

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

**「滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生」**

**研究代表者**

**関矢一郎 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 教授**

**研究要旨**

平成 25 年度は、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させるために、自家滑膜間葉系幹細胞移植術の安全性、効果及び実施可能性の評価目的とする臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」を開始した。また、滑膜幹細胞の薬事承認を目指し、PMDA の薬事戦略相談を活用しながら、治験開始までに必要な GLP 準拠の急性毒性試験を実施した。

臨床研究の実施体制は、研究代表者の関矢、分担研究者の宗田が臨床を担当し、分担研究者の森尾が製造管理を、また、分担研究者の清水が滑膜幹細胞の品質管理を担当している。平成 25 年 12 月に 1 例目の被験者を組み入れ、半月板縫合術及び滑膜採取、滑膜幹細胞の培養を実施したが、滑膜幹細胞の増殖が悪く移植を中止した。培養不成立の原因を、原料の滑膜、自己血清の両面から検討した。被験者の滑膜組織からヒトヘルペスウイルス 7 及びパルボウイルス B19 が検出されたが、培養中のウイルス増幅の可能性は否定された。半月板損傷は高齢の患者が多いのが現状であり、ウイルス感染の例も少なからずあると予想される。滑膜組織のウイルス感染の有無が滑膜幹細胞の増殖に影響するか否かを、我々が確立したウイルス・マイコプラズマ検査系で検出できるウイルス以外の可能性も含め、引き続き検討する。被験者の自己血清に関しては、採血に用いた血液バッグから溶出した可塑剤が細胞増殖を阻害した可能性は否定されたが、今回の 1 例目の結果を重く受け止め、自己血清の細胞増殖性が担保されていることを培養前に確認することを品質管理に追加することを検討している。

**研究分担者**

宗田 大 東京医科歯科大学・大学院・運動器外科 教授  
森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授  
清水則夫 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 准教授

**A . 研究目的**

半月板損傷に対してわが国で唯一の温存手術は縫合術であるが、再断裂の可能性があり、必ずしも縫合術が積極的に行なわれている状況ではない。平成 24 年度厚生労働省社会医療診療行為別調査によると、半月板手術は年間に約 3 万件で、うち縫合術はわずか 8%のみであり 90%以上が切除術で

あった。本臨床研究では、半月板損傷部の状態が悪くて現状では縫合術の適応にならない半月板損傷患者を対象とし、縫合術後に滑膜幹細胞を移植することにより、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させることを目的とする。半月板の消失・機能不全は、変形性膝関節症の原因となる。私たちの細胞治療により半月板を切除せず温存できれば、変形性膝関節症が原因の要介護を減らし、人工膝関節等の終末期高額医療に関わる医療費の軽減が見込まれる。

## **B . 研究方法**

### **(1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治療促進」**

#### **治療計画：**

膝半月板損傷の患者にまず半月板縫合術を行い、その際に滑膜組織を約 0.5 g 採取する。採取した滑膜から滑膜幹細胞を単離し、14 日間培養して滑膜幹細胞を増殖させる。14 日後に滑膜幹細胞を回収し、細胞の安全性を確認後、手術室にて移植する。移植は腰椎麻酔により下半身を麻酔後、関節鏡視下に、注射器を使用して細胞浮遊液を半月板縫合部に滴下、10 分間静置する。後治療は、従来の半月板修復術と同等とする。術後観察は、半月板縫合術を基準日とし、術後 4、6、12、24 週に、全身所見、臨床検査、局所症状の観察と評価、自覚症状のアンケート、画像検査を行う。

#### **安全性の評価：**

本臨床研究の主要な目的は、滑膜幹細胞移植術の安全性の評価。主要評価項目である臨床研究中に被験者に生じた有害事象

の有無、重症度、重篤性、発現頻度、副次評価項目の自家滑膜間葉系幹細胞移植術の実施・完遂の可否、具体的には滑膜幹細胞の出荷承認書の品質管理項目および出荷判定で評価する。また、滑膜幹細胞移植の際、関節鏡視下で縫合部位を観察して炎症の有無等確認する。

#### **有効性の評価：**

滑膜幹細胞移植の効果は、副次評価項目の患肢の自覚症状( K00S 及び NRS アンケート ) 及び医師の診断する局所症状 ( 局所観察、徒手検査、Lysholm スコア )、MRI 画像診断による半月板修復の程度( Mink の分類に基づく半月板のグレード、評価、断裂形態 )、X 線検査による関節裂隙の厚さで評価する。

