

ライス小片)を約 3g 採取し、軟骨以外の組織や血管を除去して PBS (-)で洗浄した。得られた軟骨組織を 3-5mm の大きさに細切り、5mg/ml Collagenase TypeII (GIBCO)でタンパク質分解を行った。酵素反応は、スターラーで攪拌しながら 37°C、5% CO₂ 気相下で行った。約 4 時間の酵素処理後、Cell strainer (pore size:100µm, BD Falcon™, BD Biosciences)を用いて不溶残渣を除いた。遠心処理により細胞を回収し、DMEM/F12 培地へ細胞を再懸濁して、35mm の UpCell® に 3×10⁵ ~ 5×10⁵ cells/dish の濃度で播種した。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、560µM のアスコルビン酸を添加した培地で置換した。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、さらに 1 週間追加培養を行った。

3. 細胞シートの凍結保存

これまでに開発したガラス化法を用いた。これは、胚や卵子のガラス化に用いられる MVC 法 (Kuwayama et al.,2005) のコンセプトを、細胞シートに適用したものである (図 1)。

細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には 10% DMSO および 10% ethylene glycol (EG)を用いた。ガラス化液の DMSO および EG 濃度は、それぞれ 20%とした。細胞非浸透性凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5M sucrose および 10%(w/v) カルボキシル化ポリリジン(COOH-PLL)を加えた。

また、細胞浸透性凍害保護剤として、細胞毒性の高い DMSO を除外できるか否かの検討を行った。平衡液およびガラス化液が含む細胞浸透性凍害保護剤を EG のみとし、それぞれの濃度は 20%および 40%の濃度とした。

前年度までに確立した coating 法、envelop 法および dish 法の再現性を確認し、非ガラス化試料との比較を行った。

4. ガラス化後の細胞シートの質的評価 (ECM の解析)

前年度までの研究で、ガラス化後の細胞シートの微細構造には異常が見られないことを、電子顕微鏡観察 (SEM)によって示した。今年度は coating 法 (COOH-PLL 存在下) および envelop 法 (COOH-PLL 存在下) によりガラス化された細胞シートの ECM の維持に注目し、アグリカンの組織化学染色およびタイプ II コラーゲンの免疫組織化学染色を行った。

融解後の積層化細胞シートを、4% paraformaldehyde (PFA) 液で固定し、パラフィン包埋した。薄切後、脱パラフィンおよび再水和を行い、0.1% サフラニン-O 溶液でアグリカンを染色した。また、タイプ II コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行った。免疫染色では、1 次抗体にヒトタイプ II コラーゲン抗体を、2 次抗体に EnVision + Mouse/HRP を用いた。検出は、Diaminobenzidine を用いた発色により行った。

C. 結果

1. ウサギ軟骨細胞シートガラス化技術の再現性の確認

coating 法を用いて、10 枚の細胞シートを 10% COOH-PLL 存在下でガラス化した結果、全てのシート (100%) が破断なく回収された。一方、COOH-PLL 非存在下に coating 法により 8 枚のシートをガラス化した結果、破断なく回収されたものは 1 例のみ (12.5%)であった。

envelop 法を用いて 7 枚の細胞シートをガラス化・融解した結果、シート構造の破断の発生は見られなかった。しかし、細胞の生存率 (86.8%)は、COOH-PLL 存在下の coating 法 (92.1%)および非ガラス化対照区 (94.6%) に比して有意に低かった ($P<0.05$)。

dish 法においても、ガラス化に伴うシートの破断は生じなかった (0/7)が、細胞の生存率は 77.6%であり、他の実験区に比して有意に低かった ($P<0.05$)。

2. ガラス化後の細胞シートの質的評価 (ECM の解析)

coating 法 (図 2C)、envelop 法 (図 2E) によりガラス化された試料では、非ガラス化対照区 (図 2A) と同様に、サフラニン-O による濃染が認められた。このことからガラス化された細胞シート全体に、プロテオグリカンが豊富かつ均等に分布していることが明らかになった。

免疫染色では、coating 法 (図 2D) および envelop 法 (図 2F) によるガラス化

試料で、非ガラス化対照区と同様に豊富なタイプ II コラーゲンの存在が認められた (図 2B)。以上から、coating 法、envelop 法のいずれにおいても、ガラス化・融解後の細胞シートの ECM が正常に維持されていることが確認された。

3. coating 法によりガラス化されたブタ軟骨細胞シートの融解後の形態と細胞生存性

ウサギ軟骨細胞シートのガラス化凍結において有効性が示された coating 法が、ブタ軟骨細胞シートにも適用しうるかを検証した。表 2 および図 3 に示す通り、coating 法を用いてガラス化した合計 3 例のシート全てが損傷なく融解後に回収された。これら細胞シートを構成している細胞の生存性は、非ガラス化対照区と同等であった (92.2% vs 93.1%)。

4. 積層化ウサギ軟骨細胞シートのガラス化に対する CPA の予備的検討

DMSO 不含 (EG のみ) のガラス化液を用いて、coating 法を実施した。細胞シートの融解後の形態維持に対する効果は、EG 及び DMSO の両者を用いた場合と同等であった (表 3, 図 4)。

D. 考察

本年度の研究結果より、ウサギ軟骨細胞シートのガラス化における coating 法及び envelop 法の再現性が確認された。またガラス化融解後の細胞シートの ECM 成分が、正常に維持されていることも明らかとなっ

