

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 2 回班会議

日時：平成 26 年 3 月 5 日（水）13:30～14:45

場所：国立京都国際会館 1F 【Room104】

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） 花井莊太郎（独立行政法人医薬基盤研究所） 嶽北和宏（PMDA）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） 松成ひとみ（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） 小久保舞美（東海大学） 岡田恵里（東海大学） 河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略
記録者：河毛知子

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）

平成 24 年度から研究費を頂いて本研究を進めています。現在の状況ですが、自己細胞シートによる臨床研究を終了させて、その次の先進医療につなげることを目的としています。もう一つ同種細胞シートをどのように発展させていくかというところで、現在、新たなヒト幹指針の承認を目指しています。

最初に私の方から再度概要をお話させていただきます。各国で承認されている主な細胞組織加工製品（再生医療製品）もありますが、日本でも皮膚と軟骨があります。米国では 20 年以上前からあるカーティセル 1 社のみ、欧州ではコンドロセレクトが承認を受け、後は韓国では現状沢山あります。日本もここに負けないようにと頑張っていきたいと思えます。第二世代として組織工学的な軟骨を作ったものもあります。J-TEC のように白い組織工学的な軟骨を作って移植するというような時代になってきましたが、白っぽく見えるのは軟骨の色ではなくアテロコラーゲンの色です。1 立方センチメートル当たり 4 万 5 千個の細胞が含まれているということです。なお 0.6g 採取して、2 個供給されるということですが、一辺を 1mm 四方で区切り細胞の厚さでスライスすると、この中に 0.9 個の細胞が

いるということになります。これが本当に機能するかというのは臨床の結果をみて評価していただくということになると思います。因みに細胞シートはこの中に4千5百個の細胞がいます。

基準ですが、ジャックの使用基準要件等々こちらのスライドにいろいろ書かれていますが、学会等の意見を反映させていただいて、外傷の軟骨欠損と損傷の欠損面積が4.2平方センチメートル以上となっています。このような厳しい条件が付いていますし、実施施設も大学病院と教育研究施設であればよいのですが、膝関節の手術症例が年間100例以上行っていて、万が一の為のレスキューできる体制が整っているとどこでできないということが挙げられています。

今のACIに代表されている治療では、体重がかからない非荷重部から骨膜をとり、さらに健常部を2箇所とって行うというスキームは変わっておりませんし、入れる培養のやり方が先ほどのジャックは組織工学的な塊として入れるということで、この骨膜を使用して入れるというのは、一切変わっていません。私共は軟骨の再生の研究をやっているなかで、このように出来てくるものは再生軟骨が不十分なのです。論文でもピュアレビュージャーナルにマイクロフラクチャーと従来の手術手技と変わらないという発表もあります。再生軟骨の出来具合にかなりばらつきがあること、原因としてこのような複合体（骨膜、スキャホールド、骨髄刺激法、骨髄由来細胞、培養）では多数要素の最適化は難しいことに注目して、骨膜もスキャホールドも使わない細胞シートと内因性の骨髄由来細胞で治すというアプローチで行なっています。

私共は始めからこの細胞シートを使い始めていたわけではなく、組織工学的な軟骨や、スキャホールドフリーで堅い軟骨を作ることに命を懸けていた時代もありましたが、細胞シートでも上手くいくということが分かりました。表層の修復が一番重要となります。細胞シートは軟骨に接着し、ある程度高密度で培養すると指で引っ張っても破れない細胞シートができます。堅い軟骨を作り移植してしまうと、それが関節内で動き回り、引っ掛かりやロッキングの原因となってしまうので、このようにしなやかなものであれば、例え外れたとしても、関節内で悪さをしないだろうと考えています。

変形性関節症は部分損傷から徐々に骨がむき出しになるような状態になりますが、このような部分損傷と全損欠損が混在するものです。骨にまで達する損傷はある程度の大きさまでは、変性した軟骨ではありますが治ります。私共もミニブタを使った実験で、はじめは縫い合わせていましたが、置くだけでこのように血豆状態にすれば治ることがわかりました。

いろいろな治し方がありますが、私共も滑膜細胞との併用等を検討しましたが、細胞シートできちんと治るのであれば細胞シートで硝子軟骨を作っていこうというアプローチにしています。部分損傷のような、軟骨内に留まる損傷は治癒しません。それはマトリックスが邪魔をしてしまい、修復細胞が十分に修復部分に集まらないということが原因です。関節鏡で見るとこのように毛羽立った状態に見えるものは、マトリックスが抜けてきて変

性は進んでいます。

私共は部分損傷をウサギで実験をしました。あらかじめ骨に穴をあけて糸を通してその間で切片を作り評価をしました。細胞シートを置いておくと元通りとはいきませんが変性抑制効果がみられました。雑誌の表紙にもなりました。

細胞シートの作用機序として注目しているのは、圧倒的に多くのグロースファクターを出すことがあります。特に TGF- β が多く放出されています。細胞シートの細胞をバラバラにして入れた場合に比較して約 30 倍から 50 倍の高濃度で TGF- β が出てきます。このようにトロフィックエフェクトがあるのではないかと思います。細胞シートの液性因子は TGF- β に限らず PGE2 など様々な液性因子が供給されることと、細胞シートそのものが動員されるバリア機能として働くなどいろいろな作用機序があり、全損欠損と部分損傷の両方に効果があるということがわかってきました。

