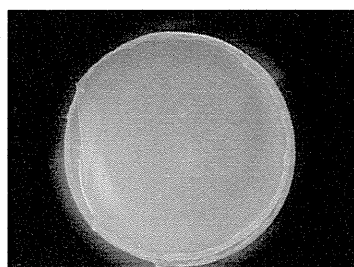


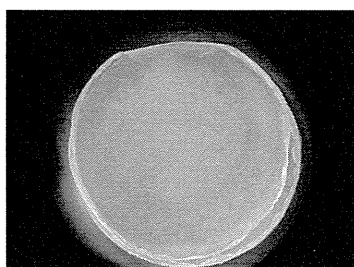
## 細胞シート保存用パッケージング素材の検討

パッケージング 素材の種類	回収率	細胞生存率
アルミ	100% (12/12)	83.3% a (n=12)
ラップ	100% (15/15)	82.6% a (n=13)
コントロール	100% (14/14)	86.7% b (n=14)

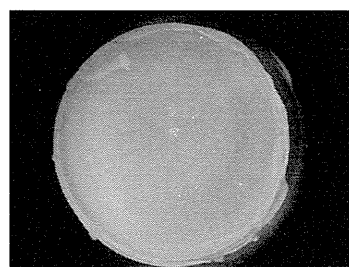
異なる符号間に有意差あり(p>0.05)



アルミ



ラップ

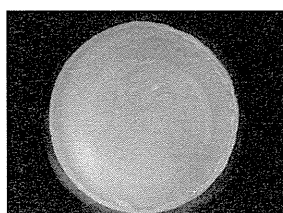


コントロール

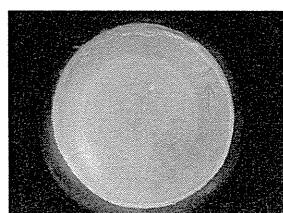
## パッケージング法によるウサギ軟骨細胞シートガラス化法の検討： ガラス化後の液体窒素への浸漬の影響(1)

パッケージング 素材の種類	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	80.0% (4/5)	84.2% (n=5)
コントロール	100% (5/5)	85.4% (n=5)

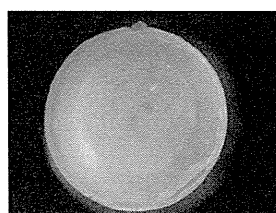
有意差なし



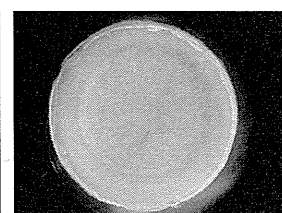
アルミ



ラップ(破損例)



ラップ(成功例)

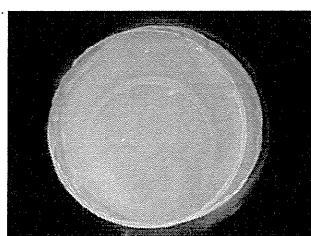


コントロール

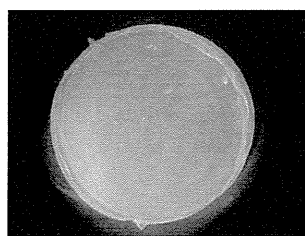
## パッケージング法によるウサギ軟骨細胞シートガラス化法の検討： ガラス化後の液体窒素への浸漬の影響(2)

パッケージング 素材の種類	液体窒素への 浸漬	無傷での 回収率	細胞生存率 (n数)
アルミ	+	100% (3/3)	84.8% (n=3)
	-	100% (2/2)	84.2% (n=2)
コントロール	-	100% (2/2)	87.4% (n=2)

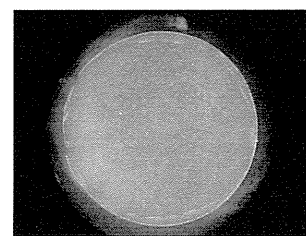
有意差なし



LN蒸気でガラス化後、  
LN内に浸漬したシート



LN蒸気によるガラス化のみ  
行ったシート



コントロール

## まとめ

- 薄層シートへのガラス化法の適用
  - より薄層(1および2層)のシートのガラス化保存も可能
- 融解条件の検討
  - より急速な融解によって細胞生存率が向上
- パッケージング方法の改良
  - 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
- ガラス化細胞シートの保存法の検討
  - 液体窒素内で保存が可能

# 今後の計画

## 【2014年度】

- ・液体窒素蒸気中での長期的な細胞シートの保存
- ・実用的な細胞シートの凍結保存デバイスおよび装置の開発
- ・ガラス化液保存の改良



ヒト細胞シートへの応用

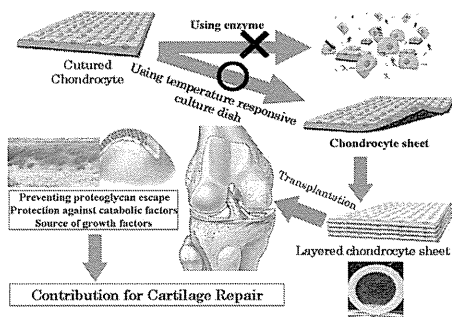
厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業  
「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

