

201206019A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療に関する前臨床研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武部 貴則

平成25 (2013) 年5月

目 次

I. 総括研究報告	
自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療に関する前臨床研究 武部 貴則	3
II. 分担研究報告書	
1. 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた 軟骨前駆細胞の品質評価に関する研究 谷口 英樹	19
2. 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた イヌ自家移植モデルによる安全性・有効性に関する研究 小林 眞司	33
3. 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた GMP 準拠培養システム構築に関する研究 前川 二郎	45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69

I. 総括研究報告書

自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療に関する前臨床研究

研究代表者

武部 貴則 横浜市立大学 臓器再生医学 助手

研究要旨

頭蓋・顎・顔面領域の組織変形に対する現在の標準的な治療法では、広範な変形に対する治療は困難であり、長期的な形態保持性の観点からも満足が行く臨床成績が得られていない。そこで、これらの課題を克服しうる新たな治療法の一つとして、幹細胞生物学の知見に基づくヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が待望されている。我々は、世界に先駆けて低侵襲操作で採取可能なヒト耳介軟骨膜中から高い増殖能、多分化能、自己複製能などの特徴を有する軟骨前駆細胞を分離・培養することに成功している。このヒト軟骨前駆細胞は、軟骨細胞と同等の高い軟骨基質産生を行うことが確認されただけでなく、免疫不全マウスへの移植により長期形態保持性に優れたヒト弾性軟骨を再構築できることを見出している。本研究では、自己軟骨前駆細胞を用いた質の高い軟骨再生医療の実現化を目指し、GMPグレードの安全な細胞調製法を検討し、標準化された細胞調製プロトコルを確立した。また、中動物を対象とした自家移植実験を実施し、プロトコルの検証・造腫瘍性等の安全性に関する検証を行った。さらに、臨床研究の実施に必要な文書体系の草案作成を行った。これらの基礎検証を元として、次年度からはCPC内に設置された無菌閉鎖系のアイソレータの運用を本格化するとともに、臨床研究計画書を策定し、速やかに「ヒト幹細胞臨床研究実施計画」の申請を行う。本研究が臨床応用されれば次世代の軟骨再生治療の実現にとって革新的な方法となる可能性があり、基礎研究から臨床試験に至るまでの研究段階の全てにおいて、世界をリードする画期的なトランスレーショナルリサーチとなる。

研究分担者

谷口 英樹 横浜市立大学 臓器再生医学 教授
小林 眞司 横浜市立大学 臓器再生医学 客員准教授
神奈川県立こども医療センター 形成外科 部長
前川 二郎 横浜市立大学 形成外科学 教授

研究協力者

矢吹 雄一郎 横浜市立大学 形成外科学 医員
廣富 浩一 横浜市立大学 形成外科学 医員
鍵本 慎太郎 横浜市立大学 形成外科学 医員
水野 満 横浜市立大学 臓器再生医学 大学院生
大石 美里 横浜市立大学 臓器再生医学 技術員
張 玉閔 横浜市立大学 臓器再生医学 技術員

A. 研究目的

頭蓋・顎・顔面領域の先天奇形や外傷に起因する組織変形に対する新しい治療法の開発は、全世界で100万人以上の患者に待ち望まれている極めて重要な臨床的解決課題である。現在の標準的な治療法は、自家軟骨/骨組織を移植する方法や合成高分子化合物などの医用材料を移植する方法である。しかし、自己組織移植では、採取量の制限と採取部位の侵襲が軟骨/骨組織移植に共通した問題である。また、軟骨組織移植に伴う経年的な組織変形と吸収や、骨組織移植に伴う経月的な組織吸収も極めて大きな問題となっており臨床的に満足いく長期成績が得られていない。医用材料を移植する方法においても、それらが人体にとり異物であることから、感染や炎症、それらに起因する皮膚穿孔などが生じることが知られており、これらの問題が未解決である。このような問題点を克服することの可能な新しい治療法として、幹細胞生物学の知見に基づくヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が切望されている(Fig.1)。

ヒト弾性軟骨の再構築法に適応可能な細胞源として、幾つかの可能性が示唆されている。ヒト耳介軟骨細胞は良好な基質産生能などの優位性を有するものの、採取部位への侵襲に加え、自己複製能を有する幹細胞が存在しないために細胞寿命に起因する長期的な組織維持の困難性などの問題点を抱えている。骨髄由来のヒト間葉系幹細胞は、これらの諸問題を解決できる可能性を持つ細胞の一つであるが、骨髄穿刺の侵襲が大きいこと、成熟軟骨細胞への分化能が極めて低いこと、血管侵入や石灰沈着をきたすことなどの様々な問題を抱えているため実用化の可能性は低い。他にも脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞など候補となる細胞は存在するものの、いずれも成熟軟骨細胞への分化能力が低

く、弾性軟骨における細胞外マトリックスの産生能は全く確認されていないことから、ヒト弾性軟骨の再構築法に応用可能な優れた細胞源は見いだされていないのが現状であった。

研究代表者らは、これら諸問題を解決するため、高い軟骨分化能を有したヒト耳介由来軟骨前駆細胞の利用に着目し、その再生医療技術を確立してきた。これまでに弾性軟骨であるヒト耳介軟骨組織に関しては、軟骨前駆細胞は発見されていなかった。そこで、研究代表者らは、全く解明の進んでいない弾性軟骨における幹/前駆細胞の局在を明らかとすることを目的として、マウス耳介を対象として Label Retaining Cell Assay (幹細胞の存在部位を特定する方法) を実施し、その存在部位が耳介軟骨を被覆する軟骨膜組織であることを特定してきた (Takebe T, *et al. PLoS ONE*, 6(10): e26393, 2011)。さらに、得られた存在部位の情報を基に、ヒト耳介軟骨膜より、高いコロニー形成活性・高い軟骨分化能および自己複製能を兼ね備えたヒト軟骨前駆細胞を分離することに世界に先駆けて成功している (Takebe T, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 14479-14484, 2011)。さらに、これらの知見に基づいて、ヒト耳介軟骨膜より分離したヒト軟骨前駆細胞を用いた弾性軟骨組織再構築法などの一連の細胞操作技術を確立している (軟骨細胞調製方法; 登録番号, 特許第 4748222 号国際公開番号, WO2008091013)。世界的にヒト弾性軟骨再生の研究領域において、軟骨前駆細胞を用いた研究は全く報告されておらず、本研究シーズは極めて独自性が高いといえる。軟骨組織や骨髄組織を採取する従来法と比較した場合、軟骨膜組織は厚さ約 1 mm と極めて薄く、採取部の犠牲は最小限である。さらに、ヒト軟骨前駆細胞は軟骨組織特異的な分化

