

201006012A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成23年 4月

はじめに

本報告書は、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）」に関する平成22年度の研究成果報告を纏めたものです。関係者の皆様のご尽力により研究期間を通じて一定の成果を上げることができましたのでご報告申し上げます。本年度（平成23年度）は3年度計画の最終年度であります。自己軟骨細胞シートによる臨床研究をできる限り実施していく所存であります。

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ました。修復再生のメカニズムを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りますが、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、サイトカインの持続的な供給源となり、さらに骨髄由来幹細胞を軟骨へ分化誘導するイニシエータとして機能しており、単なる軟骨再生というよりは、むしろ自己修復能力を向上させた効果により軟骨は修復再生されています。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、軟骨細胞シートは動物実験で治療効果を認めています。これは、従来の軟骨再生医療にはない治療効果であります。つまり、変形性関節症において、常に混在する2種類の軟骨損傷に治療効果を認めるため、将来的に変形性関節症まで適用を広げられる可能性があります。まずは安全性と有効性のエンドポイントの明確な関節軟骨損傷の患者に適用した再生医療の実現を細胞シート工学という日本オリジナルな技術により目指します。「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関しては、平成23年2月23日に東海大学「医の倫理委員会」の承認を得ることができました。同年3月3日に厚生労働省へヒト幹細胞臨床研究の申請を行い、現在審議中ですが、承認が得られ次第、適応患者へ軟骨細胞シートの移植を行う予定です。

本事業は、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す。

本研究事業での研究成果が、離断性骨軟骨炎や外傷性の軟骨損傷といった関節内の限局的な軟骨病変ばかりでなく、将来的に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いたします。

平成23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 －平成22年度総括研究報告－ 佐藤正人	3
III. 分担研究報告	
1. 家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による 治療効果の検討 伊藤聡 小久保舞美 長井敏洋 沓名寿治 三谷玄弥 鶴養拓	13
2. 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 高久裕子	35
3. 細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究 長嶋比呂志	39
4. 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いて、軟骨シート移植後の機能回復 の評価に関する研究 －基礎的検討としてのヒト変性軟骨診断－ 石原美弥	49

5. 細胞シートの顕微鏡画像を用いた非侵襲的特性評価に関する基礎検討 谷川待子 石原美弥	55
6. 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～ 小久保舞美 三谷玄弥 沓名寿治 内山善康 繁田明義	69
7. 培養軟骨細胞の免疫調節効果に関する研究 加藤玲子 小久保舞美	77
8. 自己細胞処理と安全性評価に関する研究 加藤俊一 河毛知子 田中麻衣子 渡部綾子	85
9. マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析 阿久津英憲 梅澤明弘 鶴養拓	93
IV. 研究成果の刊行（平成 22 年度）に関する一覧表	105
V. 研究成果の刊行物・別刷	115
VI. 班会議 ー議事録ー	145

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 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	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 自己細胞移植の検討
	杓名 寿治	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学 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
	海老原吾郎	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	整形外科学 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	整形外科学 軟骨再生医療	臨床研究、 軟骨再生医学
	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	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
	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	自治医科大学麻醉科学集 中治療医学講座・教授	麻醉科学	細胞シート移植後の 動態評価、 Bioluminescence に よる経時的評価
村井 邦彦	自治医科大学麻醉科学集 中治療医学講座・非常勤 講師	麻醉科学	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	内山 善康	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師	整形外科学	臨床研究、自己細胞移植の検討
	繁田 明義	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師	整形外科学	臨床研究、自己細胞移植の検討
	伊藤 聡	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生	整形外科学	軟骨再生医学、動物実験
	鵜養 拓	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生	整形外科学	同種細胞移植へ向けた検討
	河毛 知子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員	細胞培養	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	細胞処理と安全性評価に関する研究
	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員	細胞培養	細胞処理と安全性評価に関する研究
	梅澤 明弘	国立成育医療センター研究所 生殖細胞医療研究部・部長	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
	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官	分子生物学、免疫学	同種軟骨細胞移植の免疫反応に関する研究
	高久 裕子	自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・大学院生	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	石田 秀一	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