同種軟骨再生医療のための  
安全性評価

岡田恵里\*1 佐藤正人\*1 高垣智紀\*1 小林美由希\*1  
横山宗昂\*1 谷良樹\*1 河毛知子\*1 阿久津英憲\*2  
伊東紀子\*3 梅澤明弘\*2 的場亮\*3 持田譲治\*1

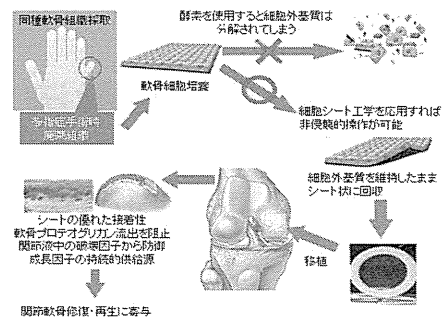
- \*1 東海大学医学部外科学系整形外科
- \*2 国立成育医療センター研究所
- \*3 株式会社DNAチップ研究所

自己細胞



採取組織: 関節軟骨と滑膜  
採取: 健常部2箇所  
採取量に制限あり  
シート作製枚数: 事前判断不可能  
移植の可能性: 事前判断不可能  
治療対象: 自己のみ(1人1回程度)

同種細胞



多指症由来関節軟骨  
手術時廃棄組織  
必要数作製可能  
試験作製により事前判断可能  
複数人、1人複数回可能

# 要約

## 目的

同種細胞を選択する際に、自己細胞で確立した試験方法を用いて安全性評価を確認する。

## 結果

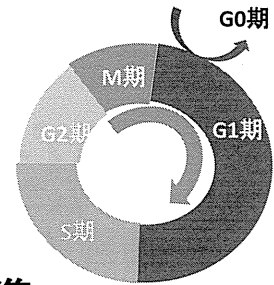
同種細胞は、試験評価法を通じて安全である細胞を選択することが可能であると確認できた。

# 評価項目

- **Gバンド分染法**
  - 細胞の染色体異常の有無を確認
  - 細胞の培養による影響を確認
- **aCGH解析**
  - 細胞の培養による影響を確認
- **造腫瘍性否定試験**
  - 腫瘍形成の有無を確認

## Gバンド分染法

- 継代数: P1, P6, P12
- 種類: 多指症軟骨組織由来細胞: 12
- 細胞分裂中期(M期): 20細胞解析
- 解析バンドレベル: 300~400bp
- 異数性の検出
- 転座、欠失等の染色体異常を検出
- 判定: 国際核型記載規約(ISCN)の基準



→組織提供者由来の細胞の染色体異常を確認  
→細胞の培養による影響を確認

## Gバンド分染法

No.	P1	P6	P12
1	正常核型	擬陽性	正常核型
2	正常核型	正常核型	正常核型
3	正常核型	正常核型	正常核型
4	正常核型	正常核型	正常核型
5	正常核型	正常核型	正常核型
6	正常核型	正常核型	正常核型
7	正常核型	正常核型	正常核型
8	正常核型	正常核型	正常核型
9	正常核型	正常核型	正常核型
10	正常核型	正常核型	正常核型
11	擬陽性	正常核型	正常核型
12	正常核型	正常核型	擬陽性

陽性: 20細胞中2つの同じ異常細胞があったサンプル(ISCN基準)

擬陽性: 20細胞中1つの異常細胞があったサンプル(東海判定)

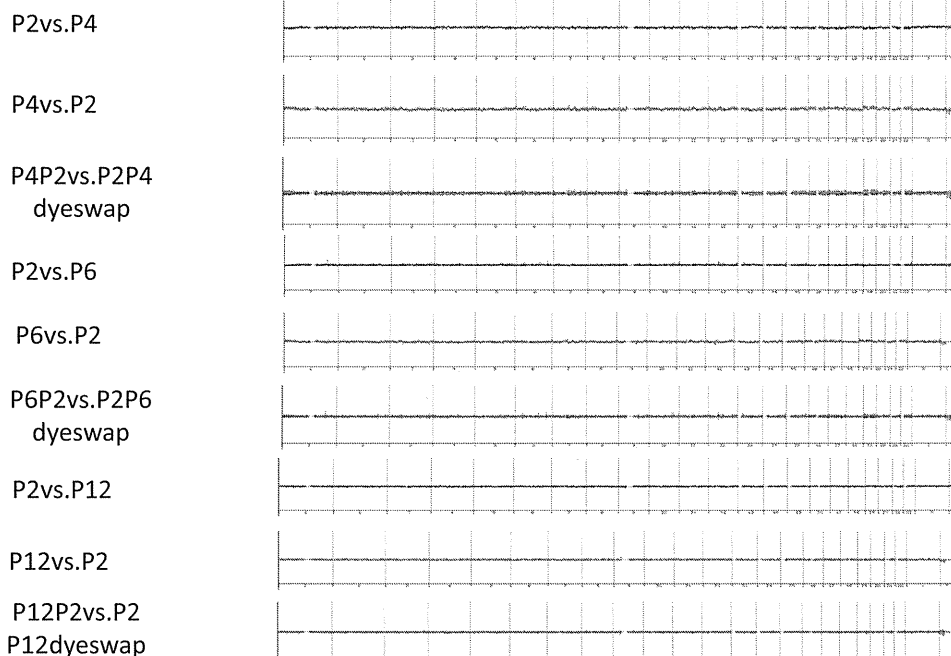
培養過程で継続的に観察される染色体異常は認められなかった。

# aCGH

- 継代数:P2, P4, P6, P12
- 種類:PD(12)
- 組み合わせ: P2-P4, P4-P2 dye swap  
P2-P6, P6-P2 dye swap  
P2-P12, P12-P2 dye swap
- 微細ゲノム異常の探索
- ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出
- 網羅的な解析
- 解析:8x60K、ADM-2(Threshod6,7,8,9,10)、  
moving average10pt

