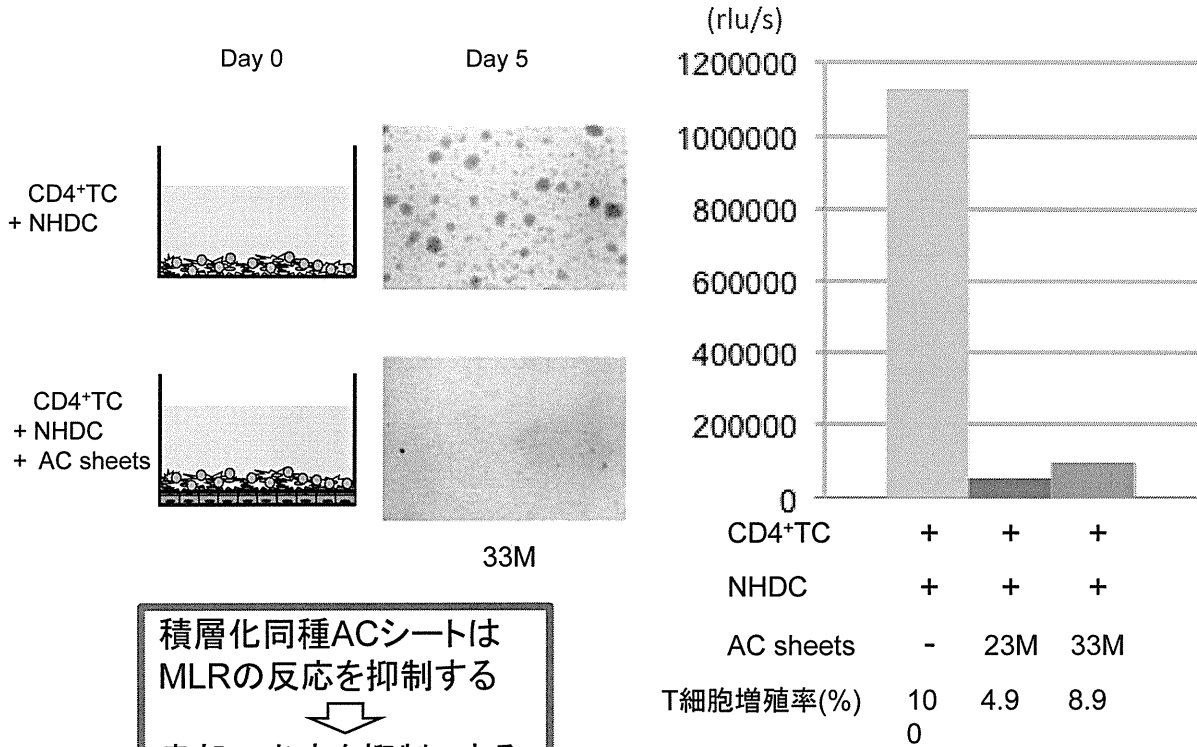


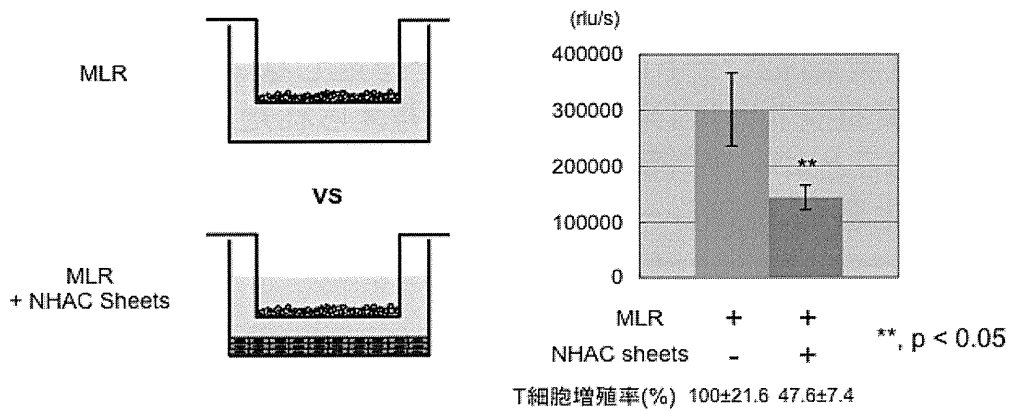
同種軟骨細胞シートがMLRにおよぼす影響



積層化同種ACシートはMLRの反応を抑制する
 ↓
 患部の炎症を抑制できる可能性を示唆

| | | | |
|-----------|----|-----|-----|
| CD4+TC | + | + | + |
| NHDC | + | + | + |
| AC sheets | - | 23M | 33M |
| T細胞増殖率(%) | 10 | 4.9 | 8.9 |
| | 0 | | |

