

多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験

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
研究分担者	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 生殖技術研究室・室長
研究協力者	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部・部長
研究分担者	小久保 舞美	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
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
研究協力者	豊田 恵利子	東海大学医学部外科学系整形外科学・奨励研究員

研究要旨：変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。

我々が同種細胞移植として検討している多指症軟骨組織由来の細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症軟骨組織由来細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する為、造腫瘍性否定試験を実施した。

造腫瘍性とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。我々は、同種移植による造腫瘍性否定試験では、より重度な免疫不全を呈するNOGマウスを用いて検討をした。

A. 研究目的

我々は、温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により作製した積層化軟骨細胞シートを軟骨損傷を有する患者へ移植し、当該細胞シートの安全性及び修復再生効果を確認している。しかし術中に成人の関節軟骨から採取できる軟骨組織は量・質共に個人差がある。軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷の治療を安定して、多くの患者に適応する為には、自己細胞による治療では限界がある。このことにより、同種細胞を用いた同種軟骨細胞シート移植が必須であると考えられる。

このため同種細胞移植で用いる細胞ソースの確保は非常に重要である。国立成育医療研究センター研究所から譲渡を受けた多

指症軟骨組織由来細胞（以下、「PD細胞」と示す。）は優れた増殖性を持ち、かつ手術時に廃棄する組織であることから、採取にあたり、現在、自己細胞で実施している臨床研究と比較して、低侵襲でレシピエントにとって負担がかからないという特徴がある。

このように有用な細胞ソースとして期待される、PD細胞のin vivoにおける造腫瘍性を否定するために検討を行ったのでそれを報告する。

B. 研究方法

多指症軟骨細胞について

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PD細胞を用いて本研究を実施した。

手術時に廃棄される検体から軟骨組織を分離し、細切後培養皿上に増殖した細胞を酵素処理により回収したPD細胞を造腫瘍性試験に用いた。

今回、同種移植の安全性の確認として、3例の検体を使用し、評価した。

軟骨細胞の分離と培養

国立成育医療研究センター研究所から譲渡されたPD細胞を東海大学にて 0.5×10^4 cells/cm² で播種、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 Corp. Japan)の培地を使用し培養した。全ての培養は37度、5% CO₂、95% O₂の条件下で行った。

移植には第2継代目の培養細胞を用いた。1週間順化後、イソフルラン吸引麻酔下にて、NOGマウス右腰部を約1cm切開し(図1)、PD細胞を1匹あたり 1×10^7 乗個になるようにペレット状態で皮下に移植する(図2)。切開した皮膚を医療用クリップで留める(図3)。Sham群には切開のみを行い、同様にクリップで留める。

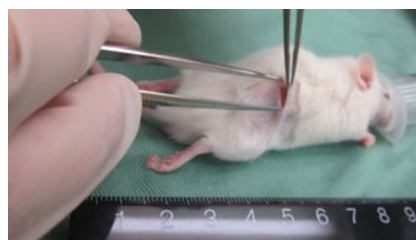


図1 右腰部を約1cm切開



図2 ペレット状態で皮下に移植



図3 医療用クリップで留める

移植後は観察及び体重測定を継続的に実施した。移植後3週、12週、24週で病理解剖する。移植部位の皮下組織、血清を採取し、灌流後にリンパ節(腋窩・鼠径部)、肺(全葉)、脾臓、腎臓、肝臓、脳を採取する。

摘出した臓器を病理組織学的に観察し、移植部位は標本作製し染色をして造腫瘍性を評価する。

NOGマウス(正式名:NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic、簡略名:NOD/Shi-scld, IL-2Rynull)は公益財団法人実験動物中央研究所により樹立された、極めて重度な複合型免疫不全を呈し、ヒト細胞の生着性がNOD-scldマウスと比

べて著しく高いことから、造腫瘍性細胞を検出する試験方法で用いられている実験モデル動物である。

C. 結果

PD細胞移植後24週までの体重の変化について示す（図4）。各群の体重の推移は大きな変化は認められなかった。また、移植直後は、移植部は膨隆しているが、どの群においても4~5週後には非移植部の皮膚と区別がつかない程度まで膨隆は縮小した（図5、6）。

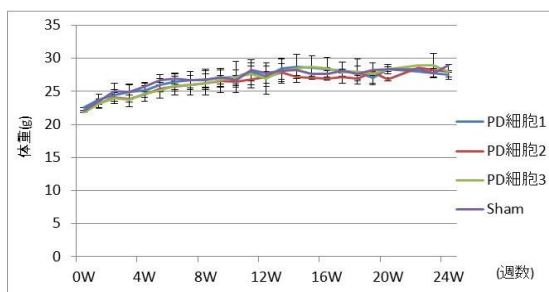


図4 体重の推移



図5 移植後1週間外観



図6 移植後5週間外観

PD細胞移植後3週及び12週、24週で、剖検し、移植部位の皮膚を摘出した。移植後3週では中央に移植した細胞塊が認められるが（図7）、移植後12週では移植した細胞塊は縮小し、軟骨基質を染めるSafranin-O染色でも染色される箇所は少なく（図8）、継時的に分解されていくことが示唆された。

