

厚生労働科学究事業 H24-再生-一般-003
「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

同種細胞シートの特性と安全性に関する研究 —多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響(その2)—

2014.3.5(水)
国立京都国際会館 1F【Room104】
国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 加藤玲子

研究の背景・目的

これまでに、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて明らかにしてきた。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でないと難しい。

○ 同種細胞利用の利点

- ・ レディメイドの細胞シートを作製することが可能になり、患者さんの負担軽減および、より計画的な移植が行える。
- ・ 同一ドナーからの細胞だと、細胞の品質(情報)が予め分かる。

○ 同種細胞ソースの候補: 多指症由来軟骨細胞

- ・ 優れた増殖性
- ・ 手術時廃棄組織

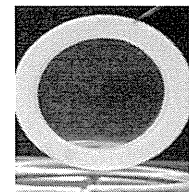
○ 同種細胞移植において懸念される問題

- ・ 拒絶反応を引き起こす可能性がある。



そこで本研究では、多指症由来軟骨細胞が免疫反応に及ぼす影響を*in vitro* で検討することを目的とする。

宿主の免疫反応を惹起しないことが示せれば同種軟骨細胞シート移植への可能性がひらける



材料

細胞:

多指症由来軟骨細胞(HPDCs)は成育医療センター臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと成育医療センターで多指症手術時に得られた軟骨組織から単離した。

ヒト末梢血由来CD4⁺T細胞(CD4⁺TCs)および正常ヒト樹状細胞(NHDCs)(Lonza社)

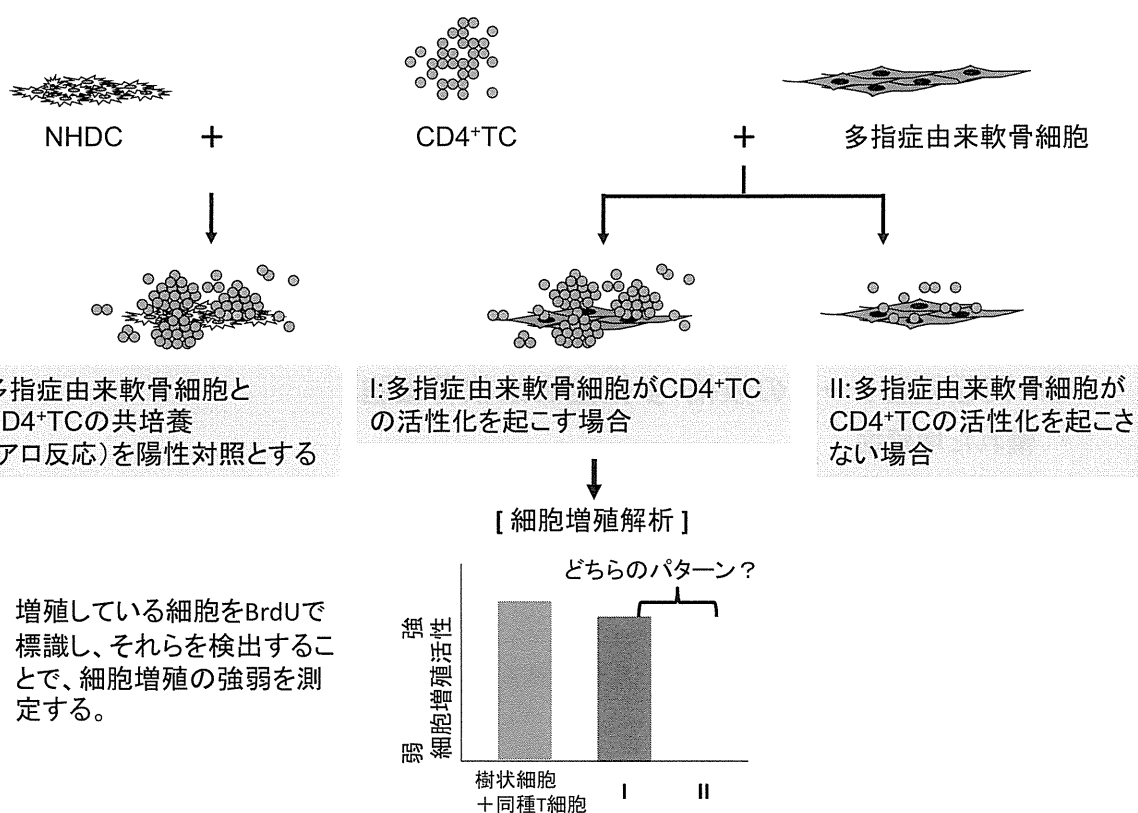
細胞増殖測定:

