

東海大学大学院平成28年度博士論文

軟骨細胞シート臨床応用のための安全性評価に関する研究

指導 佐藤 正人教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

横山美由希

Summary

これまで我々は温度応答性カルチャーインサート(UpCell 6 well Cell Culture Insert, Cell Seed, Inc.)を用いて作製した軟骨細胞シートによる、関節軟骨の修復再生効果を確認し、さらに滑膜細胞と軟骨細胞との、インサートを介した共培養法によって、より短期間で軟骨細胞シートを作製することに成功した。

積層化軟骨細胞シートによる軟骨欠損の治療は、これまでに動物実験で変形性膝関節症（以下 OA）を模した全層欠損と部分欠損の両方で良好な修復再生が生じることを確認してきた。それらに基づき、ヒト幹細胞臨床研究指針に準拠して厚生労働省へ申請し、承認を得て、すでに臨床応用を開始し現段階で良好な結果を得ている。

我々は軟骨細胞シートによる治療を実施する際に、*in vitro* において array Comparative Genomic Hybridization (以下 array CGH)および、G band 分染法を用いて軟骨細胞の過継代培養による安全性評価を行い、*in vivo* として造腫瘍性否定試験および移植後細胞シートの動態を確認した。それらの結果より、軟骨細胞が継代中に変化を生じないこと、また軟骨細胞シートが造腫瘍性を持たないこと、さらに、軟骨細胞シートは移植後、損傷部で生着し、軟骨再生に寄与していることが確認され、軟骨細胞シートの臨床応用にむけた安全性を確認することができた。

さらに今回我々は、今後の新たな細胞ソースとして検討している多指症由来軟骨細胞についてこれまでと同様の方法を用い、array CGH による安全性評価を行い、継代による変化がないことを確認した。多指症由来軟骨細胞は優れた増殖能をもち、さらに手術中に破棄する組織であることから、今後、軟骨細胞シートを広く臨床応用する際に有用な細胞ソースとなりうると考える。

Introduction

我々はこれまで組織工学手法により製造した軟骨の自己移植による軟骨再生に関する研究で、軟骨再生のための適切な scaffold や最適な細胞外環境に関する研究を行った。軟骨細胞は無血管組織に存在するだけでなく、最終分化細胞のため増殖能力に乏しい。これは、一旦軟骨に損傷が生じると、修復機構が働きにくく、自然治癒が非常に困難であることを意味する。関節軟骨が損傷すると、徐々に変形性膝関節症（以下 OA）に進行し、日常生活動作およびクオリティ・オブ・ライフの低下につながる。

OA における軟骨損傷は、軟骨内に留まる軟骨部分損傷と、軟骨下骨まで達する全層欠損が混在している状態であり、全層欠損は進行すると関節破壊につながる事が知られており、人工膝関節置換術および骨切り術など様々な治療が行われている。特に、人工関節の技術は著しく向上した。しかし、これらは、

若年者や活動性の高い症例には適していない。一方、軟骨下骨まで及ばない部分欠損に対する確立された治療方法はなく、ドリリング法やマイクロフラクチャー法のように損傷部位に対して骨髓刺激法を用いることにより骨髓からの間葉系幹細胞を導入する方法は、簡便であり、かつ短期的な成績は比較的良好であるが、修復された組織は線維軟骨又は癒痕組織から成るため、機械的強度および磨耗に対する抵抗性は正常な硝子軟骨と比べて劣り、長期的には予後不良であることが知られている。

近年、非荷重部から複数の骨軟骨柱を採取して移植する方法（モザイクプラスティ）および軟骨細胞を培養して増殖させ、欠損部位へ骨膜と共に移植する自家培養軟骨細胞移植術（以下 ACI）が、臨床症状改善のために開発されている。ACI は、有用な方法であるが、移植用に同じ関節の正常な部位（非荷重部位）から軟骨を採取するのには限界がある。さらに、ACI の限界点としては、広範囲の軟骨欠損の治療に適していないことである。

