HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究
Author(s)	佐藤, 康史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第11925号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11925
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60946
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Sato.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究

Process engineering study on preparation of Cartilage-like cell sheet for transplantation

佐藤　康史
北海道大学
2015 年

目　次

第 1 章　序論 ……1

第 2 章　スキャフォールドフリー軟骨様細胞シートの収縮防止法の検討 ……25
2-1.　緒言 ……26
2-2.　材料と方法 ……27
2-3.　結果と考察 ……33
2-3-1.　軟骨様細胞シートにおける培地組成の影響の検討 ……33
2-3-2.　血清が軟骨様細胞シートの収縮に与える影響の検討 ……38
2-3-3.　細胞が由来するドナーの差違による影響の有無の検討 ……41
2-3-4.　血清濃度の違いによる軟骨様細胞シートへの影響の検討 ……44
2-4.　結言 ……52

第 3 章　Xeno-free 法による軟骨様細胞シート作製法の検討 ……53
3-1.　緒言 ……54
3-2.　材料と方法 ……56
3-3.　結果と考察 ……63
3-3-1.　ヒト血清を用いた軟骨様細胞シート作製の検討 ……63
3-3-2.　Xeno-Free（異種動物成分不含）法で増殖させた MSC を用いた
軟骨様細胞シート作製の検討 ……73
3-4.　結言 ……78

第 4 章　軟骨様細胞シートのⅡ型コラーゲン蓄積量増大法の検討 ……79
4-1.　緒言 ……80
4-2.　材料と方法 ……82
4-3.　結果と考察 ……85
4-3-1.　軟骨様細胞シートに及ぼすアスコルビン酸の効果の検討 ……85
4-3-2.　軟骨様細胞シートに及ぼすグルタチオンの効果の検討 ……89
4-3-3.　軟骨様細胞シートに及ぼすⅠ型アテロコラーゲンの効果の検討 ……91
4-3-4.　Ⅰ型アテロコラーゲンとアスコルビン酸の同時添加の効果の検討 ……94
4-4.　結言 ……98

第 5 章　軟骨様細胞シートの分化度の非浸襲的評価方法の開発 ……99
5-1.　緒言 ……100
5-2.　材料と方法 ……102
5-3.　結果と考察 ……106
5-3-1.　軟骨細胞の再分化培養における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査 ……106
5-3-2.　MSC の軟骨分化培養（ペレット培養）における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査 ……111
5-3-3.　MSC の軟骨分化培養（シート培養）における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査 ……114
5-4　結言 ……119

第 6 章　総括 ……120

参考文献 ……126

謝辞

第１章

序論

1-1.　再生医療と幹細胞

1-1.1.　再生医療とは

総務省統計局の報告によると、2014 年 4 月 1 日現在、日本の総人口は約 1 億 2700 万人であり、そのうち 65 歳以上の高齢者の人口は約 25.6%の約 3248 万人であり、超高齢化社会と呼ばれる状態である。さらに今後も高齢化は進むと予想され、65 歳以上の人口割合は 2025 年には 30%を超え、2060 年には約 40%に達するとみられている。このように近年、急速に高齢化が進む日本では医療が重要な役割を果たすと考えられており、様々な医療技術の研究が進んでいる。その中の一つとして再生医療が非常に注目されており、現在盛んに研究が行われている。

再生医療とは、病気や外傷などにより機能不全・機能障害に陥った臓器や生体組織に対し、細胞の移植や体内の細胞を活性化させることにより、その機能を回復および正常化させる医療技術である（1)。近年、この再生医療が注目され、臓器移植や薬剤治療などに代わる新たな医療技術として期待されており、現在では様々な臓器や組織で研究が行われている。その一方で、再生医療の実用化にはさまざまな課題が残されている。例えば、治療に適した細胞を大量に確保する方法や、細胞の性質を維持したまま培養する方法、移植に適した組織の作製方法、患部に細胞を効果的に移植する方法、また移植する細胞の品質管理の方法などの課題である。これらの課題を解決するためには、細胞自身の知見が得られる細胞生物学の研究だけではなく、必要な細胞を確保するための培養プロセスを設計する培養工学や、細胞を用いて生体機能を備えた組織や臓器を作製するための組織工学（Tissue engineering）など工学的な研究が不可欠である。組織工学は、1993 年に Langer と Vacanti により提唱され、細胞（Cell）・足場材料（Scaffold）・成長因子（Growth factor）の 3 つの要素を適切に組み合

わせることにより生体機能を持った臓器や組織を再生できるとされた（2)。組織工学は移植組織の機能を決定する上で重要であり、再生医療において重要な研究分野である。

1-1.2. 幹細胞とは

再生医療において主に用いられる細胞源は体細胞と幹細胞に大きく分けられる。体細胞は生体の組織や臓器を構成している細胞であり、移植後の機能や周辺組織との親和性が高いと考えられている。現在、表皮細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、粘膜上皮細胞などが実際に再生医療の臨床研究に使用されている（3-6)。しかし、体細胞は採取の際に正常組織の侵襲を伴うため、採取できる量が限られる上、一般に増殖能が低いと言われる。また生体外で培養すると細胞が脱分化を起こし性質が異なる細胞になってしまうことがあるため、性質を維持した体細胞を大量に確保することが困難である。

そこで、これらの問題点を解決するため、再生医療の有望な細胞源として幹細胞（Stem cell）の研究が進んでいる。幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ細胞であり、体細胞（分化細胞）の供給源である。幹細胞は主に多能性幹細胞と体性幹細胞の 2 つに分類される。

多能性幹細胞はほぼ無限の増殖能を有し、個体を構成する三胚葉全ての組織細胞に分化する能力（多能性）を持つ細胞であり、再生医療に用いられているのは、主に胚性幹細胞（Embryonic Stem Cell： ES 細胞）と人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cell：iPS 細胞）である。このうち ES 細胞は受精卵から発生した胚盤胞の内部細胞塊から樹立され、個体を構成する三胚葉全ての組織細胞に分化する能力を持つ（7-9)。しかし、ES 細胞は受精卵を破壊して作製するため倫理的な問題が存在する。そのため、臨床研究があまり進んでい

ないのが現状である。一方、iPS 細胞は 2006 年に Yamanaka らによって樹立され、線維芽細胞に Oct3/4、Sox9、Klf4、c-Myc の 4 種の遺伝子を導入することにより作製された（10, 11）。iPS 細胞は自家の成熟細胞を用いて ES 細胞とほぼ同質の細胞を作製できるので、拒絶反応や倫理的な問題を回避できることが利点である。そのため、精力的に研究が行われ、2014 年には世界初の臨床研究として iPS 細胞から作製した網膜色素上皮細胞の移植が行われた。しかし、iPS 細胞は作製効率が低く、移植に必要な細胞数を確保するには非常に時間とコストがかかることなどの経済的な問題や、樹立の際に遺伝子導入を行うこと、均一な細胞集団を確保することが困難であること、また移植後に腫瘍化しやすいことなど安全性にも問題があるため臨床研究に用いるには解決しなければならない課題が多い。

これらに対し、生体内に存在する幹細胞として、造血幹細胞や神経幹細胞に代表される体性幹細胞がある。体性幹細胞は多能性幹細胞より分化能が限定的であり、一般的に増殖能も多能性幹細胞より劣る。しかし、胎生期において様々な組織や器官を構築するだけでなく、成体においても様々な組織に存在しており、増殖、分化を繰り返して個体の恒常性維持、あるいは組織損傷時の修復に関与しているものと考えられている。また、もともと生体組織に存在する幹細胞であるため、多能性幹細胞と比べ、移植後の腫瘍化などの危険性が低いと考えられる。また、体性幹細胞ではこれまでに造血幹細胞移植などの臨床での実績があるため、体性幹細胞を用いた再生医療は臨床応用へのハードルが低いと考えられる。このように体性幹細胞は再生医療において最も臨床応用を実現しやすい重要な細胞源と考えられている。

1-1.3. 間葉系幹細胞

体性幹細胞の一つとして間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）がある。1966 年に Friedenstein らは骨髄中に骨細胞や軟骨細胞へ分化する細胞が存在することを報告した（12)。1999 年に Pittenger らによって成人の骨髄中に存在する MSC は自己複製能と、骨、軟骨、脂肪などの間葉系細胞への多分化能を有することが確認された（13)。骨髄以外からも脂肪、滑膜、臍帯血、胎盤など様々な組織から採取可能なことがこれまでに分かっている。最近では、MSC は中胚葉性の間葉系細胞だけでなく、胚葉の境界を超えて外胚葉由来である神経細胞（14, 15）や内胚葉由来である肝細胞（16,17）にも分化可能なことが報告されている。MSC を特異的に同定するための表面抗原の種類はまだ完全に決定されていないが、一般的に CD29、CD44、CD71、CD90、CD105、CD106、CD166、Stro-1 などが陽性で、CD14、CD34、CD45 などが陰性であるとされている（18)。MSC は免疫抑制効果についても報告があり、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、NK 細胞の活性化や増殖、成熟を抑制する効果やプロスタグランジン E2（PGE2）や IL-10 などを産生することが報告されている（19-23)。これらのことから MSC は移植片対宿主病（GVHD）の治療に応用されている（24)。このように MSC は高い増殖能と多分化能を持ち、免疫抑制効果も有する。また、ES 細胞のような生命倫理的問題も少なく、iPS 細胞のように奇形腫の形成の可能性もないと考えられている。

MSC は様々な組織から採取可能であるが、その中でも最も古くから研究されているのが骨髄由来 MSC である。骨髄 MSC が持つ他の由来の MSC にはない利点として、骨髄移植などで行われる骨髄穿刺により採取できるため、採取法が確立されており、比較的低侵襲で採取できる点がある。また、シャーレに播種することで接着性の細胞として容易に分離できる点がある（25)。骨髄に存在

する細胞は、血球系の細胞とそれを支持する間質細胞（Stromal cell）の 2 種類に大きく分けられるが、MSC は間質細胞の一種である。間質細胞はサイトカインや栄養因子を産生して、血球系細胞の造血細胞の支持や分化に貢献しており、MSC も同様な作用をしていると考えられている。骨髄中の細胞は上述のように 2 種類あるが、そのほとんどが血球系の細胞であり、間質細胞は非常に少ない。MSC も骨髄中に含まれる全有核細胞のうち 0.001～0.01%程度でしか存在していないとされている（13)。しかし、血球系の細胞は非接着性であるため、MSC を接着性細胞として回収し、増殖させることにより治療に必要とする十分な細胞数を得ることができる。また最近では、成人の骨髄中に、ES 細胞に匹敵する増殖能、分化能を有する細胞が存在することが報告されており、そのような細胞には Multipotent adult progenitor cell (MAPC)（26）や Multilineage-differentiating stress enduring cell (Muse cell) (27) などがある。

このように MSC は多分化能やサイトカインなどの液性因子の産生、免疫抑制効果を有していることや、比較的低侵襲で容易採取できること、増殖能が高く大量の細胞を確保できること、安全性が高いことなどの利点があることから、細胞治療や組織再生の細胞源として非常に有望視されている。そのため現在、GVHD の細胞治療だけではなく、脳梗塞や脊椎損傷の治療や、軟骨や骨などの組織再生など、現在多くの臨床研究が進んでいる。

1-2.　軟骨組織と治療法

1-2-1.　軟骨組織の種類と特徴

軟骨は骨とともに骨格系を形成する結合組織であり、組織学的に、硝子軟骨、線維軟骨、弾性軟骨の三種類に分けられる（28)。硝子軟骨は関節軟骨や肋軟骨、気管などに存在し、白色、平滑で光沢に富み弾性を有する。II 型コラーゲンのほか、アグリカンなどのプロテオグリカンを豊富に含み高い粘弾性を有することが特徴である。線維軟骨は関節半月や椎間円板などに存在し、細胞成分が少なくコラーゲンを大量に含むのが特徴である。大量のコラーゲン線維、特に I 型コラーゲンが豊富に存在するがプロテオグリカン蓄積が少なく、硝子軟骨と比べ弾性が低いとされる。弾性軟骨は耳介や喉頭蓋に存在し、コラーゲンの他にエラスチンなどの弾性線維を多く含むため弾力性を有する。軟骨組織は一般に血管、神経、リンパ管などを欠くため再生能力が乏しく、欠損した場合自然治癒しない。そのため再生医療による軟骨再生治療方法の開発が期待されている。

1-2-2.　関節軟骨

関節は骨端部を覆う関節軟骨、その周囲を取り囲む関節包とそれを裏打ちする関節滑膜より構成され、その内腔に関節液が貯まっている。関節軟骨は骨端の摩耗を防ぐと同時に大きな荷重に対する緩衝装置として機能している。関節軟骨は組織学的に硝子軟骨に分類され、約 2%の軟骨細胞と、軟骨細胞が産生した豊富な細胞外マトリックス（Extracellular matrix：ECM）で構成されている。ECM のうち約 70%は水分であり、約 20%をコラーゲン、約 10%をアグリカンなどのプロテオグリカンが占める（29)。

軟骨に存在するコラーゲンのうち約 80~90%を占めるのが II 型コラーゲンで

ある（29）。II 型コラーゲンは他のコラーゲンと比べ分子鎖中のハイドロキシリジンの割合が高く、糖鎖修飾も多いことなどから、細線維の線維径が他のコラーゲンと比べ細いことが特徴である（30）。軟骨組織にはⅡ型コラーゲンの他に IX、XI 型コラーゲンなどが存在する。これらが会合した複合体を形成することにより網目構造（コラーゲンネットワーク）を形成し、軟骨組織の力学的支持体となっており、抗張力性を担っている。

軟骨に含まれるアグリカンは分子量約 2500 kDa であり、約 220 kDa のコアタンパク質に 100 本以上のグルコサミノグリカン（GAG）鎖が結合したプロテオグリカンである。さらに、アグリカンのコアタンパク質はヒアルロン酸結合能を持ち、リンクタンパク質（Link protein）と共にヒアルロン酸と巨大な会合体を形成する（29）。GAG はコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸などの二糖が繰り返し結合している多糖であるが、糖残基の多くが硫酸基またはカルボキシル基を持つため、分子全体が強く負に帯電している。そのため Na^+などの陽イオンを大量に引き付け、浸透圧が上昇するため大量の水分子を GAG 分子内に保有する（30）。これにより GAG は膨潤し、ECM の圧縮力にたえる、膨潤圧を有している。

関節軟骨はコラーゲンネットワークの間隙に大量の水和水を保持したプロテオグリカンやヒアルロン酸が密に存在するため、高い粘弾性を有し、関節運動によるせん断力や荷重による圧縮力に耐えることができる（31）。また、滑膜細胞や軟骨細胞から分泌されたヒアルロン酸により関節軟骨表面の摩擦係数は低く、関節の円滑な運動が可能になり、さらに軟骨自体の摩耗も抑えられている。

一方で、関節軟骨は血管や神経、リンパ管等が存在しないため炎症反応が働かないことや、豊富な ECM の存在のため細胞が遊走できないこと、また、軟骨細胞自体が高度に分化しているため増殖能が低いことにより軟骨組織の自己修

復能は極めて低い。そのため、一度損傷すると自然治癒せず、欠損部は再生しない（32, 33）。例えば、欠損部が軟骨層内の部分欠損の場合、損傷周囲の軟骨細胞が活性化され ECM 合成が多少増加するが、細胞の増殖は表層部分わずかに起こるのみであり、損傷部は修復されないことが多い。損傷が軟骨下骨までに達する全層欠損の場合、骨髄から出血が生じ、前駆細胞やサイトカインなどが供給され軟骨様の組織で修復される（34）。しかし、修復された組織は一般に線維軟骨と言われる、本来の硝子軟骨とは生化学的及び生体力学的に性質が異なる組織になるため、長期的には力学的に破綻し、変形性関節症へ進行する可能性が高い（35）。高齢化が進む日本では変形性関節症（Osteoarthritis：OA）患者が国内だけで 1200 万人以上と言われており、関節軟骨の根本的な治療法の開発が必要である。

このように、関節軟骨は損傷すると自然治癒によって完全には再生せず、本来の機能を失ってしまうため、外科的な再生治療が必須である。

1-2-3. 関節軟骨の治療法と課題

現在、関節軟骨欠損や変形性関節症などの疾患に対して様々な治療方法が考案されている。例えば、変形性関節症やリウマチ関節炎などで著しい関節破壊が存在する場合は人工関節置換術が選択される。人工関節置換術は関節の一部または全体を金属やプラスティックなどでできた人工関節で置き換える方法であり、一般に疼痛効果が高く、術後早期に活動できるようになる一方、手術時の侵襲が大きく、輸血や高度な感染症対策が必要になる。また、長期使用により摩耗や緩みなどが生じるため、耐久年数が約 20 年と言われており、一定期間後に再手術での交換を必要とする場合があり、患者への負担が大きいため、適用は高齢者に限られている（36）。

一方、比較的小さな軟骨損傷の場合、マイクロフラクチャー法が最も良く選択される。この方法は軟骨損傷部に小さな穴を作ることにより軟骨下骨から出血を生じさせ、骨髄から前駆細胞や成長因子を供給し、損傷軟骨の修復を促進させる方法である。関節鏡下で行うことができるため侵襲性が低く、現在一般的に行われている。しかし、再生されるのは線維軟骨と言われており、耐久性に劣り、また長期的には変性し、変形性関節症に進行する可能性がある（37)。

また、現在行われている治療法の一つに自家骨軟骨移植がある。その一種のモザイクプラスティーは軟骨組織の非荷重部位から少量の骨軟骨片を複数個採取し患部へモザイク状に移植する方法である。欠損部は硝子軟骨を含む組織で修復でき、移植片は骨組織で良好に固定されるメリットがある一方、本来の軟骨表面の曲率を再現するのが困難であり、健常部位に欠損を生じさせることなどが問題である。また特に移植できる骨軟骨片に量的制限があるため大きな欠損に対応できないことが大きな課題である（38, 39)。

このように、現在行われている治療方法では、大きな軟骨損傷を関節軟骨本来の硝子軟骨で確実に修復できる方法は存在しないため、新たな治療方法の開発が必要である。

1-2-4. 関節軟骨の再生医療

そこで、関節軟骨欠損部を硝子軟骨での再生を目指すため、再生医療の応用が期待されている。これまで細胞移植による関節軟骨の再生医療として自家軟骨細胞移植があり、1994 年に Brittberg らによって報告された（4)。これは患者の軟骨片を非荷重部位から採取し、酵素処理により軟骨細胞を単離後、単層培養により増殖させ、骨膜で覆った軟骨欠損部に培養軟骨細胞を浮遊液の状態で移植する方法である。1997 年には米国食品医薬品局（FDA）の承認を受け、

Genzyme Biosurgery 社から Carticel®として商品化されている。この方法は自家細胞を用いるため免疫反応が問題とならず、臨床応用が容易である。しかし、軟骨組織採取と移植の二度にわたる外科手術が必要であり患者への負担が大きいこと、軟骨組織採取のために正常組織に欠損を作ること、細胞を浮遊液の状態で移植するため細胞の固定性が不十分であり欠損部の外に漏出してしまうこと、また、軟骨細胞が単層培養中に脱分化を生じ軟骨表現型を失ってしまうことなどが問題点である（40, 41）。

組織工学的手法を用いた例として、アテロコラーゲンゲル包埋自家軟骨細胞移植がある。これは患者の軟骨組織から軟骨細胞を分離し、アテロコラーゲンに包埋し、三次元培養をする方法である。この方法により軟骨細胞は形質を維持したまま増殖し、軟骨特有の ECM を生産し、軟骨様組織を作製することができる。この組織を欠損部に移植し、骨膜で覆うことにより固定して、欠損部の修復を行う（42, 43）。この方法は現在、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社よりジャック®として販売され、2013 年には保険収載された。しかし、異種動物由来のコラーゲンの使用による免疫反応や、軟骨組織採取に伴う正常組織の侵襲や軟骨細胞の増殖能の低さなどの問題が残されている。そのため、自家軟骨細胞移植に代わる新たな治療の開発が必要である。

1-3.　MSC を用いた軟骨再生医療

1-3-1.　軟骨再生医療における MSC の有用性

軟骨再生医療において、自家軟骨細胞移植の場合、上記のように採取可能な軟骨細胞に限りがあり、増殖中の脱分化などの問題がある。そこで、近年、幹細胞を用いた治療法の研究が進んでおり、その中でも特に MSC を用いた軟骨再生医療が注目されている。その理由は前述のように MSC は自己複製能と多分化能を有しており、分化能を維持したまま増殖可能であるので、生体外で増殖させることで、移植のために必要になる、十分な量の細胞を確保できると考えられるからである。ここで、MSC は骨髄をはじめ、滑膜、脂肪、筋肉、臍帯など様々な組織から分離され、研究対象となっているが、由来によって増殖能や分化能などの性質がわずかに異なり、元の組織の分化系統に近い成熟細胞に分化しやすいと言われている。軟骨分化においては脂肪由来 MSC よりも骨髄由来 MSC の方が分化しやすいという報告があり（44)、また、系統が軟骨細胞に類似している滑膜由来の MSC の方が他の組織由来の MSC よりも軟骨分化能も高いという報告もある（45)。しかし、滑膜由来 MSC を用いる場合、滑膜採取のために手術を行う必要があるため、軟骨細胞移植同様に 2 度にわたる手術が必要になり、正常組織への侵襲も伴う。一方、骨髄液の採取は局所麻酔で骨髄穿刺により比較的容易に低侵襲で採取でき、患者への負担が比較的軽い。また、滑膜組織は細胞分離のため、組織を酵素処理する必要があるが、骨髄の場合は培養器に直接播種することで MSC を分離できるため、培養操作が簡便である。従って、滑膜由来 MSC よりも、骨髄由来 MSC の方が軟骨再生治療に利用しやすいと考えられた。さらに MSC を用いる利点として、患者本人の細胞を用いる自家細胞移植が可能なため免疫反応が起こる可能性が低いことが挙げられる。このように MSC を用いた軟骨再生は非常に有望視されている。

1-3-2.　MSC を用いた軟骨再生医療のプロセス

上記のように、近年 MSC を用いた再生医療が有望視されているが、その実用化を実現するためには、MSC の分離、増殖、軟骨分化、三次元組織化の一連の軟骨様組織作製プロセスの開発が必要である。初めに、骨髄液から MSC の分離には従来、密度勾配遠心法が用いられてきた（13, 46)。この方法は遠心分離によって細胞の密度に応じて分画する方法である。しかし、この方法では特殊な試薬を用いることや、操作に熟練した技術が必要であり、操作自体も 1 時間以上かかってしまうという欠点がある。そこで、より簡便な方法として直接播種法が提案されている（46)。これは、骨髄液を直接培養器に播種し、培地交換により浮遊性の血球系細胞を取り除き、接着性の細胞である MSC を分離する方法である。この方法は、簡便であり、閉鎖系で行うことができるため微生物などのコンタミネーションのリスクを軽減できる。この他、表面抗原マーカーを用いて分離する方法（47）や、MSC の接着性の性質を利用した分離デバイスを用いる方法（48）もあるが、MSC は不均一な細胞集団とされており、いずれの場合でも得られる細胞の性質に大きな違いはないと考えられる。

次に、MSC の増殖に関して、骨髄中に含まれる MSC は非常に少ない割合（有核細胞の 0.001~0.01%）とされており、治療に用いるためには大量に増殖させる必要がある。この際、未分化状態を維持したままで、均一な細胞集団を得ることが要求される。しかし、MSC は増殖にともなって、分化能を失うことや(49)、未分化状態を維持できないことが問題である（50)。通常、MSC は 10%のウシ胎児血清（FBS）を含む培地で培養することができるが、この方法で培養すると培養の経過と共に未分化の MSC の割合が減少することが報告されている（50)。しかし、線維芽細胞増殖因子（FGF）の添加により MSC の増殖を促進

され、未分化状態を維持したまま増殖ができることが報告されている（51)。近年では、種々の増殖因子を混合した無血清培地もあり、MSC の性質を維持した状態で MSC を増殖させる研究が進められている。

MSC の軟骨細胞への分化は Transforming growth factor-β（TGF-β）を培地に添加することにより誘導することができる。また、Bone morphogenetic protein（BMP）や Insulin-like growth factor（IGF）などの他のサイトカインによって MSC の軟骨分化を誘導することもできる（52-57)。しかし、MSC の軟骨分化は単層培養で誘導することは困難であり、三次元環境での培養が必要となり、現在様々な方法で三次元化培養の研究がなされている。

1-3-3.　MSC を用いた軟骨再生医療の現状

現在、MSC を用いた軟骨再生医療はいくつかの臨床例が報告されている。その一つに滑膜 MSC を増殖させ、懸濁液の状態で欠損部に移植する方法がある。この方法では、移植した細胞が軟骨の再生を促進するが、接着する細胞は約 60%であり、残りの細胞は欠損部から流出してしまうと報告されている（58)。骨髄 MSC を用いた同様の方法があるが、やはり欠損部に接着せずに流出する細胞が多いとされている。また、骨髄 MSC をコラーゲンゲルに包埋し欠損部に移植する方法も臨床試験がされた報告がある（59, 60)。この方法では MSC の移植により修復が促進されたが、完全な硝子軟骨ではなく線維軟骨が形成された。この原因は、関節内の軟骨分化誘導因子の量が MSC の軟骨分化に不十分であったせいだと考えられている。そこで、これを改善するために、MSC を生体外で軟骨細胞に積極的に分化誘導を行い、軟骨細胞へと分化させた後に移植する方法により高い治療効果が得られると考えられている。

1-4.　三次元的軟骨組織の作製

1-4-1.　三次元的組織作製方法

現在、細胞を三次元的な環境で培養し立体的な組織を作製するために、種々の足場材料（スキャフォールド）が用いられている。スキャフォールドに用いられる材料としては主に合成高分子と天然高分子がある。ポリ乳酸（PLA）やポリグリコール酸（PGA）などの合成高分子の場合、機械的強度を有する一方、生物学的活性が低く、また、担体内に細胞を均一に分布させることが困難であるという欠点がある。さらに、PLA や PGA などの生分解性高分子では、分解生成物が炎症反応を引き起こすことが問題である（61)。一方、天然高分子を用いる方法としては、ゲル材料を用いるゲル包埋培養が報告されており（42, 43)、機械的強度は劣るが、ゲル内に細胞を均一に播種することができる。また、コラーゲンやゼラチンなどの生体由来材料を用いる場合、分子内に細胞結合ドメインを持つなど生理活性を持ち、細胞の生存や分化に適した環境で培養できると考えられる。アテロコラーゲンなど、臨床に利用されている例もあるが、しかし、コラーゲンは通常、ウシやラットなどの異種動物から抽出されるため、免疫反応や感染症の危険性がある。また、アガロースやアルギン酸などの非動物性の材料は、細胞のリガンドがなく、また、生体に分解酵素が存在しないため、生体吸収性が非常に低い。高分子材料以外にはβリン酸三カルシウム（β-TCP）やハイドロキシアパタイトなどの無機材料も用いられるが、これらの使用は骨組織などの硬組織に限られる（62, 63)。このように足場となるスキャフォールドを使用することにより、立体的な構造体を容易に作製できる利点がある一方で、スキャフォールドには炎症や免疫反応をひき起こす可能性があるという潜在的なリスクがある。

1-4-2. スキャフォールドフリー組織作製方法

上記のように、移植用の組織作製にスキャフォールドを用いることには少なからず問題が存在するため、これを回避するためにスキャフォールドを用いずに細胞と細胞が産生する ECM で組織を構成する、スキャフォールドフリー組織作製法を検討する必要があると考えた。代表的なスキャフォールドフリー組織作製法に温度応答性培養器を用いた細胞シートがある。この方法は、培養状態の 37℃から温度を下げると、32℃を境に疎水性から親水性へ変化する温度応答性高分子のポリ N-イソプロピルアクリルアミドを固定化した培養器を使用する。この培養器上で細胞をコンフルエントになるまで培養した後、温度を下げることにより細胞集団をシート状に回収できる（64)。しかし、この方法で作製できる細胞シートは単層なので非常に薄く、また、単層培養で作製するため MSC を十分に軟骨分化誘導させることはできず、軟骨性の ECM の産生は少ないと考えられる。そのため、この方法による細胞シートは機械的強度に劣り、軟骨のような荷重がかかる組織には適さないと考えられる。担体を用いずに立体的な組織を作製する方法としては他にペレット培養がある。この方法は遠心管内に細胞を入れ、遠心分離によって細胞凝集体を作製する方法である（65)。ペレット培養は現在、最も一般的に軟骨分化培養に用いられている。また、同様に細胞凝集体を作製する方法としてマイクロマス培養もある（66)。しかし、これらの方法で作製される細胞凝集体は直径 1 mm 以下の球体であるので、移植に用いるには小さすぎるうえに移植の際の操作性も悪いと考えられた。また、凝集体の内部環境が不均一になりやすく、中心部が石灰化するという報告もある（67)。

そこで、球状の構造体より比較的に均一な環境で培養でき、操作性にも優れる円盤状の構造体が望ましいと考えられた。これまで円盤状の軟骨様構造体の作製方法はいくつか報告例がある。軟骨細胞を型に播種し、凝集体形成後、

回転培養を行う方法（68）や、アルギン酸ビーズ培養にて軟骨分化培養を行った後、型にビーズを入れ、アルギン酸を溶解することにより、軟骨細胞と ECM で組織を形成する方法（69）などが報告されている。しかし、これらの方法では培養に特殊な機器を使用することや操作が複雑であるなどの問題がある。当研究室では、より簡便な方法として軟骨細胞をマルチウエルプレートに高密度で播種し、遠心操作にて円盤状の細胞凝集体を作製し培養することで、直径約 6.4 mm、厚さ約 1.0 mm の軟骨様組織を作製できることを報告した（70）。

一方、MSC を用いた軟骨様組織の作製も試みられている。そこでは、MSC を底面が多孔性膜である隔膜培養器に高密度で播種し、軟骨分化誘導因子を含む軟骨分化培地で培養することにより、軟骨様組織を作製できたという報告がある（71）。当研究室において、底面が Polyethylene terephthalate（PET）製の多孔性膜で出来た隔膜培養器のセルカルチャーインサートを用いて、MSC の軟骨分化と三次元組織化を同時に行い、直径約 6.4 mm、厚さ約 1.0 mm の軟骨様細胞シートの開発に成功した（72）。この方法で作製した軟骨様細胞シートは従来のペレット培養よりも軟骨関連遺伝子の発現が高く、また ECM の蓄積量も多く、より MSC の軟骨分化に適した方法であることが示唆された。しかし、この方法では培養中に培養器内で軟骨様細胞シートが収縮してしまうことや、歪んでしまうことが高頻度で起こり、常時均一な形状の軟骨様細胞シートを作製できないという問題があった。当研究室では、多孔性膜の開孔率を最適化することにより、軟骨様細胞シートの収縮を緩和できることを報告した（73）。しかし、それでも細胞シートの収縮を完全に起こらないようにはできなかった。移植用の組織作製として、常に均一な大きさと形状の組織を作製することが必要であるため、収縮を起こさない軟骨様細胞シート作製法を開発する必要がある。そこで、本研究では収縮を起こさない軟骨様細胞シートの培養方法を検討した。