積層化市販軟骨細胞シートが物理的に分離されたMLRにおよぼす影響

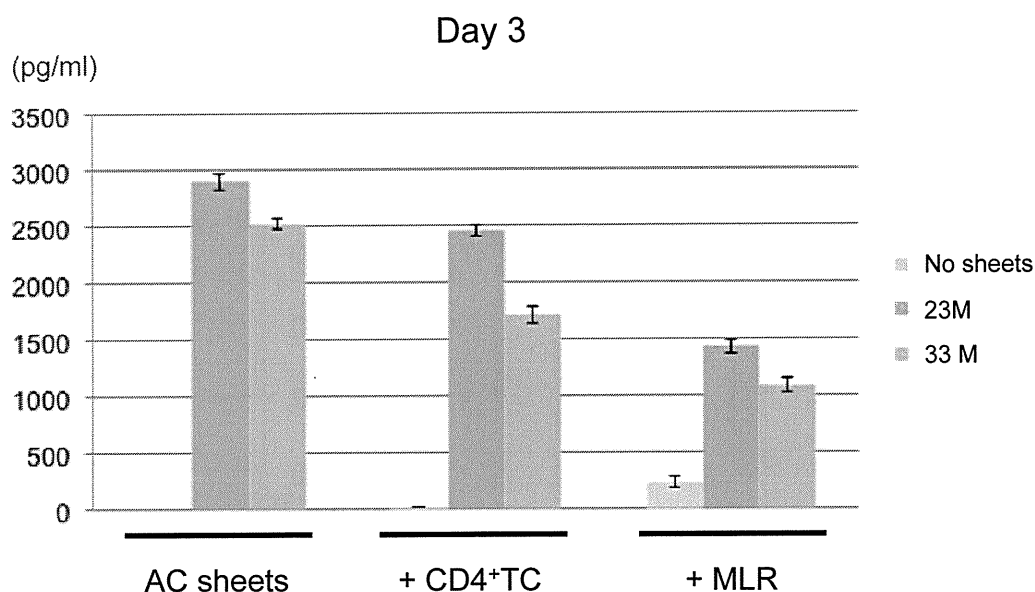


積層化NHACシートは物理的に分離したMLRの反応を抑制できる

↓
 液性因子の関与を示唆

↓
 TGF-β1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-β1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、TGF-β1を測定した。

培養上清中のTGF- β 1量



積層化同種AC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

結論

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。



H25年度では

in vitro: ACでの再現性の確認と多指症患者由来軟骨細胞シートがACと同様の性質を持っているかの検討を行う。

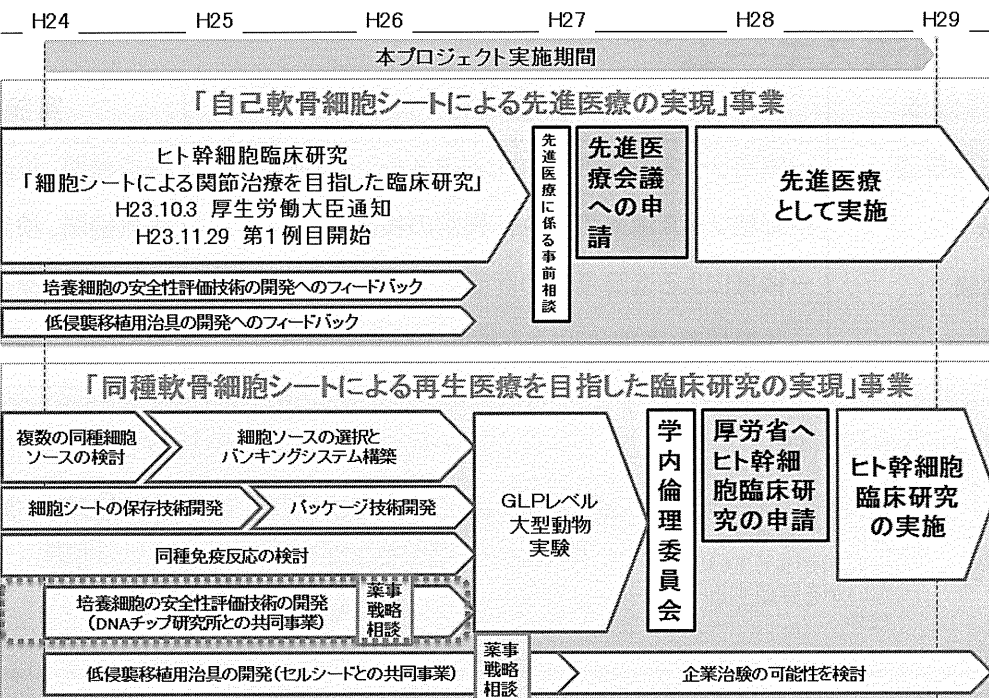
in vivo: ウサギ同種異系間での積層化軟骨シート移植を行い、免疫応答に対する影響の検討を開始する。

→H26年度以降も短期、中期、(長期)の経過観察を行う。

アレイCGH解析による 軟骨培養細胞の安全性評価

DNAチップ研究所
伊東 紀子

「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」ロードマップ



薬事戦略相談 個別面談

- ・アレイCGH解析法は、
診断薬・診断機器の扱いになるか？

2013年1月24日
医薬品医療機器総合機構(PMDA)
薬事戦略相談 個別面談

薬事戦略相談 個別面談

安全性評価法スキーム

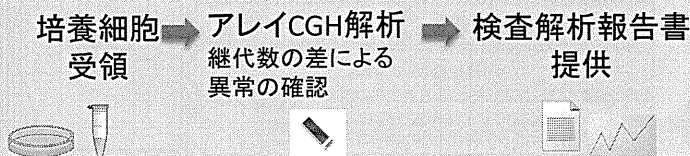
| 安全性評価法 | 評価内容 | 実施者 |
|------------|------------------------|------------|
| ウイルス・微生物検査 | →細胞ソース及び培養中コンタミネーション検査 | 医療機関、検査会社等 |
| Gバンド分染法 | →細胞ソース由来の染色体異常の検出 | 医療機関、検査会社等 |
| 造腫瘍否定試験 | →移植による造腫瘍性の評価 | 医療機関、検査会社等 |
| アレイCGH解析法 | →長期培養(過継代)による染色体異常の検出 | 医療機関、受託機関 |