— 平成22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：変形性関節症において常に混在して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）の両タイプの軟骨損傷に対して、我々は軟骨細胞シートによる修復・再生効果を動物実験で確認した。そして軟骨細胞シートの安全性を証明するために各種研究を実施した。細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、関節軟骨の再生医療の実現を目指している。本研究事業では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に関して今年度研究報告をまとめるが、特筆すべきは、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、本年3月3日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請したことである。現在本臨床研究に関しては審査中であるが、承認が得られれば直ちに臨床研究を行えるように実施体制を整備している。

【研究分担者】

三谷玄弥：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
杓名寿治：同・講師
海老原吾郎：同・助教
長井敏洋：同・助教
小久保舞美：同・特定研究員
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
村井邦彦：同・非常勤講師
長嶋比呂志：明治大学農学部生命科学科発牛工学研究室・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】

内山善康：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
繁田明義：同・講師
伊藤 聡：同・大学院生
鶴養 拓：同・大学院生
河毛知子：同・研究員
田中麻衣子：同・研究員
渡部綾子：同・研究員
梅澤明弘：国立成育医療センター研究所 生殖細胞医療研究部・部長

加藤玲子：国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官

高久裕子：自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・大学院生

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な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. 研究課題

【1】 自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究

- (1) ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請（東海大学）
- (2) 家兎膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討（東海大学）
- (3) 自己細胞処理と安全性評価に関する研究（東海大学）

【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) 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（自治医科大学）
- (2) 細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究（明治大学）
- (3) 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いて、軟骨シート移植後の機能回復の評価に関する研究（防衛医

科大学校)

- (4) 細胞シートの顕微鏡画像を用いた非侵襲的特性評価に関する基礎検討 (防衛医科大学校)
- (5) 同種異関節における細胞相互作用の検討 (東海大学)
- (6) 培養軟骨細胞の免疫調節効果に関する研究 (国立医薬品食品衛生研究所)
- (7) マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析

研究課題毎の役割としては、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。分担研究報告は上述の課題毎に報告する。

1. 「軟骨細胞シートの特性と治療効果」に関する研究グループ

- 研究分担者 三谷 玄弥 (東海大学)
- 研究分担者 杏名 寿治 (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 小久保 舞美 (東海大学)
- 研究協力者 内山 善康 (東海大学)
- 研究協力者 繁田 明義 (東海大学)
- 研究協力者 伊藤 聡 (東海大学)
- 研究協力者 鶴養 拓 (東海大学)

2. 「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)
- 研究分担者 村井 邦彦 (自治医科大学)
- 研究協力者 高久 裕子 (自治医科大学)

3. 「細胞シートの保存法」に関する研究グループ

- 研究分担者 長嶋 比呂志 (明治大学)

4. 「光を用いた非侵襲的特性評価」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)

5. 「培養軟骨細胞の免疫調節効果」に関する研究グループ

- 研究協力者 加藤 玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 研究分担者 小久保 舞美 (東海大学)

6. 「自己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 加藤 俊一 (東海大学)
- 研究協力者 河毛 知子 (東海大学)
- 研究協力者 田中 麻衣子 (東海大学)
- 研究協力者 渡部 綾子 (東海大学)

7. 「マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析」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 梅澤 明弘 (国立成育医療センター研究所)
- 研究協力者 鶴養 拓 (東海大学)

C. 研究結果

【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譲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本臨床研究に投入する。

（1） ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請（東海大学）

我々は、軟骨細胞シートによる軟骨修復再生効果を報告し、その特性を明らかにしてきた。軟骨細胞シートは力学的に脆弱ではあるが、優れた接着性を有し、損傷軟骨からのプロテオグリカンの流出を阻止し、サイトカインの持続的な供給源であると共に、損傷部に保持した骨髄由来幹細胞の軟骨分化を促進させ軟骨修復に寄与している。細胞シートによる関節治療の臨床研究を実施するため、ヒト幹細胞臨床研究指針に則り前臨床試験を実施し厚生労働省へ申請したので報告する。

