

2012.06013A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成25年 4月

はじめに

本研究報告書は、平成 24 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 5 年計画の事業として採択された「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 (H24-再生一般-003)」に関する平成 24 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。

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ー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では認められなかった治療効果であり、変形性関節症において常に混在するこれら 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拡大できるポテンシャルを有します。

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、「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たものです。厚生労働大臣通知(厚生労働省発医政 1003 第 3 号平成 23 年 10 月 3 日)により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例が東海大学医学部付属病院で実施されました。臨床研究で安全性評価を速やかに行い、所定の症例数を経て、治療効果を確認し先進医療での実施を目指します。将来的には、患者の手術侵襲を減らすためにも、免疫応答の低い軟骨組織ではレディメイドの同種細胞シートでの実施が不可欠であると考えます。企業治療の可能性を検討しながら、自己細胞シートの場合と同様にヒト幹細胞臨床研究の実施を検討していきます。

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、変形性関節症の克服に貢献できることを目指して、研究分担者、研究協力者の方々と研究を進めております。いつも、本事業を支えてくださっている全ての関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

平成 25 年 4 月

東海大学医学部外科学系整形外科学 教授 佐藤 正人

目 次

I. 研究班の構成	1
II. 総括研究報告	
関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 —平成24年度総括研究報告— 佐藤正人	3
III. 分担研究報告	
●自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現	
1. 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価 横山宗昂 石原美弥 三谷玄弥 高垣智紀 小林美由希 小久保舞美 岡田恵里	13
2. 自己細胞処理と安全性評価に関する研究 加藤俊一 小林広幸 三上礼子 小林美由希 小久保舞美 岡田恵里 河毛知子 渡部綾子 伊東紀子 的場亮	21
●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	
3. Array Comparative Genomic Hybridization 及び Gバンド分染法を用いた同種軟骨細胞の安全性評価 阿久津英憲 梅澤明弘 小林美由希 岡田恵里 河毛知子 伊東紀子 的場亮	29

4. 同種細胞シートの保存法に関する研究 長嶋比呂志 前原美樹	-----	35
5. 積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響 加藤玲子 小久保舞美 河毛知子	-----	49
IV. 研究成果の刊行（平成 24 年度）に関する一覧表	-----	57
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	63
VI. 班会議 ー議事録・発表資料ー	-----	103
VII. 実地調査 ー議事録ー	-----	185

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・教授	整形外科学 軟骨再生医療	研究統括・研究計画立案 ヒト幹細胞臨床研究
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	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	沓名 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	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	海老原吾郎	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	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	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	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	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	ヒト幹細胞臨床研究、 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	同種細胞処理とバンキ ング、安全性評価に関す る研究
	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療 学系臨床薬理学・教授	臨床検査医学	同種細胞のレギュレー ションと安全性評価に 関する研究
	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療 学系臨床薬理学・講師	レギュラトリー サイエンス	同種細胞のレギュレー ションに関する研究、 薬事戦略相談担当
	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	同種細胞処理と品質評 価に関する研究
	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	同種細胞の保存法に関 する研究、大型動物実験
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	高垣 智紀	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	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
	横山 宗昂	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	ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価
	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
	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系 整形外科学・特定研究員	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	同種細胞処理と品質評 価に関する研究
	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
	前原 美樹	明治大学農学部生命科学 科発生工学研究室・研究 アシスタント	発生工学	同種細胞の保存法に関 する研究、大型動物実験
	的場 亮	株式会社 DNA チップ研 究所・代表取締役・社長	遺伝子・ゲノム 解析	培養細胞の安全性評価 に関する研究
	伊東 紀子	株式会社 DNA チップ研 究所・研究開発部	遺伝子・ゲノム 解析	培養細胞の安全性評価 に関する研究
	坂井 秀昭	株式会社セルシード・知 的財産部	細胞シート工学	専用器材やサポートす る治具の設計検討
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

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 — 平成24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・教授

研究要旨：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、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。本研究事業の柱は2つである。「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」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」であるが、それぞれに対して研究分担者、研究協力者の方々と共に実施した内容を、今年度の研究報告としてまとめる。

現在実施中の「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」は、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。平成25年3月31日までに7症例がエントリーし、4症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1例、第2例は移植後1年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

