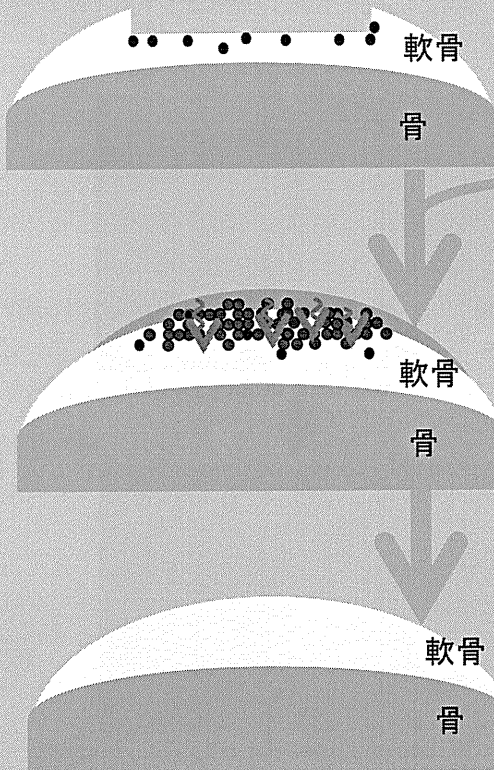


関節軟骨部分損傷の修復・再生機序



●● 修復機転に動員される細胞数の絶対的不足(自然治癒しない)

積層化細胞シート {
 ・軟骨細胞シート
 ・滑膜共培養軟骨シート

積層化細胞シートの役割

- 細胞シート由来細胞の動員
- ・ バリア機能を有する
 関節液中のカタボリックファクター進入を阻止
- ・ 軟骨保護作用を有する
 マトリックス中のプロテオグリカンの流出を阻止
- ・ 組織修復再生作用を有する
 優れた接着性
 成長因子供給源

良好な組織の修復・再生

・変形性関節症の治療への応用が期待できる



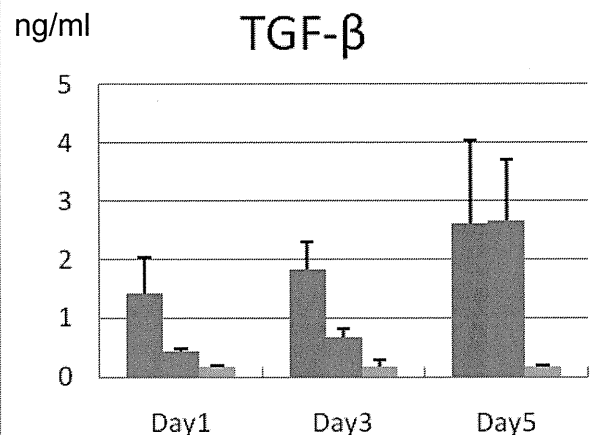
軟骨細胞シートの有する組織修復効果

Key Pathway(Relevant factors / Total factors)

- ・ TGFβ signaling pathway 13/19
- ・ Integrin-mediated adhesion 8/13

TGFβ (ELISA)濃度

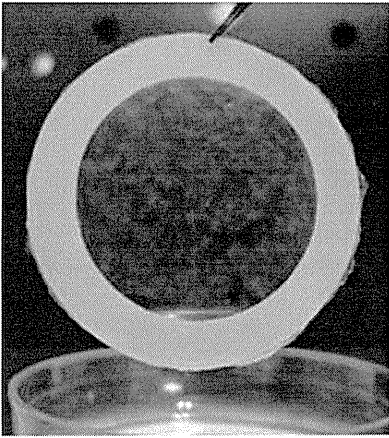
- : chondrocyte sheet A
- : chondrocyte sheet B
- : chondrocytes



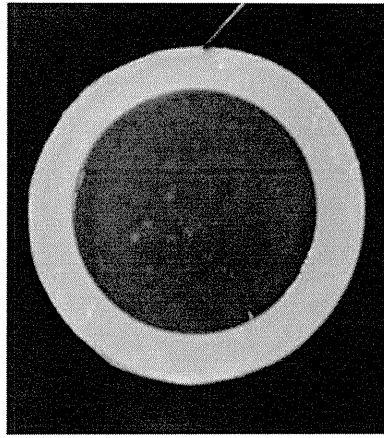
Hamahashi K, et al JTERM 2012 in press

積層化細胞シート 種差

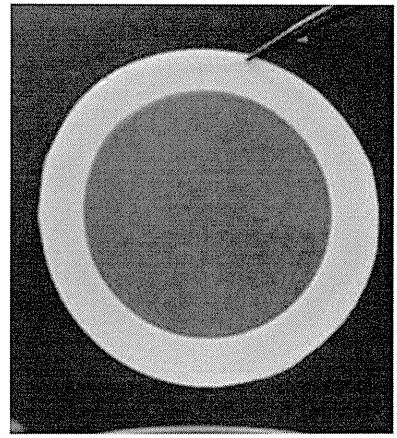
Rabbit



Mini Pig

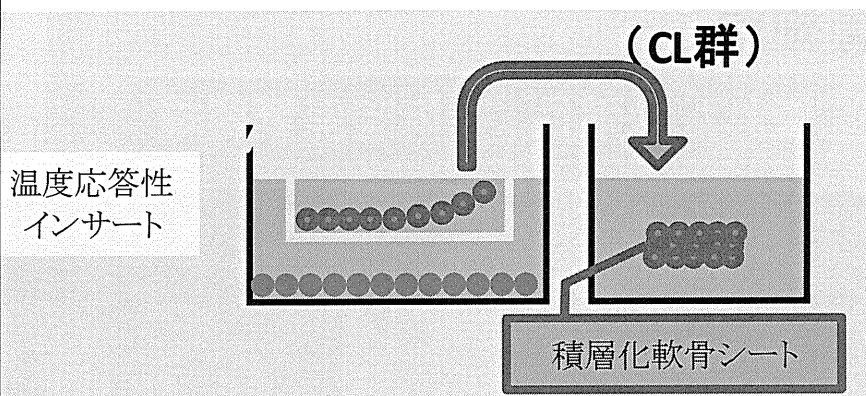


Human

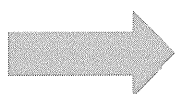


Kokubo M et al, Journal Tissue Eng Regener Med 2013 in press

積層化軟骨細胞シートの作製方法



温度応答性インサートを用いた滑膜細胞との共培養



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

IHC

A type II collagen



B Fibronectin-1



C IN α 10 (CD11c)



