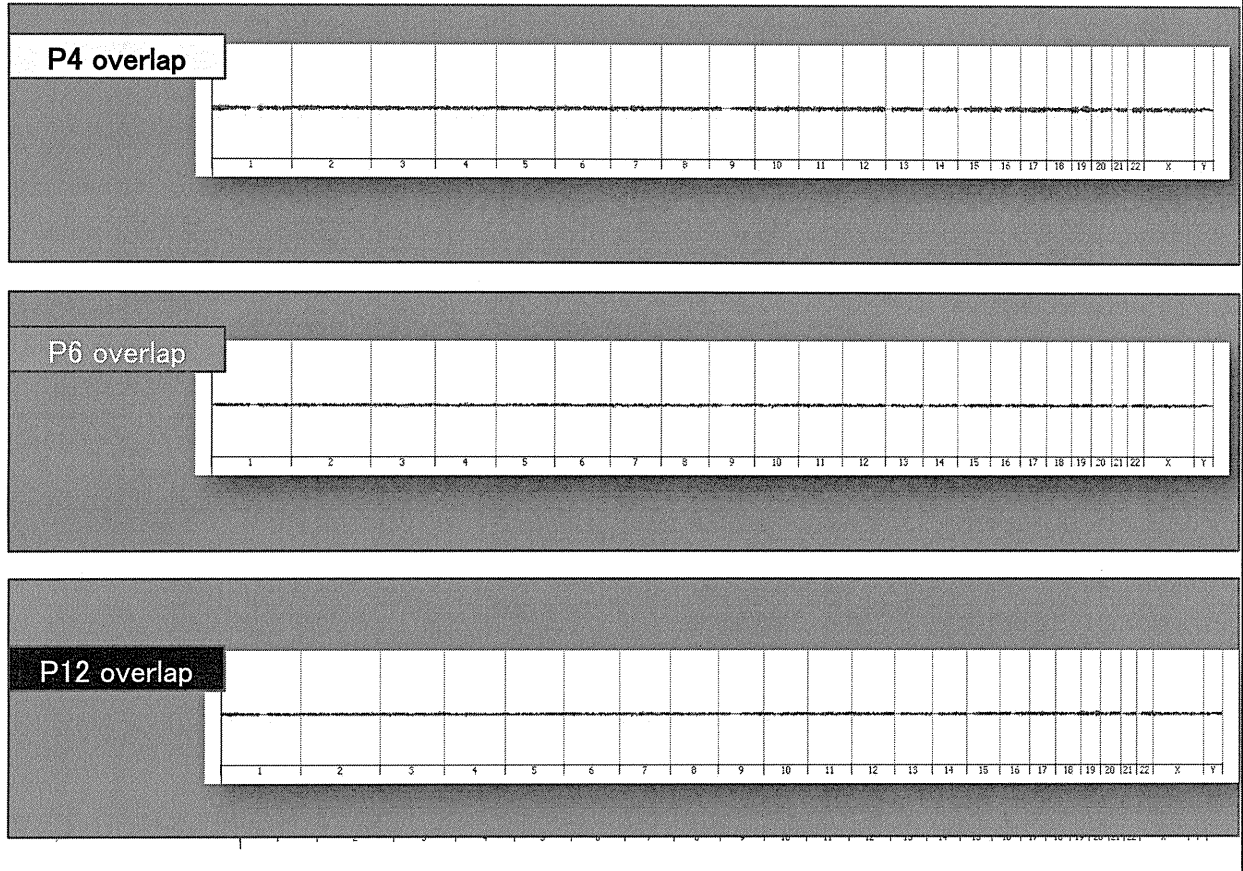


# CGH結果 Reference:P2



## Gバンド分染法

## 結果

No.	継代数		
	P1	P6	P12
1	正常核型	正常核型[19] 45,XY,add(4)(q35),-18[1]	正常核型
2	正常核型	正常核型	正常核型
3	正常核型	正常核型	正常核型
4	正常核型	正常核型	正常核型
5	正常核型	正常核型	正常核型
6	正常核型	正常核型	正常核型
7	正常核型	正常核型	正常核型
8	正常核型	正常核型	正常核型

20細胞中1細胞に  
核型異常が検出。



「疑陽性」



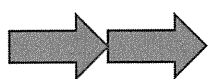
aCGHと合わせて検討

## 考察

### 本研究で必要な非臨床的な安全性評価

#### ① Gバンド分染法で細胞ソース由来の染色体異常を確認

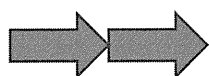
原疾患に起因する染色体異常を検知



遺伝子異常は検出不可  
検査する細胞の数に限りがある

#### ② aCGHで培養中に生じる変化を確認

コピー数の変化を全ゲノム領域にわたり高解像に検出



転座等の染色体異常は検出不可  
Reference(P2)から変化しないものは検出不可

## まとめ

### 多指症由来軟骨細胞

- ・ 手術時廃棄組織
- ・ 優れた増殖性

→P1ストックを起こしてから

約2週間で4.7億細胞に(=積層化細胞シート約745枚分)

