

# Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets

K. Hamahashi<sup>1</sup>, M. Sato<sup>1\*</sup>, M. Yamato<sup>2</sup>, M. Kokubo<sup>1</sup>, G. Mitani<sup>1</sup>, S. Ito<sup>1</sup>, T. Nagai<sup>1</sup>, G. Ebihara<sup>1</sup>, T. Kutsuna<sup>1</sup>, T. Okano<sup>2</sup> and J. Mochida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup>Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Japan

## Abstract

The authors aimed to repair and regenerate articular cartilage with layered chondrocyte sheets, produced using temperature-responsive culture dishes. The purpose of this study was to investigate the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. Articular chondrocytes and synovial cells were harvested during total knee arthroplasty. After co-culture, the samples were divided into three groups: a monolayer, 7 day culture sheet group (group M); a triple-layered, 7 day culture sheet group (group L); and a monolayer culture group with a cell count identical to that of group L (group C). The secretion of collagen type 1 (COL1), collagen type 2 (COL2), matrix metalloproteinase-13 (MMP13), transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), melanoma inhibitory activity (MIA) and prostaglandin E2 (PGE2) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Layered chondrocyte sheets produced the most humoral factors. PGE2 expression declined over time in group C but was significantly higher in groups M and L. TGF $\beta$  expression was low in group C but was significantly higher in groups M and L ( $p < 0.05$ ). Our results suggest that the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets may contribute to cartilaginous tissue repair and regeneration. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 30 April 2012; Revised 26 June 2012; Accepted 25 August 2012

**Keywords** articular cartilage; chondrocyte sheet; co-culture; enzyme-linked immunosorbent assay; humoral factor; scanning electron microscopy; temperature-responsive culture dish

## 1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common joint disease that is characterized by the gradual degeneration of articular cartilage over a long period. This disease develops mainly in weight-bearing joints of the lower limbs, such as the knee and hip joints, and causes pain and joint dysfunction. OA eventually limits the ability to perform activities of daily living and compromises quality of life. Articular cartilage defects are classified as either full- or partial-thickness defects, according to whether or not they penetrate the marrow spaces of subchondral bone. The treatments currently used for full-thickness defects of articular cartilage include microfracture surgery (Mithoefer *et al.*, 2006; Steadman *et al.*, 2001, 2002), mosaicplasty

(Hangody *et al.*, 1997, 2001; Szerb *et al.*, 2005) and autologous chondrocyte implantation (Brittberg *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 2008a, 2008b; Peterson *et al.*, 2003). These types of surgery can only be applied to a small area of articular cartilage defect, such as traumatic osteochondral lesions or osteochondritis dissecans. Microfracture surgery and drilling are techniques that encourage the regeneration of damaged cartilage by filling osteochondral defects with mesenchymal stem cells derived from the bone marrow. It is believed that the regenerated cartilage was not hyaline cartilage, but fibrocartilage (Peterson *et al.*, 2003). The functions and properties of fibrocartilage are inferior to those of hyaline cartilage, and the outcomes at long-term follow-up tend to be poor. Mosaicplasty can be used to transplant hyaline cartilage to damaged areas, although this is associated with donor site morbidity. In animal experiments, Nagai *et al.* (2008a, 2008b) reported good outcomes of allograft implantation using a scaffold-free chondrocyte plate to resolve this malfunction.

\*Correspondence to: M. Sato, Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan. E-mail: sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp

Meanwhile, full-thickness defects of articular cartilage are observed during the end stages of osteoarthritis, and these frequently spread across a wide area. Because such a cartilage condition is not an indication for these types of surgery, arthroplasty must be employed for treating severe OA as a basic remedy. Although the clinical results of arthroplasty have improved with the development of new surgical techniques and with the selection of appropriate medical devices, the stress on the patient's body from the invasive procedure is of concern.

During the initial stages of osteoarthritis, partial-thickness defects of articular cartilage are observed and they develop into full-thickness defects with progression of stages (Redman *et al.*, 2005). One key issue is how to start treatment at an early stage of the disease, but only a limited number of repairing cells can enter the injured sites (Paget, 1969). For this reason, it is important to develop new protocols for cartilage repair and regeneration using tissue engineering.

Cell sheet technology using temperature-responsive culture dishes was first reported by Okano *et al.* (1993) and is now used widely in corneal, myocardial, hepatic and other regenerative medicine fields (Harimoto *et al.*, 2002; Kushida *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2002, 2006). Nishida *et al.* (2004) reported that corneal cell sheets cultured in temperature-responsive culture dishes could adhere strongly to the cornea without scaffolding or suturing. Kushida *et al.* (2000) reported that fibronectin expression was conserved on the basal aspect of cell sheets cultured in temperature-responsive culture dishes. Cell sheets can be harvested with intact ECM and adhesion factors because the cell sheets are simply layered on top of each other, using the natural adhesiveness of the basal side. Repetition of this procedure facilitates the construction of multilayered, three-dimensional (3D) tissue structures without the need for scaffolds. Shimizu *et al.* (2006) reported that the maximum thickness of the fabricated rabbit myocardial cell sheet is three layers *in vitro*, because thicker sheets receive inadequate nutrition. They also demonstrated that repetitive allografts of cell sheets *in vivo* could not increase the thickness by more than 1 mm in myocardial tissues.

We have confirmed the ability of layered chondrocyte sheets, cultured in temperature-responsive culture dishes, to repair and regenerate partial-thickness defects of articular cartilage in animal experiments (Ebihara *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2012; Kaneshiro *et al.*, 2006, 2007; Mitani *et al.*, 2009). Chondrocyte sheets are obtained by simply reducing the temperature, with no need for enzymatic digestion, and multilayered chondrocyte sheets can be produced easily by placing one cell sheet over others. We developed a method for preparing chondrocyte sheets that requires less time by co-culture with synovial cells. We have shown that implanted chondrocyte sheets can survive for at least 8 weeks in the recipient joint (unpublished data), and the articular cartilage defects, separated from the implanted site of chondrocyte sheets, are well repaired, along with the implanted site. The chondrocyte

sheets have excellent adhesive properties and barrier functions, but this may not be the only mechanism responsible for cartilage repair and regeneration. The purpose of this study was to identify and measure the amount of humoral factors produced by layered chondrocyte sheets, and to elucidate whether another mechanism contributes to the ability of chondrocyte sheets to repair cartilage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Human chondrocytes and human synovial cells

This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration and was approved by the Institutional Review Board for Clinical Research of Tokai University School of Medicine. Human cartilage tissues and synovial tissues were obtained from six patients who underwent joint replacement surgery at Tokai University Hospital, after giving consent. The patients were four women and two men with an average age of 66 (range 37–81) years.

The tissues were sliced finely with scissors in Petri dishes. The synovial tissues and cartilage tissues were incubated for 2 and 4 h, respectively, for proteolytic digestion in 5 g/ml collagenase type 1 (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12; Gibco Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. After digestion, the cell suspension was passed through a cell strainer (BD Falcon™, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) with a pore size of 100 µm and retrieved by centrifugation. Chondrocytes were maintained in a culture medium of DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 1% antibiotic–antimycotic mixture (10 000 U/ml penicillin G, 10 000 µg/ml streptomycin sulphate and 25 µg/ml amphotericin B as Fungizone; Gibco), to which 50 µg/ml ascorbic acid (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) was added from day 4 onward. Synovial cells were maintained in a culture medium of DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic–antimycotic mixture (all from Gibco). All experiments were performed at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The cells were seeded at a density of 10 000 cells/cm<sup>2</sup> for both the primary culture and subcultures. The culture period was 7 days from P0 to P1, and 5 days from P1 to P2.

### 2.2. Temperature-responsive culture dishes and inserts

The specific method used to fabricate temperature-responsive culture dishes and inserts (CellSeed, Tokyo, Japan) has been reported (Okano *et al.*, 1995). Briefly, *N*-isopropylacrylamide (IPAAm) monomer solution was spread onto commercial culture dishes, and the dishes

## Humoral factors produced by layered chondrocyte sheets

were subjected to electron beam irradiation, which resulted in polymerization and covalent bonding of the IPAAm to the dish surface. The grafted dishes were then rinsed with distilled water to remove any ungrafted IPAAm. The culture dishes were sterilized using ethylene oxide gas (Sekiya *et al.*, 2006).