Alexa
594/DAPI
Scale: 10 μ m

Kokubo M et al, Journal Tissue Eng Regen Med 2013 in press

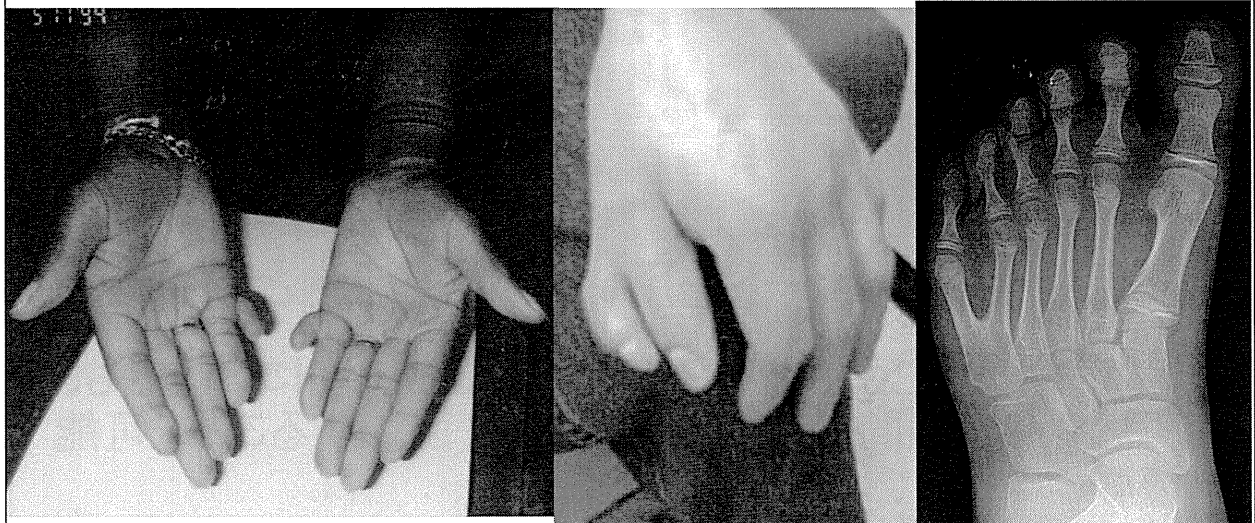
Polydactylysm

H24 細胞ソースの検討(同種)

同種細胞ソース

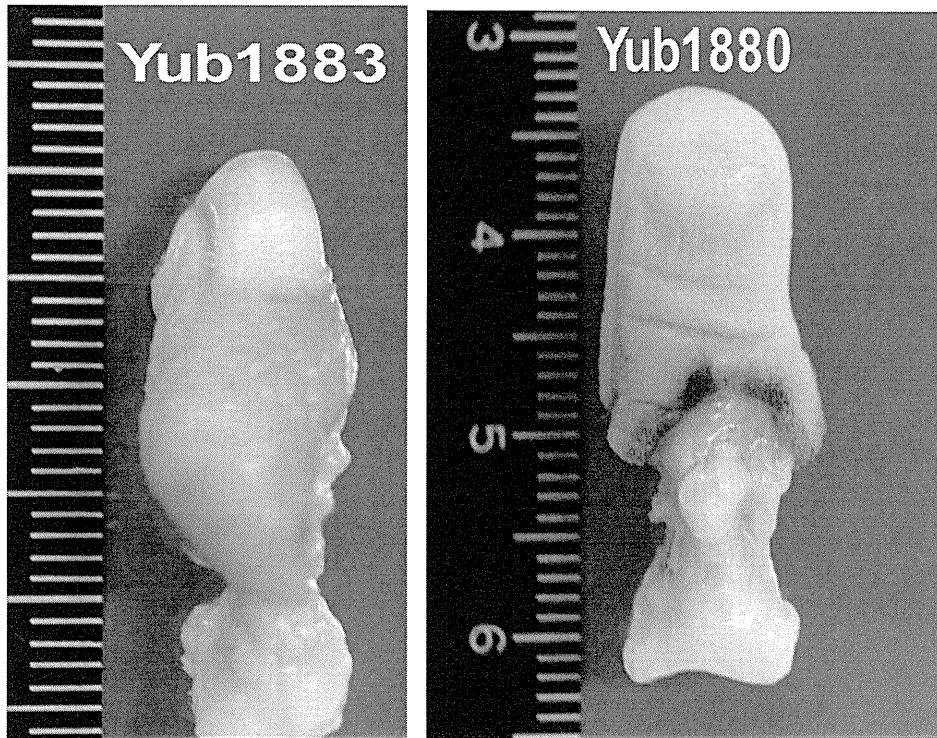
1. 多指症軟骨細胞

優れた増殖性、手術時廃棄組織



多指症手術切除検体

国立成育医療研究センター



1個の多指症手術時切除検体から 積層化細胞シートは何枚作れるか？

成育医療センターのストックリスト(年齢・部位・検体の大きさによりばらつきあり)

P0 : 1.00×10^6 cells ~ 9.00×10^6 cells

↓

P1 : 4.50×10^6 cells ~ 4.05×10^7 cells

4.5倍(経験値)

