

PD 細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。

この PD 細胞の造腫瘍性否定試験を実施した結果、腫瘍形成は認められなかった。

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

なし

2. 論文発表

1) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, 2014; 33: 643-652.

2) Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2: 265-273.

3) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet*. 2013; 14: 32.

4) Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics*. 2013; 8: 635-645.

5) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *PLoS One* 2013; 8: e63265.

6) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Jul 2. Epub ahead.

- 7) Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 2013; 45: 407-413.
- 8) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S. An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 9) Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 23): 5391-5399.
- 10) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 2013; 4: 2.
- 11) 阿久津英憲, 小野寺成実, 梅澤明弘 : 「ヒト ES/iPS 細胞と生殖補助医療」, 産科と婦人科, 診断と治療社: 2014.
- 12) 阿久津英憲 : 挑戦する人これが私の医ける道 (第3回) 阿久津英憲, レジデントノート, 2014; 15(18).
- 13) 阿久津英憲, 川崎友之, 梅澤明弘 : 第3章 「ES/iPS細胞の培養法」, *The Frontiers in Life Sciences 幹細胞研究と再生医療*, 中内啓光 (編集) 南山堂: 35-41, 2013.
- 14) 阿久津英憲, 梅澤明弘 : 「ES細胞-その基礎と臨床応用に向けた展望-」 整形・災害外科 (再生医療の現況と最前線), 56(5):501-506, 2013.
3. 学会発表
- 1) Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A: Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster). 11th ISSCR 2013 Annual Meeting, Boston, MA, June 12-15, 2013.
- 2) 奥村典子, 阿久津英憲, 浜谷敏生, 山田満稔, 菅原かな, 小川誠司, 井上 治, 上條慎太郎, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔,

吉村泰典：「 β -カテニンは分化多能性に必須でありその機能不全は悪性胚細胞腫瘍発生に関与している」（口頭）第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5 月 10~12 日, 2013 年

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

同種細胞シートの保存法に関する研究

研究分担者 長嶋 比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授

研究協力者 前原 美樹 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・研究アシスタント

研究要旨：ヒト軟骨細胞シートの凍結保存法の確立を最終目的として、既に開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化凍結保存法の改良を行った。これまでに、哺乳動物胚・卵子に有効なガラス化法のコンセプト、すなわち Minimum Volume Cooling (MVC) が細胞シートの保存に適用し得ることを明らかにしてきた。この方法の臨床応用を実現するために、今年度は(1)より脆弱な薄層シートへの適用、(2)細胞生存性向上を目的とする融解条件の検討、(3)より操作性・安全性に優れたパッケージング素材の検討を行った。その結果、(1)積層化しない単層軟骨細胞シートのガラス化も可能なこと、(2)融解速度を高める工夫によって、細胞生存性を向上させ得る可能性があること、(3)パッケージング素材としてアルミフィルムが優れていること、などが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに開発した細胞シートガラス化保存法の適用拡大と改良を目的として、以下の項目について実験を行った。

(1) 薄層シートへのガラス化法の適用

(2) ガラス化された細胞シートの融解条件の検討

(3) パッケージング素材の検討およびガラス化細胞シートの保存法の検討

B. 研究方法

1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞(株式会社プライマリーセル)を温度応答性培養皿(35 mm, UpCell®, CellSeed)に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/dishの濃度で播種し、20% FBSを添加したDMEM/F12培地(GIBCO)で培養した。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、10%FBSおよび100 μ Mのアスコルビン酸を添加したRPMI1640培地(GIBCO)に置き換えた。

培養14日目に薄層(1層)形成を確認し、実験に用いた。2層化シートを実験に供する際は、得られた単層シートをCell shifter (CellSeed)を用いて積層化した後、更に1週間追加培養した。

2. 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。

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。平衡液およびガラス化液に、それぞれ25分および30分間浸漬した細胞シートを、パッケ