### 同種軟骨細胞シート移植

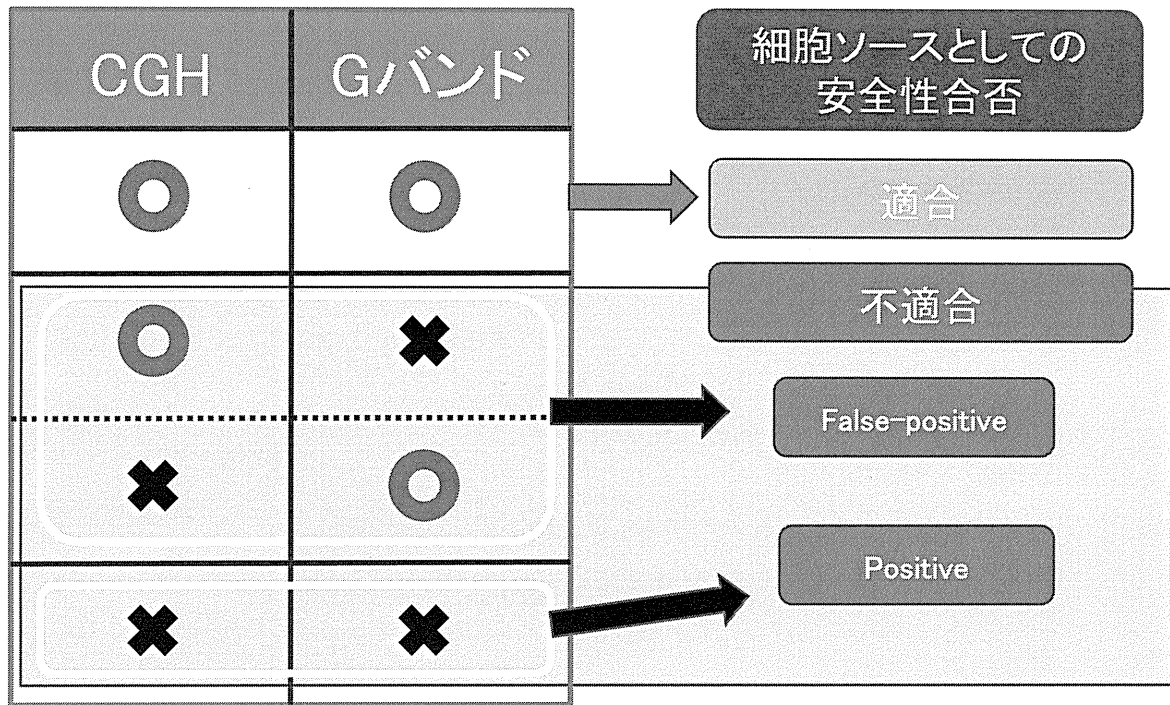
In vitro:

aCGH → Negative

Gバンド → Negative

ダブルのNegativeにより  
In vitro試験  
Negativeとする

# 今後の安全性評価について



## VII. 実地調査 一議事録一

## 議事録

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 新規採択研究課題の現地調査

日時：平成 24 年 10 月 30 日 15:00～17:30

場所：東海大学伊勢原校舎 1 号館 2 階第 2 会議室

出席者：光島健二（医薬基盤研究所）、加藤眞行（医薬基盤研究所）、小林宏行（医薬基盤研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、佐藤正人（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、渡部綾子（東海大学）、河毛知子（東海大学）、岡田恵里（東海大学）

順不同、敬称略  
記録者：渡部綾子

1. 研究代表者あいさつ
2. 現地調査の概要説明

医薬基盤研究所 小林宏行様

この度、医薬基盤研究所が厚労省からの委託を受け、弊所が貴研究課題の進捗マネジメントを実施することとなった。本事業は、先生ご自身の研究課題の進捗管理評価について支援するものであり、今後相談等があれば逐次ご連絡下さい。

今回の現地調査では研究課題の進捗状況や計画等についてお伺いし、その内容は各研究事業等の中間・事後評価委員会にて報告する。本日は始めの 30 分程度で研究の概要進捗状況等の説明、その後 1 時間程度の質問等を行ない、適宜施設等の見学を予定している。

3. 研究報告  
(1) 研究事業概要

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

この研究課題は今年度から採択され 5 年間の予定となっている。本研究事業の概要は、現在実施中のヒト幹細胞による自己細胞臨床研究を速やかに実施し先進医療に申請すること、同種細胞シートによる臨床研究を目指してヒト幹指針に則り実施するということが 2 つの大きな目的である。

ヒト幹細胞臨床研究は現在 2 例実施終了している。安全性評価をプライマリーエンドポイントと

して実施し、先進医療に申請していく予定である。同種の研究は様々な方との共同研究により成り立っており、成育医療研究センター研究所、国立医薬品食品衛生研究所、明治大学、株式会社セルシード、DNAチップ研究所等々の共同研究により、同種細胞シートによる臨床研究を実現していくことを目標としている。

背景として、整形外科は運動器疾患を扱っているが、要支援・要介護の割合が整形外科に関連するもので関節疾患と骨折・転倒等をたすと認知症よりも上回るかなり重大なテーマとして認識している。特に変形性関節症の現状は、患者さんは多い一方、政策上軽視されてきた経緯があり、この対策が急務と考えている。変形性関節症の特徴は、骨まで達する軟骨の損傷と軟骨だけが損傷している部分損傷とが混在した状態のものである。軟骨が毛羽立った状態から変形性関節症は進んでいく。軟骨の部分損傷は治らない事が昔から知られた事実であるが、関節軟骨の周りのマトリックスが邪魔をして修復に必要なかつ十分な細胞が局所に動員されないという事が大きな問題としてわかってきている。軟骨が少し毛羽立った状態からマトリックスは抜け出てしまう。関節軟骨に関しての問題点は、早期診断・早期治療が当たり前の中で、未だにこれが実現できていない疾患の一つであり、きちんと治らない現状から患者さんは民間療法やサプリメントなどに頼ってくという現状がある。

世界では軟骨欠損に関して様々な治療が行われており、関節の欠損をきれいに洗う方法から骨髄刺激法やACI、我々の目指している再生医療、また海外ではアログラフトの同種の骨軟骨移植が既に始まっている。日本ではまだ再生医療と骨軟骨移植は実現されていない。来年J-TECの自家培養軟骨ジャック®が薬事承認され保険収載になる状態まできている。世界で約2万例既に実施されているACIという技術は、2ヶ所を犠牲にして一か所を治すという方法であり、軟骨の小さな欠損部に骨膜のパッチをあてて、その中に一ヵ月以上培養した細胞を注入して治すという方法である。

