

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

検体のコラゲナーゼ処理で得られた軟骨膜細胞を10%自家血清含有培地か10%FBS含有培地で拡大培養し、どちらと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 μ l添加した。その後さらにCell Counting Kit-8を50 μ 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 μ 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. 重症免疫不全マウスへの皮下移植実験. 組織再構築能の評価

小耳症残存耳介軟骨膜より採取された細胞を、初代培養より 10%FBS 含有培地か 10%自家血清含有培地を用いて増殖させた。それぞれ 10cm ディッシュで 3 層の積層化培養し、軟骨分化誘導をかけた。積層化の 1 層目第一継代のものを使用し、2, 3 層目のものは第二継代のものを使用した。軟骨分化誘導は血清を含まない培地を用いた。

実験に使用したマウスは 6 週齢の雌の重症免疫不全マウス(NOD/SCID)で、三協ラボサービスより購入した。実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

分化させた各細胞は、セルスクレイ

パー(IWAKI)を用いて剥離した。剥離した細胞は 23 G 注射針(テルモ)を装着した 2.5 ml シリンジ(テルモ)その産生基質とともにシリンジに回収し、背部の除毛を行った重症免疫不全マウス(NOD/SCID)の背部皮下に全量注入した。移植後 4 カ月目に摘出を行い、組織学的に検討した。

10. 組織化学染色

移植後 4 ヶ月目に摘出した組織は、10%ホルマリン溶液(Wako)を用いて、室温で 24 時間以上浸漬固定した。その後、OCT Compound(Sakura Finetechnical)で包埋し、液体窒素で凍結を行い、組織法埋ブロックを作成した。組織包埋ブロックは-80℃で保存した。組織包埋ブロックをクライオスタット(LEICA CM 1950)で 5μm の厚さに薄切し、組織切片を作成した。作成した組織切片を流水で洗浄して OCT Compound を除去後、H&E 染色、Toluidine Blue 染色(武藤化学薬品)、Elastica Van Gieson 染色(武藤化学薬品)を行った。

11. 他家血清含有培地の検証

本研究は自家血清を用いた培養法の検証を主体としているが、その比較対象として他家血清を用いた培養法も検証した。

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 400cells 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、他家血清とした。血清濃度はいずれも10%とした。播種24時間後から72時間毎、計6点で観察した。

12. 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。得られたデータに関しても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22年度と平成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それぞれ4例4検体と7例7検体、合計11例であった。採血と血液の供与に関しても11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)。

平成23年度に供与頂いた7例においては、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検体当たり約300mg前後の軟骨膜が得られ、 2.5×10^5 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高い傾向を認めた(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 ± 12.0 [hr]、10%FBS 使用群は 115.1 ± 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。

5. 重症免疫不全マウス皮下移植

移植した細胞数はそれぞれ約 $1.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 、移植時は細胞がディッシュ内で産生した基質を含めた状態で約 1ml であった。軟骨膜細胞を用いた群を n=2、加えて比較対象として軟骨細胞を FBS で増殖させた群を n=1 施行した。以下代表的検体の各種染色像を提示する(図6, 7, 8)。得られた検体は、各群とも白色調、弾性硬であり、肉眼的には大きな差は認めなかった。Toluidine blue 染色で紫染されるプロテオグリカンの存在が確認された。加えて、Elastica van Gieson 染色で黒色に染色される弾性線維の存在が豊富に確認された。以上より再構築された組織は弾性軟骨組織と判断された。加えて、H E 染色において、軟骨膜様の線維性組織が軟骨組織周囲に存在することが確認された。その厚さは、軟骨細胞を移植した群と比較し厚い傾向にあった。