→細胞培養中の変化の有無を確認する

# aCGH



染色体コピー数の異常は認められなかった。

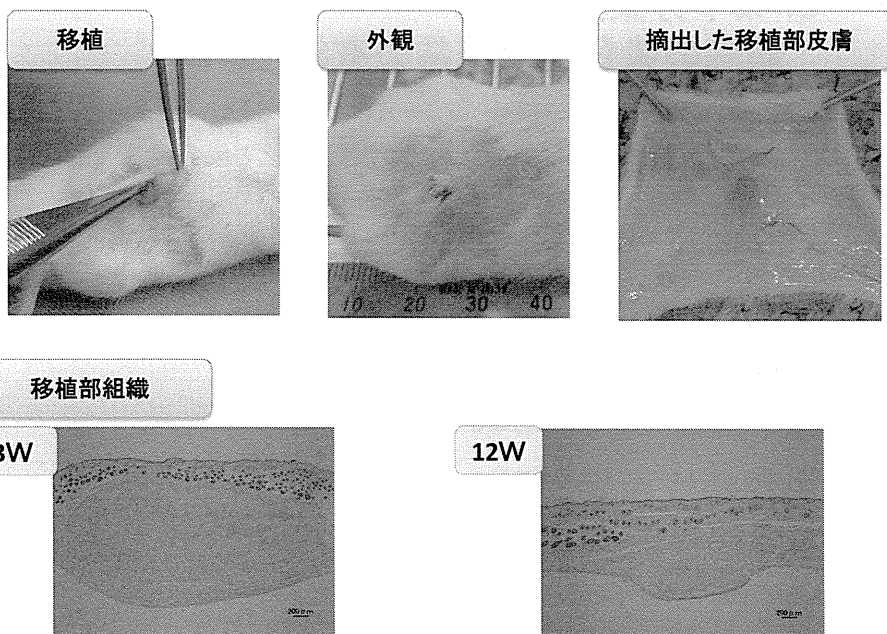
# 造腫瘍性否定試験

- 移植動物: 重度免疫不全マウス (NOGマウス)
- 継代数: P2
- 種類: PD(3)
- 細胞移植数:  $1 \times 10^7$  cell/匹
- 移植場所: 皮下
- 期間: 3W、12W、24W
- 外観・剖検の観察
- 組織の観察
- 体重測定



→ 多指症軟骨の細胞の造腫瘍性を確認

# 造腫瘍性否定試験

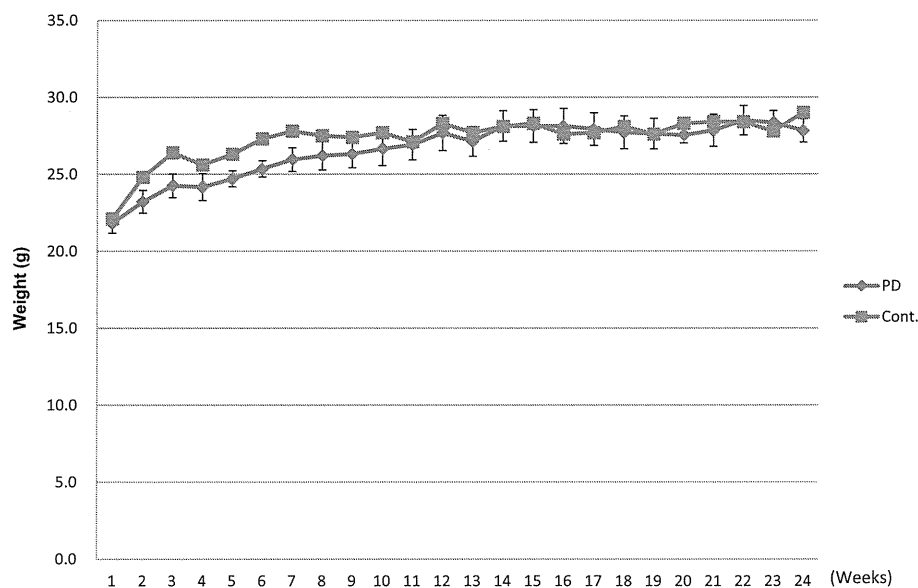


→ 造腫瘍性は認められなかった。



# 造腫瘍性否定試験

体重の変化



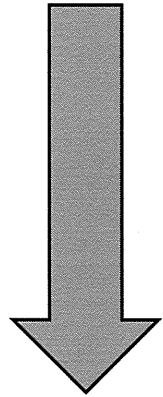
## 結果

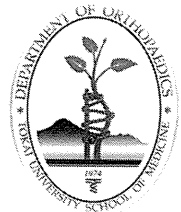
- **Gバンド分染法**  
細胞の染色体の異常の有無を確認  
→ISCNの基準による異常は認められない  
細胞培養中の影響を確認  
→ISCNの基準による異常は認められない  
→影響は認められない
- **aCGH解析**  
細胞培養中の影響を確認  
→影響は認められない
- **造腫瘍性否定試験**  
腫瘍形成の有無を確認  
→認められない