我々のコンセプトは、軟骨は表層部分をきちんと治せば自然に修復してくるという立場をとっている。表層部分の修復が最も重要であると長年の研究からわかっている。当初はスキャフォールドを使って硬い軟骨を作製する研究を行っていたが、スキャフォールドを使わずに厚みを薄くしていった過程で細胞シートと出会い、現在では細胞シートでも同等の効果が得られることがわかり研究を行なっている。細胞シートは女子医大の岡野先生のスーパー特区に入っており、軟骨の分野を担当している。温度応答性培養皿を用いると酵素処理なしにシート状に細胞を回収でき、一切の不純物を含まない細胞と細胞が分泌した細胞外マトリックスのみを回収することが出来る。これを3層に積層化したものを使用している。この細胞シートはある程度弾性を持っており軟骨表面にくっ付く事ができ、また高密度で培養すると指で引っ張っても簡単には破けないものである。この積層化軟骨細胞シートを損傷部に貼るという方法で研究を行なっている。

細胞シートは、共培養法という関節内の擬似環境で細胞シートを作り軟骨の再生を目指している。変形性関節症で混在する骨にまで達する全層欠損と、軟骨だけ損傷している部分損傷の両方に動物実験で効果を認めている。世界の再生医療製品はいくつかあるが、この両方に効果があるものはなく、初めてのものになる。

現在、自己細胞によるヒト幹指針に則った臨床研究を行なっているが、外傷だけでなく変性した軟骨にも適応して実施している。自己細胞では自己細胞臨床研究を速やかに実施して先進医療に申

請をしていくこと、同種の細胞シートによる臨床研究を目指してヒト幹指針に則り実施することが2つの大きな目的である。

全層欠損では、ミニブタの実験で修復を確認している。また部分損傷でも、家兎の実験で修復効果を証明している。軟骨表面を少し削りシートを置いて、その部分の組織切片を作製し、評価している。軟骨は表面を少し削っただけで、1ヵ月もすると表層部分が毛羽立ちマトリックスが抜けてきてしまい変形性関節症になってしまうが、シートを置く事で完全とはいかないが変性を遅らせる事ができることが分かっている。この細胞シートの特性は、非常に高濃度のTGF- $\beta$ という軟骨に必須の付帯遺伝子とも言うべきグロースファクターを分泌している事である。同じ細胞数のシングルセルよりも20倍以上シート状に入れた方が高いことを確認している。或は、滑膜細胞だけを使って修復させる再生医療も他大学では行なわれているが、欠点は滑膜細胞だけで修復させようとすると表層の部分に繊維性組織が残存してしまう事が論文で言われている。細胞シートと併用することできれいに修復されることも確認しており、バイオマテリアル誌で発表した。

様々な安全性の試験を行なって、2011年3月にヒト幹細胞臨床研究として申請し、10月3日に大臣意見書の発出をもって承認され、第1例目を11月に実施した。対象疾患は、外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷で、大きさ4.2cm<sup>2</sup>以下という条件が付けられている。4.2cm<sup>2</sup>以下というのは1枚の細胞シートでおおえる大きさで安全性をまず確認するという厚労省の指導があった。エンドポイントは、第一に安全性を確認し、移植後1年で各評価法により評価する。

今後の予定は、H24年度は自己細胞に関しては臨床研究を粛々と進めており、同種に関しては各共同研究者と協力して進めている。現在、多指症の子供の軟骨に注目している。これは手術的に廃棄する軟骨であるが、この軟骨は非常に増殖能力が高く、成育医療研究センター研究所でMTAを交し安全性の評価を進めているところである。

自己細胞シートの臨床研究は、現在までに2症例が終了している。これまでに4例エントリーし、2症例に実施した。中止となった2例は、規定された軟骨の損傷度の適応外が1例と細胞採取後の酵素処理後の細胞数が規定より少なく、安全性の評価が十分に出来ないことから逸脱となったものが1例であった。

同種軟骨細胞シートによる再生医療の実現が最終的な目標であるが、様々な先生方との共同研究を行ないながら進めている。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の一つであり、是非同種細胞シートによる関節内治療の臨床研究を実現したいと思っている。

## 2) 分担研究課題

### 2-1 「同種細胞ソースとバンキングシステムに関する研究、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 河毛知子（東海大学）

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究を平成23年度より実施している。臨床研究の承認を受ける際に使用する培養軟骨の安全性試験としてCGH解析と造腫瘍性否定試験を実施した。

自己軟骨細胞シートの臨床研究実施に際して、軟骨細胞の培養による安全性を CGH 解析により評価してきた。サンプルは TKA（人工関節置換術）、前十字靭帯再建術の際に採取した軟骨細胞を用いた。軟骨細胞の P2 をリファレンスとし、P4、P6 を評価した。解析条件を Moving Average 10pt、解析するアルゴリズムを 10 と設定し解析した。その結果、TKA で得られた軟骨細胞を P6 や P12 まで培養を続けると、7 番トリソミーが顕著に確認された。7 番染色体のトリソミーは変形性関節症で確認されるという報告がある。G バンド分染法で、継代による細胞ソース由来以外の染色体異常が起こっているのかを確認したところ、7 番トリソミー以外に培養過程で継続して観察される染色体異常は無かった。今後検体数を増やし継続して評価していく。

次に同種細胞ソースについて検討を行なった。当初は骨バンクや同種軟骨片等を考えていたが、トレーサビリティの問題があり、手術時廃棄組織で得られ優れた増殖性を持つ多指症軟骨細胞を成育医療研究センター研究所と MTA を交し、同種軟骨細胞ソースとして安全性の検討を行なった。成育医療研究センター研究所より譲渡された多指症軟骨細胞を培養し増殖率を求め、経験則と合わせどの程度細胞数を得られるかを確認したところ、P3 まで培養すると約 1756 枚分の積層化細胞シートを得る計算となった。増殖曲線を確認したところ、TKA と多指症細胞の増殖を P1 で比較すると、TKA に比べ非常に高い増殖が認められた。多指症細胞の P1、P2、P3 の比較では、凍結していたストック細胞を起こして培養した P1 は接着増殖し始めるまでに時間が掛かり、増殖曲線の立ち上がりが P2、P3 に比べ遅くなったが、接着後は P2、P3 と同等の増殖がみられた。今後はフレッシュな細胞を用い検体数を増やし評価していく。