た。以上から、MVC コンセプトに基づく我々の方法は、細胞シートのガラス化保存法として有効であると考えられる。

将来の臨床応用を想定すると、細胞シートを衛生的で安定な容器に収容した状態で凍結保存する方法が不可欠である。本研究で試みた envelop 法では、ガラス化は成立するが(シートの破損は起こらない)、細胞の生存性が coating 法と比べて劣る結果であった。シートをラップフィルムで被覆したことによる温度下降・上昇速度の低下が、細胞生存性に影響を及ぼしていると考えられる。細胞シートを衛生的に保存するために十分な強度を持ち、かつ熱伝導性に優れたシート素材の検討が必要であろう。また、細胞シートをより安定的にガラス化保存するための装置など、実用的なガラス化システムの開発も今後の課題である。

本年度の研究では、ウサギ軟骨シートより脆弱なブタ軟骨細胞シートのガラス化も試みた。その結果、ウサギ軟骨細胞シートと同様にガラス化の成功例が得られたことから、我々が開発した coating 法は、より脆弱な細胞シートへも適用し得る可能性が示された。

ガラス化液の検討では、浸透性凍害保護剤として EG 単独でも安定的にガラス化状態が成立することが確認された。今後の臨床応用において、細胞毒性の高い DMSO を除外し得る可能性が示唆された。今後は EG 単独の際の、細胞の生存性についても検証する必要がある。

E. 結論

- 1) これまでに開発した coating 法及び envelop 法により、ウサギ軟骨細胞シートを再現性高くガラス化し得ることが検証された。また、ガラス化後の細胞シートは、正常な ECM を維持している。
- 2) MVC コンセプトに基づく coating 法は、ウサギ軟骨細胞シートよりも脆弱なブタ軟骨細胞シートにも有効であることから、より広い範囲へ応用が可能と思われる。
- 3) 細胞浸透性凍害保護剤として EG を単独で使用した場合にも、EG/DMSO 併用の場合と同等の安定性でガラス化状態が成立する。

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

<原著論文>

- 1) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Kuramoto M, Arai Y, Umeyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0061900. 2013.
- 2) Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka C, Takama Y, Ueno T,

- Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S. A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. *Transplantation Proceedings*, 44(4):1136-1138, DOI:10.1016/j.transproceed.2012.01.092. 2012.
- 3) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg L.A., Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4557-62. DOI:1222902110 [pii]10.1073/pnas.1222902110. 2013.
- 4) Fujishiro S.H, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 22:473-82. DOI: 10.1089/scd.2012.0173. 2013.
- 5) Klymiuk N, van Buerck L, Bahr A, Offers M, Kessler B, Wuensch A, Kurome M, Thormann M, Lochner K, Nagashima H, Herbach N, Wanke R, Seissler J, Wolf E. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* 61:1527-32. DOI: db11-1325 [pii]10.2337/db11-1325. 2012.
- 6) Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Teratani T, Gheisari Y, Tsuji O, Okano H, Utsunomiya Y, Hosoya T, Okano H.J, Nagashima H, Kobayashi E. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 30:1228-35. DOI:10.1002/stem.1101. 2012.
- 7) Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Inuinaka C, Takeishi S, Kondo A, Okitsu T, Nagashima H, Fukuzawa M, Miyagawa S. A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters using a lectin microarray. *Transplant Proc*44:1134-5. DOI:S0041-1345(12)00239-4 [pii]10.1016/j.transproceed. 2012.03.019. (2012)
- 8) Richter A, Kurome M, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Nagashima H, Wolf E, Wuensch A. Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol* 12:84. DOI: 1472-6750-12-84 [pii]10.1186/1472-6750-12-84. 2012.
- 9) Konishi T, Takahashi S, Zhuang Z, Nagata K, Mizumoto M, Honda M, Takeuchi Y, Matsunari H, Nagashima H,

- Aizawa M. Biodegradable β -Tricalcium Phosphate Cement with Anti-washout Property Based on Chelate-setting Mechanism of Inositol Phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, DOI:10.1007/s10856-013-4903-8. 2013.
- 10) Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, Zhao J, Wells KD, Critser JK, Riley LK, Prather RS. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Medical Genomics*, 5(55), 2012.
- 11) Renner S, Braun C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Bahr A, Klymiuk N, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E. Permanent Neonatal Diabetes in INSC94Y Transgenic Pigs. *Diabetes*, DOI:db12-1065 [pii] 10.2337/db12-1065, 2012.
- 12) Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H. Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *Journal of Reproduction and Development*, 58:599-608, 2012.
- 13) Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi H, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H. Hollow Fiber Vitrification Provides a Novel Method for Cryopreserving In Vitro Maturation/Fertilization-Derived Porcine Embryos. *Biology of Reproduction*, DOI: biolreprod.112.100339, 2012.
- 14) Teratani T, Matsunari H, Kasahara N, Nagashima H, Kawarasaki T, Kobayashi E. Islets from rats and pigs transgenic for photogenic proteins. *Current Diabetes Reviews*, 8:382-389, CDR-EPUB-20120514-20 [pii], 2012.
- 15) Miyagawa S, Maeda A, Takeishi S, Ueno T, Usui N, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H. A Lectin array analysis for wild-type and α -Gal-knockout pig islets, compared with humans. *Surgery Today* 2012, in press.
- <総説>
- 1) Men H, Walters EM, Nagashima H, Prather RS. Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. *Theriogenology*, 78:1720-1729, DOI: S0093-691X(12)00330-5 [pii] 10.1016/j.theriogenology. 2012.06.003, 2012.

2) Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M. Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(suppl.4):120-126, DOI:10.1111/j.1439-0531.2012.02065.x, 2012.

2. 学会発表

<招待講演・海外>

1) Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M. Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 29-2 Jul-Aug 2012.

