

201106006B

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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成24年 4月

はじめに

本総合研究報告書は、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3年計画の事業として採択された「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3年間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この3年間で予想以上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。本研究事業の大きな柱は、研究事業名からもお分かりになる通り、軟骨細胞シートによる臨床研究を開始することです。そのために、学内におきましては、細胞移植再生医療運営委員会、臨床研究審査委員会、医の倫理委員会という3つの委員会でのハードルをクリアし、最終年度に厚生労働省へヒト幹細胞臨床研究として申請し、平成23年10月3日に小宮山厚生労働大臣の意見書の発出により、自己軟骨細胞シートによる臨床研究を東海大学医学部附属病院で実施するまでに至りました。**first-in-man study**を実施するためのプロセスを関係者の方々と学びながら、手探りで進めて参りましたが、ここまで達成できたことは、ひとえに皆様方のご指導のお蔭であると感じております。

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。軟骨細胞シートは強固な剛体ではありませんが、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、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が見込まれるため、将来的に変形性関節症まで適用を広げられるポテンシャルを有します。

本研究事業は、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。本研究成果が、外傷性の軟骨損傷といった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。

本研究事業は、平成23年度をもって終了いたしますが、平成24年度から「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」という新たな研究事業として再スタートいたします。主な事業の柱は、自己軟骨細胞シートによる高度医療の実現と同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究の実現です。現在2例に実施した自己細胞シートによる臨床研究を継続して、事業期間中に高度医療（第3項先進医療）による実施を目指し、臨床研究におけるプライマリーエンドポイントである安全性の評価を速やかに行います。同時に、将来的な臨床現場への普及のしやすさ、並びに企業への導出という出口を考えると、免疫応答の低い関節軟骨の再生では、レディメイドの同種細胞シートの臨床応用が不可欠とも言えます。そのために同種細胞シートの前臨床研究を速やかに実施し、同種細胞シート移植へ向けた周辺環境を整備し、自己細胞の場合と同様に、まずはヒト幹細胞臨床研究として申請し、実施を目指すものであります。本研究事業では、国内企業2社とも連携し、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を活用しながら事業化という出口を常に意識した臨床に還元できる研究を実施していく所存です。

今後とも皆様のご指導、ご鞭撻のほど何卒よろしくお願い申し上げます。

平成24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. 総合研究報告

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究 —平成21年度～23年度総合研究報告— 佐藤正人	5
--	-------	---

資料：分担研究報告

●自己細胞シート前臨床研究

1. ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果 海老原吾郎 小久保舞美 三谷玄弥 杓名寿治 長井敏洋	21
2. 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培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討 伊藤聡 小久保舞美 長井敏洋 杓名寿治 三谷玄弥 鵜養拓	31
3. Bioluminescence による細胞シート移植後の移植細胞動態に関する研究 村井邦彦 高久裕子	53
4. 培養軟骨細胞シートの安全性評価に関する研究 加藤俊一 河毛知子 渡部綾子 小林美由希	59

●同種細胞シート及び周辺技術の検討	
5. 同種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	71
6. 共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性評価 小久保舞美 三谷玄弥 沓名寿治 内山善康 繁田明義	81
7. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism 阿久津英憲 梅澤明弘 鷗養拓	95
8. 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	111
9. 光を用いた細胞シートの非侵襲的特性評価に関する検討 谷川待子 石原美弥	133
10. 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に関する研究 石原美弥 谷川待子	161
III. 研究成果の刊行（平成 21 年度～23 年度）に関する一覧表	183
IV. 研究成果の刊行物・別刷	209
V. 班会議 ー 議事録	373

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、 光を用いた細胞シート 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	国立成育医療研究センタ 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
	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 講座・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
	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
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	

研究班の構成

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	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
	内山 善康	東海大学医学部外科学系整形外科学・准教授	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
	小林美由希	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	細胞処理と安全性評価に関する研究
	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
	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	国立成育医療研究センター研究所 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
	谷川 待子	防衛医科大学校医用工学講座・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
	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