ミニブタ関節軟骨欠損モデル(n=12)による組織修復における有効性を ICRS grading system により検討した。安全性評価として、患者由来の軟骨細胞 (P4,P6) に対し、CGH 解析を実施しコピー数異常の有無を検討した(n=12)。免疫不全動物 (n=55) を用いて造腫瘍性否定試験を実施した。移植細胞の異所への転移を否定するため、luciferase-Tg ラット由来の細胞シートを作製し、移植後の細胞シートの動態を *in vivo* bioluminescence imaging により確認した (n=22)。また、CPC において実際に細胞シ

ートの試験製造を患者組織の持込みから、最終製品完成までの各工程での品質管理検査を2症例で実施した。

細胞シート移植群(38.3pts)では、非移植群(26.3pts)に比して有意に組織修復効果を認めた(p<0.05)。過継代培養軟骨細胞での明らかなコピー数異常も、免疫不全動物での腫瘍化も認めず、細胞シートは移植後転移することなく関節内に留まっていた。試験製造の各工程で管理検査を実施し品質に問題ないことを確認した。以上より、有効性と安全性は十分担保されると判断し、臨床研究の実施を学内倫理委員会へ諮り承認を得て、ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書を厚生労働省へ提出した。

（2） 家兎膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討（東海大学）

軟骨細胞シート作製までの培養期間を短くするべく、ヒト軟骨細胞をヒト滑膜細胞と共培養し、積層化軟骨細胞シートを作製した。今回我々は、培養時にフィーダー細胞と用いてきた培養滑膜細胞と軟骨細胞シートとの併用の効果を確認するため、家兎膝軟骨損傷モデルを用いて積層化軟骨細胞シート及び培養滑膜細胞移植による治療効果を検討したところ、両者の併用効果を認めた。

（3） 自己細胞処理と安全性評価に関する研究（東海大学）

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、CGH解析、及び、培養軟骨細胞シートを

免疫不全マウスに移植することにより造腫瘍性の確認試験を検討した。その結果安全性に問題ないことが確認された。

【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）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（自治医科大学）

軟骨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 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さら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後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定したので報告する。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用群の3群においてLuc+細胞からの発光は消失することなく22週以上検出された。発光強度は移植4週以降、軟骨細胞シート群>両細胞シート併用群>滑膜細胞シート群の順に強く発光する経過を示した。

（2）細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究（明治大学）

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に改良を加え、細胞シートのガラス化保存に成功した。前年度の研究では、シート構成細胞のガラス化後生存性は維持し得えたが、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。今年度のガラス化の改良によって、細胞生存性の維持に加えて、亀裂の発生を抑えることが可能となった。また、細胞シートの低温保存では、約3週間の冷蔵保存（4℃）が可能であった。保存液への抗酸化物質の添加が、細胞生存性維持に効果があることが示唆された。以上の結果より、細胞シートの臨床応用に際して、シートを要事調製することに加えて、今後は凍結保存あるいは低温保存したシートを用いる選択肢もあり得ると考えられる。

（3）光音響原理に基づく力学特性計測法を用いて、軟骨シート移植後の機能回復の評価に関する研究（防衛医科大学校）

軟骨細胞シートによる関節治療の評価には、シートの移植前後で同じ手法で測定し、同じパラメータで評価する必要がある。我々が独自に開発した光音響原理に基づく力学特性計測法は、対象の組織に害がない非侵襲的で、繰り返し計測が可能であることから、その評価法になりうる。そこで、軟骨細胞シート移植術の評価に有効であるかどうか、その基礎検討として今年度は変性軟骨を対象に評価法としての有用性を確認した。既に我々が構築した光音響原理に基づく力学特性計測法のプロトタイプ装置を用いて、膝前十字靭帯損傷手術と人工膝関節置換術の際に変性部と正常部で比較して計測した。その結果、軟骨変性の一般的な指標（ICRSグレード）と同じ傾向が得られ、未だ統計処理ができる例数がないが、正常部と変性部を対象にした測定値に違いがあり、軟骨細胞シートによる関節治療の評価法としての可能性が確認できた。

