

細胞シートによる関節軟骨再生医療とガラス化保存技術の開発

前原美樹・豊田恵利子・高橋 匠・佐藤正人*

東海大学 医学部 外科学系 整形外科学
〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

Regenerative Medicine for Articular Cartilage using Chondrocyte Sheets and the Development of a Vitrification Method for Cell Sheets

Miki Maehara, Eriko Toyoda, Takumi Takahashi, and Masato Sato*

Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine
143, Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

We are undergoing clinical research for regenerative medicine using chondrocyte sheets for the treatment of articular cartilage. We previously concluded a successful clinical study using autologous chondrocyte sheets and are now conducting our second clinical study using allogeneic chondrocyte sheets. Currently, allogeneic chondrocyte sheets are fabricated from chondrocytes derived from the surgical remains of juvenile polydactyly patients, which show promise as a new cell source. The use of allogeneic chondrocytes allows the fabrication of chondrocyte sheets for transplantation from those cells whose safety and quality have been established prior to fabrication. However, to further accelerate joint treatment with chondrocyte sheets, the development of a practical system for storing a ready-made supply of chondrocyte sheets, i.e. a preservation system, is indispensable from the viewpoint of cost reduction and stable supply. Here, we report the development of a vitrification method for chondrocyte sheets that allow the long-term cryopreservation of transplantation-ready chondrocyte sheets. This technology will accelerate the popularization of chondrocyte sheets used in articular cartilage regeneration.

Keywords : chondrocyte sheet / osteoarthritis / articular cartilage / regenerative medicine / vitrification

1. はじめに

関節の軟骨は硝子軟骨と呼ばれ、高い粘弾性を示し、体重を支えながら関節のなめらかな動きを可能にする。構成成分の多くは細胞外基質が占めており、細胞自体はわずか5%ほどである。無血管の組織で、

一度損傷すると自然修復が困難であるため、関節軟骨の再生医療の実現が待ち望まれている。

我々はこれまでに、自己細胞を用いて作製した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行ってきた。現在、新たなセルソースとして多指症手術時廃棄組織から単離した軟骨細胞を用い、同種軟骨細胞シートによる再生医療臨床研究を行っている。一方、将来的により多くの患者に対し本治療を施行するためには、細胞シートのレディメイドな供給体制の構築が不可欠である。我々はこれまでに細胞シートの凍結保存技術の開発に関する

* Corresponding Author
Tel: 0463-93-1121
Fax: 0463-96-4404
E-mail: sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp

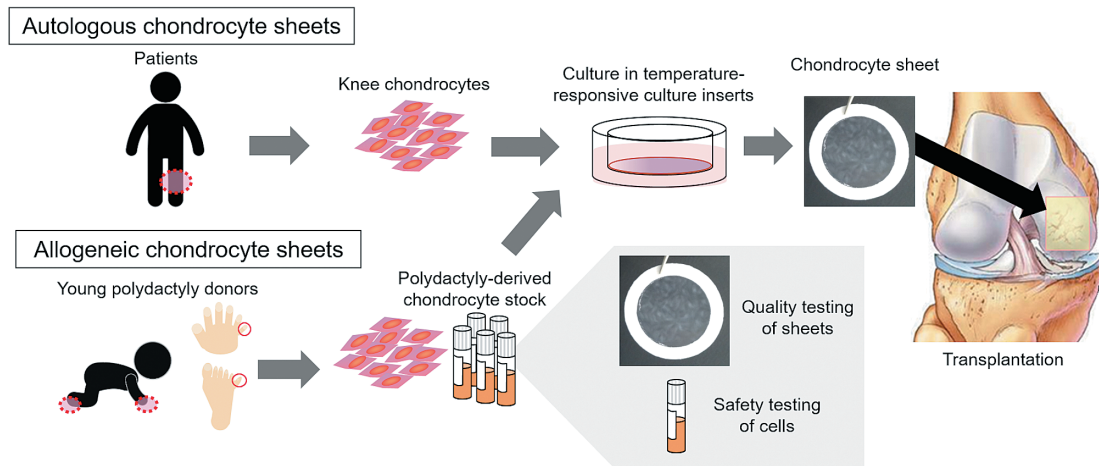


Fig. 1 Regenerative treatment of knee cartilage using chondrocyte sheets.