多指症軟骨細胞の CGH 解析による多指症軟骨細胞の培養による変化は、P6 まで問題がないことが確認できている為、今後 TKA 検体とともに P12 まで培養を継続し評価していく。

H25 年度の研究テーマとして挙げた同種軟骨細胞シートの安全性評価は、同種の細胞ソースとしての安全性を確認する必要がある為、G バンド分染法で細胞ソース由来の染色体異常の確認が必要と考える。また同種移植となるため、より重度な免疫不全を呈する動物モデルとして NOG マウスを用いた造腫瘍性否定試験を実施する予定である。

H26 年度は同種細胞シートの品質評価について検討を行なう。細胞ソースは多指症軟骨細胞を用い、自己軟骨細胞シートと同様のプロパティを得られる事を Rt-PCR、免疫染色等で確認し、また播種時の条件検討としては、培養日数、細胞数、継代数、シートの大きさ等を検討する。継代数の検討は、CGH 解析を基に DNA チップ研究所と進め、シートの大きさの検討は細胞シート作製に必要な UP Cell 6well Cell culture insert をセルシードとの共同研究でより大きなシートを作製できるよう目指していきたい。H24 年度の現在までの進捗は、研究は順調に進んでおり継続して評価を進めていきたい。

## 2-2 「同種細胞シートの特性と安全性に関する研究」

研究分担者 加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を用いた再生医療の将来的な普及には同種細



胞の移植が必須になると考えられる。同種細胞利用の利点は、レディメイドの細胞シートを作製することが可能になり、患者さんの負担軽減および、より計画的な移植が行える事、同一ドナーからの細胞を使用することで細胞の品質（情報）があらかじめ分かるという利点がある。一方、同種細胞移植という事で懸念されるのは、免疫反応で拒絶がおこる可能性があるという事である。ただし歴史的経験的に軟骨組織は殆ど免疫の拒絶を受けないという事が言われており、それを証明する為に本研究において *in vitro* , *in vivo* で研究を行なっている。

間葉系幹細胞（MSC）は免疫原性が低く、免疫細胞の活性化を抑制するという性質を有しているという報告がなされている。MSC を *in vitro* で軟骨細胞に分化させ、活性化 T 細胞と共培養した系では MSC と同様に活性化 T 細胞の活性化を抑制するという報告が 2008 年にあった。生体から取り出した軟骨細胞で調べたところ、マウス軟骨細胞は同種異系のマウスリンパ球の活性化を惹起しなかっただけでなく、マウスリンパ球とマウス樹状細胞（アロの反応）を用いたリンパ球混合培養（MLR）においても、マウス軟骨細胞が活性化リンパ球の増殖を抑制することを確認した。次に、市販ヒト軟骨細胞（NHAC）およびその積層化シートが市販ヒト T 細胞（NHPBTC）共培養により、その活性化を惹起しない事を確認し、NHPBTC と市販ヒト樹上細胞（NHDC）を用いた MLR での T 細胞の増殖を抑制できることを確認した。そこで、手術で採取された同種軟骨細胞（AC）でもこの特性が維持されるのかを確認した。

本研究の目的は、軟骨組織はこれまでの経験から免疫原性が低いと言われているが、実際に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がないことから、同種軟骨細胞シートが免疫反応に及ぼす影響を *in vitro* , *in vivo* で検討することを目的としている。宿主の免疫反応を惹起しないことが示せれば、同種軟骨細胞シート移植への可能性がひらけていくことになると思う。

今後の研究計画として、今年度は *in vitro* で同種軟骨細胞が T 細胞の活性化（細胞増殖）に及ぼす影響を検討し、次年度以降この *in vitro* の検討を継続しながら、ウサギを用いて同種異系間での積層化軟骨シート移植を行い、*in vivo* での免疫応答に対する影響の検討を開始する。H26 年度以降は、*in vivo* での移植細胞の影響に関して経過観察、評価していく予定である。

NHPBTC と同種軟骨細胞（AC）を共培養し、同種軟骨細胞（AC）が T 細胞におよぼす影響をみた結果、ポジティブコントロールではプラスト形成がみられたが、同種軟骨細胞（AC）と共培養された T 細胞はほとんど活性化していないことが分かった。次に、この性質が積層化シートでも維持されているか確認したところ、積層化同種軟骨（AC）シートも T 細胞を活性化しない事がわかった。

MSC はこれまでの研究から、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞を含む種々な免疫細胞の機能（活性化や分化など）を抑制するという報告がある。軟骨細胞が T 細胞を惹起しないという MSC と同様の性質を有していたことから、この様な免疫系の細胞に対しても軟骨細胞が同様の性質を有していれば、損傷部位の炎症反応を抑制できる可能性があるのではないかと考え、同種軟骨細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討した。

樹状細胞と同種 T 細胞（リンパ球混合培養反応：MLR）のアロ反応により同種 T 細胞は活性化され活発に増殖する状況に、同種軟骨細胞（シート）を共培養することで、アロ反応を抑制できるかどうかを確認した。結果、MLR に同種軟骨細胞を共培養したところ、ポジティブコントロールに対

