

た組織のプロテオグリカン染色性を判定したところ、赤く染色されたことから再構築された組織は、軟骨組織であることが明らかとなった。

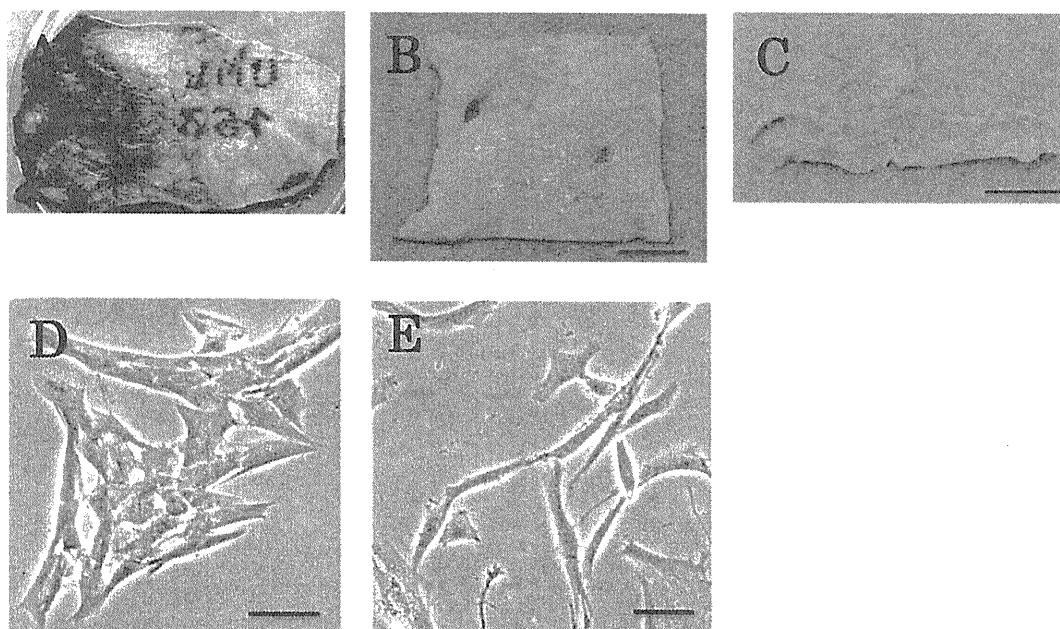
では EVG 染色による弾性線維の検出は認められなかった(figure 4d). EVG 染色による弾性線維の検出を定量化したグラフを figure 4e に示した。

#### 4. 再構築軟骨組織の Collagen type 2 の発現および弾性線維含有量の解析

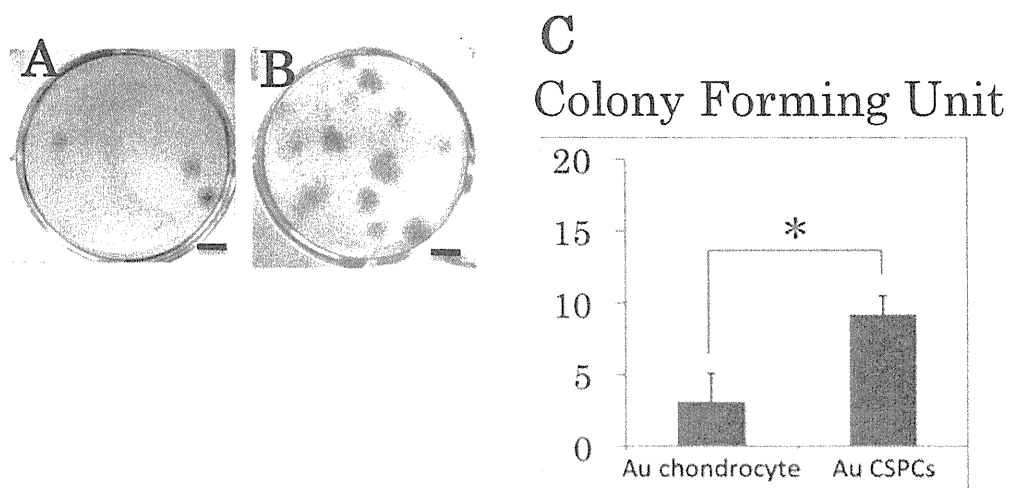
再構築組織は、正常関節軟骨組織と同等の Collagen type 2 を発現していた (figure 4a,b).

耳介軟骨では elastin の発現が認められる一方で関節軟骨および再構築軟骨では elastin の発現が認められなかった(figure 4c). 同様に、耳介軟骨では EVG 染色により弾性線維が黒く染色され、関節軟骨および再構築軟骨

