

再現性の確認と、標識蛍光色素を入れ換えてコントロールをとる dye swap がある。最近のサンプルは全て dye swap を行い、結果が反転していることを確認している。

リファレンスに HAPMAP DNA (正常 DNA)、テストサンプルに骨肉腫 DNA を用いた解析では、Moving Average 10pt での dye swap で反転した結果が得られた。この 9 番染色体を見てみると 41.5Kb のホモ欠失が確認された。この欠失は肺腺癌や胆道癌などに関わる癌抑制遺伝子上に存在していた。このように微細な領域の異常を検出できるアレイ CGH 解析法を、軟骨細胞の安全性評価に応用する事が第一の目的である。アルゴリズムや閾値は、通常がん等の変化のあるものの発見に開発されたものである為、安全性評価に適したものを現在検討している。また、現在使用しているアレイは全染色体を網羅的にプローブが配置されたものである。より安全性評価に適したものにす為、がん関連遺伝子を特に高密度に搭載したカスタムアレイの開発を行っており、現在設計が終了し Agilent 社に発注中で、今後こちらのアレイでも検討を進めたいと思っている。

#### <質疑応答>

佐藤：この最後の網羅的かつ、がん関連遺伝子を高密度に搭載したものがカスタムアレイなのでしょうか。

伊東：そうです。培養細胞の安全性評価の為のものです。

佐藤：それは、何をターゲットにしているのでしょうか。軟骨がターゲットなのでしょうか。

伊東：軟骨に限らずあらゆる培養細胞の安全性評価に適したものとなっています。

佐藤：現在、受入の時は G バンド等で、培養の途中の変化に関しては CGH で確認できないかと考えています。通常の培養期間を超えた過継代のものに培養の工程で異常が出てこないかどうかをしっかりと確認して、安全性を担保するという取り組みで行なっています。

佐藤：CGH を行なった後で、カスタムアレイもやるという事なのでしょうか。

伊東：全染色体を網羅し、かつがん関連遺伝子を高密度に搭載したデザインなので、そのアレイだけで対応できると思います。

#### (5) 「自己培養軟骨細胞の安全性評価技術に関する研究」

研究協力者 岡田恵里 (東海大学)

自己培養軟骨細胞シートの安全性評価に適した試験評価法の確立を目的とし検討を行なった結果、試験評価法を通じて安全性を確認できたので報告する。

評価項目として 3 試験検討した。造腫瘍性否定試験では、腫瘍形成の有無を確認した。G バンド分染法では、自己細胞が保有している染色体異常の有無を確認した。アレイ CGH 解析では、細胞の培養中による影響を確認した。造腫瘍性否定試験は、平成 23 年度までに腫瘍形成の有無を確認し、造腫瘍性は認められなかった。アレイ CGH 解析は、網羅的な解析により遺伝子異常を検出する方法であり、微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出などの解析が行える。試験は、解析レベル ADM-2 を 10pt、チップサイズ 8×60K を用い、細胞培養中の変

化の有無を確認した。染色体の部位、特異的ゲノム DNA クローン、がん関連遺伝子を含むゲノムコピー数の異常が、Moving Average の基線からのずれとして可視的に評価する事ができる。平成 23 年度までに、正常軟骨サンプルとして前十字靭帯再建術で採取した軟骨（正常軟骨 ACL-AC）と、傷んでいる患者サンプルとして人工膝関節置換術で採取した（患者軟骨 TKA-AC）を、P2（P：継代）、P4、P6 の継代数で用いた。P2 を基準とし、継代中の変化の有無を P4、P6 と比較し確認した。平成 24 年度は、P12 まで用いて新たに TKA-AC を 4 サンプル追加し解析した。結果、ACL-AC では、全解析において培養軟骨細胞の染色体コピー数の異常は認められなかった。TKA-AC では、患者由来の 7 番染色体の異常を認めた以外、染色体コピー数異常は認められなかった。7 番染色体異常は OA で起因するという論文の報告がある。G バンド分染法では、P2、P4、P6、P12 の継代数を用い、ACL-AC と TKA-AC を細胞分裂中期（M 期）の 20 細胞を解析バンドレベル 300~400bp で解析した。この方法により、異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出することができる。結果、ACL-AC では異常は認められなかったが、TKA-AC では、アレイ CGH で認められた 7 番染色体コピー数異常がトリソミーとして確認された。これ以外は、培養過程で継続的に観察される染色体異常は認められなかった為、培養中の影響は認められないと考えられた。

3 試験の結果より、造腫瘍否定試験での腫瘍形成は認められず、G バンド分染法で OA 症状以外の染色体異常は認められず、アレイ CGH 解析で細胞培養中の影響による染色体異常はないことが確認され、自己培養軟骨細胞の安全性は確認されたと考えられる。

#### < 質疑応答 >

佐藤：TKA というのは人工関節置換術時の患者さんのもので、OA も末期の方で御高齢の方のものになります。7 番染色体のトリソミーは、OA の患者さんで高頻度に観察される異常です。

阿久津：7 番は OA の染色体異常の欠失なのか増幅なのか、どちらでしょうか。

岡田：CGH 解析では基線からのずれで確認されていて、G バンド分染法でトリソミーであることが分かりました。

加藤（玲）：TKA の P2、P4 で比較したのか、ACL と TKA の P2、P4 で検討したのか、どちらでしょうか。

岡田：自己の移植を考えて行なっているので、TKA の患者さんの P2 と P4 を比べています。

加藤（玲）：まだ他にも変化があるように見えているのですが。

岡田：トリソミーの細胞は増えていく場合もありますし、増えずに一定のレベルを保っている場合もあります。

加藤（玲）：この例だと、増えたか減ったかしているということなののでしょうか。もともとトリソミーだったら、さらに継代ごとに増えるか減るかしているという事なのですね。

佐藤：P2 でもそもそも、トリソミーがあるからという意味でしょうか。

加藤（玲）：はい。継代して、消えなければ 0 になると思うのですが。

伊東：以前 G バンド分染法の結果を見せていただいたところ、P2 ですすでに 20 細胞中に 1 個トリソミーがありました。それがたまたま 20 個中 1 個あったのかどうかは分かりませんが、この場合は、継代毎に増えていっています。

加藤（玲）：OAの方は7番染色体がトリソミーしやすいのでしょうか。

佐藤：ある頻度で認められてくるもののようです。自分の細胞だから染色体異常があっても、そういうものを移植していいのかという議論はありますが、多指症の検体には認められていないので、お年寄りの方のサンプルよりは遺伝子的な事を考えるといいのかなと思います。

的場：最初は7番染色体に異常があるものと正常なものがヘテロな状態にあって、例えば異常があるものが多く増えれば結果トリソミーとしてGバンドで多数みつかるという事だと思います。培地の条件等でもまた変わってくる可能性もあると思います。

佐藤：軟骨細胞はどんどん脱分化していってしまうので、使用出来てP2くらいまでだと考えています。過継代というのは、より安全性を見た時に体内に入れた時にどれくらいの安全性を担保できるかというところで、このような検討で評価をしています。自己のヒト幹指針申請時に本日挙げたデータの全てではないのですが、P6までの結果でバリデーションとして安全性を認められた結果も含まれています。

#### (6)「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」

研究協力者 河毛知子（東海大学）

現在我々は、自己培養軟骨細胞シートの修復再生効果と安全性を臨床研究で確認している。同種細胞移植を見据え、細胞ソースの安全性評価を検討したので報告する。自己細胞による細胞シート移植においては、OAがすでに存在している細胞を使用する事が多く、報告の通りこの原疾患に関する7番染色体の異常を検知している。7番染色体の異常以外、明らかなコピー数異常は認められていないが、7番染色体に着目すると継代を重ねる事で顕著となるものもある為、Gバンド分染法で確認した。

成育医療研究センター研究所から譲渡頂いた多指症の軟骨細胞は、手術時廃棄組織であるが優れた増殖性を持ち、非常に期待できる細胞ソースである。同種移植の安全性の確認として、多指症由来軟骨細胞8例、平均年齢1歳1か月を使用し評価した。アレイCGHの解析条件はMoving Average 10pt、ADM-2とし、自己培養軟骨細胞シートの安全性評価と同様の解析条件で第12継代まで用い解析を行った。また、Gバンド分染法ではP1の細胞の核型を確認した。アレイCGHの結果、dye swapでの確認で、8例全てにおいて基線からのずれは確認されず継代による明らかなコピー数異常は認められなかった。Gバンド分染法では、P6で20細胞中1細胞のみに核型異常が検出された。ISCNのガイドラインでは同じ異常を持つ少なくとも2つ以上の細胞をクローンとすることから、将来生体内で自然淘汰される可能性が高いとされている為、特に問題視する必要はないものと考えられた。