(4) 細胞シートの顕微鏡画像を用いた
非侵襲的特性評価に関する基礎検
討（防衛医科大学校）

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が、本研究では、昨年度構築したハイパースペクトル顕微鏡システムのうち、基本構成品で汎用されている倒立顕微鏡で獲得した画像で細胞シートの評価の可否を基礎的に検討した。スペクトル等の新規のパラメータの導入が特に軟骨細胞シートの評価に必要であることが判明した。

(5) 同種異関節における細胞相互作用
の検討（東海大学）

2種類の細胞を非接触状態で培養できるという、インサートの特性を生かし、ヒト軟骨細胞を同種の凍結滑膜細胞を用いて共培養を行い、その増殖能の変化と作製したシートの特性評価を比較検討した。その結果、同種異関節由来の滑膜細胞との共培養法においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することが可能であり、自己由来細胞の共培養法と同様に軟骨細胞シートの特性を維持していた。

(6) 培養軟骨細胞の免疫調節効果に関
する研究（国立医薬品食品衛生研
究所）

温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨シートによる関節軟骨修復再生効果を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。しかしながら、同種軟骨細胞が宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はない。そこで本研究で、

培養軟骨細胞が*in vitro*でリンパ球の活性化（細胞増殖）におよぼす影響を検討した。その結果、同種軟骨細胞が免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の増殖を抑制したことから、関節軟骨損傷の治療に同種軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆された。

(7) マイクロアレイを用いた各種軟
骨細胞の遺伝子発現解析

多指症・前十時靭帯損傷・変形性膝関節症の軟骨細胞の遺伝子解析を行い、軟骨細胞の幼若性や将来的な細胞ソースとしての可能性を検討した。年齢により発現が変動する遺伝子とmiRNAを抽出することができた。抽出された3種類のmiRNAの中には文献的にマウスでの軟骨代謝に関与が確認されているものが含まれており、ヒトの軟骨代謝にも影響している可能性が示唆された。

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た。特筆すべきは、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、本年3月3日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請したことである。現在本臨床研究に関しては審査中であるが、承認が得られれば直ちに臨床研究を行えるように実施体制を整備している。

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. Furukawa KS, Sato M, Nagai T, Ting S, Mochida J, Ushida T, (Edited by: Eberli D) :Tissue Engineering. 20: Scaffold-free Cartilage Tissue by Mechanical Stress Loading for Tissue

Engineering. In Tech Publisher, 409-428, 2010.05.

2. 論文発表

1. 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 芹ヶ野健司, 持田讓治, 菊地眞: 関節鏡視下軟骨機能診断システムの開発と臨床応用. リウマチ科 43(5), 497-506, 2010.05.

2. Watanabe M, Sakai D, Matsuyama D, Yamamoto Y, Sato M, Mochida J : Risk factors for surgical site infection following spine surgery ; efficacy of intraoperative saline irrigation. Journal of Neurosurgery, Spine 12(5), 540-546, 2010.05.

3. 渡邊拓也, 佐藤正人, 東永廉, 渡辺雅彦, 持田讓治 : 5 椎体に及んだ胸椎椎体分離(vertebral body separation)の 1 例. 臨床整形外科 45(6), 573-578, 2010.

4. 長井敏洋, 渡辺雅彦, 酒井大輔, 佐藤正人, 持田讓治 : 脊髄硬膜動静脈瘻における臨床症状と画像との比較検討. 日本脊髄障害医学会誌 23(1), 154-155, 2010.05.

