

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. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A. Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
- 2) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響」. 第 27 回日本軟骨代謝学会（京都, 2014.2）
- 3) 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（1）：遺伝子発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（東京, 2013.11）
- 4) 加藤玲子, 薮島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（東京, 2013.11）
- 5) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾. 「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（東京, 2013.11）

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

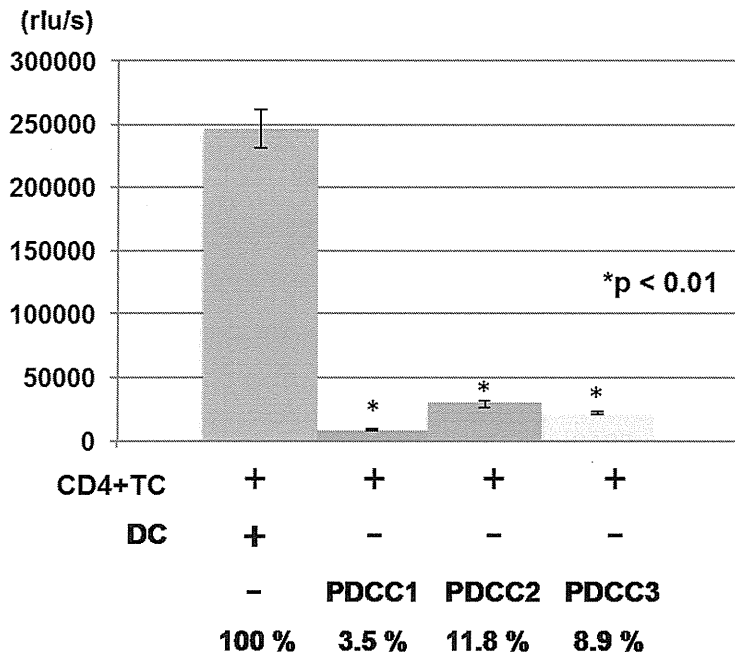


図1: 多指症軟骨組織由来細胞が同種 T 細胞におよぼす影響

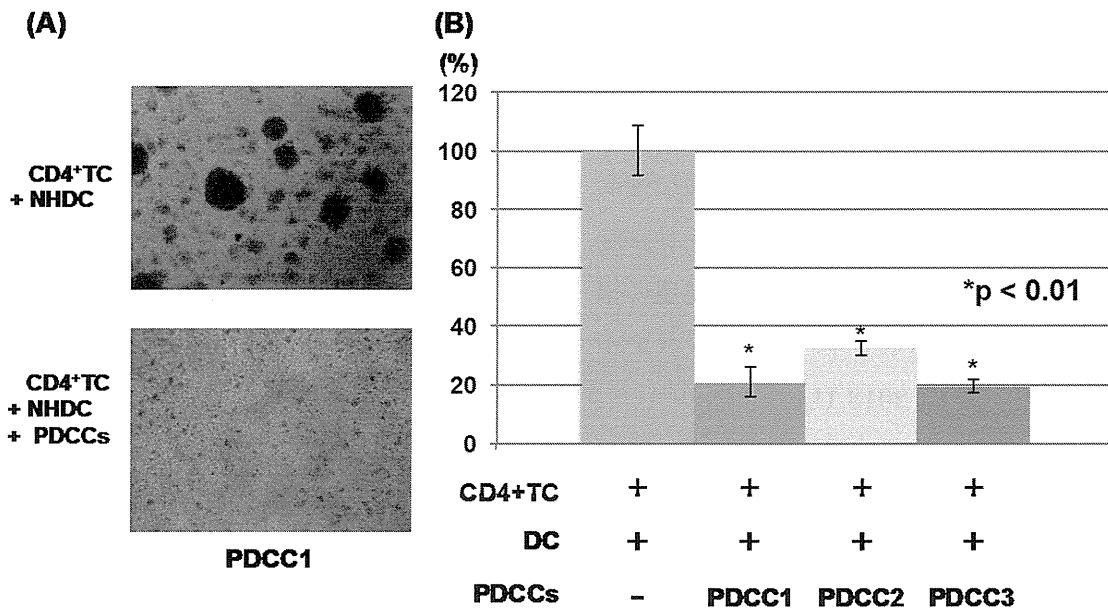


図2: 多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞の増殖におよぼす影響

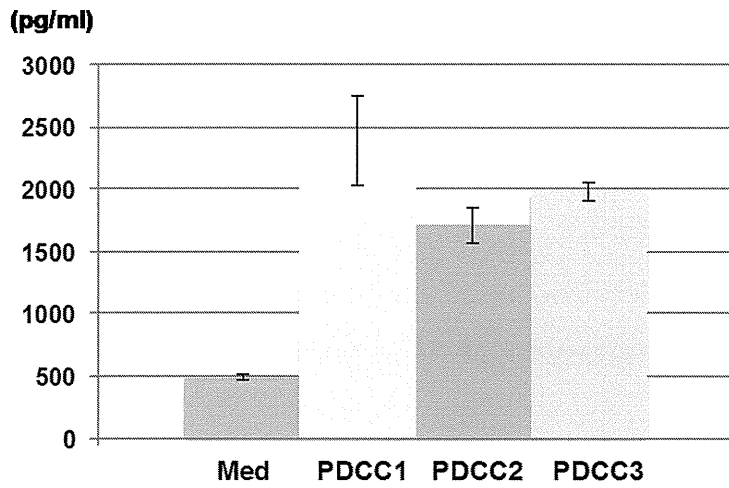


図3: 培養上清中の TGF-β1 量

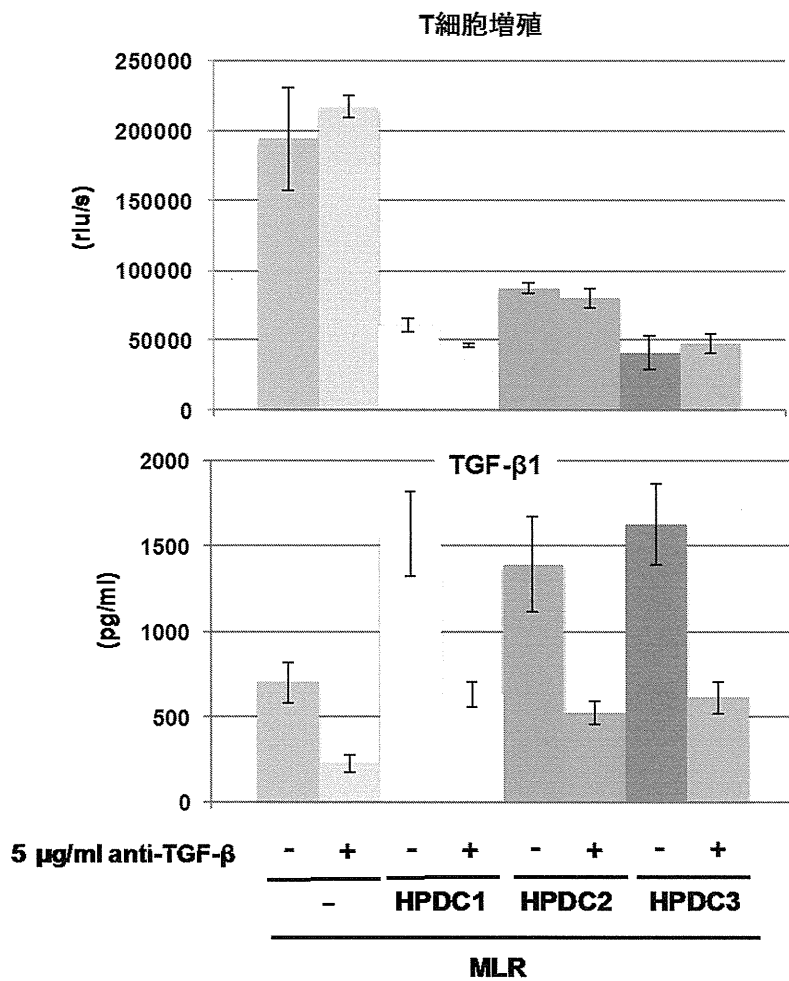


図4: 接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF-β1 の関与

## 細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による経時的評価 に関する研究

研究協力者 竹内 護 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・教授  
研究協力者 村井 邦彦 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・非常勤講師  
研究協力者 高久 裕子 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・大学院生

研究要旨：東海大学で開発された軟骨細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うため、BLI (Bioluminescence Imaging)法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートの最適な評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定した。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用シート群の3群とも21ヶ月以上の発光を確認した。実験経過中の移植細胞からの発光は移植右膝に留まり他に移動しないことを確認し、細胞シートの安全性を実証した。