とはいえ、このような細胞シートを作るときに種差があり、ウサギでは厚い細胞シートができるのですがヒトではそのようになりません。特に市販されている軟骨では細胞シートを作るとは困難ですが、私共は温度応答性のインサートを使用して滑膜細胞との共培養で関節内を疑似することで均一な細胞シートを短期間で作製することが可能となりました。これをもって臨床研究をしているところです。細胞シートという形でありながら軟骨のフェノタイプは維持され、さらに接着因子を持っています。

また CPC におけるコールドランを行って、品質の評価まで行なったうえで自己細胞シートによる臨床研究について、大臣から「実施して差し支えない」と承認していただき、現在 8 例実施しています。

岡野先生が開発された温度応答性培養皿を使って細胞シートを 3 層に積層化して行うというのですが、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 で親水性となり、このようにひげが伸びたり縮んだりすることを利用して、ひげが縮んだ状態で細胞を培養してコンフルエントに達したところで、温度を下げて細胞をシート状に回収するというものです。この操作は非侵襲的に行うことができるので、細胞やマトリックスに一切のダメージを与えることなく回収することが可能となります。

報道ステーションで取り上げられました。作用機序の説明がございましたのでご覧ください。(報道ステーション特集 2013 年 7 月の VTR のうち 3 分程度の紹介)

現在の自己細胞シートの臨床研究は、20 歳から 60 才以下で損傷が 4.2 平方 cm 以下で限定して実施しています。エンドポイントとしては、有害事象の頻度をみますが、術後 1 年まで、臨床成績、MRI、超音響法、最後にはバイオプシーまで行なって、評価して終了となります。超音響法は防衛医大の石原先生との共同研究で、2007 年から東海大でも手術時の診断に行っているものです。軟骨の厚さと粘弾性特性を定量的に見ることができます。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の検出も可能です。

今はだいたい 5 センチメートルくらいの傷で直接移植をしています。大体 3 か月経つと MRI でも修復が分かるくらいになります。術後 1 年のバイオプシーの時には、盛り上がり

た軟骨ができており、超音響法での測定やバイオブシーをして組織化学的に評価をして白黒をつけています。約 95%以上が硝子軟骨で修復しています。

(術後 1 年経過した患者さんの紹介する VTR の紹介)

移植した方は 8 例になりましたが、みなさん術後良好ですのうれしく思います。有害事象も大きなものもなく経過しています。

しかし、エントリー 11 例に対して、移植できたのは 8 例となっています。これは基準の 4.2 平方センチメートルは術前の MRI では正確にわからない為、そのことで 2 例外れています。もう 1 例はシート状に剥離できなかったということがありました。この技術及び手技に自信を持っていますが、100%ではないなと感じています。移植できた 8 例の患者さんは良好に推移しています。患者さんの立脚型の臨床スコアですが、おおよそ 1 か月から良くなり、その後、だんだんと良くなっていくことが分かっています。

繰り返しになりますが、私共は術後 1 年に超音響法での測定や、バイオブシーをすることをエンドポイントとしております。軟骨は白っぽいので癒痕であっても硝子軟骨であっても、MRI の現在の技術では質的なものは評価しきれないので、軟骨の粘弾性や組織を用いて評価しています。

自己細胞シートでの治療ではすぐに治療をすることができません。健常部の範囲、軟骨を採取するために複数回の手術となります。また、良い細胞を得られるとは限りませんし、ご高齢の患者さまから採取した細胞は遺伝子異常を起こしやすいということもわかっています。2 月 20 日に同種軟骨細胞シートによる臨床研究の学内の倫理委員会の承認を得ました。これをもとに先週、厚労省の専門官の方へご相談をしているところです。これは、多指症の細胞を使います。細胞ソースをどのようにするか検討した際に、谷室長より下二つ(骨バンク、市販の軟骨チップ)はトレースサビリティの問題があるとご指摘を頂いたこともあり、同施設内で入手可能な多指症なら良いのではないかと思いました。国立成育医療研究センターは日本で一番多指症の手術をしていますので、細胞を頂いて安全性の評価を現在 36 例位行っています。細胞の増殖能は、大体 2 週間で今までの細胞シート 700 枚くらい、3 週間では 8000 枚程度作ることが可能な計算になります。造腫瘍性否定試験を NOG マウスで実施して腫瘍化しないということを確認し、アレイ CGH と G バンドで異常が認められないということを確認しています。この際に人工関節の患者さまから頂いた細胞では 7 番染色体や性染色体の異常が高頻度でみつきり、こちらは論文でも報告されていて OA に起因する後天的に獲得された異常であることが分かっているものです。

移植した細胞シートは、関節内に 21 か月以上も追跡すると残存して他に転移しないことを確認しています。国立医薬品食品衛生研究所の加藤先生との共同研究では、軟骨細胞シートは免疫を惹起しないかということを確認して頂いています。先ほどお示した、同種の臨床研究はシート状態で保存ということはまだ通ることができていませんが、細胞の状態を保存して、必要に応じて起こしてシートを作製するという内容で倫理委員会を通しています。将来的には、明治大学の長嶋教授との共同研究で検討しているシート状でパッケ