1-5.　異種動物由来成分不含材料による軟骨様細胞シート作製方法

1-5-1.　異種動物由来成分による問題点

MSCをはじめとする動物細胞の培養には種々の動物由来成分が用いられている。例えば、増殖培地や凍結保護剤に添加されるウシ胎児血清（FBS）や細胞剥離剤として用いられるブタ由来トリプシンなどがある。しかし、臨床で用いられるヒト由来の細胞を異種動物由来成分を用いて培養した場合、異種タンパク質による免疫反応やウイルス・プリオンなどの病原体による感染症の危険が伴い安全性の面でも大きな問題がある（74)。再生医療などの移植に用いるためには、ヒト以外の異種動物由来成分が有するこのような品質、安全性の問題を解決する必要がある。

1-5-2.　異種動物由来成分不含材料による軟骨様組織作製

異種動物由来成分を使用しないMSCの増殖培養としては、自己血清や無血清培地の使用が考えられる。自己血清を使用した場合、単独または増殖因子の添加によりFBSと同等以上の増殖を得られたという報告がある(75, 76)。しかし、自己血清を用いる場合、ドナー差による影響が大きいと考えられる。また、血清を確保するために患者から採血しなければならないが、治療のために多量に細胞を得ようとした場合、非常に多くの血液が必要になるため患者への負担が大きくなる。

そこで、現在では無血清培地が開発されその応用が期待されている。無血清培地は組成が明確であり、ロット差が少なく安定した培養結果が得られ、さらに異種動物由来成分を使用していないため安全性が高いと考えられる。また、ブタ由来トリプシンに関しても、組換え酵素の使用が有効と考えられた。これまで当研究室において、無血清培地（Mesencult®-XF medium）と組換えプロ

テアーゼ（TrypLE™ Select）、動物由来成分不含細胞凍結保護剤（TC プロテクター®）を用いて MSC の分離および増殖培養に成功している（77）。しかし、この方法で培養した MSC を用いて軟骨様細胞シートを作製した報告はない。そのため、移植用に安全な軟骨様組織を作製するために、異種動物由来成分を使用せずに培養を行う、Xeno-free 法で MSC の増殖および軟骨様細胞シートの作製を検討する必要があると考えられた。

1-6.　間葉系幹細胞由来軟骨様組織の改良

1-6-1.　軟骨における細胞外マトリックスの役割

前述のように、軟骨組織には豊富な ECM が含まれ、これによって軟骨組織特有の力学的特性が保たれている。関節軟骨は非常に荷重がかかる組織であり、移植後に生着し、破壊されずに残存するためには、ECM を多く含み機械的強度の優れる軟骨様組織を作製する必要があると考えられた。

これまで様々な方法で軟骨様組織作製の報告があるが、いずれの方法でも正常軟骨組織と比べると ECM の含有量が少なく、特に GAG よりもⅡ型コラーゲンの量が少ない傾向が見られた。軟骨様組織中の ECM を増加させる培養方法を検討する必要があると考えられた。

1-6-2.　軟骨様組織の細胞外マトリックス蓄積量の増大

軟骨様組織中の ECM を増加させる方法はこれまでいくつかの報告がある。それらは軟骨様組織作製時に、間欠的に圧力をかける方法（78, 79）、回転培養によってせん断力をかける方法（80）、培養中の細胞に対し超音波照射を行う方法（81, 82）などである。しかし、物理的な刺激を細胞に与えるこれらの方法では特殊な装置を必要とすることが欠点である。一方、物理的な刺激ではなく、培養液中に生理活性タンパク質やサイトカインなどを添加し軟骨分化を促進する方法もあるが、それらの添加した物質が移植後、移植部位周辺の他の細胞に与える影響は検討されていない。また、サイトカインやタンパク質を添加することにより培養のコストが増加することが考えられるため、実用化には大きな課題となる。そこで軟骨分化促進添加物として、より安価で安全な物質を検討する必要があると考えられた。ところで、アスコルビン酸はコラーゲンが正常な三重らせん構造を形成するのに必要な、コラーゲン鎖中のリジンやプロリンの

水酸化に関与し、コラーゲン合成に必須な補因子である（83)。アスコルビン酸の欠乏は正常なコラーゲンが合成できず、壊血症の原因となる。また、アスコルビン酸はコラーゲンの mRNA の安定化などにも寄与し、線維芽細胞においてアスコルビン酸の添加により、I 型コラーゲンの合成が促進されたという報告がある（84)。軟骨分化培地にも ECM 合成促進のために、同様にアスコルビン酸が添加されている。一方で、アスコルビン酸によって軟骨前駆細胞株（ATDC5）の分化が促進されるという報告もあり、アスコルビン酸は軟骨分化にも寄与していると考えられる（85)。さらに、アスコルビン酸は抗酸化作用を持ち、細胞培養時のアポトーシスの抑制にも効果があることが報告されている（86)。そのため、より高濃度でアスコルビン酸を加えることで、細胞シート中の細胞のアポトーシスを抑制し、細胞密度が高く、また、コラーゲン合成の促進によって蓄積量が増大した細胞シートが作製できると考えられた。しかし、これらの作用に関してアスコルビン酸の濃度検討に関する報告は少なく、アスコルビン酸の濃度による影響はほとんど考察されていない。

そこで本研究では、軟骨様細胞シート中の ECM 蓄積量増加のため、アスコルビン酸をはじめとする生理活性因子の効果を検討し、MSC 由来軟骨様細胞シートの品質向上のための培養プロセスを検討することを目的とした。

1-7.　軟骨様細胞シートの非侵襲的品質推定方法の開発

1-7-1.　移植組織の品質管理

再生医療のプロセスの課題の一つに品質管理の問題がある。再生医療や細胞治療において、異種細胞や未分化細胞の混入による、移植後の炎症や腫瘍化などの副作用を回避するために、移植する細胞や組織を事前に品質評価を行う必要がある。細胞や組織を評価する際に用いられている方法として、染色による組織学評価、遺伝子発現解析、タンパク質定量、表面抗原解析などがあるが、いずれも破壊的・侵襲的な評価法である。しかし、現在の再生医療の主流は、患者自身の細胞を使用し、拒絶反応や感染症の危険性が少ないと考えられている自家細胞移植であり、患者から採取できる細胞の量には限りがあり、また細胞を必要以上に増殖させることはできない。そのため、従来のような破壊的・侵襲的な評価方法は行うことはできない。そこで移植用の細胞や組織の品質管理のため、非破壊的、非侵襲的、短時間で行うことができる評価方法を新たに検討する必要があると考えられた。これまで、細胞の非侵襲的評価方法として顕微鏡を用いて細胞の形態から細胞の状態を評価する方法（87）や、細胞の位相差から細胞の種類を識別する方法（88）などが報告されている。しかし、これらの方法は顕微鏡観察可能な単層状態の細胞の評価には有効であるが、細胞が立体的に存在する三次元的な組織の評価をすることはできない。現在のところ、立体的な組織を非侵襲的にリアルタイムで評価する方法は存在しない。そのため、移植用の立体的な組織にも適用可能な評価方法を開発する必要がある。

1-7-2.　軟骨様組織の分化度の非侵襲的推定

MSC から軟骨様細胞シートを作製する場合も、移植前に軟骨細胞への分化度を知る必要があると考えられた。しかし、軟骨様細胞シートは立体組織であり、

ECM や細胞が高密度で存在するため、顕微鏡による評価は不可能である。そこで、培養上清の分析であれば立体的な組織の分析を非侵襲的に行うことができることに注目した。

ところで、メラノーマ阻害活性（Melanoma inhibitory activity：MIA）という、病理的には悪性黒色腫や軟骨肉腫など腫瘍組織で発現し、正常組織では軟骨細胞のみが分泌する蛋白質がある（89)。軟骨における MIA の機能は定かではないが、MSC の遊走を制御し、TGF-βなどの軟骨形成活性を促進する働きや、ヒト初代軟骨細胞の培養においてグリコサミノグリカン（GAG）量を増加させるという報告があり、軟骨組織の恒常性の維持に寄与していると考えられている（90)。MIA は軟骨細胞が産生しているが、単層培養によって脱分化すると産生量が低下し、軟骨細胞へ再分化させることにより産生量が増えることが明らかとなっている。同様に MSC においても軟骨分化にともなって産生量が増えることが分かっている（89)。このように、MIA の生産量は軟骨細胞の分化度に依存しており、軟骨様細胞シートの培養において、上清中の MIA を定量することで組織中の細胞の分化状態を推測できるのではないかと考えた。そこで、上清中の MIA 量と軟骨様細胞シートの軟骨分化度の間に相関関係があるかを調査することとした。

1-8.　本研究の目的

本研究では、前述のような課題に対し、臨床応用を目指したMSC由来移植用軟骨様細胞シートの安定的な作製方法、異種動物由来成分を使用しない安全作製方法、高いECM含量の軟骨様細胞シートの作製方法を検討し、MSC由来軟骨様細胞シートの品質向上のための培養プロセスを検討すると共に、軟骨様細胞シート中の分化度の非侵襲的品質評価方法を検討することを目的とした。

1-9.　本論文の構成

本論文は6章から構成されている。

第 1 章では、序論として、間葉系幹細胞からの軟骨様細胞シートを作製するまでの培養プロセス全体の概要を示し、本研究の背景と目的について述べた。

第 2 章では、間葉系幹細胞から収縮・変形のない一定の形状のスキャフォールドフリー軟骨様細胞シートの作製方法について検討した。

第 3 章では、間葉系幹細胞から軟骨様細胞シート作製までの培養工程の異種動物成分フリー化について検討した。

第 4 章では、スキャフォールドフリー軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲンの蓄積量の増大について検討した。

第 5 章では、軟骨様細胞シートの上清分析による非侵襲的な品質評価方法について検討した。

第6章では、総括として、本研究で明らかとなった成果をまとめた。

第２章

スキャフォールドフリー軟骨様細胞シートの収縮防止法の検討

2-1. 緒言

第一章で述べたように、MSC は再生医療の細胞源として非常に有用であり、軟骨の再生医療においても早期の臨床応用が期待されている。また、軟骨再生医療においてスキャフォールドフリー組織の利用は非常に有用であり、MSC を用いてスキャフォールドフリー軟骨様組織を作製する方法を検討する必要がある。従来のスキャフォールドフリー組織作製方法として、細胞を遠心管などに入れ凝集体を作製し、培養するペレット培養法があるが、この方法で作製できる組織は直径 1 mm 以下の球状凝集体であり、非常に小さいため、移植用の組織としては適さない。そこで我々は移植に適した軟骨様組織を作製する方法として、厚みのある円盤状の軟骨様細胞シート作製の検討を行ってきた。これまで、当研究室において、ブタ初代軟骨細胞を用いてスキャフォールドフリー軟骨細胞シートの作製に成功している (70)。しかしながら、MSC を用いた場合、培養中に細胞凝集体が収縮や変形をしてしまうことがあり、均一な形状で培養できないことが問題となった（72)。これまで、培養器底面の多孔性膜の開孔率を変化させることによって収縮を緩和できることが報告された（73)。しかし、収縮を完全に防ぐことはできず、根本的な解決のためには更なる改良が必要だと考えられた。ところで、上記の軟骨様細胞シート作製において、これまで培地組成に関する検討はされていない。

そこで、本章では MSC からスキャフォールドフリー軟骨様組織作製において、培地組成の改良によって収縮のない培養方法を検討することを目的とした。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞

2-2-1-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

実験にはヒト骨髄液から以下の方法により分離した骨髄由来間葉系幹細胞を用いた。各ドナー（ドナーA：19 歳・男性、ドナーB：67 歳・男性、ドナーC：19 歳・男性、ドナーD：69 歳・男性）の腸骨より、ヘパリンロックした注射器を用いて骨髄液（約 10 ml）を採取した。採取した骨髄液にチュルク液（Nacalai tesque, 372-12）を加え、骨髄液中の単核細胞数を計数し、単核細胞密度が 6.0×10^5 cells/cm^2 になるように 100 φディッシュ（55 cm^2）（Corning, 430167）に骨髄液を播種し、以下に示した増殖用培地（10%FBS 含有 DMEM-LG）を用いて培養を行った。播種 1 日後、ディッシュを PBS(−)で洗浄してから培地交換を行い、浮遊性細胞を吸引除去した。2 日目には培地交換のみを行い、同様に浮遊性細胞を吸引除去した。これ以降、培地交換は 1 週間毎に行った。播種後約 10 日目に、ディッシュ内での偏った増殖を防ぐために、トリプシン-EDTA（Sigma, T3924）を用いて細胞を剥離し、同じディッシュに再播種した。再播種後、約 2 週間培養を行い、細胞がプレコンフルエントになった時点でトリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞は 10% Dimethyl Sulphoxide（DMSO）（Sigma, D2650）を含む 10%FBS 含有 DMEM-LG を用いてアンプル化し、液体窒素中で凍結保存した。

2-2-2. 培地

2-2-2-1. 増殖用培地（10%FBS 含有 DMEM-LG）

10.0 g/l DMEM-LG（Invitrogen, 31600-034）、3.7 g/l $NaHCO_3$（Wako,

191-01305)、10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン（Sigma, P7539）となるように超純水（Sigma, W3500）でメスアップした培地を濾過フィルター（Nalgene, 595-4520）で減圧濾過除菌した。その後、ウシ胎児血清（FBS）（Invitrogen, 26140-079）を 100 ml/l の濃度で加えた。

2-2-2-2. 基本軟骨分化培地

9.4 g/l DMEM-LG（Invitrogen, 31600-026)、3.5 g/l グルコース（Wako, 041-00595)、10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン（Sigma, P7539)、50 μg/ml アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩（Wako, 013-12061)、100 μg/ml ピルビン酸ナトリウム塩（MP Biomedicals,194734)、40 μg/ml プロリン（MP Biomedicals, 194728)、100 nM デキサメタゾン（MP Biomedicals, 194561）となるように超純水（Sigma, W3500）でメスアップした培地を濾過フィルター（Nalgene, 595-4520）で減圧濾過除菌した。その後、1% ITS™+Premix（6.25 μg/ml インスリン, 6.25 μg/ml トランスフェリン, 6.25 ng/ml 亜セレン酸, 1.25 mg/ml ウシ血清アルブミン, 5.35 μg/ml リノール酸）（BD Biosciences, 354352)、10 ng/ml TGF-ß3（R&D Systems, 243-B3)、100 ng/ml IGF-I（Peprotech, 100-11）を添加した。

2-2-2-3. 分化誘導因子非添加軟骨分化培地（軟骨分化培地(－)）

2-2-2-2.に示した基本軟骨分化培地の TGF-β3 及び IGF-Ⅰを加えない培地を分化誘導因子非添加軟骨分化培地（軟骨分化用培地(－)）として用いた。

2-2-2-4. 10%FBS 含有軟骨分化培地（軟骨分化培地(10%FBS)）

2-2-2-2.に示した基本軟骨分化培地の ITS™+Premix の代わりに FBS を 100

ml/L で添加した培地を 10%FBS 含有軟骨分化培地として用いた。

2-2-2-5. 混合培地（FBS）（基本軟骨分化培地＋DMEM-LG（10% FBS））

上記の基本軟骨分化培地と DMEM-LG（10% FBS）を 1：1 で混合したものを混合培地（FBS）として使用した。

2-2-2-6. 混合培地（無血清）（基本軟骨分化培地＋DMEM-LG（無血清））

上記の基本軟骨分化培地と血清非添加の DMEM-LG（無血清）を 1：1 で混合したものを混合培地（無血清）として使用した。

2-2-3. 培養方法

2-2-3-1. 増殖培養

増殖用培地 10 ml を用いて、アンプル内の保存細胞を、播種細胞密度が 0.15 $\times 10^4$ cells/cm^2 となるように 100 ϕ ディッシュ（Corning, 430167）に播種し、37℃、5%CO_2 雰囲気下でプレコンフルエントになるまで静置培養を行った。プレコンフルエント到達後、トリプシン-EDTA を用い細胞を剥がし、播種細胞密度が 0.15$\times 10^4$ cells/cm^2 となるように 100 ϕ ディッシュに再播種し、継代培養した。

2-2-3-2. シート培養

24 穴セルカルチャーインサート用プレート（BD Falcon, 353495, 底面積：2 cm^2）に 24 穴マルチプレート用セルカルチャーインサート（BD Falcon, 353504, 膜材質：ポリエチレンテレフタレート、細孔径：0.4 μm、細孔密度：100±10

×10^6 /cm^2、膜面積：0.3 cm^2）をセットした。増殖培養により増殖させた細胞を 4℃、1000 rpm、5 分間の遠心（Kokusan, H-3R）により回収し、各種軟骨分化用培地に 6.2×10^6 cells/ml の濃度になるように懸濁した。セルカルチャーインサートの内側に細胞懸濁液を 300 µl、外側に各種軟骨分化用培地を 1 ml 入れ、37℃、5% CO_2 雰囲気下で 21 日間、静置培養した。培地は 2 日に一度、セルカルチャーインサートの内、外側両方を全量交換した。

2-2-4. 分析方法

2-2-4-1. サイズおよび湿重量測定

培養後のシート及びペレットのサイズは、培養器よりシート及びペレットを取り出し、カバーガラスにのせ、定規と共にデジタルカメラ（Canon, IXY DIGITAL 910 IS）で上面及び側面を撮影した。パソコン画面に表示させた画像から Image J ソフトウエアを用いて画像中の定規を基準として、実際の直径・厚さを計算した。

培養物の湿重量は、培養物を PBS(−)で洗浄し、カバーガラスにのせ、キムワイプで余分な水分を取り除いた後、精密天秤（Mettler, AE240）によって測定した。

2-2-4-2. 細胞数計数

シート中の細胞数は、ペレット又はシートを PBS(−) 5 ml で 2 回洗浄後、トリプシン（Sigma, T8003）、コラゲナーゼ（Wako, 032-10534）、コラゲナーゼ type-Ⅱ（Worthington Biochemistry, 4176）をそれぞれ 5 g/l の濃度で PBS(−)

に溶かした溶液を、シートには 1 ml 加え、37℃で 40 分間酵素処理した。ピペッティングにより得られた細胞懸濁液についてトリパンブルー染色法を用いて細胞数を測定した。

2-2-4-3. 遺伝子発現量定量

軟骨細胞への分化の指標として、軟骨に特有のタンパク質であるアグリカンとⅡ型コラーゲンの mRNA の発現を定量的 RT-PCR （Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）法により測定した。まず、酵素処理によって得られた細胞懸濁液から、GenElute Mammalian Total RNA　Miniprep Kit （Sigma, RTN70）を用いて total RNA 抽出した。DNase I （Takara, 2270A）処理した total RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit （Applied Biosystems, 4368814）、および 2720 Thermal Cycler （Applied Biosystems）を用いて cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型とし、AmpliTaq Gold PCR Master Mix （Applied Biosystems, 4316753）、フォワードプライマー、リバースプライマー、プローブ、および 7500 Real Time PCR System （Applied Biosystems）を使用し、95℃10 分（1 サイクル）、95℃15 秒-60℃1 分（55 サイクル）、72℃7 分（1 サイクル）で PCR を行った。アグリカン及びⅡ型コラーゲンのプライマーおよびプローブの配列を Table 1 に示した。β-アクチン（NM_001101）は Applied Biosystems から購入した。各遺伝子の発現率はβ-アクチンの発現量を内部標準として、ヒト正常関節軟骨細胞から合成した cDNA を用い、その mRNA の発現を 100%として測定し、検量線をもとに発現率を定量した。計算方法を式 1 に示した。

$$\text{mRNA 発現率}(\%) = \frac{\dfrac{\text{アグリカン・Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量}(\text{細胞シート})}{\text{アグリカン・Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量}(\text{正常軟骨})}}{\dfrac{\beta\text{ − アクチン}(\text{内部標準})\text{の発現量}(\text{細胞シート})}{\beta\text{ − アクチン}(\text{内部標準})\text{の発現量}(\text{正常軟骨})}} \times 100 \cdots (\text{式 1})$$

Table 1. Sequences used in PCR.

Gene		Sequence
Aggrecan	F Primer	5'-AGTCCTCAAGCCTCCTGTACTCA-3'
	R Primer	5'-GCAGTTGATTCTGATTCACGTTTC-3'
	Probe	5'-ATGCTTCCATCCCAGCTTCTCCGG-3'
Col2A1	F Primer	5'-CGCTGTCCTTCGGTGTCAG-3'
	R Primer	5'- CCTTGATGTCTCCAGGTTCTCC-3'
	Probe	5'- CCAGGATGTCCGGCAACCAGGA-3'

2-3. 結果と考察

2-3-1. 軟骨様細胞シートにおける培地組成の影響の検討

均一な形状の円盤状の軟骨様細胞シート作製のため、当研究室で以前見出された条件（播種細胞数：18.6×10^5 cells、セルカルチャーインサート開孔率：12%）を基に、種々の培地条件で培養を行った。セルカルチャーインサートに MSC（ドナーA 由来）を 18.6×10^5 cells 播種し、種々の培地で培養した。培地条件は基本軟骨分化培地（CD）、増殖用培地（GM）、分化誘導因子（TGF-β3、IGF-Ⅰ）非添加軟骨分化培地（軟骨分化培地(－)）（CD(-)）、基本軟骨分化培地と増殖用培地を 1：1 で混合した培地（混合培地(FBS)）（MM）の 4 種類の培地を用いた。培地交換は 2 日毎に全量交換し、21 日間培養を行った。

培養終了時の細胞シートを培養器の上から撮影した写真を Fig. 2-1 に示した。また、混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、定規と共に軟骨様細胞シートの上からおよび横から撮影した写真を Fig. 2-2 に示した。

従来の条件である、基本軟骨分化培地で培養した細胞シートは培養開始後 48 時間以内に収縮し球状の凝集体になった（Fig. 2-1A）。また増殖用培地で培養した細胞シートは収縮しなかったが非常に薄いためセルカルチャーインサートから取り出すことができなかった（Fig. 2-1B）。また、軟骨分化培地(－)で培養した細胞シートは収縮せず、増殖用培地で培養したものよりも厚みはあったが、それでも 0.1 mm 以下であり、十分な厚さは有していなかった（Fig. 2-1C）。一方、混合培地(FBS)では、培養した細胞シートは収縮しないと同時に、他の条件と比較して明らかな厚みがあり、直径約 6.5 mm、厚さ約 0.6 mm の軟骨様細胞シートが作製できた（Fig. 2-1D、Fig. 2-2.）。

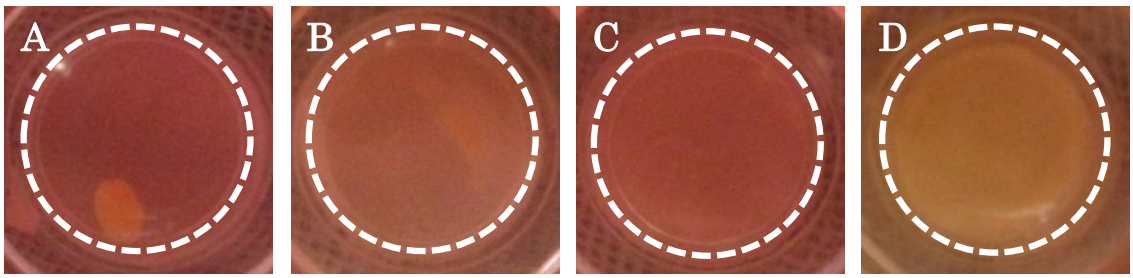


Fig. 2-1.　Influence of the medium component on the cell sheet. Top view of cell sheet cultures on Cell culture insert™. White dotted circle shows outline of the bottom of Cell culture insert™. Its diameter is 6.4 mm.
Cells were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD)(A), growth medium (GM)(B), chondrogenic differentiation medium (−) (CD(−)) (C), and mixed medium (FBS) (MM)(D).

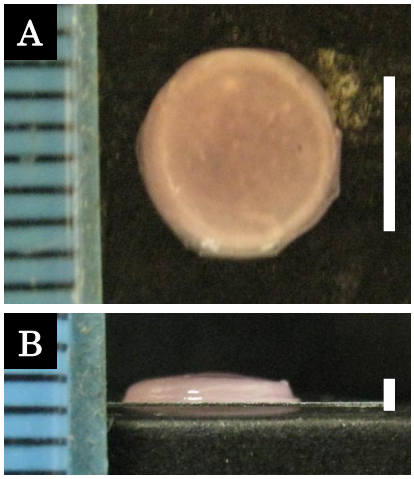


Fig. 2-2　Top and side views of cell sheet cultivated with mixed medium (FBS) (MM).

Top view (A), side view (B). Scale bars show 5 mm (A) and 1 mm (B).

これらの軟骨様細胞シートを酵素処理し、細胞数および軟骨関連遺伝子（アグリカン、Ⅱ型コラーゲン）の mRNA 発現率（定量的 RT-PCR）を測定した結果を Fig. 2-3 に示した。

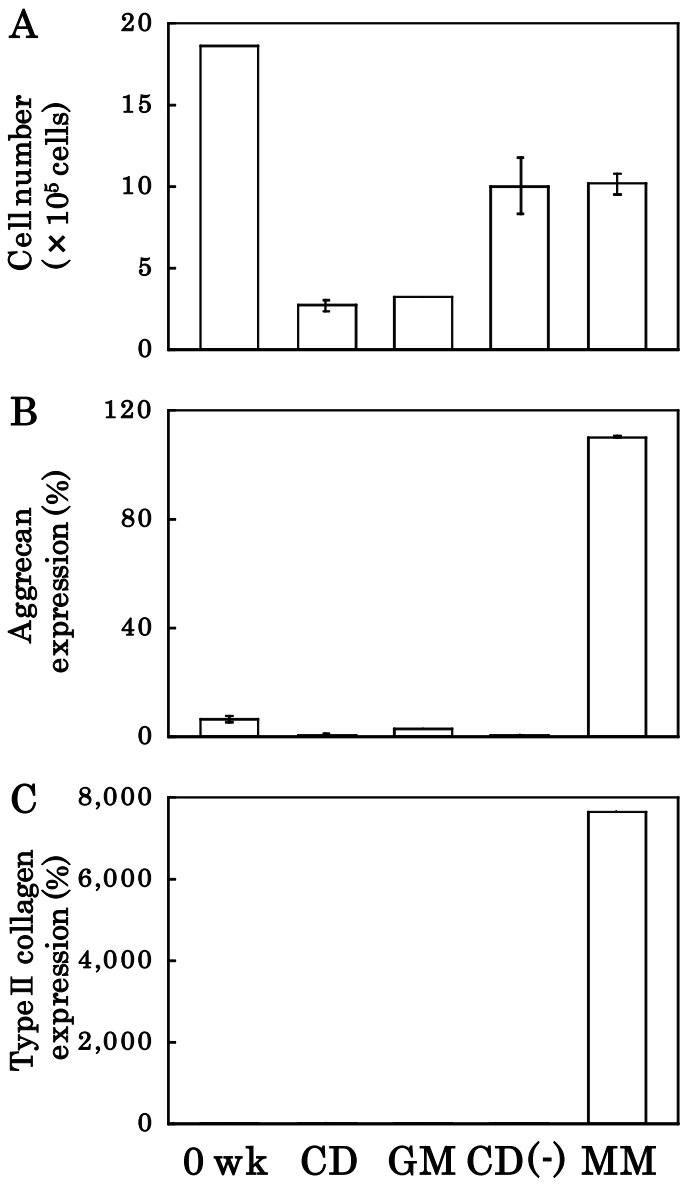


Fig. 2-3. Cell number and gene expression of cultivated cells. Cell number (A), aggrecan expression (B), type Ⅱ collagen expression (C). Before differentiation (0 wk), cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD), growth medium (GM), chondrogenic differentiation medium (−) (CD(-)),and mixed medium (FBS) (MM).

