

200906021A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成22年 4月

はじめに

本研究報告書は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金「再生医療実用化研究事業」において実施された「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究（H21-再生-一般-008）」に関する研究成果報告を纏めたものである。本年は3年度計画の1年目であるが、研究期間を終了し、一定の成果を上げることができた。

私共は、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて報告し、修復能力に富んだ積層化軟骨細胞シートの特性を明らかにしてきた。簡潔に述べさせて頂くと、軟骨細胞シートは力学的には脆弱ではあるが、優れた接着性を有し、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクターから軟骨を保護し、成長因子の持続的な供給源となり、さらに骨髄由来幹細胞の軟骨分化のためのイニシエーターとして働いており、単なる軟骨再生というよりは、むしろ自己修復能力を最大限に向上させる効果により軟骨は修復・再生されている。変形性関節症において、常に混在しながら存在する軟骨全層欠損と部分損傷という両タイプの軟骨損傷に対して、細胞シートによる修復・再生効果を確認し、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、変形性関節症の治療にまで踏み込んだ再生医療の実現を目指している。

本事業においては、先端医療開発特区「細胞シートによる再生医療実現化プロジェクト」（研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授）において、事業期間中（平成20～24年度）に「対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられている軟骨の再生医療を、積層化軟骨細胞シートにより速やかに実現するために必要な前臨床試験並びに臨床研究を行うものである。

本研究事業での研究成果が、関節内の限定的な骨・軟骨欠損病変ばかりでなく、変形性関節症の克服に僅かばかりでも貢献できることを切に願いながら、いつも研究を支えて頂いている研究分担者、研究協力者、並びに関係者の方々に深謝する次第である。

2010年4月

東海大学医学部外科学系整形外科学

准教授 佐藤 正人

目 次

I. 研究班の構成	-----	1
II. 総括研究報告		
細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究に関する研究 －平成21年度総括研究報告－ 佐藤正人	-----	3
III. 分担研究報告		
1. 滑膜細胞との共培養法を用いた軟骨細胞シートの作製とその特性評価に 関する研究 小久保舞美 沓名寿治 三谷玄弥 海老原吾郎 長井敏洋 李 禎翼	-----	15
2. 自己細胞処理と安全性評価に関する研究 加藤俊一 安藤潔 宮地勇人 中村嘉彦 佐藤忠之	-----	23
3. 同種細胞処理と安全性評価に関する研究 阿久津英憲 田中麻衣子	-----	29
4. 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 瀬尾憲正 村井邦彦	-----	33

5. 細胞シートならびに遺伝子改変ブタ精子の凍結保存に関する研究 長嶋比呂志	-----	37
6. 製造工程の異なる細胞シートの非侵襲的特性評価に関する基礎的検討 石原美弥 谷川待子	-----	43
7. ハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムの性能を評価するた めの研究 基準サンプルの作製 I : 細胞周期の同調 谷川待子 石原美弥	-----	59
IV. 研究成果の刊行（平成 21 年度）に関する一覧表	-----	77
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	85

I. 研究班の構成

研究班の構成

	研究者名	所属研究機関・役職	専門	分担研究項目
研究代表者	佐藤 正人	東海大学医学部外科学系 整形外科学・准教授	整形外科学 再生医学 軟骨再生医療	研究統括・ 研究計画立案 臨床研究
研究分担者	小久保舞美	東海大学医学部外科学系 整形外科学・特定研究員	軟骨再生医学 化学	軟骨再生医学、 分子生物学的解析評 価、 CPC での細胞培養
	沓名 寿治	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	軟骨再生医療	臨床研究、 軟骨再生医学、 光による細胞シート の評価技術
	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	軟骨再生医療	臨床研究、 自己細胞移植の検討
	海老原吾郎	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	軟骨再生医療	臨床研究、 自己細胞移植の検討
	長井 敏洋	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	軟骨再生医療	臨床研究、 軟骨再生医学
	李 禎翼	日本学術振興会・外国人 特別研究員 東海大学医学部外科系整 形外科学・客員研究員	軟骨再生医学 獣医学	大型動物実験、 自己細胞移植の検討
	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療 学系再生医療科学・教授	造血幹細胞移 植、 再生医療	細胞処理と安全性評 価に関する研究
	阿久津英憲	国立成育医療センター研 究所生殖細胞医療研究 部・室長	産科婦人科学	臨床研究アドバイザー、 同種細胞移植へ向け た検討
	瀬尾 憲正	自治医科大学麻酔科学集 中治療医学講座・教授	麻酔科学	細胞シート移植後の 動態評価、 Bioluminescence に よる経時的評価

