

## 多指症軟骨組織由来細胞の同種 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・医療機器部・主任研究官  
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 河毛 知子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員

研究要旨：本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって、すでに自己積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生の有効性が示されてきている。本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、現在、同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、PDCCs は T 細胞の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を認めた。今回の結果から、関節軟骨損傷の治療には自己軟骨細胞だけでなく、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。

### A. 研究目的

関節軟骨再生修復を目指し、自己積層化軟骨細胞シートを用いた臨床研究がすでに、本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって進められてきているが、この技術を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。これまでの経験上、軟骨組織は免疫応答が低いと言われているが、実際に宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はない。

昨年度は、より臨床応用に近い状態での検討を目指し、実際に同種軟骨細胞シートの移植を行えるようになった場合と同様の手順に従って、採取、分離された軟骨細胞から作製されたシートが免疫調節効果を有しているかを検討し、同種積層化軟骨細胞シートは免疫反応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を認めた。

現在のところ同種細胞のソースとして、多指症患者の手術時廃棄組織由来軟骨細胞

を想定している。多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、短期間に多くの積層化シートを作製することが可能であり、魅力的な細胞ソースになると考えられる。しかしながら、同種細胞移植の際、拒絶反応が起こることが懸念される。そこで本年度は、*in vitro* において多指症由来軟骨細胞が同種 T 細胞におよぼす影響を検討したので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞

多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと、国立成育医療研究センターで多指症手術時に得られた 3 例の軟骨組織から単離された細胞を使用した。(以下、PDCC1, PDCC2, PDCC3 と記す。) ヒト抹消血由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>TC) および正常ヒト樹状細胞 (NHDC) は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入した。

## 2. 各種細胞の培養

全ての培養は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 下で行った。PDCCs は DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社)、4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou 社) を加えたもので培養した。実験に使用する際は、血清濃度を 10% に減らした培地に交換した。

NHDC は LGM-3<sup>TM</sup> (Lonza 社) にインターロイキン-4 (IL-4) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) をそれぞれ最終濃度 50 ng/ml になるように添加した培地に懸濁し、温度応答性培養皿である UpCell<sup>B</sup> に播種して 1~3 日培養した後、室温で 30 分以上放置して UpCell<sup>B</sup> から剥がし、必要数播種した。

CD4<sup>+</sup>TC は反応当日に細胞融解後、LGM-3<sup>TM</sup> に再懸濁して、必要数播種した。

## 3. 混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 ウェルに NHDC (3 x 10<sup>4</sup> cells) と CD4<sup>+</sup>TC (2 x 10<sup>5</sup> cells) を播種し共培養した。

## 4. CD4<sup>+</sup>TC と PDCCs との共培養

PDCCs (2 x 10<sup>4</sup> cells) が播種された各ウェルに CD4<sup>+</sup>TC (4 x 10<sup>5</sup> cells) を撒き、共培養した。

## 5. MLR と PDCCs の共培養

PDCCs (2 x 10<sup>4</sup> cells) が播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養し

た。

## 6. 細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-deoxyuridine 化学発光キット (Roche 社) を用いて測定した。培養 5 日目に各ウェルに BrdU を加え 6~8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BrdU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

## 7. TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β の生理活性抑制

培養開始日の上清に 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) もしくは 5 µg/ml IgG 1 isotype control (Clone No. 11711; R&D System 社) を添加した。

## 8. TGF-β の測定

培養 5 日目の上清中の TGF-β の量は Quantikine<sup>B</sup> ELISA Human TGF-β1 (R&D System 社) を用いて測定した。同一条件を 3 ウェル測定し、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

## 9. 倫理面への配慮

研究に用いた PDCCs は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHDC および CD4<sup>+</sup>TC は LONZA 社より購入しているこ

とから、倫理面の問題はないと考えられる。

### C. 結果

#### 1. PDCCs が同種 CD4<sup>+</sup>TC におよぼす影響の検討

細胞増殖解析の結果、陽性コントロールである MLR の T 細胞増殖活性を 100%とした場合、PDCC1 で 3.5%、PDCC2 で 11.8%、PDCC3 で 8.9%の増殖活性しか観察されなかった。（図 1）

