

くれるか、パートナー選びといたしますか。

花井：例えば、メーカーとしての製造工程の管理とか扱い易さとか、実際に製造されるメーカーさんのご意見は伺っているとかないのですか。

長嶋：大手医療機器メーカーの技術系の人と佐藤先生も含めて話をした事がありますが、あまり食いつきは良くなかったです。

花井：会社となると、コストとか技術とかそういうものがたぶんあるので、またちょっと違った視点が得られるのかなと思ひまして。是非、いろんなところにあたられるといいのかなと思ひます。

佐藤：ありがとうございます。今回長嶋先生には、気相と液相の両方を検討して頂きました。今日はバンク化の話は議題にはありませんでしたが次回ご説明したいと思ひますが、今東海大では専用のタンクを購入してバンキング出来るようなシステム作りが大体整って、コールドランの時から保存に使うという取組みで行っています。

光島：以前の時に大日本印刷が共同研究でスタートされると聞いたのですが、大日本印刷はどういった役割分担をされるのでしょうか。

佐藤：パッケージングのところですか。長嶋先生のこうした技術を優れたパッケージングで活かせるメーカーであればどこでも良いと思ひます。大日本印刷さんの社内事情等もありまして、共同研究契約はありますが、そこと進捗は確認しながら少しずつ進めるという形になっております。

光島：アルミパッケージのところも担当されるのでしょうか。

佐藤：凍結のところに関しては、長嶋先生にご提案頂いたやり方が良さそうですけれど、医療現場となると何重にもパッケージングされるものになりますので、どういった物が最終的に良いのか、いろいろ工夫が必要になってくると思ひます。

的場：長期保存用の入れ物を新しく開発されているということで、構造的なもので何か特徴があるのでしょうか。

長嶋：はい。細胞シートの凍結というのは、お金を掛ければおそらく自動化できると思ひます。細胞の普通の凍結は、バイアルの様な物をフリーザーに入れるとか液体窒素にポンと入れるとか、容器の中で徐々に凍っていく、あるいは瞬間に凍っていくというのが凍結のイメージだと思ひます。細胞シートは容器の外、つまり実験室の環境の中でオペレーターがデリケートに扱いながら容器の外で一旦凍結が完成するわけです。その後に、液体窒素のタンクなどにしまわないといけません。しまう間に溶けてしまうので、目の前で溶けないようなアイスボックスのようなものに一旦入れて、それを持って数歩移動出来る程度にしないと、フリーザー等にしまうにしても出来ません。作製したのはただの箱に見えますが、ドライシッパーという液体窒素の吸収材がぎっしり詰まっていて、箱そのものが非常に冷気を保ちやすい構造になっています。引き出しの中にシートを入れてしまえば、その中は非常に低温に保てますので、その状態で液体窒素タンクの中にしまい込むためのものを作りました。見た目は簡単ですが、中身は手が込んでいます。

的場：温度コントロール出来ている箱ということですね。

長嶋：そうです。これをタンクにしまうのか、あるいは太陽日産に相談したのですが、iPS用のフリーザーが既にあって、多分それをそのまま流用できるのではないかと思いますと聞いています。あの箱で、大量に処理するようなものがおそらく作れるであろうと思います。メドはたっているのですが、あとはどの程度メーカーが協力してくれるかによります。

的場：或いは、シート状の細胞に特徴的にカスタムメイドしているというものではないのですね、今のところ。

長嶋：カスタマイズされています。非常に弱いので、アルミでパックしても加重で割れますから、シート用に1枚が1つの引き出しに入っているような感じになって、大事に守られるよう担保されています。

加藤：これまでガラス化保存液はカルボキシルカポリリジンなど色々検討されて最適化したと認識していますが、市販のガラス化保存液でも同じようにガラス化出来たというのは、市販品は先生方の組成と同じなのでしょうか。

長嶋：全く同じです。バイオベルテという会社から、カルボキシルカポリリジンの粉末を我々が供給を受けていて、ポリリジンを供給している会社に溶液を作製して頂きました。彼らの得意の分野ですので、全く同じ組成で作っています。いわゆる、市販化された商品にはなっていませんが、そういう培地メーカーのような所できちっと作れるという事を確認したので、今後大量消費の段階になっても大丈夫だろうと思います。

