

- Regenerative capacity of human satellite cells: the mitotic clock in cell transplantation. *Neurol Sci* 2000, **21**(Suppl 5):S943-S951.
33. Seigneurin-Venin S, Bernard V, Moisset PA, Ouellette MM, Mouly V, Di Donna S, Wright WE, Tremblay JP: Transplantation of normal and DMD myoblasts expressing the telomerase gene in SCID mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **272**:362-369.
 34. Seigneurin-Venin S, Bernard V, Tremblay JP: Telomerase allows the immortalization of T antigen-positive DMD myoblasts: a new source of cells for gene transfer application. *Gene Ther* 2000, **7**:619-623.
 35. Song JS: Adenovirus-mediated suicide SCLC gene therapy using the increased activity of the hTERT promoter by the MMRE and SV40 enhancer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005, **69**:56-62.
 36. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T: Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002, **106**:1133-1139.
 37. Watt FM: Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 1988, **89**(Pt 3):373-378.
 38. Kudo T, Okumura M, Imaizumi K, Araki W, Morihara T, Tanimukai H, Kamagata E, Tabuchi N, Kimura R, Kanayama D, Fukumori A, Tagami S, Okochi M, Kubo M, Tanii H, Tohyama M, Tabira T, Takeda M: Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **344**:525-530.
 39. Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yasuda Y, Yatera M, Okochi M, Tohyama M, Takeda M: The unfolded protein response is involved in the pathology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002, **977**:349-355.
 40. Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yatera M, Okochi M, Yamamori H, Matsumoto N, Kida T, Fukumori A, Okumura M, Tohyama M, Takeda M: FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **296**:313-318.
 41. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J: The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988, **332**:462-464.
 42. Oyadomari S, Mori M: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004, **11**:381-389.
 43. Ni M, Lee AS: ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007, **581**:3641-3651.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/13/51/prepub>

doi:10.1186/1471-2474-13-51

Cite this article as: Sato et al.: Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012 **13**:51.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ナノ秒パルスレーザー

光やレーザー光を生体へ照射すると、散乱、反射、ならびに吸収に伴う温度上昇、さらには蛍光や応力波（音響波）などが主な作用として発生する。最近注目されている光を利用した経ファイバー的・非侵襲的・選択的な診断補助装置は、このようなレーザー光と生体との相互作用の特徴を生かした技術に立脚している^{1,2)}。

ファイバー導光されたナノ秒パルスレーザーは、その高い加工品質と加工速度との組み合わせによって、微細加工の魅力的な手段になり、産業界で発展を遂げた。過去数年間に、高いウォールプラグ効率、サイズの小型化、保守性の最小化によって優れた信頼性が得られるようになり、材料加工の用途において話題のレーザーとなった。マイクロ加工に使われるナノ秒パルスレーザーは従来のランプ励起レーザーの市場シェアを奪い、また、従来のレーザーでは実現できなかった新しい用途を生み出した。このような微細加工技術は、周囲への熱影響を最小にコントロールできることが最大のメリットであり、同時にレーザーの有する生体との相互作用的特徴を併せ持つ。

われわれは、ナノ秒パルスレーザー照射により非侵襲的に得られる光音響信号と蛍光情報から、関節軟骨の本来の機能特性である力学特性と組織性状を評価する技術を開発し、この技術を関節鏡視下に適用して、変形性関節症など軟骨変性を伴う慢性関節炎などの正確な病態把握と各種治療による効果判定の定量評価を可能とするシステムの開発を考えた³⁻⁵⁾。そのために、光音響法と時間分解スペクトル分析法に必要な不可欠な各要素技術を臨床使用可能なレベルに押し上げ、さらに、プロトタイプ装置、プローブ、解析ソフトの開発・改良を行い、実際の臨床の現場での術者の使用感もフィードバックするようになった。

軟骨の粘弾性計測のための光音響法は、応力波発生という現象を利用した photomechanical（光力学的）な作用を利用したものであり、一方、軟骨の性状評価のための自家蛍光スペクトル解析は、蛍光発生という現象を利用した photochemical（光化学的）な作用を利用したものである⁶⁾。同一のレーザーが生体との間で異なる相互作用を生じるため、これらの相互作用を利用することで、形態情報だけでなく、生理的・生化学的な多情報をも同時取得することが可能であることから、超音波のような単一情報の解析よりも、診断装置としての将来性が大いに見込まれる。下記に紹介する二つの計測方法は、いずれも同一のナノ秒パルスレーザーを使用して非侵襲的に同時計測可能であるが、アプローチとしては関節鏡視下となるために完全に非侵襲というわけではない。

1. 光音響法による力学特性評価法

レーザー照射により局所で発生した応力波が、組織内を伝播する過程で組織固有の粘弾性により減衰する現象に着目し、光音響法で力学特性を計測できる基本原理を提案した。

研究開発当初はレーザー光の至適な波長が不明であったため、また、コラーゲンや蛋白を光の吸収体として考慮し、実用性の観点から小型・可搬・安価な励起光源が望まれるため、Q スイッチ Nd:YAG レーザーの第3高調波（波長 355 nm, パルス幅 5~6 ns）を使用したシステムとした³⁻⁵⁾。出力光は石英光ファイバー（コア径 400 nm）へ導光し、光音響波の検出のために圧電性高分子フィルムのポリフッ化ポリビニリデン共重合体を用いたプローブを開発した。プローブ中央部に光ファイバーを配置して、センサーをその周囲にリング状に配置した反射型プローブであり、関節鏡視下でも計測可能なものである。

2. 時間分解自家蛍光スペクトル解析による組織性状評価法

時間分解自家蛍光計測においても、光音響法と同様に、励起光は光ファイバーで導光した Q スイッチ Nd:YAG レーザー第3高調波を用い、ナノ秒オーダーのゲートで測定可能な分光システムを4チャンネルのデジタルパルスジェネレータで制御する。計測パラメータとして、蛍光ピーク強度、半値幅、ピーク波長、蛍光体積、蛍光寿命を算出した。関節軟骨はⅡ型コラーゲンに近似したスペクトルを呈し、ピーク波長ならびに半値幅も近似した。一方、椎間板線維輪外層はⅠ型コラーゲンに近似したスペクトルを呈し、同様にピーク波長ならびに半値幅も近似した^{1,2,6)}。これらの結果は、生体内の自家蛍光物質であるコラーゲンの組成を非接触で計測可能であることを示したものである。軟骨の変性診断に関してはⅠ型、Ⅱ型コラーゲンの含有比が重要と考えられており、軟骨評価法として重要性を増すものと期待している。

文 献

- 1) Sato M, Ishihara M, Kikuchi M et al : A diagnostic system for articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation. *Lasers Surg Med* 43 : 421-432, 2011
- 2) Sato M, Ishihara M, Mitani G et al : Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method and time-resolved autofluorescence. *Bioengineering ; Principles, Methodologies and Applications*, Nova Science Publishers Inc., New York, p179-190, 2010
- 3) Ishihara M, Sato M, Sato S et al : Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of biomechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 11 : 1234-1243, 2005
- 4) Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N et al : Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method. *Lasers Surg Med* 38 : 249-255, 2006
- 5) Sato M, Ishihara M, Furukawa K et al : Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. *Med Biol Eng Comput* 46 : 735-743, 2008
- 6) Kutsuna T, Sato M, Ishihara M et al : Noninvasive evaluation of tissue-engineered cartilage with time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Tissue Eng Part C Methods* 16 : 365-373, 2010

