

細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による経時的評価 に関する研究

研究協力者 竹内 護 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・教授
研究協力者 村井 邦彦 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・非常勤講師
研究協力者 高久 裕子 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・大学院生

研究要旨：東海大学で開発された軟骨細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うため、BLI (Bioluminescence Imaging)法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートの最適な評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定した。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用シート群の3群とも21ヶ月以上の発光を確認した。実験経過中の移植細胞からの発光は移植右膝に留まり他に移動しないことを確認し、細胞シートの安全性を実証した。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人教授らによって開発された細胞シートの移植後に動物を生かしたまま経時的にグラフトの動態を評価するために、経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、動物モデルにおける BLI (Bioluminescence Imaging)法による評価系を決定し、細胞シート膝関節移植後の滞在時間を測定することを目的とした。同時に、細胞シートは軟骨細胞と滑膜細胞の共培養による臨床応用を目指している。軟骨細胞シートと滑膜細胞シート単体移植と両シートを併用した移植の結果、細胞シート滞在期間に差が生じるかについて比較検討を試みた。我々は次の2つの仮説を立てた。

1. 軟骨細胞、滑膜細胞からなる細胞シートは移植部位にとどまりレシピエント自身の

軟骨再生を促しながら減り続けて短期に消失する。

2. 関節内環境に似せた滑膜細胞シートと軟骨細胞シートの併用移植は、それぞれの単独細胞シートより長期に生存して自己軟骨細胞の組織修復効果を高める。

本研究の主目的は以下の3つである。

1. ラット膝関節同種移植後の細胞シートの生存期間を BLI を用いて確認する。
2. 移植細胞生存期間について軟骨細胞シート単独移植、軟骨シート滑膜シート併用移植、滑膜細胞シート単独移植を比較する。
3. 細胞シート移植後の移植細胞の生体内遊走の有無を BLI から確認する。

近年 BLI 法による移植細胞の in vivo 追跡が盛んに報告されるようになったが、中でもホタルの発光遺伝子ルシフェラーゼ (*Luc*) が最も頻用されている。発光基質ルシフェリンとの反応による発光を高感度

CCD カメラで捕捉し、イメージ化することで実験動物を殺すことなく移植細胞の長期追跡が可能である。また、光子(フォトン)を単位とした発光強度は細胞数およびルシフェリン量に比例することが一般に知られている。移植細胞の追跡を行なうことを主目的とした他、以下を副目的とした。

1. 細胞シート移植後の細胞数推移を発光強度の変化から考察する。
2. ラットにおける細胞シート移植後の軟骨全層欠損における修復効果を組織学的に確認する。

B. 研究方法

全ての動物実験は自治医科大学実験動物委員会および関連する委員会のガイドライン勧告に従って行なった。

1. 研究チームの構成

東海大学においては研究統括者の佐藤正人らが自治医科大学から提供された Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats 由来の組織より細胞シートを作製し、自治医科大学にて大腿骨膝関節面に骨軟骨欠損を作製した野生型 Lewis rats に同種移植を行った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（竹内護教授）らが Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats より採取した細胞シートの材料を提供した。

2. 細胞シートの作製・移植

自治医科大学において先端医療技術開発センター先端治療開発部門（小林英司教授）

より同部門で開発した 16 週令のルシフェラーゼ Tg Lewis Rats の提供を受け、ラットを犠牲死して膝関節および股関節より軟骨・滑膜組織を採取し、東海大学にて酵素処理後に発光するルシフェラーゼ発現細胞シートを作製した。温度応答性培養皿 UpCell を用いて 6 ウェルプレートにて軟骨・滑膜細胞シートを作製した。これらは移植に用いることのできる品質であり、ルシフェリンを加えることで全てのシートが発光することを IVIS によるイメージングで確認した（図 1）。