研究班の構成

	長嶋比呂志	明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授	発生工学	大型動物実験、同種細胞の保存法に関する研究
	石原 美弥	防衛医科大学校医用工学・准教授	光応用技術 軟骨特性評価	光を用いた細胞シートの評価技術
研究協力者	安藤 潔	東海大学医学部内科学系血液内科学・教授	血液内科学	細胞処理と安全性評価に関する研究
	宮地 勇人	東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学・教授	臨床検査学	細胞処理と安全性評価に関する研究
	中村 嘉彦	東海大学医学部附属病院細胞移植再生医療科・室長補佐	病理学	細胞処理と安全性評価に関する研究
	佐藤 忠之	東海大学伊勢原校舎教育・研究支援センター・技師補	細胞評価	細胞処理と安全性評価に関する研究
	田中麻衣子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員	細胞培養	同種細胞移植へ向けた検討
	村井 邦彦	自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・非常勤講師	麻酔科学	細胞シート移植後の動態評価、 Bioluminescence による経時的評価
	谷川 待子	防衛医科大学校医用工学・研究員	光応用技術 細胞培養	光を用いた細胞シートの評価技術
経理事務局	須藤 武	東海大学伊勢原研究推進部伊勢原研究業務課・課長		経理事務

Ⅱ. 総括研究報告

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究に関する研究

— 平成21年度 総括研究報告 —

研究代表者 佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学・准教授

研究要旨：従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷（軟骨下骨に達しない軟骨内損傷）に対して、私共は、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて報告し、修復能力に富んだ積層化軟骨細胞シートの特性を明らかにした。要約すると軟骨細胞シートは力学的には脆弱ではあるが、優れた接着性を有し、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクターから軟骨を保護し、成長因子の持続的な供給源であると共に、さらに骨髄由来幹細胞の軟骨分化を促進するイニシエーターとしても機能しており、単なる軟骨再生というよりは、むしろ自己修復能力を最大限に向上させ得る効果により軟骨は修復・再生されている。つまり、変形性関節症において常に混在しながら存在する軟骨部分損傷（軟骨内に留まる損傷）と全層欠損（軟骨下骨まで達する損傷で従来の再生医療は全層欠損だけがターゲットである）の両タイプの軟骨損傷に対して、細胞シートによる修復・再生効果を確認し、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、変形性関節症の治療にまで踏み込んだ関節治療を目指し、自己細胞による臨床研究の早期実現と同種細胞による将来的な普及を視野に入れた再生医療の実現のため、本研究事業を実施するものである。

