

た。

保存後のシートは、38℃に加温したウォームプレート上に静置することで融解した。ピンセットを用いて細胞シートをパッケージから回収し、1M、0.5M sucrose を含む 20mM HEPES 緩衝 TCM199 (20% bovine calf serum 添加) に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

### 3. ガラス化後の細胞シートの評価

融解後の細胞シートは、形態評価(シート構造の破損の有無)の後、コラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

## 4. 実験内容

### (1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

従来法ではガラス化前の平衡液(ES)およびガラス化液(VS)への浸漬時間(前処理時間)は、それぞれ 25 分および 20 分としていた。本年度は、前処理時間の短縮を検討した。表 1 に示す様に、非積層化細胞シートに対してはそれぞれ 10 分および 10 分、もしくは 10 分および 5 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。2 層化細胞シートに対してはそれぞれ 20 分および 12.5 分、もしくは 12.5 分および 10 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。

### (2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

前処理が終了した細胞シートを、食品用ラップフィルム((株)クレハ、ポリ塩化ビニリデン、10.5μm)もしくはアルミフィルム((株)三菱ア

ルミニウム、アルミ фольド、厚さ 12μm)を用いてパッケージングし、液体窒素蒸気(-150℃)に暴露してガラス化した。

ウサギ軟骨細胞シートが液体窒素液相中での保存に耐え得るかを確認するために、以下の実験を行った。2 層化細胞シートを用いて、従来通りの液体窒素液相中でのガラス化あるいは液体窒素液相中への浸漬を行い融解後のシートの形態維持、細胞生存性を評価した。

### (3) 市販ガラス化保存液の検討

自家作製液と同組成の市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)を使用し、その有効性の確認を行った。

### (4) 長期保存後の細胞シートの評価

ガラス化細胞シートを、液体窒素タンク中(気相、-150℃)で 2 週間~1 か月間保存し、融解後の形態維持ならびに細胞生存性を評価した。

## C. 結果

### (1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

非積層化シート(計 9 例)において、融解後のシート構造に破損は全く生じることなく(図 1, A-D)、細胞生存性も高く保たれていた(89.5%)。この成績は、非ガラス化対照区(95.5%)と比較しても同等であった。また、非積層化シートでは、ガラス化前の前処理時間を従来の 45 分から 15 分に大幅に短縮しても、シート(無傷での回収率: 100%)、細胞生存性(87.8%)ともに良好に保たれることが分かった。積層化シート(2 層, 計 13 例)を従来法でガラス化した結果、融解後のシート構造に破損は全く生じるこ

となく(図1, E-H)、細胞生存性も高く保たれていた(86.1%)。ガラス化前の前処理時間を32.5分に短縮しても、同等の成績は保たれていた。しかし、前処理時間を大幅に短縮した場合(ES 12.5分/VS 10分処理)には、7例中2例において融解時に氷晶形成が生じた(表1)。

#### (2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

ラップフィルムによりパッケージングされた細胞シートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中で保存した場合、5例中1例のシートに破損が生じた(図2-A)。

パッケージングにアルミフィルムを用いた場合、液体窒素ガス気相中でガラス化する従来法では、融解後のシート構造の破損は全く生じることなく、細胞生存性は85.0%であった。この成績は、非ガラス化試料(85.8%)に匹敵するものであった。アルミフィルムでパッケージングされたシートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中に浸漬した場合も、シートの破損は生じず、また細胞の生存性も高く維持された(84.2%)。しかし、アルミフィルムでパッケージングされたシートを液体窒素液相中に浸漬してガラス化した場合は、細胞生存性(82.4%)は高く保たれたものの、シート構造の破損が顕著であった(無傷回収率 0%, 図2-C)。

#### (3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認

市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に有効であることが確認された。融解後のシートの構造

は無傷に保たれており(無傷回収率 100%, 図3-B)、細胞生存性は82.2%であった。この成績は、自家作製液(無傷回収率 100%, 細胞生存性 83.5%)および非ガラス化試料(無傷回収率 100%, 細胞生存性 84.5%)と同等であった。

#### (4) 長期保存後の細胞シートの評価

3層化細胞シートを2週間液体窒素ガス気相中に保存し融解した結果、シート構造の破損は全く生じることなく(無傷回収率 100%, 図4-B)、細胞生存率も83.2%と高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

次に、2層化細胞シートを30日間保存し融解した結果、融解後のシート構造の破損は見られず(無傷回収率 100%, 図5-B)、細胞生存率(79.2%)も高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

### D. 考察

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大試験において、2層化シートの前処理時間を大幅に短縮した際には、融解時に氷晶形成が見られた。積層数の多い細胞シートをガラス化する場合には、凍害保護剤を十分に浸透させるために、ある程度の長さの前処理時間は必要であると考えられる。

(2) アルミフィルムによるパッケージングは、細胞シートのガラス化だけでなく長期保存にも適していると思われる。今後はより長期保存後の検証が必要である。

#### E. 結論

1. 細胞シートの積層数に応じて、凍害保護剤の浸透に要する前処理時間の短縮が可能である。
2. パッケージング素材として、アルミフィルムが有望である。アルミフィルムでパッケージングされた細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約-150℃)、液体窒素液相中(-196℃)いずれの保存状態にも耐える。
3. 市販(予定)ガラス化保存液(バイオベルデ社製)の有効性が検証された。
4. 軟骨細胞シート<sup>1</sup>の長期ガラス化保存が可能である。

#### 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

<招待講演・国内>

1. 長嶋比呂志. 受精卵凍結保存のノウハウは組織・臓器の保存にどこまで応用可能か?. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会, 28-29 Nov 2014; 大阪.