### 2.3. Conventional culture group and monolayer chondrocyte sheets

In the conventional culture group, chondrocytes were seeded in culture dishes (150 cm<sup>2</sup>; BD Falcon™) at a density of 10 000 cells/cm<sup>2</sup>. To prepare the monolayer chondrocyte sheets, the synovial cells were seeded in companion plates, which were notched for use with cell culture inserts (9.6 cm<sup>2</sup>; BD Falcon™), at a density of 10 000 cells/cm<sup>2</sup>. The chondrocytes seeded on temperature-responsive inserts (4.2 cm<sup>2</sup>; CellSeed) were seeded at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup>. The culture period of the monolayer cell sheets fabricated by co-culture was 14 days with the inserts. The conventional culture group cells were retrieved using a sterile cell scraper. After removal from the incubator, temperature-responsive culture inserts were allowed to stand at 25 °C for 30 min to release confluent cells as a monolayer chondrocyte sheet from the inserts, and the culture medium was removed. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were used as supporting membranes to retrieve the sheets according to the method of Yamato *et al.* (2001). The lifted chondrocyte sheet edges promptly attached to the overlaid supporting membrane, and the cell sheet and PVDF membrane film were detached gently from the temperature-responsive culture inserts.

### 2.4. Fabrication of layered chondrocyte sheets

It was possible to retrieve the chondrocyte sheets by simply reducing the temperature, removing the need for enzymatic digestion. The retrieved chondrocytes in sheet form retained their contiguity with adjacent extracellular

structures, which implies that these cell sheets contain extracellular proteins, including cell–cell junctions, extracellular matrix (ECM) and adhesion proteins.

Multilayered chondrocyte sheets could be produced easily by placing one cell sheet over another, using a supporting PVDF membrane. To fabricate triple-layered sheets, it was necessary to repeat this procedure twice. Because the layered chondrocyte sheets floated in the culture medium, a cell strainer (BD Falcon™) was placed on top. When cultured for 1 week, the triple-layered chondrocyte sheets were extendable and were not damaged by mild external force (Figure 1A). Because each sheet adhered firmly and tightly to the others, the multilayered structure was retained even when it was extended. Due to the supporting membrane, the cell sheet–PVDF film exhibited good stability and handling the chondrocyte sheet was easy (Figure 1B).

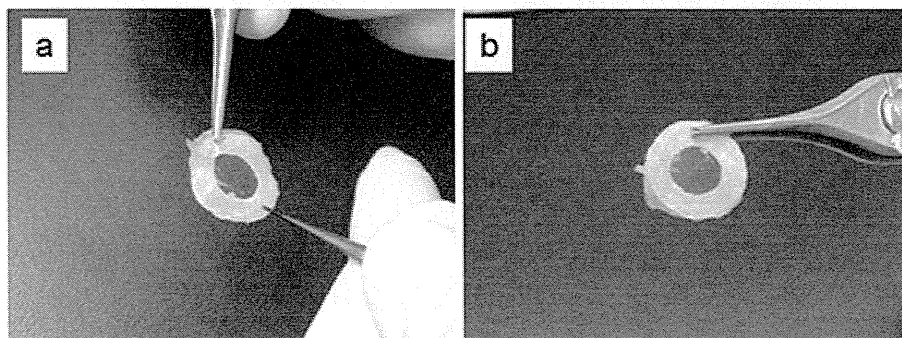
### 2.5. Scanning electron microscopy (SEM) evaluation

The layered chondrocyte sheets were soaked in 0.1 M phosphate buffer and 2% glutaraldehyde for 2 h. They were then fixed in 1% osmium solution for 1 h and dehydrated in gradually increasing ethanol concentrations (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 100%). The samples were dried using the critical point drying method, sputter-coated with gold and affixed to an adhesive interface for observation of both the top and bottom surfaces of the cell sheets by SEM (JSM-840; Jeol, Tokyo, Japan).

### 2.6. Measurement of humoral factors

Our studies included a monolayer, 7 day culture sheet group (group M); a triple-layered, 7 day culture sheet group (group L); and a conventional culture group with a cell count identical to that of group L (group C). For each group,  $n = 6$ .

After changing the culture medium to DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 1% heat-inactivated FBS



**Figure 1.** Manipulation of chondrocyte sheets. We could easily fabricate multilayered chondrocyte sheets by placing one cell sheet over another, using a supporting PVDF membrane. (A) Triple-layered sheets were fabricated by repeating this procedure. When cultured for 1 week, the triple-layered chondrocyte sheets were extendable and were not damaged by mild external force. (B) The supporting membrane provided good stability for the cell sheet–PVDF film, and the chondrocyte sheet could be handled easily

(Gibco) and 1% antibiotic–antimycotic mixture (Gibco), the specimen was extracted from the culture supernatant in equal volumes over 5 days. The amounts of collagen type 1 (COL1), collagen type 2 (COL2), matrix metalloproteinase-13 (MMP13), melanoma inhibitory activity (MIA), transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) and prostaglandin E2 (PGE2) secreted into culture supernatant were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The assays were COL1 ELISA (ACBio, Kanagawa, Japan), COL2 ELISA (MDB, Zurich, Switzerland), activated MMP13 ELISA (MDB), MIA ELISA kit 96-well plate (Roche, Mannheim, Germany), human TGF $\beta$  ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and PGE2 (R&D Systems). The biochemical data were analysed using one-factor analysis of variance (ANOVA) followed by individual *post hoc* comparisons (Tukey–Kramer).  $p < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. SEM

SEM analysis revealed that the top and basal aspects of the chondrocyte sheets had completely different structures. On the top aspect of the sheet, a network of laminated ECM structures had a 'piled-up' appearance, comprising sheet-like configurations and amorphous shapes. These edges were occasionally dog-eared on the culture medium side (Figure 2A).

By contrast, the basal aspect of the sheet that bonded to the bottom of the culture dish expressed a smooth ECM pattern and numerous mound-like elevations. Compared with the top aspect of the sheet, the arrangement of the accumulated ECM surface on the basal aspect was smoother and had a parallel pattern (Figure 2B).

#### 3.2. Analysis of humoral factors by ELISA

COL1 secretion tended to increase with each subculture. COL1 secretion did not differ significantly between the three groups from P0 (group M,  $98.10 \pm 3.46$  ng/ml; group

L,  $94.41 \pm 0.92$  ng/ml; and group C,  $92.89 \pm 5.25$  ng/ml on day 5) through P2 (Figure 3A).

COL2 secretion increased progressively in P0 (group M,  $113.39 \pm 49.26$  ng/ml; group L,  $189.22 \pm 125.47$  ng/ml; and group C,  $163.49 \pm 19.36$  ng/ml on day 5) but very little in P1–P2. COL2 secretion did not differ significantly between the three groups (Figure 3B).

MMP13 secretion was suppressed consistently in P0–P2 and did not differ significantly between the three groups (Figure 3C).

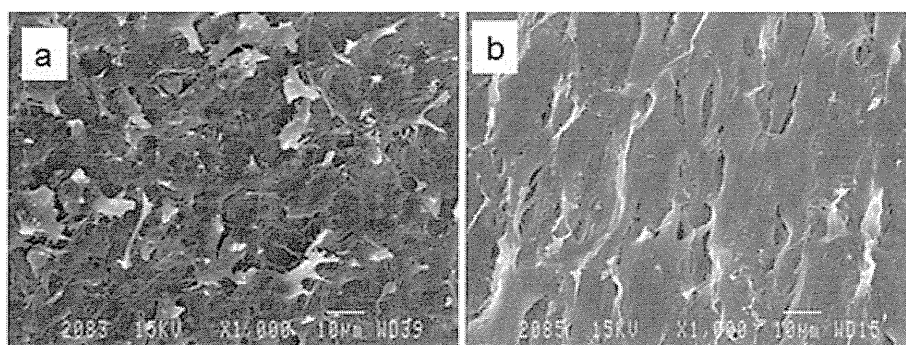
MIA secretion was significantly higher for group L in P0 (group M,  $7.32 \pm 0.82$  ng/ml; group L,  $9.87 \pm 1.50$  ng/ml; and group C,  $4.78 \pm 0.39$  ng/ml on day 1. group M,  $18.38 \pm 7.98$  ng/ml; group L,  $30.67 \pm 20.34$  ng/ml; and group C,  $26.50 \pm 3.14$  ng/ml on day 5). The same pattern was seen in P1 (group M,  $15.58 \pm 7.42$  ng/ml; group L,  $21.99 \pm 7.61$  ng/ml; and group C,  $8.89 \pm 2.59$  ng/ml on day 1). In P2, MIA secretion was significantly higher in groups M and L for days 1–5, but almost no MIA secretion was observed in group C (group M,  $7.42 \pm 3.38$  ng/ml; group L,  $16.05 \pm 4.44$  ng/ml; and group C,  $0.26 \pm 0.08$  ng/ml on day 5) (Figure 4A).