6. 他家血清含有培地の検証

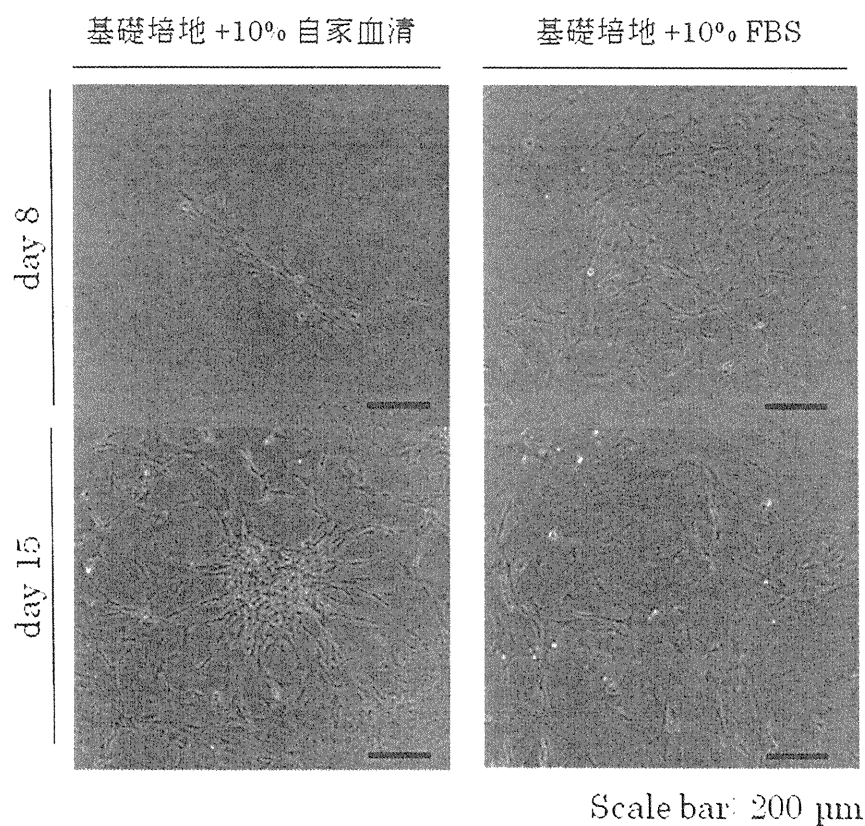
48 穴 well に播種した細胞はそれぞれ生着した。各種血清による比較を行ったところ、この assay を施行した検体においては 10%自家血清使用群がもっとも増殖した。10%他家血清含有培地使用群においても、細胞増殖が得られた。FBS 使用群と比較し大きな差

は認められなかった。ただし、n=1 で なかった。(図 9)
あり、正確な細胞倍加時間は算出され

(表 1) 平成 22 年, 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* | 21 | 10 | 32 | 16.5 |
| | | | TCS* | 25 | 13 | 25 | 15 |
| 2 | 9 | F | 小耳症 | 20 | 10 | 25 | 13 |
| 3 | 11 | M | 小耳症 | 20 | 10 | 40 | 20 |
| 4 | 10 | F | 小耳症 | 21 | 10.5 | 35 | 18 |
| 5 | 10 | F | 小耳症 | 35 | 15 | 25 | 10 |
| 6 | 11 | F | TCS* | 35 | 15 | 25 | 12 |
| 7 | 12 | M | 小耳症 | 30 | 15 | 25 | 13 |
| 8 | 10 | M | 小耳症 | 40 | 20 | 26 | 13 |
| 9 | 10 | M | 小耳症 | 30 | 12 | 0 | 0 |
| 10 | 10 | M | 小耳症 | 30 | 12 | 25 | 10 |

(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)

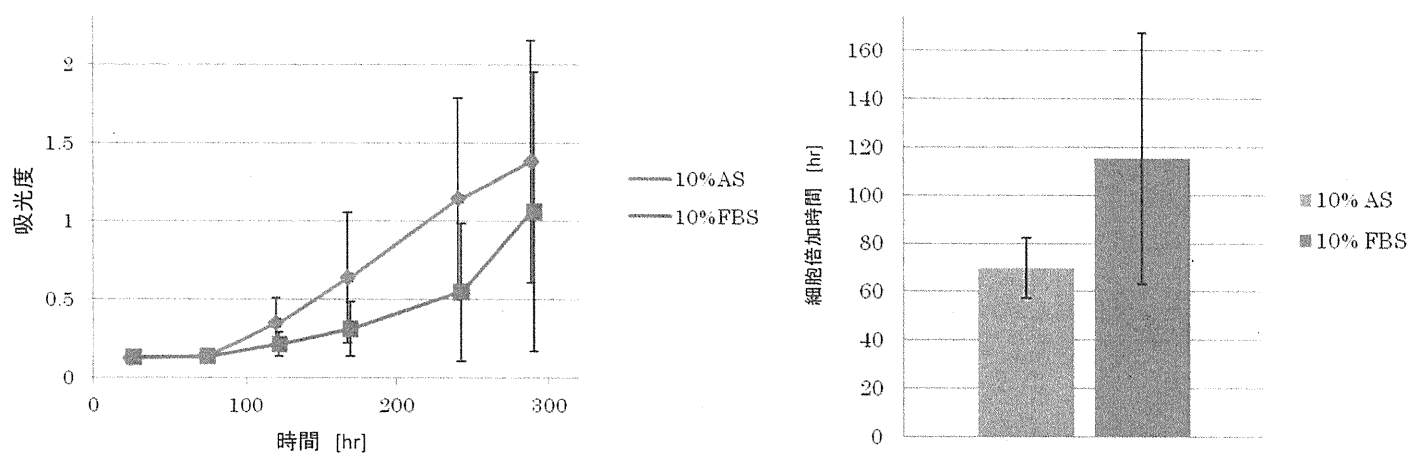
| 検体総重量[g] | 軟骨膜湿重量[g] | 軟骨膜細胞数[x10 ⁵ cells] |
|-----------|-----------|--------------------------------|
| 1.73±0.53 | 0.33±0.22 | 2.55±1.78 |