<国内学会>

1. 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞侏, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-2. 第14回日本再生医療学会総会, 19-21 Mar 2015; 横浜.

表1. 非積層および積層化(2層)ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：前処理時間短縮の検討

シート積層数	前処理時間	無傷での回収率 <sup>1</sup>	融解時氷晶形成	細胞生存率 <sup>2</sup>
非積層	ES 25分/VS 20分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.0% (n=3)
	ES 10分/VS 10分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.1% (n=3)
	ES 10分/VS 5分	100% (3/3)	0% (0/3)	87.8% (n=3)
	非ガラス化対照	100% (1/1)	0% (0/1)	95.5% (n=1)
2層	ES 25分/VS 20分	100% (6/6)	0% (0/6)	86.4% (n=6)
	ES 20分/12.5分	100% (7/7)	0% (0/7)	88.5% (n=6)
	ES 12.5分/VS 10分	100% (7/7)	28.6% (2/7)	84.8% (n=7)
	非ガラス化対照	100% (5/5)	0% (0/5)	89.0% (n=5)

ES: 平衡液; VS: ガラス化液; <sup>1,2</sup> 各区間に有意差なし

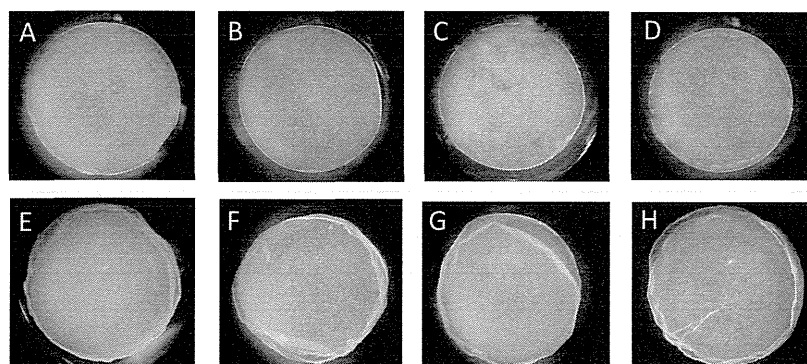


図1. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

A-D. 非積層化細胞シート; E-H. 2層化細胞シート; A. ES25分/VS20分処理区; B. ES 10分/VS 10分処理区; C. ES 10分/VS 5分処理区; D. 非ガラス化対照区; E. ES 25分/VS 20分処理区; F. ES 20分/VS 12.5分処理区; G. ES 12.5分/VS 10分処理区; H. 非ガラス化対照区

表2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：液体窒素液相への浸漬の影響\*

パッケージング素材	ガラス化条件		無傷での回収率	細胞生存率*
	液体窒素気相でガラス化	液体窒素液相に浸漬		
食品用ラップフィルム	+	+	80.0% (4/5)	84.2% (n=5)
	+	-	100% (8/8)	85.0% (n=8)
アルミフィルム	-	+	0.0% (0/2)	82.4% (n=2)
	+	+	100% (2/2)	84.2% (n=2)
非ガラス化対照			100% (8/8)	85.8% (n=8)

\*2層化細胞シートを用いた; \*各区間に有意差なし

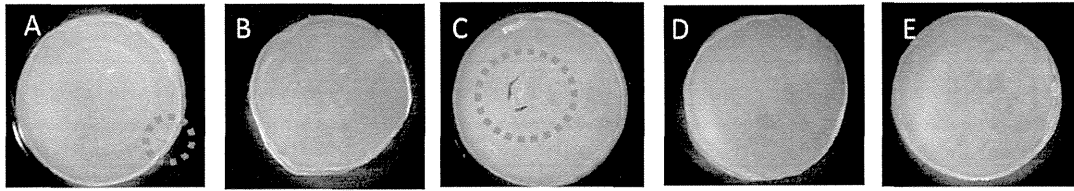


図2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

- A. 食品用ラップフィルムでパッケージングしたシートを、液体窒素蒸気でガラス化後に液体窒素液相中に浸漬した結果、シート構造の破損が見られた(赤丸印)； B. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素気相中でガラス化された細胞シート； C. アルミフィルムでパッケージングした細胞シートを液体窒素中に直接浸漬してガラス化した結果、シート構造の破損が生じた(赤丸印)； D. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素ガス気相中でガラス化後に液体窒素液相中に保存された細胞シート； E. 非ガラス化対照区

表3. 市販予定(バイオベルデ社製)ガラス化液の有効性の確認※

ガラス化液	無傷での回収率	細胞生存率
自家(明治大学)製	100% (7/7)	83.5% (n=7) <sup>ab</sup>
バイオベルデ社製	100% (9/9)	82.2% (n=9) <sup>a</sup>
非ガラス化対照	100% (5/5)	84.5% (n=5) <sup>b</sup>