<招待講演・国内>

- 1) 長嶋比呂志. 再生医学における凍結保存の役割：ブタ胎仔臓器原基のガラス化保存について. 第39回日本低温医学会総会, 東京, 21-22 Nov 2012.
- 2) 長嶋比呂志. クローンブタ・遺伝子改変ブタのトランスレーショナルリサーチへの利用. 第1回川島腎カンファレンス, 岐阜, 10-11 Nov 2012.
- 3) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹. 再生医療研究のための大型動物モデルの開発. 第12回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 22-24 Jun 2012.
- 4) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 松

本啓, 横手伸也, 岩井聡美, J.A.Medin, 渡邊将人, 梅山一大, 中野和明, 金井貴博, 小林英司. Yamaton K-2計画: 完全ヒト化腎臓作製に向けて. 自治医大ピッグシンポジウム, 東京, 11 Jun 2012.

5) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司, 中内啓光. 臓器再生研究へのクローンブタの利用. 第55回日本腎臓学会, 横浜, 1-3 Jun 2012.

<国際学会>

- 1) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Umeyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Production of chimeric porcine fetuses by aggregation method using parthenogenetic embryos. 39th Annual Conference of the IETS, Hannover, Germany, 19-22 Jan 2013.
- 2) Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H. A hollow fiber vitrification method enables cryobanking of IVM/IVF-derived transgenic pig embryos. 39th Annual Conference of the IETS, Hannover, Germany, 19-22 Jan 2013.
- 3) Honda K, Takeuchi H, Matsuda T, Kanai T, Kuramoto M, Maehara M,

- Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H. Production of genetically modified pigs by artificial reproductive technologies using frozen epididymal sperm. 39th Annual Conference of the IETS, Hannover, Germany, 19-22 Jan 2013.
- 4) Kanai T, Matsunari H, Takeuchi Y, Honda K, Maehara M, Nakano K, Takayanagi S, Watanabe M, Umeyama K, Tada N, Onodera M, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Transmission and expression of a retrovirally introduced red fluorescent protein gene in successive generations of transgenic pigs. 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 29 Jul- 2 Aug 2012.
- 5) Kanai T, Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Oota H, Takahashi M, Nagashima H. Hollow fiber vitrification(HFV) method enables cryopreservation of cryosensitive porcine embryos. In: 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 29 Jul- 2 Aug 2012.
- 6) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Nakazawa A, Kasahara M, Uemoto S, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H. Transgenic Pig Expressing Red Fluorescent Protein, Kusabila-Orange as a Novel Tool for Preclinical Research of Hepatocyte Transplantation. 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.
- 7) Baehr A, Wuensch A, Burck L, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Seissler J, Klymiuk N, Wolf E. Beta-Cell Specific Expression of LEA29Y Prevents Cellular Rejection in Islet Xenotransplantation. 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.
- 8) Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K. Attenuation of Hyperacute Dysfunction and Coagulopathy in GalT-KO Pulmonary Xenotransplantation In: 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.
- 9) Renner S, Braun C, Blutke A, Herbach N, Wuensch A, Kessler B, Kurome M, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E. Phenotypic Characterization of Diabetic INSC94Y Transgenic Pigs. 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.
- 10) Wuensch A, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E. Expression of Human

Thrombomodulin on the Endothelium of Pig Xenograft Donors. 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.

11) Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondo A, Nagashima H, Miyagawa S. Adult Pig Islets, Rich in the High-Mannose Form Compared with Humans, Were Slightly Up-Regulated, and Alpha-Linked GalNAc Was Reduced by Gal-Knockout. 24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin, Germany, 15-19 Jul 2012.

12) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Arai Y, Umeyama K, Fujishiro S, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Development of a feasible verification system for pluripotent stem cells using porcine Parthenogenetic embryos. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, 13-16 Jun 2012.

13) Fujishiro S, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Matsunari H, Arai Y, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Furukawa Y, Umeyama K, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of naïve porcine induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting,

Yokohama, 13-16 Jun 2012.

14) Takeuchi H, Enomoto H, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y. Genetically engineered and systemically expressing kusabira-orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. Orthopaedic Research Society, San Francisco, USA, 4-7 Feb 2012.

15) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Shiota A, Enosawa S, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Transgenic pigs with pancreas and liver specific expression of fluorescent proteins. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting Yokohama, Japan, 13-16 Jun 2012.

<国内学会>

1) 渚 佐, 笹山典久, 白数昭雄, 太田久由, 長嶋比呂志, 川原学, 高橋昌志. 中空糸によるマウス胚盤胞期胚のガラス化凍結保存. 北海道畜産草地学会第1回大会, 北海道, 15-16 Dec 2012.

2) 宮川周士, 前田晃, 王丹丹, 上野豪久, 臼井規朗, 興津輝, 後藤昌史, 松本慎一, 長嶋比呂志. 豚島の糖鎖構造についての検討. 第15回日本異種移植研究会, 京都, 8 Dec 2012.

3) 松成ひとみ, 金井貴博, 坂井理恵子, 中野和明, 渡邊將人, 梅山一大, 高柳就子,

小林俊寛, 山口智之, 塩田明, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志. 膝・肝二色蛍光発現するトランスジェニックブタの開発. 第105回日本繁殖生物学会大会, つくば, 5-8 Sep 2012.

4) 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 松田泰輔, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 金井貴博, 新井良和, 梅山一大, 藤城修平, 水上義久, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志. ブタ単為発生胚を用いた凝集キメラ作出法. 第105回日本繁殖生物学会大会, つくば, 5-8 Sep 2012.

5) 渡邊将人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 中野和明, 前原美樹, 金井貴博, 松村幸奈, 林田豪太, 倉本桃子, 坂井理恵子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. 遠赤色蛍光蛋白 monomeric Plum を発現するトランスジェニックブタの作出. 第105回日本繁殖生物学会大会, つくば, 5-8 Sep 2012.

6) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹. 再生医療研究のための大型動物モデルの開発. 第12回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 22-24 Jun 2012.

