点のほかに、一度に複数の情報が得られることと、MRIやX線などの画像診断装置と比べると非常にコンパクトで、さらに、簡便に取り扱うことができ、かつ即時に診断結果が出ることである。もちろん、放射線被曝、造影剤の使用や磁場の影響などのような侵襲性はない。

われわれは、パルスレーザー光照射により局所で発生した応力波が、組織内を伝播する過程で組織固有の力学特性により減衰する現象に着目し、光音響法で力学特性を計測できる基本原理を提案した。応力波の減衰時間( $\tau$ )が組織の粘性( $\eta$ )と弾性( $G$ )の比( $\eta/G$ )に相当するという原理である。われわれは原理実証実験として、力学特性を変化させた生体ファントムを測定対象に、光音響法を用いて計測された粘弾性パラメーターである減衰時間と既存の侵襲的粘弾性分析装置から得られる物質固有の粘弾性特性値( $\tan\delta$ )に相関があることを示し、提案した方法で力学特性が測定

できることを実証した<sup>1)2)</sup>。さらに、細胞外マトリックスの主要成分の一つであるコラーゲンが自家蛍光物質であること、自家蛍光は生体内に内在する物質から発生する蛍光であるため生体内の性状を反映することから、自家蛍光による組織性状評価法について提案・検討した<sup>3)4)</sup>。軟骨組織には構成成分・機能が異なる硝子軟骨、線維軟骨、弾性軟骨があり、硝子軟骨の細胞外マトリックスはII型コラーゲンとプロテオグリカンが主要な成分で、線維軟骨の場合はI型コラーゲン優位の細胞外マトリックス、弾性軟骨の場合はコラーゲンとともにエラスチンを多く含んでいる。われわれは、光音響法で用いるレーザー光を自家蛍光の励起光とし、時間分解自家蛍光スペクトル測定により得られる波長と時間を関数とするパラメーターが、コラーゲンの分子種で異なることを自家蛍光特性実験で検証した。これを細胞外マトリックスの性状を評価する方法とし、光音響法と組み合わせた評価法を開発している。提案しているシステムを図1に示す<sup>5)</sup>。

まず、本開発システムの安全性を確認するために、細胞増殖活性試験においてレーザー光照射による軟骨への影響を確認した。細胞増殖活性試験には、Cell Counting Kit-8を使用するWST-8アッセイを用いた。培養した軟骨細胞にレーザー光を照射して、増殖活性試験試薬を滴下した後、37℃、5% CO<sub>2</sub>気相の条件のインキュベータで培養し、上清の吸光度より細胞の増殖活性を算出した。結果を図2に示す<sup>6)</sup>。現在の測定条件としている50倍のショット数の場合でも、使用している装置の最大出力のエネルギーの場合でも、ネガティブコントロールとしたレーザー光を当てない細胞群と増殖活性に有意差はなかった。また、ポジティブコントロールとしたアルコール滴下群とは異なる増殖活性を有意差を持って示した。これにより、現在設定しているレーザー光の条件では細胞の増殖活性に影響がないことが確認された。以上から、レーザー光照射による細胞傷害がないことが示され、開発手法の安全性を確認した。