多指症軟骨細胞の安全性は確認された

# 研究の進捗

H24	自己軟骨細胞シート安全性評価(過継代:CGH, Gバンド)
	同種軟骨細胞シートの細胞ソースとその増殖性の検討
H25	同種軟骨細胞シート安全性評価(過継代:CGH, Gバンド)
	同種軟骨細胞シート安全性評価(造腫瘍性否定試験)
H26	同種軟骨細胞シートの品質評価





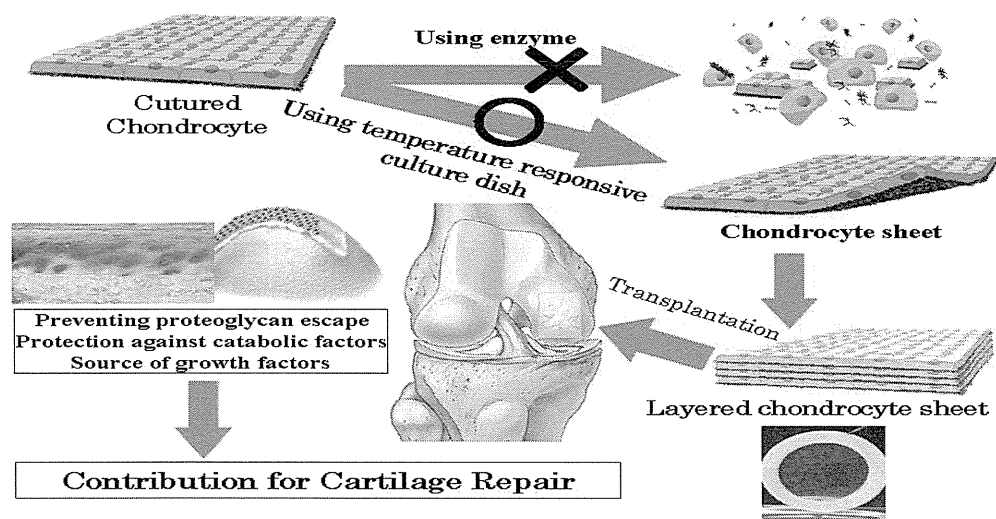
# 低酸素環境で作製した 軟骨細胞シートの特性評価

Evaluation of characteristics of chondrocyte sheet constructed under hypoxia environment

小久保舞美

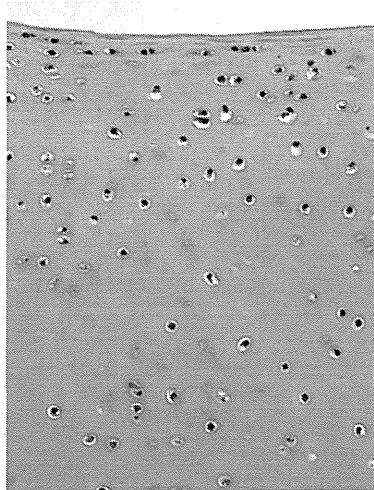
東海大学医学部外科学系整形外科学

## 温度応答性培養皿を使った軟骨細胞シートの作製



- [1] Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, Mitani G, Sakai H, Mochida J 2006  
Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun.*
- [2] Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, Mitani G, Sakai H, Kikuchi T, Mochida J 2007  
Cultured articular chondrocyte sheets FOR partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes.
- [3] Mitani G, Sato M, Lee JI, Kaneshiro N, Ishihara M, Ota N, Kokubo M, Sakai H, Kikuchi T, Mochida J. 2009  
The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration.

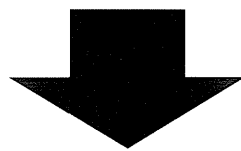
# 課題と目的



## 軟骨細胞の特徴

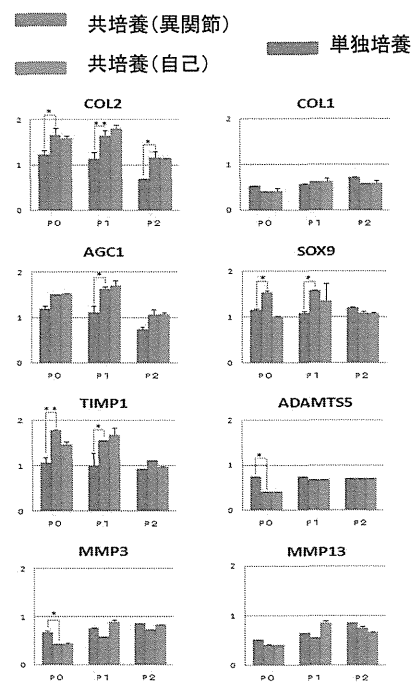
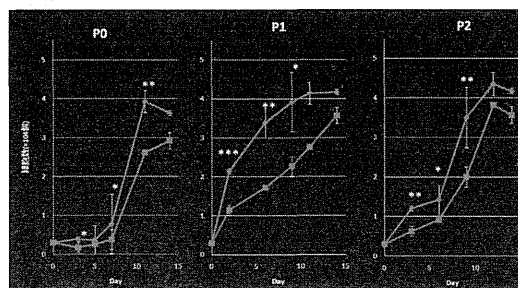
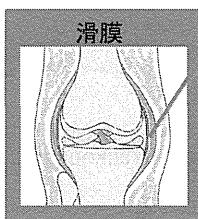
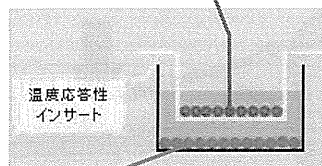
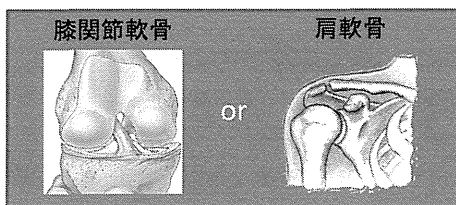
- ・組織から採取される細胞数が少ない
- ・増殖能が乏しい

