

表 題 細胞シート移植後の動態評価
Bioluminescence による経時的評価に関する研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 高久裕子

担当指導教員氏名 佐藤正章 講師

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻
麻酔・救急・集中治療医学分野
麻酔科学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに	3
1) 軟骨組織について	
2) 変形性膝関節症について	
3) これまでの軟骨再生法	
4) 細胞組織工学の発達	
5) 温度応答性培養皿による細胞シートの特徴	
6) 共同研究者による軟骨細胞シート開発と先行研究	
7) 移植細胞追跡法について	
研究報告	15
I. 目的	15
II. 対象と方法	16
1) ルシフェラーゼトランスジェニックラット	
2) ルシフェラーゼトランスジェニックラットの軟骨組織，滑膜組織の採取	
3) 温度応答性培養皿を用いた細胞シートの作製	
4) ラット膝関節全層欠損モデルの作製と細胞シート同種膝関節移植方法，及び 群の作製	
5) In Vivo の BLI と発光強度の測定	
6) 組織学的評価	
III. 結果	27

1) 移植細胞のバイオルミネッセンスイメージング (BLI)	
2) 発光強度の推移	
3) 組織学的評価	
IV. 考察	30
V. 軟骨細胞シートの今後の展望	33
VI. 結論	34
VII. 謝辞	35
VIII. 引用文献	36

はじめに

1) 軟骨組織について

軟骨組織は血管のない結合組織であり，軟骨細胞と高度に特殊化した豊富な細胞外基質から構成される．細胞外基質の種類によって組織学的に硝子軟骨，弾性軟骨および線維軟骨の3種類に分類される．関節表面を覆う関節軟骨は主に硝子軟骨からなり，成人では2～5 mmの厚さを持つ．硝子軟骨重量の60～80%は細胞間水分からなり，次に約15%を主に2型コラーゲンが占る．また約15%をグリコサミノグリカンを含むプロテオグリカン凝集体と多接着糖蛋白質を占める．これらの豊富な細胞外基質が硝子のように見えることから硝子軟骨と呼ばれる．軟骨細胞は細胞外基質のなかに点在し，総重量は3～5%に過ぎないが，コラーゲン，グリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの産生と維持の役割を担っている．血管を欠く組織ではあるが，この水分を多く含む細胞外基質が物質拡散を容易にするため，軟骨細胞は関節腔を裏打ちする滑膜細胞によって産生，分泌される滑膜液から栄養されている．関節軟骨組織は関節表面の摩擦を軽減し，荷重を分散させつつ下層の骨に伝えることで，強度かつ反復する衝撃に耐えられる．しかし，硝子軟骨は無血管野であること，非移動性であること，および成熟軟骨細胞が分裂能に乏しいことから，修復能が非常に低い（1-3）．その他，線維軟骨はI型コラーゲン優位の軟骨であり，荷重時の変形防止の機能を持ち，椎間板，恥骨結合および半月板などを形成している．弾性軟骨は2

型コラーゲンとともに弾性線維を多く含み，耳介や喉頭蓋の軟骨を形成する。

関節軟骨より弾性に富み，組織に柔軟性を与える。

2) 変形性膝関節症について

変形性膝関節症は加齢や外傷により軟骨組織の摩耗をきたして生じる。初期には関節軟骨の表層帯が破壊され，最終的にその破壊は骨までおよび，軟骨下の骨が露出して新たな関節表面をつくる。動作時の疼痛が増し，関節の可動域が徐々に減少する。自然治癒はほとんど望めず，症状が進行すると膝関節置換術の適応になる。組織学上，変形性膝関節症では軟骨層の全層欠損と部分欠損が混在している。全層欠損である骨軟骨欠損では骨髄から間葉系幹細胞が動員されて，欠損孔が小さければ治癒することがあるが，特に損傷が軟骨層に限局する軟骨部分欠損では従来修復は困難で生じないとされてきた(4)。

3) これまでの軟骨再生法

以下に実際におこなわれてきた軟骨再生法を挙げる。骨刺激法は，損傷軟骨から骨髄まで孔を開けて出血させることで骨髄由来間葉系幹細胞を損傷部に誘導する方法である(5,6)。簡便な方法であるが再生軟骨は主に線維軟骨となる。自家骨軟骨移植は，損傷軟骨周囲の非荷重部位健常軟骨から軟骨組織を採取して損傷部に移植する方法である(7,8)。軟骨組織を移植できる利点があるが，接着性の問題，平滑な表面を必ずしも得られないこと，健常軟骨損傷などの欠

点がある。自家培養軟骨細胞移植は上記のように採取した健常軟骨組織をさらに酵素処理後に細胞分離したのち約3週間培養する。培養細胞を細胞浮遊液として損傷部位に移植後骨膜で縫合して漏出を防ぐ(9-11)。欧米を中心に臨床応用され効果をあげている。採取する健常軟骨組織が自家骨軟骨移植に比べて少なく済むこと、比較的大きな軟骨損傷部位の治療ができる利点がある。しかし2回の手術が必要であり侵襲が高いこと、高コストであること、そして軟骨増殖能に限界があるなどの欠点がある。自家培養骨髄間葉系幹細胞移植は骨髄から骨髄液を採取して間葉系幹細胞を抽出、培養したのち移植する(12-14)。骨髄液の採取は簡便であるが、軟骨への分化が不十分であり線維軟骨が再生されやすいという欠点がある。

4) 細胞組織工学について

前述のような分化細胞や幹細胞の懸濁液の充填による再生治療は比較的小さな障害部位に限られ、また移植細胞の生着率が課題であった。1988年に Vacanty と Langer らは、ポリグラクチン、ポリオルソエステル、及びポリ酸無水物の3種の生体吸収性高分子を細胞が付着する足場として肝細胞、膵細胞及び小腸細胞の細胞浮遊液に加えると細胞がそれらの高分子に生着、増幅することを報告した(15, 図1)。

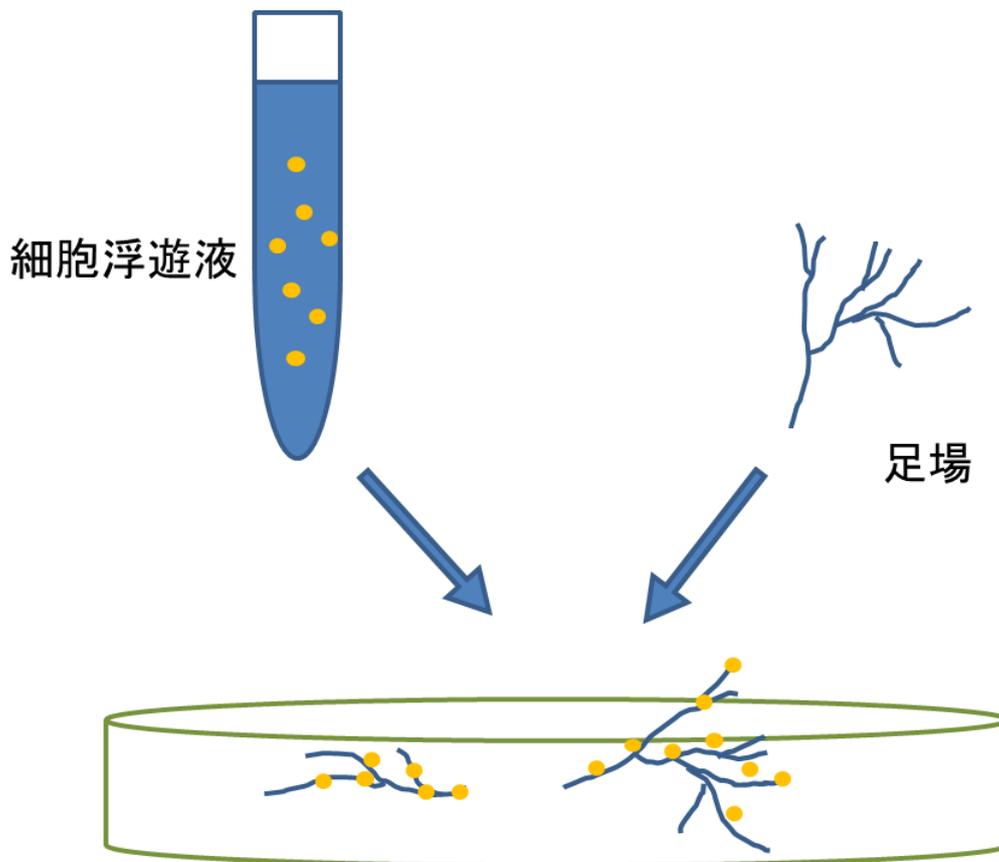


図 1. Vacanty らの描いた組織再生法

培養，回収した標的細胞の浮遊液と足場材料を共に培養することで，細胞は足場に生着，増殖を開始する．これにより 3 次元構造を持つ組織再生が人工的に可能になった．

そして細胞，成長因子，足場という 3 つの要素により組織を構築させる細胞工学を提唱した．それ以後細胞増殖のための様々な生体用高分子ポリマーが開発されてきた．元々軟骨組織は豊富な細胞基質を有する．足場材料が分解吸収されるとともに細胞基質に置き換わり，本来の軟骨組織に近づけることができた．組織工学技術のよい適応とされ組織工学的に構築された軟骨グラフトの研究が盛んになった．2002 年に Ochi ら (16) はアテロコラーゲンゲルの中で組織工学的に構築した軟骨グラフトを用いた臨床研究の良い成果を報告した．これら足場