アレイCGH解析法



培養細胞(過継代)のDNAに微細ゲノム異常が生じていないかを評価する技術

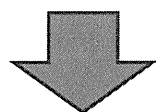
アレイCGH解析法の受託解析



※医療機関(東海大学病院)からの受託として実施する

薬事戦略相談 個別面談

- ・アレイCGH解析法は、
診断薬・診断機器の扱いとなるのか？



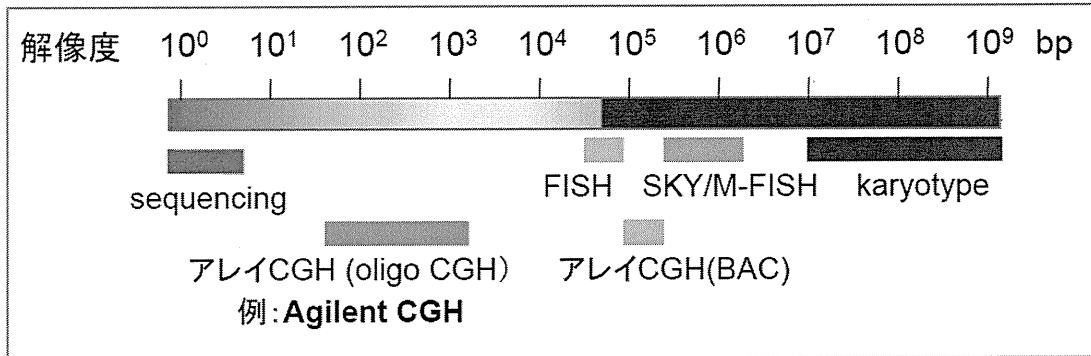
本アレイCGH解析は、医師にデータを提供するサービスである。(検査キット販売事業ではない)
診断薬・診断機器の扱いとはならない。

アレイCGH

実験・解析概要

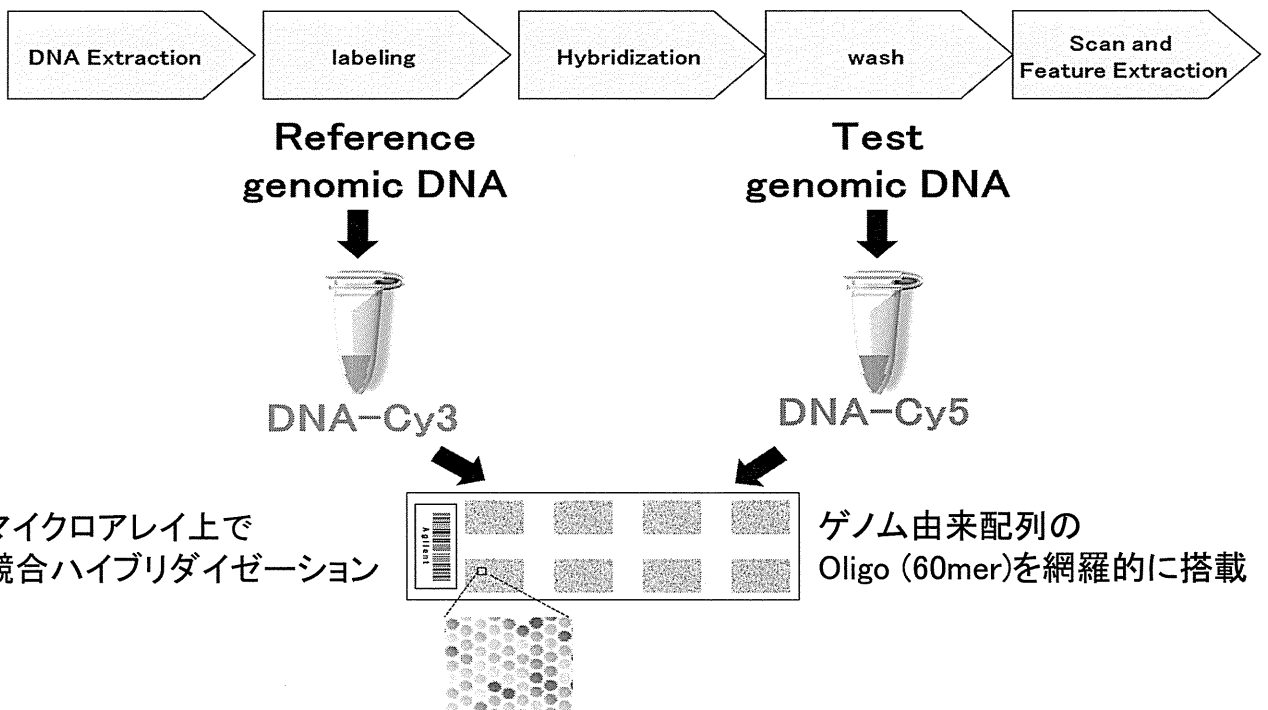
ゲノム構造異常解析技術の発展

- 1959年 Down症候群の第21番染色体トリソミーの発見
- 1970年 Q分染法の開発
- 1986年 FISHによる染色体マッピングの最初の報告
- 1992年 染色体CGHの開発
- 1996年 ヒト24種類の染色体を色分けするSKY/M-FISHの開発
- 1998年 アレイCGHの開発