ージして保存したものを移植することを考えています。セルシードの方、DNA チップ研究所の方と、治具の開発あるいは軟骨細胞シートの評価を考えています。

私共のターゲットは変形性膝関節症としていますが、例えば O 脚の患者様に細胞だけを移植しても治るわけではありません。細胞だけを移植しても同じ箇所が傷んでしまいます。このような患者様には O 脚を矯正し、前十字靭帯が切れていたら前十字靭帯を再建し、アライメント、不安定性を治して、最後に細胞を移植して治すという方法をとっています。何も無いところ、例えば砂漠にオアシスを作り、生着しやすい薬等を併用しながら環境を整えよりよい再生医療の実現を目指していきたいと考えております。

昨年からの研究に関する HP を立ち上げています。アクセス数は 4 万件を超えています。患者様からの質問も受けています。

< 質疑応答 >

嶽北：自家のものを他家に変えて臨床研究を行う予定ですか。

佐藤：そうですね、自家のものを他家に変えて臨床研究を行う予定です。しかし、自己のときは一枚で覆えるようにするように面積に規定が設けられましたが、他家ですと何枚でも作製できるので大きさの規定を排除して学内の倫理委員会をクリアしています。あとの評価項目等は一切同一になっております。

嶽北：ヒト幹臨床研究はやらなければならないのですが、話を伺っていると治験をやればいいのに、と思いますが。

佐藤：おっしゃる通りですね。ご存知の通り次の法律では同種はすべて 1 種になってしまいます。iPS、ES と同様に同種すべて 1 種になってしまいます。ほとんどのヒト幹は第 2 種なのです。しかも軟骨なのに同種だから第 1 種なのです。解せないことです。この前ご相談させていただきましたけれども、今回の新法には違和感を感じているところではございます。

嶽北：2 つ前のスライドですが PMDA の相談は 26 年度ですか。

佐藤：この時は自己で先進医療を相談にいかうというものです。

嶽北：臨床研究をして先進といくと、お金がもったいなく感じますね。これだけ治験に持っていきそうなものは治験に進めた方が良いのではないのでしょうか。

佐藤：また改めてご相談させてください。

(2) 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞に及ぼす影響 (その 2)」

研究分担者 加藤玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)

同種細胞シートの特性と安全性に関する研究の中で多指症由来、先ほど佐藤先生のお話にも出てきましたが、同種を考えた時の細胞ソースとして多指症由来の軟骨細胞を想定していることから、多指症由来軟骨細胞が同種 T 細胞に及ぼす影響について検討いたしましたのでご報告いたします。

自己の軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生効果というのは、佐藤研究室での研究より明らかになってきていますが、この技術の将来的な応用を考えると、同種移植によるものでなければ難しいと考えられます。

同種移植の利点ですが、あらかじめ細胞シートを作製することが可能となり、患者さんの負担が軽減される、より計画的な移植が行えるということ等が考えられます。また同一ドナーからの細胞であれば、あらかじめ品質が分かるという利点があります。

多指症由来の軟骨細胞は、優れた増殖能をもち、手術時廃棄組織であることから、患者様に余計な負担をかけないという大きなメリットがあります。ただし、同種細胞移植ということで、拒絶反応を引き起こす可能性があるということから、本研究では多指症軟骨細胞が免疫応答に及ぼす影響を *in vitro* で検討することを目的として検討を始めています。

宿主の免疫反応を惹起しないことが示せれば、同種由来の細胞シートの可能性が開けることになると考えています。今回用いた細胞ですが、多指症由来の軟骨細胞は、国立成育医療研究センター研究所から譲渡された組織から単離された細胞を用いています。ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞(CD4⁺TCs)および正常ヒト樹状細胞は、ロンザ社より市販されているものを用いています。細胞増殖測定及び TGF- β 1 測定はスライドに示したものをを用いています。

まず初めに、同種軟骨細胞が T 細胞におよぼす影響をみました。つまり免疫原性があるかどうか確認している実験系です。多指症由来の軟骨細胞と同種の T 細胞を混合培養します。混合培養のコントロールとして、免疫原性が高いと知られている樹状細胞と同種の T 細胞の混合培養をアロ反応の陽性対照として用いています。以下 MLR と略します。たとえば、多指症由来の軟骨細胞が樹状細胞と同様に免疫原性が高ければ、T 細胞が活性化してどんどん増えていくと予想されます。それに対して、もし同種の T 細胞の活性化を惹起しなければ、ほとんど T 細胞の増殖は見られなくなると考えられます。実際の結果では、MLR では同種の T 細胞の活性化がかなり高くみられましたが、多指症由来の軟骨細胞と共培養したものでは、殆ど T 細胞の活性化が起きていませんでした。このことから、多指症由来の軟骨細胞は、免疫原性が非常に低いと示唆されました。