ヒトでは特に個体差が大きく、シート作製までに多くの時間を要する



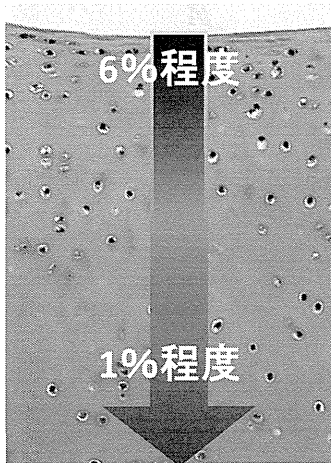
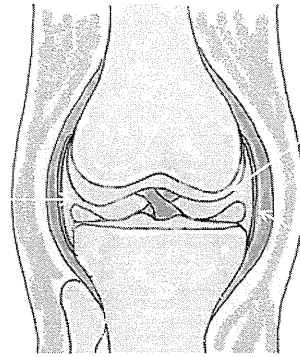
個体差の大きいヒト細胞から、ばらつきなく、より短期間で優れた軟骨細胞シートを作製すること培養法の検討を目的とする

## ～滑膜細胞との共培養法を用いた培養期間短縮～



# 生体内での軟骨の環境

生体内での軟骨の栄養源  
→ 関節包内の滑液



軟骨の酸素濃度は  
→ 表層から深層部まで6%～1%程度

## 実験方法1

### 細胞

ACL再建術時に患者同意のもと得られた

ヒト関節軟骨組織、ヒト滑膜組織 : N=10 (Men= 9, Female=1) , 15~55y/o

→ コラゲナーゼ処理で単離 継代してP0~P2の細胞を使用

### 培養

基本培地 : DMEM/F12 1:1 +20%FBS+アスコルビン酸+抗生剤

酸素濃度 : 5% or 20%

### 評価

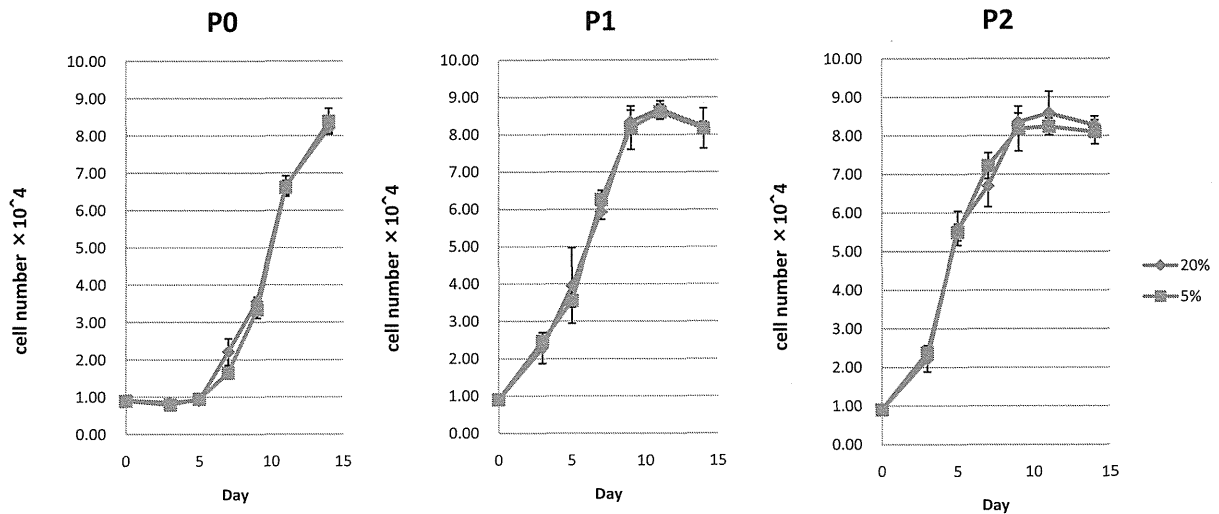
1. 細胞増殖能 : MTT Assay (Day3, 5, 7, 9, 11, 14)

