

- puled laser irradiation. The TERMIS-Americas 2013 November 10-13, 2013 Atlanta/USA
- 7) Ishihara M, Sato M, Kikuchi T, et al : Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of the biomechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Engineering* **11** (7-8) : 1234-1243, 2005
- 8) <http://cellsheets.med.tokai.ac.jp/index.html>
- 9) Yao J, Wang LV : Photoacoustic tomography : fundamentals, advances and prospects. *Contrast Media Mol Imaging* **6** : 332-345, 2011
- 10) Wang LV, Hu S : Photoacoustic tomography : *in vivo* imaging from organelles to organs. *Science* **335** : 1458-1462, 2012
- 11) 石原美弥 : 光音響画像の現状. 電気学会論文誌 C, 電子・情報・システム部門誌 **132** (8) : 1287-1290, 2012
- 12) <http://essay.utwente.nl/64336/>
- 13) Rajan J, Shao X, Chamberland D, et al : Characterization and treatment monitoring of inflammatory arthritis by photoacoustic imaging : a study on adjuvant-induced arthritis rat model. *Biomed Opt Express* **4** : 900-908, 2013

石原 美弥 (Miya Ishihara)

1994年 慶応義塾大学大学院理工学研究科修了

1996年 防衛医科大学校 助手のち准教授

2011年 同 教授

学会活動 :

日本レーザー医学会理事, 日本分子イメージング学会理事,

日本生体医工学会代議員, SPIE Bios Program committee,

Editorial Board of Photoacoustics

2002年 The 5th The Tissue Engineering Society International, Best Oral Presentation

2005年 日本エム・イー学会 荻野賞

2010年 長寿科学振興財団 会長賞



再生医療の細胞培養技術と産業展開

【第5編 応用研究ビジネスプラン】

第27章 関節軟骨治療研究

菊地鉄太郎¹⁾，佐藤正人²⁾

1) ㈱セルシード CMC 開発部 主任研究員

2) 東海大学 医学部 外科学系 整形外科学 教授

第27章 関節軟骨治療研究

菊地鉄太郎*¹, 佐藤正人*²

1 はじめに

軟骨とは、軟骨細胞とそれを取り囲む基質からなる支持器官であり、血管、神経、リンパ管を欠く組織である。膝関節軟骨の機能としては、荷重分散性、低摩擦性が求められ、この機能に何らかの障害が起きると関節症となる。その中で関節痛を伴う変形性関節症患者の割合は特に高い。変形性膝関節症とは、肥満、加齢、遺伝、職業、スポーツ、外傷などを原因とした、関節軟骨がすり減り、痛みを伴う疾患であり、疾病の程度により初期、中期、末期の3段階に分かれる。65歳以上の成人の約50%が多少なりとも変形性関節症に罹患しているとされ、高齢化に伴い誰もがかわりそうな疾患の一つと考えられている。これを受け、日本整形外科学会では2007年にロコモティブシンドローム（運動器症候群, Locomotive Syndrome）という概念を提唱し、特に高齢者において要支援・要介護に至る前の健康寿命をいかにして長く保つかという視点から、骨、関節、筋肉などの各器官の機能低下だけでなく、全身的な協調性に着目して予防啓発を行っている。

このように多くの患者がおりながら、変形性関節症の根本的な治療法は未だ確立されていない。実際に、治療現場では痛みを消炎鎮痛剤で抑え、関節内に直接ヒアルロン酸注射することで軟骨表面の滑りを改善することを行っているに過ぎない。消炎鎮痛剤、ヒアルロン酸を投与し続け、病状の進行をいかに阻止するか、最終手段である人工関節置換術までの期間をいかに延ばせるかが焦点となっているだけなのである。

本章では、新たな関節軟骨再生治療法の開発を目的に、これまで行われてきた軟骨細胞による膝関節軟骨治療、並びに我々が精力的に研究開発を進めている従来技術では困難であった上記変形性関節症も治療可能と期待される軟骨細胞シートによる膝関節軟骨治療について概説したい。

2 培養軟骨細胞移植

人間の体には様々な種類の軟骨があり、化学組成や構造、機械的強度などが異なる。関節軟骨はその中でも硝子（しょうし）軟骨と呼ばれるもっとも硬く丈夫な軟骨である。また、その表面は極めて潤滑性がよく、滑らかな関節の動きを実現している。関節軟骨のこれらの優れた機械的性質はやプロテオグリカンなどの含水性の生体高分子からなる微細構造に支えられている。

* 1 Tetsutaro Kikuchi (株)セルシード CMC開発部 主任研究員

* 2 Masato Sato 東海大学 医学部 外科学系 整形外科学 教授

一般に成長を終えた軟骨組織は自己修復能が低いと言われている¹⁾。一つの原因は軟骨細胞が軟骨基質に覆われているため、損傷部へ移動して修復することが難しいことがあると考えられる。また、軟骨組織が無血管であるため再生を担う未分化な細胞も供給されない。実際、軟骨の欠損部に血液や骨髄液を導入することで線維性の組織による修復が起こることが知られている。しかしながら、この方法によって修復された組織には正常な関節軟骨のような強度や潤滑性のない線維軟骨と呼ばれる状態となる。軟骨組織の修復を担う細胞として、軟骨の表層を覆う軟骨膜の細胞が知られているが、大きな軟骨欠損は修復することができない²⁾。

こうした中で、体外で培養した軟骨細胞を軟骨欠損部に補充することで修復能力を強化しようというのが細胞を利用した培養軟骨移植治療である。細胞を用いた再生医療が提案されて以来、軟骨細胞を用いた関節軟骨再生の試みが継続的に行われ、1994年にはBrittbergらによって臨床研究の結果が報告されている^{3,4)}。同報告の手技では関節軟骨の非荷重部から採取した軟骨細胞を体外で増殖させ、さらに健常な脛骨から骨膜を欠損部の大きさ分採取して、その骨膜で被覆した軟骨欠損部に懸濁液の形で充填している。この手法は自家軟骨細胞移植 (Autologous Chondrocyte Implantation; ACI) として確立し、1995年にはGenzyme社でCarticel[®]として製品化されている。その後、細胞のみではなく生体吸収性材料を組み合わせることで軟骨様組織が体外で培養できることがわかり、生体吸収性の細胞足場材料を用いた移植方法が多く試みられ、日本では2012年に(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社がジャック[®]として軟骨細胞をアテロコラーゲンゲル中で培養した組織工学製品の製造販売承認を取得している^{5,6)}。しかしながら、骨膜を使用することには変わりはない。