### A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人教授らによって開発された細胞シートの移植後に動物を生かしたまま経時的にグラフトの動態を評価するために、経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、動物モデルにおける BLI (Bioluminescence Imaging)法による評価系を決定し、細胞シート膝関節移植後の滞在時間を測定することを目的とした。同時に、細胞シートは軟骨細胞と滑膜細胞の共培養による臨床応用を目指している。軟骨細胞シートと滑膜細胞シート単体移植と両シートを併用した移植の結果、細胞シート滞在期間に差が生じるかについて比較検討を試みた。我々は次の2つの仮説を立てた。

1. 軟骨細胞、滑膜細胞からなる細胞シートは移植部位にとどまりレシピエント自身の

軟骨再生を促しながら減り続けて短期に消失する。

2. 関節内環境に似せた滑膜細胞シートと軟骨細胞シートの併用移植は、それぞれの単独細胞シートより長期に生存して自己軟骨細胞の組織修復効果を高める。

本研究の主目的は以下の3つである。

1. ラット膝関節同種移植後の細胞シートの生存期間を BLI を用いて確認する。
2. 移植細胞生存期間について軟骨細胞シート単独移植、軟骨シート滑膜シート併用移植、滑膜細胞シート単独移植を比較する。
3. 細胞シート移植後の移植細胞の生体内遊走の有無を BLI から確認する。

近年 BLI 法による移植細胞の *in vivo* 追跡が盛んに報告されるようになったが、中でもホタルの発光遺伝子ルシフェラーゼ (*Luc*) が最も頻用されている。発光基質ルシフェリンとの反応による発光を高感度

CCD カメラで捕捉し、イメージ化することで実験動物を殺すことなく移植細胞の長期追跡が可能である。また、光子（フォトン）を単位とした発光強度は細胞数およびルシフェリン量に比例することが一般に知られている。移植細胞の追跡を行なうことを主目的とした他、以下を副目的とした。

1. 細胞シート移植後の細胞数推移を発光強度の変化から考察する。
2. ラットにおける細胞シート移植後の軟骨全層欠損における修復効果を組織学的に確認する。

## B. 研究方法

全ての動物実験は自治医科大学実験動物委員会および関連する委員会のガイドライン勧告に従って行なった。

### 1. 研究チームの構成

東海大学においては研究統括者の佐藤正人らが自治医科大学から提供された Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats 由来の組織より細胞シートを作製し、自治医科大学にて大腿骨膝関節面に骨軟骨欠損を作製した野生型 Lewis rats に同種移植を行った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（竹内護教授）らが Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats より採取した細胞シートの材料を提供した。

### 2. 細胞シートの作製・移植

自治医科大学において先端医療技術開発センター先端治療開発部門（小林英司教授）

より同部門で開発した 16 週令のルシフェラーゼ Tg Lewis Rats の提供を受け、ラットを犠牲死して膝関節および股関節より軟骨・滑膜組織を採取し、東海大学にて酵素処理後に発光するルシフェラーゼ発現細胞シートを作製した。温度応答性培養皿 UpCell を用いて 6 ウェルプレートにて軟骨・滑膜細胞シートを作製した。これらは移植に用いることのできる品質であり、ルシフェリンを加えることで全てのシートが発光することを IVIS によるイメージングで確認した（図 1）。

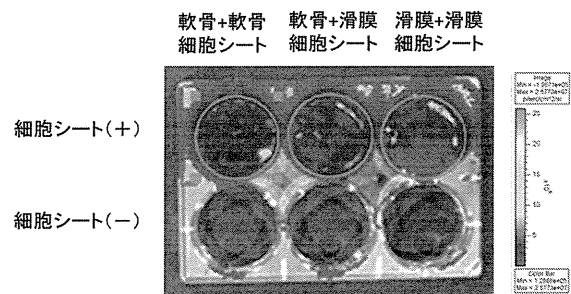


図 1. 細胞シートを置いたシャーレ上にルシフェリンを添加した後の IVIS の画像  
左から軟骨細胞シート、軟骨滑膜併用細胞シート、滑膜細胞シートからの発光が青くイメージ化されている。