Cell Proliferation ELISA, BrdU(chemiluminescence) kit (Roche社)

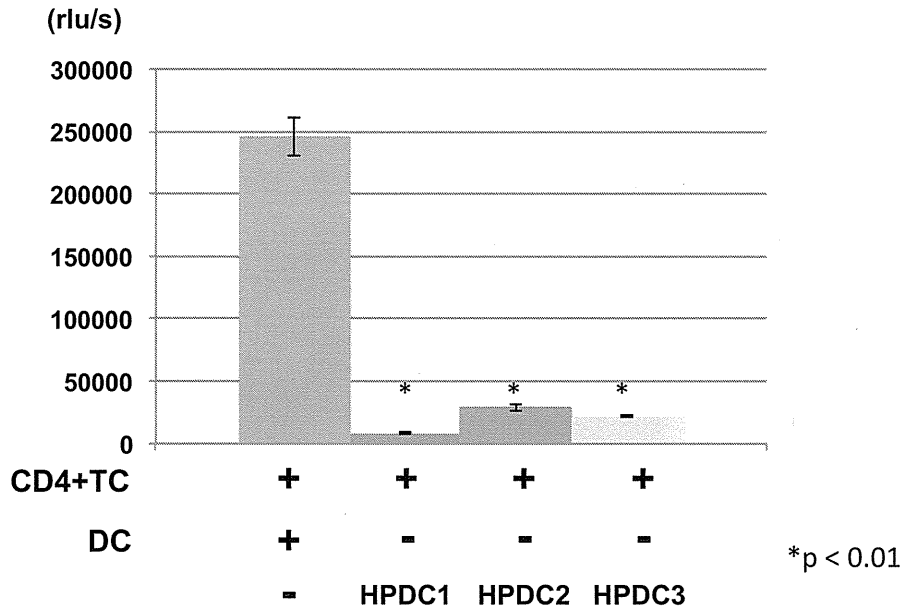
TGF-β1測定:

Quantikine[®] ELISA Human TGF-β1 (R&D Systems社)