次に、組織工学的手法を用いて作製した培養軟骨組織を対象に、開発システムを適用して計測し

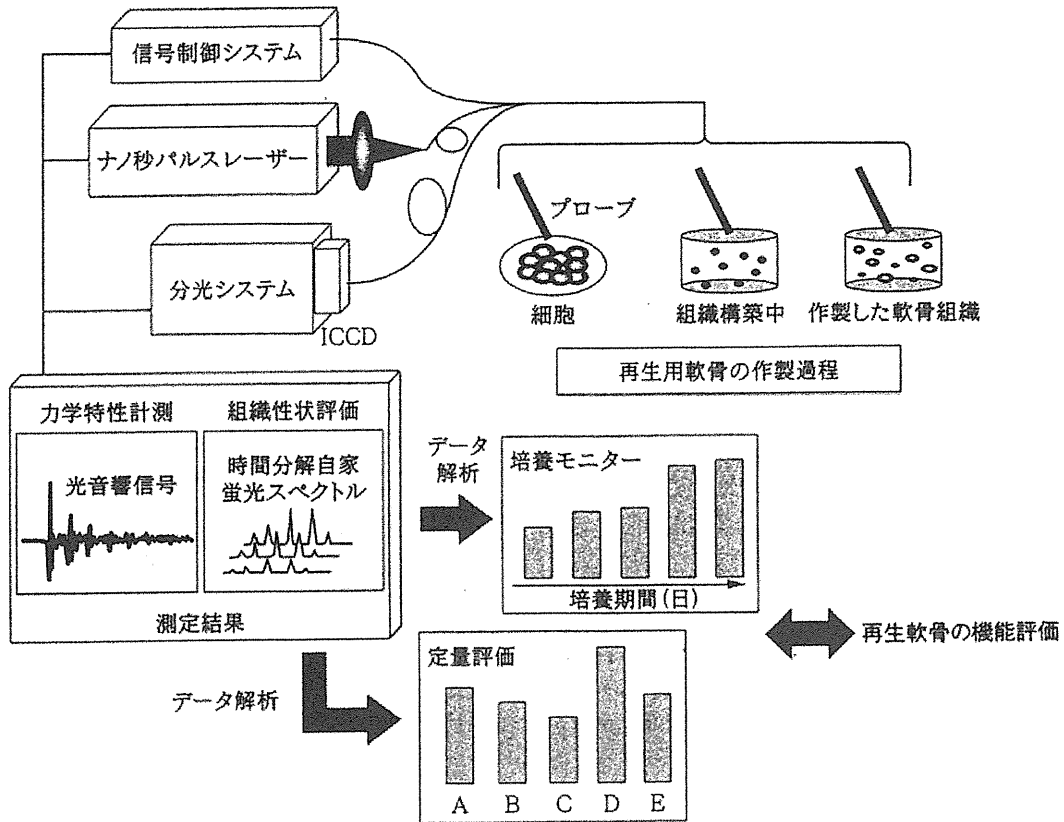


図1 提案しているシステム<sup>5)</sup>

ナノ秒パルスレーザーを光ファイバーで導光し、作製過程の再生用軟骨に、プローブを介して照射して、検出した測定信号から、力学特性計測と組織性状評価を実施する。非侵襲的に測定できるので、培養モニターが可能となり、定量値が算出できるので複数のサンプルの定量評価が可能となる。

た。結果の1例を図3に示す<sup>7)</sup>。この実験に用いた培養担体は、共著者の佐藤らが開発した膜付アテロコラーゲンハニカムスポンジ (ACHMS-scaffold) である<sup>8)9)</sup>。本担体はアテロコラーゲンからなり、ハニカム状の構造で、大きさは48ウェルプレートに合わせた外径11 mm、厚さ2 mmである。また、細胞保持のために片面がコラーゲン膜でシールドされている。組織工学における培養担体は、細胞を保持し分化誘導する極めて重要な役割を担う。既に本担体を培養担体として椎間板線維輪細胞を培養した実験において、高密度かつ三次元培養が可能であり、軟骨としての形質を維持しながら長期間培養が可能であることが示されている。培養担体に日本白色家兎 (体重約1 kg) から膝関節軟骨を摘出して酵素処理 (コラゲナー

ゼとアクチナーゼ処理) により単離した軟骨細胞を高密度 ( $1 \times 10^6$  細胞/担体) で播種し、三次元培養を12週間行った。図3に示すように、結果として培養軟骨組織の培養期間をパラメーターとして、減衰時間をプロットした。幼弱家兎の摘出膝関節軟骨を対象にした結果も比較のために示した。培養期間が長くなるにつれて、応力波の減衰時間は短くなり、正常軟骨の値に近づき、培養期間が12週の培養軟骨組織で正常軟骨に比べて測定された力学特性は約88%であった。計測した培養軟骨組織の細胞外マトリックスを生化学的に分析したところ、粘弾性値の経時変化とコラーゲン量、コンドロイチン硫酸量の変化には相関係数0.9以上が得られ、細胞外マトリックスの構築過程を反映した力学特性が得られた。以上より、開