7) 前原美樹, 松成ひとみ, 金井貴博, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 佐藤正人, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートの新規ガラス化保存法の開発. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 12-14 Jun 2012.

8) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司, 中内啓光. 臓器再生研究へのクローンブタの利用. 第55回日本腎

臓学会学術総会, 横浜, 1-3 Jun 2012.

9) 梅山一大, 渡邊将人, 本田香澄, 竹内靖浩, 中野和明, 松成ひとみ, 横尾隆, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. 糖尿病発症遺伝子改変ブタによる Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)病変の作出. 第59回日本実験動物学会総会, 別府, 24-26 May 2012.

10) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹. 遺伝子改変ブタ・クローンブタのトランスレーショナルリサーチへの応用. JALAM (日本実験動物医学会), 別府, 23 May 2012.

11) 相澤守, 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり, 神澤信行, 長嶋比呂志, 石井賢, 戸山芳昭, 松本守雄. 多機能性キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの開発. 第85回日本整形外科学会学術総会, 京都, 17-20 May 2012.

3. 受賞

1) 渡邊将人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 中野和明, 前原美樹, 金井貴博, 松村幸奈, 林田豪太, 倉本桃子, 坂井理恵子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. 【優秀発表賞】遠赤色蛍光蛋白 monomeric Plum を発現するトランスジェニックブタの作出. 第105回日本繁殖生物学会大会, つくば, 5-8 Sep 2012.

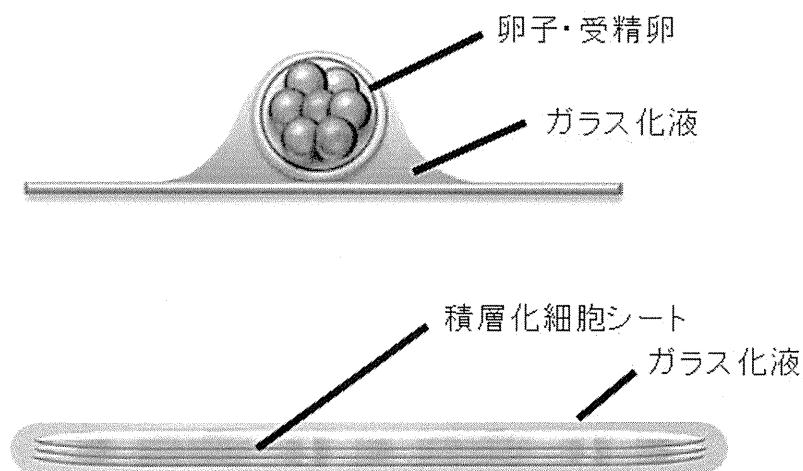


図 1. 卵子及び受精卵または細胞シートにおける MVC コンセプトの応用

表 1. 積層化ウサギ軟骨細胞シートのガラス化後の形態および細胞生存性

ガラス化法	ガラス化液への COOH-PLL の有無	無傷で回収された シートの枚数 /供試枚数 (%)	平均 細胞生存率 (mean ± SEM)
非ガラス化		8/8 (100)	94.6±0.5 ^a
coating 法	+	10/10 (100)	92.1±0.9 ^a
	-	1/8 (12.5)	91.9±0.7 ^a
envelop 法	+	7/7 (100)	86.8±0.7 ^b
dish 法	+	7/7 (100)	77.6±3.15 ^c

^{a-c} 同列内異符号間で有意差あり (p<0.05)

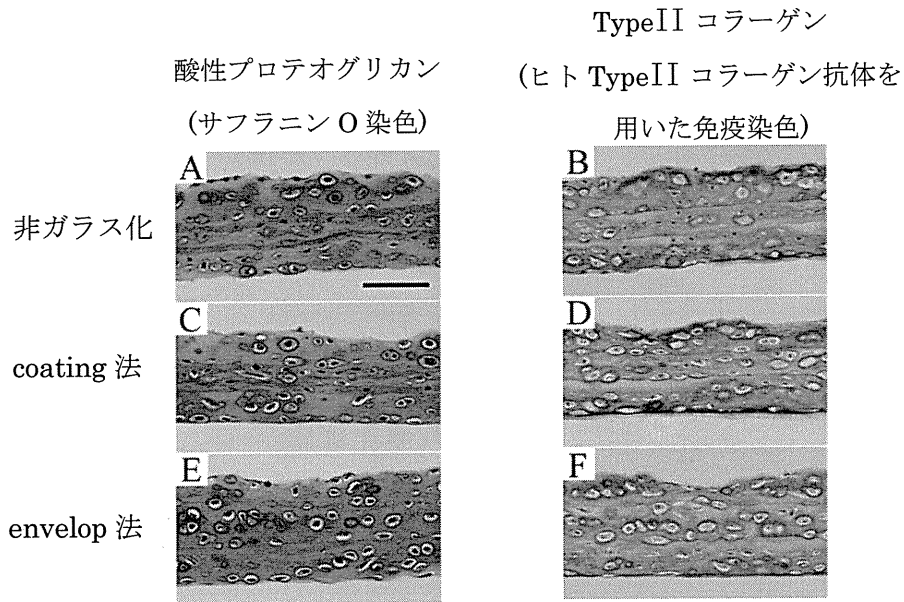


図 2. 積層化ウサギ軟骨細胞シートの組織学および免疫染色結果
 (スケールバー=100 μm)

表 2. ガラス化後のブタ軟骨細胞シートの生存性評価

実験区	無傷で回収された シートの枚数 /供試枚数 (%)	平均細胞生存率 (%)
非ガラス化	3/3(100.0)	93.1
coating 法	3/3(100.0)	92.2