#### **症例数：**

5 例

#### **組み入れ基準：**

以下の選択基準及び除外基準を満たす膝半月板損傷患者

#### **【 選択基準 】**

- 1) 横断裂、水平断裂、複合断裂、変性断裂等で、一般的に半月板切除術の適応となるような断裂形態の症例
- 2) る症例
- 3) 臨床症状に対し手術治療の適応がある症例
- 4) 半月板修復術が技術的に可能と考えられる症例
- 5) 臨床研究開始前の同意取得時に20歳以上

- 6) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られた患者

#### **【除外基準】**

- 1) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られない患者
- 2) 活動性の感染がある患者
- 3) ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1、HIV-2)、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) のいずれかが陽性の患者
- 4) 活動性の悪性腫瘍を有する患者
- 5) 抗生物質に過敏な患者
- 6) 妊娠している、または授乳中の患者
- 7) 糖尿病がある患者
- 8) 全身状態が悪い患者
- 9) 担当医が本臨床研究への参加を不適当と判断した場合

#### **(倫理面への配慮)**

本臨床研究は介入研究であり、医学部倫理審査委員会の承認を得て実施している。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として、厚生労働大臣の了承を得て行われている。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、及び本臨床研究実施計画書を遵守し、「医療機器GCP省令」に準拠して実施している。

#### **(2) ノードラットを用いた滑膜幹細胞の急性全身毒性試験**

滑膜幹細胞の薬事承認を目指し PMDA と事前面談を実施し、承認には GLP 準拠の安全性試験が必要であること確認した。「ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成 24 年 9

月 7 日付薬食発 0907 第 2 号)、「医療機器の製造販売承認申請に必要な生物学的安全性評価の基本的な考え方について」(平成 24 年 3 月 1 日付薬食機発 0301 第 20 号)で考慮すべき評価項目として挙げられている試験項目について検討し、急性全身毒性試験を計画した。動物種は、ヒトの細胞を投与しても拒絶反応の起こらない免疫不全動物で、臨床投与経路と同じく膝関節内に投与可能なヌードラットを選択した。動物数、投与回数、試験期間、観察項目及び検査項目は、医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスを参考に設定した。

#### **C . 研究結果**

##### **(1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治療促進」**

#### **製造・品質管理体制の整備**

滑膜幹細胞の製造を行う本学細胞治療センターは ISO9001 を取得した施設であるが、環境整備や環境モニタリングの改善を実施し、整備された環境のもと問題のない手順にて製造が実施されている。品質管理に関しても、滑膜幹細胞製造の各工程において、ウイルス・マイコプラズマ検査、無菌試験、エンドトキシン試験、細胞数算定の工程内管理試験を実施し、安全性の確保された細胞のみ移植する体制を整備した。

#### **臨床研究の実施**

平成 25 年 12 月 5 日に 1 例目の被験者を組み入れ半月板縫合術、滑膜採取を行い、滑膜幹細胞の培養を開始した。滑膜組織搬入時のウイルス・マイコプラズマ検査におい

て、ヒトヘルペスウイルス7及びパルボウイルス B19 が陽性であったが、被験者の除外基準のウイルス以外の場合は追試験でウイルスの定量試験を実施し、 $\mu\text{g}$  DNA 当たりのウイルス量が製造工程の進行に伴い増加していることが確認された場合は研究を中止するが、製造工程の進行に伴い減少する場合は製造を続行し、その後の処置は主治医の意向に従うという計画に従った。培養 12 日目に観察した際、細胞形態異常及び細胞増殖悪化を確認したため、本被験者の研究は移植前で中止した。

### 培養不成立の原因解明

培養不成立の原因として、自己血清および滑膜に問題があった可能性を検討した。異常を確認した培養 12 日目の細胞を回収し、同じロットの -MEM 培地に FBS を 10% 添加した培地に播き替えて培養を続けた。その結果、細胞は形態、増殖ともに通常の状態に戻ったことから、自己血清に問題があった可能性が示唆された。

本臨床研究で使用した血液バッグ「セルエイド」には、可塑剤としてフタル酸ジ(2エチルヘキシル)(DEHP)が含まれていたため、溶出した DEHP が細胞増殖を阻害した可能性を検討した。ガスクロマトグラフィー質量分析法による血清中 DEHP の定量を、ボゾリサーチ株式会社への委託試験として実施した。その結果、1 例目の被験者の血清中には  $5.66 \mu\text{g}/\text{mL}$  の DEHP が検出された。比較のために準備したボランティアの血清にも  $2\sim 3 \mu\text{g}/\text{mL}$  の DEHP が検出されたが、血清の非働化処理によって DEHP 溶出量が約 2 倍に増加することがわかった。

