

同種軟骨再生医療のための安全性評価

研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究分担者	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授
研究分担者	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授
研究分担者	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師
研究協力者	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	横山 宗昂	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	的場 亮	株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長
研究協力者	伊東 紀子	株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部

研究要旨：我々は、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過である。将来的な普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を検討している。この細胞ソースとして多指症軟骨組織由来細胞を検討した。

自己軟骨細胞をシート化する際に確立した試験評価方法の Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)、Gバンド分染法により、細胞ソースの確認及び培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、通常の培養継代期間を超えて培養した細胞について安全性評価を実施した。この結果、多指症軟骨組織由来細胞は、試験評価方法を通じて安全性を判断することができた。

A. 研究目的

平成23年10月3日に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政1003第3号）により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、自己細胞を使用した「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を実施している。現在までに11例をエントリーし、8症例に実施した。第1-4症例は移植後1年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中に重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節治療効果が得られており、細胞シート移植による関節治療効果の検討を進めている。細胞シートの原料として、自己細胞は、関節軟骨組織の健常部と滑膜組織を採取し、採取量に制限があり、シート作製枚数やシート移植の

可能性の有無は事前に判断できない。また、対象として自己で1人、1回程度の実施が可能である。今後、細胞シートによる関節治療の将来的な普及を目指すためには、自己細胞の課題を解決すべく、細胞の原料として同種細胞の可能性を検討することにした。同種細胞として、手術時に廃棄される多指症由来関節軟骨組織を採取することにより、シートを必要数作製可能となり、また、シートを移植前に試験的に作製するため、移植の有無が事前に判断できる。対象として複数人に複数回の実施が可能となる。

細胞シートの原料を同種細胞にすることにより、将来的な普及を目指し、同種細胞シート移植を念頭に自己の安全性評価で用いた試験方法に従い、同種細胞の安全性を

確認することを目的とした。薬食発法第0208003号第4章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」を確認するため、通常の培養期間を超えて継代培養した細胞について微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出などの網羅的な解析により遺伝子異常を検出することが出来るとされている aCGH 解析を実施し、継代培養中の変化を評価した。また、細胞が保有している核型について異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出することが出来るとされている G バンド分染法により染色体核型解析を実施し、細胞の変異と継代培養中の変化を評価した。

B. 研究方法

サンプル

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究名「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」）により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡された多指症軟骨組織由来細胞を用いて本研究を実施した。

多指症の手術時に廃棄する指関節の軟骨組織を分離し、細切後培養して増殖した細胞を酵素処理により回収し、多指症軟骨組織由来細胞とした。検体 12 症例（平均年齢 1 歳 4 箇月）を用いて継代培養し、供試する細胞を調整した。（例 第 2 継代（P2））

細胞培養

培地：DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Co. Japan)

培養条件：37 度、5% CO₂

播種数：0.5 × 10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

No.	gender	age
1	M	0y11m
2	M	1y3m
3	F	0y11m
4	F	1y2m
5	F	0y11m
6	M	1y1m
7	F	0y11m
8	F	1y6m
9	F	1y0m
10	M	4y6m
11	F	1y1m
12	M	0y8m

（平均年齢：1y4m）

aCGH 解析

上述の各 12 サンプルの細胞を継代培養して P2、P4、P6、P12 の細胞を調整し、DNA を抽出した。解析は、チップサイズ 8 × 60K、Moving Average10pt で実施して細胞培養中における細胞への影響の有無を確認するため、同一人物の細胞について P2 を標準試料とし、組み合わせを P2 と P4、P2 と P6、P2 と P12 それぞれについて解析を実施した。さらに、各組み合わせは蛍光

色素を入れ替えての dye swap 解析も実施することにより、データを再確認してデータの信頼性を高め、ゲノム DNA の変化がみられた領域数を数値として検知する。標準試料との差異を検出するアルゴリズムとして Aberration Detection Method-2 (ADM-2) Threshold 6、7、8、9、10 を用いて解析を行う。また、細胞培養中に顕微鏡下で細胞形態の観察を実施する。

G バンド分染法

と同様の細胞（12 サンプル）の細胞を継代培養して P1、P6、P12 の細胞を調整し、解析バンドレベル 300bp ~ 400bp で、細胞分裂中期（M 期）のよく広がった細胞を用いて、評価基準であるヒト染色体に関する国際命名規約 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature : ISCN) に従い、20 細胞を核型解析に用いて、細胞ソース由来の核型解析及び同一人物による各継代の核型解析結果を比較検討した。

