

関節鏡：grade1

光音響検査法：※表 1 参照

病理検査：Mankin score：1

→2013.01.07 臨床研究終了

Entry No.2

46 歳男性

2012.3.7 移植施行

【術前評価】

Lysholm score：72

KOOS score Total：58.3

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

関節鏡：grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score：59

KOOS score Total：60.7

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score：88

KOOS score Total：63.7

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score：96

KOOS score Total：78.0

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

【術後 1 年】

Lysholm score：85

KOOS score Total：88.7

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade1

関節鏡：grade1

光音響検査法：※表 2 参照

病理検査：検査中

→2013.03.19 臨床研究終了

Entry No.3

48 歳女性

術前関節鏡評価にて軟骨損傷が

Outerbridge grade II で適応外のため逸脱

Entry No.4

52 歳男性

細胞数が基準細胞数に満たず逸脱

Entry No.5

31 歳男性

2012.12.19 移植施行

【術前評価】

Lysholm score：58

KOOS score Total：72.0

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

関節鏡：grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score：86

KOOS score Total：72.6

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score：81

KOOS score Total：75.0

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

Entry No.6

50 歳男性

2013.02.06 移植施行

【術前評価】

Lysholm score：45

KOOS score Total：29.2

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

関節鏡：grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score：39

KOOS score Total：66.7

単純レントゲン写真：grade3

MRI 検査：grade2

Entry No.7

37 歳女性

剥離試験不適合で逸脱

E. 結果

以上、2013 年 3 月 31 日までに 7 症例がエントリーし、4 症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第 1 例、第 2 例は移植術後 1 年が経過し臨床研究を終了した。

F. 考察

これまでに移植後 1 年経過した 2 症例に関しては、術後 1 年後の臨床評価スコア（※表 3, 4 参照）、単純レントゲン写真、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨

床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による有効な関節軟骨再生効果が得られている。

今後は移植症例数をさらに追加し、軟骨細胞シート移植による関節治療効果の検討を進め、先進医療としての実現を目指す予定である。

G. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

H. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

I. 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

※1 Kellgren-Lawrence Grading Scale

Grade1 : doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping

Grade2 : definite osteophytes,definite narrowing of joint space

Grade3 : moderate multiple osteophytes,definite narrowing of joints space,some sclerosis and possible deformity of bone contour

Grade4: large osteophytes,marked narrowing of joint space,severe sclerosis and definite deformity of bone contour

※2 Nelson の MRI 分類

Grade0 : normal

Grade1 : intact cartilage with signal change

Grade2 : high signal breach of cartilage

Grade3 : thin,high signal rim extending behind the osteochondral fragment indicating synovial fluid around the fragment

Grade4 : mixed or low signal loose body in the center of lesion or free within the joint