軟骨細胞は間葉系幹細胞、以下 MSC と略しますが、MSC は 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の免疫細胞の機能（活性化や分化など）を抑制するとの報告があります。もし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ります。そこで、多指症由来軟骨細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討しました。軟骨細胞が由来する間葉系幹細胞は免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することが知られていることから、軟骨細胞ではどうか検討しました。アロ反応で活性化され活発に増殖するような状況になっている同種 T 細胞の活性化を、多指症由来軟骨細胞を共培養することで、おさえることができればスライドのグラフのようになります。細胞増殖は DNA 合成の観点から評価します。もし軟骨細胞が同種 T 細胞を活性化するならば、グラフの I のように取り込み量が高くなるのに対して、活性化を起こさな

い場合はグラフの II のように取り込み量が少なくなります。実際の結果は、MLR の反応だけを 100%とした場合、多指症由来の細胞を共培養すると 3 割弱まで T 細胞の増殖を抑制するということがわかりました。

先行実験で、MLR の反応に、トランスウェルを用いて物理的に離れた状況で成人の軟骨細胞シートを共培養した際の影響を確認しました。その結果、抑制効果は減弱しますが、MLR の反応を抑制していることがわかりました。このことより、抑制効果に何らかの液性因子の関与が考えられました。TGF- β 1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインであります。一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがあるという報告があります。MSC においても TGF- β 1 が、その免疫調節効果に関与する液性因子の一つである報告があることから、多指症由来軟骨細胞の培養上清中の TGF- β 1 を測定しました。その結果、個体差はありますが、多指症由来軟骨細胞は TGF- β 1 を高発現していることがわかりました。このことから TGF- β 1 が同種免疫調節効果に関与している可能性が示唆されました。

ここからは、プレリミナリーなデータですが、TGF- β 1 の中和抗体により細胞上清中の TGF- β 1 の生理活性を落とすことで、T 細胞の増殖抑制効果が解除されるかどうか検討しました。結果は、TGF- β 1 中和抗体により、培養液中の TGF- β 1 の生理活性は低下しているが、今回の様に接触培養条件下においては、多指症軟骨細胞による T 細胞の増殖抑制効果には影響がでていないようでした。

今後の予定ですが、シート化した多指症患者由来軟骨細胞が同様の性質を維持しているかの検討を行います。また、非接触培養条件下で、T 細胞増殖抑制効果への TGF- β 1 の関与の再検討を行いつつ、他の因子の関与について検討したいと考えています。

以上、まとめますと、多指症由来軟骨細胞は免疫応答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がわかりました。これらのことより、関節軟骨損傷の治療に自己だけでなく、同種である多指症由来軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆されました。

< 質疑応答 >

阿久津：見逃したのかもしれませんが、多指症の細胞は TGF- β が発現していたのか確認させてください。

加藤：発現しています。多指症由来軟骨細胞でもかなり高く発現しています。

阿久津：一度落ちた増殖活性がほかの細胞や条件で戻るということはあるのでしょうか。

加藤：間葉系幹細胞との共培養により増殖活性が落とされた T 細胞を回収して、新たに刺激を加えると再増殖するという報告はあります。

光島：多指症患者由来軟骨細胞の培養条件はどの条件を用いているのか、どの時点でのものを用いていますか。

加藤：東海大でシート化して移植すると考えられている、P2 の軟骨細胞を用いています。

光島：パッセージの影響はどのように考えていますか。

加藤：非常に興味があるところですが、まだ早い段階や継代を進めた時のものは実施して

いません。ただ、軟骨細胞は継代を重ねると軟骨細胞の性質を失っていくといわれていますので、今のところは臨床研究で用いるパッセージを揃えています。

光島：液性因子は多種類を同時に網羅的に調べるのは出来るのか。

加藤：お金をかければできるので検討したいと思います。

佐藤：やりましょう。

(3) 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 (その2)

研究分担者 長嶋比呂志 (明治大学)

私共は軟骨細胞シートの凍結保存を担当しています。凍結保存することの意義は最終的にはアログラフで随時移植できるストックをすることを目標としています。

本来我々の研究室は受精卵を凍結保存する技術に取り組んでいます。なるべく容量の少ない保存液で保存する主流となっているコンセプトです (ミニマムボリュームクーリング)。細胞シートの保存に成功した鍵となっています。もう一つカルボキシル化ポリリジンによりガラス化を安定化させたことが鍵となりました。カルボキシル化ポリリジンがあることでクラックの発生が抑制でき細胞シートの保存が可能となりました。これまでの成果は特許出願や論文で報告しています。

11 月にも途中経過をご報告しましたが、凍結保存は細胞の生存性が低下することが凍結保存の宿命ですが、なるべく生存性の低下を防ぎたいということがあらゆる凍結保存研究の究極目標となっています。また、ウサギの細胞シートに取り組んでいますが、経験としてウサギやブタ、ヒトを経験しましたが、細胞シートの構造が弱いものの方が凍結保存としては難しく、また基本的には 3 層を検討していましたが、より脆弱なシート、2 層や 1 層を想定して凍結保存できるのか検討しています。