自治医大において 16 週令の野生型 Lewis rats スラット 36 匹（オス）をレシピエントとし、2%イソフルラン麻酔下で右膝に正中傍膝蓋骨切開を行い、膝蓋骨を脇に処理した。展開された膝関節の右膝大腿骨膝蓋面を充分に露出した後に、骨髓から間葉系幹細胞が動員されても自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を 18G 針を用いて作製（φ ; 3

mm)した。そのうえで同部位に16週齢のルシフェラーゼトランスジェニックラット（オス）由来の軟骨組織および滑膜組織から作製したルシフェラーゼ発現軟骨細胞シートと滑膜細胞シートを同種移植した（図2）。軟骨細胞と滑膜細胞単独シートと両細胞併用シートの生存期間に対する相乗効果を見るために、ルシフェラーゼ発現軟骨細胞シート(AC)とルシフェラーゼ発現滑膜細胞(SY)シートの2種類を作製した。それらを組み合わせて軟骨細胞シート単独群(AC-AC群)と滑膜細胞(SY-SY群)シート単独群、両シート併用群(AC-SY群)の3群を作製した(各  $n = 12$ )。各種細胞シートの膝関節内滞在期間の影響について比較検討を試みた。

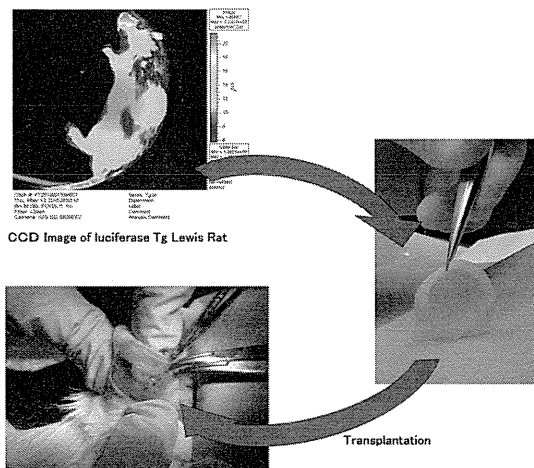


図 2. ルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞シートの移植手順

それぞれ、ルシフェラーゼトランスジェニックラットのイメージング画像（左上）、作製したルシフェラーゼを発現する細胞シート（右）、野生型ルイスラットに作製した骨軟骨欠損（左下）を示す。

### 3. BLI 法による評価方法、ルシフェリン投与方法の検討

D-ルシフェリン (Biosynth AG、Staad、Switzerland)150 mg/kg を肩甲骨下より皮下投与後、CCD カメラを搭載した IVIS(Xenogen Corp; Alameda、CA) でイメージングを確認した。イメージングの際にはもっとも強いルシフェラーゼ発光強度を測定することにした。次いで、ルシフェリンの投与方法を検討した。ルシフェラーゼ陽性軟骨細胞シート移植後1ヶ月目のルイスラット1匹を試験的に用いた。3種類の 방법으로ルシフェリンの投与方法を比較検討した。飽和濃度に近い50 mg/mlの濃度のルシフェリン溶液を蒸留水で作製した。イソフルラン麻酔下に投与した。ルシフェリンの投与経路と投与量は、陰茎静脈から静脈注射(IV)60 mg/kg、肩甲骨付近から皮下注射投与(SC)150 mg/kg、および移植膝間隙から膝関節内注射(IA)30 mg/kgとした。ルシフェリン投与後のラットをIVISの高感度 CCD カメラを搭載した小動物用チャンバーに静置した。そのうえで1分毎に放出される光子量から発光強度を計測した。発光強度の経時的变化を図3に示す。ルシフェリン投与方法に従って異なる発光強度曲線となることが判明した。

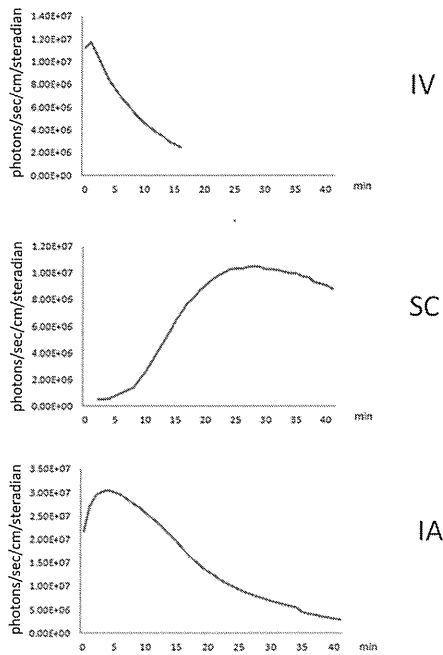


図 3. IVIS によって測定した異なる投与方法の発光強度の経時変化  
上から順に静脈注射 (IV) 投与方法、皮下注射 (SC) 投与方法、関節内注射 (IA) を示す。

IV では発光強度の最高値は 1~2 分で達し、その後急速に低下した。そのため発光強度の計測を開始する前にピーク値の計測を逃すことがあった。また陰茎静脈からの投与は技術を必要とした。一度失敗すると大きな皮下出血をきたすため再投与は困難となった。SC では緩やかに発光強度は上昇した。発光強度は 20~30 分後に最高値に達して緩やかに低下した。薬液投与は難しい手技を必要としなかった。ただし、同じ発光強度を得るのに IV 投与方法に比べて 2 倍以上のルシフェリンが必要であり、3 種の投与方法のなかで最も多くのルシフェリ

ンを必要とした。IA では発光強度は 4~5 分で最高値に達した。手技は静脈注射に比較して簡易であったが投与に失敗することがあった。この方法は血流を介せず直接ルシフェリンが移植細胞に作用するために最少量のルシフェリンによる最大の発光強度を確認することができた。しかしながら、薬液の投与量は 0.2 ml 程度であったが、ラットの膝関節包は過膨張した。このことは膝関節圧の上昇の原因となり、移植細胞や骨軟骨欠損部の再生に何らかの影響を与えることが懸念された。以上の予備実験から、皮下注射(SC) が一番簡易であり、手技によるバイアスが生じる危険性が小さいと判断した。また IA と比べて移植部位への影響は少ないと判断し、ルシフェリンの投与は皮下注射で行った。

