

3週間行った軟骨前駆細胞および軟骨細胞に対しパイン処理を行ったのち、細胞破砕液を回収し、以降の解析に用いた。なお、従来の分化誘導培地において検討を行うとともに、今回我々の研究により新たに開発した医薬品グレードの試薬にて調製した分化誘導培地の両者を用いて、前駆細胞から分化した軟骨細胞からプロテオグリカン産生量を計測した。測定に際しては、BLYSCAN Assays(Biocolor)のキットを用いた。

#### 4.3 感染症のスクリーニング

試験項目は、(1)肝炎ウイルス、HIV などを中心とした血清感染症抗原、抗体のチェック、(2)一般細菌、抗酸菌、マイコプラズマなどのチェックを行った。提出検体は培養上清とした。試験対象とした症例および培養細胞は前項の細胞操作方法によって培養を実施したサンプルの中からランダムに選択した1例とした。

### 5. CPC 本格稼働に向けた運用体制の構築

再生細胞治療センター運営委員会（以下CPC運営委員会）を設置し、全職員を対象とし定期的に講習会を施行した。その場で相互の計画を周知し、プロトコルが干渉することのリスクを低減するように努めている。そのため、CPC運営委員会主催の講習会において当科も発表を複数回行った。具体的には、CPC運営に関する事項を運営委員会側から院内に周知すると同時に当科のプロトコルを提示し周知している。

（倫理面への配慮）

前述検体の供与に関して、当院の倫理委員会の承認を得て施行した。また、患者へは目的と方法、および想定される合併症とその対処法を説明し、文章による同意を得た。さら

に倫理面へ配慮し、研究への参加は個人の意思を尊重した。得られたデータに関してもIDや氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った。

### C. 研究成果

供与頂いた検体から抽出した軟骨細胞、軟骨膜細胞を本学付属病院 Cell Processing Center内で拡大培養、軟骨分化誘導を行った。また、現在作成中のGMP準拠プロトコルにおいて品質評価を目的として実施する工程内試験、および、最終製品試験として予定している試験の実施可能性・妥当性を検証した。

まず、工程内試験・最終製品試験の参考基準の策定に向けて、FACSにより軟骨・移行部・軟骨膜に由来する各々の細胞の表面抗原解析の基礎データを取得した。すなわち、ヒト軟骨前駆細胞の特異的マーカーを同定することを目的として、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の発現解析を行った。造血幹細胞に発現していることが知られているCD34、CD117(c-kit)、間葉系幹細胞に発現していることが報告されているCD44、CD73、CD90、CD105、CD133、CD140a、CD146、CD271の発現を解析した(Fig.1)。これらの表面抗原のうち、CD44およびCD90の陽性率は軟骨細胞と軟骨前駆細胞において大きな相違が観察された。すなわち、CD44陽性率は、軟骨細胞で $35.4 \pm 7.3\%$ であったのに対し、軟骨前駆細胞では $58.8 \pm 8.6\%$ であった。CD90陽性率は、軟骨細胞で $46.5 \pm 3.9\%$ であったのに対し、軟骨前駆細胞では $63.0 \pm 1.7\%$ であった。

次に、最終製品試験の一つとして、出荷判定を行うための重要な基準であると考えている、グリコサミノグリカン定量試験を実施した(Fig.2)。すなわち、分化誘導を行った移

植用細胞を回収し、産生基質量の定量解析を実施した。その結果、従来実施してきた research use の薬品を用いた分化誘導系、および、今回新たに開発した医薬品を使用した分化誘導系のいずれにおいても、良好に軟骨分化誘導が達成され、10 µg/ml 前後の基質産生が確認されることが明らかとなった。今後妥当性のある基準の策定に向けて、検体数・解析回数を増加させていく。

さらに、安全性を担保するための最終製品試験の策定へ向けて、CPC 内で調製した軟骨前駆細胞を対象として感染症のスクリーニング検査を行った。CPC 内で培養を行った軟骨前駆細胞は、すべての感染検査において陰性であることが判明した(Fig.3、添付文書①-1, 2, 3)。なお、本試験は委託検査である。委託先は、本大学にて多数の実績がある臨床検査会社であり、医薬品試験部門を所有している。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の GMP グレードの試験の実績は十分であり、かつ査察等および成績証明書・試験管理記録書等を精査して、その信頼性を担保している。

また、得られた試験結果をもとに、具体的な感染症のバリデーションプロトコルとして、下記のような手順草案を策定した。

① 無菌試験: チオグリコール酸培地および Soybean-Casein Digest(SCD) 培地の各 100mL にサンプル(被験細胞の培養) 10 mL ずつ接種し、それぞれ 30~25℃および 20~25℃で 14 日間培養し、菌の増殖の有無を確認する。試験本数については全容器数の 1%、ただし 2 本以上とする。

細胞製生物薬品は抗菌活性が無く、かつ得られるサンプルが少量のため、本手順では日本薬局方の無菌試験法のうち、直接法を採用する。しかし、発育阻止因子(抗生物質等)が含有されており、その影響が無視できない

場合はメンブラン法を検討する。

② マイコプラズマ試験: JP16 に準拠して培養法および DNA 染色法にてマイコプラズマの存在を確認する。検体について前処理を行い測定試料としたのち、培養法(マイコプラズマ否定試験用カンテン培地を用いた培養及びマイコプラズマ否定試験用液体培地を用いた培養を行いマイコプラズマの集落形成の有無を確認する)及び DNA 染色を行った細胞を用いて培養し、蛍光染色を行いマイコプラズマの存在を観察することにより試験を実施する。合否判定基準は存在が否定されることとする。

③ エンドトキシン試験: JP16 のリムルス試験法に準拠する。和光純薬工業(株)の「リムルス ES-II テストコーワ」を用いる。校正はロット毎に日本薬局方標準エンドトキシンで検定した参考値(EU-vial)を基準として実施する。

## D. 考察

現在、前川分担研究グループを中心に作成段階にある GMP 準拠プロトコールにおいて予定している品質試験は、工程内試験と最終製品試験である。前者は、プロトコール内において、次の作業手順に移行するにあたっての判断材料として行われる。具体的には、位相差顕微鏡による観察や細胞数計測、FACS による表面抗原解析などを検討している。一方、最終製品試験は培養細胞やそれらが産生された基質がヒト生体内へ投与するのに妥当かどうかの判断材料として実施される。具体的には、各種感染症の否定試験と移植細胞と産生基質のバリデーションである。本分担研究では、これらの試験項目に関して、安全性の高い細胞培養プロトコール

のもと調製を行った軟骨前駆細胞を対象とした各種解析を実施し、品質評価基準の策定へ向けた参考値の取得を図った。

まず、将来的な工程内試験における重要な指標と考えられるマーカー発現の定量基準作成へ向けて、各種間葉幹細胞マーカーを用いたFACSによる表面抗原解析を実施した。軟骨前駆細胞の特徴を規定する分子の抽出を試みた結果、我々が過去に報告してきた結果と同様に、軟骨前駆細胞を含む軟骨膜細胞にのみ特異的にCD44、CD90抗原の発現が確認された。軟骨前駆細胞より再構築された軟骨においても、CD44・CD90を共発現する細胞は軟骨膜組織において特異的に局限することが明らかとなっている。興味深いことに、CD44・CD90共陽性細胞は再構築過程の初期において特に存在頻度が向上していたことから一過性増殖（Transient Amplification）に供する細胞であることが示唆され、本マーカー陽性細胞を含むことは、軟骨前駆細胞の存在を示唆する一つの基準となるものと考えられた。次年度において、解析を行う検体数を増加し、定量的な数値を規定し、FACSによる品質評価法の基準を策定していく。