凍結保存の研究の常識となっていますが、温度を下降させるフェーズと温度を上昇させるフェーズがありますが、実は細胞の融解のところが重要だとわかっています。従来、細胞の凍結方法は緩慢法と呼ばれるものですが、ガラス化法も融解方法が非常にクリティカルになるため、融解方法の検討を行っています。また、昨年から実施していますが、最終的には医療応用を考えた時にパッケージすることを想定して、今からパッケージを検討しています。

例数を重ねていくつか結論がでました。薄層細胞シートは 2 層と 1 層をそれぞれ 6 枚ほど検討したところ、1 層でも破れることはなく、生存性もほとんど低下しませんでした。これにより非常に構造上脆いものも現在の方法で可能となっています。これが一つの結論となっています。

今までの融解方法は加温版の上で融解しています。溶液の中につけると一番早く融解できますが、それをすると破れてしまうことが多く、安全面を考えて加温版を用いています。

温度を急速に上げることやゆっくり上げること、また上からもはさむことをなどを検討しました。加温版の温度を若干上げると、有意差は出ませんが、悪くありませんでした。45度というのは細胞にとってはハームフルですが、一瞬ですので、加温版の温度を45度まで上げて問題はありませんでした。さらに上から温かくしたパックで挟み込む形で融解する方法を比較したところ、有意差は見られなかったが生存性が若干上がりました。このように良さそうな条件をスタンダードにしました。以降、我々の実験は加温版を45度まであげ、上からも挟み込む形を採用しました。細胞シートにクラックが入ることはありませんでした。これらの実験は2層を用いています。

パッケージは熱伝導率の素材ということで、アルミ、ラップを検討しました。実際に試すとアルミホイルもラップも意外と良く、破れることもありませんでした。生の状態で86%ですが、アルミでは83%、ラップでは82%でした。ハンドリングを考えラップが好ましいと考えられました。シートの保存を考えると保管が問題となり、液体窒素の気相での保管が好ましいと考えました。完全にシールするもの考えると、工業的になってしまいます。研究段階では完全にシールするのは難しいので、今後の研究の進め方によりますが、検討が必要です。

気相での保存、従来の液体窒素に浸けて保存する方法について確認しました。液体窒素の蒸気でガラス化した後に液体窒素に浸ける方法を試すと、ラップは破れてしまったものが1枚だけありました。しかし、生存性は低下しませんでした。アルミは完全に封をすることが難しいが、シートにヒビが入ることもアルミが破れてしまうこともなかった為、一番有望であると考えられました。アルミをパッケージ素材に選んで、ガラス化は最適化したものを用いて、保管は液体窒素の蒸気又は液体窒素に浸ける形で、今後の臨床研究に合ったものを選ぶこととなります。液体窒素の蒸気で保管するのは、シートをうまく収められるような保管箱が必要となります。しかし、年度内の検討は困難でした。来年度の班会議では見本をお見せできると思います。

まとめると従来開発したガラス化法で、より脆弱な薄層細胞シートへのガラス化の運用は可能でした。佐藤先生の報告によると多指症の軟骨細胞シートは非常に脆弱にみえるので、そちらにも適応可能であると思われます。パッケージの方法は、アルミでパックされたレトルト食品のようなものもあるので、実際に医療に用いる素材として使えようと考えています。保存の方法も液体窒素の蒸気でも液に浸けるものでも適応可能であるということがわかりました。

< 質疑応答 >

坂井：以前質問させて頂いたかもしれませんが、細胞生存率はどのように測定しているのか。

長嶋：単純にコラゲナーゼで細胞をばらしまして、トリパンブルーで細胞の生き死にを測定しています。

坂井：シートの細胞はまんべんなく全体的にダメージをうけているのか、部分的なのかわかりますか。

長嶋：おそらく、論文の報告ではコラーゲンをみましたが、どこかダメージを受けたスポットのようなものは見られませんでした。構成する細胞数が多いので、全体的にたとえば5%などダメージを受けているのではないかと考えられます。

佐藤：本件に関しては、今厚労省の事業に関しては企業の方と共同で研究開発を進めていくことを言われています。今回の継続申請では、セルシード、DNA チップ研究所そして、大日本印刷の方がこの事業に協力してくれる予定で、東海大と契約を結びました。なにが得意かと申しますと、パッケージが得意ですので、ぜひ長嶋先生と交えてディスカッションしたいと考えております。

阿久津：凍結融解した時の評価方法のマーカーは考えられていますか。画像での評価も大日本印刷は得意としているのでそのように考えた方がいいのではないのでしょうか。

長嶋：そうですね、先ほどの報告もありましたし、考えたいと思います。はじめはこんなに薄いシートは保存が難しいだろうと考えていましたが、実際にできていますので、今後実用化を考えると生化学的なことを見たいと考えてみたいと思います。

嶽北：今まではこれは研究レベルでの話だと思って聞いていましたが、事業化されるということですので、大日本印刷が参加するということは、ゆくゆくは医薬品ですとか製品レベルで考えられるのだらうと思います。その上の話として、再生医療に限らず、品質管理の観点から、液体窒素での保存であれば、液相を推奨していませんでした。液相での保存はコンタミネーションを起こすといわれているので、再生医療の分野で保管については気相での保存で考えてほしいと思っています。佐藤先生の出荷する前に保管し、流通は保管した状態となると考えられますね。薬事で考えるとベットサイドまでもっていくのではなく物の流通の観点から、物がどのような形で流通されるかが重要となると思います。佐藤先生の研究では溶かした状態でベッドまでもっていくのだと思いますが、大日本印刷は保管した状態でベッドまでもっていく方向へ考えられるのかなと思います。そのようになれば、薬事では一時包装として、容器の完全性、漏れないか、中のものが溶け出さないかという観点が必要になると思います。それを含めて素材を考えるべきだと思います。