研究に取り組んできた。本稿では、軟骨細胞シートによる関節治療の概要と、細胞シートガラス化保存法の技術的特徴やその有効性について紹介する。

2. 軟骨細胞シートによる関節治療

2.1 関節軟骨治療の現状

変形性膝関節症は最も一般的な関節疾患の一つであり、事故やスポーツによる外傷、肥満や骨格、遺伝、加齢に伴う関節への過負担などの様々な要因により徐々に関節軟骨が変性する慢性の進行性疾患である。初期には軟骨表面の毛羽立ちや亀裂などの軟骨部分欠損がみられ、病態の進行に伴いやがて軟骨下骨が露出する軟骨全層欠損となる。最も深刻な症状の一つに疼痛があげられ、歩行や階段昇降で痛みを感じ、身体活動量の減少から Quality of Life が著しく阻害される。軟骨損傷に対する治療法として、欠損範囲の小さな損傷に対しては骨髄刺激法、骨軟骨柱移植術などが施行されるが、再生される軟骨は線維軟骨で、硝子軟骨と比較して力学的に劣り、長期の治療効果は望めない。より広範囲の軟骨損傷に対しては自家培養軟骨移植術が行われ、現在国内唯一の軟骨再生医療製品であるジャック®が用いられるが、対象疾患は外傷及び離断製骨軟骨炎に限られ、変形性膝関節症は適応外である。

変形性膝関節症に進行した重症の軟骨損傷については、生物学的に硝子軟骨を再生させる根本的治療法はなく、末期の患者には人工関節置換術が適応される。治療成績は優れているが、人工関節の耐用年数は15～20年と言われており、現状では再置換の可能性が低くなる65歳以上が適応となっている。このような背景から、変形性膝関節症を含む軟骨損傷に対する軟骨再生医療が望まれている。

2.2 細胞シート工学

細胞シート工学は、東京女子医大の岡野らによって開発された日本発の技術である。現在、角膜¹⁾、血管上皮²⁾、食道³⁾、心筋⁴⁾、歯根膜⁵⁾などの多くの組織を対象とした臨床研究および治験が進められている。細胞シートは、温度応答性ポリマー（poly-*N*-isopropylacrylamide）が均一に固定化された培養器材上で細胞を培養することにより作製できる。このポリマーは32℃以上で疎水性、32℃以下で親水性に変化する性質を持つため、コンフルエントな状態となった細胞をトリプシンなどの酵素を用いることなく、シート状に回収することが可能である^{6,7)}。細胞外マトリックスをはじめ、接着因子、表面タンパクを保持したまま、非侵襲的に細胞を回収することが出来るため、再生医療に用いる組織等の培養に適している。

2.3 軟骨細胞シートによる関節治療

我々は、関節軟骨再生を目指した軟骨細胞シートによる再生医療臨床研究を行ってきた。軟骨細胞を温度応答性培養器材にて培養すると、豊富な細胞外マトリックスの中に細胞を保持した軟骨細胞シートを作ることが出来る。この軟骨細胞シートを3層に積層化させて1週間培養することにより、十分な強度を持つ **monolithic structure** が形成される⁸⁾。この軟骨細胞シートを、ラット⁹⁾、ウサギ¹⁰⁾ およびミニブタ¹¹⁾ を用いた全層欠損モデル動物、ウサギを用いた部分欠損モデル動物¹²⁾ に移植した結果、軟骨欠損部に硝子軟骨での再生を認めた。変形性膝関節症でしばしば認められる全層欠損と部分欠損の両タイプの軟骨損傷が混在するような軟骨損傷に対しても、軟骨細胞シートが有効である可能性が示された。我々は、患者の自己細胞から作製した軟骨細胞シートによる

