

## 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 25 年度 第 1 回班会議

日時：平成 25 年 11 月 28 日（木）14:00～16:00

場所：霞が関ビル 35 階 東海大学校友会館（東海の間）

出席者：光島健二（独立行政法人医薬基盤研究所）、眞鍋孝司（独立行政法人医薬基盤研究所）、花井荘太郎（独立行政法人医薬基盤研究所）、木下奈津美（独立行政法人医薬基盤研究所）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、的場亮（DNA チップ研究所）、平賀育英（DNA チップ研究所）、伊東紀子（DNA チップ研究所）、坂井秀昭（セルシード）、丸木秀行（東京女子医科大学）、佐藤正人（東海大学）、浜橋恒介（東海大学）、谷良樹（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、河毛知子（東海大学）、岡田恵里（東海大学）、豊田恵利子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：岡田恵里

### 1. 開会

研究代表者あいさつ

### 2. 研究報告

#### （1）「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

このプロジェクトは今年度で 2 年目になり、3 月に中間評価があります。変形性膝関節症が再生医療としてターゲットとすべきことは、小さな損傷を治すだけでは仕方がないため、究極的にはこの疾患を治すこととなります。最終的には人工関節としてコストパフォーマンスがよいものがありますが、生物学的な膝で生涯を終えていただきたいと考えてプロジェクトを進めています。

関節症の初期は軟骨がささくれであったり、毛羽立ったりしている状態です。この状態でも、中のマトリックスは抜けているため、本当は治さなければなりません、この段階を治す術がありません。270 年前から潰瘍化した軟骨は治りづらいといわれていますが、進歩していません。軟骨の下に軟骨下骨がありますが、ここまで達する損傷は、ある大きさまでは質の悪い線維軟骨では治るといわれています。軟骨内損傷といわれる部分損傷は、中の骨髄からの細胞動因が非常に少なく軟骨マトリックスが邪魔して修復されず、きちんと治癒されません。

我々は、温度応答性培養皿を用いた細胞シートを作製し、動物実験において全層欠損と部分損傷に効果があることを確認しました。将来的に細胞シートは両方の損傷が混在している変形性膝関節症の治療になるのではないかとデータを蓄積しているところです。温度応答性培養皿は、イソプロピルアクリルアミドポリマーの作用により 37℃ で疎水性、20℃ で親水性を獲得します。細胞播種し、コンフルエントになったところで温度を下げると細胞シートとして回収できます。シートは細胞と細胞が自ら分泌した細胞外マトリックスが集積した成分で人工物は一切含まれていません。

ー昨年より臨床研究を開始し、現在、8例の移植が終了しています。

(TVで放映された映像により細胞シートの作製と今後の展望の解説)

自己細胞の移植は厚労省による年齢制限と大きさの制限がありますが、安全性と有効性を術後1年のエンドポイントで評価しています。今まで対象とされてきた損傷は外傷性損傷だけでしたが、東海大学では唯一変性した軟骨にも適用してよいことになりました。

シートは、5cmの小切開で直接患部に移植します。3箇月でMRIにより軟骨ができてきたことが確認されます。評価方法として、レーザーを用いた超音響法(厚さと粘弾性特性)により、プローブを変えることでType I、Type II コラーゲンの組織性状の差が検出できます。軟骨は、よい軟骨も悪い軟骨も白く修復されるので、移植一年後に抜釘術の際に修復された軟骨を超音響法(厚さと粘弾性特性)とバイオプシーによる組織学的評価を実施して、95%以上硝子軟骨でしっかり治っていることを確認しています。

臨床研究で有効性と安全性を確認することを進めています。

(TVの放映による移植2例目の患者さまの治療後の状態を紹介。回復がよくて喜んでいます。患者さまのコメント、移植をしているいろいろチャレンジできて、大きなプラスだったと思います。)