【研究分担者】

小久保舞美：東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員

沓名寿治：同・助教

三谷玄弥：同・講師

海老原吾郎：同・助教

長井敏洋：同・助教

李 禎翼：日本学術振興会・外国人特別研究員、東海大学医学部外科学系整形外科学・客員研究員

加藤俊一：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授

阿久津英憲：国立成育医療センター研究所 生殖細胞医療研究部・室長

瀬尾憲正：自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・教授

長嶋比呂志：明治大学農学部生命科学科発 生工学研究室・教授

石原美弥：防衛医科大学校医用工学・准教授

【研究協力者】

安藤 潔：東海大学医学部内科系血液内科学・教授

宮地勇人：東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学・教授

中村嘉彦：東海大学医学部附属病院細胞移植再生医療科・室長補佐

佐藤忠之：東海大学伊勢原校舎 教育・研究支援センター・技師補

田中麻衣子：東海大学医学部外科系整形外科学・研究員

村井邦彦：自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・非常勤講師

谷川待子：防衛医科大学校医用工学・研究員

A. 研究背景と目的

変形性関節症をはじめとする運動器疾患は、生命を直接脅かすものではないために、癌や心臓疾患など生命に直接関わる疾患と比べるとやや軽視されてきた。しかし、日常生活動作（ADL）を下げるばかりか、生活の質（QOL）の低下も招き、人的社会的損失は計り知れないものがある。平成20年度版高齢社会白書によると、我が国の65歳以上の高齢者人口は過去最高の2,746万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も21.5%となり、未曾有の超高齢化社会が到来した。そして健康寿命を縮める原因（要支援となる原因）の第1位が関節疾患20.2%（平成19年国民生活基礎調査）であると報告されている。

関節軟骨の再生医療は、軟骨細胞の培養が比較的容易であったため、再生医療の第1世代というような言われ方をされた時期もあった。そして軟骨の再生医療は1990年前半から海外で実施、報告され、米国をはじめとする諸外国では既に2万例に近い手術症例の蓄積がある。しかしながら、

その対象疾患は小さな軟骨の外傷性病変であり、再生医療が真に必要とされる変形性関節症の治療には20年近く経過した現在でも、いまだに到達する気配すら感じられない。それは、“軟骨もどき”はできても真の関節軟骨を作ることが、想像以上に難しいことが明らかになったため、今まさに軟骨再生医療を実現するためのプレイクスルーが待望されている。

本研究事業では、先端医療開発特区「細胞シートによる再生医療実用化プロジェクト」（研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授）において「事業期間中（H20~24年度）に対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられている関節軟骨の再生医療を、積層化軟骨細胞シートにより速やかに実現するために必要な前臨床試験並びに臨床研究を行うものである。

B. 研究方法

本事業で実施する研究は下記の2つである。

1. 自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究
2. 同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究

下記に各々関して説明する。

【1】 自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究

東海大学医学部では既に持田讓治教授を研究責任者とする「自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究」が厚生労働省の承認を得てヒト幹細胞臨床研究を平成20年

度より実施しており、これらのノウハウを今回の臨床研究に投入する。

関節治療に関する細胞シートの実績は下記の通りであり、既に学術誌において発表され、一部は現在投稿中である。

（1）細胞シートによる関節治療効果

積層化細胞シートにより、関節軟骨部分損傷並びに全層欠損において軟骨の修復再生効果を確認した（ウサギとミニブタ）。

（2）ヒト細胞を用いた軟骨細胞シートの新規培養法の確立

滑膜細胞との共培養により、シート作製までの培養期間にばらつきが少なくなり、結果として培養期間を短縮することが可能となった。

（3）上記（2）の新規の培養方法により作製した細胞シートによる関節治療効果

関節軟骨全層欠損において共培養法で作製した積層化軟骨細胞シートの軟骨の修復再生効果を確認した（ミニブタ）。

上記の実績が示すように、既に自己細胞シート移植に関しては前臨床研究をほぼ終了している。本事業では、臨床研究を一刻も早く実現するために、ヒト細胞シートの安全性の評価とCPCにおける細胞シートの試験製造並びに特性評価を実施する。安全性の評価が終了した時点で学内倫理委員会に申請し、ヒト幹細胞指針への申請準備を行う。東海大学ではヒト幹細胞指針へ申請する場合、一定期間学内倫理委員会並びに細胞移植再生医療運営委員会において審議することとなっている。

【2】同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究

（1）ミニブタによる同種移植の有効性確認（東海大学：杓名、海老原、明治大学：長嶋）

同種のミニブタ膝関節から採取した滑膜と関節軟骨から細胞を酵素的に単離した後、温度応答性培養皿とカルチャーインサートを使用し、滑膜細胞との共培養法により作製した積層化軟骨細胞シートを作製する。自然修復しない大きさ（直径6 mm以上の）の骨軟骨全層欠損を作製し、同種軟骨細胞シート移植による治療効果を確認する。