#### 4. 組織学的評価

前述した右膝に骨軟骨欠損を作製し細胞シートを同種移植した 36 匹のレシピエントルイスラットの中から 24 匹を用いた。AC-AC 群(n=8)、AC-SY 群(n=8)、SY-SY 群(n=8)から、移植後 2、4、6、8 週に各群 2 匹ずつ CO<sub>2</sub> 吸入にて安楽死させた。それらの移植膝の骨軟骨欠損部の標本作製した。組織検体は 4%パラホルムアルデヒドで 1 週間固定したのち、3 週間 10%EDTA で脱灰した。パラフィン包埋したのち骨軟骨欠損部の中央部分で 5 $\mu$ m 厚の薄切り標本作製した。各切片は再生軟骨の評価のためサフラニン O 染色を施した後に光学顕微鏡で観察した。この染色法は硝子軟骨細

胞外基質の構成要素であるグルコサミノグリカンを含む酸性粘液多糖に反応した部分が赤く染色され、軟骨基質が線維化すると染色されない。再生の評価は International Cartilage Research Society (ICRS) histological grading system を用いて点数化による評価を行った（表1）。この方法は国際軟骨再生会議が提唱している。骨軟骨欠損部の再生所見を硝子軟骨組織の有無、組織統合性、表層組織の性状、軟骨下骨といった組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。評価は2名の観察者で行った。点数は平均値をグラフ化した。

再生組織の形成	Talwasech の形成	移植部周囲の性状
4:大部分が硝子軟骨	1:石灰化軟骨部の形成が25%以下	1:結合していない
3:大部分が線維軟骨	2:石灰化軟骨部の形成が25%-45%	2:炎症の一部
2:軟骨組織ではない	3:石灰化軟骨部の形成が50%-75%	3:炎症の結合
1:軟骨組織以外	4:石灰化軟骨部の形成が76%-90%	4:炎症反応を認めない
軟骨染色	軟骨下骨の形成	炎症反応
1:無染	1:形成されない	1:炎症反応を認めない
2:わずかに染まる	2:わずかに形成されている	2:わずかに炎症反応を認める
3:中等度染まる	3:しっかり形成されている	3:強い炎症反応を認める
4:強く染まる		
細胞形成の組織統合性	表層の性状	組織学的欠損部評価
1:順接	1:強度の線維化または連続	1:25%以下
2:炎症や連続	2:中等度の線維化、非整合性	2:26-50%
3:軟骨細胞の構成ではない	3:強度の線維化、非整合性	3:51-75%
4:柱状軟骨細胞を認める	4:正常	4:76-90%
5:正常またはそれに近い軟骨細胞		5:91-110%
軟骨細胞のクラスター形成		合計点
1:細胞のクラスター形成が25-100%		
2:25%以下のクラスター形成		
3:クラスター形成を認めない		

表 1. ICRS histological grading system

軟骨組織の再生所見について組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。

## C. 結果

### 1. 細胞シートの関節内滞在時間

BLI から移植細胞由来と推察する細胞の21ヶ月以上生存を全てのラットにおいて

確認した。イメージングでは発光は移植膝に限局して他所での発光は認めなかった。また明らかな運動機能異常も観察されなかった（図4）。

これ以上の計測は、おそらく寿命と思われるラットの死亡が続いたため中止した。

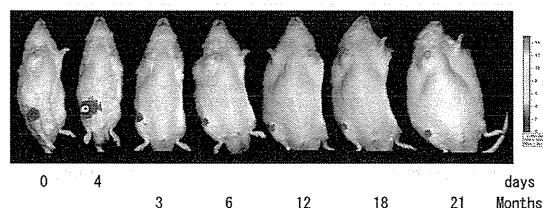


図 4. 右膝から検出されたルシフェラーゼ発光の CCD 画像の経時的変化

図は AC-AC 群のうちの1匹のイメージングを経時的にしめす。ルシフェラーゼの発光を右膝部に限局して認める。

### 2. 軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、両細胞シート併用移植による滞在期間の差の検討

発光強度の推移は各群とも移植後3~4日後にピーク値に達した。移植0日の発光強度に比べてAC-AC群で16倍、AC-SY群で5倍、SY-SY群で7倍に達した。発光強度は暫時減少して3~4週間後には3群とも移植0日の発光強度の1/10程度の値になって安定した。これは言い換えると各群においてピーク時の発光強度から1/160、1/50、1/70以下に減少したことになる。しかし発光は微弱ながらも消失することではなく21ヶ月以上計測された（図5上図）。発光強度の群間差は移植後1ヶ月までは3群間にばらつきを認める傾向があっ



たが、それ以降の長期の経過では各群とも同程度の変化率で推移した（図5下図）。

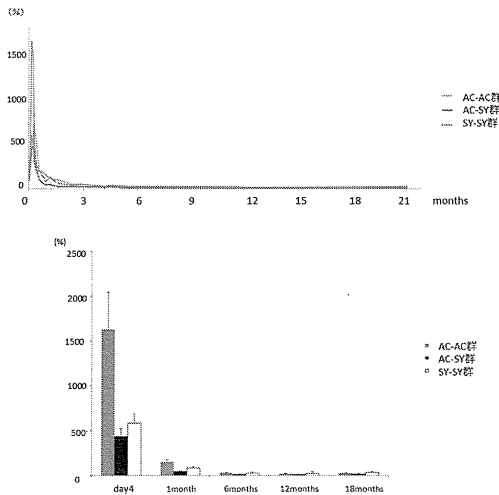


図5. 長期にわたる発光強度変化の推移  
 移植0日（day0）の発光強度比を100とした場合の発光強度の推移を示す。

上図：発光強度曲線の推移、各群とも移植後3-4日のピーク値に達した後に低値で安定した発光強度を示すようになった。しかし21ヶ月間発光は途切れることはなかった。下図：ある地点の発光強度比の各群の値を抽出してグラフ化した。各群とも半年以降は初期の1/10以下に安定した。