Gバンド分染法は、細胞1つ1つの染色体異常を検出出来るのに対し、微細な遺伝子異常の検出は出来ない。アレイCGHはゲノムワイドだが、微細な遺伝子異常の検出は出来ない。Gバンドで細胞ソース由来の異常を検出し、アレイCGHで培養中に生じる変化を捉えることで、移植に供

する細胞が目的外の変化がないことを確認することが可能であると示唆される。

我々が同種軟骨細胞移植の細胞ソースとして考えている多指症由来軟骨細胞は、手術時廃棄組織であるが高い増殖活性を示しP1ストックを起こしてから約2週間で2継代進める事が可能で、理論値ではあるが積層化細胞シート約745枚分作製可能である。安全性評価としては、細胞ソース由来の異常の検知と培養中に生じる変化を捉える必要があり、それぞれアレイCGH法とGバンド分染法が適していると考えられる。来年度は、aCGHとGバンドでどちらかで陽性が出た検体は移植細胞ソースとしてのin vitro安全性評価不適合とし、サンプル数を増やして検討していく。また、NOGマウスへ移植する造腫瘍性否定試験についても検討していきたい。

#### <質疑応答>

阿久津：多指症も今の培養法のままで出来るのか、または多少修正が必要なのでしょうか。

佐藤：多指症は非常によく増殖するので、温度応答性のインサートや滑膜との共培養なしでも出来るのではないかと考えています。シートのプロパティの検討も今後必要なのですが、増殖活性もよく軟骨の基質産生も高いので、これまでの成人の検体とは同じ培養法ではありません。

長嶋：軟骨細胞から作ったシートと多指症は、TGF- $\beta$ などのものも同等と考えているのでしょうか。

佐藤：その辺りの詳細も検討していかなければならないと考えています。多指症由来のシートの特性解析は今後の課題だと考えています。

長嶋：例えばシートの保存で、アロの系を模倣して凍結の実験も子豚の指で可能だと思います。指由来の軟骨の特性があるのであれば、やってみるのもいいと思うのですが。

佐藤：より末梢の軟骨を使ってというのは、面白いかもしれませんがね。

嶽北：薬事では、異種由来同等品での評価と言うのはやむをえない時に使う評価であって、安全性評価としてはヒトで試すのであればヒト由来製品で評価するものです。残念ながらヒト由来製品でデータを取ることが出来ないものに関しては、動物由来製品を使うという事だと思います。ただ、動物とヒトでの同一性というのは、なかなか説明が出来ないのだと思います。有効性評価をするのであれば動物を使つての説明も出来るかもしれませんが、安全性となると難しいと思います。核型解析もアレイCGHも、薬事の視点からは、安全性評価が難しいと思います。同種をつかって、特性解析試験として製造由来の安全性を確認しています、というような利用はできるのではないかと思います。

佐藤：同種であれば細胞数も沢山ありますし、ロットで管理できるので、網羅的に色々な安全性評価が出来ると思います。

的場：今持てる技術の最新の技術で調べて、変化が無いというところをしっかりと示せたらいいと思います。

佐藤：多指症は多因子異常として色々と報告されていますが、本当にそれががん関連遺伝子と繋がっているかという点なども、CGHやGバンドできちんと検証できれば安全性がある程度確保できると考えています。

(以上敬称略)

### 3. 総合討論

本事業に関しての活発な意見交換がなされました。

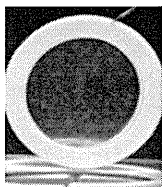
### 4. 事務連絡

この事業内容が今回の再生医療学会の学会賞を頂けた事は、皆様のおかげだと思っております。誠にありがとうございます。来年度以降、この研究を継続して最後には患者さんの手に届くような再生医療に近付けたいと考えています。来年度の班会議の予定は、第1回を夏か秋頃に、第2回は3月の再生医療学会が開かれる京都で開催したいと思っておりますので、宜しく願いいたします。

### 5. 閉会

以上

# 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現



東海大学 医学部 外科学系 整形外科学

佐藤 正人



DEPARTMENT OF ORTHOPAEDIC SURGERY  
TOKAI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE



目的: 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込んだ関節軟骨の再生医療を実現する。

**Evidence 1** 共培養法で活性化させた軟骨細胞シートによる関節軟骨再生(上皮系以外の組織で世界初)

**Evidence 2** 変形性関節症で混在する軟骨全層欠損と部分欠損の両方で有効性を動物実験で実証済

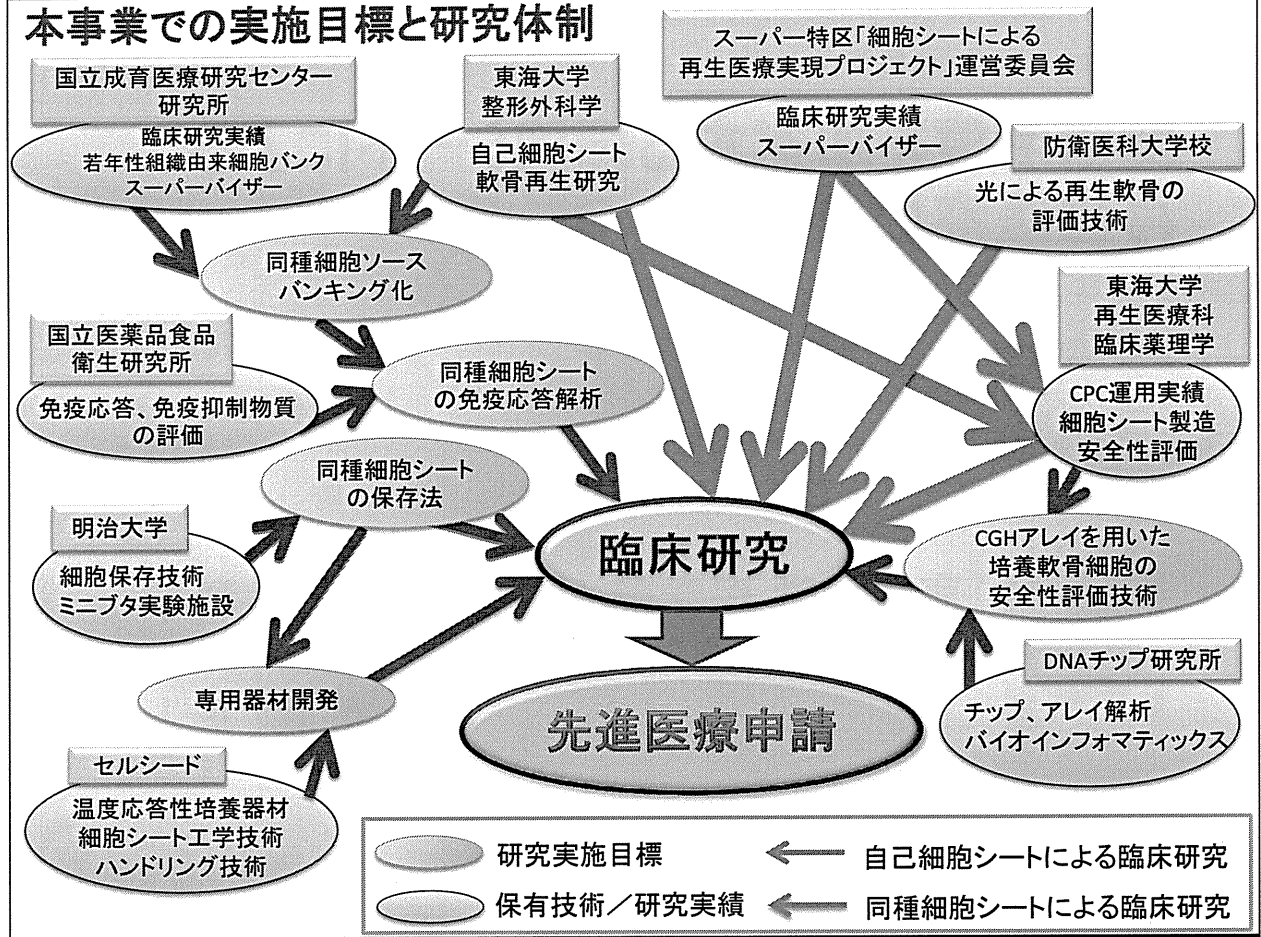
On going

ヒト幹細胞指針に則った臨床研究で初めて変性軟骨にも適用し現在実施中

**Goal 1** 自己細胞シートによる臨床研究終了後、速やかに先進医療への移行を申請し実施する。

**Goal 2** 同種細胞シートによる臨床研究をヒト幹細胞指針に則り申請し実施する。

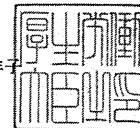
# 本事業での実施目標と研究体制



厚生労働省発医政 1003 第 3 号  
平成 23 年 10 月 3 日

東海大学医学部  
医学部長 今井 裕 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子



## ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成 23 年 3 月 3 日付で申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。