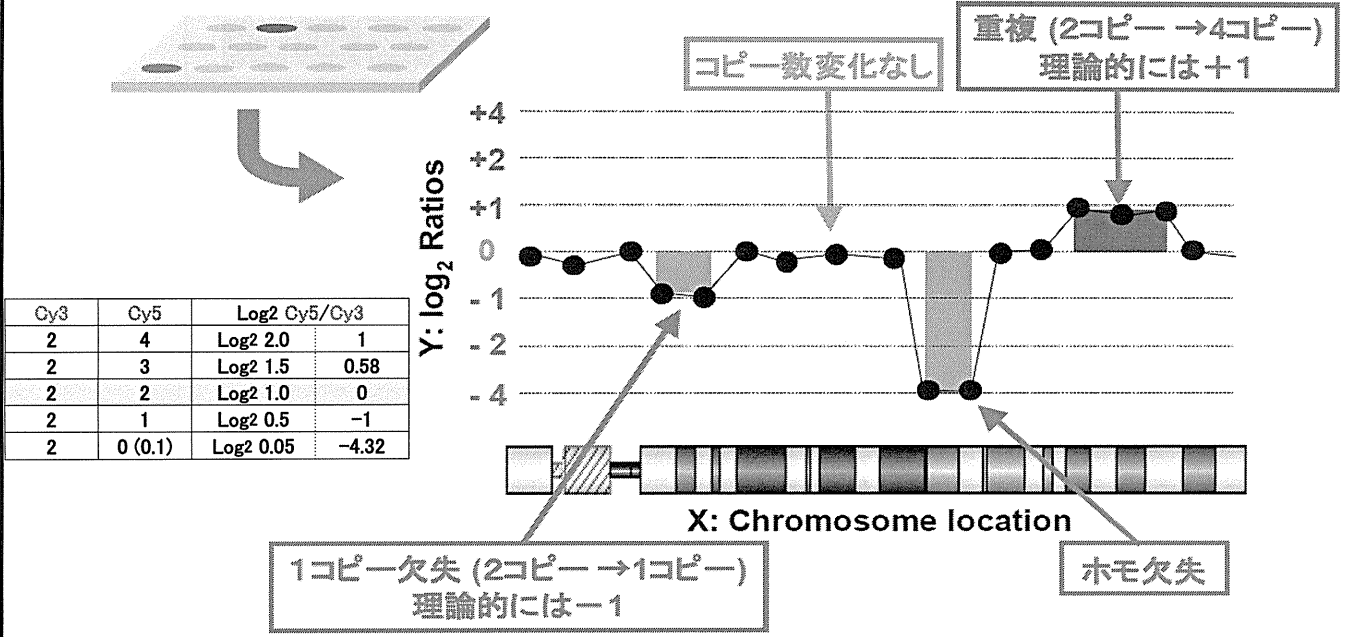
CGH: comparative genome hybridization

アレイCGH 実験概要



データ解析概要

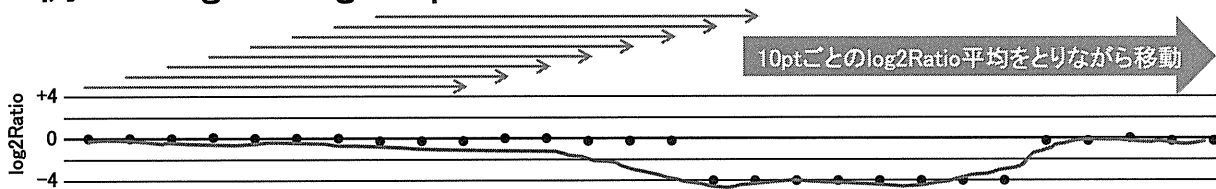
Cy5/Cy3 比をLog2に変換し画面に表示



データ解析概要

Moving Average (移動平均)

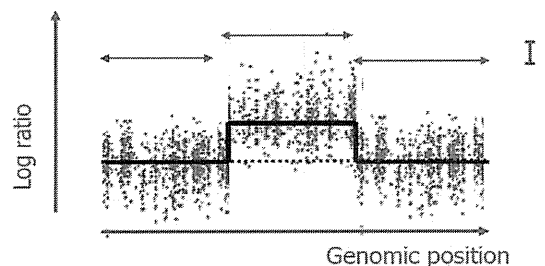
例: Moving Average 10pt



差異を検出する解析アルゴリズム

Aberration Detection Method-2

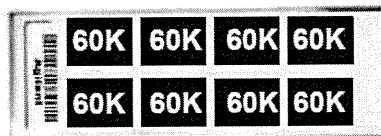
LogRatioの変化が大きい領域を検出



実験解析概要

実験プラットフォーム

Agilent SurePrint G3 Human
CGH Microarray 8 × 60K



塩基配列基準データベース:UCSC Human Genome build hg19

Moving Average (移動平均)