してその活性化を 1/4 程度、T 細胞の増殖を抑制していた。よって同種軟骨細胞は MLR の反応を抑制することがわかり、患部の炎症を抑制できる可能性を示唆していると思われた。シートの状態での検討はまだ行っていないため、今後の課題とし検討していきたいと思う。参考データとして、この軟骨細胞の抑制効果に関して、細胞同士が関与している抑制経路と、液性因子が関与している経路とが MSC の研究から報告されている。そこで、軟骨細胞の抑制効果の経路はどのようなものか確認した。トランスウェルを用いて軟骨細胞と MLR を物理的に分離させて培養し確認したところ、細胞を直接接触させた状態の時に比べて T 細胞の活性化の抑制は低かったものの、1/2 程度は抑制していた。この結果から、軟骨細胞の抑制効果には何らかの液性因子が関与していることが示唆された。

纏めとして、同種軟骨細胞は免疫反応を惹起しないだけでなく、患部の炎症も抑制できる可能性が考えられた。この性質は積層化シートでも維持されていた。以上のことより、関節軟骨損傷の治療に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。今後この再現性を確認するとともに、抑制メカニズムの解明に液性因子の同定などを行なう予定である。来年度以降、ウサギ同種異系間での積層化軟骨細胞シート移植実験を行ない、*in vivo* での免疫応答に対する影響を検討する。

### 2-3 「同種細胞シートの保存法に関する研究」

研究分担者 長嶋比呂志（明治大学農学部発生工学研究室）

同種細胞の臨床応用を考えた際に細胞シートの凍結保存が非常に重要となる。凍結保存が可能になれば、シートの作製と移植実施時期の調整が容易になること、また治療用シートのストックが可能となる事で、*allograft* の移植を促進する事ができる。しかし、現状では実用的な細胞シートの凍結保存法はない。

ガラス化法がヒトや動物卵子・胚の凍結保存法として普及してきている。細胞シートの凍結保存へのガラス化法の応用は、シャーレの状態でガラス化するとクラック（ひび割れ）が生じたり、液体窒素への浸漬によってシートが破損したりする問題点があった。

研究の目的は、実用的な細胞シートのガラス化法を確立することである。今年度はこれまで研究してきたコーティング法を論文化するため、再現性の確認、正常性の確認を進めている。また、ガラス化法の効果向上のために、より微弱なシートへの適用を図ることも考えている。来年度からは、臨床応用を踏まえた素材の検討、ガラス化細胞シートの機能試験（ウサギへの移植試験）、産業化を踏まえた実用的なガラス化デバイスの開発、最終目標としてヒト細胞シートへの応用を進めていきたいと考えている。

卵子・胚におけるガラス化保存法の基本コンセプトは、超急速な冷却・融解が非常に重要である。またそれを可能にする最小限の液量、安定的なガラス化状態を実現する凍害保護剤（凍害保護剤には 2 種類あり、浸透性の凍害保護剤と非浸透性の凍害保護剤がある）のコンビネーションの確立、細胞浸透性のある凍害保護剤は細胞毒性がある為、細胞毒性の低い浸透性凍害保護剤を選択する。

使用濃度は平衡液が最終濃度で 15%程度、ガラス化液が最終濃度 30%程度の凍害保護剤を使用する。これを基に細胞シートへの適応を考え、超急速な冷却・融解は液体窒素蒸気中での冷却・加温板上での融解とし、コーティング法により液量を最小化し、安定的なガラス化状態を実現する凍害保護剤をして非浸透性凍害保護剤であるカルボキシル化ポリリジン (PLL) を用い、細胞毒性の低い浸透性凍害保護剤として DMSO と Ethylene glycol を使用することとした。使用濃度は平衡液が最終濃度で 20%程度、ガラス化液が最終濃度 40%程度となるようにした。

開発したコーティング法は、細胞シートへの凍害保護剤の浸透後、ガラス化液による被覆を行ない、ガラス化液でコーティングされた細胞シート (メッシュデバイス上) を液体窒素蒸気 (-125℃) 中で細胞シートをガラス化する。融解は、加温板 (38.5℃) 上で行い、融解した細胞シートから凍害保護剤を除去・洗浄し、細胞シートを回収するという方法である。将来的に保存や臨床応用時に使用できるようにするために、ラップフィルムを使用した方法も検討した。今回、食品用のラップを使用し、ガラス化液でコーティングした細胞シートをラップでカバーし、液体窒素蒸気中でガラス化させた。融解は加温盤 (38.5℃) 上で行い、細胞シートからラップを剥がし、凍害保護剤の除去・洗浄を行ない回収した。将来的な製品化イメージとして、パッケージを開けたらすぐに使える状態を考えている。今回使用した食品用のラップのような薄い素材であれば、ガラス化の要件を妨げない事がわかった。日本では膜技術が非常に発達しており、今後最適な素材を検討していきたい。カルボキシル化ポリリジン (PLL) が細胞シートの凍結保存には非常に重要な役割を担っているが、これを用いればシャーレで細胞シートを凍結保存することも不可能ではない。このシャーレ法は、シャーレ内のガラス化液に細胞シートが浸漬されたものを、液体窒素蒸気中でガラス化を行なうものである。融解は、加温板 (38.5℃) 上で行い、融解した細胞シートから凍害保護剤を除去・洗浄し、回収する。ポリリジンの存在により、ガラス化が非常に安定化する。

ウサギ軟骨由来積層化細胞シートのガラス化後の形態を比較したところ、PLL 有のコーティング法は無処置 (ガラス化無) と同様にきれいな形態を維持できたが、同じコーティング法でも PLL 無ではクラックが入ってしまった。PLL 有のラップフィルム法、シャーレ法もきれいな形態を維持できた。電子顕微鏡でガラス化後の微細構造を観察したところ、いずれの方法も細胞と細胞外マトリックスの基本構造は保たれていた。ガラス化後の形態維持および細胞生存性を確認したところ、PLL 有のコーティング法は試験に供したシートは全て無傷で回収でき、細胞生存性も非ガラス化よりわずかに落ちる程度であった。PLL 無のコーティング法では細胞生存性は PLL 有と変わらなかったのに対し、無傷で回収できたシートが殆ど無かった。シート構造の保持には PLL の存在が非常に重要である事がわかる。ラップフィルム法 (PLL 有) ではシートは全て無傷で回収でき、細胞生存性は有意差はなかったが若干コーティング法より低かった。シャーレ法 (PLL 有) でも、全て無傷で回収できたが、細胞生存性はラップフィルム法よりさらに低くなった。原因は、シャーレ法では液量が多い為、ガラス化法の条件を満たしていないためと考えられる。