※3 Outerbridge-Brittberg

grade1 : 関節軟骨の軟化を認める

grade2 : 軟骨表面の羽毛立ち、浅い亀裂を認める

grade3 : 軟骨下骨の深さまでの軟骨損傷があるが、軟骨下骨の露出は認めない

grade4 : 軟骨下骨の露出を認める

※4 Mankin score system

I : 構造

a. 正常 : 0

b. 表面の不整 : 1

c. 表面の不整、バンヌス形成 : 2

d. 中間層までの亀裂 : 3

e. 深層までの亀裂 : 4

f. 石灰化層までの亀裂 : 5

g. 完全な破壊 : 6

II：細胞

- a. 正常：0
- b. びまん性の細胞数増加：1
- c. クローニング：2
- d. 細胞数減少：3

III：サフラニン-O 染色性

- a. 正常：0
- b. 軽度の低下：1
- c. 中等度の低下：2
- d. 重度の低下：3
- e. 染色性の消失：4

IV：Tidemark の状態

- a. 正常：0
- b. 血管の横断：0

総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：>7

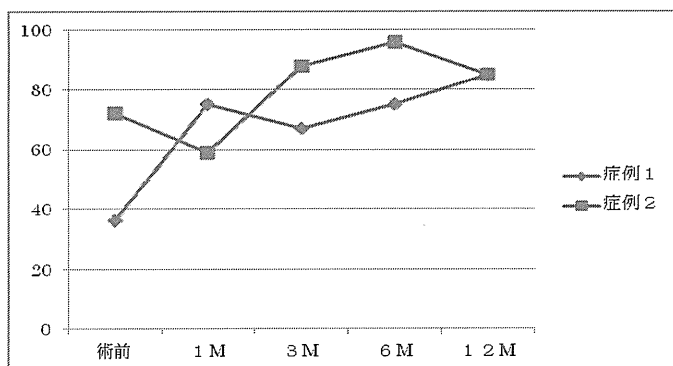
※表 1. 第 1 症例の超音響検査法評価結果

Day	手術前	12ヶ月
評価日	2011 12/21	2013 1/7
移植部	0.65	0.87
周辺軟骨部	1	1

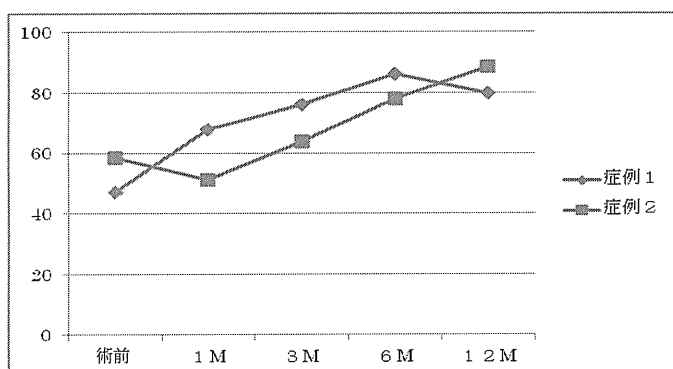
※表 2. 第 2 症例の超音響検査法評価結果

Day	手術前	12ヶ月
評価日	2012 02/14	2013 3/8
移植部	0.60	1.06
周辺軟骨部	1	1

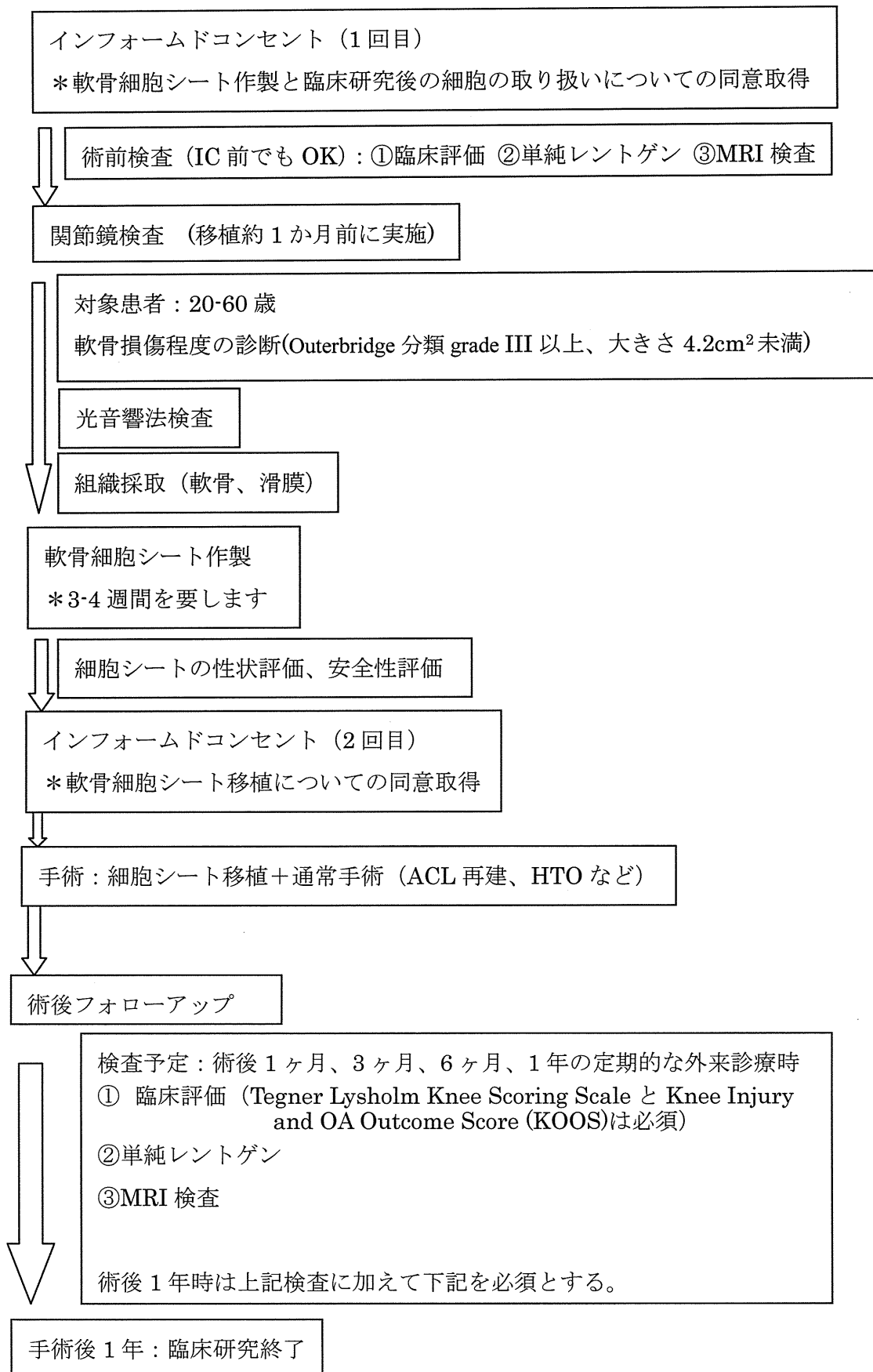
※表 3. 第 1 症例と第 2 症例の Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale 推移