(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 ⁵ cells] | 第二継代時細胞数 [x10 ⁵ cells] |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|
| AS | 1.88±0.77 | 13.2±3.55 |
| FBS | 1.73±0.72 | 8.52±3.52 |

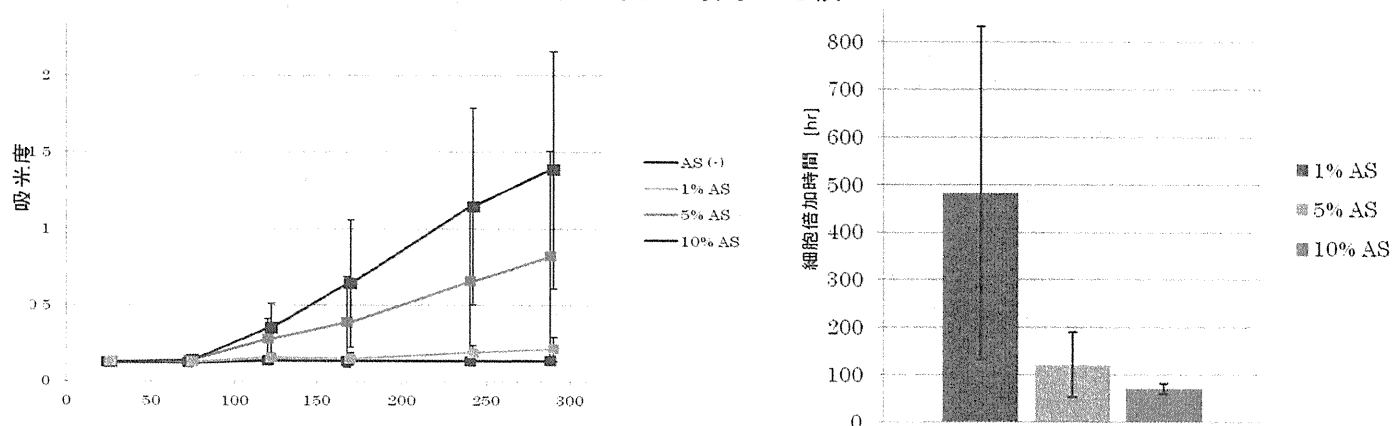
(図 2) 軟骨膜細胞の各種血清による増殖能の評価 (n=3)

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)

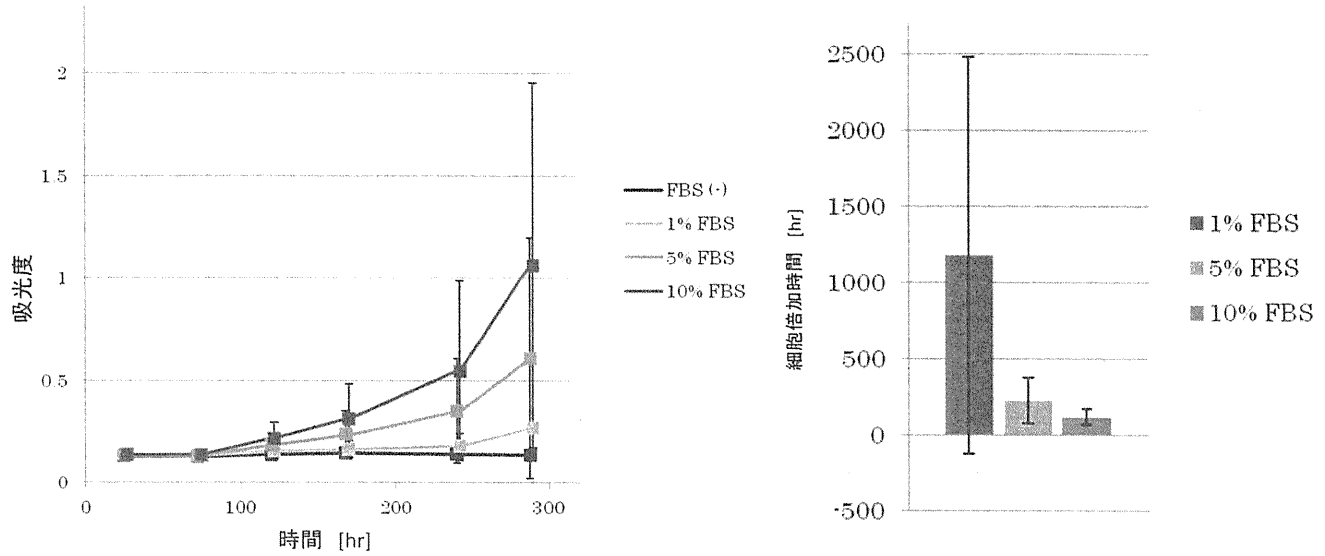
左：異なる自家血清濃度での軟骨膜細胞の増殖能の比較
 右：増殖曲線を元に算出した細胞倍加時間の比較