【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

沓名寿治：同・講師

海老原吾郎：同・講師

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

小林広幸：東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授

三上礼子：東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師

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生工学研究室・教授

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】

高垣智紀：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

小林美由希：同・大学院生

横山宗昂：同・大学院生

河毛知子：同・研究員

岡田恵里：同・特定研究員

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

石原美弥：防衛医科大学校医用工学講座・教授

前原美樹：明治大学農学部生命学科発生工学研究室・研究アシスタント

的場亮：株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長

伊東紀子：株式会社 DNA チップ研究所・
研究開発部

坂井秀昭：株式会社セルシード・知的財産
部

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23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2,958万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も23.1%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19.4%（平成22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（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軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政1003第3号平成23年10月3日）により、東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。本臨床研究により安全性の評価を速やかに行うと共に、先進医療としての実施を目指す。また、将来的な普及の観点から、免疫応答の低い軟骨組織では、レディメイドの同種細胞シートでの実施が不可欠であり、まずは前臨床研究を行い、同種移植へ向けた周辺環境を整備し、企業治験の可能性を検討しながら、自己細胞シートの場合と同様にヒト幹細胞臨床研究の実施を目指すものである。

B. 研究課題

【1】自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現

- （1）自己細胞シートによる臨床研究「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の実施（東海大学、防衛医科大学校）

【2】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

- （1）「複数の同種細胞ソースの検討」と「細胞ソースの選択とバンキング

システムの構築」（国立成育医療研究センター研究所、東海大学、株式会社DNAチップ研究所）

- (2) 「細胞シートの保存技術開発」と「パッケージ技術開発」（明治大学）
- (3) 軟骨細胞シートの同種免疫反応に関する研究（国立医薬品食品衛生研究所、東海大学）

研究課題毎の役割としては、今年度は、研究分担者、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. 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価」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 小久保 舞美（東海大学）
研究協力者 石原 美弥（防衛医科大学校）
研究協力者 高垣 智紀（東海大学）
研究協力者 小林 美由希（東海大学）
研究協力者 横山 宗昂（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（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）
研究分担者 小林 広幸（東海大学）
研究分担者 三上 礼子（東海大学）
研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
研究協力者 小林 美由希（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（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 伊東 紀子（株式会社DNAチップ研究所）
研究協力者 的場 亮（株式会社DNAチップ研究所）

3. 「Array Comparative Genomic Hybridization及びGバンド分染法を用いた同種軟骨細胞の安全性評価」に関する研究グループ

研究分担者 阿久津 英憲（国立成育医療研究センター研究所）
研究協力者 梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）
研究協力者 小林 美由希（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（東海大学）
研究協力者 河毛 知子（東海大学）
研究協力者 伊東 紀子（株式会社DNAチップ研究所）
研究協力者 的場 亮（株式会社DNAチップ研究所）

4. 「同種細胞シートの保存法に関する研究」に関する研究グループ

研究分担者 長嶋 比呂志（明治大学）
研究協力者 前原 美樹（明治大学）

5. 「積層化軟骨細胞シートの同種T細胞におよぼす影響」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）
研究協力者 河毛 知子（東海大学）

C. 研究結果

【1】自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現

「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。本臨床研究による安全性の評価を速やかに行うとともに、先進医療の実現を目指している。

（1）細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価（東海大学、防衛医科大学校）

軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部附属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。

平成25年3月31日までに7症例がエントリーし、4症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1例、第2例は移植後1年を経過し臨床研究を終了した。これまでに移植後1年経過した2症例に関しては、術後1年後の臨床評価スコア、単純レントゲン写真、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

今後は移植症例数をさらに追加し、軟骨

細胞シート移植による関節治療効果の検討を進め、先進医療としての実現を目指す予定である。

（2）自己細胞処理と安全性評価に関する研究（東海大学、株式会社 DNA チップ研究所）

我々は温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により、積層化軟骨細胞シートを作製し、その修復再生効果を確認してきた。本学で開発された培養軟骨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、ヒト幹細胞臨床研究指針に準拠して厚労省へ申請する際の安全性評価として、自己培養軟骨細胞をシート化する際の試験評価方法の確立を目的として検討を行った。