10pt

差異を検出する解析アルゴリズム

Aberration Detection Method-2

検証実験概要

再現性の確認

同様の実験をもう一度行い、結果を比較する。

色素入れ替え(dye swap)

標識蛍光色素を入れ換えてコントロールをとる方法。

結果が逆転していることを確認する。

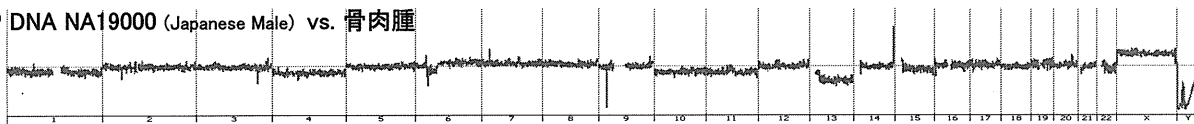
同プラットフォームによる

コピー数変化の例

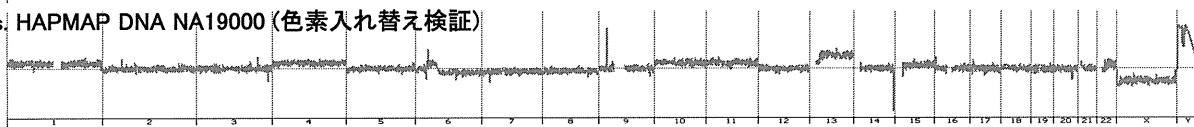
Moving Average 10pt

正常DNA vs. 骨肉腫DNA

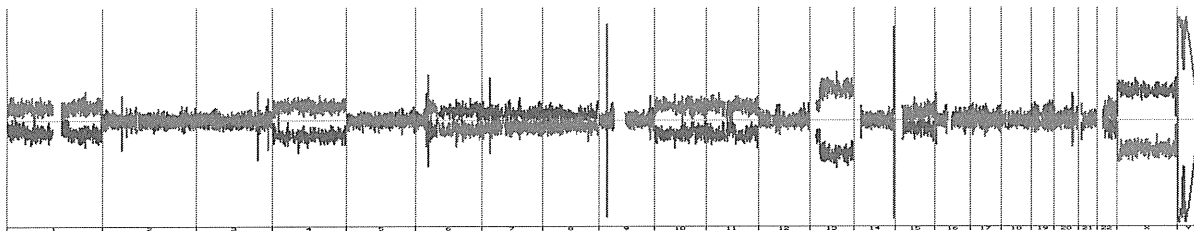
HAPMAP DNA NA19000 (Japanese Male) vs. 骨肉腫



骨肉腫 vs. HAPMAP DNA NA19000 (色素入れ替え検証)



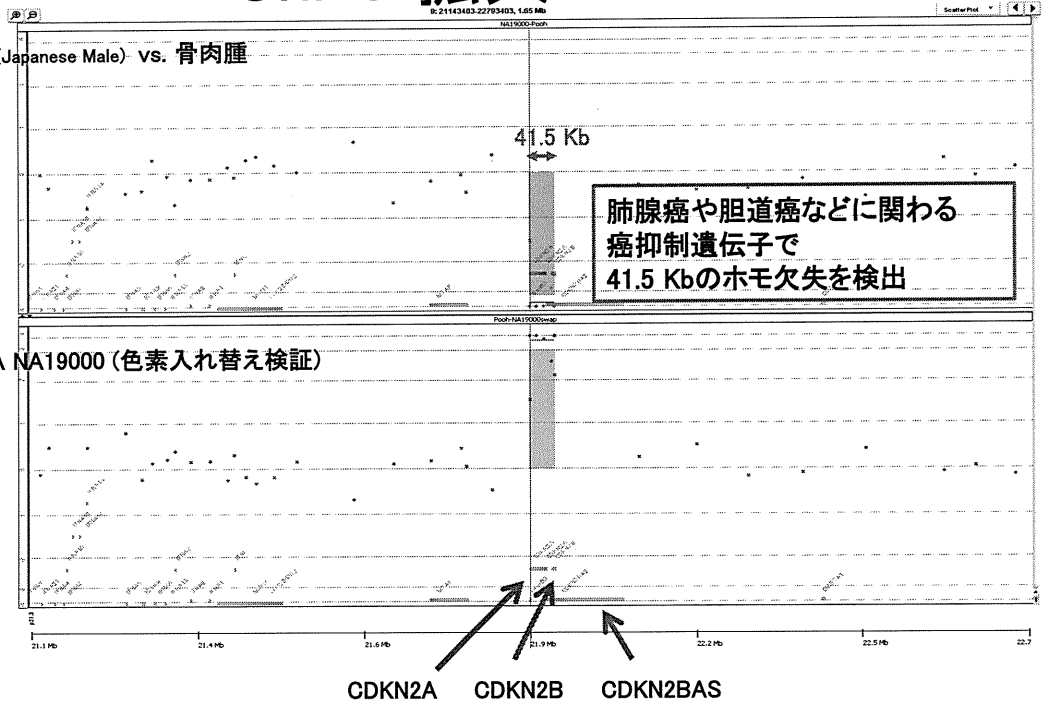
重ね合わせると反転した結果になっている



Aberration Detection Method-2解析の結果、19領域検出された。

Chr 9 拡大

HAPMAP DNA NA19000 (Japanese Male) vs. 骨肉腫



本研究事業における役割・課題

- ・アレイCGH解析法を軟骨培養細胞の安全性評価に応用 (passage2 vs. 過継代)
- ・安全性評価に適したアルゴリズム・閾値の検討
- ・安全性評価に適したカスタムアレイの開発 (網羅的 + がん関連遺伝子を高密度に搭載)