これらを踏まえ、我々はこれまで、軟骨欠損を伴う OA 患者に対する再生医療に焦点を置き、その臨床応用を研究の目的とし、岡野らにより開発された、温度応答性カルチャーインサート（以下「UpCell インサート」、株式会社セルシード [Tokyo, Japan] より提供）を用いて、軟骨細胞シートの作製による組織修復再生効果を検討してきた。軟骨細胞シートにより軟骨欠損部を覆うことにより、成

長因子等、液性因子を持続的に供給する可能性がある。更に、軟骨細胞シートは滑液中に存在する異化因子から関節軟骨を保護し、その結果、損傷部位に対する自己の自然治癒も促進する効果がある。

UpCell インサートは、温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) を表面に固定化したものである。これにより器材表面は 32°C を境に可逆的に疎水性 (細胞接着表面) から親水性 (細胞遊離表面) に変化する。そのため、トリプシン等の細胞に損害を与える酵素を一切用いることなく、温度を 20°C ~ 25°C に調整し 10 ~ 30 分間待つだけで、無傷な細胞がシート状に回収することができる。回収した細胞シートはフィブロネクチンやインテグリンなど接着性タンパク質を保有するため、移植中に縫合の必要がない。よってこの UpCell インサートを用いることにより scaffold を用いずに軟骨の形質をある程度維持させながら、積層化軟骨細胞シートを作製することができる。

積層化軟骨細胞シートは、単層のシートより軟骨保護効果が大きい。三谷らは、UpCell インサートを用いて作製した積層化軟骨細胞シートの特性を解析し、細胞シートを積層化することによって、カタボリックな因子の低下を認め、軟骨形質維持に重要な遺伝子発現を確認し、さらに我々は軟骨の維持に重要な遺伝子を確認した。

さらに、臨床応用に向け、より短期間で軟骨細胞シートを作製することが必要とされるため、生体内で軟骨組織の栄養供給源として働く滑膜組織に着目し、UpCell インサートを用いて軟骨細胞と滑膜細胞とを共培養した。この方法により、血清（FBS）と滑膜細胞から供給される液性因子のみを軟骨細胞に作用させることが可能となり、関節内における軟骨細胞の栄養供給の状況に非常に近い環境での培養が可能となった。

我々は、積層化軟骨細胞シートを作製するためにこれらの手法を用い、大型動物実験においてその効果を確認した。ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する厚生労働省の指針に従って申請書を提出し、承認の下、既にこれらの臨床応用を開始し、良好な結果が得られている。

ヒトを対象とする再生医療の臨床研究では、まず何より安全性の担保が最も重要な問題になる。長期間の培養法では、その工程において培養細胞に染色体または表現型の変化が誘発されないということを確認するのは特に重要である。

上記の前提に基づき、造腫瘍性否定試験および移植後細胞シートの動態評価に加え、array Comparative Genomic Hybridization（以下 array CGH）および G band 分染法を用いて、軟骨細胞シートの安全性を評価した。軟骨細胞を長期間培養した場合でも、ゲノムに変化がないことを確認する目的で array CGH を使用し、更に過継代培養された細胞の安全性を評価するため、追加試験として G band 分

染法を行った。G band 分染法では、核染色体を確認し、異常を分析するため、プロテアーゼおよびギムザ染色液を用いてバンドを示す。これは、最も広く使用されている染色体検査であり、検体は半永久的に保存される。

軟骨細胞はこれまで過継代培養に対する安全性評価の方法が確立されていないが、今回用いた array CGH および G band 分染法による評価方法は、手法も安定しており、これらの評価に適していると考える。さらに移植後細胞シートの動態を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックラット (Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats) 由来の組織より軟骨組織と滑膜組織を採取し、酵素処理後、発光する Luc⁺軟骨・滑膜細胞シートを作製し、その関節内滞在時間を計測した。