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、通常の培養継代期間を超えて培養した軟骨細胞について、aCGH解析、Gバンド分染法を用いて安全性の評価を検討した。aCGH解析、Gバンド分染法により自己軟骨細胞の培養中（培養期間、培養作業）によるコピー数の異常は生じないことが確認された。このことから自己培養軟骨細胞をシート化する際の試験評価方法を確立し、現在、臨床サンプルを用いて検証中である。

【2】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

（1）Array Comparative Genomic Hybridization 及び G バンド分染法を用いた同種軟骨細胞の安全性評価（国立成育医療研究センター研究所、東海大学、株式会社 DNA チップ研究所）

変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。自己細胞による細胞シート移植においては、変形性膝関節症が既に存在する組織の細胞を使用する 경우가多く、同種移植には細胞ソースの検討及びaCGHに追加して核型解析による安全性試験を行う必要があると考えられ、そのため本研究を行った。

我々が同種細胞移植として検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症由来軟骨細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する際の安全性の評価としては、培養中に生じた変化の検知と、細胞ソース由来の遺伝子異常を考慮する必要があり、それらの評価にはaCGH及びGバンド分析法がそれぞれ適していると考えられ、これらを同種軟骨細胞移植の安全性評価として併用することの意義は大きい。

（2）同種細胞シートの保存法に関する研究（明治大学）

ヒト軟骨細胞シートの凍結保存法の確立を最終目的として、ウサギおよびブタ軟骨細胞シートを用いてガラス化凍結保存法を開発した。これまでに、哺乳動物胚・卵子に有効なガラス化法のコンセプトが細胞シートの保存に適用し得ることを示

してきた。すなわち、保存液の容量を最小化する最小容量冷却(Minimum Volume Cooling: MVC)法のコンセプトに基づいて細胞シートをガラス化することによって、シート構造を破損することなく、高い細胞生存性を保った状態での超低温保存が可能であることを明らかにしてきた(coating法)。我々が開発したcoating法を、さらに実用的技術として発展させるために、パッケージに収容する方法(envelop法)も開発した。

本年度の研究から、これらの方法の再現性が確認されるとともに、envelop法では細胞生存性が有意に低下するという課題も顕在化した。一方で、ガラス化されたウサギ軟骨細胞シートは、細胞外マトリックス(ECM)の主要成分であるタイプIIコラーゲンとプロテオグリカンを正常に維持していることが確認された。また、本研究で開発したガラス化法が、より脆弱なブタ軟骨細胞シートにも適用可能であることや、凍害保護剤として細胞毒性の高いDMSOを除外できる可能性が示唆された。

（3）積層化軟骨細胞シートの同種T細胞におよぼす影響（国立医薬品食品衛生研究所、東海大学）

同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種積層化軟骨細胞シートが免疫系に与える影響をin vitroで検討した。その結果、同種積層化軟骨細胞シート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。さらにこの抑制効果の一部分にTGF- β が関与していることが示唆された。これらのことより、関節軟骨損傷の治療には、自己だけでなく

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。

D. 結論

本研究事業の 2 つの大きな課題である「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」並びに「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」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、平成 25 年 3 月 31 日までに 7 症例がエントリーし、4 症例に軟骨細胞シート移植を施行したことである。第 1 例、第 2 例は移植後 1 年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

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) 伊東紀子, 佐藤正人, 的場 亮, 梅澤明弘. 幹細胞医療の実用化技術と産業展望, 第 7 章 品質評価, 2 新しい評価法としてのアレイ CGH 法. シーエムシー出版, 256 - 261, 2013.

2. 論文発表

1) Sato M, Shin-ya K, Lee JI, Ishihara M, Nagai T, Kaneshiro N, Mitani G, Tahara H, Mochida J. Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential. BMC Musculoskelet Disord 13(1):51, 2012.04.

2) Ito S, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J. Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. Biomaterials 33(21), 5278-5286, 2012.07.