佐藤：融解時の白濁の原因は、何でしょうか。

前原：シートが白濁するという事は、ガラス化状態がきちんと成立していないという事で、原因としてはガラス化処理液が細胞に染込んでいないこと、温度の下降が不完全であったなどが考えられます。先ほどのガラス化状態が不完全だったというのは、処理時間が短かったために、細胞へのガラス化液の浸透が十分でない状態でガラス化してしまうと、白濁して細胞の生存性が低下してしまいます。

(3)「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）

多指症軟骨細胞シートの作製についてご報告いたします。多指症軟骨由来細胞から多指症軟骨細胞シート作製を検討して、CPCのコールドランの準備を整えました。前回までの報告の内容ですが、多指症軟骨由来細胞の安全性評価をGバンド、アレイCGH、NOGマウスで行い安全性を確認し、多指症由来の細胞を細胞ソースとして採用しました。実際の細胞の増殖性ですが、継代しても増殖性を維持しています。増殖性が良いので、細胞ストックを作製可能であることが分かりました。バンキングシステムの目的としては、いつでも、どこでも、どの年齢の患者様にでも治療できる事を期待して細胞ストックを作製します。あらゆる検体の細胞を集めることにより、より安全性や質の高い細胞を選択すること

ができます。選択した細胞を移植用の細胞としてストックできます。バンキング化による細胞への影響は、細胞を起こした時の生存率は 97%以上あり、その後培養すると増殖性も 3-5 日でサブコンフルエントになり、継代が出来る量まで増え、実際播種した量の 7-8 倍ほど増殖しているので細胞をストックすることは問題ないと思います。

次にシート作製の最適化を検討しました。検討項目として、日数と播種数、積層化の有無を条件にしました。結果は、14 日間で 1.0×10^4 cells/cm² で播くと、積層化しなくても自然に重層化したシートが作製できました。自然に積層化した多指症の細胞シートと自己細胞の細胞シートと比較してみると、自己細胞は 3 層積層化シートで 2.32×10^6 の細胞数で生存率が 93.4%、多指症細胞シートは単層シートでも 1.73×10^6 の細胞数で生存率が 97.5%と、自己細胞シートに比べ単層でも同等もしくは同等以上の細胞シートを作製できることが分かりました。シート作製の条件を纏めると、自己の播種細胞数 5×10^4 cells/cm² が、多指症細胞だと 1/5 量の 1×10^4 cells/cm² でできます。培養方法は、自己細胞は滑膜を共培養に使用しましたが、多指症細胞では共培養は必要ありませんでした。また、シートの作製は多指症細胞だと事前にバンキング化してストックをするので、患者さんが決まり次第、細胞シートを移植出来るようになります。シートも 3 層から 1 層になることで、積層化という人為的な操作段階を 1 つ省く事ができ、その面でも省力化が図れることとなります。また、シート作製日数も、短縮できることとなります。シートの作製枚数ですが、自己細胞も多指症細胞も個人差がありますが、多指症細胞だとバンキング化により事前に安全性を確認できますし、シート作製枚数も自己で 1 枚作製する細胞量で、多指症細胞は 15 枚できる計算となります。この条件で「同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を申請し承認されました。

全体の工程は①多指症細胞から細胞を凍結するまでの段階、②実験室でバリデーション試験により安全性と質の良いものを確認して移植に用いるかの適正判定の段階、③患者様が決まったら移植に適した細胞を起こして培養しシートを作製し品質確認ができたものを移植する段階の 3 つになります。この工程内検査で安定性試験やエンドトキシンなどの各種の試験で安全性の担保を取ります。

CPC でのコールドランは、3 つの工程を全て行います。本来ならば、昨日予定していましたが、患者様の体調により中止となりました。いつでも開始出来る準備を整えています。

本年度は、細胞ソースの評価と増殖性の評価を行い、CPC でのコールドランの準備もできています。次年度は、細胞を収集して評価をしていきます。

<質疑応答>

花井：自己細胞と、多指症由来の細胞では増殖性がかなり違う原因は、多指症の方が小児だからということなのでしょうか。

佐藤：はい、そうですね。全然、活きが違います。やはり、細胞自体が未分化なのも勿論ありますし、指の軟骨のプロパティチェックをしています。小児の関節の部分ですと、

軟骨になる部分と骨になる部分が多少含まれているのではないかという点を非常に気にして、そういったところのプロパティチェックを沢山しているところです。キャラクターが同じでありながら見た目は同じ軟骨ではありますが、全然違います。