（2）製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価（防衛医科大学校：石原）

分子分光法は、分子のエネルギー準位に相当する光の波長の吸収特性や発光特性から、分子構造や定量的成分分析が可能な方法である。我々が開発しているハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムは、生細胞の高分解能で空間情報と波長情報が同時に取得でき、5次元（空間（x,y,z）軸、時間軸、波長軸の5軸）細胞追跡を可能にするシステムである。本システムには培養環境（温度37℃、湿度90%、CO2濃度5%）を維持できる培養装置があるため、軟骨細胞シートの培養過程の連続モニターが可能である。また、ラインスペクトル法を適用しているので高速にデータの取得が可能で、照明光による細胞への影響を最小限にできる。既に我々は細胞外マトリックスの評価に分光情報が有用であることを示している。ハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムにより得られる培養過程の軟骨

細胞シートの細胞外マトリックスや細胞内局在の分光情報により、細胞シートの保有する細胞外マトリックスの質と量を非破壊で評価する。

（3）移植細胞動態の解析（自治医科大学：瀬尾、村井（研究協力者））

ルシフェラーゼ過剰発現ラットから単離した軟骨細胞、滑膜細胞から細胞シートを作製し、骨軟骨欠損損傷ラットの欠損部へ同種移植し、移植後にルシフェリンを静注または皮下注した後に、発光強度をXenogen社のIVIS systemでCCDカメラを用いて体外から測定する。このシステムはin vivo imagingであり、高感度のCCDカメラを用いることにより関節内に移植された軟骨細胞シートから透過した微弱な蛍光を動物が生きのまま体外で観察することが可能である。更に一定時間の発光強度を定量的に測定し、そこから自家蛍光などによるバックグラウンドを差し引くことで、生体内動態あるいは関節内動態を経時的定量的に評価することも可能である。よって関節内での細胞シートの滞在時間を計測することが可能である。

（4）低侵襲移植技術の開発（東海大学：佐藤、沓名、海老原、明治大学：長嶋）

明治大学では、クローンミニブタやGFP導入ミニブタの生産、syngenicなドナー・レシピエント系の構築などを確立し、大型動物による移植細胞シートと宿主細胞とのインターアクションや修復・再生に関わる細胞動態を詳細に解析可能である。さらにミニブタを用いることで、

実際の臨床現場で使用しているものと同等の関節鏡や治具を用いての移植と評価が可能であり、低侵襲の治療システム開発にも適しており、細胞シートの移植用治具の開発を行う。

（5）同種細胞ソースに関する研究（国立成育医療センター：阿久津、東海大学：小久保、田中（研究協力者））

国立成育医療センターでは、若年者の新鮮な軟骨細胞が入手可能である。特に先天異常の多指症の治療の際に採取可能な関節軟骨の細胞ソースとしての検討を行う。また、同種細胞の適切なバンキングシステムを、細胞の匿名化等にも配慮し、既存の骨バンクを参考に構築する。安全性に関しても自己細胞と同様のチェックリストを設けるが、感染症のチェックは厳密に行う。

（6）同種細胞シート移植治療技術の開発（明治大学：長嶋）

同種細胞シートをシートごと長期間保存可能なガラス化凍結または冷蔵保存法を開発する。

具体的な研究計画としては、今年度は、分担、研究協力者を下記のようなグループに分け、研究代表者統括下に、各研究課題を鋭意継続中であるが、必要に応じてグループ間でも討議を行い、人的交流をグループ間で行いながら、効率的な研究が実施できるような体制を整えている。分担研究報告は下記グループ毎に報告する。

1. 「滑膜細胞との共培養法を用いた軟骨細

胞シートの作製とその特性評価」に関する
研究グループ

研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
研究分担者 杓名 寿治（東海大学）
研究分担者 三谷 玄弥（東海大学）
研究分担者 海老原 吾郎（東海大学）
研究分担者 長井 敏洋（東海大学）
研究分担者 李 禎翼（東海大学）