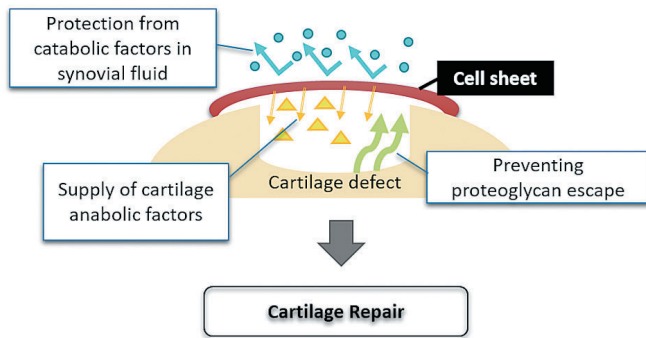


Fig. 2 Mechanism of cartilage repair using chondrocyte sheets.

関節軟骨再生医療をヒト幹細胞臨床研究として申請し、平成23年11月より患者への移植を実施した (Fig. 1)。本研究は変形性関節症の患者も含めて実施され、全8例の移植が終了している。全例において硝子軟骨での組織修復が確認され、臨床症状が改善した。現在は先進医療Bとして申請し、その実施を目指し研究を進めているところである。

しかしながら、自己軟骨細胞を用いる場合、軟骨組織採取のための手術が必要なこと、採取可能な組織量が限られること、細胞シートの品質に個人差があることなどが課題となる。軟骨細胞は免疫寛容な組織であることが知られていることから、我々は1歳前後の子供の多指症手術時廃棄組織より得られる指関節軟骨を用いた同種軟骨組織による細胞シート治療を考案した。同種軟骨細胞を用いることで上述の自己軟骨細胞を用いる場合の課題を解消出来る。また、多指症患者の細胞は幼弱で増殖性が高く、継代によって多くの細胞数を確保できるため、ロット化して管理することで安全性の評価も十分に実施可能で、均一な細胞を安定的に供給可能である。本研究は、厚生科学審議会再生医療部会にて受理され、大臣意見書の発布を受け、現在は再生医療安全性確保法の下、第1種再生医療等提供計画として臨床研究を実施している (Fig. 1)。

2.4 軟骨細胞シートの軟骨修復作用機序

軟骨細胞シートは、フィブロネクチンなどの接着因子を発現しており、優れた生着性を有する。移植した損傷部位を広範囲に被覆することにより、プロテオグリカンの流出の阻止や、関節液中の炎症系サイトカイン、細胞外マトリックス分解酵素等のカタボリック因子から防護するバリア機能を果たす (Fig. 2)。また、軟骨細胞シート自体がTransforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), Melanoma Inhibitory Activity (MIA), Prostaglandin E2などの液性因子を産生することもわかっている¹³⁾。つまり、軟骨

細胞シートがこれらの軟骨同化因子を持続的に供給し、軟骨下骨より誘導される骨髄由来幹細胞の軟骨分化を促進するイニシエーターとしての機能を果たしていると考えられる (Fig. 2)。また、軟骨細胞は、シート構造を構築することで、軟骨同化因子の産生量が有意に増加する¹³⁾。軟骨細胞シートの軟骨修復への作用機序には、シート自身が産生する液性因子によるパラクライン効果が大きく関与していると考えられる。

3. 細胞シートの凍結保存技術

3.1 細胞シート凍結保存技術開発の意義

前述のように、セルソースとして同種細胞を用いることで、安全性や品質が確認された細胞から軟骨細胞シートを作製可能な環境を整えることが出来る。しかしながら、現時点では軟骨細胞シートの完成には約2~3週間の培養期間を要する。軟骨細胞シートを安定的かつ経済的に供給するために、軟骨細胞シートそのものを『使いたいときにすぐに使える』、すなわちレディメイドな状態で保存し、より迅速に治療を行うことができるシステムの構築が必須となる。我々は、完成した細胞シートを安定的に長期間保存するための、細胞シート凍結保存技術の開発を行ってきた。

3.2 ガラス化法

細胞は多くの細胞内自由水を含む。生理的塩類溶液中で細胞を溶液の凝固温度以下に冷却すると、溶液の凍結に伴い細胞内外の水分が凍結し (氷晶形成)、細胞膜やオルガネラに物理的障害を与え、細胞の生存性に大きな影響を与えていると考えられている。そのため、従来の細胞凍結保存法は、細胞内外の氷晶形成をいかに抑制出来るかが重要なポイントであった。

一方、ガラス化法では、高濃度の凍害保護剤を含む溶液が急速に冷却されることによって、溶液が液相から固相に変化し、氷晶形成を伴わないガラス化状態 (アモルファス状態) となる。組織や細胞がガラス状態の中に封じ込められるので、氷晶形成が起こらない。また、試料とともにガラス化する溶液の量を最小化して用いる方法 (Minimum Volume Cooling Method; MVC法)¹⁴⁾により、ガラス化の状態がより安定化し、細胞の生存性が向上することが示されている¹⁵⁾。MVC法に基づくガラス化法は、凍結保存の難度の高い細胞や組織など、あるいはこれまでに凍結保存が成立しなかった対象物に有効である可能性が高い。

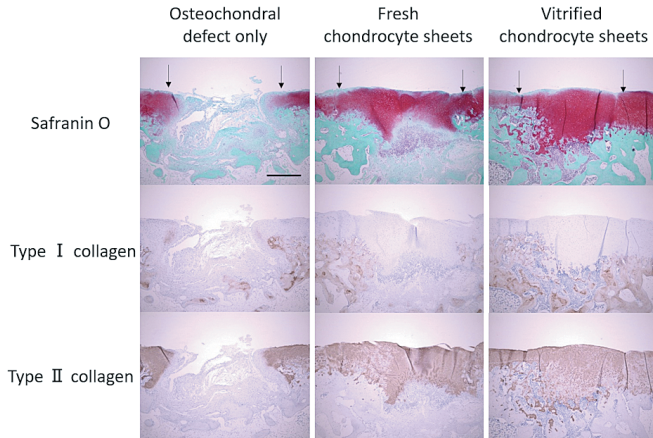


Fig. 3 Histological appearance from the transplantation of fresh or vitrified chondrocyte sheets. Safranin O staining and immunostaining for type I/II collagens for each group (scale bar = 1mm). (from Tani *et al.*, 2017)¹⁸⁾

3.3 細胞シート保存技術へのガラス化法の応用

従来、培養細胞シートの凍結保存において、凍結・融解に伴いシート状および層状の構造が破壊されることが問題となっていた¹⁶⁾。我々は、ウサギ軟骨細胞から作製した細胞シートを用い、軟骨細胞シートの構造を破損することなく凍結保存し得る、細胞シートガラス化保存技術を確立した¹⁷⁾。この方法は、凍害保護剤を含んだ粘性のあるガラス化液でシートを極めて薄く被覆し、液体窒素気相中（約 -150°C ）に保存するものである。MVC法のコンセプトに従い、細胞シートを最少容量の溶液とともにガラス化することが可能で、液体窒素内への浸漬に際する物理的な衝撃も回避することが出来る。これにより、薄層で脆弱な細胞シートを安定的に超低温保存することが可能となった。この方法を用いて1か月間ガラス化保存されたウサギ軟骨細胞シートを、融解後、日本白色家兎の軟骨欠損モデルへ移植した結果、新鮮な細胞シートと同様の軟骨修復効果を認めた (Fig. 3)¹⁸⁾。

3.4 同種軟骨細胞シートにおけるガラス化保存法の成績

我々は、細胞シートのガラス化保存技術を同種軟骨細胞シートへ適応するための条件検討を進め、ガラス化保存した多指症由来軟骨細胞シートの融解後の細胞生存性、微細構造、軟骨同化因子産生能について、新鮮な細胞シートとの比較検討試験を行った。その結果、融解後のシート構造に破損は見られず、ミクロ構造においても、強固な細胞間接着を持つ様子や、フィブロネクチンやコラーゲンなどの密な織

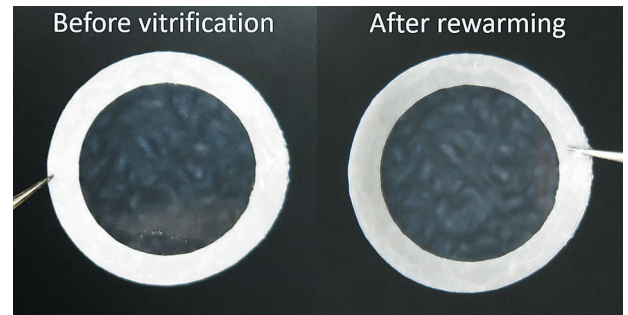


Fig. 4 The macrostructure of polydactyly-derived chondrocyte sheets before vitrification and after rewarming the vitrified sheet.

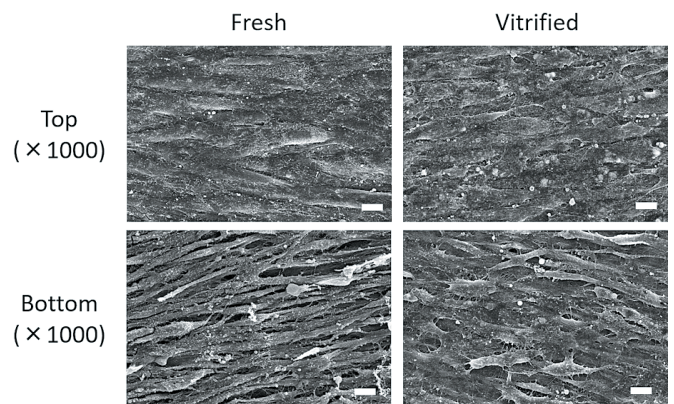


Fig. 5 The microstructure of polydactyly-derived chondrocyte sheets in the fresh and vitrified groups. (scale bar = 10 μm)

維状構造を持った細胞外マトリックスが観察され、これらは新鮮な細胞シートと同様の所見であった (Fig. 4, 5)¹⁹⁾。また、ガラス化後の軟骨細胞シート1枚当たりの平均生細胞数は、新鮮な細胞シートと比して有意な差を認めなかった¹⁹⁾。さらに、ガラス化後の軟骨細胞シート1枚当たりのTGF- β 1およびMIA産生量は、細胞数 (1×10^6) 当たりに換算すると、いずれも新鮮な細胞シートの90%以上に相当した¹⁹⁾。このように、我々の開発した細胞シートガラス化保存技術では、シート微細構造や細胞生存性に加え、細胞シートの機能も高く維持されることが考えられる。今後、異種同所性軟骨全層欠損モデル動物を用いて、*vivo*試験における治療効果の評価を行っていく予定である。

4. おわりに

同種軟骨細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究は、平成31年度の研究期間終了までに10症例の移植を予定しており、同時に移植用ドナー細胞の

収集と安全性の確認試験を進めている。平成30年2月現在、既に3症例の細胞シート移植試験を終え、経過は良好である。細胞シート凍結保存技術においては、更なる発展を目指し、細胞加工施設内や手術現場での使用を考慮した細胞シート保存容器の素材や形状の検討、低毒性な凍害保護剤の探索、より簡便で誰でも操作可能な凍結保存操作への改良を、現在進めている。安定供給可能な実用的システムの構築により、細胞シートを『使いたいときにすぐに使える』、すなわちレディメイドな状態にすることで、細胞シートによる関節治療の普及がより加速することを期待している。

本治療法が関節損傷に悩む多くの患者の根本的な治療法となることを信じ、一日も早い臨床応用を目指して今後も研究を推進していく。

文 献

- 1) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Nagai S, Kikuchi A, Tano Y, Okano T : *Transplantation*, **77** (3), 379-385 (2004)
- 2) Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : *Biomacromolecules*, **1** (3), 377-381 (2000)
- 3) Ohki T, Yamato M, Murakami D, Takagi R, Yang J, Namiki H, Okano T, Takasaki K : *Gut*, **55** (12), 1704-1710 (2006)
- 4) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : *Tissue Engineering*, **7** (2), 141-151 (2001)
- 5) Iwata T, Washio K, Yoshida T, Ishikawa I, Ando T, Yamato M, Okano T : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9** (4), 343-356 (2015)
- 6) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y : *Journal of biomedical materials research*, **27** (10), 1243-1251 (1993)
- 7) Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y : *Biomaterials*, **16** (4), 297-303 (1995)
- 8) Mitani G, Sato M, Lee JI, Kaneshiro N, Ishihara M, Ota N, Kokubo M, Sakai H, Kikuchi T, Mochida J : *BMC Biotechnology*, **9**, 17 (2009)
- 9) Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, Sato M : *Biomaterials*, **35** (7), 2199-2206 (2014)
- 10) Ito S, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J : *Biomaterials*, **33** (21), 5278-5286 (2012)
- 11) Ebihara G, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ito S, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J : *Biomaterials*, **33** (15), 3846-3851 (2012)
- 12) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, Mitani G, Sakai H, Mochida J : *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **349** (2), 723-731 (2006)
- 13) Hamahashi K, Sato M, Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9** (1), 24-30 (2015)
- 14) Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S : *Theriogenology*, **51**, 165 (1999)
- 15) Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP : *Reproductive biomedicine online*, **11** (3), 300-308 (2005)
- 16) Kito K, Kagami H, Kobayashi C, Ueda M, Terasaki H : *Cornea*, **24** (6), 735-741 (2005)
- 17) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H : *BMC Biotechnology*, **13**, 58 (2013)
- 18) Tani Y, Sato M, Maehara M, Nagashima H, Yokoyama M, Yokoyama M, Yamato M, Okano T, Mochida J : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **11** (12), 3437-3444 (2017)
- 19) Maehara M, Sato M, Toyoda E, Takahashi T, Okada E, Takizawa D, Matsumura K, Hyon SH, Nagashima H, Watanabe M : in *ORS 2017 Annual Meeting* (2017)

(Received 20 December 2017 ;

Accepted 4 January 2018)

著者略歴

前原 美樹 (まえはら みき)

2013年3月 明治大学大学院農学研究科修士課程修了
 2013年4月 明治大学農学部発生工学研究室 技術員
 2015年4月 東海大学医学部外科学系整形外科学 特定研究員
 現在に至る



豊田 恵利子 (とよだ えりこ)

1993年3月 東京理科大学大学院基礎工学研究科修士課程修了
 1993年3月 日本化薬株式会社総合研究所
 2006年3月 横浜市立大学木原生物学研究所 共同研究員
 2010年3月 博士(理学)(横浜市立大学)
 2013年4月 東海大学医学部外科学系整形外科学 特定研究員
 現在に至る



高橋 匠 (たかはし たくみ)

2006年6月 University of California, San Diego, Bioengineering : Pre-med Major 学士(理学) 修了
 2010年12月 University of Southern



California, Biomedical
Engineering Major :
Doctor of Philosophy 博
士課程中途退学
2014年7月 東海大学医学部外科学
系整形外科学 特定研
究員
現在に至る



佐藤 正人 (さとう まさと)
1991年3月 防衛医科大学校医学教
育部医学科卒業
1993年7月 自衛隊横須賀病院整形
外科 医官
2001年9月 防衛医科大学校医学教
育部医学研究科 (整形
外科学専攻) 修了
同 年10月 自衛隊横須賀病院整形
外科 科長
2003年10月 東海大学医学部外科学
系整形外科学 講師
2007年4月 同 准教授
2013年4月 同 教授
現在に至る