※2層化細胞シートを用いた； <sup>a,b</sup>異符号間に有意差あり(p>0.05)

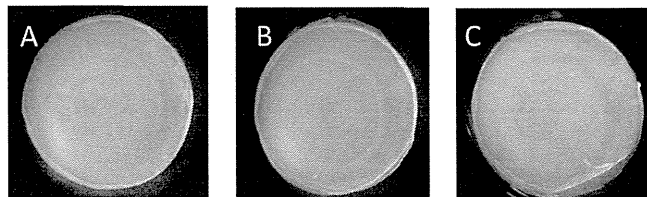


図3. ガラス化および融解後のウサギ軟骨細胞シートの形態

- A. 自家(明治大学)製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート； B. バイオベルデ社製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート； C. 非ガラス化対照区

表 4. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：3層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率
ガラス化区	0日間*	100% (1/1)	83.4% (n=1)
ガラス化保存区	2週間	100% (2/2)	83.2% (n=2)
非ガラス化対照区	-	100% (1/1)	84.1% (n=1)

\*ガラス化直後に融解した

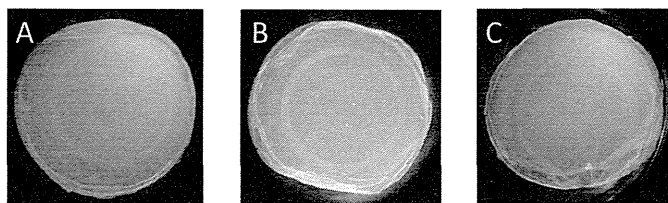


図 4. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(3層化細胞シートを2週間保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 2週間保存； C. 非ガラス化対照

表 5. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：2層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率*
ガラス化区	0日間*	100% (3/3)	78.0% (n=3)
ガラス化保存	30日間	100% (3/3)	79.2% (n=3)
非ガラス化対照区	-	100% (2/2)	82.2% (n=2)

\*ガラス化直後に融解した； \*各区間に有意差なし

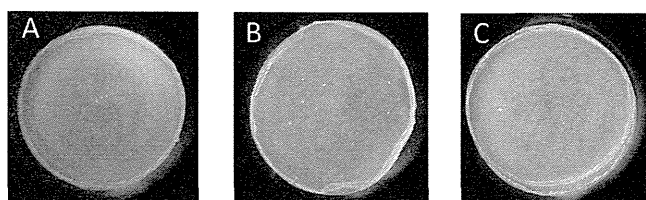


図 5. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(2層化細胞シートを1ヶ月保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 1ヶ月保存； C. 非ガラス化対照

## 軟骨細胞の同種 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

研究要旨：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、同種軟骨細胞の免疫細胞に対する反応性について検討してきている。昨年度、同種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、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示した。今年度は *in vitro* の接触培養条件下において、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果への PGE2 および TGF- $\beta$ 1 の影響を検討した。その結果、接触培養条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- $\beta$ 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。また、NHACs と共培養された MLR 中の CD4<sup>+</sup>T 細胞がどのようなサブセットになっているか検討したところ、IL-2 および TNF- $\alpha$  といった Th1 細胞タイプサイトカインは、軟骨細胞と共培養することで有意に減少しており、IL-4 や IL-17 といった Th2 細胞、Th17 細胞タイプのサイトカイン量はほとんど産生されていなかった。一方、Treg 細胞が産生する IL-10 は有意に発現量が増えていた。再現性の確認が必要であるが、軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に関与する Treg 細胞が優位になっていることが示唆された。

### 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、既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おり、その関節軟骨修復再生の有効性が示されてきているが、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。しかし実際に宿主内で、同種軟骨細胞が、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がなかったことから、我々はこれまでに同種軟骨細胞の T 細胞におよぼす影響について検討してきている。

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 (PDCCs)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。昨年度は、*in vitro*において PDCCs が同種 T 細胞におよぼす影響を検討し、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を明らかにし、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 を利用出来る可能性を示した。また、軟骨細胞による免疫調節効果のメカニズムの解明をめざして、軟骨細胞で高発現している TGF- $\beta$ 1 に着目し、PDCCs による T 細胞増殖抑制効果への影響を検討したところ、接触培養条件下では、中和抗体で TGF- $\beta$ 1 の生理活性を減弱させても、抑制効果に影響がないことを示した。そこで今年度は、積層化軟骨細胞で高い発現がみられている PEG2 の PDCCs による T 細胞増殖抑

制に対する影響を検討した。さらに、軟骨細胞が CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化にどのような影響を与えるかを、各 T 細胞サブセットに特徴的なサイトカイン量を測定し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。) 正常ヒト関節軟骨細胞-膝(NHAC-kn 以下 NHACs)、ヒト抹消血由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>TCs)および正常ヒト樹状細胞(NHDCs)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。

NHACs は、Chondrocyte Basal Medium (CBM) に Supplements and Growth Factors を加えた培地 (CGM) で培養した。

NHDCs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>®</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>®</sup>から剥がし、必要数播種した。