C. 結果

aCGH 解析

P2 から P12 まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった。各検体の組み合わせの解析では、Threshold 6、7、8、9、10 により $\text{Log}_2\text{Ratio}=0、1、2$ と検出され(表 2)、Threshold 6、7、8、9、10 のうち、Threshold 10 であるとすべて解析数値は $\text{Log}_2\text{Ratio}=0$ と検出された。また、dye swap 解析を実施すると $\text{Log}_2\text{Ratio}=1、2$ の値が 0 と検出さ

れた。(表 3)。

表 2 解析結果 (標準試料 : P2)

No.	P4	P6	P12
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	1
6	0	0	0
7	0	0	1
8	0	0	0
9	0	0	0
10	2	0	0
11	1	0	0
12	2	2	2

表 3 解析結果 (表 2 の dye swap)

No.	P4	P6	P12
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

また、プローブ 10pt 毎に Moving Average(移動平均)の値を算出してライングラフ化し、染色体毎に染色体のコピー数異常の検出を基線からのずれとして可視化させて実施した。可視化した図(図 1)より、細胞は、12 例とも P4、P6、P12 すべてにおいて、基線からのずれは正常とみなされる範囲であった。

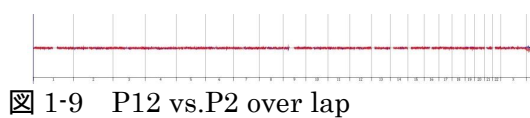
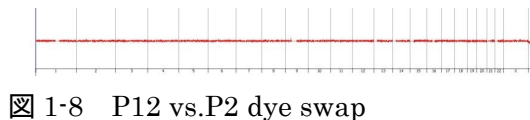
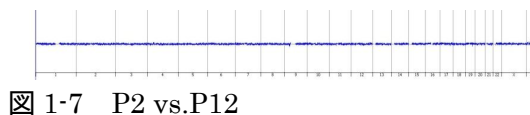
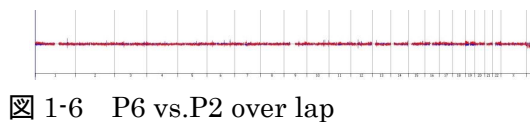
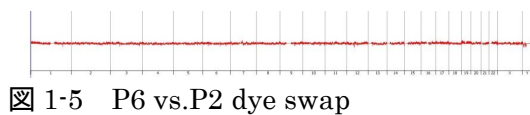
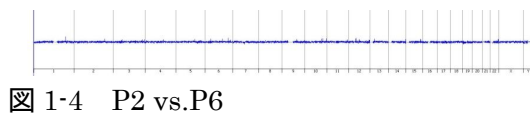
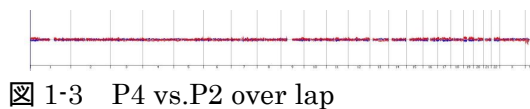
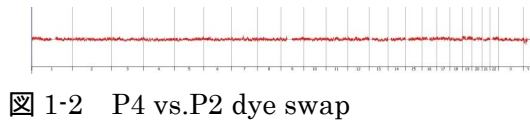
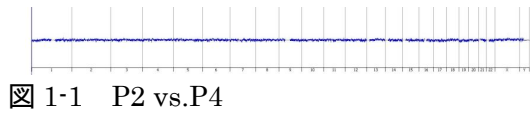


図 1-1 ~ 図 1-9 Genome View

G バンド分染法

解析結果は、各サンプル各継代数ともに ISCN の基準によると染色体異常と判断される細胞はなかった。構造変化が検出され

た細胞もあったが、一般的に認められる変異であるものは基準では正常とみなされるものであった（図 2、表 4）。



図 2 G バンド分染法 (P1)

表 4 核型分析結果

No.	P1		P6		P12	
	細胞	ISCN	細胞	ISCN	細胞	ISCN
1	正常核型[20]	正常	正常核型[19] 変異[1]	正常	正常核型[20]	正常
2	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
3	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
4	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
5	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
6	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
7	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
8	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
9	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
10	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
11	正常核型[18] 変異[1] 変異[1]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常
12	正常核型[20]	正常	正常核型[20]	正常	正常核型[19] 変異[1]	正常