- 3) 佐藤正人. 【総説】ナノ秒パルスレーザー. 整形外科 63(9), 980, 2012.08.
- 4) Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. J Orthop Res 30(12), 1915-1922, 2012.12.
3. 学会発表
- 1) Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Ukai T, Kobayashi M, Mochida J. Early intervention to prevent cartilage degeneration by administration of anti-VEGF antibody in rabbit model. 2012 World Congress on Osteoarthritis Research Society International, 2012.04.
- 2) 佐藤正人. 【講演】関節軟骨の再生医療と軟骨修復に適した体内環境の構築. 再生医療を推進する議員の会, 東京, 2012.05.
- 3) 佐藤正人, 石原美弥, 菊地 眞, 持田讓治. 【シンポジウム】医工融合による臨床応用—関節鏡視下光音響プローブの開発. 第51回日本生体医工学会大会, 福岡, 2012.05.
- 4) 佐藤正人, 加藤俊一, 加藤玲子, 阿久津英憲, 長嶋比呂志, 村井邦彦, 石原美弥, 中村嘉彦, 三谷玄弥, 高垣智紀, 海老原吾郎, 伊藤 聡, 小林美由希, 小久保舞美, 持田讓治. 【シンポジウム】細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究. 第11回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2012.06.
- 5) 伊藤 聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 小林美由希, 鶴養 拓, 長井敏洋, 沓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治. 積層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植による関節軟骨治療効果の検討. 第11回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2012.06.
- 6) 小林美由希, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 横山宗昂, 鶴養 拓, 伊藤 聡, 長井敏洋, 林 克之, 伊東紀子, 持田讓治. 培養軟骨細胞の安全性評価—CGH (Comparative Genomic Hybridization)解析による検討—. 第11回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2012.06.
- 7) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田讓治, 松岡厚子. *in vitro*における同種軟骨細胞（シート）の免疫応答におよぼす影響. 第11回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2012.06.
- 8) 前原美樹, 松成ひとみ, 金井貴博, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 佐藤正人, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートの新規ガラス化保存法の開発. 第11回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2012.06.
- 9) 佐藤正人. 【シンポジウム】軟骨細胞シートの事例からみたヒト幹細胞臨床研究の取り組み. 第2回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京, 2012.09.
- 10) Kobayashi M, Sato M, Kawake T, Yokoyama M, Kokubo M, Ukai T, Ito S, Nagai T, Hayashi K, Ito N, Mochida J. Safety evaluation of cultured chondrocytes by comparative genomic hybridization analysis. 3rd TERMIS World Congress 2012, Tissue Engineering and regenerative Medicine, Austria, Vienna, 2012.09.
- 11) Sato M, Ebihara G, Nagai T, Mitani G, Kutsuna T, Kokubo M, Kobayashi M, Yamato M, Okano T, Mochida J. 【Symposium】 Cartilage repair in

transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. 3rd TERMIS World Congress 2012, Tissue Engineering and regenerative Medicine, Austria, Vienna, 2012.09.

12) 長井敏洋, 佐藤正人, 鶴養 拓, 小林美由希, 持田讓治. 抗 VEGF 抗体ヒトモノクローナル抗体による関節軟骨予防効果. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012.10.

13) 浜橋恒介, 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 長井敏洋, 海老原吾郎, 杳名寿治, 持田讓治. 積層化軟骨細胞シートによって分泌された液性因子の検討. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012.10.

14) 佐藤正人. 【招待講演】軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究. 文部科学省イノベーションシステム整備事業「再生医療本格化のための最先端技術融合拠点」第 5 回シンポジウム, 東京, 2012.11.

15) Sato M. 【講演】Biological articular cartilage repair using cell sheet. The 7th International Congress of Chinese Orthopaedic Association (COA2012), Int. Beijing, China, 2012.11.

16) 佐藤正人. 【教育研修講演】細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究. 栃木県臨床整形外科医会, 栃木, 2012.11.

17) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 持田讓治, 松岡厚子. 積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響. 第 50 回日本人工臓器学会大会, 福岡, 2012. 11.

18) Nagai T, Sato M, Ukai T, Kobayashi M, Mochida J. Anti VEGF antibody contributes to better repair of articular

cartilage. 2013 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Antonio, Texas, 2013.01.

19) Hamahashi K, Sato M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Mochida J. Analysis of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. 2013 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Antonio, Texas, 2013.01.

20) 佐藤正人. 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨再生医療の実現へ向けた取り組み. 第 4 回スーパー特区シンポジウム「細胞シートによる再生医療実現プロジェクト」, 東京, 2013.02.