CD4<sup>+</sup>TCs 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 NHDCs (3 x 10<sup>4</sup> cells) と CD4<sup>+</sup>TCs (2 x 10<sup>5</sup> cells)を播種し共培養した。

### 4. MLR と軟骨細胞の共培養

PDCCs (2 x 10<sup>4</sup> cells)もしくは NHACs (2 x 10<sup>4</sup> cells)が予め播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養した。

### 5. Cox2 インヒビターによる PGE2 産生抑制および TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β1 の生理活性抑制

培養開始日の上清に最終濃度 1 µM NS398 (Sigma 社) の Cox2 インヒビターを添加した。PEG2 と TGF-β1 の同時抑制の場合は、最終濃度 1 µM NS398 と最終濃度 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) を併せて添加した。

### 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 3~5 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 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

#### 7. IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL17 の測定

培養上清中の各サイトカインの量は BD™ Cytometric Bead Array (BD Biosciences 社)を用いて測定した。同一条件の培養上清を 3 つ測定し、統計的有意差を Student's T 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

#### 8. TGF- $\beta$ 1 の測定

培養上清中の TGF- $\beta$ 1 の量は Quantikine<sup>®</sup> ELISA Human TGF- $\beta$ 1 (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および東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHACs、CD4<sup>+</sup>TCs および NHDCs 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. 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 PGE2 の影響についての検討

積層化軟骨細胞では PGE2 の発現が高いことから、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への PGE2 の関与を検討するため、MLR と PDCCs の共培養系に PGE2 産生に関するシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox2) の阻害剤である NS398 を添加し、PGE2 の産生を抑えた。NS398 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 1)

##### 2. 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 PGE2 および TGF- $\beta$ 1 の影響についての検討

昨年度、接触培養条件下においては TGF- $\beta$ 1 を単独で抑制しても、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がないことを報告した。また今回 PGE2 を単独抑制しても、同条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果を減弱されることがないことが分かったことから、両者活性を同時に抑えた場合の影響について検討した。その結果、それぞれ単独抑制の場合と同様に、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がみられなかった。(図 2)

##### 3. 軟骨細胞が CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットに与える影響についての検討

今回は NHACs による MLR 中の CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットへの影響を検討し

た。図 3-1 に示す条件で培養した培養上清中の各サイトカインの量を測定した。

### 3-1. Th1 細胞：IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 量の測定

IL-2 および TNF- $\alpha$  は CD4<sup>+</sup>TCs や NHACs のみの培養上清中では、検出限界以下だった。MLR では IL-2 が約 2050 pg/ml、TNF- $\alpha$  が約 380 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では IL-2 が約 1645 pg/ml、TNF- $\alpha$  が約 44 pg/ml と有意に低くなっていた。一方、IFN- $\gamma$  は逆に MLR で約 392 pg/ml であるのに対して、共培養系では約 766 pg/ml と有意に高くなっていた。（図 3-2）

### 3-2. Th2 細胞：IL-4 量の測定

MLR と NHACs の共培養系で約 5.7 pg/ml であったが、それ以外は検出限界(4.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。（図 3-3）

### 3-3. Th17 細胞：IL-17 量の測定

IL-17 は、いずれも検出限界(18.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。

### 3-4. Treg 細胞：IL-10 および TGF- $\beta$ 1 量の測定

IL-10 は MLR で約 11 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では約 45 pg/ml と有意に高くなっていた。一方、TGF- $\beta$ 1 は CD4<sup>+</sup>TCs や MLR の上清中では共に約 100 pg/ml であるのに対して、NHACs と MLR の共培養中では約 340 pg/ml と高発現が見られたが、NHACs 単独と比較して（約 320 pg/ml）有意差がなかった。（図 3-4）

## 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。我々は昨年度までに、マウス軟骨細胞、成人関節軟骨細胞とその積層化シート、および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。さらに昨年度においては、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た（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）ことから、接触培養条件下における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF- $\beta$ 1 の影響について検討したところ、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ても PDCCs の T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがないことを明らかにした。そこで今年度、積層化軟骨細胞で高発現しており、T 細胞増殖に抑制的に働くことが知られている PGE2 の産生抑制および TGF- $\beta$ 1 の生理活性と PGE2 量を同時に減少させることで、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える影響を検討した。その結果、PGE2 を単独で

減少させても、TGF- $\beta$ 1 の生理活性と同時に減少させても、T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがなかった。(図 1, 2) このことから、接触培養条件下においては細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

さらに今年度は NHACs が CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットにどのような影響を与えているか検討した。従来 CD4<sup>+</sup>TCs は、産生するサイトカインの種類によって、Th1 細胞 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) と Th2 細胞 (IL-4, IL-5) に大別されていたが、近年、新たなサブセットとして Th17 細胞 (IL-17, IL-21, IL-22) や制御 T (Treg) 細胞 (IL-10, TGF- $\beta$ ) が分類された。Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞が免疫応答を促進するのに対して、Treg 細胞は免疫応答の抑制に働くことが知られている。これらのうちどのサブセットになるかは CD4<sup>+</sup>TCs が受ける刺激によって決められる。一方、NHACs は TGF- $\beta$ 1 を発現しているが、TGF- $\beta$ 1 は Th17 細胞や Treg 細胞の分化に関わるサイトカインであることから、NHACs との共培養によって MLR 中の CD4<sup>+</sup>TCs が Th17 細胞もしくは Treg 細胞に分化している可能性が高いと考えられた。そこで共培養中の CD4<sup>+</sup>TCs が実際にどのサブセットに分化しているか検討するため、MLR の培養上清と MLR と NHACs の共培養の培養上清中の IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Th1 細胞)、IL4 (Th2 細胞)、IL-17 (Th17 細胞)、IL-10 および TGF- $\beta$ 1 (Treg 細胞) を測定し比較した。その結果、共培養上清中で Th1 細胞タイプの