(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

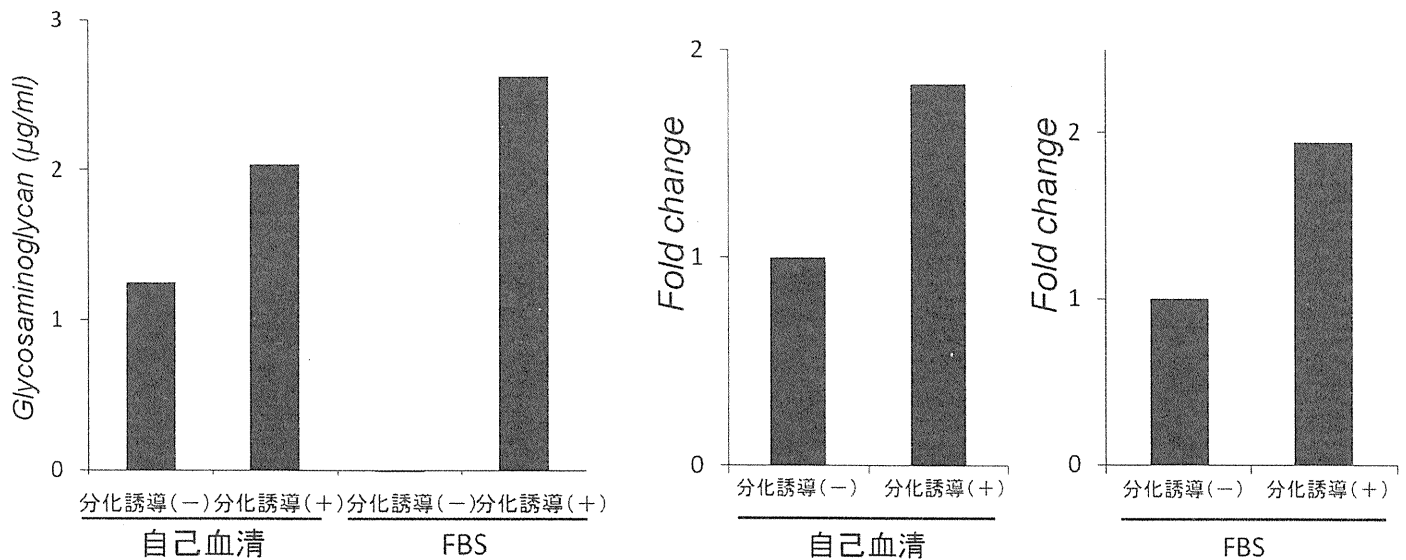
右: 増殖曲線を元に算出した細胞倍加時間の比較



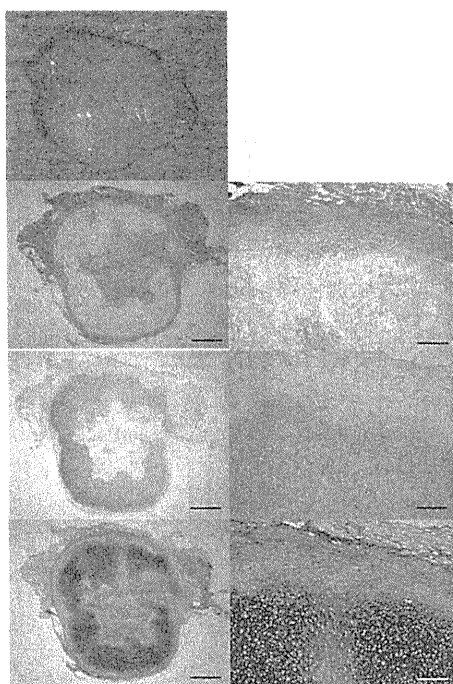
(図5) 自家血清含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の軟骨分化能の評価

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)