材料の必要条件は細胞の分裂，分化のため付着点となり組織再生のための場を提供すること，多くの細胞を含有できること，組織の再生とともに分解吸収すること，必要な強度をもつことが挙げられる．しかしながら移植時の異物反応，高分子ポリマーの生体内分解時の炎症，ホストの周囲組織との結合，均一な細胞増殖に対する問題の完全な克服はなされていない．ゆえに移植片の長期的な生体適合性のリスクが問題となっていた(17)．つまり足場材料を使用しない組織工学的軟骨組織を作製できればこれらのリスクを考慮しなくてよくなるので理想的である．Mainil-Varlet P et al ら (18) が a static bioreactor system という方法を用いて足場材料を必要としない組織工学的軟骨組織の作製に成功した．また Nagai ら (19) は巡回培養法を考案して少ない細胞数の軟骨細胞から足場材料を必要としない組織工学的軟骨組織の作製を報告した．

5) 温度応答性培養シートによる細胞シートの回収

Okano ら (20, 21) が考案した温度応答性培養皿は，ナノレベルの薄さの温度応答性ポリマー (polyisopropylacrylamide : PIPAAm) が培養皿の表面に固定されている．このため器材表面は 32°C を境に可逆的に疎水性 (細胞接着表面) から親水性 (細胞遊離表面) に変化して水分を吸収して膨らみ，培養細胞は器材表面から別離する．そのため細胞に障害を与えるトリプシン等の酵素処理を必要としない．温度を下げることで細胞外マトリックスを損傷することな

く、無傷な状態で培養細胞をシート上に回収することが可能となった(図2)。

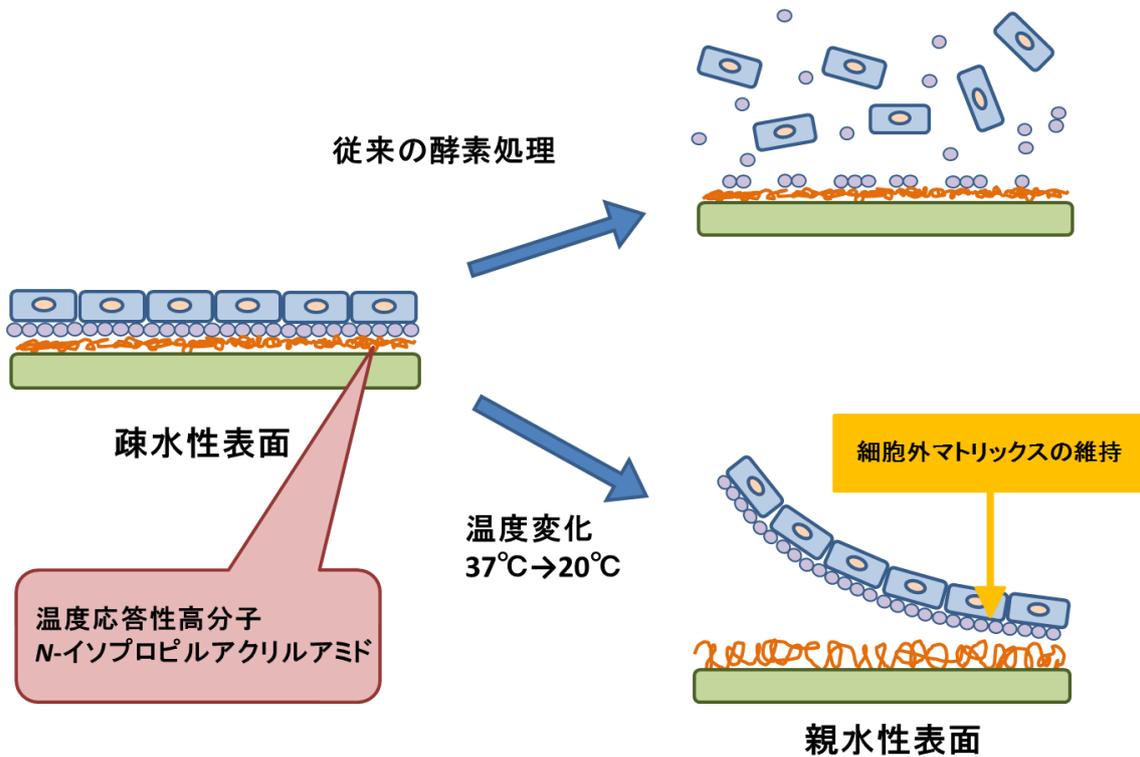


図2. 温度応答性培養皿を用いた細胞シートの作製

蛋白質分解酵素を用いた細胞回収法では細胞外基質が分解され、細胞は個々に解離した状態で回収される。温度応答性培養皿上で培養した細胞は、温度下降操作によって培養皿表面の温度応答性高分子ポリマーが親水化し、細胞がシート状に脱着する。

このように回収した細胞シートは細胞外マトリックスを保持しているため優れた組織接着性をもつ。そのため移植時の縫合が一切不要となる。細胞シートは積層化することも可能であり、具体的には単層細胞シートの上に重合ビニリデン・ジフルオリド (PVDF) 膜をかぶせ別の単層細胞シートを被せることで作製できる。こうして前述したような細胞増殖のための人工的に構築した足場材料を用いることなく、3次元構造をもった組織再生が可能になった。細胞シートは

軟骨組織以外にも、角膜上皮 (22)、皮膚組織 (23)、口腔粘膜 (24)、膀胱上皮 (25)、心筋細胞 (26, 27) および歯根膜組織 (28) などで適用されている。これらの細胞シートはヒトへの臨床応用に向けた研究が進んでいる (29-32)。

6) 共同研究者による軟骨細胞シート開発と先行研究

佐藤ら共同研究者の開発する軟骨細胞シートは変形性膝関節症の治療を目的としている。移植による関節軟骨の修復と再生に関する基礎的研究を重ねた結果、関節軟骨の修復、再生におけるレシピエント側とドナー側の細胞の相互作用について注目してきた。その後、組織工学的軟骨が軟骨表層から浅層部分に必要な最小限存在すれば、レシピエント側の細胞によって軟骨の再生が主導的に修復促進することが報告した (33-35)。軟骨細胞シートは、通常の培養皿で得られる培養軟骨細胞と異なり、他の組織工学的軟骨と同等の組織修復再生効果を発揮する (36)。また軟骨細胞シートは全層欠損と部分欠損の両方の治療に効果を認めている (36, 37)。つまり細胞シートは優れた軟骨損傷面への接着性をもち、軟骨損傷部位を関節液のカタボリックファクターから保護する優れたバリア機能を有する。さらに軟骨の細胞外マトリックスが関節液へ流出するのを防ぐ。さらに細胞シート由来細胞から持続的に成長因子が供給されることが軟骨の修復と再生に寄与していると考えられる。細胞シートは積層化することによって3次元構造が強化される (図3)。