その結果、細胞数は基本軟骨分化培地および増殖用培地で培養したものは約 3 ×10^5 cells と播種時（18.6×10^5 cells）から大きく減少していた。一方、軟骨分化培地(−)および混合培地(FBS)で培養したものはほぼ同程度の細胞数（約 10 ×10^5 cells）であり、播種時の約 50%の細胞は残存していたことを示した（Fig. 2-3A）。

また、軟骨関連遺伝子の mRNA 発現は基本軟骨分化培地、増殖用培地、軟骨分化培地(−)で培養した細胞シートではアグリカンで 0.5%~4%、Ⅱ型コラーゲンで 0%~7%と共にほとんど発現していなかったが、混合培地で培養した細胞シートはアグリカンが約 110%、Ⅱ型コラーゲンが約 7600%と共に非常に高い発現率であった（Fig. 2-3B, C）。

これらのことから、基本軟骨分化培地と増殖用培地を 1：1 で混合した混合培地を用いることにより、収縮せず、軟骨関連遺伝子の発現も高く、厚みのある軟骨様細胞シートを作製できる可能性が示された。

本実験に用いたいずれの条件でも三次元培養によって細胞数の減少が観察された（Fig. 2-3A）。この原因は、二次元の増殖培養から三次元に培養環境が変化したことにより、変化に適用できない細胞がアポトーシスなどの細胞死を引き起こした可能性や、細胞が高密度に存在することにより、栄養や酸素が不足することによるネクローシスが起こることが予想された。また、シートが形成しなかった基本軟骨分化培地や増殖培地に対し、シートが形成した軟骨分化培地(-)や混合培地では培養終了時の残存細胞が多く（Fig. 2-3A）、シートを形成するためには播種細胞数からの減少を抑えることが必要であると考えられた。また、収縮しなかった軟骨分化培地(−)、混合培地(FBS)では細胞数にはあまり差がないにも関わらず、軟骨分化培地(−)で培養したものと混合培地(FBS)で培養したものでは細胞シートの厚さに顕著に違いがあった。これは混合培地(FBS)で培養

した細胞シートの軟骨関連遺伝子の発現率が他の条件と比較して非常に高かったことから（Fig. 2-3B, C）、混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シートはより多くのアグリカンやⅡ型コラーゲンなどの ECM を蓄積したことが原因だと考えられた。

また、細胞シートが基本軟骨分化培地で収縮し、分化培地(－)で収縮しなかったが（Fig. 2-1）、基本軟骨分化培地と分化培地(－)の成分の違いは、分化誘導因子の TGF-β3 と IGF-Ⅰの有無であるので、これらが細胞シートの収縮に関与した可能性が考えられる。特に、TGF-βは細胞骨格の再構築に関与している可能性があり（91）、分化培養中の細胞骨格の再構築が細胞シートの収縮を起こすように影響したと考えられる。一方、混合培地を使用することにより収縮を防止できると同時に、分化度も高くなったが（Fig. 2-2, Fig. 2-3B, C）、培地中のどの成分が影響したのかは明らかではない。本実験における、各培地条件間の大きな違いは血清と増殖因子であり、これらが影響した可能性が高いと推測された。

2-3-2. 血清が軟骨様細胞シートの収縮に与える影響の検討

2-3-1.で混合培地を使用することにより、軟骨様細胞シートを収縮なく作製できることが明らかとなった。しかし、培地中のどの成分が影響したのかは明らかではない。そこで、混合培地中の血清が軟骨様細胞シートの収縮へ与える影響を検討するため、増殖因子の量が等濃度になるように、通常の混合培地(FBS)の他に基本軟骨分化培地と無血清 DMEM-LG を 1：1 で混合した血清を含まない混合培地（混合培地(無血清)）も用いて軟骨様細胞シートを作製した。セルカルチャーインサートに MSC（ドナーA）を 18.6×10^5 cells 播種し、基本軟骨分化培地、混合培地(FBS)、混合培地(無血清)の 3 種類の軟骨分化培地で軟骨様細胞シート作製を行った。2 日毎に培地交換を行い、21 日間培養を行った。

培養終了後、軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、定規と共に軟骨様細胞シートの上からおよび横から撮影した写真を Fig. 2-4 に示した。

その結果、2-3-1.と同様に混合培地(FBS)で培養した細胞シートは収縮を起こさず、直径約 6 mm、厚さ約 0.5 mm のシート状の軟骨様細胞シートが作製できた（Fig. 2-4B, E)。一方、基本軟骨分化培地（Fig. 2-4A, D）および混合培地(無血清)（Fig. 2-4C, F）で培養した細胞シートは収縮し、球状の凝集体になった。このことから、細胞シートの収縮を防ぐためには培地への血清添加が必要だと考えられた。

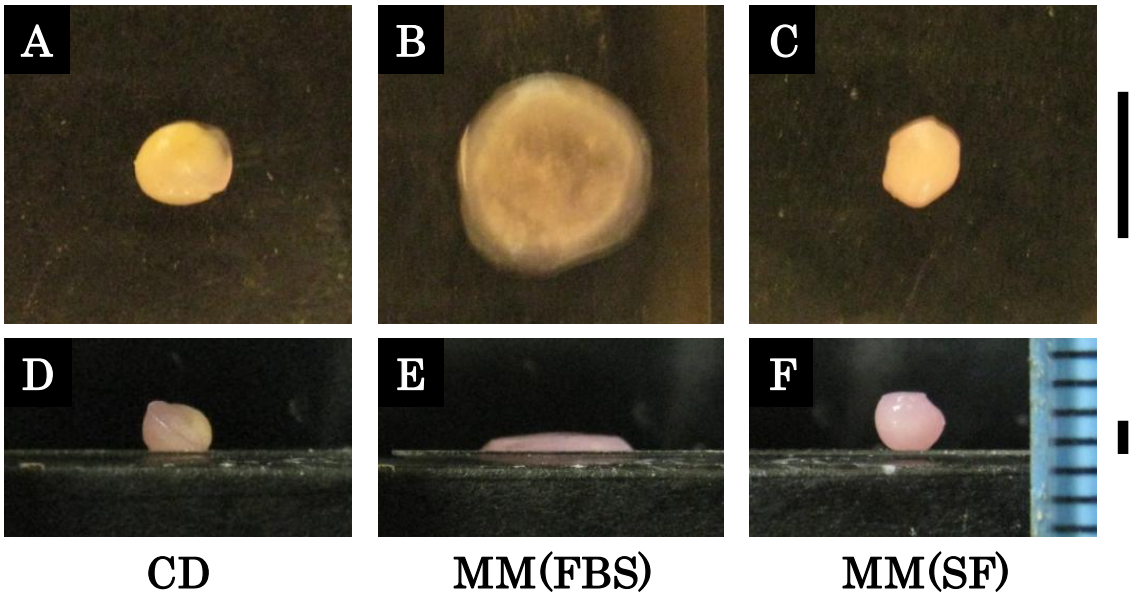


Fig. 2-4.　Influence of serum in the medium on cell sheet culture. Top and side view of cell sheets cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD) (A, D), mixed medium (FBS) (MM(FBS)) (B, E), and mixed medium (serum free) (MM(SF)) (C, F). Top view (A-C), side view (D-F). Scale bars show 5 mm (A-C) and 1 mm (D-F).

2-3-1.で無血清培地である基本軟骨分化培地で培養した場合、高頻度で軟骨様細胞シートの収縮が起こったが、混合培地を用いたところ軟骨様細胞シート収縮を防ぐことができた。収縮が防げた理由としては、混合することにより分化誘導因子（TGF-β3、IGF-Ⅰ）などの濃度が半分になること、または血清が加わることの 2 つが考えられたが、本実験で基本軟骨分化培地と無血清 DMEM-LG を混合した混合培地(無血清)を用いた場合には細胞シートが収縮したため、分化因子などの濃度が半分になったことよりも血清が添加されたことが細胞シートの収縮防止につながったと考えられた。この結果から、血清中の成分が収縮の原因となる因子を阻害した可能性が考えられた。その因子の一つ

として、細胞内のアクチンの関与が考えられた。PGA スポンジを用いた研究で、培養にともない構造体が収縮することが報告されており、この現象にα-平滑筋アクチン（α-SMA）の構築が関係していると考えられている（92)。さらに、FGF-2 によってα-SMA の構築を抑制し、収縮を抑制できることが報告されていることから、血清中に含まれる FGF-2 によってアクチンストレスファイバーの構築を抑制し、収縮防止につながった可能性も考えられた。

2-3-3. 細胞が由来するドナーの差違による影響の有無の検討

基本軟骨分化培地と増殖用培地を 1 : 1 で混合した混合培地を用いることにより軟骨様細胞シートの収縮を防ぐことができた。さらに、細胞が由来するドナーの差違による影響の有無を確認するために、ドナーA（19 歳、男性）由来の MSC の他に、ドナーB（67 歳、男性）、ドナーC（19 歳、男性）およびドナーD（69 歳、男性）由来の MSC を用いて、基本軟骨分化培地および混合培地(FBS)で軟骨様細胞シート作製を行った。

ドナーの年齢、性別および各培地で培養した細胞シートの収縮の有無を Table 2-1 に示した。また、各ドナー由来の MSC から作製した軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、軟骨様細胞シートの上からおよび横から撮影した写真を Fig. 2-5 に示した。

Table 2-1. Donor information and sheet shrinkage

Donor	Age	Sex	Shrinkage	
			CD	MM
A	19	male	+	-
B	67	male	+	-
C	19	male	+	-
D	69	male	+	-

CD: Basic chondrogenic differentiation medium. MM: Mixed medium

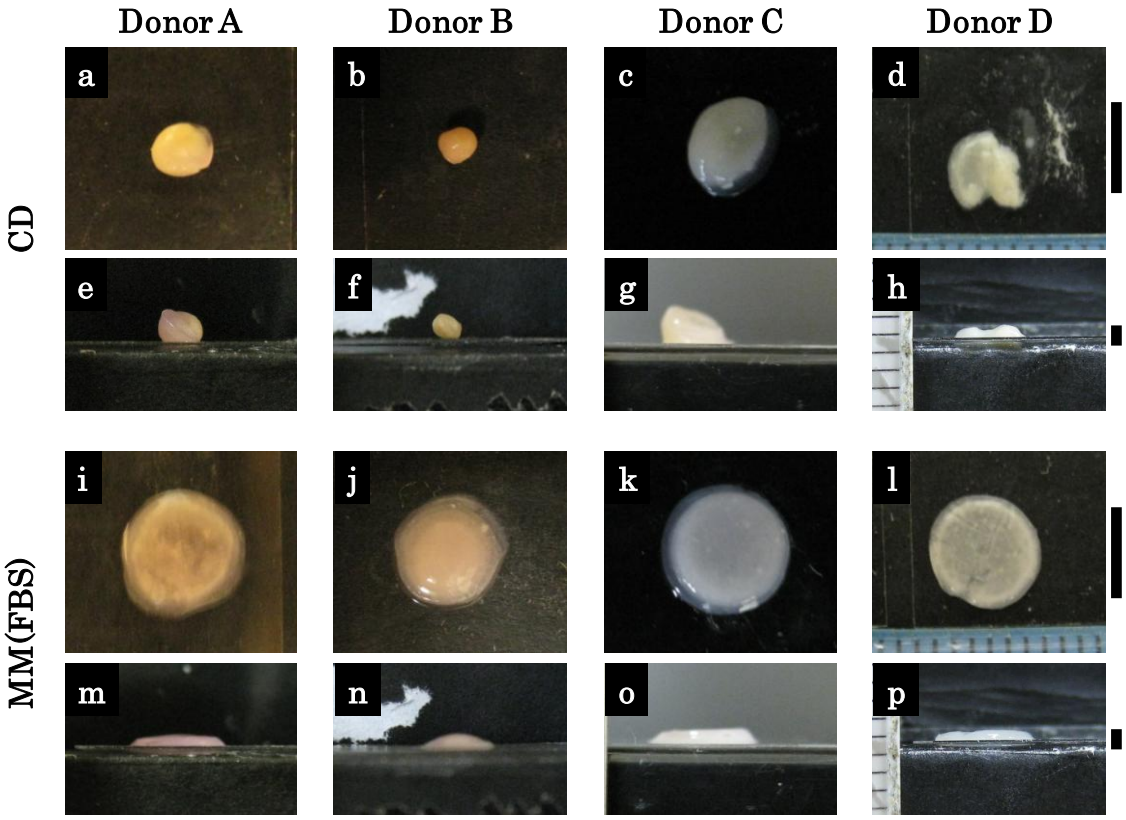


Fig. 2-5. Top and side views of cell sheets using different donor's MSCs. MSCs derived donor A (a, e, i, m), donor B (b, f, j, n), donor C (c, g, k, o), donor C (d, h, l, p) were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD) (a-h), and mixed medium (FBS) (MM(FBS)) (i-p). Scale bars show 5 mm (a-d, i-l) and 1 mm (e-h, m-p).

その結果、基本軟骨分化培地を用いた培養では、ドナーC およびドナーD 由来の MSC では収縮しないで軟骨様細胞シートが生成した場合もあったが（ドナーC；6 検体中 3 検体、ドナーD；20 検体中 3 検体)、ほとんどの検体が収縮した。またドナーA およびドナーB 由来の MSC では基本軟骨分化培地で培養した軟骨様細胞シートがすべて収縮した。一方、混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シートはいずれのドナー由来の MSC でも収縮が見られなかった。

従って、混合培地(FBS)を用いることにより、どのようなドナー由来の MSC でも収縮せずに軟骨様細胞シートを作製できる可能性が高いと考えられた。

2-2-4. 血清濃度の違いによる軟骨様細胞シートへの影響の検討

これまでに、混合培地を用いることにより収縮を起こさずに軟骨様細胞シートを作製することができ、また、収縮防止には血清が必要だと考えられた。しかし、最適な血清濃度について調べられていない。そこで、血清濃度の違いが軟骨様細胞シートに与える影響を調べるため、基本軟骨分化培地（無血清）、混合培地(FBS)（FBS 濃度 5%）の他に 10%FBS 含有軟骨分化培地（軟骨分化培地(FBS)）（FBS 濃度 10%）を用いて軟骨様細胞シート作製を行った。

セルカルチャーインサートにMSC（ドナーC 由来）を 18.6×10^5 cells 播種し、基本軟骨分化培地、混合培地(FBS)、軟骨分化培地(FBS)の 3 種類の軟骨分化培地を用いて培養を行った。

培養終了後に軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、定規と共に軟骨様細胞シートの上からおよび横から撮影した写真を Fig. 2-6 に示した。

血清を含まない基本軟骨分化培地で培養した軟骨様細胞シートは収縮し、一部が盛り上がった形状になった（Fig. 2-6A, D）。一方、血清を含んだ条件の混合培地(FBS)と軟骨分化培地(FBS)では収縮せず均一な厚みの軟骨様細胞シートが作製できた（Fig. 2-6B, C, E, F）。しかし、混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シート（直径約 6.5 mm、厚さ約 0.75 mm）に比べ軟骨分化培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シート（直径約 6 mm、厚さ約　0.5 mm）は大きさも少し小さく、厚さも少し薄かった。

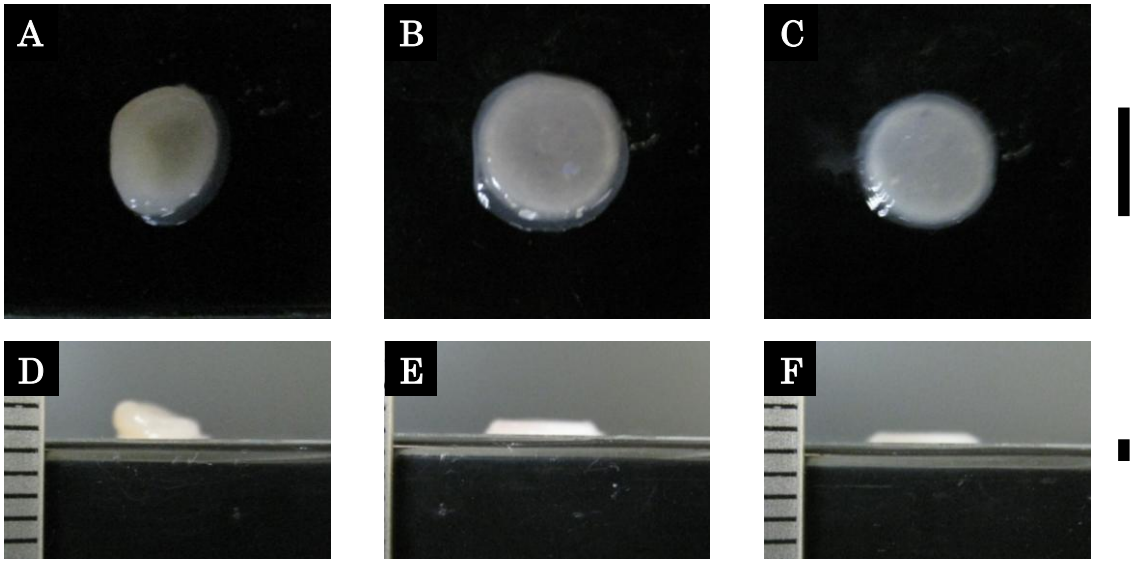


Fig. 2-6.　Top and side views of cell sheets cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (FBS 0%) (A, B), mixed medium (FBS) (FBS 5%) (B, E), and 10% FBS contained chondrogenic differentiation medium (FBS) (FBS 10%) (C, F). Top view (A-C), side view (D-F). Scale bars show 5 mm (A-C) and 1 mm (D-F).

培養した細胞シートの細胞数および軟骨関連遺伝子（アグリカン、Ⅱ型コラーゲン）を測定するため、細胞シートを酵素処理し、得られた細胞を計数、RNA 抽出を行った。シート中の細胞数および遺伝子発現率を Fig. 2-7 に示した。

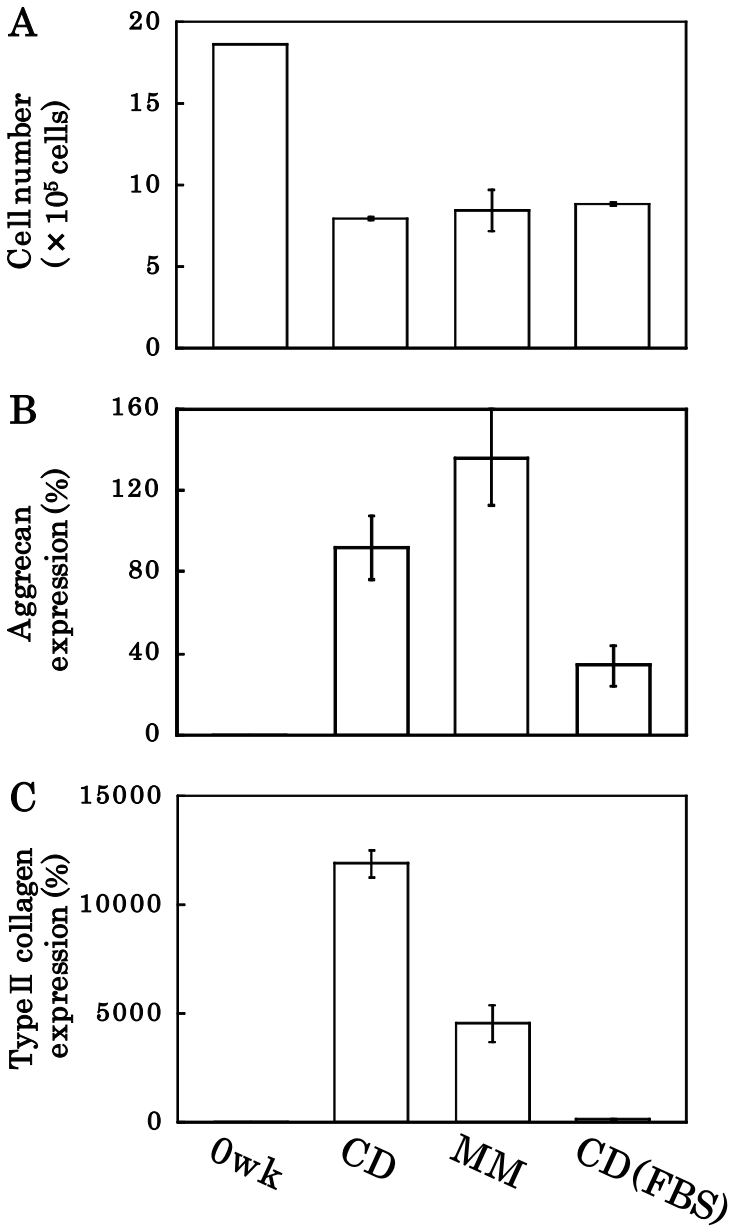


Fig. 2-7. Influence of serum concentration on cell sheet. Cell number and gene expression of cultivated cells. Cell number (A), aggrecan expression (B), type Ⅱ collagen expression (C). Before differentiation (0wk), cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD), mixed medium (FBS) (MM), 10% FBS contened chondrogenic differentiation medium (CD(FBS)).

いずれの軟骨分化培地で培養した軟骨様細胞シートでも細胞数にはほとんど差が見られなかった（Fig. 2-7A）。また軟骨関連遺伝子の mRNA 発現は、アグリカンでは混合培地(FBS)が最も高く（約 140%）、次いで基本軟骨分化培地（約 90%）、軟骨分化培地(FBS)（約 34%）であった。またⅡ型コラーゲンでは基本軟骨分化培地が最も高く（約 12000%）、次いで混合培地(FBS)（約 4500%）、軟骨分化培地(FBS)（約 110%）であった。すなわち、軟骨分化培地(FBS)（FBS 濃度 10%）で培養した軟骨様細胞シートは混合培地(FBS)（FBS 濃度 5%）で培養したものに比べ薄かったが（Fig. 2-6C, F）、アグリカン、Ⅱ型コラーゲンの発現率も低かった（Fig. 2-7B, C）。

軟骨分化培地(FBS)は混合培地(FBS)と比較して、分化誘導因子（TGF-β3、IGF-Ⅰ、デキサメタゾン）や血清、その他軟骨分化培地に含まれる成分濃度が高いにも関わらず、培養した軟骨様細胞シートが薄く、また軟骨関連遺伝子の発現率も低かった。この原因として、FBS が MSC の軟骨分化に阻害的に働くとの報告（93）があり、培地中に含まれる血清が分化に阻害的に働いた可能性が考えられた。これは FBS に含まれているサイトカインによる影響が考えられ、その中でも FGF-2 は MSC において TGF-β や IGF-I シグナリングの活性を低下させることが報告されている（94）。そのため軟骨分化培地中の血清濃度が 5%より 10%と高濃度の方が軟骨分化に阻害的に働きやすいことを示していると考えられた。また、基本軟骨分化培地と比較して、混合培地で培養した場合、アグリカンの発現率は増加したが、Ⅱ型コラーゲンの発現率は減少した。このことから、血清による軟骨分化への影響は、血清濃度が 10%の高濃度の場合、アグリカンとⅡ型コラーゲンの両方に対し阻害的に作用したが、血清濃度が 5%の場合、アグリカンや sGAG よりも、Ⅱ型コラーゲンに対して阻害的に作用することが考えられた。

しかし、無血清である基本軟骨分化培地で培養したものと混合培地(FBS)で培養したものを比較した場合、混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シートの方が軟骨関連遺伝子、特にアグリカンの mRNA の発現が高かった。これについては、FBS 添加の影響よりも、軟骨様細胞シートが収縮しなかったことの影響が大きいという可能性も考えられた。

軟骨様細胞シートの収縮の原因については複数の原因が考えられる。これまで、軟骨細胞を用いた細胞シートでは収縮は報告されていないため、軟骨細胞と MSC の違いが原因の一つと考えられた。軟骨細胞は組織内部では球状の形をしており、当研究室でブタ初代軟骨細胞を用いて細胞シート作製した際には MSC の時の様な収縮は起こらなかった（70）。また、MSC は未分化状態では細長い線維芽状の細胞だが、軟骨分化に伴い多角形状になることが報告されている（87）。さらに、基本軟骨分化培地で培養した細胞シートが収縮し、増殖用培地、軟骨分化培地(－)などで培養した細胞シートが収縮しなかったことを考え合わせると、軟骨様細胞シートの培養中の収縮には、MSC の軟骨細胞分化に伴う細胞の形態変化が関係しているのではないかと考えられた。つまり、MSC の場合、初めは線維芽様の細胞が堆積し細胞凝集体を作るが、それぞれの細胞が軟骨分化に伴い線維芽状から多角形状に変化することにより、細胞シート全体の形状変化につながった可能性が考えられた。

さらに、軟骨細胞と MSC では軟骨分化培養時の形態変化や挙動が異なることが報告されている（95）。例として、骨髄 MSC の場合、細胞間接着は主に接着帯（カドヘリンを介したアクチンフィラメント）によって結合するが、軟骨細胞の場合、細胞間接着はデスモソーム（カドヘリンを介した中間径フィラメント）によって結合するという報告がある。この細胞間接着の違いや結合する細胞骨格の違いによる影響も考えられた。また、ペレット培養において、骨髄 MSC

は軟骨分化初期段階では細胞が密集しており、軟骨分化に伴い生成された ECM の蓄積によって細胞間の間隔が開いていくが、軟骨細胞の場合は、軟骨分化培養の初期段階から細胞は密集せずに細胞間の間隔が開いており、分化に伴い ECM が蓄積しさらに間隔が開いていくことが報告されている（95)。つまり、軟骨細胞の場合、初めから球状の細胞が堆積し凝集体を形成するため培養中に形態変化が起きず、さらに培養の初期から ECM が蓄積し細胞がシート内に点在するため、細胞間の接着も少なく、細胞シートが収縮しないと考えられた。一方、MSC の場合、播種後、線維芽状の細胞が凝集し凝集体を形成するが、この際、ECM の蓄積はなく細胞が密集した状態になるため細胞間接着が多くなる。その後、軟骨分化に伴い ECM の蓄積と上記のような細胞形態変化が起こるが、細胞間接着が強いため、細胞シート全体の形状変化につながった可能性が考えられた。

また、その他の軟骨細胞と MSC の違いとしてはシート培養中の細胞数の変化がある。軟骨細胞のシートの場合は培養中に細胞数の減少はあまり見られなかったが、MSC の場合は培養終了後には播種細胞数の半分以下になっていた。これは、軟骨細胞は分化培養中にアポトーシス関連遺伝子が発現せずアポトーシスを起こさないが、MSC は分化培養中にアポトーシスを起こすという報告と矛盾しない（95)。このような MSC のアポトーシスの頻度の高さや細胞数の変化も軟骨様細胞シートの収縮に関係している可能性も考えられた。当研究室の過去の報告で、同じ規格のセルカルチャーインサートに MSC を播種した場合、播種細胞数が少ないと細胞シートが収縮したことから（72)、シート内部の細胞数が収縮に影響している可能性が考えられた。

また、他の収縮の原因としては、細胞骨格であるアクチンや軟骨様細胞シート中の ECM が関連していると考えられた。一般的な細胞凝集体の形成には細胞

骨格によって細胞を収縮する方向へ引っ張る力と収縮して表面張力を最小限にしようとする力が働くことが知られている。これは、ペレット培養において遠心管に播種した細胞が球状に凝集することなどから裏付けられる。収縮に反する力としてはインテグリンの働きが重要であると考えられた。つまり、インテグリンによる細胞－多孔性膜（基質）間の接着が促進されることにより収縮に対する抵抗力になると考えられる。血清には細胞の接着を促進する物質が含まれていると考えられるため、血清を添加した培地を用いることにより、細胞－多孔性膜間の接着が促進され、より強固に接着したため、軟骨様細胞シートの収縮を防ぐことができたと考えられた。

さらに、ECM の蓄積も軟骨様細胞シートの収縮に関係していると考えられた。線維芽細胞をコラーゲンゲルに包埋することでゲルが収縮することが報告されている。また、一般的に軟骨組織内ではコラーゲンが収縮する方向に働き、GAG 生体軟骨組織において荷重に耐える、つまり膨張する方向に働き収縮を防ぐ方向に働いていることが知られている（96)。アグリカンはコアタンパクに多数の GAG 鎖がつながった構造をしているため、アグリカンも収縮を防ぐ方向に働いていると考えられる。一般に軟骨の発生においてⅡ型コラーゲンは軟骨分化の初期段階で発生し、アグリカンは成熟軟骨細胞で発現することが知られている。MSC を用いて軟骨様細胞シートを作製した場合、培養初期にⅡ型コラーゲンの蓄積が起こり、その後アグリカンや GAG が蓄積してくると考えられる。この際にシートの形状維持には収縮と膨張の両方のバランスが重要であると考えられるが、コラーゲンの蓄積が多くなったり、GAG の蓄積が少なくなったりすることで収縮と膨張のバランスが崩れ、その結果、軟骨様細胞シートが収縮する可能性があると考えられた。軟骨分化培地に血清を添加することにより軟骨様細胞シートの収縮を防ぐことができた。また、軟骨分化培地に血清を添加するこ

とによりアグリカンの mRNA 発現は基本軟骨分化培地に比べ高く、一方、Ⅱ型コラーゲンの発現率は混合培地で低下した。このことから、血清を添加することによりⅡ型コラーゲンの発現、蓄積を抑制され、相対的に sGAG の量が増加し、軟骨様細胞シートの収縮を防いだ可能性も考えることができる。

2-4. 結言

本章では、間葉系幹細胞からスキャフォールドフリー軟骨様細胞シートを収縮なく作製する培養方法の開発のため、培地組成の検討を行った。その結果、従来の基本軟骨分化培地と増殖培地を 1 : 1 で混合した混合培地を使用することで、収縮を起こさずに軟骨様細胞シートを作製することに成功した（Fig. 2-1、Fig. 2-2、Fig. 2-5）。この方法の場合、収縮したケースと比べ、軟骨関連の遺伝子発現が高く、MSC が軟骨細胞へ良好に分化していることが示唆された（Fig. 2-3）。収縮を起こさずに軟骨様細胞シートを作製するためには、少なくとも 5% 程度の血清を添加する必要があると考えられた（Fig. 2-4）。一方で、培地中の血清濃度が 10%と高い場合、MSC の軟骨分化が少し阻害されることが示唆された（Fig. 2-7）。

以上、軟骨分化培地と増殖培地を 1 : 1 で混合した混合培地を用いることにより、MSC から軟骨様細胞シートを、収縮を起こさず、安定して作製でき、さらに、効率よく分化させることができることを明らかにした。

第 3 章

Xeno-free 法による軟骨様細胞シート作製法の検討

3-1. 緒言

第 2 章で、MSC からスキャフォールドフリー軟骨様細胞シートを収縮することなく作製するには、従来の軟骨分化培地と増殖培地を 1 : 1 で混合した、ウシ胎児血清（FBS）含有混合培地を用いることが必要であることを明らかにした。また、軟骨様細胞シートの作製には、他に MSC の増殖培地や凍結保存時の凍結保護剤として FBS を含む培地を使用し、また細胞回収時に細胞剥離剤としてブタ由来トリプシンを使用している。次に、この軟骨様細胞シートを軟骨欠損の治療へ臨床応用を考えた場合、このような異種動物由来成分の使用が課題となる。すなわち、第 1 章で述べたように、異種動物由来成分は異種タンパク質やウイルスなどの病原体の混入の可能性があり安全性に問題があるため、移植用組織の培養工程ではこれらを使用しないことが望ましい。従って、軟骨様細胞シート作製工程においても、これらの異種動物由来成分を使用しない Xeno-free 法による MSC の分離・増殖、および軟骨様細胞シートの作製を検討する必要性がある。

上述したように、軟骨様細胞シートの収縮防止のために、増殖培地に含まれる、異種動物由来成分である FBS を加える必要があった。初めに、軟骨様細胞シート作製工程から FBS を取り除くために、代替品を検討した。ここで、臨床応用において自己血清の使用が最も安全と考えられた。そこで、自己血清使用の前段階として、本章では MSC と同種のヒト血清（HS）を FBS の代わりに使用して、軟骨様細胞シートの作製が可能か検討することにした。

一方、完全な Xeno-free 化を実現するためには、軟骨様細胞シート作製の前段階である、MSC の分離・増殖の工程からも FBS、ブタ由来トリプシンなどの異種動物由来成分を取り除く必要がある。これまで当研究室では FBS 含有培地の代わりに無血清培地 MesenCult®-XF 培地（Stem Cell Technologies）、ブタ由

来トリプシンの代わりに組換えプロテアーゼ TrypLE™ Select（Invitrogen）、凍結保存時の FBS 含有培地の代わりに無血清凍結保護剤 TC プロテクター®（DS Pharma Biomedical）を用いた Xeno-free 法での MSC の分離および増殖培養を報告している（77）。そこで、本章ではこのような Xeno-free 法で分離・増殖させた MSC を用いて軟骨様細胞シートを作製可能かどうか検討することにした。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 間葉系幹細胞の分離