なお、臨床研究の中止、終了などに伴う厚生労働大臣への報告については、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成 22 年厚生労働省告示第 380 号)の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するようお願いする。

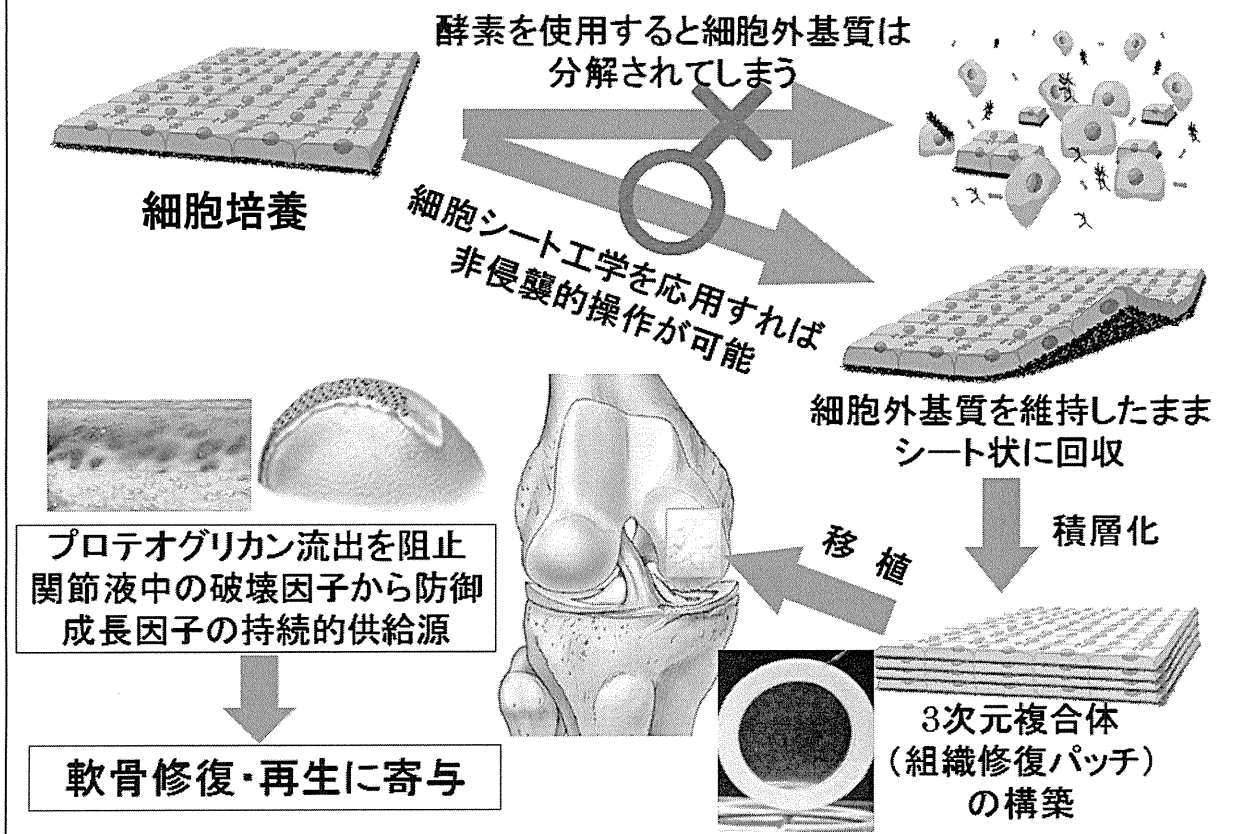
記

課 題 名：細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

研究責任者：佐藤 正人

(東海大学医学部・外科学系整形外科学・准教授)

# 細胞シートによる関節軟骨修復・再生



## 自己細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究

### 【対象患者】

- ・20～60歳
- ・外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷  
軟骨損傷を合併した観血的整復固定術、靭帯再建術、高位脛骨骨切り術、関節鏡視下手術の適応患者で、関節鏡所見で膝関節軟骨損傷部 Outerbridge分類Grade III以上の症例を対象とする。
- ・大きさ4.2cm<sup>2</sup>以下の軟骨損傷

→ 様々な程度の軟骨変性度を有する患者に適用する

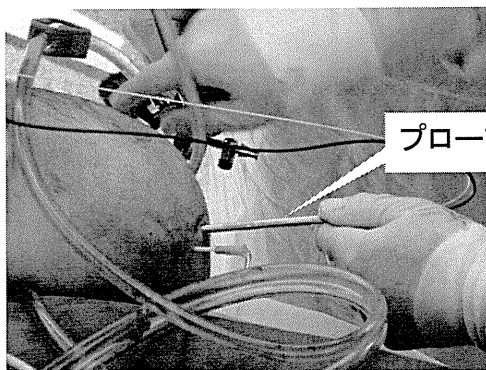
### 【エンドポイント】

- ①有害事象の頻度
- ②術後1年までの臨床評価基準における点数
- ③術後1年までの単純レントゲン写真評価基準における点数
- ④術後1年までのMRI評価基準における点数
- ⑤術後1年時での超音波検査による粘弾性評価（関節鏡）
- ⑥術後1年時での組織学的評価点数（関節鏡視下生検サンプル）



# レーザー誘起光音響法(LIPA)による軟骨計測

東海大学で臨床応用2007年から

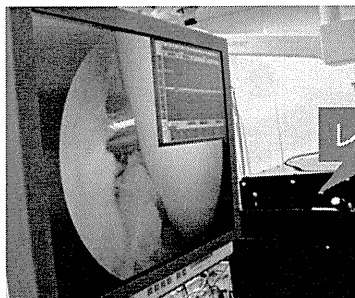


プローブ



レーザー

関節鏡装置

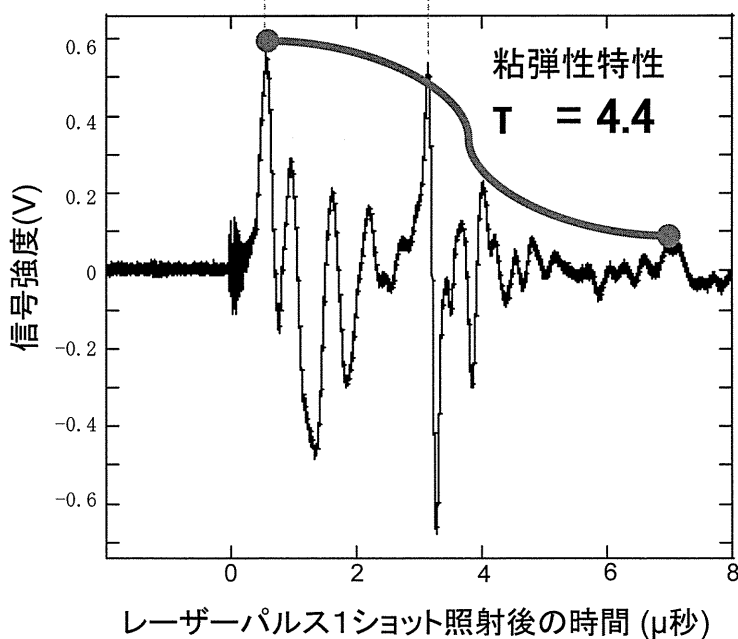


レーザー

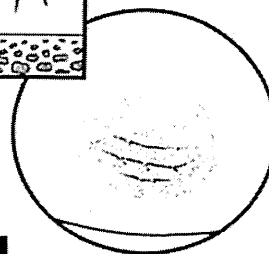
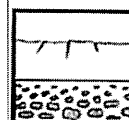
関節鏡の画像に  
オシロスコープの計測画像を取込