※表 4. 第 1 症例と第 2 症例の Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score 推移



※付記 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」 研究実施の流れ



自己細胞処理と安全性評価に関する研究

研究分担者	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授
	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授
	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師
研究協力者	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
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
研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
	伊東 紀子	株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部
	的場 亮	株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長

研究要旨：我々は温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により、積層化軟骨細胞シートを作製し、その修復再生効果を確認してきた。本学で開発された培養軟骨細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、ヒト幹細胞臨床研究指針に準拠して厚労省へ申請する際の安全性評価として、自己培養軟骨細胞をシート化する際の試験評価方法の確立を目的として検討を行った。

培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、通常の培養継代期間を超えて培養した軟骨細胞について、aCGH 解析、G バンド分染法を用いて安全性の評価を検討した。この結果、自己培養軟骨細胞は、試験評価方法を通じて安全性を確認できた。

A. 研究目的

自己培養軟骨細胞の安全性を確認することを目的に安全性試験を実施した。薬食発法第 0208003 号第 4 章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」を確認するために昨年度に引き続き、通常の培養期間を超えて継代培養した細胞について微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出などの網羅的な解析により遺伝子異常を検出することが出来るとされている array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) 解析を実施した。また、自己細胞が保有している核型につい

て異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出することが出来るとされている G バンド分染法により染色体核型解析を実施した。

B. 研究方法

① aCGH 解析

本学臨床研究審査委員会の承諾のもと、人工関節置換術（Total Knee Arthroplasty : TKA）（4 検体）の術式により得られた軟骨組織から酵素処理により単離した患者由来の軟骨細胞を自己軟骨細胞として解析に用いた。それぞれの自己軟骨細胞について、 1.0×10^4 cells/cm² の播種濃度で継代培養し、2 桁継代として第 12 継代（P12）まで培養を行い、第 2、4、6、12

継代 (P2、P4、P6、P12) の細胞から DNA を抽出した。解析レベルは、Aberration Detection Method-2 (ADM-2) 10pt、チップサイズを 8×60K で解析を実施して細胞培養中における細胞への影響の有無を確認するため、同一人物の自己軟骨細胞について P2 を標準試料とし、組み合わせを P2 と P4、P2 と P6、P2 と P12 それぞれについて解析を実施した。さらに、各組み合わせは蛍光色素を入れ替えての dye swap 解析も実施することによりデータを再確認し、データの信頼性を高めた。また、細胞培養中に顕微鏡下で細胞形態の観察を実施した。

② G バンド分染法

①と同様の軟骨細胞 (2 検体) とともに、昨年度 aCGH 解析を実施した前十字靭帯再建術 (Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: ACL) の術式により採取した軟骨細胞 (4 検体) を正常軟骨細胞として解析に用いた。それぞれの軟骨細胞について、 1.0×10^4 cells/cm² の播種濃度で継代培養し、2 桁継代として P12 まで培養を行い、P2、P4、P6、P12 の細胞を解析バンドレベル 300bp~400bp で、細胞分裂中期 (M 期) のよく広がった細胞を用いて、評価基準であるヒト染色体に関する国際命名規約 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: ISCN) に従い、20 細胞を核型解析に用いて同一人物による各継代の核型解析結果を比較検討した。

C. 結果

① aCGH 解析

P2 から P12 まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった。aCGH 解析では、標準試料との差異を検出するアルゴリズムとして ADM-2 (10pt)、Threshold 6、7、8、9、10 を用いて解析を行った。同一人物の P2 から抽出した DNA を標準試料とし、組み合わせを P2 と P4、P2 と P6、P2 と P12 それぞれについて解析を実施した。さらに、各組み合わせは蛍光色素を入れ替えての dye swap 解析も実施し、ゲノム DNA の変化がみられた領域数を数値として検知できた。各検体の組み合わせの解析では、Threshold 6、7、8、9、10 により、それぞれすべて $\text{Log}_2\text{Ratio}=0$ (22 解析)、あるいは 2 (2 解析) と検出され、Threshold 6、7、8、9、10 のアルゴリズムに関わらずに検出された解析数値は変化することなく、一定の数値を保ったままであった。また、プローブ 10pt 毎に Moving Average (移動平均) の値を算出してライングラフ化し、染色体毎に染色体のコピー数異常の検出を基線からのずれとして可視化させて実施した。可視化した図より、7 番染色体に基線からのずれが多少認められた (図 1-1~図 1-6)。