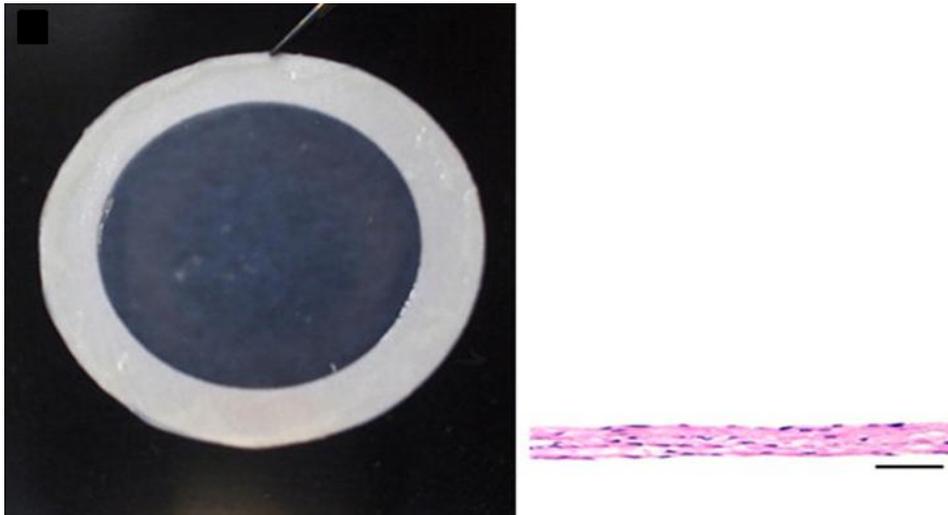


図3. 軟骨細胞シートと積層化されたシートの HE 染色像
写真では5層構造の積層化細胞シートを示す。海老原 2012 より引用 (40)。

2012年にヒトを対象にした臨床研究において、同じ軟骨細胞数でも単層シートと比べて、積層化したシートでは transforming growth factor ($TGF\beta$) , prostaglandinE2 (PGE2) および meranoma inhibitor (MIA) などの液性因子の分泌量が有意に増加していることが報告された (38)。膝関節において滑膜細胞は関節腔を裏打ちして関節液を分泌して軟骨細胞を栄養している。軟骨再生分野では滑膜細胞から作ったグラフト移植による軟骨欠損の治療効果は以前から報告されている。滑膜細胞は軟骨組織の損傷修復に重要な役割を果たす (17)。しかし、滑膜細胞由来のグラフトを用いた、軟骨損傷の治療では、再生した軟骨組織の表層により多くの線維組織が生じやすいことが報告されている (39)。共同研究者らは軟骨細胞と滑膜細胞を共培養あるいは併用シートを作製して関節内環境を疑似することで、細胞シートの作製、回収率の向上や移植後の軟骨再生により有効な効果を期待している。Kokubo ら (40) は滑膜細胞と軟骨細胞

を共培養することが軟骨細胞シートの作成期間を短縮させ、かつ確実に軟骨細胞シートを回収することを報告した。また軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用w移植はそれぞれの単独移植に比べて、骨軟骨欠損の修復能をより高めることが明らかにされた (41)。

申請者はこの優れた軟骨再生効果を持つ軟骨細胞と滑膜細胞の併用シートがどのくらいの期間、膝関節内の損傷部位に存在しているのか興味を持った。成熟した軟骨細胞、滑膜細胞からなる細胞シートは移植と同時に減り続けて短期に消滅してしまうのではないかと仮説をたてた。また実際の関節内の環境に似せた滑膜細胞と軟骨細胞シートの併用移植は、はそれぞれの単独細胞シート移植より長期に生存して、細胞シートがもたらす自己軟骨細胞の損傷修復再生効果を強めるという仮説をたてた。これらの仮説を検証するためにバイオイメーjingの手法を用いることを考えた。

7) 移植細胞追跡法について

移植細胞の追跡は実験動物を期間ごとに安楽死させ標本作製後、移植細胞に特異的な標識を免疫染色で同定するのが古典的な方法であったが、これでは生きた同一の個体での移植細胞を追跡は困難であった。近年では実験動物が生きたままの移植細胞追跡が可能となる方法としてバイオイメーjingの手法が考案されるようになった。核磁気共鳴画像装置を用いた追跡法は鉄粒子を移植細胞にとりこませて追跡する (42-44)。T2 強調画像で低信号領域として確認で

きる。この方法は大型動物にも適用でき、解像度に優れるが、他の組織の T2 強調画像低信号領域を示す領域と判別が難しい場合がある。また鉄粒子自体に細胞障害性がある。陽電子断層撮影装置および単一光子放射断層撮影装置をする追跡法では ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{18}F , ^{124}I 等の放射活性物質を移植細胞にとりこませ、陽電子断層撮影および単一光子放射断層撮影を行う (45-47)。大型動物に適用でき、解像度や検出度に優れるが放射活性暴露による遺伝子改変の可能性がある。バイオルミネッセンスイメージング (BLI 法) は生体発光する動物の発光遺伝子を同定し標的細胞に導入する。ホタルのルシフェラーゼ遺伝子やクラゲの GFP 遺伝子が有名であり、厳密には前者はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光、後者は蛍光である。移植細胞が小動物等の浅層部に存在する場合には解像度がよいが、深部での検出は難しくなることがある。ルシフェラーゼ発光は細胞数に比例する特性を持ち、細胞数の半定量にも用いられる。ただし、細胞にとって直接遺伝子導入する処置は侵襲的である。このようなバイオルミネッセンスの担体遺伝子は生体内の組織工学的に構築されたグラフトのイメージングに頻繁に使用されてきている。これらのなかでもホタルの発光遺伝子 (*Luc*) が最もよく用いられる。ATP の存在下でルシフェラーゼと基質ルシフェリンの間で反応が生じて発光する。それらは高感度 CCD カメラを搭載した In vivo Imaging system (IVIS) を用いて捕捉、画像化することでバイオルミネッセンスイメージングとして追跡することができる。

近年では生体発光の特殊なマーカー遺伝子を発現するトランスジェニック動物が開発されている(48-50)。BLIではそれらのトランスジェニック動物由来の細胞を用いて他の動物に移植したあとの移植細胞の生存期間の測定や移植細胞の追跡をすることが可能である。この方法は非侵襲的で、実験動物を生かしたまま長期の移植細胞の追跡が可能である。そのため、しばしば臓器や組織の再生研究に使用されてきた(51-55)。申請者は *luc* 遺伝子が導入されたトランスジェニックラットをセルソースとした軟骨細胞シートを作製したのち、同種移植後の BLI による細胞追跡によって細胞シートの移植後生存期間を測定することを試みた。

研究報告

I. 目的

前述した先行研究から本研究の仮説は以下とした。

1. 軟骨細胞，滑膜細胞からなる細胞シートは移植部位にとどまりレシピエント自身の軟骨再生を促しながら減り続けて短期に消失する。
2. 関節内環境に似せた滑膜細胞シートと軟骨細胞シートの併用移植は，はそれぞれの単独細胞シートより長期に生存して自己軟骨細胞の組織修復効果を高める。

本研究の主目的は以下の3点である。

1. ラット膝関節同種移植後の細胞シートの生存期間を BLI を用いて確認する。
2. 移植細胞生存期間について軟骨細胞シート単独移植，軟骨シート滑膜シート併用移植，滑膜細胞シート単独移植を比較する。
3. 細胞シート移植後の移植細胞の生体内遊走の有無を BLI から確認する。

副目的は BLI の特性と，日本白色家兎の膝軟骨全層欠損修復に軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用移植が有効であった過去の先行研究をふまえて以下の2点とした。

1. 細胞シート移植後の細胞数推移を発光強度の変化から考察する。

2. ラットにおける細胞シート移植後の軟骨全層欠損における修復効果を組織学的に確認する.

II. 対象と方法

すべての動物実験は自治医科大学実験動物委員会および関連する委員会のガイドライン勧告に従って行なった。

1) ルシフェラーゼトランスジェニックラット

Kobayashi らが (56) 開発したルシフェラーゼ遺伝子を発現するトランスジェニックラット (Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats) を用いた。このトランスジェニックラットはプロモーターが ROSA26 遺伝子であり (図 4),



図 4. Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats のプロモーター部分のシェーマ
袴田, 2006 の Fig. 1A より引用 (36). ROSA26 遺伝子をプロモーターにもつため, 全身にルシフェラーゼ発現する。

安定して全身にルシフェラーゼを発現する。このトランスジェニックラットは pBROAD2 プラスミド (InvivoGen, CA, USA) を Nco と XbaI で処理した ROSA26 プロモーターを抽出した後, ホタルルシフェラーゼベクター (Promega, Wisconsin, USA) に組み込んでルイスラットの受精卵に遺伝子を導入することによって作製された。レシピエントラットの染色体へのプラスミド導入部位は明らかにされていない。ルシフェラーゼ酵素の発現量も臓器細胞毎に異なるた

め、その発光強度には臓器特異性がある (図 5).