#### 2. PDCCs が MLR におよぼす影響の検討

MLR の写真では T 細胞の大きな芽球形形成が観察されているのに対して、MLR と PDCCs を共培養した写真では小さな芽球形形成しか観察されなかった。（図 2-A）一方、細胞増殖解析ではコントロールの MLR での T 細胞増殖活性を 100%とした場合、その増殖活性は PDCC1 で 21%、PDCC2 で 33%、PDCC3 で 20%になっていた。（図 2-B）

#### 3. 培養上清中の TGF-β1 量

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。昨年度、積層化軟骨細胞シートにおいて TGF-β1 が高発現していることを報告している。そこで PDCC1 の抑制効果にも TGF-β1 の関与が考えられたことから、培養上清中の TGF-β1 を測定した。（図 3）その結果、PDCC1 で 2383 pg/ml、PDCC2 で 1710 pg/ml、PDCC3 で 1980 pg/ml と非常に高

い TGF-β1 の発現がみられた。

#### 4. 接触培養条件における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF-β1 の影響についての検討

PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への TGF-β1 の関与を検証するため、MLR と PDCCs の共培養系に TGF-β 中和抗体を添加し、培養上清中の TGF-β1 の生物活性をベースレベルまで減少させた。TGF-β 中和抗体の添加有り、無しの間で T 細胞増殖活性を比較したところ、有意な差は見られなかった。（図 4）

### D. 考察

本研究は、同種細胞を用いた積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞が免疫系に与える影響を *in vitro* で検討している。同種軟骨細胞の使用が可能になれば、レディメイドの細胞シートを作製することができ、患者の負担軽減および、より計画的な移植が行える上、細胞の品質や種々の情報を予め知ることができる利点がある。これまでの研究で、マウス軟骨細胞および成人関節軟骨細胞とその積層化シートが同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の細胞増殖も抑制することを明らかにしてきている。そこで今年度は、現在同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞におよぼす影響を *in vitro* で検討した。まず、CD4<sup>+</sup>TC に対する PDCCs の影響をみたところ、陽性コントロ

ールである MLR の T 細胞増殖活性に対して PDCCs と共培養した T 細胞増殖活性は、個体差はみられたが、平均 8.1 % と非常に低かった。(図 1) このことは PDCCs が同種 T 細胞の活性化(細胞増殖)をほとんど誘発しないことを示唆している。また、PDCCs が活性化 T 細胞に与える影響を検討したところ、PDCCs が活性化 T 細胞の増殖を抑制できることが分かった。(図 2) 以上のことより、PDCCs も成人関節軟骨細胞と同様に免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することを示唆している。

成人関節軟骨細胞を用いた先行実験から、T 細胞増殖抑制効果には、1: 液性因子(その候補の一つとして TGF- $\beta$ 1) と、2: 細胞間接触の両方が関与していることを示唆する結果を得ている。(厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 H23 年度: 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究および H24 年度: 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現の報告書の加藤分担の項参照)そこで、PDCCs 培養上清中の TGF- $\beta$ 1 量を測定した結果、PDCCs においても高発現していることが分かった。(図 3) このことより、PDCCs による同種 T 細胞の活性化抑制に TGF- $\beta$ 1 が関与することが推測されたが、実際に TGF- $\beta$ 1 が関わっているか、TGF- $\beta$  中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- $\beta$ 1 の生物活性をベースレベルまで減少させ検討した。その結果、接触培養条件下においては、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果を減弱させる

ことはなかった。(図 4) このことは、MLR と PDCCs が接触する培養条件下では、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への TGF- $\beta$ 1 の寄与が低いことを示唆している。

我々は、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を見据えた場合の細胞ソースとして、現在のところ、多指症軟骨組織由来細胞(PDCCs)を想定している。PDCCs は 1: 手術時廃棄組織から単離できる、2: 優れた増殖性を有し、一検体から複数人分の積層化シートを作製することが可能である、といったことなどから、魅力的な細胞ソースになると考えられる。

今後、PDCCs の有用性を確実なものにするために、1: 検体数を増やした再現性の確認、2: PDCCs 抑制効果の一部分に TGF- $\beta$ 1 の関与があるかの再検証; 今回は MLR と PDCCs が接触する培養条件下で検討していたので、トランスウェルなどを用いて、MLR と PDCCs を物理的に離し(非接触培養条件)、液性因子のみ行き来できる条件下で、抗 TGF- $\beta$  抗体を添加することで、PDCCs による抑制効果が相殺されるかの検証などを行う予定である。

