

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791666

研究課題名(和文)細胞シートによる関節軟骨損傷治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the articular cartilage injury therapy with the cell sheet

研究代表者

小久保 舞美(KOKUBO, Mami)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：40535209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】我々は細胞シートによる関節軟骨の修復再生を目指している。今回、様々な酸素濃度環境下で軟骨細胞シートを作製しその特性を評価した。【方法】ヒト関節軟骨細胞およびヒト滑膜細胞を共培養し、酸素濃度2%下で培養する群、酸素濃度5%培養群、酸素濃度20%培養群の3群を作製し、培養14日まで経時的に各々の軟骨細胞増殖度を計測した。次に共培養積層化軟骨細胞シートを作製し、DMMB Assay、real time PCR法を用いて発現を検討した。【結果】他群と比較してより深層部に近い2%酸素濃度環境下では、より早く細胞外基質に富んだ積層化軟骨細胞シートを作製することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Background: We attempted regeneration of the articular cartilage using layered chondrocyte sheets prepared with temperature-responsive culture dishes. However, for clinical application, it is necessary to evaluate the characteristics of the cells in these sheets, identify their similarities to naive cartilage, and develop a technique to produce the cell sheets in shorter period. We paid attention to in vivo cartilaginous oxygen concentration. Methods: We made a cell sheet under various oxygen concentration environment and evaluated the characteristics. Result: We were able to manufacture the product stratification cartilage cells sheet which it was earlier and were full of extracellular matrices.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・整形外科学

キーワード：関節病学 再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は高齢社会を向かえた現在の日本において、最も患者数の多い疾患と言っても過言ではなく、東京大学 22 世紀医療センターの調査では 2400 万人とも言われている。変形性膝関節症(Osetoarthritis, OA)に限定すると、60 歳以上では何らかの X 線学的所見が 80% 以上に出現しており、約 40% が症状を有し、約 10% が日常生活に支障をきたしているといわれている。一方で骨折、前十字靭帯損傷、半月板損傷などの外傷後や、血友病、先端巨大症などの基礎疾患を有する場合には、40 歳以下の若年者にもしばしばみられる。膝関節軟骨損傷における治療方法として、再生医療が注目されている。現在までの報告では、1994 年に Brittberg ら(N Engl J Med 1994)が初めて報告した自家軟骨移植法 (Autologous Chondrocyte Transplantation, ACT)がその一つとして挙げられる。ACT による OA の治療は欧米や韓国では臨床的に用いられている方法である。国内でも非荷重部の関節軟骨から単離した軟骨細胞や、MSC を用いて組織工学的に軟骨を作製し、骨軟骨全層欠損例には臨床応用が開始されている。広島大学では atelocollagen gel を担体として用いた 3 次元軟骨細胞培養で作製した組織工学的軟骨を軟骨欠損部位へ骨膜パッチと共に移植している。しかし、これらは外傷性の骨軟骨損傷や離断性骨軟骨炎であり、軟骨欠損範囲が元々小さな症例に適応とされており、高齢者に発生する広範な軟骨の変性と初期段階の部分欠損を伴う OA の治療には踏み込めていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト軟骨細胞における増殖や分化のメカニズムを解明し、広範囲の関節軟骨損傷にも対応できる【細胞シートによる関節軟骨損傷治療法の開発】の確立である。

### 3. 研究の方法

関節内において、軟骨がおかれている環境の酸素濃度は、約 2% ~ 4% とも言われている。また膝軟骨細胞の環境は、荷重というメカニカルストレスが特徴として挙げられ滑膜組織の提供する栄養素は、荷重によって軟骨内部にもたらされると推察される。軟骨細胞シート移植法の臨床応用へ向け、更なる培養期間短縮のために、培養環境を関節内での環境に近づけた培養法を検討する。【方法】本学臨床研究審査委員会承認の下、患者同意のもと肩関節制動術の際時に得られたヒト関節軟骨細胞および ACL 再建術時に得られたヒト滑膜細胞(合計 22 例)を単離後 24 穴カルチャーインサート用プレートに滑膜細胞を、温度応答性インサート内に軟骨細胞を播種して共培養をし、酸素濃度 2% で培養する群(2% 群)、酸素濃度 5% で培養する群(5% 群)、酸素濃度 20% で培養を行う群(20% 群)の 3 群を作製し、培養 14 日まで経時的に各々の軟骨細胞増殖度を MTT assay で計測した。また、

温度応答性インサートを用いて同様に培養を行い同条件下で、共培養積層化軟骨細胞シート(L-2%群、L-5%群、L-20%群)を作製し、プロテオグリカン量(以下 PG 量)を DMMB Assay を用いて測定し、real time PCR 法を用いて COL1、COL2 等の軟骨形質維持に関する遺伝子発現を検討した。