2. ECM蓄積量 : DMMB法 (Day14)

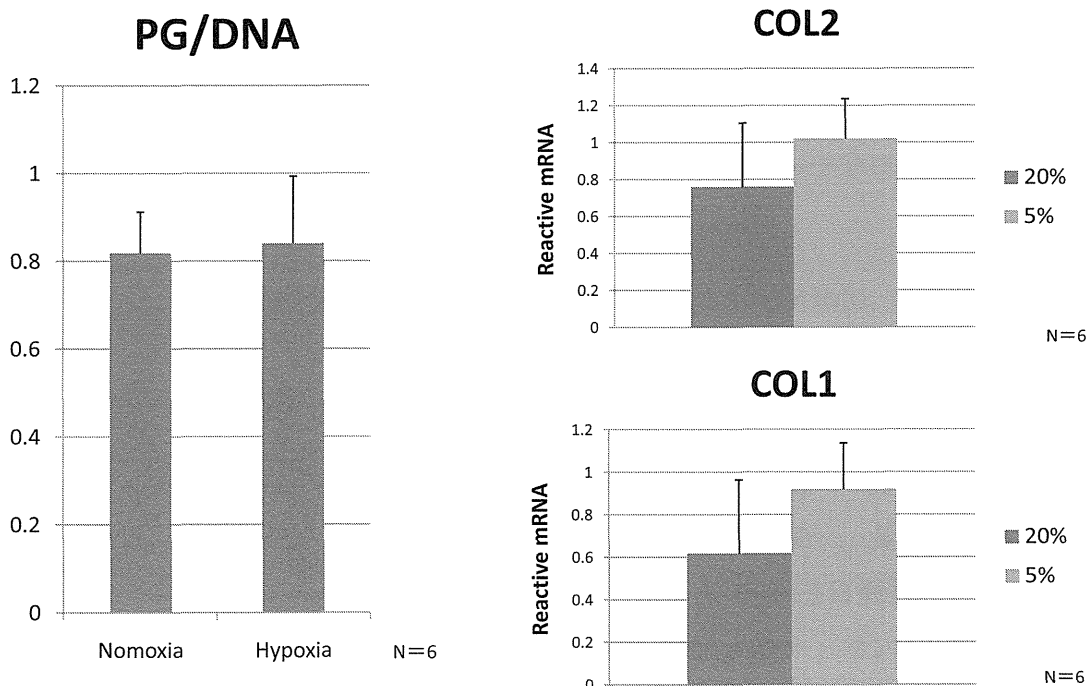
→ 播種日をDay0 とする

3. real time PCR : COL1,COL2, (Day14)

# MTT Assay結果



# P0細胞単層培養14日目の基質産生能



# 実験方法2

## 細胞

ACL再建術時に患者同意のもと得られた

ヒト関節軟骨組織、ヒト滑膜組織 : N=12 (Men= 9, Female=3) , 15~42y/o

→ コラゲナーゼ処理(4時間) で単離 継代してP0~P2の細胞を使用

## 培養

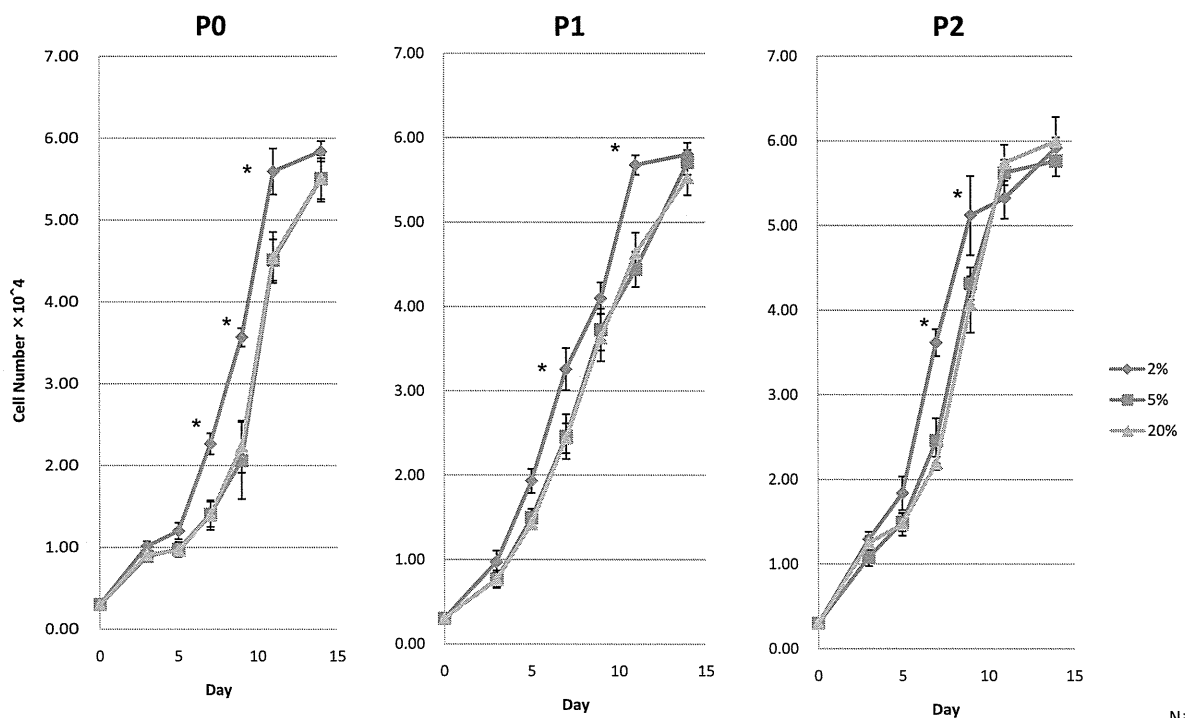
基本培地 : DMEM/F12 1:1 + 20%FBS + アスコルビン酸 + 抗生剤

