

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 （総括・分担）研究報告書

「多施設ヒト幹細胞臨床研究による3次元再生皮下軟骨の有効性確認」

研究代表者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。しかし臨床研究を通じて、治験実施に向けて有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が複雑であることの3つ課題が明らかとなった。本研究ではこの3つの課題を解決し、3次元皮下再生軟骨の有効性を確立するとともに、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院と連携し多施設臨床研究を実施し、治験開始に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行させることを目的としている。

本年度は、昨年に引き続き有効性評価法を検討した。ヌードラットへ移植した再生軟骨組織を超音波、MRI、CTなどを用いて非侵襲的に計測し、その後、組織学的、生化学的解析を行った。再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、MRI (T2, D 値) を選択した。また、懸念される石灰化を検出するためには、モリブデンX線 (マンモグラフィー) の併用が有用であることが示唆された。

再生医療推進法の成立に伴い、インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを利用し、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設への組織搬出入技術を検討した。ヌードラットへの移植後の組織学的、生化学的評価において良好な軟骨再生が観察され、富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製法と、東京医科歯科大学や山形大学への搬送技術が有効であることが示され、安定した再生軟骨移植が可能であることが示唆された。

また、インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究の実施に向け、ヒト幹細胞臨床研究指針に則る審査の手続きをすすめた。

研究分担者氏名・所属研究機関名・職名

大友 邦・東京大学・教授  
 星 和人・東京大学・特任准教授  
 荒川 義弘・東京大学・准教授  
 小室 美子・東京大学・特任講師  
 岡崎 睦・東京医科歯科大学・教授  
 飯野 光喜・山形大学・教授  
 新田 尚隆・(独)産業技術総合研究所・主任研究員

A. 研究目的

われわれは世界に先駆けて力学強度と3次元形態を有する3次元皮下再生軟骨を開発した。現在、東京大学医学部附属病院において、口唇口蓋裂の鼻変形患者に3次元皮下再生軟骨を移植するヒト幹細胞臨床研究を実施している。今回の臨床研究を通じて、治験実施に向けての3つ課題、有効性エビデンスを補強すること、多施設研究が未実施であること、製造プロセスと品質管理法が複雑であること、が明らかとなった。本研究では3つの課題を解決し、治験実施に資する臨床データを作成し、速やかに治験に移行することを目的としている。そこで、現在実施中の

臨床研究に対して、有効性の評価項目を追加し、研究機関に同一のスーパー特区内の東京医科歯科大学と、関東から距離のある山形大学を加える改訂版ヒト幹細胞臨床研究実施し、同時に高度医療導入を図る。

B. 研究方法

1. 有効性評価法の確立

1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

有効性評価法を確立するため、現在の製造法に則り、実験的にヒト3次元皮下再生軟骨を作製した。移植組織としては、線維芽細胞や細胞生存性が低下した軟骨細胞の混入を想定し、100%ヒト耳介軟骨細胞、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞 = 10:90、ヒト耳介軟骨細胞：線維芽細胞 = 1:99、100%線維芽細胞、100% 55 処理ヒト耳介軟骨細胞をそれぞれ  $5 \times 10^7$  cells / mL で1%アテロコラーゲンに懸濁し、PLLA足場素材 (5 mm x 3 mm x 50 mm) へ播種した。ヌードラット背部皮下へ移植後、2週と8週でヌードラットを産総研に搬送し、超音波、CT、MRI、血流測定などを用いて再生軟骨組織の力学的、生化学的特性を非侵襲的に評価した。その後、ヌードラットから再生軟骨組織を摘出し、トルイジンブルー染色

や HE 染色などによる組織学的評価、ならびに GAG や COL2 ELISA などによる生化学的評価を行った。さらに非侵襲測定値と組織学・生化学的評価結果との比較に基づき、臨床機を用いた測定プロトコルの作成を行った。

#### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

臨床上の有効性評価には、従来の治療法との比較が不可欠である。そこで、昨年に引き続き、従来法の自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施し、プロスペクティブに経過を追跡した。

### 2. 多施設臨床研究の実施

#### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

2013年4月26日に、再生医療推進法が成立した。インプラント型再生軟骨の産業化においても、その製造を医療機関外に委託することが可能となる。そこで、インプラント型再生軟骨の治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを利用し、同施設における作製と、医療施設間への組織搬出入技術を確立し、その有効性を検討した。再生軟骨組織は、現行のヒト幹細胞臨床研究に則って作製し、富士ソフト社と東京大学が共同開発した再生軟骨の長期保存方法(特願2011-263837)で保管した。その後、同施設から東京医科歯科大学および山形大学にヒト再生軟骨組織を輸送し、ヌードラットの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織の保管期間による影響を検討するため、再生軟骨作製後、保管容器に入れて速やかに輸送、移植する群と、2週間保管した後、輸送、移植する群とで比較を行った。移植後8週に再生軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的に評価した。

#### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

現行のヒト幹細胞臨床研究では、東京大学医学部附属病院内で採取から移植まで、使用するすべての容器にICタグをつけて一貫したトレーサビリティを実現している。多施設臨床研究を実施するにあたり、東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院共有できるようなインターネット化を拡張し、実証実験を継続した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコルに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学、東京医科歯科大学、山形大学、(独)産業技術総合研究所の動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

### 3. 製造検査の効率化

現在の製造プロトコルでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)などに約130万円の検査費用がかかっている。本年度は、これらの試験を培養液の濁度やマイコプラズマPCRなどので一部代替えし、検査費用の低減をはかるための科学的検証を行った。東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行い、アガロース電気泳動を行った。

### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

治療実施機関を東京大学医学部附属病院口腔外科、東京医科歯科大学医学部附属病院形成外科、山形大学医学部附属病院口腔外科に拡張したヒト幹細胞臨床研究の実施計画書について作成を進めた。

### C. 研究結果

#### 1. 有効性評価法の確立

##### 1-1) 3次元皮下再生軟骨の非侵襲的評価

100%ヒト耳介軟骨細胞を使用した移植組織では、移植後2週から8週にかけて成熟が進行し、トルイジンブルー染色で広範なメタクロマジーが観察された。一方、線維芽細胞が混入している再生軟骨では、ほとんど軟骨再生が認められなかった。一方、TB面積、GAG、COL2 ELISAなどの軟骨基質蓄積のマーカーは、産総研で行った超音波、CT、MRI、血流測定のうち、MRI(T2、D値)と高い正の相関を示すことが明らかとなった。また、懸念される石灰化について、評価法として選出したD値に影響を与える可能性が危惧された。石灰化を検出する測定法の併用が必要であると考え、産総研と検討をおこなった。その結果、CT撮影では再生軟骨の石灰化は検出できなかったが、モリブデンX線管球を用いることにより、ヌードラットへ移植された再生軟骨組織の石灰化を撮像することが可能であることが明らかとなった。また、ファントムを用いて、臨床機種での撮像条件の検討を行った。モリブデンX線管球のスペクトルに近い臨床機種として、マンモグラフィーを選定した。

#### 1-2) 対照群(従来法)のデータ作成

昨年度に引き続き、自家腸骨移植法を施行した患者に対し、現行のヒト幹細胞臨床研究での評価項目(有害事象の有無、血液検査、疾患関連QOL評価、生活活動度評価、顔面形態評価、など)を実施した。

### 2. 多施設臨床研究の実施

#### 2-1) 採取した軟骨組織および製造した再生軟骨の搬出入技術の確立と実証

富士ソフト社のCPCで作製し、東京医科歯科大学および山形大学においてヌードラットに移植された再生軟骨組織は、移植後8週で組織学的に、良好な軟骨成熟像を示した。移植前の保管期間の違いによる明らかな差は観察されなかった。

軟骨基質の定量評価を行うためのGlycosaminoglycans (GAGs)測定においても、培養期間の違いに関わらず、高い基質の蓄積が検出された。COL2 ELISAでも同様に、再生軟骨で高い値を示した。

#### 2-2) 多施設間でのトレーサビリティ構築

東京大学医学部附属病院内で運用されているトレーサビリティを、東京医科歯科大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院で共有できるようなインターネット化を拡張し、実証実験を行った。

### 3. 製造検査の効率化

軟骨細胞の培養上清を用いて、iNtRON e-Myco Mycoplasma PCR Detection KitでPCRを行った。サンプルには、東京大学医学部附属病院で行った自主臨床研究の3症例で回収した最終培養上清を用いた。同サンプルは、自主臨床研究中のマイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)で、陰性であることが明らかとなっている。PCRのサイクル数を増加させてい

ったところ、すべてのサンプルで50サイクルから僅かなバンドが検出された。したがって、Mycoplasma PCR のサイクル数40が陰性、サイクル数50以上が陽性となることを確認することにより、代替試験とすることが可能であることが示唆された。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究に向けて、臨床研究の専門家に相談をしながら、ヒト幹細胞臨床研究の申請書の改訂を検討した。本技術は、将来的には、富士ソフト社(東証一部、証券コード9749)に技術移転し、同社が治験実施、産業課を行う予定となっている。本プロジェクトにおいて、将来的な治験を見据えて、効率よくデータを収集することが出来るよう、平成25年1月11日に厚生労働省医政局研究開発振興課に相談した。その結果、治験を念頭に置いた多施設臨床研究を行うに当たり、インプラント型再生軟骨の製造場所としては東京大学医学部附属病院の細胞プロセッシングセンターの代替えとして、治験における製造場所となる富士ソフト社のCPCを用いることも可能である、とのアドバイスをいただいていた。そこで、改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書において富士ソフト社のCPCを再生軟骨組織の製造場所とする改訂を検討した。