実験系1—多指症由来軟骨細胞が同種T細胞におよぼす影響—

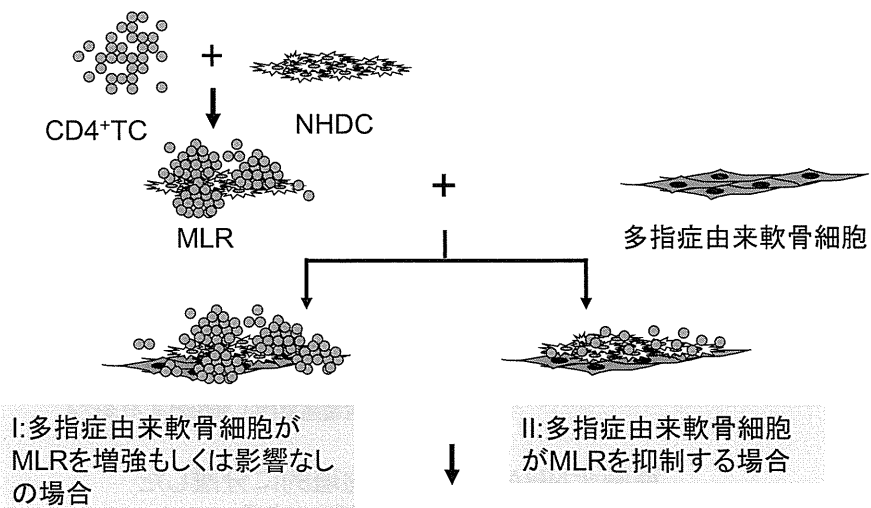


多指症由来軟骨細胞が同種T細胞におよぼす影響

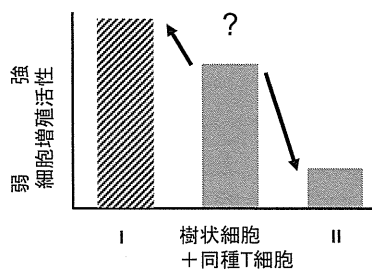


多指症由来軟骨細胞はT細胞を活性化しない

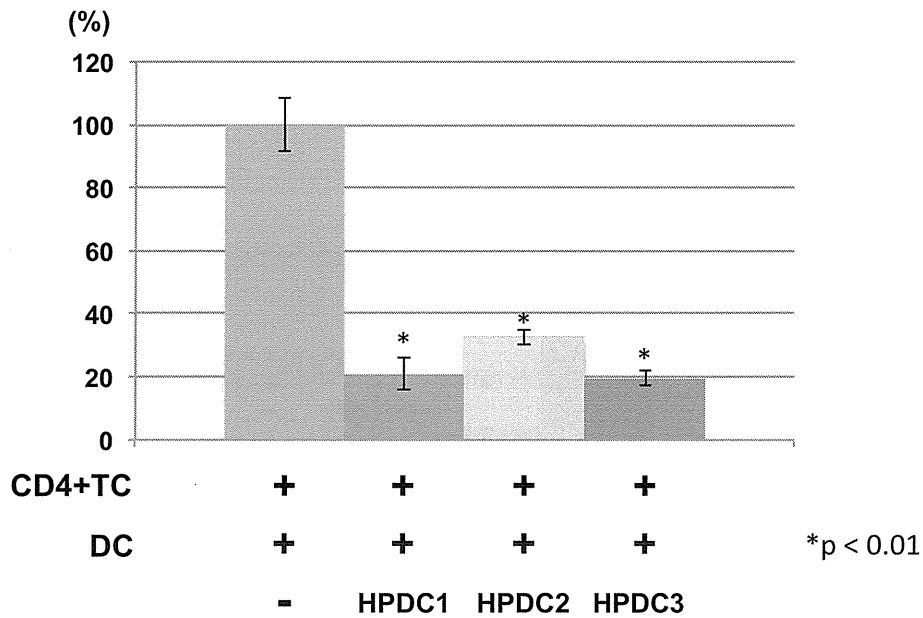
実験系2—多指症由来軟骨細胞がMLRにおよぼす影響—



[細胞増殖解析]