従来法による間葉系幹細胞の分離は、ドナーC（19 歳・男性）及びドナーD（69 歳・男性）から採取した骨髄液から 2-2-1.に示した方法で行った。

異種動物成分不含材料を用いて培養を行う Xeno-Free 法による培養には、無血清増殖用培地（MesenCult®-XF 培地)、組み換えプロテアーゼ（TrypLE™ Select)、無血清細胞凍結保護剤（TC プロテクター®）を使用した。

使用する 100φディッシュに、PBS(−)で 20 倍に希釈した MesenCult®-XF Attachment Substrate（Stemcell technologies, 05424）を 2.5 ml 加え、4℃、オーバーナイトでディッシュをコーティングした。ドナー（ドナーE：17 歳・男性）から注射針を用いて採取した骨髄液（約 10 ml）を、チュルク液（Nacalai tesque, 372-12）を用いて骨髄液中の単核細胞数を計測し、単核細胞密度が 7.0 $\times 10^4$ cells/cm^2 となるように、コーティングした 100φディッシュに骨髄液を播種し、以下に示した無血清増殖培地 MesenCult®-XF 培地を用いて培養を行った。播種してから 8 日後に半量培地交換を行い、プレコンフルエントに到達した 13 日後にディッシュの培地を除去し、37℃に加温した TrypLE™ Select（Invitrogen, 12563-011）を用いて細胞を剥離し、細胞懸濁液を回収した。回収した細胞懸濁液は遠心分離（1000 rpm, 5 分間, 4℃）し上清を除去した後、TC プロテクター®（DS pharma biomedical, TCP-001）を用いてアンプル化し、液体窒素中で凍結保存した。

3-2-2. 培地作製

3-2-2-1. 増殖培地

10%FBS 含有 DMEM-LG は 2-2-2-1.と同様に作製した。FBS の代替品としてヒト血清（Human serum: HS）を用いた 10%HS 含有 DMEM-LG は、10.0 g/l DMEM-LG（Invitrogen, 31600-034）、3.7 g/l $NaHCO_3$（Wako, 191-01305）、10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン（Sigma, P7539）となるように超純水（Sigma, W3500）でメスアップした培地を濾過フィルター（Nalgene, 595-4520）で減圧濾過除菌した。その後、ヒト血清（Human serum, “Off the Clot” Type AB）（PAA laboratories, C11-021）を 100 ml/l の濃度で加えた。

無血清培地 MesenCult®-XF 培地は 400 ml の MesenCult®-XF Basal Medium（Stemcell technologies, 05421）に MesenCult®-XF Supplement（Stemcell technologies, 05422）を 100 ml、L-Glutamine（Stemcell technologies, 07100）を 2 mM となるように添加した。

3-2-2-2. 軟骨分化培地

基本軟骨分化培地は 2-2-2-2.と同様の方法で作製した。混合培地（FBS）は基本軟骨分化と 10%FBS 含有 DMEM-LG を 1:1 で混合し作製した。混合培地（HS）は基本軟骨分化と 10%HS 含有 DMEM-LG を 1：1 で混合し作製した。

3-2-3. 培養方法

3-2-3-1. 増殖培養方法

従来法による増殖培養は 10%FBS 含有 DMEM-LG を用いて、2-2-3-1.と同様の方法で行った。

Xeno-Free 法による増殖培養は、使用する 100 φディッシュに、PBS(−)で 28 倍に希釈した MesenCult®-XF Attachment Substrate を 2.5 ml 加え、4℃、オーバーナイトでコーティングした。MesenCult®-XF 培地 10 ml を用いて、アンプル内の保存細胞を播種細胞密度が 0.15×10^4 cells/cm^2 となるように、コーティングした 100 φディッシュに播種し、37℃、5%CO_2 雰囲気下でプレコンフルエントになるまで静置培養を行った。プレコンフルエント到達後、TrypLE™ Select を用いて細胞を剥がし、播種細胞密度が 0.15×10^4 cells/cm^2 となるように 100 φディッシュに再播種し、継代培養した。

3-2-3-2. 軟骨分化培養およびシート培養

2-2-3-2.と同様の方法で行った。

3-2-4. 分析方法

3-2-4-1. サイズおよび湿重量測定

2-2-4-1.と同様の方法で行った。

3-2-4-2. 細胞数計数

2-2-4-2.と同様の方法で行った。

3-2-4-3. 遺伝子発現解析

2-2-4-3.と同様の方法で、アグリカンおよびⅡ型コラーゲンの遺伝子発現率の測定を行った。

3-2-4-4. 硫酸化グルコサミノグリカン（sGAG）定量

軟骨細胞シートを 24 穴プレートのウェル内にて PBS(−)で 5 分ずつ 3 回洗浄した。sGAG 抽出液（4 M グアニジン塩酸塩（Wako）、10 mM Na_2EDTA（Dojindo）、100 mM ε-アミノカプロン酸（Wako）、5 mM ベンズアミジン塩酸（Wako）、pH 5.8）を 1 ml を加え、4℃、168 strokes/min で 48 時間振とう抽出した。その後、4℃、3000　g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。上清に 3 倍量の 1.3%(w/v) 酢酸カリウム（Wako, 160-03175）／無水エタノール（Wako, 321-00025）を加え、沈殿を回収した。回収した全沈殿物を純水 2 ml に溶解し、sGAG 溶液とした。96 穴プレート（Greiner bio-one, 655101）の各ウェルに sGAG 溶液を 30 µl ずつ添加し、150 µl の DMMB 溶液（2 ml/L ギ酸（Kanto）、2 mg/L ギ酸ナトリウム（Kishida, 000-71542）、16 mg/L DMMB（Sigma, 341088）、5 ml/L 無水エタノール（Wako, 321-00025））を加えた。DMMB 溶液を添加後、分光光度計（Bio-rad, Model 550 Microplate Reader）を用いて 540 nm の吸光度を測定した。スタンダードとして 10~50 µg/ml のコンドロイチン硫酸 C ナトリウム（Sigma, C4384）を用いた。

3-2-4-5. Ⅱ型コラーゲン定量

軟骨細胞シートを 24 穴プレートのウェル内にて PBS(−) で 3 回洗浄した。3 M グアニジン塩酸塩（Wako 070-01825）／0.05 M Tris（Wako, 204-07885）-HCl buffer、pH 7.5 を 0.5 ml 入れ 4℃、160 strokes/min で 1 晩往復振とうした。10000 rpm で 3 分間遠心分離し、沈殿物を冷却した純水で 2 回洗浄した。0.5 M NaCl（Junsei, 19015-0301）を含む 0.05 M 酢酸（Wako, 017-00251）0.8 ml 中に再度沈殿物を浮遊させた。10 mg/ml ペプシン（Wako, 168-18723）／0.05 M 酢酸 0.1 ml を加え、4℃、160 strokes/min で 48 時間往復振とうした。

10×TBS（1.0 M Tris-2.0 M NaCl-50 mM $CaCl_2$、pH7.8~8.0） 0.1 ml 加え、1 N NaOH（Junsei, 39155-1201）を用いて pH8.0 に調整した。1 mg/ml 膵エラスターゼ（Wako, 058-05361）／1×TBS（pH7.8~8.0）を 0.1 ml 加え 4℃、160 strokes/min で 1 晩往復振とうした。単量化したサンプルを 10000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を回収し、－20℃で保存した。

Ⅱ型コラーゲンの ELISA 法による定量には、Native TypeⅡ collagen Detection Kit（Chondrex, 6009）を用いた。キャプチャー抗体 0.1 ml を溶液 A（キャプチャー抗体希釈バッファー）10 ml で希釈した。96 穴 ELISA プレートに 1 ウェル当たり 0.1 ml 加え、4℃で 1 晩置いた。1×ウォッシュバッファーで 3 回洗浄した。サンプルを 1：100~1：10000 の範囲で、溶液 B（サンプル／スタンダード希釈バッファー）で希釈した。また、Ⅱ型コラーゲンスタンダードを 0.003~0.2 μg/ml の濃度範囲で溶液 B に溶解させ、7 つのスタンダードそれぞれと希釈したサンプルを 1 ウェル当たり 0.1 ml 加え室温で 2 時間置いた。その後、プレートを 1×ウォッシュバッファーで 3 回洗浄した。検出抗体 0.05 ml を溶液 C（検出抗体希釈バッファー）10 ml に溶解させ、この溶液を 1 ウェル当たり 0.1 ml 加え、室温で 2 時間置いた。プレートを 1×ウォッシュバッファーで 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン 50 μl を溶液 D（ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン希釈バッファー）10 ml で希釈し、これを 1 ウェル当たり 0.1 ml 加え室温で 1 時間置いた。プレートを 1×ウォッシュバッファーで 6 回洗浄した。1 バイアルのペルオキシダーゼ標識二次抗体用基質（OPD）を OPD 希釈液 10 ml に溶解させ 1 ウェル当たり 0.1 ml 加え室温で 30 分置いた。2.5 N 硫酸（停止液）50 μl を加えて、反応を止め、分光光度計（Bio-rad, Model 550 Microplate Reader） で 490 nm での吸光度を測定し、Ⅱ型コラーゲン量を定量した。

3-2-4-6. 組織学分析

作製した軟骨様細胞シートを PBS(−) 2 ml により 3 回洗浄し、15% ホルマリン溶液を約 8 ml 加えて組織を固定した後、構造体の中心部の切片（厚さ 4 μm）を作製した。

パラフィンによって包埋されている切片の載ったプレパラートをガラスシャーレに入れ、プレパラート全体が浸る程度のキシレン（Wako, 244-00086）を加えて 10 分間静置した。この操作はガラスシャーレとキシレンを新しいものに換え、3 回繰り返した。次に新しいガラスシャーレにプレパラートを移し、プレパラート全体が浸る程度の無水エタノール（Wako, 321-00025）を加えて 10 分間静置した。この操作はガラスシャーレと無水エタノールを新しいものに換え、2 回繰り返した。さらに新しいガラスシャーレにプレパラートを移し、プレパラート全体が浸る程度の 99.5% エタノール（Junsei, 17065-0382）を加えて 10 分間静置した。この操作はガラスシャーレと 99.5%エタノールを換え、2 回繰り返した。最後に流水で 3 分間洗浄した。この試料を顕微鏡で観察した。

軟骨様細胞シート切片のアグリカン染色はアルシアンブルー染色法によって行った。ガラスシャーレに 15 ml の 3% 酢酸水溶液（Wako, 014-0261）を入れ、脱パラフィン操作をしたスライドを 3 分間浸して洗浄した。3% 酢酸水溶液を除去し、200 μl のアルシアンブルー染色液（Wako, 015-13805）をスライド上の切片に滴下して室温で 30 分間静置した。新しいガラスシャーレに 15 ml の 3% 酢酸水溶液を入れ、スライドを 3 分間浸して洗浄した。この操作をガラスシャーレと 3% 酢酸水溶液を新しいものに換えて 3 回行った。最後に、流水で 3 分間洗浄し、染色した切片を位相差顕微鏡（Olympus, CKX41-31PHP）により観察し、デジタル画像を取得した。

軟骨様細胞シート切片のアグリカン染色に、トルイジンブルー染色法も行っ

た。脱パラフィン操作をしたスライドに 200 µl トルイジンブルー染色液（Wako, 206-14555）をスライド上の切片に滴下して室温で 30 分間静置した。新しいガラスシャーレに 15 ml の 99.5% エタノール（Junsei, 17065-0382）を入れ、スライドを数秒間浸して洗浄した。この操作をガラスシャーレと 99.5% エタノールを新しいものに換えて 2 回行った。染色した切片を位相差顕微鏡（Olympus, CKX41-31PHP）により観察し、デジタル画像を取得した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. ヒト血清を用いた軟骨様細胞シート作製の検討

軟骨様細胞シートを臨床応用するため、安全上の問題から動物由来成分を代替する必要がある。これまでにウシ胎児血清（FBS）を含む分化培地を用いることにより細胞シートの収縮を防げることが分かった。そこで臨床応用を可能にするために FBS の代わりにヒト血清（HS）の利用を検討した。FBS の代わりに HS を添加した混合培地を使用してシート培養を行った。すなわち、セルカルチャーインサートにドナーC 由来またはドナーD 由来で、FBS 含有増殖用培地で増殖させた MSC を 18.6×10^5 cells 播種し、従来の基本軟骨分化培地や混合培地(FBS)（基本軟骨分化培地＋10%FBS 含有 DMEM-LG）に加え、HS 含有混合培地（基本軟骨分化培地＋10%HS 含有 DMEM-LG）（混合培地(HS)）の 3 種類の軟骨分化培地を用いてシート培養を行った。

培養終了時の軟骨様細胞シートを培養器の上から撮影した写真を Fig. 3-1 に示した。また、各培地で培養した軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、定規と共に軟骨様細胞シートの上からおよび横から撮影した写真を Fig. 3-2 に示した。

その結果、混合培地(HS)で培養した軟骨様細胞シートは混合培地(FBS)で培養した軟骨様細胞シートと同様に収縮を起こさず培養可能であった（Fig. 3-1）、また混合培地（HS）で培養した軟骨様細胞シートは混合培地（FBS）で培養した軟骨様細胞シートと、外見上、ほぼ同等の大きさ、厚さを有していた（Fig. 3-2）。

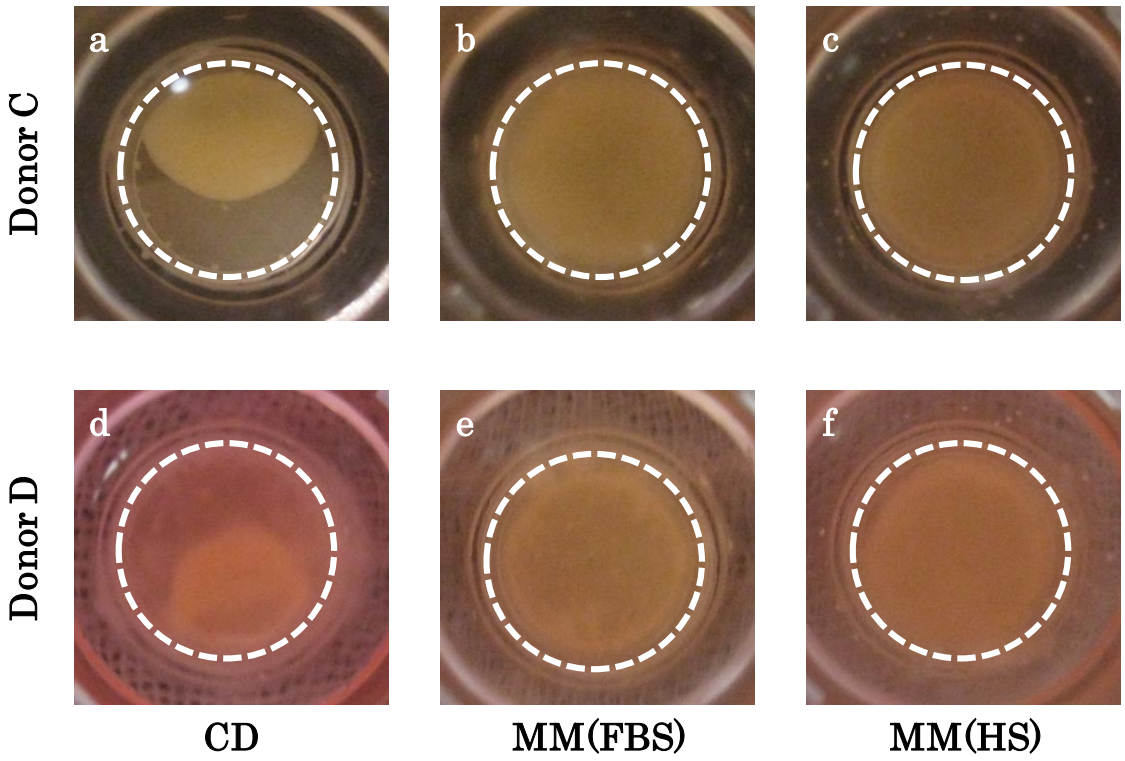


Fig. 3-1. Influence of human serum on the cell sheet. Top view of cell sheet cultures on Cell culture insert™. White dotted circle shows outline of the bottom of Cell culture insert™. Its diameter is 6.4 mm.

MSCs derived donor C (a-c), and donor D (d-f). Cells were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD) (a, d), mixed medium (FBS) (MM(FBS)) (b, e), and mixed medium (HS) (MM(HS)) (c, f).

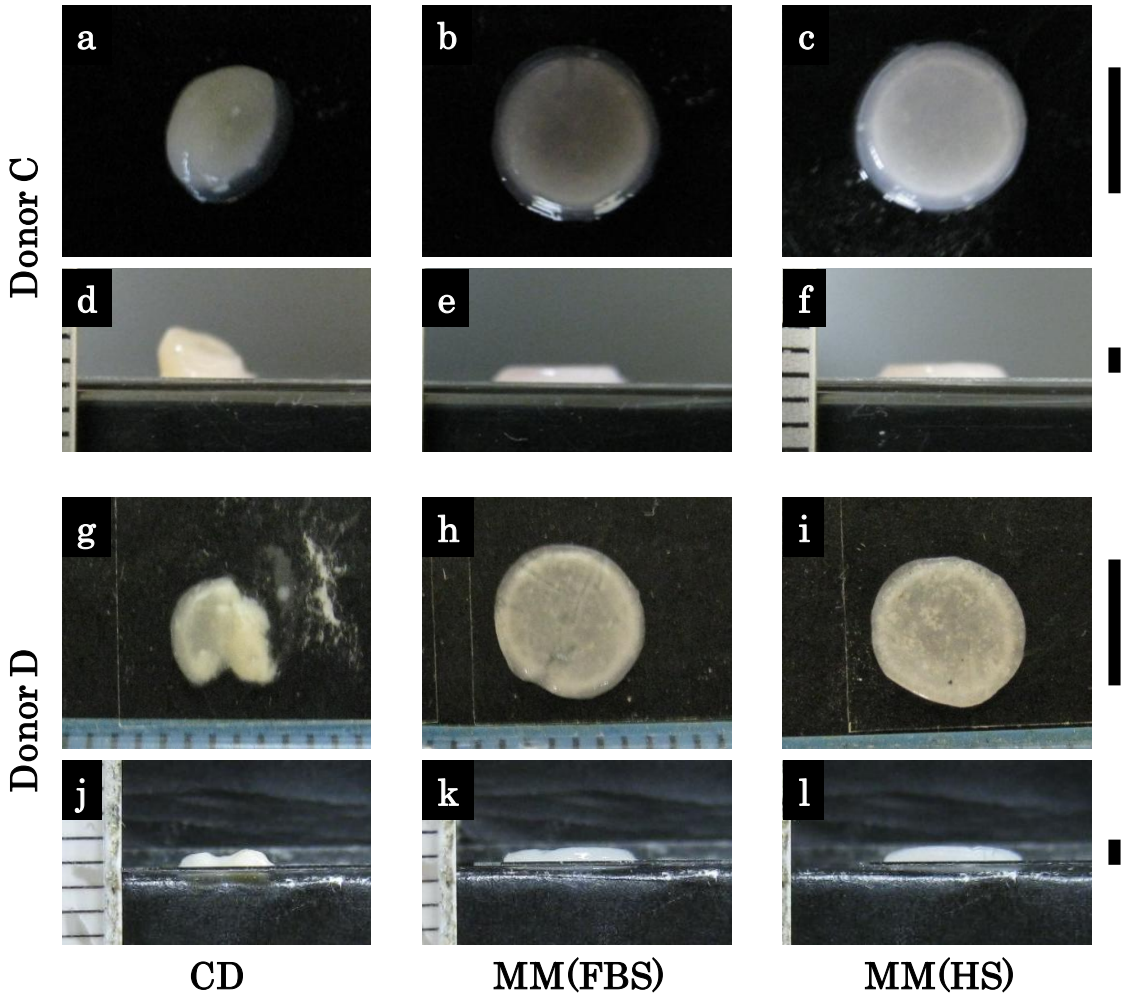


Fig. 3-2　Top and side views of cell sheets cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD) (a, d, g, j), mixed medium (FBS) (MM(FBS)) (b, e, h, k), and mixed medium (HS) (MM(HS)) (c, f, i, l). Top view (a-c, g-i), side view (d-f, j-l). MSCs derived donor C (a-f), and donor D (g-l). Scale bars show 5 mm (a-c, g-i) and 1 mm (d-f, j-l).

また、血清の由来の種差が MSC の軟骨分化に影響するか調べるため、軟骨関連遺伝子の測定を行った。ドナーC 由来の MSC を各培地で 3 週間培養した後の軟骨様細胞シートの細胞数および軟骨関連遺伝子（アグリカン、Ⅱ型コラーゲン）の mRNA の発現率を Fig. 3-3 に示した。

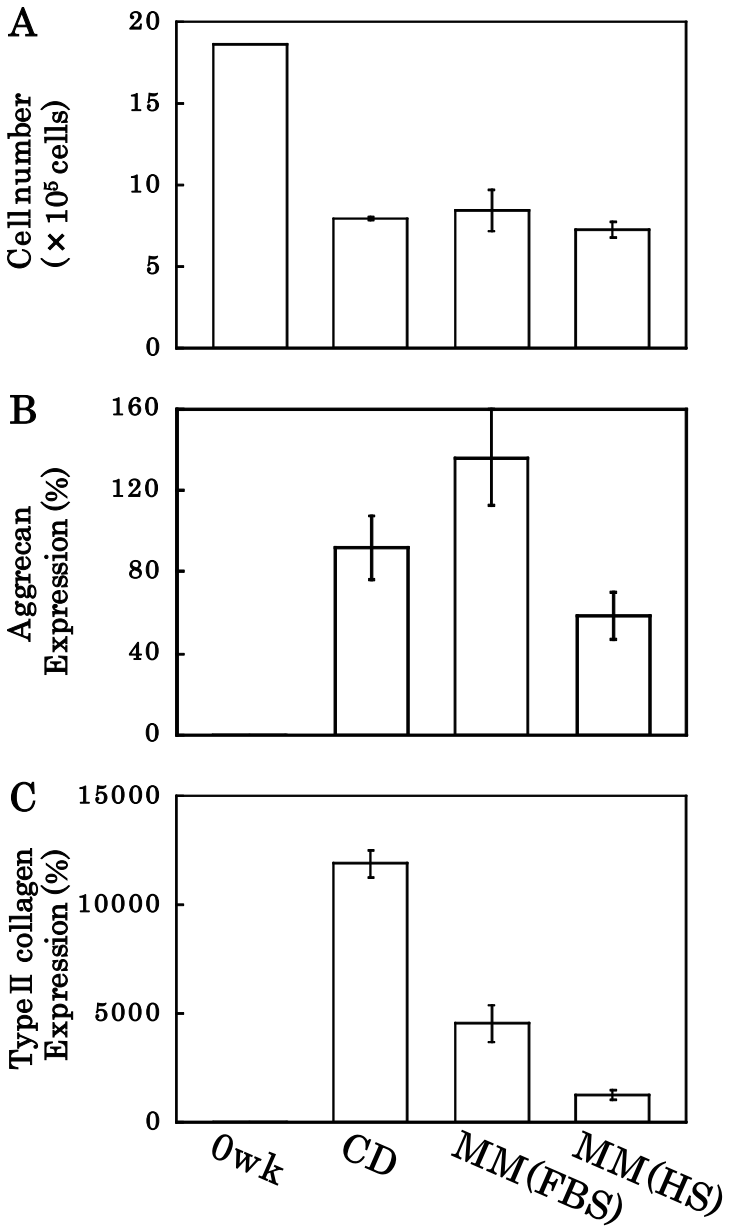


Fig. 3-3. Cell number and gene expression of cultivated cells.

Cell number (A), aggrecan expression (B), type Ⅱ collagen expression (C). Before differentiation (0wk), cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD), mixed medium (FBS) (MM(FBS)), mixed medium (HS) (MM(HS)) .

その結果、軟骨様細胞シートの細胞数はいずれの条件でも差は見られなかった。軟骨関連遺伝子の mRNA の発現率は、基本軟骨分化培地で培養したものが、アグリカン約 92%、Ⅱ型コラーゲンが約 12000%であった。混合培地(FBS)で培養したものはアグリカン約 140%、Ⅱ型コラーゲン約 4500%であり、混合培地(HS)で培養したものでアグリカン約 60%、Ⅱ型コラーゲン約 1200%であった。この結果から、混合培地(HS)で培養したものは混合培地(FBS)で培養したものよりも軟骨関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。

また、軟骨様細胞シート中の ECM の蓄積に関して、硫酸化グルコサミノグリカン（sGAG）を DMMB 法で、Ⅱ型コラーゲンを ELISA 法で定量し、それぞれ湿重量で標準化して示した（Fig. 3-4）。

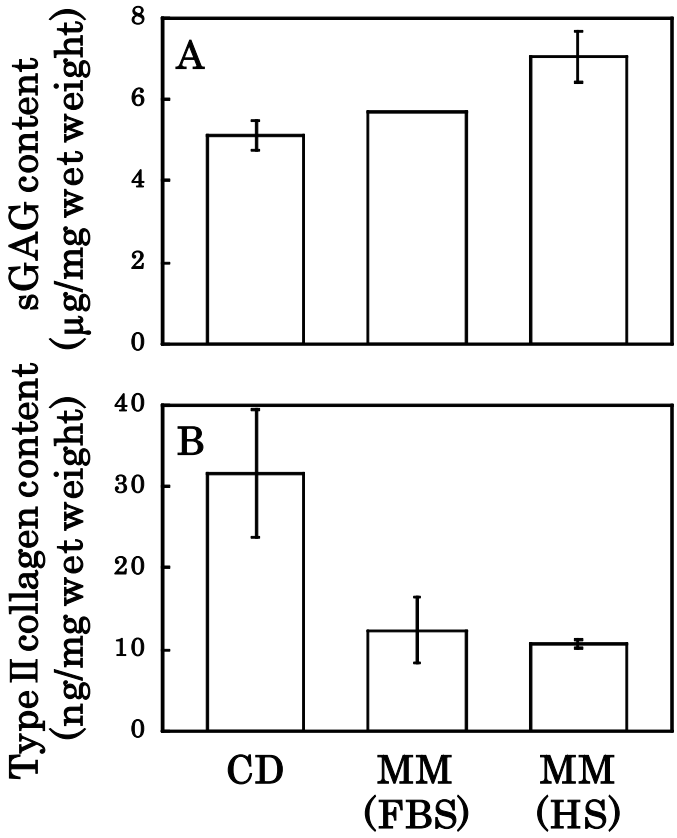


Fig. 3-4　Quantitative biochemical analyses of sGAG and type Ⅱ collagen. sGAG per wet weight (A), and type Ⅱ collagen per wet weight (B). Cells were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD), mixed medium (FBS) (MM(FBS)), and mixed medium (HS) (MM(HS)) .

その結果、ECM の蓄積量は培地条件間でほとんど差は見られなかった（5.1～7.1 μg/mg）（Fig. 3-4A)。一方、Ⅱ型コラーゲンの蓄積量は基本軟骨分化培地（CD）で最も高く、混合培地よりも顕著に高かった。一方、混合培地間では FBS と HS の間にほとんど差が見られなかった（Fig. 3-4B)。

また、細胞の状態と sGAG の蓄積を組織学的に分析するため、各培地で 3 週間培養した軟骨様細胞シートの中心部を通る、厚さ 4 μm の切片を作製し、アルシアンブルーおよびトルイジンブルーによって染色を行った（Fig. 3-5、Fig. 3-6）。

その結果、いずれの培地で培養した場合にも、アルシアンブルー、トルイジンブルーによって組織が均一に染まった。培地の違いによる染色の差はほとんど見られなかった。これは、sGAG の蓄積量が培地条件によらずほぼ同程度であることと一致する。また、トルイジンブルー染色では、組織内部の構造および細胞形態が観察できた（Fig. 3-6d-i）。ここでは、軟骨様細胞シートの内部は細胞の間隔が広く、網目状に発達した sGAG の蓄積が見られた。この間隔の広さは基本軟骨分化培地で培養したものが最も広く、混合培地では FBS と HS の差は見られなかった。また、広い未染色の空間内に多角形状の細胞が観察された。一方、細胞シートの表面では、表面に沿って伸展した細長い細胞が観察された。これらの特徴的な構造は、典型的な軟骨様組織の構造と類似していると考えられた。

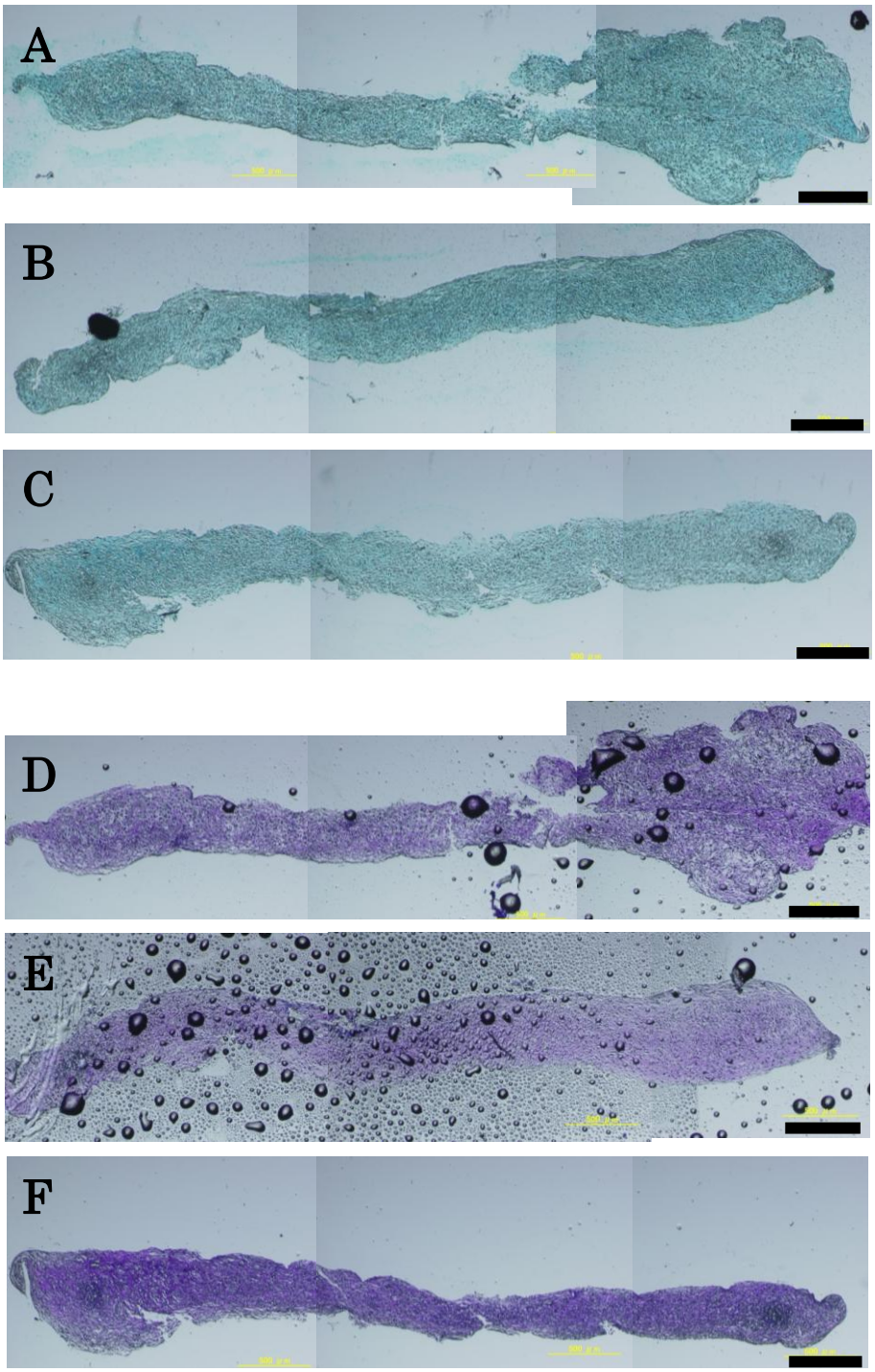


Fig. 3-5　Histological analyses of cell sheets. Cells were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (A, D), mixed medium (FBS) (B, E), and mixed medium (HS) (C, F) and stained with alcian blue (A-C) and toluidine blue (D-E). The scale bars show 500 μm.