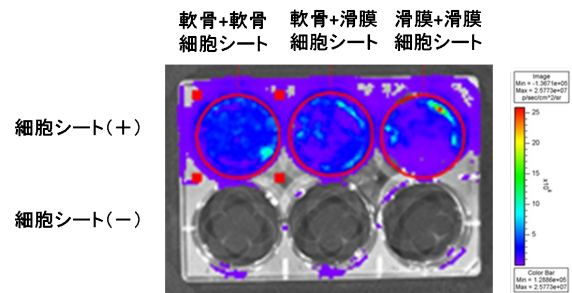


図 1. 細胞シートを置いたシャーレ上にルシフェリンを添加した後の IVIS の画像
左から軟骨細胞シート、軟骨滑膜併用細胞シート、滑膜細胞シートからの発光が青くイメージ化されている。

自治医大において 16 週令の野生型 Lewis rats スラット 36 匹(オス)をレシピエントとし、2%イソフルラン麻酔下で右膝に正中傍膝蓋骨切開を行い、膝蓋骨を脇に処理した。展開された膝関節の右膝大腿骨膝蓋面を充分に露出した後に、骨髓から間葉系幹細胞が動員されても自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を 18G 針を用いて作製 (φ ; 3

mm)した。そのうえで同部位に16週齢のルシフェラーゼトランスジェニックラット（オス）由来の軟骨組織および滑膜組織から作製したルシフェラーゼ発現軟骨細胞シートと滑膜細胞シートを同種移植した（図2）。軟骨細胞と滑膜細胞単独シートと両細胞併用シートの生存期間に対する相乗効果を見るために、ルシフェラーゼ発現軟骨細胞シート(AC)とルシフェラーゼ発現滑膜細胞(SY)シートの2種類を作製した。それらを組み合わせて軟骨細胞シート単独群(AC-AC群)と滑膜細胞(SY-SY群)シート単独群、両シート併用群(AC-SY群)の3群を作製した(各 $n = 12$)。各種細胞シートの膝関節内滞在期間の影響について比較検討を試みた。

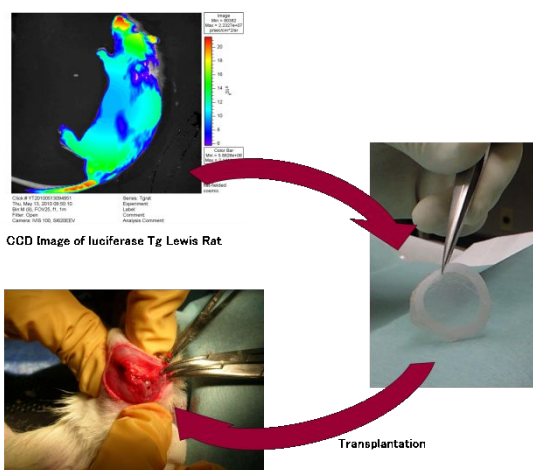


図2. ルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞シートの移植手順

それぞれ、ルシフェラーゼトランスジェニックラットのイメージング画像（左上）作製したルシフェラーゼを発現する細胞シート（右）野生型リスラットに作製した骨軟骨欠損（左下）を示す。

3. BLI法による評価方法、ルシフェリン投与方法の検討

D-ルシフェリン（Biosynth AG、Staad、Switzerland）150 mg/kg を肩甲骨下より皮下投与後、CCDカメラを搭載したIVIS(Xenogen Corp; Alameda、CA)でイメージングを確認した。イメージングの際にはもっとも強いルシフェラーゼ発光強度を測定することにした。次いで、ルシフェリンの投与方法を検討した。ルシフェラーゼ陽性軟骨細胞シート移植後1ヶ月目のリスラット1匹を試験的に用いた。3種類の方法でルシフェリンの投与方法を比較検討した。飽和濃度に近い50 mg/mlの濃度のルシフェリン溶液を蒸留水で作製した。イソフルラン麻酔下に投与した。ルシフェリンの投与経路と投与量は、陰茎静脈から静脈注射(IV)60 mg/kg、肩甲骨付近から皮下注射投与(SC)150 mg/kg、および移植膝間隙から膝関節内注射(IA)30 mg/kgとした。ルシフェリン投与後のラットをIVISの高感度CCDカメラを搭載した小動物用チャンバーに静置した。そのうえで1分毎に放出される光子量から発光強度を計測した。発光強度の経時的変化を図3に示す。ルシフェリン投与方法に従って異なる発光強度曲線となることが判明した。