ージング素材で被覆しガラス化した。

3. パッケージング素材の比較

食品用ラップフィルム((株)クレハ、ポリ塩化ビニリデン、厚さ10.5 μ m)、もしくはアルミホイル((株)三菱アルミニウム、アルミニウム、厚さ12 μ m)を用いた。パッケージングした細胞シートを、液体窒素蒸気(-140 $^{\circ}$ C)に暴露してガラス化した。また、パッケージングした細胞シートを液体窒素蒸気中でガラス化した後に、液体窒素中に保管し得るかについても調べた。

4. 融解条件の検討

細胞シートを38 $^{\circ}$ Cの加温盤上に静置して融解する従来法を基準として、より急速な融解が期待できる2種の方法と比較した。すなわち、加温版の温度を45 $^{\circ}$ Cとする方法、および45 $^{\circ}$ Cの加温盤上に静置した細胞シート上に38 $^{\circ}$ Cの加温パックを重ねて置く方法を試行した。融解した細胞シートを、ピンセットを用いてパッケージから回収し、1M、0.5M、0M sucrose を含む20mM HEPES 緩衝TCM199 (20% FBS 添加) に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

5. ガラス化後の細胞シートの評価

融解後の細胞シートをコラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

C. 結果

1. 薄層シートへのガラス化法の適用

単層(6例)および2層化シート(6例)のガラス化を行った結果、融解後のシート構造の破損は全く認められなかった(図1, 表1)。

細胞の生存性は、単層シートおよび2層化シートともに、非ガラス化シートに比較して若干劣る傾向であった(84.9% vs. 88.4%; $p < 0.05$, 84.9% vs. 86.3%; 有意差無し)(表1)。

2. ガラス化された細胞シートの融解条件の検討

2層化シートを用いて融解条件を検討した結果を表2にまとめた。細胞シートの融解に用いる加温盤温度を45 $^{\circ}$ Cとし、さらに細胞シートを上下から加温する方法によって、非ガラス化試料に匹敵する細胞生存性が得られた(84.8% vs. 86.8%)。

また、いずれの区においても、融解後に細胞シートの破損は全く見られなかった(図2)。

3. パッケージング素材の検討およびパッケージングした細胞シートの保存法の検討

パッケージング素材に食品用ラップフィルム(従来法)もしくはアルミフィルムを用いて、2層化シートのガラス化を行った。いずれの方法においても、融解時の細胞シートの破損は、全く生じなかった(表3, 図3)。両区の細胞生存性(83.3% vs 82.6%)は同等であったが、非ガラス化区(86.7%, $P < 0.05$)に比して若干低下した(表3)。

液体窒素蒸気中で細胞シートをガラス化

した後に液体窒素に浸漬した結果、ラップフィルムでパッケージングされた細胞シートでは、5例中の1例において軽微な破損がみられた。一方、アルミフィルムでパッケージングされた細胞シート(5例)では、破損の発生は全く見られなかった(表4, 図4)。細胞生存率は、ガラス化区と非ガラス化区で同等であった(85.1% vs. 84.2% vs. 85.4%)。

上記試験から、アルミフィルムでパッケージされたシートは、液体窒素に浸漬保存し得る可能性が示されたので、追試を行った。表5、図5に示す通り、アルミフィルムでパッケージを用いてガラス化されたシートを、液体窒素中に浸漬後に融解しても、シート構造や細胞生存性への影響は見られなかった。

D. 考察

従来我々は、3層に積層化したウサギ軟骨細胞シートを対象として、ガラス化法の開発を行ってきた。将来のヒト軟骨細胞シートへの応用を考えると、より脆弱なシートもガラス化出来ることが求められる。そこで、今年度は1層および2層構造のウサギ軟骨細胞シートのガラス化を試みたところ、1層のシートにおいても優れた成績が得られた。

より脆弱な細胞シートのガラス化に対しては、パッケージングが有利に働いている可能性がある。特にアルミフィルムは、液体窒素への暴露時にも変形することがないので、内部の細胞シートを保護する効果が

高いと考えられる。今後は、アルミフィルムを用いた試験も行う予定である。また、アルミフィルムは食品用ラップよりも加工や滅菌が容易なので、研究段階の使用には適している。将来の臨床応用を視野に入れて、アルミフィルムを素材とする細胞シート用パッケージの製品化も必要であろう。