5. 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治 : 関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発. 東日本震災会誌 22, 207-213, 2010.06.

6. 佐藤正人, 石原美弥, 荒井恒憲, 菊地眞, 持田讓治 : レーザー照射が椎間板細胞に与える影響-PLDD への警鐘-. 日本レーザー医学会誌 31(2), 146-151, 2010.07.

7. Watanabe M, Sakai D, Yamamoto Y, Sato M, Mochida J : Upper cervical spine

injuries: age-specific clinical features, *J Orthop Sci* 15(4), 485-92, 2010.08.

8. Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Kokubo M, Ebihara G, Ohta N, Mochida J: Intravenous administration of anti-VEGF humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, 12(5):R178, 2010.09.

9. 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 鶴養拓, 小久保舞美, 持田讓治: 分子レベルからみた整形外科疾患—シリーズVIII; 関節軟骨損傷修復のための軟骨細胞シート, *整形・災害外科* 53(13), 1554-1555, 2010.12.

10. 前田隆, 渡辺雅彦, 佐藤正人, 持田讓治: 同一馬尾に数珠状に発生した多発性神経鞘腫の1例. *臨床整形外科* 46(1), 77-81, 2011.01.

11. Lee JI, Sato M, Ushida K, Mochida J: Measurement of diffusion in articular cartilage using fluorescence correlation spectroscopy. *BMC Biotechnology* 2011, 11:19, 2011.03.

3. 学会発表

1. 渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, 長井敏洋, 佐藤正人, 持田讓治: 上位頸椎損傷の年代別特徴—高齢者に着目して—. 第39回日本脊椎脊髄病学会, 2010.04.

2. 渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, 佐藤正人, 持田讓治: 脊椎手術における術後感染発生危険因子(術中洗浄の重要性). 第83回日本整形外科学会学術総会, 2010.05.

3. 佐藤正人, 太田直司, 馬場崇行, 木平孝治, 丑田公規, 持田讓治: 【シンポジウム】クラゲ由来ムチンを用いた関節治療の可能

性. 第62回日本細胞生物学会, 大阪, 2010.05.

4. 渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, 佐藤正人, 持田讓治: 頸椎砂時計種に対する治療戦略. 第139回神奈川整形災害外科研究会, 2010.06.

5. 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 金城永俊, 宿南知佐, 持田讓治: ヒト膝関節内組織におけるTenomodlin, Scleraxisの発現状況. 第2回日本関節鏡, 膝, スポーツ整形外科学会(2nd JOSKAS), 沖縄, 2010.07.

6. 檜山明彦, 渡辺雅彦, 佐藤正人, 酒井大輔, 山本至宏, 長井敏洋, 持田讓治: 血液透析患者の腰椎病変における脊椎手術成績の検討. 第59回東日本整形災害外科学会, 2010.09.

7. 長井敏洋, 佐藤正人, 古川克子, 沓名寿治, 海老原吾郎, 太田直司, 伊藤聡, 小久保舞美, 鶴養拓, 牛田多加志, 持田讓治: 血管新生阻害効果による関節軟骨修復の検討. 第29回日本運動器移植・再生医学研究会, 2010.10.

8. 海老原吾郎, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤聡, 太田直司, 長井敏洋, 沓名寿治, 持田讓治: 積層化軟骨細胞シートの液性因子の解析. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

9. 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 芹ヶ野健司, 菊地眞, 持田讓治: 【シンポジウム】ナノ秒パルスレーザーによる関節軟骨の機能評価. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

10. 李 禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 小久保舞美, 持田讓治: 滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移植体による軟骨再生効果. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京