佐藤：貴重なご意見ありがとうございます。実は気相での保存は、東海大にあった臍帯血バンクから気相で保存するタンクを譲りうける予定なのでそれで進めたいと思います。

(4)「同種軟骨再生医療のための安全性評価」

研究協力者 岡田恵里(東海大学)

同種軟骨再生医療のための安全性評価についてご報告いたします。私どもは、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過をたどっています。自己細胞では関節軟骨の健常部の一部を犠牲にし、シート作製枚数は採取量など

により制限があり、移植の可能性は実際にシートを作製しないと判断できません。また、自己での移植手術は一人一回程度になります。同種細胞として、手術時廃棄組織から多指症軟骨を採取した場合は、シートの作製は必要数可能であり、移植の可能性もバリデーション試験として、シートの試作時に判断できます。また増殖性が良いので不特定の方に複数枚移植することができます。将来の普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を考え、細胞ソースとして多指症組織由来の細胞を検討しました。

評価項目として、自己細胞の際と同様に 3 試験行いました。G バンド分染法では、細胞が保有している染色体異常の有無の確認と、細胞の培養による影響を確認しました。アレイ CGH 解析では、細胞の培養による影響を確認しました。また造腫瘍性否定試験では、腫瘍形成の有無を確認しました。これらの評価方法を通じて同種細胞は安全であることを確認しました。

G バンド分染法は、継代数 P1、P6、P12 継代の細胞を用い、分裂中期に 20 細胞をバンドレベルが 300 ~ 400bp で解析し、異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出しました。また判定に際しては、国際核型記載規約の判断によって判断しました。構造変化が検出された細胞もありましたが、普遍的にみられる変異や継代すると見られなくなる変異であり、生体内で淘汰される変異であると考えられました。また核型記載国際規約ではすべて正常とみなされるものでした。したがって、細胞ソースの染色体異常は認められず、また、細胞培養中の変化においても染色体異常は認められませんでした。

アレイ CGH 解析では継代数 P2 をリファレンスとして、P4、P6、P12 の細胞を用いて解析しました。また、色素を入れ替えるダイスワップでも確認を行い、微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常など網羅的な解析を行いました。結果として、多指症軟骨細胞は、各サンプルの P4、P6、P12 すべてにおいて、基線からのずれは正常とみなされる範囲でした。Aberration Detection Method-2 Threshold 10 では変異の箇所が認められませんでした。Aberration Detection Method-2 Threshold 6、7、8、9 のアルゴリズムでは、変異の箇所が、1 ~ 2 箇所と認められるものもありましたが、色素入れ替え実験ダイスアップでは、変異の箇所が 0 箇所となり再現性のみられないものでした。したがって、染色体のコピー数の異常は認められませんでした。

造腫瘍性否定試験では、重度免疫不全マウスにドナー細胞を 3 種類用いて P2 の細胞を 1×10^7 の 7 乗個を皮下移植しました。剖検は、3 週、12 週、24 週にコントロールと移植マウス 6 匹を供しました。その際、マウスの外観観察と剖検時の観察、組織の観察等を行いました。外観や臓器、移植部の観察は、コントロールと比較し、異常は認められませんでした。また 3 週では、軟骨を呈していますが、12 週ではその色は薄くなり、24 週ではほとんど見られないサンプルもありました。これは組織によって吸収されているのかと考えられました。組織染色においても異常は認められませんでした。体重の変化をみますと、コントロールとほぼずれはなく同じように増加しています。また、移植した細胞の縮小がみられた 12 週からはほぼ同じ推移となりました。

これらの結果より、G バンド分染法では染色体異常はないこと、及び細胞の培養中の影響による染色体異常は認められないことが確認されました。アレイ CGH 解析においても細胞培養中の影響は認められませんでした。造腫瘍性否定試験では腫瘍形成は認められませんでした。以上の結果より、多指症の細胞の安全性は確認されました。

また、臨床試験では、より安全性を担保するために、基準では陰性とみなされる変異であっても、擬陽性とみなし、G バンド分染法またはアレイ CGH で 1 つでも擬陽性と思われる細胞は用いないことにしました。

今年度は同種軟骨細胞シートの安全性評価を行いました。来年度は、同種軟骨細胞シートの品質評価に移りたいと思います。

< 質疑応答 >

光島：前回の報告では国立成育医療研究センター研究所の細胞を 12 種検定されて、擬陽性を除くと 4 種残るという結果でしたが、今回の発表と同様ですか。

岡田：同じです。

光島：擬陽性が 8 個か 7 個あったということですね。安全の為に擬陽性は使わずセレクトしたという結論で変わりないですね。

岡田：結論は変わりません。

佐藤：だいたい 30% が全く何もない状態で、アレイ CGH でも G バンドでも引っかからない状態です。

光島：実際それからシート作製に取り掛かっているのですか。

佐藤：まだ品質チェックですね、学内の倫理委員会は通ったので、今回のヒト幹では学内の多指症サンプルを使って移植するので、国立成育医療研究センター研究所からの輸送等の懸念なく使えるサンプルです。