現在11例のエントリー中、8例に実施しました(3例は厚労省の基準外で中止になった患者)。移植を実施した8例の患者さまは経過良好で今のところ、有害事象はありません。現在、世界で実施している治療はACIで、アメリカで2万例以上行なわれ、健常部から採取した骨膜を縫い付けて1箇月培養した細胞を挿入し、治療しています。細胞組織加工製品は、日本ではJ-TECの皮膚と軟骨、米国では約20年前からカーティセルの軟骨、欧州ではコンドロセレクト、韓国では10種類ほどあります。

承認されているJ-TECのジャックは、骨膜との併用であり、骨膜と軟骨の間にアテロコラーゲンゲルに包埋した軟骨細胞を挿入している点が新しい点です。ジャック:0.9個細胞/1mm<sup>3</sup>、東海:4500個細胞/1mm<sup>3</sup>の細胞を使用しています。このことから、組織修復はより効果的だと推察されます。ジャックの使用について、厚労省とのワーキンググループで定められた使用基準は、外傷性、大きさの制限、安全性を理解した医師(ワークショップと実技指導)、使用実施基準を満たした施設等の条件がついています。

我々は健常部1、2箇所から骨膜を採取し、貼りつけて小さな損傷を治療する方法から脱却し、骨膜を採取しません。骨膜を用いた治療法は、多くが線維軟骨で修復され、硝子軟

骨での修復がみられません。これは、複合体の形状での修復が問題であると考えられ、多数要素の最適化の検討は困難であり、骨膜やスキャホールドは用いません。軟骨細胞シートと骨髄由来細胞の相互作用により硝子軟骨で治癒していることを動物実験で確認しています。この結果を踏まえて、前臨床試験で大型動物ミニブタモデルを用いてシートの縫合も検討したところ、縫合なしでの治療に成功しています。動物実験において部分損傷のモデルの開発並びに作製を行ない、表層にシートを移植すると変性が遅れる結果が得られ、細胞シートの変性抑制効果が認められています(学会誌の表紙)。細胞シートの効果の作用機序を検討し、サイトカインの TGF- $\beta$  に着目し研究しました(浜橋参照)。ラット、ウサギ、ミニブタ、ヒトと種がヒトに近づくにつれ、細胞シートが作製しにくくなります。ヒトに応用するにあたり、3 週間でより均一な細胞シートの作製を研究し、生体内の環境を擬似するような共培養法を開発しました(小久保参照)。一連の研究により、臨床試験を実施しています。

細胞シートの治療は、自己細胞もよいのですが、2 回の手術が必要であること、高齢であると必ずしも活きのよい細胞ではないこと、採取量に限界があり複数回の手術が難しいこと、OA 患者は遺伝子異常をもっている場合があることを解決するために同種軟骨細胞の使用を考案しました。外国では軟骨チップが市販されていますが、トレーサビリティの問題があり、国内で手術時に廃棄される多指症の軟骨組織(1 歳前後)を同種細胞のソースとして期待し、国立成育医療研究センター研究所との共同研究で供与された細胞を用いて安全性試験を実施しています。この細胞は P2、P3 で爆発的に増殖します。シート化すると多くの患者さまに適用できる魅力的な細胞ソースと考えています。NOG マウスを用いた安全性の評価や、既に世界でヒトの軟骨細胞が 2 万件移植されていますが、腫瘍化した報告はされていません。G バンド分染法、アレイ CGH 解析により、継代培養中に遺伝的变化があるかを評価しました(河毛参照)。軟骨は免疫拒絶されない組織であるといわれていますが、免疫について国立医薬品食品衛生研究所と共同研究をしています(加藤参照)。また、シートを作製し、シート状で保存することにより、細胞シートの作製日数を待たずにいつでもレディメイドで治療できるように明治大学と共同研究し、保存の開発を進めています。株式会社セルシードと温度応答性培養皿の大きさや治療地部について、DNA チップ研究所とアレイ CGH 解析について共同研究を行っています。

上皮系以外の細胞で、世界で初めての技術を用いて軟骨の部分損傷と全層欠損の両方に効果の認められた方法で臨床研究を行っています。自己細胞シートを先進医療へ移行できるよう、また、同種細胞シートの臨床研究を行えるように準備しています。