Almost no TGF $\beta$  secretion was observed in any of the passages for group C. In P0 and P1, TGF $\beta$  secretion was significantly higher for groups M and L (group M,  $2.61 \pm 1.42$  ng/ml; group L,  $2.66 \pm 1.05$  ng/ml; and group C,  $0.18 \pm 0.02$  ng/ml on day 5 in P0) (Figure 4B).

In group C, PGE2 secretion declined with time. By contrast, PGE2 secretion was significantly higher in groups M and L in P0 (group M,  $1.32 \pm 0.19$  ng/ml; group L,  $1.51 \pm 0.29$  ng/ml; and group C,  $0.81 \pm 0.39$  ng/ml on day 5) and in P2 (group M,  $0.62 \pm 0.04$  ng/ml; group L,  $1.88 \pm 0.15$  ng/ml; and group C,  $1.06 \pm 0.15$  ng/ml on day 1) (Figure 4C).

### 4. Discussion

We confirmed the availability of layered chondrocyte sheets cultured in temperature-responsive culture dishes for repair and regeneration of partial-thickness defects of articular cartilage in animal experiments. SEM examination indicated



**Figure 2.** SEM analysis showed that the top and basal aspects of the chondrocyte sheets had completely different structures. (A) A network of laminated ECM structures was observed on the top aspect of the sheet, and the ECM sheet edges were occasionally dog-eared on the culture medium side. (B) The basal aspect of the cell sheet, which bonded to the bottom of the culture dish, was covered with a smooth ECM pattern, and numerous mound-like elevations were observed. Compared with the top aspect of the chondrocyte sheet, the arrangement of the accumulated ECM surface on the basal aspect was smoother and had a parallel pattern. Scale bar = 10  $\mu$ m

Humoral factors produced by layered chondrocyte sheets

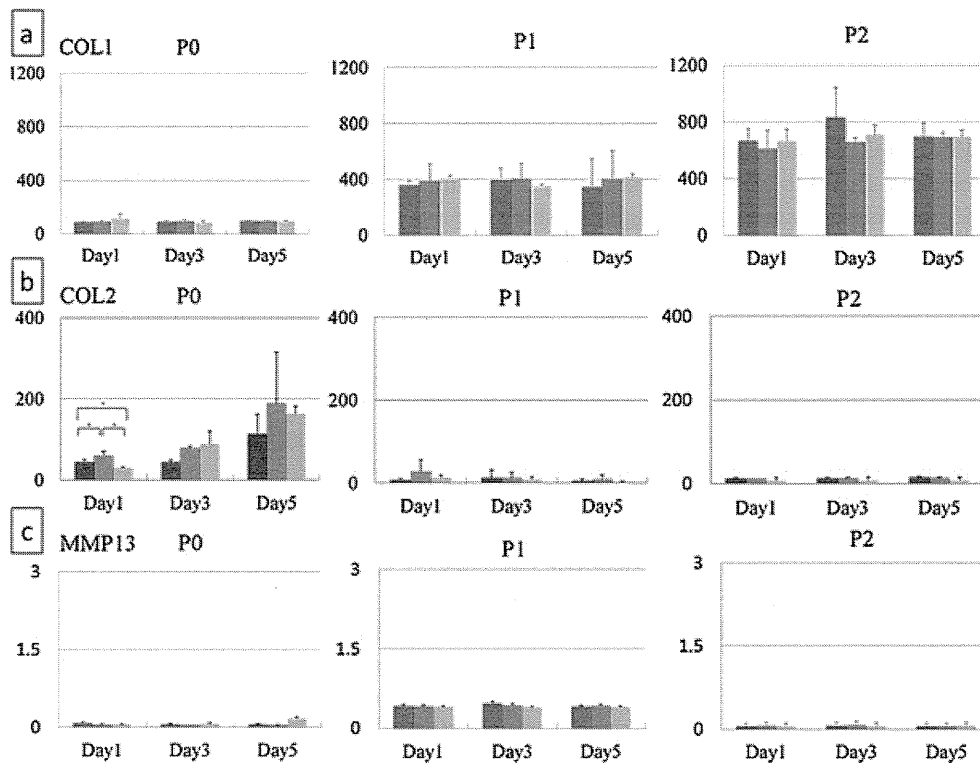


Figure 3. Secretion of COL1, COL2 and MMP13. (A) COL1 secretion tended to increase with each subculture passage. (B) COL2 secretion increased progressively in P0. (C) MMP13 secretion was suppressed consistently from P0 through P2. In the graph, group M is shown in blue, group L in red and group C in green; vertical axis units, ng/ml; \* $p < 0.05$

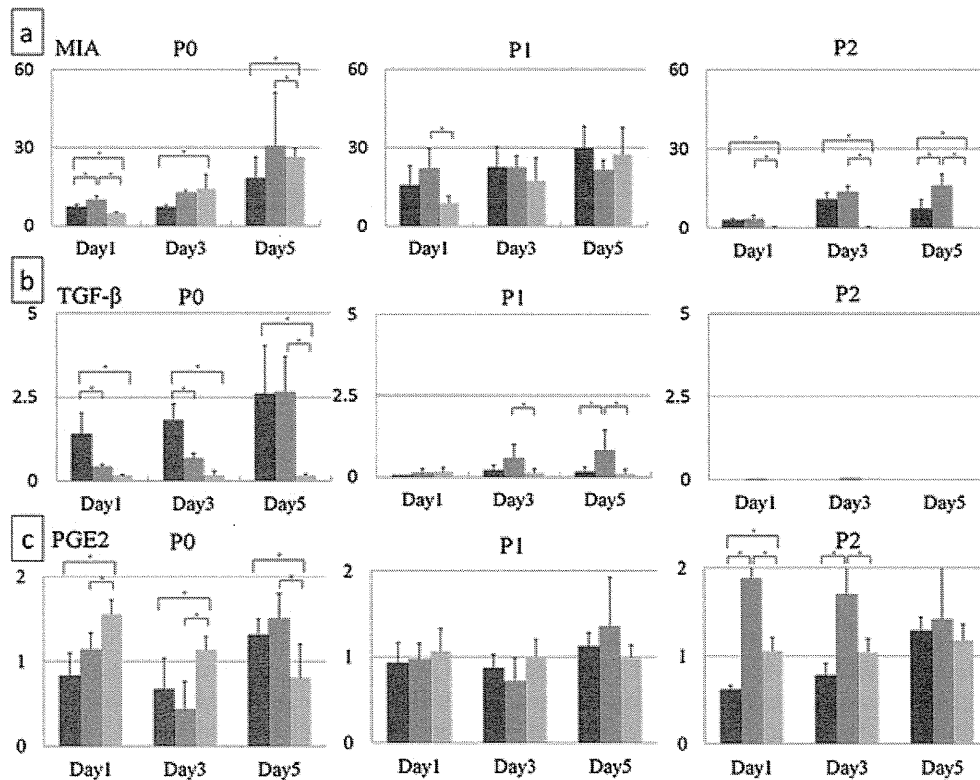


Figure 4. Secretion of MIA, TGF $\beta$  and PGE2. (A) MIA secretion was significantly higher for group L than group C in P0 and P2. (B) TGF $\beta$  secretion was significantly higher for groups M and L than group C in P0 and P1. (C) PGE2 secretion was significantly higher for groups M and L than group C in P0 and P2. In the graph, group M is shown in blue, group L in red and group C in green; vertical axis units, ng/ml; \* $p < 0.05$

that the top and bottom of the cell sheets had completely different structures. A network of laminated ECM structures on the top aspects of the sheets resembled the normal superficial cartilage zone, the lamina splendens initially proposed by MacConaill (1951) and later identified by Ckark (1990). However, SEM showed that the sheets did not have a smoother surface than normal articular cartilage. In this study, it was not possible to observe a distinct fibrous collagen structure, which may exist beneath the lamination. SEM of the superficial zone in ordinary cartilage shows several layers of collagen fibrils lying immediately beneath the lamina splendens and forming a mesh of interwoven fibrils that run parallel to the articular surface. In the superficial zone, the chondrocytes appear to be located beneath the layers of collagen fibrils. By contrast, on the basal aspect, numerous mound-like elevations were observed, which resembled an aggregation of chondron-like shapes. This smooth surface was more similar to the surface of normal cartilage than was the top side of the cell sheets. The smooth, flat surface of the basal side implies abundant accumulation of extracellular proteins, which is reflected in their characteristic adhesiveness. The effects of gravity during the culture period and the flat bottoms of the culture dishes may also have contributed to this even surface structure.