また、最終産物における軟骨基質産生の定量評価を目的として、分化誘導を行った軟骨前駆細胞を対象としてグリコサミノグリカン定量試験を実施した。前川分担研究グループが確立した医薬品のみを用いた安全性の高い分化誘導プロトコールによって誘導した軟骨前駆細胞の基質産生をELISA法により検証を行った結果、リサーチユースの試薬を用いている従来法と比較して、同等のグリコサミノグリカン産生が確認された。さらに、次年度においては、インスリン添加によって良好な基質産生が確認されている方法（前川分担研究グループの項参照）によって、誘導

された軟骨前駆細胞の基質産生も定量的に評価を行う。得られた結果を指標として、妥当性の高い出荷判定基準を策定し、製品標準書における最終製品試験の試験項目を具体化する。

本分担研究のもう一つの目的は、前川分担研究グループが検討したGMPグレードの安全性の高いプロトコールによって調製された軟骨前駆細胞の感染症の有無を検証することにある。今回の試験結果により、実際の運用に際しても感染症が否定され、適正に細胞が調製されていることが判明した（Fig. 3, 別途添付文書）。臨床研究を施行する際には、血清感染症が無いことが必須であるため、そのプロトコールに準じて製造した培養細胞には微生物のコンタミネーションが無かったことが確認されたことは意義深い。今後、本格的にCPCの運用を開始した後も継続的に感染症否定試験を継続し、安全性・滅菌性を十分に担保できることを実証していく。

## E. 結論

本分担研究では、ヒト軟骨前駆細胞の調製にあたり、調製処理、中間段階の調製物、最終調製物の品質管理等の作業管理システムの客観的基準を構築することを目的として、前川分担研究グループによって決定された安全性の高い細胞調製法のもと、評価に必要な基礎的な検討（分化誘導基準、感染判定、逸脱事象設定等）を行った。具体的には、肉眼観察・FACS（Fluorescence Activated Cell Sorter）による細胞表面抗原解析・グリコサミノグリカン測定試験・無菌試験・マイコプラズマ試験・エンドトキシン試験などを実施した。これにより、中間産物および最終産物の安全性に関わる定量基準を設定し、再現性良く安全な出荷判定を行うための客観基準の取得を試みた。本年度において得られた参

考値をもとに、次年度において高い安全性・有効性を担保することの可能なバリデーションプロトコルの樹立を図る。

また、現在当院で臨床試験プロトコルの作成に着手している計画は、我々のグループが唯一である。その一方で様々な計画を同時に運用することも可能であり、その場合は複数の計画とプロトコルが干渉してはならない。そこで、我々はCPC運営委員会を設立し、病院内部職員を対象とした教育訓練の実施などを実施してきた。以上より、今後円滑に再生医療研究を推進していくための基盤体制が構築できたものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takanori Takebe\*, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, Hideki Taniguchi \*: Vascularised and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013 (in press)
2. Hiroyasu Tanaka\*, Shin Tanaka\*, Keisuke Sekine\*, Sayaka Kita, Ai Okamura, Takanori Takebe, Yun-wen Zheng, Yasuharu Ueno, Junzo Tanaka, Hideki Taniguchi (\*; Equal contribution). Efficient generation of pancreatic  $\beta$ -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials*, 2013, S0142-9612
3. Koike H, Taniguchi H: Characteristics of hepatic stem/progenitor cells in the fetal and adult liver. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012 Sep 27
4. Sekine K, Taniguchi H: Basics and applications of stem cells in the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012 Sep 8
5. Zheng YW, Tsuchida T, Taniguchi H.: A novel concept of identifying precancerous cells to enhance anti-cancer therapies. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012 Aug 10
6. Sun L, Moritake T, Zheng YW, Kenshi Suzuki, Gerelchuluun A, Hong Z, Zenkoh J, Taniguchi H, Tsuboi K.: In vitro stemness characterization of radio-resistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76. *Journal of Radiation Research*, 00, 1-9, 2012
7. Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, Hiroomi Kan, Hiromu Suzuki, Mitsuru Mizuno, Yuichiro Yabuki, Takuro Adegawa, Tomohiko Yoshioka, Junzo Tanaka, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi: Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. *Transplant Proc*, 44 (4), 1158-1161, 2012
8. Takanori Takebe, Keisuke Sekine, Yuka Suzuki, Masahiro Enomura, Shin Tanaka, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Hideki Taniguchi: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*, 44 (4), 1018-1020, 2012
9. Takanori Takebe, Naoto Koike, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Hideki Taniguchi: Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc*, 44 (4), 1130-1133, 2012
10. Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Yuka Suzuki, Akihide Kamiya, Hiromitsu Nakauchi, Hideki Taniguchi:

- Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc*, 44 (4), 1127-1129, 2012
11. Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Masahiro Enomura, Chiemi Matsui, Hiroyasu Tanaka, Hideki Taniguchi: Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc*, 44 (4), 1104-1106, 2012
  12. Hiroyuki Koike\*, Koji Kubota\*, Keisuke Sekine\*, Takanori Takebe, Rie Ouchi, Yun-Wen Zheng, Yasuharu Ueno, Naoki Tanigawa, Hideki Taniguchi. (\*; Equal contribution) Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC biotechnology*, 12(1), 81, 2012
  13. Takebe T\*, Kobayashi S\*, Zheng YW, Mizuno M, Yabuki Y, Maegawa J, Taniguchi H: Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. (\*; Equal contribution) *PLoS One*. 2011; 6(10): e26393
  14. Takebe T\*, Kobayashi S\*, Imui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H. (\*; Equal contribution) Reconstitution of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the perichondrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35): 14479-84, 2011
  15. 谷口英樹: 再生医学の現状と将来展望 *神奈川輸血研究会誌* 神奈川輸血研究会 2012: 4
  16. 谷口英樹: iPS 細胞の利用による再生医療のイノベーション *かながわ政策研究大学連携ジャーナル* 政策研究・大学連携センター～シンクタンク 神奈川～ 2012: 3: 90
  17. 武部貴則, 谷口英樹 ”細胞から臓器へ, 再生医療研究が拓く近未来像”, Vol.19 No.1, 2012年7月, *Organ Biology*
- ## 2. 学会発表
- \*学会発表 (国際)
1. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shina T, Ouchi R, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Polycomb group protein Ring1B regulates proliferation and differentiation of mouse hepatic stem/progenitor cell by repressing cyclin-dependent kinase inhibitors. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  2. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Shiina T, Obana Y, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Role of the polycomb group protein EZH2 in the murine hepatic stem/progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  3. Tuchida T, Zheng Y, Shimao T, Zhang R, Sakurai Y, Li B, Takiguchi K, Tanaka H, Ishibashi N, Mizuno K, Watanabe M, Tanaka T, Taniguchi H: Block hepatocellular carcinogenesis of rats by removal of precancerous cells with an acyclic retinoid. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  4. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H: Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. International Society