サイトカインでは、IL-2 および TNF- $\alpha$  は有意に減少していたが、IFN- $\gamma$  は有意に増加していた。この結果より Th1 細胞に分化していないことを否定できないが、免疫調節能を有すると報告のある間葉系幹細胞でも、今回の結果同様に IL-2 は減少させるが IFN- $\gamma$  は増加させたとの報告もある。今後、Th1 細胞に特異的な転写因子である T-bet の発現を確認する等の検討の余地がある。Th2 細胞タイプの IL-4 は解析系の検出限界が 4.9 pg/ml であるのに対して、共培養系で 5.7 pg/ml 測定された以外は検出できなかった。さらに Th17 細胞タイプの IL-17 も検出限界以下で測定できなかった。これらの結果より、Th2 細胞および Th17 細胞への分化はほとんどないと考えられる。Treg 細胞タイプサイトカインでは IL-10 は共培養系で有意に増加していた。一方、TGF- $\beta$ 1 は NHACs も発現していることから、Treg 細胞由来と区別できないが、共培養系が NHACs 単独培養中の TGF- $\beta$ 1 量より若干高い傾向がみられたが、有意な差はなかった。今後、フローサイトメトリーを用いた解析により、T 細胞だけに着目して、各サブセットに特異的な細胞表面抗原や細胞内タンパク質を検出することで、NHACs によって影響を受けた CD4<sup>+</sup>TCs のプロファイルを明らかにする必要があるが、今回の培養条件下では、TGF- $\beta$ 1 の刺激により IL-10 を産生する Treg 細胞が優位になっている可能性が高いと考えられる。

## E. 結語

接触培養条件下において、PDCCsの活性化 T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- $\beta$ 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

活性化条件下にある CD4<sup>+</sup>TCs は軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に関与する Treg 細胞が優位になっている可能性が高い。

## 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, Kawakami T, Komoriya K, Kato R, Niimi S, Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)
- 2) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京, 2014.11)
- 3) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京,

2014.11)

- 4) 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. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10)
- 5) Miyajima-Tabata A, Kato R, Komoriya K, Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)
- 6) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)