光島：今の発表は国立成育医療研究センター研究所のサンプルのものでですね。東海大のものも同じように 33% でしょうか。

佐藤：それはこれから検討していきます。同意書等も全く違うものなので。

(5) 「低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価」

研究分担者 小久保舞美 (東海大学)

現在までに温度応答性培養皿により軟骨細胞シートを作製し、共培養を用いて臨床研究を行っています。軟骨細胞を使用する課題と目的になりますが、採取する細胞数が少ないということ、また増殖能が低いということがあります。また個体差が大きくシート作製に影響が大きいという課題があります。より短期間で個体差が少なく細胞シートを作製することを目的としました。現在行っている臨床研究では、滑膜細胞との共培養法を用いることで培養期間を短縮することが可能となりました。

生体内の軟骨の環境は、酸素濃度は表層が 6% 程度、深層になりますと 1% 程度となりま

す。実験では酸素濃度 5%と 2%にしました。細胞は ACL (前十字靭帯再建術の際に採取) 軟骨と滑膜細胞を用いて共培養を行いました。臨床の方で行っている 20%と低酸素濃度 5%で比較しました。評価軟骨の増殖能について MTT アッセイを用いて評価しました。また ECM の蓄積量について DMMP 法を用いて評価しました。またリアルタイム PCR 法を用いてコラーゲンタイプ 2 及びコラーゲンタイプ 1 の評価を行いました。MTT の結果では、すべての継代数 P0、P1、P2 におきまして 5%と 20%の差はありませんでした。PG 量とコラーゲンタイプ 2 及びコラーゲンタイプ 1 についても有意な差はありませんでした。

そこで次に、より深層に近い 2%の酸素濃度で検討しました。結果ですが、5%対 20%では差が見られなかったのですが、細胞増殖能が P0 初代培養の細胞では、培養 7 日目から有意な差が見られました。P0、P1、P2 でも有意な差をもって増殖しました。また基質産生量についても 2%は 20%に対して有意な差をもって細胞外基質の増殖が見られました。リアルタイム PCR 法の結果では 2%、5%も 20%に対してアナボリックなファクター (COL2,AGC1,SOX9,TIMP1,ITG 10,COL27,FN1) で高い発現が見られました。特に COL2,AGC1,SOX9, ITG 10 の高い発現が確認されました。カタボリックなファクター (COL1,MMP3,MMP13,ADAMTS5) はすべて低値に抑えることが可能でした。

考察になりますが、現在の方法で剥離を行う期間になるのですが、現在臨床研究を行っている 20%の環境ですと平均 14.7 日掛かりますが、2%にすると 11.8 日とより短期間で短縮することが可能となりました。これによって入院期間の短縮であったり退院するのが早くなったりといった QOL の向上が考えられます。低酸素環境に置くだけで MSC が軟骨分化に分化能を有するというので、2%の環境に置き PCR の結果で有意な結果を得たことから、軟骨特異的遺伝子の向上や、基質産生量を向上させる低酸素環境が有用であるということが確認できました。

結語になります。軟骨細胞の培養環境を生体環境に近づけることによって、より個体差の大きいヒト細胞でも、より短期間で細胞外基質を多く含む軟骨細胞シートを作製することが可能となりました。

< 質疑応答 >

光島：増殖性が良くなると細胞シートの作製期間が早まるのですか。

小久保：細胞シートの剥離が早まるということです。

坂井：通常の方法と低酸素では培地は同じですか。

小久保：培地は全く同じです。低酸素環境にただけです。

阿久津：共培養している滑膜が良くなっているのか、それともそのものが良くなっているのですか。

小久保：滑膜はまだ評価していません。

佐藤：もちろんその可能性があるのですが、いまご報告した結果はすべて軟骨細胞を評価したものです。みると面白いかと思います。

小久保：少しだけ検討したデータがあるのですが、若干上がるという結果が確認されています。nが少ないのですが。

長嶋：低酸素の濃度はいろいろ検討されたのですか。

小久保：はじめは論文を参考にして5%で実施しましたが、差がみられなかったので2%としました。低酸素環境にするインキュベーターがほかの研究室と共同にしておりましたので今のところ実施しているのは2%と5%のみとなっております。

長嶋：増殖期のところとコンフルエントになっていくところと2回環境がガラッとかわりますよね。増殖期のところは酸素を要求するのでそこは普通でよいかもしれないけれども、コンフルエントになって細胞シートになって重ねていくところについては、細胞はほとんど増えていないはずだから、酸素があるとただ単に酸化ストレスを受けるだけなのでそこで低酸素にするのが良いのではないかと考えられますが、そのような感触はありますか。