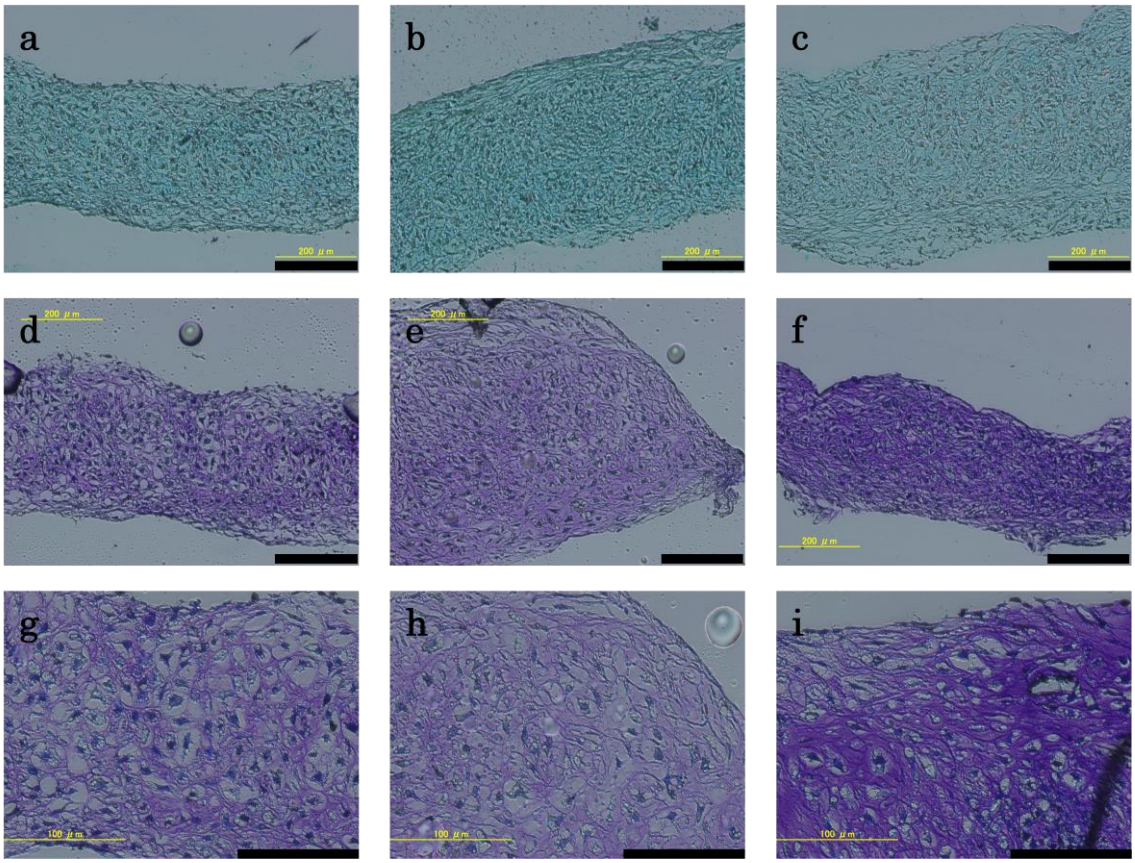


Fig. 3-6　Histological analyses of cell sheets. Cells were cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (a, d, g), mixed medium (FBS) (b, e, h), and mixed medium (HS) (c, f, i) and stained with alcian blue (a-c) and toluidine blue (d-i). The scale bars show 200 μm (a-f), and 100 μm (g-i).

このことから、FBS の代わりにヒト血清を用いた場合でも、収縮を起こさずに軟骨様細胞シートを作製できることが明らかとなった。ヒト血清を使用した場合、FBS を使用した場合より軟骨関連遺伝子発現が低下したが、ECM の蓄積にはほとんど影響がなかった。また、軟骨様細胞シートは軟骨組織に類似した特徴的な内部構造を示し、アルシアンブルー、トルイジンブルー染色ともに陽性だった。これらのことから、FBS の代わりにヒト血清を用いた混合培地の使用により、軟骨様細胞シートを作製可能であることが示された。

上記の結果から、ウシ胎児血清（FBS）またはヒト血清（HS）はシート内部の細胞の生存率に関しては FBS と HS の間に差はないが、軟骨分化に関しては FBS の方が優れていると考えられた。その理由の一つとして、FBS は胎児由来である一方、HS は成人由来であることが考えられた。なぜなら、一般に血液に含まれる成長因子の量は胎児の時に多く、成長に伴い減少すると考えられているからである。MSC の増殖培養においても、HS を用いた場合、FBS を添加した場合に比べ増殖が遅いことが報告されている（76, 97）。従って、FBS を添加した混合培地の方が HS を添加した混合培地よりも軟骨様細胞シートの軟骨分化率が高くなった理由の一つは、FBS が HS よりも多くの成長因子を含んでいるためだと推測された。

3-3-2. Xeno-Free（異種動物成分不含）法で増殖させた MSC を用いた軟骨様細胞シート作製の検討

3-3-1.で、軟骨様細胞シート作製時に使用する血清を FBS から HS に代替可能であることを示した。しかし、Xeno-Free 培養のためにはさらに MSC の増殖の過程から FBS、ブタ由来トリプシンなどの異種動物由来成分を除外して培養を行わなければならない。そこで、異種動物由来成分不含材料によって増殖させた MSC を用いて、これまでの方法と同等な軟骨様細胞シートを作製可能か検討するために、FBS 含有培地の代わりに無血清増殖用培地（MesenCult®-XF Medium）、ブタ由来トリプシンの代わりに組み換えプロテアーゼ（TrypLE™ Select）、FBS の代わりに血清不含凍結保護剤（TC プロテクター®）を用いて、骨髄液から分離および増殖をさせた MSC（ドナーE 由来）をセルカルチャーインサートに 18.6×10^5 cells 播種し種々の軟骨分化培地でシート培養を行った。シート培養時に基本軟骨分化培地（CD）、混合培地(FBS)（MM(FBS)）、混合培地(HS)（MM(HS)）をそれぞれ用いた。2 日毎に培地交換を行い、21 日間培養を行った。

培養終了後、作製した軟骨様細胞シートをセルカルチャーインサートから取り出し、軟骨様細胞シートの上および横から撮影した写真を Fig. 3-7 に示した。また、作製した軟骨様細胞シートの細胞数および軟骨関連遺伝子（アグリカン、Ⅱ型コラーゲン）の mRNA の発現率を Fig. 3-8 に示した。

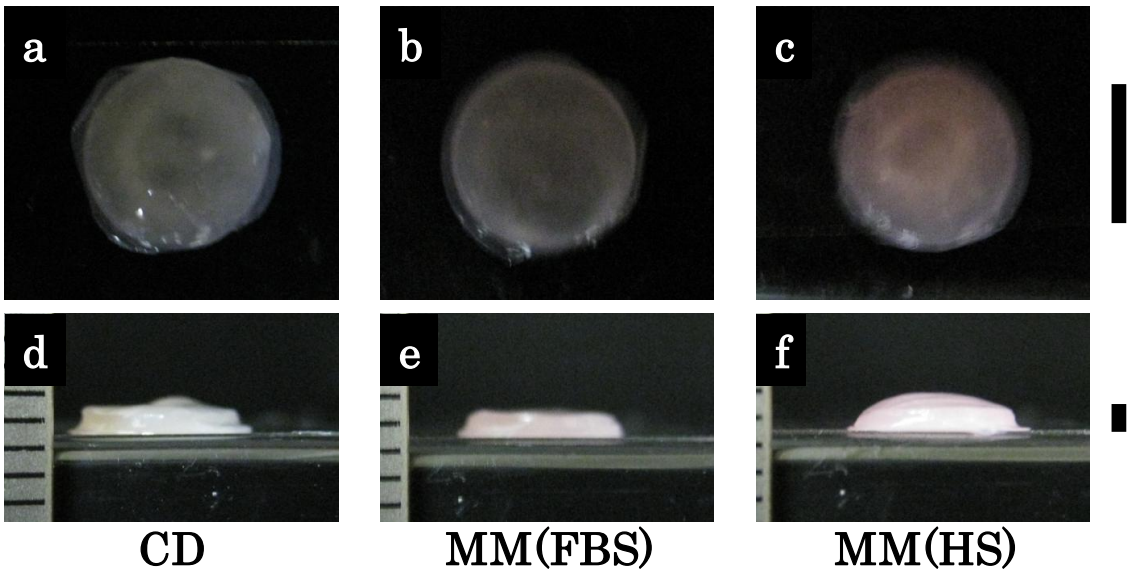


Fig. 3-7. Top and side views of cell sheets cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD) (a, d), mixed medium (FBS) (MM(FBS) (b, e), and mixed medium (HS) (MM(HS) (c, f) .Scale bars show 5 mm (a-c) and 1 mm (e-f).

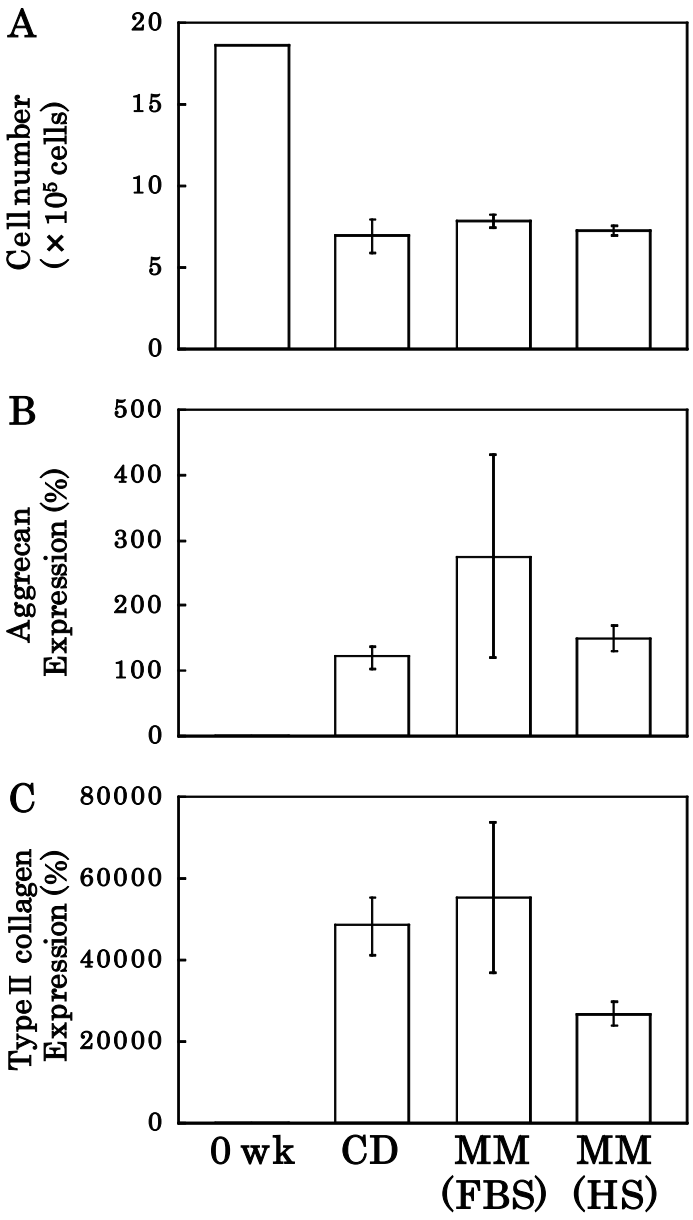


Fig. 3-8. Cell number and gene expression of cultivated cells.

Cell number (A), aggrecan expression (B), type Ⅱ collagen expression (C). Before differentiation (0wk), cultivated with basic chondrogenic differentiation medium (CD), mixed medium (FBS) (MM(FBS)) and mixed medium (HS) (MM(HS)).

その結果、いずれの培地を用いた場合でも細胞シートの収縮は起こらず、厚さ約 1 mm と十分な厚みのある軟骨様細胞シートを作製できた。(Fig. 3-7)。

また、定量的 RT-PCR の結果は、アグリカン、Ⅱ型コラーゲン共に混合培地（FBS）(MM(FBS)) で最も高かった（アグリカン約 275%、Ⅱ型コラーゲン約 55000%)。また、ヒト血清を使用した混合培地（HS）(MM(HS)) でも高い発現率が得られた（アグリカン約 150%、Ⅱ型コラーゲン約 27000%）(Fig. 3-8)。

従って、MesenCult®-XF 培地を用いて増殖させた MSC を用いても、FBS 培地の場合と同様に収縮せずに厚みのある軟骨様細胞シートが作製でき、かつ細胞シート内の細胞の軟骨関連遺伝子の mRNA 発現も非常に高いことが明らかとなった。さらに、ここでは細胞シート作製時にヒト血清を含む培地を使用することにより、培養の全工程を Xeno-free 法で行えることが明らかとなった。

今回の研究では増殖用培地として無血清 MSC 増殖用培地（MesenCult®-XF 培地）および細胞解離剤として組み換えプロテアーゼ（TrypLE™ Select）を使用し、異種動物由来成分を含まない工程で培養を行う Xeno-Free 法での増殖した MSC の使用を検討した。その結果、Xeno-Free 法で増殖させた MSC は従来法で増殖させた MSC と比較して増殖速度が速く、より小さな線維芽様の細胞形態を示した。さらに、軟骨様細胞シート中の細胞の軟骨関連遺伝子の発現が非常に高かった。この原因としては、MesenCult®-XF 培地に含まれる増殖因子の影響である可能性が考えられた。当研究室の過去の報告でも、Xeno-Free 法で増殖させた MSC は従来法で増殖させた MSC と比較し、高い増殖能、短い平均世代時間、小さい繊維芽様の細胞形態、また高い CD90・CD166 陽性細胞の割合と低いアグリカン遺伝子発現率を示した（77, 97)。すなわち、Xeno-Free 法で増殖させた MSC は未分化状態を保ったまま増殖し、そのことが高い軟骨関連

遺伝子の発現につながったと考えられている。また、大きく広がった細胞に比べて小さい繊維芽様細胞の方が増殖能や分化能が高いという過去の報告とも一致した（98, 99）。

このように、Xeno-Free 法による MSC 増殖と HS を用いた軟骨分化培養を組み合わせることにより、高い軟骨分化率および厚み、固さのある軟骨様細胞シートを安全に作製する方法を提案できた。

一方、本章では市販のヒト血清を使用したが、将来的な臨床応用のためには安全性を確保するために患者自身の自己血清の使用を検討する必要がある。そこで、その実現性を必要な血清量から検証してみる。本章の作製条件による軟骨様細胞シート 1 個の作製に必要な血清量を計算すると、培養期間 3 週間、培地交換頻度 2 日、培地量 1.3 ml、軟骨分化培地中の血清濃度 5%であるので、軟骨分化培地が 13 ml 必要であり、血清としては 0.65 ml 必要であると計算できる。ここで、患者から採取した血液量の 30%を血清に使用できるとした場合、200 ml の血液採取で 60 ml の血清が回収でき、この場合、約 90 個の軟骨様細胞シート作製に必要な血清が回収できる。このことから、自己血清でも軟骨様細胞シートを作製し、治療に用いることが量的には可能であるといえる。

3-4. 結言

本章では、軟骨様細胞シートの臨床応用に向け、免疫反応や感染症の危険性が少なく安全な細胞シートの作製のため、異種動物由来成分を使用しない培養工程、すなわち Xeno-free 法による培養を検討した。

まず、分化培養工程の Xeno-free 化のため、分化培地に使用する血清をウシ胎児血清（FBS）からヒト血清（HS）への置き換えを検討した。その結果、HS を使用した場合でも、収縮することなく軟骨様細胞シートを作製することが可能であった（Fig. 3-1、Fig. 3-2）。また、FBS を使用した場合と ECM の蓄積量に変化が見られず、品質においても同等であったと考えられた（Fig. 3-4）。

次に、培養の全工程を Xeno-free 法で行うため、MesenCult-XF 培地を用いて分離及び増殖を行った MSC を使用し、FBS または HS を使用した混合培地で軟骨様細胞シートの作製を行った。その結果、いずれの培地条件でも収縮せずに厚みのある軟骨様細胞シートが作製でき、細胞の軟骨関連遺伝子の mRNA 発現も非常に高かった。また、細胞シート作製時にヒト血清を含む培地を使用した条件においても、アグリカンが約 150%、Ⅱ型コラーゲンが約 27000%と十分な発現が見られた。

以上の結果より、無血清培地 MesenCult-XF 培地を用いて増殖を行い、分化培養時にヒト血清を使用し軟骨様細胞シートを作製することにより、異種動物由来成分を使用せずに培養の全工程を Xeno-free 法で行えることを明らかにした。

第 4 章

軟骨様細胞シートのⅡ型コラーゲン蓄積量増大法の検討

4-1. 緒言

第 2 章で述べたように血清を含む混合培地を使用することにより、収縮を起こさずに軟骨様細胞シートの作製することに成功した。しかし、軟骨様細胞シート中に含まれる ECM のうち、sGAG は約 6 μg/mg と正常軟骨（約 80 μg/mg）の約 8%程度まで蓄積していたのに対し、II 型コラーゲンの蓄積量は約 0.01 μg/mg と正常軟骨（約 120 μg/mg）の約 0.01%であった。第 1 章で述べたように ECM は軟骨組織の力学的特性に重要な役割を担っており、移植後に患部に生着し、破壊されないためには軟骨様細胞シート中の ECM 含量、特にⅡ型コラーゲン量を増加させる必要があると考えられた。

これまで当研究室において、軟骨細胞の三次元培養において、グルコサミノグリカン（GAG）構成糖である、コンドロイチン硫酸、N アセチル-D-ガラクトサミン、D-グルクロン酸、D-ガラクトース、N アセチル D-グルコサミンを添加したところ、軟骨様組織内部のⅡ型コラーゲン蓄積量が増加したことを報告した（100)。しかし、この効果は MSC のスキャフォールドフリー細胞シート培養では見られなかったため、MSC においてⅡ型コラーゲンの合成を促進する効果を持つ、新たな添加物を検討する必要が考えられた。

そのような添加物の候補として、コラーゲンの合成に必須な因子である、アスコルビン酸が挙げられる。アスコルビン酸はコラーゲン鎖中のリジンやプロリンの水酸化に関与する酵素、プロコラーゲン-プロリンジオキシゲナーゼおよびプロコラーゲン-リシン-5-ジオキシゲナーゼの補因子であり、正常な三重らせん構造を形成するのに重要である。また、線維芽細胞においてアスコルビン酸にⅠ型コラーゲンの増加効果が報告されており、コラーゲンの合成にも関与していることが示唆されている（84)。このようなことから、アスコルビン酸はⅡ型コラーゲンにおいても同様の増加効果があるのではないかと推測された。ま

た、アスコルビン酸は軟骨分化においても分化を促進する効果があることが報告されている。例えば、軟骨前駆細胞株（ATDC5）においてアスコルビン酸が軟骨分化を促進することが報告されている（85)。この原因の一つに細胞の内のシグナルである細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）の関与が考えられている。ERK はマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）の一つであり、細胞の増殖や分化に関与していると考えられる。軟骨分化を誘導する TGF-βは ERK や p38 MAPK などの MAPK を活性化することが報告されている（101)。ERK はⅡ型コラーゲンの転写に重要な Smad のリン酸化に関与していると考えられるため、アスコルビン酸は ERK の活性化によってⅡ型コラーゲンの転写を促進できるのではないかと考えた。

一方、従来立体的組織作製の際のスキャフォールドに用いられている、コラーゲンでも軟骨分化の促進が報告されている。例えば、Ⅰ型コラーゲンをコートした培養器で脱分化した軟骨細胞を培養した場合、軟骨分化が促進されることが報告されている（102)。この効果には、コラーゲンとその受容体であるインテグリンとの結合によるシグナル伝達が関与していると考えられ、細胞内のシグナル伝達物質である ERK もインテグリンシグナルによっても活性化されることが報告されている（103)。また、Ⅰ型コラーゲンも ERK を活性化することが報告されているため（104)、Ⅰ型コラーゲンを添加することによりインテグリン媒介の ERK 活性化が起こり、Ⅱ型コラーゲン合成を促進させることが期待できた。ここでは、抗原性が低いため従来から軟骨様組織のスキャフォールドとして使用され、臨床例のある、Ⅰ型アテロコラーゲンの利用を検討した。

以上のように、本章では軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲン蓄積量を増大させる培養方法として、アスコルビン酸とⅠ型アテロコラーゲンの添加を検討することを目的とした。

4-2. 材料と方法

4-2-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

ドナーC（19 歳、男性）およびドナーF（54 歳、女性）から採取した骨髄液から、2-2-1.と同様の方法で分離した細胞を使用した。

4-2-2. 培地

4-2-2-1. 増殖用培地

増殖培養用の培地は 2-2-2-1.と同様の培地を使用した。

4-2-2-2. 分化誘導用培地

軟骨様細胞シート作製用の分化誘導培地は 2-2-2-5 で示した混合培地を使用した。いくつかの実験では培地への添加物として、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩（Wako, 013-12061）、グルタチオン（Sigma, G-4251）、I 型アテロコラーゲン（Koken, IPC-50）を適宜、培地に添加した。なお、I 型アテロコラーゲン溶液は pH 3.0 HCl で適宜希釈し、目的の濃度になるように培地量の 1%量を添加した。

4-2-3. 培養方法

4-2-3-1. 増殖培養

MSC の増殖培養は 2-2-3-1.と同様の方法で行った。

4-2-3-2. 軟骨分化培養

軟骨様細胞シートの作製は 2-2-3-2.と同様の方法で行った。

4-2-4. 分析方法

4-2-4-1. サイズおよび湿重量測定

2-2-4-1.と同様の方法で行った。

4-2-4-2. 細胞数計数

2-2-4-2.と同様の方法で行った。

4-2-4-3. 遺伝子発現解析

2-2-4-3.と同様の方法で、アグリカン、Ⅱ型コラーゲン、Ⅰ型コラーゲン、X 型コラーゲン、MMP-13 および SOX9 の遺伝子発現率の測定を行った。

4-2-4-4. 硫酸化グルコサミノグリカン（sGAG）定量

3-2-4-4.と同様の方法で行った。

4-2-4-5. Ⅱ型コラーゲン定量

3-2-4-5.と同様の方法で行った。

4-2-4-6. 組織学分析

軟骨様細胞シートの切片作製、脱パラフィン処理、アルシアンブルー染色およびトルイジンブルー染色は 3-2-4-6.と同様に行った。

切片中の細胞核は Propidium iodide（PI）によって染色した。脱パラフィ

ン化した切片上に 1 μg/ml の PI（Sigma、P4170-10MG）/PBS(−)を 100 μl 滴下し、暗所で 15 分間静置した。その後、蒸留水で 5 分間、2 回洗浄した。染色した切片は蛍光顕微鏡（励起波長：520-550 nm, 検出波長：580 nm, Olympus）により観察しデジタル画像を取得した。

4-3. 結果と考察

4-3-1. 軟骨様細胞シートに及ぼすアスコルビン酸の効果の検討

軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲン量増加のため、コラーゲン合成促進効果が期待できる、アスコルビン酸を高濃度で培地に添加し、培養を行った。通常の混合培地に含まれている濃度（25 μg/ml）をコントロールとし、他に 50、250、2500 μg/ml となるようにアスコルビン酸リン酸マグネシウム塩（Vitamin C phosphate: VCP）を加えた培地を用いて、軟骨様細胞シートを作製した。すなわち、ドナーF 由来の MSC を 18.6×10^5 cells 播種し、アスコルビン酸濃度 25、50、250、2500 μg/ml の 4 種類の軟骨分化培地を用いてシート培養を行った。21 日間培養を行い、2 日毎に培地交換を行った。培養終了後、軟骨様細胞シートの湿重量、sGAG 蓄積量、Ⅱ型コラーゲン蓄積量を測定し、さらに sGAG 及びⅡ型コラーゲンの蓄積量を湿重量で標準化した蓄積密度を算出した結果を Fig. 4-1 に示した。

その結果、アスコルビン酸を通常濃度の 10 倍の 250 μg/ml 添加したときに湿重量が約 20%増加した。一方、細胞シート中の細胞数は条件間で変化が見られなかった。sGAG の蓄積量および蓄積密度はいずれの条件においても同等であった。一方、Ⅱ型コラーゲンの蓄積量及び蓄積密度は、コントロールと比べ、アスコルビン酸高濃度条件で顕著に増加した（Fig. 4-1）。

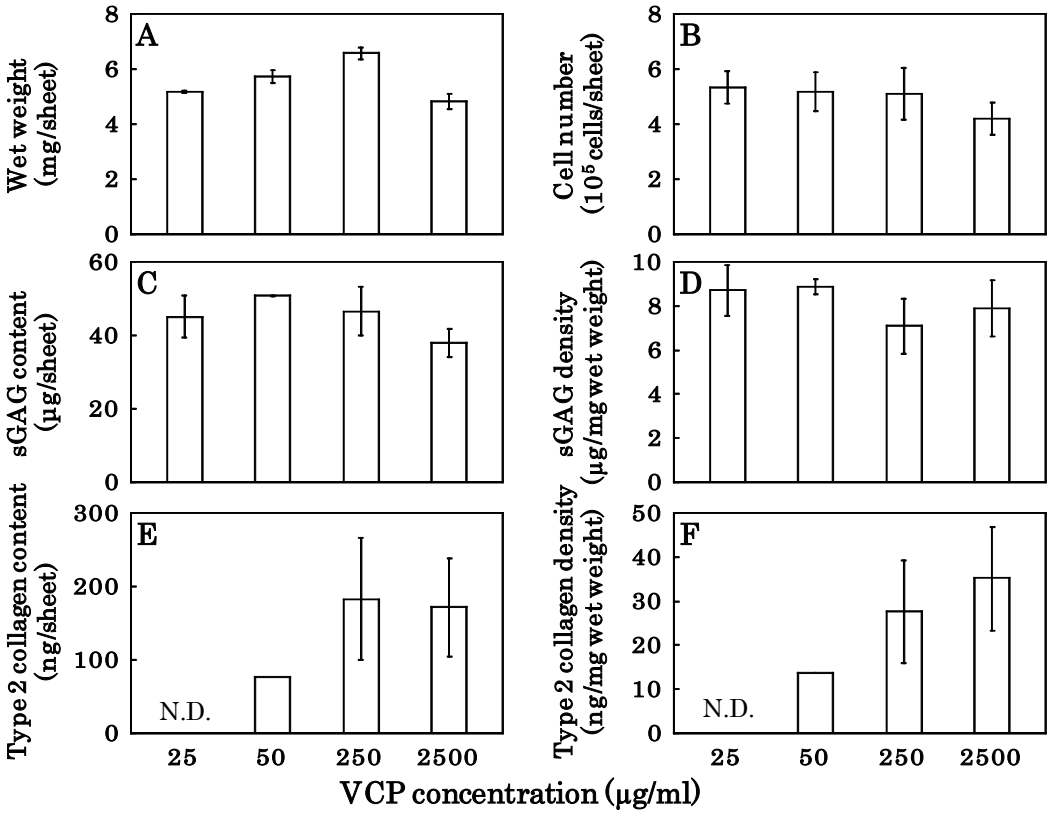


Fig. 4-1.　Effect of VCP on MSC sheet culture. Wet weight (A), cell number (B), sGAG content (C), type 2 collagen content in cell sheets (E). sGAG (D) and type 2 collagen contents were normalized by sheet wet weight (F).　(n=2, average ± S.D.) N.D., not detected.