- for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012 (Oral)
5. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Koike N, Taniguchi H, Tanaka H: Generation of islet like structures with human functional vascular networks. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  6. Zheng Y, Li B, Zhang R, Kimura M, Tsuchida T, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: Self-renewal versus differentiation as well as the liver repopulation capability of human hepatic stem cells. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  7. Zhang R, Zheng Y, Tsuchida T, Takebe T, Kimura M, Li B, Takiguchi K, Sekine K, Ueno Y, Taniguchi H: Construction of chimeric mice with human immatured hepatocytes. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  8. Sekine K, Ishikawa M, Takebe T, Suzaki A, Kawashimo K, Matsui C, Taniguchi H: Identification of pancreatic stem/progenitor cells expressing PDX1 reside in the CD133 positive pancreatic duct. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  9. Mizuno M, Kobayashi S, Takebe T, Suzuki H, Murata S, Yabuki Y, Hirotomi K, Yasumura K, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstitution of Articular(joint) cartilage defects by auricle(ear) derived stem/progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
  10. Takebe T, Sekine K, Fujiwara R, Matsui C, Enomura M, Tanaka H, Koike N, Taniguchi H: Engineering of vascularized human hepatic tissue. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep.25-28, 2011 Seoul, Korea
  11. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Zheng YW, Taniguchi H: Self-assembling Hepatic organoid formation in vitro. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
  12. Suzuki H, Kobayashi S, Takebe T, Mizuno M, Yabuki Y, Yasumura K, Murata S, Maegawa J, Taniguchi H: Identification and utilization of human cartilage stem cells from the ear. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
  13. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Fujiwara R, Tanaka H, Dhiemi Matsui, Koike N, Taniguchi H: Vascularization of pancreatic beta-cells inside the transparency cranial window. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
- \* 学会発表 (国内)**
1. 谷口英樹 : iPS 細胞からヒト臓器を作る！－薬剤評価系への波及効果－ 日本動物実験代替法学会第 25 回大会 ランチョンセミナー Dec 8, 2012 東京
  2. 谷口英樹, 武部貴則, 関根圭輔, 青山晋輔, 安達弥永 : ヒト iPS を用いたファーマコセロミクス基盤技術の開発 第 127 回日本薬理学会関東部会 シンポジウム Oct 20, 2012 東京
  3. 武部貴則, 関根圭輔, 江野村允宏, 小池

博之, 張冉冉, 三橋優澄, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹: 多能性幹細胞を用いた機能的なヒト臓器の創出 第11回日本再生医療学会 Jun 12-14, 2012 横浜

学会 Jun 12-14, 2012 横浜

4. 武部貴則, 小林眞司, 矢吹雄一郎, 鈴木啓, 水野満, 安村和正, 広富浩一, 鄭允文, 前川二郎, 谷口英樹: ヒト耳介軟骨膜由来幹/前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発 第11回日本再生医療

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Fig.1 各種ヒト耳介由来細胞の FACS による細胞表面抗原の網羅的解析