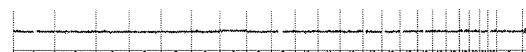


図 1-1 TKA-AC P2 vs.P4



図 1-2 TKA-AC P4 vs.P2 dye swap

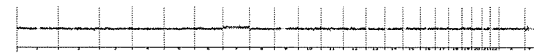


図 1-3 TK-A-C P2 vs. P6

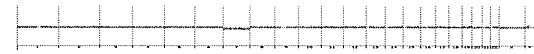


図 1-4 TK-A-C P6 vs. P2 dye swap

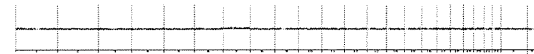


図 1-5 TK-A-C P2 vs. P12

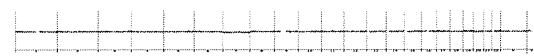


図 1-6 TK-A-C P12 vs. P2 dye swap

図 1-1～図 1-6 Genome View

そして、継代が進むにつれて、7 番染色体において基線からのずれが大きくなる検体も認められ、7 番染色体に明らかなコピー数の異常が認められた。また、7 番染色体を除いたすべての染色体は、基線からのずれは認められなかった。したがって、培養期間および培養作業中による細胞への影響は認められないと考えられた。

② G バンド分染法

染色体核型解析は、評価基準 ISCN に従い細胞分裂中期（M 期）20 細胞核型解析を実施した。人工関節置換術より単離した患者の培養軟骨細胞は、2 検体ともに 7 番染色体にトリソミー異常であることが確認された（図 2）。

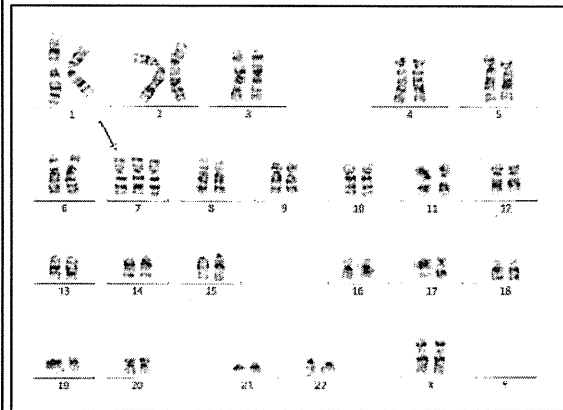


図 2 G バンド分染法 (TKA)

そして、7 番染色体トリソミー異常は、各継代においても観察され、恒常的に存在する変異であることが判明した。7 番染色体トリソミー異常を除き、他の染色体異常は、培養過程で継続的に観察されることはなかった。したがって、細胞に対する培養期間および培養作業中による影響は認められないと考えられた。

D. 考察

通常用いる培養期間を超えて培養した軟骨細胞は、顕微鏡下において形態に異常は認められなかった。しかし、細胞培養の継代数が進むにつれて、細胞の増殖性の低下が認められた。したがって、自己軟骨細胞は、過継代はシート化に適さないことが示唆された。

aCGH 解析は、これまで特に遺伝子異常の集積の結果として起こるガンに関して、ゲノムワイドの解析により新たな遺伝子の増幅や欠失を検出するために有用な解析法であり、疾患の遺伝子異常や健常人のハブ

ロタイプ型の検出にも用いることが可能である。

今回、aCGH 解析により、人工関節置換術の術式から単離した患者由来の培養軟骨細胞は、基線のずれとして 7 番染色体のコピー数異常が認められた。このコピー数の異常は、同一人物の G バンド分染法の染色体核型解析を参照すると、7 番染色体トリソミーの異常として確認することができた。この 7 番染色体トリソミーの異常は、既に報告 (Castellanos et al, 2004) のある、変形性関節症 (Osteoarthritis : OA) 患者に起因する異常ではないかと推察された。また、昨年度の解析した正常軟骨としての前十字靭帯再建術で採取した培養軟骨細胞は、培養中における影響はなかったこと、および患者由来の培養軟骨細胞は、OA 患者由来と推察された 7 番染色体を除く染色体については基線からのずれは認められず、コピー数の異常が生じないことを確認できたため、正常軟骨細胞と同様に細胞に対する培養期間および培養作業による影響は認められないと推察された。

aCGH 解析により、少量の DNA から解析が可能であり、遺伝子の異常検知やがん関連遺伝子の異常を数値により得られる。そして、微細な変化を捉えることが可能なため、培養中における培養期間や培養作業による細胞への影響の有無は、同一人物の自己細胞の継代数の若いサンプルを標準試料として継代が進んだサンプルを解析することにより、細胞の状態が確認できることが判明された。

また、G バンド分染法での染色体核型解析では、自己由来の染色体異常の有無を確定でき、一定の割合で染色体異常が恒常性を示す細胞増殖をする検体と、継代が進むにつれて染色体異常にすべて置き換わるような変異の頻度が上昇する細胞群が認められた。今後、検体数を増やして検討したい。

aCGH 解析および G バンド分染法は、細胞培養中における細胞の変化を確実に捉え、遺伝子異常および染色体異常の検知に有用な安全性評価の手法であることが示唆された。