3 軟骨細胞移植の課題

3.1 軟骨細胞の培養と脱分化

軟骨細胞は生体内ではほとんど分裂しないが、軟骨片の酵素処理により細胞のみを単離すると血清添加培地によって培養皿上で増殖させることができる。培養皿上で増殖させた軟骨細胞は関節軟骨基質 (II型コラーゲンやプロテオグリカンなど) の産生を停止し、線維芽細胞様に変化する (脱分化)。同様の現象は他の細胞でも見られ、組織の損傷があった時にすみやかに必要な細胞数まで分裂し、その後組織を再構築するために再び元の形質を取り戻す (再分化) という組織修復機構の一部であると考えられる。実際、脱分化した軟骨細胞は分化誘導因子の添加や三次元培養などによって再分化させる (関節軟骨基質の産生能力を取り戻す) ことができる。しかしながら、一般的に軟骨細胞では脱分化が進行するにしたがって再分化する能力が徐々に失われる。再分化する能力が失われた軟骨細胞は移植をしても関節軟骨のような硝子軟骨は形成せず、線維性の組織 (線維軟骨) を形成する。よって、必要な細胞数を得るために増殖培養をすることと硝子軟骨を形成する能力を保つこととはトレードオフとなり、軟骨細胞を体外培養する際の最も大きな課題となっている。さらに、このような増殖能力や再分化能力はドナーの年齢や動物種によっ

て大きく異なるため、様々なドナー条件で培養工程を検証する必要がある。特に動物実験の結果のヒトへの外挿については留意が必要である。実際、RobertsらはACIを受けた患者の内、主に硝子軟骨が再生した例が22%、硝子軟骨と線維軟骨の混合が48%、主に線維軟骨であった例が30%であったと報告している⁷⁾。

3.2 対象疾患と適用拡大

関節軟骨再生治療のターゲットとなりうる関節軟骨損傷は主に①外傷、②離断性骨軟骨炎、③関節リウマチ、および、④変形性膝関節症の4つに分けられる(表1)。現在のところ細胞移植による再生治療が行われているものはほとんどが①外傷または②離断性骨軟骨炎に限られる。③関節リウマチでは関節炎による軟骨破壊が主な機序であるため炎症の原因(自己免疫疾患の一種と考えられている)をコントロールできない限り、軟骨の修復のみでの症状の回復は困難であると考えられる。④変形性関節症についても加齢や関節の不安定性が原因となるため、軟骨の修復の

表1 関節軟骨再生治療の対象疾患

疾患	主な原因	軟骨損傷の様式	治療方法
外傷	<ul style="list-style-type: none"> ・交通事故 ・労働災害 ・スポーツ事故 	<ul style="list-style-type: none"> ・局所的な全層剥離またはクリアカットのPartial Thickness Defect 	<ul style="list-style-type: none"> ・整復固定(生体吸収性のピンなど) ・除去術(剥離した骨軟骨片の除去) ・移植術(骨軟骨移植, 細胞移植) ・骨髓液誘導
離断性骨軟骨炎	<ul style="list-style-type: none"> ・外傷 ・スポーツ(繰り返し負荷; 野球肘など) ・先天性要因 	<ul style="list-style-type: none"> ・軟骨下組織の壊死により、軟骨が部分的に剥離する ・15~20歳の成長期に多い ・大腿骨遠位端の内側顆に多い 	<ul style="list-style-type: none"> ・整復固定(生体吸収性のピンなど) ・除去術(剥離した骨軟骨片の除去) ・移植術(骨軟骨移植, 細胞移植) ・骨髓液誘導
慢性関節リウマチ	<ul style="list-style-type: none"> ・自己免疫疾患 ・ホルモンバランス ・自律神経失調 	<ul style="list-style-type: none"> ・関節炎(滑膜炎)による軟骨破壊 ・20~30歳代, 50歳前後の女性に多い ・全身性の炎症 	<ul style="list-style-type: none"> ・食餌療法, 理学療法 ・抗炎症剤, 鎮痛剤, 免疫抑制剤 ・手術療法(滑膜切除, 人工関節)
変形性膝関節症	<ul style="list-style-type: none"> ・加齢・肥満 ・スポーツ ・アラインメントの異常 	<ul style="list-style-type: none"> ・初期: 軟骨表面のすり減り ・末期: 関節軟骨の広範囲損傷 ・高齢の女性に多い 	<ul style="list-style-type: none"> ・人工関節(TKR, UKA) ・骨切り術(HTOなど) ・除去術(Debridement, 半月板除去, 滑膜除去) ・関節内注射 ・抗炎症薬(内服)

みで回復が見込める例は限られている。また、これらの疾患では比較的広範囲の損傷となることが多いため従来の手技で細胞を移植することが困難であるという課題もある。一方で、対象となる患者数は①外傷や②離断性骨軟骨炎が全国で数千人程度であるのに対し、③関節リウマチは60～70万人（『関節リウマチの診療マニュアル（改訂版）診断のマニュアルとEBMに基づく治療ガイドライン』、厚生労働省研究班）、④変形性膝関節症は2,500万人⁸⁾と推定されており、後者への適用拡大ができれば大きな進歩となる。一つの戦略としては薬物や従来の治療法との組み合わせ治療が考えられる。

適用拡大についてはもう一つ、より軽度の患者への適用が考えられる。現在の軟骨細胞移植治療は軟骨採取と細胞移植の2回の外科手術（Open surgeryまたは関節鏡手術）が必要である。移植方法の改善や他家細胞を用いることで侵襲性を低減することができれば、より軽症例への適用が可能となる。特に変形性膝関節症については初期の軽度の軟骨損傷が基点となって時間とともに症状が進行することが多いため、初期に治療できればその後の悪化を予防できる可能性がある。課題としては、初期の軟骨損傷は軟骨下骨が露出しない軟骨表面の剥離や毛羽立ち（partial thickness defect）であるため、通常の懸濁液やスキャフォールドでの移植が難しいことと、一般に初期は、レントゲンやMRIでの評価が困難であること、さらに自覚症状が軽微であることも多く、受療率が低いことなどが挙げられる。

3.3 臨床における複合的要素と成績評価

前述したように軟骨組織自体には血管や神経がない。このことは軟骨損傷時の炎症形式が特殊であることを示唆する。多くの組織では損傷時に出血を伴い、これが主に炎症を惹起し組織修復の基点となる。また一方で末梢神経が直接損傷されるか、または、炎症を認識し、疼痛が発生する。ところが関節軟骨の損傷では出血がないため急激な炎症が起こりにくい。また、神経がないため疼痛も発生しない。激しい炎症や疼痛が発生するのは、炎症や力学的負荷が軟骨以外の骨や靭帯、関節包などの組織に及んだ時である。このことは軟骨修復の効果を評価する上で重要な課題である。なぜならば軟骨組織の修復そのものは疼痛などの患者の自覚症状に影響しにくいからである。しかしながら関節軟骨組織が十分に修復できなければ、関節への負荷が軟骨や周辺組織を徐々に破壊していく可能性がある。よって、関節軟骨修復の評価には運動機能検査や問診のみではなく、直接に軟骨修復を評価する必要がある。特に硝子軟骨か線維軟骨を正確に判別するには生検による病理組織学的診断を要する。また、関節修復の影響が上述のように緩徐に関節破壊へ繋がるのが考えられるため、長期的なフォローアップも必要である。

関節軟骨再生の目的は長期的な日常生活動作（Activities of Daily Living; ADL）の維持である。この点においては従来の治療法との関係性を考慮する必要がある（表2）。関節治療におけるもっとも大きな進歩は人工関節置換術にあると言える。当初は長期の耐久性・安定性に課題があったもの、材質などの改良により実用年数は少しずつ伸びてきており、重度の変形性関節症においては標準的な治療のひとつとなっている。変形性関節症の詳細な機序は不明な部分もあるが、

表2 従来の関節治療の概略

原理	主な手技	主な適用	関節軟骨への影響
切除術	・滑膜切除 ・Debridement (軟骨部分切除) ・半月板切除	・関節炎 ・関節軟骨損傷	・炎症の原因を取り除くことにより、軟骨変性の進行を予防
抗炎症作用	・ステロイド剤 ・NSAIDs ・ヒアルロン酸 ・持続洗浄	・関節炎 ・関節痛	・炎症を抑制することにより、軟骨変性の進行を予防
骨髄刺激法	・Drilling ・Abrasion法 ・Microfracture法	・関節軟骨欠損	・軟骨欠損部の軟骨下骨を部分的に破壊し骨髄からの間葉系細胞を誘導し、欠損部の修復を促進する。
アライメント修正	・骨切り術 (HTOなど)	・変形性関節症	・関節軟骨への負荷の軽減
人工関節	・関節全置換 ・関節部分置換	・変形性関節症	・人工物により軟骨を含む関節機能を代替
骨軟骨移植	・同種骨軟骨移植 ・自家骨軟骨移植 (Mosaic plastyなど)	・関節軟骨欠損	・荷重部の軟骨組織を修復可能 (ただし、同種組織は凍結保存により軟骨細胞が死滅しているため効果は劣る)。

外傷による関節の損傷やアライメントが危険因子となることから軟骨への過剰な負荷が原因の一つと考えられる。このことから、関節軟骨再生治療は関節軟骨への負荷を減らすための様々な修復術と組み合わせて行うことが必要であり、臨床適用を考える上では、どのような症例に対し、どのような修復術と組み合わせるかを検討する必要がある。またこの場合、臨床試験においては、組み合わせた修復術の効果と再生治療の効果を分離して評価することが求められる。

4 関節軟骨再生治療における新しい技術

4.1 軟骨細胞の培養・移植技術

軟骨細胞の培養技術上の最大の課題は脱分化の抑止と硝子軟骨形成能力の維持である。これまでに遺伝子操作を用いずに硝子軟骨形成能力を維持したまま軟骨細胞の増殖させる、決定的な方法は開発されていない。しかし、培養条件の最適化により軟骨細胞のポテンシャルを最大限に引き出すことは行われている。特に、スキヤフォールド (細胞足場材料) を用いた三次元培養により脱分化を抑制する方法が多く試されている。越智らが開発したアテロコラーゲンゲル中で軟骨細胞を培養する方法では、従来の単層培養法に比較して軟骨基質 (II型コラーゲンやコンドロイチン硫酸) の産生量が高く保たれる^{6,9)}。また、硝子軟骨を形成するための別のアプローチとして、

いくつかの分子マーカーを用いて硝子軟骨形成能力を品質管理したChondroCelect[®]という製品が2009年に欧州で販売承認を得ている。

スキャフォールドは移植手技の改善にも寄与する。この目的ではゲルではなくコラーゲン膜を用いている例が多い。これには軟骨欠損部を骨膜で覆う代わりにコラーゲン膜で覆う方法¹⁰⁾と、コラーゲン膜に直接軟骨細胞を播種して移植する方法がある¹¹⁻¹³⁾。後者の方法では、軟骨欠損部の形状に合わせて軟骨細胞を播種したコラーゲン膜を切り抜き、フィブリン糊などで固定する。懸濁液やゲルを使用する方法に比較して初期強度が強いメリットがある。そのほかに生体吸収性のポリグリコール酸メッシュなどの合成高分子材料も検討されている¹⁴⁾。スキャフォールドには移植部からの細胞の流出を防ぐ効果もある。これらの方法が従来のACIの手技に対してより高い関節軟骨修復効果があるかどうかはまだ十分に検証されていないが、移植時間の短縮や侵襲性の低減、骨膜移植による合併症の防止などに効果があるとみられている^{15,16)}。

4.2 積層化軟骨細胞シート

一方、我々は家兎やミニブタを用いた基礎的研究から軟骨の修復・再生におけるホスト（レシピエント）側の細胞とドナー側の細胞との相互作用の重要性を確認し、組織修復・再生に必要な最小限の軟骨誘導イニシエーター（組織工学的軟骨）があれば、ホスト側の細胞が主導的に修復促進することを見出した。また、変形性関節症の初期にみられる関節軟骨表面の毛羽立ち（fibrillation）程度の場合でも、軟骨の強度と潤滑に重要な役割を担っている軟骨基質の変性がみられることから、軟骨基質の流失や関節液内のプロテアーゼなどによる軟骨基質の分解を防ぐことで軟骨破壊の進行を抑制することができるのではないかと考えた。このような発想から我々は積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨再生治療を提唱している。

細胞シートは東京女子医科大学の岡野らによって開発された技術で、温度応答性培養皿を用いて培養中に産生された細胞外基質や細胞膜タンパク質を維持したまま細胞をシート状に形成したものである¹⁷⁻¹⁹⁾。この技術によれば、温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）（図1）がナノスケールの厚さで均一に固定化された温度応答性細胞培養基

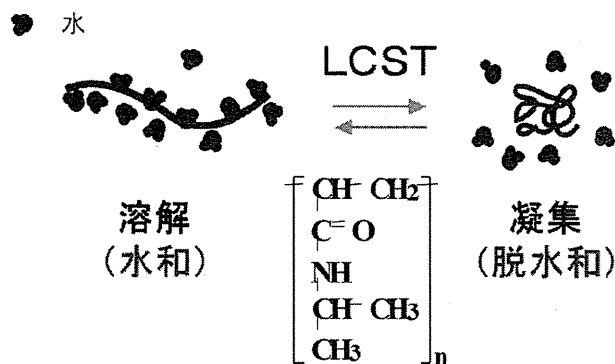


図1 温度応答性ポリマー（ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm））

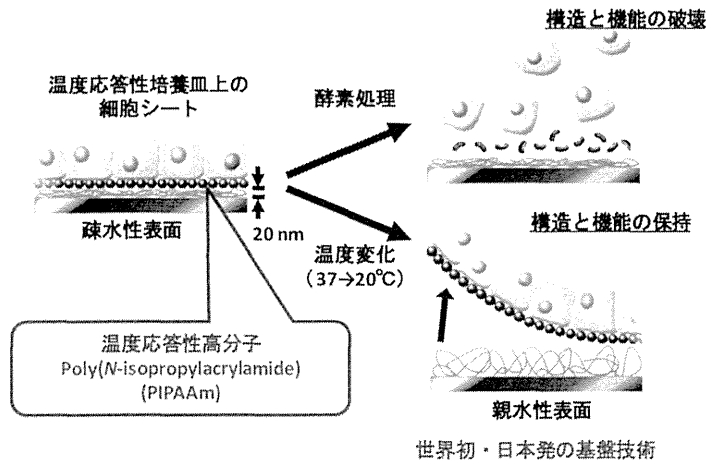


図2 細胞シート工学の基本概念

材上でコンフルエントになるまで培養した細胞は、温度を下げるだけでシート状に剥離させられる（図2）。細胞を基材上で培養すると、細胞はフィブロネクチンやラミニンなどの接着タンパク質を分泌して細胞外マトリックスを形成させながら基材表面に接着する。これまで、培養した細胞は、蛋白酵素、EDTAなどを用い基材-細胞間のタンパク質を化学的に破壊させる方法、或いはラバーポリスマンを用い基材-細胞間のタンパク質を物理的に破壊させる方法でしか基材表面から剥離させられなかった。本基材を用いれば、こうした操作が全て不要となり、温度を変えるだけで培養した細胞を剥がせるようになる。本基材から回収した細胞シートは、化学的、物理的にも損傷を受けておらず、細胞自身が分泌した接着性タンパク質をそのまま保持しており、生体組織にも速やかに付着することができる。本基材から得られる細胞シートは、従来の技術では得られなかったような高付着性で高活性なものとして得られ、しかも生体組織に極めて良好に生着する。また、細胞シート同士を積層化すれば組織化することもでき、今後の再生医療技術の展開のためのプラットフォーム技術と位置付けられている。この細胞シート工学を駆使し、東京女子医科大学ではこれまでに多くの臓器に対する再生医療技術が開発され、実際に角膜、食道、心臓、歯周などの各疾患に対しては東京女子医科大学、および関連大学においてヒトへの臨床研究、治療が世界に先駆けて始めている（図3）。

そのような中で、我々は温度応答性細胞基材を利用した細胞シート工学に着目し、自家軟骨細胞をシート化することに成功し、さらにその軟骨細胞シートを積層化することで軟骨様組織を作製することに成功した。得られた積層化軟骨シートは優れた組織修復・再生能、組織接着能を有しており、変形性膝関節症に対する根治治療の再生医療製品として大いに期待される（図4）。我々はこの手法を用いて軟骨細胞シートを作製し、軟骨損傷を治療する方法を検討した結果、細胞シートを積層化することにより、単層細胞シートと比べてCol2・fibronectin・Sox9・HAS2などの軟骨再生に重要な遺伝子の発現が上昇することや、動物モデルにおいて軟骨欠損に積層化細

再生医療の細胞培養技術と産業展開

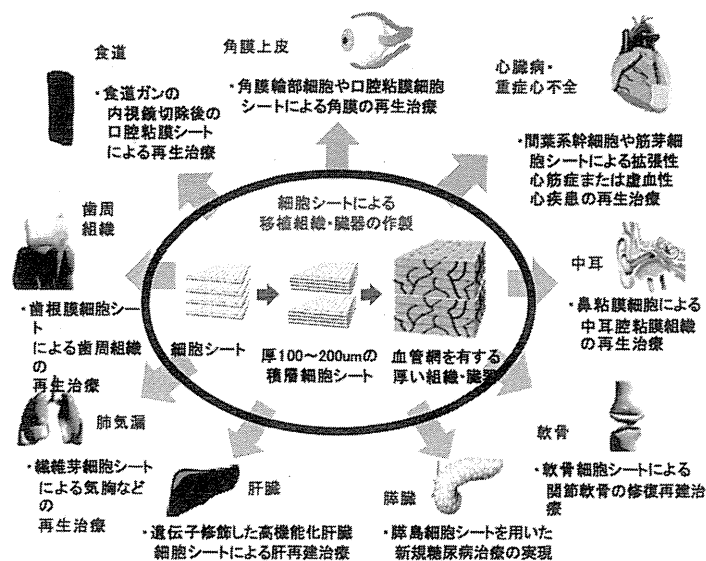


図3 細胞シート再生医療の研究例

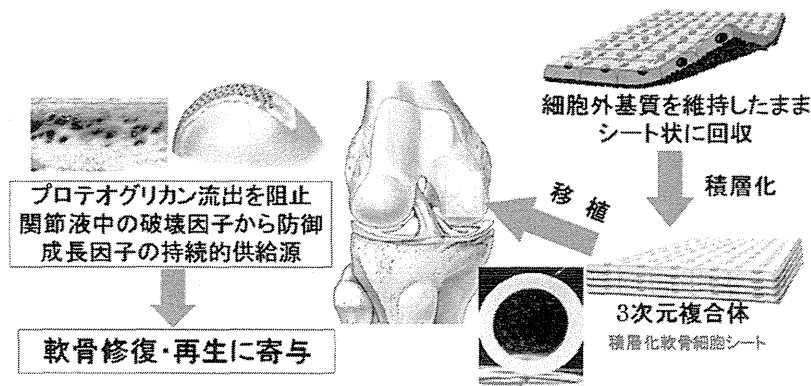


図4 軟骨細胞シートによる膝軟骨再生医療

胞シートを移植することで良好な修復再生が生じることを確認した²⁰⁻²³⁾。また、軟骨組織と同時に採取可能な滑膜細胞との共培養を行うことにより、軟骨細胞単独で培養するよりも短期間で軟骨細胞シートを作製可能であることも見出した²⁴⁾。軟骨細胞シートによる軟骨再生治療は従来の軟骨細胞移植と異なり、骨膜などによる被覆が必要なく、欠損部に直接貼付することができる。また、軟骨基質の流失や分解酵素による軟骨の変性を防ぐバリア効果があるため、従来は修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷（軟骨下骨に至らない軟骨表層の欠損）に対しても有効であった。ミニブタを用いた実験では、全層欠損と部分欠損の双方に効果があることを確認している。東海大学では、佐藤らがこの積層化軟骨細胞シートによる再生医療を早期に実現すべく、骨軟骨

損傷治療を対象としたヒトへの臨床研究実施について2011年2月に東海大学内倫理委員会の承認、2011年10月には厚生科学審議会科学技術部会の承認を得て、現在までに8人の患者へ移植し、全例において良好な経過を得ている。

上述のように、変形性膝関節症の初期から中期に見られる軟骨部分欠損に関しては、従来有効な治療法がなく、積層化細胞シートからなる3次元複合体による新規治療法が確立されれば、軟骨の変性抑制効果、変形性膝関節症の進行遅延、防止が期待でき、まさに画期的な治療法となる。

4.3 幹細胞・前駆細胞の利用

前述のとおり、少量の軟骨組織から採取できる軟骨細胞の硝子軟骨再生能力は限られている。また、自家軟骨細胞移植では軟骨組織採取手術が必要である。このようなことから、より採取が容易で増殖能力があり、軟骨細胞へ分化可能な幹細胞・前駆細胞の利用が検討されている。最もよく検討されている細胞は骨髄由来の接着性細胞である骨髄間質細胞（Mesenchymal Stromal Cell; MSC）である。骨髄を細胞培養用ディッシュで培養するとごく一部の細胞が接着、増殖する。この細胞からは骨、軟骨、靭帯、筋肉、脂肪などの間葉系細胞を分化誘導することができるため骨髄間葉系幹細胞とも呼ばれる。また、骨髄間質細胞からは内胚葉由来の肝細胞や外胚葉由来である神経細胞も分化誘導することができる^{25,26)}。骨髄液は局所麻酔による骨髄穿刺で採取可能であり、軟骨組織よりも採取の侵襲性が低い。また、限界はあるものの軟骨細胞への分化能力を保ったまま増殖培養が可能である。骨髄間質細胞を軟骨欠損部に移植した例では軟骨の修復が促進される結果が得られている^{27,28)}。また、培養時の軟骨細胞への分化や軟骨組織の形成を促進する効果のある成長因子を加える試みも行われている^{29~31)}。ただし、三次元培養などにより体外で軟骨組織を作製する方法はまだごく小さな組織でしか確立していない。その他の組織幹細胞としては滑膜由来細胞³²⁾や脂肪由来細胞³³⁾、骨格筋由来細胞^{34,35)}などが報告されている。また、胚性幹細胞（Embryonic Stem Cell; ESC）や人工多能性幹細胞（induced-Pluripotent Stem Cell; iPSC）を用いた方法^{36,37)}、Direct reprogrammingを用いた方法³⁸⁾も報告されている。

4.4 他家細胞の利用

自家軟骨細胞移植では患者本人の軟骨組織を採取する必要がある。また、軟骨細胞のポテンシャルはドナーによって様々であるから、患者によっては十分な品質の軟骨細胞を得られない可能性がある。このような課題を解決するために、他家細胞の利用が考えられる。他家細胞移植の大きな課題は細胞の入手と拒絶反応であるが、感染症の問題や保存方法の問題もある。細胞入手の問題は社会的な側面が強く、同種の組織が入手しやすい米国などに比べると日本での実現にはかなりのハードルがあり、法整備や社会的合意の形成が必要である。一方、拒絶反応については骨・軟骨では古くから経験的に同種移植が行われており、免疫抑制剤を使用しなくとも生着する可能性は高いと予想される。我々も将来的な発展を考慮して、軟骨細胞シートの細胞源として同種軟骨細胞の検討を行っている。軟骨細胞シートの保存法に関しての特許も出願し、臨床の場で待機

期間なく、すぐに使用可能なレディメイドの同種細胞シートによる再生医療の実現に向けた準備を行っている。今後、安全性と免疫応答に関する詳細なデータを蓄積していく必要がある。

4.5 関節軟骨の評価技術

従来、軟骨修復の検査は関節鏡視下の肉眼所見やレントゲン、生検による病理組織検査が主であった。しかし、多くの臨床研究では侵襲を避けるため生検が行われていないため、再生した軟骨が硝子軟骨か線維軟骨を評価できていなかった。近年、高磁力のMRIの導入により、軟組織のコントラスト分解能が向上し、関節軟骨の変性についても評価できるようになってきた^{39,40)}。MRIによる評価は非侵襲であるため、移植後の長期のフォローアップ評価に有用と考えられる。また、関節鏡視下で軟骨の粘弾性を計測できるシステムが開発されており、生検の一部を代替できる可能性がある^{9,41)}。

5 おわりに

関節軟骨は極めて我慢強い。特に膝関節や股関節などは、歩行のたびに日々何千回という負荷を受けながらも何十年もその機能を維持しているのであるから、驚くべき耐久性である。それでも関節の不安定性による局所的な過負荷や持続的な炎症にさらされることにより、少しずつ変性・破壊が進んでいくと考えられている。一方、軟骨は痛みを感じる神経がなく、いわば「物言わぬ組織」である。かなりの損傷を受けるまでは自覚症状が生じない。そのため、気づいた時にはすでに重症化し修復が困難な場合が少なくない。再生医療の理想はこのような高度に損傷した組織を魔法のようにきれいに再生することではあるが、現在の技術ではまだ遠く及ばない。細胞移植のようなリスクの高い治療は生命にかかわる重篤な症例に用いるべきという考え方もあるが、一方では再生医療の低リスク化・低コスト化により、より軽症例への適用、そして予防的医療への適用を目指すのも一つの道だと考える。その点で今後の軟骨再生治療としては幹細胞や他家細胞などを利用したOff-the-shelf製品の実現へ向けても努力していきたい。

文 献

- 1) A. Newman, *Am. J. Sport. Med.*, **26**, 309 (1998)
- 2) S. K. Bulstra *et al.*, *J. Orthop. Res.*, **8**, 328 (1990)
- 3) P. J. Chesterman *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **50**, 184 (1968)
- 4) M. Brittberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **331**, 889 (1994)
- 5) T. Kimura *et al.*, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **231** (1984)

- 6) M. Ochi *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **84**, 571 (2002)
- 7) S. Roberts *et al.*, *Arthritis Res. Ther.*, **5**, R60 (2003)
- 8) N. Yoshimura *et al.*, *J. Bone Miner. Metab.*, **27**, 620 (2009)
- 9) Y. Uchio *et al.*, *Med. Eng. Phys.*, **24**, 431 (2002)
- 10) G. Bentley *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **85**, 223 (2003)
- 11) W. Bartlett *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **87**, 640 (2005)
- 12) P. Behrens *et al.*, *Knee*, **13**, 194 (2006)
- 13) P. Cherubino *et al.*, *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)*, **11**, 10 (2003)
- 14) D. A. Grande *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 211 (1997)
- 15) D. Goyal *et al.*, *Arthroscopy*, **29**, 1872 (2013)
- 16) B. S. Dunkin *et al.*, *Oper. Tech. Sports Med.*, **21**, 100 (2013).
- 17) I. Elloumi-Hannachi *et al.*, *J. Intern. Med.*, **267**, 54 (2010)
- 18) T. Okano *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243 (1993)
- 19) N. Yamada *et al.*, *Die Makromol. Chemie, Rapid Commun.*, **11**, 571 (1990)
- 20) N. Kaneshiro *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 723 (2006)
- 21) G. Ebihara *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 3846 (2012)
- 22) S. Ito *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 5278 (2012)
- 23) M. Sato *et al.*, *Anat. Rec. (Hoboken)*, **297**, 36 (2014)
- 24) M. Kokubo *et al.*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, (2013)
- 25) B. E. Petersen *et al.*, *Science*, **284**, 1168 (1999)
- 26) G. C. Kopen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 10711 (1999)
- 27) S. Wakitani *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **76**, 579 (1994)
- 28) S. Wakitani *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**, 199 (2002)
- 29) M. Nawata *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **52**, 155 (2005)
- 30) A. A. Worster *et al.*, *J. Orthop. Res.*, **19**, 738 (2001)
- 31) G. Wu *et al.*, *Cell Tissue Bank.*, (2013)
- 32) H. Koga *et al.*, *Cell Tissue Res.*, **333**, 207 (2008)
- 33) F. Guilak *et al.*, *Biorheology*, **41**, 389 (2004)
- 34) R. Kuroda *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **54**, 433 (2006)
- 35) N. Adachi *et al.*, *J. Rheumatol.*, **29**, 1920 (2002)
- 36) S. Uto *et al.*, *Biomed. Res.*, **34**, 281 (2013)
- 37) W. S. Toh *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 6968 (2010)
- 38) H. Outani *et al.*, *PLoS One*, **8**, e77365 (2013)
- 39) R. K. Surowiec *et al.*, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* (2013)
- 40) P. Niemeyer *et al.*, *Am. J. Sports Med.*, **42**, 150 (2014)
- 41) M. Ishihara *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, **38**, 249 (2006)

VI. 班會議 一議事録・発表資料一

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 26 年度 第 1 回班会議

日時：平成 26 年 11 月 6 日（木）14:00～16:00

場所：霞ヶ関ビル 35 階 東海大学交友会館【三保の間】

出席者：光島健二、花井荘太郎、木下奈津美（医薬基盤研究所）

長嶋比呂志、前原美樹、高草木大地（明治大学）

加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

丸木秀行、小久保舞美（東京女子医科大学）

的場亮、平賀育英、伊東紀子（DNA チップ研究所）

橋本せつ子、初岡政典、菊地鉄太郎、高野りや、河毛知子、

佐藤千香子（セルシード）

佐藤正人、豊田恵利子、岡田恵里、白砂早織、渡部綾子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：渡部綾子

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）

私共の厚労科研事業は今年度で 3 年目になり、進捗は順調です。まずは研究事業の概要をご説明いたします。PO の先生方には、本日の資料と議事録を後日お送りいたします。

現在、細胞シートは自己細胞で臨床研究を実施しています。3 層に積層化したものを患部に貼って治すという方法で非常にシンプルな系で行っています。軟骨細胞シートは、動物実験において、軟骨の全損欠損と部分損傷の両方に作用するというのがユニークな点です。世界中で既に行われている軟骨の再生は、全損欠損を対象としているものです。部分損傷の方が治すのが非常に難しいと言われていますが、私共の軟骨細胞シートは、全損欠損と部分損傷の両方に動物実験で効果があることを確認しています。また、臨床研究においても変形性膝関節症に適応していて、そのような患者さんを集めて軟骨の欠損部に対して移植するというような研究をしています。この部分損傷にも効果があった結果は、以前 BBRC の雑誌の紙面で取り上げられました。

各国で承認されている主な再生医療製品ですが、軟骨に限ってもかなり多くのところが

行っています。日本で昨年保険収載されたジャック®も、外傷あるいは離断性骨軟骨炎のものが対象で、変形性関節症は対象外となっています。また世界のこのようなメーカーもほぼ全て外傷の軟骨損傷が対象であって、変形性関節症に踏み込んだものはありません。ジャック®の保険収載の要件設定に際して、整形外科学会で委員会を設置し、どういったものに適応するのかなどの事案を議論しましたが、「外傷性の軟骨欠損、離断性骨軟骨炎（変形性膝関節症を除く）」としっかり明記されていますので、私共の系は決してジャック®と同じではありません。対象疾患が明らかに違うということをご承知いただければと思います。