能を有していることに加え、自己複製と分化による恒常的な組織維持が期待され、長期組織維持の期待される質の高い軟骨再生医療を実現可能な独創的研究であるといえる。

本研究では、研究代表者らが確立した軟骨再構築技術を、現行治療による修復が困難な高度の先天奇形や顔面変形を有する患者に対し、医療応用することを目的とした前臨床研究を推進することを目的とする。優れた軟骨再生治療をいち早く提供すべく、研究期間終了時に、「ヒト幹細胞臨床研究実施計画」の申請を行い、認可を得次第、速やかに臨床研究に移行する。

B. 研究方法

1. GMP グレード医薬品を用いた培養工程の検証

本項目では、臨床応用に適した GMP グレードの血清や液性因子 (bFGF, Insulin, L-ascorbic Acid, Dexamethasone 等) を選定し、(1)ヒト軟骨前駆細胞の拡大培養、(2)ヒト軟骨前駆細胞の分化誘導、が可能であることを、複数の小児例の臨床検体より樹立した軟骨前駆細胞を対象として検証を実施した。なお、臨床検体の採取は、横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て実施し、小耳症患者より手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。

具体的には、まず拡大培養に用いる増殖培地の組成を、10%の FBS と D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とした。それに basic Fibroblast Growth Factor(フィブラストスプレー®; 科研製薬)の投与量によって条件を分け比較検討した。以前より確立してきた培養法においては、分化誘導培地において bFGF を 10 ng/ml 使用し、増殖培地においては bFGF を添加していなかった。本研究においては、10 ng/ml 前後で濃度条件を振

って検討した。まず、1000 cells/cm² で 35 mm ディッシュへ播種し、拡大培養を 10 日間施行した。その後、Collagenase 処理し、それぞれの細胞数をカウントした。

次に、軟骨分化誘導を行う分化培地の検討を行った。1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミン C 注 10% PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキササート注射液®; 富士製薬工業株式会社), basic Fibroblast Growth Factor (フィブラストスプレー®; 科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とした。それにインスリン(ヒューマリン R®; 日本イーライリリー)の添加の有無で比較検討した(Fig.2)。

さらに、医薬品を用いた安全性の高い培養工程が、背景因子の異なる様々な患者(例えば、成人例)由来ヒト軟骨前駆細胞を用いても実施可能であることを、細胞増殖の検討、および分化誘導効果を定量的に評価することにより検証を行った。最終的に分化誘導を行った軟骨前駆細胞は免疫不全マウス皮下へ移植を行うことにより、軟骨再構築が可能であるか否かを検証した(Fig.2)。

また、将来的に維持培養に用いる血清をウシ由来から自家血清化を目指し、同意の得られた患者より自家血清を採取し基礎的な比較検討も実施した。自家血清含有培地使用群と FBS 含有培地使用群に分け、(1)血清濃度における増殖能の評価、(2)自家血清で拡大培養した軟骨前駆細胞における軟骨分化能の評価、(3)重症免疫不全マウスへの皮下移植実験を行った。

2. 培養工程における品質管理基準の検証

本項目では、ヒト軟骨前駆細胞の調製にあたり、調製処理、中間段階の調製物、最終調製物の保管等の作業管理システムの客観的

基準を構築することを目的として、前項によって決定された安全性の高い細胞調製法のもと、品質評価に必要な基礎的な検討（分化誘導基準、感染判定、逸脱事象設定等）を行った。具体的には、肉眼観察・FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)による細胞表面抗原解析・グリコサミノグリカン測定試験・無菌試験・マイコプラズマ試験・エンドトキシン試験などを実施した。これにより、中間産物および最終産物の安全性に関する定量基準を設定し、再現性良く安全な出荷判定を行うための客観基準の構築を試みた。

3. 中動物を用いたプロトコルの検証

本項目では、動物を用いて耳介より分離した軟骨前駆細胞による自家移植実験を実施する。試験動物は健康なビーグル(TOYO Beagle, 5ヶ月齢, オス)を6頭用いた。いずれも検体採取にあたり、獣医師指導のもと

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号, 最終改正平成18年6月2日法律第50号), 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示第88号), 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 2006年6月1日)を遵守した麻酔処置を実施した。

全個体において片側外耳介を採取し、無菌的に皮膚を剥離した。得られた検体のうち脂肪や血管, 他の組織を剪刃で取り除いた後, 軟骨組織から軟骨膜を剥離し, 耳介軟骨膜中に存在する軟骨前駆細胞の分離・培養を行った。弾性軟骨再生治療の安全性の評価を目的として, われわれが開発した細胞増殖・分化誘導プロトコルに基づいて調製された軟骨前駆細胞の移植実験を実施した。本検討するとともに, 手術に関わる有害事象の検証や, 造腫瘍性等の安全性に関わる検証を行

った。移植片は, 複数の時系列で摘出を行った。再生された軟骨組織をヘマトキシリン&エオジン, アルシアンブルー, エラスチカ・ワンギーソン(弾性線維染色)の各染色で組織学的に解析するとともに, コラーゲンI, IIなどの免疫組織学的な評価も実施した。また, 再生軟骨中のプロテオグリカン, 1型コラーゲン, 2型コラーゲンの各基質含有量の計測を行った。

4. 各種手順書の草案作成

平成25年度に予定している細胞プロセッシングアイソレータの試験運用に向け, GMPグレードでの細胞調製が可能な各種作業書類の草案作成を行った。具体的には, 標準作業手順書, 製品標準書, 製造指図書, その他電子システム構築に必要な書類の草案を作成した(Fig.3)。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト生体試料の採取を伴うため, 本研究機関で設置された倫理委員会で研究の科学的妥当性および倫理的正当性について検討・承認を得た上で行う必要があった。使用する生体試料は研究の目的, 提供者が被る不利益の有無, プライバシーの保護等に関して十分なインフォームドコンセントを行った後, 文書による本人の同意の得られたものに限った。医療機関(横浜市大付属病院歯科・口腔外科及び市民医療センター, 神奈川県立こども医療センター)にて検体の採取を行い, シャーレ等に入れ, 研究施設である横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生医学に搬送した。研究施設へは, 患者の氏名その他の個人情報とは連結不可能な匿名化ののちに搬送した。このため, 患者の個人情報(プライバシー)は厳重に保護された。個人情報の保護に関する法律(平成15年5月, 法律