2. 「自己細胞処理と安全性評価」に関する
研究に関する研究グループ

研究分担者 加藤 俊一（東海大学）
研究協力者 安藤 潔（東海大学）
研究協力者 宮地 勇人（東海大学）
研究協力者 中村 嘉彦（東海大学）
研究協力者 佐藤 忠之（東海大学）

3. 「同種細胞処理と安全性評価」に関する
研究グループ

研究分担者 阿久津 英憲（国立成育医療センター研究所）
研究協力者 田中 麻衣子（東海大学）

4. 「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
研究グループ

研究分担者 瀬尾 憲正（自治医科大学）
研究協力者 村井 邦彦（自治医科大学）

5. 「細胞シートならびに遺伝子改変ブタ精子
の凍結保存」に関する研究グループ

研究分担者 長嶋 比呂志（明治大学）

6. 「製造工程の異なる細胞シートの非侵襲
的特性評価」に関する研究グループ

研究分担者 石原 美弥（防衛医科大学

校）

研究協力者 谷川 待子（防衛医科大学
校）

C. 研究結果と考察

（1）滑膜細胞との共培養法を用いた軟骨
細胞シートの作製とその特性評価に関する
研究

細胞外基質を豊富に含む軟骨組織から採
取される軟骨細胞の数は少なく、また、乏
しい増殖能のために、採取から移植可能な
組織作製まで多くの時間を要する。今回、
滑膜細胞との共培養により、短期間で确实
に軟骨細胞シートの作製に成功した。前十
字靭帯再建術の際に患者同意のもと得られ
た 10 例のヒト関節軟骨細胞および滑膜細
胞を単離後、継代し、P0、P1、P2 の細胞を
使用した。24 穴カルチャーインサート用プ
レートに滑膜細胞を、温度応答性インサート
内に軟骨細胞を播種して共培養を行う群
（C 群）インサート内で軟骨細胞のみ培養
を行う群（S 群）の 2 群を作製し、培養 14
日まで経時的にそれぞれの細胞増殖度を
MTT assay で計測した。C 群を培養後シート
状で積層化し、7 日間培養した共培養積層
化シート（CL 群）を作製し、
COL1, COL2, TIMP1, FN1, SOX9, AGC1, COL27,
IN α 10, MMP3, MMP13, ADAMTS5 の発現を免疫
組織学的及びリアルタイム PCR 法を用いて
検討した。

S 群と比較して C 群の細胞増殖活性は継
代数に関わらず培養 3 日目で 2 倍以上の増
加傾向を示し、11 日目にプラトーに達した。
初期播種量が 1×10^4 cells/cm² の場合、P0
においては平均 2 週間、P1, P2 では平均 1
週間早く軟骨細胞シートの作製が可能であ

った。また CL 群では COL2, FN の発現をシート全体に確認し、細胞周囲に $IN\alpha 10$ の強発現を確認した。また mRNA 値は単層培養と比較し、COL2 は約 2 倍、AGC1 約 1.5 倍の増加と共に、TIMP1 及び SOX9 の発現増加を確認する一方で COL1, MMP3, MMP13, ADAMTS5 は低値に抑制された。

温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養では、液性因子を介した細胞間相互作用により、より早く良質な軟骨細胞シートを作製でき、また積層化によって軟骨分化並びに形質維持に重要な遺伝子の増加を認め、軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。

（2）「自己細胞処理と安全性評価」に関する研究

細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、学内のプロジェクト研究チームによる総合的な研究体制を構築し、細胞シートを GMP に準拠して体外で作製するために必要な設備面、技術面、人員面での検討を行った。

ヒト細胞シートの安全性評価として、培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、培養期間を超えて培養した細胞について、細胞形態観察、染色体異常の有無、造腫瘍性の確認試験等を検討した。