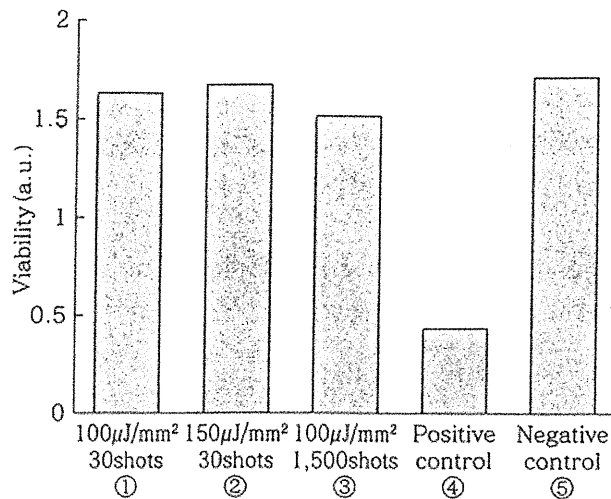


図2 レーザー光照射による細胞障害試験<sup>5)</sup>

①本測定で使用する照射条件, ②測定で使用する照射条件よりもパルスエネルギーが1.5倍大きい, ③測定で使用する照射条件よりもパルス数が50倍多い, ④細胞が死滅する条件として, アルコールを滴下する群, ⑤レーザー光を照射しない群。

発手法が軟骨再生医療の基盤技術の一つである評価法として有用であることを実証した。

軟骨の再生過程だけでなく, 関節軟骨の変性に伴う変化を評価できれば, 開発システムが高齢社会で急増する変形性関節症の診断法として適用可能となると着想し, 検証実験を既に開始している。酵素を用いた変性モデルを対象にした実験では, 変性の進行度によって光音響法で測定される粘弾性パラメータが変化することを既に明らかにした。2005年より東海大学臨床研究審査委員会承認のもと, この光音響法を関節鏡視下での軟骨変性診断に適用している。ヒト膝関節軟骨を対象に計測した結果から, 組織学的変化と力学特性パラメータの変化が相関することを確認した。現在測定できる力学特性は, 組織の粘性 ( $\eta$ ) と弾性 ( $G$ ) の比 ( $\eta/G$ ) に相当する応力波の減衰時間 ( $\tau$ ) であるが, 粘性 ( $\eta$ ) と弾性 ( $G$ ) の絶対値を測定できるように, 測定に利用するレーザーの波長を複数にするシステム構築の検討を開始している。また, 再生軟骨の評価技術として標準化をすることで, 軟骨再生医療の早期実用化を目指している。

この研究の一部は, 独立行政法人新エネルギー

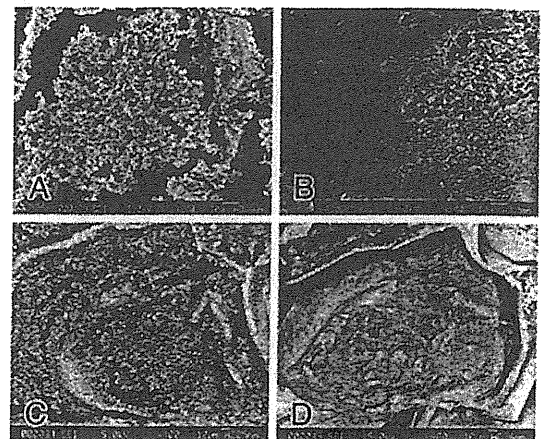
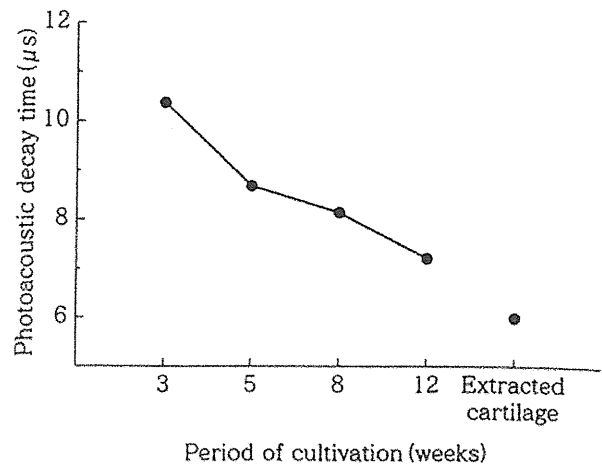