今後軟骨細胞シートを広く臨床応用するにあたり、新たな細胞ソースが必要と考え、多指症由来軟骨細胞に着目した。多指症由来軟骨細胞は優れた増殖能をもち、かつ手術中に破棄する組織であることから、採取にあたりドナーには全く侵襲のないものである。本稿では軟骨細胞シートの安全性評価を行った後、今後細胞ソースとして検討している多指症由来軟骨細胞の継代による安全性評価を array CGH にて施行し検討した。

Discussion

array CGH は、従来の核型分析よりも短期間、低コストで実施できる。さらに、この技術により微細なゲノム異常の解析が容易になり、疾病病因の解明に有用な手がかりとなっている。これは、癌と関連する既知の染色体異常およびゲノムの変化の診断にも適用されているものである。

従来安全性を評価する方法として、染色体分析で使用されてきた G band 分染法は、染色体数および転座における変化など主要な構造の異常に対応できるが、微細な構造の異常を検出する能力は限られている。FISH 法も、診断が既にある程度まで確定している場合を除き、標的プローブの選択をすることができない。しかし、本研究で用いた array CGH により、全ゲノム上のコピー数における変化の高解像度検出が可能となる。さらに、array CGH の結果は FISH や核型分析の結果より解釈が容易で、高度に熟練した技術者がいなくてもソフトウェアを用いることにより自動化して行うことができる。今回のような array CGH および G band 分染法、両検査の併用により、細胞ソース由来の染色体異常および培養中に発生した変化の解析がいずれも可能になると考えられ、これらの併用は移植細胞の安全性評価法として非常に有用な方法となる可能性がある。

さらに、造腫瘍性がないことを確認するために本研究で使用方法は、国際的に承認された指針である WHO TRS 878 に従って行った。WHO TRS 878

では、ヌードマウスを用いた発癌性細胞を検出するために使用される場合の移植方法が定量化されている。本研究で使用した SCID マウスは、膵臓癌、乳癌、神経膠腫、リンパ腫および白血病細胞由来の一部の細胞系統が腫瘍を形成しないとされるヌードマウスよりさらに感受性が高いため、少数の発癌性細胞混入の検出においてより優れている。

本研究では、免疫不全の動物モデルとして SCID マウスに軟骨細胞を移植したが、移植細胞または腫瘍細胞の異常な増殖は観察されなかった。最終生成物は移植において安全であることが示唆される。

また、本研究で使用した軟骨細胞と滑膜細胞は、間葉系幹細胞であるため最終分化したヒト体細胞およびヒト体性幹細胞であった。この点から、ヒト幹細胞の使用は、胚性幹細胞（万能細胞）および人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の使用よりも腫瘍原性のリスクが低いと考えられる。本研究により、細胞は最終生成物の形成に関与する分離、酵素処理、冷凍保存および培養などの人為的操作においても造腫瘍性を獲得しなかったということも確認された。染色体異常および遺伝子異常について検査するために、*in vitro* 試験として array CGH および G band 分染法を使用した事に加え、*in vivo* 試験のこれらの結果が得られたことは非常に重要である。

移植した細胞シートの動態を継続的に評価できるよう、*bioluminescence imaging* 法を用いた。ルシフェラーゼトランスジェニックラットの細胞の使用は、移植細胞および免疫担当細胞の追跡で実証されているように、現在医学研究における標準手法である。生物発光画像も、*in vivo* における移植細胞の追跡に使用されている。化学反応における光の生成を触媒する蛍ルシフェラーゼは、この目的のために最も多く使用され、蛍光物質（ルシフェリン）の反応により放出された光子の画像を捉える高感度 CCD の使用により、動物を犠牲にすることなく、長期間同一の実験動物を非侵襲的に、繰り返し、継続的に追跡することが可能となった。