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」

自己培養軟骨細胞の 安全性評価技術に関する研究

岡田恵里*1 佐藤正人*1 小林美由希*1 河毛知子*1
横山宗昂*1 小久保舞美*1 三谷玄弥*2 高垣智紀*1
的場亮*3 伊東紀子*3 持田讓治*1

- *1 東海大学医学部外科学系整形外科学
- *2 東海大学医学部附属大磯病院整形外科
- *3 株式会社DNAチップ研究所

要約

目的

自己培養軟骨細胞をシート化する際、
安全性を評価するために適した試験評価方法を
確立する。

結果

自己培養軟骨細胞は、試験評価法を通じて安全
であると確認できた。

評価項目

- **造腫瘍性否定試験**
→腫瘍形成の有無を確認
- **Gバンド分染法**
→細胞の染色体異常の有無を確認
- **Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)解析**
→細胞の培養による影響を確認

造腫瘍性否定試験

～H23年度

腫瘍形成の有無を確認

•自己軟骨細胞シート移植(TKA)

→造腫瘍性は認められなかった。

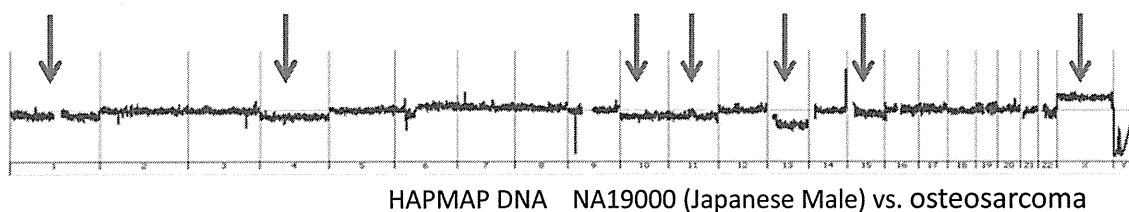
完了

aCGH

- 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
- 網羅的な解析
- 解析レベル: ADM-2(10pt)
- チップサイズ: 8 × 60K
- DNA量: 250ng

→細胞培養中の変化の有無を確認する

例)骨肉腫



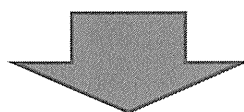
aCGH

H23年度

- 継代数: Passage2, Passage4, Passage6; P2,P4, P6
- 種類: 正常軟骨—Anterior Cruciate Ligament Reconstruction; ACL-AC(4)
患者軟骨—Total Knee Arthroplasty; TKA-AC(3)
- 組み合わせ: 再試験

P2-P4, P4-P2 dye swap

P2-P6, P6-P2 dye swap



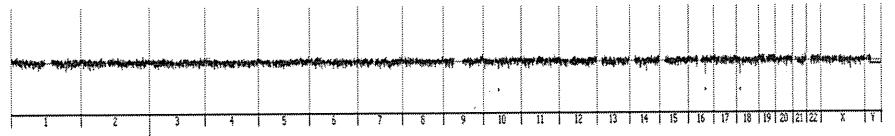
H24年度

- 継代数: P2, P4, P6, P12
- 種類: TKA-AC(4)
- 組み合わせ: P2-P4, P4-P2 dye swap
P2-P6, P6-P2 dye swap
P2-P12, P12-P2 dye swap