酸素濃度 : 2%, 5%, 20% 下でそれぞれ培養

## 評価

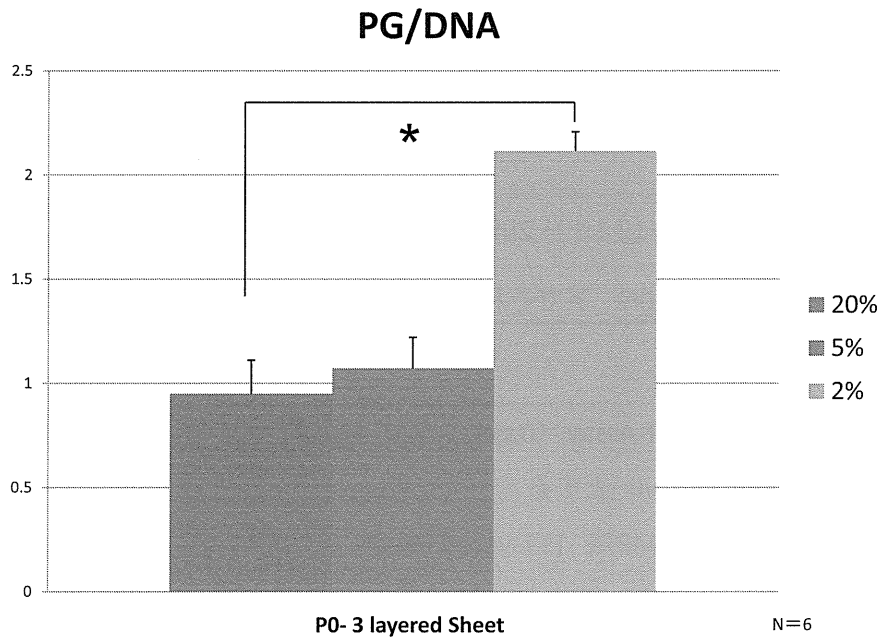
1. 細胞増殖能 : MTT Assay (Day3, 5, 7, 9, 11, 14)  
→ 播種日をDay0 とする
2. ECM蓄積量 : DMMB法 (3 layered Sheet)
3. real time PCR : COL1, COL2, TIMP1, MMP3, MMP13, ADAMTS5, FN-1, ITG $\alpha$ 10, COL27, AGC1, SOX9 (3 layered Sheet)