## 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

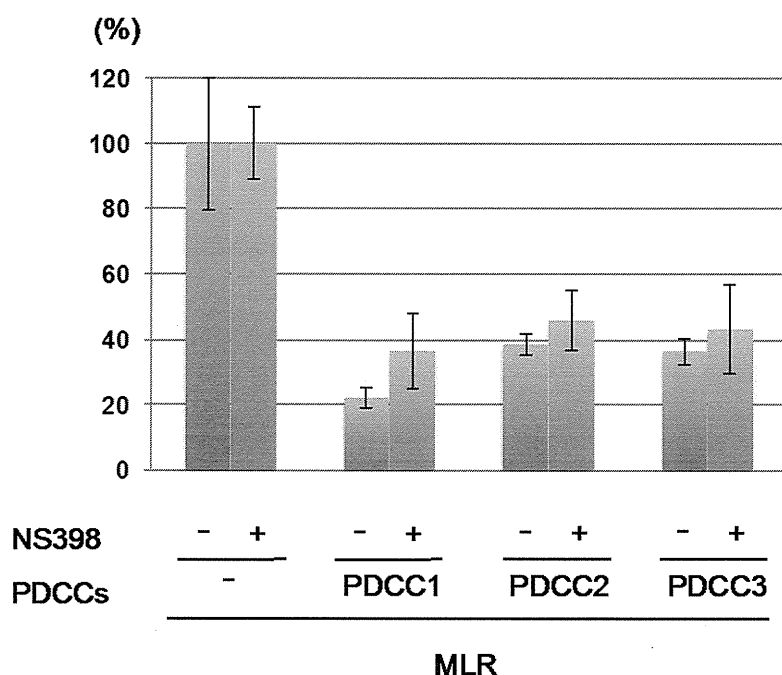


図1:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への PGE2 の関与

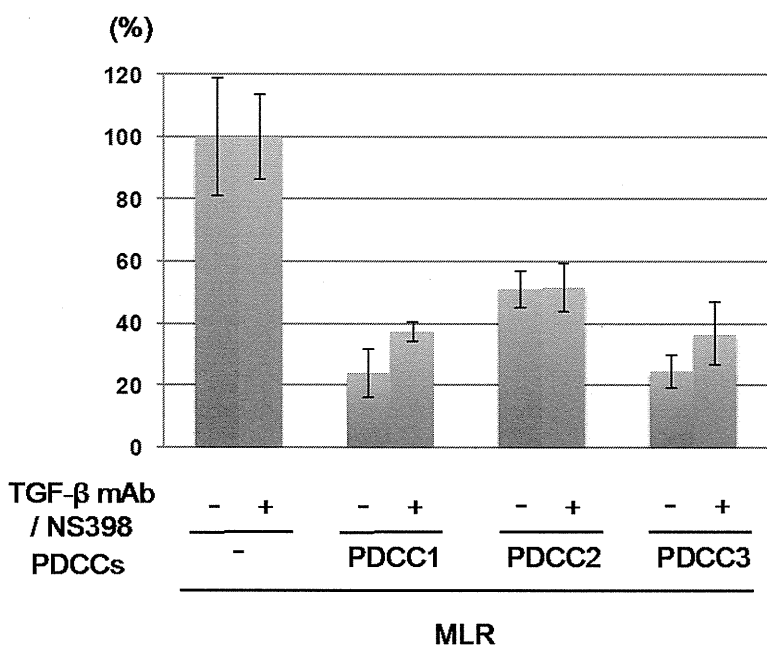
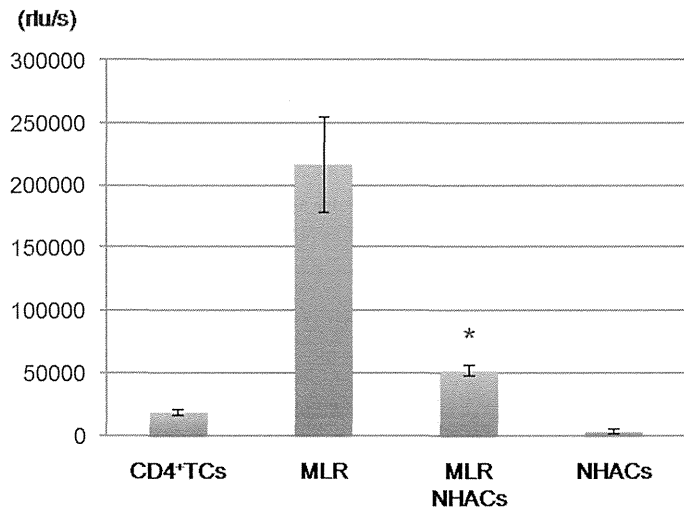
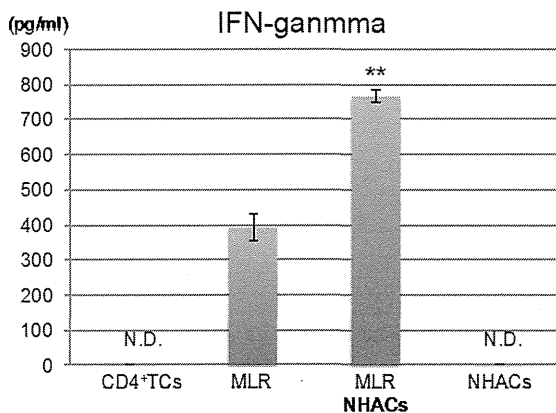
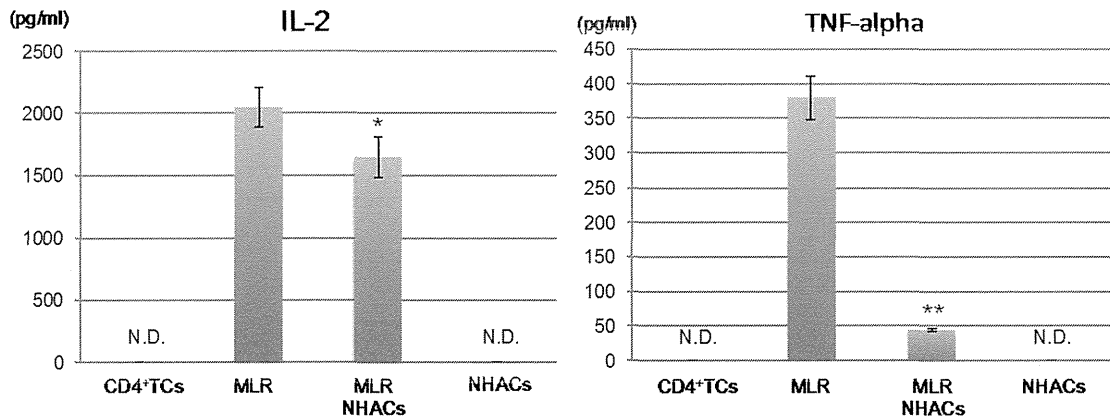


図2:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF- $\beta$ 1 および PGE2 の関与



\* : P < 0.05

図3-1: NHACsによるMLR中のCD4<sup>+</sup>TCsの増殖抑制  
 (以下、この培養条件の培養上清中の各サイトカイン量を測定)