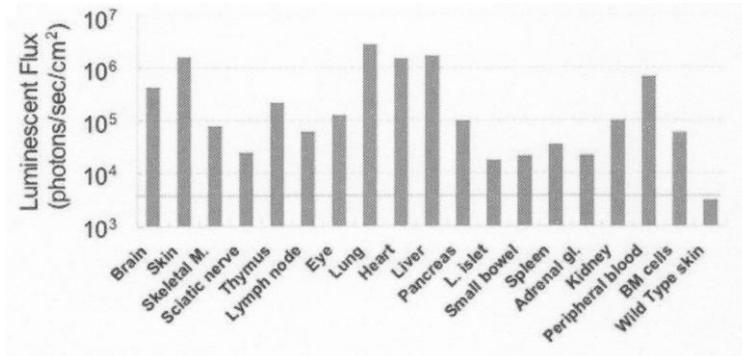


図 5. Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats の組織別ルシフェラーゼ遺伝子発現量
ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は組織特異性がある. 袴田, 2006 の Fig. 1C より引用 (36).

ルシフェリンを体内に投与するとルシフェラーゼ酸素による異化が生じて光が放出される. その発光強度は ATP や Mg の存在によっても影響される. 同一の環境では発光強度はルシフェリンの投与量, 細胞数に比例するため, ルシフェラーゼを発現する細胞の半定量的な計測も可能となる. トランスジェニックラットから採取したルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞ドナーを用いて, 非トランスジェニックラットレシピエントへの同種移植を行うことで目的の細胞追跡が可能となる.

2) ルシフェラーゼトランスジェニックラットの軟骨組織, 滑膜組織の採取

生後 16 週のルシフェラーゼ発現トランスジェニックルイスラット 8 匹(オス)を対象とした. 麻酔は 2%イソフルランで行った. 両側下肢内側に皮切をおき, 皮膚を剥離した後, 側副靭帯, 前後十字靭帯を切断して膝関節内を露出させた.

その後、滑膜組織と関節軟骨を摘出した。採取組織は酵素処理後、組織から細胞分離を行った。その後に温度応答性培養皿を用いて滑膜細胞、温度応答性インサートには軟骨細胞を播種した。インサートを介して共培養を行った。

3) 温度応答性培養皿を用いた細胞シートの作製

ルシフェラーゼを発現する軟骨組織と滑膜組織は0.016%タイプIコラーゲナーゼ (Worthington, NJ, USA) を加えて調整したDMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12) を使用してスターラを用いて攪拌し、37°C、5%CO₂の条件下でタンパク質分解を4時間行った。その後メッシュサイズが100µmのセルストレーナー (BD Falcon™, NJ, USA) で剥離し、遠心分離後に目的のルシフェラーゼ陽性の軟骨細胞と滑膜細胞を回収した。軟骨細胞はDMEM/F12に牛胎児血清(GOBCO, NY, USA)と抗mycotic抗体 (GOBCO) をそれぞれ20%、1%になるよう調整した。そこにアスコルビン酸 (和光純薬工業, 大阪, 日本) 50µg/mlを加えて細胞培養を行った。滑膜細胞は牛胎児血清と抗mycotic抗体をそれぞれ10%と1%に調整したDMEM/F12で細胞培養を行った。全ての細胞は37°Cで5%二酸化炭素/95%空気下で培養した。軟骨細胞は温度応答性インサート (5.0 cm² CellSeed, 東京, 日本) , 滑膜細胞は温度応答性培養皿に10,000cells/cm²となるように均一に播種して、20%牛胎児血清添加DMEM/F12でさらに約14日間共培養を行った。その後に細胞密度を確認して、温度応答性培養皿を培養機から取り出し、25°Cで30分間の低温処置を行っ

たのち回収した。積層化細胞シートを作製する場合は、この細胞シートの上に重合ビニリデン・ジフルオリド (PVDF) 膜で覆うことで作成する。実際には端から巻き上げて回収したのち別の細胞シートの上に重ね合わせる。この操作を3回繰り返すと3層の積層化細胞シートが作製される。本研究では単層培養した軟骨細胞シートと滑膜細胞シートを作製し、細胞数をおおよそ揃えるため細胞シートを2枚ずつ合わせて2枚の軟骨細胞シート、1枚ずつの軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、及び2枚の滑膜細胞シートのコンビネーションをそれぞれ作製した。作製した細胞シートはルシフェリンを添加した後に、IVISを使用して細胞シートが発光することを確認した (図6)。

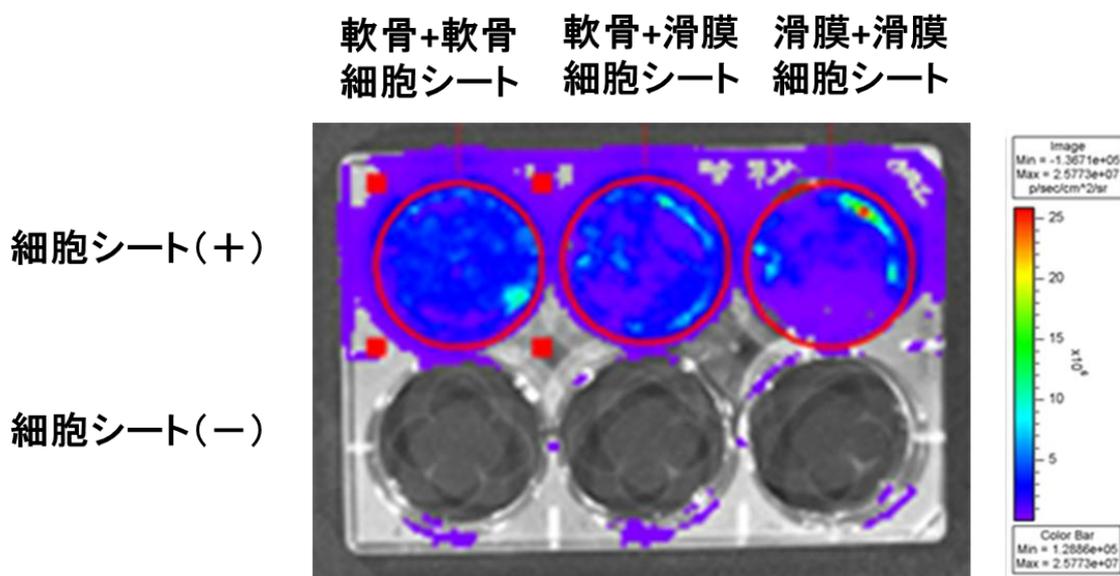


図6. 細胞シートを置いたシャーレ上にルシフェリンを添加した後の IVIS の画像
左から軟骨細胞シート, 軟骨滑膜併用細胞シート, 滑膜細胞シートからの発光が青くイメージ化されている。

4) ラット膝関節全層欠損モデルの作製と細胞シート同種膝関節移植方法、及び群の作製

16 週齢の野生型ルイスラット 36 匹（オス）をレシピエントとし、2%イソフルラン麻酔下で右膝に正中傍膝蓋骨切開を行い、膝蓋骨を脇に処理した。展開された膝関節の右膝大腿骨膝蓋面を十分に露出した後に、骨髄から間葉系幹細胞が動員されても自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を 18G 針を用いて作製（ ϕ ; 3 mm）した。そのうえで同部位に 16 週齢のルシフェラーゼトランスジェニックラット（オス）由来の軟骨組織および滑膜組織から作製したルシフェラーゼ発現軟骨細胞シートと滑膜細胞シートを同種移植した。軟骨細胞と滑膜細胞単独シートと両細胞併用シートの生存期間に対する相乗効果を見るために、ルシフェラーゼ発現軟骨細胞シート（AC）とルシフェラーゼ発現滑膜細胞（SY）シートの 2 種類を作製した。それらを組み合わせて軟骨細胞シート単独群（AC-AC 群）と滑膜細胞（SY-SY 群）シート単独群，両シート併用群（AC-SY 群）の 3 群を作製した（各 $n = 12$ ）。各種細胞シートの膝関節内滞在期間の影響について比較検討を試みた（図 7）。