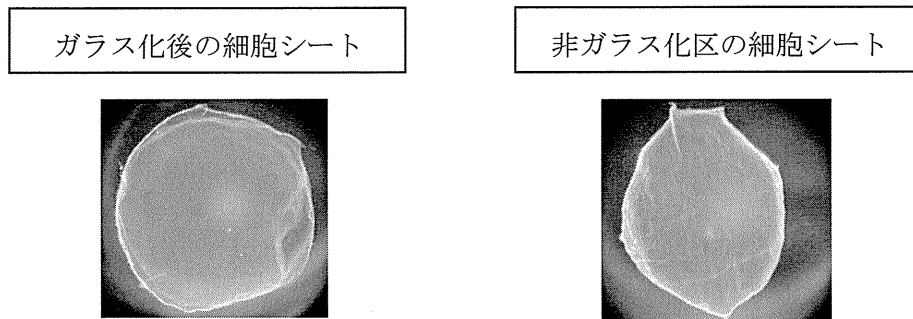


図 3. ガラス化後のブタ軟骨細胞シートの形態 (実体顕微鏡による観察)

表 3. 積層化ウサギ軟骨細胞シートのガラス化に対する CPA の予備的検討

実験区	供試枚数	回収されたシートの状態(枚)	
		破損無し または軽微な亀裂	破損
EG	4	3	1
DMSO+EG	4	3	1

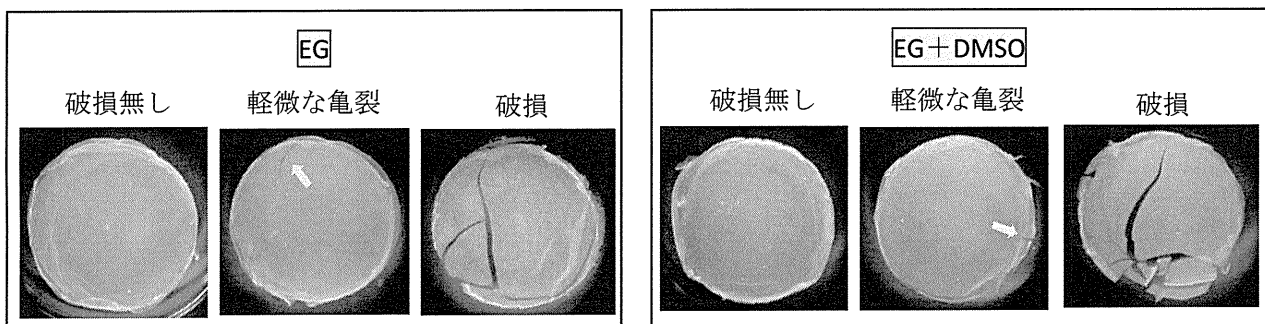


図 4. DMSO 不含ガラス化液でガラス化された細胞シートの融解後の形態

積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響

研究分担者 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官
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 河毛 知子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員

研究要旨：すでに動物実験で自己積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生の有効性が示され、ヒト幹細胞臨床研究が東海大学で実施されている。本研究では、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種積層化軟骨細胞シートが免疫系に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、同種積層化軟骨細胞シートは免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを認めた。さらにこの抑制効果の一部分に TGF- β が関与していることが示唆された。これらのことより、関節軟骨損傷の治療には、自己だけでなく同種積層化軟骨細胞シートを使用出来る可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節軟骨再生修復を目指し、自己積層化軟骨細胞シートを用いた臨床研究がすでに、本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって進められてきているが、この技術を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。これまでの経験上、軟骨組織は免疫応答が低いと言われているが、実際に宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はない。そこで本研究では、*in vitro* において同種積層化軟骨細胞シートが免疫系にどのような影響を与えるかを検討することを目的とした。

これまでにマウス軟骨細胞を用いて、同種リンパ球の活性化に及ぼす影響を検討し、マウス軟骨細胞は同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、同種活性化リンパ球の増殖も抑制することを明らかにした。さらに、市販ヒト軟骨細胞およびその積層化シートがヒト T 細胞およびヒト T 細胞とヒト樹上細胞によるリンパ球混合培養にお

ける活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制することを示してきている。

今年度は、より臨床応用に近い状態での検討を目指し、実際に同種軟骨細胞シートの移植を行えるようになった場合と同様の手順に従って、採取、分離された軟骨細胞から作製されたシートが免疫調節効果を有しているかを検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒト膝関節軟骨細胞は、東海大学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと、東海大学病院で採取された 2 例 2 膝、23 歳男性 (23M) および 33 歳男性 (33M) の軟骨組織から分離された細胞を使用した。ヒト抹消血由来 CD4⁺T 細胞 (CD4⁺TC) および正常ヒト樹状細胞 (NHDC) は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入した。

2. 各種細胞の培養

全ての培養は 37°C, 5% CO₂ 下で行った。ヒト膝関節軟骨細胞は DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社), 4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakougyou 社) を加えたもので培養した。

NHDC は LGM-3TM (Lonza 社) にインターロイキン-4 (IL-4) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) をそれぞれ最終濃度 50 ng/ml になるように添加した培地に懸濁し、温度応答性培養皿である UpCell[®] に播種して 1~3 日培養した後、室温で 30 分以上放置して UpCell[®] から剥がし、必要数播種した。

CD4⁺TC は反応当日に細胞融解後、LGM-3TM に再懸濁して、必要数播種した。

3. 積層化軟骨細胞シートの作製

まず単層のシートを作製するため、Cell Seed 社の温度応答性インサート (4.2cm²) に軟骨細胞 (2.1 x 10⁵ cells) を播種し、ascorbic acid 入り培地で 2 週間培養した。細胞外マトリックスを十分に発現した状態の単層シートを 3 層重ねあわせ、さらに 7 日間同培地で培養し、積層化軟骨細胞シートを作製した。

4. 混合リンパ球培養反応 (MLR)

12 ウェルに NHDC (3.3 x 10⁵ cells) と CD4⁺TC (2.2 x 10⁶ cells) を播種し共培養した。

5. CD4⁺TC と積層化軟骨細胞シートとの共培養

積層化軟骨細胞シートを敷いた各ウェルに CD4⁺TC (2.2 x 10⁶ cells) を撒き、共培養した。

6. MLR と積層化軟骨細胞シートの共培養

積層化軟骨細胞シートを敷いた各ウェルに先述した条件の MLR を共培養した。

7. 細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-deoxyuridine 化学発光キット (Roche 社) を用いて測定した。培養 5 日目に各ウェルに BrdU を加え 6~8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BudU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。BrdU 取り込み量測定は、12 ウェル中の各反応系をそれぞれピペティングして浮遊させた T 細胞を回収し、96 ウェルへ移して行った。

8. TGF-β の測定

培養 3 日目の上清中の TGF-β の量は Quantikine[®] ELISA Human TGF-β1 (R&D System 社) を用いて測定した。

9. 倫理面への配慮

研究に用いたヒト膝関節軟骨細胞は、東海大学臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHDC および CD4⁺TC は LONZA 社より購入していることから、倫理面の問題は無いと考えられる。

C. 結果

1. 積層化軟骨細胞シートが同種 CD4⁺TC に及ぼす影響の検討

陽性コントロールである MLR の写真では T 細胞が活性化され芽球形成しているのに対して、CD4⁺TC と積層化軟骨細胞シートを共培養した写真では、ほとんど T 細胞の増殖がみられなかった。(図 1-1) 一方、細胞増殖解析では、MLR の T 細胞増殖活性を 100%とした場合、23M で 1%、33M で 1.2%の増殖活性しか観察されなかった。

(図 1-2)

2. 積層化軟骨細胞シートが MLR に及ぼす影響の検討

MLR の写真では T 細胞の芽球形成が観察されているのに対して、MLR と積層化軟骨細胞シートを共培養した写真では T 細胞の芽球形成像はほとんど観察されなかった。

(図 2-1) 一方、細胞増殖解析ではコントロールの MLR での T 細胞増殖活性を 100%とした場合、その増殖活性は 23M で 4.9%、33M で 8.9%になっていた。(図 2-2)

3. 培養上清中の TGF- β 量

これまでの研究において、セルカルチャーインサートを用いて活性化 T 細胞と市販軟骨細胞シートを物理的に分離して培養しても、その増殖活性を半減させたことから、抑制効果の一部には液性因子の関与が示唆されていた。(H23 年度 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究 積層

化軟骨細胞シートの免疫調節効果に関する研究の項参照) 一方、TGF- β は軟骨細胞分化に重要な役割を果たすだけでなく、間葉系幹細胞(MSC)の抑制効果に関与が示唆されている液性因子の一つであることから、培養上清中の TGF- β の量を測定した。

(図 3) その結果、23M および 33M 由来積層化軟骨細胞シートの細胞上清中で、2,500 pg/ml 前後と非常に高い TGF- β の発現がみられた。さらに CD4⁺TC と積層化軟骨細胞シートを共培養上清中では 1,500~2,500 pg/ml、MLR と積層化軟骨細胞シートを共培養上清中でも 1,000~1,500 pg/ml と高い値を維持していた。

D. 考察

本研究では、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種積層化軟骨細胞シートが免疫系に与える影響を *in vitro* で検討した。これまでの研究で、マウス軟骨細胞および市販正常ヒト軟骨細胞とその積層化シートが同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の細胞増殖も抑制することを明らかにしてきている。そこで今年度は、より臨床応用に近い状態での検討を目指し、対象を実際に同種軟骨細胞シートの移植を行えるようになった場合と同様の手順に従って、採取、分離された軟骨細胞から作製された積層化軟骨細胞シートとし、*in vitro* において同種 T 細胞に対して活性化抑制効果を有しているかを検討した。まず、CD4⁺TC に対する同種積層化軟骨細胞シートの影響をみたところ

ろ、陽性コントロールである MLR の T 細胞増殖活性に対して積層化軟骨細胞シートと共培養した T 細胞増殖活性は 1%前後と非常に低かった。(図 1) このことは積層化軟骨細胞シートが同種 T 細胞の活性化(細胞増殖)をほとんど誘発しないことを示唆している。一方、MSC は T 細胞を始めとして、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞を含む種々の免疫担当細胞の機能(活性化や分化など)を抑制するとの報告がある。もし積層化軟骨細胞シートが同様の性質を有していれば、損傷部位周辺の炎症反応を抑制できる可能性がある。そこで、まず積層化軟骨細胞シートが活性化 T 細胞に与える影響を検討したところ、積層化軟骨細胞シートが活性化 T 細胞の増殖を抑制できることが分かった。(図 2) さらに、TGF- β は軟骨細胞分化を促進するサイトカインであるが、一方で免疫担当細胞の増殖やその作用を抑制する働きも報告されている。また、MSC においても TGF- β が、その免疫調節効果に関与する液性因子の一つである報告があることから、培養上清中の TGF- β 量を測定した結果、積層化軟骨細胞シートにおいて、高発現していることが分かった。(図 3) このことから、積層化軟骨細胞シートによる同種 T 細胞の活性化抑制に TGF- β が関与することが推測され、積層化軟骨細胞シート移植において、TGF- β は移植部位近傍の軟骨の分化を促進するだけでなく、炎症反応を抑制するのにも重要な役割を果たすサイトカインになりうると考えられる。

以上のことより、ヒト同種積層化軟骨細胞シートを移植しても、宿主の免疫細胞の活性化を惹起しないだけでなく、炎症部位における免疫細胞の活性化を抑制できる可能性が示唆された。同種軟骨細胞の使用が可能になれば、レディメイドの細胞シートを作製することができ、患者の負担軽減および、より計画的な移植が行える上、細胞の品質や種々の情報を予め知ることができる利点がある。我々は、臨床応用を見据えた場合の細胞ソースとして、主に多指症患者の手術時廃棄組織を想定している。成人の自己軟骨細胞からでは、多くても数枚の積層化シートしか作製出来ないのに対して、多指症患者由来の軟骨細胞は増殖が良く、2 継代すれば、数百枚(理論値)の積層化シートを作製することが可能であり、魅力的な細胞ソースになると考えられる。

今後、1: 検体数を増やした再現性の確認、2: 多指症患者由来軟骨細胞から作製された積層化シートが免疫調整効果を有しているかの検討、3: 抑制効果の一部を TGF- β が担っていることを証明するための検証実験、具体的には活性化 T 細胞の培養系に TGF- β を添加して活性化が抑制されるかの検証、および、共培養系へ抗 TGF- β 抗体を添加することで、積層化軟骨細胞シートによる抑制効果が相殺されるかの検証などを行う予定である。

E. 結語

関節軟骨損傷の治療には自己だけでなく、同種積層化軟骨細胞シートを使用出来る可能

性が示唆された。

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. 著書

1) 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子 「次世代医療機器評価指標作成事業-再生医療分野—」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み. シーエムシー出版, 東京(2012) pp.38-46

2. 学会発表

1) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田譲治, 松岡厚子 「in vitro における同種軟骨細胞（シート）の免疫応答におよぼす影響」第11回日本再生医療学会（横浜, 2012. 6）

2) Miyajima-Tabata A, Sakai K, Kato R, Matsuoka A. Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPA polyers. Eurotox 2012 (Stockholm, 2012.6)

3) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 持田譲治, 松岡厚子 「積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響」第 50 回日本人工臓器学会大会（福岡, 2012. 11）

4) 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子 「高分子医療材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性」2012 バイオマテリアル学会（仙台, 2012. 11）