（東海大学整形外科准教授・佐藤 正 人）

変形性膝関節症

3週間以内で関節軟骨細胞シート作製に成功

軟骨は、骨と異なり自己修復が期待できない。膝関節の軟骨に関しては、運動器として重要な潤滑性が求められ、欠損時に移植できるしなやかさと強度を備えた適切な素材がなかなか見いだせなかった。東海大学外科学系整形外科の佐藤正人准教授は細胞シート工学に目を付け、全層および部分的な膝関節の軟骨欠損に対応できる移植法を開発。2011年に厚生労働省の承認を得て自己細胞シートによる臨床研究を開始した。現在、より簡便で低コストの臨床応用を実現するため、同種細胞シートの研究も進めている。

◆ 体内に近い環境での再生を求め細胞シート工学に出よう

膝の軟骨がすり減る変形性膝関節症(膝OA)の患者数は、わが国では急速な高齢化に伴い2,400万人以上に上るといわれる。患者は常時痛みを訴え、日常生活における運動機能の悪化、QOLの低下を招く。従来は消炎鎮痛薬やヒアルロン酸の関節内注射などによる対症療法で痛みを抑え、最終的な治療には人工関節を用いるのが主流であった。そこで、佐藤准教授は早期から膝OAを根治するため、関節軟骨の再生技術に応用できないかと考え研究を開始した。

関節軟骨は、荷重に耐える強度と、運動器としての潤滑性を兼ね備えた硝子軟骨組織^{*1}で、軟骨の中でも最も再生が難しいといわれる。通常、外傷などによる軟骨欠損の再生は健康軟骨組織から細胞を採取、培養して欠損部位に移植する。

しかし、この方法だと培養した細胞をいったん、ばらばらの状態にして移植するため、細胞が漏れ出さないように健康部分から取った骨膜で覆わなければならない。つまり、1カ所の欠損を修復するために軟骨と骨膜を採取する2カ所の健康部を侵襲することになる。

同准教授は、一定の強度と柔軟性を持つ組織工学的軟骨を作製し、かつ侵襲の少ない方法で移植する手段

を模索する中で、東京女子医科大学の岡野光夫教授らのグループが開発した細胞シートに着目した。「軟骨細胞シートは、培養した細胞をシート状のまま使用することが可能なため、骨膜を採取する必要がない。患者の負担を軽減し、安全で丈夫な軟骨組織を再生できる可能性を感じた」と振り返る。

細胞シート工学技術では、酵素処理を必要としない温度応答性培養皿を用いる。37℃では表面が疎水性となり細胞が接着するが、32℃以下では親水性となる特性を持つ。つまり、温度を変化させるだけで細胞の機能を維持したままシートを回収できる。

こうして作製した細胞シートを3層に重ねて移植すると、体内で軟骨組織に近い環境を整えることができ、TGF- β ^{*2}という成長因子が分泌されて軟骨組織の再生を促すことが分かった(図)。

◆ 全層損傷だけでなくOA早期の部分損傷の再生も可能

細胞シート工学技術を用いる最大のメリットは、関節軟骨損傷部の表層部にシートを移植するだけで、患者自身の体内に必要な部分のみの再生を促進できる点だ。そのため、膝OAにおける軟骨の全層欠損と、膝OA早期に見られる部分的な深さの欠損の両方に対応可能である。大きさは4.2cm²でさまざまな程度の軟骨

東海大学外科学系
整形外科准教授
佐藤 正人氏



変性を有する患者への適用を目指している。

ミニブタなどの動物実験では、移植後3カ月程度で関節軟骨の部分損傷および全層損傷双方で良好な修復再生が認められた。

しかし、関節軟骨細胞シートは、動物実験では3週間の培養期間で作製できたが、ヒトの細胞を用いる場合は3〜5週間と培養期間にばらつきがあった。

そこで、佐藤准教授は「滑膜が存在するヒトの関節により近い環境を人工的につくれば、短期間で丈夫な細胞シートができるのではないか」と考え、軟骨細胞を培養する際に滑膜細胞を加える共培養法^{*3}により、3週間以内でヒト関節軟骨細胞シートを作製することに成功した。

2011年から外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷を有する患者を対象に臨床研究を開始。現在2例の細胞シート移植を実施し良好な経過を示している。また、スーパー特区「細胞シートによる再生医療実現化プロジェクト」にも参加し、多方面と連携しつつ研究を進めている。今後3年間で20〜60歳の患者10例を目標に臨床研究を行い、安全性の評価、術後1年での臨床評価基準による評価、単純X線写真、MRIなどによる評価、そして同准教授自身が開発したレーザー誘起光音響法^{*4}による粘弾性評価などを実施する。臨床研究終了後、速やかに高度医療への移行を申請する予定だ。

◆ 他者の細胞を用いた細胞シートの大量生産も視野に

軟骨細胞は他の細胞と比べて免疫応答性が低く、海外では同種間細胞移植(患者本人でなく、他人の細胞を培養して移植)も認められている。患者自身の細胞を培養して移植する自己培養細胞移植では、培養を待たせなければならない。また、移植手術ごとにセブプロセッシングセンター(CPC)というクリーンルーム内での培養や、それに伴う人件費などのコストがかかるため、臨床応用への足かせとなっている。

佐藤准教授は「他の臓器と異なり、移植時に免疫抑制剤を使用する必要

用語解説

*1 硝子軟骨組織

関節軟骨の他、骨端板、肋軟骨、気管軟骨、喉頭軟骨などを構成する軟骨。組織構成の95%を細胞外基質が占め、軟骨細胞は5%程度であるため、自然修復は非常に困難である。

*2 TGF- β

トランスフォーミング成長因子。B細胞の増殖や免疫グロブリン(Ig)産生抑制、線維芽細胞の増殖、創傷治癒の促進といった作用を持つ。腎臓、骨髄、血小板などほとんどの細胞で産生され、コラーゲンなど間葉細胞の合成・増殖も促進する。

*3 共培養法

2種類以上の細胞をそれぞれの接着領域を制御して培養する方法。細胞の増殖・分化・機能発現などは細胞周囲の微小環境にある液性因子や細胞間の相互作用、細胞と細胞外基質の相互作用により調節を受けている。共培養法はこれらの細胞微小環境を再現する。

*4 レーザー誘起光音響法

人体に影響のない微弱なレーザー光を患部に照射し、その反応によって軟骨の質を粘弾性特性から評価する方法。従来のX線や関節鏡による評価では軟骨の強さや硬さなどの質の評価はできなかった。

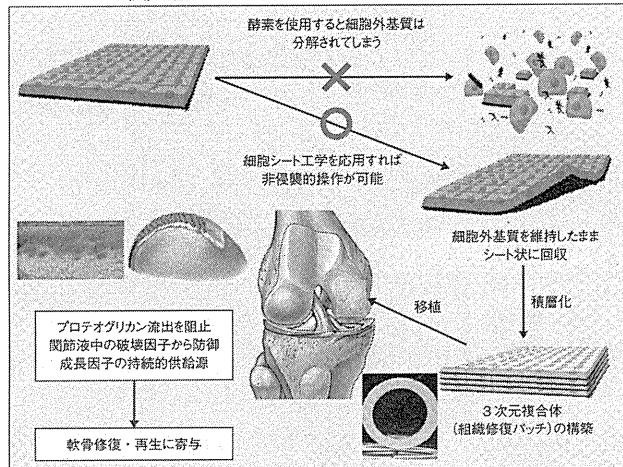
がない軟骨細胞の特性を生かして、他者の細胞を用いた細胞シートをあらかじめ大量につくっておき、手術時にすぐ使えるようにできれば、臨床での普及も加速する」と今後の研究テーマを展開した。