(図 6) 10%自家血清含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の皮下移植実験



| | |
|---|---|
| a | |
| b | c |
| d | e |
| f | g |

a: 肉眼所見

5×4×1.5mm 円盤状, 34.6mg

b: Hematoxylin & Eosin 染色, 弱拵

c: Hematoxylin & Eosin 染色, 強拵

d: Toluidine blue 染色, 弱拵

e: Toluidine blue 染色, 強拵

f: Elastica van Gieson 染色, 弱拵

g: Elastica van Gieson 染色, 強拵

Scale bar: 弱拵/1 mm 強拵/200μm

(図 7) 10%FBS 含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の皮下移植実験



| | |
|---|---|
| a | |
| b | c |
| d | e |
| f | g |

a: 肉眼所見

4×4×1.5mm, 不整形, 25.4mg

b: Hematoxylin & Eosin 染色, 弱拵

c: Hematoxylin & Eosin 染色, 強拵

d: Toluidine blue 染色, 弱拵

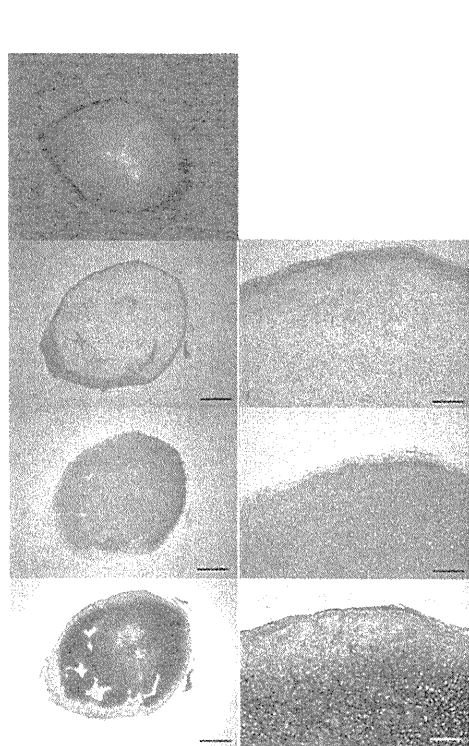
e: Toluidine blue 染色, 強拵

f: Elastica van Gieson 染色, 弱拵

g: Elastica van Gieson 染色, 強拵

Scale bar: 弱拵/1 mm 強拵/200μm

(図 8) 10%AS 含有培地で増殖させた軟骨細胞の皮下移植実験



| | |
|---|---|
| a | |
| b | c |
| d | e |
| f | g |

a: 肉眼所見

4×4×2mm, 円盤状, 38.2mg

b: Hematoxylin & Eosin 染色, 弱拡大

c: Hematoxylin & Eosin 染色, 強拡大

d: Toluidine blue 染色, 弱拡大

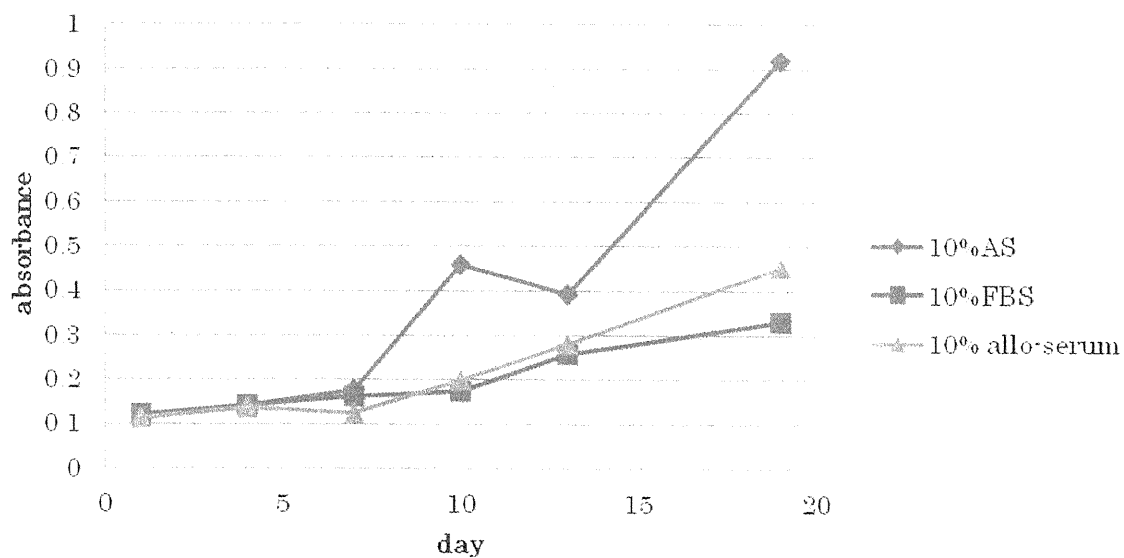
e: Toluidine blue 染色, 強拡大

f: Elastica van Gieson 染色, 弱拡大

g: Elastica van Gieson 染色, 強拡大

Scale bar: 弱拡大/1 mm 強拡大/200μm

(図 9) 各種血清 10%含有培地における軟骨膜細胞増殖の比較 (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. 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で評価されている。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。

次に間葉系幹細胞における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、組織再構築能を評価するに当たって、他種由来蛋白の残留を考慮しなければならない。例えば、FBS を使用した検体においてはウシ由来蛋白が残留し、それに対する炎症反応が生じるとの報告がある。そのため、FBS を使用することにより、移植細胞が障害され最終産物として得られる組織が減少するリスクがある。ただし、重症免疫不全マウスへの皮下移植実験においては、炎症反応を起こさざる免疫状態にないため、自家血清使用群と FBS 使用群に大きな差は無かったものと想像される。また、本研究においては軟骨分化誘導培地に血清を添加していない。血清を含まない培地で培養し、数回培地交換をすることで細胞内に取り込まれた他

種由来蛋白を減少させることが可能としている報告もある。今回の検証で FBS 使用群と自家血清使用群で大きな差が出なかった要因の一つかもしれない。いずれにしても、重症免疫不全動物を利用した実験では、臨床を想定した移植系と同等の評価にはなりえず、大動物実験などが必要となるであろう。

さらに、今後の検討課題として、増殖効率や分化誘導の程度に差やバラつきも挙げられる。それらは必ず生じうるものである。そのため、最終産物もバラつくリスクは否定できない。そのバラつきが臨床的に影響及ぼすのか検証しなければならない。もし影響が出るのであれば、それを定量的に解析し、許容できるか否かを評価しなければならない。

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、重要な検討課題であろう。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。

なお、補足実験として施行した他家血清の検証は現段階では不十分といわざるを得ないが、今回検証した検体においては、10%FBS 含有培地使用群より 10%他家血清含有培地使用群の方が良好な増殖が得られた。他家血清は FBS と同様に個体との相性が存在すると思われる。また、感染症の問題もある。しかし、その感染症のリスクは各種血液製剤を用いるリスクと同等であり、FBS のそれとはまったく異なる。小児例などにおいては医原性の貧血などの問題で、血液採取量には上限がある。そのため、自家血清を安定的に生成することが難しい。そういった場合に他家血清であれば、比較的安定的に入手が可能であろう。

いずれにしても、最終産物を安定的に生成するプロトコールが必要であり、使用血清に関して更なる検証が必要である。

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)。

重症免疫不全マウスへの皮下移植では組織再構築能を評価した。自家血清使用群と FBS 使用群ともに弾性軟骨が再構築され、それらは肉眼的に、そして組織学的に大きな差は認めなかった。

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指している。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(Toyoko Beagle, 5ヶ月齢, オス)を8頭用いた。実験動物の飼育と管理は平成23年度はボゾリサーチセンター(株)に委託した。本学動物実験センターに委託した。いずれも検体採取にあたり、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。

まず、平成23年度は以下の麻酔法などを用いた。動物は前日から一夜絶食後、麻酔前処置を施し、軟骨摘出手術時はペントバルビタールナトリウム(20~30 mg/kg)を静脈内投与し、術中の麻酔深度を適度に維持した。再移植手術時は塩酸ケタミン(ケタラール筋注用, 第一三共(株))と5%ブドウ糖液(日本薬局方, (株)大塚製薬工場)を1:50の割合に混合(0.1%液)し、微量点滴により術中の麻酔深度を適度に維持する。術前及び術後管理として感染防止目的で結晶ペニシリンGカリウムと硫酸ストレプトマイシン(明治製菓(株))の混合液を術中に使用した。また、術前後の予防投薬としてアジスロマイシン(ファイザー製薬(株))を用いた。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。

次に、平成24年度は以下の通りの麻酔と手術を行った。動物は手術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 μ mのCell Strainer (BD Falcon)で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, CO₂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 $^{\circ}$ 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/cm²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 2.5×10^4 cells/cm² 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討においては異なる組成の物を使用している(後述)。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 5×10^4 cells/cm² 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% FBS(GIBCO), 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, CO₂濃度 5%に設定したインキュベーター内

で行った。

5. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

前述の積層化により軟骨分化誘導をかけるに当たり、research useのものではなく、臨床応用を念頭に入れて医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討を行った。培地の組成は 1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミンC注10%PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキサート注射液®; 富士製薬工業株式会社), basic Fibroblast Growth Factor (フィブラストスプレー®; 科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とした。血清は検討条件により使用しないか、10% FBS(GIBCO)を添加した。

6. 重症免疫不全マウスへの皮下移植実験

積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた。実験に使用したマウスは6週齢の雌の重症免疫不全マウス(NOD/SCID)で、三協ラボサービスより購入した。実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