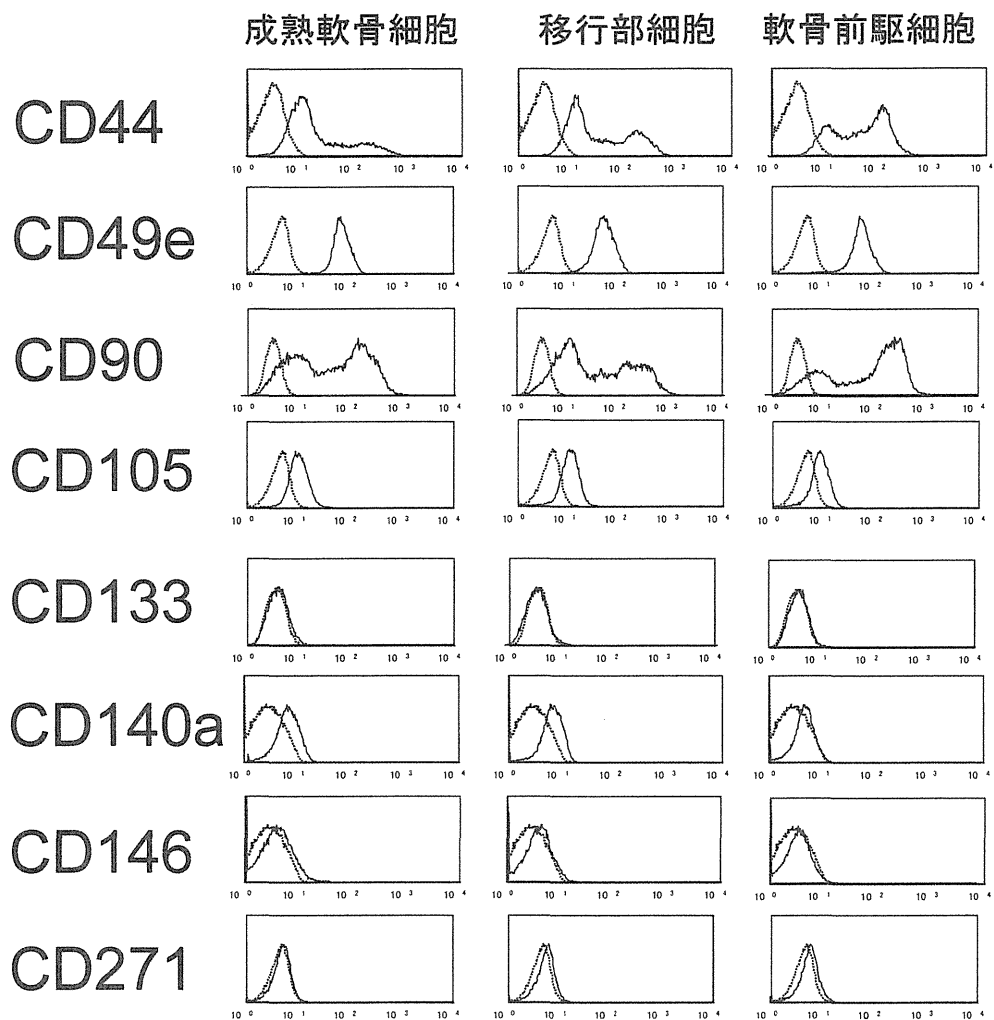


Fig.2 ELISA 法を用いたグリコサミノグリカン定量評価系の確立

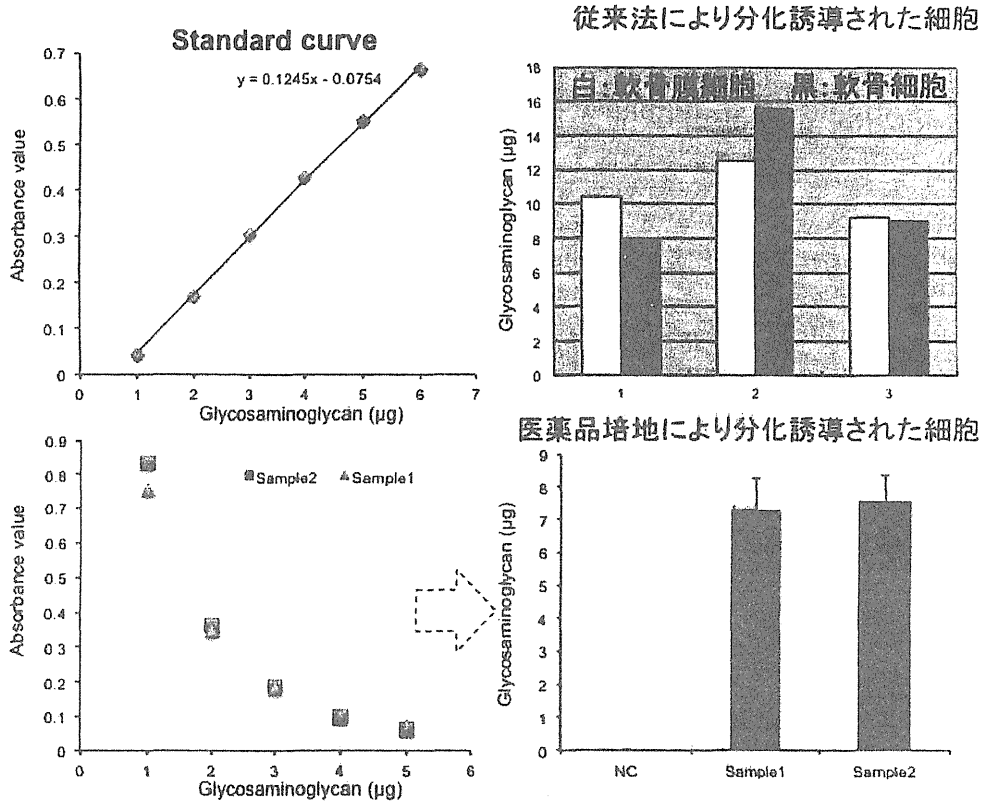


Fig. 3 製品試験に関する検討(品質試験報告書)

公立大学法人 横浜市立大学附属病院 再生細胞治療センター		使用開始日: 1	
文書番号: QD74	文書名: 品質試験報告書	第1版	Page 4 / 5

製造部門責任者: 矢吹 雄一郎 様

**品質試験報告書**

貴にご依頼を受けました検体の品質試験結果は下記の通りです。

品質部門責任者  
氏名: 三上 太郎 様

プロジェクト名	***軟骨培養
プロジェクトID	11101
製品番号	01
材料	培養液
LotNo	なし

No.	検査項目	分析方法	規格値	結果
1	HBs 抗原	CLIA 法 (化学免疫測定法)	インセイ	インセイ
2	HCV 抗体	CLIA 法 (化学免疫測定法)	インセイ	*測定不可
3	HIV 抗体	CLIA 法 (化学免疫測定法)	インセイ	インセイ
4	TP 抗体	CLIA 法 (化学免疫測定法)	インセイ	*測定不可
5	RPH	LIA (ラテック×免疫比濁法)	インセイ	インセイ
6	コンドトキシシン	比濁時間分析法	<1.0pg/ml	<1.0
7	β-Dグルカン	比濁時間分析法	<11.0 pg/mL	<6.0
8	一般細菌			—
9	抗酸菌			インセイ
11	マイコプラズマ	PA 法	40 未満	40 未満
12		CF 法	4 未満	4 未満
13		培養		—
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

標準品・試薬、調製試液、使用機器のデータは次頁

\*最も低いキャリブレーション値以下。



添付文書①-1 製品試験に関する検討 感染症否定試験など

検査報告書

所属		患者番号	氏名	採取日
形成外科	外来			
検体種別		培養液		


検査項目	結果	備考
HBs抗原	インセイ(0.01IU/mL)	
HCV抗体	測定不可	最も低いキャリブレーション値以下
HIV抗体	インセイ(0.11 S/CO)	
TP抗体	測定不可	最も低いキャリブレーション値以下
RPR	インセイ(0.1)	
エンドキシン	<1.0	
β-Dグルカン	<6.0	

公立大学法人横浜市立大学附属病院 臨床検査部

渡邊 真一郎 

添付文書①-2 製品試験に関する検討 感染症否定試験など

抗酸菌		検体日
種・菌株	形成外科	____年 ____月 ____日
送付日		
検体番号		
検体種別	環境検査	
採取日時		
依頼コメント		
検査状況	自検	
塗抹・顕鏡		
Z-N染色		
培養結果		
培養結果 陰性		
同定結果		
株1		
株2		
結果コメント		
公立大学法人 横浜市立大学附属病院 臨床検査部		

渡邊 真一郎 



検査報告書

0922-0  
(702)

公立大学法人 横浜市立大学附属病院

16 培養液

検査項目	検査結果	検数	検出率
マブアノミーニエ(PA)	40検	16	40%

ご報告は 完了です



自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた  
イヌ自家移植モデルによる安全性・有効性に関する研究

研究分担者

小林 眞司 神奈川県立こども医療センター 形成外科 部長  
横浜市立大学 臓器再生医学 客員准教授

研究協力者

水野 満 横浜市立大学 臓器再生医学 大学院生  
大石 美里 横浜市立大学 臓器再生医学 技術員

研究要旨

我々は、本学付属病院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、低侵襲的に採取可能な耳介軟骨膜由来前駆細胞を用いて、頭蓋額顔面部における変形を治療するための臨床研究実施へ向けて、前臨床研究を推進している。本分担研究では、自家移植モデルによる軟骨再構築の実現可能性とその安全性の評価を主たる目的として、動物モデルによる弾性軟骨再構築の検証実験を行った。その結果、ヒトにおける先行研究と同様に、イヌ耳介軟骨膜より前駆細胞集団を分離・培養することに成功した。さらに、積層化培養に基づく軟骨分化誘導技術を用いることにより、自己の軟骨前駆細胞からイヌ弾性軟骨を再構築することに成功した。再構築された軟骨には Collagen type I 陽性の軟骨膜の再生が認められ、さらに CD44/ CD90 共陽性細胞が存在していることが明らかとなったことから、再構築された軟骨は前駆細胞を含んでおり、長期的な形態維持に優れることが示唆された。また、移植から摘出までの全期間において、腫瘍形成などの明らかな有害事象は認めなかった。以上より、中動物を対象とした自家移植実験により、自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた軟骨再生医療の実現可能性および安全性に関する基礎的な検証を行うことに成功した。

A. 研究目的

近年、自己細胞を用いて欠損組織などを再生する組織再生医療が注目され、頭蓋顔面領域の先天性奇形、外傷性陥凹、美容形成外科領域などにおいても審美的治療に再生弾性軟骨を応用することが期待されている。これまでも自己耳介弾性軟骨細胞を用いた軟骨再生医療が臨床応用されているが、軟骨組織の採取による過大な侵襲、低い長期

形態維持性、成熟細胞を用いるために組織を維持する幹／前駆細胞が存在しないといった問題があった。

我々は、こうした問題を解決しうる新たな細胞源としてヒト耳介軟骨中に存在する軟骨前駆細胞の利用に着目してきた。

これまでマウスやヒト耳介軟骨における軟骨前駆細胞は全く同定されていなかった。我々は、マウスを対象とした実験の結果、耳

介軟骨を覆う軟骨膜中に前駆細胞が存在することを示してきた (S. Kobayashi, et al, *PLoS ONE*, 2011). そこで, ヒトを対象とした研究を開始し, 残存耳介軟骨より分離した軟骨膜に由来する細胞を解析した結果, 軟骨膜中に高い増殖活性, 高い軟骨への分化能を併せ持つ軟骨前駆細胞が存在することを実証してきた. このヒト軟骨前駆細胞は, *in vitro* で成熟軟骨細胞と同等の軟骨基質産生を行うことが確認されただけでなく, 重症免疫不全マウスへの皮下移植による軟骨再構築能の解析実験により, ヒト弾性軟骨再構築能を有することを示している. 再生軟骨中には, 前駆細胞集団を豊富に含む軟骨膜組織の再構築も認められたことから, 長期的にわたる形態維持保持性が期待される手法であることが判明している.