血清中の DEHP が増殖阻害の原因物質で

あるかを確認するために、血清中の DEHP 濃度  $5.66 \mu\text{g}/\text{mL}$  の結果と血清含有量 10% であることを考慮し、 $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$  を中心に  $0.3, 0.6, 1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  の DEHP を滑膜幹細胞の培養系に添加し、細胞増殖が阻害されるか否かを調べた。その結果、いずれの濃度でも滑膜幹細胞の増殖は阻害されなかった。

自己血清に何らかの問題があったとすれば、本被験者以外の滑膜幹細胞でも増殖が阻害されるであろうと考え、研究室保管のヒト滑膜幹細胞を本被験者の自己血清を含む培地で培養し、増殖が阻害されるか否かを調べた。複数の保管滑膜幹細胞で検討したが、すべての細胞において、細胞形態および細胞増殖異常は認められなかった。

培養不成立の原因として、被験者の滑膜に問題があった可能性を検討した。本被験者の滑膜はヒトヘルペスウイルス7とパルボウイルス B19 が陽性であったが、培養に伴いウイルスの定量値は低下していた。従って、パルボウイルス B19 とヒトヘルペスウイルス7陽性の滑膜であったことが、滑膜幹細胞培養不成立の原因とは考えにくかった。しかし、私たちのウイルス・マイコプラズマ検査システムでは検出できない微生物に感染していたため、細胞の増殖が抑制された可能性も考えられるため、保存してある培養 12 日目のウイルス・マイコプラズマ試験検体中に混入している外来微生物のシーケンス解析を予定している。

### (2) ノードラットを用いた滑膜幹細胞の急性全身毒性試験

GLP 認証を取得している株式会社日本バイオリサーチセンターへの委託試験として実施した。

滑膜由来間葉幹細胞の安全性に関する非臨床試験の一環として、ヒト滑膜由来間葉幹細胞を雄ヌードラットに1回関節内投与し、その毒性について検討した。

滑膜由来間葉幹細胞の投与量は、細胞懸濁液として調製可能な上限濃度である  $1 \times 10^5$  cells/ $\mu$ L と、関節腔内組織を物理的圧迫しないと考えられる上限液量である 40  $\mu$ L/膝から算出される  $8 \times 10^6$  cells/匹を設定していたが、細胞数が予定を下回り  $2.56 \times 10^6$  cells しか回収できなかったため、当試験の投与量は、得られた細胞全てを用いて 5 匹分投与できる  $2.86 \times 10^5$  cells/匹とした。対照として、滑膜由来間葉幹細胞を懸濁しているバッファを同液量投与する群を設けた。

投与日の一般状態は、群分け前、投与直後及び投与後 4 時間に、その後は 24 時間、48 時間及び 72 時間に、ISO10993-11: 2006, Annex C Table C.1 の項目について観察した。体重は、投与日の投与前、投与後 24 時間、48 時間及び 72 時間に測定した。全例について各観察期間終了時に、4%ペントバルビタルナトリウムの腹腔内投与 (40 mg/kg) 麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

ヒト滑膜由来間葉幹細胞の投与により、一般状態、体重推移及び剖検とも異常は認められず、急性全身毒性の判定基準からは、ヒト滑膜由来間葉幹細胞に急性全身毒性はないものと判定された。しかしながら、実際の投与量は  $2.86 \times 10^5$  cells/匹であったため、試験計画書設定の  $8 \times 10^6$  cells/

匹を下回り試験の評価目的を満たさないため、ヒト滑膜由来間葉幹細胞の急性全身毒性について、評価しないこととした。なお、実際の投与量は  $2.86 \times 10^5$  cells/匹 (200 g) は、ヒト臨床で予定される投与量 ( $5 \times 10^7$  cells/50 kg) とほぼ同じであった。

#### D. 考察

これまでの検討の結果、培養不成立の原因として被験者の自己血清に問題があった可能性があるが、血清中の増殖阻害物質を特定することはできなかった。細胞に何らかのウイルスが感染していた可能性も、現時点では否定しきれない。自己血清と滑膜の両方の悪条件が重なり増殖が阻害された可能性も考えられる。