## LIPA結果

軟骨の厚さに相当: 2.0 mm

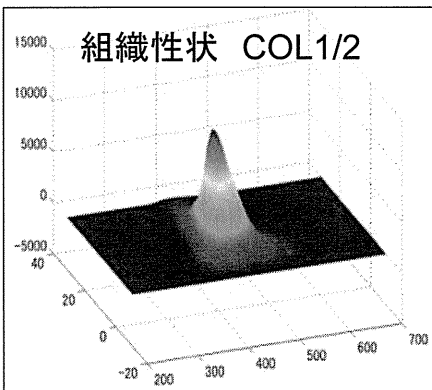


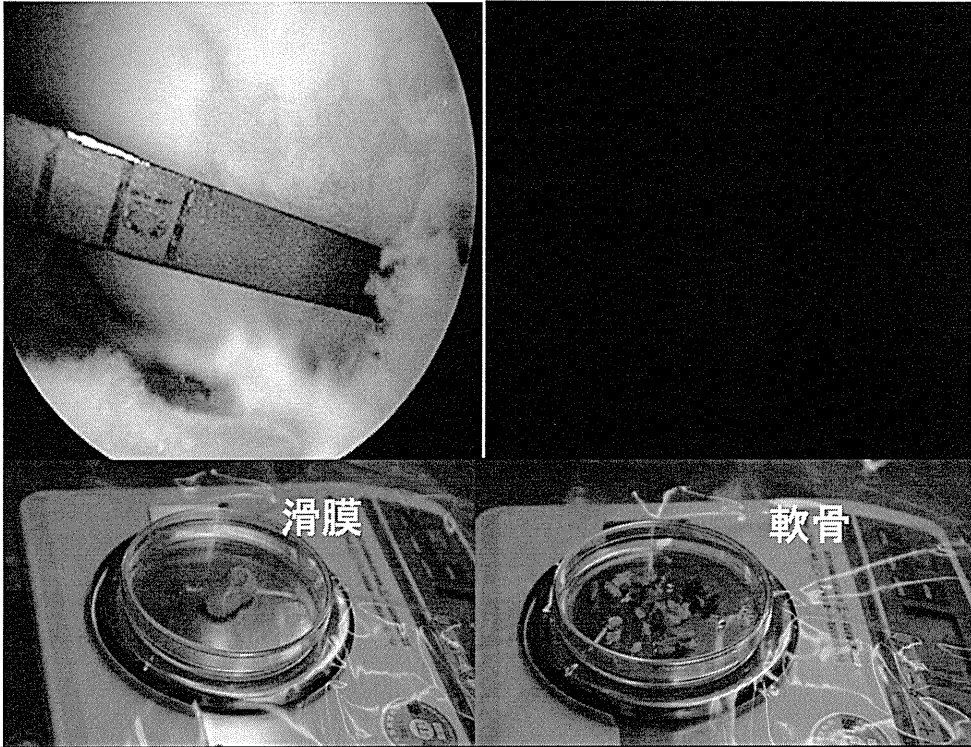
Outerbridge classification  
GRADE II fibrillation



B

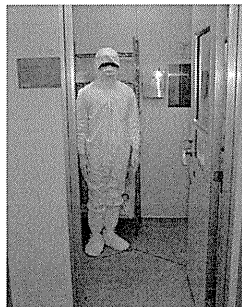
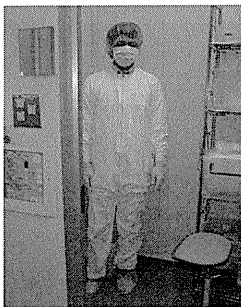
組織性状 COL1/2