### 4. 研究成果

生体内での軟骨表面の酸素濃度と同程度の 5% 群は、20% 群と比べ有意な差はなかったが、深層部に近い 2% 下ではより早く細胞外基質に富んだ積層化軟骨細胞シートを作製することが可能であった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. 査読有 Yuko Takaku, Kunihiro Murai, Taku Ukai, Satoshi Ito, Mami Kokubo, Masaaki Satoh, Eiji Kobayashi, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Mamoru Takeuchi, Joji Mochida, Masato Sato  
In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint *Biomaterials* 35(7), 2199-2206, 2014.
2. 査読有 Genya Mitani, Masato Sato, Masayuki Yamato, Mami Kokubo, Tomonori Takagaki, Goro Ebihara, Teruo Okano, Joji Mochida  
Potential utility of cell sheets derived from the anterior cruciate ligament and synovium fabricated in temperature-responsive culture dishes.  
*J Biomed Mater Res Part A: Published online* 2013 in Wiley Online Library

- (wileyonlinelibrary.com). DOI:  
10.1002/jbm.a.34962
3. 査読有 Miki Maehara, Masato Sato, Masahito Watanabe, Hitomi Matsunari, Mami Kokubo, Takahiro Kanai, Michio Sato, Kazuaki Matsumura, Suong-Hyu Hyon, Munetaka Yokoyama, Joji Mochida and Hiroshi Nagashima  
Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. BMC Biotechnol 13(58), 2013.
  4. 査読有 Kokubo M, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Ebihara G, Okano T, Mochida J  
Characterization of chondrocyte sheets cultured using heat-sensitive inserts.  
J Tissue Eng Regen Med (2013) Published online in Wiley Online Library.
  5. 査読有 Hamahashi K, Sato M, Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J  
Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets.  
J Tissue Eng Regen Med (2012) Published online in Wiley Online Library.
  6. 査読有 Ito S, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J  
Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. Biomaterials 33(21), 5278-5286, 2012.
  7. 査読有 Ebihara G, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ito S, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J  
Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. Biomaterials 33(15), 3846-3851, 2012.
  8. 査読有 高久裕子, 村井邦彦, 鷓養拓, 伊藤聡, 小久保舞美, 小林英司, 竹内護, 持田讓治, 佐藤正人  
ラット膝関節内へ移植した細胞シートの Bioluminescence による経時的評価  
臨床整形外科 47(1), 27-31, 2012.

〔学会発表〕(計 30 件)

1. 第13回日本再生医療学会 2014.3.4-6  
京都  
ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発：実用化に向けた改良研究-1：共同演者  
前原美樹、佐藤正人、松成ひとみ、内倉鮎子、松村幸奈、坂井理恵子、小久保舞美、松村和明、玄丞然、持田讓治、長嶋比呂志
2. 第13回日本再生医療学会 2014.3.4-6  
京都  
低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価：ポスター発表  
小久保舞美、佐藤正人、三谷玄弥、高垣智紀、内山善康、繁田明義、持田讓治
3. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.14-15 京都  
関節軟骨細胞初代培養時の Ascorbic acid の影響：ポスター発表  
小久保舞美、佐藤正人、内山善康、繁田明義、持田讓治
4. 第12回日本再生医療学会 2013.3.21-23  
横浜  
Array Comparative Genomic Hybridization および G バンド分染法を用いた軟骨細胞の安全性評価：共同演者  
小林美由希、佐藤正人、河毛知子、横山宗昂、小久保舞美、三谷玄弥、高垣智紀、的場亮、伊東紀子、持田讓治
5. 第50回日本人工臓器学会 2012.11.26  
福岡  
積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響：共同演者  
加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、河毛知子、宮島敦子、持田讓治、松岡厚子
6. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会  
2012.10.26-27 名古屋  
軟骨細胞シートの安全性評価：共同演者  
小林美由希、佐藤正人、小久保舞美、河毛知子、鶴養拓、伊藤聡、長井敏洋、林克之、

伊東紀子、持田讓治

7. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2012.10.26-27 名古屋  
積層化軟骨細胞シートによって分泌された液性因子の検討：共同演者  
浜橋恒介、佐藤正人、小久保舞美、三谷玄弥、伊藤聡、長井敏洋、海老原吾郎、沓名寿治、持田讓治
8. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会  
2012.10.26-27 名古屋  
低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価：口演発表  
小久保舞美、佐藤正人、三谷玄弥、内山善康、繁田明義、持田讓治
9. 第11回日本再生医療学会 2012.6.12-14  
横浜  
積層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植による関節軟骨治療効果の検討：共同演者  
伊藤聡、佐藤正人、小久保舞美、小林美由希、鶴養拓、長井敏洋、三谷玄弥、持田讓治
10. 第11回日本再生医療学会 2012.6.12-14  
横浜  
細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究：共同演者  
佐藤正人、加藤俊一、加藤玲子、阿久津英憲、長嶋比呂志、村井邦彦、石原美弥、中村嘉彦、三谷玄弥、高垣智紀、海老原吾郎、伊藤聡、小林美由希、小久保舞美、持田讓治
11. 第11回日本再生医療学会 2012.6.12-14  
横浜  
in vitro における同種軟骨細胞(シート)の免疫応答におよぼす影響：共同演者  
加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、持田讓治、松岡厚子
12. 第 11 回 日 本 再 生 医 療 学 会  
2012.6.12-14 横浜  
ウサギ軟骨細胞シートの新規ガラス化保存法の開発：共同演者  
前原美樹、松成ひとみ、金井貴博、小久保舞美、松村和明、玄丞然、佐藤正人、