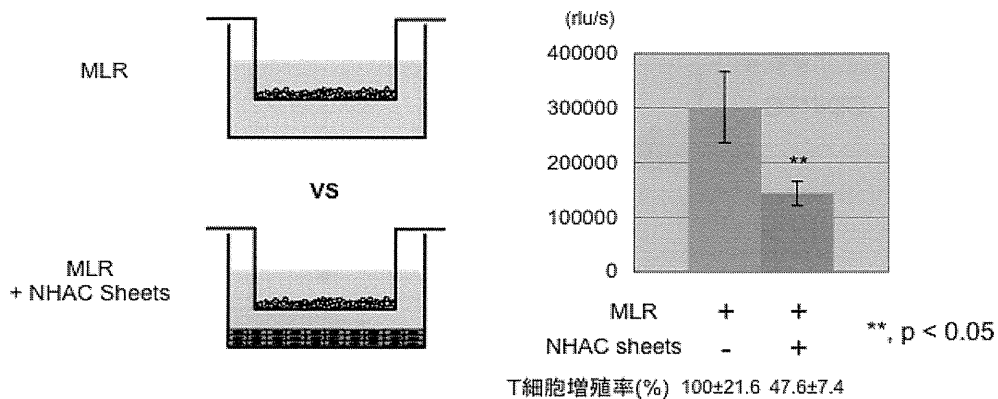


多指症由来軟骨細胞が活性化T細胞の増殖におよぼす影響



多指症由来軟骨細胞は活性化T細胞の増殖を抑制する

積層化市販軟骨細胞シートの免疫抑制効果の一部には液性因子が関与している

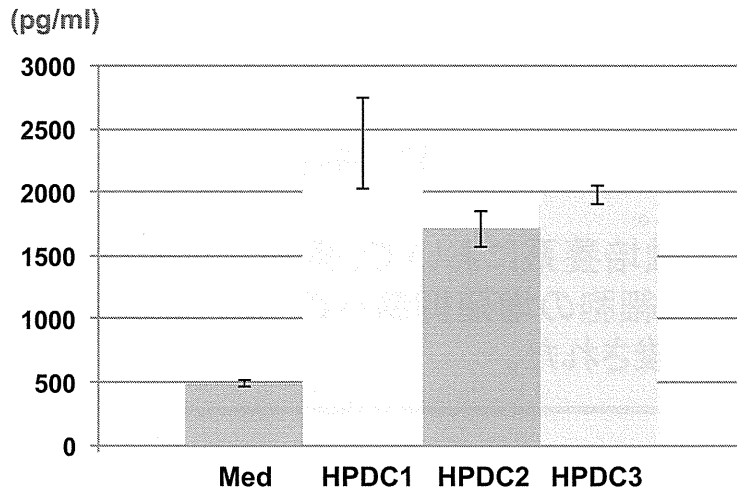


積層化NHACシートは物理的に分離したMLRの反応を抑制できる

液性因子の関与を示唆

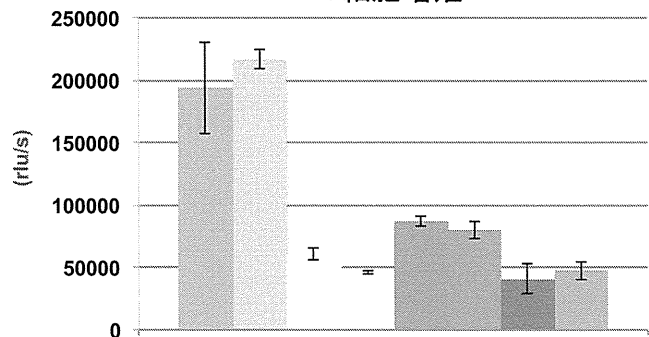
TGF-β1は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインであるが、一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがある。MSCにおいてもTGF-β1が、その免疫調節効果に関与する液性因子の一つである報告があることから、TGF-β1を測定した。

培養上清中のTGF-β1量

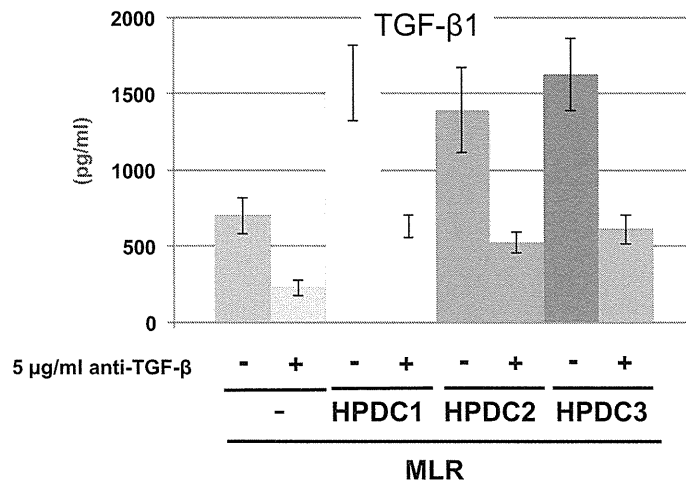


多指症由来軟骨細胞はTGF-β1を高発現しており同種T細胞の活性化抑制に関与している可能性がある

T細胞増殖



TGF-β1



結語

- ・ 多指症由来軟骨細胞は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が分かった。

これらのことより、関節軟骨損傷の治療に自己だけでなく、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。

- ・ 今回の接触培養系において、多指症由来軟骨細胞による活性化T細胞の増殖抑制へのTGF- β 1の寄与は低い可能性が示唆された。

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

明治大学 発生工学研究室
長嶋比呂志、松成ひとみ、前原美樹
2014/03/05

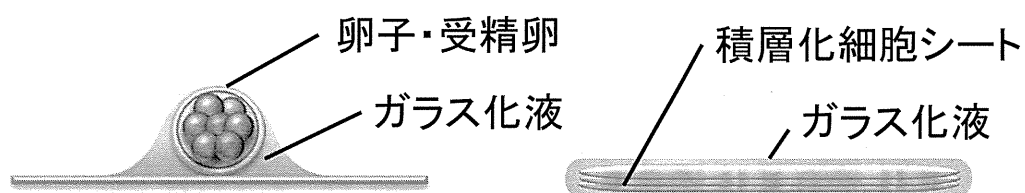
研究の背景

軟骨細胞シートの凍結保存

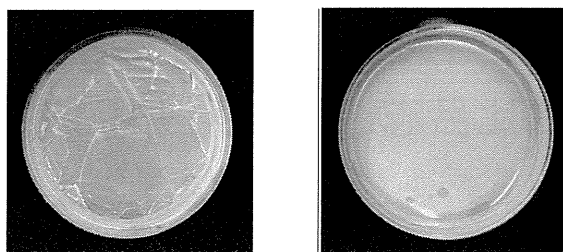
- ◆ シート作製と移植実施時期の調整が容易になる
 - ◆ 治療用シートのストックが可能となる
 - ◆ allograftの移植を促進する