↓

P2 : 2.03×10^7 cells ~ 4.70×10^8 cells

4.5~11.6倍

↓

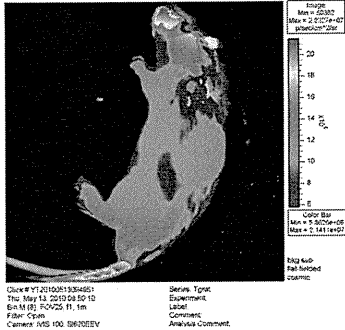
P3 : 9.11×10^7 cells ~ 4.98×10^9 cells

積層化細胞シート
約745枚分(P2)

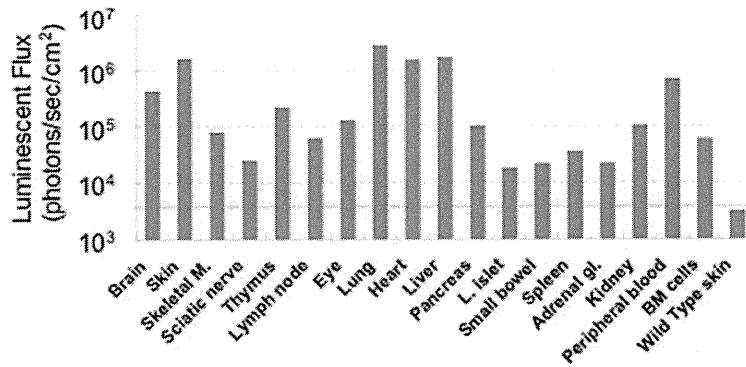
P0ストックを起こしてから約3週で
最大49億 cells に増殖(P3予測値)

積層化細胞シート
約7,904枚分(P3)

ROSA/luciferase Tg rat



大塚製薬(前自治医大教授)小林英司
先生が作製
プロモーター ROSA26
臓器移植実験の細胞ソースとして有用



関節内に移植された細胞シートは他に転移しない

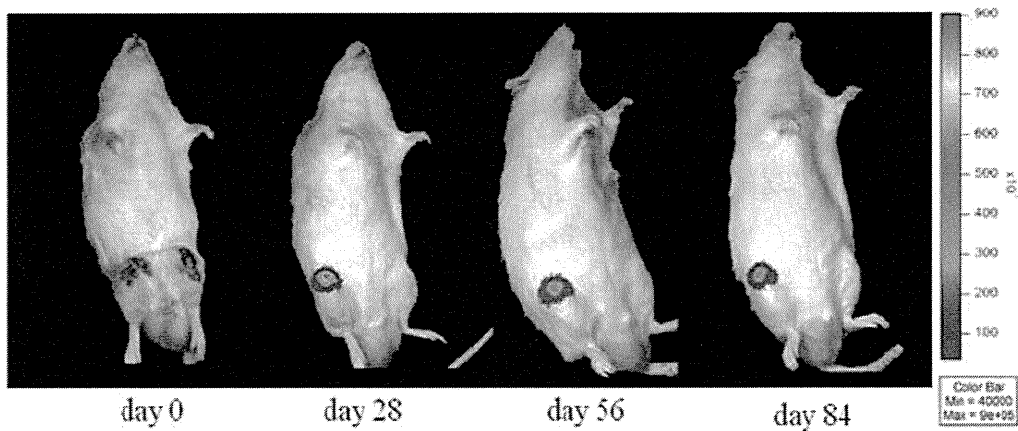


Fig. 1. CCD images of luciferase activity from the right knee joint of the rats after transplantation of the bioengineered luc^{s+} chondrocyte and luc^{s+} synovial cell sheets.
The color bar indicates photons/sec/cm²/sr.

移植された同種細胞シートは移植時と同様の発光強度のまま8週間以上関節内に滞在する

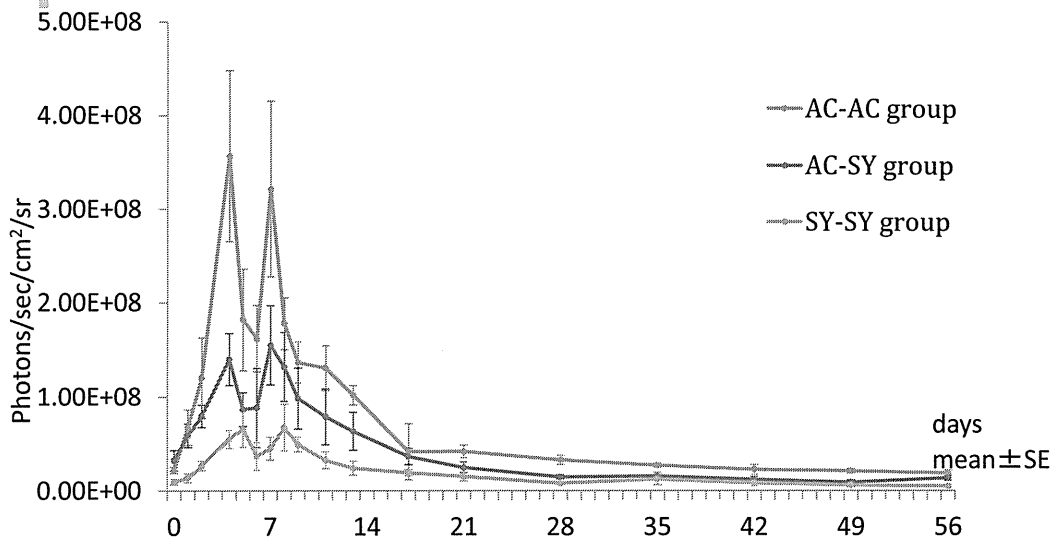


Fig. 2. Comparison of time-dependent changes in luciferase activity among the 3 groups.

AC-SY group: combination of chondrocyte and synovial cell sheets group,

AC-AC group: 2-layered chondrocyte sheets,

SY-SY group: 2-layered synovial cell sheets (n = 4 for each group). Data shown are the average maximum values of photons/sec/cm²/sr, and the bars represent SD.