#### D. 考察

##### 1. 有効性評価法の確立

現在、東京大学医学部附属病院で実施している3次元皮下再生軟骨の自主臨床研究は、安全性の確認を主目的としている。一方、治験の主目的の一つが有効性の実証であるため、治験実施にむけて有効性評価指標を確立することは必須である。しかし、軟骨の特徴である力学強度やII型コラーゲンやプロテオグリカン(GAG)の蓄積を生体内で評価する手法は確立されていないのが現状である。そのため、超音波で軟骨の生体内での力学強度を評価し、またCTやMRIで生化学的組成を評価できるようになれば、評価項目が明確になり効率的な治験実施が可能となると思われる。本年度の検討により、MRI(T2, D値)が再生軟骨組織の成熟度を反映する評価項目であることが示された。また、懸念される石灰化の検出として、マンモグラフィーの併用が有用であることも示唆された。

##### 2. 多施設臨床研究の実施

富士ソフト社CPCで、インプラント型再生軟骨組織を作製し、同施設から東京医科歯科大学や山形大学に輸送されたヒト再生軟骨組織を、ヌードラットの背部皮下へ移植し、企業と医療施設間での組織搬出入技術の確立をめざした。搬送時間をあまり要さない東京医科歯科大学でも、関東から距離の離れた山形においても、移植された再生軟骨で良好な軟骨再生を認めた。富士ソフト社におけるインプラント型再生軟骨組織の作製法と、東京医科歯科大学や山形大学への搬送技術が有効であることが示され、安定した再生軟骨移植が可能であることが示唆された。

##### 3. 製造検査の効率化

現在の製造プロトコールでは1例あたり、無菌試験、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)などに約130万円の検査費用がかかっている。本年度の検討により、マイコプラズマ否定試験(培養法・DNA染色法)の代替として、Mycoplasma PCRが有効である

ことが示され、サイクル数40、50における検出が妥当であることが示唆された。

#### 4. 改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書作成

改定版ヒト幹細胞臨床研究の申請書において、富士ソフト社のCPCを再生軟骨組織の製造場所とする改訂を検討した。将来的な治験を見据え、効率よくデータを収集出来ることが期待される。

#### E. 結論

インプラント型再生軟骨の有効性評価法を確立する一助として、ヌードラットに移植した再生軟骨組織を超音波診断装置による力学評価、MRI・CTによる生化学評価を、GAGやII型コラーゲンの定量解析、組織学的評価や石灰化の検討を行い、再生軟骨組織の成熟度を測定する評価項目として、T2, D値, モリブデンX線管球を選定した。これらの評価項目は、臨床機でのMRTおよびマンモグラフィーで撮影することが可能であった。

また、インプラント型再生軟骨の治験実施場所となる富士ソフト社のCPCを利用した検討を行い、同施設におけるインプラント型再生軟骨の作製と、医療施設への組織搬出入技術が有効であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

<論文発表>

1. Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. (in press)
2. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. (in press)
3. Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. Open J Regen Med. 2013;2(4):93-8.
4. Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage. Mater Sci Appl. 2013;4(8):73-8.
5. 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 日本口腔科学会雑誌 63(2), 2014, 207-215.

<学会発表>

1. 高戸毅：骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究. 第67回NPO 法人日本口腔科学学会 2013年5月22 - 24日 栃木県総合文化センター, 栃木
2. 高戸毅：あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来. 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会学術講演会 2013年6月7日 - 9日 神奈川歯科大学, 神奈川
3. Takato T : Nanotechnological Approach for Cartilage Regenerative Medicine. Frontiers in Nanomedicine and Imaging Symposium, June 21-22, 2013, Lausanne, Switzerland, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne(EPFL)
4. 高戸毅:学融合が拓く未来の医療. 疾患生命工学センター発足 10周年記念シンポジウム 2013年9月24日 - 25日 東京大学伊藤国際学術研究センター, 東京
5. Takato T : Clinical application of bone and cartilage regenerative medicine. Seoul Symposium 2013, October 25, Seoul, Korea
6. 高戸毅：新たな顎骨および軟骨再建技術の開発. 耳鼻咽喉科分野同窓会総会, 2013年12月1日 日本外国特派員協会(プレスクラブ), 東京
7. Takato T, Saijo H, Fujihara Y, Hoshi K : Treatment of Cleft Lip Nasal Deformity-From Birth to Adult-. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Vietnam & Japan Hanoi, 23 November 2013, Vietnam
8. Takato T : Clinical application of regenerative medicine in oral and maxillofacial areas. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Japan and Vietnam, November 23-24, Hanoi, Vietnam
9. Takato T : Clinical application of cartilage regenerative medicine1. Asia Forum for Aesthetic Surgery & Medicine[AFAS], March 29, 2014, COEX Grand Ballroom(1F), Seoul, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し