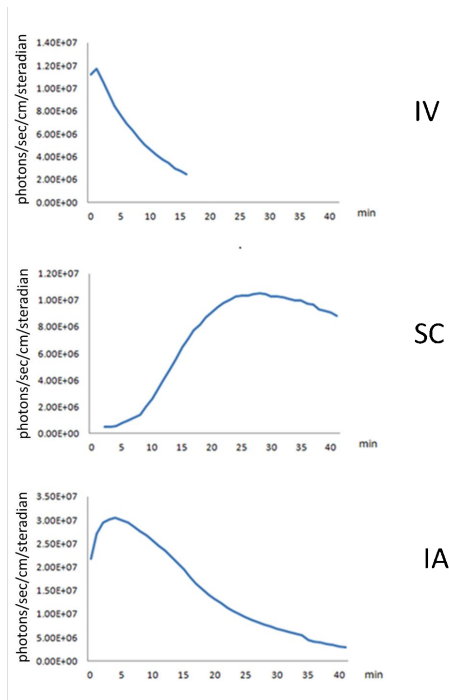


図 3. IVIS によって測定した異なる投与方法の発光強度の経時的変化
上から順に静脈注射 (IV) 投与方法、皮下注射 (SC) 投与方法、関節内注射 (IA) を示す。

IV では発光強度の最高値は 1~2 分で達し、その後急速に低下した。そのため発光強度の計測を開始する前にピーク値の計測を逃すことがあった。また陰茎静脈からの投与は技術を必要とした。一度失敗すると大きな皮下出血をきたすため再投与は困難となった。SC では緩やかに発光強度は上昇した。発光強度は 20~30 分後に最高値に達して緩やかに低下した。薬液投与は難しい手技を必要としなかった。ただし、同じ発光強度を得るのに IV 投与方法に比べて 2 倍以上のルシフェリンが必要であり、3 種の投与方法のなかで最も多くのルシフェリ

ンを必要とした。IA では発光強度は 4~5 分で最高値に達した。手技は静脈注射に比較して簡易であったが投与に失敗することがあった。この方法は血流を介せず直接ルシフェリンが移植細胞に作用するために最少量のルシフェリンによる最大の発光強度を確認することができた。しかしながら、薬液の投与量は 0.2 ml 程度であったが、ラットの膝関節包は過膨張した。このことは膝関節圧の上昇の原因となり、移植細胞や骨軟骨欠損部の再生に何らかの影響を与えることが懸念された。以上の予備実験から、皮下注射(SC) が一番簡易であり、手技によるバイアスが生じる危険性が小さいと判断した。また IA と比べて移植部位への影響は少ないと判断し、ルシフェリンの投与は皮下注射で行った。

4. 組織学的評価

前述した右膝に骨軟骨欠損を作製し細胞シートを同種移植した 36 匹のレシピエントルイスラットの中から 24 匹を用いた。AC-AC 群(n=8)、AC-SY 群(n=8)、SY-SY 群(n=8)から、移植後 2、4、6、8 週に各群 2 匹ずつ CO₂ 吸入にて安楽死させた。それらの移植膝の骨軟骨欠損部の標本作製した。組織検体は 4%パラホルムアルデヒドで 1 週間固定したのち、3 週間 10% EDTA で脱灰した。パラフィン包埋したのち骨軟骨欠損部の中央部分で 5 μ m 厚の薄切り標本作製した。各切片は再生軟骨の評価のためサフラニン O 染色を施した後に光学顕微鏡で観察した。この染色法は硝子軟骨細