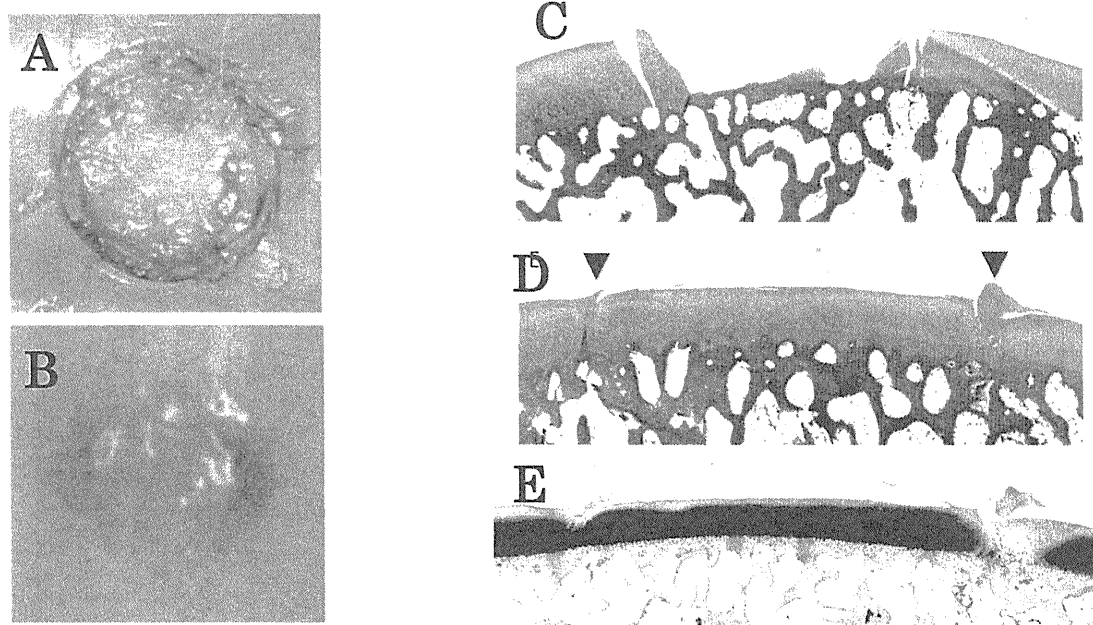
(Figure 1) 耳介軟骨からの軟骨膜細胞, 軟骨細胞の分離



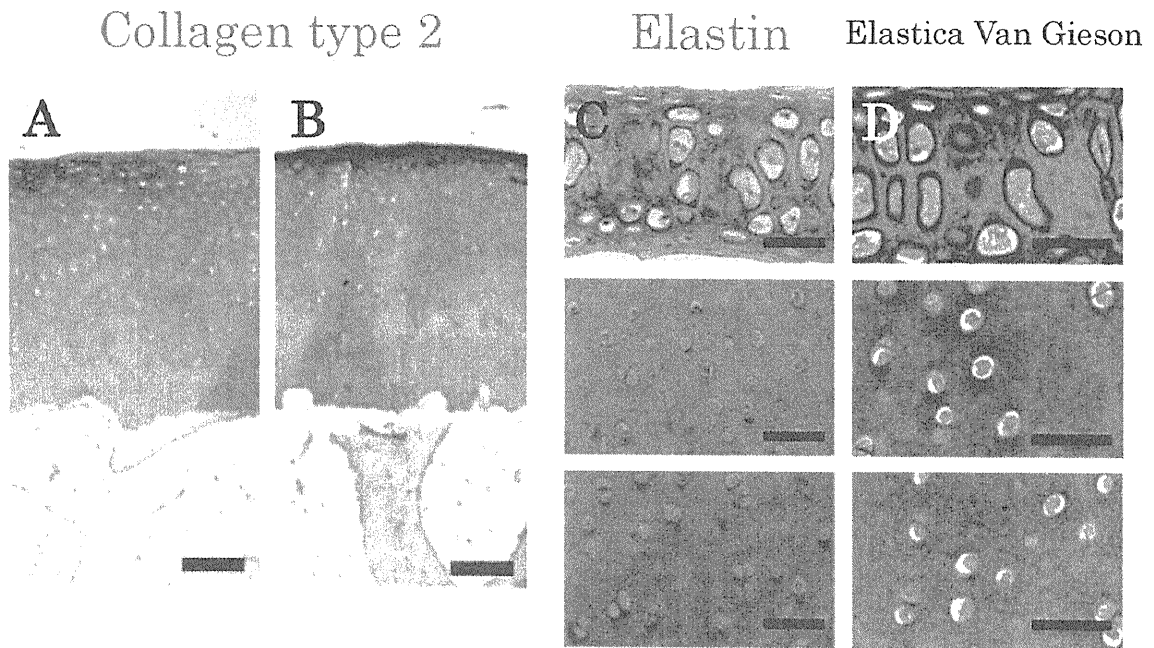
(Figure 2) 耳介軟骨由来軟骨細胞,軟骨膜細胞のコロニー形成能



(Figure 3) 移植2ヶ月後の肉眼所見, 組織学的所見

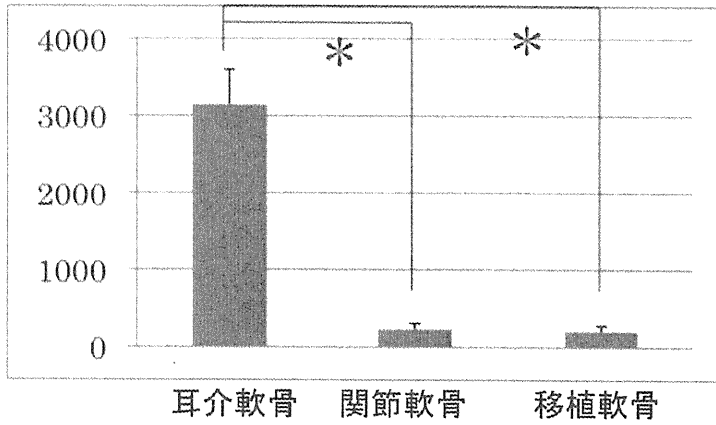


(Figure 4) 再構築組織の Collagen type 2 発現および弾性線維含有量の解析



**E**

Pixel intensity/10000 $\mu\text{m}^2$  (輝度 $\leq 100$ )



#### D. 考察

軟骨組織は血管に乏しく生体内で自然に再生しにくい組織のため、関節表面の軟骨が損傷すると変形性関節症へと移行する。特に膝関節は加齢やスポーツなどにより損傷を受けやすく、高齢者に多く発症が認められる。日本だけでも放射線学的に診断される膝変形性関節症の患者数は2530万人いると試算があるにも関わらず、根本的な治療法がない。現在の変形性関節症の標準的な治療法は骨髄刺激法（欠損が線維軟骨で修復され、治癒効果が不確実）や、モザイクプラスチック法（高い外科的正確性と、正常組織に損傷を生じる必要がある）が提唱されているが、治癒効果の面で課題が残っている。また、再建された組織の長期形態維持性が不安定であることや組織採取量に制限があることなどが克服しがたい臨床的課題であった。治癒効果を向上させるために、自己細胞を用いて欠損組織を再生する組織再生医療が注目され、軟骨細胞を利用した治療法が考案された。しかし、正常軟骨組織を傷害して細胞を得ることから、罹患部位をさらに障害する必要があるなどの課題が指摘されている。そこで近年、他の細胞供給源として様々な自己細胞が提唱され、臨床研究がなされている。しかし、候補のひとつである骨髄由来間葉系幹細胞は、採取部位である腸骨への侵襲が大きく、軟骨への分化能が低いため骨へ分化転換してしまうことから実用化への可能

性は極めて低い。脂肪由来幹細胞もまた、軟骨への分化能は低く臨床応用には不向きである。また、他の間葉系幹細胞と比較して高い軟骨分化能を有することから、滑膜由来幹細胞を用いた軟骨再生治療が行われており、良好な成績を挙げている。だが、細胞採取のために関節鏡手術が必要であり、侵襲が大きい。これらの背景は、現状では多くの方法が考案されながらも低侵襲かつ治癒効果の高い治療法の確立がなされていないという側面を示すものとなっている。