E. 結論

aCGH 解析、G バンド分染法により自己軟骨細胞の培養中（培養期間、培養作業）によるコピー数の異常は生じないことが確認された。このことから自己培養軟骨細胞をシート化する際の試験評価方法を確立し、安全性を評価することができたと示唆された。

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（研究分担者：加藤俊一）

1) Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone Marrow Transplantation of Unwashed Cord Blood Using

- Reduced-Intensity Conditioning
Treatment : A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Apr;18(4):633-9. [Epub ahead of print] 2011 Aug 23.
- 2) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S. for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 May;18(5):780-7. [Epub ahead of print] 2011 Oct 18.
- 3) Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Jul 15;59(1):110-4. doi: 10.1002/pbc.23384. [Epub ahead of print] 2011 Oct 28.
- 4) Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S. High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Jul;18(7):1090-8, [Epub ahead of print] 2011 Dec 23.
- 5) Masuda H, Iwasaki H, Kawamoto A, Akimaru H, Ishikawa M, Ii M, Shizuno T, Sato A, Ito R, Horii M, Ishida H, Kato S, Asahara T. Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):160-71. doi: 10.5966/setm. 2011-0023. Epub 2012 Feb 6.
- 6) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood.* 2012 Mar 1;119(9):2141-8. [Epub ahead of print] 2012 Jan 10.
- 7) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S,

- Shiraishi K, Minemura T, Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jul;18(7):1119-27, 2012 Jan 14 [Epub ahead of print]
- 8) Matsumura T, Kami M, Yamaguchi T, Yuji K, Kusumi E, Taniguchi S, Takahashi S, Okada M, Sakamaki H, Azuma H, Takanashi M, Kodo H, Kai S, Inoue-Nagamura T, Kato K, Kato S. Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. *Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan*. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1482-6doi:10.1038/leu.2012.11. [Epub ahead of print] 2012 Jan 17.
- 9) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant*. 2012 Jun 16(4):340-5, 2012 Mar 8. [Epub ahead of print]
- 10) Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda T. Unrelated cord blood transplantation vs related transplanatation with HLA-1 antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia* 2012 Jul18. doi:10.1038/leu.2012.203. [Epub ahead of print]
- 11) Yabe M, Masukawa A, Kato S, Yabe H, Nakamura N, Matsushita H. Systemic mastocytosis associated with t(8:21) acute myeloid leukemia in a child: Detection of the D816 mutation of KIT. *Pediatr Blood Cancer*, 2012 Jul 27. Doi.10.1002/pbc24250 [Epub ahead of print]
- 12) Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuichi K, Nakashioya C, Yoshiba F, Fukui T, Ito R, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF mobilized peripheral blood CD34(+) cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcer. *Cell Transplant*. 2012 Oct 25. doi:10.3727/096368912X658007. [Epub ahead of print]
- 13) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K,

Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab.* 2012 Nov;107(3):513-20. doi:10.1016/j.ymgme.2012.09.004. Epub 2012 Sep 7.

14) Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S, Alini M, Risbud MV, Chan D, Cheah KS, Yamamura K, Masuda K, Okano H, Ando K, Mochida J. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Commun.* 2012 Dec 11;3:1264. doi: 10.1038/ncomms2226.

2. 論文発表（研究分担者：小林広幸）

1) O'Donoghue ML, Bhatt DL, Flather MD, Goto S, Angiolillo DJ, Goodman SG, Zeymer U, Aylward PE, Montalescot G, Ziecina R, Kobayashi H, Ren F, Wiviott SD. Atopaxar and its effects on markers of platelet activation and inflammation: results from the LANCELOT CAD program. *J Thromb Thrombolysis.* 34 (1):36-43, 2012.

2) Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama

Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, Mimura T. Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 23(2):269-75, 2013

3) Moriya Y, Mizuma A, Uesugi T, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W, Kobayashi H, Kawada H, Ando K, Takagi S, Takizawa S. Phase I Study of Intravenous Low-dose Granulocyte Colony-stimulating Factor in Acute and Subacute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012 Sep 6. [Epub ahead of print]

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

Array Comparative Genomic Hybridization 及び G バンド分染法を用いた同種軟骨細胞の安全性評価

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
	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
	伊東 紀子	株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部
	的場 亮	株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長

研究要旨：変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。自己細胞による細胞シート移植においては、変形性膝関節症が既に存在する組織の細胞を使用する場合が多く、同種移植には細胞ソースの検討及び aCGH に追加して核型解析による安全性試験を行う必要があると考えられ、そのため本研究を行った。