低侵襲移植用治具の設計開発

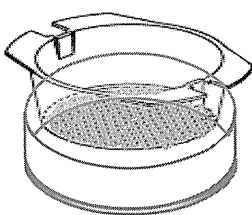
株式会社セルシードとの共同研究

H24~26年度 大面積創面への移植技術構築

温度応答性培養器材の開発

(検討課題)

- ・大型セルインサート形状設計
- ・多孔膜固定化
- ・温度応答性表面構築



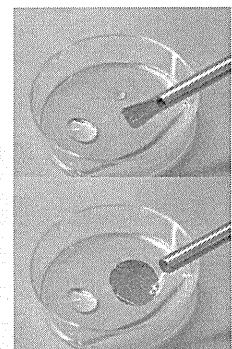
関節軟骨、関節滑膜
組織細胞の培養

H25~27年度 移植技術検討

細胞シート移植用治具の設計

(検討課題)

- ・細胞シートの捕捉方法
- ・細胞シート活性の維持
- 細胞シート移植用関節鏡基盤技術



軟骨細胞シート
捕捉

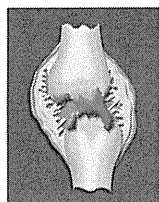
H26~28年度 移植治療実現検討

臨床研究データの有効利用

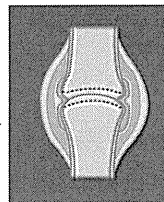
PMDAでの薬事戦略相談

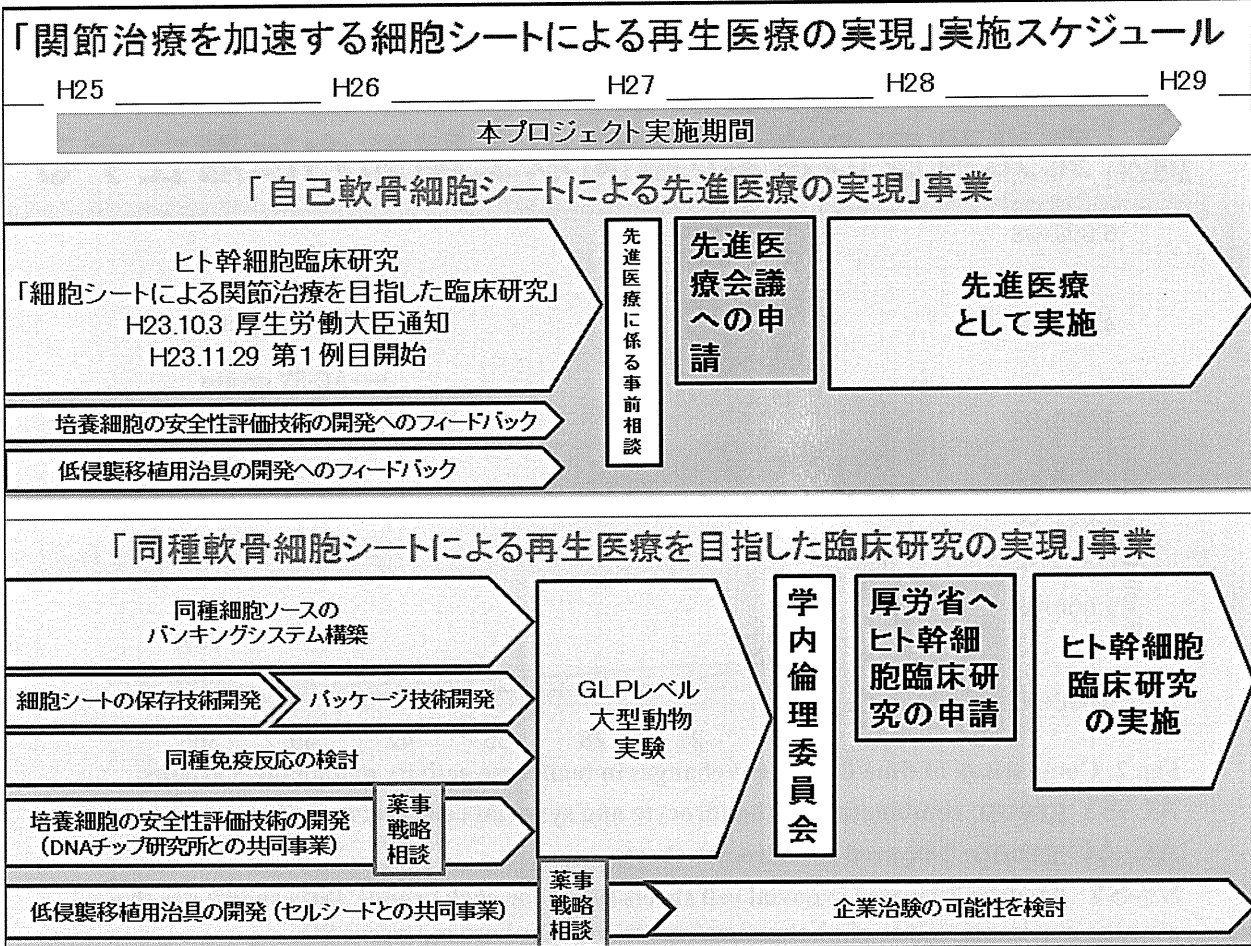
(可能性判断)

- ・先進医療における細胞シート製造民間委託
- ・軟骨細胞シート製造販売承認



軟骨細胞シート
移植





将来展望

【近未来】

- ・ ヒト幹細胞臨床研究として実施中の自己軟骨細胞シートによる臨床研究を速やかに完遂し、ヒトでのProof of Conceptを得て、先進医療として実施する。
- ・ 新薬事法下で同種細胞シートによる実用化戦略をさらに加速させ、周辺技術を整備し、低侵襲で短期間で完了する同種細胞シートによる関節治療を実現する。

【波及効果】

- ・ 本治療法は変形性関節症患者に対する治療体系を抜本的に改変するポテンシャルを有し、患者のADLとQOLの向上、ひいては国民の健康寿命の延伸に寄与する(関節疾患の要支援原因疾患第1位からの脱却)。