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

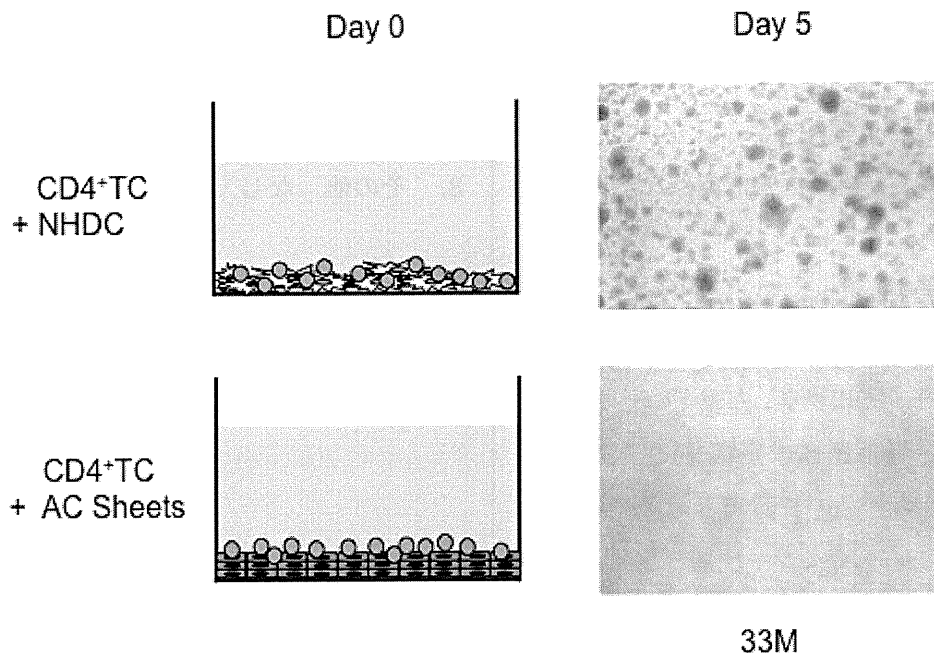


図1-1: 同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響

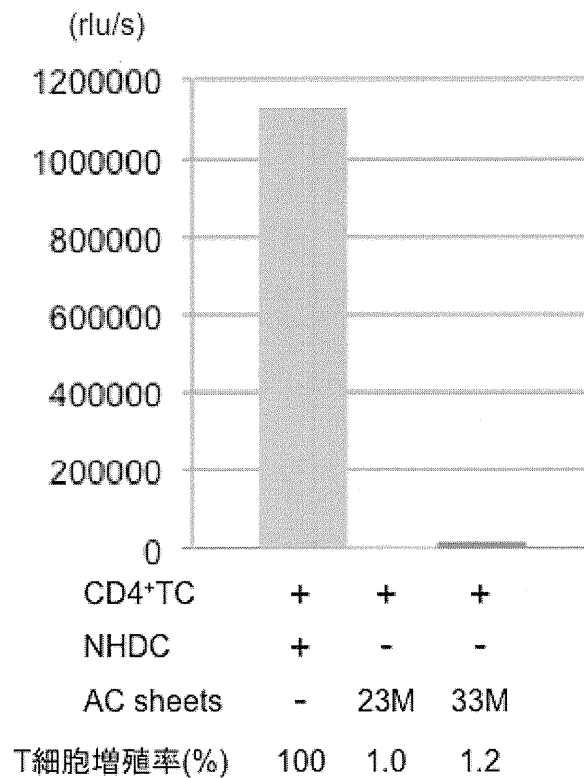


図1-2: 同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響

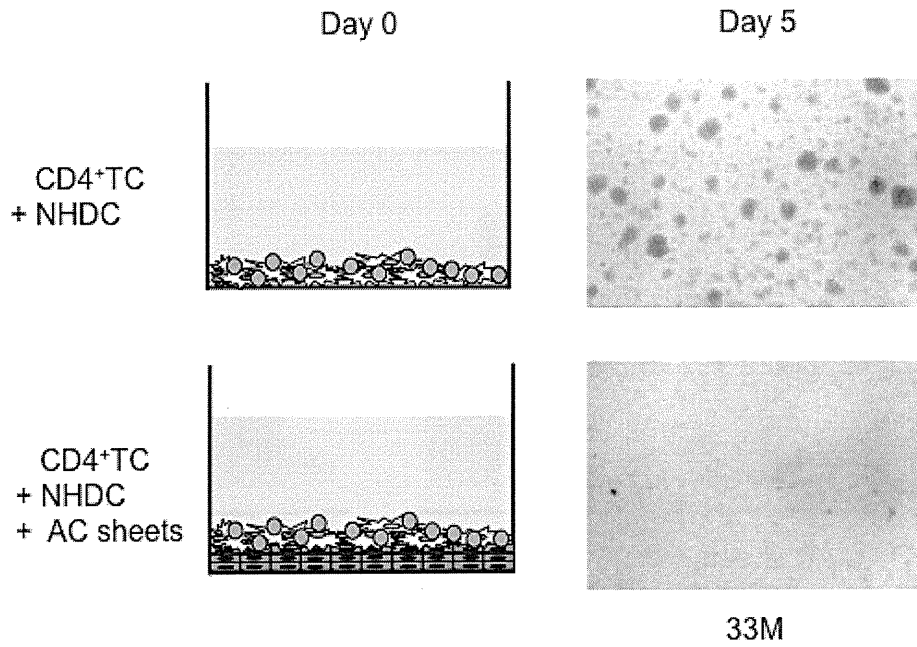


図2-1: 同種軟骨細胞シートがMLRにおよぼす影響

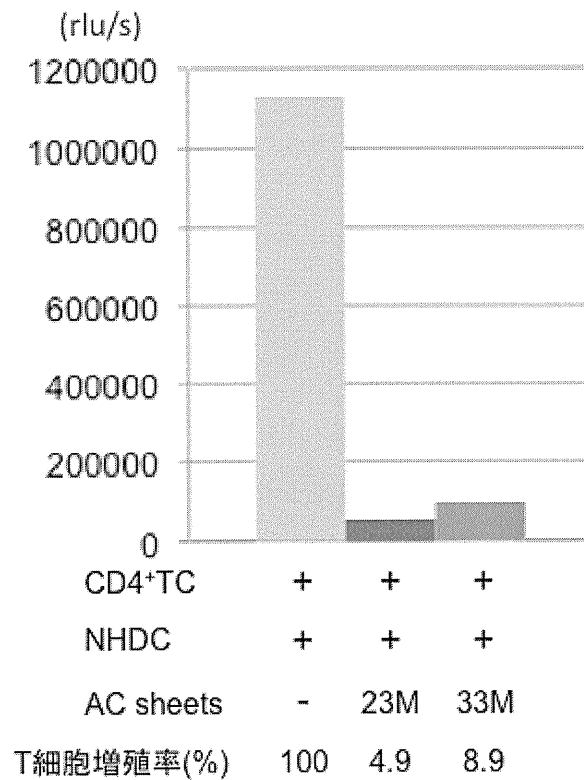


図2-2: 同種軟骨細胞シートがMLRにおよぼす影響

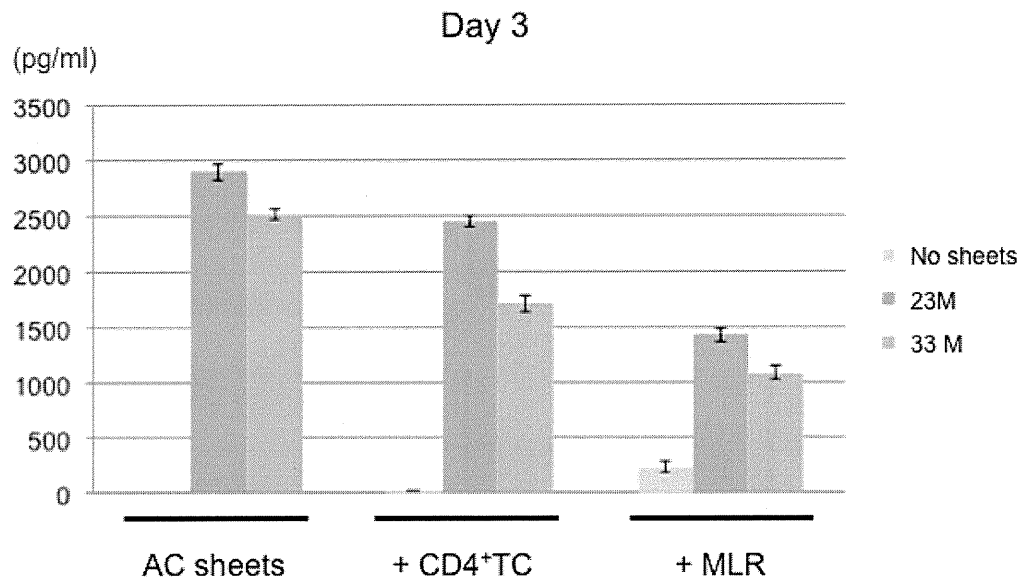


図3:培養上清中のTGF-β1量