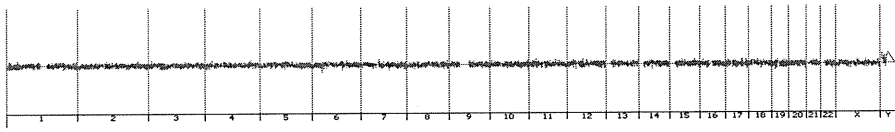
aCGH

ACL-AC

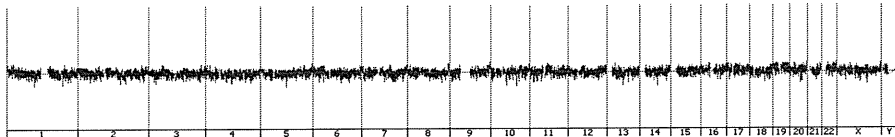
P2 vs.P4



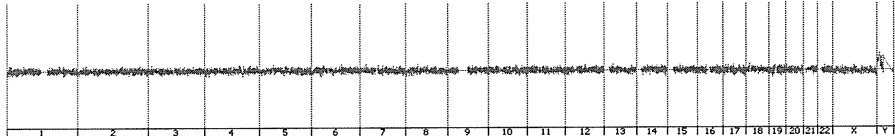
P4 vs.P2 swap



P2 vs.P6



P6 vs.P2 swap

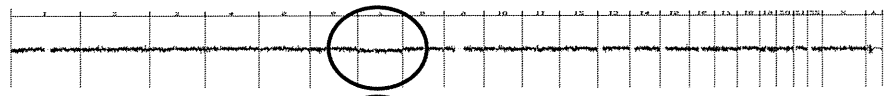


染色体コピー数の異常は認められなかった。

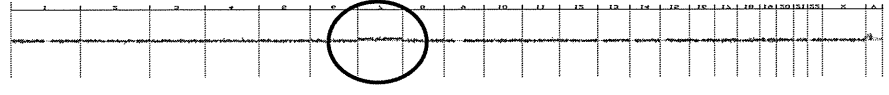
aCGH

TKA-AC

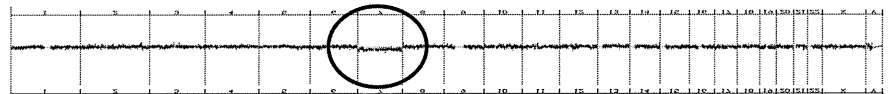
P2 vs.P4



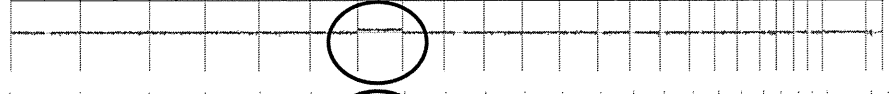
P4 vs.P2 swap



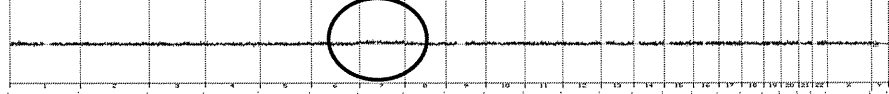
P2 vs.P6



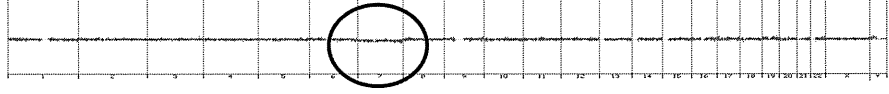
P6 vs.P2 swap



P2 vs.P12



P12 vs.P2 swap



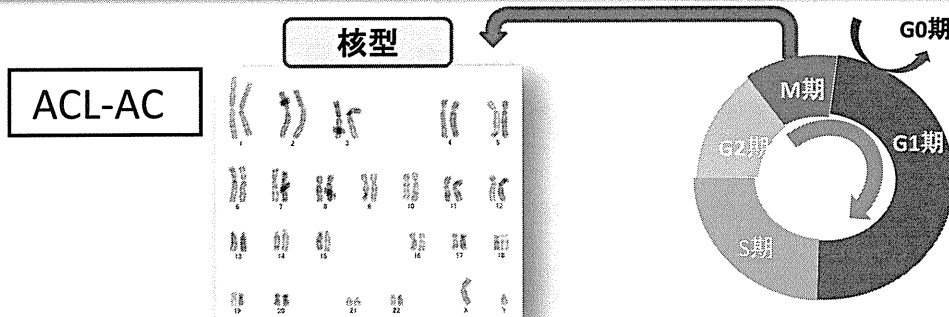
OAに起因する7番染色体の異常*を認めた以外、
染色体コピー数の異常は認められなかった。

(*Castellanos et al, Osteoarthritis cartilage 12,982-985,2004)

Gバンド分染法

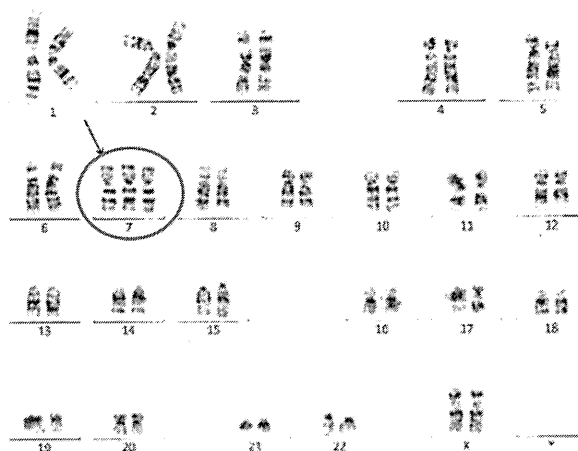
- 継代数: P2, P4, P6, P12
- 種類: 正常軟骨; ACL-AC(3)
患者軟骨; TKA-AC(2)
- 細胞分裂中期(M期): 20細胞解析
- 解析バンドレベル: 300~400bp
- 異数性の検出
- 転座、欠失等の染色体異常を検出

→患者由来の細胞の染色体異常を確認



Gバンド分染法

TKA-AC



OAに起因する7番染色体トリミー以外は培養過程で継続的に観察される染色体異常は認められなかった。

結果

- **造腫瘍性否定試験**
腫瘍形成の有無を確認
→認められない
- **Gバンド分染法**
細胞の染色体異常を確認
→OA症状以外の異常は認められない
- **Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)解析**
細胞培養中の影響を確認
→影響は認められない