厚生労働省「国民生活基礎調査」(2010年)によると、膝OAなどの関節疾患や骨折・転倒といった運動器疾患が原因で介護(要支援・要介護)が必要になった患者は全体の21%を占めるという。日本整形外科学会はこの運動器疾患を「ロコモティブシンドローム」と定義し早期診断、早期治療を呼びかけている。

膝OAの進行は防止できず、早期診断、早期治療のための適切な評価方法や簡便なバイオマーカーが確立されていない点も課題である。

「関節軟骨細胞シートは、外傷だけでなく変性による軟骨損傷にも対応でき、全層欠損に至る前の早期の部分欠損に対しても簡便で有効な治療手段である。レーザー誘起光音響法などを用いて40歳代くらいから早期に膝OAを診断し、軟骨損傷を細胞シートで再生できれば、運動を続けたい人にとって福音となり、将来的に要支援・要介護となる確率を大幅に減少させることができると考える」と締めくくった。

〈図〉細胞シート工学を応用した関節軟骨の修復・再生



細胞外基質を維持したままシート状に回収。さらに積層化して欠損部に移植すると、成長因子の持続的供給源となり、軟骨修復・再生に寄与する

VI. 班會議 一議事録・発表資料一

議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業
【関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現】
平成 24 年度第 1 回班会議

日時：平成 24 年 6 月 13 日 15:00～17:30

場所：パシフィコ横浜 展示ホール 2 階 (E204 号室)

出席者：岡田潔（厚生労働省）、嶽北和宏（PMDA）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、的場亮（DNA チップ研究所）、平賀育英（DNA チップ研究所）、伊東紀子（DNA チップ研究所）、坂井秀昭（セルシート）、佐藤正人（東海大学）、三上礼子（東海大学）、伊藤聡（東海大学）、小林美由希（東海大学）、横山宗昂（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、渡部綾子（東海大学）、河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：渡部綾子、河毛知子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告会

(1) 「概要説明」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

関節軟骨は、外傷や加齢、遺伝的要素、力学的ストレスなど多種の要因により細胞周囲の微小環境変化やプロテオグリカンの流出、コラーゲン線維網の破綻等により変性し、変形性関節症を発症する。我々は、これまでに関節軟骨の修復・再生に関して基礎的研究を主に家兎並びにミニブタを用いて実施し、これらの研究から軟骨の修復・再生におけるホスト（レシピエント）側の細胞とドナー側の細胞との相互作用の重要性を確認し、組織修復・再生に必要最小限の軟骨誘導イニシエーター（組織工学的軟骨）があれば、ホスト（レシピエント）側の細胞が主導的に修復促進することを見出した。ミニブタを用いた全層欠損モデルにおいても軟骨修復効果を確認し、積層化細胞シートは関節軟骨部分損傷と全層欠損の双方に効果があることを確認した。今回の細胞シート作製にあたり、より良い細胞シートを短期間で作製する為に滑膜との共培養法を採用し、共培養することで TGF- β に富んだシートが作製できるということも確認している。

本研究事業「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」は、自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現と、同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究の実現からなる。既に、ヒト幹細胞指針に則りヒト幹細胞臨床研究へ申請し承認を受けて、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」として臨床研究をスタートしている。安全性試験として、造腫瘍性否定試

験、CGH、IVIS システムを用いてルシフェリン Tg ラットの移植シートの動態評価を行なった。造腫瘍性否定試験では腫瘍形成を否定し、過継代細胞でも異常が見られないことが CGH 解析により確認された。また、移植シートは、関節内滞在を長期に渡り確認した。

本臨床研究は、対象疾患を外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷で、大きさ 4.2cm^2 以下の軟骨損傷とし、様々な程度の軟骨変性度を有する患者に適応するものである。インフォームドコンセントを二度行ない、さらに移植の際には学内の承認委員会で再度了承を得てから移植を行なっている。現在までに2例の患者に臨床応用し、経過は良好である。

軟骨細胞は、免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器移植とも言え、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、同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指している。同種の細胞ソースの候補の一つとして多指症の検体がある。多指症の検体は採取出来る軟骨量は多くはないが、P3 まで培養を続けると 80 倍近くまで増殖し、その幼若性により軟骨細胞の特性を維持することが期待できるものである。しかし、安定供給の問題や、遺伝的な問題等が考えられるため、安全性の評価を重要視して研究を進めていきたいと考えている。同種細胞移植の周辺技術開発として、同種細胞ソースとバンキングシステム構築に関する研究を国立成育医療研究センター研究所と、同種細胞シートの特性と安全性に関する研究を国立医薬品食品衛生研究所と、同種細胞シートの保存法に関する研究を明治大学と、培養軟骨細胞の安全性評価技術に関する研究を(株)DNA チップ研究所と、低侵襲移植用治具、効率的培養法に関する研究を(株)セルシードと共同研究を行っていく。

現在の臨床研究を速やかに先進医療に移行させるとともに、同種に関しては安全性を担保してヒト幹細胞臨床研究を目指したいと考えている。

<質疑応答>

岡田：現在の臨床研究のプロトコルから大きく変更がないと思うので、先進医療に申請する前の事前相談と、次のヒト幹申請を同時進行で行うとタイムラグが少なくて済むと思います。先進医療の申請は、プライマリーエンドポイントを有効性としているヒト幹申請を通ったものが審査のベースとなっています。

佐藤：次のヒト幹申請の時に、今の臨床研究のプロトコルを少し修正したい場合は可能でしょうか。

岡田：よいと思います。早めに相談をして頂いて、書類の準備を行なって頂けたらと思います。

(2)「他家由来滑膜細胞との共培養」

研究分担者 小久保舞美（東海大学）

軟骨細胞培養時の課題として、ヒトでは個体差が大きく、またシートの作製までに多くの時間を要することが挙げられる。この問題点を解決するために、生体内での軟骨の栄養源（関節内滑液）に注目し、温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養法を行なうことで、ばらつきが少なく、また短期間で軟骨細胞シートを回収することが可能となった。

今回、他家由来の肩軟骨細胞と膝滑膜細胞を用いた共培養法で、自己由来の共培養時と同様の効果が得られるか、MTT Assay、Rt-PCR、免疫染色を行ない、細胞増殖能と形質発現、接着性等の確認を行なった。

他家異関節由来滑膜細胞との共培養法は自己由来細胞の共培養法と同様に、増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能にし、積層化軟骨細胞シートの遺伝子発現は自己由来細胞の共培養法で作製したものと同等の発現であった。

<質疑応答>

佐藤：他家由来のものでも自己由来と同等の効果があつたという説明です。

加藤：肩の軟骨細胞は、年齢による差はありますか。

小久保：年齢による差というよりは、その時の損傷度の違いによるような感じがしました。肩は比較的若い検体が多かったと思います。

加藤：肩の軟骨細胞と膝の軟骨細胞は、同じような性質なのですか。細胞ソースとして適しているということは考えられますか。

小久保：肩は動きが膝より少ないためか、肩の軟骨細胞はやわらかくていいような印象があります。

加藤：それはECMの量が違うということでしょうか。

小久保：それもあると思います。

加藤：何をもってよいシートとするかは難しいですね。

佐藤：臨床研究の際は、ヒト幹に通したとおり、厚さやPCR、FACS等で規定して見えています。

坂井：共培養時に、滑膜細胞の入れる量によって違いはあるのでしょうか。タイミングは検討しましたか。

小久保：滑膜細胞があまり多いと、軟骨細胞より増殖が速いので培地中の栄養を先に奪ってしまうと思います。タイミングは検討してみたいと思います。

坂井：多指症の検体も滑膜細胞を入れるのでしょうか。

佐藤：滑膜細胞も一緒に採取してきているので、同じ方法でと思っていますが、多指症は今までの軟骨細胞とは違う増殖がみられるので検討が必要です。

坂井：多指症の検体を使うなら、滑膜細胞は必要ないのではないですか。

佐藤：まだプロパティを確認していないのでわかりませんが、増殖能がよくP3まで使えそうなので、そのあたりも検討しないといけないと思います。

阿久津：多指症はコンスタントに出ている症例ですが、臨床で使用していくためには、もう少し検討しないといけないと思います。バンキングに関しても考えないといけないと思います。