2011 年度までの到達点は、コーティング法を開発 (特許出願) し、積層化ウサギ軟骨細胞シートでの用途をつけ、シートの破断が無くガラス化・融解が可能であること、細胞生存性の低下もない事を確認した。2012 年度のこれまでの成果は、PLL 有のコーティング法では非常に再現性が高くガラス化・融解によるシートの破断がない事がわかった。ただし、ラップフィルム法では細胞生存性

が非ガラス化試料よりわずかに低下してしまうため、今後の課題である。コーティング法、ラップフィルム法は従来法に比べると細胞生存性は改善されていた。予備的な実験では、コーティング法では、より脆弱な（1重、2重）のガラス化が可能であった。また、DMSOを使わないガラス化にも可能性があり、増粘剤でのガラス化安定性の検討も行っている。

#### 2-4 「低侵襲移植用治具，効率的培養法に関する研究」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

今回の自己細胞シート臨床研究では、厚労省の規定で細胞シートの大きさである  $4.2\text{cm}^2$  以下という規定が設けられている。将来的により大きい細胞シートを作製するため、大型の培養器材を開発する事が一つの課題となっている。なるべく大きいもので、扱いやすく、基本的なハンドリングが向上するような器材を開発してもらいたいと考えている。

研究計画は、大型セルインサートの開発、移植時に用いる移植用治具の設計、臨床研究のデータを有効利用できるのかを PMDA での薬事戦略相談を利用しながら検討していきたい。

#### 4. 質疑応答

<自己軟骨細胞シートについて>

光島 PO：これまでの前臨床段階で使用された動物モデルは何でしょうか。

佐藤：ウサギとミニブタで有効性の確認をしています。安全性の評価としての造腫瘍性否定試験では、マウス免疫不全動物に軟骨細胞シートを移植して腫瘍化しない事を確認しています。

光島 PO：適切な動物モデルは完成されているのでしょうか。あるいは、この5年間で改良や構築などを考えているのでしょうか。

佐藤：自己細胞シートのヒト幹細胞指針申請時に既に確立されています。全層欠損モデルと、部分損傷モデルの両方で有効性を確認しています。今までの多くの再生医療のものは全層欠損モデルを使用していますが、全層欠損モデルと部分損傷モデルの両方とも確認しました。全層欠損モデルはウサギとミニブタを使用しています。同種の方も自己細胞と同じように確認していきたいと思っています。

光島 PO：申請書に記載されている疾病名が膝軟骨損傷とありますが、OAとは違うものなのでしょうか。

佐藤：膝関節軟骨損傷というと外傷のイメージが強いと思うのですが、私共が対象としているのは、それ以外が健全な軟骨だけではなく、ある程度変性してしまったものも変形性関節症になってきますので、かなり幅を持たせて対象の年齢を20-60歳にしてありますので、現実に変形性関節症が発症してしまった患者さんの膝で厚労省の規定する軟骨損傷があるものに関して応用しています。

加藤 PO：膝軟骨損傷を抱えている患者さんは、基本的に部分的にOAを含んでいると考えてよいのでしょうか。

佐藤：そうです。

加藤 PO：対象となられる候補者の患者さんは多くいるのでしょうか。

佐藤：候補者はいらっしゃいますが、年齢の制限や損傷の大きさ深さ方向の制限がありますし、大きさ等を現在の MRI 等ではなかなか評価しきれません。まず術前の関節鏡で検査をして、初めて適応かどうか分かるので厳しいところでもあります。

加藤 PO：患者一人に対して、移植後は最低 1 年みていかなければならないのですね。

佐藤：はい。エンドポイントを 1 年として、1,3,6 ヶ月で臨床のスコアと MRI をとって、最後 1 年経過後に関節鏡を行なって、直視での検査と超音波法による軟骨の粘弾性の評価等も合わせて軟骨の総合的な評価を行なうプロトコールになっています。

加藤 PO：最低平成 25 年の内に目標数エントリーし実施できないといけませんね。問題はないのでしょうか。

佐藤：今年度 5 例くらいは終了したいと思います。既に終了した 2 例とこれから 3 例を行なっていくと考えていますが、予定していた患者さんが的確でないことがあると、私共は計画的に予定を組んで行なっているのでブランクが一定期間空いてしまうので、そこが問題です。

光島 PO：最終的に 10 症例でとお考えでしょうか。

佐藤：10 症例で申請を行なっていますが、安全性が確立された時点で次の段階に進みたいと考えています。

光島 PO：今年度のその他の申請金額が 1500 万となっていますが、5 例程度ならその予算内で行えるという事でしょうか。

佐藤：2 例は終了しているので、あと 3 例くらいは実施したいと思います。

光島 PO：細胞シートの積層化ですが、軟骨細胞と骨膜細胞との共培養についてどのような方法でしょうか。

佐藤：骨膜細胞ではなく滑膜細胞です。関節の中には軟骨と滑膜という組織があり、非常に多様性に富んだ組織が含まれています。私共は、軟骨細胞シートを短期間で確実に作るために関節内を疑似した状態にするための共培養法という方法を使っており、滑膜細胞も取ってきて体外で培養しています。小久保が確認しておりますが、軟骨細胞だけを培養していると、どうしても増殖能にバラつきがでてしまうのですが、短期間で作る際になるべく均一化されたものを作り上げるために共培養法で作っています。