#### < 質疑応答 >

質問：自己細胞シートの臨床研究は 10 症例とありますが、あと 2 例実施しますか。

回答：8 症例実施しています。1 年後フォローまでもっていきたいです。1 症例につき 350 万円の費用がかかりますので、今年度は実施しないかもしれません。厚生労働省との協議

が必要ですが、仮に HP で患者さまが集まれば来年の今頃までに 10 例まで実施するかもしれません。

## (2) 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響」

研究分担者 加藤玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)

これまでに東海大学佐藤班で、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨の部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した自己積層化軟骨シートによる関節軟骨修復効果を世界で初めて明らかにしてきています。しかしながら、本技術の将来的な普及を考えると同種細胞移植が望ましいと考えられます。同種移植は、予め細胞の品質が確認でき、レディメイドでの細胞シート作製が可能になり、患者さまの負担の軽減や計画的な移植が行える利点があります。軟骨組織は免疫応答が低いといわれていますが、実際に同種軟骨細胞が宿主内で免疫反応において、どのような挙動を示すのか詳細な報告がないため、同種軟骨細胞の免疫応答に関する研究を行ってきました。これまでの成果として、マウス軟骨細胞、市販ヒト軟骨細胞およびヒト膝関節軟骨細胞といった成人軟骨細胞(AC)、さらに成人ヒト軟骨積層化シートがリンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、リンパ球混合培養反応(MLR)において活性化リンパ球の増殖を抑制することを示してきました。

今回は、同種軟骨細胞ソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞を用いて検討を行いました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、これまで検討した成人軟骨細胞と同様に T 細胞の活性化を惹起しませんでした。さらに、多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討した結果、MLR を抑制していることが確認でき、患部周辺の炎症を抑制できる可能性が考えられました。一方、先行実験から、抑制効果には液性因子の関与が示唆されていました。TGF- $\beta$ 1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインの 1 つであるが、一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがあります。MSC においても TGF- $\beta$ 1 がその免疫調節効果に関与する液性因子の 1 つである報告があることから、多指症軟骨組織由来細胞の培養中の TGF- $\beta$ 1 を測定しました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、TGF- $\beta$ 1 を高発現しており、同種 T 細胞の活性化抑制に関与している可能性が確認できました。来年度は、in vitro では多指症患者由来軟骨細胞シートが AC と同様の性質を持っているかの検討および、軟骨細胞の T 細胞増殖抑制効果に TGF- $\beta$  が関与しているかに関しては、TGF- $\beta$  中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- $\beta$  量を減少させ検討します。in vivo ではウサギ同種異系間での積層化軟骨シート移植を行い、免疫応答に対する影響の検討の開始を考えています。次年度以降、短期中期長期の経過観察をしたいと考えています。

### < 質疑応答 >

質問：この結果は多指症軟骨に限ったことですか。

回答：これまでの成果として、マウスの軟骨細胞でもリンパ球活性化を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖の抑制効果を確認しています。さらに、市販の軟骨細胞、成人

の患者さまの膝軟骨細胞を用いた先行実験でも同様な結果が出ています。

将来的に同種の細胞ソースとして、廃棄組織から採取できる点で多指症由来軟骨細胞が有用と考え、今回検討対象の細胞といたしました。

質問：効果としてはどうですか。

回答：T細胞の活性化をほとんど惹起しない点では、先行実験で用いた成人の軟骨細胞と差はないと考えています。抑制効果についても、今のところ、多指症由来軟骨細胞が特別に強いわけではないと考えています。