ありがとうございました



TOKAI Univ. Hospital, Isehara, JAPAN

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

同種細胞シートの保存に関する研究： ウサギ・ブタ軟骨細胞シートのガラス化保存

明治大学 発生工学研究室
前原美樹 長嶋 比呂志

研究の背景

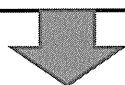
軟骨細胞シートの凍結保存

Allograft移植の促進

療用シートのストックや流通システムが不可欠

Autograft移植

シート作製と移植実施時期の調整が容易
治療の反復にも利用可能



現状: 実用的な細胞シート凍結保存法がない

ガラス化液の組成

◆基礎培地

20mM HEPES 含 TCM199 medium + 20% Calf Serum

◆凍害保護剤

浸透性凍害保護剤:

DMSO, Ethylene glycol (EG)

非浸透性凍害保護剤:

Sucrose, カルボキシル化ポリリジン(COOH-PLL)

◆使用濃度

平衡液:

・10% DMSO + 10% EG もしくは 20% EG

ガラス化液:

・20% DMSO + 20% EG もしくは 40% EG

・0.5M Sucrose

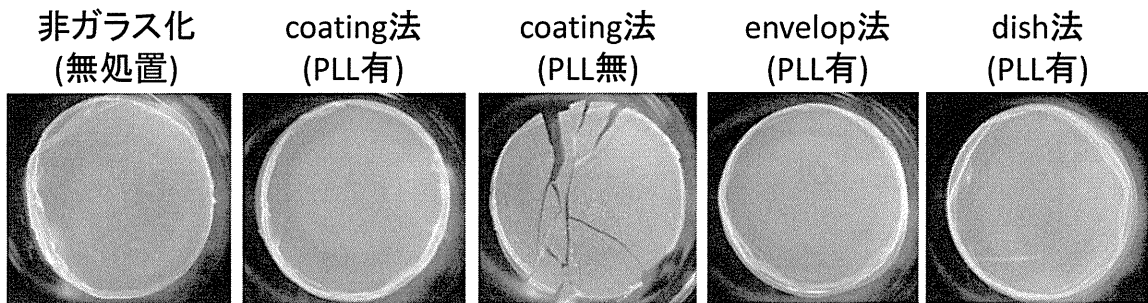
・10% COOH-PLL

細胞シートのガラス化技術確立の要件

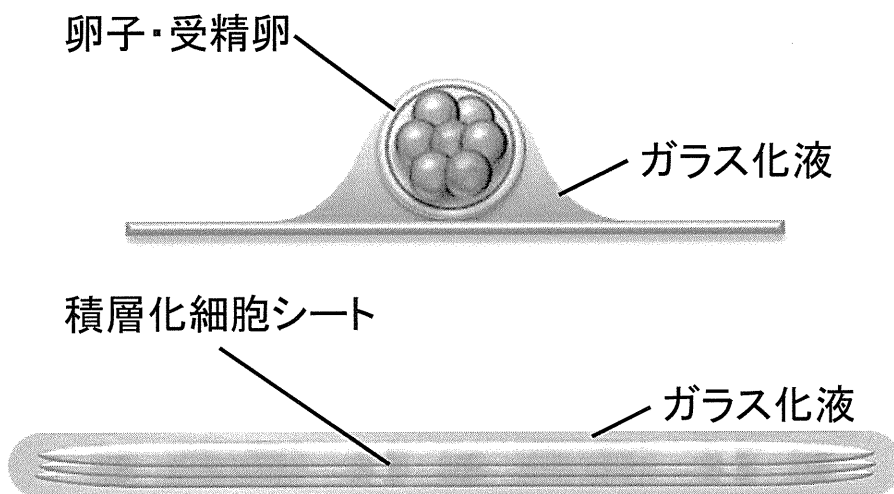
- シート形状の維持
- 細胞生存性
- 微細構造の維持
- ECM成分の維持
- 機能成分の生産能の維持
- 軟骨損傷治癒機能の維持

前年度までの成果

- ① 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方法を開発した(coating法; 特願2011-260318)。
- ② 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方法の基礎を確立した(envelop法)。



Minimum Volume Cooling(MVC) concept

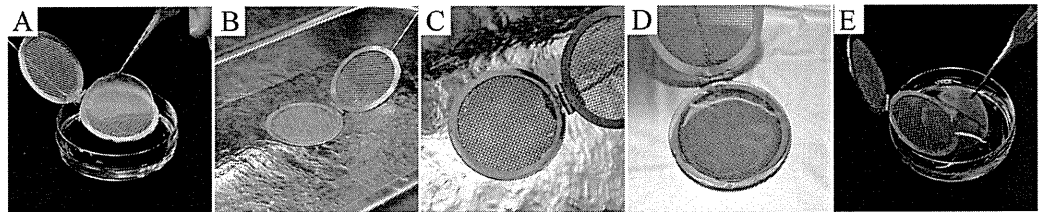


今年度の研究成果

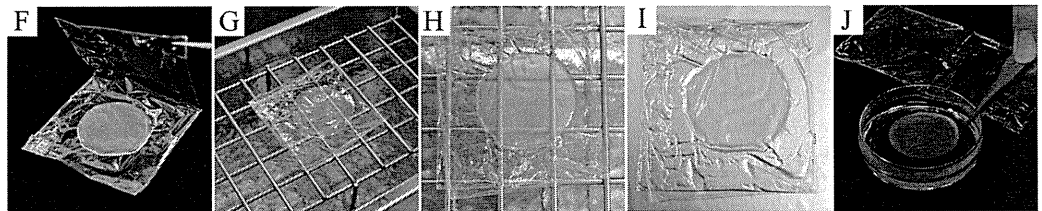
- 再現性の確認
- ガラス化後の細胞シートの正常性
→ECMの解析
- 他種シートへの適用拡大
→ブタ軟骨細胞シートで実施
- 凍害保護剤の検討
→EG単独での効果の検討(DMSO不使用)