We have reported that layered chondrocyte sheets possess excellent adhesive properties and barrier functions for defending against invasion by catabolic factors in synovial fluid and for preventing leakage of proteoglycan in ECM from damaged cartilage (Ebihara *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2012; Kaneshiro *et al.*, 2006, 2007; Mitani *et al.*, 2009).

We also confirmed that COL2 secretion increased and MMP13 secretion was inhibited, suggesting that layered chondrocyte sheets maintain an intact ECM and exert a chondroprotective action. The MMP13 concentration of synovial fluid is  $1.928 \pm 0.373$  ng/ml in OA and 2.35 ng/ml in normal joints (Kim *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2010). Although MMP13 secretion increased slightly in P1, the level was low – 0.5 ng/ml or less. In P1 and P2, COL2 secretion was virtually non-existent. These data suggest that repeated subculture causes chondrocyte dedifferentiation (Schnabel *et al.*, 2002).

The layered chondrocyte sheets secreted MIA, TGF $\beta$  and PGE2, which play an important role in chondrocyte differentiation and tissue repair. MIA is a small, soluble protein secreted by malignant melanoma cells and chondrocytes. It modulates osteogenic differentiation toward a chondrogenic direction and stabilizes cartilage differentiation (Schubert *et al.*, 2010). Because MIA level in synovial fluid reflects cartilage remodelling, it is believed that this factor may provide a marker for objectively estimating the restorative reaction of chondrocytes (Saito *et al.*, 2002). In this study, MIA secretion was maintained better in groups M and L than in group C, even in P2.

In OA, interleukin-1 (IL-1) stimulates the expression of MMPs and aggrecanases, which induce cartilage degeneration. IL-1 can reduce the production of cartilage-specific macromolecules, including COL2 (Pujol *et al.*, 2008). On the other hand, TGF $\beta$  stimulates production of ECM components by chondrocytes and can counteract the effects of catabolic cytokines such as IL-1 (Blaney Davidson *et al.*, 2006). The TGF $\beta$  signalling pathway is crucial for the maintenance of articular cartilage homeostasis and for preventing its disruption (Roman-Blas *et al.*, 2007). In this study, TGF $\beta$  secretion levels were high in group L in P0 and P1 but very low in P2, a pattern similar to that for COL2.

PGE2 exerts pleiotropic effects in various tissues through EP1–4 receptors. EP2 is the main receptor expressed in articular cartilage, and the PGE2 signal through EP2 stimulates articular chondrocyte growth (Aoyama *et al.*, 2005). Continuous inhibition of PGE2 accelerates the progression of OA (Nishitani *et al.*, 2010). In this study, group L had a higher secretory capacity for PGE2, suggesting that the implantation of layered chondrocyte sheets may cause more efficient tissue repair processes of partial-thickness cartilage defects.

TGF $\beta$  and PGE2 also have an inhibitory effect on T cell proliferation (Aggarwal and Pittenger, 2005; Di Nicola *et al.*, 2002). This inhibitory effect might be beneficial in counteracting immune rejection, such as graft-versus-host disease, suggesting one possible future clinical application.

In our experiments, some humoral factors were no longer secreted with successive subculture passages. Therefore, we believe that the use of P0 cells would be appropriate in clinical application, considering the culture period and probability of contamination.

## 5. Conclusions

Layered chondrocyte sheets secrete various humoral factors. We observed significantly higher secretory capacity of TGF $\beta$  and PGE2, which play an important role in cartilage repair and regeneration, in layered chondrocyte sheets fabricated using a co-culture method. In addition to the excellent adhesive properties and barrier functions of the sheets themselves, the abundant secretion of these humoral factors supports the efficacy of layered chondrocyte sheets in cartilage repair.

## Acknowledgements

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and Health and Labour Sciences Research Grants 'Research on Regenerative Medicine for Clinical Application' from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## References

- Aggarwal S, Pittenger MF. 2005; Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**: 1815–1822.
- Aoyama T, Liang B, Okamoto T, et al. 2005; PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. *J Bone Miner Res* **20**: 377–389.
- Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, et al. 2006; Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) and the TGF $\beta$  signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* **65**: 1414–1421.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. 1994; Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**: 889–895.
- Ckark JM. 1990; The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat* **171**: 117–130.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. 2002; Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**: 3838–3843.
- Ebihara G, Sato M, Yamato M, et al. 2012; Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* **33**: 3846–3851.
- Hangody L, Kish G, Karpai Z, et al. 1997; Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects in dogs. *Orthopedics* **5**: 175–181.
- Hangody L, Feczko P, Bartha L, et al. 2001; Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* **391**: 328–336.
- Harimoto M, Yamato M, Hirose M, et al. 2002; Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* **62**: 464–470.
- Ito S, Sato M, Yamato M, et al. 2012; Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. *Biomaterials* **33**: 5278–5286.
- Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al. 2006; Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **349**: 723–731.
- Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al. 2007; Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* **13**: 87–92.
- Kim KS, Choi HM, Lee YA, et al. 2010; Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol Int* **28**: 543–547.
- Kushida A, Yamato M, Konno C, et al. 2000; Temperature-responsive culture dishes allow nonenzymatic harvest of differentiated Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell sheets. *J Biomed Mater Res* **51**: 216–223.
- Lehmann LJ, Schollmeyer A, Stoeve J, et al. 2010; Biochemical analysis of the synovial fluid of the shoulder joint in patients with and without rotator cuff tears. *Z Orthop Unfall* **148**: 90–94.
- MacConaill MA. 1951; The movements of bones and joints; the mechanical structure of articulating cartilage. *J Bone Joint Surg Br* **33B**: 251–257.
- Mitani G, Sato M, Lee JI, et al. 2009; The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol* **9**: 17.
- Mithoefer K, Williams RJ III, Warren RF, et al. 2006; Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* **88**: 294–304.
- Nagai T, Furukawa KS, Sato M, et al. 2008a; Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. *Tissue Eng* **14**: 1183–1193.
- Nagai T, Sato M, Furukawa KS, et al. 2008b; Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng* **14**: 1225–1235.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. 2004; Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77**: 379–385.
- Nishitani K, Ito H, Hiramitsu T, et al. 2010; PGE2 inhibits MMP expression by suppressing MKK4–JNK MAP kinase–c-JUN pathway via EP4 in human articular chondrocytes. *J Cell Biochem* **109**: 425–433.
- Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. 1993; A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* **27**: 1243–1251.
- Okano T, Yamada N, Okuhara M, et al. 1995; Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic–hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* **16**: 297–303.
- Paget J. 1969; Healing of cartilage. *Clin Orthop* **64**: 7–8.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. 2003; Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* **85**: 17–24.
- Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, et al. 2008; Interleukin-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res* **49**: 293–297.
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. 2005; Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* **9**: 23–32.
- Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. 2007; Modulation of TGF $\beta$  signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartilage* **15**: 1367–1377.
- Saito S, Kondo S, Mishima S, et al. 2002; Analysis of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg Br* **84**: 1066–1069.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, et al. 2002; Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr Cartilage* **10**: 62–70.
- Schubert T, Schlegel J, Schmid R, et al. 2010; Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP). *Exp Mol Med* **42**: 166–174.
- Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, et al. 2006; Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 573–582.
- Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al. 2002; Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* **90**: e40.
- Shimizu T, Sekine H, Yang J, et al. 2006; Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J* **20**: 708–710.
- Steadman J, Rodkey W, Rodrigo J. 2001; Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* **391**: 362–369.
- Steadman J, Rodkey W, Briggs K. 2002; Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* **15**: 170–176.
- Szerb I, Hangody L, Duska Z, et al. 2005; Mosaicplasty: long-term follow-up. *Bull Hosp Joint Dis* **63**: 54–62.
- Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al. 2001; Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng* **7**: 473–480.