分化させた各細胞は、セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離した。剥離した細胞は 23 G 注射針(テルモ)を装着した 2.5 ml シリンジ(テルモ)その産生基質とともにシリンジに回収し、背部

の除毛を行った重症免疫不全マウス(NOD/SCID)の背部皮下に注入した。

7. 大動物(イヌ)への皮下移植実験

イヌにおいても積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた。皮下移植の際の周術期管理は、抗菌薬や麻酔法などそれぞれ耳介採取時のものと同様に行った。移植法としては、麻酔下に背部皮下を剥離した後にポケットを作成し、その部位にシリンジに吸引してある細胞を直接注入した。ポケットと皮膚はそれぞれ縫合し、閉鎖した。皮下移植後3カ月で検体を摘出し組織学的に検討した。

C. 研究結果

1. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

方法に記したとおり、ヒト耳介軟骨膜より採取された軟骨膜細胞の分離培養を試みた。ご供与頂いた組織は約6x5mm程度であった。拘縮耳と鼻翼欠損の症例においては成人であったものの軟骨膜細胞の分離が可能であった。それぞれ、10%FBS含有培地で拡大培養したところ、良好な増殖が得られた。拡大培養したのち、積層化培養しながら医薬品を用いた培地で軟骨分化誘導をかけた。従来われわれが用いている軟骨分化誘導培地であれば、積層化をしながら培地交換を繰り返すと約2-3週間程度で培養上清の粘稠性が増すことが分かっている。これは定量化が難しいが、軟骨分化誘導の

指標として考えている。医薬品を用いた培地で軟骨分化誘導したディッシュは4週間を過ぎても培養上清に変化は認めず、8週程度かかった。

軟骨分化誘導をかけた細胞群を重症免疫不全マウス背部皮下へ移植し、4カ月後に組織を回収した。回収した組織を組織学的に評価したところ、アルシアンブルーで青染される軟骨組織の再構築を認めた。軟骨組織周囲には線維性の軟骨膜様組織を認めた。