CPC における試験製造並びに特性評価として、CPC で作製した培養軟骨細胞シートに関して、性状確認試験、物理的構造確認試験、細胞数測定試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ DNA 定量、ウイルス否定試験、無菌性試験等の評価系を構築した。

（3）「同種細胞処理と安全性評価」に関する研究

細胞シートによる関節軟骨修復・再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、特に同種細胞ソースの性質評価に関する解析を行った。

同種ヒト細胞シートの安全性評価として、若年ヒト軟骨、滑膜細胞等の初代細胞株の開発研究を行い、初期形質を評価するとともに体外培養環境下での形質転換やゲノム安定性を評価するための基盤解析系を構築した。本年度は、国立成育医療センター研究所の特色を生かし、多指症患者からの検体を用いて関節軟骨の細胞ソースとしての検討を行うとともに、希少組織である滑膜組織由来細胞の樹立システムの構築をおこなった。関節部の滑膜組織は顕微鏡的観察により認められる微小な組織であり、滑膜組織由来細胞株の樹立のためには技術的な更なる検討が必要であることが判明した。若年者の関節部組織由来細胞は分化能や増殖性から同種移植用の細胞ソースで非常に重要であることから更なる開発研究を進め、安全、安心な再生医療を目指し本研究を進めていく。

（4）「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

細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うために、BLI (Bioluminescence Imaging) 法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、luciferase 遺伝子を発現する細胞シートを作製・移植し、更に関節内に移植された

細胞シートに最適化された評価方法の検討を行った。

BLI法では luciferin-luciferase 反応を利用するため基質となる luciferin を十分にグラフトに届ける必要があるが、関節内に細胞シートを移植した場合に最適な luciferin の投与経路・投与量は明らかにされていない。このため、luciferase Tg ラットから細胞シートを作製して同種同系 Lewis ラットに移植し、静脈内・皮下・関節内投与の測定結果を同一個体中で経時的に比較することにより、細胞シートに対する最適な評価系を決定した。さらにこの評価系を用いて、移植された細胞シートの長期的な評価を開始した。

温度応答性培養皿 UpCell を用いて luciferase Tg ラット由来の発光する細胞シートを作製することができた。luciferase の投与経路はラットでは皮下投与が優れており、最適な投与量を 300mg/kg と決定した。しかし、luciferin 試薬は 1g あたり約 15 万円と高価であるためコスト上の問題があり、ウサギなどの中動物に用いるには静脈内投与や関節内投与が最適である可能性がある。移植したグラフトは術後 4 日目には発光強度の増強が確認され、確実に生着しつつあると考えられることから、引き続き長期的に動態を評価する予定である。

（5）「細胞シートならびに遺伝子改変ブタ精子の凍結保存」に関する研究

細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの凍結保存に取り組んだ。哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等の凍結保存に実

績のあるガラス化法を、細胞シートに適用するための条件検討を行った。

ガラス化法は、細胞シートを構成する細胞の生存性を高効率に維持し得えた。しかし、ガラス化あるいは融解時に、脆弱な構造体である細胞シートに亀裂が生じることが避けられなかった。この亀裂の発生を避けるために、組織片ガラス化用デバイスの応用や、新規デバイスの開発についても検討した。また、大型実験動物であるブタを用いて細胞シートの移植試験を行う際に、蛍光蛋白のような細胞マーカーを持ったブタの利用が望まれる。そのようなブタの安定供給を可能にするため、分担者らが既に開発した、赤色蛍光蛋白（クサビラオレンジ）遺伝子を持ったブタの精子の凍結保存を行い、さらにそれらの受精能を検証した。凍結精子を用いた人工授精で産仔が得られることが確認され、これによって赤色蛍光蛋白マーカーを持ったブタの研究利用を今後促進することができる。

（6）「製造工程の異なる細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する研究

本研究では、同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の1つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する第1年目の研究成果として報告する。移植に用いる細胞シートそのものを非侵襲的に評価することで再生医療のバリデーション実施が可能となる。本研究では、光をモダリティとして選択し、再生医療のバリデーションが可能となるようなシステムを構築することを目的とした。分析手段には分子分光法を採用し、目的を達成できるハイパースペクトル顕微