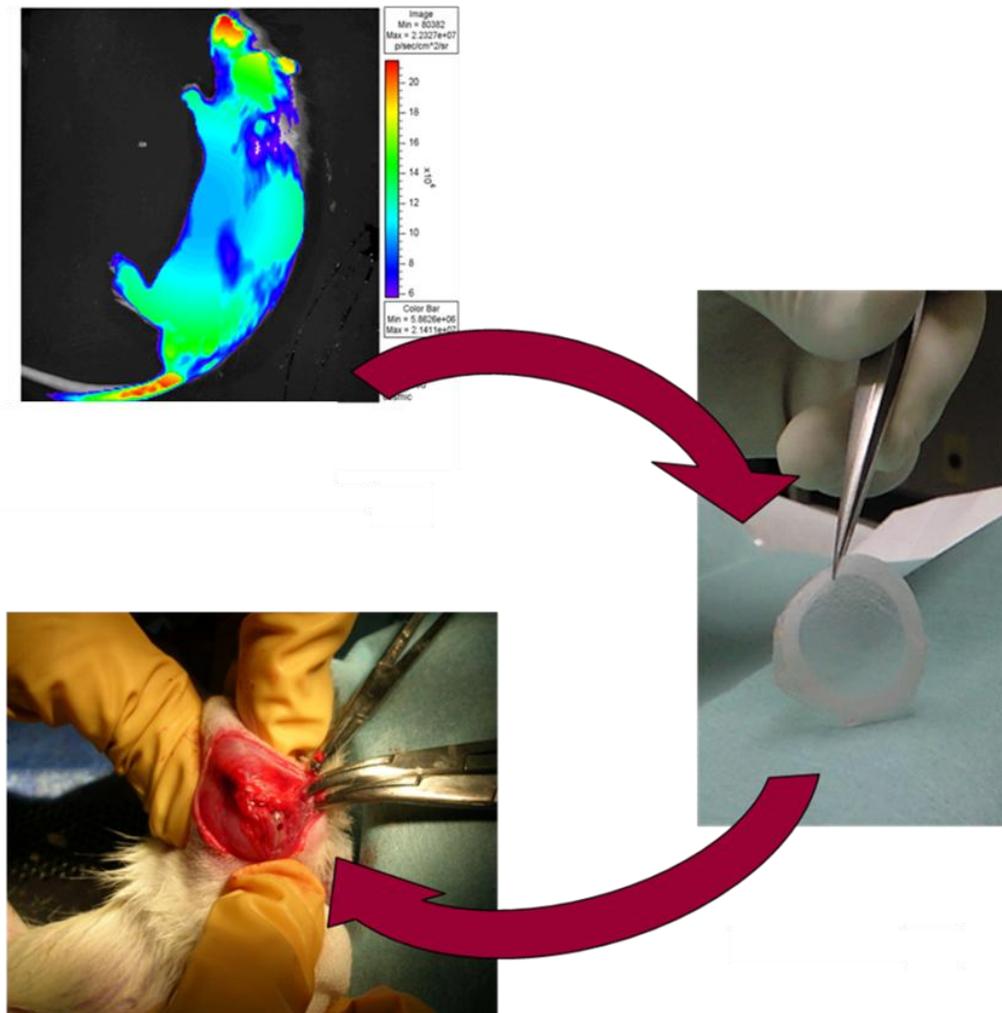


図7. ルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞シートの移植手順
それぞれ、ルシフェラーゼトランスジェニックラットのイメージング画像（左上）、作製したルシフェラーゼを発現する細胞シート（右）、野生型リスラットに作製した骨軟骨欠損（左下）を示す。

5) In Vivo の BLI と発光強度の測定

D-ルシフェリン（Biosynth AG, Staad, Switzerland）150 mg/kg を肩甲骨下より皮下投与後、CCD カメラを搭載した IVIS（Xenogen Corp; Alameda, CA）でイメージングを確認した。イメージングの際にはもっとも強いルシフェラーゼ

発光強度を測定することとした。次いで、ルシフェリンの投与方法を検討した。

ルシフェラーゼ陽性軟骨細胞シート移植後1ヶ月目のルイスラット1匹を試験的に用いた。3種類の方法でルシフェリンの投与方法を比較検討した。飽和濃度に近い50 mg/mlの濃度のルシフェリン溶液を蒸留水で作製した。イソフルラン麻酔下に投与した。ルシフェリンの投与経路と投与量は、陰茎静脈から静脈注射（IV）60 mg/kg，肩甲骨付近から皮下注射投与（SC）150 mg/kg，および移植膝間隙から膝関節内注射（IA）30 mg/kgとした。ルシフェリン投与後のラットをIVISの高感度CCDカメラを搭載した小動物用チャンバーに静置した。そのうえで1分毎に放出される光子量から発光強度を計測した。発光強度の経時的変化を図8に示す。ルシフェリン投与方法に従って異なる発光強度曲線となることが判明した。

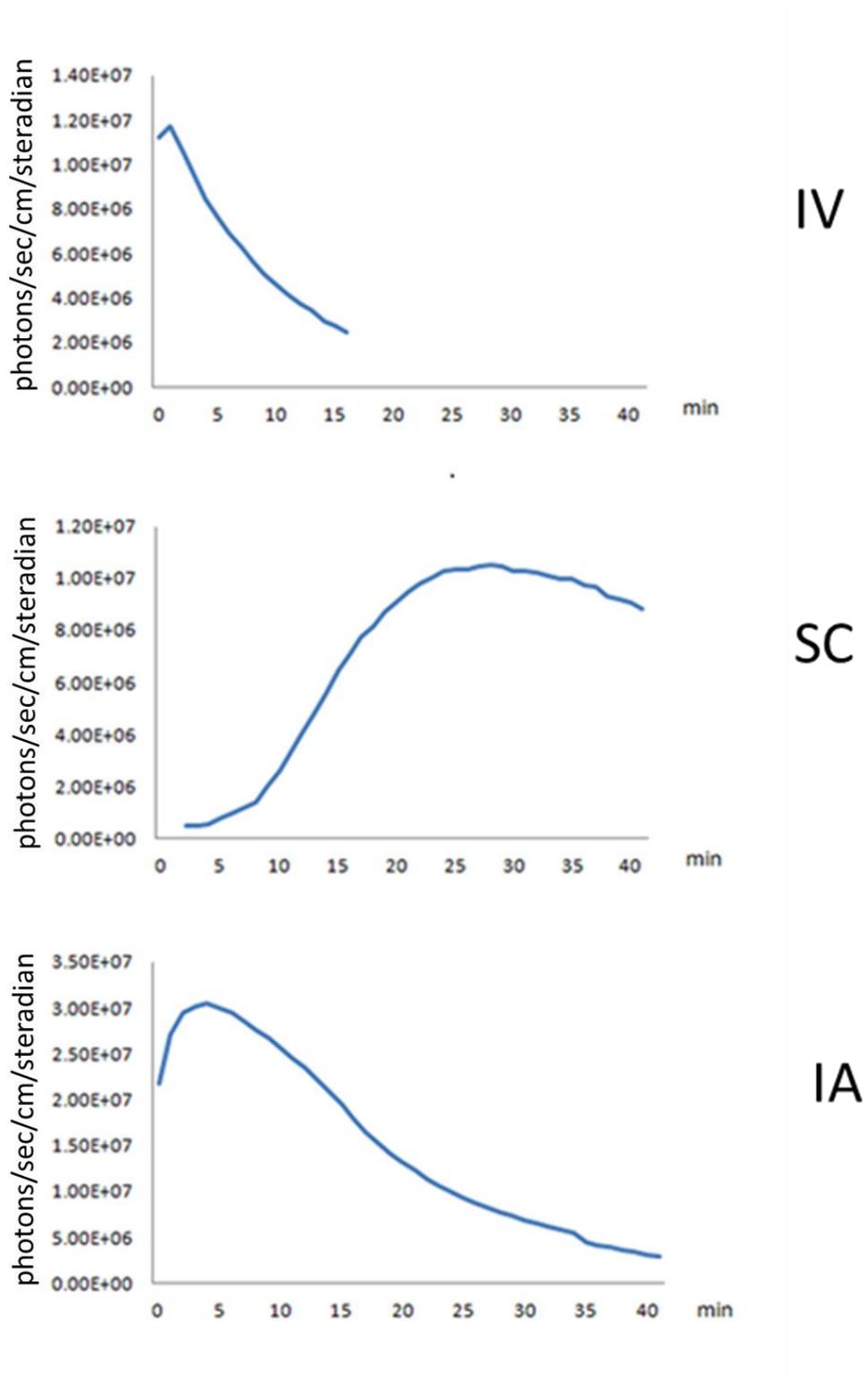


図 8. IVIS によって測定した異なる投与方法の発光強度の経時的変化.
 上から順に静脈注射 (IV) 投与方法, 皮下注射 (SC) 投与方法, 関節内注射 (IA) を示す.