アスコルビン酸を高濃度で加えた条件での組織学分析を行うために、アスコルビン酸濃度 25 および 250 μg/ml の条件で作製した軟骨様細胞シートを PI、アルシアンブルー、トルイジンブルーで染色した。結果を Fig. 4-2 に示した。

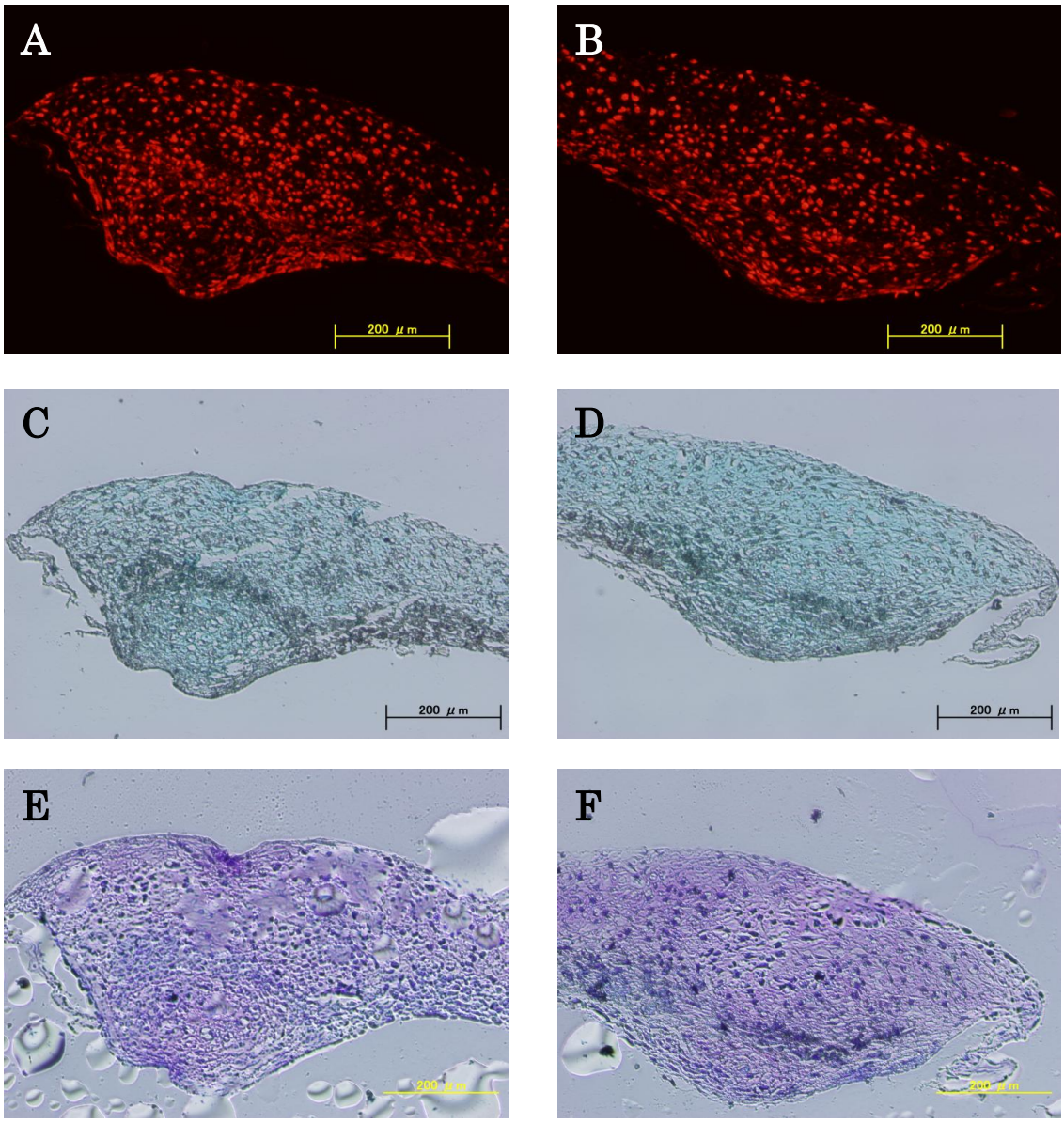


Fig. 4-2. Histological staining of sections. The sections of an MSC sheet cultivated with VCP added at 25 (A, C, E) and 250 μg/ml (B, D, F) were stained with PI (A, B), alcian blue (C, D), and toluidine blue (E, F). The scale bar indicates 200 μm.

その結果、いずれにおいても条件間の明確な差違は見られなかった。この結果は Fig. 4-1 で示した細胞数および sGAG の定量結果を反映していた。また、軟骨組織として組織学的に異常な様子は認められず、高濃度のアスコルビン酸は軟骨様細胞シートの形成および成熟に悪影響がないことが示された。

アスコルビン酸は様々な生理活性が報告されており、その中には I 型コラーゲンの合成促進効果（84）や抗アポトーシス効果（86）などがある。本実験では、高濃度のアスコルビン酸を含む培地で従来の基本軟骨分化培地（50 μg/ml）や第 2 章で開発した混合培地（25 μg/ml）と比較して、細胞シートの湿重量およびⅡ型コラーゲン蓄積量の増加が見られた。湿重量が増加したことから、アスコルビン酸による細胞数の減少の抑制効果が考えられた。アスコルビン酸には抗アポトーシス効果があることが報告されているため、濃度依存的に軟骨分化培養時に起こる細胞数の減少が抑制できると考えたが、本章においてアスコルビン酸の濃度条件間で細胞数に変化が見られなかった。そのため、アスコルビン酸添加による、軟骨様細胞シートの湿重量の増加は抗アポトーシス効果ではなく、別の作用であると考えられた。一方、アスコルビン酸は軟骨分化を促進する効果が報告されているが、本実験で sGAG には効果が見られなかったことから、アスコルビン酸の効果はⅡ型コラーゲン合成に特異的に作用したと考えられた。

4-3-2.　軟骨様細胞シートに及ぼすグルタチオンの効果の検討

軟骨様細胞シートにおけるアスコルビン酸の効果が抗酸化作用によるものかを推定するために、グルタチオンの添加を行った。グルタチオンはアスコルビン酸同様に細胞内で抗酸化作用を有しており（86,104）、抗酸化剤として軟骨様細胞シートへの効果を検討した。

グルタチオンを 0、0.1、1、10 mM になるように添加した軟骨分化培地を用いて軟骨細胞シートを作製した。すなわち、ドナーF 由来の MSC を 18.6×10^5 cells 播種し、グルタチオン濃度 0、0.1、1、10 mM の軟骨分化培地で培養を行った。21 日間培養を行い、2 日毎に培地交換を行った。培養終了後、軟骨様細胞シートの湿重量、sGAG 蓄積量、Ⅱ型コラーゲン蓄積量を測定し、さらに sGAG 及びⅡ型コラーゲンの蓄積量を湿重量で標準化した蓄積密度を算出した結果を Fig. 4-3 に示した。

その結果、細胞シートの湿重量はグルタチオンの添加に伴い減少し、10 mM の条件ではコントロール条件の約半分程度まで減少した。また、Ⅱ型コラーゲンの蓄積量および蓄積密度はグルタチオンの添加により、大きく減少した。一方、sGAG の含量はグルタチオンの添加によって減少せず、蓄積密度は増加する傾向が見られた。

以上のように、抗酸化剤による軟骨様細胞シートへの影響を、グルタチオンの添加により検討した。その結果、細胞シートの湿重量とⅡ型コラーゲンの蓄積量は大きく減少した。このことから、グルタチオンは軟骨様細胞シートの形成過程に悪影響を与えたと考えられた。一方、sGAG は増加する傾向が見られたが、この原因が不明である。

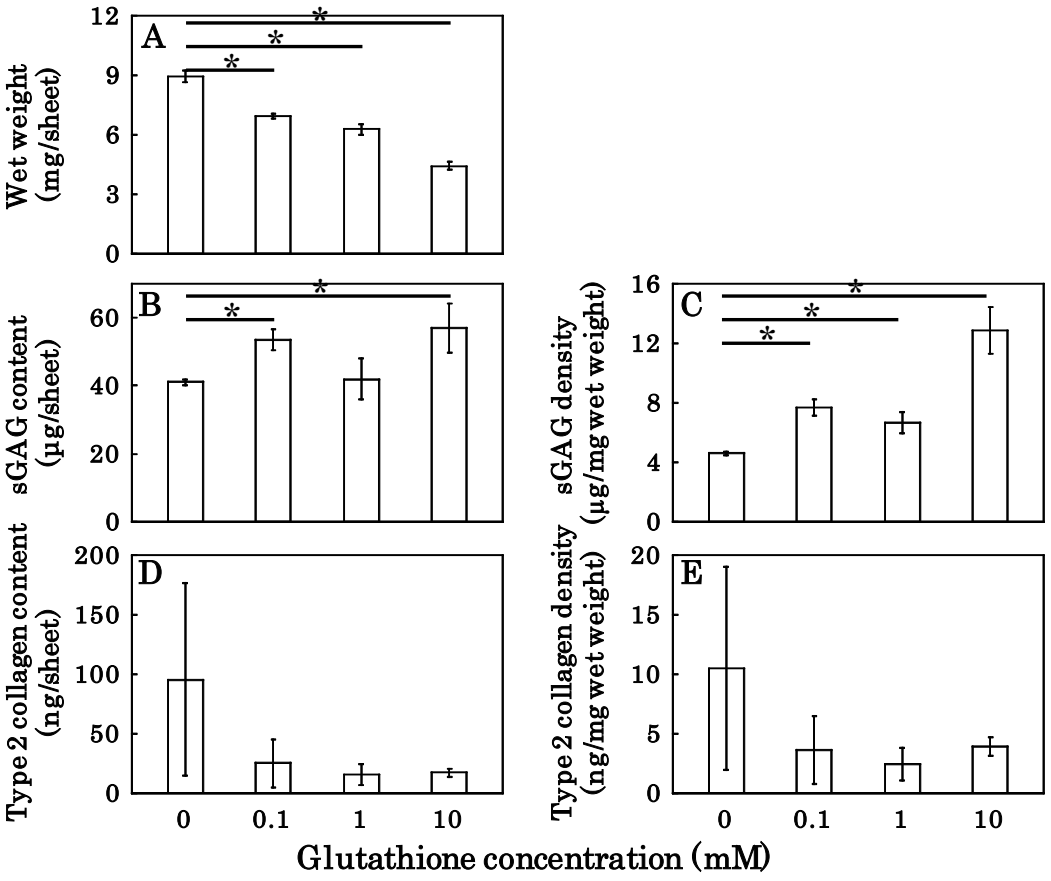


Fig. 4-3. Effect of glutathione on MSC sheet culture. Wet weight (A), sGAG content (B), and type 2 collagen content (D) in cell sheets. sGAG (C) and type 2 collagen contents (E) were normalized by sheet wet weight. (n=3, average ± S.D.) * ; $p<0.05$

以上をまとめると、グルタチオンは軟骨様細胞シートの形成を阻害し、シートの湿重量およびⅡ型コラーゲン合成が減少した。このことから、抗酸化剤であるグルタチオンの添加は効果がなく、アスコルビン酸の添加で見られた、Ⅱ型コラーゲンの合成促進効果は抗酸化作用によるものではないと考えられた。

4-3-3.　軟骨様細胞シートに及ぼすⅠ型アテロコラーゲンの効果の検討

Ⅰ型アテロコラーゲンは一般に軟骨様組織を作製する際のスキャフォールドとして使用されているが、インテグリンを媒介した ERK 活性化により、細胞の活性を刺激し、細胞の生存率および遺伝子発現を増加させることで、Ⅱ型コラーゲンの合成促進にも効果が期待できた。そこで、Ⅰ型アテロコラーゲンを低濃度で培地に添加し、培養することで、軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲン蓄積量に与える影響を検討した。

pH 3.0 HCl で希釈したⅠ型アテロコラーゲン溶液を 0、0.05、0.5、5、50 μg/ml になるように添加した軟骨分化培地を用いて軟骨細胞シートを作製した。すなわち、ドナーC 由来の MSC を 18.6×10^5 cells 播種し、Ⅰ型アテロコラーゲン濃度 0、0.05、0.5、5、50 μg/m の軟骨分化培地で培養を行った。21 日間培養を行い、2 日毎に培地交換を行った。培養終了後、軟骨様細胞シートの湿重量、sGAG 蓄積量、Ⅱ型コラーゲン蓄積量を測定し、さらに sGAG 及びⅡ型コラーゲンの蓄積量を湿重量で標準化した蓄積密度を算出した結果を Fig. 4-4 に示した。

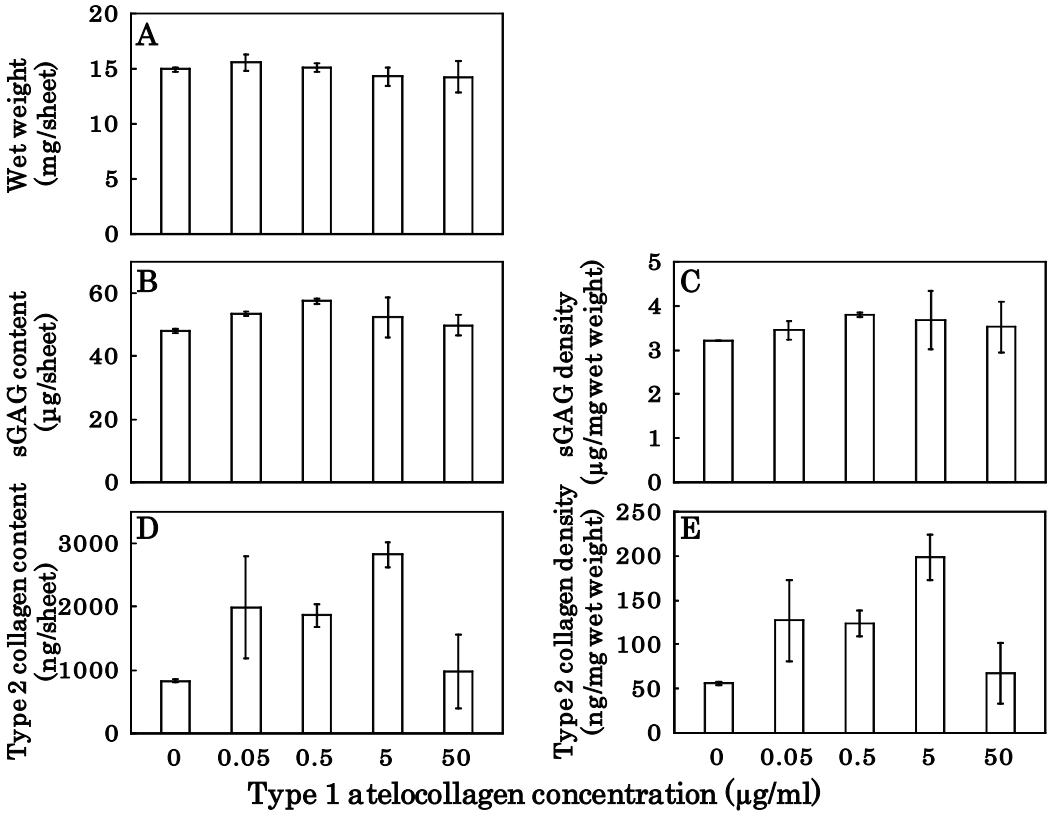


Fig. 4-4. Effect of type 1 atelocollagen on MSC sheet culture. Wet weight (A), sGAG content (B), and type 2 collagen content (D). in cell sheets. sGAG (C) and type 2 collagen contents (E) were normalized by sheet wet weight.

その結果、軟骨様細胞シートの湿重量はいずれの条件でも変化は見られなかった。sGAG の蓄積量及び蓄積密度は 0 から 5 μg/ml の条件で、Ⅰ型アテロコラーゲンの添加により増加が見られた。しかし、高濃度（50 μg/ml）ではわずかに減少した。Ⅱ型コラーゲンの蓄積量および蓄積密度はⅠ型アテロコラーゲンの添加により増加が見られた。特に、5 μg/ml の条件では無添加の条件と比べて約 3~4 倍の増加が見られた。一方、50 μg/ml の条件では無添加の条件と比較して増加が見られなかった。

この結果から、低濃度のⅠ型アテロコラーゲンの添加ではECMの蓄積量の増加が見られることが明らかとなった。この効果の原因はいくつかの要因が考えられた。一つは、コラーゲンがインテグリンなどに結合することにより、細胞内シグナルの活性が増加したことが考えられた。インテグリンシグナリングは細胞の生存や遺伝子発現調製に関与していることが報告されている（103)。このようなシグナリングを介すことにより ECM 関連の遺伝子発現が活性化した可能性が考えられた。他の可能性として、コラーゲン分子が培地中でペプチドやアミノ酸に分解され、それらがMSCのECM合成に作用したことが考えられた。その根拠として、コラーゲンに含まれるハイドロキシプロリンやそれを含むペプチドの添加により軟骨分化が促進されることが報告されている（106)。また、アミノ酸まで分解され、細胞に取り込まれた可能性も考えられた。当研究室においても軟骨細胞の培養においてアミノ酸の添加により、Ⅱ型コラーゲン量が増加したことを報告している(107)。これらのことにより、細胞内でECM合成に関連する遺伝子の転写が増加し、ECMの生産性が増加したと考えられた。一方、高濃度のコラーゲンではこのような効果が見られなかった。この原因の一つに合成されたECMが分解された可能性が考えられた。なぜなら、軟骨細胞周囲の繊維性のコラーゲンの存在は、軟骨分解を導く異化応答を誘導するという報告があるためである（102)。従って、合成された ECM が分解されたことにより、蓄積量が増加しなかった可能性が考えられた。

一方、本実験で使用したⅠ型アテロコラーゲンはウシ由来であり、異種動物由来成分であるため、臨床応用の際には安全性の観点から、代替品を検討することが望ましいと考えられる。将来的には代替品として組み換えコラーゲンや合成コラーゲン、合成ペプチドの使用が有効と考えられる。

4-3-4.　Ⅰ型アテロコラーゲンとアスコルビン酸の同時添加の効果の検討

4-3-1.および 4-3-3.においてアスコルビン酸およびⅠ型アテロコラーゲンの単独添加により、軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲンの蓄積量の増加が見られた。そこでこれらの同時添加により相乗効果が得られるか検討した。それぞれにおいて最もⅡ型コラーゲン蓄積量が増加した濃度である、アスコルビン酸 250 μg/ml およびⅠ型アテロコラーゲン 5 μg/ml をそれぞれ単独および同時添加を検討した。すなわち、ドナーF 由来の MSC を 18.6×10^5 cells 播種し、無添加（ -)、Ⅰ型アテロコラーゲン 5 μg/ml（COL)、アスコルビン酸 250 μg/ml（VCP)、Ⅰ型アテロコラーゲン 5 μg/ml とアスコルビン酸 250 μg/ml の同時添加（C+V）の 4 種類の軟骨分化培地を用いてシート培養を行った。21 日間培養を行い、2 日毎に培地交換を行った。培養終了後、軟骨様細胞シートの湿重量、sGAG 蓄積量、Ⅱ型コラーゲン蓄積量を測定し、さらに sGAG 及びⅡ型コラーゲンの蓄積量を湿重量で標準化した蓄積密度を算出し、結果を Fig. 4-5 に示した。

その結果、軟骨様細胞シートの湿重量は、Ⅰ型アテロコラーゲンの単独添加では増加が見られなかった、一方でアスコルビン酸添加群（VCP, C+V）では増加した。sGAG の蓄積量はいずれの条件でも増加が見られたが、蓄積密度ではⅠ型アテロコラーゲン単独添加以外では差が見られなかった。しかし、Ⅱ型コラーゲンの蓄積量では、添加物による効果に顕著な違いが見られた。無添加ではⅡ型コラーゲン蓄積量が約 53 mg であったのに対して、Ⅰ型アテロコラーゲンの単独添加では約 1.6 倍、高濃度のアスコルビン酸の単独添加では約 4 倍に増加した。さらに、Ⅰ型アテロコラーゲンとアスコルビン酸の同時添加では約 8 倍に増加し、これらの相乗効果が得られたと考えられた。また、蓄積密度においても同様の傾向が見られた。

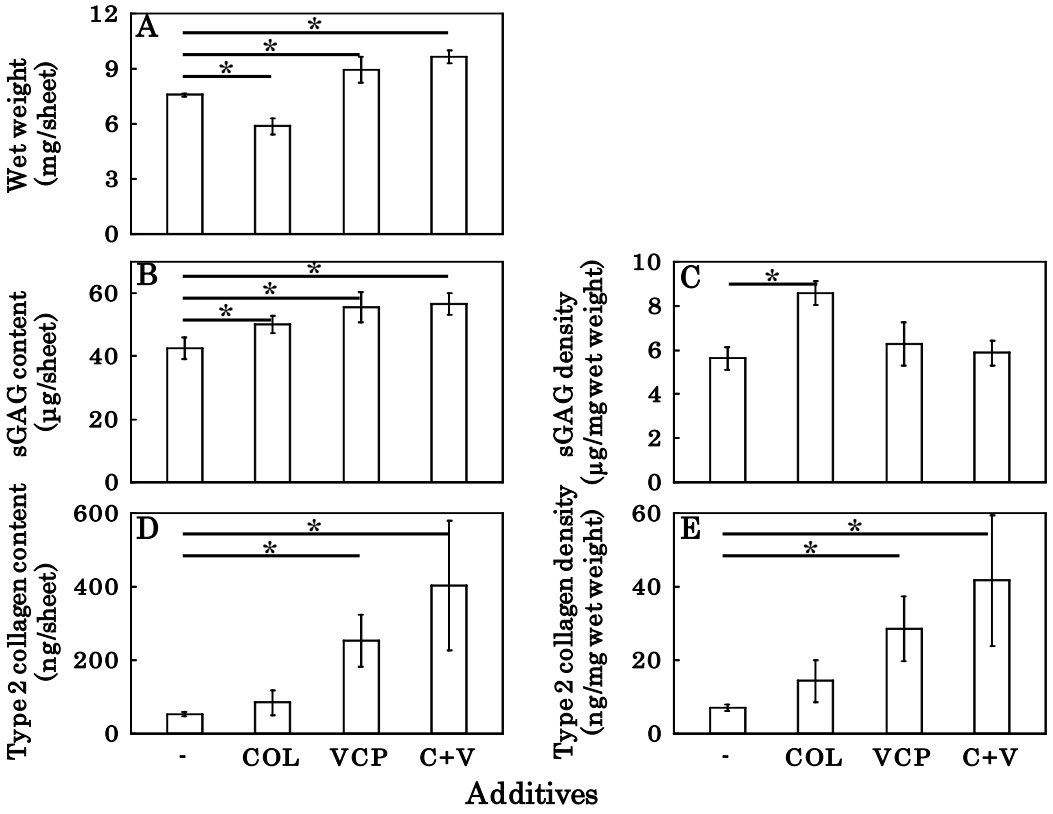


Fig. 4-5. Synergistic effect of VCP and type 1 atelocollagen on MSC sheet culture. Type 1 atelocollagen (COL, 5 μg/ml), VCP (VCP, 250 μg/ml), and both (C+V) were added to the MSC sheet culture. Wet weight (A), sGAG content (B), type 2 collagen content (D) in cell sheets. sGAG (C) and type 2 collagen contents (E) were normalized by sheet wet weight. (n=3, average ± S.D.) * ; *p<0.05*

次に、これらの効果が見られた理由を検討するために、軟骨細胞の分化、未分化、脱分化および肥大分化に関係する、Ⅰ、Ⅱ、X型コラーゲン、アグリカン、SOX9、また ECM の分解に関係する、MMP-13 の mRNA 発現率を RT-PCR で測定し、それらの結果を Fig. 4-6 に示した。発現率は内部標準のβ-アクチンで標準化し、無添加条件を 1 としてその割合として示した。

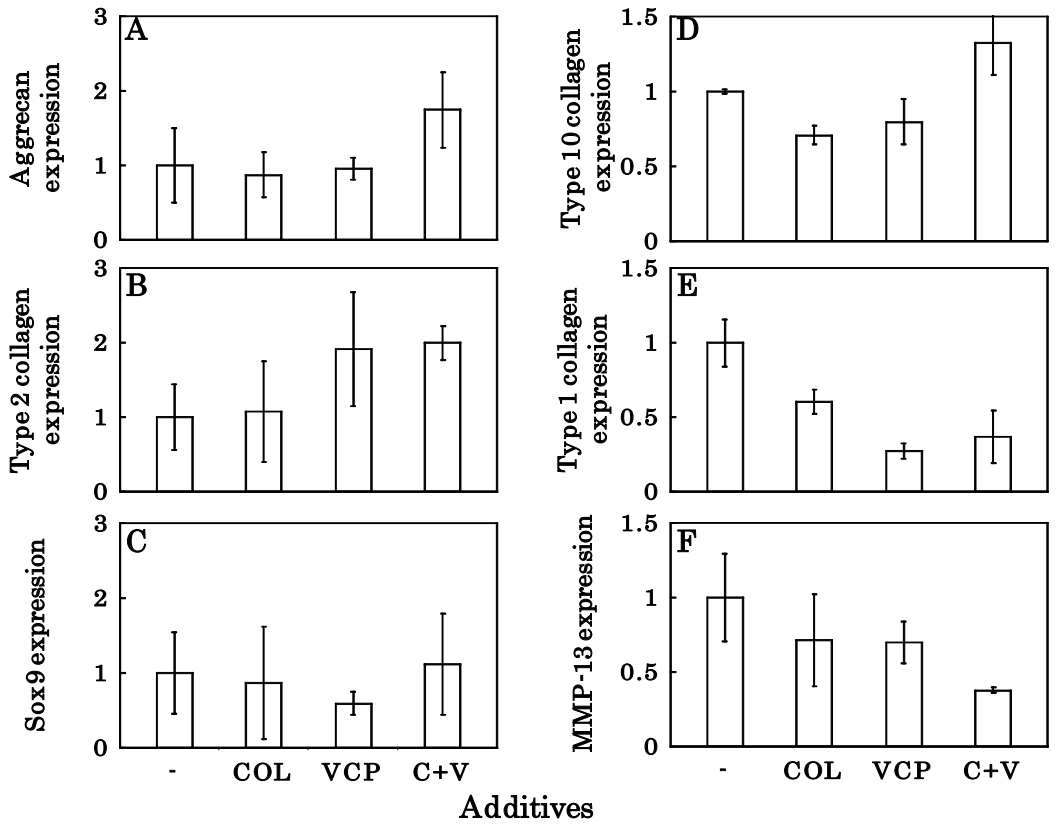


Fig. 4-6. Synergistic effect of VCP and type 1 atelocollagen on chondrogenic differentiation in MSC sheet culture. Type 1 atelocollagen (COL, 5 μg/ml), VCP (VCP, 250 μg/ml) and the both (C+V) were added to the MSC sheet culture. Gene expression levels of aggrecan (A), type 2 collagen (B), Sox9 (C), type 10 collagen (D), type 1 collagen (E), and MMP-13 (F).

その結果、アグリカンの遺伝子発現はⅠ型アテロコラーゲンおよびアスコルビン酸の単独添加ではコントロール（無添加）と比較して変化しなかったが、Ⅰ型アテロコラーゲンとアスコルビン酸の同時添加により約 2 倍に増加した。Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現は、Ⅰ型アテロコラーゲンの添加では増加は見ら

れなかったが、アスコルビン酸添加群（VCP、C+V）では約 2 倍に増加した。軟骨分化に重要な転写因子である SOX9 の発現率はいずれの条件でも変化は見られなかった。一方で脱分化のマーカーであるⅠ型コラーゲンはコントロール（無添加）と比較して、いずれの条件でも減少したが、アスコルビン酸添加群（VCP, C+V）で特に抑制された。肥大分化マーカーのⅩ型コラーゲンはⅠ型アテロコラーゲンまたはアスコルビン酸の単独添加により、若干の抑制が見られた一方、同時添加ではわずかに増加した。ECM の分解に関与する MMP-13 の遺伝子発現はⅠ型アテロコラーゲンまたはアスコルビン酸の単独添加により約 30%減少した。さらに、コラーゲンとアスコルビン酸の同時添加では約 70%減少し、相乗的な作用が見られた。

これらの結果から、アスコルビン酸とⅠ型アテロコラーゲンの同時添加により軟骨分化が促進された理由の一つに、アグリカンやⅡ型コラーゲンの遺伝子発現率が増加したことが示唆された。一方で、同時添加が脱分化や肥大分化に関係する、Ⅰ型やⅩ型コラーゲンの遺伝子発現には大きく影響していなかったため、同時添加が脱分化や肥大分化を抑制し、軟骨細胞の表現型の維持に貢献していることが示唆された。さらに、同時添加が MMP-13 を顕著に抑制していたことから、アスコルビン酸とⅠ型アテロコラーゲンの添加による効果は、Ⅱ型コラーゲンの遺伝子の発現増加による合成促進だけではなく、MMP-13 の抑制による分解の低下も反映していることが示唆された。

4-4. 結言

軟骨様細胞シート中の ECM 蓄積量増加のため、種々の生理活性物質を含む培地で軟骨様細胞シートを作製し、その合成促進効果を検討した。アスコルビン酸を加えた場合、sGAG 量に顕著な差がなかった一方で、Ⅱ型コラーゲン量は大幅に増加した。Ⅰ型アテロコラーゲンを添加した場合、sGAG 量はわずかに増加した一方で、Ⅱ型コラーゲン量は約 4 倍に増加した。アスコルビン酸及びⅠ型アテロコラーゲンを同時に添加した場合、ECM の蓄積量が増加した。特にⅡ型コラーゲンの蓄積量はそれぞれの単独添加よりも増加し、無添加条件の約 8 倍に増加した。この効果の理由の一つには、Ⅱ型コラーゲンの合成が促進されたことに加え、それを分解する MMP-13 の発現が抑制されたことによる可能性が示唆された。

以上の結果より、アスコルビン酸とⅠ型アテロコラーゲンを同時添加することにより、軟骨様細胞シート中のⅡ型コラーゲン量を大幅に増加させる方法を提案できた。

第 5 章

軟骨様細胞シートの分化度の非侵襲的評価方法の開発

5-1. 緒言

再生医療の実用化への課題として品質管理の問題がある。再生医療において長期間の培養後に移植するため、移植に用いる細胞や組織の品質管理を行うことが重要であり、軟骨様細胞シートにおいても同様で、移植前に品質を評価する必要がある。従来行われている細胞評価の方法としては、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析、RT-PCR による遺伝子発現解析、染色による組織学解析などがある。しかし、再生医療製品の場合、採取できる細胞や組織は必要最低限の量であり、また、医薬品のような大量生産ができないため、従来のような破壊的・侵襲的な方法は行うことができない。そこで、再生医療製品に応用できる非破壊的、非侵襲的な新規の細胞評価方法を開発する必要がある。当研究室ではこれまでに、顕微鏡観察下で細胞形態解析に基づく細胞の評価方法を報告した（87)。しかし、この方法では平面に接着した細胞は評価可能であるが、三次元構造をもつ立体的な軟骨様組織には適用できない。すなわち、現在のところ、立体的な組織を非侵襲的に評価する方法は少ない。そのため、立体的な組織の評価が可能な方法を考案する必要が考えられた。そこで培養上清分析を非侵襲的に行うことができることに注目し、上清中の特定の細胞が特異的に産生する物質を定量することで、その細胞の存在を判別することができると考えた。そこで軟骨細胞が特異的に産生するメラノーマ阻害活性（MIA）と呼ばれるタンパク質に注目した。MIA は主に腫瘍組織が産生し、正常な細胞では軟骨細胞が産生する。これまでに、脱分化したヒト軟骨細胞の再分化培養や MSC の軟骨分化誘導培養の際に、分化に伴い MIA 濃度が増加したという報告がある（89)。そこで、上清中の MIA を定量することにより、立体的な軟骨様組織においても、組織中の細胞の軟骨細胞への分化度を評価できるのではないかと考えた。そこで本章では軟骨様組織中の軟骨細胞への分化度を MIA 定量に

より非侵襲的にモニタリングする方法を検討した。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 細胞

5-2-1-1. 正常ヒト軟骨関節軟骨細胞

シングルドナーから採取し、2 継代された凍結細胞 2 ロット（ドナーG（50 歳、男性）、ドナーH（45 歳、男性））を、Lonza 社から購入した（Lonza, CC-2550）。

5-2-1-2. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

ドナーB（67 歳、男性）およびドナーD（69 歳、男性）から採取した骨髄液から 2-2-1-1.に示した方法で分離した。

5-2-2. 培地

5-2-2-1. 増殖用培地

軟骨細胞の増殖培養には CGM™ BulletKit®（Lonza, CC-3216）を用いた。

MSC の増殖培養には 2-2-2-1.に示した 10%FBS 含有 DMEM-LG を用いた。

5-2-2-2. 分化誘導培地

軟骨細胞の再分化培養には CDM™ BulletKit®（Lonza, CC-3225）を用いた。

MSC の軟骨分化培養には 2-2-2-2.に示した軟骨分化培地を用いた。

5-2-3. 培養方法

5-2-3-1. 増殖培養

軟骨細胞の増殖培養は、5-2-1-1.の細胞を 100 φディッシュに CGM™

BulletKit®を用いて 0.436×10^4（ドナーG）又は 1×10^4（ドナーH）cells/cm^2 の密度で播種し、37℃、5% CO_2 雰囲気下で静置培養した。細胞がプレコンフルエントに到達した後、トリプシン処理により細胞を回収し、1×10^4 cells/cm^2 の密度で継代し、プレコンフルエントに達するまで培養した。

MSC の増殖培養は 2-2-3-1.と同様の方法で行った。

5-2-3-2. 軟骨分化培養

軟骨細胞の再分化培養は、ペレット培養で行った。2.5×10^5 cells の軟骨細胞を 0.5 ml の CDM™ BulletKit®に懸濁し、15 ml 容ポリプロピレン製遠心管（Sumilon, MS-56150）に入れ、室温で 1000 rpm、5 分遠心し、細胞凝集体を作製した。その後、37℃、5% CO_2 雰囲気下で 28～42 日間静置培養した。培地交換は 7 日毎に行った。

MSC の軟骨分化培養は、ペレット培養及びシート培養で行った。ペレット培養は 2.5×10^5 cells の MSC を 0.5 ml の軟骨分化培地に懸濁し、15 ml 容ポリプロピレン製遠心管（Sumilon, MS-56150）に入れ、室温で 1000 rpm、5 分遠心し、細胞凝集体を作製した。その後、37℃、5% CO_2 雰囲気下で 24 日間静置培養した。培地交換は 3 日毎に行った。

シート培養は 12.4×10^5 cells の MSC を 0.3 ml の軟骨分化培地に懸濁し、セルカルチャーインサートに入れた。24 ウエルプレートに軟骨分化培地を 1 ml 加え、その中にセルカルチャーインサートを装着した。プレートを室温で 1000 rpm、5 分遠心し、その後、37℃、5% CO_2 雰囲気下で 24 日間静置培養した。培地交換は 2 日毎に行った。

5-2-4. 分析方法

5-2-4-1. 細胞数計数

2-2-4-1.と同様の方法で行った。

5-2-4-2. 遺伝子発現解析

2-2-4-3.と同様の方法で行った。

5-2-4-3. MIA 定量

培養上清中の MIA 濃度は ELISA 法を用いて定量した。ELISA 法は MIA ELISA（Roche Applied Science, l1976826001）を用い、製造者のプロトコルに従い行った。

上清は 13000 g、5 分間遠心分離して不純物を沈殿させ MIA 定量用サンプルとした。MIA 標準溶液は 0～50 ng/ml となるように粉末が入っている 6 つの容器に、純水 0.5 ml を加え溶解した。キャプチャー抗体（ビオチン標識抗 MIA マウスモノクローナル抗体）を純水 0.7 ml で 10 分間、室温で完全に溶かした。検出抗体（POD 標識抗 MIA マウスモノクローナル抗体）を純水 0.7 ml で 10 分間、室温で完全に溶かした。インキュベーションバッファー1.7 ml に 50 µl の検出抗体を加えよく混合し、その後 50 µl のキャプチャー抗体を加え完全に混ぜ、免疫試薬を作製した。ストレプトアビジンコートされている 96 ウエルプレートの各ウエルに MIA 標準溶液又はサンプルを 20 µl ずつ加えた。96 ウエルプレートの各ウエルに免疫試薬を 180 µl 加え、450 rpm で振とうしながら 90 分間インキュベートした。インキュベート後、インキュベーションバッファーを取り除き、各ウエルを、ウォッシュバッファーを用いて 3 回洗浄した。

洗浄終了後、各ウエルに ABTS（2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonate)）基質溶液を 200 µl 加え、450 rpm で振とうしながら室温で 10～20 分間インキュベートした。インキュベート後 405 nm の吸光度を測定し、検量線を元に MIA 量を定量した。

5-3. 結果と考察

5-3-1. 軟骨細胞の再分化培養における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査

軟骨細胞の再分化培養における分化度と MIA 産生との関係を調べるため、軟骨細胞のペレット培養を行った。ドナーG 由来の軟骨細胞（2.5×10^5 cells）を 15 ml 容遠心管に播種しペレット培養を行った。7 日毎に培地交換、細胞数計数、アグリカン遺伝子発現測定、および MIA 濃度の定量を行った。同一ドナーの細胞を用いて、3 回実験を行った。結果を Fig. 5-1 に示した。

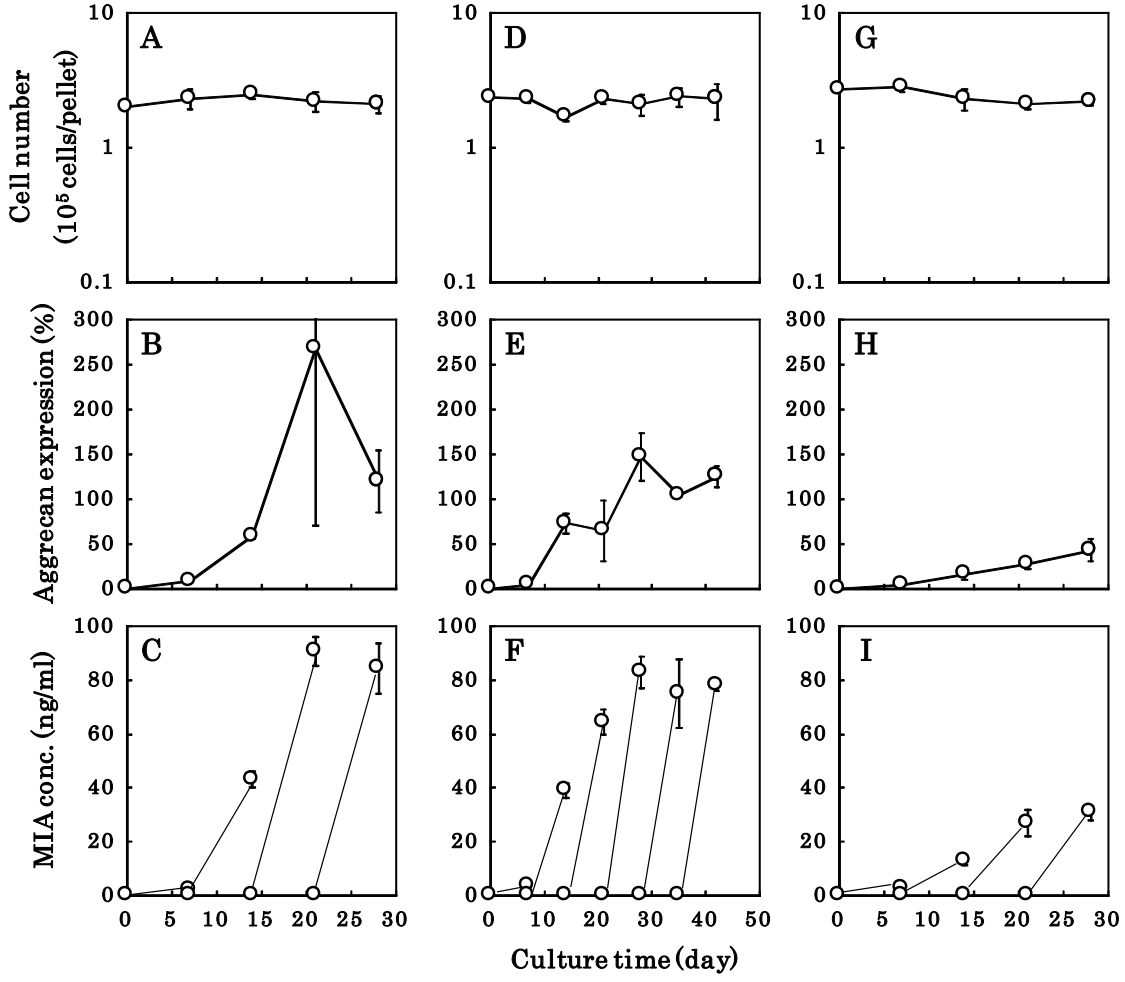


Fig. 5-1. Chondrocyte redifferentiation in pellet culture (donor G).
1st batch (A-C), 2nd batch (D-F), 3rd batch (G-I). Cell number (A, D, G), Aggrecan expression (B, E, H), MIA concentration (C, F, I).

その結果、細胞数はいずれの培養でも初期播種細胞数からほとんど変化せず、一定に保たれていた。アグリカン遺伝子発現率は培養の経過と共に上昇していき、軟骨細胞が再分化したことが示された。さらに、上清中の MIA の濃度はアグリカン遺伝子の発現率と同様に、培養の経過と共に増加した。このことから、再分化に伴い軟骨細胞が MIA を産生するようになったことが示唆された。これらの結果を基に、細胞当たりの MIA 比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との関係を調べた（Fig. 5-2)。

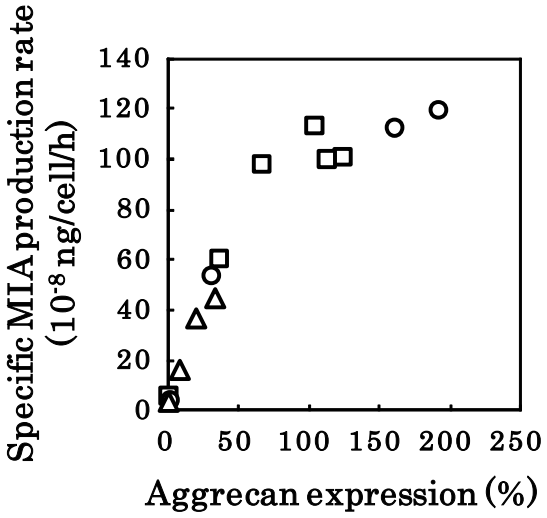


Fig. 5-2.　Relationship between specific MIA production rate and aggrecan expression (donor G).

○：1st batch, □：2nd batch, △：3rd batch.

Fig. 5-2 に示したように、3 回の実験の結果を合わせてプロットした結果、アグリカン遺伝子発現率と MIA 比生産速度との間では、アグリカン発現率が約 100%付近までは直線性をもった正の相関関係が見られ、それ以上の発現率では MIA 比生産速度はほぼ一定となっている可能性が考えられた。

さらに、異なるドナー由来の軟骨細胞（ドナーH）を使用して、同様の条件で培養を行い、培養上清中の MIA の濃度、及び MIA の比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との相関関係について調べた（Fig. 5-3, 5-4）。

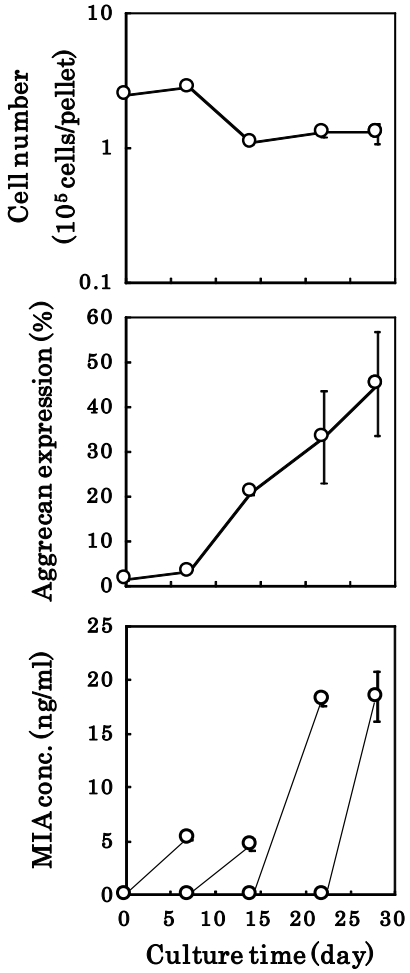


Fig. 5-3.　Chondrocyte redifferentiation in pellet culture (donor H).

その結果、ドナーG の細胞を用いた時と同様に培養の経過と共にアグリカン遺伝子発現と上清中の MIA の濃度が増加した（Fig. 5-3）。これらの結果を基に、ドナーG の細胞と同様に細胞当たりの MIA 比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との関係を調べ、Fig. 5-2 にドナーH のプロットを追加した（Fig. 5-4）。

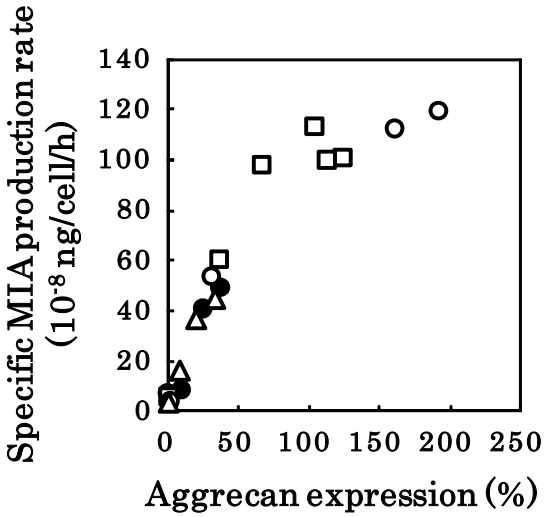


Fig. 5-4. Relationship between specific MIA production rate and aggrecan expression.

（○、□、△：donor G、●：donor H）

Fig. 5-4 において、ドナーG 由来の細胞を用いた 3 回の実験及びドナーH 由来の細胞を用いた実験のアグリカン遺伝子発現率と MIA 比生産速度との相関関係を調べると、ドナーG で得られた相関直線とドナーH の相関直線がほぼ重なることがわかった。従って、ドナーが異なっても同様の相関が得られたことから、MIA 比生産速度からアグリカン遺伝子発現率を推定できる可能性が示唆された。

今回の実験では脱分化した軟骨細胞の再分化培養において、培養の経過に伴いアグリカン遺伝子発現が増加すると共に、MIA 濃度も増加したが、この関係は過去の報告と一致した（89）。アグリカン遺伝子発現と MIA 比生産速度の間には正の相関関係が見られた。この要因は定かではないが、理由の一つに、Sox9 の関与が考えられる。Sox9 は軟骨分化において重要な転写因子であり、軟骨分化を制御する。具体的には、軟骨性の ECM であるアグリカンやⅡ型コラーゲン、

およびMIAはいずれもシグナル伝達においてSox9の下流に位置し、Sox9によって転写が制御されると考えられる（108）。そのため、再分化に伴い上流のSox9の発現が増加するにつれ、その下流であるアグリカンとMIAの転写が同時に上方制御されるため、この両者には相関関係が見られたと考えられる。

5-3-2. MSC の軟骨分化培養（ペレット培養）における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査

5-3-1.で軟骨細胞の再分化培養において、アグリカン遺伝子発現と MIA の比生産速度との間に明確な正の相関関係が見られたため、この方法を MSC の軟骨分化培養に適用できないか検討した。ドナーB 由来の MSC（2.5×10^5 cells）を 15 ml 容遠心管に播種しペレット培養を行った。3 日毎に培地交換を行い、18 日間培養を行った。6 日毎に細胞数計数、アグリカン遺伝子発現測定、および MIA 濃度の定量を行った。結果を Fig. 5-5 に示した。

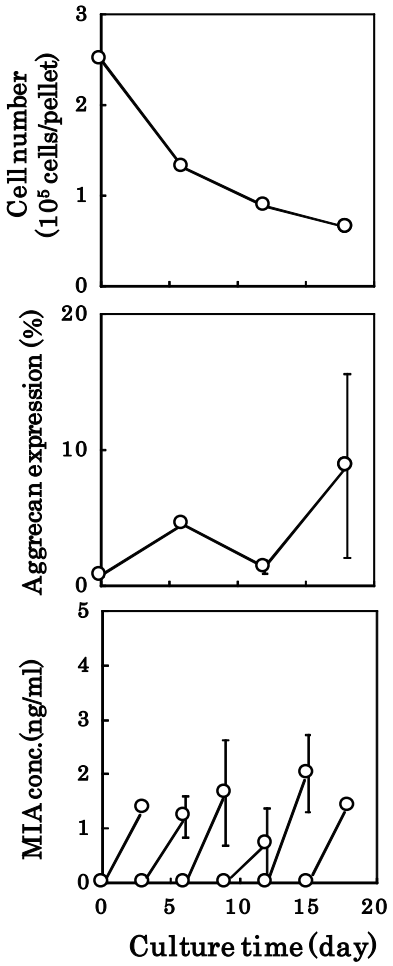


Fig. 5-5. MSC chondrogenic differentiation in pellet culture.

その結果、細胞数は軟骨細胞の培養の時とは異なり、経時的に減少した。アグリカン遺伝子発現率と上清中の MIA 濃度は培養の経過に伴い増加したが、軟骨細胞の再分化培養の実験と比べ、非常に低い値であり、分化が十分に進行しなかった可能性が考えられた。これらの結果を基に、軟骨細胞と同様に細胞当たりの MIA 比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との関係を調べた結果を Fig. 5-6 に示した。

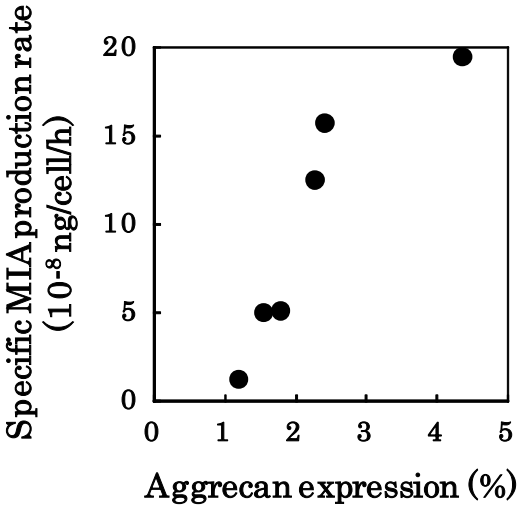


Fig. 5-6. Relationship between specific MIA production rate and aggrecan expression

その結果、非常に狭い範囲（アグリカン発現率 1~4%）ではあるが、アグリカン遺伝子発現率と MIA の比生産速度との間に正の相関関係が見られた。従って、MSC の軟骨細胞への分化誘導培養においても、培養上清中の MIA 定量により軟骨細胞への分化度を評価できる可能性が考えられた。

軟骨細胞の再分化培養で得られた相関関係が、MSC の軟骨分化培養においても得られるのか検証するため、軟骨細胞の再分化培養と同様にペレット培養で行った。MSC を用いた場合、軟骨細胞の培養の時とは異なり、細胞数は経時的に減少した（Fig. 5-5）。この結果は過去に報告された、軟骨分化培養中に骨髄由来 MSC はアポトーシスを引き起こすが、軟骨細胞はアポトーシスが起きないという結果と一致する（95）。つまり、ペレット培養による軟骨分化培養中に MSC はアポトーシスを起こしたため、細胞数が減少していったと考えられる。また、アグリカン遺伝子の発現率は軟骨細胞では 100%以上の高い発現が見られたのに対して（Fig. 5-1）、MSC では 10%以下と非常に低かった（Fig. 5-5）。この原因は不明であるが、両者の栄養要求性の違いが考えられた。すなわち、培養中のペレットの形態は中心部が低酸素・低栄養状態になりやすいが、軟骨細胞は組織中で付近に血管が存在せず低酸素・低栄養状態であるので、ペレット内のような悪条件の環境でも比較的生存が可能であると考えられる。そこで、ペレット内で軟骨細胞が生存できることで、アグリカン遺伝子の発現も十分に高くなったと考えられる。それに対して、MSC は低酸素・低栄養状態の条件では軟骨細胞よりも生存率が低いと考えられる。そのため、ペレット内では MSC の生存が難しいか MSC 内の遺伝子の転写活性が低下した状態になりやすいと考えられる。今後は MSC でもより高いアグリカン遺伝子の発現率範囲での関係性を調べる必要がある。そのためには、低酸素・低栄養状態にならない、別な培養方法を用いる必要があると考えられた。

5-3-3. MSC の軟骨分化培養（シート培養）における分化度と MIA 比生産速度の関係の調査

MSC のペレット培養においてアグリカン遺伝子発現率と MIA の比生産速度との間に正の相関関係が示唆されたことから、MSC の軟骨様細胞シートの作製に応用できるか検討した。ドナーB 由来の MSC（12.4×10^5 cells）をセルカルチャーインサートに播種しシート培養を行った。2 日毎に培地交換を行い 6 日毎に細胞数計数、アグリカン遺伝子発現測定、および MIA 濃度の定量を行った。結果を Fig. 5-7 に示した。

その結果、細胞数は培養の経過と共に減少し、培養終了時には初期播種細胞数の約 1/3 にまで減少した。アグリカン遺伝子発現率は培養の経過と共に増加していき、100%を超える高い発現率が見られたため、MSC が軟骨細胞へ十分に分化したことが示唆された。さらに、上清中の MIA の濃度はアグリカン遺伝子の発現率と同様に、培養の経過と共に増加した。このことから、MSC から分化した軟骨細胞が MIA を産生するようになったことが示唆された。これらの結果を基に、細胞当たりの MIA 比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との関係を調べ、Fig. 5-8 に示した。

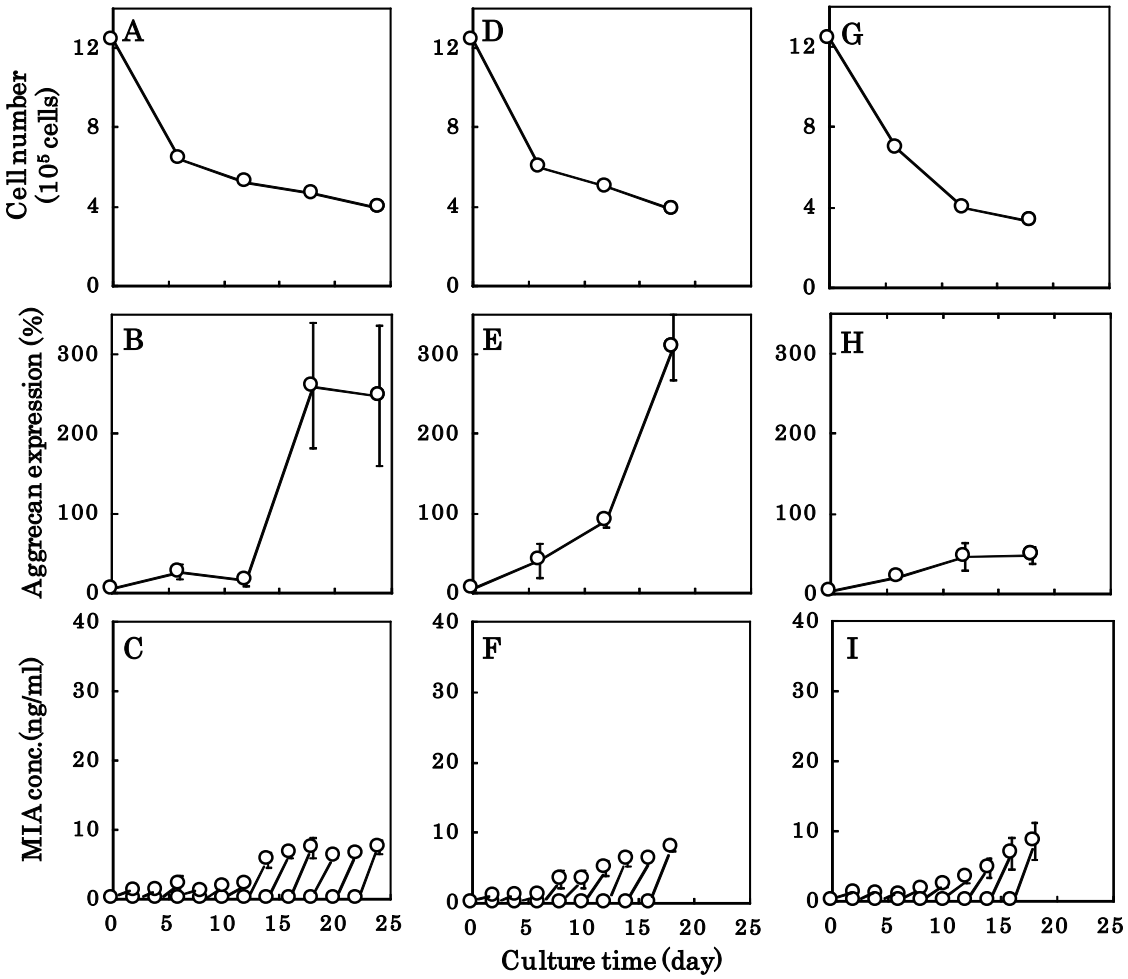


Fig. 5-7. MSC chondrogenic differentiation in sheet culture (donor B). 1st batch (A-C), 2nd batch (D-F), 3rd batch (G-I). Cell number (A, D, G), Aggrecan expression (B, E, H), MIA concentration (C, F, I).

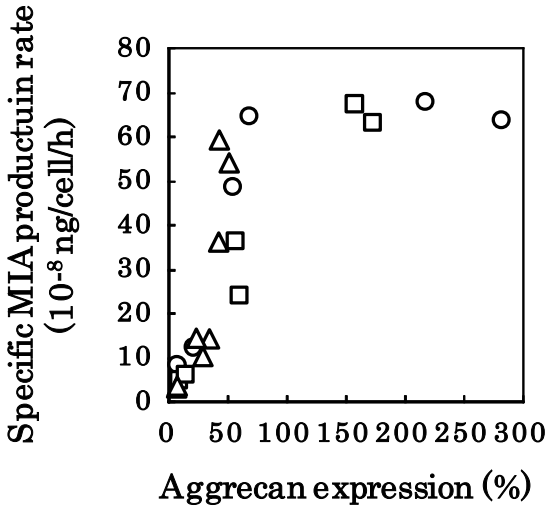


Fig. 5-8.　Relationship between specific MIA production rate and aggrecan expression。

その結果、軟骨細胞の培養の時と同様に、アグリカン遺伝子発現率と MIA 比生産速度との間では、アグリカン発現率が約 100%付近までは直線性をもった正の相関関係が見られ、それ以上の発現率では MIA 比生産速度はほぼ一定になることが明らかとなった。

さらに、異なるドナー由来の軟骨細胞（ドナーD）を使用して、同様の条件でシート培養を行い、培養上清中の MIA の濃度、及び MIA の比生産速度とアグリカン遺伝子発現率との相関関係について調べた（Fig. 5-9, 5-10）。

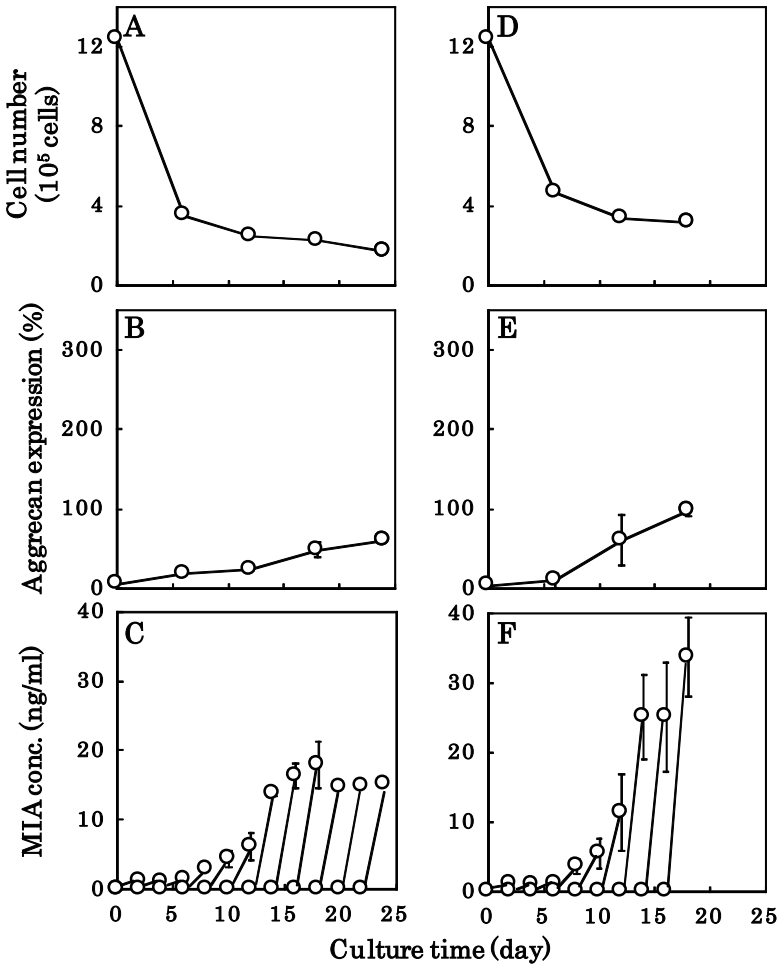


Fig. 5-9. MSC chondrogenic differentiation in sheet culture. (donor D). 1st batch (A-C), 2nd batch (D-F). Cell number (A, D), Aggrecan expression (B, E), MIA concentration (C, F).

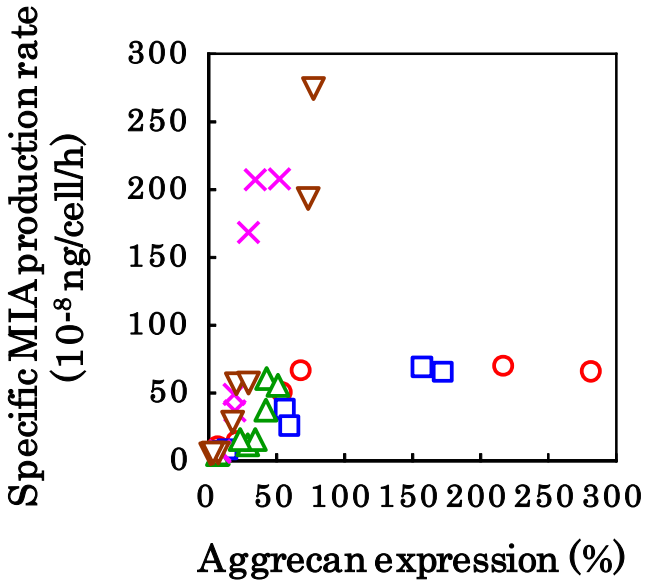


Fig. 5-10.　Relationship between specific MIA production rate and aggrecan expression.

Donor B (○ ; Batch 1 , □ ; Batch 2 , △ ; Batch 3)

Donor D (× ; Batch 4 , ▽ ; Batch5)

その結果、Fig. 5-10 に示すように、ドナーによって相関直線の傾きにやや違いが見られたが、いずれの条件でもアグリカン mRNA 発現率と MIA 比生産速度との間に良好な相関関係が見られた。また、発現率が 100%以上では MIA 比生産速度はほぼ一定になることが確認された。よって、アグリカン mRNA 発現率が 100%以下であれば MIA 比生産速度から分化率を非侵襲的に推定できる可能性が示された。

5-4. 結言

これまで、立体的な軟骨様組織に関して、品質評価のための有用な非侵襲的評価方法は報告されておらず、我々は新たに、細胞シート中の細胞の分化度を非侵襲的に測定する方法を検討した。軟骨細胞が特異的に産生し、上清中へ分泌される MIA というタンパク質に注目し、MIA の生産速度と、軟骨細胞への分化度の関係性を調べた。その結果、軟骨細胞、MSC の両方で、軟骨分化培養に伴い、アグリカンの遺伝子発現が増加すると共に、上清中の MIA の濃度も増加した。そして、アグリカン遺伝子の発現率と細胞あたりの MIA 比生産速度の間に明確な相関関係が見られた。ただし、アグリカン遺伝子発現率が 100%以下では相関関係があったが、それ以上では MIA 比生産速度が一定であった。

このことから、軟骨様細胞シート作製時に、培養上清中の MIA 濃度をモニタリングすることにより、非破壊・非侵襲的に軟骨様細胞シート中の細胞の分化度を評価できる可能性が示唆された。

第 6 章

総括

関節軟骨は特有の細胞外マトリックス（ECM）（アグリカン、II 型コラーゲン）を豊富に含み、関節運動において緩衝装置の役割を果たし、円滑な関節運動を支持する。関節軟骨は関節運動において常に強い荷重やせん断力を受ける組織であるが、血管や神経を欠き、組織中の細胞密度が低く、軟骨細胞の増殖能も低いことから、軟骨組織の自己修復能力は極めて低く、損傷や変性した後の再生は極めて限定的である。関節軟骨の損傷や変性は、長期的には変形性関節症に進行し、痛みや可動域制限によって患者の Quality of life（QOL）の低下を引き起こす。変形性関節症の患者数は国内だけで 1000 万人以上といわれており、高齢化の進行により、今後さらに増加すると考えられる。一方で、現在行われている関節軟骨の治療はそれぞれ欠点を有する上、効果は非常に限定的であり、現在のところ軟骨再生に有効な治療法はない。そこで、これまでの治療法の欠点を解決するために間葉系幹細胞（MSC）を使用した軟骨再生医療が考えられており、我々は今回、MSC を用いた移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究を行った。

すなわち、MSC の分離、増殖、分化、三次元組織化などの多数の工程を経て軟骨様細胞シートを作製するが、臨床応用に到達するためには、細胞シートの作製効率や、患者に対する安全性を考慮することが重要である。そのため、安定的に安全な軟骨様細胞シートを作製する方法や、作製した軟骨様細胞シートの品質評価方法の開発などを達成しなければならない。

従って、これらの問題を解決するために、本研究では MSC を用いて移植用の軟骨様細胞シートを作製するプロセスにおいて、一定の形状の軟骨様細胞シートを異種動物由来成分を用いずに作製する方法、および作製した軟骨様細胞シート中の細胞に関する非侵襲的な分化度評価方法の検討を行った。

本論文は序論および総括を含む 6 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第 2 章では、MSC から一定の形状の軟骨様細胞シートを作製する方法の検討のため、軟骨様細胞シート作製における培地組成の検討を行った。MSC を隔膜培養器であるセルカルチャーインサートに播種し、種々の培地で培養を行った。その結果、従来使用されていた軟骨分化培地を使用した場合、培養中に細胞シートが収縮した。また、これを基に考案した種々の改変培地のうち、血清を含まない培地では同様の収縮が見られた。一方、軟骨分化培地と増殖培地を 1：1 で混合した血清を含む培地を用いた場合、収縮が起こらずにほぼ一定の大きさの円盤状の軟骨様細胞シートを作製することに成功した。また、この方法による一定形状の軟骨様細胞シートは、収縮した場合に比べ、軟骨分化関連遺伝子である、アグリカンと II 型コラーゲン発現が顕著に高い傾向があり、細胞シート中の MSC が効率よく軟骨細胞に分化したことが示唆された。

第 3 章では、移植用として安全な軟骨様細胞シートの作製のため、異種動物由来成分を使用しない Xeno-free 法で軟骨様細胞シートを作製する方法の検討を行った。そこで、初めに分化培養に使用するウシ胎児血清（FBS）を、より安全と考えられるヒト血清（Xeno-free 法）に変え培養を行った。その結果、ヒト血清を使用した場合でも FBS を使用した場合と同等の形状、サイズを有する軟骨様細胞シートを作製することに成功した。さらに、細胞シートの性状を詳細に分析するため組織学染色および硫酸化グルコサミノグリカン、II 型コラーゲンの蓄積量を定量した結果、FBS を使用した場合とヒト血清を使用した場合

の間に組織学的な差違は見られず、また、硫酸化グルコサミノグリカン、II 型コラーゲンの蓄積量もほぼ同等であった。従って、ヒト血清を使用することで軟骨様細胞シート作製を Xeno-free 法で行うことが可能であることが示された。さらに、増殖培養の工程を含めた、培養の全工程を Xeno-free 化するために、FBS 含有増殖用培地およびブタトリプシンの代わりに無血清培地および組換えプロテアーゼを用いて増殖させた MSC を使用し、軟骨様細胞シートの作製を検討した。その結果、Xeno-free で増殖した MSC を使用し、さらに軟骨様細胞シート作製にはヒト血清を含む培地を使用することにより、完全に Xeno-free 法で軟骨様細胞シートを作製できることを明らかにした。

第 4 章では、移植後の軟骨様細胞シートの生着、生存性を向上させるために、軟骨様細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量の増加を検討した。すなわち、軟骨様細胞シート作製時に培地に、細胞内のシグナルを活性化することにより、II 型コラーゲン遺伝子発現を増加させることに有効と考えられる種々の添加物を加えることで、II 型コラーゲンの産生量の増加を検討した。その結果、アスコルビン酸を高濃度（250 μg/ml）で添加した場合、細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量が約 2 倍と顕著に増加した。また、I 型アテロコラーゲン（5 μg/ml）を添加した場合にも細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量が約 4 倍と顕著に増加した。さらに、軟骨様細胞シート作製時にアスコルビン酸と I 型アテロコラーゲンを同時に添加したところ、細胞シート中の II 型コラーゲンの蓄積量は無添加条件と比較して最大約 8 倍に増加した。ここでは、軟骨分化関連遺伝子であるアグリカンや II 型コラーゲンの遺伝子発現が増加すると共に、ECM 分解酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ 13（MMP-13）の発現が顕著に抑制されていた。このことから、アスコルビン酸と I 型アテロコラーゲンの添加効果には、

II 型コラーゲンの合成の促進だけではなく、蓄積後の分解の抑制による、軟骨様細胞シート中の II 型コラーゲンの増加も含まれることが示唆された。このように、軟骨様細胞シートの II 型コラーゲン量を従来の約 8 倍に増加させる培養方法を開発することができた。

第 5 章では、従来の破壊的・侵襲的評価方法に代わる、軟骨様細胞シートの新規品質評価方法の開発のため、軟骨様細胞シート中の細胞の軟骨細胞への分化度の非侵襲的評価方法について検討した。ここで、非侵襲的に定量することが可能な培養上清分析に注目し、軟骨細胞特異的な物質の上清中の濃度測定を行うことにより、軟骨様細胞シート中の MSC の軟骨細胞への分化度を推定できないか検討した。すなわち、軟骨細胞が特異的に産生する物質であるメラノーマ阻害活性（MIA）の比生産速度と軟骨細胞分化マーカーであるアグリカン遺伝子発現率との関係を調べた。その結果、軟骨細胞の再分化培養において、アグリカン遺伝子発現率と細胞当たりの MIA 比生産速度との間に、アグリカン遺伝子発現率が約 100%までは明確な正の相関関係が見られた。さらに MSC の軟骨分化培養においても同様に測定したところ、アグリカン遺伝子発現率と MIA 比生産速度との間に同様の相関関係が見られた。このことから、軟骨様細胞シート作製時に、上清中の MIA 濃度の変化を定量することにより、非破壊・非侵襲的に軟骨様細胞シート中の細胞の分化度を移植前に評価できる可能性が示された。

第 6 章では、総括として本研究で得られた成果についてのまとめおよび今後の展望を述べた。

本論文では、軟骨再生医療を目的としたMSCからの移植用軟骨様細胞シート作製の培養プロセスにおいて、II 型コラーゲン含量の多い軟骨様細胞シートを収縮なく、かつ、より安全に作製する方法を提案し、さらに非侵襲的に細胞分化度を評価する方法を提案した。今後は、前臨床試験による安全性や治療効果の検証を含め、本論文で示されたMSC由来軟骨様細胞シートが早期に臨床応用されることが期待される。

参考文献

1. **Mason C., Dunnill P.**: A brief definition of regenerative medicine. Regen. Med., 3(1), 1-5 (2008).
2. **Langer R., Vacnti J. P.**: Tissue engineering. Science, 260(5110), 920-926, (1993).
3. **O'Connor N. E., Mulliken J. B., Banks-Schlegel S. Kehinde O., Green H.**: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet,* 1(8211), 75-78 (1981).
4. **Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L.**: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N. Engl. J. Med., 331(14), 889-895 (1994).
5. **Sawa Y., Miyagawa S., Sakaguchi T., Fujita T., Matsuyama A., Saito A., Shimizu T., Okano T.**: Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. Surg. Today, 42(2), 181-184 (2012).
6. **Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Yamamoto K., Adachi E., Nagai S., Kikuchi A., Maeda N., Watanabe H., Okano T., Tano Y.**: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N. Engl. J. Med., 351(12), 1187-1196 (2004).
7. **Evans M. J., Kaufman M. H.**: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 292(5819), 154-156 (1981).
8. **Martin G. R.**: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse

embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78(12), 7634-7638 (1981).

9. **Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M.**: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282(5391), 1145-1147 (1998).
10. **Takahashi K., Yamanaka S.**: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126(4), 663-376 (2006).
11. **Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.**: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131(5), 861-872 (2007).
12. **Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., Petrakova K. V.**: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J. Embryol. Exp. Morphol., 16(3), 381-390 (1966).
13. **Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R.**: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284(5411), 143-147 (1999).
14. **Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G.**: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96(19), 10711-10716 (1999).
15. **Dezawa M., Kanno H., Hoshino M., Cho H., Matsumoto N., Itokazu Y., Tajima N., Yamada H., Sawada H., Ishikawa H., Mimura T., Kitada**

M., Suzuki Y., Ide C.: Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J. Clin. Invest., 113(12), 1701-1710 (2004).

16. **Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. M., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S., Goff J. P.**: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science, 284(5417), 1168-1170 (1999).
17. **Theise N. D., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei P. B., Morgan G., Teperman L., Henegariu O., Krause D. S.**: Liver from bone marrow in humans. Hepatology, 32(1), 11-16 (2000).
18. **黒田康勝, 出澤真理:** 間葉系幹細胞の特性と再生医療における展開。再生医療- 日本再生医療学会雑誌, 10(1), 8-11 (2011).
19. **Glennie S., Soeiro I., Dyson P. J., Lam E. W., Dazzi F.**: Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood, 105(7), 2821-2827 (2005).
20. **Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G. L., Pistoia V., Uccelli A.**: Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood, 107(1), 367-372 (2006).
21. **Spaggiari G. M., Capobianco A., Becchetti S., Mingari M. C., Moretta L.**: Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood, 107(4), 1484-1490 (2006).

22. **Ramasamy R., Fazekasova H., Lam E. W., Soeiro I., Lombardi G., Dazzi F.**: Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. Transplantation, 83(1), 71-76 (2007).

23. **Uccelli A., Moretta L., Pistoia V.**: Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat. Rev. Immunol., 8(9), 726-736 (2008).

24. **Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M. E., Remberger M., Dini G., Egeler R. M., Bacigalupo A., Fibbe W., Ringdén O.**: Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet, 371(9624), 1579-1586 (2008).

25. **Ohgushi H., Caplan A. I.**: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. J. Biomed. Mater. Res., 48(6), 913-927 (1999).

26. **Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., Verfaillie C. M.**: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 418(6893), 41-49 (2002).

27. **Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Shigemoto T., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y., Dezawa M.**: Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107(19), 8639-8643 (2010).

28. **遠山 正彌, 大槻 勝紀, 中島 裕司**: 人体発生学, 南山堂, 265-275 (2003).

29. **藤井 克之, 井上 一**: 骨と軟骨のバイオロジー, 金原出版, 85-97 (2002).

30. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.**: 細胞の分子生物学, 教育社, 692-715 (1987).

31. **岩田 久, 新名 正由**: 関節マーカー, メディカルレビュー社, 96-97 (1997)

32. **室田 誠逸** : 再生医学・再生医療　現代科学増刊 41、東京化学同人、16-23、160-163 (2002).

33. **Temenoff J. S., Mikos A. G.**: Review; tissue engineering for regeneration of articular cartilage, Biomaterials, 21(5), 431-440 (2000).

34. **Hunziker E. B.**: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage, 10(6), 432-463 (2002).

35. **黒澤 尚, 星川 吉光, 高尾 良英, 坂西 英夫, 川野 哲英**: スポーツ外傷学Ⅳ下肢、医歯薬出版株式会社、186-211　(2001).

36. **許 俊鋭, 斎藤 明, 赤池 敏宏**: 先端医療シリーズ 37　人口臓器・再生医療の最先端、先端医療技術研究所、241-244 (2005).

37. **Steinwachs M. R., Guggi T., Kreuz P. C.**: Marrow stimulation techniques. Injury, 39(1), 26-S31 (2008).

38. **田畑 泰彦, 岡野 光夫**: ティッシュエンジニアリング 2006、日本医学館、120-125 (2006)

39. **Jakob R. P., Franz T., Gautier E., Mainil-Varlet P.**: Autologous osteochondral grafting in the knee; indication, results, and reflections, Clin. Orthop. Relat. Res., 401, 170-184 (2002).

40. **Wakitani A.**: Present statue and perspective of articular cartilage

regeneration. Yakugaku zasshi, 127(5), 857-863 (2007).

41. **Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W.**: Changes in the ratio of type-Ⅰ and type-Ⅱ collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes, J. Bone Joint Surg. Br., 86(2), 286-295 (2004).
42. **Uchio Y., Ochi M., Matsusaki M., Kurioka H., Katsube K.**: Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. J. Biomed. Mater. Res. 50(2), 138-143 (2000).
43. **Ochi M., Uchio Y., Kawasaki K., Wakitani S., Iwasa J.**: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. J. Bone Joint Surg. Br., 84(4), 571-578 (2002).
44. **Bernardo M. E., Emons J. A., Karperien M., Nauta A. J., Willemze R., Roelofs H., Romeo S., Marchini A., Rappold G. A., Vukicevic S., Locatelli F., Fibbe W. E.**: Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. Connect. Tissue Res., 48(3), 132-140 (2007).
45. **Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T.**: Comparison of human stem cells derived frim various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum., 52(8), 2521-2529 (2005).
46. **Caterson E. J., Nesti L. J., Danielson K. G., Tuan R. S.**: Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. Mol. Biotechnol., 20(3), 245-256 (2002).

47. **Deschaseaux F., Gindraux F., Saadi R., Obert L., Chalmers D., Herve P.**: Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med, low phenotype. Br. J. Haematol., 122(3), 506-517 (2003).

48. **Ito K., Aoyama T., Fukiage K., Otsuka S., Furu M., Jin Y., Nasu A., Ueda M., Kasai Y., Ashihara E., Kimura S., Maekawa T., Kobayashi A., Yoshida S., Niwa H., Otsuka T., Nakamura T., Toguchida J.**: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by nonwoven fabric. Tissue Eng. Part C Methods, 16(1), 81-91 (2010).

49. **Kim J., Kang J. W., Park J. H., Choi Y., Choi K. S., Park K. D., Baek D. H., Seong S. K., Min H. K., Kim H. S.**: Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. Arch. Pharm. Res., 32, 117-126 (2009)

50. **Yokoyama M., Miwa H., Maeda S., Wakitani S., Takagi M.**: Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. J. Biosci. Bioeng., 106(1), 46-50 (2008).

51. **Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K., Pan H., Koike C., Yoshida E., Takagishi K., Kato Y.**: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem. Biophys. Res. Commun., 288(2), 413-419 (2001).

52. **Fukumoto T., Sperling J. W., Sanyal A., Fitzsimmons J. S., Reinholz G. G., Conover C. A., O'Driscoll S. W.**: Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal

mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. Osteoarthritis Cartilage, 11(1), 55-64 (2003).

53. **Indrawattana N., Chen G. P., Tadokoro M., Shann L. H., Ohgushi H., Tateishi T., Tanaka J., Bunyaratvej A.:** Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, Biochem. Biophys. Res. Commun., 320(3), 914-919 (2004).
54. **Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M., Yoo J. U.:** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, Exp. Cell Res., 238(1), 265-272 (1998).
55. **Mackay A. M., Beck S. C., Murphy J. M., Barry F. P., Chichester C. O., Pittenger M. F.:** Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow, Tissue Eng., 4(4), 415-428 (1998).
56. **Worster A. A., Nixon A. J., Brower-Toland B. D., Williams J.:** Effect of transforming growth factor beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells, Am. J. Vet. Res., 61(9), 1003-1010 (2000).
57. **Worster A. A., Brower-Toland B. D., Fortier L. A., Bent S. J., Williams J., Nixon A. J.:** Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix, J. Orthop. Res., 19(4), 738-749 (2001).
58. **Koga H., Shimaya M., Muneta T., Nimura A., Morito T., Hayashi M., Suzuki S., Ju Y. J., Mochizuki T., Sekiya I.**: Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of

cartilage defect. Arthritis Res. Ther., 10(4), R84 (2008.

59. **Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M.**: Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis Cartilage., 10(3), 199-206 (2002).

60. **Wakitani S., Mitsuoka T., Nakamura N., Toritsuka Y., Nakamura Y., Horibe S.**: Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. Cell Transplant.,13(5), 595-600 (2004).

61. **De Jong W. H., Eelco Bergsma J., Robinson J. E., Bos R. R.**: Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants. Biomaterials, 26(14), 1781-1791 (2005)

62. **Niyama K., Ide N., Onoue K., Okabe T., Wakitani S., Takagi M.**: Construction of osteochondral-like tissue graft combining β-tricalcium phosphate block and scaffold-free centrifuged chondrocyte cell sheet. J. Orthop. Sci., 16(5), 613-621 (2011).

63. **Miyagi S., Tensho K., Wakitani S., Takagi M.**: Construction of an osteochondral-like tissue graft combining β-tricalcium phosphate block and scaffold-free mesenchymal stem cell sheet. J. Orthop. Sci., 18(3), 471-477 (2013).

64. **Elloumi-Hannachi I., Yamato M., Okano T.**: Cell sheet engineering: a unique nanotechonology for scaffold-free Tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. J. lnten. Med., 267(1), 54-70 (2010).

65. **Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G., Ishiguro T., Okumura M., Iwanaga T., Kadosawa T., Fuinaga T.**: Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet culture system. Exp. Hematol., 32(5), 502-509 (2004).

66. **Yang J. W., de Isla N., Huselstein C., Sarda-Kolopp M. N., Li N., Li Y. P., Jing-Ping O. Y., Stoltz J. F., Eljaafari A.**: Evaluation of human MSCs cell cycle, viability and differentiation in micromass culture. Biorheology. 43(3-4), 489-496 (2006).

67. **Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M. Yoo J. U.**: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp. Cell Res., 238(1), 265-272 (1998).

68. **Nagai T., Furukawa K. S., Sato M., Ushida T., Mochida J.**: Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. Tissue Eng. Part A, 14(7), 1183-1193 (2008).

69. **Miyazaki T., Miyauchi S., Matsuzaka S., Yamagishi C., Kobayashi K.**: Formation of proteoglycan and collagen-rich scaffold-free stiff cartilaginous tissue using two-step culture methods with combinations of growth factors. Tissue Eng. Part A, 16(5), 1575-1584 (2010).

70. **新山　耕平**: スキャフォールドフリー軟骨細胞シートの作成方法の検討, 北海道大学大学院　工学研究科　生物機能高分子専攻　生物工学講座　細胞培養工学研究室　修士論文 (2009).

71. **Murdoch A. D., Grady L. M., Ablett M. P., Katopodi T., Meadows R. S., Hardingham T. E.**: Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage.

Stem Cells, 25(11), 2786-2796 (2007).

72. **藤友 崇**：骨髄間葉系幹細胞とマルチウエルを用いた軟骨シート作成法の検討, 北海道大学 工学部 応用理工系学科 応用化学コース 生物工学講座 細胞培養工学研究室　学士論文　(2009).

73. **Maeda S., Fujitomo T., Okabe T., Wakitani S., Takagi M.**: Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells. J. Biosci. Bioeng., 111(4), 489-492 (2011).

74. **Mannello F., Tonti G. A.**: Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! Stem Cells, 25(7), 1603-1609 (2007).

75. **Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F., Zander A. R.**: Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp. Hematol., 32(12), 1212-1225 (2004).

76. **Takagi M., Nakamura T., Matsuda C., Hattori T., Wakitani S., Yoshida T.**: *In vitro* proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells employing donor serum and basic fibroblast growth factor. Cytotechnology, 43(1-3), 89-96 (2003).

77. **Miwa H., Hashimoto Y., Tensho K., Wakitani S., Takagi M.**: Xeno-free proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology, 63(3), 301-308 (2012).

78. **Carver S. E., Heath C. A.**: Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. Biotechnol. Bioeng., 62(2), 166-174 (1999).

79. **De Croos J. N., Dhaliwal S. S., Grynpas M. D., Pilliar R. M., Kandel R.**

A.: Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation. Matrix Biol., 25(6), 323-331, (2006).

80. **Furukawa K. S., Imura K., Tateishi T., Ushida T.**: Scaffold-free cartilage by rotational culture for tissue engineering. J. Biotechnol., 133(1), 134-145 (2007).
81. **Tien Y. C., Lin S. D., Chen C. H., Lu C. C., Su S. J., Chih T. T.**: Effects of pulsed low-intensity ultrasound on human child chondrocyte. Ultrasound Med. Biol., 37(7), 1174-1181 (2008).
82. **Choi J. W., Choi B. H., Park S. H., Pai K. S., Li T. Z., Min B. H., Park S. R.**: Mechanical stimulation by ultrasound enhances chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells ina Fibrin-Hyaluronic acid hydrogel. Artif. Organs, 37(7), 648-655 (2013).
83. **Kavitha O., Thampan R. V.**: Factors influencing collagen biosynthesis. J. Cell Biochem. 104(4), 1150-1160 (2008).
84. **Chan D., Lamande S. R., Cole W. G., Bateman J. F.**: Regulation of procollagen synthesisi and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. Biochem. J., 269(1), 175-181 (1990)
85. **Temu T. M., Wu K. Y., Gruppuso P. A., Phornphutkul C.**: The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 299(2), E325-E334 (2010).
86. **Yun Z. Y., Takagi M., Yoshida T.**: Effect of antioxidants on the apoptosis of

CHO cells and production of tissue plasminogen activator in suspension culture. J. Biosci. Bioeng., 91(6), 581-585 (2001).

87. **Takagi M., Kitabayashi T., Koizumi S., Hirose H., Kondo S., Fujiwara M., Ueno K., Hiroaki M., Hosokawa Y., Masuhara H., Wakitani S.**: Correlation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiationfrom mesenchymal stem cells to chondrocytes. Biotechnol. Lett., 30(7), 1189-1195 (2008).

88. **Tokumitsu A., Wakitani S., Takagi M.**: Noninvasive discrimination of human normal cells and malignant tumor cells by phase-shifting laser microscopy. J. BioSci. Bioeng., 109(5), 499-503 (2010).

89. **Bosserhoff A. K., Buettner R.**: Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocytedifferentiation. Biomaterials, 24(19), 3229-3234 (2003).

90. **Tscheudschilsuren G., Bosserhoff A. K., Schlegel J., Vollmer D., Anton A., Alt V., Schnettler R., Brandt J., Proetzel G.**: Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. Exp. Cell Res., 312(1), 63-72 (2006).

91. **Lee J., Ko M., Joo C. K.**: Rho plays a key role in TGF-beta1-induced cytoskeletal rearrangement in human retinal pigment epithelium. J. Cell Physiol., 216(2), 520-526 (2008).

92. **Li Q., Liu T., Zhang L., Liu Y., Zhang W., Liu W., Cao Y., Zhou G.**: The role of bFGF in down-regulating α-SMA expression of chondrogenically induced BMSCs and preventing the shrinkage of BMSC engineered cartilage. Biomaterials, 32(21), 4773-4781 (2011).

93. **Lee S., Kim J. H., Jo C. O., Seong S. C., Lee J. C., Lee M. C.**: Effect of serum and Growth Factors on Chondrogenic Differentiation of Synovium-Derived Stromal Cells. Tissue Eng. Part A, 15(11), 3401-3415 (2009)

94. **Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., Tsuchiya T.**: FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling, Cytotechnology, 56(1), 1-7 (2008).

95. **Ichinise S., Muneta T., Koga H., Segawa Y., Tagami M., Tsuji K., Sekiya I.**:Morphological differences during *in vitro* chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. Lab. Invest., 90(2), 210-221 (2010).

96. **Asanbaeva A., Masuda K., Thonar E. J., Klisch S. M., Sah R. L.**: Cartilage growth and remodeling: modulation of balance between proteoglycan and collagen network in vitro with beta-aminopropionitrile. Osteoarthritis Cartilage, 16(1), 1-11 (2007).

97. **三輪 寛人**: 動物由来成分を使用しない安全な間葉系幹細胞増殖培養法の検討. 北海道大学大学院　工学研究科　生物機能高分子専攻　生物工学講座 修士論文 (2010).

98. **Sekiya I., Larson B. L., Smith J. R., Pochampally R., Cui J. G., Prockop D. J.**: Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma : conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality, Stem Cells. 20(6), 530-541 (2002).

99. **Neuhuber B., Swanger S. A., Howard L., Mackay A., Flscher I.**: Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics.

Exp. Hematol., 36(9), 1176-1185 (2008).

100. **Kagita E., Lkeda M., Wakitani S., Takagi M.**: Effect of monosaccharides composing glycosaminoglycans on type 2 collagen accumulation in three- dimensional culture of chondrocyte. J. Biosci. Bioeng., 109(1), 51-54 (2010).

101. **Arikawa T., Matsukawa A., Watanabe K., Sakata K. M., Nagayama M., Takeshita K., Ito K., Niki T., Oomizu S., Shinonaga R., Saita N., Hiroshima M.**: Galectine-9 accelarates transforming growth factor beta3-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to chondrocytes. Bone, 44(5), 849-857 (2009).

102. **Rutgers M., Saris D. B., Vonk L. A., van Rijen M. H., Akrum V., Langeveld D., van Boxtel A., Dhert W. J., Creemers L. B.**: Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes. Tissue Eng. Part A, 19(1-2), 59-65 (2013).

103. **Naci D., Aoudijit F.**: Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. Cell Signal., 26(9), 2008-2015 (2014).

104. **Chetoui N., Gendron S., Chamoux E., Aoudjt F.**: Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. Mol. Immunol., 43(10) 1687-1693 (2006).

105. **Meister A.**: On the antioxidant effect of ascorbic-acid and glutathione. Biochem. Pharmacol., 44(10), 1905-1915 (1992).

106. **Nakatani S., Mano H., Sampei C., Shimizu J., Wada M.**:

Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. Osteoarthritis Cartilage, 17(17), 1620-1627 (2009).

107. **井出 直人**: 軟骨細胞三次元培養におけるアミノ酸の添加効果、 北海道大学　工学部　応用化学科　生物工学講座　細胞培養工学研究室　学士論文(2008).

108. **Kolanczyk M., Mautner V., Kossler N., Nguyen R., Kühnisch J., Zemojtel T., Jamsheer A., Wegener E., Thurisch B., Tinschert S., Holtkamp N., Park S. J., Birch P., Kendler D., Harder A., Mundlos S., Kluwe L.**: MIA is a potential biomarker for tumour load in neurofibromatosis type 1. BMC Med., 9, 82 (2011).

謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院　総合化学院　総合化学専攻　細胞培養工学研究室において行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行し本論文の執筆にあたり、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院　工学研究院　髙木 睦 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文をご精読いただき、貴重な意見を賜りました、北海道大学大学院　工学研究院　大利　徹　教授、田口　精一　教授、ならびに北海道大学　遺伝子病制御研究所　藤田　恭之　教授に感謝の意を表します。

本研究を進める上で、医学的見地から多くの貴重な御助言、御提言を賜りました広島大学大学院　医歯薬保健学研究院　脇谷 滋之 教授ならびに武庫川女子大学　健康スポーツ科学部　目良　恒　博士に深く感謝いたします。また、研究資料の骨髄液採取にご協力いただいた、北海道大学大学院　医学研究科　岩崎　倫政　教授、眞島　任史　教授、髙橋　大介　助教に深謝いたします。

研究活動において、常日頃から御心配を賜りました、北海道大学大学院 工学研究院　恵良田 知樹　准教授に心より感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、多大なる御助言と御協力を賜りました、北海道大学大学院 工学研究院 藤原 政司　助教に心より感謝いたします。最後に、日頃から研究成果等の討議において有益な御助言、御協力を賜りました、北海道大学大学院　総合化学院　総合化学専攻　細胞培養工学研究室の皆様に深く感謝いたします。

2015 年 3 月
佐藤　康史