細胞増殖パターンは、被験者の組織の質や血清中の成長因子などに依存し、個体差が大きいことが知られている。滑膜幹細胞はウシ胎児血清 (FBS) を含む培地でもよく増殖し、FBSの方が一定の品質を確保しやすい。しかし、FBSでは滑膜幹細胞にウシ由来の物質が残存する可能性があり、安全性の面で自己血清より劣っている。私たちは、膝軟骨損傷を対象とする過去に実施した臨床研究において、約 30 例の滑膜幹細胞を患者の自己血清で培養した。いずれも問題なく増殖し、自己血清は安全性および品質の面で問題ないと判断し、自己血清を用いる培養を採用した。しかし、今回の培養不成立の結果を重く受け止め、自己血清の細胞増殖性が担保されていることを培養前に確認してから、本番の培養に使用することを検討している。

今回の問題に直面し、将来的には血清の個体差に左右されない無血清培地の使用も検討する予定はあるが、本臨床研究においては、自己血清をできるだけ良い条件で使用したい。自己血清の分析の結果、血液成分分離バッグ「セルエイド」を用いて調製した血清には2~3 µg/mLのDEHPが検出され、非働化処理によってDEHPの溶出量が約2倍に増加することがわかった。滑膜幹細胞の培養系にDEHPを添加する実験から、今回検出されたDEHP濃度では細胞増殖を阻害するには至らなかったが、できるだけ安全な自己血清を使用するために、血清を非働化せずに使用する製造方法に変更することを検討している。

## E . 結論

自己血清の細胞増殖性が担保されていることを培養前に確認してから培養に用いる品質管理体制を整えてから、臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治療促進」を再開する。

## F . 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

国際誌

1. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus

injury. *Clin Orthop Relat Res*. Dec 13 2013 Epub ahead of print

2. Katagiri H, Muneta T, Tsuji K, Horie M, Koga H, Ozeki N, Kobayashi E, Sekiya I. Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun*. **453**: 603-9, 2013
3. Hatsushika D, Muneta T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *J Orthop Res*. **31**: 1354-9, 2013

### 著書

1. 関矢一郎 半月板損傷 **スポーツ整形外科マニュアル** 165-72, 2013
2. 関矢一郎 関節軟骨損傷 **スポーツ整形外科マニュアル** 194-6, 2013
3. 関矢一郎 変形性膝関節症 **スポーツ整形外科マニュアル** 197-200, 2013

### 国内雑誌

1. 堀江雅史、宗田 大、関矢一郎 滑膜由来間葉系幹細胞による膝半月板再生 **炎症と免疫** **21**: 58-66, 2013
2. 堀江雅史、宗田 大、関矢一郎 滑膜由来間葉系幹細胞を用いた半月板再生の基礎と臨床への展望 **整形・災害外科** **56**: 593-601, 2013
3. 関矢一郎、初鹿大祐、宗田大 半月板治療の限界と将来展望;滑膜幹細胞による半月板再生 **Monthly Book Orthopaedics** **26**: 73-9, 2013

4. 関矢一郎 Save the meniscus **整形外科**  
65: 9, 2014

7. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生医療の開発 山梨運動器再生セ  
ミナー 山梨 2013年9月12日

2. 学会発表(研究代表者分)

国際学会

1. Sekiya I, Muneta T. Arthroscopic  
transplantation of synovial MSCs for  
cartilage regeneration. 11<sup>th</sup> International  
Cartilage Repair Society annual meeting,  
Izmir, Turkey, Sep 15-18 2013

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

国内講演

1. 関矢一郎、宗田 大 滑膜由来の間葉系  
幹細胞を用いた関節軟骨再生・変形性膝  
関節症に対する私たちの取り組み 第  
57 回日本リウマチ学会総会・学術集会  
京都 2013年3月20日
2. 関矢一郎、宗田 大 滑膜間葉系幹細胞  
を用いる軟骨再生医療の実際:特に安全  
性の観点から 第86回日本整形外科学  
会総会 広島 2013年5月23日
3. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生 第4回関節治療研究会 東京  
2013年5月29日
4. 関矢一郎、宗田 大 滑膜幹細胞による  
軟骨・半月板再生:基礎から臨床まで現  
状と展望 第5回日本関節鏡・膝・スポ  
ーツ整形外科学会 札幌 2013年6月  
20-22日
5. 関矢一郎、宗田 大 滑膜幹細胞による  
半月板治癒促進 第5回日本関節鏡・  
膝・スポーツ整形外科学会 札幌 2013  
年6月20-22日
6. 関矢一郎 滑膜幹細胞による軟骨・半月  
板再生 第26回日本臨床整形外科学会  
静岡 2013年7月14日