57号)に基づき、提供された試料、個人データの利用については必要かつ適切な措置を講じた。

2病院にて倫理委員会の承認済みであり、適宜更新され現在に至る(横浜市立大学医学部附属病院 承認番号 064, B090702029, 神奈川県立こども医療センター・承認番号 3-74)。尚、本研究ではイヌを用いた動物実験を行ったが、実施に際しては動物愛護法などに則り、横浜市立大学実験動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究成果

前臨床研究の遂行にあたり、まず適応症例を外傷性・先天性顔面部陥凹変形症例と決定した(Fig.1)。本症の従来治療としては、自家組織(骨/軟骨・脂肪弁)グラフトによる再建術が行われている。しかし、長期形態維持や生着率に問題があり、複数回の侵襲的な手術が必要であることが問題点とされていた。本研究期間終了時には、Fig.1の矢印が示す様な、顔面部の陥凹変形病変に対し、分化誘導を行った自己耳介軟骨膜由来軟骨前駆細胞の細胞注入を実施、再生軟骨による治療有効性・安全性の検証を試みる。

さて、本研究では、GMP準拠プロトコルの策定へ向けて、以下、1.GMPグレード医薬品を用いた培養工程の検証、2.培養工程における品質管理基準の検証、3.中動物を用いたプロトコルの検証・安全性の検討、4.臨床研究に必要な書類作成の4項目を実施した。

GMPグレード医薬品を用いた培養工程の検証に関しては、①臨床応用可能なGMPグレードの血清の選定、および液性因子の選定を行い、②小児～成人例の新規に樹立した10例の細胞を含む、23例での細胞増殖・分化誘導試験の実施(Fig.2)、③自家血清含有培地を用いた細胞増殖能、軟骨分化能、組織再

構築能の比較検討を実施した。また、培養工程における品質管理基準の検証としては、FACS解析、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験(PCR)を実施し、分化誘導を行った最終産物の出荷判定基準を規定するためにELISAによるグリコサミノグリカン、エラスチン定量実験を実施した。

一方、中動物を用いたプロトコルの検証・安全性の検討に関しては、耳介より分離した軟骨前駆細胞による分化誘導工程の検証、自家移植実験を実施し、弾性軟骨再構築の実効性・有効性の評価を、計6例のイヌを用いて実施した。再生弾性軟骨の形成を確認するとともに、明らかな有害事象を認めず有益な基礎データを取得することができた。

次年度においては、治療有効性・安全性の更なる検証を目的として、霊長類(サル)より採取した耳介軟骨膜由来軟骨前駆細胞を培養・分化誘導し、同個体のサル(頬部、背部、腹部)に移植することで弾性軟骨再生モデルの臨床前試験を予定する。コントロールとして骨髄由来間葉系幹細胞を採取し、移植を行う。サルは、二足歩行動物であり、かつマウスやイヌと比較してより大型であることから、移植床がヒトにより近い組織構造と組織緊張を持つ動物といえる。したがって、臨床例により即したモデルでの検証が可能となることから、自家軟骨前駆細胞による再生軟骨が顔面部変形の修正に有用であるか否かの検証を試みる。

一方、標準作業手順書、製品標準書、製造指図書に関しても既に草案作成を完了しており、次年度における申請へ向けて適切な準備段階に到達することができたといえる(Fig.3, 4)。

D. 考察

本年度においては、当初計画の通りの進捗

を認めており、臨床研究の開始へ向けて基礎的なデータ取得ができたものと考えられる。これらの研究成果を踏まえ、次年度においては、①附属病院に設置された細胞プロセッシングアイソレータを用いた試験運用の実施、②各種手順書および被験者への説明書類等の完成・移植または投与段階における安全対策の構築、③ヒト幹細胞臨床研究指針に準拠した臨床研究計画書の策定と厚生労働省への申請を行い、臨床研究の実施へ向けて研究を加速化させる。なお、計画は次の通りである。

①附属病院に設置された細胞プロセッシングアイソレータを用いた試験運用の実施

A) 細胞プロセッシングアイソレータ(CPC)を用いた細胞分離・培養工程の検証

横浜市立大学附属病院では昨年、高いレベルでの空調管理を可能とする設備と各種監視システムを有する細胞プロセッシング室(CPC)を建設した。CPC内にはクラス100の空気清浄度を持つアイソレータと、それに閉鎖的に接続可能な恒温培養器、冷却遠心機、位相差顕微鏡を導入済である。本研究項目では、申請者が初年度に確立した手順書に基づいてCPCの試験運用を実施する。試運転の結果得られた改善点をブラッシュアップし、初年度に作成した草案を再構成する。

平成24年度において選定されたGMPグレードの血清や液性因子を用いた培養工程(試薬等の受け入れ試験の実施も含む。)をCPC内で検証を行い、全培養工程が安定的に再現性よく実施可能であることを検証する。昨年度新たに樹立を行った細胞等を用いて、背景因子の異なる様々な患者由来ヒト軟骨前駆細胞を用いて、細胞増殖および分化誘導効果の定量的検証を行う。

B) 培養工程における品質管理基準の検証

ヒト軟骨前駆細胞の調製にあたり、調製処

理、中間段階の調製物、最終調製物の保管等の作業管理システムの客観的基準を策定する。平成24年度において得られた参考値を指標として、中間産物および最終産物のバリデーションに必要な定性基準の明確化ならびに定量基準の数値化を行い、再現性良く安全な出荷判定を行うための客観基準を構築する。

②各種手順書および被験者への説明書類等の完成・移植または投与段階における安全対策の構築

平成24年度において作成された標準作業手順書、製品標準書、製造指図書、電子システム構築の草案を基礎として、研究項目1.において得られた知見をもとに詳細な部分において改良を加え、各種作業書類を完成させる。

さらに、被験者への説明を目的として、臨床研究目的や意義・方法、予期される効果と危険、代替治療法の有無および当該法との比較、何時であっても同意が撤回可能であること、健康被害が生じた際の補償に関する措置、個人情報保護等に必要な事項、などが平易な用語を用いて記載された書類の作成を行う。

また、移植または投与段階における安全対策の構築を目的として、採取した細胞の情報管理体制を構築し、被験者の試料および記録等を保存する体制を整備する。

③ヒト幹指針準拠臨床研究計画書の作成と厚生労働省への申請

①、②において作成された実施計画書、研究要旨、同意書、標準作業手順書、製品標準書、製造指図書を含む、臨床研究実施計画の最終確定版を策定する。これらの準備が全て整い次第、速やかに厚生労働省への申請を行う。