## CPCガウニングおよび細胞調整室

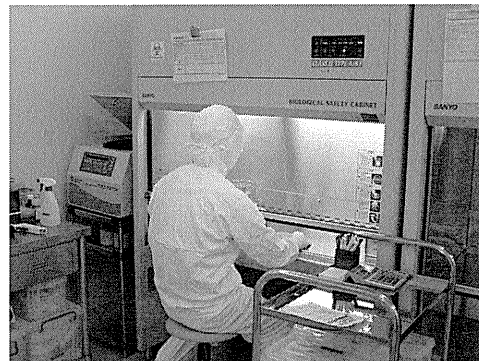
一次ガウニング室 二次ガウニング室



細胞調整室①



細胞調整室②



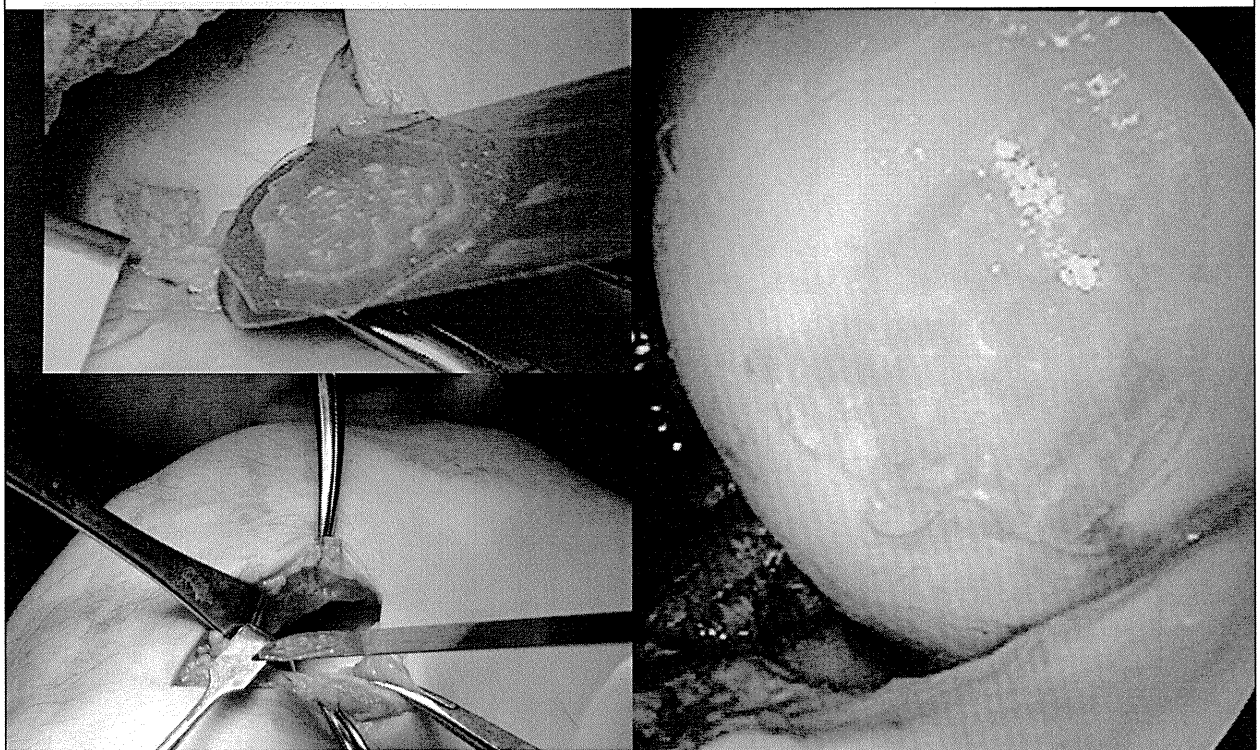


## 臨床研究第1例目

# CPCから手術室へ細胞シート搬入



## 臨床研究 第2例目

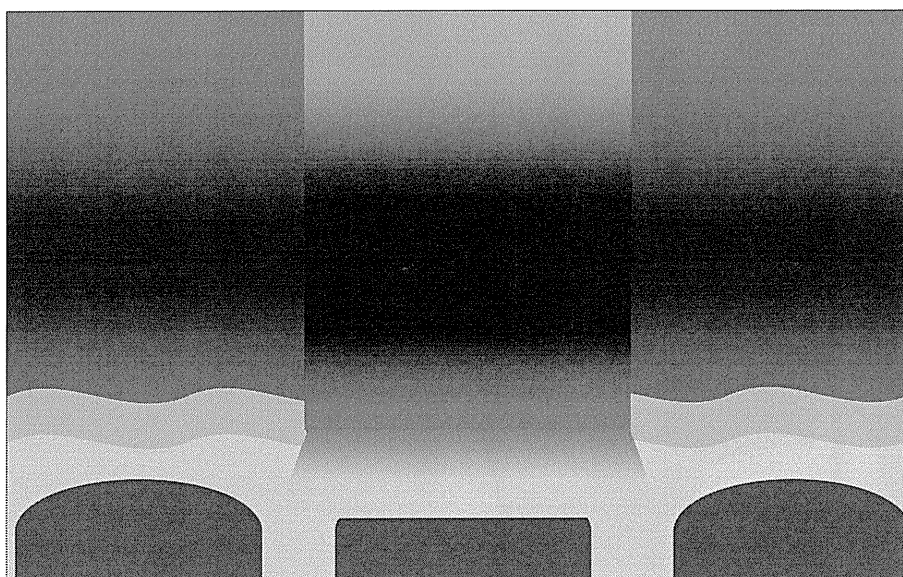


# 変形性膝関節症



## 軟骨全層欠損(骨軟骨損傷)

Metaplasia to fibrous cartilage



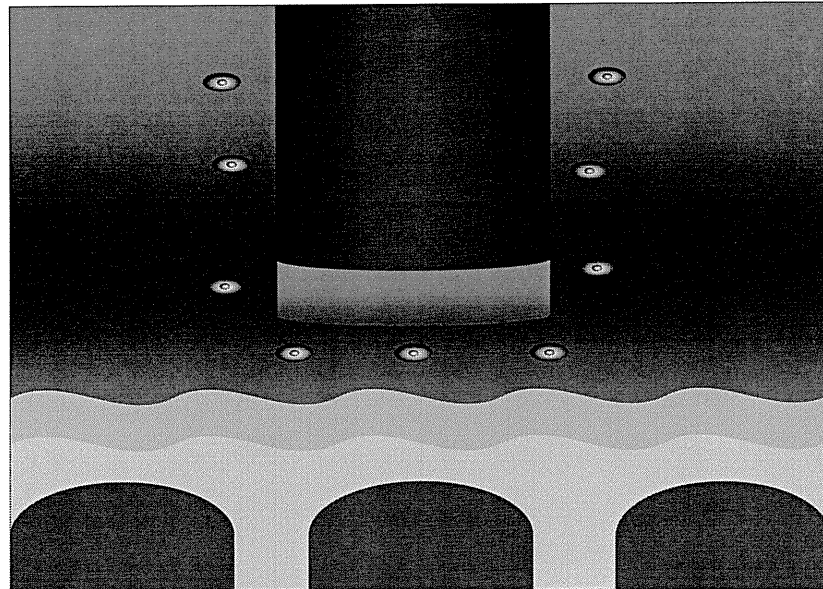
関節軟骨

軟骨下骨

Gospodarowicz 1976

# 軟骨部分欠損(軟骨内損傷)

No healing



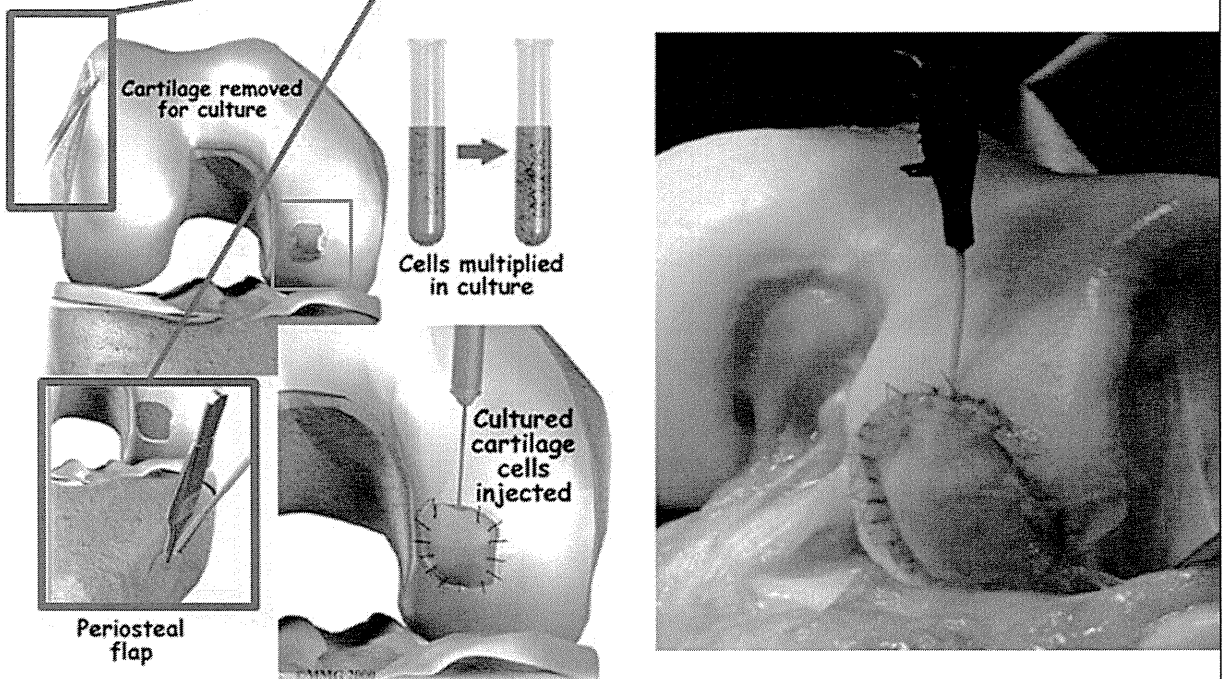
關節軟骨

軟骨下骨

Mankin 1962

## 自家(自己)培養軟骨細胞移植(ACT/ACI)

健全部2箇所を犠牲



## 培養軟骨細胞移植の問題点

なぜ今までの軟骨再生ではダメなのか？

- ・ 健常部 2箇所（軟骨採取部位と骨膜採取部位）に侵襲
- ・ 再生組織の構築の不具合（組織過形成、石灰化、適合性）
- ・ 部分損傷や変形性関節症は適応外

再生軟骨 = { 骨膜  
骨髄由来細胞（内在性）  
培養軟骨細胞  
スキャフォールド } 組織工学的軟骨



多数要素の最適化は困難  
至適修復・再生は困難

## 培養軟骨細胞移植の問題点

修復機序を考慮した再生医療であるべき

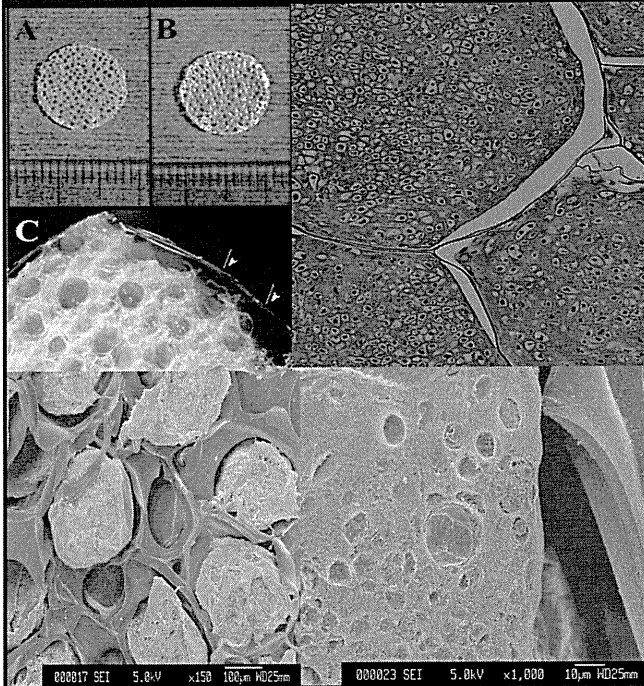
- ・ 健常部 2箇所（軟骨採取部位と骨膜採取部位）に侵襲
- ・ 再生組織の構築の不具合（組織過形成や周囲との適合性）
- ・ 部分損傷や変形性関節症は適応外

再生軟骨 = { ~~骨膜~~  
骨髄由来細胞（内在性）  
培養軟骨細胞  
スキャ~~フォ~~ールド } 組織工学的軟骨



組織修復に適した環境提供の点で重要

# Atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS) scaffold



## Intervertebral Disc Cell

- J Biomed Mater Res A. 2003, 64:248-56
- Spine. 2003, 28:548-53.
- Med Biol Eng Comput. 2003,41:365-71.

## Articular Chondrocyte

- Tissue Engineering 2005, 11:1234-43.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005, 75:177-84.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007, 83:181-88.