質問：多指症由来軟骨細胞は、増殖がよいとのことでしたので、免疫抑制作用がより強く出るのかと思ったのですが。

回答：成人の軟骨と横並びにしたときも多指症由来軟骨細胞の方が強く抑えていることはなかったのですが、成人の細胞と比較しても十分抑えています。

質問：TGF- $\beta$  は型がいろいろとあると思いますがどれをみていますか。

回答：TGF- $\beta$ 1 をみています。

質問：レセプターは、関節の移植したあたりの細胞にどのようにでていますか。

回答：関節は1と3がメインです。市販の分化誘導培地もTGF- $\beta$ 1か3が入っています。

質問：膝関節症の病変部の免疫状態は、どのようになっていますでしょうか。免疫が病態として関与していますか。

回答：変形性関節症はリウマチとはかなり違います。リウマチはTNF抗体治療（免疫抑制剤）があり、かなり免疫抑制剤が効くようです。OAもわずかに、抗TNF抗体、ステロイド系、MPXなどが効くと論文にあります。免疫はリウマチとは比較できないくらい小さい影響だと思います。

回答：この実験は同種の細胞活性化を惹起しないということを確認することが第一の目的です。活性化T細胞の増殖を抑制することは、付加的な効果として考えています。元々、*in vivo*で軟骨細胞の親細胞であるMSC細胞が、免疫原性が低いだけでなく、さまざまな免疫細胞の活性化や分化を抑制する性質があるといわれています。同様な性質が軟骨細胞にもあればなおよいと思います。したがって、本研究では、患者さまのT細胞の活性化を惹起させないことを示すことが大事です。

### （3）「セルソースの安全性評価」

研究協力者 河毛知子（東海大学）

同種軟骨細胞シートの細胞ソースとして用いるマテリアル検討の結果、手術時廃棄組織であり、かつ優れた増殖性をもつ多指症由来軟骨細胞が適していることがわかりました。多指症由来軟骨細胞を用いて安全性評価を実施しました。

各実験のマテリアルは国立成育医療研究センター研究所から凍結細胞（n=12、平均年齢1歳4か月）の分与を受けたものを用いました。

自己細胞を用いた臨床研究の安全性評価としては、アレイCGHにより培養中に生じる変

化を確認してきました。同種移植の安全性評価としては、同様にアレイ CGH により培養処理による変化の確認と、セルソースとしての核型の確認が必要だと考えられます。

培養処理による変化の確認にアレイ CGH が適している理由について本解析は、第 2 継代のサンプルを reference とし、その reference サンプルから継代した細胞を用いて test サンプルを作製する為、培養処理による変化を的確に捉えることが可能です。

G バンド分染法はセルソースの核型と培養処理による変化を確認することができます。アレイ CGH とは異なり、それぞれの継代毎に染色体の変化を確認することができる手法です。

安全性評価の 2 つの手法を組み合わせることで、安全性の高い細胞ソースを選び出すことができますと考えられます。適合するサンプルは擬陽性を除きますが、G バンドで擬陽性としたサンプルは、国際規約ではクローンと解されないものです。今回の解釈にあたり、国際規約では正常核型と解されるものも除外したのは、同種移植を目指しているため、より高い安全性を担保する為に検討項目としました。

造腫瘍性否定試験についても現在実施しています。培養した多指症由来軟骨細胞を NOG マウスに移植し 24 週まで観察し、病理組織学的に評価します。研究進捗ですが、予定しておりました平成 25 年度の安全性評価について進めています。次年度は同種軟骨細胞シートの品質評価を進めていく予定です。

#### < 質疑応答 >

質問：培養して異常が起きているのですか。患者さまの核型は何でみえていますか。TKA の患者さまが元々もっている異常はありますか。

回答：患者さまの核型は培養した細胞で G バンドにより P2 と P12 までのサンプルで比較しています。患者さまが元々もっている異常は 7 番トリソミーと X 染色体でトリソミーがあることは報告されています。ジャックの参考資料として引用されているものもあります。

質問：CGH 擬陽性がいくつかあったものはサンプル間ででるのですか。出やすいホットスポットのようなものがあるのでしょうか。

回答：ホットスポットはダイスワップで消えます。プローブの癖というか、擬陽性が出やすい場所があると考えられますが、ダイスワップで確認します。閾値を下げたときに出ることがあるのでダイスワップ等で確認することにしています。