図3 組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織の培養過程において光音響法で経時的に測定した力学特性とその走査型電子顕微鏡像<sup>7)</sup>

A 培養3週(800倍) B 培養12週(800倍)  
C 培養3週(400倍) D 培養12週(400倍)

ギー・産業技術総合開発機構のプロジェクト(再生医療の早期実用化を目指した再生評価技術開発)ならびに厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の助成により実施されている。

### 文 献

- 1) Ishihara M et al : Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic measurement. Jpn J Appl Phys 42 : 556-558, 2003
- 2) Ishihara M et al : Biomechanical characterization of tissue-engineered cartilages by photoacoustic measurement. Proc SPIE 4961 : 221-

V. 班會議 一議事録一

## 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22年11月26日 14:00～17:00

場所：霞が関ビル 35F 東海大学学友会館 諏訪の間

出席者：嶽北和宏（厚生労働省）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、村井邦彦（自治医科大学）、佐藤正人（東海大学）、鶴養拓（東海大学）、田中麻衣子（東海大学）、河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：河毛知子

#### 1. 開会

研究代表者あいさつ

#### 2. 研究報告会

##### (1) 「本プロジェクト概要説明」 研究代表者 佐藤正人（東海大学）

- ・ミニブタ軟骨全損欠損を積層化細胞シートによって治療効果を確認した。
- ・細胞シートは部分欠損になぜ効果があるのか。  
欠損は骨髄まで達していないので、治癒効果は骨髄由来のものではないと考えられ、シートから放出させるものによるのではないかと考えられ、検討をしている。
- ・同種細胞ソースとして、多指症の Yub 軟骨細胞の増殖性の高さにより有望
- ・明治大学において細胞シートの保存法を検討して頂いている。
- ・自治医科大学において細胞シートが移植部位の関節内にとどまり、全身の他部位へ移動することなく、局所で治癒に関連していることを証明して頂いている。
- ・国立医薬品食品衛生研究所では同種細胞移植の可能性を検討するため、免疫抑制効果に関する研究をして頂いている。
- ・防衛医科大学では細胞シートの非侵襲的特性評価の研究をして頂いている。
- ・東海大学では、細胞シートの液性因子について研究を進めている。

以上のように、各大学、機関において連携を密にして、細胞シートの臨床応用に関しての一連の研究を実施している。



<質疑応答>

阿久津：細胞シートで検討しているのは、軟骨細胞由来のものだけか、それ以外のものがあるならば、有効な細胞シートの評価を、そうではない細胞シート（例えば皮膚の細胞シートなど）をコントロールとして、比較検討して使えるのではないか。

→現在、細胞シートは関節由来細胞の軟骨と滑膜だけで検討している。

長嶋：液性因子について、多く分泌する、もしくはより少なく分泌する因子のように比較すればどの液性因子が影響しているのか比較できるのではないか。

→miRNA レベルで検討している結果を加味して、その点も盛り込んでいきたい。

嶽北：力学的強度についての検討はしているのか。

→細胞シート自体に力学特性を期待するようなものではなく、永久的に残存するものではないと考えているので、力学的検討はしていない。

(2)「軟骨細胞シートの共培養について」佐藤正人（東海大学）

- ・ 個体差のないシートの作製を目指す

培地への成長因子添加やフィーダー細胞などを検討する。

- ・ 滑膜細胞との共培養により 3 週間で確実にシートを作製できる。

<質疑応答>

阿久津：共培養というのは一緒になってしまっているのか。

→インサートを使っているので別々になっている。

嶽北：フィーダーもプライマリーのものであるのか。

→プライマリーのものも使用しているが、そうでなくても効果はある。軟骨細胞と滑膜細胞で別々のヒトのものであっても大丈夫である。

阿久津：滑膜細胞を使用すると増殖はそんなに良いのか、また、フィーダーとして滑膜細胞を株化出来ないのか、そして滑膜細胞はどのようなものが良いのか。

→滑膜細胞と多指症の細胞で培養すれば、より増殖は早いかも知れない。株化については、滑膜細胞は様々なものが集まっているので、プロパティの決定は出来にくく、株化は難しいと考えられる。また、液性成分が富んでいるのは軟骨細胞である。滑膜細胞はどのようなものが良いかについては、現時点で詳細には答えられないが、P1、P2 でも結果は出てきている。