坂井：多指症は他の研究でも使われているのでしょうか。

阿久津：研究レベルでは、使用されています。

佐藤：成育でのバンキングはされているのですか。

阿久津：我々の研究所内では、バンキングシステムまでとはいかないですが、バンキングはしています。

佐藤：臨床研究でそれを使う事は可能でしょうか。

岡田：ダメという記載はないので、安全性の規格を満たしていれば使えると思います。iPS の保存についても同様なトレーサビリティがしっかりできれば、バンクというか保存施設をやっていききたいとは考えています。

佐藤：その施設は沢山できるのでしょうか。

岡田：ES、iPS でそれぞれ関東、関西で一つずつくらいだと思います。

佐藤：期間としては、時間がかかるのでしょうか。

岡田：おそらくそんなに先の話ではないと思います。厚労省の意見が纏まれば、早ければ 12 月には公募が開始されるのではないのでしょうか。

長嶋：多指症はコンスタントに出ているということですが、組織の状態で保存する形でのメリットはないのでしょうか。

阿久津：プライマリーカルチャーをターゲット部位で行うと他は廃棄になってしまいますし、プライマリーセルの保存はとても大変ですので、組織の状態で保存するメリットはあると思います。

長嶋：組織を輪切り、スライスの状態なら凍結保存できると思います。多指症も輪切りの状態で保存したらどうでしょうか。ブタの指が丁度多指症の検体と同じくらいの大きさだと思うので、今度検討してみたいと思います。

(3) 「*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」

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。

具体的には T 細胞もしくは混合リンパ球培養 (MLR) の系に市販ヒト膝軟骨細胞 (NHAC) もしくは積層化 NHAC シートを共培養し、NHAC および積層 NHAC シートが T 細胞に与える影響を細胞増殖の観点から検討した。まず市販ヒト T 細胞と NHAC を共培養し、NHAC の同種 T 細胞への影響をみた結果、共培養された T 細胞はほとんど活性化していないことが分かった。さらに NHAC と MLR の共培養の結果から、NHAC は MLR における活性化 T 細胞の増殖を抑制できることが分かった。このことより NHAC が患部の炎症を抑制できる可能性が示唆された。

また、セルカルチャーインサートを用いて物理的に軟骨細胞や積層化軟骨細胞シートを活性化 T 細胞と分離して培養しても、MLR の反応抑制が確認されたことから、抑制効果の一部には液性因子の関与が示唆された。その候補因子の一つとして、MSC で抑制効果に関与が示唆されている TGF- β が考えられる。同種軟骨細胞は免疫応答を惹起しないだけではなく抗炎症作用も期待できるのではないかと示唆される。

<質疑応答>

岡田：シートの移植によって、抗炎症効果も期待できるということでしょうか。

加藤：期待できると思います。TGF- β が関わってくる可能性が考えられます。

岡田：TGF- β のように液性因子について追及していくと、医薬品という話になってしまうのではないのでしょうか。

嶽北：薬理作用は医薬品で、物理的作用は医療機器という扱いになります。ケースバイケースになります。

加藤：シートは覆うという事に意味がありますよね。

佐藤：カタボリックファクターから損傷部を守る効果が期待できます。

岡田：医薬品は薬事法の承認申請があるので治験が必要になります。医療機器は、臨床データーを使つての先進医療申請になるので、個別で相談をして下さい。

佐藤：貴重なご意見をありがとうございます。

坂井：単層と積層では違いがあるのでしょうか。

加藤：単層ではこの系では確認していません。

坂井：MSC では、もっと効果があるのではないのでしょうか。滑膜ではどうでしょうか。

加藤：in vitro では同等の効果が得られています。滑膜では、確認して行きたいと思います。

佐藤：同種で免疫反応が起こらないという裏付けデーターになるので、今後も検討を進めて頂きたいと思います。滑膜との併用でも十分に効果があると確認しているので、より大きな損傷に活かしていきたいと思います。

(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 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－方向へプロットされる。全プローブの Log₂Ratio 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。

東海大のサンプルとは異なるが、リファレンスに HAPMAPDNA、テストサンプルに一人が 22 番染色体にパーシャルトリソミーを持つ一卵性双生児の DNA を混合して解析した結果、10%の混合率でも検出可能であった。

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、本手法は微細なゲノム異常の検出が可能である。また、Dye swap をすることで反転した結果となり、追加で実施した再実験ではその再現性が確認された。

<質疑応答>

佐藤：今回のこの解析手法を軟骨細胞のバリデーションの検査として検討をしています。今後は過継代 P12 を解析する予定です。滑膜も同手法で解析を考えていますが、かなりヘテロな集団なので検討の必要があると考えております。

加藤：軟骨の評価として 6 万プローブ搭載のマイクロアレイを使用しているようですが、アジレント社では 18 万プローブ搭載のマイクロアレイを使用しているとのことでしたが、今回の解析方法で全ゲノムを網羅していると考えておられるのでしょうか。

伊東：アレイには 100 万、40 万、18 万、6 万プローブ搭載の全 4 種類のマイクロアレイがございますが、今回は CNV を検出する目的ではなく、変化がなかったということを確認する為の解析でしたので十分であったと考えております。また、今回は遺伝子領域に高密度にプローブを配置したマイクロアレイで検出しています。

的場：100 万プローブ搭載のマイクロアレイではコスト的には 6 万プローブ搭載型の 8 倍程度になります。

佐藤：将来的には軟骨や滑膜に特異的なものが出来るとなおりますね。

伊東：n を増やす必要性やアルゴリズムの閾値の検討を深める必要があります。

(5) 「OA に関連する miRNA」

研究協力者 河毛知子（東海大学）

DNA チップ研究所との共同研究で変形性関節症（OA）に関連すると思われる miRNA 5 種類を見出した。OA で特異的に高発現する miRNA 1 種、特異的に低発現する miRNA 4 種である。まず、軟骨および cell line で実験系の検討を行い、至適条件を確認し、コントロールを RNU6B とした。Cell line はマウス由来のものであるが、ヒト miRNA 5 種のうち 3 種は相同性の高いものが mirBase で確認されたが、残り 2 種については相同性の高いものはヒットしなかった。しかし、それぞれの miRNA の inhibitor や Mimic を Transfection することで発現の挙動を操作できた。このことからマウスでは相同性の高い miRNA が見つからなかった 2 種の miRNA についても、まだ報告がないだけでマウスにも相同性の高いものが存在すると示唆された。miRNA の発現の挙動を操作することで、軟骨特異的な遺伝子発現に変化がないかリアルタイム PCR で確認した。その結果、SOX9 については、miRNA を発現抑制、過剰発現させた両群でコントロール群に比べ低発現であった。今後 5 種の miRNA と SOX9 との関連を検討する。