2013年度  
日本再生医療学会

Johnson & Johnson  
Innovation Award

【応用・臨床研究】

# 関節治療を加速する 細胞シートによる再生医療の実現

Realization of Cartilage Regeneration by Cell Sheet  
Accelerating Joint Treatment

佐藤 正人

Sato, Masato

東海大学医学部外科学系整形外科学

E-mail : sato-m@is.iccu-tokai.ac.jp

## Summary

We have studied the repair and regeneration of cartilage damage using layered chondrocyte sheets prepared in a temperature-responsive culture dish. We previously reported achieving robust tissue repair when covering only the surface layer of partial thickness defects with layered chondrocyte sheets in domestic rabbits, and also reported good Safranin O staining and integration with surrounding tissue in a mini-pig model of full-thickness cartilaginous defects in the knee joint. We have continued our studies using human chondrocytes obtained from patients under IRB approval, and have confirmed the safety and efficacy of chondrocyte sheets. We have submitted a report to the Ministry of Health, Labour, and Welfare in Japan, and then the Ministry gave us approval to perform a clinical study of joint repair using cell sheets in 2011. We have just started implanting layered chondrocyte sheets in patients at Tokai University Hospital.

## KEY WORDS

関節軟骨 細胞シート 再生医療 ヒト幹細胞臨床研究

## はじめに

本稿では2013年度日本再生医療学会 Johnson & Johnson Innovation Award (Clinical Research) を受賞した研究に関して、実際に患者さんに軟骨細胞シートを東海大学医学部付属病院で移植しているヒト幹細胞臨床研究を紹介し、関節軟骨の再生医療の現状と我々の細胞シートによる関節治療の今後の展望を述べる。

## 関節軟骨の再生医療の現状

米国 NIH が管理運営する臨床試験(治験)の登録サイトである ClinicalTrials.gov において「cartilage」で検索すると2013年10月10日現在319件が検索されてくるが、そのうち状況が不明なものを除外し、現在オープンなものは渉猟し得た限りでは98件となる。さらに細胞、組織、組織工学的軟骨移植による治療法に関するものは24件あるが、その内訳は、自家軟骨細胞、他家軟骨細胞・組織、骨髄間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉幹細胞等様々である。関節軟骨の再生医療においては、マイクロフラクチャー法をコントロールにした比較試験が多いが、既存の再生医療製品である Carticel との比較試験も散見される。一方、国内ではジャパニティッシュエンジニアリング社のジャックがこの分野の製品としては唯一のものであり、それに続く国内で関節軟骨の再生医療に関する進行中の治験は、渉猟し得た限りでは現在、確認できなかった。





厚生労働大臣の意見書の発布をもって実施可能となるヒト幹細胞臨床研究で関節軟骨の再生に関するものは、大阪大学で1件、信州大学で1件、東海大学で1件の計3件の個別テーマと、広島大学、大阪市立大学、大阪大学、兵庫医科大学、近畿大学が同一テーマで多施設共同研究を実施中である。大阪大学では自己滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織移植法による臨床研究を、信州大学ではI型コラーゲンを担体とした自己骨髄間葉系細胞移植による臨床研究を、東海大学では滑膜細胞との共培養法で作製した軟骨細胞シート移植による臨床研究を、それぞれ実施している。上述の多施設共同研究は関節鏡視下自己骨髄間葉系細胞移植による臨床研究である。一方、ヒト幹細胞臨床研究指針制定以前より、東京医科歯科大学では滑膜由来の幹細胞を単離し高密度浮遊液にして関節鏡視下に移植する臨床研究を実施しており、これらを合わせると、現在国内では5件の臨床研究が行われていることになる。これらすべての臨床研究の疾患対象は外傷による軟骨損傷であるが、変性した軟骨にも適応が認められているのは我々が東海大学で実施している細胞シートによる臨床研究だけである。これは前臨床研究の動物実験で軟骨部分損傷と骨軟骨損傷(全層欠損)という変形性膝関節症でしばしば混在する軟骨損傷型の両方に治療効果を認めたためである。

## 細胞シートに関する先行研究と軟骨細胞シート

温度応答性培養皿は、東京女子医科大学先端生命科学研究所所長 岡野光夫教授が開発したもので、独自のナノ表面設計により温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを器材表面に固定化することで器材表面は32℃を境に可逆的に疎水性の細胞接着表面から親水性の細胞遊離表面に変化する<sup>11,2)</sup>。この特性により、温度を下げるだけで、無傷な細胞と細胞外マトリックスがシート状に回収可能である。すでにこの細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究ならびに治験は、心筋、角膜、食道粘膜、歯根膜、関節軟骨、鼓室の6つの異なる分野で開始され、それぞ

れ再生医療の実現をめざしている。

温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シート(図1)は、通常の二次元培養された培養軟骨細胞とは異なる特性を有している。播種直後の培養皿への接着のしにくさが、かえって軟骨本来の形質を導きやすく、通常単層培養で生じる脱分化が生じにくい<sup>3,4)</sup>。我々は細胞シートにたどり着く以前に種々の組織工学的軟骨に関する研究を行ってきた<sup>5)-10)</sup>。これらの膨大な動物実験の結果から、我々は関節軟骨の修復再生の場合、表層から浅層部分の修復が最重要で、それよりも下部の修復は後から自然修復されることを確信した。細胞シートを損傷軟骨表層部に移植すると他の組織工学的軟骨と同等以上の組織修復再生効果を発揮する<sup>11)-15)</sup>。これは、主として積層化細胞シートが分泌する種々の液性因子(TGF $\beta$ , PGE2等)による効果と考えられている。積層化細胞シートを構成する軟骨細胞がオートクライン、パラクライン等の効果により、多くの液性因子を積層化しただけで大量に分泌するようになり、同数の単離された細胞が分泌する量の数十倍にもなることがわかっている<sup>16)</sup>。細胞シートは当初短期間のうちに関節内で分解されてしまうと予想されていたが、bioluminescenceによる*in vivo* tracking imagingでは、移植後21ヵ月のラット膝関節内に存在することが明らかとなった<sup>17)</sup>。また、細胞シートの作製状態には種差が存在し、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヒトでは明ら

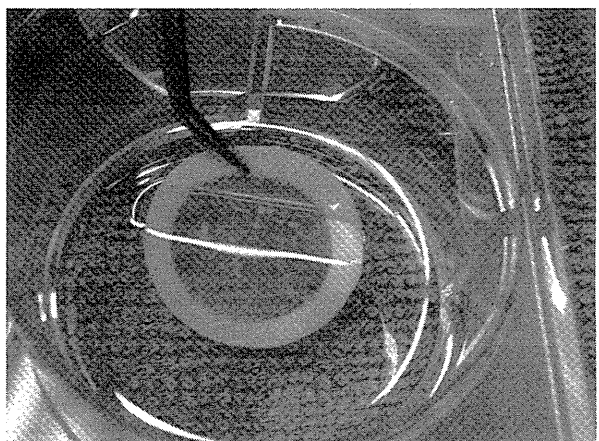


図1 積層化軟骨細胞シート  
移植当日CPCから手術室へ運ばれた積層化軟骨細胞シート



かにこの順で軟骨細胞シートの積層化は難しくなり、特に2継代以上経過して脱分化しなかった市販のヒト軟骨細胞では作製は困難である。短期間で活性の高い積層化ヒト軟骨細胞シートを作製するには、温度応答性カルチャーインサートを使用した滑膜細胞との共培養法が必須であり、関節内環境を疑似した培養方法が効果的であり、現在我々の臨床研究ではこの方法を採用している<sup>4)</sup>。

## 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

我々が実施しているヒト幹細胞臨床研究は、従来の軟骨再生医療とは一線を画し、日本で初めて変性した膝関節軟骨にも適応が認められたものである<sup>18)</sup>。現在までに11例がエントリーされ8例の移植が終了しているが、重篤な有害事象はなく、いずれも術後経過は良好である。

臨床研究の詳細は<http://cellsheets.med.u-tokai.ac.jp/>を参照いただきたい。

### 1. 対象患者

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷を有する患者。

### 2. 選択基準

下記の選択基準をすべて満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

- ①20～60歳までで性別は問わない。
- ②膝関節軟骨損傷を有するもの。
- ③関節鏡所見で軟骨損傷がOuterbridge分類Grade III以上のもの。
- ④膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに1.0cm<sup>2</sup>以上4.2cm<sup>2</sup>未満の軟骨欠損を有し、従来骨髄刺激法やモザイクプラスティなどが適応となる。

### 3. エンドポイント

- ①有害事象の頻度。
- ②術後1年での臨床評価基準における点数。
- ③術後1年での単純レントゲン写真評価基準における点数。
- ④術後1年でのMRI評価基準における点数。