#### E. 結語

PDCCs は免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することから、同種積層化軟骨細胞シート移植の際の細胞ソースとして PDCCs を利用出来ることが示唆された。

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.学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A. Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
- 2) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響」. 第 27 回日本軟骨代謝学会 (京都, 2014.2)
- 3) 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
- 4) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
- 5) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾. 「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)

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

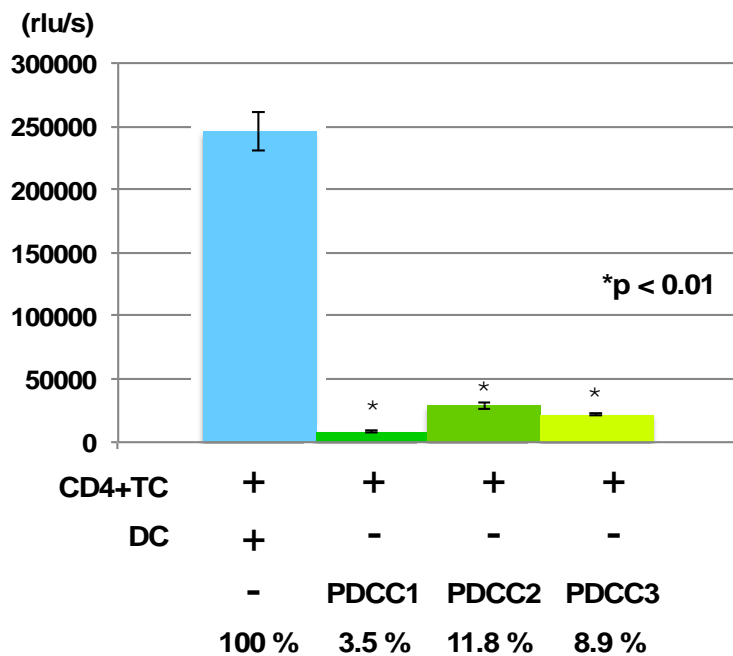


図1：多指症軟骨組織由来細胞が同種 T 細胞におよぼす影響

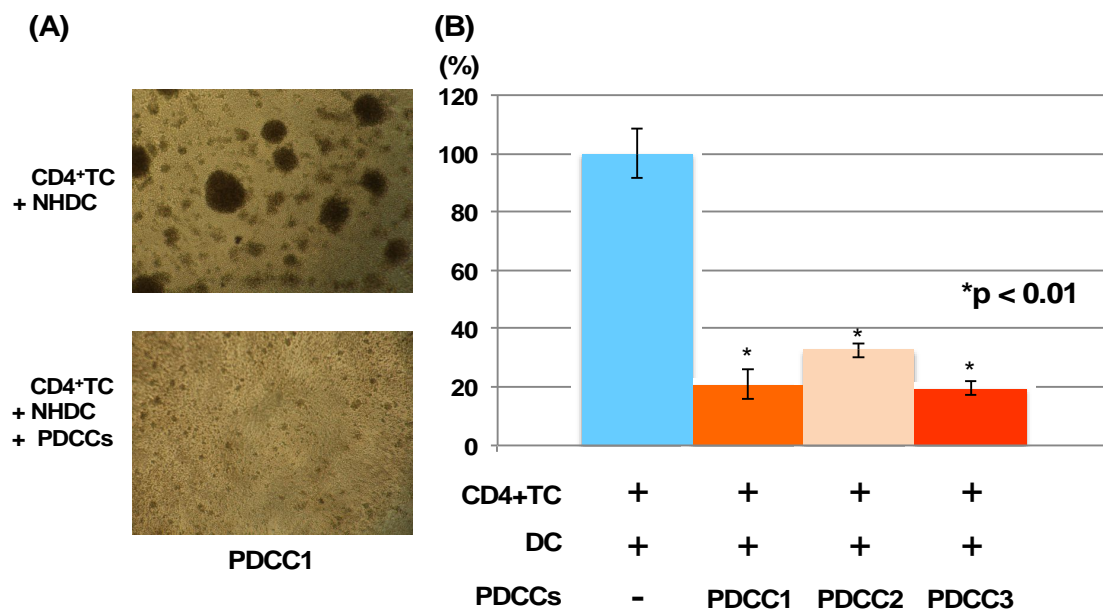


図2：多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞の増殖におよぼす影響

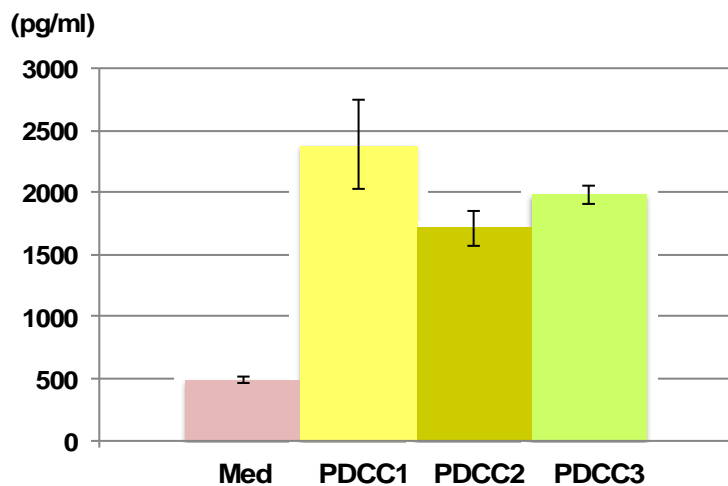


図3:培養上清中の TGF-β1 量

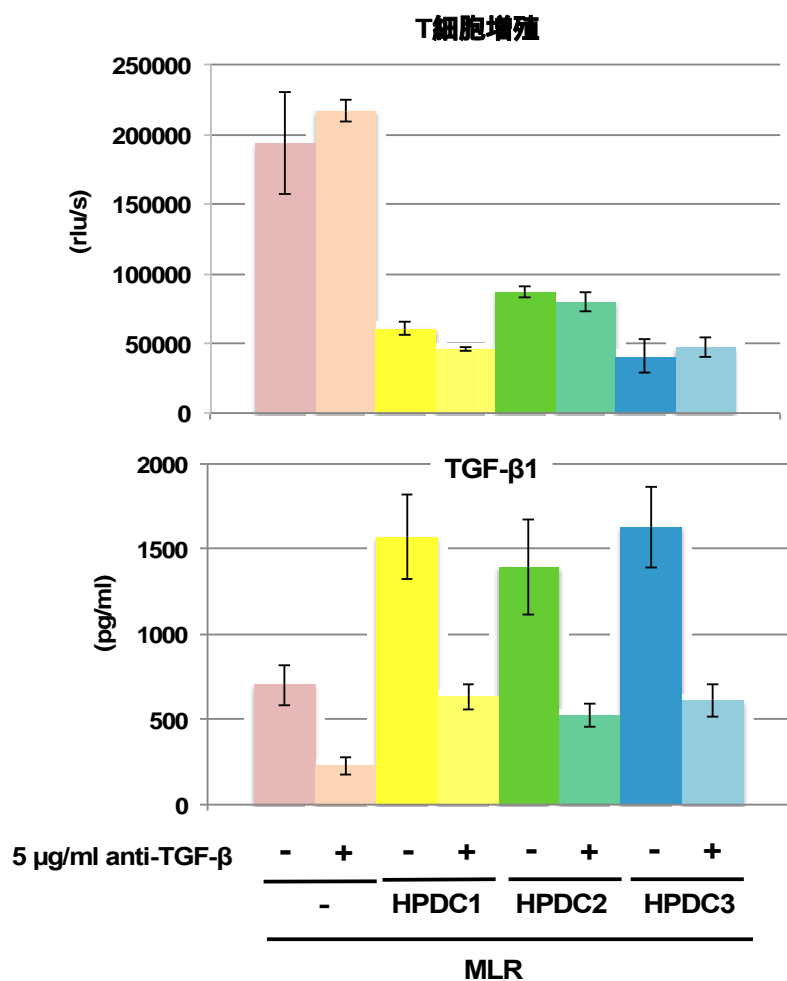


図4:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF-β1 の関与