### 3. 組織所見

組織所見では3群ともに軟骨細胞の再生所見を認めた。6週目まではAC-AC群、SY-SY群で軟骨基質の赤染がAC-SY群よりも著明であるが、8週目にはAC-SY群の赤染が長く続く印象をうけた。SY-SY群では移植後8週の顕鏡所見において線維化の所見を強く認めた（図6）。ICRS grading systemの点数はAC-AC群での値が他の群

よりも高かった。8週目の時点でAC-AC群とSY-SY群は値の低下を認めたが、AC-SY群のスコアは6週目から横ばいを示した（図7）。

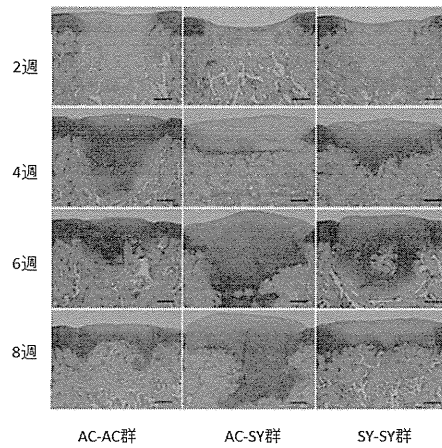


図6. 軟骨組織修復の組織学的評価。サフランニンO染色した標本の光学顕微鏡画像。軟骨細胞が産生するグリコサミノグリカンを含む産生粘液多糖が赤く染色されている。スケールバーは500µmを表す。

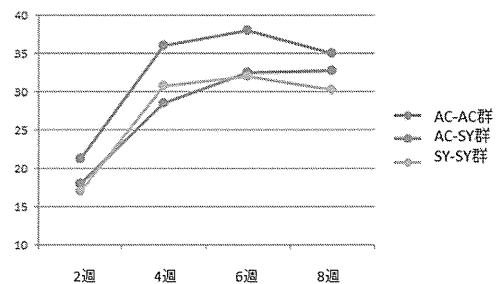


図7. ICRS grading systemによる点数の変化

AC-SY群の値が8週目の地点でも低下を認めていない。

### D. 考察

今回の研究で予想以上の細胞シートの長

期生存を BLI を用いて確認することに成功した。また移植した軟骨細胞シートは 21 ヶ月以上膝関節内で生存することを確認した。さらに BLI 画像から移植した細胞が他所に移動しないで膝に留まることが確認できた。これは細胞シートの安全性を証明する結果であったと考えられる。細胞シートは軟骨組織の修復および再生の誘導因子として働いてシートを移植後に移植部周囲の宿主細胞による主導的な修復が行なわれると考えている。その後、細胞シート由来の細胞自身は移植後に消失すると考えていた。成熟した細胞からなる軟骨細胞シートの細胞はそのままの形で生存することは考えにくく、例えば脱分化した形で存在する可能性も考えられる。軟骨組織におけるニッチ環境についていまだ不明の部分が多いためこれらの機序解明は今後の課題である。次に生存期間に関する軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用効果について調べた。細胞シートにおける軟骨細胞と滑膜細胞の併用は、軟骨下骨の再生や再生軟骨細胞の構築において軟骨細胞単独シートより優れた効果があることを実証している。これらの先行研究を参考として生存期間においても軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用が単独細胞シート移植よりも長い細胞の生存期間が記録されると仮説をたてた。しかしながら 3 群とも 21 ヶ月以上の長期生存することを確認したため、生存期間に関して軟骨細胞シートと滑膜細胞を併用する効果は今回の研究では明らかではなかった。

BLI で計測される発光強度の変化を記録

したが、3 群とも移植時より 3~4 日目に最高の発光強度を記録し、その後、AC-AC 群、AC-SY 群、SY-SY 群の発光強度はそれぞれピーク 時の 1/160、1/50、1/70 まで低下して経過した。この現象について考察する。In vitro では同量のルシフェリンを同一種のルシフェラーゼ導入細胞に投与するとその発光強度は細胞数にほぼ比例することが一般的に知られている。即ち半定量的に BLI の発光強度を利用して細胞数を推測することが可能である。今回の In vivo の実験では術後数日の移植直後の細胞を取り巻く環境が一定ではなく厳密な細胞数の比較はできない。移植部周囲の環境は移植後に大きな変化が生じるとともに、移植術を施行する時には移植細胞には大きなストレスがかかる。そのため移植された細胞の周術期の生体活性の変化の程度については不明である。つまり今回の発光強度曲線の変化の 1 つの説明としては、移植時はストレスによって移植細胞の生体活性が低いため計測される発光強度は低くなり、経過とともに移植細胞の生体活性は回復して発光強度も高値をしめすと考えられる。その後、移植時より細胞シートの細胞は死滅していくため経過とともに移植時に比べてごくわずかな細胞シートの細胞が移植部位に生存したのではないかと考える。今回の実験でこの発光強度は微弱ではあるが 21 ヶ月以上途切れることなく続くことが証明された。これ以降はおそらく寿命によるレシピエントラットの死亡が相次いだため計測を中止しており、より長期の変化は不明であるが、

細胞シートは移植後生涯にわたって移植部位にわずかにせよ生存しうることが示唆された。実際の移植細胞の同定、およびその形態の確認は今後の研究課題となる。軟骨細胞シートは再生した軟骨組織が時間の経過によって線維軟骨に置き換わることなく、完全に硝子軟骨の状態が保たれる状態を目指して開発されている。今回の組織所見ではSY-SY群の組織像で線維軟骨の再生所見が著明であった。このことは他種の動物実験の成果と一致した。

#### E. 結論

BLI の手法を用いて、ラット膝関節における大腿骨軟骨全層欠損モデルに対する細胞シートの同種膝関節移植後に移植細胞シート細胞が長期生存することを確認した。本研究期間において移植細胞は追跡中に膝関節から他臓器の移動を認めなかったことから細胞シート移植後の安全性を確認した。以上をまとめ 2014 年 2 月号の Biomaterials 誌上で報告した。

#### 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) Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E,

Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, Sato M. In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint. Biomaterials, 2014 Feb;35(7):2199-2206.