⑤術後1年での超音波検査による粘弾性評価。

⑥術後1年での組織学的評価点数。

## 軟骨細胞シートの将来展望

細胞シートは関節内に長期間留まり、損傷部からプロテオグリカン等のマトリックス流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクターから損傷部を保護し、さらに自らも液性因子を分泌供給し、修復に必要な細胞そのものも動員する。これら一連の組織の修復・再生に適した機能を細胞シートは有していると考えられる。我々は体外で、できるだけ正常に近い特性の軟骨を作製するといった従来の組織工学的アプローチを諦めた。それは、正常に近い軟骨組織をいくら作製できたとしても、細胞成分が5%以下と極めて少なく、マトリックスが極端に多い構造体を移植後にどのようにして維持することが可能なか、という点が解決されない限り、再生医療には適さないと見極めたからである。軟骨細胞シートは、移植前は決して正常な軟骨組織ではない。損傷部の修復に優れていれば、正常な組織形態に最初から近似している必要は全くない。

現在は、ヒト幹細胞臨床研究として少数の患者に自己細胞シート移植(図2)を適用し、安全性と有効性をエンドポイントとして評価している段階であるが、自己細胞を用いる場合は、組織採取のための侵襲的な手

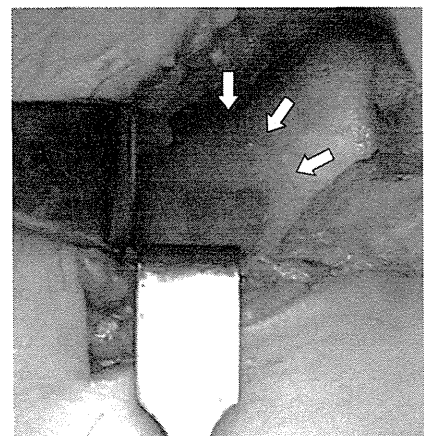


図2 積層化自家軟骨細胞シート移植 (ヒト幹細胞臨床研究)

膝関節を小切開して積層化軟骨細胞シートを移植した直後



術とその後に3～4週間かかる培養工程がある。つまり、目の前の患者さんをすぐに治療することができない。また、自己細胞による手術は、正常軟骨の確保の点から、せいぜい1～2回が限界と思われる。つまり、再度悪化した場合に複数回移植をすることができない。このような問題点を解決するため、将来的に同種細胞シートを用いるメリットは大きく、それにより、実用化による普及も加速するものと確信している。骨・軟骨は昔から同種組織移植が経験的に行われてきたことからわかるように、免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器(組織)の1つである。海外では細かくチップ状にした関節軟骨片がすでに市販され、実際に臨床で使用可能である。同種iPS細胞から分化誘導された軟骨細胞が臨床で使えるようになれば、もちろん大変魅力的であるが、喫緊に実現可能な同種軟骨細胞ソースを現在慎重に検討しているところである。軟骨細胞シートの保存法に関する特許も出願し<sup>19)20)</sup>、臨床の現場で待機期間なく、すぐに使用可能なレディメイドの同種細胞シートによる再生医療の実現に向けた準備を行っている。軟骨という臓器(組織)特異性を生かし、同種細胞シートによる治療を一般化させたいと考えている。

## おわりに

先日、再生医療安全性確保法と改正薬事法が参議院本会議で可決、成立した。先に成立した再生医療推進法とともに我が国での再生医療関連の法整備が進んだ。現政権は、医療分野を日本の成長戦略として国策の柱としているが、今後どのように舵取りがなされていくのか、現時点では先行きを見通せない点も多く存在する。しかし、基礎研究でも、臨床研究でも、そして実際の普及に直接影響するレギュラトリーサイエンスにおいても、再生医療立国として世界をリードしていくことが我が国の進むべき道だと信じたい。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、これまでご指導いただき支えていただきました東海大学医学部外科学系整形外科学

持田譲治教授、同 基盤診療学系臨床薬理学 小林広幸教授、東京女子医科大学先端生命医科学研究所 岡野光夫教授、大和雅之教授、清水達也教授、江上美芽教授、明治大学農学部 長嶋比呂志教授、国立成育医療センター研究所 梅澤明弘先生、阿久津英憲先生、国立医薬品食品衛生研究所 加藤玲子先生、防衛医科大学校 医用工学 石原美弥教授、株式会社セルシード、DNAチップ研究所の方々、そして、いつも研究と臨床に真摯に前向きに取り組んでいる東海大学軟骨班のメンバーに深く感謝いたします。

## ●文献

- 1) Okano T, Yamada N, Okuhara M, et al : Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* **16** : 297-303, 1995
- 2) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* **27** : 1243-1251, 1993
- 3) Mitani G, Sato M, Lee JI, et al : The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol* **9** : 17, 2009
- 4) Kokubo M, Sato M, Yamato M, et al : Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with temperature-responsive culture inserts. *J Tissue Eng Regen Med* 2013 Jul 19. doi : 10.1002/term.1764. [Epub ahead of print]
- 5) Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al : An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. *J Biomed Mater Res A* **64** : 248-256, 2003
- 6) Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al : An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. *Spine* **28** : 548-553, 2003
- 7) Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, et al : Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **75** : 177-184, 2005
- 8) Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, et al : Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured



- adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **79** : 25-34, 2006
- 9) Nagai T, Furukawa KS, Sato M, et al : Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. *Tissue Eng Part A* **14** : 1183-1193, 2008
- 10) Nagai T, Sato M, Furukawa KS, et al : Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A* **14** : 1225-1235, 2008
- 11) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al : Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **349** : 723-731, 2006
- 12) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al : Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* **13** : 87-92, 2007
- 13) Ebihara G, Sato M, Yamato M, et al : Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* **33** : 3846-3851, 2012
- 14) Sato M : Cell sheet technologies for cartilage repair. *Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues*. Woodhead Publishing Limited, CBC Press LLC, 251-265, 2010
- 15) Ito S, Sato M, Yamato M, et al : Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. *Biomaterials* **33** : 5278-5286, 2012
- 16) Hamahashi K, Sato M, Yamato M, et al : Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. *J Tissue Eng Regen Med* 2012 Nov 19. doi : 10.1002/term.1610. [Epub ahead of print]
- 17) Takaku Y, Murai K, Ukai T, et al : *In vivo* cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint. *Biomaterials* 2013 in press
- 18) 厚生労働省発医政1003第3号「ヒト幹細胞臨床研究実施計画について」。平成23年10月3日
- 19) 出願番号：特許出願2011-260318, 出願日：2011.11.29, 出願人：学校法人明治大学, 学校法人東海大学, 株式会社バイオベルテ, 発明者：長嶋比呂志, 佐藤正人, 他
- 20) Maehara M, Sato M, Watanabe M, et al : Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnol* **13** : 58, 2013

VI. 班會議 一議事録・発表資料一

## 議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業  
【関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現】  
平成 25 年度 1 回班会議

日時：平成 25 年 11 月 28 日（木）14:00～16:00

場所：霞が関ビル 35 階 東海大学校友会館（東海の間）

出席者：光島健二（独立行政法人医薬基盤研究所）、眞鍋孝司（独立行政法人医薬基盤研究所）、花井荘太郎（独立行政法人医薬基盤研究所）、木下奈津美（独立行政法人医薬基盤研究所）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、的場亮（DNA チップ研究所）、平賀育英（DNA チップ研究所）、伊東紀子（DNA チップ研究所）、坂井秀昭（セルシード）、丸木秀行（東京女子医科大学）佐藤正人（東海大学）、浜橋恒介（東海大学）、谷良樹（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、河毛知子（東海大学）、岡田恵里（東海大学）、豊田恵利子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：岡田恵里

### 1. 開会

研究代表者あいさつ

### 2. 研究報告

#### (1) 「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

このプロジェクトは今年度で 2 年目になり、3 月に中間評価があります。変形性膝関節症が再生医療としてターゲットとすべきことは、小さな損傷を治すだけでは仕方がないため、究極的にはこの疾患を治すこととなります。最終的には人工関節としてコストパフォーマンスがよいものがありますが、生物学的な膝で生涯を終えていただきたいと考えてプロジェクトを進めています。