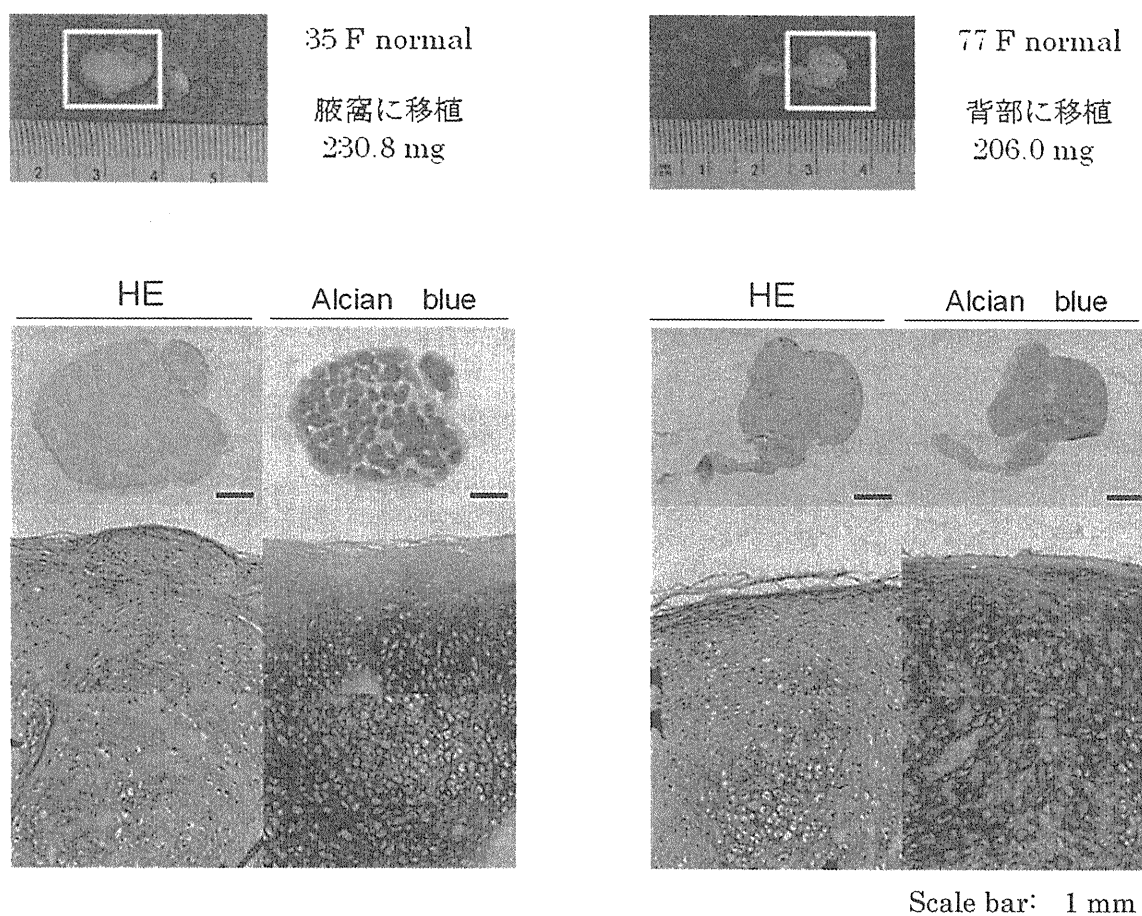
2. 大動物(イヌ)における実験

イヌの耳介から軟骨と軟骨膜を剥離した。部分的に癒着が強く剥離に難を要した部位もあったが、概ね良好に剥離された。検体より軟骨細胞、軟骨膜細胞を分離し、10%FBS含有培地を用いて培養したところ、良好な増殖を認めた。拡大培養した後、軟骨分化誘導培地と積層化培養を併用し軟骨分化誘導をかけた。イヌの細胞群はヒト軟骨・軟骨膜細胞と異なり分化誘導をかけても培養上清の粘稠性は増さなかった。同一個体の背部皮下へ移植し、2カ月後に検体を回収した。約7mm大の白色、やや不整な円盤状の固い組織を回収した。組織学的に解析したところ、アルシアンブルーで青染される軟骨様組織を認めた。また、その部位に一致してエラスチカ・ワン・ギーソン染色で黒染されたため、再構築された組織は弾性軟骨であることがわかった。

(表 1) 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検証に用いた検体リスト

| No. | 年齢 | 性別 | 疾患名 | 移植細胞数 [$\times 10^6$ cells] | 採取検体 | |
|-----|----|----|------|------------------------------|-----------|----------|
| | | | | | サイズ [mm] | 湿重量 [mg] |
| 1 | 35 | F | 拘縮耳 | 7.4 | 22x9x6 | 268.4 |
| | | | | 7.4 | 10x8x6 | 230.8 |
| | | | | 14.8 | 22x13x2.5 | 204 |
| | | | | 5.9 | 11x5x0.5 | 22.5 |
| 2 | 77 | F | 鼻翼変形 | 6.2 | 23x10x2 | 206 |
| | | | | 6.2 | 17x7x2 | 111.9 |

(図 1) 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地で培養したヒト成人耳介軟骨膜細胞における組織再構築能の評価



(図 2) イヌ耳介から軟骨膜, 軟骨組織の剥離

左: ビーグル犬の耳介

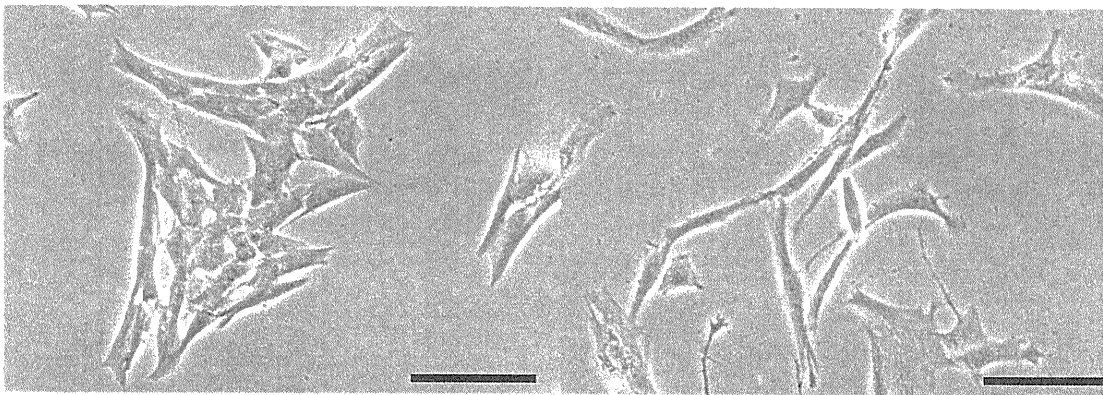
中央: 耳介の皮膚および筋組織, 周囲結合組織をトリミングした状態

右: 剥離し回収した軟骨膜組織と軟骨組織(一部)



(図 2) イヌ耳介から分離された軟骨・軟骨膜細胞(初代培養開始 5 日目)

左: 軟骨細胞 右: 軟骨膜細胞



Scale bar: 100 μ m

(図 3) イヌ背部より回収した組織(マクロ像)

左: 触診上固く触れた組織を皮膚を含めて切除し回収した.

右上: 固く触知する部位のみトリミングした

右下: 断面像