

多指症軟骨由来細胞シートの作製

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
研究協力者	白砂 早織	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
研究分担者	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター 生殖医療研究部・部長
研究協力者	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター研究所・副所長
研究協力者	小久保 舞美	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所・博士研究員

研究要旨：我々は、これまでに自己軟骨細胞シートによる関節治療を目指したヒト幹細胞臨床研究を実施し、重篤な有害事象は認められることはなく終了した。平成 26 年 8 月に同種軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究の承認を得て、現在実施準備中である。

本研究では、多指症手術で廃棄される軟骨組織から細胞シートの作製及びその特性の解析を実施した。本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取し、細胞を調整・播種・培養し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解し速やかに平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。細胞シートの組織切片を作製し、構造および厚みを解析した。

その結果、多指症軟骨細胞の凍結ストックから重層化した細胞シートの作製が可能であった。

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」を実施した。移植が実施された全 8 症例は移植後 1 年を経過し、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解析を進めている。細胞シートの基材として、自己細胞は、関節軟骨組織の非荷重部の健常部と滑膜組織を採取することや採取量に制限があること、及び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さらなる普及を目指すために自己細胞の課題を解決すべく、細胞シートの基材となる細胞を同種細胞に代替することにより、自己組織の侵襲がなくなるため、軟骨及び滑膜組織の採取量によるシートの作製数の制限がなくなり、各患者に応じて移植に必要な枚数が作製可能となる。また、患者の移植前にシートを作製することが可能となり、バリデーション試験として細胞シートの特性解析が実施できる。したがって、特性解析により、基材としての細胞の適合性を判定し、合格した細胞の中から、シート作製によりよく適応する細胞をシート作製の基材として選抜することが可能となる。この選抜された細胞を基材とすることにより、多数の患者に複数回の移

植の実施が可能であると想定される。

細胞シートの基材となる多指症手術時廃棄組織由来細胞でシート作製が可能かを検討した。

B. 研究方法

サンプル

本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術（男女含め 4 症例、平均年齢 1 歳 1 か月）廃棄組織より軟骨組織を採取し、細切して酵素処理を行い単離した細胞を多指症軟骨組織由来細胞とし、本研究を実施した（表 1）。

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)及び DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)

培養条件：37 °C、5% CO₂

播種数：1 × 10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

No.	gender	months
1	F	16
2	M	12
3	M	8
4	M	17

（平均年齢：1 歳 1 箇月）

シート作製

多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取して単離した細胞を培養し、増殖させた細胞を酵素処理により回収し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解して平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。シートは剥離試験を実施し、剥離できた結果をもとにシート作製が可能であると判断した。

シートの生細胞数及び細胞生存率

細胞シートは、酵素処理を行い細胞に単一化した。単離した細胞を死細胞が染色されるトルイジンブルーで生細胞と死細胞を染め分けて、生細胞を計数し、シート当たりの生細胞数と細胞生存率を算出した。

細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフランin O 染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し、顕微鏡下で厚みを計測した。

C. 結果

シート作製

自己軟骨細胞シート作製時と同様に軟骨組織から細胞を単離し、培養して増殖した細胞を酵素処理により単離して凍結細胞ストックを作製した。一定期間保管した後、この凍結細胞ストックを融解して細胞生存率を測定し、高い生存率を保っていること

が確認された（表 2）。融解後、速やかに平面培養すると、多指症軟骨由来細胞は増殖性がよく、サブコンフルエントに増殖する期間は、4~5 日間であり、少なくとも P7 で細胞集団倍加数は 15 であった（表 3）。また、サブコンフルエントに達した時に細胞を酵素処理で単一に単離して、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製し、14 日間で細胞シートとして剥離が可能であった（図 1）。

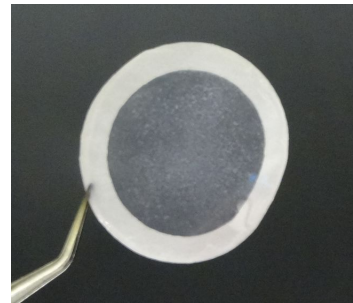
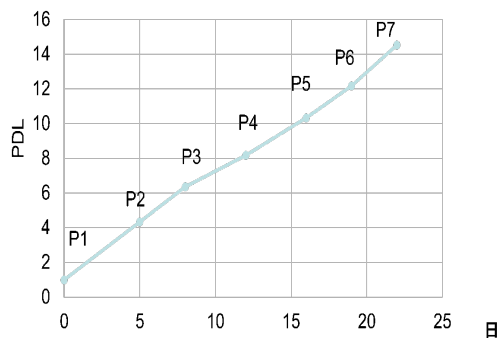


図 1 細胞シート

表 2 凍結細胞ストックの生存率

サンプル	%
1	93.2
2	97.8
3	98.2
4	97.4
5	99.6
6	96.9
平均	97.2 ± 0.8

表 3 細胞集団倍加数



シートの生細胞数及び細胞生存率

各シート 1 層あたりの生細胞数の平均値は

190.2 ± 51.4 cells/cm² (表 3)であり、また、細胞シートの細胞生存率は 97.7±0.8%であった（表 4）。

表 4 細胞シートの細胞数

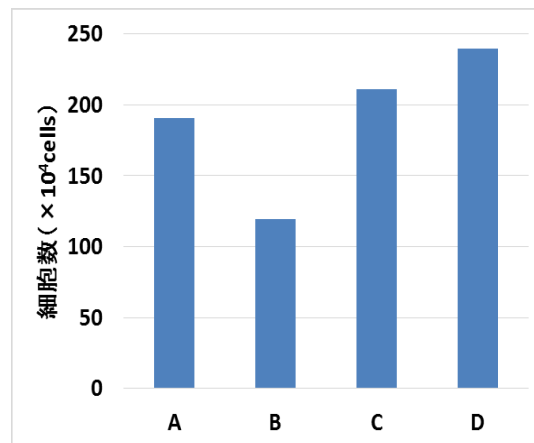
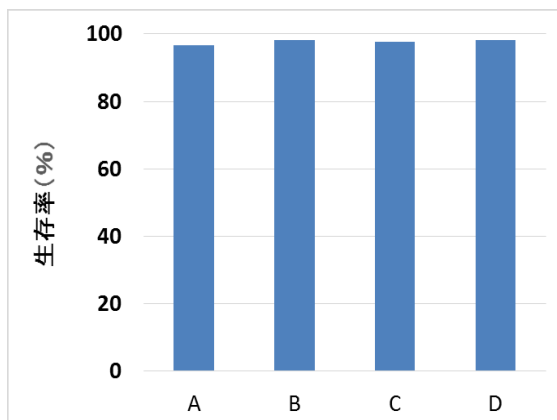


表5 細胞シートの細胞生存率



細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフラニンO染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し（図2）顕微鏡下で細胞シートの構造を観察したところ、細胞の重層化が認められた。また、各サンプルの細胞シートの厚みを計測したところ、平均の厚みは21.5 μ mであった。

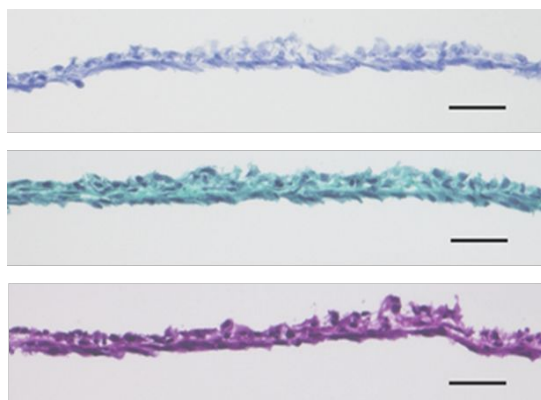


図2 細胞シートの厚み

D. 考察

我々が同種細胞ソースとして検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であり、高い細胞増殖活性を有した。

これまで自己軟骨細胞シートは、作製には、自己の軟骨組織を関節鏡視下で採取を行う侵襲工程から3週間を要し、採取箇所による採取量の制限もあり、作製枚数に制限があった。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るため、自己軟骨細胞を継代する工程はシート化に適さないことが示唆されてきた。

一方、同種細胞を基材とすると、自己侵襲することはなくなる。また、多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、各患者の必要に応じた移植枚数のシートを作製することが可能となる。

多指症軟骨組織から細胞を単離し、培養することによって細胞を増やし、細胞ストックを作製した。細胞ストック工程を経ても細胞の起き具合は高い生存率をっており、その後の増殖性も安定していた。この細胞を基材にして細胞シート作製が可能であった。作製した多指症軟骨細胞シートは、1層のシートであり、3層に積層化した自己細胞シートと遜色ない生細胞数と細胞生存率であった。

E. 結論

本研究において、細胞シートの作製工程の検討を行い、この工程で細胞シート作製

が可能であることが判明した。作製された細胞シートは、生細胞数、細胞生存率、厚みの各項目において、3層に積層化された自己細胞シートと遜色ない結果が得られた。

このことから、多指症軟骨由来細胞シートは、細胞の凍結ストックから1層での重層化した細胞シートの作製が可能であり、同種細胞シートの基材になりう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. 著書

なし

2. 論文発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*, 1, 18-29, 2015.

2) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome

inactivation and embryogenesis in mice. *Nature communications*, 5, 5464, 2014.

3) 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*, 29, 44-51, 2014.

4) Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 1039-1050, 2014.

5) Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of Reprogramming Transgenes Improves the Tissue Reconstitution Potential of Keratinocytes Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*, 3, 992-1001, 2014.

6) Ichida JK, T C W J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H*, Meissner A*, Eggan K* (*;corresponding author) . Notch inhibition allows

oncogene-independent generation of iPS cells. Nat Chem Biol, 10, 632-639, 2014.

7) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞iPS細胞研究のこれから - 再生医療の実用化に向けたルールを学ぼう」 Medical Technology, 42(11), 1156-1159, 2014.

8) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞・iPS細胞の基本, ES細胞, iPS細胞で何ができるの? 何が変わるの?」 Medical Technology, 42(10), 1037-1042, 2014.

9) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞とiPS細胞, どこがどう違うの?」 Medical Technology, 42(9), 920-926, 2014.

3.学会発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H. Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors (F-2142). 12th Annual Meeting of ISSCR (国際幹細胞学会), Vancouver, Canada, 2014.6.17-22.

2) 阿久津英憲. 「生殖医学における ES細胞と iPS 細胞の意義」. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会 教育講演 3 (招待), 東京, 2014.12.4.

4. 学会発表（研究協力者：岡田恵里）

1) 岡田恵里, 佐藤正人, 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. 多指症軟骨由来細胞シート作製.

第 14 回日本再生医療学会総会, 東京, 2015.3.19-21

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