鏡システムの構築をめざした。この結果、生細胞を対象に高分解能で空間情報と波長情報が同時に取得できる、5次元（空間（x,y,z）軸、時間軸、波長軸の5軸）細胞追跡を可能にするシステムを構築できた。同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の1つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する第1年目の研究成果として、当初の予定通りの進捗であった。第2年度目以降は、細胞シートの、均一性や細胞密度の評価を第1の目的とし、さらに、細胞外マトリックスの産生と維持に関して、フィブロネクチンやインテグリンが関係する接着性、成長因子に関しての評価が可能になるように、照明条件や取り込み条件の最適化を検討する。

D. 結論

本研究事業の2つの大きな課題である「自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究」並びに「同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究」は何れも、当初の予想以上の成果が得られている。次年度はCPCでの試験製造と安全性評価に重点を置き、臨床研究のための準備を確実にする予定である。

E. 倫理面への配慮

東海大学では臨床研究審査委員会並びに医の倫理委員会を設けており、厳格な審査の上に臨床研究を行っている。厚生労働省が定めた「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究対象者に対してのインフォームドコンセント、患者の権利、守秘義務、プライバシーの保護に十分

に留意している。本研究内容に関しては平成17年から臨床研究審査委員会の承認の下、東海大学においてヒトサンプルを用いた臨床研究を実施している。また、動物実験においては、東海大学動物実験委員会並びに共同研究施設での動物実験施設主催の動物実験講習会に本プロジェクトの動物実験担当研究員は全員受講し、動物実験に関する理念：3Rの原則を理解し、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保育並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、動物愛護の精神に基づいた十分な配慮がなされている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書
 1. Sato M, Cell sheet technologies for cartilage repair, Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues,2010.04
 2. Sato M, Ishihara M, Mitani G, Kutsuna T, Lee J Ik, Kikuchi M, Mochida J, Bioengineering: Principles, Methodologies and Applications. Chapter 7 : Development of a Diagnostic System for Osteoarthritis is Using a Photoacoustic Measurement Method and Time-resolved Autofluorescence, Nova Science Publishers, Inc, ISBN :

978-1-60741-762-0

2. 論文発表

1. Mitani G, Sato M, Lee J Ik, Kaneshiro N, Ishihara M, Kokubo M, Ota N, Sakai H, Kikuchi T, Mochida J, The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration, BMC Biotechnology 2009,9:17,2009.03
2. 石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治, 菊地眞, 高齢者の ADL(Activity of Daily Life)維持に貢献する変形性関節症の早期診断システムの研究開発, 未病と抗老 18(1):110-114,2009.04
3. Kutsuna T, Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Nagai T, Kikuchi M, Ushida T, Mochida J, Noninvasive Evaluation of Tissue Engineered Cartilage with Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy, Tissue Eng Part C Methods, Jul 10. [Epub ahead of print],2009.07
4. Ishihara M, Bansaku I, Sato M, Mochida J, Kikuchi M, Multifunctional characterization of engineered cartilage using nano-pulsed laser, IFMBE Proceedings 25(X): p.69-70,2009.09
5. 石原美弥, 菊地眞, 佐藤正人, 沓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治, 【解説・総説】軟骨再生医療に有効な光技術, 整形・災害外科 52(12): p.1533-1537, 2009.11
6. Ohta N, Sato M, Ushida K, Kokubo M, Baba T, Taniguchi K, Urai M, Kihira K,

Mochida J, Jellyfish mucin may have potential disease-modifying effects on osteoarthritis, BMC Biotechnology, 2009.12