IV では発光強度の最高値は1~2分で達し、その後急速に低下した。そのため発光強度の計測を開始する前にピーク値の計測を逃すことがあった。また陰茎静脈からの投与は技術を必要とした。一度失敗すると大きな皮下出血をきたすため再投与は困難となった。SCでは緩やかに発光強度は上昇した。発光強度は20~30分後に最高値に達して緩やかに低下した。薬液投与は難しい手技を必要としなかった。ただし、同じ発光強度を得るのにIV投与方法に比べて2倍以上のルシフェリンが必要であり、3種の投与方法のなかで最も多くのルシフェリンを必要とした。IAでは発光強度は4~5分で最高値に達した。手技は静脈注射に比較して簡易であったが投与に失敗することがあった。この方法は血流を介せず直接ルシフェリンが移植細胞に作用するために最少量のルシフェリンによる最大の発光強度を確認することができた。しかしながら、薬液の投与量は0.2 ml程度であったが、ラットの膝関節包は過膨張した。このことは膝関節圧の上昇の原因となり、移植細胞や骨軟骨欠損部の再生に何らかの影響を与えることが懸念された。以上の予備実験から、皮下注射(SC)が一番簡易であり、手技によるバイアスが生じる危険性が小さいと判断した。またIAと比べて移植部位への影響は少ないと判断し、ルシフェリンの投与は皮下注射で行った。

6) 組織学的評価

Itoら (27) は, 日本白色家兎を用いて軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用による骨軟骨欠損部の有効な軟骨再生効果について報告している. 同様の実験をルイスラットにおいても追試した. 前述した右膝に骨軟骨欠損を作製し細胞シートを同種移植した 36 匹のレシピエントルイスラットの中から 24 匹を用いた. AC-AC 群 ($n = 8$), AC-SY 群 ($n = 8$), SY-SY 群 ($n = 8$) から, 移植後 2, 4, 6, 8 週に各群 2 匹ずつ CO_2 吸入にて安楽死させた. それらの移植膝の骨軟骨欠損部の標本作製した. 組織検体は 4%パラホルムアルデヒドで 1 週間固定したのち, 3 週間 10%EDTA で脱灰した. パラフィン包埋したのち骨軟骨欠損部の中央部分で 5 μm 厚の薄切り標本作製した. 各切片は再生軟骨の評価のためサフラニン 0 染色を施した後に光学顕微鏡で観察した. この染色法は硝子軟骨細胞外基質の構成要素であるグルコサミノグリカンを含む酸性粘液多糖に反応した部分が赤く染色され, 軟骨基質が線維化すると染色されない. 再生の評価は International Cartilage Research Society (ICRS) histological grading system を用いて点数化による評価を行った (57-59, 表 1). この方法は国際軟骨再生会議が提唱している. 骨軟骨欠損部の再生所見を硝子軟骨組織の有無, 組織統合性, 表層組織の性状, 軟骨下骨といった組織学的特徴や変性の程度を合計 11 点から 45 点で点数化し, 点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す. 評価は 2 名の観察者で行った. 点数は平均値をグラフ化した.

T

再生組織の形態

- 4: 大部分が硝子軟骨
- 3: 大部分が線維軟骨
- 2: 軟骨組織ではない
- 1: 軟骨組織以外

軟骨基質染色

- 1: 無染
- 2: わずかに染まる
- 3: 中等度染まる
- 4: 強く染まる

細胞形態の組織統合性

- 1: 崩壊像
- 2: 嚢胞や途絶
- 3: 軟骨細胞の構成ではない
- 4: 柱状軟骨細胞を認める
- 5: 正常またはそれに近い軟骨細胞

軟骨細胞のクラスター形成

- 1: 細胞のクラスター形成が \geq 25-100%
- 2: 25%以下のクラスター形成
- 3: クラスター形成を認めない

Tidemark の形成

- 1: 石灰化軟骨層の形成が \leq 25%以下
- 2: 石灰化軟骨層の形成が \geq 25%-49%
- 3: 石灰化軟骨層の形成が \geq 50%-75%
- 4: 石灰化軟骨層の形成が \geq 76%-90%
- 5: 完全な石灰化軟骨層の形成

軟骨下骨の形成

- 1: 形成されない
- 2: わずかに形成されている
- 3: しっかり形成されている

表層の構造

- 1: 強度の線維化または途絶
- 2: 中等度の線維化、非整合性
- 3: 低度の線維化、非整合性
- 4: 正常

組織学的欠損部充填率

- 1: 25%以下
- 2: 26-50%
- 3: 51-75%
- 4: 76-90%
- 5: 91-110%

移植部側面の性状

- 1: 結合していない
- 2: 片側か両側の一部
- 3: 両側の結合

基底部の統合性

- 1: 50%以下
- 2: 50-70%
- 3: 71-90%
- 4: 91-100%

炎症反応

- 1: 炎症所見を認めない
- 2: わずかに炎症反応を認める
- 5: 強い炎症反応を認める

計45点

表. 1 ICRS histological grading system

軟骨組織の再生所見について組織学的特徴や変性の程度を合計 11 点から 45 点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。

III. 結果

1) 移植細胞のバイオルミネッセンスイメージング (BLI)

BLI から移植細胞由来と推察する細胞の 21 ヶ月以上生存を全てのラットにおいて確認した。イメージングでは発光は移植膝に限局して他所での発光は認めなかった。また明らかな運動機能異常も観察されなかった (図 9)。

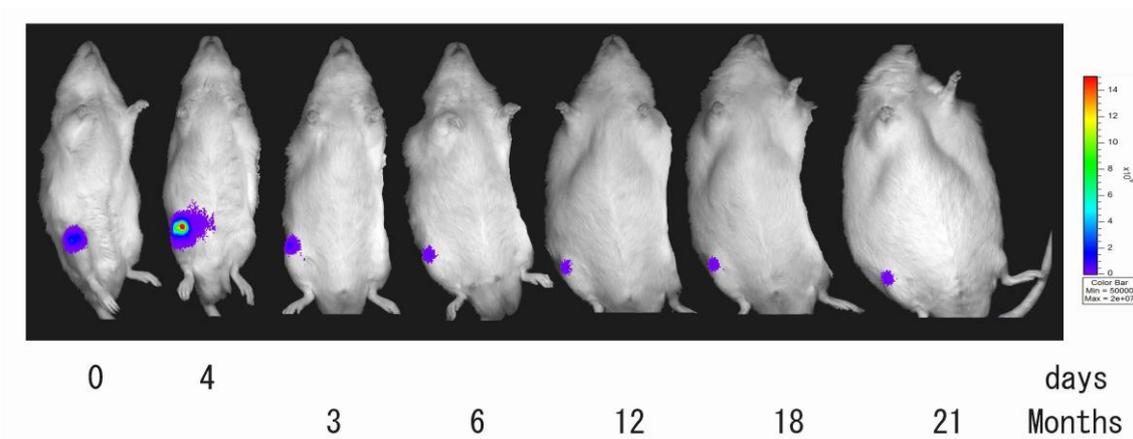


図 9. 移植後の IVIS 画像.

図は AC-AC 群のうちの 1 匹のイメージングを経時的にしめす。ルシフェラーゼの発光を右膝部に限局して認める。

2) 発光強度の推移

発光強度の推移は各群とも移植後 3~4 日後にピーク値に達した。移植 0 日の発光強度に比べて AC-AC 群で 16 倍, AC-SY 群で 5 倍, SY-SY 群で 7 倍に達した。発光強度は暫時減少して 3~4 週間後には 3 群とも移植 0 日の発光強度の 1/10 程度の値になって安定した。これは言い換えると各群においてピーク時の発光強度から 1/160, 1/50, 1/70 以下に減少したことになる。しかし発光は微弱

ながらも消失することはなく 21 ヶ月以上計測された (図 10 上図). 発光強度の群間差は移植後 1 か月までは 3 群間にばらつきを認める傾向があったが, それ以降の長期の経過では各群とも同程度の変化率で推移した (図 10 下図).