D. 考察

通常用いる培養期間を超えて培養した細胞は、顕微鏡下において形態に異常は認められなかった。また、自己の場合は細胞培養の継代数が進むにつれて、細胞の増殖性の低下が認められたため、自己軟骨細胞は、過継代はシート化に適さないことが示唆されたが、同種細胞の場合は、細胞の増殖性の低下は認められなかった。

aCGH 解析により、少量の DNA から解析が可能であり、遺伝子の異常検知やがん関連遺伝子の異常を数値として得られる。そして、微細な変化を捉えることが可能なため、継代培養中における細胞への影響の有無は、同一人物の細胞の継代数の若いサンプルを標準試料として継代が進んだサンプルを解析することにより、継代培養中による明らかな遺伝子異常は認められなかったため、細胞への影響は認められないと考えられた。

G バンド分染法での染色体核型解析では、細胞ソース由来の染色体異常の有無を確認でき、また、継代培養した細胞についてもほかの変異は、培養過程で継続的に観察されることはなかったため、生体内で自然淘汰される可能性が高い変化であることが推察され、細胞に対する継代培養中による影響は認められないと考えられた。

また、染色体異常が保存される変異は認められなかった。

E. 結論

G バンド分染法により細胞ソース由来の染色体異常は認められなかった。

aCGH 解析、G バンド分染法により細胞培養中によるコピー数の異常は生じないことが確認された。

両解析により、多指症軟骨組織由来細胞は、試験法の一般的な基準においては、すべてのサンプルにおいて異常は認められなかった。

しかし、私どもが臨床研究として、細胞

ソースを採用する際の基準としては、より安全性を担保するために、aCGH 解析、G バンド分染法の両解析結果において、陽性ではないが、1 つでも変異がみとめられた場合は採用せず、陰性の結果のみであるサンプルを臨床研究の細胞ソースとして選択することにした。

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. 論文発表（研究分担者：加藤俊一）

1) Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kosaka Y, Kikuchi A, Kato S, Kigasawa H, Horikoshi Y, Oda M, Kaneda M, Mori T, Mugishima H, Tsuchida M, Taniguchi S, Kawano Y. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant*. 2014 Feb 8. [Epub ahead of print]

2) Ohnishi H, Sasaki H, Nakamura Y, Kato S, Ando K, Narimatsu H, Tachibana K. Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adh Migr*. 2013 Sep 1;7(5):426-33. Epub 2013 Aug 5.

3) Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of KIR ligand incompatibility on

clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* 2013 Nov 29;3:e164.

4) Kasahara M, Sakamoto S, Horikawa R, Koji U, Mizuta K, Shinkai M, Takahito Y, Taguchi T, Inomata Y, Uemoto S, Tatsuo K, Kato S. Living donor liver transplantation for pediatric patients with metabolic disorders: The Japanese multicenter registry. *Pediatr Transplant.* 2014 Feb;18(1):6-15. Epub 2013 Nov 28.

5) Masaoka N, Morooka M, Nakajima Y, Ogata H, Kodo H, Kato S. Study for the improvement of umbilical cord blood sampling using a new trial apparatus. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Feb;40(2):405-9. Epub 2013 Nov 18

6) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A. PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):195-200. Epub 2013 Sep 30.

7) 加藤俊一. 先天代謝異常症に対する造

血細胞移植療法の確立とガイドラインの作成に向けて. *内分泌・糖尿病・代謝内科*, 2013,37(5):567-577.

8) 加藤俊一. 小児造血細胞移植. *日本小児血液・がん学会雑誌*, 2013,50(3):297-310.

9) Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol.* 2013 Aug;98(2):206-13. Epub 2013 Jul 17.

10) Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Morishima S, Spellman S, Kashiwase K, Kato S, Cesbron A, Tiercy JM, Senitzer D, Velardi A, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Significance of Ethnicity in the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease and Leukemia Relapse after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Aug;19(8):1197-1203. Epub 2013 Jun 6.

2. 論文発表（研究分担者：小林広幸）

1) Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of

intracerebroventricular administration of D-serine on formalin-induced pain. J Anesth. 2013 Sep 19. [Epub ahead of print]

2) Miura M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. Tokai J Exp Clin Med. 2013 Jul 20;38(2):62-70.

3) Moriya Y, Mizuma A, Uesugi T, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W, Kobayashi H, Kawada H, Ando K, Takagi S, Takizawa S. Phase I study of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute and subacute ischemic stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2013 Oct;22(7):1088-97.

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