光島 PO：その場合、軟骨と滑膜の細胞比率は重要になってくるのでしょうか。

佐藤：検討しています。滑膜細胞の播種条件はどのくらいでしょうか。

小久保：一万 cell/cm<sup>2</sup>です。

佐藤：その共培養で行っています。

光島 PO：細胞の比率でいえば何対何くらいなののでしょうか。

小久保：軟骨 5：滑膜 1 です。

光島 PO：これが、ベターなのかは検討しているのでしょうか。

小久保：はい。検討しています。

光島 PO：これを 3 段に積層しているのですね。

佐藤：はい。移植前の1週間前の段階で剥離試験を行ない、積層化しています。

光島 PO：3層が最適という検討をされたのでしょうか。

佐藤：どれだけ重ねたら良いかという検討はしておりませんが、3層で十分な厚さと強度を保持していますので、これまで動物実験も3層で行っています。

佐藤：共培養では、軟骨と滑膜細胞は、温度応答性インサートで物理的に離れた状態で培養しています。滑膜の液性成分が軟骨を刺激している環境を作っています。

加藤 PO：申請書を読ませて頂いたのですが、そのものが増えるというよりも、シートはあくまで保護膜的な役割としての考えで、他の再生医療とは別の考え方として働き方が違うと捉えてよいのですね。

佐藤：そうです。軟骨の修復に必要な時期というのは、だいたい1,2ヶ月くらいと考えています。表層部分をきちんと治す事が一番大事で、これまで動物実験で確認しています。その際に、どの位の期間、細胞シートが移植部位に残っているのかを自治医大との共同研究で、ルシフェラーゼを強発現させるトランスジェニックラットで作った軟骨細胞シートを関節の中に移植して経時的にIVISで体外から動態評価を行ないました。結果、1,2ヶ月くらいのところにピークがあり、だんだん下がっていきます。細胞シートが機能しているのは1,2ヶ月くらいだろうと確認しております。ただ、非常に少ない値ではありますが、機能しているかどうかは別の話として1年以上も残存している事も確認しています。

光島 PO：論文を拝見しましたが、スフェロイド移植との比較はされたのでしょうか。

佐藤：移植の簡便さを考えるのであればスフェロイドなら関節鏡視下で行える可能性はありますが、スフェロイドの方が良いというデータも持っておりませんし、大型動物実験の方もまだです。

#### <同種軟骨細胞シートについて>

光島 PO：対象患者さんはOA患者の初期、中期を対象にお考えなのでしょうか。

佐藤：厚労省の了解が得られればOA患者さんの初期、中期に対応したいと考えていますが、OAの初期の場合、そのような患者さんに手術的な事をしてよいのかという問題もあり、今の症例の適応とあまりかわらないようにすることが無難ではないかと考えています。

光島 PO：OAの初期というのは、症状的にはっきりと診断がつくものなのでしょうか。また、マーカーのようなものがあって区別出来るのでしょうか。

佐藤：世界中で研究されていますが、軟骨の特異的なマーカーはまだありません。臨床的には、画像診断、MRIで軟骨損傷を確認し、臨床症状での判断も行ないます。外傷の既往がある患者さんは若くして変形性関節症になりやすいので、対象となってくると思います。

光島 PO：細胞ソースの話ですが、多指症軟骨細胞のゲノム異常はないのでしょうか。

佐藤：報告はされております。しかし膝に移植して指が出てくる事は考え難いですし、高齢者の細胞を使用するより幼若な細胞を使用した方が活性が高くよいと思います。

加藤 PO：一人のドナーからと考えているのでしょうか。

佐藤：P3で積層化軟骨細胞シートが1700枚以上できる試算で、実際に一人の患者さんに使用するのは3~5枚となるので、一人のドナーからかなりの患者さんが救えるポテンシャルを有していると

考えられます。オーダーメイドで行うよりもはるかに効率的で、有効性の高いものとなると思います。患者さんの待機期間を減らせること、同種ですと安全性を追求できるという事もあります。

光島 PO：いろいろなドナーからの細胞を別々にバンク化するお考えはあるのでしょうか。

佐藤：将来的にはあったほうがよいと思いますが、トレーサビリティがしっかりして、メジャーなゲノム異常がないものをストックしていくことになるかと思います。

佐藤：軟骨をチップ状にした製品も販売されていて、細胞ソースの一つとして考えていましたが、厚労省との話し合いの中でトレーサビリティを考えれば成育医療研究センター研究所の多指症検体がよいのではないかという方向になりました。

加藤 PO：保存法に関してですが、特許を申請されていますが、手技的に難しくはないのでしょうか。

長嶋：ふつうは液体窒素の溶液中で凍結させるものを、今回凍結液を表面にまぶした状態で凍結するという発想の問題であって、真似しようとすれば可能となってしまいます。

加藤 PO：実施例はウサギの細胞シートですか。

長嶋：そうです。

加藤 PO：温度と時間のどちらが重要なのでしょうか。

長嶋：温度です。受精卵では詳しく調べられています。今回の方法は機械化するには可能な方法なのではないかと考えています。

小林：一度融解したものを再度ガラス化するというのは可能なのでしょうか。

長嶋：ガラス化状態がよければ可能です。ヒトの受精卵では行なわれています。

加藤 PO：パウチは、凍結した状態のものが入っていて、使用の際に融解して使うかたちになるのでしょうか。

長嶋：そうです。凍結したものが入っていて、使用の際に温めて融解することになります。

加藤 PO：3層なので、このようなガラス化の条件なのでしょうか。枚数を変えれば、条件も変わってくるのでしょうか。

長嶋：そうです。テスト的に1層2層も行なっていますが、工夫すれば出来るのではないかと考えています。大きなシートの場合も、それに対応していきたいと考えています。

加藤 PO：動物実験では、全層欠損と部分損傷と両方行なっていますが、今回の臨床研究でも両方の方をわざわざ選んで行っているのでしょうか。

佐藤：適応が Outerbridge 分類で GradeⅢ以上となっていて、軟骨が半分以上削れてしまった患者さんに適応となっています。深さ方向や大きさの規定を考えると、全層欠損に近い患者さんです。既存の方法と同じ適応になってしまっています。必ず手術が必要となっている患者さんを限定に行なっています。