細胞シートのガラス化保存において、融解時の温度上昇速度は、細胞生存性に大きな影響を及ぼすと考えられる。今年度の研究では、より急速な温度上昇を実現する工夫によって、細胞生存性を高く維持し得ることが示された。より効率的な融解装置の開発等によって、細胞生存性のさらなる向上が期待できる。

E. 結論

1. 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、より薄層(1および2層)の細胞シートのガラス化保存にも有効である。
2. 細胞シートの融解をより急速に行うことによって、細胞生存率が改善される。
3. 細胞シートのパッケージング素材として、アルミフィルムが適している。アルミフィルムを用いてパッケージングされた細胞シートは、液体窒素蒸気でのガラス化後、液体窒素内で保存することも可能である。

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

<著書(共著)>

1) 長嶋比呂志: 哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: 繁殖生物学. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.

2) 松成ひとみ, 長嶋比呂志: 動物個体内での臓器再生. In: 幹細胞研究と再生医療. 南山堂; 2013: 130-135.

<原著論文>

1) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. J Reprod Dev 60:in press. 2014.

2) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. PLoS One DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone.0092219PONE-D-13-45932 [pii], 2014.

3) Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in

single- and multitransgenic pigs. Transplantation ,DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.

4) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. PLOS ONE 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.

5) Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. Hum Mol Genet 22:4368-82, 2013

6) Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraeche K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R,

Wolf E: Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. BMC Biotechnol 13:43. DOI: 1472-6750-13-43 [pii], 10.1186/1472-6750-13-43, 2013

7) Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M, Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. Surg Today 43:782-6. DOI: 10.1007/s00595-012-0274-x, 2013

8) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. Genesis, 51(11):763-776, 2013.

9) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. BMC Biotechnology , 13:58, 2013.

10) Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H, Miyagawa S: A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters.

Journal of Surgical Research , 183(1):412-418,DOI 10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.

11) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the red fluorescent protein kusabira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. Transplantation Proceedings, 45:1808-1810, 2013.

12) Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. J Reprod Dev 59(6): 599-603, 2013.

<総説>

1) 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志 : 卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、再生医療 13, 48-51, 2014

<その他>

<招待講演・海外>

1) Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov

2013; Osaka.

<招待講演・国内>

- 1) 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタによるトランスレーショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.
- 2) 長嶋比呂志: トランスレーショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京.
- 3) 長嶋比呂志: クローンブタをプラットフォームとするトランスレーショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京.
- 4) 長嶋比呂志: 生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京.
- 5) 長嶋比呂志: クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島.
- 6) 長嶋比呂志: クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催): 18 Jun 2013; 東京.

<国際学会>

- 1) Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of

the hollow fiber vitrification method for cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 2) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 3) Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 4) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H, Okada Y, Toyama Y: The analyses of collagen fascicle remodeling along with cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction in Kusabira-Orange transgenic pigs. In:

60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: 15-18 Mar 2014; New Orleans, USA.

5) Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M, Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

6) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

7) Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation

Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

8) Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

9) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Evolution of glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: KIDNEY WEEK 2013: 5-10 Oct 2013; Georgia, USA.

10) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, 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. In: 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society: 13-16 Oct 2013; Venice.

11) Hara S, Yokoo T, Umeyama K, Nagashima H, Nagata M: Pathological analysis of glomerular nodular lesion in diabetic pigs carrying a

dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: The International Society of Nephrology World Congress of Nephrology 2013: 31 May- 4 Jul 2013; Honk Kong.

<国内学会>

- 1) 松成ひとみ、浅野吉則、小林美里奈、内倉鮎子、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志: 膵臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来膵臓形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 2) 前原美樹、佐藤正人、松成ひとみ、内倉鮎子、松村幸奈、坂井理恵子、小久保舞美、松村和明、玄丞侏、長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 3) 松田泰輔、渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、小林美里奈、林田豪太、倉本桃子、金井貴博、山口智之、中内啓光、長屋昌樹、長嶋比呂志: ブタ卵における mRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 4) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells

based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.

- 5) 渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、松田泰輔、金井貴博、小林美里奈、松村幸奈、坂井理恵子、倉本桃子、林田豪太、浅野吉則、高柳就子、新井良和、梅山一大、長屋昌樹、花園豊、長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 6) 内倉鮎子、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存. In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸.
- 7) 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、佐原寿史、山田和彦、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用. In: 第1回日本先進医工学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪.
- 8) 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウンドの更新. In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪.
- 9) 内倉鮎子、松成ひとみ、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、前原美樹、若山清香、若

山照彦, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-1: 融解速度の胚生存性への影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

10) 牧野智宏, 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 新井良和, 松本守雄, 長嶋比呂志, 大鐘潤: ブタにおけるFbn1遺伝子のエピジェネティック制御解析. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

11) 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 骨格筋分化抑制遺伝子MstnのDNAメチル化による発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

12) 内田奈緒美, 東大, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

13) 坂本望, 東大, 内田奈緒美, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: ブタHnf1a, Hnf4aの肝臓特異的発現にはDNAメチル化とアンチセンス非コードRNAが関与する. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

14) 林田豪太, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 前原美樹, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブFucci を発現するブタ体細胞核移植胚の作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東

京.

15) 浅野吉則, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 中野和明, 林田豪太, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 金井貴博, 松田泰輔, 新井良和, 渡邊将人, 長嶋比呂志: DNAメチル化阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がブタ体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

16) 松村幸奈, 前原美樹, 本田香澄, 林田豪太, 倉本桃子, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ガラス化保存された体外成熟/体外受精胚を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

17) 相澤守, 中島佑亮, 小西敏功, 水本みのり, 本田みちよ, 新井良和, 中野和明, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ケイ素含有アパタイトによる高い骨伝導性を備えたキレート硬化型セメントの創製とその硬組織に対する生体内反応. In: 第26回日本セラミックス協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep 2013; 長野.

18) 水本みのり, 小西敏功, 本田みちよ, 木南啓司, 有村英俊, 新井良和, 中野和明, 長屋昌樹, 長嶋比呂志, 相澤守: キレート硬化型アパタイトセメントの材料特性および生体適合性に及ぼす α -リン酸三カルシウム粒子添加の影響. In: 第26回日本セラミックス協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep 2013; 長野.

19) 新井良和, 大鐘潤, 藤城修平, 中野和明, 塩田邦郎, 花園豊, 長嶋比呂志: 実物としてのマウス多能性幹細胞DNAメチル化プロファイルに基づく幹細胞評価: ブタiPS細胞を例として. In: 第7回日本エピジェネティクス研究会年会: 30-31 May 2013; 奈良.

20) 原怜史, 横尾隆, 梅山一大, 長嶋比呂志, 長田道夫: Dominant-negative変異型hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α)導入糖尿病ブタにおける糸球体結節性病変の解析. In: 第56回日本腎臓学会学術総会: 10-12 May 2013; 東京.

<特許>

1) 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット. 特願2014-027655. In.; 2014.

<新聞等>

1) 日経バイオテク (net) 2013.10.11. 「科学技術振興機構、明治大学、自治医科大学、効率的な方法で、短期間に免疫のないブタを作ることに成功」

2) 時事通信社 (net) 2013.10.10. 「免疫不全ブタ、半年で作成＝再生医療を促進・明大など」

3) 日経バイオテク (net) 2013.10.10. 「明治大と自治医大、JST、mRNAを用いたZFNと体細胞核移植技術で免疫不全ブタを短期間で作出」

4) 読売新聞テレビ朝日 報道ステーション 2013.7.4. 「軟骨細胞シートを使った変形性ひざ関節症の治療法」

<受賞>

1) The JRD Outstanding Paper Award
受賞年月: 2013年9月

受賞機関: 日本繁殖生物学会

受賞論文: 「Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device」Matsunari Hら他9名. *J. Reprod. Dev.* 58(5): pp. 599-608 (2012).