質問：将来使用する細胞シートは P12 まで考えているのでしょうか。実際の細胞シートはどの段階ものを使用するのですか。

回答：同種でも P1、P2 くらいまでの使用を考えています。P12 は使用しません。生体内で移植した後を完全に擬似できるわけではないですが、長期培養した場合を考慮し、より安全なものを考えて P12 まで実施しました。

(4)「ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：細胞生存性向上への条件検討」

研究分担者 長嶋比呂志（明治大学）

研究の背景として、シート作製と移植実施時期の調整が容易になること、治療用のシートのストックが可能になること、同種移植を推進することのために、実用的な細胞シートの凍結保存技術がこの臨床応用に不可欠です。

前年度までの成果は、細胞シートを破損することなくガラス化や融解可能な方法（コーティング法；特許出願 2011-260318, BMC Biotechnology, Maehara et al.2013）を確立しました。これは、受精卵の凍結保存法を踏襲したものであり、軟骨細胞シートへの応用も可能でした。また、臨床応用を想定し、細胞シートをパッケージに収納後ガラス化する方法（envelop 法）の検証を実施しました。ガラス化後の細胞シートの構造的正常性確認を実施しました。シート構造の正常性は保たれていました（細胞外マトリックス）が、個々の細胞の生存性が少し落ちました。この現象はどの保存方法でも生存性は落ちてしまうので、生のもと同様なくらいの生存性を目指したいと考えています。ウサギだけでなく適用拡大を図るため、他種シート（ブタ軟骨細胞シート）を用いた実験を実施し、ガラス化が成功しました。

今年度の取り組みは、細胞生存性向上への条件検討として、薄層シートへのガラス化の適用を検討し、3層シートだけでなく2層、1層の試料ともガラス化が成功しました。また、融解条件の検討をし、ラップとアルミも同等な結果がでたので、アルミを用いてパッケージング方法の改良を進めることにしました。アルミパッケージを開発することは、将来医療機器メーカーが商品開発に参入した場合にもつながっていくので、この材料でよいのではないかと考えています。そして、より薄いシートの凍結も可能になったため、ヒトのシートもできるのではないかと思います。より急速な解凍条件で細胞生存性が上がりました。

今後の計画は、現行法では衛生面を考えてシートを液体窒素の中につけるのではなく、クロスコンタミ防止のため、液体窒素の蒸気中に保存するので、そのような条件で長期保存しても大丈夫であるとのデータを収集します。今は、既存の液体窒素タンクを用いているので実用的な装置の開発を考えています。ヒトへの応用を考えて、細胞生存性をより生ものものに近づけるように方法を開発していきます。

< 質疑応答 >

質問：ラップの材質は何ですか。

回答：ビニレンです。

質問：水分の浸透性があるのではないですか。

回答：非常に低いですが、長期的にはあります。

質問：今後は保存の形態としてはラップよりアルミの方がよいとのことですね。

回答：はい。

質問：ガラス化層でコーティングしているとのことですが、使用している溶液は、使用する

る際に除去していますか。また、溶液は何ですか。

回答：シートにまとわりついている非常に粘張性のある溶液です。組成は、シュウクロース、DMSO、エチレングリコール、ポリリジン、普通のバッファーが含まれています。

保存にタンパクが必要なので、今は実験で牛血清を使用していますが、実用化を考えてリコンビナントのアルブミンや他の血清に入れ換えていくことを考えています。溶液はシートを洗うことで除いています。

質問：カルボキシル化ポリリジンは非常に重要な物質とのことですが、凍結し、融解するときにも安定化として重要ですか。

回答：細胞は水の結晶化で影響を受けるのですが、ガラス化は凍結するとき（温度が下がるとき）の水の結晶化、融解するとき（温度が上がるとき）の再結晶化を抑制しています。