自己培養軟骨細胞の安全性は確認された

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」

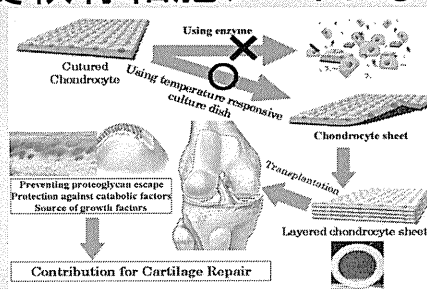
Array Comparative Genomic Hybridization 及びGバンド分染法を用いた 同種軟骨細胞の安全性評価

- ▶
- ▶ 小林美由希*1横山宗昂*1 佐藤正人*1 高垣智紀*1
- ▶ 河毛知子 *1 岡田恵里*1
- ▶ 阿久津英憲*2 伊東紀子 *3 的場亮 *3
- ▶ 梅澤明弘*2 持田讓治*1

- ▶ *1 東海大学医学部外科学系整形外科学
- ▶ *2 国立成育医療研究センター研究所
- ▶ *3 株式会社DNAチップ研究所

目的

自己培養軟骨細胞シートによる関節治療



(臨床研究にて現在進行中)

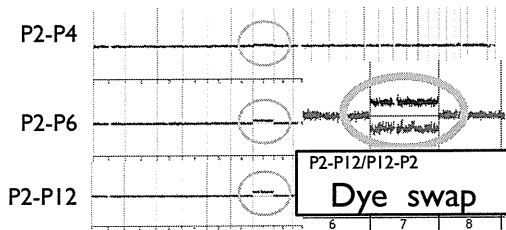
軟骨細胞シートの普及を目指して
同種培養軟骨細胞シート移植が必要

細胞ソースとしての安全性

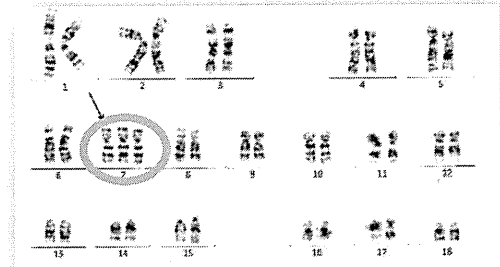
自己軟骨細胞シート移植で 参考データとして用いたTKA-AC問題点

自己細胞

- ・ OAによるtrisomyなどの変異や加齢による変化が既に生じている可能性がある
- ・ 術中に採取できる非荷重部における軟骨は少量である
- ・ 侵襲なく、関節軟骨を採取することは困難
- ・ 増殖能が低いためシート作製に時間を要する



CGH & Gバンド: Chr7 トリソミー検出



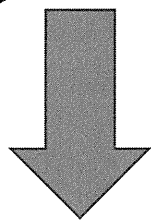
OA患者に起因する変異

(castellanos, et al. Osteoarthritis Cartilage, 12:982-985, 2004)

同種移植を目指した安全性評価

自己

aCGHにより、培養中に生じる変化を捉える



同種由来細胞を移植するに当たって
培養による影響と合わせて
細胞ソースとしての安全性確認も必要ではないか？

同種

- ① 細胞ソース由来の異常の検出
- ② aCGHで培養中に生じる変化を確認

マテリアル

多指症の軟骨細胞(以下Poly.-AC)を検討

- ・ 優れた増殖性
- ・ 手術時廃棄組織

優れた細胞ソースとなり得る

| 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 |

平均: 1y1m
(y: year m: month)

aCGH

方法

解析条件

Moving Average 10pt

Aberration Detection Method-2 =10

- ・ 多指症軟骨細胞を第12継代まで培養
- ・ P2の細胞をreferenceとし、P2vs.P4、P2vs.P6、P2vs.P12で施行

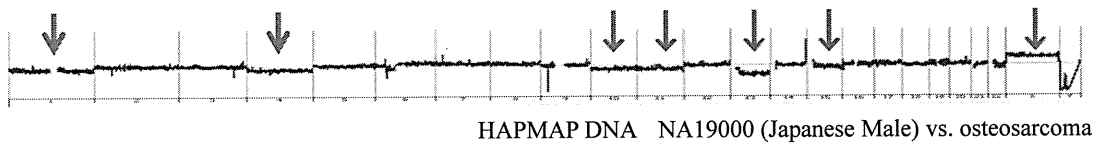
自己軟骨細胞シート移植における
安全性評価と同様の条件

+

過継代サンプル(P12)を評価

aCGHの特徴

- ① コピー数の変化を全ゲノム領域で高解像に検出できる
- ② 微細な染色体異常の検出が可能
- ③ 結果の解釈が比較的容易
- ④ ソフトウェア上設定で自動化できるため、熟練した技術者がいなくても安定した結果を得られる
- ⑤ 少量のDNAで検査可能



Gバンド

方法

- 第1継代目、第6継代目、第12継代目の多指症軟骨細胞の分裂中期を用いる。

Gバンド分染法

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バンドを表出する染色体検査の方法である。

標本は半永久的保存となり染色体検査として最も普及している。

分裂中期 (metaphase)
核膜が消失し、染色体は動原体を介して紡錘体に結合
染色体はもっとも太く短くなり、細胞の赤道面上に配列

