

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20680

研究課題名（和文）Characterization of polydactyly-derived chondrocyte sheets using cell surface markers

研究課題名（英文）Characterization of polydactyly-derived chondrocyte sheets using cell surface markers

研究代表者

高橋 匠（TAKAHASHI, Takumi）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：80783654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多指症由来軟骨組織より作製した細胞シート（PDシート）の有効性向上を目指し、細胞表面マーカーを用いた軟骨再生治療効果の高い細胞集団の同定を目的とした。細胞表面マーカーの網羅的解析により有効性と相関のあるマーカーを絞り込み、バリデーション試験によりマーカー候補を絞り込んだ。マーカー候補を用いて多指症由来軟骨細胞のセルソートと特性解析を行い、セルソート後の細胞よりPDシートの作製を試みた。シート化後に差は認めなかったが、セルソート直後の細胞では軟骨特性において差を認めた。よって、本研究ではPDシートの有効性評価指標として用いることが可能なマーカーの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症を対象とした根治的治療法を目指し、多指症由来軟骨細胞シートの開発を行っている。多指症由来軟骨細胞は、増殖性に優れている一方、継代培養時に軟骨再生治療効果が低下することやドナーに応じて軟骨再生治療効果が異なることが明らかとなっている。本研究では、PDシートの有効性評価指標として用いることが可能な細胞表面マーカーを同定した。高い再生治療効果が期待できる細胞シートを安定的に供給するための有効性評価指標として今後使用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to analyze the cell surface markers expressed by polydactyly-derived chondrocyte sheets (PD sheets) to identify cell populations with high cartilage regenerative potential. A comprehensive analysis of cell surface markers was performed to identify potential markers with correlation to efficacy, and further validation experiments were performed to narrow the search. Using the identified surface markers, we performed cell sorting and analyzed the cartilage properties of the cells in addition to fabricating PD sheets. Although significant differences were not detected for PD sheets fabricated after cell sorting, differences were detected for cells analyzed directly after cell sorting. As such, cell surface markers that may be used as efficacy markers for PD sheets were successfully identified in this study.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞シート 再生医療 変形性膝関節症 多指症 関節軟骨 細胞表面マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究室では、変形性膝関節症 (osteoarthritis of the knee=膝 OA) の根治的治療を目指し、これまで軟骨細胞シートの研究開発を行ってきた。膝 OA は外傷や加齢に伴い緩徐に進行する難治性の関節軟骨変性疾患であり、極めて罹患率の高い疾病であるが、根治的な治療法は確立されていない。

(2) 従来の関節軟骨損傷治療では、損傷部は瘢痕組織が線維軟骨で置換されるが、生体本来の硝子軟骨と比べて潤滑性が劣るため、長期的な負荷により力学的に破綻し、軟骨の変性が再度進行することで痛みの再発などが問題となることが多い。また、世界的に人口の高齢化が進行し、膝 OA の患者数がさらに増加することが懸念されている。

(3) 我々は、多指症手術時の廃棄組織より得られる軟骨組織より軟骨細胞を単離し、多指症由来軟骨細胞シート (PD シート) を作製している。これまでウサギやラットの異種同所性移植モデルにおいて、継代培養による PD シートの有効性の低下やドナー差においての有効性の変動を確認してきた。

(4) 多指症由来軟骨細胞に関して国内では、国立成育医療研究センターの共同研究者らが多指症由来軟骨細胞は CD14(-), CD31(-), CD34(-), CD45(-), CD117(-), CD133(-), CD29(+), CD44(+), CD73(+), CD90(+), CD105(+), CD166(+)) であり、継代に伴い CD29, CD73, CD105, CD166 の発現が低下していることを報告してきた (Nasu et al. J Cell Physiol. 2015)。本研究室では、PD シートの細胞は CD31(-), CD45(-), CD44(+), CD81(+), CD90(+)) と報告してきたが (Maehara et al. Inflamm Regen. 2017) 他の細胞表面マーカーがドナーや継代培養に応じて変動することが推察されるが、検証されたことはない。

2. 研究の目的

(1) 多指症由来軟骨細胞シート (PD シート) に存在する軟骨再生治療効果の高い細胞集団を、細胞表面マーカーを用いて同定する。

(2) 軟骨再生治療効果の高い細胞集団を特定する細胞表面マーカーを用いて細胞を分離し、分離後の細胞特性および分離後の細胞より PD シートを作製し評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞表面マーカーの網羅的解析

これまで *in vivo* や *in vitro* 評価により特定した軟骨再生治療効果が異なるドナーの PD シートを用いて、BD Lyoplate Screening Panels Human Cell Surface Markers (242 種のターゲットを対象) を用いた細胞表面マーカーの網羅的解析を行う。網羅的解析の結果と硝子軟骨形成能評価の結果で相関する細胞表面マーカー候補を絞り込む。