胞外基質の構成要素であるグルコサミノグリカンを含む酸性粘液多糖に反応した部分が赤く染色され、軟骨基質が線維化すると染色されない。再生の評価は International Cartilage Research Society (ICRS) histological grading system を用いて点数化による評価を行った（表1）。この方法は国際軟骨再生会議が提唱している。骨軟骨欠損部の再生所見を硝子軟骨組織の有無、組織統合性、表層組織の性状、軟骨下骨といった組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。評価は2名の観察者で行った。点数は平均値をグラフ化した。

<p>再生組織の形態</p> <p>4: 大部分が硝子軟骨 3: 大部分が線維軟骨 2: 軟骨組織ではない 1: 軟骨組織以外</p> <p>軟骨基質染色</p> <p>1: 無染 2: わずかに染まる 3: 中等度染まる 4: 強く染まる</p> <p>細胞形態の組織統合性</p> <p>1: 網様像 2: 裂隙や途絶 3: 軟骨細胞の構成ではない 4: 柱状軟骨細胞を認める 5: 正常またはそれに近い軟骨細胞</p> <p>軟骨細胞のクラスター形成</p> <p>1: 細胞のクラスター形成が25-100% 2: 25%以下のクラスター形成 3: クラスター形成を認めない</p>	<p>Tidemark の形成</p> <p>1: 石灰化軟骨層の形成が25%以下 2: 石灰化軟骨層の形成が25%-49% 3: 石灰化軟骨層の形成が50%-75% 4: 石灰化軟骨層の形成が76%-90% 5: 完全な石灰化軟骨層の形成</p> <p>軟骨下骨の形成</p> <p>1: 形成されない 2: わずかに形成されている 3: しっかり形成されている</p> <p>表層の構造</p> <p>1: 強度の線維化または途絶 2: 中等度の線維化、非整合性 3: 低度の線維化、非整合性 4: 正常</p> <p>組織学的欠損部充填率</p> <p>1: 25%以下 2: 26-50% 3: 51-75% 4: 76-90% 5: 91-100%</p>	<p>移植部断面の性状</p> <p>1: 結合していない 2: 骨髄か関節の一部 3: 両側の結合</p> <p>基底部の統合性</p> <p>1: 50%以下 2: 50-70% 3: 71-90% 4: 91-100%</p> <p>炎症反応</p> <p>1: 炎症所見を認めない 2: わずかに炎症反応を認める 5: 強い炎症反応を認める</p>
--	--	--

計45点

表 1. ICRS histological grading system

軟骨組織の再生所見について組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。

C. 結果

1. 細胞シートの関節内滞在時間

BLI から移植細胞由来と推察する細胞の21ヶ月以上生存を全てのラットにおいて

確認した。イメージングでは発光は移植膝に局限して他所での発光は認めなかった。また明らかな運動機能異常も観察されなかった（図4）。

これ以上の計測は、おそらく寿命と思われるラットの死亡が続いたため中止した。

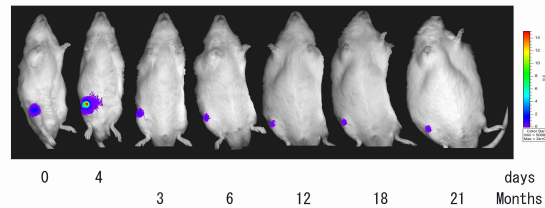


図 4 . 右膝から検出されたルシフェラーゼ発光の CCD 画像の経時的変化

図は AC-AC 群のうちの1匹のイメージングを経時的にしめす。ルシフェラーゼの発光を右膝部に局限して認める。

2. 軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、両細胞シート併用移植による滞在期間の差の検討

発光強度の推移は各群とも移植後 3~4 日後にピーク値に達した。移植 0 日の発光強度に比べて AC-AC 群で 16 倍、AC-SY 群で 5 倍、SY-SY 群で 7 倍に達した。発光強度は暫時減少して 3~4 週間後には 3 群とも移植 0 日の発光強度の 1/10 程度の値になって安定した。これは言い換えると各群においてピーク時の発光強度から 1/160、1/50、1/70 以下に減少したことになる。しかし発光は微弱ながらも消失することはなく 21 ヶ月以上計測された（図 5 上図）。発光強度の群間差は移植後 1 ヶ月までは 3 群間にばらつきを認める傾向があっ