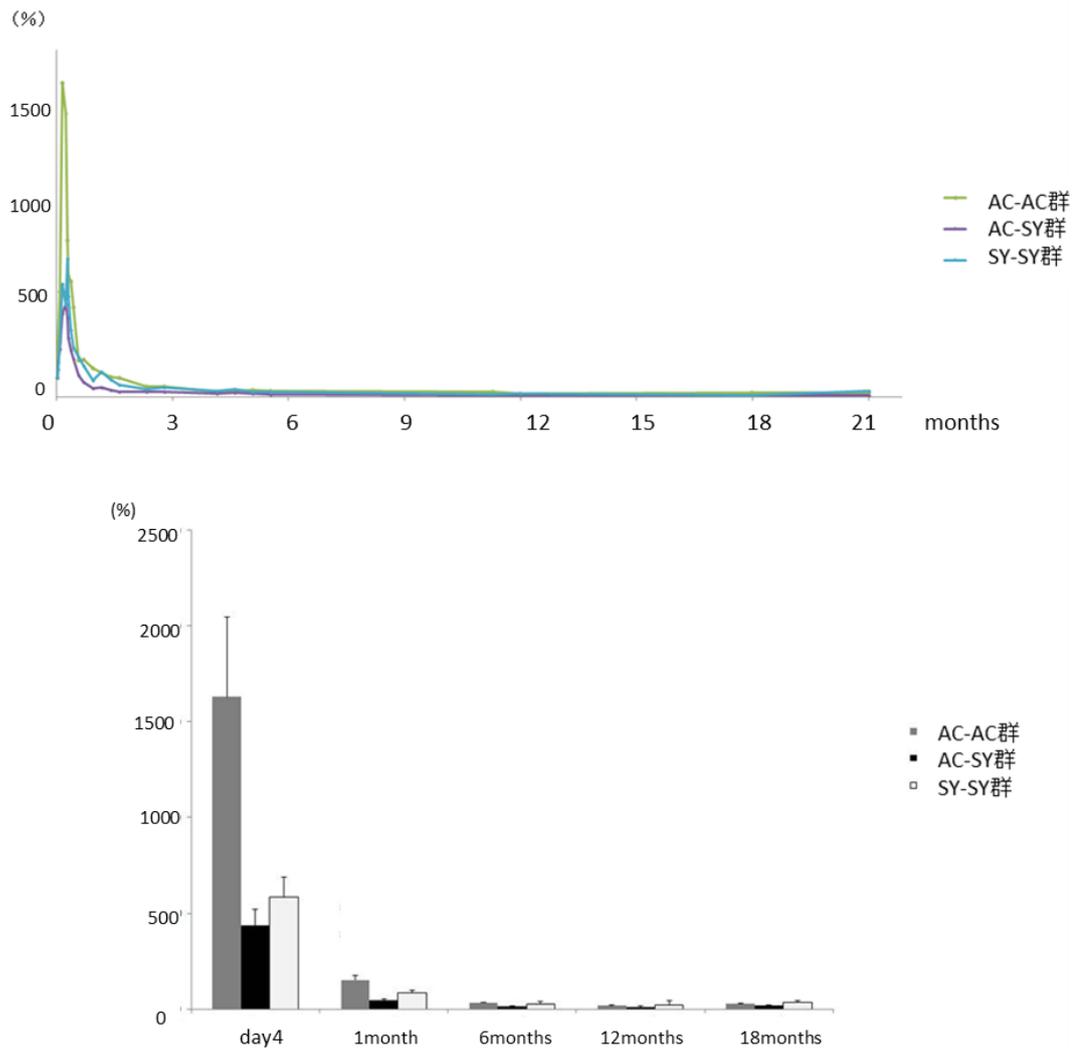


図 10. 長期にわたる発光強度変化の推移
 移植 0 日 (day0) の発光強度比を 100 とした場合の発光強度の推移を示す. 上図: 発光強度曲線の推移, 各群とも移植後 3-4 日のピーク値に達した後に低値で安定した発光強度を示すようになった. しかし 21 か月間発光は途切れることはなかった. 下図: ある地点の発光強度比の各群の値を抽出してグラフ化した. 各群とも半年以降は初期の 1/10 以下に安定した

3) 組織学的評価

組織所見では3群ともに軟骨細胞の再生所見を認めた。6週目まではAC-AC群, SY-SY群で軟骨基質の赤染がAC-SY群よりも著明であるが, 8週目にはAC-SY群の赤染が長く続く印象をうけた。SY-SY群では移植後8週の顕鏡所見において線維化の所見を強く認めた(図11)。ICRS grading systemの点数はAC-AC群での値が他の群よりも高かった。8週目の時点でAC-AC群とSY-SY群は値の低下を認めたが, AC-SY群のスコアは6週目から横ばいを示した(図12)。

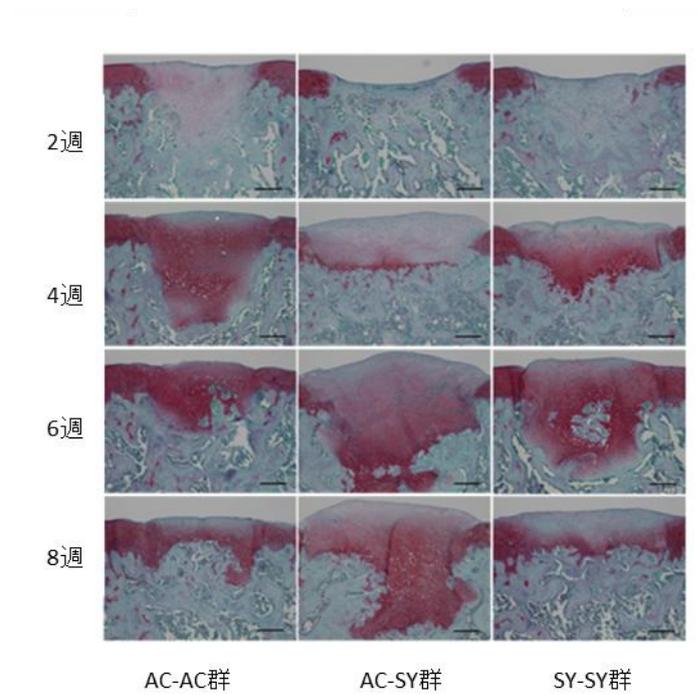


図11. 軟骨組織修復の組織学的評価. サフラニンO染色した標本の光学顕微鏡画像. 軟骨細胞が産生するグリコサミノグリカンを含む産生粘液多糖が赤く染色されている. スケールバーは500 μ mを表す

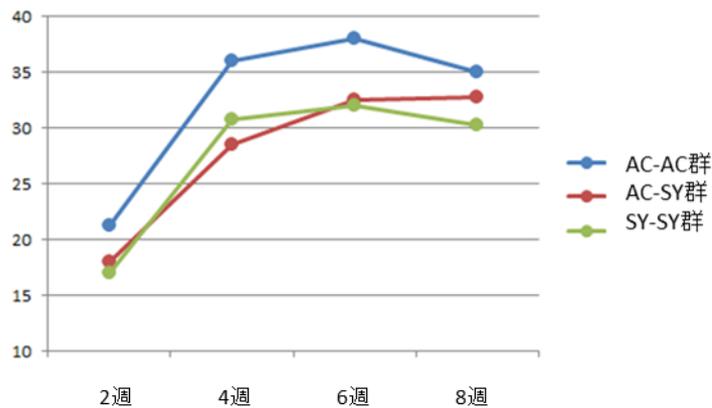


図 12. ICRS grading system による点数の変化
AC-SY 群の値が 8 週目の地点でも低下を認めていない。

IV. 考察

申請者は今回の研究で予想以上の細胞シートの長期生存を BLI を用いて確認することに成功した。また移植した軟骨細胞シートは 21 カ月以上膝関節内で生存することを確認した。さらに BLI 画像から移植した細胞が他所に移動しないで膝に留まることが確認できた。これは細胞シートの安全性を証明する結果であったと考えられる。細胞シートは軟骨組織の修復および再生の誘導因子として働いてシートを移植後に移植部周囲の宿主細胞による主導的な修復が行なわれると考えている。その後、細胞シート由来の細胞自身は移植後に消失すると考えていた。成熟した細胞からなる散骨細胞シートの細胞はそのままの形で生存することは考えにくく、例えば脱分化した形で存在する可能性も考えられる。軟骨組織におけるニッチ環境についていまだ不明の部分が多いためこれらの機序解明は今後の課題である。

次に申請者は生存期間に関する軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用効果について調べた。共同研究者らは細胞シートにおける軟骨細胞と滑膜細胞の併用は、軟骨下骨の再生や再生軟骨細胞の構築において軟骨細胞単独シートより優れた効果があることを実証している (41, 60)。これらの先行研究を参考として生存期間においても軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用が単独細胞シート移植よりも長い細胞の生存期間が記録されると仮説をたてた。しかしながら3群とも21か月以上の長期生存することを確認したため、生存期間に関して軟骨細胞シートと滑膜細胞を併用する効果は今回の研究では明らかではなかった。

申請者はBLIで計測される発光強度の変化を記録したが、3群とも移植時より3~4日目に最高の発光強度を記録し、その後、AC-AC群、AC-SY群、SY-SY群の発光強度はそれぞれピーク時の1/160, 1/50, 1/70まで低下して経過した。この現象について考察する。In vitroでは同量のルシフェリンを同一種のルシフェラーゼ導入細胞に投与するとその発光強度は細胞数にほぼ比例することが一般的に知られている。即ち半定量的にBLIの発光強度を利用して細胞数を推測することが可能である。今回の申請者のIn vivoの実験では術後数日の移植直後の細胞を取り巻く環境が一定ではなく厳密な細胞数の比較はできない。移植部周囲の環境は移植後に大きな変化が生じるとともに、移植術を施行する時には移植細胞には大きなストレスがかかる。そのため移植された細胞の周術期の生体活性の変化の程度については不明である。つまり今回の発光強度曲線の変化の1つの説明としては、移植時はストレスによって移植細胞の生体活性が低いため