(2) 細胞表面マーカー候補のバリデーション試験

細胞表面マーカーの網羅的解析により同定した複数の細胞表面マーカー候補を用いて、新たなドナーより作製した PD シートの単染色によるバリデーション試験を行う。

(3) セルソートによるバリデーション試験

バリデーション試験により同定した細胞表面マーカーを用いてセルソートを行い、セルソート直後の細胞を用いて軟骨関連遺伝子の解析を行う。

(4) セルソートにより分離した細胞より作製した PD シートの評価

バリデーション試験により同定した細胞表面マーカーを用いてセルソートを行い、分離した細胞を用いて PD シートを作製する。完成した PD シートの硝子軟骨形成能を評価する。

4. 研究成果

(1) 細胞表面マーカーの網羅的解析

7 ドナーより PD シートを作製し、細胞表面マーカーの網羅的解析を実施した。PD シートに含まれる細胞は CD105/CD73/CD90 の高い陽性率 (>95%)、CD11b/CD14/CD19/CD34/CD45/HLA-DR の低い陽性率 (<5%) を示すことが確認された。1 ドナーにおいては CD34 の発現を認めた。これらの結果から、1 ドナーを除いて International Society for Cell Therapy (ISCT) の MSC minimum criteria に適合していた。また、CD9/CD10/CD13/CD29/CD44/CD49c/140a/140b/CD151/CD166 などの細胞表面マーカーにおいても高い陽性率 (>95%) を認めた。

in vitro 評価における硝子軟骨形成能評価と細胞表面マーカーの発現蛍光強度との相関解析

を行い、242種の細胞表面マーカーより10種の正の相関および10種の負の相関が高い細胞表面マーカーに絞り込んだ。これらの20種のマーカーを細胞表面マーカー候補とした。

(2) 細胞表面マーカー候補のバリデーション試験

16ドナーよりPDシートを作製し、バリデーション試験を行った。作製したPDシートの *in vitro* 評価を3次元培養法にて行い、COL2A1とCOL1A1の遺伝子発現比を硝子軟骨形成能として評価した。また、20種の細胞表面マーカー候補を単染色により解析した。硝子軟骨形成能と細胞表面マーカーの発現蛍光強度との相関解析の結果、これまで報告のあるCD73を含む正の相関が比較的高い2種および負の相関が比較的に高い2種の計4種の細胞表面マーカーを同定した。

(3) セルソートによるバリデーション試験

バリデーション試験により同定した4種の細胞表面マーカーをそれぞれ用いてセルソートを行い、セルソート直後の細胞を評価した。有効性の高い多指症細胞を用いて、それぞれの細胞表面マーカーでセルソートを行った結果、COL2A1, SOX9, ACAN, COMPの遺伝子発現において分離した細胞間で差があることが確認された。

(4) セルソートにより分離した細胞より作製したPDシートの評価

バリデーション試験により同定した4種の細胞表面マーカーをそれぞれ用いてセルソートを行い、分離した細胞よりPDシートを作製し硝子軟骨形成能を評価した。結果、各4種の細胞表面マーカーを用いて分離した細胞より作製したPDシートにおいては、硝子軟骨形成能において有意な差は確認されなかった。

(5) まとめ

これらの結果から、同定した細胞表面マーカーはPDシートの有効性評価に有用であることが確認された。一方で、分離した細胞より作製したPDシートにおいては差が確認されなかったことから、セルソートより分離した細胞から作製したPDシートでより高い軟骨再生治療効果を得るには、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋匠、佐藤正人、川口祐加、豊田恵利子、前原美樹、和才志帆、渡辺雅彦
2. 発表標題 多指症由来同種軟骨細胞シートの細胞表面マーカー解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Takahashi, Masato Sato, Yuka Kawaguchi, Eriko Toyoda, Miki Maehara, Ayako Watanabe, Shiho Wasai, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 Surface markers for the characterization of polydactyly-derived chondrocyte sheets
3. 学会等名 TERMIS-AP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋匠、佐藤正人、川口祐加、豊田恵利子、前原美樹、岡田恵里、内山綾香、森岡美帆、山下晃弘、赤松正、妻木範行、渡辺雅彦
2. 発表標題 自己および同種軟骨細胞シートの細胞表面マーカー解析
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養物、細胞培養物の評価方法、細胞培養物の製造方法、及び軟骨様組織形成特性評価用マーカー	発明者 佐藤正人、高橋匠、川口祐加、角田智志、佐藤千香子	権利者 東海大学、株式会社セルシード
産業財産権の種類、番号 特許、2020-044265	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現
<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	豊田 恵利子 (TOYODA Eriko) (90749269)	東海大学・医学部・特定研究員 (32644)	
研究協力者	内山 綾香 (UCHIYAMA Ryoka)	東海大学・医学部・大学院生 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------