## Adipose Tissue-derived Stromal Cell

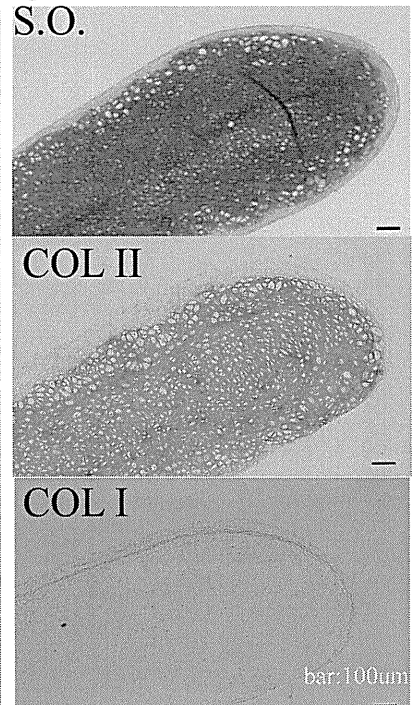
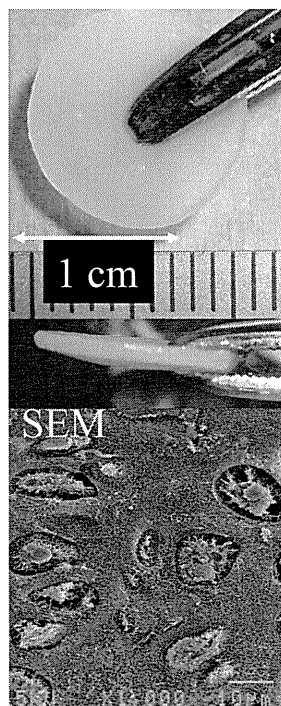
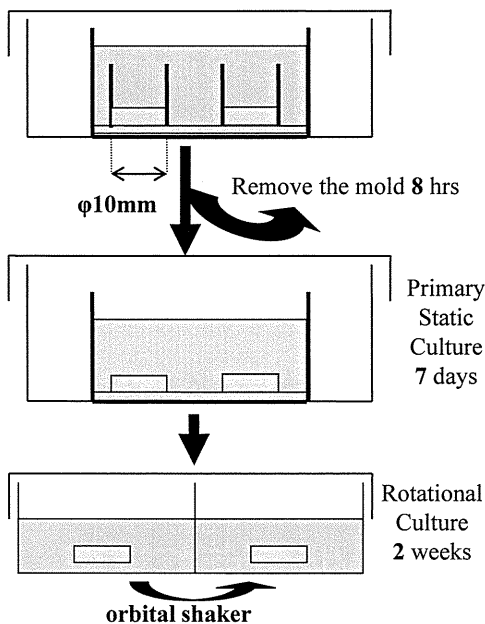
### → Bone and Cartilage

- Cells Tissues Organs. 2004, 178:2-12.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006, 76:230-9.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006, 79:25-34.

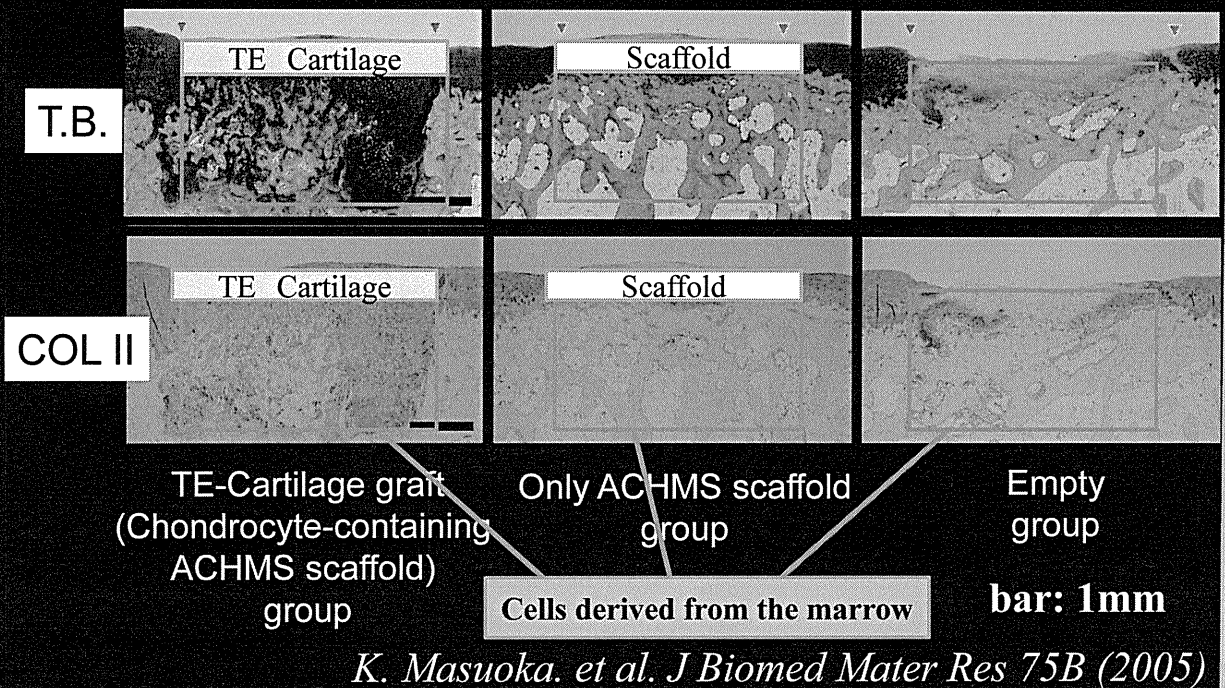


## Chondrocyte Plate Scaffold-free Tissue Engineered Cartilage

*Nagai .T et al Tissue Eng.2008*



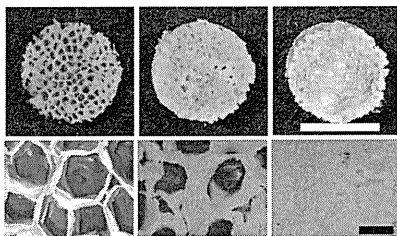
# The reparative tissue 12 weeks after surgery



## どの組織工学的軟骨でも同じ結果！ (軟骨全層欠損に対する動物実験での治療効果に関して)

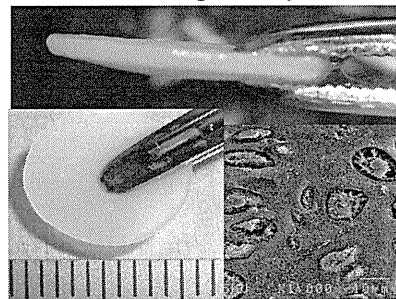
### TE Cartilage with Scaffold

J Biomed Mater Res Part B 2005  
J Biomed Mater Res Part B 2006  
J Biomed Mater Res Part B 2007

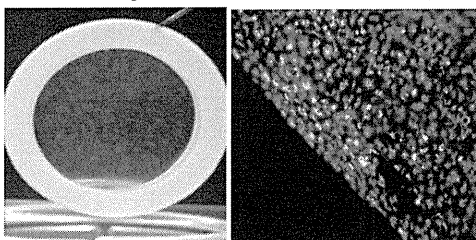


### TE Cartilage without Scaffold

Tissue Eng Part A 2008-a  
Tissue Eng Part A 2008-b  
Med Biol Eng Comp 2008



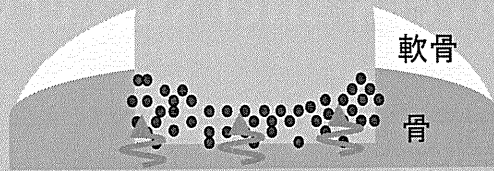
### Layered Chondrocyte Sheet



BBRC 2006  
Eur Cells Mater 2007  
BMC Biotechnol 2009  
CBC Press LLC 2010  
Biomaterials 2012-a  
Biomaterials 2012-b  
JTERM 2012 in press

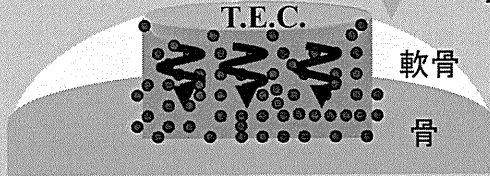


# 関節軟骨全層欠損の修復・再生機序



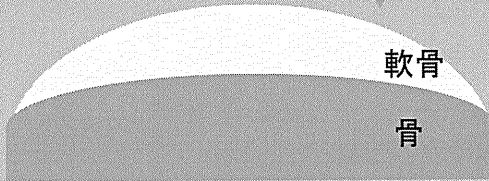
- 骨髄由来MSCの動員が可能  
(欠損が小さければ自然治癒する)

T.E.C. 組織工学的軟骨(TEC)  
(積層化細胞シートでも可能)