我々が同種細胞移植として検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症由来軟骨細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する際の安全性の評価としては、培養中に生じた変化の検知と、細胞ソース由来の遺伝子異常を考慮する必要があり、それらの評価には aCGH 及び G バンド分析法がそれぞれ適していると考えられ、これらを同種軟骨細胞移植の安全性評価として併用することの意義は大きい。

A. 研究目的

これまで我々は、温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により、積層化軟骨細胞シートを作製し、その修復再生効果を確認し、現在当該シートの修復再生効果及び、安全性を確認している。しかし術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しく、軟骨細胞シート作製に要する時間と増殖能との関係からも軟骨細胞シートの普及のためには同種細胞を用いた同種軟骨細胞シート移植が欠かせないと考えられる。また自己細胞による細胞シート移植においては、変形

性関節症（以下、OA と示す。）が既に存在する細胞を使用する場合が多く、同種移植には細胞ソースの検討及び aCGH に追加して核型解析による安全性試験を行う必要があると考えられる。

このため同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。国立成育医療研究センター研究所から譲渡頂いた多指症の軟骨細胞は優れた増殖性を持ち、かつ手術時に廃棄する組織であることから、採取にあたり、低侵襲でレシピエントにとって負担がかからないという特徴がある。

このように有用な細胞ソースとして期待

される、多指症検体の安全性を確認するために検討を行ったのでそれを報告する。

B. 研究方法

多指症軟骨細胞について

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究名「同種細胞シートによる関節治療を目指した研究」）により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡された多指症由来軟骨細胞を用いて本研究を実施した。

手術時に廃棄される多指症検体から軟骨組織を分離し、細切後培養皿上に増殖した細胞を酵素処理により回収した細胞を多指症軟骨細胞としてaCGH解析及びGバンド分染法に供した。

今回、同種移植の安全性の確認として、8例のサンプル（表1. 平均年齢1歳1か月）を使用し評価した。

No.	gender	age
1	M	11m
2	M	1y 3m
3	F	11m
4	F	1y 2m
5	F	11m
6	M	1y 1m
7	F	11m
8	F	1y 3m

表1. 平均1y1m(y: year m: month)

軟骨細胞の分離と培養

成育医療研究センター研究所から譲渡された多指症軟骨細胞は、東海大学にて 0.5×10^4 cells/cm²で播種、DMEM/F12

supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Corp. Japan)の培地を使用し培養した。全ての培養は37度、5% CO₂、95% O₂の条件下で行った。

aCGHには培養細胞から抽出した第2継代目、第4継代目、第6継代目、第12継代目（以下、P2、P4、P6、P12と示す。）の培養細胞から抽出したゲノムDNA、Gバンド分染法にはP1（以下P1と示す。）P6、P12の培養細胞を用いた。

aCGH（Array Comparative Genomic Hybridization）解析

aCGHは、特に遺伝子異常の集積の結果として起こる癌の検出に利用されている解析手法である。自己軟骨細胞シート移植における培養軟骨細胞の安全性試験として、ReferenceをテストサンプルのP2のDNAとすることで培養中に生じる変化を検知する手法を確立してきた。本研究でも同様に多指症軟骨細胞を細胞シート作製の為に培養を行う為、当該解析方法により培養中に生じる変化を検討する。

今回我々が用いたaCGHの最大の特徴としては、コピー数の変化を全ゲノム領域にわたり高解像に検出できることである。またFISHや核型分析では発見することが困難な微細な異常を検出することが可能であり、これまでにない網羅性で全ゲノム領域を解析することができる。

さらに結果の解釈が比較的容易であり、ソフトウェア上で変異の有無を自動化できるため、熟練した技術者でなくとも、安定した結果が得られ、解析に要する DNA は 250ng 程度と少量である。

今回我々は Moving Average 10pt 、 Aberration Defection Method-2 、 Threshold 10 の条件で評価し、コピー数の異常が生じないことの確認とともに、moving average の基線からのずれとして可視的に評価した。

G バンド分染色法

G バンド分染色法は分裂中期(metaphase)の細胞を用いて、各染色体の同定、異常の解析を行う為にタンパク分解酵素とギムザ染色液を使用してバンドを表出する方法である。標本は半永久的保存となり最も普及している染色体の検査方法である。

同種移植を見据えた細胞ソースの安全性を確認することが目的であるため、P1 の細胞の核型を確認し、よりオリジナルに近い確認ができていると考えられる。

また、実際に移植に使用する細胞は今回確認している P6 や P12 より以前になると考えられるが、過継代の G バンド分染色法の実施により担保できると示唆される。

C. 結果

aCGH

多指症軟骨細胞は、8 例とも P4、P6、P12 の全サンプルにおいて、P2 との差異を表す基線からのずれは検出されず、継代による

明らかなコピー数の異常は認められなかった(図 1-A、図 2-A、図 3-A)。また、Reference と test サンプルを逆にすることで(Dye swap) aberration が検出された場合に擬陽性の排除ができるのだが、全ての Dye swap の結果においても継代による明らかなコピー数の異常は認められなかった(図 1-B、図 2-B、図 3-B)。