3. 学会発表

1. 石原美弥, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞, レーザーによる軟骨の多角的評価システムの開発, 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009.04
2. 小久保舞美, 佐藤正人, 太田直司, 坂井秀明, 持田讓治, 滑膜細胞との共培養法を用いた短期間での軟骨細胞シートの作製とその特性評価, 第 53 回日本リウマチ学会, 2009.04
3. 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規, 持田讓治, クラゲ由来ムチンの関節軟骨に対する影響の検討, 第 53 回日本リウマチ学会, 2009.04
4. 番作勲, 石原美弥, 菊地眞, 佐藤正人, 持田讓治, 変形性関節症診断用の光音響プローブの改良, 第 84 回日本医療機器学会大会, 2009.05
5. 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 菊地眞, 【シンポジウム】光による関節軟骨の力学特性と性状評価, 第 82 回日本整形外科学会学術総会, 2009.05
6. Miya Ishihara, Isao Bansaku, Masato Sato, Joji Mochida, Makoto Kikuchi, Multifunctional characterization of engineered cartilage using nano-pulsed laser, IFMBE Proceedings,2009.09
7. Miya Ishihara, Isao Bansaku, Masato Sato, Joji Mochida, Makoto

Kikuchi, Multifunctional characterization of engineered cartilage using nano-pulsed laser, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009.09

8. 佐藤正人, 【教育研修講演】関節軟骨再生 up to date, 第7回並木整形外科セミナー, 2009.09

9. 李禎翼, 佐藤正人, 三谷弦弥, 持田讓治, 【ASIA NOW】関節軟骨修復再生をめざした軟骨滑膜混合細胞体の開発, 第58回東日本整形災害外科学会, 2009.09

10. 佐藤正人, 石原美弥, 三谷弦弥, 沓名寿治, 菊地眞, 【シンポジウム】光を用いた関節軟骨の機能評価法, 第36回日本臨床バイオメカニクス学会, 2009.10

11. 佐藤正人, 三谷玄弥, 沓名寿治, 長井敏洋, 海老原吾郎, 太田直司, 小久保舞美, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 持田讓治, 【シンポジウム】関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨（軟骨細胞シート/プレート）の役割, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

12. 沓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治, 時間分解自家蛍光スペクトル分析による scaffold free 組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

13. 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 沓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治, 同種異関節における細胞相互作用の検討-共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

14. 李禎翼, 佐藤正人, 三谷弦弥, 持田讓

治, 滑膜細胞と軟骨細胞からなる細胞移植体の作製と評価, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

15. 石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 沓名寿治, 持田讓治, 菊地眞, 光技術を用いた軟骨変性・再生の評価法の開発, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

16. 長井敏洋, 佐藤正人, 沓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 小久保舞美, 持田讓治, 抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 (Bevacizumab)による軟骨修復効果, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

17. 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 馬場崇行, 谷口佳代子, 浦井誠, 丑田公規, 持田讓治, クラゲムチンの関節軟骨に対する影響の検討, 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11

18. 番作勲, 石原美弥, 大森努, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞, 高分子圧電フィルムを用いた光音響プローブの改良, 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11

19. 石原美弥, 佐藤正人, 番作勲, 三谷玄弥, 沓名寿治, 持田讓治, 菊地眞, 光音響原理に基づく軟骨変性診断法の開発:原理実証から臨床研究まで, 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11

20. 沓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治, ナノ秒パルスレーザーによる Scaffold Free 組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価, 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11

21. 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 沓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治, 同種異関節由来細胞間共培養法を用いた軟骨細胞シートの作製とそ

の特性, 第9回再生医療学会, 2010.03

22. Kutsuna T, Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Nagai T, Ushida T, Mochida J, Noninvasive Evaluation of Tissue Engineered Cartilage with Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy, 56rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03

23. Ohta N, Sato M, Ushida K, Kokubo M, Baba T, Taniguchi K, Urai M, Kihira K, Mochida J, Jellyfish mucin may have potential disease modifying effects of osteoarthritis of the knee, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03

24. Kokubo M, Sato M, Mitani G, Kutsuna T, Ohta N, Ebihara G, Sakai H, Mochida J, Evaluation of characteristics of chondrocyte sheet constructed of cultured chondrocytes using co-culture method with synovial cells, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし