

Ⅲ. 分担研究報告

「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の総括

研究分担者	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者	高垣 智紀	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者	石原 美弥	防衛医科大学校医用工学講座医用工学・教授
研究協力者	谷 良樹	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	横山 宗昂	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究協力者	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
研究分担者	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授
研究分担者	三上 礼子	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師

研究要旨：本研究事業の目的は「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」と「同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究の実現」である。軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。その後、総症例数としては11症例エントリーし、8症例に積層化軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった3症例の内訳は、2例が関節鏡にて選択基準に合致せず、1例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全8症例が移植後1年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行して平成26年12月12日に臨床研究を終了した。全8症例において、術後1年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は生じず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療としての実施を目指す。

A. 研究目的

膝関節軟骨損傷患者を対象として、関節内組織より単離した細胞を、温度応答性培養皿を用いて培養、細胞シートを作製し、軟骨損傷が生じている部位へ移植する。この新規治療法の安全性をプライマリーエンドポイントとして客観的に評価する。また、各種の臨床的評価を実施して、効果に関するデータを収集する。

B. 研究方法

1. 症例数

総エントリー 11 例
移植実施 8 例

2. 対象疾患

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

3. 選択基準と除外基準

1) 選択基準

以下の選択基準を全て満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

- ① 20歳から60歳までの性別を問わない患者
- ②（外傷または変性により生じた）膝関節軟骨損傷を有するもの
- ③ 関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類で Grade III 以上のもの
- ④ 膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに 1.0cm² 以上 4.2cm² 未満の軟骨欠損

を有し、従来骨髄刺激法やモザイクプラスチックなどが適応となる患者

2) 除外基準

下記の除外基準に1つでも当てはまる患者は対象としない。

- ① 患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合
- ② 重大な合併症を有している場合
- ③ 問題となるような感染症（HBV、HCV、HIV、HTLV、FTA-ABS等の陽性を含む）を有している場合

以上より、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の被験者としての的確であると判断した患者に対して、時期を変えて2回の臨床研究に関するインフォームドコンセントが取れた場合に開始し、細胞シート作製のために軟骨および滑膜組織を採取した。

4. 細胞シート作製と移植

1) 組織の採取

対象患者に対して、術前関節鏡検査時と細胞シート移植時に、それぞれ事前に十分な時間をかけて患者本人と家族に対してインフォームドコンセントを行い、合計2回の同意書を取得して本臨床研究を行う。関節鏡検査時に軟骨損傷程度を確認し、その際に細胞シート作製のために必要な、滑膜（1g以上）と大腿側関節面非荷重部の軟骨（1.5g以上）を採取する。

2) 細胞シート作製

① 細胞の単離

採取した軟骨組織と滑膜組織をそれぞれ細切し、コラゲナーゼによる酵素処理を行い、細胞を単離、得られた細胞数を確認する。

② 共培養（単層細胞シート作製）

培地内に温度応答性インサートを介して軟骨細胞 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ および滑膜細胞 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ を播種し、軟骨細胞・滑膜細胞を共培養する。温度 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、炭酸ガス濃度 $5 \pm 1\%$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ 環境下にて培養する。

③ 積層化細胞シートの作製

共培養で作製した軟骨細胞シートを3枚に積層化する。これを繰り返し、必要数の積層シートを作製する。

3) 積層化細胞シート移植

作製された積層化軟骨細胞シート（最終製品）を対象患者に対して計画された予定手術時に軟骨損傷部へ移植する。軟骨損傷部の大きさに合わせて、複数枚を移植する事もある。軟骨損傷部が不良組織で充填されている場合はこれを切除して、病巣部を郭清した後、損傷部の直上に損傷部が覆われるように細胞シートを移植する。細胞シートを周辺組織へ縫合する操作は行わない。

5. 評価項目と評価基準

1) 主要評価項目

安全性：有害事象の発生の有無

2) 副次評価項目

有効性：術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年における臨床評価項目、単純レントゲン検査、MRI 検査並びに術後 1 年の時点での関節鏡、超音響法、病理検査による評価。

① 臨床評価

臨床評価基準として、Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score での評価を術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施する。

② 単純レントゲン検査

関節裂隙、軟骨下骨の状態、関節症の進行の有無を評価する。関節症の進行度は Kellgren-Lawrence grading scale (※1)を用いて術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

③ MRI 検査

経時的な軟骨の厚み、性状の変化を評価し、Nelson MRI Grading (※2)を用いて、術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

④ 関節鏡検査

術後 1 年の時点での関節表面の軟骨性状（色調、硬さ、平滑性）、Outerbridge 分類 (※3)を評価する。また痛みや関節の腫脹などが生じた場合には適宜実施し軟骨の状態を評価する。

⑤ 超音響法検査

術後 1 年の時点での関節軟骨の粘弾性特性を定量的に評価するために、我々が独自に開発した機能診断装置により、関節鏡視下に移植部と周辺軟骨部の軟骨を評価する。本評価法は東海大学医学部臨床研究審査委

員会承認下で、東海大学医学部付属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

⑥ 病理検査

関節鏡を行った際に再生組織の一部を生検し、Safranin-O 染色を行い、Modified Mankin Score(※4)を用いて客観的に組織学的評価を行う。

C. 結果

[発生した有害事象]

なし

[安全性の評価]

積層化軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、いずれも術後経過は良好であり、移植後 1 年を経過して臨床研究中に有害事象は発生しなかった。

[有効性の評価]

軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。

D. 考察

移植後 1 年を経過した全 8 症例に関しては、術後 1 年後の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象は発生せず、軟骨細胞シート移植による有効な関節軟骨再生効果が得られている。

E. 結論

自己細胞を用いた軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部附属病院において実施が認められ、臨床研究保険に加入後、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例目の移植を施行した。その後、総症例数としては 11 症例エントリーして、8 症例に軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった 3 症例の内訳は、2 例が関節鏡にて選択基準③又は④に合致せず、1 例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全 8 症例が移植後 1 年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行し、平成 26 年 12 月 12 日に臨床研究を終了した。全 8 症例において、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は発生せず、自己軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療での実施を目指す。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

※1 Kellgren-Lawrence Grading Scale

Grade1 : doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping

Grade2 : definite osteophytes, definite narrowing of joint space

Grade3 : moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joints space, some sclerosis and possible deformity of bone contour

Grade4 : large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone contour

※2 Nelson の MRI 分類

Grade0 : normal

Grade1 : intact cartilage with signal change

Grade2 : high signal breach of cartilage

Grade3 : thin, high signal rim extending behind the osteochondral fragment indicating synovial fluid around the fragment

Grade4 : mixed or low signal loose body in the center of lesion or free within the joint

※3 Outerbridge-Brittberg

grade1 : 関節軟骨の軟化を認める

grade2 : 軟骨表面の羽毛立ち、浅い亀裂を認める

grade3 : 軟骨下骨の深さまでの軟骨損傷があるが、軟骨下骨の露出は認めない

grade4 : 軟骨下骨の露出を認める

※4 Mankin score system

I : 構造

a. 正常 : 0

b. 表面の不整 : 1

c. 表面の不整、バンヌス形成 : 2

d. 中間層までの亀裂 : 3

e. 深層までの亀裂 : 4

f. 石灰化層までの亀裂 : 5

g. 完全な破壊 : 6

Ⅱ：細胞

- a. 正常：0
- b. びまん性の細胞数増加：1
- c. クローニング：2
- d. 細胞数減少：3

Ⅲ：サフラニン-O 染色性

- a. 正常：0
- b. 軽度の低下：1
- c. 中等度の低下：2
- d. 重度の低下：3
- e. 染色性の消失：4

Ⅳ：Tidemark の状態

- a. 正常：0
- b. 血管の横断：0

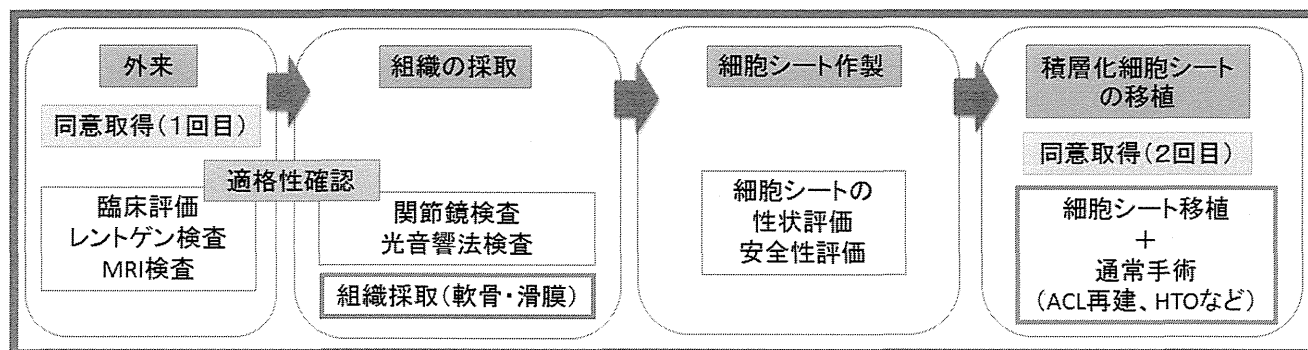
総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：>7

「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」 研究実施の流れ



移植術後検査(定期的な外来診療時)

	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	1年後
臨床評価	○	○	○	○
単純レントゲン検査(下肢)	○	○	○	○
MRI検査	○	○	○	○
関節鏡検査				○
超音響法検査				○
病理検査				○

臨床研究終了

多指症軟骨由来細胞シートの作製

研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者	豊田 恵利子	東海大学医学部外科学系整形外科学・奨励研究員
研究協力者	白砂 早織	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究分担者	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター 生殖医療研究部・部長
研究協力者	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター研究所・副所長
研究協力者	小久保 舞美	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所・博士研究員

研究要旨：我々は、これまでに自己軟骨細胞シートによる関節治療を目指したヒト幹細胞臨床研究を実施し、重篤な有害事象は認められることはなく終了した。平成 26 年 8 月に同種軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究の承認を得て、現在実施準備中である。

本研究では、多指症手術で廃棄される軟骨組織から細胞シートの作製及びその特性の解析を実施した。本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取し、細胞を調整・播種・培養し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解し速やかに平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。細胞シートの組織切片を作製し、構造および厚みを解析した。

その結果、多指症軟骨細胞の凍結ストックから重層化した細胞シートの作製が可能であった。

A. 研究目的

平成 23 年 10 月 3 日に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政 1003 第 3 号）により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、自己細胞を使用した「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を実施した。移植が実施された全 8 症例は移植後 1 年を経過し、臨床研究中に重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節治療効果が得られており、細胞シート移植による関節治療効果の解析を進めている。細胞シートの基材として、自己細胞は、関節軟骨組織の非荷重部の健常部と滑膜組織を採取することや採取量に制限があること、及びシート作製枚数やシート移植の可能性の有無は事前に判断できない。また、対象として自己で 1 人、1 回程

度の実施が可能である。今後、細胞シートによる関節治療のさらなる普及を目指すために自己細胞の課題を解決すべく、細胞シートの基材となる細胞を同種細胞に代替することにより、自己組織の侵襲がなくなるため、軟骨及び滑膜組織の採取量によるシートの作製数の制限がなくなり、各患者に応じて移植に必要な枚数が作製可能となる。また、患者の移植前にシートを作製することが可能となり、バリデーション試験として細胞シートの特性解析が実施できる。したがって、特性解析により、基材としての細胞の適合性を判定し、合格した細胞の中から、シート作製によりよく適応する細胞をシート作製の基材として選抜することが可能となる。この選抜された細胞を基材とすることにより、多数の患者に複数回の移

植の実施が可能であると想定される。

細胞シートの基材となる多指症手術時廃棄組織由来細胞でシート作製が可能かを検討した。

B. 研究方法

サンプル

本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術（男女含め 4 症例、平均年齢 1 歳 1 か月）廃棄組織より軟骨組織を採取し、細切して酵素処理を行い単離した細胞を多指症軟骨組織由来細胞とし、本研究を実施した（表 1）。

細胞培養

培地：DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Co. Japan)及び DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)

培養条件：37°C、5% CO₂

播種数：1×10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

No.	gender	months
1	F	16
2	M	12
3	M	8
4	M	17

(平均年齢：1 歳 1 箇月)

① シート作製

多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取して単離した細胞を培養し、増殖させた細胞を酵素処理により回収し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解して平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。シートは剥離試験を実施し、剥離できた結果をもとにシート作製が可能であると判断した。

② シートの生細胞数及び細胞生存率

細胞シートは、酵素処理を行い細胞に単一化した。単離した細胞を死細胞が染色されるトルイジンブルーで生細胞と死細胞を染め分けて、生細胞を計数し、シート当たりの生細胞数と細胞生存率を算出した。

③ 細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフラニン O 染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し、顕微鏡下で厚みを計測した。

C. 結果

① シート作製

自己軟骨細胞シート作製時と同様に軟骨組織から細胞を単離し、培養して増殖した細胞を酵素処理により単離して凍結細胞ストックを作製した。一定期間保管した後、この凍結細胞ストックを融解して細胞生存率を測定し、高い生存率を保っていること

が確認された（表 2）。融解後、速やかに平面培養すると、多指症軟骨由来細胞は増殖性がよく、サブコンフルエントに増殖する期間は、4~5 日間であり、少なくとも P7 で細胞集団倍加数は 15 であった（表 3）。また、サブコンフルエントに達した時に細胞を酵素処理で単一に単離して、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製し、14 日間で細胞シートとして剥離が可能であった（図 1）。

表 2 凍結細胞ストックの生存率

サンプル	%
1	93.2
2	97.8
3	98.2
4	97.4
5	99.6
6	96.9
平均	97.2±0.8

表 3 細胞集団倍加数

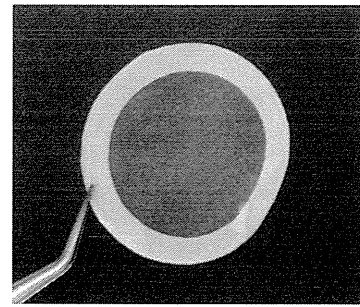
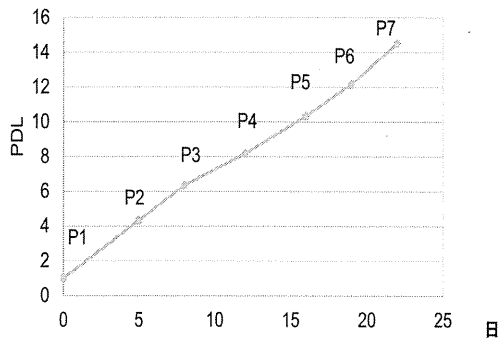


図 1 細胞シート

② シートの生細胞数及び細胞生存率

各シート 1 層あたりの生細胞数の平均値は $190.2 \pm 51.4 \text{ cells/cm}^2$ (表 3) であり、また、細胞シートの細胞生存率は $97.7 \pm 0.8\%$ であった（表 4）。

表 4 細胞シートの細胞数

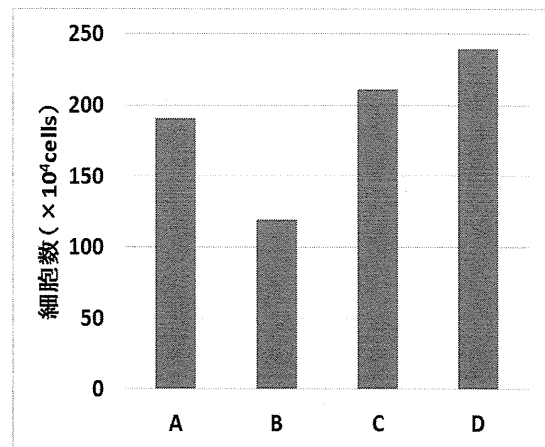
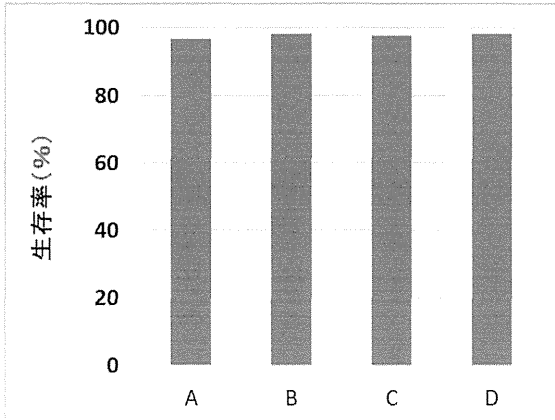


表 5 細胞シートの細胞生存率



③ 細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフラニン O 染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し（図 2）、顕微鏡下で細胞シートの構造を観察したところ、細胞の重層化が認められた。また、各サンプルの細胞シートの厚みを計測したところ、平均の厚みは 21.5 μm であった。

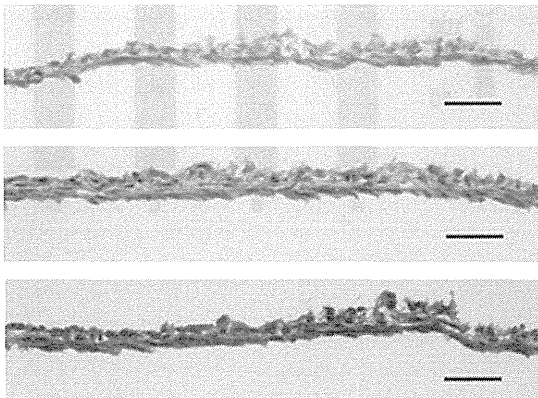


図 2 細胞シートの厚み

50 μm

D. 考察

我々が同種細胞ソースとして検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であり、高い細胞増殖活性を有した。

これまで自己軟骨細胞シートは、作製には、自己の軟骨組織を関節鏡視下で採取を行う侵襲工程から 3 週間を要し、採取箇所による採取量の制限もあり、作製枚数に制限があった。また、自己の場合は細胞培養の継代数が進むにつれて、細胞の増殖性の低下が認められるため、自己軟骨細胞を継代する工程はシート化に適さないことが示唆されてきた。

一方、同種細胞を基材とすると、自己侵襲することはなくなる。また、多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、各患者の必要に応じた移植枚数のシートを作製することが可能となる。

多指症軟骨組織から細胞を単離し、培養することによって細胞を増やし、細胞ストックを作製した。細胞ストック工程を経ても細胞の起き具合は高い生存率を保っており、その後の増殖性も安定していた。この細胞を基材にして細胞シート作製が可能であった。作製した多指症軟骨細胞シートは、1 層のシートであり、3 層に積層化した自己細胞シートと遜色ない生細胞数と細胞生存率であった。

E. 結論

本研究において、細胞シートの作製工程の検討を行い、この工程で細胞シート作製

が可能であることが判明した。作製された細胞シートは、生細胞数、細胞生存率、厚みの各項目において、3層に積層化された自己細胞シートと遜色ない結果が得られた。

このことから、多指症軟骨由来細胞シートは、細胞の凍結ストックから1層での重層化した細胞シートの作製が可能であり、同種細胞シートの基材になりうることが示唆された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Akutsua H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*, 1, 18-29, 2015.

2) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome

inactivation and embryogenesis in mice. *Nature communications*, 5, 5464, 2014.

3) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet*, 29, 44-51, 2014.

4) Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 1039-1050, 2014.

5) Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of Reprogramming Transgenes Improves the Tissue Reconstitution Potential of Keratinocytes Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*, 3, 992-1001, 2014.

6) Ichida JK, T C W J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H*, Meissner A*, Eggan K* (*;corresponding author) . Notch inhibition allows

oncogene-independent generation of iPS cells. Nat Chem Biol, 10, 632-639, 2014.

7) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞iPS細胞研究のこれから - 再生医療の実用化に向けたルールを学ぼう」 Medical Technology, 42(11), 1156-1159, 2014.

8) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞・iPS細胞の基本, ES細胞、iPS細胞で何ができるの?何が変るの?」 Medical Technology, 42(10), 1037-1042, 2014.

9) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞とiPS細胞, どこがどう違うの?」 Medical Technology, 42(9), 920-926, 2014.

3.学会発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H. Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors (F-2142). 12th Annual Meeting of ISSCR（国際幹細胞学会）, Vancouver, Canada, 2014.6.17-22.

2) 阿久津英憲. 「生殖医学における ES細胞と iPS 細胞の意義」. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会 教育講演 3（招待）, 東京, 2014.12.4.

4. 学会発表（研究協力者：岡田恵里）

1) 岡田恵里, 佐藤正人, 豊田恵利子, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. 多指症軟骨由来細胞シート作製.

第 14 回日本再生医療学会総会, 東京, 2015.3.19-21

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析

研究協力者	豊田 恵利子	東海大学医学部外科学系整形外科学・奨励研究員
研究協力者	岡田 恵里	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者	白砂 早織	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	渡部 綾子	東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
研究協力者	河毛 知子	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	高野 りや	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	中村 嘉彦	東海大学医学部付属病院中央診療部 セルプロセッシング室・室長補佐

研究要旨：これまで本事業において、軟骨欠損に対し自己軟骨細胞を用いた細胞シートによる関節軟骨治療を実施し、重篤な有害事象もなく、移植部に硝子軟骨の再生を認めている。さらに、本治療法をレディメイド型の医療として確立するために、多指症手術時廃棄組織から得られる軟骨細胞を同種細胞ソースとして使用することを目指して、これまでに多指症軟骨細胞の安全性を確認した。本研究では、多指症由来軟骨から作製した細胞シートの特性を解析し、自己膝軟骨細胞による細胞シート治療で移植された細胞シート（成人膝軟骨細胞シート）のデータと比較した。その結果、多指症由来軟骨から作製した細胞シートは、成人膝軟骨細胞シートと同等の細胞数から構成され、生細胞率は95%以上を示した。また、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31, CD45陰性、CD81, CD90陽性を示すことを確認した。

A. 研究目的

我々は、温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により作製した積層化軟骨細胞シートを、軟骨損傷を有する8名の患者へ移植し、1年間の観察期間を終了した。これまでに重篤な有害事象はなく、1年後の細胞シート移植部の組織学的評価で硝子軟骨の再生が認められ、細胞シートによる関節治療の安全性及び有効性を確認している。しかし、軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷治療を、多くの患者に医療として提供するためには、オーダーメイドとなる自己細胞を用いた方法には限界があり、同種細胞を用いた同種軟骨細胞シート移植が必須であると考えられる。

我々は、これまでに多指症軟骨組織由来細胞の安全性を確認するため、国立成育医

療研究センター研究所から譲渡を受けた多指症由来細胞を用いて造腫瘍性否定試験を行い、多指症由来軟骨細胞が造腫瘍性を示さないことを示した。また、aCGH および核型解析を行うことにより、培養による遺伝子コピー数異常の有無を評価して、安全性の高い多指症由来軟骨細胞を選別できることを確認した。これらの成果に基づき、同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究は、2014年8月に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政0806第9号平成26年8月6日）による承認を得て、現在移植用の多指症軟骨細胞ストックの作製保管を始めている。本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製される細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同等の機能を示すか検証するために、多指症軟骨細胞シートの特性を

成人膝軟骨細胞シートと比較した。

B. 研究方法

多指症由来軟骨細胞

本学臨床研究審査委員会承認のもと多指症手術廃棄組織（男性 7 症例:平均年齢 1 歳 2 カ月）より、細切した軟骨片、または、コラゲナーゼにより単離した軟骨細胞を培養皿に播種し、培地（20%ウシ胎児血清添加 DMEM/F12 (FBS; GIBCO)、1% antibiotics-antimycotic (GIBCO)）で培養した。細胞がサブコンフルエントまで増殖した時点で剥離し、凍結細胞ストック（第 1 継代細胞）を作製した。

細胞シートの作製

凍結細胞ストックを融解後、平面培養して増殖させたのち、第 2 継代または第 3 継代の軟骨細胞を、 1×10^4 cells/cm² で温度応答性インサートに再播種し、0.01%アスコルビン酸（日新製薬株式会社）を添加した培地で 14 日間培養した。14 日間培養後、細胞シートを PVDF 膜を用いて剥離し、細胞がシートを形成していることを確認した（剥離試験）。

細胞数の測定

細胞シートを TrypLE™ Express (Life Technologies) 中で 37°C で 30~60 分加温後、遠心（1500rpm x 5min）し TrypLE™ Express を除去した。細胞ペレットに 0.25 mg/mL collagenase P (Roche) を含む培地を加え、37°C で 20~45 分加温して細胞を分散させた。遠心により collagenase 液を除去し、FACS 緩衝液（0.2%BSA, 1 mM

EDTA, DPBS(-) に懸濁した。トリパンプルーと血球計算盤を用いて、細胞数、生細胞率を求めた。

細胞表面マーカーの解析

細胞シートから調整した細胞を FITC 標識抗 CD31 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗 CD45 抗体 (Beckman Coulter)、APC 標識抗 CD81 抗体 (BD Pharmingen) および APC 標識 CD90 抗体 (BD Pharmingen) およびアイソタイプコントロール (Beckman Coulter) で標識し、FACS Vantage (BD) を用いて解析した。

C. 結果

多指症由来軟骨細胞は滑膜との共培養を必要とせず増殖し、培養開始後 14 日目で全例の細胞シートの剥離が可能であった（表 1）。

多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートの一枚当たり細胞数を調べたところ、平均 $2.39 \pm 0.97 \times 10^6$ cells で、生細胞率は平均 $96.8 \pm 2.6\%$ であった（表 2）。

多指症軟骨細胞シートを構成する細胞の純度を解析するため、血液系細胞で発現する CD31 および白血球共通抗原である

表 1. 多指症軟骨細胞シート剥離試験

細胞ID	月齢	性別	剥離検査
PD-1	12	M	○
PD-2	8	M	○
PD-3	17	M	○
PD-4	20	M	○
PD-5	13	M	○
PD-6	15	M	○
PD-7	13	M	○

表2 多指症軟骨細胞シートの細胞数

細胞ID	細胞数 ($\times 10^4$ cells/sheet)	生細胞率(%)
PD-1	239.8	98.2
PD-2	376.2	95.8
PD-3	225.5	98.6
PD-4	246.4	92.0
PD-5	198.6	99.4
PD-6	204.6	94.1
PD-7	195.8	97.8
平均 \pm SD	239.0 \pm 96.8	96.8 \pm 2.6

CD45、間葉系細胞に発現する CD81 および結合組織や一部幹細胞など広く発現が認められる CD90 の細胞表面への発現をフローサイトメーターにより解析した（図1）。多指症軟骨細胞シートの各マーカー陽性細胞率は、平均で CD31 (0.22 \pm 0.21%)、CD45 (0.42 \pm 0.48%)、CD90 (99.71 \pm 0.19%)、CD81 (99.78 \pm 0.23%) で、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31 および CD45 陰性、CD81 および CD90 陽性であることが確認された。

D. 考察

本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートを膝軟骨損傷の治療に用いることを目標としている。移植する細胞シートの品質の指標として評価すべき項目は、ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第 0912006 号)や、関節軟骨再生に関する評価指標(薬食機発 1215 第 1 号)等で示されており、細胞数、生存率、細胞の純度試験は基本的な試験項目として挙げ

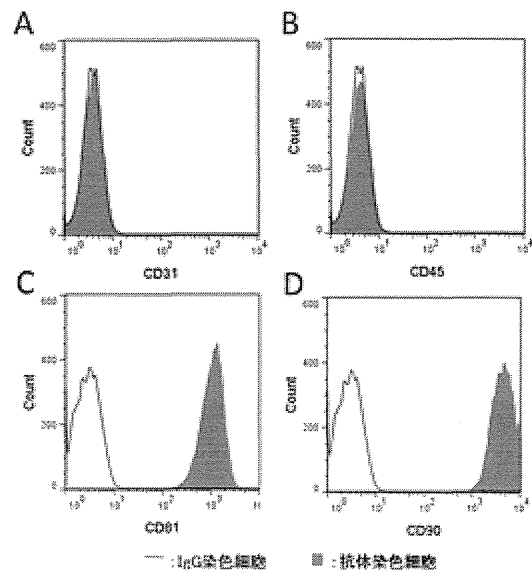


図1. 多指症軟骨細胞シートと成人膝軟骨細胞シートの各マーカー発現
 A)CD31 B)CD45 C)CD81 D)CD90

られている。また、細胞シートの軟骨修復促進メカニズムとして、関節液中のカタボリックファクターから軟骨損傷部位を保護することや、細胞シートから産生される TGF β などの寄与があると考えており、移植する細胞シートの細胞数、生細胞率は、細胞シートの有効性に関与する重要な因子であると考えられる。

これらの評価項目の基準を考えるうえでは、臨床研究により有効性が示された成人膝軟骨細胞シートの特性評価から得られている知見が一つの指標となると考えられることから、多指症由来軟骨細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すかどうか解析をおこなった。

多指症軟骨細胞からは、全例のドナーから剥離可能な強度をもつシートを作製することができ、多指症軟骨細胞シートには軟骨損傷部を保護する機能が期待できる。ま

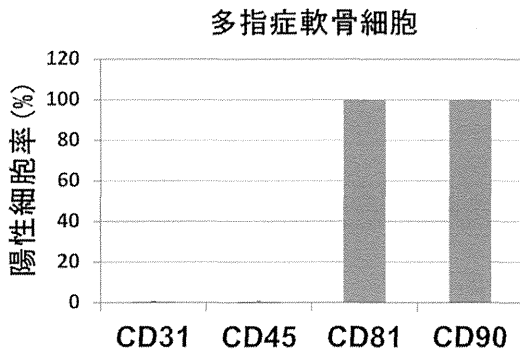


図2. 多指症軟骨細胞の陽性細胞率 (n=7)

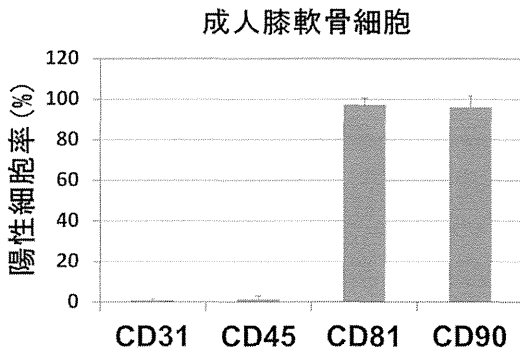


図3. 成人膝軟骨細胞の陽性細胞率 (n=8)

た、自己軟骨細胞を用いた臨床研究で成人膝軟骨細胞シートを構成する細胞数の平均値は、 2.3×10^6 cells で、生細胞率は 93% であったことから、多指症細胞シートに含まれる細胞数および生細胞率は成人膝軟骨細胞シートと同等であり、トロフィックファクター産生に寄与しうる細胞が同程度含まれることが確認された。今後、細胞シートあたりのトロフィックファクターの産生についても、成人膝軟骨細胞シートと同程度の能力を持つのか、明らかにする必要がある。また、細胞の純度の指標となる各種マーカーの陽性細胞率の検討では、血液細胞、内皮細胞に発現する CD31、白血球共通抗原である CD45 の陽性細胞率は 1% 以下で、

血球系細胞の混入はほぼないと考えられた。間葉系由来細胞に発現する CD81 および結合組織などに広く発現する CD90 の陽性細胞率は 99% であり、これらのマーカーの発現では、多指症軟骨細胞シートは成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すことが確認された。CD81 および CD90 は、成人膝軟骨細胞シートでドナー間でのばらつきがほとんどなく発現を認めたマーカーであったことから、これらのマーカーの発現は、細胞シートの評価指標として最低限満たすべき必要条件と考えられる。しかし、CD81 および CD90 の発現と細胞シートの有効性との関係は明らかではないため評価指標として十分条件とはいえず、有効性と相関するサロゲイトマーカーを同定することが今後の課題である。

E. 結論

多指症軟骨細胞シートは、細胞数、生存率、CD31、CD45、CD81 および CD90 の発現パターンで、成人膝軟骨細胞シートとほぼ等しい特性を示すことを確認した。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書
なし
2. 論文発表
なし
3. 学会発表

- 1) 豊田恵利子, 佐藤正人, 鵜養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. マイクロアレイを用いた多指症軟骨細胞と成人膝軟骨細胞の特性比較. 第28回日本軟骨代謝学会（東京, 2015.3）
- 2) 豊田恵利子, 佐藤正人, 岡田恵里, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. 多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析. 第14回日本再生医療学会総会（横浜, 2015.3）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

同種細胞シートの保存法に関する研究

研究分担者 長嶋 比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授

研究協力者 前原 美樹 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・研究員

研究要旨：今年度は、これまでに開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の改良として、(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価を行った。その結果、(1) 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、非積層化シートに有効であり、特に非積層化細胞シートでは前処理時間の大幅な短縮が可能であること、(2) アルミフィルムでパッケージングされたガラス化細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約 -150°C)、液体窒素中(-196°C) いずれの保存状態にも耐え得ること、(3) 市販ガラス化液の使用によって、自家作製液と同等の成績が得られること、(4) 細胞シートの長期安定保存が可能であること、などが示された。

A. 研究目的

これまでに開発した細胞シートガラス化保存法の適用拡大と改良を目的として、以下の項目について実験を行った。

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価

B. 研究方法

1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞((株)コスモバイオ)を温度応答性培養皿(35mm, UpCell®, CellSeed)に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/dishの濃度で播種し、20% FBSを添加したDMEM/F12培地(GIBCO)で培養した。培養3-4日目に細胞がコンフルエントに達したことを確認して、10%FBSおよび $100 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸を添加したRPMI1640培地(GIBCO)に置き換えた。培養14日目に薄層(1層)形成を確認し、実験

に用いた。2層もしくは3層化細胞シートを実験に供する際は、得られた単層シートをCell shifter (CellSeed)を用いて積層化した後、更に1週間追加培養した。

2. 細胞シートの凍結保存および融解

既に開発したガラス化法を用いた(Maehara et al., 2013)。これは、胚や卵子のガラス化に用いられるMVC法(Kuwayama et al., 2005)のコンセプトを細胞シートに適用したものである。

細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には10% DMSOおよび10% Ethylene glycol (EG)を用いた。ガラス化液のDMSOおよびEG濃度は、それぞれ20%とし、細胞非浸透性凍害保護剤として0.5M sucroseおよび10% (w/v) カルボキシル化ポリリジン(COOH-PLL)を加えた(自家作製液)。

細胞シートをパッケージング素材に収容し、液体窒素蒸気(-150°C)に暴露してガラス化し