## 組織工学的軟骨(T.E.C)の役割

- ・周囲組織との高い適合性
- ・骨髄由来MSCの効率的なトラップ
- ・軟骨分化の促進  
イニシエーターとして  
成長因子供給源として

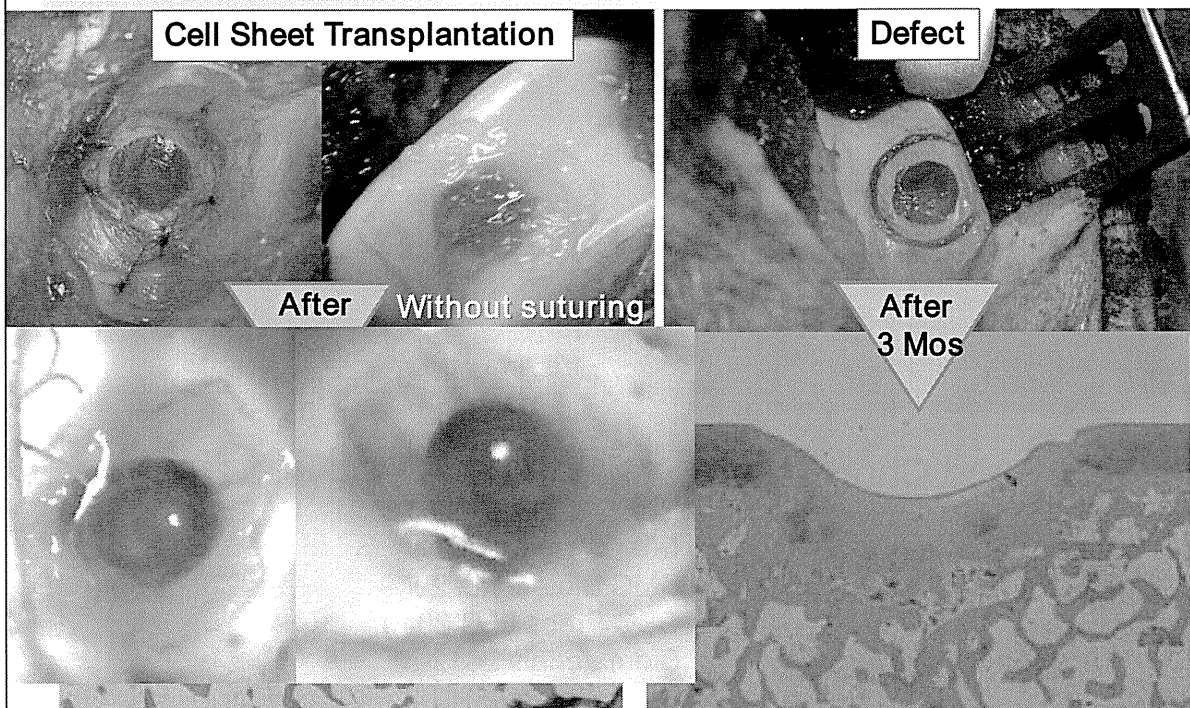


## 良好な組織の修復・再生

- ・表層のTECの存在とMSCの動員が重要
- ・欠損部全てをTECで充填する必要なし



# ミニブタ軟骨全層欠損に対する積層化軟骨細胞シートの効果

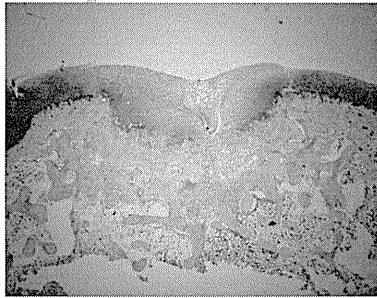


Ebihara G, et al. Biomaterials 2012

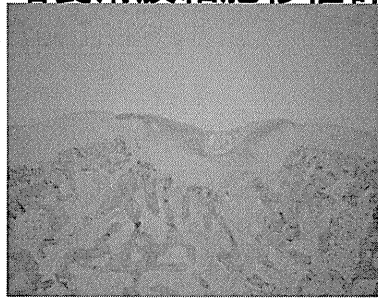


# 培養滑膜細胞単独 VS. 軟骨細胞シート併用

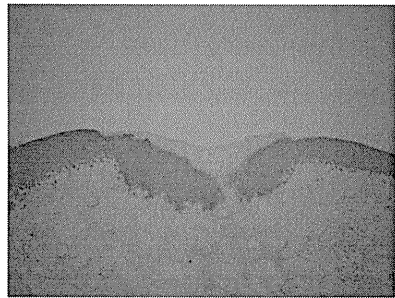
## 培養滑膜細胞移植群



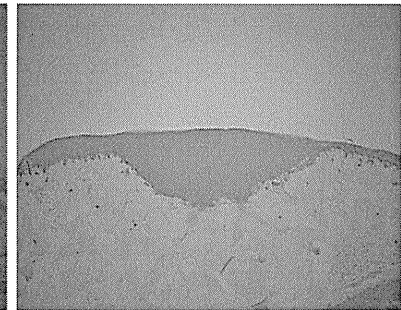
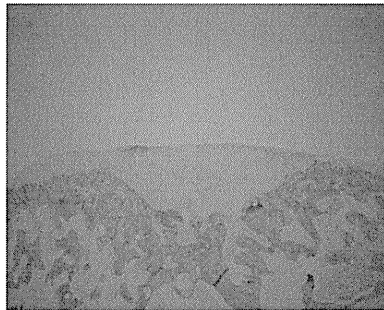
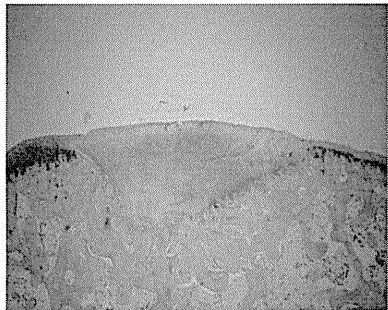
Safranin O



Col I



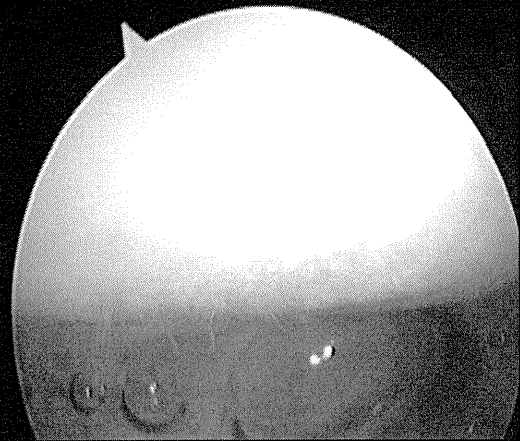
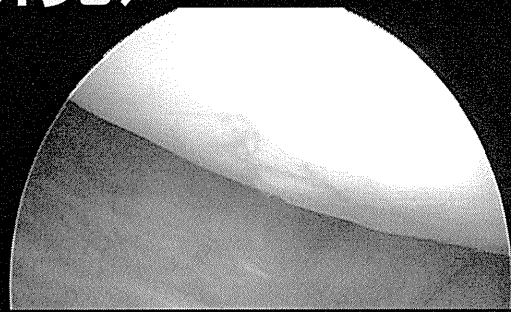
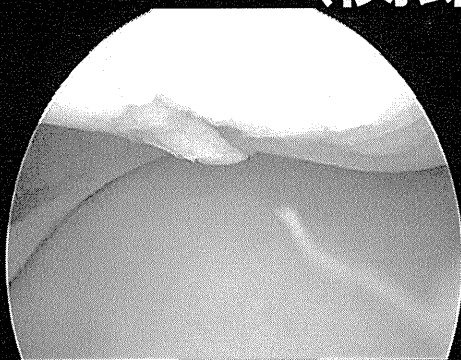
Col II