質問：この物質は特許をとった物質ですか。

回答：既に、別の方が特許を取っています。

質問：このような作用があることはわかっていたことですか。

回答：はい。

#### (5) 「温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養により作製した軟骨細胞シートの特性」

研究分担者 小久保舞美（東海大学）

動物実験により、温度応答性培養皿 UpCell™ を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨損傷部分に接着し組織修復に寄与し、その特性解析から軟骨保護作用を有していることを確認しましたが、細胞外基質を豊富に含む軟骨組織から採取される軟骨細胞の数は少なく、また乏しい増殖能や個体により、採取から移植可能な組織作製まで多くの時間を要します。本実験では、個体差の大きいヒト細胞でも、ばらつきなく、より短時間で、優れた軟骨細胞シートを作製する培養法を検討し、ヒト臨床研究にて用いられている培養法を開発しました。関節軟骨は、滑膜が分泌する関節液から栄養を得ているため、生体内に近い環境で培養することにより、滑膜細胞から栄養の供給を受けて増殖が促進することを期待し共培養を実施しました。

シートは、軟骨組織および滑膜組織を酵素的に単離後継代し、P0、P1、P2の細胞を使用し、軟骨細胞のみ培養を行う群（S群）、共培養を行う群（C群）、C群を培養14日目に3層に積層化しさらに7日間培養した群（CL群）を作製しました。P0、P1、P2それぞれC群、S群の軟骨細胞増殖能をMTT assayを用いて計測しました。S群と比べC群はP0では培養7日目から、P1、P2では培養3日目から有意に増殖しました。軟骨形質維持に重要な遺伝子の有意な発現をreal time PCRで確認し、全ての継代数でCOL2はCL群がS群と比べ1.7倍以上の発現を示し、接着因子の発現は1.5倍以上の発現を示し、一方、カタリックファクター遺伝子発現は特にP0細胞においてCL群がS群と比較し有意な抑制を示しました。免疫組織染色では、積層化シートはCOL2や接着因子の発現がシート全体で確



認められましたが、単層シートでは接着因子の発現は確認されませんでした。

正常関節内において、滑膜による関節液は軟骨の栄養原であり、慢性炎症のない滑膜組織から採取された滑膜細胞と共培養することで、軟骨細胞増殖にプラスになる液性因子のみを軟骨細胞に作用させることができ、軟骨細胞の増殖が促進したと推察されました。この結果、培養期間は単独培養と比べて平均 10.5 日短縮でき、患者さんの入院期間が短縮し、QOL の向上になると考えられます。滑膜細胞との共培養法は増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを積層化できるとともに、より軟骨細胞に適した環境を作り出すことができました。

< 質疑応答 >

質問：同種を想定した場合、滑膜は使用しますか。

回答：同種の場合は滑膜細胞を用いなくとも細胞の増殖がよいので、滑膜細胞の使用は考えていません。インサートを使ったほうが栄養供給源がよいです。滑膜と共培養しなくともシートがつくれます。

質問：軟骨共培養の細胞数と細胞比率はどうか。

回答：軟骨細胞は  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  の播種数で、滑膜細胞は  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  の播種数です。

質問：5 : 1 の比率がよかったということですか。

回答：はい。

質問：プレートは直径どのくらいですか。

回答：軟骨細胞は底面積  $4.2\text{cm}^2$  インサートを使用しています。滑膜細胞は底面積  $9.6\text{cm}^2$  ディッシュを使用しています。

(6) 「温度応答性培養皿を使用して作製した積層化軟骨細胞シートが分泌する液性因子の検討」

研究協力者 浜橋恒介 (東海大学)

我々は温度応答性培養皿を用いて細胞シート工学を応用した関節軟骨修復・再生を目指し、日本白色家兎やミニブタを用いた軟骨部分欠損および全層欠損モデルを作製し、軟骨細胞シート移植によって欠損部が良好に修復されることを確認しています。研究の結果から、積層化軟骨細胞シートは軟骨損傷部からのプロテオグリカン流出を防止し、関節液中のカタボリックファクター進入を阻止することで局所を保護する役割を持つことが確認できています。一方で軟骨再生に寄与するサイトカインや成長因子などの液性因子の供給源となっていることが推察されます。本研究の目的は積層化軟骨細胞シートが分泌する液性因子を測定し、その作用機序に関して検討することです。