E. 結論

研究代表者らが世界で初めて同定した低侵襲的に採取可能なヒト軟骨前駆細胞を用いれば、高い軟骨分化能を有しながらも、幹細胞の特徴である自己複製と分化による恒常的な細胞更新による組織維持が期待される。したがって、このような優位性を有する細胞を用いて軟骨再生治療が展開できれば、低侵襲的に、かつ、形成外科治療の必須要件である長期形態維持性に優れた再生医療となることが期待される。

頭蓋・顎・顔面領域の先天奇形や外傷に起因する組織変形に対する質の高い治療法の開発は、全世界で100万人以上の患者に待ち望まれている極めて重要な臨床的解決課題である。従来、患者自身の軟骨組織を移植する手術が広く行われていが、採取に伴う術後の疼痛や胸部の瘢痕が問題となるばかりでなく、前胸部の変形をきたす症例もある。また、先天性の変形に対する手術は小児期に行われることが多いため、患者へ対する侵襲は相対的に大きく、その負担は計り知れない。

本研究により我が国での臨床研究が開始すれば、前記のような患者・患児に対し従来治療の問題点を克服し得る優れた軟骨再生治療を提供できるものと期待される。また、本臨床研究によってその有効性が明らかとなれば、潜在的に存在する極めて多くの患者への適応拡大が期待される可能性がある。なぜならば、本細胞は関節軟骨への分化能力をも有していることがすでに明らかとなっており、莫大な医療ニーズの存在する関節疾患への適応拡大も大いに想定されるからである (Fig.5, Mizuno M, *et al.* Submitted)。このように、さまざまな軟骨組織の欠損を対象とした再生医療への展開可能性があることから、国際施策としても有益な研究へと進展してゆくことが期待される。このような極め

て独自性・革新性の高いシーズを用いて、多面的でかつ有用性の高い再生医療技術へと醸成してゆくためにも、今回我々が実施を試みる自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実現化へ向けてさらに研究開発を加速化させる (Fig.6)。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takanori Takebe*, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, Hideki Taniguchi *: Vascularised and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013 (in press)
2. Hiroyasu Tanaka*, Shin Tanaka*, Keisuke Sekine*, Sayaka Kita, Ai Okamura, Takanori Takebe, Yun-wen Zheng, Yasuharu Ueno, Junzo Tanaka, Hideki Taniguchi (*; Equal contribution). Efficient generation of pancreatic β -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials*, 2013, S0142-9612
3. Judee Grace Nemeno-Guanzon, Johan Robert Berg, Mitsuru Mizuno, Soojung Lee, Yong Hwa Jo, Jee Eun Yeo, Bo Mi Nam, Bo Young Kim, Dae-Hyun Kim, Yong-Gon Koh, Takanori Takebe* and JeongIk Lee*: Towards the advancement of blood vessel tissue engineering. *International Journal of Tissue Regeneration*, in press (*: equally correspondence). REVIEW

4. Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, Hiroomi Kan, Hiromu Suzuki, Mitsuru Mizuno, Yuichiro Yabuki, Takuro Adegawa, Tomohiko Yoshioka, Junzo Tanaka, Jiro Maegawa, Hideki Taniguchi: Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. *Transplant Proc*, 44 (4), 1158-1161, 2012
 5. Takanori Takebe, Keisuke Sekine, Yuka Suzuki, Masahiro Enomura, Shin Tanaka, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Hideki Taniguchi: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*, 44 (4), 1018-1020, 2012
 6. Takanori Takebe, Naoto Koike, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Hideki Taniguchi: Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc*, 44 (4), 1130-1133, 2012
 7. Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Yuka Suzuki, Akihito Kamiya, Hiromitsu Nakauchi, Hideki Taniguchi: Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc*, 44 (4), 1127-1129, 2012
 8. Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Masahiro Enomura, Chiemi Matsui, Hiroyasu Tanaka, Hideki Taniguchi: Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc*, 44 (4), 1104-1106, 2012
 9. Hiroyuki Koike*, Koji Kubota*, Keisuke Sekine*, Takanori Takebe, Rie Ouchi, Yun-Wen Zheng, Yasuharu Ueno, Naoki Tanigawa, Hideki Taniguchi. (*; Equal contribution) Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC biotechnology*, 12 (1), 81, 2012
 10. Takebe T*, Kobayashi S*, Zheng YW, Mizuno M, Yabuki Y, Maegawa J, Taniguchi H: Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. (*; Equal contribution) *PLoS One*. 2011;6(10): e26393
 11. Takebe T*, Kobayashi S*, Imui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H. (*; Equal contribution) Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the perichondrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35):14479-84, 2011
 12. 武部貴則, 谷口英樹 ”細胞から臓器へ, 再生医療研究が拓く近未来像”, Vol.19 No.1, 2012年7月, Organ Biology
2. 学会発表
- * 学会発表 (国際)
1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H: Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012 (Oral)
 2. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Koike N, Taniguchi H, Tanaka H: Generation of islet like structures with human functional vascular networks. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting.

- Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
3. Zheng Y, Li B, Zhang R, Kimura M, Tsuchida T, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: Self-renewal versus differentiation as well as the liver repopulation capability of human hepatic stem cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
 4. Zhang R, Zheng Y, Tsuchida T, Takebe T, Kimura M, Li B, Takiguchi K, Sekine K, Ueno Y, Taniguchi H: Construction of chimeric mice with human immatured hepatocytes. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
 5. Sekine K, Ishikawa M, Takebe T, Suzuki A, Kawashimo K, Matsui C, Taniguchi H: Identification of pancreatic stem/progenitor cells expressing PDX1 reside in the CD133 positive pancreatic duct. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
 6. Mizuno M, Kobayashi S, Takebe T, Suzuki H, Murata S, Yabuki Y, Hiroto mi K, Yasumura K, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstitution of Articular(joint) cartilage defects by auricle(ear) derived stem/progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012
 7. Takebe T, Sekine K, Fujiwara R, Matsui C, Enomura M, Tanaka H, Koike N, Taniguchi H: Engineering of vascularized human hepatic tissue. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
 8. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Zheng YW, Taniguchi H: Self-assembling Hepatic organoid formation in vitro. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
 9. Suzuki H, Kobayashi S, Takebe T, Mizuno M, Yabuki Y, Yasumura K, Murata S, Maegawa J, Taniguchi H: Identification and utilization of human cartilage stem cells from the ear. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
 10. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Fujiwara R, Tanaka H, Dhiemi Matsui, Koike N, Taniguchi H: Vascularization of pancreatic beta-cells inside the transparency cranial window. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep 25-28, 2011 Seoul, Korea
- * 学会発表 (国内)
1. 谷口英樹, 武部貴則, 関根圭輔, 青山晋輔, 安達弥永: ヒト iPS を用いたフェーマコセロミクス基盤技術の開発 第127回日本薬理学会関東部会 シンポジウム Oct 20, 2012 東京
 2. 武部貴則, 関根圭輔, 江野村允宏, 小池博之, 張冉冉, 三橋優澄, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹: 多能性幹細胞を用いた機能的なヒト臓器の創出 第11回日本再生医療学会 Jun 12-14, 2012 横浜
 3. 武部貴則, 小林眞司, 矢吹雄一郎, 鈴木啓, 水野満, 安村和正, 広富浩一, 鄭允文, 前川二郎, 谷口英樹: ヒト耳介軟骨膜由来幹/前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発 第11回日本再生医療学会 Jun 12-14, 2012 横浜