表 1. パッケージング¹⁾された薄層細胞シート (ウサギ軟骨細胞) のガラス化・融解後の形態維持と細胞生存性

細胞シートの種類		無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
1 層	ガラス化	100% (6/6)	84.9% (n=3)a
	非ガラス化対照	100% (6/6)	88.4% (n=6)b
a, b p<0.05			
細胞シートの種類		無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
2 層	ガラス化	100% (6/6)	84.9% (n=2)
	非ガラス化対照	100% (6/6)	86.3% (n=6)

1) ラップフィルムによりパッケージングした

有意差なし

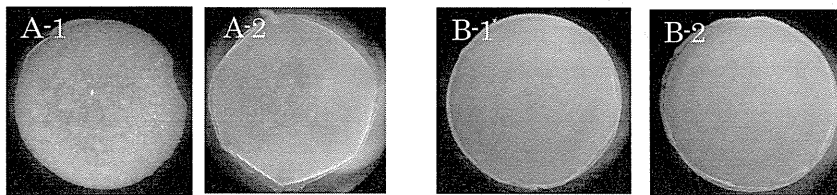


図 1. ガラス化された薄層細胞シートの融解後の形態

A-1: 非ガラス化細胞シート (1 層)、A-2: ガラス化・融解後の細胞シート (1 層)

B-1: 非ガラス化細胞シート (2 層)、B-2: ガラス化・融解後の細胞シート (2 層)

表 2. ガラス化ウサギ軟骨細胞シートの融解温度の検討

融解条件(温度)		無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
上面	下面		
-	38	100% (13/13)	82.5% (n=11)a
-	45	100% (9/9)	83.1% (n=9)a
38	45	100% (13/13)	84.8% (n=9)ab
非ガラス化対照		100% (11/11)	86.8% (n=12)b

a, b p<0.05

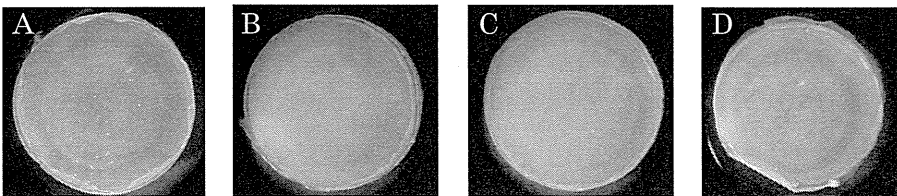


図 2. ガラス化されウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態に対する融解条件の影響

A: 下面のみを 38°C で加温、B: 下面のみを 45°C で加温、C: 下面を 45°C、上面を 38°C で加温、

D: 非ガラス化対照

表3. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態維持と細胞生存性

パッケージング素材	無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
アルミ	100% (12/12)	83.3% (n=12)a
ラップ	100% (15/15)	82.6% (n=13)a
非ガラス化対照	100% (14/14)	86.7% (n=14)b

^{a, b}p<0.05

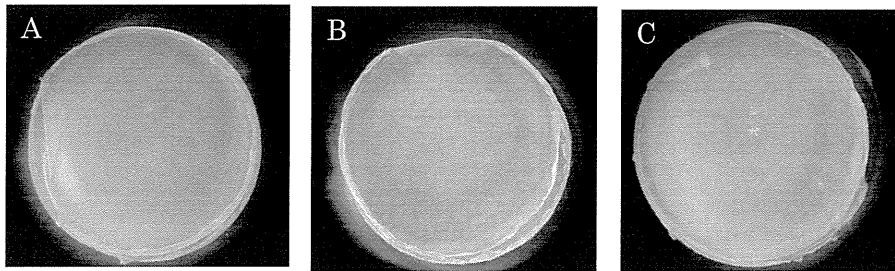


図3. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態比較

A: アルミフィルム、B: ラップフィルム、C: 非ガラス化対照

表4. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中保存の検討

パッケージング素材	無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
アルミ	100%(6/6)	85.1%(n=6)
ラップ	80%(4/5)	84.2%(n=5)
非ガラス化対照	100%(5/5)	85.4%(n=5)