こういった問題を解決するべく、軟骨細胞へ分化しうる幹細胞に関する研究が広く行われている。われわれは、ヒト耳介軟骨膜細胞中に軟骨幹／前駆細胞を同定し、その臨床応用を目指している。関節軟骨再生に弾性軟骨由来の軟骨幹／前駆細胞を用いることの利点は、その未分化性にある。間葉系幹細胞や脂肪組織由来幹細胞は以前より軟骨分化を含めた多分化能が報告されており、特に間葉系幹細胞は椎間板再生や関節軟骨再構築に関して臨床応用が試みられている。しかしその一方で、多分化能のために予期せぬ骨分化や脂肪分化をきたす可能性と危険性は回避できない。その一方、軟骨幹／前駆細胞は多分化能がわれわれの先行研究で確認されているものの、間葉系幹細胞などからはいわゆる下流の細胞であり、軟骨分化へある程度特化していると想像される。そのため、

その他の幹細胞を用いる場合と比べると骨分化や脂肪分化の可能性より低いが、弾性軟骨から硝子軟骨である関節軟骨への分化能を有すると想定した。本研究では、その仮説を立証するための研究成果を示した。

#### E. 結論

今回われわれは、弾性軟骨である耳介軟骨膜から採取した軟骨膜細胞を異種軟骨組織である関節軟骨の欠損症治療法の細胞源として臨床応用するにあたって、関節軟骨欠損を作製したイヌを用いて軟骨膜細胞の分離、培養法、移植法の検証を行った。

軟骨膜細胞の関節軟骨欠損部位に移植したところ、組織学上硝子軟骨様の組織が認められた。今後は例数を重ねるとともに、硝子軟骨特異蛋白の発現の有無を評価する必要がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書における記載の通りである。

#### G. 研究発表

#### 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

厚生労働科学研究費補助金  
分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法  
の開発 -自家血清を用いた培養法の検証-

研究協力者 矢吹雄一郎  
分担研究者 前川二郎

研究要旨

われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した細胞を用いて軟骨組織の再構築に関する検証を行っている。重症免疫不全マウスを用いた皮下移植実験では再構築された軟骨様組織に軟骨膜と言える組織を認めており、長期形態維持能が高いと予想している。今後、ヒト耳介軟骨膜細胞の臨床応用を目指しているが、他種血清を使うことによって生じる感染症や免疫反応の問題が臨床的課題となっていた。そのため、軟骨膜細胞を自家血清含有培地で培養する手法の検証を行った。

その結果、現段階では自家血清を用いた培養法は細胞増殖に関して他種血清(FBS)と同等かそれ以上であることが明らかとなった。軟骨分化誘導においては、自家血清使用群は FBS 使用群と比較し同等の分化能を有していることが示唆された。今後は、臨床応用に向けたプロトコールを作成することを目標とし、増殖や分化誘導のバラつきなどを評価していきたい。

## A. 研究目的

現在、Tissue engineering を基礎とした培養再生軟骨や間葉系幹細胞を用いた椎間板再生に関する研究がなされており、それぞれ臨床応用されつつある。そして、培養再生軟骨は先天性頭蓋顎顔面奇形や外傷性高度顔面変形などへの臨床応用も期待されている。その一方で、培養に際して使用する血清の問題や再構築し移植した細胞群・組織の長期結果に関する検討が臨床的には不十分であると言わざ

るを得ない。

われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した細胞(以下、軟骨膜細胞)の中にヒト弾性軟骨幹/前駆細胞を同定している。それらを重症免疫不全マウスの背部皮下へ移植し、組織再構築能を評価したところ、軟骨組織のみならず軟骨膜様組織の再構築を認めた。そのため、軟骨膜細胞を用いて再構築された軟骨は長期形態維持能が高いと予想している。今回、ヒト耳介軟骨膜細胞を臨床応用するにあたって、他種血清を使うことによって生じる感染症

や免疫反応の問題を考慮し、自家血清を用いた培養法の検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、小耳症患者より手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下で鈍的に剥離した。

### 2. ヒト耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の初代培養および継代操作

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、0.2% Collagenase type II (SIGMA) に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は100 $\mu$ mのCell Strainer (BD Falcon) で濾過し、遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) した。上清を除去後、血清(濃度や種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (SIGMA; 以下 D-MEM/F-12) で洗浄し、遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培

養ディッシュ (FALCON) に播種した。細胞は気相条件を 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington) を含有する D-MEM/F-12 (SIGMA) を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の 0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で 20~30 分静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した D-MEM/F-12 medium (SIGMA) を加え、ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は 1200 cells/cm<sup>2</sup> の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

### 3. 軟骨分化誘導と積層化培養

耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の軟骨分化誘導は分化誘導培地を用いることに加え、積層化培養によってより強く分化誘導を行った。

軟骨細胞は *in vitro* における二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三

次元での培養・軟骨分化誘導が試みられている。そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後2日間、10%各種血清(種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加したD-MEM/F-12 medium (SIGMA)で培養し、細胞の接着を促した後、軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。

軟骨分化誘導培地は、1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate (WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor I (SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor (科研製薬)を含有するD-MEM/F-12 medium (SIGMA)とし、血清は用いなかった。

軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後、別に用意した細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し、上から播種し積層化した。2層目を播種後、1層目と同様に2日間は10%各種血清(種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加したD-MEM/F-12 medium (SIGMA)で培養を行い、その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し、計3層に重層化した。なお、細胞の培養はすべて、気相条件を37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で行った。

#### 4. 自家血清の調製

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て耳介弾性軟骨を供与いただいた同一患者から血液を採取した。

まず当院では術前にスクリーニングとして全例血液検査を行っている。その際の血液検査所見において貧血傾向の有無を確認した。貧血傾向の無い症例のみ血清作成目的の採血を施行した。血液は全例、空腹時朝の血液を採取した。具体的には、まずは耳介形成術の麻酔導入の際に確保した末梢静脈路から採取を試みた。その末梢静脈路から十分採血できないと判断した際は、即時その部位からの採血は中止し、全身麻酔導入後大腿動脈を23G針で穿刺し採血した。その際は血腫などの合併症を回避すべく十分圧迫止血した。止血が確認されたのちもガーゼとテープで軽度圧迫固定しながら術中に複数回穿刺部を直接観察し、確認した。また、採血量は体重に対し1.0ml/kgを越える採血は行わないようにした。

採取された血液は、本学先端医科学研究センターヒト組織プロセッシング室で処理した。まず、30min 静置し、その後遠心分離(2500rpm, 4°C, 10min)を行った。上清を分注し、血清とした。得られた血清は恒温槽を用いて56°Cの状態に20分間静置し、非動化した。その後、0.22µm フィルター(FALCON)で濾過し、4°Cで保存した。