\* : P < 0.05  
 \*\* : P < 0.01

図3-2: Th1 サイトカインの測定

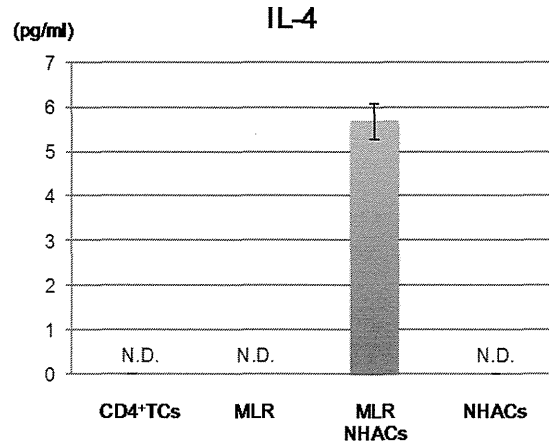


図3-3: Th2 サイトカインの測定

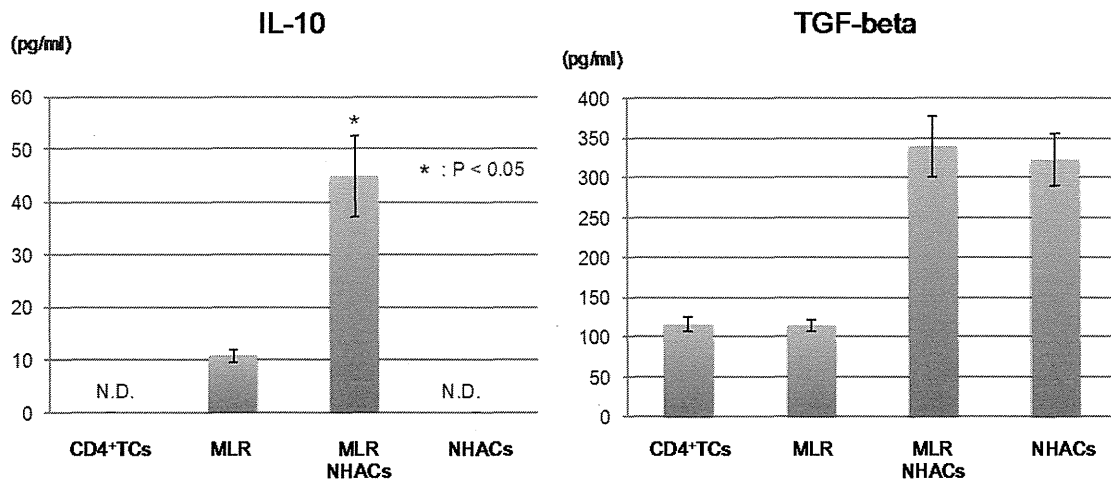


図3-4 : Treg サイトカインの測定

IV. 研究成果の刊行（平成26年度）  
に関する一覧表



## 書籍

出版	書籍名 (出版社)	タイトル	ページ	出版地	著者氏名
2014年	再生医療の細胞培養技術と産業展開 (シーエムシー出版)	第5編 応用研究ビジネスプラン, 第27章 関節軟骨治療研究	293-303	JPN	菊地鉄太郎, <u>佐藤正人</u>

## 雑誌

出版	発表誌名	論文タイトル	ページ・ 巻号	著者氏名
2015年	BMC Musculoskeletal Disorders	Diffusion tensor imaging can detect the early stages of cartilage damage: a comparison study	16:35	Ukai T, <u>Sato M</u> , Yamashita T, Imai Y, Mitani G, Takagaki T, Serigano K, Mochida J
2014年	Arthritis Research & Therapy	Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis	16(5), 427	Nagai T, <u>Sato M</u> , Kobayashi M, Yokoyama M, Tani Y, Mochida J
2014年	望星	健康のカギはロコモの予防	45(12), 24-29	<u>佐藤正人</u>
2014年	最新医学	セルシートエンジニアリング	69(7月増刊号), 144-153	<u>佐藤正人</u>
2014年	The BONE	骨・軟骨イメージング (超音響を用いて)	28(2), 105-110	石原美弥, <u>佐藤正人</u>
2014年	日本臨牀	細胞シートによる関節治療の再生医療	72(増刊号3), 722-727	<u>佐藤正人</u>

## 雑誌 (その他)

出版	誌名	タイトル
2014.11.12	夕刊フジ	「東海大学医学部附属病院・整形外科 最先端の軟骨再生研究」
2014.8.16	読売新聞(夕刊)	高齢者の膝痛、他人の軟骨細胞移植で治療計画
2014.7.23	読売新聞(朝刊)	[医療ルネサンス]進む再生医療 <3>膝軟骨補う細胞シート
2014.7.16	日刊ゲンダイ	世界初「軟骨細胞シート」変形性膝関節症に効果あり
2014.6.30	日経バイオテク On Line	「国内初の他家軟骨再生医療、東海大が実施を計画、乳児指軟骨細胞から作製」
2014.6.13	週刊朝日	名医の最新治療 外傷性の痛みへの再生医療が保険適用に 膝の痛み (軟骨再生)