光島 PO：申請書に記載されている、“軟骨誘導イニシエーター”とはどのような意味でしょうか。

佐藤：不要な細胞を削り取る際に骨髓細胞が出てきて、骨髓細胞が分化して軟骨細胞に置き換わっていきます。細胞を動員して再生させるという事です。ただし、置き換わる細胞がただそのままだと線維性の軟骨という質の悪い細胞になってしまいますが、細胞シートがある事で軟骨に分化しやすくなるという事でイニシエーターという表現をしております。

光島 PO：シートから液性因子が出ているということでしょうか。

佐藤：そうです。TGF- $\beta$  が圧倒的に多いので、TGF- $\beta$  と考えられます。浜橋助教が論文化し、もうすぐ発表されますが、シングルセルで入れるよりも 20 倍以上の高濃度で出ています。

光島 PO：安全性に関する事ですが、ウサギの細胞で実験しているのでしょうか。

加藤：ヒトの細胞シートでやっています。まだ多指症検体では試していません。

光島 PO：今後は多指症検体でもお考えでしょうか。

加藤：はい。考えています。

光島 PO：液性因子が関与しているという事ですが、基本的な研究も同定等を含め免疫のメカニズムも検討されていくのでしょうか。

加藤：もともと間葉系幹細胞の方の研究が進んでいて、液性因子に関してもいくつか報告あり、軟骨細胞に特異的ともいえる TGF- $\beta$  や、プロスタグランジン、HGF などとも言われていますが、複数のもものでは言われていてもその単独では区切れないというのがあります。佐藤先生のお話にあったように、シート化すると TGF- $\beta$  が同細胞数のシングルセルより 20 倍も高いという結果が出ていますので、軟骨細胞の場合特に TGF- $\beta$  にまずターゲットを絞って確認したいと思っています。TGF- $\beta$  だけではないとは考えているのですが。

光島 PO：5 年間の研究期間で、そこまで検討したいという事ですね。

加藤：そうですね。出来る限り行ないたいと思います。

光島 PO：参考データにありましたが、液性因子のみだと T 細胞の活性化を半分くらい抑えているだけになりますよね。

加藤：間葉系幹細胞も同様なのですが、細胞同士の接触と液性因子の両方が関与しているので、参考データは細胞と物理的に離して、液性因子だけで半分くらい抑制できているという事を示しています。

光島 PO：両方必要ですよという事になるのですね。

加藤：そうですね。

光島 PO：細胞同士がインターアクションしているということなのでしょうか。

加藤：そうですね。液性因子だけでは、半分くらいしか抑えきれないという逆のエビデンスから考えると、細胞同士での接触が関与しているといえますが、軟骨細胞に関してはどういう機構が働いているのかは、今のところ分かっていません。

加藤 PO：先進医療になると、どの位患者さん負担になるのでしょうか。

佐藤：先進医療をいくりに設定するかによると思います。保険診療とは別に患者さんから先進医療を受けるための自費でいただくのですが、今掛かっている額をそのままやるということになっても、患者さんは集まらないと思います。今の段階でまだ考えておりません。

光島 PO：今の予算の使い方ですが、ロードマップについてですが、自己細胞シートでは先進医療にもっていくことで費用的にはこの部分は研究費の対象から外れるということなのでしょうか。

先進医療に申請して実施となれば、別のファンドで行うことになるのでしょうか。

佐藤：先進医療まで認められれば、そうなると思います。

光島 PO：同種細胞シートでは、自己細胞シートで申請したようにいけば 5 年間のなかで臨床研究まで進めるといえる可能性があるということですね。



佐藤：はい。大型動物実験を実施しなくてはならないかという部分で、かなり大きなハードルになってくると現在考えております。同種同系の実験はすでに行なっているのですが、同種異系でもし行なう必要が出てくれば、かなり時間を要する事はあります。今までの、科学的に安全であるということと、同種の細胞に関しては世界でも少しずつ始まっているので、臨床研究レベルでは免除頂けるのであれば、もっと早く進めると思います。

光島 PO：ロードマップ上に薬事戦略相談が DNA チップ研とセルシードであるのですが、GLP レベルでの大型動物実験が必要であるかどうかの戦略相談というのは、いつごろお考えでしょうか。

佐藤：GLP レベルでの大型動物実験が必要かどうかについては、ヒト幹申請を通すための実験ですので厚労省との相談になると思います。薬事戦略相談については、DNA チップ研との CGH アレイを安全性の標準ツールにしたいと考えていて、それが果たして有用なのかどうかを踏まえて薬事戦略相談に行きたいと考えています。

光島 PO：同種のヒト幹細胞臨床研究の厚労省との折衝というのは、3年目くらいを考えているのでしょうか。

佐藤：一番大事な安全性のチェックが全部済んだところだという事になると思います。

光島 PO：今行なっている自己の臨床の成績も考慮されるということになってくるのでしょうか。

佐藤：そう思います。

光島 PO：26年度の10月くらいで予定の10例が終了して、26年度終了時点では全て揃っているという予定でしょうか。

佐藤：それが一番理想ではあります。

光島 PO：自己の臨床の成績を持って、同種の方に行けたら理想ですね。

光島 PO：交付申請書で、直接経費で2480万が計上されていますが、その他の研究費の部分は臨床研究の患者3名の研究費とみてよいのでしょうか。

佐藤：患者さんの臨床研究、あるいは安全性試験等の外注費用となります。

(以上敬称略)

## 5. 施設見学

CPC と手術室の見学

## 6. 閉会

以上