細胞シートのガラス化法

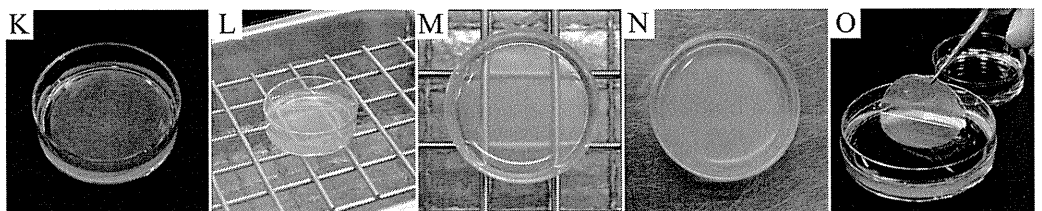
coating法



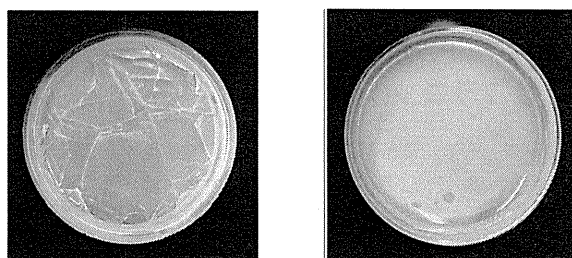
envelop法



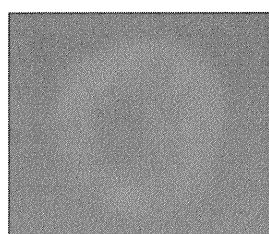
dish法



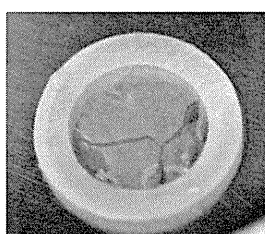
カルボキシル化ポリリジンのガラス化安定化効果



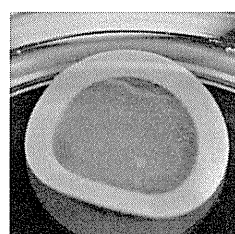
液体窒素への直接浸漬による細胞シートの破損



液体窒素に浸漬した細胞シート



融解後の細胞シート



非ガラス化細胞シート

細胞シートガラス化法の再現性の確認

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

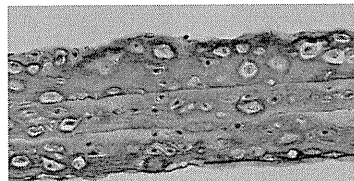
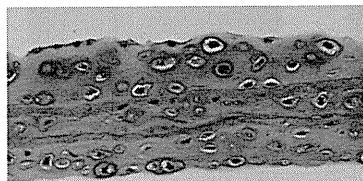
^{a-c}同列内異符号間に有意差あり(p<0.05)

ガラス化後の細胞シートのECM成分は維持されている

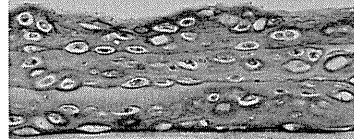
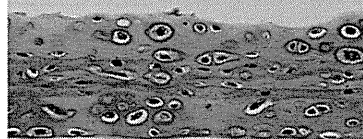
酸性プロテオグリカン
(サフラニンO染色)

Type II コラーゲン
(ヒトType II コラーゲン抗体
を用いた免疫染色)

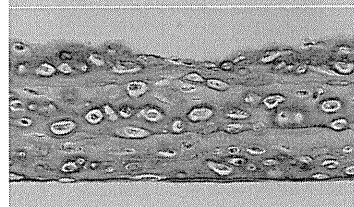
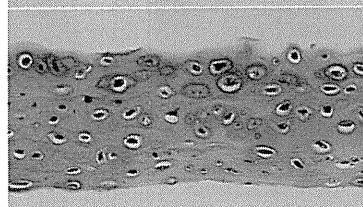
非ガラス化



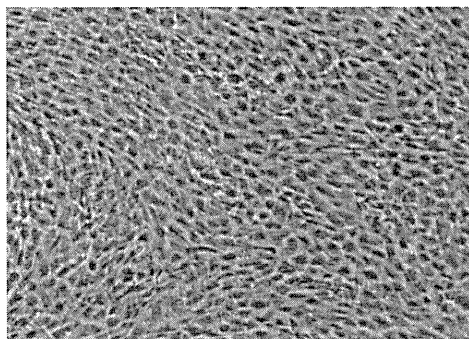
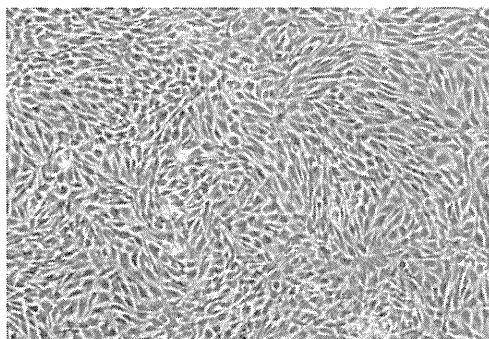
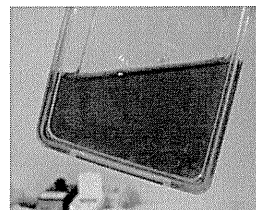
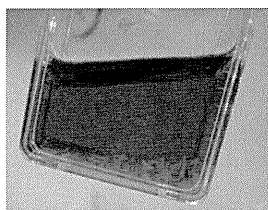
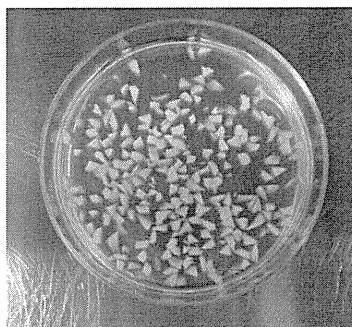
coating法



envelop法



ブタ軟骨組織からの細胞樹立およびシートの作製



P0

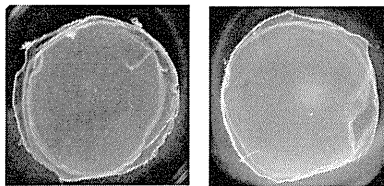
P2 (積層化直前)