研究班の構成

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. 総合研究報告

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

— 平成21—23年度 総合研究報告 —

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:平成21年度から3箇年の予定の研究事業期間を終了するにあたり、研究分担者、協力者と共に予想以上の成果をあげることができたのでここに報告する。変形性関節症において常に混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てきた。本研究事業では、臨床研究にまで移行するというトランスレーショナルリサーチとしての大きな課題があるため、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、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すものである。本研究事業の柱は2つある。「自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究」「同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究」であるが、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、平成23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、同年10月3日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認されたことである。現在までに2例の患者に臨床応用し、現在のところ経過は良好である。本研究事業成果を次につなげ、関節軟骨の再生医療の普及に可及的速やかに役立つような方策を検討し、関係者と共に実施していく所存である。

【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
沓名寿治：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：国立成育医療研究センター研究所 生殖細胞医療研究部・室長
長嶋比呂志：明治大学農学部生命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講座・教授

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

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

【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：東海大学医学部付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

内山善康：東海大学医学部外科学系整形外
科学・准教授

繁田明義：同・講師

伊藤聡：同・大学院生

鵜養拓：同・大学院生

小林美由希：同・大学院生

河毛知子：同・研究員

渡部綾子：同・研究員

梅澤明弘：国立成育医療研究センター研究
所 生殖細胞医療研究部・部長

谷川待子：防衛医科大学校医用工学講座・
研究員

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

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ブ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) ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果（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培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討（東海大学）
- (3) Bioluminescence による細胞シ-

ト移植後の移植細胞動態に関する研究（自治医科大学）

- (4) 培養軟骨細胞シートの安全性評価に関する研究（東海大学）
- (5) ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請と承認（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) 同種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）
- (2) 共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性評価（東海大学）
- (3) 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（国立成育医療研究センター研究所、東海大学）
- (4) 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（明治大学）
- (5) 光を用いた細胞シートの非侵襲的特性評価に関する検討（防衛医科大学校）
- (6) 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に関する研究（防衛医科大学校）

研究課題毎の役割としては分担、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. 「ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果」に関する研究グループ

- 研究分担者 海老原 吾郎（東海大学）
- 研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
- 研究分担者 三谷 玄弥（東海大学）
- 研究分担者 杓名 寿治（東海大学）
- 研究分担者 長井 敏洋（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培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討」に関する研究グループ

- 研究協力者 伊藤 聡（東海大学）
- 研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
- 研究分担者 長井 敏洋（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）
- 研究協力者 鶴養 拓（東海大学）

3. 「Bioluminescence による細胞シート移植後の移植細胞動態」に関する研究グループ

- 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）

4. 「培養軟骨細胞シートの安全性評価」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 渡部 綾子（東海大学）
- 研究協力者 小林 美由希（東海大学）

5. 「同種軟骨細胞の免疫調節効果」に関する研究グループ

- 研究分担者 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. 「共培養法を用いた軟骨細胞シートの特
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 三谷 玄弥（東海大学）

研究分担者 沓名 寿治（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）

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
研究センター研究所）

研究分担者 梅澤 明弘（国立成育医療
研究センター研究所）

研究協力者 鶴養 拓（東海大学）

8. 「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）

9. 「光を用いた細胞シートの非侵襲的特性
評価、超音響原理に基づく力学特性計測法
を用いた軟骨シート移植時の機能評価」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

【1】 自己細胞シートによる再生医療を
目指した臨床研究とそのため
の前臨床研究
東海大学医学部では既に「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投入し、適切な前臨床研究を実施してヒト幹細胞臨床研究を目指す。

(1) ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた軟骨細胞シートの修復再生効果（東海大学）

本研究では大型動物であるミニブタ関節軟骨全層欠損モデルを用いて関節軟骨の修復再生効果を検討し、さらに組織修復には細胞シートが産生する液性因子も寄与していると推測し、その解析を行ったので報告する。ミニブタ関節軟骨全層欠損モデルの積層化細胞シート移植群では組織学的にsafranin-oの染色性及び、周辺組織とのintegrationも良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていた。しかし、一部の症例で家兎での実験時には見られなかったような、safranin-oの染色性が乏しい組織で修復される現象を見出し、それらの軟骨下骨の修復状況はいずれも不良であった。これらの結果から積層化軟骨細胞シートは関節軟骨修復に寄与すると考えられるが、動物実験モデル、培養条件、移植条件等はさらなる検討を要する。また、積層化細胞シートの産生する液性因子は軟骨の分化や組織修復に関与するCOL2、MIA、TGF-βの分泌が上昇し、MMP-13は0.05ng/ml以下と常に抑制されていることを確認した。これらの結果から軟骨組織修復・再生には積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子との相互作用が関与している可能性が示唆された。