#### 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

IV. 研究成果の刊行（平成25年度）  
に関する一覧表

## 書籍

出版	書籍名 (出版社)	タイトル	ページ	出版地	著者氏名
2014年	遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元組 織化・その最先端 技術と材料技術 (メディカル ドゥ)	第3章 細胞3次元組織化のた めの培養技術 6. 細胞積層化技術 3) 滑膜細胞との共培養法によ り作製した軟骨細胞シートの 特性評価	270-276	JPN	小久保舞美, <u>佐藤正人</u>
2013年	再生医療におけ る臨床研究と製 品開発 (技術情報協会)	第6章 非臨床安全性試験・ 臨床試験における評価 [4] 軟骨再生における評価	384-387	JPN	<u>佐藤正人</u>

## 雑誌

出版	発表誌名	論文タイトル	ページ・ 巻号	著者氏名
2014年	Biomaterials	In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint	35(7), 2199-2206	Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, <u>Sato M</u>
2014年	The Anatomical Record	Articular cartilage regeneration using cell sheet technology	297(1), 36-43	<u>Sato M</u> , Yamato M, Hamahashi K, Okano T, Mochida J
2013年	Journal of Biomedical Materials Research. Part A	Potential utility of cell sheets derived from the anterior cruciateligament and synovium fabricated in temperature- responsiveculture dishes	Epub ahead of print	Mitani G, <u>Sato M</u> , Yamato M, Kokubo M, Takagaki T
2013年	BMC Biotechnology	Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets	13(58) Epub ahead of print	Maehara M, <u>Sato M</u> , Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H
2013年	Journal of Tissue Engineering and	Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with	Epub ahead of print	Kokubo M, <u>Sato M</u> , Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Ebihara G, Okano T,

	Regenerative Medicine	temperature-responsive culture inserts		Mochida J
2012年	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets	Epub ahead of print	Hamahashi K, <u>Sato M</u> , Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J
2014年	日本再生医療学会誌	関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現	13(1), 64-68	<u>佐藤正人</u>
2014年	日本機械学会誌	軟骨再生医療の現状・今後の展望	117(1142), 16-19	<u>佐藤正人</u>
2013年	CLINICAL CALCIUM	細胞シートによる関節軟骨の治療	23(12), 59-65	<u>佐藤正人</u>
2013年	CLINICIAN	細胞シートによる関節治療	60(620), 74-81	<u>佐藤正人</u>
2013年	整形外科	血管新生阻害剤 - その適応の拡大をめざして	64(5), 468	長井敏洋, <u>佐藤正人</u> , 持田譲治
2013年	整形・災害外科	細胞シート技術を応用した軟骨再生法の開発	56(5), 565-572	<u>佐藤正人</u> , 持田譲治
2013年	Pharma Medica	細胞シートによる関節軟骨再生治療	31(4), 15-19	<u>佐藤正人</u>

雑誌 (その他)

出版	発表誌名	タイトル	ページ・巻号	著者氏名
2013年	週刊文春	ひざ痛治療革命「軟骨再生」最前線レポート	2013年9月12日号	<u>佐藤正人</u>
2013年	MEDICAMENT NEWS	特集＝再生医療の現状と展望「軟骨再生治療」	第2117号, 10-12	<u>佐藤正人</u>

学会発表

発表	発表学会名	タイトル	著者氏名
研究代表者 佐藤正人			
2014年	2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society	Prevention of post-traumatic osteoarthritis by administration of intra-articular anti-VEGF antibody (bevacizumab; Avastin)	Nagai T, <u>Sato M</u> , Kobayashi M, Mochida J
2013年	TERMIS-AM 2013	Diagnosis for degenerative articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation	Tani Y, <u>Sato M</u> , Yokoyama M, Takagaki T, Kobayashi M, Kokubo M, Ebihara G, Ito S, Ukai T, Ishihara M, Mochida J
2013年	Gordon Research Conference	Articular Cartilage Regeneration Using Cell Sheet	<u>Sato M</u>

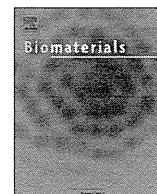
2014年	第13回日本再生医療学会	【シンポジウム】軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究と今後の課題	佐藤正人
2014年	第13回日本再生医療学会	同種軟骨再生医療のための安全性評価	岡田恵里, 佐藤正人, 高垣智紀, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 河毛知子, 阿久津英憲, 伊東紀子, 梅澤明弘, 持田讓治
2014年	第13回日本再生医療学会	低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価	小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 内山善康, 繁田明義, 持田讓治
2014年	第13回日本再生医療学会	ウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1	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, 持田讓治, 長嶋比呂志
2014年	第27回日本軟骨代謝学会	多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響	加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田讓治, 新見信吾
2014年	第27回日本軟骨代謝学会	細胞シートを用いた関節軟骨再生治療	高垣智紀, 佐藤正人, 三谷玄弥, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治
2014年	農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト・医薬品作物等開発分科会, 推進会議プログラム	コラーゲンヒトリゲルを用いた関節軟骨再生に関する研究開発	佐藤正人
2014年	第3回三浦半島地区膝関節疾患懇話	【特別講演】軟骨再生医療の現状と未来	佐藤正人
2014年	第13回かわごえ並木の会	【特別講演】細胞シートによる関節軟骨の再生医療	佐藤正人
2013年	第28回日本臨床リウマチ学会	【ランチョンセミナー】再生医療で変形性膝関節症は治せるか?	佐藤正人
2013年	最先端研究開発支援(FIRST)プログラム	【パネルディスカッション】細胞シートが拓く新しい再生医療	佐藤正人
2013年	防衛医科大学校整形外科同門会	【教育研修講演】軟骨再生医療の現状と細胞シートによる関節治療の展望	佐藤正人
2013年	小田原整形外科医会	【教育セミナー】軟骨再生医療の現状と未来	佐藤正人
2013年	第3回DDS徐放化再生医療研究会	【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療の可能性	佐藤正人
2013年	第28回日本整形外科学会基礎学術集会	ウサギ膝前十字靭帯切離モデルを用いた抗VEGF抗体ヒト化モノク	長井敏洋, 佐藤正人, 小林美由希, 持田讓治

		ローナル抗体 (bevacizumab) の関節内投与による軟骨変性抑制効果の検討	
2013年	第386回横浜市立大学整形外科同門会談話会	【招待講演】軟骨の再生医療の現状	佐藤正人
2013年	第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会	【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨の再生(ヒト幹細胞臨床研究)	佐藤正人
2013年	第12回国際バイオテクノロジー展・技術会議	【特別講演】関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現	佐藤正人
2013年	第29回日本医工学治療学会	【教育セミナー】細胞シートによる関節軟骨の再生医療(ヒト幹細胞臨床研究)	佐藤正人
研究分担者 阿久津英憲			
2013年	11th ISSCR 2013 Annual Meeting	Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster)	Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A
2013年	第65回日本産科婦人科学会学術講演会	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	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
研究分担者 長嶋比呂志			
2013年	Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session	【招待講演】Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO	Nagashima H
2013年	第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム	【招待講演】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	長嶋比呂志
2013年	第5回愛宕Nephrology Forum	【招待講演】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	長嶋比呂志
2013年	東京医科歯科大学大学院特別講義	【招待講演】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	長嶋比呂志
2013年	第106回日本繁殖生物学会市民公開講座	【招待講演】生殖工学技術が拓く未来の動物生産	長嶋比呂志
2013年	第28回福島移植フォーラム	【招待講演】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	長嶋比呂志
2013年	第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催)	【招待講演】クローン動物の医学・医療への利用	長嶋比呂志



研究分担者 加藤玲子			
2014年	第27回日本軟骨代謝学会	多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響	加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾
2013年	第35回日本バイオマテリアル学会大会	生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(2): タンパク質発現の網羅的解析	加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾

## V. 研究成果の刊行物・別刷



## *In vivo* cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint



Yuko Takaku<sup>a</sup>, Kunihiro Murai<sup>a</sup>, Taku Ukai<sup>b</sup>, Satoshi Ito<sup>b</sup>, Mami Kokubo<sup>b</sup>, Masaaki Satoh<sup>a</sup>, Eiji Kobayashi<sup>c</sup>, Masayuki Yamato<sup>d</sup>, Teruo Okano<sup>d</sup>, Mamoru Takeuchi<sup>a</sup>, Joji Mochida<sup>b</sup>, Masato Sato<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Jichi Medical University School of Medicine, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

<sup>b</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

<sup>c</sup> Division of Development of Advanced Treatment, Center for Development of Advanced Medical Technology, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

<sup>d</sup> Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 October 2013

Accepted 22 November 2013

Available online 20 December 2013

#### Keywords:

Chondrocyte

Cell sheet

Tissue engineering

Transplantation

Bioluminescence imaging

### ABSTRACT

In our previous studies, we have demonstrated effective regeneration of cartilage through the creation and application of layered cell sheets that combine both chondrocytes and synovial cells. In this study, we were able to demonstrate that cells derived from cell sheets can survive for long periods after transplantation into rat knee joints having osteochondral defects. We established a method for generating cell sheets from firefly luciferase-expressing chondrocytes obtained from transgenic Lewis rats, and carried out allogenic transplantation of these cell sheets into wild-type Lewis rats. We then administered luciferin and monitored the survival of the transplanted cells by using bioluminescence imaging (BLI). Our data showed that the transplanted cells survived and could be detected for more than 21 months, which was longer than expected. Furthermore, the BLI data showed that the transplanted cells remained in the knee joint and did not migrate to other parts of the body, thus confirming the safety of the cell sheets. In this study, we monitored the duration of survival of cell sheets composed of only chondrocytes, only synovial cells, or both chondrocytes and synovial cells, and found that all three types of cell sheets survived for an extended period of time.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Articular cartilage tissue lacks blood vessels and has a poor ability to self-renew. Self-renewal is particularly difficult if the defect is partial and localized, and does not reach the subchondral bone. If the defect encompasses the entire articular cartilage layer, and has reached the subchondral bone, mesenchymal stem cells are introduced from the bone marrow. If the defect is small in size, regenerative repair may be possible [1]. In actual pathological instances of osteoarthritis, there is a mixture of partial- and total-thickness defects. Knee cartilage damage caused by aging or trauma easily converts to osteoarthritis and is accompanied by sharp pain.

Fortunately, the lack of blood vessels in articular cartilage results in a lower rate of rejection after grafting. Therefore, the use of

allografts is more widely studied for cartilage regeneration than for the regeneration of other tissues and organs.

To date, many animal experiments and clinical studies have been carried out to evaluate strategies for improving self-renewal in articular cartilage. Recently, research involving tissue-engineered cartilage grafts has become increasingly common. In a clinical study, Ochi et al. [2] reported improvements in the response to mechanical loads and sensory innervation using tissue-engineered cartilage grafts created in atelocollagen gels. A wide variety of synthetic polymers and biomaterials are used as scaffolds to create bioengineered cartilage grafts. Consequently, biocompatibility risks associated with the application of such substances over the long term have been reported [3]. The creation of tissue-engineered cartilage tissue that does not utilize scaffolds would significantly mitigate these risks, making their application more feasible and safer for patients. Mainil-Varlet et al. [4] successfully created scaffold-free tissue-engineered cartilage using a static bioreactor system. Furthermore, Nagai et al. [5], using their rotation

\* Corresponding author. Tel.: +81 463 93 1121; fax: +81 463 96 4404.  
E-mail address: [sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp](mailto:sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp) (M. Sato).

culture method, reported that it is possible to create tissue-engineered cartilage from a lower number of chondrocytes than previously reported.

In the field of cartilage regeneration, previous research has focused on finding therapeutic methods to treat cartilage defects by using grafts made from synovial cells. Synovial cells have a critical role in the repair of cartilage defects [3]. However, in the treatment of cartilage defects using grafts derived from synovial cells, fibrous tissue is more likely to be formed on the surface of the regenerated cartilage tissue [6].

To treat osteoarthritis, our group has carried out some basic studies concerning the repair and regeneration of articular cartilage using tissue engineering. We have focused on the importance of the interaction between the cells of the recipient and the donor in the repair and regeneration of articular cartilage. If there are a minimum number of bioengineered chondrocytes at or near the surface of the cartilage layer, we have found that the recipient's cells drive the regeneration of cartilage [7–9].

Chondrocyte sheets, generated using the bioengineered cell sheet technology developed originally in Japan, can be harvested on a temperature-responsive culture dish without damaging the cells and extracellular matrix [10,11]. Layered chondrocyte sheets fabricated using temperature-responsive culture dishes have characteristics that differ from those of cultured chondrocytes using normal culture dishes. These characteristics allow them to exert regenerative effects to the same degree as other bioengineered cartilage tissue [12]. Chondrocyte sheets have already proven more effective in promoting regeneration of both partial- and full-thickness defects [12,13].

Cell sheets exhibit superior adhesion to the surface of damaged cartilage having partial- or full-thickness defects. In addition, cell sheets have superior barrier functionality, which protects the site from the catabolic factors present in the joint fluid, and also prevents leakage of the extracellular matrix of cartilage tissue into the joint fluid. Moreover, cell sheets might contribute to the repair and regeneration of cartilage by continuously providing growth factors derived from cell sheets. Layered cell sheets maintain their three-dimensional structure. In our most recent clinical studies that focused on humans, we found that multilayered sheets express a significantly larger amount of humoral factors such as transforming growth factor  $\beta$ , prostaglandin E2, and melanoma inhibitor activity compared with single-layered sheets and cultured chondrocyte as the same number. These data indicate that multilayered sheets will probably have higher efficacy with respect to cartilage regeneration than single-layered sheets [14].

The synovial cells existing in the knee joint secrete the synovial fluid that nourishes chondrocytes. We have developed a method of harvesting chondrocyte sheets at a faster pace and with greater certainty by co-culturing chondrocytes and synovial cells in an environment that resembles the inside of the knee joint [15]. Furthermore, in experiments on Japanese white rabbits, the transplantation of a combination of chondrocyte sheets and synovial cells led to improved repair of osteochondral tissue defects compared with the transplantation of chondrocyte sheets or synovial cells alone [16].

We sought to determine the duration for which cell sheets comprising chondrocytes and synovial cells survive and continue to secrete growth factors at defect sites within the knee joint. We hypothesized that mature chondrocytes and synovial cells, as part of cell sheets, would gradually decrease in number from the moment of transplantation, and disappear after 3–4 weeks. We also expected that grafts consisting of a combination of chondrocytes and synovial cells within an environment resembling the inside of the knee joint would survive longer than grafts of each type of cell, by enhancing the regenerative effect exerted by the recipient's own chondrocytes.

Bioluminescent reporter genes are increasingly being used to image engineered cells *in vivo*. Of these, the firefly luciferase (*luc*) gene is the most commonly used. The enzymatic reaction between luciferase and its substrate, luciferin, results in photon emission, which can be detected using a cooled charge-coupled device (CCD) camera. In recent years, transgenic animals carrying specific marker genes have been generated [17–19]. Cells derived from them can be transplanted into other animals and then used to investigate survival time, cell migration, and so forth, in those animals. These cells are also frequently used in research on the regeneration of organs and tissues [20–24]. In this study, we transplanted luciferase-expressing transgenic rat cells into nontransgenic rats and then attempted to effectively track those transplanted cells.

The aim of this study was to determine the survival time of bioengineered chondrocyte sheets and synovial cell sheets after transplantation to cartilage defects in the knee joint of rats by using *in vivo* bioluminescence imaging (BLI).

## 2. Materials and methods

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Institutional Regulation for Animal Experiments as well as the Fundamental Guideline for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in Academic Research Institutions under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology for animal handling and care. The study was approved by the Institutional Animal Experiment Committee of Jichi Medical University.

### 2.1. Luciferase-expressing transgenic rats

Hakamata et al. generated transgenic rats that express the luciferase gene (*Rosa*/luciferase transgenic Lewis rats) [25]. This gene contains the ROSA26 promoter, which allows the stable expression of luciferase ubiquitously throughout the entire body of the rats. When the substrate luciferin is injected *in vivo*, light is emitted through oxidation catalyzed by luciferase, a reaction that uses ATP. The strength of light emission differs according to the cell type, as emission strength is affected by endogenous ATP,  $Mg^{2+}$ , the amount of expression of the luciferase enzyme, and other elements that differ across cell types.

### 2.2. Harvest of chondrocytes and synovial cells from luciferase-expressing transgenic rats

Luciferase transgenic (Tg) 16-week-old male Lewis rats, obtained as described previously [25], were treated with general anesthesia using 2% isoflurane in  $O_2$ . An incision was made on the inner part of the lower extremities, exteriorizing the knee joint, and severing collateral ligaments as well as anterior and posterior cruciate ligaments. Then, the synovial and cartilaginous tissue was scraped with a scalpel. The tissue cells were isolated from the tissue samples using an enzymatic procedure. Luciferase-expressing synovial cells and chondrocytes were seeded in temperature-responsive culture dishes. Co-culture of the cells on these inserts permitted a shorter proliferation time than needed with single-cell-type cultures [15].

### 2.3. Cell culture using temperature-responsive culture dishes

After isolating synovial cells and chondrocytes from tissues using an enzymatic procedure, the synovial cells were seeded in temperature-responsive culture dishes, while the chondrocytes were seeded in temperature-responsive inserts. Co-culture via use of the inserts reduced the proliferation time compared with that required to culture each type of cell independently.

The luciferase-expressing cartilaginous and synovial tissues harvested from Tg rats were subjected to proteolytic digestion at 37 °C and 5%  $CO_2$  in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12 adjusted with 0.016% collagenase (Worthington, NJ, USA), over a period of 4 h, with continuous stirring with a strainer. Subsequently, the luciferase-expressing chondrocytes and synovial cells were separated using a cell strainer with a pore size of 100  $\mu m$  (BD, NJ, USA), centrifuged, and harvested. The synovial cells were incubated in DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% mycotic antibody (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). All cells were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5%  $CO_2$  and 95% air.

The chondrocytes were seeded in temperature-responsive inserts (5.0  $cm^2$ ; CellSeed Inc., Tokyo, Japan). The synovial cells were evenly seeded in temperature-responsive culture dishes (9.6  $cm^2$ ; CellSeed Inc.) so that the cells were distributed at 10,000 cells/ $cm^2$ , and then co-cultured with the chondrocytes in DMEM/F12 supplemented with 20% FBS for a period of about 14 days.

After confirming that the cells were confluent after about 14 days of culture, the temperature-responsive culture dishes were transferred to a lower temperature (25 °C) incubator for an additional 30 min.