計測される発光強度は低くなり、経過とともに移植細胞の生体活性は回復して発光強度も高値をしめすと考えられる。その後、移植時より細胞シートの細胞は死滅していくため経過とともに移植時に比べてごくわずかな細胞シートの細胞が移植部位に生存したのではないかと考える。今回の実験でこの発光強度は微弱ではあるが21カ月以上途切れることなく続くことが証明された。これ以降はおそらく寿命によるレシピエントラットの死亡が相次いだため計測を中止しており、より長期の変化は不明であるが、細胞シートは移植後生涯にわたって移植部位にわずかにせよ生存しうることが示唆された。実際の移植細胞の同定、およびその形態の確認は今後の研究課題となる。軟骨細胞シートは再生した軟骨組織が時間の経過によって繊維軟骨に置き換わることなく、完全に硝子軟骨の状態が保たれる状態を目指して開発されている。今回の組織所見ではSY-SY群の組織像で線維軟骨の再生所見が著明であった。このことは他種の動物実験の成果と一致した。

V. 軟骨細胞シートの今後の展望

細胞シートによる膝軟骨の治療戦略は、海外で使われている軟骨チップ等の固い軟骨片を使用する場合に局所に固定するための縫合やフィリン糊による固着などの煩雑な手技を必要としない。このためグラフト脱転による関節内遊離体の問題も大きな有害事象にはなりにくい。ヒト軟骨細胞は増殖活性の個人差が大きく、特に市販されているヒト軟骨細胞は脱分化が進んでいるために細胞シートの作製は難しい。このように現在ではヒト軟骨細胞での積層化細胞シートの作製は難しい。共培養法を用いたヒト軟骨細胞シートが普及して臨床の現場で待機することなく使用するためには、軟骨細胞シートのさらなる安全性とその機能の検証を動物実験や臨床研究で重ねることが必要がある。また新鮮なヒト軟骨細胞のセルソースの確保と同種軟骨細胞シートの保存法を確立させることも今後の課題である。申請者は細胞シートによる変形性膝関節症の再生医療開発は低侵襲で有効性が高く、かつ普及が期待できるレディメイドの治療戦略であり、実用化に一番近い方法と考えている。

VI. 結論

申請者は、細胞シートのラット膝同種移植における長期生存を BLI を用いて実証した。軟骨細胞シート、滑膜細胞シートおよび両細胞併用シートはいずれも長期に生存したため軟骨細胞と滑膜細胞の併用移植効果による生存期間の効果は不明であった。移植細胞は移植した膝部に留まって長期に生存した。このため我々は細胞シート移植の長期の安全性を確認した。

VI. 謝辞

本研究の遂行と論文の執筆に当り，東海大学医学部外科学系整形外科学講座の佐藤正人教授をはじめとする皆さまには心から厚く御礼申し上げます。また，竹内護教授をはじめとした自治医科大学麻酔科学・集中治療医学講座の皆様にも日々の研究のご配慮を頂きましたことを，この場をお借りして真に深謝いたします。

本研究は再生医療実用化研究事業として厚生労働省の科学研究費の補助を受けて行なわれました。

本研究内容は，2013年11月にBiomaterials誌に受理されました。

VII. 引用文献

- (1) Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*;28:192-202, 1998
- (2) Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*;41:1331-42, 1998
- (3) Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*;54:465-80, 2005
- (4) Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res*;18:773-80, 2000
- (5) Schmidt H, Schulze KJ, Cyffka R. Results of treatment of cartilage damage by Pridie drilling of the knee joint. *Beitr Orthop Traumatol*;35:117-22, 1988
- (6) Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade*;28:26-32, 1999
- (7) Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S. The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. *Clin Orthop Relat Res*;43-50, 1985

(8) Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*;9:318-21, 1993

(9) Grande DA, Singh IJ, Pugh J. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec*;218:142-8, 1987

(10) 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*;331:889-95, 1994

(11) Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am*;85-A Suppl 2:17-24, 2003

(12) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*;284:143-7, 1999

(13) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*;76:579-92, 1994

- (14) 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*;10:199-206, 2002
- (15) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*;260:920-6, 1993
- (16) 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*;84,571-8, 2002
- (17) Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*;78:721-33, 1996
- (18) Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage*;9 Suppl A:S6-15, 2001
- (19) Nagai T, Furukawa KS, Sato M, Ushida T, Mochida J. Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rotational culture. *Tissue Eng Part A*;14:1183-93, 2008
- (20) Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*;16:297-303, 1995

- (21) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*;27:1243–51, 1993
- (22) Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea*.;22:S28-34, 2003
- (23) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng*;7:473-80, 2001
- (24) Ohki T, Yamato M, Murakami D, Takagi R, Yang J, Namiki H, Okano T, Takasaki K. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut*.;55:1704-10, 2006
- (25) Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, Toma H, Okano T. Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *BJU Int*.;93:1069-75, 2004
- (26) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng*.;7:141-51, 2001

(27) Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng.*;12:499-507, 2006

(28) Akizuki T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res.*;40:245-51, 2005

(29) 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.*;351:1187-96, 2004

(30) Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Murakami D, Kondo M, Sasaki R, Namiki H, Okano T, Yamamoto M. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology.*;143:582-8.e1-2, 2012

(31) Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. et al. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today.*;42:181-4, 2012

- (32)Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue engineering in periodontal tissue. *Anat Rec (Hoboken)*.;297:16-25, 2014
- (33)Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M, Hattori H, Yoshihara Y, Matsui T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*;75:177–84, 2005
- (34)Nagai T, Sato M, Furukawa KS, Kutsuna T, Ohta N, Ushida T, Mochida J. Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A*;14:1225–35, 2008
- (35) Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Kaneshiro N, Nagai T, Mitani G, Kutsuna T, Ohta N, Kokubo M, Kikuchi T, Sakai H, Ushida T, Kikuchi M, Mochida J. Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. *Med Biol Eng Comput*;46:735–43, 2008
- (36)Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, Mitani G, Sakai H, Mochida J. Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*;349:723–31, 2006

- (37)Mitani G, Sato M, Lee JI, Kaneshiro N, Ishihara M, Ota N, Ota N, Kokubo M, Sakai H, Kikuchi T, Mochida J. The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol*9:17, 2009
- (38)Hamahashi K, Sato M, Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J. Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. *J Tissue Eng Regen Med*. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/term.1610, 2012
- (39)Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derivfrom porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*;28:5462–70, 2007
- (40)Kokubo M, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Ebihara G, Okano T, Mochida J. Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with temperature-responsive culture inserts. *J Tissue Eng Regen Med*. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/term.1764, 2013
- (41)Ito S, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J.et al. Repair of articular

cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells.

Biomaterials;33:5278–86, 2012

(42)Li Z, Suzuki Y, Huang M, Cao F, Xie X, Connolly AJ, Yang PC, Wu JC.

Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells*;26:864-73, 2008

(43)Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA,

Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells.

Blood. ;102:867-72, 2003

(44)Anderson SA, Glod J, Arbab AS, Noel M, Ashari P, Fine HA, Frank JA.

Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood*;105:420-5, 2005

(45)Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ,

Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*;113:1005-1, 2006

(46)Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, Chung JK, Lee MC, Lee DS. Tissue

distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after

intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med*;47:1295-301, 2006

(47)Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, Segars WP, Chen HH, Fritzges D, Izbudak I, Young RG, Marcelino M, Pittenger MF, Solaiyappan M, Boston RC, Tsui BM, Wahl RL, Bulte JW. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*;112:1451-61, 2005

(48)Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*;407:313-9, 1997

(49)Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun*;329:288-95, 2005

(50)Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K, Nagashima H. Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res*;15:229-40, 2006

(51)Ono K, Takii T, Onozaki K, Ikawa M, Okabe M, Sawada M. Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochem Biophys Res Commun*;262:610-4, 1999

(52)Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells*;27:878–87, 2009

(53)Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*;286:779–85, 2001

(54)Sekine H, Shimizu T, Dobashi I, Matsuura K, Hagiwara N, Takahashi M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng Part A*;17:2973-80, 2011

(55)Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, Kobayashi E, Umezu M, Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun*.;4:1399, 2013

- (56) Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. “Firefly rats” as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation*;81:1179–84, 2006
- (57) Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage*;14:1214–26, 2006.
- (58) Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Stauffer E; International Cartilage Repair Society. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am*;85-A Suppl 2:45–57, 2003
- (59) O’Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* ;70: 595–606, 1988
- (60) Ebihara G, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ito S, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J. Cartilage repair in

Biomaterial; 33 : 3846–51, 2012