本研究結果は *Biomaterials* 誌 2012 に掲載された。

（２）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培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討（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、家兔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。以前の報告では、滑膜細胞移植だけでは関節軟骨表層に線維性組織の混入が認められたが、軟骨細胞シートを併用することで site dependent な differentiation 効果を高めることで良好な組織修復が得られたものとする。本研究結果は *Biomaterials* 誌 2012 に掲載予定である。

（３）Bioluminescence による細胞シート移植後の移植細胞動態に関する研究（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、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。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 18 カ月以上検出された。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。

（４）培養軟骨細胞シートの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、通常の培養期間を超えて過継代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 2 種類の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。評価プロトコールとしての moving average と ADAM2 threshold の変化を精査、確認し、その結果、CNV は認めず安全性に問題ないことが確認された。さらに 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。東海大学で開発された軟骨細胞シートによる関節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チームによる総合的な研究体制を構築した。

（５）ヒト幹細胞を用いた臨床研究計画の申請と承認（東海大学）

一連の研究結果により、有効性と安全性は十分担保されると判断し、「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、平成23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、同年10月3日に厚生労働大臣の「ヒト幹細胞臨床研究について」の意見書の発出（厚生労働省発医政1003第3号）をもって、同年11月29日に第1例目の臨床研究を開始した。現在2例を実施中であるが、いずれも経過は良好である。

【2】同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究

将来的な再生医療の普及を目指した場合、セルソースとして同種軟骨細胞を使用することが望ましい。関節軟骨は、同種移植後に恐らく免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器移植の1つとなり得る。本研究では、同種軟骨細胞シート移植のために直面すると思われる諸問題を解決するために実施する。

（1）同種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が明らかにされてきているが、この技術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。そこで本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、培養軟骨細胞およびその積層化シートが免疫系に与える影響を*in vitro*で検討した。H22年度は検討対象を主にマウス軟骨細胞にし、*in vitro*でマウスリンパ球の活性化（細胞増

殖)におよぼす影響を検討した。その結果、軟骨細胞は同種だけでなく異種リンパ球の活性化も抑制することが確認できた。H23年度は検討対象をヒトにして検討を行ったところ、同種軟骨細胞は免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化T細胞の増殖を抑制することを認めた。さらに、積層化軟骨細胞シートも活性化T細胞増殖抑制効果を維持していることが確認できた。これらのことより、関節軟骨損傷の治療に同種積層化軟骨細胞シートを使用出来る可能性が示唆された。

（2）共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性評価（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。

（3）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（国立成育医療研究センター研究所、東海大学）

MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs of ~22 base pairs that regulate gene expression. We harvested cartilage tissue from patients with polydactylyism, anterior cruciate ligament injury, and osteoarthritis undergoing total knee arthroplasty and used microarrays to

identify miRNAs whose expression is upregulated or downregulated with age. The results were assessed by real-time PCR and MTT assay in a mimic group, in which synthetic double-stranded RNA from the isolated miRNA was transfected to upregulate expression, and in an inhibitor group, in which the miRNA was bound specifically to downregulate expression. The expression of two miRNAs (miR-199a-3p and miR-193b) was upregulated with age and that of one miRNA (miR-320c) was downregulated with age. A real-time PCR assay showed that type 2 collagen, aggrecan, and SOX9 expression were downregulated in the miR-199a-3p mimic group but was upregulated in the inhibitor group. Similar results were observed for miR-193b. By contrast, ADAMTS5 expression was downregulated in the miR-320c mimic group and upregulated in the inhibitor group. Cell proliferative activity was upregulated significantly in the miR-193b inhibitor group compared with the control group. We believe that miR-199a-3p and miR-193b are involved in the senescence of chondrocytes, and miR-320c is involved in the juvenile properties of chondrocytes.