たが、それ以降の長期の経過では各群とも同程度の変化率で推移した（図5下図）。

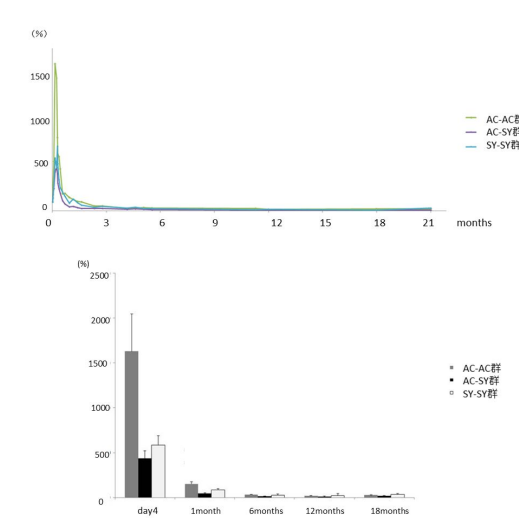


図5. 長期にわたる発光強度変化の推移
 移植0日（day0）の発光強度比を100とした場合の発光強度の推移を示す。

上図：発光強度曲線の推移、各群とも移植後3-4日のピーク値に達した後に低値で安定した発光強度を示すようになった。しかし21ヶ月間発光は途切れることはなかった。下図：ある地点の発光強度比の各群の値を抽出してグラフ化した。各群とも半年以降は初期の1/10以下に安定した。

3. 組織所見

組織所見では3群ともに軟骨細胞の再生所見を認めた。6週目まではAC-AC群、SY-SY群で軟骨基質の赤染がAC-SY群よりも著明であるが、8週目にはAC-SY群の赤染が長く続く印象をうけた。SY-SY群では移植後8週の顕鏡所見において線維化の所見を強く認めた（図6）。ICRS grading systemの点数はAC-AC群での値が他の群

よりも高かった。8週目の時点でAC-AC群とSY-SY群は値の低下を認めたが、AC-SY群のスコアは6週目から横ばいを示した（図7）。

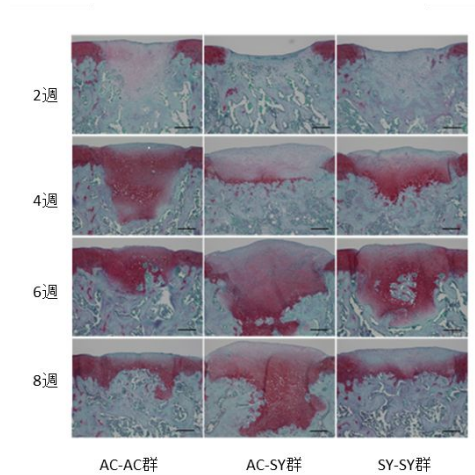


図6. 軟骨組織修復の組織学的評価。サフランインO染色した標本の光学顕微鏡画像。軟骨細胞が産生するグリコサミノグリカンを含む産生粘液多糖が赤く染色されている。スケールバーは500μmを表す。