<質疑応答>

岡田：細胞シートが変形性関節症の治療に役立つという観点から行っている研究なのですか。

佐藤：OA もマイルドからシビアなものまであるのですが、将来的に疾患のコントロールも再生医療に重要だと考えております。

長嶋：遺伝子治療のように、細胞シートに miRNA を入れるということですか。

佐藤：遺伝子治療までは考えておりません。再生医療のサポートとして使用できないかと考えています。現在、VEGF を用いた研究も行っていますが、実際に再生医療を行なう上で、こういった薬等を併用していったほうが効果的ではないかと考えています。

長嶋：患者さんの状態を把握するエピジェネティクスとなるといいですね。

佐藤：そのように使用できるといいと思います。治療する患者さんの状態に応じてオーダーメイドができるといいです。

長嶋：軟骨の健全さの指標でメチル化によるモニターが出来るかも知れませんね。

阿久津：mi は難しいですね。ターゲットを見つけていくのはまだ基礎研究でも難しいなか、臨床研究に結び付けていくには相当のエビデンスの構築が必要だと思います。

佐藤：特異的な mi などに注目していきたいと思います。

的場：分泌系では確認していないのですか。

佐藤：関節液でも検討してみたいです。OA のグレーディングのバイオマーカーがないので、進行度のマーカーになれば興味深いと思います。

(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

平成 21－23 年度に実施された「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」事業ではお忙しいところ報告書を作成頂き、誠にありがとうございました。今回採択されました「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」事業は事業期間 5 年となっておりますが、厳しい 3 年目の中間評価を乗り切るべく、スタートが肝心と思っておりますので、今まで以上にご協力をお願い申し上げます。次回の班会議は年度末に予定しておりますので、何卒宜しくお願い致します。

5. 閉会

以上

議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業
【関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現】
平成 24 年度第 2 回班会議

日時：平成 25 年 3 月 22 日 13:00～15:30

場所：パシフィコ横浜 会議センター4 階（411 号室）

出席者：嶽北和宏（PMDA）、加藤眞行（独立行政法人医薬基盤研究所）、光島健二（独立行政法人医薬基盤研究所）、木下奈津美（独立行政法人医薬基盤研究所）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、石原美弥（防衛医科大学校）、長嶋比呂志（明治大学）、松成ひとみ（明治大学）、前原美樹（明治大学）、的場亮（DNA チップ研究所）、平賀育英（DNA チップ研究所）、伊東紀子（DNA チップ研究所）、菊地鉄太郎（セルシード）、佐藤正人（東海大学）、三上礼子（東海大学）、小林美由希（東海大学）、横山宗昂（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、岡田恵里（東海大学）、河毛知子（東海大学）、渡部綾子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：渡部綾子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告会

(1) 「概要説明」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

日本オリジナルな技術により変形性関節症にまで踏み込んだ関節軟骨の再生医療実現を目指している。軟骨細胞シートは、軟骨の全層欠損と部分損傷の両方の動物実験で有効性を実証した従来にない方法である。これまでの再生医療は、軟骨の全層欠損でしか有効性が認められていなかったが、細胞シートはこの両方の軟骨の損傷系に関して効果を認めたものである。ヒト幹細胞指針に則った自己の臨床研究は、現在までに 7 例がエントリーし 4 症例に実施した。現在実施中の自己細胞による臨床研究を速やかに実施し先進医療に移行すること、また軟骨は免疫抑制剤を必要とされない数少ない臓器・組織移植の一つとなりうると考えており、同種細胞シートによる関節治療の実用化を目指した戦略を練っていきたいと考えている。

自己細胞シートの臨床研究は、平成 23 年 10 月に大臣意見書をもって承認され今年で 2 年目となる。この細胞シートは、3 層に積層化したものを患部に移植するという極めて単純な方法で行っており、これまでの再生医療のような煩雑な手技は必要とされない。問題は、軟らかいシートを手術時に奥まで届けるという点だが、今後工夫していくところである。先日実施した 4 例目の患者さんは、内側型の変形性関節症で大腿骨の軟骨がえぐれてしまっていた。超音波法で粘弾性特性を測り、

滑膜と非荷重部から軟骨を採取した。滑膜細胞と軟骨細胞の共培養法で 2 週間培養した後、単層の軟骨細胞シートを 3 層に積層化して 1 週間培養し細胞シートを作製した。この症例では 2 枚移植が可能であった。

この臨床研究は、移植部位の大きさや年齢制限を厚労省との相談の中で設けられたが、様々な程度の軟骨変性を有する患者さんに適応していくということで認めて頂いたものである。エンドポイントは安全性評価として有害事象の頻度、セカンダリーエンドポイントとして有効性評価を実施している。レーザー誘起の光音響法は、防衛医大の石原先生が開発されたもので 2007 年から東海大で臨床応用しており、関節鏡視下で軟骨の粘弾性特性と厚さを測る方法である。波形より、粘弾性特性と厚さが分かり、プローブを変えると組織性状も確認できるというものである。軟骨は白い組織であり、移植した軟骨が機能した軟骨かあまり機能しない軟骨（出来のわるい軟骨）なのか見た目では判断が難しいため、光音響法を用いて評価を行なっている。滑膜と軟骨を採取し CPC に搬入し 3 週間培養する。これまで実施した 4 例の臨床経験では 2～5 枚くらい作製可能であった。移植後 3 ヶ月経過すると、MRI で再生軟骨を認める事ができる。移植後 1 年に再度関節鏡を行ない、硬さを光音響法で測定し、再生した軟骨を患者同意のもとバイオプシーし評価を行なっている。組織標本では、Type II コラーゲン、サフラニン O 染色は共に濃染され、明らかに硝子軟骨でほぼ再生されていると確認できた。現在、7 例エントリーした内の 4 例に実施したが、残りの 3 例は、規格に合わなかったもの、或いは培養後の剥離試験で剥離出来なかったものに関して中止とした。今のところ有害事象は認めていない。先日、高校の体育の先生で剣道の有段者である第 2 例目の患者さんの術後の様子がテレビで紹介され、術後 6 ヶ月で良い回復が得られており嬉しいコメントを頂いている。

変形性関節症の特徴は、骨まで達する軟骨の全層欠損と軟骨だけが損傷している部分損傷とが混在した状態のものである。全層欠損は、骨髄まで達すると出血するためある程度の大きさのものは治ることが知られている。部分損傷は、関節軟骨の周りのマトリックスが邪魔をして修復に必要なかつ十分な細胞が局所に動員されず、きちんと治らない。従来の軟骨の再生医療は、全層欠損に適應されている。世界で約 2 万例既に実施されている ACI という技術は、2 ヶ所を犠牲にして一か所を治すという方法であり、軟骨の小さな欠損部に骨膜のパッチをあてて、その中に一ヵ月以上培養した細胞を注入して治すという方法である。J-TEC の製品ジャック®も基本的に同じもので、パッチに入れる内容物がゲル内で培養されている以外は同じコンセプトである。我々は、出来あがった再生軟骨が、種々のコンプレックスである事が問題と考える。多数要素の最適化は難しいと考えており、なるべくシンプルに骨膜もスキャフォールドも使用しないで、良い環境下で軟骨を修復させたいと考えている。我々のコンセプトは、表層部分の修復が最も重要であると長年の研究からわかっており、軟骨は表層部分をきちんと治せば自然に修復してくるという立場をとっている。当初はスキャフォールドを使って硬い軟骨を作製する研究を行なっていたが、スキャフォールドを使わずに厚みを薄くしていった過程で細胞シートと出会い、現在では 3 層の積層化細胞シートでも同等の効果が得られることがわかり研究を行なっている。

医科歯科大や阪大では、滑膜細胞だけを使って修復させる再生医療も行なわれている。阪大の安藤先生の論文にもあるが滑膜細胞だけで修復させようとすると表層の部分に繊維性組織が残存してしまう。我々は、細胞シートを併用することできれいに修復されることも確認しており、昨年バイ

オマテリアル誌で発表した。

部分損傷は、家兎の実験で修復効果を証明している。軟骨表面を少し削りシートを置いて、その部分の組織切片を作製し評価した。軟骨は表面を少し削っただけで、4 週もすると表層部分が毛羽立ちマトリックスが抜けてきてしまい変形性関節症になってしまうが、シートを置く事で完全とはいかないが変性の進行を抑制する効果が分かった。これは、変形性関節症の治療に道を開く初めての報告で BBRC 誌の表紙を飾った。細胞シートは、局所を保護する役目、関節中のカタボリックファクターの阻止、細胞自身が出すサイトカインを持続的に供給する供給源になっているのではないかと考えている。細胞シートの特性として、非常に高濃度の TGF- β という軟骨に必須の付帯遺伝子とも言えるグロースファクターを分泌している事に注目している。同じ細胞数のシングルセルよりも約 20~30 倍シート状に入れた方が TGF- β が高いことを確認している。このような効果で、局所的に効果があるのではないかと考える。

細胞シートは、ミニブタやウサギでは作製できるがヒトでは難しい。市販の軟骨細胞でも作製は容易ではない。我々は、均一かつ安定して作製する為に、セルシード製の温度応答性インサートを用いた共培養法で作製している。滑膜細胞との共培養では、安定して細胞シートが作製できる。軟骨細胞は単層で培養を続けていくと、脱分化を起こし Type II collagen など発現しなくなってしまうが、積層化する事で Type II collagen, Fibronectin-1 や Integrin α -10 も良く発現するシートが作製できる。

同種のセルソースの検討として、厚労省との相談の中でトレーサビリティの問題がある骨バンクや同種軟骨片等ではなく、手術時廃棄組織で得られ、優れた増殖性を持つ多指症軟骨細胞を成育医療研究センター研究所と MTA を交し、同種軟骨細胞ソースとして安全性の検討を行なっている。多指症は手術時廃棄組織であり、倫理的にも問題がないのではと考える。多指症は、現在 1 歳前後で切除手術を行なうのが一般的である。多指症 1 検体から積層化細胞シートがどの程度作製できるかということ、理論値として P2 (第 2 継代) で 745 枚分、P3 (第 3 継代) で約 8000 枚作製できる試算である。現在、一人の患者さんに細胞シート 2~5 枚を使用しているが、1 検体の指で多数の患者さんに治療可能となる点で同種のセルソースは大変魅力的である。

本プロジェクトは 5 年間であり、残り 4 年となった。自己の細胞シートで先進医療の申請まで、また同種に関しては安全性を担保してヒト幹細胞臨床研究を目指したいと考えている。初年度の中間評価の結果では、16 人中 2~3 番目の評価であった。改善すべき点として挙げられた、GLP 基準の大型動物実験が本当に必要なのかというコメントがある。自己の細胞シートのヒト幹細胞申請時に GLP 基準の大型動物実験を既に行なったが、同種細胞シートの申請時にも再度行う必要があるのかについて、本当に実施が必要なのかというコメントもあり、省略出来るのであればより研究を早く進める事が可能ではないかと感じている。プログラムオフィサーの先生方からも貴重な御意見等頂いており、今後ともご指導頂けたらと思う。

<質疑応答>

阿久津：既に 4 症例行なわれた自己細胞シートでは、得られる細胞シートの数でばらつきがありますね。中には細胞増殖が良くなかった方もいらした様で、様々なファクターがあると思いますが、

例えばマーカー等である程度最初の段階で予測出来るようなものはないのでしょうか。

佐藤：最初の段階で予測できるようなマーカーは中々難しいと思います。勿論、出荷前の手術移植前日の検査は行なっておりまして、PCR で遺伝子発現を確認し、表面マーカー等も確認した上で、出荷基準を設けております。最初の受入の段階での細胞の活きの良し悪しはまだ分かっていません。

阿久津：培養してみないと分からないという事ですね。

佐藤：そうです。

小久保：細胞採取時点でのデータも取っていますが、採取時点で細胞を使うか使わないかまでは判断しておりません。

佐藤：若いから良い細胞かという、先日の症例は 30 代でしたが、細胞の増えは良かったがマトリックスの基質合成の能力が低く、剥離試験で不合格となってしまった症例もいらっしゃいます。最初の段階で、活きのいいマーカーというのがあればいいのですが。

(2)「ウサギ・ブタ軟骨細胞シートのガラス化保存」

研究分担者 長嶋比呂志（明治大学）

同種細胞の臨床応用を考えた際に細胞シートの凍結保存が非常に重要となる。保存技術を開発することは、現在行なわれている autograft では治療の反復といった場合に有効であり、allograft 移植の促進には、シートの作製と移植実施時期の調整が容易になること、また治療用シートのストックや流通システムが可能となる事が必要であると考えます。

細胞シートのガラス化液の組成は、受精卵の凍結保存培地を応用している。基礎培地として、TCM199 の Hepes Buffer に Calf Serum（血清）を加えたもの、凍害保護剤としては細胞浸透性のものとして DMSO と Ethylenglycol (EG)、非浸透性のものとして Sucrose とカルボキシル化ポリリジンを使用している。使用濃度は平衡液が 10%DMSO と 10%EG の total20%、もしくは今後の検討として DMSO を除く場合は EG20%となり、ガラス化液は浸透性保護剤の濃度が上がるため 20%DMSO と 20%EG の total40%あるいは EG のみだと EG40%となる。非浸透性の凍害保護剤は、現在有効であると認めているものは Sucrose0.5M と COO-PLL10%としている。

細胞シートのガラス化保存を確立する時の要件として、シート形状の維持、細胞生存性、微細構造の維持、ECM 成分の維持、TGF- β の話もあったように治療の機能成分の生産能の維持、軟骨損傷治癒効果の維持が考えられる。

前年度までの成果として、細胞シートを破損することなくガラス化および融解することの出来る coating 法を開発し特許を出願した。また、臨床応用を想定し、細胞シートをパッケージしてガラス化する envelop 法の基礎を確立した。それぞれ PLL 有りで形態が安定しガラス化が可能であった。

受精卵のガラス化法には Minimum Volume Cooling(MVC)があり、人の受精卵でも一般化しているコンセプトであり、最小容量の液でガラス化させるというのが MVC の考え方である。溶液量が最小化される事で、液層から固層に変化した際の固層の状態が非常に安定化することが知られており、人を含めて多種の哺乳動物の受精卵や未受精卵で保存が可能となっている。コンセプトは、こ