（４）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（明治大学）

軟骨細胞シートの臨床応用に際して、シートを用時調製することに加えて、今後は凍結保存シートの利用を視野に入れること

を目指していく。軟骨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、細胞シートの低温保存ならびに凍結保存に取り組んだ。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。凍結保存研究では、哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等実績のあるガラス化法を細胞シートに適用し、実用性の高いガラス化保存法の開発に成功した。細胞シートの臨床応用に際して、シートを用時調製することに加えて、今後は凍結保存シートの利用が可能になるであろう。

（５）光を用いた細胞シートの非侵襲的特性評価に関する検討（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。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て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。

（６）光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた軟骨シート移植時の機能評価に関する研究（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、対象の組織に対して非侵襲的で、繰り返し計測が可能であることから、評価に適している。そこで、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、軟骨シート移植前の移植部位の計測をした。その結果、正常部と変性部を対象にした測定値より、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。

D. 結論

本研究事業では、臨床研究にまで移行するというトランスレーショナルリサーチとしての大きな課題があるため、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、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すものである。本研究事業の柱は2つある。「自己細胞シートによる軟骨再生医療の臨床研究」「同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究」であるが、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、平成23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、同年10月3日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認されたことである。現在までに2例の患者に臨床応用し、現在のところ経過は良好である。本研究事業成果を次につなげ、関節軟骨の再生医療の普及に可及的速やかに役立つような方策を検討し、関係者と共に実施していく所存である。

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 (Edited by: Archer C, Ralphs J) : Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues, 10. Cell sheet technologies for cartilage repair. WOODHEAD Publishing,

CRC Press LLC, 251-265, 2010.01.

2) 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.

3) Sato M, Ishihara M, Mitani G, Kutsuna T, Lee J Ik, Kikuchi M, Mochida J (Edited by: Garcia A, Durand C) : Bioengineering : Principles, Methodologies and Applications. Chapter 7: Development of a diagnostic system for osteoarthritis is using a photoacoustic measurement method and time-resolved auto-fluorescence. Nova Science Publishers, Inc, 179-190, 2010.12.

4) 佐藤正人 : 運動器疾患の予防と治療, 3. 変形性膝関節症の早期診断と治療の進歩, 軟骨機能診断システムによる治療効果判定. 財団法人 長寿科学振興財団, 97-107, 2011.03.

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) Ishihara M, Bansaku I, Sato M, Mochida J, Kikuchi M : Multifunctional characterization of engineered cartilage using nano-pulsed laser. IFMBE Proceedings 25(X), 69-70, 2009.09.

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. 医療機器学 79(7), 578-579, 2009.10.

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), 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 9(98), 2009.12.

7) Ishihara M, Sato M, Matsumura K, Mochida J, Kikuchi M : Development of the hyperspectral cellular imaging system to apply to regenerative medicine. Progr. Biomed. Opt. Imaging Proc. SPIE , 7566061-5, 2010.01.

8) 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 16(3), 365-373, 2010.02.

9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 佐藤正人: 関節軟骨を機能に基づいて正しく評価するために. *HUMAN SCIENCE* 22(2), 13-17, 2011.04.
- 16) 佐藤正人: 関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨の役割. *整形外科* 62(6), 550, 2011.06.
- 17) Sato M, Ishihara M, Kikuchi M, Mochida J: A diagnostic system for articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine* 43, 421-432, 2011.06.
- 18) 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 菊地眞, 持田讓治: ナノ秒パルスレーザーによる鏡視下関節軟骨の機能評価. *整形・災害外科* 54(7), 839-843, 2011.06.
- 19) Sato M, Ishihara M, Kikuchi M, Mochida J: The influence of Ho:YAG laser irradiation on intervertebral disc cells. *Lasers in Surgery and Medicine* 43(9), 921-926, 2011.10.
- 20) Lee JI, Sato M, Kim HW, Mochida J: Transplantation of scaffold-free spheroids composed of synovium-derived cells and chondrocytes for the treatment of cartilage defects of the knee. *European Cells and Materials* 22, 275-290, 2011.11.
- 21) 長井敏洋, 佐藤正人, 持田讓治: 抗VEGF ヒト化モノクローナル抗体投与による関節軟骨修復. *リウマチ科* 46(4), 406-414, 2011.
- 22) 高久裕子, 村井邦彦, 鶴養拓, 伊藤聡, 小久保舞美, 小林英司, 竹内護, 持田讓治, 佐藤正人: ラット膝関節内へ移植した細胞シートの Bioluminescence による経時的評価. *臨床整形外科* 47(1), 27-31, 2012.01.
- 23) 佐藤正人, 石原美弥, 菊地眞, 持田讓治: レーザー・光技術の整形外科領域への応用と展望. *O plus E* 34(2), 139-144, 2012.01.
- 24) Ebihara G, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ito S, Ukai