ブタ軟骨細胞シートのガラス化保存(Coating法)

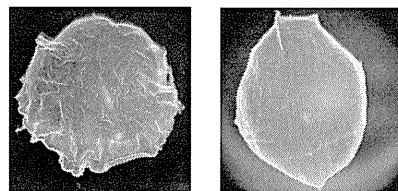
表2. 積層化ブタ軟骨細胞シートのガラス化(coating法)後の形態維持および細胞生存性

	供試枚数 (n数)	破損なく回収された シートの枚数 (%)	平均細胞 生存率 (%)
ガラス化区	3	3/3 (100)	92.2
非ガラス化区	2	2/2 (100)	93.1

ガラス化後の細胞シート



非ガラス化区の細胞シート



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

凍害保護剤	供試枚数	融解後のシートの様子	
		破損無および 軽微な亀裂	破損
EG	4	3	1
EG+DMSO	4	3	1

EG

EG+DMSO

破損無し

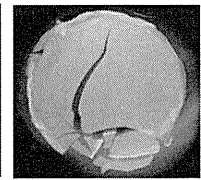
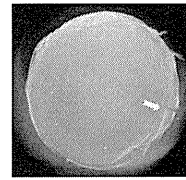
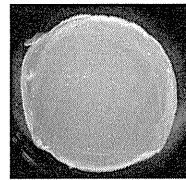
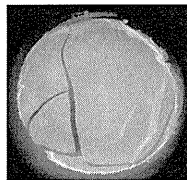
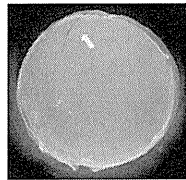
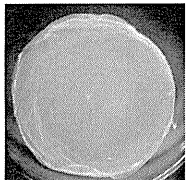
軽微な亀裂

破損

破損無し

軽微な亀裂

破損



来年度の計画

研究目的

実用的な細胞シートガラス化法の確立

研究計画

2013年度

- ・臨床応用を踏まえたパッケージング素材の検討
- ・実用的な細胞シートの凍結保存システム(装置を含む)の開発

ガラス化細胞シートの機能試験(ウサギへの移植試験)

実用的なガラス化デバイスの開発

↓
ヒト細胞シートへの応用

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業 H24-再生-一般-003
「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

同種細胞シートの特性と安全性に関する研究 —積層化軟骨細胞シートの同種T細胞におよぼす影響—

2013.3.22(金)
パシフィコ横浜 会議センター4階(411号室)

国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 加藤玲子

研究の背景・目的

これまでに、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて明らかにしてきた。しかしながら、本技術の将来的な普及を考えると同種細胞移植でないと難しい。

同種細胞利用の利点

- ・ 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。
- ・ 同一ドナーからの細胞だと、細胞の品質(情報)が予め分かる。

同種細胞移植において懸念される問題

- ・ 拒絶反応を引き起こす可能性がある。



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かの詳細な報告はない。そこで本研究では、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

間葉系幹細胞(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。また、MSCを*in vitro*で軟骨細胞に分化させて、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はある。(Rheumatology 2008;47:22-30)では、生体から取り出した軟骨細胞ではどうか？



これまでの成果

- マウス軟骨細胞は同種異系マウスリンパ球の活性化を惹起しなかった。さらに、マウスリンパ球とマウス樹状細胞を用いたリンパ球混合培養(MLR)において、マウス軟骨細胞が活性化リンパ球の増殖を抑制することを示した。(第24回日本軟骨代謝学会:P2-2 2011)
- 市販ヒト軟骨細胞(NHAC)およびその積層化シートが市販ヒトT細胞(CD4⁺TC)の活性化を惹起しないだけでなく、CD4⁺TCと市販ヒト樹状細胞(NHDC)を用いたMLRでのT細胞の増殖を抑制できることを示した。(第11回日本再生医療学会総会: C-6-33 2012)

材料・方法

細胞:ヒト末梢血由来CD4⁺T細胞(CD4⁺TC)および正常ヒト樹状細胞(NHDC)(Lonza社)
ヒト膝関節軟骨細胞(AC)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人工関節置換術時に得られた軟骨組織から分離したものを使用した。(23歳 ♂: 23M, 33歳 ♂: 33M)

温度応答性培養皿: UpCell® Cell culture Insert (セルシード社)

細胞増殖測定: Cell Proliferation ELISA, BrdU(chemiluminescence) kit (Roche社)

TGF-β1測定: Quantikine® ELISA Human TGF-β1 (R&D Systems社)

積層化細胞シート作製: ACをUpCell® Cell culture Insert に 2.1×10^5 播種し、培養14日目に3層に積層化し7日間培養した。

細胞培養: 12 well plateで培養を行った。(実験系1および実験系2の図参照)

1: CD4⁺TC(2.2×10^6)とNHDC(3.3×10^5)による混合リンパ球培養反応(MLR)