- 長嶋比呂志
13. 第25回日本軟骨代謝学会 2012.3.9-10  
愛知  
CGH(Comparative Genomic Hybridization)を用いた培養軟骨細胞の安全性評価：共同演者
14. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2012.2.4-7 San Francisco  
Analysis of function of miR-199a-3p and miR-320c in chondrocytes：共同演者  
Taku Ukai, Masato Sato, Hidenori Akutsu, Akihiro Umezawa, Toshihiro Nagai, Mami Kokubo, Joji Mochida
15. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20-21 群馬  
細胞シートによる関節治療を目指したトランスレーショナルリサーチ：共同演者  
佐藤正人、三谷玄弥、金城永俊、長井敏洋、沓名寿治、高垣智紀、伊藤聡、鵜養拓、小久保舞美、持田讓治
16. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20-21 群馬  
積層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討：共同演者  
伊藤聡、佐藤正人、小久保舞美、鵜養拓、長井敏洋、沓名寿治、三谷玄弥、持田讓治
17. 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 東京  
血管新生阻害薬(Bevacizumab)静脈内投与による関節軟骨修復の検討：共同演者  
長井敏洋、佐藤正人、沓名寿治、海老原吾郎、伊藤聡、小久保舞美、鵜養拓、持田讓治
18. 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 東京  
細胞シート膝関節移植後のBioluminescens Imagingを用いた移植細胞の追跡：共同演者  
高久裕子、村井邦彦、小久保舞美、伊藤聡、持田讓治
19. 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 東京  
再生医療に向けた前十字靭帯,滑膜由来細胞シートの検討：共同演者  
三谷玄弥、佐藤正人、小久保舞美、宿南知佐、持田讓治
20. 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 東京  
積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討：共同演者  
浜橋恒介、佐藤正人、小久保舞美、三谷玄弥、伊藤聡、長井敏洋、海老原吾郎、沓名寿治、持田讓治
21. 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2 東京  
家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討：共同演者  
伊藤聡、佐藤正人、小久保舞美、鵜養拓、長井敏洋、三谷玄弥、持田讓治
22. 第24回日本軟骨代謝学会 2011.3.4-5 福岡  
in vitro における培養軟骨細胞の免疫応答におよぼす影響：共同演者  
加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、持田讓治、松岡厚子
23. 第24回日本軟骨代謝学会 2011.3.4-5 福岡  
軟骨細胞初代培養時におけるアスコルビン酸の影響とその添加時期の検討：口演発表  
小久保舞美、佐藤正人、内山善康、繁田明義、伊藤聡、鵜養拓、持田讓治
24. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.2.13-16 Long Beach  
Jellyfish mucin may have potential disease modifying effects of osteoarthritis of the knee：共同演者  
Naoshi Ohta, Masato Sato, Kiminori Ushida, Mami Kokubo、Takayuki Baba、Kayoko

Taniguchi、Makoto Urai、Koji Kihira、Joji Mochida

25. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.2.13-16 Long Beach

Evaluation of characteristics of chondrocyte sheets using co-culture method with allogeneic synovial cells :  
ポスター発表

Mami Kokubo、Masato Sato、Genya Mitani、Uchiyama Yoshiyasu、Akiyoshi Handa、Toshiharu Kutsuna、Satoshi Ito、Taku Ukai、Naoshi Ota、Toshihiro Nagai、Kousuke Hamahasi、Joji Mochida

26. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.14-15 京都

積層化軟骨細胞シートの液性因子の解析：共同演者

海老原吾郎、佐藤正人、小久保舞美、三谷玄弥、伊藤聡、太田直司、長井敏洋、沓名寿治、持田讓治

27. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.14-15 京都

滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移植タイプによる軟骨再生効果：共同演者

LEE J.、佐藤正人、三谷玄弥、伊藤聡、小久保舞美、持田讓治

28. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.14-15 京都

抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体 (Bevacizumab) 投与による骨軟骨修復効果の検討：共同演者

長井敏洋、佐藤正人、沓名寿治、小久保舞美、海老原吾郎、太田直司、持田讓治

29. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.14-15 京都

再生医療に向けた前十字靭帯、滑膜由来細胞シートの検討：共同演者

30. 第28回日本整形外科学会  
基礎学術集会

2013.10.17-18 千葉

自己細胞移植における array comparative genomic hybridization および G バンド分染法を用いた過継代軟骨細胞の安全性評価：共同演者

小林美由希、佐藤正人、河毛知子、岡田恵理、横山宗昂、小久保舞美、三谷玄弥、高垣智紀、的場亮、伊東紀子、持田讓治

〔図書〕(計1件)

1 .遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元培養組織化-その最先端技術と材料技術 (2014年)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 舞美(KOKUBO, Mami)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：40535209