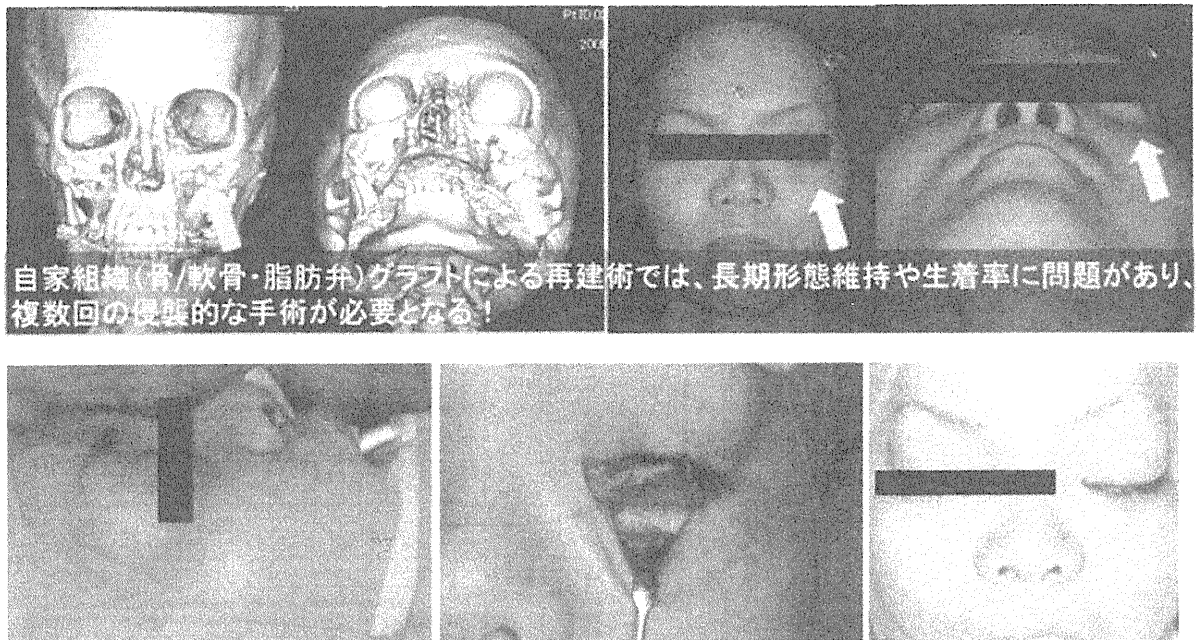
* 座長等

1. Takanori Takebe: **Symposium** “Current state and future of Regenerative Medicine”, The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 29.
2. 武部貴則：一般演題(口演) 軟骨 第12回日本再生医療学会. Mar 21-23, 2013 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

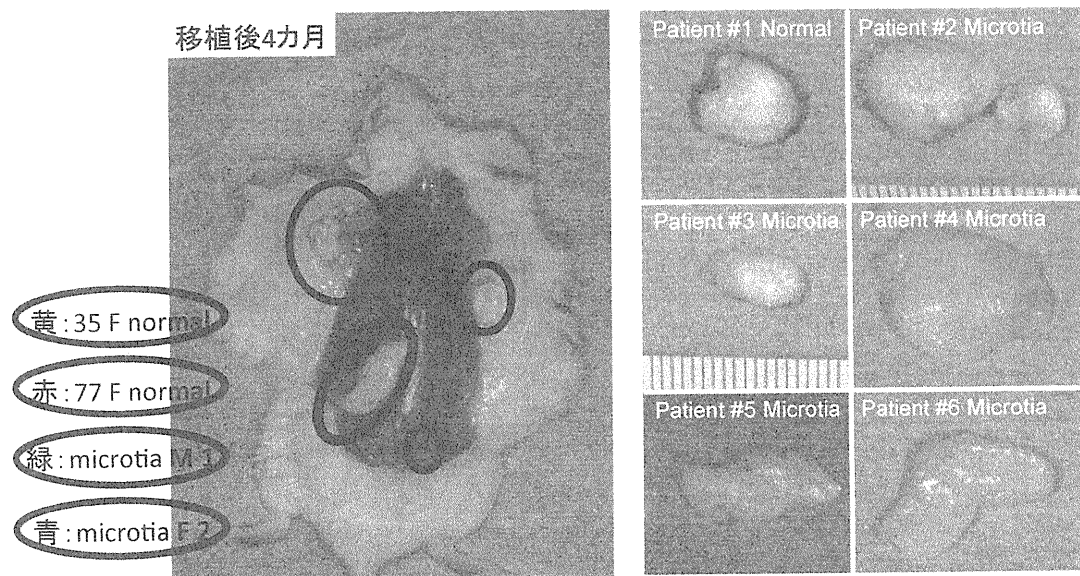
Fig.1 適応症例の決定（外傷性・先天性顔面部陥凹変形症例）



矢印の示す様な、顔面部の陥凹変形病変に対し、分化誘導を行った自己耳介軟骨膜由来軟骨前駆細胞の細胞注入を実施、再生軟骨による治療有効性・安全性の検証を試みる。

Fig.2 医薬品を用いた培地および成人例由来軟骨前駆細胞を用いた培養プロトコルの検証

臨床応用可能なGMPグレードの血清18ロットを対象として増殖活性評価を行い、最適なロットを選定した。また、分化誘導に用いるGMPグレード液性因子(bFGF、Insulin、L-ascorbic Acid、Dexamethasone)を選定