上記の研究を行い、軟骨細胞シートの安全性を確認した後、臨床研究を行うため、本学医の倫理委員会からの承認を得た。続いて、ヒト幹細胞の臨床研究を行う計画を厚生労働省に提出した。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従って、2011 年 3 月 3 日に厚生労働省に申請書を提出、「ヒト幹細胞による臨床研究の実施計画について」（2011 年 10 月 3 日、1003 No.3 同省通知）により、東海大学医学部附属病院における臨床研究の実施が承認され、これまでに、患者 8 例に積層化軟骨細胞シートを移植し、良好な結果を得ている。

今回着目した多指症は、手の発生段階で生じる先天異常、形態異常で、およそ 1000 人に 1~2 人が発症し、その 80~90%が母指多指症である。ヒトでは受精後 5 週で肢芽が肥大し手板を形成する。手板内に均一に分布していた間葉細胞は、受精後 6 週になると各指に相当する部に集まり指放線と呼ばれる細胞集団を形成し、この中に将来骨になる軟骨が形成される。各指骨原基の間に関節が形成され、指と指との間のみずかきの部分でアポトーシスが起これると指間陥凹が形成される。多指症は手板内で指放線が余計に形成されたときに発現するとされる。多指症は手の先天異常のうち最も多く、先天奇形症候群の部分症状の一つとして見られることもあり、近年一部の症候群では Hox、Shh、Gli などの遺伝子の変異が関与しているという報告もあるが²⁵⁻²⁸、多くは単独で発症し、個体の遺伝的素因と環境要因の相互作用の多因子により引き起こされた例が多いと考えられている。余剰指に対しては 1 歳前後で手術が行われ、一般的に重複している手指のうち、低形成のものを切除するが、この多指症由来の組織は有能な細胞ソースとして様々な方法で応用が期待され、ヒト組織の再構築に向けて研究が進められている。

我々が着目した多指症由来軟骨細胞も 2 症例ではあるが、arrayCGH にて安全性を確認し、良好な結果が得られている。さらに、arrayCGH では多指症関連遺伝子や癌関連遺伝子も網羅することが可能で、これらが継代により増加

しないことを確認できる点も arrayCGH のメリットである。多指症由来軟骨細胞は優れた増殖能をもち、さらに手術中に破棄する組織であることから、採取にあたりドナーへの侵襲が全くないものである。また P1 のストックより培養を開始して、1 枚のシートを作製するに、従来は 3 週間を要していたが、多指症由来軟骨細胞では増殖能が高いため、3 週間で 2 継代すすめることが可能であり、理論上では 700 枚以上の細胞シートを作製することができる。よって今後新たな細胞ソースとして多指症由来軟骨細胞は期待できるが、染色体異常による疾患とは現段階では関連連づけられていないものの、先天異常であることを考慮すると、これまでの成人の安全性評価の方法と同様に G band 分染法による核型分析を用いてドナー由来の核型および変異を確認し、多指症由来軟骨細胞の安全性を確認することは重要であり、それによって細胞シートが広く臨床応用される際に有用な細胞ソースとなりうると考える。

Conclusion

UpCell インサートを用いて作製した、積層化軟骨細胞シートによる変形性膝関節症の軟骨治療について、ヒト幹細胞臨床研究指針に準拠し、厚生労働省へ申請する際の安全性評価を行った。

今後、積層化軟骨細胞シートの治療を広く臨床応用するために、優れた増殖能を持ち、手術時に破棄する組織である多指症由来軟骨細胞を同種細胞の細胞ソースとして着目し、同細胞の過継代培養による安全性評価を、arrayCGH を用いて行った。2 症例ではあるが培養過程で持続的に観察されるコピー数異常並びに染色体異常は認められなかった。新たな細胞ソースとして期待できると考える。

・この学位論文は **Assessment of the Safety of Chondrocyte Sheet Implantation for Cartilage Regeneration : Tissue Engineering Part C** に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・ **Assessment of the Safety of Chondrocyte Sheet Implantation for Cartilage Regeneration : Tissue Engineering Part C** に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。