21) 佐藤正人. 家兔変形性関節症モデルを用いた抗 VEGF 抗体剤による軟骨修復再生効果. 総合医学研究所第 4 回シンポジウム& 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業進捗報告会, 東京, 2013.02.

22) 佐藤正人. 【The Johnson & Johnson Innovation Award 受賞講演】Realization of cartilage regeneration by cell sheet accelerating joint treatment. 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2013.03.

23) 佐藤正人, 持田讓治. 【パネルディスカッション】細胞シートによる関節軟骨の再生医療と体内環境の構築. 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2013.03.

24) 小林美由希, 佐藤正人, 河毛知子, 横山宗昂, 小久保舞美, 三谷玄弥, 高垣智紀, 的場 亮, 伊東紀子, 持田讓治. Array Comparative Genomic Hybridization および G バンド分染法を用いた軟骨細胞の安全性評価. 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2013.03.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅲ. 分担研究報告

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価

研究協力者	横山 宗昂	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
	石原 美弥	防衛医科大学校医用工学講座医用工学・教授
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
研究協力者	高垣 智紀	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
	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
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
研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員

研究要旨：本研究事業の目的は「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」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」である。軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例が実施された。平成 25 年 3 月 31 日までに 4 例の軟骨細胞シート移植が終了し、第 1 例と第 2 例は移植後 1 年を経過し臨床研究を終了した。今後は本臨床研究による安全性の評価を速やかに行うとともに、先進医療の実現を目指している。

研究実施予定期間：承認後～3 年間

予定症例数：10 例（プライマリーエンドポイントである安全性の評価が十分に達成できたと判断した場合、本臨床研究は予定症例数に達しなくても終了する。）

A. 選択基準

以下の選択基準を全て満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

1. 20 歳から 60 歳までの性別を問わない患者
2. （外傷または変性により生じた）膝関節軟骨損傷を有するもの
3. 関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類で Grade III 以上のもの
4. 膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに 1.0cm² 以上 4.2cm² 未満の軟骨欠損を有し、従来骨髄刺激法やモザイクプラスティなどが適応となる患者

B. 除外基準

下記の除外基準に 1 つでも当てはまる患者は対象としない。

1. 患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合
2. 重大な合併症を有している場合
3. 問題となるような感染症（HBV、HCV、HIV、HTLV、FTA-ABS 等の陽性を含む）を有している場合

以上より、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の被験者としての確であると判断した患者に対して、時期を変えて 2 回の臨床研究に関するインフォームドコンセントが取れた場合に開始し、細胞シート作製のために軟骨および滑膜組織を採取した。

C. 検査・評価項目とスケジュール

- 1) 臨床評価

臨床評価基準として、Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score での評価を術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施する。

2) 単純レントゲン写真

関節裂隙、軟骨下骨の状態、関節症の進行の有無を評価する。関節症の進行度はKellgren-Lawrence grading scale (※1)を用いて術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

3) MRI 検査

経時的な軟骨の厚み、性状の変化を評価し、Nelson MRI Grading (※2)を用いて、術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

4) 関節鏡

術後1年の時点での関節表面の軟骨性状（色調、硬さ、平滑性）、Outerbridge分類(※3)を評価する。また痛みや関節の腫脹などが生じた場合には適宜実施し軟骨の状態を評価する。

5) 超音響法検査

術後1年の時点での関節軟骨の粘弾性特性を定量的に評価するために、我々が独自に開発した機能診断装置により、関節鏡視下に移植部と周辺軟骨部の軟骨を評価する。本評価法は東海大学医学部臨床研究審査委員会承認下で、東海大学医学部付属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

6) 病理検査

関節鏡を行った際に再生組織の一部を生検し、Safranin-O 染色を行い、Modified

Mankin Score(※4)を用いて客観的に組織学的評価を行う。

D. 軟骨細胞シート移植症例報告

Entry No.1

43歳男性

2011.12.21 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 36

KOOS score Total : 47.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

関節鏡 : grade3

【術後1ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 67.9

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

【術後3ヶ月】

Lysholm score : 67

KOOS score Total : 76.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後6ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 86.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後1年】

Lysholm score : 85

KOOS score Total : 79.8

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade1