

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養法に関する研究

米永 一理

要旨本文

序文

われわれの施設では、0.1g 程度の耳介軟骨から軟骨細胞を単離・培養して、大型の 3 次元形状と力学的強度を有するインプラント型再生軟骨の作製を試みている。この再生軟骨の作成のためには、当施設での従来法（100 万細胞）よりも大量の軟骨細胞（1 億細胞以上）が必要となることが予想された。この過程では、細胞の単離の際に、十分量の細胞を、短時間で安全に回収することができ、初代培養において、できるだけ多くの細胞を確実に培養できることが望ましい。しかし、軟骨は、豊富なコラーゲンを基質とするマトリックスを含んでいるため、コラゲナーゼの浸漬処理による消化を必要とする。よって、軟骨を軟骨細胞に単離することは容易ではない。コラゲナーゼ処理は、軟骨細胞の活性を減少させ、増殖、分化を抑制するため、適切な濃度・時間での処理が必要である。また、軟骨細胞は継代数が増えるほど、脱分化を起こし、基質産生能を失うことが知られている。さらに、継代操作そのものも、再生組織の細菌汚染や、取り違い事故のリスクを増加させる。したがって、コラゲナーゼ処理による細胞単離により、できるだけ多くの細胞を確保し、必要最低限の細胞播種濃度で培養し、最大限の細胞数を獲得することで、継代数を極力減らす必要がある。しかしこれまで、耳介軟骨細胞の単離・播種・培養法の最適条件に関しては検討報告がない。本研究は、安定した軟骨再生医療を提供するためのプロトコール作成の一環として、ヒト耳介軟骨からの軟骨細胞単離におけるコラゲナーゼ処理濃度・時間および単離後の播種濃度の最適化を図り、より効率的な細胞培養の方法を確立することを目的とし、大きく 3 つの項目に分けて検証した。

方法

自動測定器 NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討

NucleoCounter®と、従来使用していた Live/Dead® Viability Assay による計測値の相関性を、不純物のないすべて生細胞である Passage 3 (P3) のヒト軟骨細胞を用いて確認した。次に、当施設の各実験において、ヒト耳介軟骨を単離・回収し、不純物を含んだ溶液中の細胞の測定機会があるごとに NucleoCounter®と Live/Dead® Viability Assay を用いて、全細胞数、生存細胞数、そして細胞生存率を比較検討した。さらに、NucleoCounter®を用いて 3 人の研究者が測定し、同時に別の 3 人の研究者により、Live/Dead® Viability Assay にて 3 回計測し CV 値を比較した。

軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

軟骨細胞の単離

3 名の小耳症の患者から手術時に摘出された遺残耳介軟骨片を、250~1,000 μ m 程度の大きさになるまで細切した。0.15%、0.3%、0.6%、そして 1.2%の濃度のコラゲナーゼ を準備し、各濃度における 2、4、6、および 24 時間後の全細胞数、生存細胞数、および細胞生存率を NucleoCounter®で測定した。

軟骨細胞の培養

生存細胞を、1 型コラーゲンでコーティングされたプラスチック培養皿に播種した。初代培養の最適な細胞播種密度を評価するため細胞を 30,000、10,000、3,000、1,000、300、100 細胞/cm² の密度で播種した。

Real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction analysis 分析

Total RNA は、サプライヤーのプロトコールに従って、軟骨細胞から抽出した。精製した RNA から cDNA を得た。PCR により、標的遺伝子の PCR amplicon 配列を含む cDNA を、クローニングし増幅し、RT-PCR 分析を行った。

ELISA 法を用いた一本鎖 DNA の定量によるアポトーシスの検出

アポトーシスは、一本鎖 DNA ELISA キットのプロトコールに則って評価した。

軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討

軟骨細胞の単離と単層培養

前検討を踏まえて、3 名の小耳症の患者から手術時に摘出された遺残耳介軟骨片を細切後、0.3%の濃度のコラゲナーゼにより 24 時間処理し、軟骨細胞を単離した。初代耳介軟骨細胞培養では、5,000 細胞/cm² で播種した (n=36)。この 36 の培養皿を 3 つのグループに分け、各グループは初回の培養液の交換を、培養後 1 日目、2 日目、3 日目の 3 つとした。通常は廃棄される回収した培養液から、浮遊細胞を採取した。各グループはさらに遠心分離をして培養液を交換する群と、遠心分離をせずに培養液を交換しない 2 つのサブグループに分けた。播種した細胞は、生着細胞のみを培養した場合を (A)、生着細胞および浮遊細胞を同等に混合し培養した場合を (F+ A)、浮遊細胞のみを培養した場合を (F) と

し、3つの群に分けた。これらを再播種し、1週間後、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL1A1) およびII型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL2A1) の遺伝子発現を評価した。

ペレット培養、RT-PCR 分析、GAG の測定、ELISA 法を用いた一本鎖DNA の定量によるアポトーシスの検出

培養した軟骨細胞をペレット培養し、3週間培養後、組織学的、生化学的分析を行った。RT-PCR 分析を前検討と同様に分析した。さらに硫酸化 GAG 含有量を、アルシアンブルーアッセイを用いて測定し、アポトーシスを前検討と同様に評価した。

結果

自動測定器 NucleoCounter® の耳介軟骨細胞における有用性の検討

NucleoCounter® により Live/Dead® Viability Assay と近似した細胞数、生存率を測定できることがわかった。Nucleocounter® の値は、Live/Dead® Viability Assay と比べ有意に低値であり、バラツキが少ない、精度の高いデータが得られたことがわかった。

軟骨細胞の至適コラーゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

最大限の生細胞数を得ることができる最短の浸漬時間は、コラーゲナーゼ濃度 0.15% および 0.3% では 24 時間、0.6% では 6 時間、1.2% では 4 時間であることが分かった。次に、コラーゲナーゼ濃度毎の細胞培養時の最適な細胞播種密度は、コラーゲナーゼ濃度 0.3% 24 時間、0.6% 6 時間で 3,000~10,000 細胞/cm² であることがわかった。コラーゲナーゼ処理の各条件下での軟骨細胞のアポトーシスと炎症性サイトカインの遺伝子発現は、コラーゲナーゼ濃度が増加するにつれて、アポトーシス関連因子の P53 の増加する傾向を認めた。また、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β は、コラーゲナーゼ濃度 0.6% 以上では増加する傾向であった。アポトーシスアッセイの結果も、0.6% または 1.2% とコラーゲナーゼ濃度が高い場合は、浸漬時間が長いほうが、アポトーシスを起こしやすい傾向を示した。

軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討

浮遊細胞は、培養後 1、2、3 日でいずれも見かけ上の生細胞数は 1 つの培養皿あたり、25 万から 30 万で有意な差はなかった。次に、浮遊細胞を培養 1、2、3 日で回収し、培養液を交換せずにそのまま使う群と、新しい培養液に交換する群に分け、培養皿 1 つ分、2 つ分、3 つ分を、新しい培養皿に播種した。培養後 1 日で回収した細胞の方が 2、3 日で回収した細胞と比べて、培養期間が長いいため、初代培養細胞と同じ回収時には、より多くの細胞が増殖した。浮遊細胞を再播種するにあたり、新しい培地に交換した方がより増殖効率がよい傾向を示した。COL1A1 と COL2A1 の mRNA の Real-time RT-PCR を用いた測定では、浮遊細胞のみを用いて継代した場合、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合、生着細胞のみを用いて継代した場合いずれでも発現に有意な差はなかった。さらに、3週間ペレットにて培養した軟骨の組織学的、生化学的分析においても、有意な差は認めなかった。

考察

自動測定器 NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討

P0 細胞の Live/Dead® Viability Assay によるカウントには、バラツキがあった。これは不純物を多く含んだ懸濁液中の細胞の判別が難しく、さらにその細胞の生死の判定は一層煩雑であり、経験や、各々の基準が異なることなどが原因と考えられる。NucleoCounter® は、不純物を含む懸濁液からでも細胞数とその生死を測定可能であり、Live/Dead® Viability Assay 法と比べ、非常に簡便で客観的であるため、正確、精密かつ効率的な軟骨生細胞数測定法として軟骨細胞の生存率測定法としての有用性が認められた。

軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

コラゲナーゼ濃度と浸漬時間および細胞数の結果より、生存細胞数が最大になる軟骨片のコラゲナーゼ浸漬時間は、軟骨片が完全に消失した時点に相当する。また、浸漬時間が短いと、軟骨片の細切したことでダメージをうけた表面の細胞から単離されるため、生存率が低くなる。この傾向は、アポトーシスアッセイの結果によっても確認され、軟骨片を高濃度のコラゲナーゼに長時間浸漬することは、軟骨細胞への傷害性がある。さらに、軟骨から採取できる軟骨細胞の最大数は、約 1×10^7 個/g であり、これは今までの 10 倍である。アポトーシス関連遺伝子、炎症性サイトカインの遺伝子の発現、アポトーシスアッセイからも、コラゲナーゼ濃度が低いと細胞への損傷が減少する。この細胞の損傷は、コラゲナーゼが消化酵素の一種であり、細胞毒性があることによると考える。したがって、サイズが 250~1,000 μ m である軟骨片から軟骨細胞を単離するための最適な条件は、コラゲナーゼ濃度 0.3%24 時間、または 0.6%6 時間で浸漬し、細胞播種密度を 3,000~10,000 細胞/cm² の範囲で培養することである。

軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討

今回の結果より、培養皿に生着せず浮遊している細胞にも十分な増殖能があり、また通常の生着細胞との違いがないことがわかった。この浮遊細胞を用いた培養法を用いると通常培養のみ場合と比べ 1.5 倍の細胞数を確保することができ、初代培養の播種濃度の検討の結果と合わせると、0.1g の軟骨片から、約 100 万細胞を回収することができる。これらを、3,000-10,000 細胞/cm² で播種すると継代前 (P0) で約 1000 万細胞を確保することができ、さらに P1 で約 1 億細胞を確保できる。この 1 億細胞は、われわれが想定する移植再生軟骨の必要細胞数であり、2-3 週間で患者への利用が可能となる。このことにより、継代を繰り返すことによる脱分化や、細胞変性リスクを減らし、より安全・確実な再生軟骨移植片を作製することができる。

軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養法の妥当性を見出した本研究内容は、現在東京大学で治験が行われているヒト耳介軟骨を用いた再生軟骨の臨床応用において、実際に利用されている技術の一部である。さらに、今後様々な細胞培養法の開発に幅広く応用できると考える。