私共の自己細胞シートのヒト幹細胞臨床研究は、平成 23 年 10 月に厚労大臣の意見書の発布をもって約 3 年間施行しています。対象患者さんは 20-60 歳、対象は外傷または変性（変形性膝関節症を有した患者様も含まれています）により生じた膝関節軟骨損傷で、変形性膝関節症あるいは靭帯損傷で 10 年以上放置して明らかに不安定性が原因で膝関節症が進んでいるような患者様を対象としています。軟骨の欠損が 4.2cm^2 以下という大きさの制限が厚労省との話し合いの中で決められましたが、これは 1 枚の細胞シートでおおえる大きさをまずはやりなさいという事でこの大きさが基準となっています。エンドポイントの根拠は、安全性を見るための有害事象の頻度、術後 1 年までの臨床症状の変化、レントゲン、MRI、さらに私共のユニークな点は術後 1 年で必ず関節鏡でセカンドルックを行って直視下に再生した軟骨の粘弾性特性を超音響法で評価するという事です。その部分のバイオプシーを行い組織学的にもしっかり評価をします。手術は、骨切り術というアライメント矯正あるいは靭帯再建術をして、同時に合併する軟骨損傷に対して細胞シートを移植して、細胞を組織で評価する流れとなります。現在、5cm 程度切開し、直視下に細胞シートを移植しています。移植後 3 ヶ月もすると MRI で新しい軟骨の修復が確認できるようになってきます。大腿骨内課の加重部の軟骨損傷に対して、細胞シートを移植した 1 年後の結果です。上がお皿（膝蓋骨）で下が大腿骨です。お皿と大腿骨が擦れ合う、いわゆる PF 関節と呼ばれる部位は非常に治りにくいという事が従来の軟骨の再生医療では言われていますが、ここもきれいに治りました。先日、ドイツとオランダで講演した際にも、PF 部分の修復効果は非常に注目されました。術後 1 年のバイオプシー時には、再生した軟骨が盛り上がった感じで治っている事が多くあります。プローブで触れたり、超音響法で粘弾性特性を直接評価し、患者様の許可を頂いてバイオプシーを行い評価しています。超音響法の粘弾性特性では、厚さと粘弾性特性比が半定量的に分かり、プローブを変えると組織学的なプロパティの差も測定できます。私共と防衛医大との共同研究で開発したものを使用しています。組織学的にも Type II コラーゲンで濃染され、組織染色のサフラニン O でも強く染まり、明らかに硝子軟骨で再生しているという事を確認しています。現在までに 11 例エントリーし、移植できたのは 8 例となっています。これは大きさの基準の 4.2cm^2 以下に合わなかった患者様 2 例と、1 例は基準細胞数に満たなかったという例がありました。11 月の末に 8 例目の最終の患者さんのセカンドルックでバイオプシーを予定しています。患者立脚型の術後の評価ですが、これは患者さんへの問診で、どういった日常生活に影響が

あるのか、またスポーツアクティビティなどを点数評価したものです。おおむね術後 3 か月以上経つと、ほぼ術前より回復してきています。

こちらは、先日の再生医療学会の市民公開シンポジウムでの 6 例目の患者さんの VTR 紹介です。この患者さんは両膝手術されていて、片方は骨切り術のみでシートの移植には損傷の大きさが対象には合わず、もう片方は 4.2cm² のサイズに適合したので再生の治療を合わせて行いました。全て東海大で手術しています。

自己細胞シートは非常に成績が良いのですが、自分の細胞で治す限り目の前の病変を直ぐに治療できない問題点があります。また、自分の組織を犠牲にするので正常な部分から採取できる大きさには限界があり、また悪くなったときに繰り返し治療を受けることはできません。さらに、必ずしも活きの良い細胞とは言えませんし、高齢者の変形性膝関節症の患者さんでは 7 番染色体のトリソミーや遺伝子異常も頻繁に認める事があるため、そのような細胞を自分の細胞だから自分に戻して良いのかという問題もあります。

私共が現在取り組んでいるのは、同種の軟骨細胞シートです。私共が着目しているのは多指症患者様由来の細胞です。この細胞を 1 度凍結保存して、十分に細胞シートの特性や安全性を評価し、必要な時に培養してシート状にしたものを移植するという事を考えています。将来的には、細胞シートの状態になった所で保存出来ないかと考えています。ヒト幹細胞臨床研究を始めるにあたり、厚労省と細胞ソースを何にするかについて相談しました。多指症由来のもの、地域ごとにあるボーンバンクの骨に付いている軟骨、あるいは既に海外でチップ状にして売られている軟骨を輸入して使用する等の 3 つを提案しましたが、トレーサビリティの観点から、自施設内で得られる手術時に廃棄処分となる多指症の軟骨でという方向に決まりました。

共同研究先である阿久津先生と梅澤先生の国立成育医療研究センター研究所からサンプルをたくさん頂き、安全性のチェックを行いました。36 例以上検討し、多指症の細胞が使えるということになりました。この細胞は非常に良く増えます。あくまで予測値ではありますが、パッセージ 2 (P2) で 2 週間の培養で細胞シート 745 枚分、P3 まで含めると 8000 枚近く 1 本の多指症由来の軟骨から作製できることが分かりました。自分の細胞で治す場合、これまで臨床研究で患者さんに移植できたのは 2-6 枚でしたので、この数値は非常に驚くべき数であると思っています。超免疫不全マウスの NOG マウス皮下に移植して腫瘍化しないこと、また IVIS システムを用いて移植細胞の残存する細胞を観察したところ 21 ヶ月以上関節内に留まって他に転移しないことなど、安全性評価として確認しました。平成 26 年の 8 月 6 日に同種細胞シートのヒト幹細胞臨床研究の承認を得ました。これは 27 年度中に実施予定だったところ、非常に早く安全性の確認ができたので今年度申請し承認を得ています。現在、移植に適した細胞の選定準備に入りました。8 月 16 日の読売新聞の一面でも紹介され、同種細胞シートの臨床研究が始まるという事を取り上げて頂きました。東海大での多指症の手術症例は年間 10 症例程度ありますので、形成外科の先生とタイアップして、院内で協力体制を整えて準備を進めているところです。

私共は、変形性膝関節症は単なる軟骨損傷だけではないので、患者様には O 脚をアライメント矯正し不安定性を治して、同時に軟骨が無い所には移植して治すという方法で行っています。変形性関節症はリウマチまではいきませんが、炎症あるいは血管新生などがあります。こういった変形性関節症にトータルで取り組むという事を考えて、Anti-VEGF の抗体（市販薬）が変形性膝関節症に効果があることを動物実験で確認したところですので、再生医療と一緒に使うことも視野に現在検討している所です。

自己細胞シートは平成 23 年 8 月に承認されて現在 8 例の移植が完了し、有害事象はなく本年 11 月末で 1 年フォローアップが終了して臨床研究を完了する予定です。現在、先進医療として実施するために、病院長、医学部長などの了解を得て学内会議に諮る準備をしているところです。同種細胞シートに関しては、ヒト幹細胞臨床研究として今年度 8 月に承認されて、現在移植に適した細胞の選定作業を開始したところです。

（2）「ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：長期保存の実現に向けての基礎的検討」

研究協力者 前原美樹（明治大学）

私共はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究を担当しています。長期保存の実現に向けての基礎的検討を行いましたのでご報告いたします。研究背景として、軟骨細胞シートの凍結保存が実現することによって、細胞シートの作製と移植時期の調整が容易になる点や、治療用シートのストックが可能になる事で、同種移植の促進が可能になると考えられます。実用的な細胞シートの凍結保存方法の確立が不可欠な課題となっています。

我々は、これまでに細胞シートのガラス化保存に受精卵を凍結保存する技術を応用してきました。対象の細胞に対して、なるべく容量の少ないガラス化保存液で保存する（ミニマムボリュームクーリング）により細胞の生存性が保たれるコンセプトが受精卵の凍結保存法であり、それを細胞シートに応用して研究を進めています。また、ガラス化の効果の非常に高いカルボキシル化ポリリジン（化合物）を用いて、細胞シートのガラス化保存に応用し、これらが細胞シートガラス化保存のポイントとなっています。2011 年に特許出願し、2013 年には BMC Biotechnology で論文が掲載されました。