当院では小耳症において患側1耳に



対し、耳介形成術と耳介挙上術の2期的な再建術を施行している。そのため、前述の方法にのっとり、条件を満たせば2回採血を施行した。

#### 5. 小耳症残存耳介軟骨検体から得られる軟骨膜細胞数の検討

以前より小耳症残存耳介軟骨より軟骨膜細胞を回収し、分離培養を行っているが、検体から得られる軟骨膜細胞数に関して検討した報告は少ない。そこで、本年度得られた検体において、検体湿重量や軟骨膜湿重量、軟骨膜より得られる細胞数などを計測した。

#### 6. 自家血清含有培地による軟骨膜細胞の初代培養

前年度に報告した通り、軟骨膜細胞は自家血清含有培地で初代培養や拡大培養、継代操作など可能であったが、具体的な差異に関しては十分に検討なされていない。本年度は得られた細胞群を10%自家血清含有培地か10%FBS含有培地で拡大培養し、どちらもコンフルエントに近づいた時点で同時に継代操作を行った。その際、細胞数を計測した。また、拡大培養時における軟骨膜細胞の形態を定性的に比較検討した。

#### 7. 各培養条件、血清濃度における増殖能の評価

各培養条件における軟骨膜細胞の

増殖能を定量化するにあたり、MTT assay を施行した。試薬は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所)を用いた。48穴wellに900cellsずつ播種し、7日に一回培地を交換した。血清の種類はFBS, 自家血清とした。

まずは、血清濃度が10%においても自家血清使用群で十分増殖が得られるかどうかを、FBS使用群と比較し検討した。播種24時間後から72時間毎、計6点で観察した。MTT assayを行うwellは培地を吸引後、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加したD-MEM/F-12 (SIGMA)で洗浄し、同培地を500 $\mu$ l添加した。その後さらにCell Counting Kit-8を50 $\mu$ l添加し、気相条件を37 $^{\circ}$ C, CO $_2$ 濃度5%に設定したインキュベーター内で3時間培養行った。培養上清を100 $\mu$ lずつ採取し、450nmの吸光度を測定した。得られた増殖曲線を指数関数へ近似し、細胞倍加時間を算出した。

次に、至適な自家血清濃度を評価すべく、異なる濃度における増殖能を評価した。培地の血清濃度はそれぞれ0%, 1%, 5%, 10%と条件を振った。観察時点と方法は前述と同様である。

そして、FBSにおいては、すでに低血清化に伴い増殖効率が低下することが判明しているが、軟骨膜細胞における増殖効率の低下を定量化する目的で、異なる濃度における増殖能を比較検討することとした。培地の血清濃度はそれぞれ0%, 1%, 5%, 10%と条件を振った。観察時点と方法は前述と

同様である。

## 8. 自家血清で拡大培養した軟骨膜細胞における軟骨分化能の評価

細胞分化の定量化として、ELISAと定量PCRを行った。まず、10%自家血清含有培地で拡大培養したのち、軟骨分化誘導をかけた状態の培養上清をサンプリングした。ディッシュに定着している細胞からISOGENで回収した。同様に分化誘導前の状態や10%FBS含有培地で培養したものをサンプリングした。

培養上清はByscan™ Glycosaminoglycan assay kitでグリコサミノグリカン含有量を定量した。

定量PCRではTaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)のprimer/probe setを用いた。

## 9. 倫理面への配慮

前述検体の供与に関して、当院の倫理委員会の承認を得て施行した。また、患者へは目的と方法、および想定される合併症とその対処法を説明し、文章による同意を得た。さらに倫理面へ配慮し、研究への参加は個人の意思を尊重した。得られたデータについてもIDや氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った。

## C. 研究結果

### 1. 小耳症残存耳介軟骨検体から得られる軟骨膜細胞数の検討

平成23年度において、小耳症における残存耳介軟骨の供与を頂いたのは7例7検体であった。採血と血液の供与に関しても7例全例ご同意いただき、それぞれ耳介形成術施行時と耳介挙上術施行時の2回にわたり血液の供与を頂いた(表1)。

それら7例において、検体湿重量などの計測を行った。小耳症は症例により残存耳介軟骨の体積が異なる。そのため、多少のばらつきがあるが、1検体当たり300mg前後の軟骨膜が得られ、 $2.5 \times 10^5$ 個前後の軟骨膜細胞が回収された。

血清は採血量に対し、40-50%程度の量で生成が可能であった。

### 2. 自家血清含有培地による軟骨膜細胞の初代培養

10%自家血清含有培地を用いた培養法で軟骨膜細胞の初代培養を試みたところ、播種した細胞がディッシュに定着がやや不良であり、10%FBS含有培地使用群と比較すると定着した細胞数に差が出てしまう結果となった。しかし、定着した細胞群は速やかに増殖し、FBS使用群と同等の増殖を見せた(図1)。鏡視下で観察しうる範囲内で細胞の形状に大きな差異は認めなかった。初代培養時

はそれぞれ 35mm ディッシュで拡大培養したところ、各群ともに概ね同時にコンフルエントとなった。その際、10cm ディッシュへ継代し、セルカウントを行ったところ、各群とも細胞数に大きな差が無いことを確認した(表 3)。継代操作の際も、自家血清使用群は細胞のディッシュへの固着性が低く、ディッシュから剥離しやすい傾向を認めた。そのため、短時間のコラゲナーゼ処理にも関わらず細胞を遊離することが可能であった。

### 3. 各培養条件、血清濃度における増殖能の評価

前述の通り、10%自家血清含有培地使用群においても10%FBS使用群と同等の増殖効率が認められることが定性的に判断できた。そのため、それらの定量化を行ったところ、10%自家血清含有培地使用群の方において増殖効率が低い傾向を認めた(図 2)。細胞倍加時間を算出したところ、10%自家血清使用群は  $69.8 \pm 12.0$  [hr]、10%FBS使用群は  $115.1 \pm 49.8$  [hr] ( $p=0.088$ , NS, Mann-Whitney U test)であった。

つぎに、自家血清使用群において、含有自家血清濃度と増殖効率の相関性を評価した。その結果、10%自家血清を含有する培地において細胞倍加時間が最も短いことが明らかとなった(図 3)。

FBS使用群において、含有FBS血

清濃度と増殖効率の相関性を評価した。その結果、10%FBSを含有する培地において細胞倍加時間が最も短いことが明らかとなった(図 4)。

### 4. 自家血清で拡大培養した軟骨膜細胞における軟骨分化能の評価

10%自家血清含有培地使用群と10%FBS含有培地使用群、各群において拡大培養した軟骨膜細胞を軟骨分化誘導した。その際の培養上清においてグリコサミノグリカン含有量を定量した。n=1ではあるが、自家血清で増殖させた細胞においてもグリコサミノグリカンの産生をしていることが分かった(図 5)。その程度は、FBS含有培地で増殖させた群と同等であることが予想される。