人工関節置換術時に採取した軟骨組織と滑膜組織から細胞を単離後継代し P0、P1、P2 のサンプルで積層化軟骨細胞シートを作製しました。共培養法にて作製した単層細胞シートを ELISA 用培地に変更して 7 日間培養した群を M 群、単層細胞シートを 3 層に積層化

し、ELISA 用培地に変更して 7 日間培養した群を L 群、L 群と同細胞数の単層培養群を C 群としました。培養上清を 5 日間経時的に同量採取し、ELISA にて MIA、TGF- $\beta$ 、PGE2、COL1、COL2、MMP13 を測定しました。その結果、軟骨分化や組織修復に関わる MIA、TGF- $\beta$ 、PGE2 を分泌していること、また COL2 の分泌上昇と MMP13 の抑制が確認され、細胞外マトリックスの維持効果と軟骨保護作用を有していることが明らかとなり、軟骨欠損に対する積層化軟骨細胞シート移植の有用性が改めて確認されました。

先行研究において積層化軟骨細胞シートは、SOX9、COL27、fibronectin、integrin $\alpha$ 10 を強く発現していることが PCR 法で確認され、軟骨本来のフェノタイプを維持し、また優れた接着性を有していることを報告しましたが、今回の検討で積層化軟骨細胞シートは多くの液性因子を分泌し、特に軟骨組織修復に重要な役割を果たす MIA、TGF- $\beta$  および PGE2 の高い分泌能が確認され、その供給源としての役割を担っていることが示唆されました。

#### < 質疑応答 >

質問：細胞数について。積層化すると細胞数は変わってくると思いますが、1 枚と積層化したものでは細胞数は揃えていますか。

回答：3 層に積層化したシートと従来の単層培養群は細胞数を揃えています、シングルシートと 3 層に積層化したシートは揃っていません。

質問：積層化は 3 枚ですので、1 層の 3 倍になるのですか。

回答：はい。細胞数は 3 倍になります。

質問：1 枚のシートと 3 枚の積層化したシートで液性成分に差はなかったのですか。

回答：液性成分の量としては、1 層も 3 層もあまり変わらないです。しかし少なくとも積層化によって液性成分の分泌が減少することはなかったです。

質問：今は臨床で P0 を用いられていますが、P0、P1、P2 と比較してどれがよいですか。P0 がよいですか。

回答：自己の場合ですと P0 がよいと思います。シートといいましても継代を重ねると軟骨細胞は脱分化の方向へ進みますので、培養期間の関係もありなるべく早い継代数で行いたいと思います。同種の場合は、継代が進んでも軟骨のフェノタイプが維持されるような傾向にあるので、P1 或いは P2 でも使用できるのではないかと考えています。

質問：MMP3、13 に対する遺伝的な抑制があるということは、本来軟骨細胞が持っている性質を維持しているということですか。

回答：MMP3、13 は変形性関節症において、カタボリックな影響として関節内にできてしまうので、それを抑制する効果があります。PCR の結果からも細胞シートにすることで MMP3、13、ADAMTS5 などが抑制されることが分かっており、シートのプロパティとして OA の抑制効果が期待されます。

### 3. 総合討論

自己の臨床試験は 8 例行われてきて、錬度が上がってきています。東海大学学内で CPC の運営・管理、シートの作製、手術が成熟してきていると思われます。自己細胞シートの 1 年後フォローを行います。学内同種細胞シートの申請を自己細胞シートのときと同様に行うことを目指しています。再生医療関連の法律が 3 つ改正されるので、ヒト幹細胞臨床研究の審査方法も変更されることになり、厚労省で行われていた審議が全国 12~20 箇所で開催することになるようです。iPS/ES 細胞に関しては厚労省が担当するようです。