そこで, 我々が開発した前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築技術を, 形成外科領域における頭蓋・顔・顔面部に欠損を有する患者を対象として医療応用すべく, 現在は前臨床研究を遂行している.

これまでの検証は, ヒト軟骨前駆細胞を異種である免疫不全マウスへ移植することによる実験系を主として推進してきた. 一方で, 我々が想定している自己耳介由来細胞を用いた再生医療の実現可能性を検証するためには, 自家の移植モデルを利用して軟骨再構築が可能であることを動物レベルで実証しておく必要があると考えられる.

そこで, 本分担研究では, 自己の前駆細胞を用いて弾性軟骨の再構築が可能であることを実証するために, 中動物 (イヌ) における自家移植を実施した. すなわち, イヌ耳介においてもヒト耳介と同様に耳介軟骨膜に前駆細胞が存在することを明らかにし, それらを分離・培養を行うとともに, 拡大培養を行った軟骨前駆細胞の分化誘導を行い,

皮下への注入による自家移植実験により組織再構築が可能であるか検証を行った. また, 移植手術に伴う侵襲や, 前駆細胞に由来する腫瘍形成・異所性組織形成など有害事象等の発生の有無についても検証を実施した.

## B. 研究方法

### 1. イヌ耳介軟骨組織からの軟骨膜, 軟骨組織の分離

#### ① 試験動物

健康なイヌ, ビーグル (TOYO Beagle : オリエントアル酵母), 5ヶ月齢の雄を用いた.

#### ② 麻酔処置

獣医師指導のもと, 「動物の愛護及び管理に関する法律」 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号, 最終改正平成 18 年 6 月 2 日法律第 50 号), 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号), 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」 (日本学術会議, 2006 年 6 月 1 日) を遵守した麻酔処置を実施した.

いずれの手術日も動物は前日から一夜絶食をした. 麻酔前処置 (ミダゾラム (0.3 mg/kg, s.c.): 富士製薬) を投与し, 鎮静を確認した後, 鎮痛薬としてレペタン ((0.01 mg/kg, i.v.): 大塚製薬) を投与した. 次いで麻酔の導入を行った. 麻酔導入薬は, プロポフォール ((0.5 mg~35 mg/kg, i.v.): 丸石製薬) にて行った. 麻酔深度が適正になったことを確認し, 麻酔は気管挿管を行った後, イソフルラン (0.1%~2%) により維持した. 術中は疼痛反応の確認のため, 心電図にモニタリングを行い, 術中の麻酔深度を適度に維持した. 術後の疼痛管理は, レペタン ((0.01 mg/kg, i.v.): 大塚製薬) により行った.

術前及び術後管理として感染防止目的で抗生物質（セファゾリン(10~30 mg/kg)術後2日間の計3日間, 1日1回皮下注射した)を投与した。術部は,消毒薬（イソジン,明治製菓(株)）を1日1回, 術部表層の癒合を確認できるまで塗布した。

### ③軟骨膜組織の分離

全個体について, 外耳介を手術により採取し, 無菌的に皮膚を剥離した。脂肪や血管, 他の組織をハサミで取り除き, 軟骨組織から鑷子を用いて軟骨膜を剥離し, 軟骨と軟骨膜を分けた。

## 2. イヌ耳介由来軟骨前駆細胞の培養

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を, 剪刀やメスを用いて細切した。その後, 0.2% Collagenase type II (Worthington)に懸濁・振蕩し, 基質を分解し細胞を分離した。その際, 軟骨膜組織と軟骨膜は2時間振蕩した。各組織の細胞懸濁液は100  $\mu$ mのCell Strainer(BD Falcon)で濾過し, 遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)した。上清を除去後, 血清(濃度や種類は検討条件による), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (SIGMA; 以下 D-MEM/F-12)で洗浄し, 遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は, 35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(BD FALCON)あるいは60 mm 細胞培養ディッシュ(BD FALCON)に播種した。細胞は気相条件を37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は, 0.2% Collagenase type II (Worthington)を含有する D-MEM/F-12

(SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase type II溶液を注入し, インキュベーター内で20~30分静置し, 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12(SIGMA)を加え, ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行い, 洗浄を行った後, ディッシュに播種し再び培養した。尚, 播種濃度は1200 cells/cm<sup>2</sup>の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

## 3. 積層化培養と軟骨分化誘導

耳介軟骨膜由来細胞の軟骨細胞への分化誘導は積層化培養と分化誘導培地によって軟骨細胞へ分化誘導を行った。軟骨細胞はin vitroにおける二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており, 単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとこの形質であるCollagen II産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため, ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟骨分化誘導が試みられてきた。

そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を2.5x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後2日間, 10%血清, 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 (SIGMA)で培養し, 細胞の接着を促した後, 軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。軟骨分化誘導培地は, 1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate(WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline

Growth Factor- I (SIGMA), Basic Fibroblast Growth Factor(科研製薬)を含有する D-MEM/F-12(SIGMA)とし、血清は用いなかった。軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後、別に用意した細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し、上から播種し積層化した。2層目を播種後、1層目と同様に2日間は10%各種血清(種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12(SIGMA)で培養を行い、その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返す、計3層に重層化した。なお、細胞の培養はすべて、気相条件を 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定したインキュベーター内で行った。

#### 4. 自家耳介由来軟骨前駆細胞の皮下移植

研究方法 1.と同じ手順で麻酔導入・周術期管理を行い、耳介を摘出したビーグルの背部皮下を剥離し、ポケットを作製し、細胞を移植した。分化させた細胞は、セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離し、1.5 mL tube (Eppendorf)に回収したものを用いた。皮下移植2ヶ月で検体を摘出し、組織学的に解析を行った。実験に使用したイヌは5ヶ月齢の雄ビーグル(TOYO Beagle)を用いた。実験動物の飼育は本学実験動物センターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

#### 5. 組織化学染色

移植後2ヶ月目に摘出した組織は、10%ホルマリン溶液(Wako)を用いて、室温で24時間以上浸漬固定した。その後、パラフィンで包埋し、組織包埋ブロックを作成した。組織包埋ブロックを5 mmの厚さに薄切を行い、組織切片を作成した。作成した組織切片を