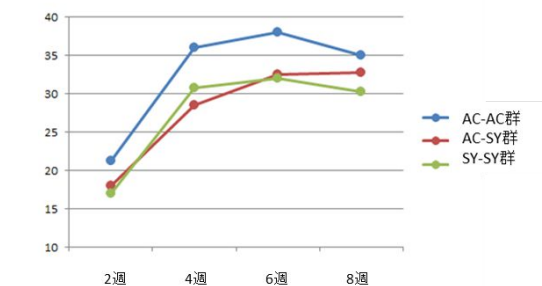


図7. ICRS grading systemによる点数の変化

AC-SY群の値が8週目の地点でも低下を認めていない。

D. 考察

今回の研究で予想以上の細胞シートの長

期生存を BLI を用いて確認することに成功した。また移植した軟骨細胞シートは 21 ヶ月以上膝関節内で生存することを確認した。さらに BLI 画像から移植した細胞が他所に移動しないで膝に留まることが確認できた。これは細胞シートの安全性を証明する結果であったと考えられる。細胞シートは軟骨組織の修復および再生の誘導因子として働いてシートを移植後に移植部周囲の宿主細胞による主導的な修復が行なわれると考えている。その後、細胞シート由来の細胞自身は移植後に消失すると考えていた。成熟した細胞からなる軟骨細胞シートの細胞はそのままの形で生存することは考えにくく、例えば脱分化した形で存在する可能性も考えられる。軟骨組織におけるニッチ環境についてまだ不明の部分が多いためこれらの機序解明は今後の課題である。次に生存期間に関する軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用効果について調べた。細胞シートにおける軟骨細胞と滑膜細胞の併用は、軟骨下骨の再生や再生軟骨細胞の構築において軟骨細胞単独シートより優れた効果があることを実証している。これらの先行研究を参考として生存期間においても軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用が単独細胞シート移植よりも長い細胞の生存期間が記録されると仮説をたてた。しかしながら 3 群とも 21 ヶ月以上の長期生存することを確認したため、生存期間に関して軟骨細胞シートと滑膜細胞を併用する効果は今回の研究では明らかではなかった。

BLI で計測される発光強度の変化を記録

したが、3 群とも移植時より 3~4 日目に最高の発光強度を記録し、その後、AC-AC 群、AC-SY 群、SY-SY 群の発光強度はそれぞれピーク 時の 1/160、1/50、1/70 まで低下して経過した。この現象について考察する。In vitro では同量のルシフェリンを同一種のルシフェラーゼ導入細胞に投与するとその発光強度は細胞数にほぼ比例することが一般的に知られている。即ち半定量的に BLI の発光強度を利用して細胞数を推測することが可能である。今回の In vivo の実験では術後数日の移植直後の細胞を取り巻く環境が一定ではなく厳密な細胞数の比較はできない。移植部周囲の環境は移植後に大きな変化が生じるとともに、移植術を施行する時には移植細胞には大きなストレスがかかる。そのため移植された細胞の周術期の生体活性の変化の程度については不明である。つまり今回の発光強度曲線の変化の 1 つの説明としては、移植時はストレスによって移植細胞の生体活性が低いため計測される発光強度は低くなり、経過とともに移植細胞の生体活性は回復して発光強度も高値をしめすと考えられる。その後、移植時より細胞シートの細胞は死滅していくため経過とともに移植時に比べてごくわずかな細胞シートの細胞が移植部位に生存したのではないかと考える。今回の実験でこの発光強度は微弱ではあるが 21 ヶ月以上途切れることなく続くことが証明された。これ以降はおそらく寿命によるレシピエントラットの死亡が相次いだため計測を中止しており、より長期の変化は不明であるが、

細胞シートは移植後生涯にわたって移植部位にわずかにせよ生存しうることが示唆された。実際の移植細胞の同定、およびその形態の確認は今後の研究課題となる。軟骨細胞シートは再生した軟骨組織が時間の経過によって線維軟骨に置き換わることなく、完全に硝子軟骨の状態が保たれる状態を目指して開発されている。今回の組織所見ではSY-SY群の組織像で線維軟骨の再生所見が著明であった。このことは他種の動物実験の成果と一致した。

E. 結論

BLI の手法を用いて、ラット膝関節における大腿骨軟骨全層欠損モデルに対する細胞シートの同種膝関節移植後に移植細胞シート細胞が長期生存することを確認した。本研究期間において移植細胞は追跡中に膝関節から他臓器の移動を認めなかったことから細胞シート移植後の安全性を確認した。以上をまとめ 2014 年 2 月号の Biomaterials 誌上で報告した。

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. 著書

なし

2. 論文発表

1) Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E,

Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, Sato M. In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint. Biomaterials, 2014 Feb;35(7):2199-2206.

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