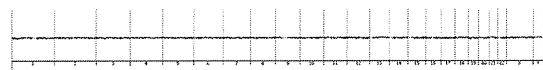


図 1-A

Reference sample: P2, test sample: P4

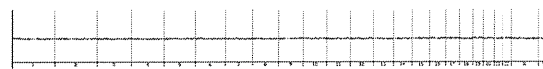


図 1-B

Reference sample: P4, test sample: P2

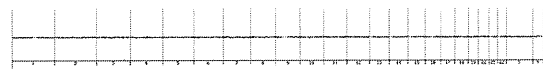


図 2-A

Reference sample: P2, test sample: P6

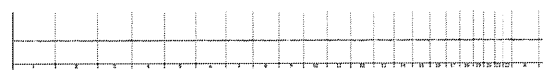


図 2-B

Reference sample: P6, test sample: P2

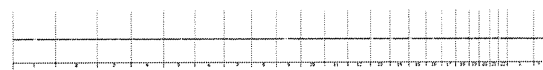


図 3-A

Reference sample: P2, test sample: P12

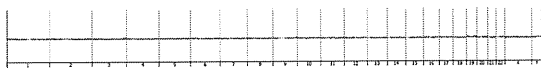


図 3-B

Reference sample: P12, test sample: P2

G バンド分染法

8 例中 1 例の P6 のサンプルにおいて 20 細胞中 1 細胞に核型異常が検出された。その他 7 例のサンプルの P1、P6、P12 及び、前述の核型異常が検出された同サンプルの P1、P12 においてはすべて正常核型（図 4）であった（表 2）。

No.	継代数		
	P1	P6	P12
1	正常核型	正常核型[19] 核型異常[1]	正常核型
2	正常核型	正常核型	正常核型
3	正常核型	正常核型	正常核型
4	正常核型	正常核型	正常核型
5	正常核型	正常核型	正常核型
6	正常核型	正常核型	正常核型
7	正常核型	正常核型	正常核型
8	正常核型	正常核型	正常核型

表 2. G バンド分染法結果

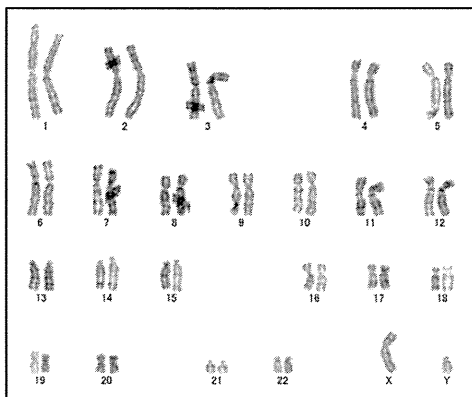


図 4. 正常核型

D. 考察

G バンド分染法で P6 において 20 細胞中 1 細胞に核型異常が検出されたが、ISCN のガイドラインでは同じ異常を持つ少なくとも 2 つ以上の細胞をクローンと解されることから、将来生体内で自然淘汰される可能性が高く、特に問題視する必要はないものと考えられるが、同様のサンプルを aCGH で解析しても aberration は検出されなかった。

これは G バンド分染法では一定個数の細胞（本解析では 20 細胞）をサンプリングして、染色体異常を確認できるのに対し、aCGH はゲノムワイドで変異を確認するという違いから生じていると示唆される。

つまり、G バンドでは割合以上で染色体異常となっていなければ、検知できず、aCGH は染色体異常を検知するためにもある一定以上の割合で染色体異常となっていなければ検出できない。また我々が用いている解析手法では、aCGH の Reference を test サンプルの P2 としている為、その変化が培養により増加しないもの場合、また染色体の異常が転座等である場合には検出は不可能である。

しかし、微細な遺伝子異常の検出は G バンド分染法では検出できないのに対して、aCGH は非常に優れている。

このため、G バンドで細胞ソース由来の異常を検出し、aCGH で培養中に生じる変化を捉えることで、我々が目的としている、移植に供する細胞が目的外の変化がないことを確認することが可能であると示唆され

る。

E. 結論

我々が同種細胞移植として検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。

この多指症由来軟骨細胞を同種細胞移植として検討する際の安全性の評価は、培養中に生じた変化の検知と、細胞ソース由来の遺伝子異常を考慮する必要があり、それらの評価にはaCGH及びGバンド分析法がそれぞれ適していると考えられる。これらを、同種軟骨細胞移植の安全性評価として併用することの意義は大きい。

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. 著書

なし

2. 論文発表

1) Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res* 30(12), 1915-1922, 2012.

2) Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular

identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 8:3(2):8, 2012.

3) Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. Feeder-Free and Serum-Free Production of Hepatocytes, Cholangiocytes, and Their Proliferating Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells: Application to Liver-Specific Functional and Cytotoxic Assays. *Cell Reprogram* 14: 171-185, 2012.

4) 阿久津英憲, 梅澤明弘. 「クローン技術を応用するヒトES細胞の可能性」母子保健情報 66:80-84, 2012.

5) 阿久津英憲, 川田治良, 藤井輝夫. 「多能性幹細胞とマイクロデバイスのインテグレーション・アプリケーションの可能性」バイオマテリアル・生体材料・30(4), 242-244, 2012.

6) 阿久津英憲, 福田篤, Dieter Egli. 「クローン胚からのES細胞作製」実験医学 30(10), 1621-1625, 2012.

7) 阿久津英憲, 福田篤. 「生殖細胞の分化誘導」*Medical Science Digest* 38(6), 253-256, 2012.

3. 学会発表

1) Akutsu H. (シンポジウム) “Human ES cells: acquired pluripotency from blastocysts”, 4th Congress of the Asia

Pacific Initiative on Reproduction, Osaka,
Aug 31, 2012.

2) Akutsu H. (招待講演) “iPSCs for regenerative medicine”, International Conference on "Stem Cell and Regenerative Medicine: Research to Business", Hyderabad, India, Mar 24, 2012.

3) 阿久津英憲. (シンポジウム) 「ヒト ES 細胞～小児難治疾患へ挑む～」第 48 回大会日本小児循環器学会総会・学術集会, 京都, 2012.07.

4) 阿久津英憲. (シンポジウム) 「ゼノフリーヒト ES/iPS 細胞の培養システムの確立」日本組織培養学会第 85 回大会, 京都大学百周年記念ホール, 2012.05.

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

同種細胞シートの保存法に関する研究

研究分担者 長嶋 比呂志 明治大学農学部生命学科発生工学研究室・教授

研究協力者 前原 美樹 明治大学農学部生命学科発生工学研究室・研究アシスタント

研究要旨：ヒト軟骨細胞シートの凍結保存法の確立を最終目的として、ウサギおよびブタ軟骨細胞シートを用いてガラス化凍結保存法を開発した。これまでに、哺乳動物胚・卵子に有効なガラス化法のコンセプトが細胞シートの保存に適用し得ることを示してきた。すなわち、保存液の容量を最小化する最小容量冷却(Minimum Volume Cooling : MVC)法のコンセプトに基づいて細胞シートをガラス化することによって、シート構造を破損することなく、高い細胞生存性を保った状態での超低温保存が可能であることを明らかにしてきた(coating 法)。我々が開発した coating 法を、さらに実用的技術として発展させるために、パッケージに収容する方法(envelop 法)も開発した。本年度の研究から、これらの方法の再現性が確認されるとともに、envelop 法では細胞生存性が有意に低下するという課題も顕在化した。一方で、ガラス化されたウサギ軟骨細胞シートは、細胞外マトリックス(ECM)の主要成分であるタイプ II コラーゲンとプロテオグリカンを正常に維持していることが確認された。また、本研究で開発したガラス化法が、より脆弱なブタ軟骨細胞シートにも適用可能であることや、凍害保護剤として細胞毒性の高い DMSO を除外できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト軟骨細胞シートの実用的凍結保存法の開発を目的とした。本年度は、これまでに開発した coating 法および envelop 法の効果の検証と適用拡大を目的として以下の実験を行った。(1) ウサギ軟骨細胞シートのガラス化におけるシート構造の破損の発生と生存性を指標として、我々が開発した方法の再現性を検証した。(2) ガラス化・融解されたウサギ軟骨シートの正常性の指標として、ECM の主成分であるタイプ II コラーゲンとプロテオグリカンの維持を確認した。(3) 開発したガラス化法が、ウサギ軟骨細胞シートより脆弱なブタ軟骨細胞シートへも適用可能か否かを検証した。(4) ガラス化液に含まれる細胞浸透性凍害保護剤として、細胞毒性の高い DMSO を除外することが可能か否かを検証した。

B. 研究方法

1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞 (株式会社プライマリーセル) を温度応答性培養皿 (35 mm, UpCell®, CellSeed) に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/dish の濃度で播種し、10% FBS を添加した RPMI-1640 培地 (株式会社プライマリーセル) で培養した。培養 3-4 日目に細胞がコンフルエントに達したことを確認して、100 μ M のアスコルビン酸を添加した培地に置き換えた。培養 14 日目に薄層 (1 層) 形成を確認し、Cell shifter (CellSeed) を用いて 3 層に積層化した後、更に 1 週間追加培養した。

2. ブタ軟骨細胞の樹立および培養

10 週齢の仔ブタ (体重 15kg 前後) の膝関節より、軟骨組織 (厚さ 1-2mm のス