キシレン、エタノールで処理し脱パラフィン処理の後、蒸留水で洗浄した。

Hematoxylin-Eosin(HE), Alcian Blue(AB), Elastica Van Gieson(EVG)染色をそれぞれ実施した。

#### 6. 免疫組織化学染色

作製した薄切スライドを用いて、脱パラフィン作業を行った。抗原はクエン酸緩衝液(関東化学)に浸し、121°C、15分間熱処理により賦活化され、Protein Block Serum Free(Dako)により、1時間室温でブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体をそれぞれ抗ヒトコラーゲン type II マウスモノクローナル抗体、抗ヒトコラーゲン type I マウスモノクローナル抗体、抗ヒト CD44 マウスモノクローナル抗体、抗ヒト CD90 マウスモノクローナル抗体、を Protein Block Serum Free(Dako)にそれぞれの濃度で希釈し、2時間、4°Cで反応させた。ネガティブコントロールのスライドは、マウス IgG1 抗体(Dako, 1:200)を使用した。一次抗体反応の後、0.01% Tween TBSにより、抗体を3回洗浄した。洗浄の後、二次抗体反応を行った。DAB染色における二次抗体には、Chemmate Envision HRP-polymer(Dako)を使用した。二次抗体を室温にて1時間反応させ、再度洗浄を行った。発色は、DAB+ solution(Dako)を用いた。核染色は Hematoxylin により行った。それぞれのサンプルは BIOREVO(BZ-9000, キーエンス)により観察した。蛍光染色における二次抗体は、Alexa Fluor 488 goat antibody, Alexa Fluor 555 goat antibody, Alexa Fluor 647 goat antibody を一次抗体の動物種に合わせそれぞれ選択し、500倍希釈し使用した。二次抗体を室温にて1時間反応させ、再度洗浄を行った。核染色は

4,6-Diamidino-2-Phenylindole(DAPI)により行った。それぞれのサンプルは LSM510 Laser-scanning Microscope(Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan)

#### (倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験は、すべて獣医師指導のもと、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号, 最終改正平成18年6月2日法律第50号), 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示第88号), 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 2006年6月1日)を遵守し, 実施した。

### C. 研究成果

我々は、まずイヌ耳介の組織学的解析を行った。ヒトと同様にイヌ軟骨膜は, Alcian Blue 陰性(Fig.1a 左), Elastic Van Gieson 陰性(Fig.1a 右), Collagen type II 陰性(Fig.1b 左), Collagen type I 陽性(Fig.1b 右)の組織であることが明らかとなった。さらに, 免疫組織学的解析により, イヌ耳介軟骨膜中のみヒト耳介由来軟骨前駆細胞マーカーである CD44, CD90 両陽性細胞が存在(0.95 (±0.12)%) していることが明らかとなった(Fig.1c,d)。以上より, 軟骨膜中に未分化性の高い細胞が存在していることが示唆された。

そこで, イヌ耳介軟骨から軟骨膜を分離し, 耳介由来軟骨前駆細胞の培養を行った。耳介由来軟骨前駆細胞は, 高いコロニー形成能に加えて, 高い軟骨分化能を有することが明らかとなっている。本検証においても, 分離した耳介由来軟骨前駆細胞(Fig.2a)は軟骨細胞と比較して高い増殖活性を有し, 軟骨細胞(Fig.2b)と同等の分化能を有している

ことが示された。次いで, 我々はイヌ耳介由来軟骨前駆細胞の弾性軟骨再構築能を検証するために, 積層培養と分化誘導培地を用いることにより軟骨分化誘導を行った後(Fig.2c 耳介由来軟骨前駆細胞, Fig.2d 耳介軟骨細胞)に, 誘導をつた細胞を重症免疫不全マウス(Nonobese Diabetic/Severe

Combined Immune Deficiency マウス :

NOD/SCID)に皮下移植した。本手法は, 我々が開発したヒト耳介由来軟骨前駆細胞を用いた細胞調製法に則って実施した(軟骨細胞調製方法 : 特願 :

2007-012160(PCT/JP2008/051327))。移植から2ヶ月後, マウス皮下に再構築された組織を摘出したところ, 一定の硬さを有する軟骨様組織を認めた(Fig.3a)。摘出した軟骨様組織の組軟骨織学的解析を実施したところ, Hematoxylin Eosin(Fig.3b), Alcian Blue(Fig.3c), Elastic Van Gieson(Fig.3d)により, 軟骨小腔および豊富なプロテオグリカン, 弾性線維を有した弾性軟骨組織の再構築が認められた。さらに, 再生軟骨には Collagen type I 陽性の軟骨膜組織の再構築を認めた。軟骨膜の再構築は, 長期的な形態維持が期待できることを意味する。以上より, イヌ耳介由来軟骨前駆細胞はヒト耳介由来軟骨前駆細胞と同様に弾性軟骨の再構築能を有していることが明らかとなった。

続いて, 我々は実際のヒト臨床研究を想定した前臨床研究として, イヌへの自家移植の実験モデルを作製し, 検証を行った。自家移植モデルにおいても, 積層化培養および軟骨分化誘導培地による分化誘導を行った後に, 移植を行った。自己軟骨前駆細胞の皮下移植から2ヶ月後, 再構築された組織を摘出し組織学的解析を行った。Hematoxylin Eosin(Fig.4a), Alcian Blue(Fig.4b), Elastic Van Gieson(Fig.4c)により, 軟骨小腔および

豊富なプロテオグリカン、弾性線維を有した弾性軟骨組織の再構築が認められた。自家イヌ耳介由来軟骨前駆細胞の皮下移植により再構築された弾性軟骨組織は、Collagen type II 陽性の軟骨部分を覆う Collagen type I 陽性の軟骨膜組織の再構築を認めた (Fig.4d)。さらに、Collagen type I 陽性組織である軟骨膜中には CD90,CD44 両陽性細胞が認められており (Fig. 4e)、再生軟骨は長期的な形態維持が期待された。

なお、上記の過程において、いずれにおいても明らかな有害事象は認めなかった。

#### D. 考察

これまでに、ヒト耳介などの弾性軟骨組織の臨床的再構築に使用可能な細胞源として、骨髄や脂肪組織から分離された間葉系幹細胞が重要であると考えられている。しかし、これらの間葉系幹細胞は、弾性軟骨に特徴的な細胞外マトリックスの構成成分であるプロテオグリカン、Collagen type II, エラスチン産生能を有した弾性軟骨細胞への分化能が極端に低いことが臨床応用上で極めて大きな障壁となっている。さらに、骨髄由来間葉系幹細胞に関しては、生体内に移植した後に骨化や血管侵入などの問題が発生するリスクが高いことも臨床応用を阻む理由の一つとなっていた。我々はこれらの未解決課題を克服しうる細胞源として、ヒト耳介軟骨膜中に存在する高い増殖能、軟骨分化能、自己複製能、組織再構築能を兼ね備えた軟骨前駆細胞を同定してきた。さらに、本細胞の培養操作技術を検討することにより、大型のヒト弾性軟骨組織を長期的に再構築できることを明らかにしている。軟骨膜に由来する前駆細胞は耳介弾性軟骨の表面を覆う軟骨膜から分離するために非常に採取が容易であり、軟骨組織自体を損

傷しないという点でより低侵襲である。そして、軟骨膜細胞は高い増殖能を有するため大量の細胞を少量の組織より培養出来ることから自己組織の侵襲を最小限に抑えられ、臨床的に優れた組織再構築法となることが期待される。