観察倍率を120倍まで上げて、HE染色により観察したが、目立った異常は認められなかった（図9）。

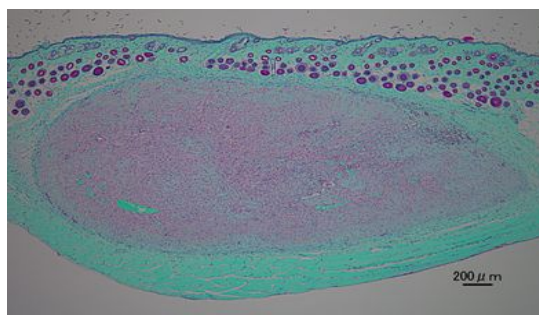


図7 移植後3週 Safranin-O染色

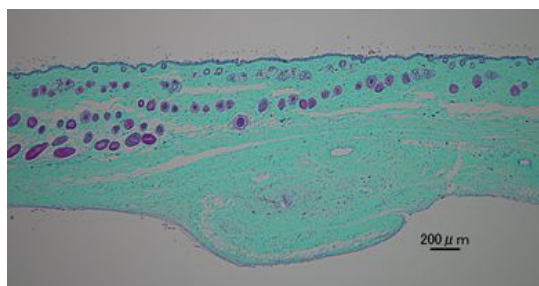


図8 移植後12週 Safranin-O染色

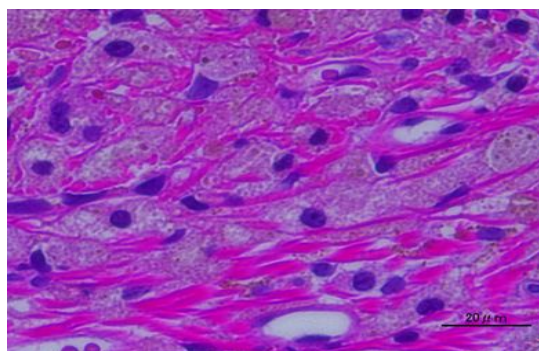


図9 移植後12週 HE染色

D. 考察

本研究では、腫瘍性否定試験の国際的なガイドラインとなっているWHOのTRS 878(Requirements for Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” in WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report (1998) (technical report series number 878)に準じて試験を行った。

一般的に細胞・組織加工製品の原材料となるヒト幹細胞は大きく2種に分けられる。一つは我々が用いているヒト体細胞、ヒト体性幹細胞であり、もう一つは胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)である。

ES細胞やiPS細胞を移植した場合、残存していた未分化幹細胞が腫瘍形成しうる為に問題となる。造腫瘍性と未分化能の密接な関連を考慮した場合、我々が用いている軟骨細胞は間葉系幹細胞ではあるが、最終分化した細胞であると考えられる。

このことから、スタートの段階から懸念されるヒト幹細胞の造腫瘍性としてはリスクが低いことが分かる。

もう一つ造腫瘍性は検討するにあたり、考慮しなければならない点として、最終製品を作製するために行われる調整段階がある。

我々の研究では、組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養という人為的操作が該当する。細胞をシート状に回収する温度応答性培養皿を用いることについては、温

度応答性培養皿はGMPに則った製造工程で生産が行われており、医療機器に準拠した品質が保証されていること、温度応答性培養皿の製造を行っているセルシード社が海外で実施した治験で用いたものと同じ製品であり、欧州医薬品庁(EMA)が求める基材の安全性については十分検討されていることから、造腫瘍性に影響を及ぼすものとは考え難い。このことから、本研究で用いた検体は、最終製品を作製するまでの調整(組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養)を経たものを模した検体といえるであろう。

本研究は、細胞の調整という人為的操作により、細胞が造腫瘍性を獲得していないか、検討することを主目的としてTRS 878を準じて、造腫瘍性を確認したものである。

PD細胞を用いた同種移植の最終製品を免疫不全動物モデルに移植したが、移植した細胞の異常な増殖は確認されず、代謝され、分解されたと考えられる。

多指症は様々な合併症を持つことが多く、絶対的な原因はわかっていない。In vitro試験で染色体や遺伝子の異常の有無を確認しているが、それも移植された側の患者へ影響があるのか絶対的な確認は不可能である。このことから、in vivo試験である、本研究で細胞の異常増殖が否定されたことは、造腫瘍性の確認以上に有益な情報を得たと示唆される。

E. 結論

我々が同種細胞移植として検討している

PD 細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。

この PD 細胞の造腫瘍性否定試験を実施した結果、腫瘍形成は認められなかった。

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) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, 2014; 33: 643-652.
- 2) Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2: 265-273.

3) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet*. 2013; 14: 32.

4) Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics*. 2013; 8: 635-645.

5) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *PLoS One* 2013; 8: e63265.

6) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Jul 2. Epub ahead.

- 7) Terai M, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 2013; 45: 407-413.
- 8) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S. An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 9) Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 23): 5391-5399.
- 10) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 2013; 4: 2.
- 11) 阿久津英憲, 小野寺成実, 梅澤明弘: 「ヒト ES/iPS 細胞と生殖補助医療」, 産科と婦人科, 診断と治療社: 2014.
- 12) 阿久津英憲: 挑戦する人これが私の医きる道 (第3回) 阿久津英憲, レジデントノート, 2014; 15(18).
- 13) 阿久津英憲, 川崎友之, 梅澤明弘: 第3章 「ES/iPS細胞の培養法」, The Frontiers in Life Sciences 幹細胞研究と再生医療, 中内啓光 (編集) 南山堂: 35-41, 2013.
- 14) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 「ES細胞-その基礎と臨床応用に向けた展望-」 整形・災害外科 (再生医療の現況と最前線), 56(5):501-506, 2013.

3. 学会発表

- 1) Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A: Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster). 11th ISSCR 2013 Annual Meeting, Boston, MA, June 12-15, 2013.
- 2) 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：「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」(口頭) 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5月 10~12日, 2013年

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