複数検体の患者由来軟骨前駆細胞を用いて検証を実施、良好な細胞増殖、軟骨分化誘導を確認！

Fig.3 臨床研究の開始へ向けた文書体系の作成状況一覧

文書 No.	第一階層 【品質マニフル】	文書 No.	第二階層 【規定】	文書 No.	第三階層 【手順】	文書 No.	第四階層 【記録】	文書 No.	第五階層 【標準文書】	文書 No.	第六階層 【外部文書】		
QM01	『品質マニフル』	QM01	『品質保証規定』	QP01-01	『文書管理手順』	Q001	『文書管理台帳』	SD11	『FDA無菌操作法(イ)』				
QM02	『文書体系』			QP01-02	『教育訓練手順』	Q003	『職員の教育』						
QM03	『再生細胞治療センター位電付け』					Q004	『教育訓練管理記録』						
QM04	『再生細胞治療センター組織図』					Q005	『教育訓練計画書』						
QM05	『再生細胞治療センター業務一覧』					Q016	『是正処置実施記録』						
QM06	『用語の定義』					Q017	『逸脱報告書』						
QM07	『横浜市立大学附属病院組織図』					Q061	『入退室管理記録』						
QM08	『再生細胞治療センター利用要綱』					Q091	『製品標準書』						
QM09	『再生細胞治療センター運営委員会要綱』					Q092	『製造指図書』						
QM10	『横浜市立大学職員就業規則』			QP01-03	『苦情・回収処理手順』	Q006	『苦情・回収処理調査依頼書』			SD22	『医療安全管理指針(共通編)』		
QM11	『行動計画』					Q007	『苦情・回収処理調査報告書』						
				QP01-04	『自己点検手順』	Q010	『自己点検実施表領書』						
SD01	『遺伝子治療臨床研究に関する指針』					Q011	『自己点検実施記録』						
SD02	『ヒト細胞を用いた臨床研究に関する指針』					Q012	『自己点検年間計画書』						
SD03	『ヒト(自己)由来細胞・組織加工他家畜等の品質及び安全性の確保に関する指針』					Q016	『是正処置実施記録』						
SD04	『治療薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治療薬GMP)』			QP01-05	『逸脱管理手順』	Q017	『逸脱報告書』						
SD05	『限内における血液細胞処理のための指針』			QP01-06	『変更管理手順』	Q016	『是正処置実施記録』						
						Q021	『変更申請書』						
						Q022	『変更管理記録』						
				QP01-07	『バリテーション管理手順』	Q091	『製品標準書』						
						Q025	『バリテーション実施計画書』						
						Q026	『バリテーション実施報告書』						
						Q027	『バリテーション管理記録』						
				QP01-08	『トライイン手順』	Q029	『トライイン事前チェックシート』						
		QM02	『製造管理規定』	QP02-01	『受払手順』	Q031	『原材料管理記録』			ED21	『資材搬入・搬出経路』		
								Q032	『出荷申請書・通知書』			ED22	『原材料搬入・搬出経路』
								Q033	『出入区分表』				
								Q034	『試薬管理記録』				
						QP02-02	『保管管理手順』	Q054	『資材管理記録』				
								Q034	『保管管理台帳/記録』				
						QP02-03	『原材料の安全性確認手順』	Q091	『製品標準書』				
						QP02-04	『チェックオーバー手順』	Q031	『原材料管理記録』				
								Q037	『チェックオーバー記録』				
								Q060	『機器操作標準作業書』				
						Q091	『製品標準書』						
						Q017	『逸脱報告書』						
						Q031	『原材料管理記録』						
						Q091	『製品標準書』						

200種近い文書体系の作成を概ね完了した!