旧制度のうちに同種細胞シートのヒト幹細胞臨床研究の準備をしたいと考えています。同種の安全性、有効性は自己細胞との比較に努めています。しかし、同種ならではの問題として免疫作用、細胞やシートの保存方法を検討しなくてはなりません。最終的にはシートを保存しておいて患者さまがいたらすぐに移植できるようなかたちで進めたいと思っています。細胞ソースとして培養したものを確保する必要があります。ステージを経て最終系に持って行きたいと考えています。バンキングとして、細胞シートを作るところまで確認してから、細胞を選んで使用することを念頭においているので、細胞の決定に 1 年以上かかると予想されます。それからヒトの移植へ進む予定です。

質問：適用する検体が 4/12 とありますが、すべて使用するのですか。それとも 1 つに絞りますか。

回答：組織の提供元は東海大学と国立成育医療研究センター研究所がありますが、東海大学の組織を使用することにより、申請のハードルがさがるので、こちらのほうから先行して実施したいと思います。バンキング化、サンプル採取だけでも 1 年以上かかってしまいます。有効性を確認してから、使用を考えています。

質問：どのくらいの頻度で多指症の検体はありますか。

回答：国立成育医療研究センター研究所は週に 1 件、東海大学は年に 5~6 件です。

質問：先進医療、今後の治験はどうですか。薬事法も変わってきて、医療機器として実施しやすくなると思いますが、培地の組成等、検討したほうがよいのではないのでしょうか。同等性を考えたほうがよいと思います。

回答：臨床研究は PMDA に持っていくと、参考データでしかないことは承知しています。澤先生からは、参考データとして後押ししてもらっていると聞いています。変形性膝関節症の臨床でのデータをかなり使えると思いますが、詳細は詰めたと思います。そのまま治験に応用できるものかどうかわかりませんが、PMDA の方に会議に入っただき、ご意見やご理解をいただけるようにしています。企業が参入していないので、自己細胞シートは先進医療へ進めたく、同種細胞シートは学内でのデータ収集を考えています。

質問：凍結保存の溶液は DMSO、エチレングリコールが入っています。昨年の班会議で PMDA 方から、患者さまに移植する前に洗って残存していなかったらよいとのことですが、PMDA 試験段階なので牛の血清を使っているけれども、ヒトのリコンビナントのもの

を使用していくことになりますか。その実験もしておいたほうがよいのでしょうか。血清に関しての扱いはどのようになりますか。

回答：血清は牛血清を絶対使用してはならないというものではないと思います。角膜も使用しています。

質問：胎児血清ならばよいとのことですか。

回答：きちんとトレースしているものならば大丈夫です。

回答：私共は、BSEの発症例のないニュージーランドから購入して、国内で35Gの線照射しているものを使用しています。安全性は、かなり担保されていると思います。アルブミンはどのくらい洗ったらどのくらい少なくなるか、バリデーションデータを取っています。検出限界以下ではないが、かなり低くなることは確認しています。

質問：当面は牛血清の凍結保存法で大丈夫ですか。

回答：大丈夫だと思っています。

コメント：自己評価シートの作成の依頼をします。今年度の進捗状況の報告をお願いします。班会議の内容と自己評価シートを確認して報告書を厚労省に提出します。

コメント：5年間の研究となっていますが、ロードマップ1~3年は詳しく書かれていますが、中間期になってきているので、4~5年も詳細を書かれたほうがよいと思います。書面評価される先生方がわかるように書かれたほうがよいかと思います。

回答：来年度は重要な期間であり、自己細胞シートを先進医療に、また同種細胞シートをヒト幹に通したいと考えているので、これによりかなり変わってくると思います。

コメント：まだ、厚労省のヒアリングの対象になるかわかりませんが、期間が5年間ですと、もう一回あるかもしれません。

#### 4. 事務連絡

細胞シートの臨床応用のシンポジウムが開催されます。次回、再生医療学会、京都の国際会議場3月4-6日の期間中に開催します。3月4-5日を予定しています。

#### 5. 閉会

以上