今年度の取組みとして、実用化に向けた改良研究、実用的な細胞シート凍結保存デバイスの開発、融解した細胞シートの機能解析を行ってきたので報告いたします。実用化に向けた改良研究は、細胞シートをガラス化保存する際のガラス化処理時間について検討しました。これまで 1 枚の細胞シートをガラス化保存するのに、ガラス化保存が完了するまで 45 分と非常に時間が掛かっていたため、操作の簡略化を目的としてガラス化処理時間短縮の検討を行いました。結果、ガラス化処理の時間を約半分の 23 分に短縮しても、細胞シートの生存性を高く保つ事ができることが分かりました。ただし、ガラス化保存状態が不安

定なサンプルも数枚出てきたため、今後は最適な時間の条件検討が必要であると思われました。また、これまで積層化細胞シートを用いて検討してきましたが、より薄いシートを想定して凍結保存方法を応用できるかを検討しました。非積層化細胞シートでも、ガラス化法によって構造が崩れず、生存性も低下することはなく保存できることが分かりました。この実験に関しても、ガラス化の処理時間の短縮の検討を行ったところ、45 分間から 15 分に短縮することが可能でした。

シートの長期保存を目的とした細胞シートのパッケージング素材と保存方法について、食品用ラップフィルムとアルミホイルを用いて液相内での保存による細胞シートの構造変化と細胞生存性について確認しました。予め液体窒素の蒸気で細胞シートをガラス化した後に液体窒素に浸漬する方法（液相内保存）を試しました。液体窒素に浸漬すると、ラップは一部の細胞シートで破損してしまったものがありましたが、アルミはシートが破損することなく保存が可能でした。しかし、アルミでパッケージしても、予め液体窒素の蒸気で細胞シートのガラス化処理をしていないと、液体窒素へ浸漬させた際に破損してしまいました。パッケージングの素材として、アルミホイルが有用であること、予め液体窒素の蒸気でガラス化処理されていれば、液体窒素の気相中、液相中でも保存に耐え得る得る事が分かりました。また、これまで手作業で少量ずつ作製していたガラス化保存液について、今後安定的に大量処理することを想定して、市販のガラス化保存液の効果の比較検討を行ったところ、同等の成績が得られ市販品を使用できることが確認できました。

次に、実用的なガラス化凍結保存デバイスの開発では、凍結保存デバイスの作製を行いました。イメージとして箱型のデバイスを現在作製中で、箱の中に引出し状のラックが複数入るようになっているものです。1つのラックの中に1枚の細胞シートの保存が出来るようになっています。液体窒素のタンクの中に箱ごと収納することができます。タンクの半分程度液体窒素を入れると上部の気相の部分が 150℃くらいに冷却されるので、気相中で細胞シートを大量に保存できるというものを現在開発しています。実物は、来週納品予定となっています。このデバイスが完成することによって、より長期的に細胞シートを保存することが可能となり、長期保存した細胞シートの融解後の機能性評価ということを今後中心に行っていく予定です。

細胞シートの融解後の機能解析についてですが、細胞シートから生産される TGF- β の生産量を測定することによって評価しています。凍結保存後の細胞シートにそれぞればらつきがないということ、WST1 を平行して確認しています。細胞シート融解後の生存性を Live/dead 染色法によって評価しています。現在は非ガラス化細胞シートを用いて条件検討を行っているところです。今後、ガラス化された細胞シートに応用して機能解析の評価を進めていく予定です。

今後の計画として、細胞シートをより長期的に保存することを目標として、加えてガラス化された細胞シートの融解後の機能解析を行っていきます。実用的なガラス化保存装置の開発も視野に入れていきます。最終目的としては、ヒト細胞への応用となります。

<質疑応答>

佐藤：ヒト幹細胞臨床研究で同種細胞シートが承認されましたが、細胞の状態でストックし、それを患者様がいらっしゃった時に3週間かけて培養して移植するというやり方です。明治大学との共同研究は、最終的に細胞シートごと保存するということを目標に行っている研究になります。

光島：確認ですが、ヒト細胞シートはこれからということで、今はウサギの細胞シートということですね。

前原：はい、そうです。

光島：ヒトの細胞シートは薄いので、ウサギの方で3層、2層、単層ということですね。ヒトの場合はやはり3層が基本ということになりますか。

佐藤：そうですね。自己細胞は3層なのですが、同種は自然に重層化してきますが、それでもだいたい3層くらいと考えていいかと思います。

光島：ヒトの細胞シートはいつごろになりますか。もうすぐ取り掛かれる状況なのですか。

佐藤：ヒトのサンプルを他施設に出して実験するには両方の倫理委員会を通したりなどなかなか時間が掛かってしまいます。前原さんは来年度から東海大で研究員として働く事になりますので、そこはスピードアップできると思います。

光島：凍結融解のところですが、前回報告されたと思いますが凍結融解条件の基本はほぼきまったと思ってよいのですか。

長嶋：はい。条件は決まったと思います。当初はほとんどヒト幹の申請段階に入っても凍結したシートは使われるか分からないし、おそらく手作業的に作るものになるであろう。PMDAの嶽北先生のお話にもありましたが、そうなると衛生条件を担保するためには液体窒素に漬けるのは厳しいとのご意見があったので、液体窒素蒸気で長期保存するということを前提としました。このところ佐藤先生と相談しましたが、場合によってはメーカーの力を借りて完全に密閉できるパッケージを考えようということにもなってきています。完全に密閉してあれば、液体窒素に漬けても衛生条件は担保されますから、実験段階ではありますが、今後液体窒素の蒸気で保存するとなっても、液相に漬けることになっても、どちらでも対応できるだろうと思います。パッケージ素材としては、実験当初は食品用ラップで始めましたが、アルミが一番扱いやすく性能も良いので、アルミの薄膜のようなパッケージを作れば臨床に十分適応に向くだろうと確定したと考えています。

花井：製品化を目指すのであれば、ある程度規格を決めていかないといけないのではありませんか。

長嶋：はい。

花井：方向性を決めておかないと、あれもこれもあるとなると、全部検討するのは大変ですよ。ガラス化して、液相で、アルミホイルパックで、基本的にはヒト由来細胞は3層でということが最終形と考えてよいのですね。

長嶋：最終形は、そのようなイメージを持っています。どういうメーカーさんが協力して