阿久津：フィーダーとして滑膜を使用する場合、不死化されていないと、毎回培養するこ

とになり、条件が一定にならず、手技的なものも求められるのではないか。

佐藤：フィーダーに関しては移植する培養細胞と同様に審査において重要なポイントとなり得るか。

嶽北：製品として、滑膜+軟骨と両方の細胞を入れた場合は、品質においてキャラクターの確立されたものが望ましい。またプライマリーで作成した場合のフィーダー細胞も3T3細胞と同じような審査が製品の審査中において必要になる。フィーダー細胞の品質は均一にした方がよい。

(3)「細胞シート移植後の動態—Ivisでの評価」分担研究者 村井邦彦（自治医科大学）

・細胞シートを膝関節に移植し、BLIを用いて動態を経時的に追う。

シート移植後ルシフェリンを皮下投与して計測した結果 day0～day84 まで発光が計測された。移植グラフトは移植後 4-8week で消失するものと考えられてきた、しかし、今回の実験ではより長く生着していることが示唆された。

3 か月ではげっ歯類では骨化していた為、より早い段階での評価が必要だと考えられる。

<質疑応答>

佐藤：グラフで補正していないというのは、移植直後に上昇していることを指しているのか、また骨化してしまったものに関して細胞シートはどこにいったのかが免疫染色等で同定できると面白い。

→ルシフェリンが移植直後に安定しているかが確かでないが、発光強度が細胞数と比例関係であるのは確かである。細胞シートについては表層に移植したのは確かなのですが。

阿久津：ヒトでも骨化してしまうのか。

→ラットで行った為であると考えられる。骨膜移植を併用する再生医療では、組織の過形成や一部骨化したという報告はあるが、ヒトでは一般的ではない。

河毛：げっ歯類は骨化しやすいのか。

→一般的にげっ歯類は内軟骨性骨化が生じ易い。ウサギ以上の大型の動物を使えば大丈夫である。また defect も小さい為に骨化したのではないか。

長嶋：骨化すると動きにくくなるのか。

→動きについては問題はなかった。ウサギに関して脚への体重のかけ方を測定したが時間が経つと両足同じように体重をかけるようになる。ラットやマウスの体の構造上、後ろ足の軟骨に特別負荷がかからないのではないか。

(4)「細胞ソースの検討—マイクロアレイ解析」研究協力者 鵜養拓 (東海大学)

多指症・前十時靭帯損傷・変形性膝関節症の患者由来の軟骨細胞を遺伝子解析を行うことで軟骨細胞の幼若性を担保する要因に関しての検討や将来的な同種細胞ソースとしての検討を行うために多指症・ACL 損傷・変形性膝関節症の手術時に得られた軟骨を採取し、遺伝子発現 (以下 GE) 及び miRNA 発現解析をマイクロアレイにて行った。Yub・ACL・TKA と段階的に変動する遺伝子を抽出し、同様に miRNA でもマイクロアレイ施行し Yub・ACL・TKA 間で GE と miRNA 共通に変動する遺伝子を抽出した。

hsa-miR-c は Yub・ACL・TKA と年齢に伴い発現が上昇する遺伝子を制御していた。一方、hsa-miR-a、hsa-miR-b の 2 つの miRNA は年齢に伴い発現が低下している遺伝子を制御するため軟骨の幼若性に関与している可能性が示唆された。

<質疑応答>

阿久津：ACL の軟骨は正常なのか。

→20-30 代の外傷で発症した患者由来の軟骨で、損傷部位とは別の部位の軟骨で、手術の際に再建靭帯を通す部位での軟骨なので、正常軟骨としてコントロールに使っている。

長嶋：変動一貫性で抽出された遺伝子と液性因子で同じものはあるのか。

→注目しているのは免疫抑制因子だが今回の結果では同じものはなかった。

阿久津：ACL と TKA だけで、つまり膝関節由来のものだけで発現の比較をしてみてもどうか。調べた遺伝子について軟骨に影響すると明らかになっていないものならば、バリテーションが必要であり、定量的な確認も必要である。

嶽北：移植用細胞 GAG などの発現パターンはどのような挙動を示したのか、また cell ソースに関連する話はあるのか。ひっかけてきた遺伝子はこれからどのようにしてゆくのか。

→3 種の遺伝子で機能的に評価する。これからについては miR-a などそれぞれでマスターとして効いている遺伝子を確認してゆく。

阿久津：miRNA が制御している遺伝子のターゲットは文献なりで出てきているのか。

→出てきていないが、これからノックダウンするなりして研究してゆく。

阿久津、村井：知られていない遺伝子の場合、軟骨分化について関り重要な役割を果たすということを示すことや、評価を遺伝子レベルだけであるのは難しい。Vitro の系に組み込んでどのような挙動を示すか検討してはどうか。

嶽北：どのような細胞ソース (どのようなマーカーがどの程度発現している細胞) を目指しているのか設定した上で、それを達成できる遺伝子を調べた方が良いのではないかと。

→目標設定を行う必要がある。

(5)「細胞シートの凍結および低温保存へのチャレンジ」研究協力者 前原美樹（明治大学）

- ・凍結における細胞の生存性は細胞内氷晶形成がネックになっている。
- ・低温における保存は物理的ダメージ回避に有効とかがえられるが、その際に使用する抗酸化剤の EGCG はコラーゲン架橋を促進するため、細胞シートのプロパティが改変される可能性があり、この辺りを今後検討する必要性がある。
- ・今後は CAS 冷凍の可能性を検討する。マイナス 20℃でも不凍状態で保存できるのは利点と考える。

<質疑応答>

村井：保存時に氷晶化を抑えるのは内膜の保持に重要だからという考えで良いのか。

→氷晶化も膜の維持両方が重要であり、オルガネラ構造の維持も非常に重要なこと。液相のままの保存であれば物理的変化のストレスが抑えられるかもしれない。

嶽北：ヒトで十分に安全性を検討した保存剤はあるのか？理想としては、製品のパッケージを開けてすぐに使えるような（洗浄不要のもの）保存剤が理想と考えられるがそういったものはあるのか。

→グリセロール、プロパンジオールなど一般的に使われている。ポリリジンも食品の保護剤として使われている。

佐藤：大変重要なポイントであり、臨床現場ですぐに使用可能なもので検討する方が望ましい。

阿久津：どの保存法が一番有用なのか。

→すべての可能性がある。

阿久津：それでは既に臨床応用されているものが良いのではないか。

佐藤：同種細胞シート移植を考えた場合、保存方法はどうか、その際のパッケージングや開封時の使用方法など実際に即したもので、検討して行ければと思います。

（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

次回は1月下旬～2月上旬に開催予定、後日調整して連絡いたします。

5. 閉会

以上

## 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2回班会議

日時：平成23年1月28日 14:30～17:30

場所：霞が関ビル 35F 東海大学学友会館 諏訪の間

出席者：田邊裕貴（厚生労働省）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、前原美樹（明治大学）、佐藤正人（東海大学）、鵜養拓（東海大学）、浜橋恒介（東海大学）、伊藤聡（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：河毛知子

#### 1. 開会

研究代表者あいさつ

#### 2. 研究報告会

##### (1) 「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）

##### ・間葉系幹細胞(MSC)の免疫制御システムに関する研究について

同種（マウス）MSC(mMSC)でのマウス活性化リンパ球の増殖抑制確認

異種（ヒト）MSC(hMSC)でも抑制効果を示すのかの確認検討

*in vitro* においては mMSC だけでなく、異種である hMSC にもマウス活性化リンパ球増殖抑制効果が確認された。

##### ・培養軟骨細胞での検討

マウスリンパ球混合培養にアロの培養軟骨細胞を共培養したところ、リンパ球の増殖が抑制された。このことから、培養軟骨細胞は MSC と同様に活性化リンパ球の増殖を抑制することが示唆された。さらに、異種であるヒト培養軟骨細胞でも同様の効果が見られた。

今後、ウサギの軟骨細胞やシート化した培養軟骨細胞でも抑制効果を検討する。

#### <質疑応答>

佐藤：今回のように軟骨細胞が活性化リンパ球の細胞増殖を抑制できることを示した論文が既に存在するのか。

→MSC を軟骨細胞に分化させたもので同様の結果を示す論文はあるが、もともと軟骨細胞であったものでは、報告はないと理解している。また、免疫原性が低いこと、つまりアロの細胞を積極的に活性化させていないことと、免疫細胞の活性化を抑制することは、今のところ同じメカニズムであるかどうかは分かりません。

佐藤：軟骨細胞シートから TGF- $\beta$  や PGE2 の分泌が確認されていることや、免疫細胞の活性化を抑制することが知られている MSC では、抑制効果を媒介しているのは MSC が分泌する免疫抑制物質であるとの報告があるが。

→軟骨細胞もリンパ球の増殖抑制を行う際に免疫抑制物質を出しているのではないかと推測されます。しかしながら、免疫原性が低いのは免疫抑制物質を分泌しているからであるとは、現段階では明言できません。

阿久津：ヒト間葉系幹細胞でスキッドマウスを用いて筋肉を作製した。これは免疫拒絶をされなかった為と考えられるので、今回の発表と同じことが言えるのかも知れない。

## (2) 「細胞シートの凍結および低温保存へのチャレンジ：第二回報告」

研究協力者 前原美樹（明治大学）

### ・凍結保存 ガラス化法→Slow-vitrification 法

ガラス化法の凍害保護剤として用いたカルボキシル化ポリリジン(PLL)の検討。PLL は毒性が少なく、食品添加物としても利用されている不凍ポリアミノ酸であり、凍結安定化効果を持っている。

ガラス化する時に PLL(+)と(-)で検討した結果、(-)では破損したが、(+)では intact

Slow-vitrification と PLL を組み合わせることによって細胞シートはガラス化状態で保存できる。

### ・低温保存 4℃

RPMI1640 と HFDM-1 (ヒト繊維芽細胞増殖用合成培地) と RPMI1640+suppli の 3 種の培地を用いて、軟骨細胞を培養した。3 週間の期間では、低温化で細胞の生存率を高く維持した。

### <質疑応答>

佐藤：京都大学の先生が絡むのはどちらの系ですか。PLL はとても良い結果を得られそうな印象を受けました。どの方法が一番手ごたえはありそうですか。

→京都大学の先生から分与して頂いているのは PLL です。手ごたえについては、今回は

シートでは  $n$  が少ないですし、低温の方では培養細胞しか検討していないのでどれとも言い難いです。

阿久津：シートの機能解析はとても重要です。佐藤先生の方で確立されているので、是非検討を進めてください。

佐藤：明治大学ではヒトの細胞の受け入れは可能ですか。

→確認します。

加藤：3種の培養液であまり差が見られなかったように思いますが、3週間も持つのはアスコルビン酸による影響でしょうか、それとも軟骨細胞特有の現象でしょうか。PLL 100%ではだめなのか。

→アスコルビン酸はコラーゲンを成熟させる効果があるので、その効果の為かも知れない。PLL については、DMSO は無くても大丈夫であり、ガラス化に PLL 100%は論文上では、カルボキシル化が 65%が良いという報告があり、同じ条件で実験を行った。しかし、シートでは検討していない。

佐藤：阿久津先生の方では保存に何を使っているのか。

(阿久津) →ヒト iPS 細胞、ES 細胞ではゼノフリーとしても販売されている一般的なもので、緩慢凍結法です。ガラス化は、手間が掛かるのであり、世界的には特に日本で盛んに行われている。生殖補助医療分野ではガラス化法がスタンダードです。

河毛：前回までの報告でも凍害保護剤は PLL を使っていたのか。

→使用していた。初めは PLL が高分子なので脱水の効果を期待していた。

### (3) 「共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性」

研究分担者 小久保 舞美 (東海大学)

- ・軟骨だけの培養だと培養期間が安定しなかったが、滑膜を共培養することで、2~3週間で安定的に培養が出来た。
- ・同種異関節共培養 (肩と膝) では、MTT でも PCR も共培養した方が単層よりも良かった。
- ・インサートを使用することで Fibronectin が中まで染まる。

<質疑応答>

阿久津：細胞の量は。また、それでどのくらいシートが作れるのか。



→軟骨 1g と滑膜 3g で 24 枚くらいのシートが出来る。

阿久津：プライマリーなのか継代したものなのか。

→プライマリーを用いている。P2 で活性は落ちてくるのに対して、多指症の細胞は P2、P3 でも活性が落ちない。

阿久津：滑膜はフィーダーの為だけに採ってきているのか。

→伊藤が滑膜の移植について発表します。

#### (4) 「本プロジェクトの概要説明」

研究代表者 佐藤 正人（東海大学）

- ・自己→ヒト幹→一刻も早く臨床応用したい→同種へ
- ・細胞シートにおいて軟骨細胞シートは上皮系以外の細胞で初めての試みである。
- ・2種の全損欠損と部分損傷の両方で有効であると動物で確認されている。
- ・従来の治療法について

自己培養軟骨細胞移植：ACI

骨膜と軟骨と健常部二か所を犠牲にし、培養も1ヵ月～かかる。

- ・OAの治療へ踏み込んだ再生医療

#### <質疑応答>

田邊：臨床応用したいものは積層化シートなのか。継代数、移植後の増殖、残存について。造腫瘍については。

→三次元培養に近い積層化シートを臨床応用を目指している。プライマリーでシート化する。移植後は増殖せず、残存は Ivis で約 3 ヶ月で最終的にはほとんどが置き換わる。造腫瘍についてはマウスで見えています。

田邊：同種について。同種、異種どちらが免疫抑制するのか。

(加藤) →どちらも免疫抑制が見られる。

田邊：同種は他の企業がついてバックアップして製品であると言ってしまうと倫理面でかなり有利な方向へ進む。海外では製品としてなっているものも多い。感染や残存で問題がなければすぐに実用化できるのではないかと。

田邊：多指症で問題はあるのか。

(阿久津) →ないでしょう。

田邊：サイトカインは。

→TGF- $\beta$  と PGE2 が免疫抑制効果を発揮している。

(5)「家兎膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞と滑膜細胞移植による治療効果の検討」

研究協力者 伊藤 聡 (東海大学)

- ・フィーダーとして使っていた滑膜も一緒に移植したらどうかの検討
- ・荷重のかけ方

Defect のみでは day28 までみても 38% までしか回復しなかったが、それ以外の軟骨細胞シート群や滑膜とのコンビネーション群では回復した。細胞の移植は疼痛軽減効果がある。

- ・染色

滑膜のみ移植した群では表層だけ繊維性に置き換わっていたが、内部は修復されていた。

<質疑応答>

佐藤：今回の結果から、軟骨に滑膜も加えたほうが良いと思うか。

→1 ヶ月しかまだ結果を見ていないが、defect に滑膜を充填して軟骨細胞シートで覆った方が結果を見ても良さそうに見える。

佐藤：滑膜のみで行っている大阪大学の問題点として、表層が繊維性のものに置き換わってしまうというものがあるが。

→今回の結果を見ても表層が繊維性のものに置き換わっているものが見られた。軟骨細胞シートだと表層が繊維性のものに置き換わるものはなかった。

佐藤：滑膜 180 万はどこからきた数字なのか。

→関矢先生の論文から、ウサギの膝の容積比とヒトの膝で比較して決定した。

田邊：シートは何層なのか。

→3 層です。軟骨は三次元培養をしないと軟骨のフェノタイプを維持できないので 3 層にした。

田邊：滑膜はペレットにする時に何か混ぜているのか。

→Up Cell なので何も加えず、ペレットとして取り出している。

田邊：ヒトへの応用となると defect によって細胞数が異なってくるのではないか。

→そうなると思いますが検討中です。

田邊：一疾患一申請でしょうか。

(佐藤) →広い幅で持たせたいので軟骨の損傷グレードでは Outerbridge 分類で Grade III 以上の症例に設定する予定。

田邊：何例で、また有意差はでそうか。

(佐藤) →5 例では難しいかと、10 例で考えている。コントロールを置かないので有効性評価は難しいかもしれません。

田邊：プライマリーに安全性、セカンダリーが有効性にするのがベターであろう。

(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

3月24日中間評価

### 5. 閉会

以上

## 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期間で作製する為、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- $\beta$ 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