## 培養滑膜細胞+軟骨細胞シート併用群

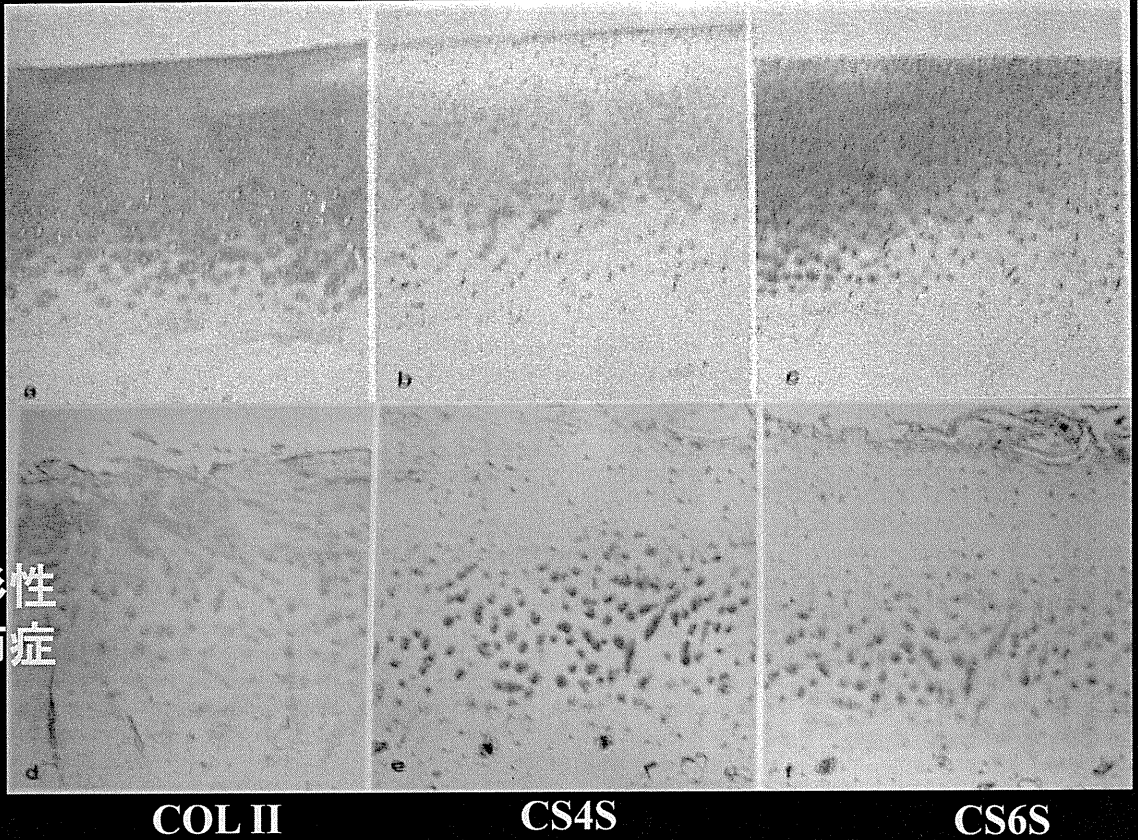
Ito S et al, Biomaterials 2012

# 初期の変形性関節症 (関節鏡所見)



# 関節軟骨

正常



変形性  
関節症

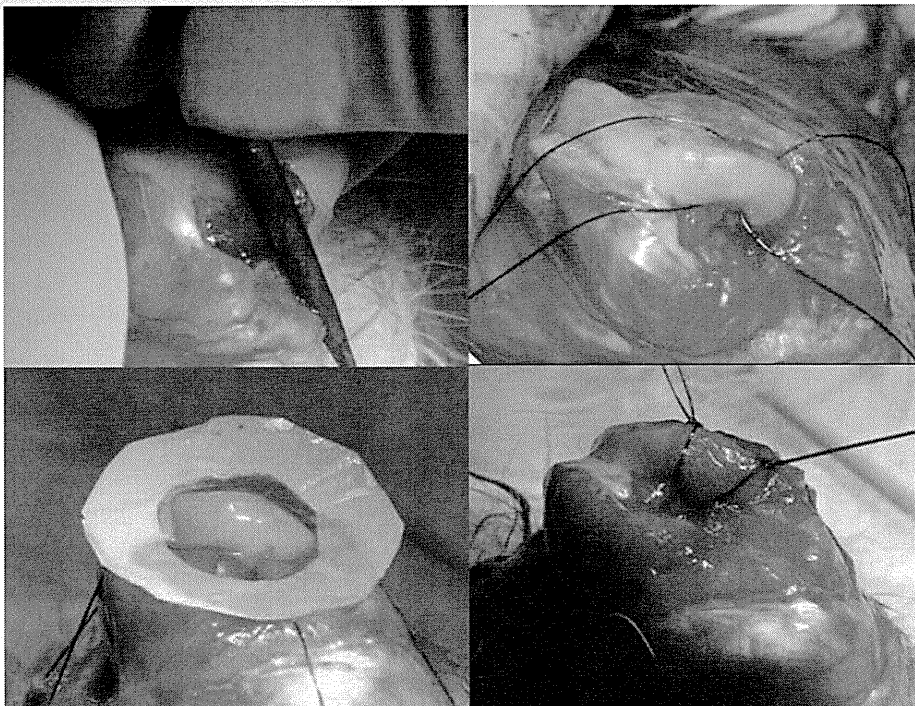
COL II

CS4S

CS6S

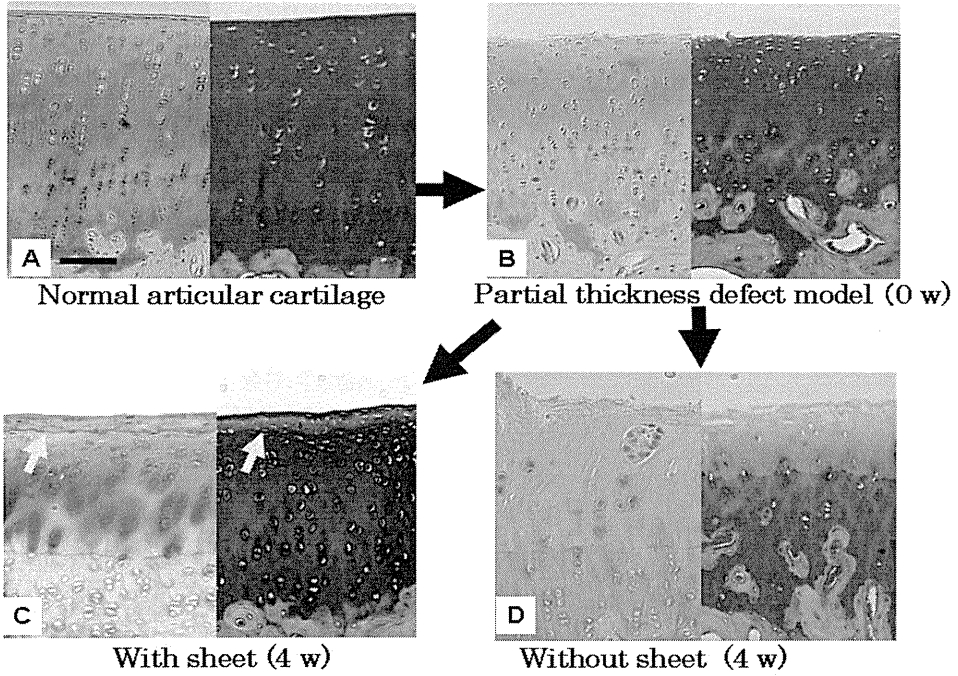


## 家兎軟骨部分欠損に対する積層化軟骨細胞シートの移植



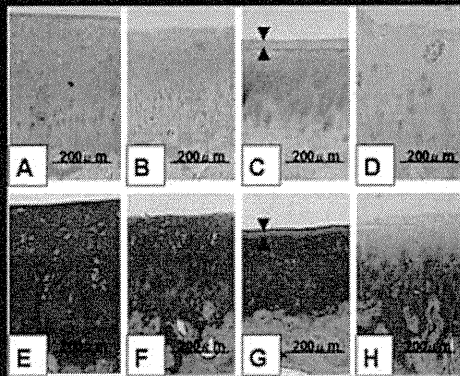
Kaneshiro N et al, BBRC 2006

# 軟骨部分欠損に対する軟骨細胞シート の効果



Kaneshiro N et al, Eur Cells and Mater 2007

ELSEVIER



**EDITORS**

Wolfgang Baumgaertel  
 Ernesto Carafola  
 Chin Ha Chung  
 Andre Goffeau  
 I. C. Gurseslar  
 James D. Jamieson  
 Claude Klee  
 M. Daniel Lane  
 William J. Leguizar  
 Masami Miyamoto  
 Yo-ichi Nabeshima  
 Tsunetsugu Omura  
 Sten Orrenius  
 Min-Ming Poo  
 Jacques Pouyssegur  
 William S. Reznickoff  
 Kiyoshi Takatsu

*Biochemical and  
 Biophysical  
 Research  
 Communications*

**B  
 B  
 R  
 C**