関節症の初期は軟骨がささくれであったり、毛羽立ったりしている状態です。この状態でも、中のマトリックスは抜けているため、本当は治さなければなりません、この段階を治す術がありません。270 年前から潰瘍化した軟骨は治りづらいといわれていますが、進歩していません。軟骨の下に軟骨下骨がありますが、ここまで達する損傷は、ある大きさまでは質の悪い線維軟骨では治るといわれています。軟骨内損傷といわれる部分損傷は、中の骨髄からの細胞動因が非常に少なく軟骨マトリックスが邪魔して修復されず、きちんと治癒されません。

我々は、温度応答性培養皿を用いた細胞シートを作製し、動物実験において全層欠損と部分損傷に効果があることを確認しました。将来的に細胞シートは両方の損傷が混在している変形性膝関節症の治療になるのではないかとデータを蓄積しているところです。温度応答性培養皿は、イソプロピルアクリルアミドポリマーの作用により 37°C で疎水性、20°C で親水性を獲得します。細胞播種し、コンフルエントになったところで温度を下げると細胞シートとして回収できます。シートは細胞と細胞が自ら分泌した細胞外マトリックスが集積した成分で人工物は一切含まれていません。

一昨年より臨床研究を開始し、現在、8 例の移植が終了しています。

(TV で放映された映像により細胞シートの作製と今後の展望の解説)

自己細胞の移植は厚労省による年齢制限と大きさの制限がありますが、安全性と有効性を術後 1 年のエンドポイントで評価しています。今まで対象とされてきた損傷は外傷性損傷だけでしたが、東海大学では唯一変性した軟骨にも適用してよいことになりました。

シートは、5cm の小切開で直接患部に移植します。3 箇月で MRI により軟骨ができてきたことが確認されます。評価方法として、レーザーを用いた光音響法（厚さと粘弾性特性）により、プローブを変えることで Type I, Type II コラーゲンの組織性状の差が検出できます。軟骨は、よい軟骨も悪い軟骨も白く修復されるので、移植一年後に抜釘術の際に修復された軟骨を光音響法（厚さと粘弾性特性）とバイオプシーによる組織学的評価を実施して、95%以上硝子軟骨でしっかり治っていることを確認しています。

臨床研究で有効性と安全性を確認することを進めています。

(TV の放映による移植 2 例目の患者さまの治療後の状態を紹介。回復がよくて喜んでいきます。患者さまのコメント、移植をしているいろいろなチャレンジできて、大きなプラスだったと思います。)

現在 11 例のエントリー中、8 例に実施しました（3 例は厚労省の基準外で中止になった患者）。移植を実施した 8 例の患者さまは経過良好で今のところ、有害事象はありません。現在、世界で実施している治療は ACI で、アメリカで 2 万例以上行なわれ、健常部から採取した骨膜を縫い付けて 1 箇月培養した細胞を挿入し、治療しています。細胞組織加工製品は、日本では J-TEC の皮膚と軟骨、米国では約 20 年前からカーティセルの軟骨、欧州ではコンドロセレクト、韓国では 10 種類ほどあります。

承認されている J-TEC のジャックは、骨膜との併用であり、骨膜と軟骨の間にアテロコラーゲンゲルに包埋した軟骨細胞を挿入している点が新しい点です。ジャック：0.9 個細胞/1mm<sup>3</sup>、東海：4500 個細胞/1mm<sup>3</sup>の細胞を使用しています。このことから、組織修復はより効果的だと推察されます。ジャックの使用について、厚労省とのワーキンググループで定められた使用基準は、外傷性、大きさの制限、安全性を理解した医師（ワークショップと実技指導）、使用実施基準を満たした施設等の条件がついています。

我々は健常部 1、2 箇所から骨膜を採取し、貼りつけて小さな損傷を治療する方法から脱却し、骨膜を採取しません。骨膜を用いた治療法は、多くが線維軟骨で修復され、硝子軟

骨での修復がみられません。これは、複合体の形状での修復が問題であると考えられ、多数要素の最適化の検討は困難であり、骨膜やスキャホールドは用いません。軟骨細胞シートと骨髄由来細胞の相互作用により硝子軟骨で治癒していることを動物実験で確認しています。この結果を踏まえて、前臨床試験で大型動物ミニブタモデルを用いてシートの縫合も検討したところ、縫合なしでの治療に成功しています。動物実験において部分損傷のモデルの開発並びに作製を行ない、表層にシートを移植すると変性が遅れる結果が得られ、細胞シートの変性抑制効果が認められています（学会誌の表紙）。細胞シートの効果の作用機序を検討し、サイトカインの TGF- $\beta$  に着目し研究しました（浜橋参照）。ラット、ウサギ、ミニブタ、ヒトと種がヒトに近づくにつれ、細胞シートが作製しにくくなります。ヒトに応用するにあたり、3 週間でより均一な細胞シートの作製を研究し、生体内の環境を擬似するような共培養法を開発しました（小久保参照）。一連の研究により、臨床試験を実施しています。

細胞シートの治療は、自己細胞もよいのですが、2 回の手術が必要であること、高齢であると必ずしも活きのよい細胞ではないこと、採取量に限界があり複数回の手術が難しいこと、OA 患者は遺伝子異常をもっている場合があることを解決するために同種軟骨細胞の使用を考案しました。外国では軟骨チップが市販されていますが、トレーサビリティの問題があり、国内で手術時に廃棄される多指症の軟骨組織（1 歳前後）を同種細胞のソースとして期待し、国立成育医療研究センター研究所との共同研究で供与された細胞を用いて安全性試験を実施しています。この細胞は P2、P3 で爆発的に増殖します。シート化すると多くの患者さまに適用できる魅力的な細胞ソースと考えています。NOG マウスを用いた安全性の評価や、既に世界でヒトの軟骨細胞が 2 万件移植されていますが、腫瘍化した報告はされていません。G バンド分染法、アレイ CGH 解析により、継代培養中に遺伝的変化があるかを評価しました（河毛参照）。軟骨は免疫拒絶されない組織であるといわれていますが、免疫について国立医薬品食品衛生研究所と共同研究をしています（加藤参照）。また、シートを作製し、シート状で保存することにより、細胞シートの作製日数を待たずにいつでもレディメイドで治療できるように明治大学と共同研究し、保存の開発を進めています。株式会社セルシードと温度応答性培養皿の大きさや治療地部について、DNA チップ研究所とアレイ CGH 解析について共同研究を行っています。

上皮系以外の細胞で、世界で初めての技術を用いて軟骨の部分損傷と全層欠損の両方に効果の認められた方法で臨床研究を行っています。自己細胞シートを先進医療へ移行できるよう、また、同種細胞シートの臨床研究を行えるように準備しています。

#### <質疑応答>

質問：自己細胞シートの臨床研究は 10 症例とありますが、あと 2 例実施しますか。

回答：8 症例実施しています。1 年後フォローまでもっていきたいです。1 症例につき 350 万円の費用がかかりますので、今年度は実施しないかもしれません。厚生労働省との協議



が必要ですが、仮に HP で患者さまが集まれば来年の今頃までに 10 例まで実施するかもしれません。

(2) 「多指症由来軟骨細胞の同種 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)

これまでに東海大学佐藤班で、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨の部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した自己積層化軟骨シートによる関節軟骨修復効果を世界で初めて明らかにしてきています。しかしながら、本技術の将来的な普及を考えると同種細胞移植が望ましいと考えられます。同種移植は、予め細胞の品質が確認でき、レディメイドでの細胞シート作製が可能になり、患者さまの負担の軽減や計画的な移植が行える利点があります。軟骨組織は免疫応答が低いといわれていますが、実際に同種軟骨細胞が宿主内で免疫反応において、どのような挙動を示すのか詳細な報告がないため、同種軟骨細胞の免疫応答に関する研究を行ってきました。これまでの成果として、マウス軟骨細胞、市販ヒト軟骨細胞およびヒト膝関節軟骨細胞といった成人軟骨細胞(AC)、さらに成人ヒト軟骨積層化シートがリンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、リンパ球混合培養反応(MLR)において活性化リンパ球の増殖を抑制することを示してきました。

今回は、同種軟骨細胞ソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞を用いて検討を行いました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、これまで検討した成人軟骨細胞と同様に T 細胞の活性化を惹起しませんでした。さらに、多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討した結果、MLR を抑制していることが確認でき、患部周辺の炎症を抑制できる可能性が考えられました。一方、先行実験から、抑制効果には液性因子の関与が示唆されていました。TGF- $\beta$ 1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインの 1 つであるが、一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがあります。MSC においても TGF- $\beta$ 1 がその免疫調節効果に関与する液性因子の 1 つである報告があることから、多指症軟骨組織由来細胞の培養中の TGF- $\beta$ 1 を測定しました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、TGF- $\beta$ 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確認できました。来年度は、in vitro では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および、軟骨細胞の T 細胞増殖抑制効果に TGF- $\beta$  が関与しているかに関しては、TGF- $\beta$  中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- $\beta$  量を減少させ検討します。in vivo では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の開始を考えています。次年度以降、短期中期長期の経過観察をしたいと考えています。