花井：そうすると安全性上の懸念として、異所性に骨化を起こしてしまうのではないかと、ということが懸念されますか。

佐藤：ただ異所性の骨化に関しては、Type10 コラーゲンや Runx など骨になるようなものは強くは発現してないので、異所性骨化を起こすような事はないと思いますし、関節の中に MSC に近いものがあったとしても関節内に移植したものが骨化を起こすようなことはないと考えています。別の実験で、あまり沢山 MSC を関節内投与すると小さな軟骨の塊ができる、それは細胞浮遊の状態でも 10⁷ レベルのような非常に高密度で入れると軟骨の欠片が沢山できるという報告はあります。

光島：確認ですが、軟骨組織を採ってきて、ゆくゆくはシングルセルになるまで純化されるのでしょうか。

岡田：多指症細胞は手術室で医師によって軟骨組織を採取して頂いて、コラゲナーゼ処理でバラバラにして、それをストックして実際に安全性と品質検査でその細胞が適しているかどうかを判断します。

光島：シングルセルアイソレーションというか、個々の細胞からスタートしていると思っ
てよいのですか。コラゲナーゼ処理でバラバラにした時に、一部の集団の塊を持ってくる
のか、細胞一つ一つを分けて持ってきているのか。

佐藤：それは、1 細胞由来ということでしょうか。1 細胞由来という事ではありませんが、
ストックは 10 の何乗かレベルではしています。

光島：スタート時は、いわゆる細胞集団なのですね。

佐藤：そうです。一応その集団をもって、同一ロットであるとしています。

光島：バンキングなのですが、一人の多指症の患者さんから幾つかコラゲナーゼ処理した
塊を数個とって安全性評価までもっていくのか、一人の多指症の患者さんには一つの組織
由来の細胞単位としてやられるのか、どうしようにするのでしょうか。

岡田：一人の患者さんに対して 1 つの塊とみなして、コラゲナーゼ処理の時点で組織全体
を同じ液で溶かすので、一人の患者さんは 1 ロットで、バッチのように細胞数が取れると、
ストック時点で一人の患者さんから 5 本とか、多い方だともっと本数が取れるようになり
ます。均一という事で管理します。

光島：今まで何例くらい多指症患者さんのストックがあるのでしょうか。

佐藤：ヒト幹が通ってからは、実は昨日第 1 例目だったのですが、患者さんが熱発してキ
ャンセルになってしまいました。そのために CPC のサニテーションなど準備していたので
すが、延期になってしまいました。

光島：今ご説明頂いていたのは、こういうふうにやりますよということなのですね。

佐藤：そうです。安全性のことがあって、今までの積み重ねが成育とありますので、同じ

事を CPC 内でやるというところを準備しているところです。

光島：計画では、何症例くらい多指症の患者さんの組織をバンキングされる予定なのか。

佐藤：厚労省に出しているのは、20 症例です。東海大の年間の多指症の手術件数が大体 10 例程度です。ただ、多指症の組織は大きいものから小さいものまで様々ですので、あまり小さいと評価もできない事が予想されるので、この件数を取らせていただく事になっています。

花井：細胞としては、1 症例 1 ロットで症例を集めるのでしょうか。

佐藤：ある程度ストックをして、一番良い細胞で何人かの患者さんを治したいと思っていますので、その為にも一番良い細胞を得るために 20 症例くらい計画しています。

光島：一番良い細胞というのは、移植される患者さんと細胞ストックの何をマッチングして見られるのですか。

佐藤：マッチングのところは、実際やってみないと分からないところがあります。ただ、細胞シートの質の評価に関しては、自己細胞の時のデータもあり、見た目にも培養の仕方が全然違った多指症由来の細胞シートができあがっていくので、その条件設定もかなり最適化されていますので、過去の自己の細胞とのデータを見比べながら一番良いものをという形にしたいと思っています。