Fig.4 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療実施に向けた現状版の行程表

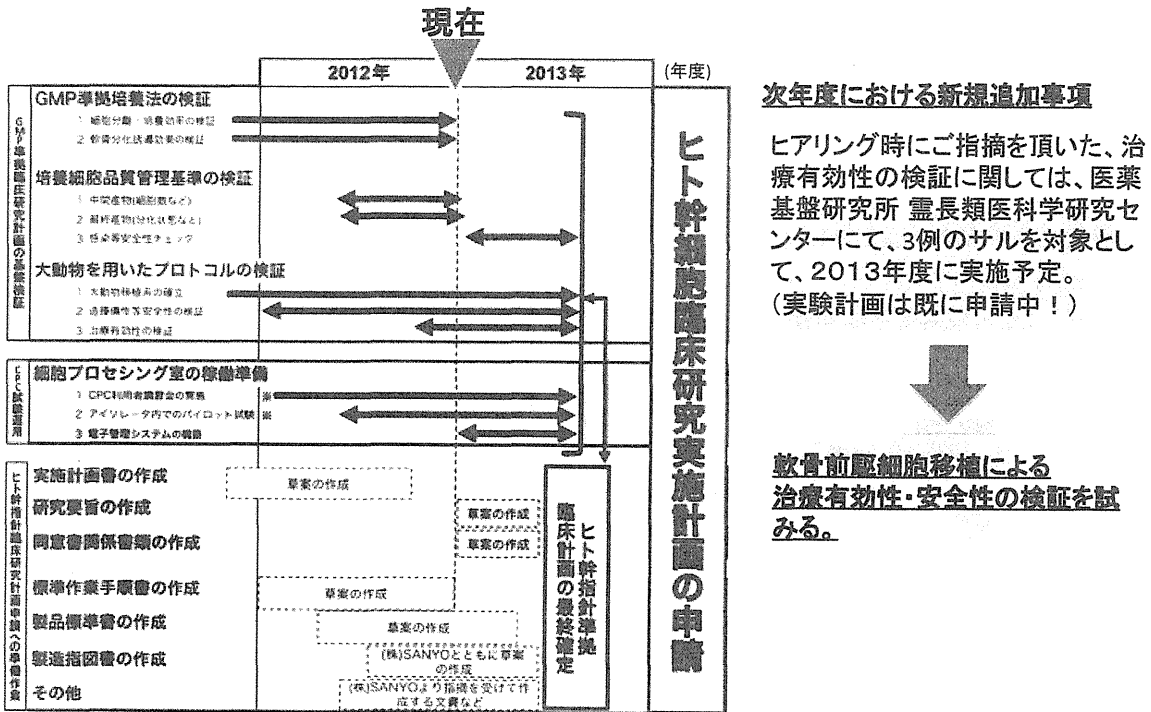


Fig.5 自己耳介由来軟骨前駆細胞の関節軟骨再生医療への展開可能性

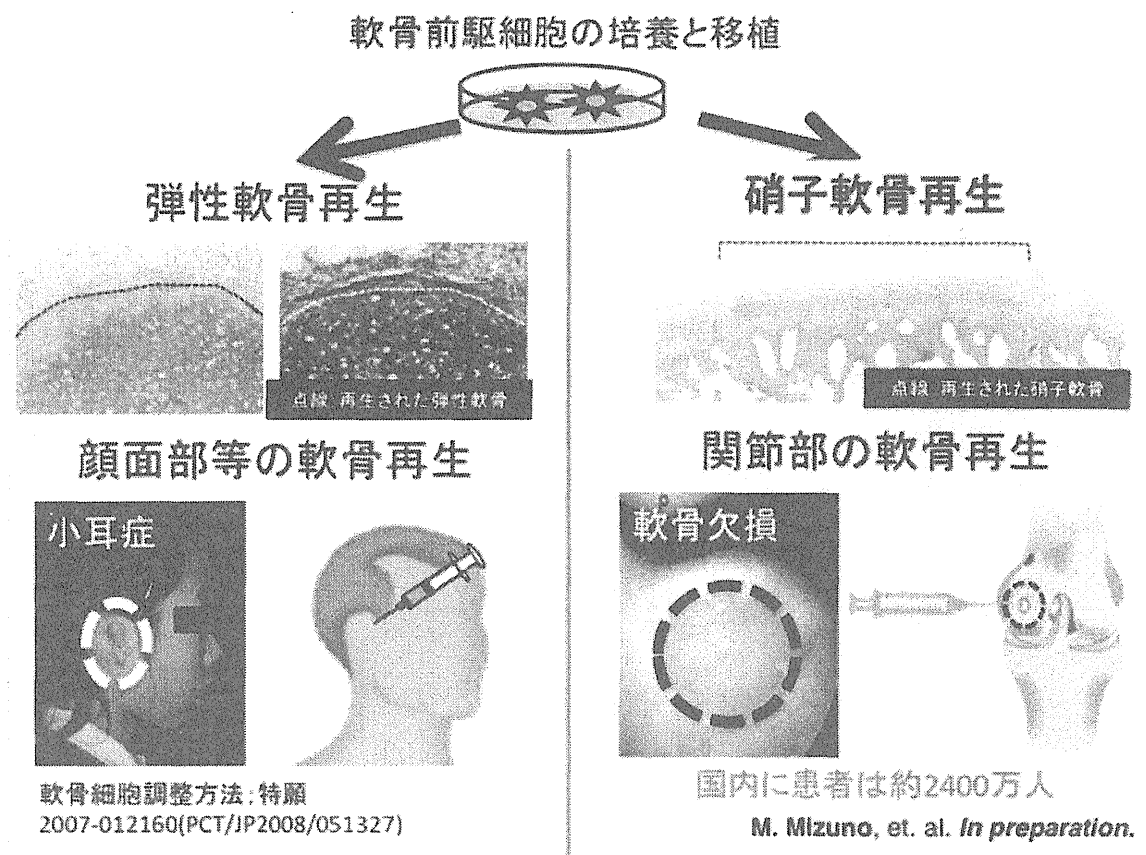
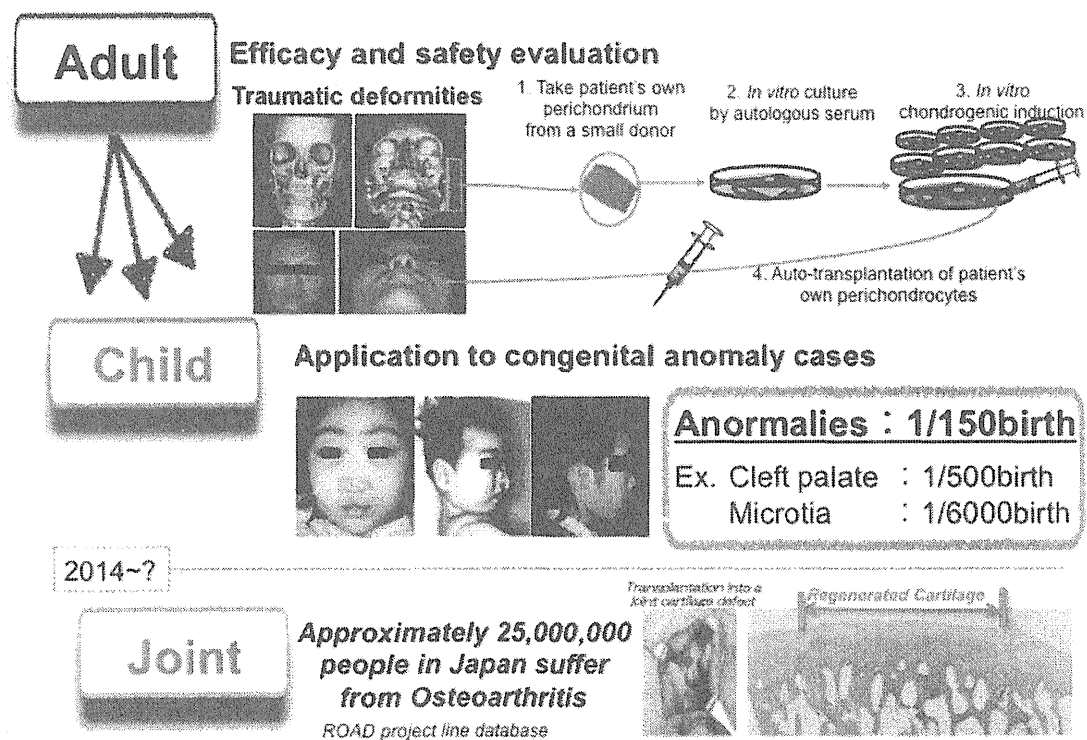


Fig.6 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた軟骨再生医療の適応拡大スキーム



Ⅱ. 分担研究報告書

自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた再生医療の実施へ向けた
軟骨前駆細胞の品質評価に関する研究

研究分担者

谷口 英樹 横浜市立大学 臓器再生医学 教授

研究協力者

大石 美里 横浜市立大学 臓器再生医学 技術員

張 玉閔 横浜市立大学 臓器再生医学 技術員

研究要旨

我々は、マウスおよびヒト耳介軟骨膜中に、高い軟骨分化能と自己複製能を兼ね備えた軟骨前駆細胞が存在することを世界に先駆けて見出してきた。さらに、耳介軟骨膜より分離した軟骨前駆細胞を用いることにより、長期的に大型のヒト弾性軟骨を再構築することに成功している。軟骨再生医療の実施に際し、骨髄や脂肪などに由来する他の幹細胞を用いる手法と比較して、骨や脂肪などの異所性組織を形成する可能性が低く、極めて安全性が高い。現在は、このような自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた優れた軟骨再生医療の実現化を目指し、前臨床研究を遂行している。本研究では、ヒト耳介由来軟骨前駆細胞の調製にあたり、調製処理、中間段階の調製物、最終調製物の品質管理等の作業管理システムの客観的基準を構築することを目的として、他の分担研究グループの検証により決定された安全性の高い細胞調製法のもと、評価に必要な基礎的な検討（分化誘導基準、感染判定、逸脱事象設定等）を行った。これらの検討を元に、次年度においては中間産物および最終産物の安全性に関わる定量基準を設定し、再現性良く安全な出荷判定を行うための客観基準の構築を試みる。