2: CD4⁺TC(2.2×10^6)と積層化ACシートの共培養

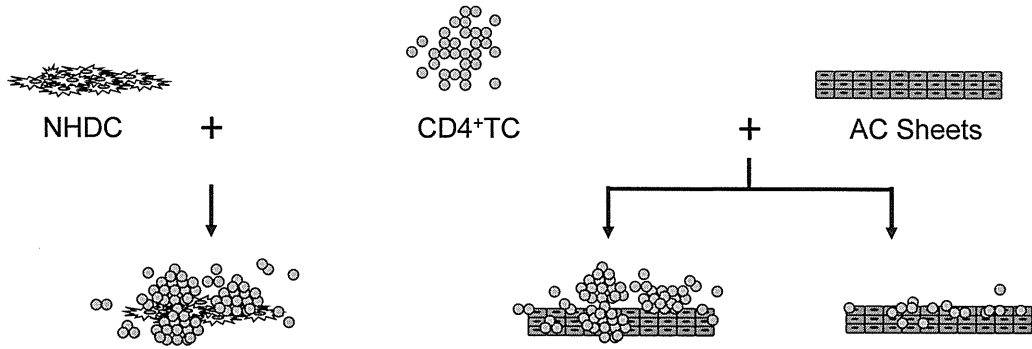
3: MLCと積層化NHACシートの共培養

いずれの培養系も培養3,4日目に半量の培地交換を行った。

細胞増殖実験: 培養5日目に実験系1では上記1と2の間で、実験系2では上記1と3の間でT細胞の増殖を比較した。

TGF-β1測定: 培養3日目の培養上清で測定した。

実験系1—同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響—



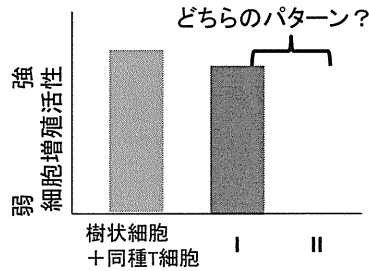
NHDCとCD4+TCの共培養
(アロ反応)を陽性対照とする

I: AC SheetsがCD4+TCの活性化
を起こす場合

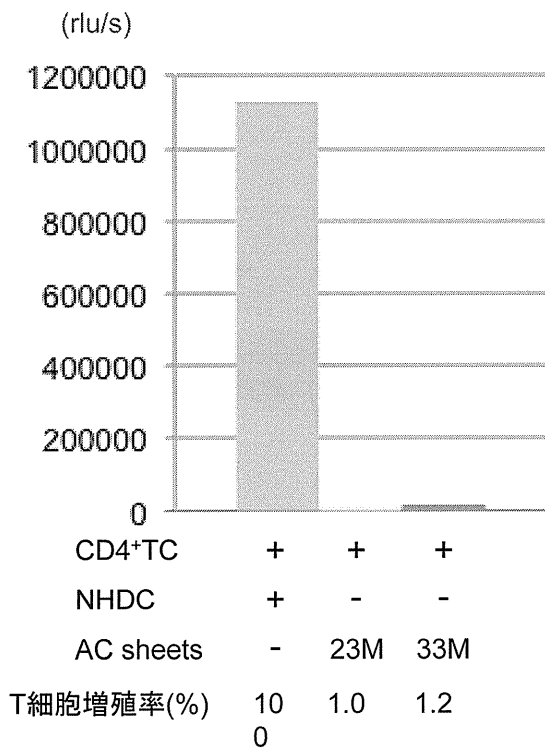
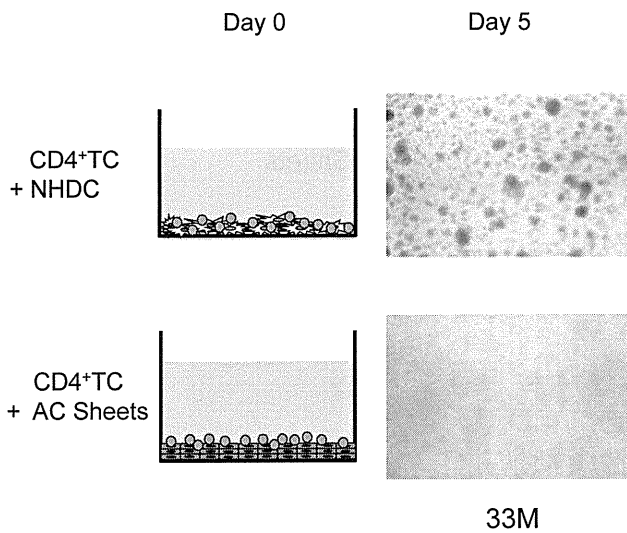
II: AC SheetsがCD4+TC
の活性化を起こさない場合

[細胞増殖解析]

増殖している細胞をBrdUで
標識し、それらを検出するこ
とで、細胞増殖の強弱を測
定する。



同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響



積層化同種ACシートは
T細胞を活性化しない

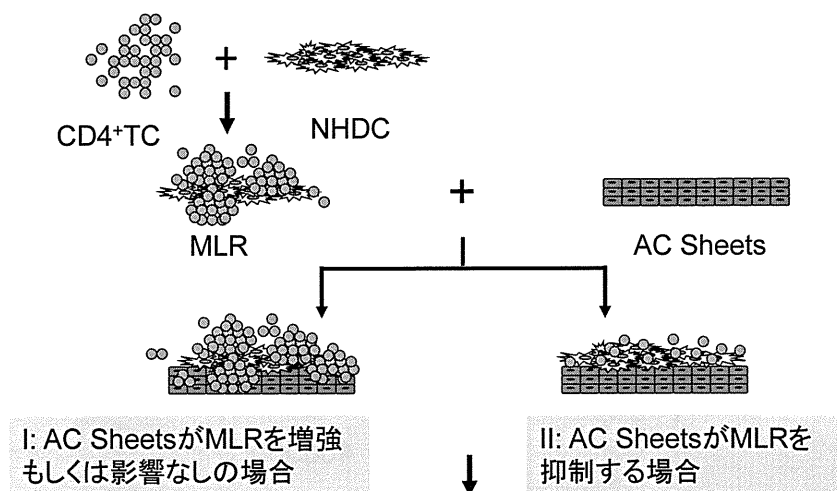
MSCはT細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞を含む種々の免疫細胞の機能（活性化や分化など）を抑制するとの報告がある。

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。



同種軟骨細胞が活性化T細胞に与える影響を検討する。

実験系2—同種軟骨細胞シートがMLRにおよぼす影響—



[細胞増殖解析]