本分担研究では、臨床試験への移行を想定し、ヒトで得られた知見の自家移植モデルによる有効性・安全性の検証を行った。検証に際しては、中動物であるイヌにおいても同様に、我々が同定したヒト耳介由来軟骨前駆細胞と類似の細胞が存在するか否かの検証を行った (Mizuno M, *et al.* Submitted)。その結果、これまでにマウス・ヒト軟骨前駆細胞の特異的マーカーとして報告してきている CD44 や CD90 を共発現している細胞が、イヌ耳介軟骨膜中においても認められることが明らかとなった。イヌ軟骨膜より分離した細胞は、高いコロニー形成活性を有しており、長期にわたる継代と培養が可能であった。さらに、軟骨、骨、脂肪への分化能を有していたことから、ヒトと同様に軟骨前駆細胞としての特性を有する細胞であることが示唆された。一方、本研究において新たに同定された軟骨前駆細胞は、免疫不全マウスへの移植後も長期的に異所性組織形成を認めなかったことから、軟骨細胞へ効率の良く分化誘導されることが明らかとなった。従来から報告されている骨髄などに由来するイヌ間葉系幹細胞とは明らかに性質が異なった、より軟骨細胞系列にコミットした前駆細胞であることが推測された。

さらに、本前駆細胞を積層化培養による軟骨分化誘導後に産生基質と共に皮下移植する方法により、*in vivo* においてイヌ弾性軟骨組織が再構築されることを見いだした。再構築された組織には、正常軟骨膜に含ま



れる Collagen type I 陽性の膜状組織の再生も観察されており、軟骨前駆細胞から軟骨組織と軟骨膜組織がともに再構築することが明らかとなった。したがって、再構築された軟骨膜中に存在する前駆細胞の自己複製による細胞更新と軟骨細胞分化が期待されるため、優れた組織維持性を有していることが大いに期待される。

以上の結果から、イヌにおいても、マウス・ヒトと同様に軟骨前駆細胞を同定することに成功した。また、自家移植実験によって、弾性軟骨を再構築することが確認され、移植に伴う明らかな有害事象等は認めなかった。一方で、ヒトへの臨床応用は顔面部への移植を想定しており、イヌの実験では十分に同様の条件を再現することが困難であることも新たに判明した。すなわち、今回の検証で用いたイヌ背部・腹部皮下移植モデルは、顔面部皮下で生じる緊張などのパラメータが大きく異なっているものと推測された。したがって、次年度においては、より各種条件がヒトに近似する霊長類（サル）を対象として顔面部皮下への自家移植実験を実施し、イヌにおける実験での検証が困難であった情報の取得を図る。これにより、臨床研究へ移行する上で我々の軟骨再生医療の実現性・安全性を、充分に実証してきてゆきたい。

## E. 結論

今回我々は、弾性軟骨である耳介軟骨膜から採取した軟骨前駆細胞を弾性軟骨再生の細胞源として臨床応用するにあたり、自家移植モデルによる検証を行い、再生弾性軟骨を得ることを達成した。これにより、これまでの異種移植モデルでの知見が、自家移植モデルにおいても十分に成立するというコンセプトが実証できたものと考えられる。今後は長期観察例における有害事象の検討

や、治癒効果を判定するため霊長類を対象とした自家移植モデルでの検証、より大型の軟骨を効率よく作製するための手法の最適化などの研究を推進していく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Maegawa J, Kobayashi S, Yabuki Y, Hiroto K, Yasumura K, Iwai T. Blepharoplasty in senile blepharoptosis: preoperative measurements and design for skin excision. *Aesthet Surg J*. 2012 32(4):441-446.
2. Shinji Kobayashi, Mari Tanaka, Yukie Ohashi, Yukichi Tanaka, Jiro Maegawa. Functional reconstruction of epignathus with cleft palate using part of a mature teratoma. *The Cleft Palate-Craniofacial J*. 2012 Vol. 49, No. 6, pp. e69-e74.
3. Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, Hiroomi Kan, Hiromu Suzuki, Mitsuru Mizuno, Yuichiro Yabuki, Takuro Adegawa, Tomohiko Yoshioka, Junzo Tanaka, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi. Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. *Transplantation Proceedings*. 2012 May; 44(4):1158-61
4. Shinji Kobayashi, Takeshi Nishikouri, Jiro Maegawa, Takashi Hirakawa, Toshihiko Fukawa. A novel craniofacial osteogenesis

distraction system enabling control of distraction distance and vector for the treatment of syndromic craniosynostosis. *J of Craniofacial Surgery* 23(2):422-5, 2012

## 2. 学会発表

1. 水野満、小林眞司、武部貴則、鈴木啓、村田駿介、矢吹雄一郎、安村和則、松崎賢寿、吉川洋史、中林誠一郎、前川二郎、谷口英樹：自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた関節軟骨再構築：第12回日本再生医療学会総会，横浜，2013，3.
2. 武部貴則，小林眞司，矢吹雄一郎，鈴木啓，水野満，安村和則，広富浩一，鄭允文，前川二郎，谷口英樹：ヒト耳介軟骨膜由来幹/前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発：若手研究奨励賞受賞者講演(YIA)臨床応用研究部門：第11回日本再生医療学会総会，横浜，2012，3.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Fig. 1a