の方法を応用し、積層化細胞シートの周りにガラス化液をまとわり付く状態にして MVC を Follow した形でガラス化を行なうことである。

今年度の成果として、再現性の確認と、ガラス化後の細胞シートの正常性を ECM 解析して確認した。また他種シートへの適応拡大でブタの軟骨細胞シートにも実施した。凍害保護剤の検討として、EG 単独での保護の効果の検討を行なった。coating 法は、細胞シートへの凍害保護剤の浸透後、ガラス化液による被覆を行ない、ガラス化液でコーティングされた細胞シート（メッシュデバイス上）を液体窒素蒸気（-125℃）中で細胞シートをガラス化する。融解は、加温板（38.5℃）上で行い、融解した細胞シートから凍害保護剤を除去・洗浄し、細胞シートを回収するという方法である。envelop 法は、ガラス化液でコーティングした細胞シートをラップでカバーして同様の方法で行なったものである。dish 法はシャーレを用いて行う方法である。envelop 法も dish 法も、ポリリジンを添加して行なった場合、ガラス化が成立した。ガラス化が不成立の場合は、クラックが入り不透明になる。ポリリジン（PLL）有無の効果は、固化した状態でクラックが入ると砕けてしまうが、PLL が入る事でガラス化が安定し成立する。また、液体窒素への浸漬によってシートが破損したりする問題点があったが、液体窒素の蒸気を利用した事でガラス化が成功した。

積層化ウサギ軟骨細胞シートのガラス化後の形態維持および細胞生存性を確認した。PLL 有の coating 法は試験に供したシートは全て無傷で回収でき、細胞生存性も非ガラス化と同程度であった。PLL 無の coating 法では細胞生存性は PLL 有と変わらなかったのに対し、無傷で回収できたシートが殆ど無かった。シート構造の保持には PLL の存在が非常に重要である事がわかる。envelop 法（PLL 有）ではシートは全て無傷で回収でき、細胞生存性は有意な差はなかったが若干コーティング法より低かった。ラップで包む事により、熱の伝導性が悪くなりガラス化時と融解時に温度の速度や上昇速度が遅くなる為、細胞生存性に影響が出たと考えられる。dish 法（PLL 有）でも、全て無傷で回収できたが、細胞生存性は非ガラス化に比べ遥に低くなった。dish 法では液量が多い為、ガラス化法の条件を満たしていないためと考えられる。また、ガラス化後の細胞シートの ECM 成分の維持をサフラニン O 染色と Type II collagen 免疫染色で確認したところ、coating 法、envelop 法どちらも、非ガラス化と同様に濃染された。ブタ軟骨組織から細胞シートを作製し、積層化ブタ軟骨細胞シートのガラス化（coating 法）の形態維持および細胞生存性を確認したところ、全て損傷なく回収でき、細胞生存性も非ガラス化と同程度であった。少し微弱な細胞シートでも、これまでの coating 法でのガラス化が可能であると考えられた。積層化ウサギ軟骨細胞シートのガラス化に対する CPA（凍害保護剤）の予備的検討では、EG 単独使用でも十分対応可能ではないかという事がわかった。

来年度は、臨床応用を踏まえたパッケージングの方法が今後重要になると考えられる点から、熱伝導率や、液体窒素の超流動の性質を上手く利用した医療に適したパッケージング素材を検討すること、オートメーション化したシステムについても検討していきたい。人の状態に近いより微弱なシートについてもガラス化が可能である担保をとっていきたい。また、実際にガラス化したシートが治療効果を有するのかを確認するため、ウサギなどへの移植実験を行なっていく必要があると考える。最終的にはデバイスの開発、そして人への応用を目指していきたい。

<質疑応答>

阿久津：ガラス化法での融解方法はどのように行なっているのでしょうか。

長嶋：通常のガラス化では溶液の中に浸けて加温を行います。シートの場合は破けてしまいますので、加温板に乗せました。加温盤では、温度の上昇速度が遅い為、もう少し早く溶かす方法を検討する必要があると思っています。

阿久津：同種を考えると当然凍結というのが必要不可欠になってくると思うのですが、実用化になった際にどれだけ簡便に効率よく使用出来るかが重要になってくると思います。

長嶋：そう思います。今はまだ試験的ですから、1枚1枚ピンセットでつまんで融解しておりますが、臨床現場では出来ればパッケージしてあるものをレトルト食品のようなイメージで液を移し換えていくときれいに洗えるというような方法が出来たらいいと思いますが、今後検討したいと思います。

阿久津：20%のFBSを使用されていますが、代替するようなものはあるのでしょうか。

長嶋：あると思います。基本的にはヒトの受精卵のガラス化液と同じものですが、PVAやPBPなどの高分子で置き換わっているようなものを使えば、同じ様な効果が得られると思います。今は試験的ですので血清を使っていますが、血清でなくてはならないという事はないと思います。

佐藤：昨日の再生医療学会でも話題になっていましたが、再生医療関連の新しい法律が国会で3つくらい出てくるようです。今までは、大学で全て培養・保存等を行なわなければならなかったのですが、外部委託出来るようになると聞いています。もしそのような事が可能となれば、それだけに特化した企業か、アカデミアにお願いししっかり管理してもらって、使う時にそこで融解して輸送だけ何か考えるという方法でもいいのかなと思います。

嶽北：envelop法というのは、液を入れてラップをするようなものなのでしょうか。

長嶋：浸けこむプロセスがあります。凍害保護剤を細胞の中に浸透させる為に、液の中で必要成分を細胞の中に浸透させて最終的にガラス化液でコーティングしてから包んでいます。

嶽北：再生医療、細胞治療として、今欧州では新しいコンセプトとして製薬企業とはアセチル化PEGかなにかに包んだ細胞を中に入れて、サイトカインや酵素の供給源としての細胞というような位置づけで開発していてPhase IIくらいにいつています。細胞シートの話とは少しずれてしまいますが、そのような製品と同じ様に応用できないのかと思ひまして伺った次第です。

佐藤：保存の時に使っている薬品に関して、使用してはいけないものはあるのでしょうか。例えば、DMSOだったらきちんと洗い流せた事を確認できればよいとか。

嶽北：安全かどうかはキーだと思います。安全かどうかを評価する上では、どれだけ容認できるのかという事と有効性とのバランスを評価するものであって、何か使ってはいけないというものではありません。一応十分に洗い流せたら測らなくてもいいものと、絶対どんなものであっても測らなくてはならないものがあるとは思ひます。例えば、議論中のICH-Q3Dで検討されているのは、カドミウム、ヒ素、水銀、鉛のようなアレルギーに関連する物質は絶対に測らなければならないもので第1類となるものですが、第2類としてセレンや亜セレン酸などもあります。一般的にメジャーな毒物については、絶対に測らなければならないというようになっているようです。

佐藤：貴重な御意見ありがとうございます。

阿久津：細胞生存率もかなり高いですし、性質としてもきちんと保持されているようなので、あとは有効性についてどれだけ担保できるのかですね。

佐藤：細胞シートの特性評価として液性成分は測れると思うので、一度 vivo で動物実験を行なおうと思います。

(3)「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）

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、同種細胞移植が必要になると考えられる。同種細胞利用の利点は、レディメイドの細胞シートを作製することが可能になり、患者さんの負担軽減および、より計画的な移植が行える事、同一ドナーからの細胞を使用することで細胞の品質（情報）が予め分かるという点である。一方、懸念される問題として、拒絶反応を引き起こす可能性があるという事である。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、実際に同種軟骨細胞が宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すのか詳細な報告はないため、本研究において同種軟骨細胞シートが免疫反応に及ぼす影響を in vitro で検討することを目的とする。宿主の免疫反応を惹起しないことが示せれば、同種軟骨細胞シート移植への可能性がひらけると考える。

軟骨細胞は間葉系幹細胞（MSC）より派生、分化する細胞であるが、MSC は免疫原性が低く、免疫細胞の活性化を抑制するという性質を有している事が報告されている。この MSC を in vitro で軟骨に分化させ、活性化 T 細胞と共培養した系では、MSC 由来軟骨細胞が MSC と同様に活性化 T 細胞を抑制するという報告がある。我々はこれまでに、生体内から取り出した軟骨細胞でこの性質が維持されているかについても、これまでにマウスと市販ヒト軟骨細胞およびその積層化シートでそれぞれ活性化 T 細胞を抑制するという事を確認している。

東海大学臨床研究委員会承認の下、手術により得られたヒト膝関節軟骨細胞を用いてシートを作製した。23 歳男性と 33 歳男性から採取されたものを使用した。ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞（CD4⁺TC）と正常ヒト樹状細胞（NHDC）による混合リンパ球培養反応（MLR）（アロ反応）を陽性対象とし、CD4⁺TC と積層化軟骨シートを共培養して積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞への影響をみた結果、試験に供した 2 例共に陽性反応のようなブラストは確認されず、また細胞増殖解析の結果からも共培養された T 細胞をほとんど活性化しないことが分かった。MSC は T 細胞、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細胞の機能（活性化や分化）を抑制するとの報告がある。もし軟骨細胞が同様の性質を有していれば、損傷部位の炎症反応を抑制できる可能性があると考えられる。そこで同種軟骨細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討した。MLR と積層化軟骨細胞シートの共培養の結果から、積層化同種軟骨細胞シートは MLR における活性化 T 細胞の増殖を抑制することが分かり、患部の炎症を抑制できる可能性が示唆された。また、セルカルチャーインサートを用いて積層化市販軟骨細胞シート（NHAC Sheets）を物理的に MLR と分離して培養しても MLR の反応が半分程度抑制されたことから、抑制効果の一部には液性因子の関与が示唆

された。TGF- β 1 は軟骨細胞の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と作用を抑制する働きがある。MSC においても TGF- β 1 が、その免疫調節効果に関与する液性因子の一つであるとの報告があることから TGF- β 1 を測定したところ、積層化同種軟骨細胞シートは TGF- β 1 を高発現しており、同種 T 細胞の活性化抑制に関与している可能性があること示唆された。

同種軟骨細胞シートは免疫応答を惹起しないだけでなく、患部の炎症を抑制出来る可能性も考えられた。以上のことより、関節軟骨損傷の治療に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。平成 25 年度は、*in vitro* で軟骨細胞シートでの再現性の確認と多指症患者由来の軟骨細胞シートが同様の性質を持っているかの検討を行なう。*in vivo* では、ウサギ同種異系間での積層化細胞シート移植を行ない免疫応答に対する影響の検討を開始する。これは次年度以降も短期、中期、長期の経過観察を行ないたいと思っている。

<質疑応答>

佐藤：海外ではチップ状の軟骨も販売されていますが、文献的にみると軟骨の免疫応答は低いという論文は非常に少ないので、エビデンスがまだ十分ではないと感じています。同種の免疫応答をしっかり確認し安全性を示していきたいと思います。勿論、同種では感染症やウイルス性のものもしっかりバリデーションしなくてはならないと思っています。

阿久津：細胞シートの TGF- β について、単に発現量を見るだけではなく、今後 Si でノックダウンして機能的に確認してみると良いのではないのでしょうか。

佐藤：そうですね。阻害剤を使った *in vitro* も面白いかもしれませんね。細胞シートの液性成分を網羅的に ELISA で調べた結果では、TGF- β 以外に PGE-2 も高く発現していました。PGE-2 は炎症に効果があり、それが軟骨に効果を発揮するというような論文もあって、免疫応答を抑制する方に働くものなので、色々液性成分の factor は出てくるようです。プロスタグランジンの阻害剤は小野製薬から出ていますので、これらでやってみても面白いかもしれませんね。

加藤（玲）：ただ、一つの成分だけではないはずなので幾つか候補があれば一つずつ検討してみるのもあるかと思います。液性因子だけではなく、cell cell interact も抑制に働く部分があるかと思っています。TGF- β は軟骨が軟骨であるがためのサイトカインであります。副次的に炎症を抑制する働きがあればという考えがあって、まずは TGF- β を検討しました。

的場：炎症性のマーカーというか、炎症であがってくる発現などもポイントなのかなと思います。今の実験では T-cell 中心ですが、マクロファージ系の免疫系のものなどはプラスに働いているのかマイナスに働いているのかというようなものはありますでしょうか。

加藤（玲）：MSC では、Tcell だけではなく NK 細胞や樹状細胞など殆どのものが分化や増殖を抑える方向に働くという報告があります。実際、私の実験系でも樹状細胞と Tcell を共培養した MLR に積層化シートを共培養しているので、Tcell だけではなく DC の方の活性も複合的に抑制していると思っています。

的場：色々な影響があると思うので、Tcell だけでなく、マクロファージ系の免疫系の発現量もみていったらいいのではないかと思います。

加藤（玲）：今後、他の免疫系の細胞もみていけたらいいと思います。

光島：実験系（混合培養）での細胞の濃度は、実際の手術時の濃度を反映しているものなのでしょうか。

加藤（玲）：vivo に手術の時の濃度に反映できているかは分からないのですが、実験系では栄養因子の枯渇のせいで増えないのではないかという点については、予備実験で検討したことがありますので、増えるのに必要な栄養が残った条件で実験を行なっています。

光島：ウサギの次はミニブタで行うのでしょうか。

佐藤：免疫応答の基礎的な研究なので、同種で動物実験という事でウサギくらいを考えています。先ほど冒頭にお示しした、大型動物で GLP をやらなくては行けないかという事とは別で考えて頂きたいと思います。出来れば GLP は回避したいなと思っておりますが、ヒト幹申請では回避できますでしょうか。

嶺北：個人的な意見ですが、何故 GLP がヒト幹申請で必要なのか疑問に思うところです。薬事レベルでも、それを求めることが可能なかが非常に議論のあるところです。大事なのは、動物愛護と安全性データの信頼性をどのように確保するかであると思います。

(4)「アレイ CGH 解析における軟骨培養細胞の安全性評価」

研究協力者 伊東紀子（DNA チップ研究所）

1 月 24 日に伺った薬事戦略相談の事前相談の個別面談について報告する。相談の目的は、アレイ CGH 解析法は診断薬・診断機器の扱いになるかという事である。安全性の評価法として、従来はウイルス・微生物検査法や G バンド分染法、造腫瘍否定試験があり、弊社としては新しい技術としてアレイ CGH 解析法を取り入れたいと思っている。方法は、東海大学より培養細胞のゲノム DNA を受領し、アレイ CGH 解析法によって過継代の差による異常の確認を行ない、検査解析結果を報告する受託解析となっている。相談の結果、このようなケースの場合は検査キットの販売事業ではなく、医師にデータを提供するサービスであるという事で、診断薬・診断機器の扱いとはならないという回答を頂いた。

アレイ CGH 実験の概要を説明する。アレイ CGH は 1998 年に開発され、これまでの方法より格段に解像度が上がった。安全性評価としての G バンド分染法の解像度は約 5 メガで、アレイ CGH は数 Kb から欠失や増幅がわかるツールとなっている。アレイ CGH とは、テストサンプル・リファレンスサンプルを 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－方向へプロットされる。全プローブの Log₂Ratio を Moving Average（移動平均）により可視化し、差異を検出する解析アルゴリズム Aberration Detection Method-2(ADM-2) 解析によりアベレーション（Log₂Ratio の変化が大きい）の領域を検出する。安全性検査に用いる実験プラットフォームは Agilent 社製の 1 枚に 8 アレイ載ったものを使用している。1 つのアレイには全染色体が網羅的に 6 万プローブ搭載されている。解析は Moving Average を 10pt とし、ADM-2 を用いる。検証実験としては、同様の実験を再度行う