

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

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	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	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
研究協力者	河毛 知子	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	高野 りや	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	中村 嘉彦	東海大学医学部付属病院中央診療部 セルプロセッシング室・室長補佐

研究要旨：これまで本事業において、軟骨欠損に対し自己軟骨細胞を用いた細胞シートによる関節軟骨治療を実施し、重篤な有害事象もなく、移植部に硝子軟骨の再生を認めている。さらに、本治療法をレディメイド型の医療として確立するために、多指症手術時廃棄組織から得られる軟骨細胞を同種細胞ソースとして使用することを目指して、これまでに多指症軟骨細胞の安全性を確認した。本研究では、多指症由来軟骨から作製した細胞シートの特性を解析し、自己膝軟骨細胞による細胞シート治療で移植された細胞シート（成人膝軟骨細胞シート）のデータと比較した。その結果、多指症由来軟骨から作製した細胞シートは、成人膝軟骨細胞シートと同等の細胞数から構成され、生細胞率は95%以上を示した。また、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31, CD45陰性、CD81, CD90陽性を示すことを確認した。

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8名の患者へ移植し、1年間の観察期間を終了した。これまでに重篤な有害事象はなく、1年後の細胞シート移植部の組織学的評価で硝子軟骨の再生が認められ、細胞シートによる関節治療の安全性及び有効性を確認している。しかし、軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷治療を、多くの患者に医療として提供するためには、オーダーメイドとなる自己細胞を用いた方法には限界があり、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。

我々は、これまでに多指症軟骨組織由来細胞の安全性を確認するため、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由来細胞を用いて造腫瘍性否定試験を行い、多指症由来軟骨細胞が造腫瘍性を示さないことを示した。また、aCGH および核型解析を行うことにより、培養による遺伝子コピー数異常の有無を評価して、安全性の高い多指症由来軟骨細胞を選別できることを確認した。これらの成果に基づき、同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究は、2014年8月に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政0806第9号平成26年8月6日）による承認を得て、現在移植用の多指症軟骨細胞ストックの作製保管を始めている。本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製される細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同等の機能を示すか検証するために、多指症軟骨細胞シートの特性を

成人膝軟骨細胞シートと比較した。

B. 研究方法

多指症由来軟骨細胞

本学臨床研究審査委員会承認のもと多指症手術廃棄組織（男性 7 症例:平均年齢 1 歳 2 カ月）より、細切した軟骨片、または、コラゲナーゼにより単離した軟骨細胞を培養皿に播種し、培地（20%ウシ胎児血清添加 DMEM/F12 (FBS; GIBCO)、1% antibiotics-antimycotic (GIBCO)）で培養した。細胞がサブコンフルエントまで増殖した時点で剥離し、凍結細胞ストック（第 1 継代細胞）を作製した。

細胞シートの作製

凍結細胞ストックを融解後、平面培養して増殖させたのち、第 2 継代または第 3 継代の軟骨細胞を、 1×10^4 cells/cm² で温度応答性インサートに再播種し、0.01%アスコルビン酸（日新製薬株式会社）を添加した培地で 14 日間培養した。14 日間培養後、細胞シートを PVDF 膜を用いて剥離し、細胞がシートを形成していることを確認した（剥離試験）。

細胞数の測定

細胞シートを TrypLE™ Express (Life Technologies) 中で 37 °C で 30~60 分加温後、遠心（1500rpm × 5min）し TrypLE™ Express を除去した。細胞ペレットに 0.25 mg/mL collagenase P (Roche) を含む培地を加え、37 °C で 20~45 分加温して細胞を分散させた。遠心により collagenase 液を除去し、FACS 緩衝液（0.2%BSA, 1 mM

EDTA, DPBS(-)）に懸濁した。トリパンブルーと血球計算盤を用いて、細胞数、生細胞率を求めた。

細胞表面マーカーの解析

細胞シートから調整した細胞を FITC 標識抗 CD31 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗 CD45 抗体 (Beckman Coulter)、APC 標識抗 CD81 抗体 (BD Pharmingen) および APC 標識 CD90 抗体 (BD Pharmingen) およびアイソタイプコントロール (Beckman Coulter) で標識し、FACS Vantage (BD) を用いて解析した。

C. 結果

多指症由来軟骨細胞は滑膜との共培養を必要とせず増殖し、培養開始後 14 日目で全例の細胞シートの剥離が可能であった（表 1）。

多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートの一枚当たり細胞数を調べたところ、平均 $2.39 \pm 0.97 \times 10^6$ cells で、生細胞率は平均 $96.8 \pm 2.6\%$ であった（表 2）。

多指症軟骨細胞シートを構成する細胞の純度を解析するため、血液系細胞で発現する CD31 および白血球共通抗原である

表 1. 多指症軟骨細胞シート剥離試験

細胞ID	月齢	性別	剥離検査
PD-1	12	M	○
PD-2	8	M	○
PD-3	17	M	○
PD-4	20	M	○
PD-5	13	M	○
PD-6	15	M	○
PD-7	13	M	○

表2 多指症軟骨細胞シートの細胞数

細胞ID	細胞数 ($\times 10^4$ cells/sheet)	生細胞率(%)
PD-1	239.8	98.2
PD-2	376.2	95.8
PD-3	225.5	98.6
PD-4	246.4	92.0
PD-5	198.6	99.4
PD-6	204.6	94.1
PD-7	195.8	97.8
平均 \pm SD	239.0 \pm 96.8	96.8 \pm 2.6

CD45、間葉系細胞に発現する CD81 および結合組織や一部幹細胞など広く発現が認められる CD90 の細胞表面への発現をフローサイトメーターにより解析した（図 1）。

多指症軟骨細胞シートの各マーカー陽性細胞率は、平均で CD31 (0.22 \pm 0.21%)、CD45 (0.42 \pm 0.48%)、CD90 (99.71 \pm 0.19%)、CD81 (99.78 \pm 0.23%) で、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31 および CD45 陰性、CD81 および CD90 陽性であることが確認された。

D. 考察

本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートを膝軟骨損傷の治療に用いることを目標としている。移植する細胞シートの品質の指標として評価すべき項目は、ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発第 0912006 号）や、関節軟骨再生に関する評価指標（薬食機発 1215 第 1 号）等で示されており、細胞数、生存率、細胞の純度試験は基本的な試験項目として挙げ

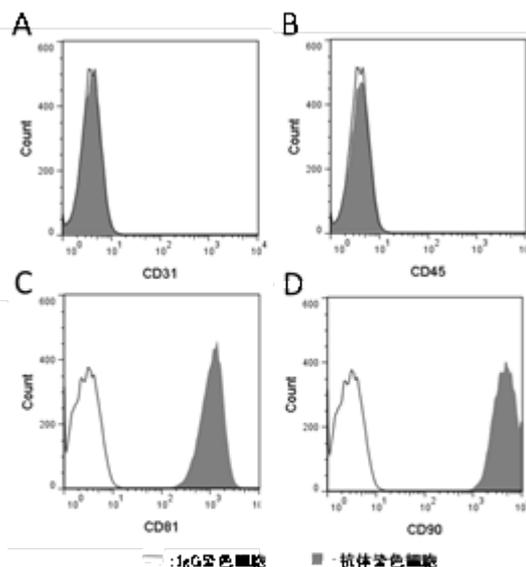


図1. 多指症軟骨細胞シートと成人膝軟骨細胞シートの各マーカー発現
 A)CD31 B)CD45 C)CD81 D)CD90

られている。また、細胞シートの軟骨修復促進メカニズムとして、関節液中のカタボリックファクターから軟骨損傷部位を保護することや、細胞シートから産生される TGF などの寄与があると考えており、移植する細胞シートの細胞数、生細胞率は、細胞シートの有効性に関与する重要な因子であると考えられる。

これらの評価項目の基準を考えるうえで、臨床研究により有効性が示された成人膝軟骨細胞シートの特性評価から得られている知見が一つの指標となると考えられることから、多指症由来軟骨細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すかどうか解析をおこなった。

多指症軟骨細胞からは、全例のドナーから剥離可能な強度をもつシートを作製することができ、多指症軟骨細胞シートには軟骨損傷部を保護する機能が期待できる。ま

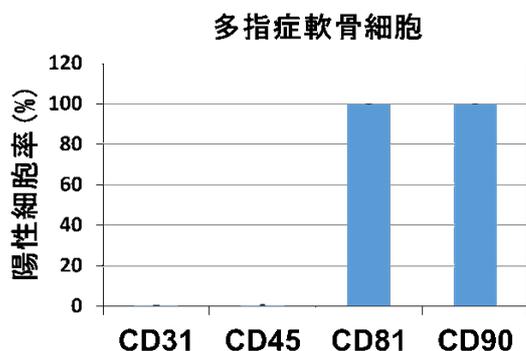


図2. 多指症軟骨細胞の陽性細胞率 (n=7)

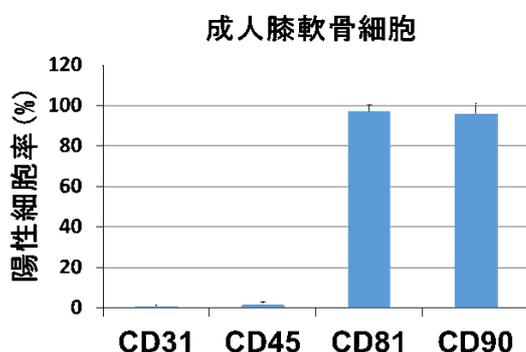


図3. 成人膝軟骨細胞の陽性細胞率 (n=8)

た、自己軟骨細胞を用いた臨床研究で成人膝軟骨細胞シートを構成する細胞数の平均値は、 2.3×10^6 cells で、生細胞率は 93%であったことから、多指症細胞シートに含まれる細胞数および生細胞率は成人膝軟骨細胞シートと同等であり、トロフィックファクター産生に寄与しうる細胞が同程度含まれることが確認された。今後、細胞シートあたりのトロフィックファクターの産生についても、成人膝軟骨細胞シートと同程度の能力を持つのか、明らかにする必要がある。また、細胞の純度の指標となる各種マーカーの陽性細胞率の検討では、血液細胞、内皮細胞に発現する CD31、白血球共通抗原である CD45 の陽性細胞率は 1%以下で、

血球系細胞の混入はほぼないと考えられた。間葉系由来細胞に発現する CD81 および結合組織などに広く発現する CD90 の陽性細胞率は 99%であり、これらのマーカーの発現では、多指症軟骨細胞シートは成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すことが確認された。CD81 および CD90 は、成人膝軟骨細胞シートでドナー間でのばらつきがほとんどなく発現を認めたマーカーであったことから、これらのマーカーの発現は、細胞シートの評価指標として最低限満たすべき必要条件と考えられる。しかし、CD81 および CD90 の発現と細胞シートの有効性との関係は明らかではないため評価指標として十分条件とはいえず、有効性と相関するサロゲイトマーカーを同定することが今後の課題である。

E. 結論

多指症軟骨細胞シートは、細胞数、生存率、CD31、CD45、CD81 および CD90 の発現パターンで、成人膝軟骨細胞シートとほぼ等しい特性を示すことを確認した。

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
なし
3. 学会発表

- 1) 豊田恵利子, 佐藤正人, 鵜養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. 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. 第28回日本軟骨代謝学会（東京, 2015.3）
- 2) 豊田恵利子, 佐藤正人, 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. 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. 第14回日本再生医療学会総会（横浜, 2015.3）

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