学会発表

発表	発表学会名	タイトル	著者氏名
研究代表者 佐藤正人			
2015年	Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting	The effect on articular cartilage repair using collagen vitrigel and chondrocyte sheets	Tani Y, <u>Sato M</u> , Takezawa T, Yokoyama M, Kobayashi M, Toyoda E, Kawake T, Okada E, Mochida J
2015年	Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting	The effect of using collagen vitrigel containing transforming growth factor beta 1 on articular cartilage repair	Maruki H, <u>Sato M</u> , Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Kobayashi M, Kokubo M, Kawake T, Okada E, Mochida J, Kato Y
2014年	The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization(ACTO)	【Keynote lecture】 Clinical Application of Chondrocyte Sheet and Future Perspectives	<u>Sato M</u>
2014年	France-Japan Symposium	Regenerative Medicine & Innovative Therapies	<u>Sato M</u>
2014年	Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Annual Conference 2014, TERMIS-AP	Cell sheet technology for biological articular cartilage repair and regeneration	<u>Sato M</u>
2014年	Orthopaedic Research Society International (OARSI)	miRNA and chondrocyte function	<u>Sato M</u>
2015年	第14回日本再生医療学会総会	ビトリゲルと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	細胞を用いない TGF-β1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	丸木秀行, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治, 加藤義治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	多指症軟骨由来細胞シートの作製	岡田恵里, <u>佐藤正人</u> , 豊田恵利子, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲,

			梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-2	前原美樹, <u>佐藤正人</u> , 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞然, 長嶋比呂志
2015年	第14回日本再生医療学会総会	多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析	豊田恵利子, <u>佐藤正人</u> , 岡田恵里, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	インテグリン活性化によるヒト初代軟骨細胞機能制御	大脇敏之, 小久保舞美, 菊地鉄太郎, 熊代善一, 深井文雄, <u>佐藤正人</u> , 大和雅之, 岡野光夫
2015年	第14回日本再生医療学会総会	幼若動物由来軟骨細胞シートの特性評価	小久保舞美, 大脇敏之, 菊地鉄太郎, 河毛知子, 熊代善一, 大和雅之, <u>佐藤正人</u> , 岡野光夫
2015年	第28回日本軟骨代謝学会	マイクロアレイを用いた多指症軟骨細胞と成人膝軟骨細胞の特性比較	豊田恵利子, <u>佐藤正人</u> , 鶴養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第28回日本軟骨代謝学会	EP2 アゴニストを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 横山宗昂, 小林美由希, 高橋匠, 岡田恵里, 丸木秀行, 加藤義治, 持田讓治
2015年	第38回厚木整形外科医会学術講演会	【特別講演】変形性膝関節症のエビデンスと再生治療の役割	<u>佐藤正人</u>
2015年	第15回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム	【シンポジウム】他家軟骨再生医療	<u>佐藤正人</u>
2015年	第1回再生医療産業化展	【基調講演】関節治療を加速する同種細胞シートによる再生医療の実現	<u>佐藤正人</u>
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム 東京	【講演】変形性膝関節症 - 治療の実際と未来医療 -	<u>佐藤正人</u>
2014年	第56回神奈川医学会総会・学術大会	【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療 (ヒト幹細胞臨床研究)	<u>佐藤正人</u>
2014年	第42回日本関節病学会	【パネルディスカッション】関節軟骨損傷に対する治療戦略	<u>佐藤正人</u>
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	初代培養軟骨細胞に ascorbic acid が及ぼす影響	小久保舞美, <u>佐藤正人</u> , 内山善康, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	血小板活性化血清関節内投与による軟骨治療効果の検討	横山宗昂, <u>佐藤正人</u> , 谷良樹, 小林美由希, 小久保舞美, 持田讓治

2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	細胞を用いないTGF-β1含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治, 加藤義治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	Vitrigelと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討	谷良樹, 佐藤正人, 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	同種移植を目指したガラス化凍結保存細胞シートを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	谷良樹, 佐藤正人, 長嶋比呂志, 前原美樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析	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, 持田讓治, 新見伸吾
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム さいたま	【講演】変形性膝関節症 - 治療の実際と未来医療 -	佐藤正人
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム 名古屋	【講演】変形性膝関節症 - 治療の実際と未来医療 -	佐藤正人
2014年	第32回日本骨代謝学会学術集会	【カレントコンセプト】軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究と今後の課題	佐藤正人
2014年	第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学	【シンポジウム】細胞シートを用いた関節軟骨の修復再生	佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治
2014年	東海大学医学部付属病院 抗加齢ドック設立8周年記念講演会	【講演】メタボより怖いロコモってなに? - 運動器疾患の予防と未来医療 -	佐藤正人
2014年	大和市整形外科医会	【特別講演】軟骨再生医療の現状と展望	佐藤正人
2014年	金沢区整形外科医会	教育研修講演】再生医療で変形性膝関節症は治るのか?	佐藤正人
2014年	第87回日本整形外科学会学術総会	レーザー誘起光音響法とMRIによる変形性膝関節軟骨診断の比較検討	横山宗昂, 佐藤正人, 谷良樹, 高垣智紀, 鶴養拓, 三谷玄弥, 今井裕, 山下智裕, 持田讓治
2014年	第87回日本整形外科学会学術総会	DT imagingによる関節軟骨損傷の検討	鶴養拓, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 芹ヶ野健司
2014年	日本組織培養学会第87回大会サテライト	【シンポジウム】関節軟骨を再生する医療技術の開発状況	佐藤正人