A. 研究目的

頭頸部領域の先天奇形や、交通事故による外傷等に起因する変形に対する質の高い治療法の開発は、全世界で望まれている重要な臨床的解決課題である。現在の標準的な治療法である自家組織移植術は、健常部位に犠牲が生じるだけでなく、痛みなどの侵襲も問題となっており、これらの問題点を克服するために、自己の成熟軟骨細胞を用いた「弾性軟骨再生医療」が近年注目を集めている。しかし、従来の再生医療技術においては成熟した

軟骨細胞を用いているために、長期的に組織を維持する「幹／前駆細胞」が移植されておらず、再生軟骨を維持することが難しいと考えられていた。

そこで、我々は、未だに明らかにされていない弾性軟骨組織に存在する幹／前駆細胞を利用に注目し、研究を推進してきた。ヒト耳介を構成する軟骨は、弾性軟骨と呼ばれる弾力性の高い軟骨であり、その周囲を軟骨膜という薄い被膜状の組織が覆っている。我々は、この耳介軟骨膜中に前駆細胞の特徴を有

する細胞集団が存在することを、世界で初めて明らかにした。さらに、臨床応用を目指し、分離・同定されたヒト軟骨前駆細胞を成熟軟骨細胞へ効率的に分化誘導を行う細胞培養技術の開発を推進してきた。本培養技術により軟骨分化誘導を行ったヒト幹細胞を免疫不全マウスへ移植することで、大型のヒト弾性軟骨を再構築することに成功している。

これらの研究成果に基づき、交通事故などによる外傷や先天奇形により重篤な顔面変形を有する患者に対し、自己軟骨前駆細胞を用いた質の高い弾性軟骨再生の臨床研究実施へ向けて準備を推進している。厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究指針」に基づく認可を得た上で、本学において臨床研究を開始すべく、GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠プロトコールの作成を試みている。

GMPとは、厚生労働省薬事法の内、医薬品の研究、開発、教育訓練、製造設備、原料、製造、中間体、最終製品、廃棄物、包装資材、検査、販売、不合格品および回収品、等について規定し、それを記録、文書化する事を義務付けた省令のことであり、細胞治療や再生治療などヒト細胞を体外で分離・培養を行う際の安全性確保のため順守すべき重要な指針である。

本研究では、再生医療用細胞材料の安全性や、臨床試験の信頼性を担保するためのGMP準拠プロトコールの策定に向けて、適正な品質評価法を確立するため、基礎データの取得を試みる。すなわち、評価項目とその解析系を洗い出し、分化誘導基準、感染判定、逸脱事象などの設定を行う上での基盤的な実証データを取得することを目的とする。

B. 研究方法

1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、小耳症患者より手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下で鈍的に剥離した。

2. ヒト耳介軟骨前駆細胞、軟骨細胞の初代培養および継代操作

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、0.2% Collagenase type II(SIGMA)に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は100 μm の Cell Strainer(BD Falcon)で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)した。上清を除去後、血清(濃度や種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F-12 Medium(SIGMA; 以下 D-MEM/F-12)で洗浄し、遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。細胞は気相条件を37°C, CO₂濃度5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington)を含有する D-MEM/F-12 (SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で20~30分静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 (SIGMA)を加え、ピペティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4°C, 5 min)を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種

濃度は 1200 cells/cm²の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

3. 軟骨分化誘導と積層化培養

耳介軟骨膜由来前駆細胞, 軟骨細胞の軟骨分化誘導は分化誘導培地を用いることに加え, 積層化培養によって分化誘導を行った。

軟骨細胞は *in vitro* における二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており, 単層の細胞と積層化した細胞とでは形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養 4 継代後には失うという報告もあるため, 高密度培養による積層化培養が有効な軟骨分化誘導法として考えられている。そこで本研究においても細胞を 3 層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を 2.5x10⁴ cells/cm² に調製し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後 2 日間, 10%各種血清(種類は検討条件による), 1 % Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA) を添加した D-MEM/F-12(SIGMA)で培養し, 細胞の接着を促した後, 軟骨分化誘導培地を用いて 5 日間培養した。

軟骨分化誘導を行う分化培地は, 1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミン C 注 10%PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキサート注射液®; 富士製薬工業株式会社), Basic Fibroblast Growth Factor (フィブロラストスプレー®; 科研製薬), インスリン(ヒューマリン R®; 日本イーライリリー)を含有する D-MEM/F-12(SIGMA)とし, 血清は用いなかった。

軟骨分化誘導培地を用い 7 日間培養を行った後, 別に用意した細胞を 5x10⁴ cells/cm²

に調製し, 上から播種し積層化した。2 層目を播種後, 1 層目と同様に 2 日間は 10%各種血清(種類は検討条件による), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12(SIGMA)で培養を行い, その後軟骨分化誘導培地を用いて 5 日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し, 計 3 層に重層化した。なお, 細胞の培養はすべて, 気相条件を 37°C, CO₂濃度 5% に設定したインキュベーター内で行った。

4. 製品試験に関する検討

4.1 FACS による表面抗原解析

軟骨前駆細胞と軟骨細胞は第 4 継代培養の後, 各々 1x10⁶ 細胞毎に 1 mg の Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin(PE), Allophycocyanin(APC) 抱合モノクローナル抗体で 4°C, 30 分間染色した。3 度の洗浄後, 1 µg/ml の Propidium Iodide(PI) を含む PBS に懸濁し, FACS による解析を行った。解析には MoFlo Cell Sorter (Dako Cytomation)を用い, 染色には抗 CD28, CD34, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD117(c-kit), CD133, CD138, CD140a, CD146, CD271 抗体を用いた。軟骨前駆細胞に対し, 抗 CD44, CD90 抗体を用いてソーティングを行った。ソーティングゲートは, CD44+ CD90+, CD44+ CD90-, CD44- CD90+, CD44- CD90- に対して設定し, 各分画の細胞は 6 穴ディッシュ(BD Biosciences)に 52 cells/cm² の密度で播種した。ソーティングに際し, 細胞の残骸, 死細胞やダブレットは前方散乱光, 側方散乱光, PI によって除去した。

4.2 グリコサミノグリカン測定試験

積層化培養による軟骨分化誘導下で培養を