- 都, 2010.10.
11. 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 持田讓治: 関節軟骨細胞初代培養時の ascorbic acid の影響. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
12. 伊藤 聡, 佐藤正人, 太田直司, 馬場崇行, 木平孝治, 持田讓治: クラゲ由来ムチンとヒアルロン酸の相互作用に関する研究第 1 報. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
13. 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 宿南知佐, 持田讓治: 再生医療に向けた前十字靭帯, 滑膜由来細胞シートの検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
14. 長井敏洋, 佐藤正人, 杵名寿治, 小久保舞美, 海老原吾郎, 太田直司, 持田讓治: 抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体 (Bevacizumab) による骨軟骨修復効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
15. 杵名寿治, 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: 旋回培養法における至適回数について時間分解自家蛍光スペクトル測定 (TR-LIFS) による評価. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
16. 石原美弥, 佐藤正人, 谷川待子, 松村耕治, 持田讓治, 菊地眞: 軟骨細胞シート評価のためのハイパースペクトル顕微鏡システムの構築. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
17. 佐藤正人, 渡辺雅彦, 持田讓治: 【パネルディスカッション】東海大学における整形外科医の育成. 第 140 回神奈川整形災害外科研究会, 横浜, 2010.10.
18. 高久裕子, 村井邦彦, 村上孝, 佐藤正人, 持田讓治: 軟骨再生医療研究における Bioluminescence Imaging の有用性. 第 31 回日本レーザー医学会総会, 愛知, 2010.11.
19. 石原美弥, 佐藤正人, 杵名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治, 菊地眞: 【シンポジウム】光音響計測技術の軟骨再生医療への可能性と展開. 第 31 回日本レーザー医学会総会, 愛知, 2010.11.
20. Sato M: 【特別講演】 Chondrocyte Sheet for Articular Cartilage Regeneration, The 4th International Cell Therapy Symposium. Seoul, Korea, 2010.11.
21. Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Ito S, Kokubo M, Mochida J: Repair of articular cartilage with anti-VEGF antibody bevacizumab. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011.01.
22. 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 宿南知佐, 持田讓治: 再生医療に向けた前十字靭帯, 滑膜由来細胞シートの検討. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.
23. 長井敏洋, 佐藤正人, 杵名寿治, 海老原吾郎, 持田讓治: 血管新生阻害薬 (Bevacizumab) 静脈内投与による関節軟骨修復の検討. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.
24. 浜橋恒介, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤 聡, 長井敏洋, 海老原吾郎, 杵名寿治, 持田讓治: 積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.
25. 伊藤 聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鶴

養 拓, 長井敏洋, 三谷玄弥, 持田讓治：
家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟
骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療
効果の検討. 第10回日本再生医療学会総
会, 東京, 2011.03.

26. 佐藤正人, 持田讓治：【シンポジウ
ム】細胞シートによる関節軟骨治療－臨
床応用を目指した取り組み－. 第24回軟
骨代謝学会, 福岡 2011.03.

27. 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美,
持田讓治, 松岡厚子：in vitro における培
養軟骨細胞の免疫反応におよぼす影響.
第24回軟骨代謝学会, 福岡 2011.03.

28. 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康,
繁田明義, 伊藤 聡, 鵜養 拓, 持田讓
治：軟骨細胞初代培養時におけるアスコ
ルビン酸の影響とその添加時期の検討.
第24回軟骨代謝学会, 福岡 2011.03.

29. 高垣智紀, 佐藤正人, 伊藤聡, 馬場
崇行, 木平孝治, 持田讓治：培養軟骨細胞
におけるクラゲ由来ムチンとヒアルロン
酸の相互作用の検討. 第24回軟骨代謝学
会, 福岡 2011.03.

30. Mitani G, Sato M, Kokubo M,
Nakamura Y, Mochida J：マイクロアレ
イを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解
析. 第24回軟骨代謝学会, 福岡 2011.03.

31. Mitani G, Sato M, Kokubo M,
Nakamura Y, Mochida J：Investigation
of Cell Sheets Derived From Anterior
Cruciate Ligaments for Tissue
Engineering. The 3rd Combined
Meeting of the Japanese and American
Orthopaedic Societies for Sports
Medicine.2011.03.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 分担研究報告