

骨細胞は P6 まで継代を重ねても異常は見らなかった。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(プラスト)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プ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- β 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、プ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、プラストが出来かかった時期から NHAC を共培養し始めているので、そのプ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- β 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- β 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 Log₂Ratio 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

あれば一方向へプロットされる。全プローブの Log_2Ratio 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 で行くとするのなら、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で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 鶴養拓（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：超音波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

本事業に関しての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