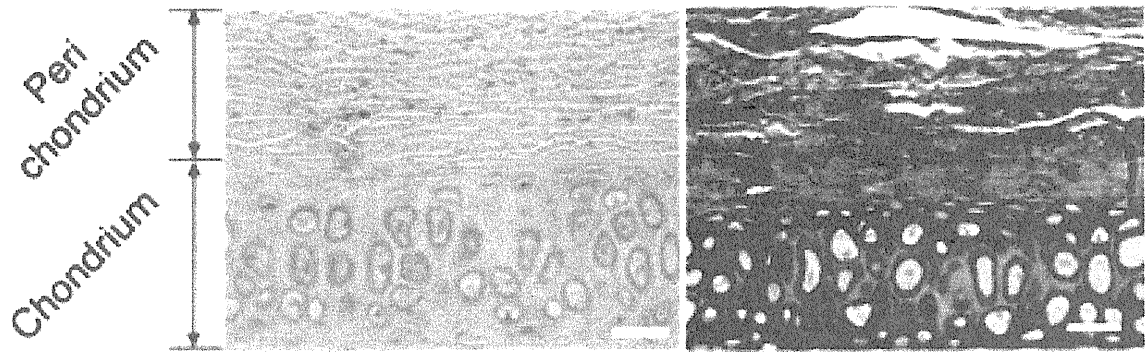


Fig. 1b

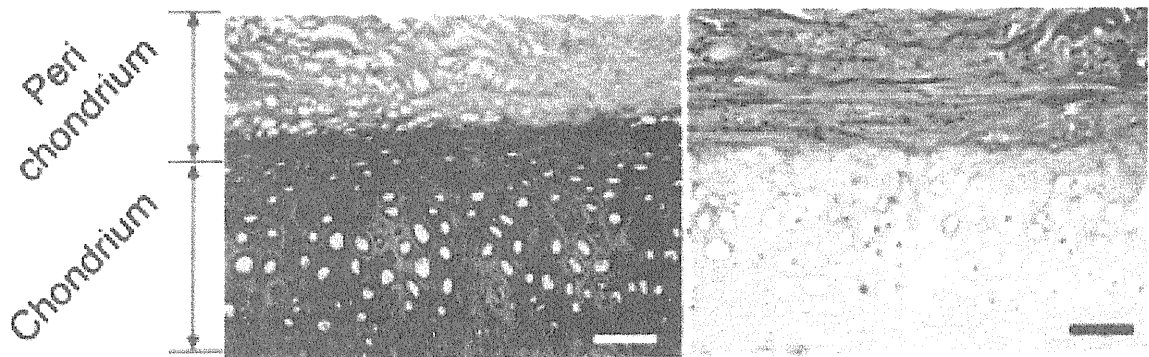


Fig. 1c

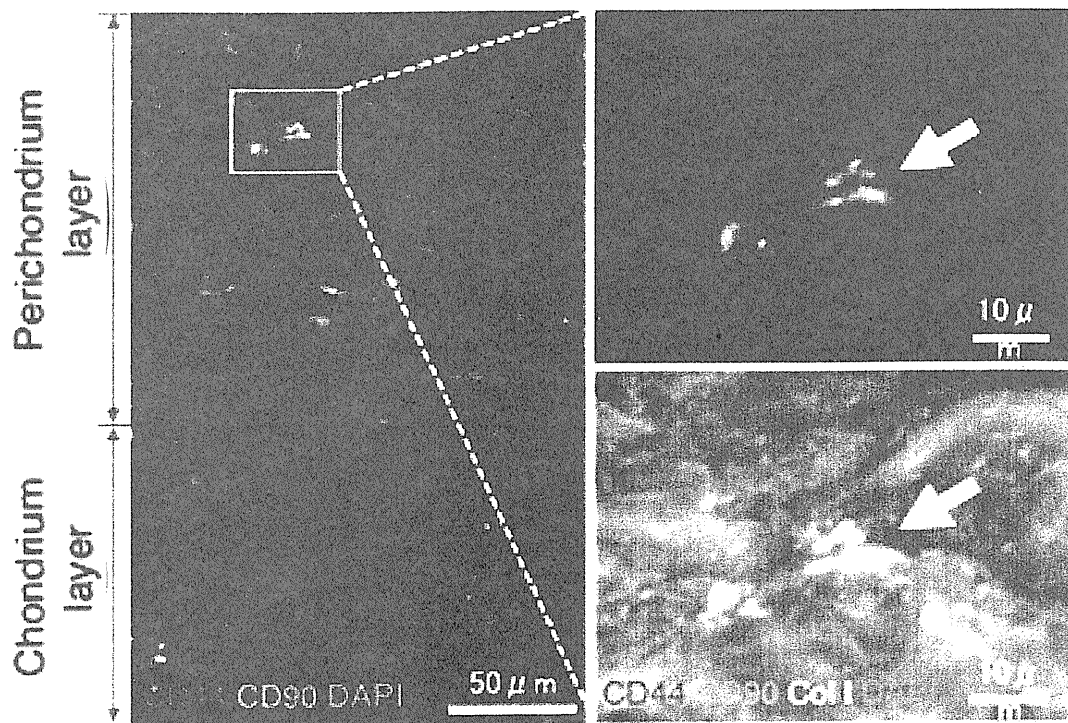


Fig.1d

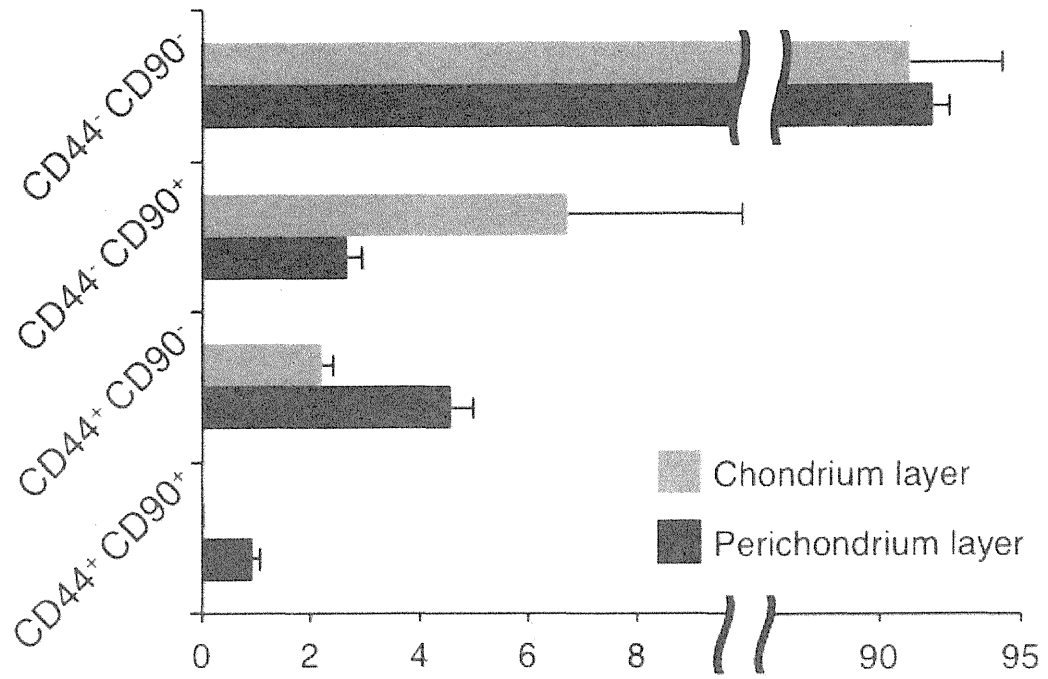


Fig.2a

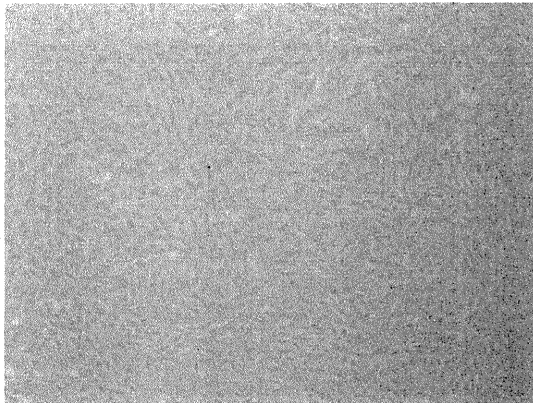


Fig.2b

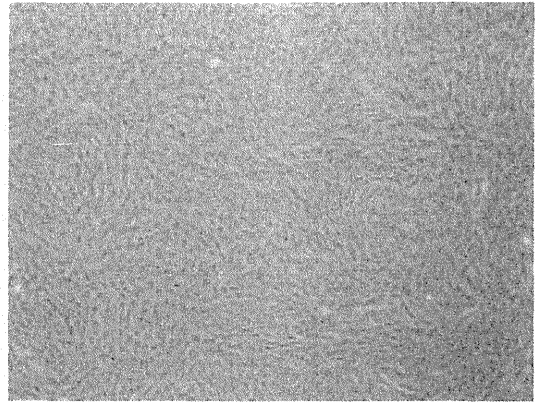


Fig.2c

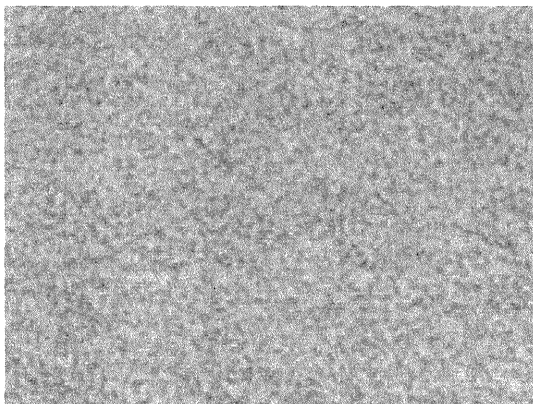


Fig.2d