有意差なし

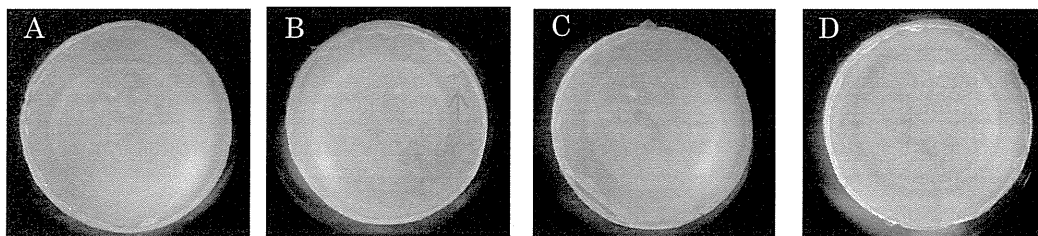


図4. パッケージング法によりガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中浸漬後の形態

A: アルミフィルム、B: ラップフィルム(破損例)、C: ラップフィルム(成功例)、D: 非ガラス化対照

表 5. アルミパッケージを用いてガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中保存の影響

	液体窒素への 浸漬の有無	無傷での回収率	細胞生存率(n 数)
ガラス化※	+	100%(3/3)	84.8%(n=3)
	-	100%(2/2)	84.2%(n=2)
非ガラス化対照	-	100%(2/2)	87.4%(n=2)

※液体窒素蒸気への暴露によってガラス化を行った。

有意差なし

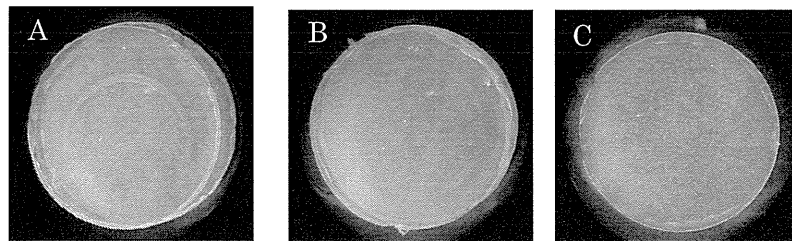


図 5. アルミパッケージを用いてガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素浸漬後の形態
A: 液体窒素中に浸漬した細胞シート、B: 液体窒素蒸気によるガラス化のみ行った細胞シート、
C: 非ガラス化対照

多指症軟骨組織由来細胞の同種 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
研究分担者 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 岡田 恵里 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：本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって、すでに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てきている。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、現在、同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、PDCCs は T 細胞の免疫応答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。今回の結果から、関節軟骨損傷の治療には自己軟骨細胞だけでなく、同種である多指症由来軟骨細胞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。

昨年度は、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、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。

現在のところ同種細胞のソースとして、多指症患者の手術時廃棄組織由来軟骨細胞

を想定している。多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、短期間に多く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。しかしながら、同種細胞移植の際、拒絶反応が起こることが懸念される。そこで本年度は、*in vitro* において多指症由来軟骨細胞が同種 T 細胞におよぼす影響を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞

多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと、国立成育医療研究センターで多指症手術時に得られた 3 例の軟骨組織から単離された細胞を使用した。(以下、PDCC1, PDCC2, PDCC3 と記す。) 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。PDCCs 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 (Wakojunyakukouyou 社) を加えたもので培養した。実験に使用する際は、血清濃度を 10 % に減らした培地に交換した。

NHDC は LGM-3™ (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-3™ に再懸濁して、必要数播種した。

3. 混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 ウェルに NHDC (3 x 10⁴ cells) と CD4⁺TC (2 x 10⁵ cells) を播種し共培養した。

4. CD4⁺TC と PDCCs との共培養

PDCCs (2 x 10⁴ cells) が播種された各ウェルに CD4⁺TC (4 x 10⁵ cells) を撒き、共培養した。

5. MLR と PDCCs の共培養

PDCCs (2 x 10⁴ cells) が播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養し

た。

6. 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 BrdU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

7. TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β の生理活性抑制

培養開始日の上清に 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) もしくは 5 µg/ml IgG 1 isotype control (Clone No. 11711; R&D System 社) を添加した。

8. TGF-β の測定

培養 5 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。同一条件を 3 ウェル測定し、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

9. 倫理面への配慮

研究に用いた PDCCs は、国立成育医療研究センター研究所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、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 結果