< 質疑応答 >

質問：この結果は多指症軟骨に限ったことですか。

回答：これまでの成果として、マウスの軟骨細胞でもリンパ球活性化を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖の抑制効果を確認しています。さらに、市販の軟骨細胞、成人

の患者さまの膝軟骨細胞を用いた先行実験でも同様な結果が出ています。

将来的に同種の細胞ソースとして、廃棄組織から採取できる点で多指症由来軟骨細胞が有用と考え、今回検討対象の細胞といたしました。

質問：効果としてはどうですか。

回答：T細胞の活性化をほとんど惹起しない点では、先行実験で用いた成人の軟骨細胞と差はないと考えています。抑制効果についても、今のところ、多指症由来軟骨細胞が特別に強いわけではないと考えています。

質問：多指症由来軟骨細胞は、増殖がよいとのことでしたので、免疫抑制作用がより強く出るのかと思ったのですが。

回答：成人の軟骨と横並びにしたときも多指症由来軟骨細胞の方が強く抑えていることはなかったのですが、成人の細胞と比較しても十分抑えています。

質問：TGF- $\beta$  は型がいろいろとあると思いますがどれをみていますか。

回答：TGF- $\beta$ 1 をみています。

質問：レセプターは、関節の移植したあたりの細胞にどのようにでていますか。

回答：関節は1と3がメインです。市販の分化誘導培地もTGF- $\beta$ 1か3が入っています。

質問：膝関節症の病変部の免疫状態は、どのようになっていますでしょうか。免疫が病態として関与していますか。

回答：変形性関節症はリウマチとはかなり違います。リウマチはTNF抗体治療（免疫抑制剤）があり、かなり免疫抑制剤が効くようです。OAもわずかに、抗TNF抗体、ステロイド系、MPXなどが効くと論文にあります。免疫はリウマチとは比較できないくらい小さい影響だと思えます。

回答：この実験は同種の細胞活性化を惹起しないということを確認することが第一の目的です。活性化T細胞の増殖を抑制することは、付加的な効果として考えています。元々、*in vivo*で軟骨細胞の親細胞であるMSC細胞が、免疫原性が低いだけでなく、さまざまな免疫細胞の活性化や分化を抑制する性質があるといわれています。同様な性質が軟骨細胞にもあればなおよいと思えます。したがって、本研究では、患者さまのT細胞の活性化を惹起させないことを示すことが大事です。

### (3) 「セルソースの安全性評価」

研究協力者 河毛知子（東海大学）

同種軟骨細胞シートの細胞ソースとして用いるマテリアル検討の結果、手術時廃棄組織であり、かつ優れた増殖性をもつ多指症由来軟骨細胞が適していることがわかりました。多指症由来軟骨細胞を用いて安全性評価を実施しました。

各実験のマテリアルは国立成育医療研究センター研究所から凍結細胞（n=12、平均年齢1歳4か月）の分与を受けたものを用いました。

自己細胞を用いた臨床研究の安全性評価としては、アレイCGHにより培養中に生じる変

化を確認してきました。同種移植の安全性評価としては、同様にアレイ CGH により培養処理による変化の確認と、セルソースとしての核型の確認が必要だと考えられます。

培養処理による変化の確認にアレイ CGH が適している理由について本解析は、第 2 継代のサンプルを reference とし、その reference サンプルから継代した細胞を用いて test サンプルを作製する為、培養処理による変化を的確に捉えることが可能です。

G バンド分染法はセルソースの核型と培養処理による変化を確認することができます。アレイ CGH とは異なり、それぞれの継代毎に染色体の変化を確認することができる手法です。

安全性評価の 2 つの手法を組み合わせることで、安全性の高い細胞ソースを選び出すことができると考えられます。適合するサンプルは擬陽性を除きますが、G バンドで擬陽性としたサンプルは、国際規約ではクローンと解されないものです。今回の解釈にあたり、国際規約では正常核型と解されるものも除外したのは、同種移植を目指しているため、より高い安全性を担保する為に検討項目としました。

造腫瘍性否定試験についても現在実施しています。培養した多指症由来軟骨細胞を NOG マウスに移植し 24 週まで観察し、病理組織学的に評価します。研究進捗ですが、予定しておりました平成 25 年度の安全性評価について進めています。次年度は同種軟骨細胞シートの品質評価を進めていく予定です。

#### <質疑応答>

質問：培養して異常が起きているのですか。患者さまの核型は何でみていますか。TKA の患者さまが元々もっている異常はありますか。

回答：患者さまの核型は培養した細胞で G バンドにより P2 と P12 までのサンプルで比較しています。患者さまが元々もっている異常は 7 番トリソミーと X 染色体でトリソミーがあることは報告されています。ジャックの参考資料として引用されているものもあります。

質問：CGH 擬陽性がいくつかあったものはサンプル間でどののですか。出やすいホットスポットのようなものがあるのでしょうか。

回答：ホットスポットはダイスワップで消えます。プローブの癖というか、擬陽性が出やすい場所があると考えられますが、ダイスワップで確認します。閾値を下げたときに出ることがあるのでダイスワップ等で確認することにしています。

質問：将来使用する細胞シートは P12 まで考えているのでしょうか。実際の細胞シートはどの段階ものを使用するのですか。

回答：同種でも P1、P2 くらいまでの使用を考えています。P12 は使用しません。生体内で移植した後を完全に擬似できるわけではないですが、長期培養した場合を考慮し、より安全なものと考えて P12 まで実施しました。

(4) 「ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：細胞生存性向上への条件検討」

研究分担者 長嶋比呂志（明治大学）

研究の背景として、シート作製と移植実施時期の調整が容易になること、治療用のシートのストックが可能になること、同種移植を推進することのために、実用的な細胞シートの凍結保存技術がこの臨床応用に不可欠です。

前年度までの成果は、細胞シートを破損することなくガラス化や融解可能な方法（コーティング法；特許出願 2011-260318, BMC Biotechnology, Maehara et al.2013）を確立しました。これは、受精卵の凍結保存法を踏襲したものであり、軟骨細胞シートへの応用も可能でした。また、臨床応用を想定し、細胞シートをパッケージに収納後ガラス化する方法（envelop 法）の検証を実施しました。ガラス化後の細胞シートの構造的正常性確認を実施しました。シート構造の正常性は保たれていました（細胞外マトリックス）が、個々の細胞の生存性が少し落ちました。この現象はどの保存方法でも生存性は落ちてしまうので、生のもと同様なくらいの生存性を目指したいと考えています。ウサギだけでなく適用拡大を図るため、他種シート（ブタ軟骨細胞シート）を用いた実験を実施し、ガラス化が成功しました。

今年度の取り組みは、細胞生存性向上への条件検討として、薄層シートへのガラス化の適用を検討し、3層シートだけでなく2層、1層の試料ともガラス化が成功しました。また、融解条件の検討をし、ラップとアルミも同等な結果がでたので、アルミを用いてパッケージング方法の改良を進めることにしました。アルミパッケージを開発することは、将来医療機器メーカーが商品開発に参入した場合にもつながっていくので、この材料でよいのではないかと考えています。そして、より薄いシートの凍結も可能になったため、ヒトのシートもできるのではないかと思います。より急速な解凍条件で細胞生存性が上がりました。

今後の計画は、現行法では衛生面を考えてシートを液体窒素の中につけるのではなく、クロスコンタミ防止のため、液体窒素の蒸気中に保存するので、そのような条件で長期保存しても大丈夫であるとのデータを収集します。今は、既存の液体窒素タンクを用いているので実用的な装置の開発を考えています。ヒトへの応用を考えて、細胞生存性をより生ものに近づけるように方法を開発していきます。

<質疑応答>

質問：ラップの材質は何ですか。

回答：ビニレンです。

質問：水分の浸透性があるのではないですか。

回答：非常に低いですが、長期的にはあります。

質問：今後は保存の形態としてはラップよりアルミの方がよいとのことですね。

回答：はい。

質問：ガラス化層でコーティングしているとのことですが、使用している溶液は、使用す