# MTT Assay 結果

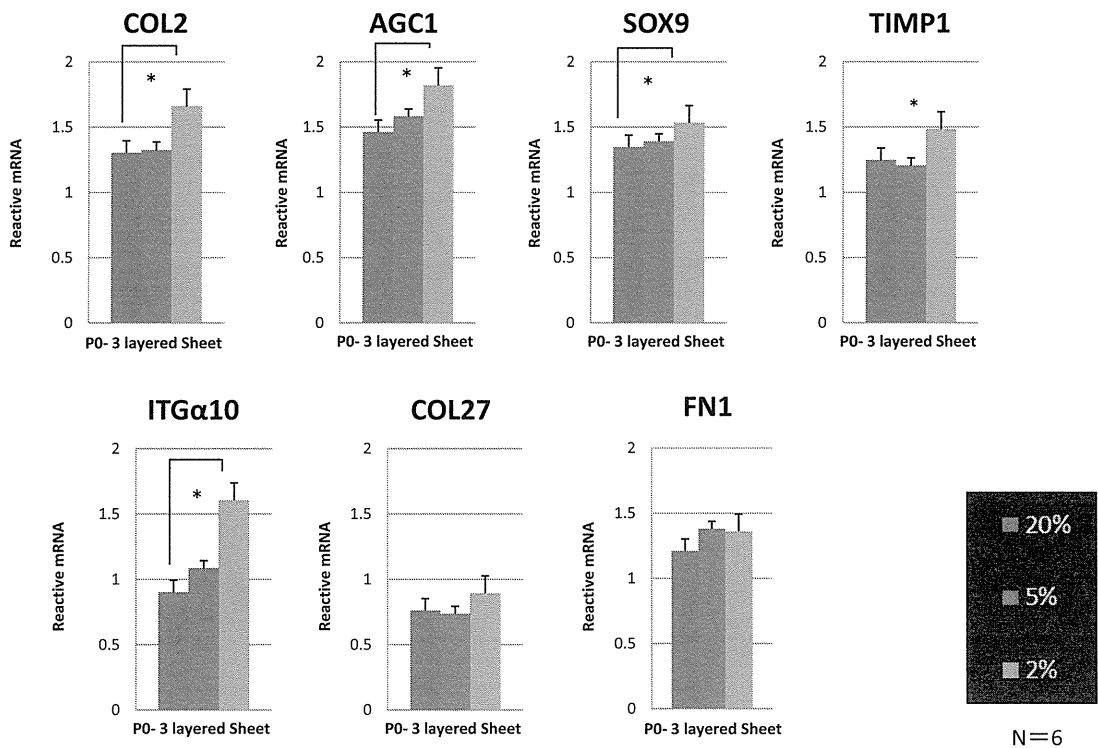


N=6

# DMMB Assay 結果

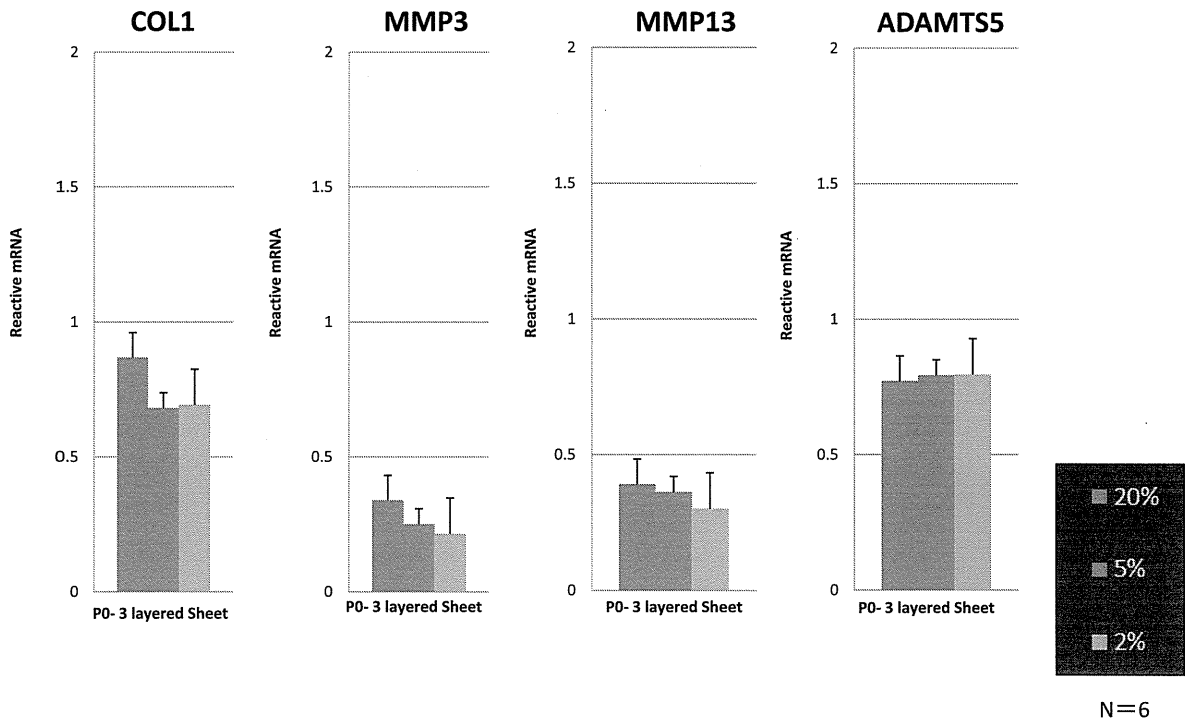


# Real time PCR 結果

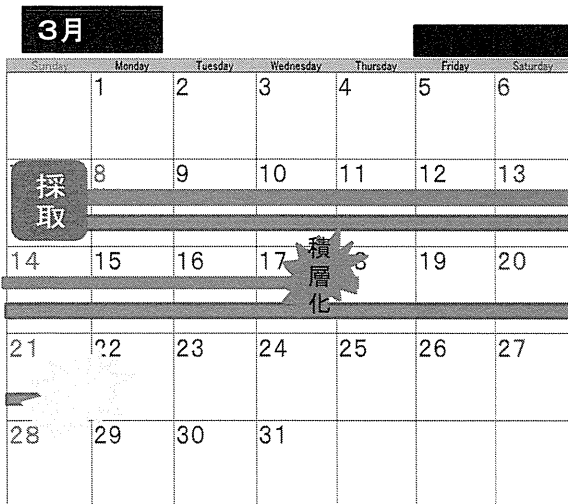




# Real time PCR 結果



## 考察1. 培養期間の短縮



積層化までにかかる培養期間

20% : 平均14.7日  
 5% : 平均14.5日  
 2% : 平均11.8日

n=7

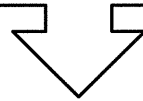
☆入院期間の短縮  
 ☆QOLの向上



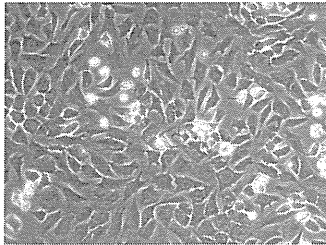
## 考察2. 基質産生能の増加

Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering

Elise Duval, et al. *Biomaterials*, 6 June 2012, Page6042-6051



軟骨特異的遺伝子 ↑  
基質産生量 ↑



シャーレ上で培養された軟骨細胞は、急速に軟骨基質の産生能を失う(脱分化)

## 結語

軟骨細胞の培養環境をより生体内環境に近づけることによって  
個体差の大きいヒト細胞でも  
より短期間で細胞外基質を多く含む  
軟骨細胞シートを作製することが出来た。