1. PDCCs が同種 CD4⁺TC におぼす影響の検討

細胞増殖解析の結果、陽性コントロールである MLR の T 細胞増殖活性を 100%とした場合、PDCC1 で 3.5%、PDCC2 で 11.8%、PDCC3 で 8.9%の増殖活性しか観察されなかった。(図 1)

2. PDCCs が MLR におよぼす影響の検討

MLR の写真では T 細胞の大きな芽球形形成が観察されているのに対して、MLR と PDCCs を共培養した写真では小さな芽球形形成しか観察されなかった。(図 2-A) 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 PDCC1 で 21%、PDCC2 で 33%、PDCC3 で 20%になっていた。(図 2-B)

3. 培養上清中の TGF-β1 量

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。昨年度、積層化軟骨細胞シートにおいて TGF-β1 が高発現していることを報告している。そこで PDCC1 の抑制効果にも TGF-β1 の関与が考えられたことから、培養上清中の TGF-β1 を測定した。(図 3) その結果、PDCC1 で 2383 pg/ml、PDCC2 で 1710 pg/ml、PDCC3 で 1980 pg/ml と非常に高

い TGF-β1 の発現がみられた。

4. 接触培養条件における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF-β1 の影響についての検討

PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への TGF-β1 の関与を検証するため、MLR と PDCCs の共培養系に TGF-β 中和抗体を添加し、培養上清中の TGF-β1 の生物活性をベースレベルまで減少させた。TGF-β 中和抗体の添加有り、無しの間で T 細胞増殖活性を比較したところ、有意な差は見られなかった。(図 4)

D. 考察

本研究は、同種細胞を用いた積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞が免疫系に与える影響を *in vitro* で検討している。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。これまでの研究で、マウス軟骨細胞および成人関節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、現在同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞におよぼす影響を *in vitro* で検討した。まず、CD4⁺TC に対する PDCCs の影響をみたところ、陽性コントロ

ールである MLR の T 細胞増殖活性に対して PDCCs と共培養した T 細胞増殖活性は、個体差はみられたが、平均 8.1 % と非常に低かった。(図 1) このことは PDCCs 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。また、PDCCs が活性化 T 細胞に与える影響を検討したところ、PDCCs 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) 以上のことより、PDCCs も成人関節軟骨細胞と同様に免疫原性が低だけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することを示唆している。

成人関節軟骨細胞を用いた先行実験から、T 細胞増殖抑制効果には、1：液性因子（その候補の一つとして TGF- β 1）と、2：細胞間接触の両方が関与していることを示唆する結果を得ている。(厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 H23 年度：細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究および H24 年度：関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現の報告書の加藤分担の項参照) そこで、PDCCs 培養上清中の TGF- β 1 量を測定した結果、PDCCs においても高発現していることが分かった。

(図 3) このことより、PDCCs による同種 T 細胞の活性化抑制に TGF- β 1 が関与することが推測されたが、実際に TGF- β 1 が関わっているか、TGF- β 中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- β 1 の生物活性をベースレベルまで減少させ検討した。その結果、接触培養条件下においては、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果を減弱させる

ことはなかった。(図 4) このことは、MLR と PDCCs が接触する培養条件下では、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への TGF- β 1 の寄与が低いことを示唆している。

我々は、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を見据えた場合の細胞ソースとして、現在のところ、多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) を想定している。PDCCs は 1：手術時廃棄組織から単離できる、2：優れた増殖性を有し、一検体から複数人分の積層化シートを作製することが可能である、といったことなどから、魅力的な細胞ソースになると考えられる。

今後、PDCCs の有用性を確実なものにするために、1：検体数を増やした再現性の確認、2：PDCCs 抑制効果の一部分に TGF- β 1 の関与があるかの再検証；今回は MLR と PDCCs が接触する培養条件下で検討していたので、トランスウェルなどを用いて、MLR と PDCCs を物理的に離し（非接触培養条件）、液性因子のみ行き来できる条件下で、抗 TGF- β 抗体を添加することで、PDCCs 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

PDCCs は免疫原性が低だけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することから、同種積層化軟骨細胞シート移植の際の細胞ソースとして PDCCs を利用出来ることが示唆された。