実用的な細胞シート凍結保存法が不可欠

Minimum Volume Cooling(MVC) concept



カルボキシル化ポリリジンのガラス化安定化効果



◆特許出願

名称：凍結細胞シートの製造方法

特許番号：特願2011-260318

出願日：2011年11月29日

◆論文

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets

Miki Maehara^{1,2}, Masato Sato³, Masahito Watanabe^{1,2}, Hitomi Matsunari^{1,2}, Mami Kokubo³, Takahiro Kanai¹, Michio Sato⁴, Kazuaki Matsumura⁵, Suong-Hyu Hyon⁶, Munetaka Yokoyama³, Joji Mochida³ and Hiroshi Nagashima^{1,2*}

BMC Biotechnology誌に掲載

今年度の取り組み

□ 細胞生存性向上への条件検討

- ・薄層シートへのガラス化法の適用
- ・融解条件の検討
- ・パッケージング方法の改良

□ 凍結保存した軟骨細胞シートの機能成分の生産能の維持および軟骨損傷治癒機能の維持の確認 (東海大学にて実施)

薄層細胞シートにenvelope法を応用した際の融解後の形態維持と細胞生存率

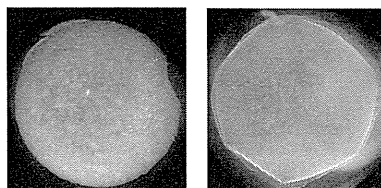
| シートの種類 | | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n数) |
|--------|--------|------------|-------------|
| 2層 | ガラス化 | 100% (6/6) | 84.9% (n=2) |
| | コントロール | 100% (6/6) | 86.3% (n=6) |

有意差なし

| 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 |
| | コントロール | 100% (6/6) | 88.4% (n=6) ^b |

異符号間に有意差あり(p>0.05)

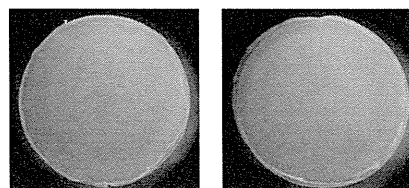
単層シート



非ガラス化区

ガラス化区

2層化シート

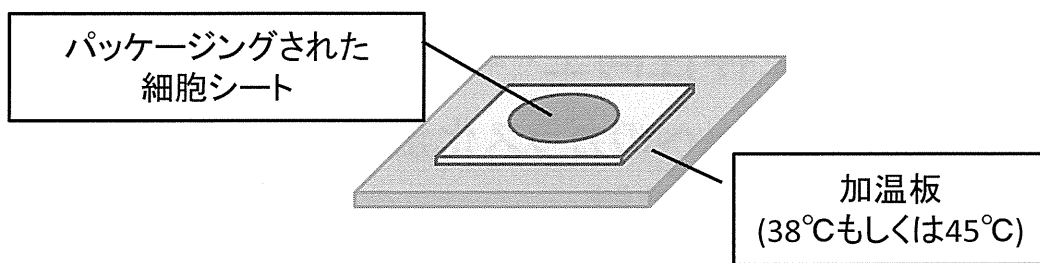


非ガラス化区

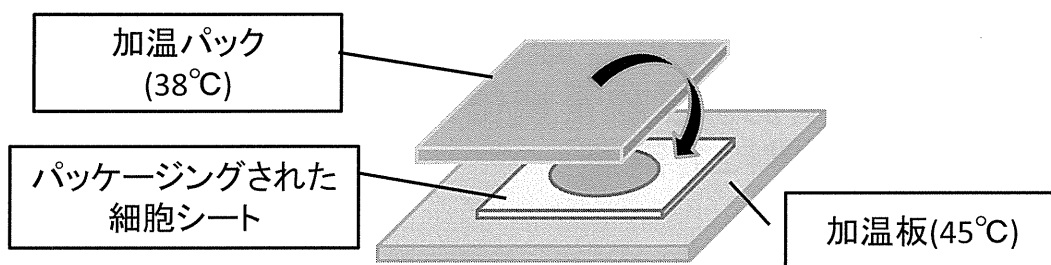
ガラス化区

細胞シートの融解温度の検討(2層シート)

①細胞シートを下方から加温する



②細胞シートを上方・下方から加温する → より急速な融解



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 |
|----------|----|--------------|----------------|
| 上 | 下 | | |
| - | 38 | 100% (13/13) | 82.5% a (n=11) |
| - | 45 | 100% (9/9) | 83.1% a (n=9) |
| 38 | 45 | 100% (13/13) | 84.8% ab (n=9) |
| コントロール | | 100% (11/11) | 86.8% b (n=12) |

異符号間に有意差あり(p>0.05)