小久保：そちらも考えたのですが、20%より低酸素の方が増殖が良かったので、やはり軟骨には低酸素の方が良いのではないかと思います。

長嶋：受精卵の培養は低酸素が当たり前で、特に培養した受精卵を凍結保存しようと思うと、低酸素での培養が必須条件なのです。だから軟骨細胞は低酸素が向いていないと思っていたのですが、低酸素で今後進むのであれば、低酸素で培養して凍結という方向に持っていくと生存性が上がるかもしれませんね。検討してみます。

3. 総合討論

光島：全体のロードマップに関わる内容になりますが、前回の先生の発表では、8例目の移植が昨年11月で1年の観察期間があり、うまくいけばその時点で先進医療の申請を行うということでしたよね。今年の秋冬にかけて実施するのは自己細胞シートですか。

佐藤：8例で充分かどうかというのは、私共では判断出来なのですが、8例の安全性を確認できるのが、11月から12月にかけてですので、そこまでのデータをまとめて先進医療として申請を準備するという一区切りにしようと思っています。と申しますのは、臨床症例10例ということでヒト幹を出しておりますが、ロット購入している血清の有効期限が今年の7月なので、4月に新しい研究費を頂いて臨床研究をまたできることという環境になりますが、その3か月間に新しい患者さまをリクルートできるかにもよります。後ろが決まっているので追加で新しい患者さんを1例か2例行くと、1年フォローアップを待つのかどうかということがありますので、10例まで行くとするとまとめる期間が遅くなってしまいます。8例で充分というのであれば、そこまでのデータをまとめてということになります。

光島：PMDAとの相談はどのようにされていますか。

佐藤：先進医療はPMDAではないので。

花井：研発課が窓口ですね。

光島：8例での評価で良いのか事前相談は可能でしょうかね。

佐藤：もちろん相談するつもりです。BSEが発生していない国から購入した血清の有効期

限がきてしまって、35 グレイの 線まで当てているものなのでそれを入れ替えるということとは、莫大なお金が掛かってしまうので。

光島：9 例目を実施するとなると、途中から培養に使う血清が変わってしまうということになるのですね。わかりました。もう一つ、同種細胞シートについてですが、前回の班会議では、再生医療関連法案の関係で、旧法で通したいとおっしゃっていたと思いますが。それも今年の 11 月までにということでしょうか。

佐藤：それについてですが、2 月 20 日に学内の倫理委員会が通ったところでして、その次の週の火曜日に研発課の原専門官と相談しています。時期的に厳しく非常にタイトであること、現ヒト幹で出すにしても時間的に 6 か月、7 か月どんなに早くても掛かるので、間に合うかどうかということになります。もし新法の下でやるとなると、同種は 1 種に分類されるということになりますので。

光島：それは确实ですか。

佐藤：そのようなのです。iPS や ES と同じように評価されるのは困るなと思います。軟骨で同種だからと 1 種というのは。また嶽北先生に相談もさせて頂いて、医師主導治験というルートがあるのであれば、そちらも考えたいと思います。

光島：基本的なところですが、同種の場合ですと、軟骨組織から細胞を採取するのであって、幹細胞を単離して増やすわけではないのに、1 種ですか。組織から採取した細胞を増やすだけですよね。ちょっと解せないところがありますね。

佐藤：我々は最終分化した細胞にこだわっていて、その方が液性因子等を沢山出しますので、それに組織修復能力に長けていますし、私共は植えた細胞シートが局所に留まって大きくなって生着するとは考えていません。組織修復には最終分化した細胞がいいと思います。細胞シートが 1 か月くらい植えた細胞シートがそこに留まってくればよいと考えています。なかなかどのように持っていくのが良いかというのは様々な人に相談して決めたいと思っています。

光島：シートは 1 か月くらいでなくなりますか。

佐藤：自治医大との共同研究でルシフェラーゼ、蛍の光で発光する細胞シートを作ってそれをラットに植えますと、ほんのわずかですが、21 か月まで発光していました。しかし、殆どの発光はだいたい 4 週間くらいで、急激に発光強度が落ちてきますから、細胞シートがシートとして機能しているのは最初の 4 週程度ではないかと考えています。

花井：共培養した滑膜を一緒に入れていたわけではないのですよね。

佐藤：滑膜はフィーダーとして使っているだけで、軟骨細胞のシートだけを入れています。

嶽北：先ほど申し上げました通り、治験でもっていくべきだと思います。

的場：大変参考になりました。またいろんな方向で我々の技術を生かしていきたいと考えています。

佐藤：是非私共はシートの評価方法を確立したいと考えています。出荷前検査が煩雑ですので。DNA チップ研究所の方と開発したいと考えています。

光島：来年度目標の一つとしては、シートの品質管理基準を確立するのが目標ですね。

佐藤：そうです、来年度中です。

嶽北：相談を承っています。このプロジェクトの予算は年間1億円いかないで、15万円で相談できますので、議事録に残せばよいと思います。

佐藤：是非、薬事戦略相談をさせて頂いて進めて行きたいと思います。

4. 事務連絡

今年度の報告書の作成時期となっています。事務局の方からフォーマットと共に、報告書の提出を3月末でお願いしています。ご協力いただければと思います。よろしくお願いいたします。

5. 閉会

以上