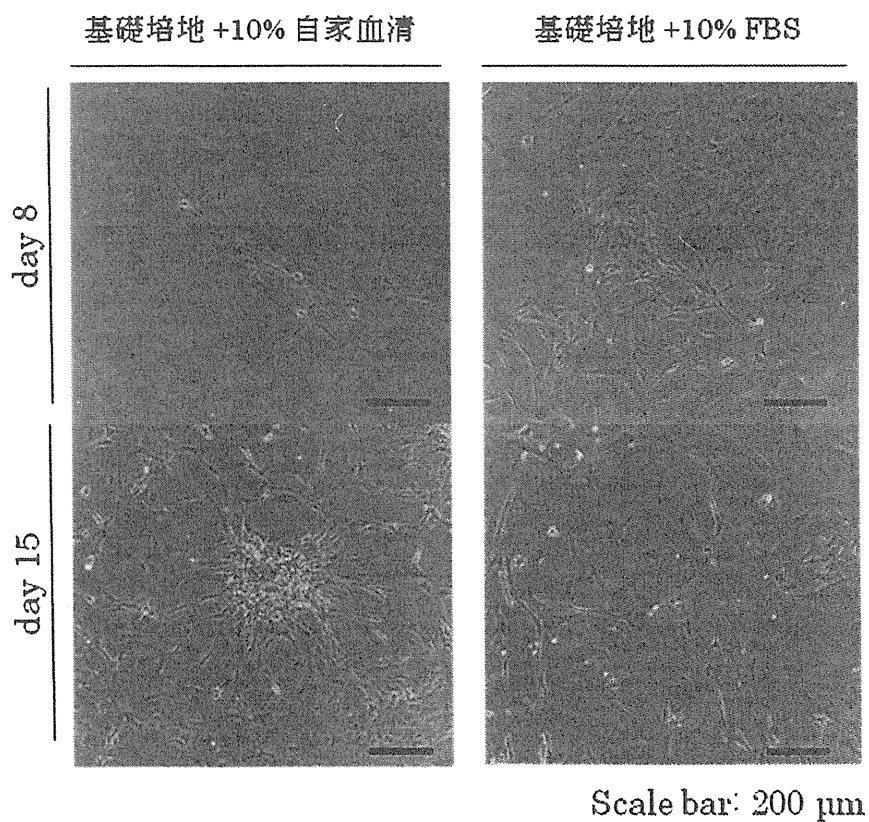
また、分化誘導した細胞群におけるmRNA発現を定量化した。各群において、軟骨分化の指標の一つであるアグリカン遺伝子の発現が分化誘導前と比較し上昇していることが分かった。自家血清使用群とFBS使用群と比較すると、同等もしくはややFBS使用群の方が高い発現を認めた。

(表 1) 平成 23 年度分 検体リスト, および血清生成量

No.	年齢	性	疾患	耳介形成術施行時		耳介挙上手術施行時	
				採血量[ml]	血清生成量[ml]	採血量[ml]	血清生成量[ml]
1	11	F	TCS*	25	13	25	15
2	10	F	小耳症	35	15	25	10
3	11	F	TCS*	35	15	25	12
4	12	M	小耳症	30	15	25	13
5	10	M	小耳症	40	20	26	13
6	10	M	小耳症	30	12	0	0
7	10	M	小耳症	30	12	25	10

\* TCS: Treacher Collins Syndrome 先天性顔面変形症候群の一つ, 両側小耳症を伴う.

(図 1) 自家血清含有培地における初代培養の検討



(表 2) 軟骨膜湿重量, 分離された軟骨膜細胞数 (n=7)

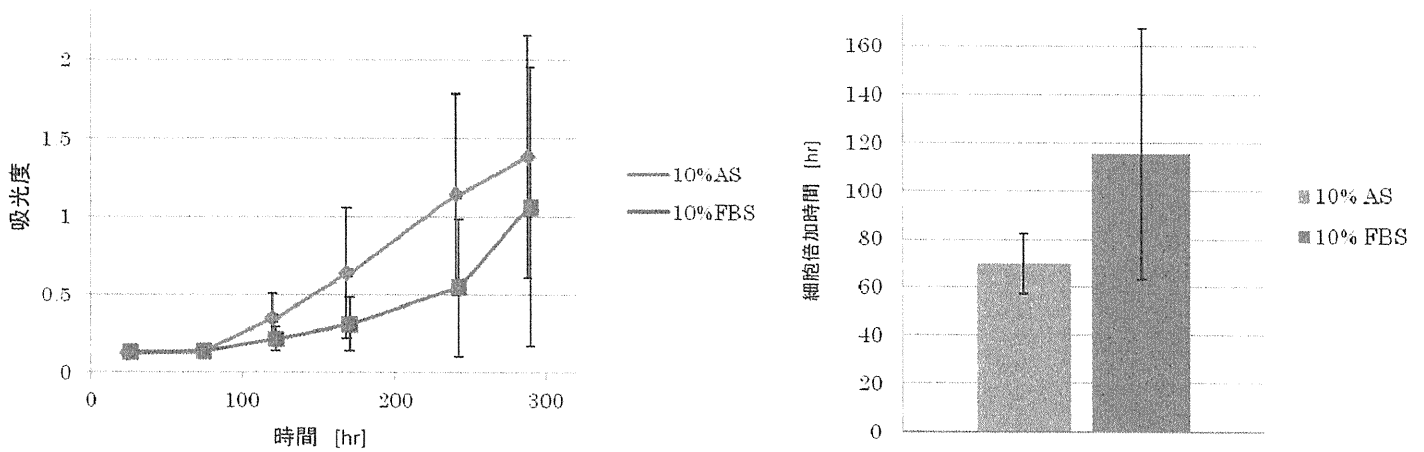
検体総重量[g]	軟骨膜湿重量[g]	軟骨膜細胞数[x10 <sup>5</sup> cells]
1.73±0.53	0.33±0.22	2.55±1.78

(表 3) 同一培養期間における細胞数の比較 (n=7)

	初代継代時細胞数 [x10 <sup>5</sup> cells]	第二継代時細胞数 [x10 <sup>5</sup> cells]
AS	1.88±0.77	13.2±3.55
FBS	1.73±0.72	8.52±3.52

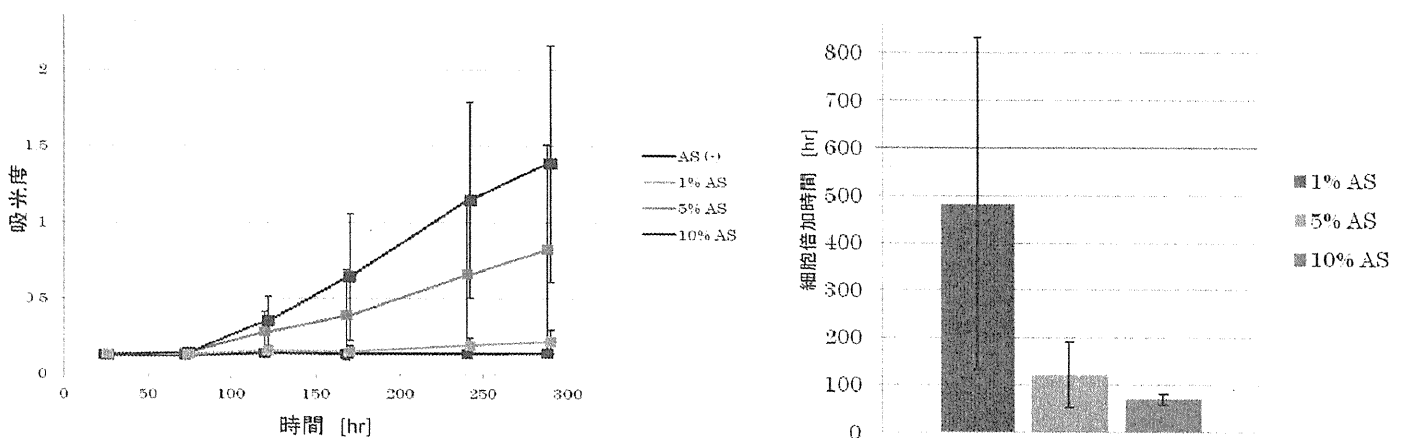
(図 2) 軟骨膜細胞の各種血清による増殖能の評価 (n=3)

左：10%自家血清 (AS) と 10%FBS 含有培地下での軟骨膜細胞の増殖能の比較  
 右：増殖曲線を元に算出した細胞倍加時間の比較



(図 3) 異なる自家血清濃度における軟骨膜細胞の増殖能の評価 (n=3)

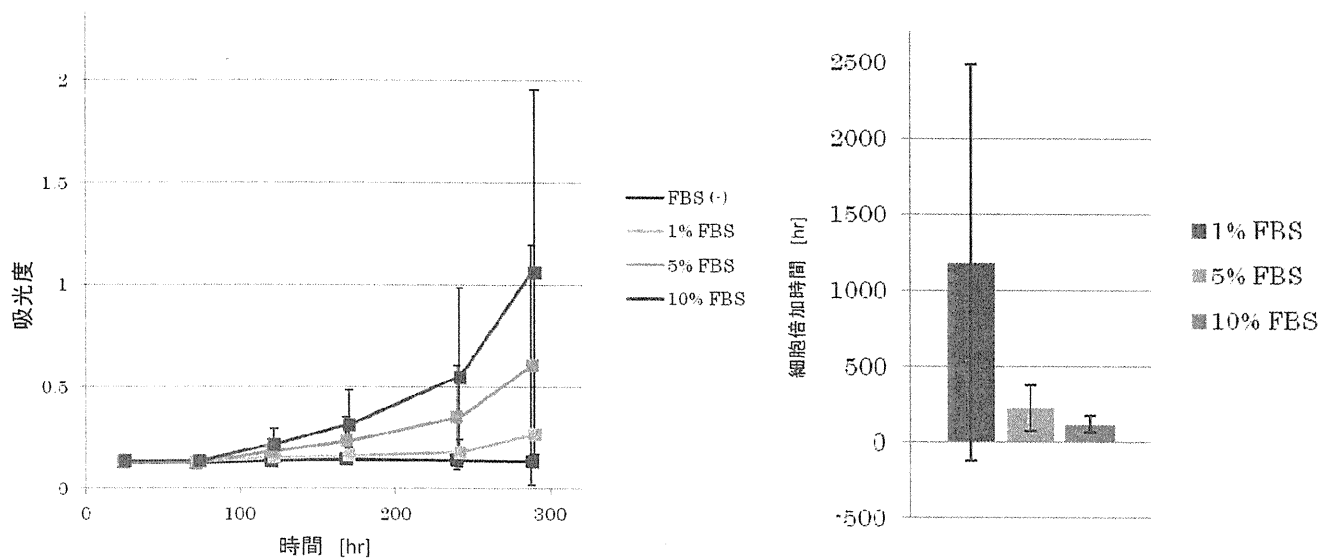
左：異なる自家血清濃度での軟骨膜細胞の増殖能の比較  
 右：増殖曲線を元に算出した細胞倍加時間の比較



(図4) 異なるFBS濃度における軟骨膜細胞の増殖能の評価(n=3)

左：異なるFBS濃度での軟骨膜細胞の増殖能の比較

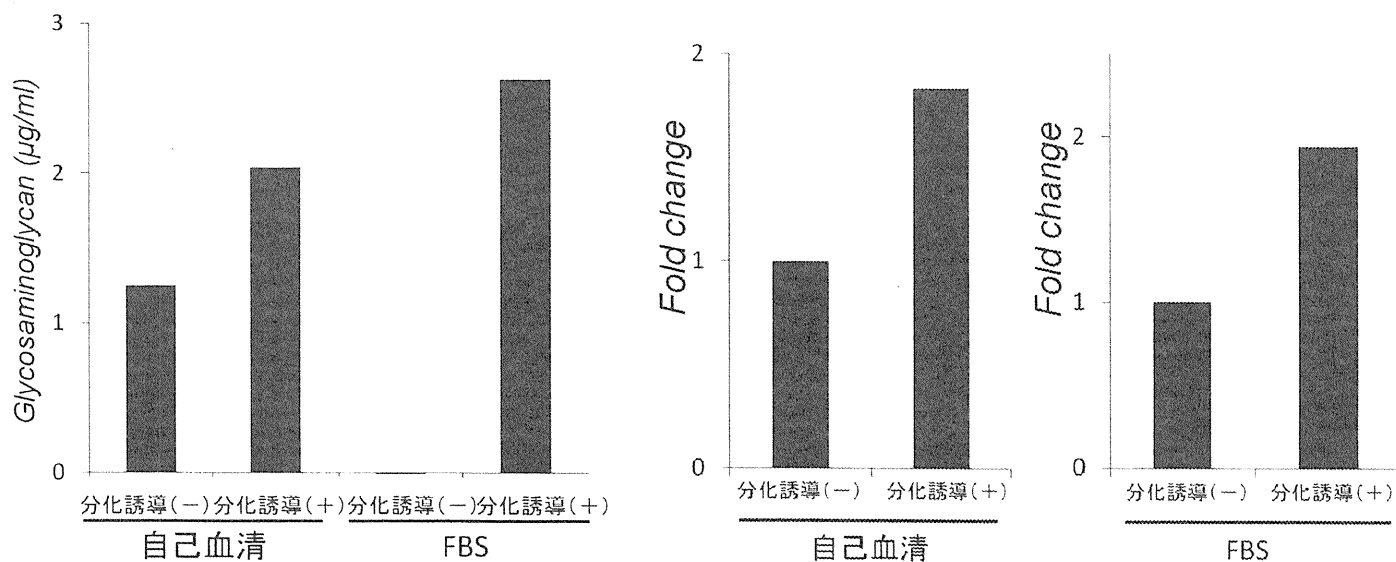
右：増殖曲線を元に算出した細胞倍加時間の比較



(図5) 自家血清含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の軟骨分化能の評価

左：各培養上清中のグリコサミノグリカン含有量の比較 (n=1)

右：各培養条件におけるアグリカン遺伝子発現解析 (n=1)



## D. 考察

現在, Tissue engineering を基礎とした培養再生軟骨や間葉系幹細胞を用いた椎間板再生の研究がなされており, それぞれ臨床応用されつつある. そして, 培養再生軟骨は先天性頭蓋顔面奇形や外傷性高度顔面変形などへの臨床応用も期待されている. 従来, 小耳症などの先天性組織欠損や外傷性陥凹変形に対し, 耳介形成術に代表されるような肋軟骨による再建術や腸骨や筋膜, 真皮脂肪組織などの移植がなされてきた. しかし, 再建材料を得るためには組織採取を必要とし, 時としてその侵襲の強さが問題となる. また, 再建された組織の長期形態維持性が不安定であることや組織採取量に制限があることなどが克服しがたい臨床的課題であった.

こういった問題を解決するべく, 軟骨細胞へ分化しうる幹細胞に関する研究が広く行われている. われわれは, ヒト耳介軟骨膜細胞中に軟骨幹/前駆細胞を同定し, その臨床応用を目指している. 軟骨幹/前駆細胞を用いることの利点は大きく分けて2点挙げられる. まず一つ目として, 軟骨膜の再構築にある. われわれの先行実験では軟骨膜細胞の移植実験において, 軟骨細胞のみのものと比較すると Collagen type I で染色される軟骨膜様組織が再構築されており, その部位に軟骨幹/前駆細胞が再分布していることが分かっている. 臨床的には軟骨膜を含めた自家軟骨移植の方が軟

骨膜を含めないものより長期形態維持能が高いと言われており, 軟骨幹/前駆細胞が含まれる軟骨膜様組織も同様であると期待している. 二つ目の利点としては, 軟骨組織以外へ分化するリスクが低いことである. 骨髄由来間葉系幹細胞や脂肪組織幹細胞は以前より軟骨分化を含めた多分化能が報告されており, 特に間葉系幹細胞は椎間板再生や関節軟骨再構築に関して臨床応用が試みられている. しかしその一方で, 多分化能のために予期せぬ骨分化や脂肪分化をきたす可能性と危険性は回避できない. その一方, 軟骨幹/前駆細胞は多分化能がわれわれの先行研究で確認されているものの, 軟骨分化へある程度特化していると想像される. そのため, その他の幹細胞を用いる場合と比べると骨分化や脂肪分化の可能性より低く, より安全であると想定している.

これらヒト耳介軟骨幹/前駆細胞, および軟骨膜細胞をヒトに臨床応用するにあたって, 細胞を確実に増殖させ安定した量の最終産物を得ることが重要である. そのため, 現在は培養にあたって各種血清が用いられることが多い. 血清は自家, 他家, 他種(FBS など)に大きく分けられる. それぞれ長所と短所があるが, 他家血清や他種血清を用いるときは感染性や免疫反応などの問題がある. とくに FBS にはウシ海綿状脳症をはじめとした感染症や異種タンパクに対する免疫反応の危険性が否定できない. これらの問題を回避するために, 自家血

清を用いる試みがなされている。実際、軟骨実質から採取された細胞を自家血清含有培地で増殖させ、腹部皮下へ移植し軟骨様組織の再構築を誘導し、それを臨床応用している報告がある。加えて、骨髄由来間葉系幹細胞や関節軟骨の領域においては自家血清と他種血清における増殖効率と分化誘導の差を報告するものが散見される。

まず増殖能は、さまざまな間葉系幹細胞などで評価されており、それらによると FBS よりも自家血清を用いた群の増殖率が高いとする報告が多い。Shahdadfar ら(Stem Cells, 2005)は骨髄由来間葉系幹細胞において FBS 使用群が自家血清使用群と比較して細胞周期に関わる遺伝子を過剰発現していることを確認しており、それらは細胞周期の延長と複製老化につながっていると考察している。われわれが用いている軟骨膜細胞は自家血清使用群の増殖効率が高かった。われわれが用いているヒト耳介軟骨幹/前駆細胞においても同様の現象が起きているものと推察される。

増殖に際しての至適血清濃度に関しては報告によりさまざまである。軟骨膜細胞においては、血清濃度が高い群の増殖効率が高いことが分かった。しかし、自家血清は採血量に対し 40-50%程度の割合で生成される。そのため、必要採血量の問題から 10%以上の濃度で血清を用いる培養法はあまり現実的ではないと考える。よって、自家血清使用濃度は現段階では 10%が妥当と考える。

次に分化誘導に関してもさまざま報告があるが、FBS 使用群が自家血清使用群と比較して分化誘導がかかりやすいとする報告が多い。Shahdadfar ら(Stem Cells, 2005)は骨髄由来間葉系幹細胞において FBS 使用群の方が骨分化、脂肪分化、軟骨分化それぞれの遺伝子発現が増加していたと報告している。このように、細胞培養に FBS を用いると良くも悪くも様々なシグナルが活性化していると予想されている。ただし、今回の検証において、自家血清使用群は FBS 使用群と比較し、軟骨分化誘導に大きな差は無かった(n=1)。また、前年度に報告したとおり、重症免疫不全マウスへの皮下移植実験において、自家血清含有培地で培養した軟骨膜細胞群に組織再構築能を認めている。そのため、分化誘導の程度に差が存在したとしても、臨床的な問題が生じる範囲ではないと予想している。

今後の検討課題としては、自家血清使用群と FBS 使用群を比較した際、前述の通り増殖効率や分化誘導の程度に差やバラつきが生じる可能性がある。その際、そういったものが臨床的に影響及ぼすのか検証しなければならない。もし影響が出れば、それを定量的に解析する必要がある。

また、初代培養時や継代、分化誘導後など全ての培養工程において自家血清使用群はディッシュへの固着性が低い傾向にあったことも、重要



な検討項目であろう。つまり、臨床応用するにあたり、安定的な最終産物を産生するプロトコールが必要であるからだ。Shahdadfar ら(Stem Cells, 2005)は骨髄由来間葉系幹細胞において、FBS 使用群は自家血清使用群と比較しある一部の細胞接着因子の発現が高いことを示している。ヒト耳介軟骨幹／前駆細胞においても同様の現象が起こっているのかもしれない。今後は、各群における mRNA の総合的な検証を行い、プロトコールに直結する基礎的な検証と裏付けが必要である。

## E. 結論

今回われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した軟骨膜細胞を臨床応用するにあたって、他種血清を使うことによって生じる感染症や免疫反応の問題を考慮し、自家血清を用いた培養法の検証を行った。

軟骨膜細胞の自家血清含有培地を用いて初代培養が可能であった。また、増殖効率を MTT assay で評価したところ、自家血清使用群は FBS 使用群より高い増殖を認めた(n=3)。

自家血清で培養した軟骨膜細胞の分化能を評価した。FBS 使用群と比較し大きな差は無いことが確認された(n=1)。

今後は例数を重ねるとともに、臨床応用に向けたプロトコール作成を目的とし、増殖効率や分化誘導のバラつきやディッシュへの固着性などを検

証していく。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載の通り。

## G. 研究発表

なし

## 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

厚生労働科学研究費補助金  
分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた  
軟骨再生療法の開発  
・細胞調製センターにおける臨床応用へ向けた研究・

分担研究者 前川二郎  
研究協力者 矢吹雄一郎

研究要旨

われわれは、本学付属病院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、Good Manufacturing practice (以下GMP)に準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその報告が必要となる。現在、それらプロトコールの作成に加え、大動物(イヌ)における耳介軟骨・軟骨膜細胞培養とそれらの軟骨再構築能の検討を行っている。また、医薬品を用いた軟骨分化誘導に関して検討を行っている。現在、それぞれの研究・検討を進めている段階であり、今後さらなる条件検討と例数を重ねる必要がある。

A. 研究目的

再生医学の概念は1990年代より広まり、その概念は定着して久しいと言える。しかしその一方で、現状で臨床応用に至っている技術はごく一部である。2009年11月、本学付属病院は病院内に再生細胞治療センター(cell processing center: 以下CPC)を建設・設置を開始した。その後、2010年10月頃よりCPC内の機材の試運転やシュミレーションテストなどを開始している。当院CPCは同区画内に作業スペースを2カ所設計しており、それぞれCP1とCP2としている。CP1にはクラス100の空気清浄度を保持

できるアイソレーター(Cell Processing work station system; SANYO)を設置している。われわれは、当CPCとアイソレーターを利用し、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目標としている。それにあたり、GMPに準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその報告が必要となっている。現在、基礎実験として2つの項目に関して行っている。まず、大動物(イヌ)における耳介軟骨・軟骨膜細胞培養とそれらの軟骨再構築能の検討を行っている。そして、医薬品を用い

た軟骨分化誘導に関しても検討を行っている。

## B. 研究方法

### 1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、4人の小耳症患者と拘縮耳患者、鼻翼欠損患者の全6例から手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。尚、拘縮耳の症例は耳介軟骨を弁状にし、耳輪部の再建しており、そのトリミングで生じた余剰耳介軟骨を供与いただいた。鼻翼欠損患者は耳輪部を全層で楔状に採取し、composit graft として鼻翼部の再建に用いた。その際のトリミングで生じた余剰耳介軟骨を供与いただいた。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下でエレクトロリウムを用い鈍的に剥離した。

### 2. イヌ耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

試験動物は健康なビーグル(TOYO Beagle : オリエンタル酵母) 5ヶ月齢、オスを5頭用いた。実験動物の飼育と管理は本学動物実験センターに委託した。まず検体採取にあたり、獣医師指導のもと「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号、最終改正平成18年6月2日法律第50号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基

準」(平成18年4月28日環境省告示第88号)、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006年6月1日)を遵守した麻酔処置を実施した。

いずれの手術日も、動物は前日から一夜絶食後、麻酔前処置を施した。ミダゾラム：富士製薬(0.3mg/kg, i.s.)を投与し、鎮静を確認した後、鎮痛薬としてレペタン：大塚製薬(0.01mg/kg, i.v.)を投与した。次いで麻酔の導入を行った。麻酔導入薬は、プロポフォール：丸石製薬(0.5mg~3.5mg/kg, i.v.)にて行った。麻酔深度が適正になったことを確認し、経口気管挿管を行った後、イソフルランにより麻酔を維持した。術中は疼痛反応と麻酔深度を確認するため、心電図でモニタリングし、適正に維持した。術後の疼痛管理はレペタン：大塚製薬(0.01mg/kg, i.v.)を用いた。術中および術後の感染予防目的として、セファゾリン(10-30mg/kg/回)を1日1回、合計3日間、皮下注射で投与した。術後創処置はイソジン外用薬：明治製菓(株)を用いた。縫合部の生着が確認できるまで1日1回処置した。

全個体において片側外耳介を採取し、無菌的に皮膚を剥離した。得られた検体のうち脂肪や血管、他の組織を剪刀で取り除いた。その後、軟骨組織から軟骨膜を剥離し、軟骨実質と軟骨膜に分けた。

### 3. 耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の培養

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質

部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、0.2% Collagenase type II (SIGMA) に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は100 $\mu$ m の Cell Strainer (BD Falcon) で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)した。上清を除去後、10% Fetal Bovine Serum (GIBCO; 以下 FBS), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium(SIGMA; 以下 D-MEM/F-12)で洗浄し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(FALCON)あるいは60 mm 細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。細胞は気相条件を37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington) を含有する D-MEM/F-12(SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で20~30分静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA) を添加した D-MEM/F-12 medium (SIGMA)を加え、ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は1200 cells/cm<sup>2</sup>の密度とし

コンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

#### 4. 軟骨分化誘導と積層化培養

耳介軟骨膜細胞, 軟骨細胞を用いた積層化培養によって軟骨細胞へ分化誘導を行った。軟骨細胞は *in vitro* における二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟骨分化誘導が試みられてきた。そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後2日間、10%FBS (GIBCO), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養し、細胞の接着を促した後、軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。軟骨分化誘導培地は、基本的には10%FBS(GIBCO), 1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate (WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor-I (SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor (科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium (SIGMA)を使用した。ただし、医薬品を用いた分化誘導培地の検