光島：前回の発表で、低酸素環境下で生育が良いとありましたが、あの成果はこちらでは検討しないのでしょうか。

佐藤：低酸素下でとなると CPC 室内に装置を持ち込む必要があつて、それはかなり大変なことです。基礎研究レベルあるいは将来的な発展としての選択肢はあると思いますが、今現在 CPC にその装置を持ち込むというのはバリデーションのやり直しなどあつて現実的ではないので、この事業には入らないと思います。

(4) 「多指症軟骨由来細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 (その 3)」

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、多指症軟骨由来細胞(PDCCs)が同種 T 細胞に及ぼす影響について検討していますのでご報告いたします。

これまでに、自己の軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生の有効性が示されてきていますが、この技術の再生治療の将来的な普及を考えると、同種細胞移植が必須になると考えられます。同種細胞利用の利点ですが、予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、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、品質の良い細胞の選択も可能になることが考えられます。

現在、同種細胞移植の細胞ソースとして多指症軟骨由来細胞を考えています。これは優れた増殖性をもち、手術時廃棄組織であることから、倫理上の問題も少ないと考えられま

す。しかしながら同種細胞を移植するというだけで、拒絶反応を引き起こす可能性があるということが懸念されます。そもそも軟骨細胞は、経験上免疫応答が低いといわれている組織ですが、宿主内でこの軟骨細胞が特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はなかったことから、同種軟骨細胞およびその積層化シートが免疫応答に及ぼす影響をこれまでに *in vitro* で検討してきました。

マウス、ウサギおよびヒトの軟骨細胞シートが T 細胞に及ぼす影響を見てきましたが、T 細胞の活性化を惹起しない、活性化した T 細胞の増殖も抑制する報告をしてきています。また、患者さん由来の積層化シートで、液性因子である TGF- β 1 が高発現しているという報告があることなどから、TGF- β 1 を抑制効果に關与する候補因子の一つと考えています。

このように、PDCCs は活性化 T 細胞の増殖を抑制できるということから、抑制機構のメカニズムの解明をめざしたいと思っています。変形性膝関節症の患者さんの場合、病態の周辺部は炎症が起きていますが、炎症には T 細胞など他の免疫細胞も関わっているのですが、そのような活性化を抑制できれば、移植した軟骨細胞シートが構造的に治療部分に役立つだけでなく炎症なども抑制できればと考え、この抑制メカニズムを解明することを一つの目標として研究を行っています。まず、メカニズムの一端として、液性因子の影響をみました。TGF- β 1 が高発現しているということから、TGF- β mAB(中和抗体)を培養液中に添加することにより、培養反応中の TGF- β レベルを低下させることで、PDCCs による増殖抑制効果が減弱するかどうか、さらに積層化軟骨細胞シートでは、PGE2 の発現も高いと報告されていたので、アラキドン酸カスケードの PGE2 の上流にある、Cox2 のインヒビターである NS398 により PGE2 量を減少させることで、同様に PDCCs による増殖抑制効果が減弱するか、さらに両方を同時に抑えることで、PDCCs による増殖抑制効果が減弱するか、ということを確認しました。

実験方法は、T 細胞と樹上細胞を混合培養（リンパ球混合培養）すると T 細胞が増殖します。そこに多指症軟骨由来細胞を共培養すると、T 細胞の増殖が抑えられることがこれまでに分かっています。この培養系にさらに TGF- β の中和抗体、もしくは同時に Cox2 のインヒビターを加えることで、この反応が抑制されたままになるのか、もしくは抑制効果が減弱して T 細胞の活性化が起こるかというのを細胞増殖解析により確認しました。その結果、TGF- β 中和抗体により、培養液中の TGF- β 1 量は MLR のみと同等レベルまで低下している環境下でも、MLR と PDCCs との共培養系で抑制されていた T 細胞の増殖活性には影響がみられない、つまり抑制されたままであるということが示されました。さらに NS398 を添加して PGE2 量を減少させても、PDCCs により抑制されていた T 細胞の増殖活性には影響がみられず、抑制されたままでした。次に、TGF- β 中和抗体と Cox2 インヒビターを加えて、TGF- β 1 および PGE2 を同時に抑制しても、有意な差はみられず、PDCCs による T 細胞増殖抑制効果には影響がみられないという結果が得られました。これらの結果より、今回のように接触培養条件下においては、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果には、TGF- β 1 だけでなく PGE2 の寄与も少ないことが示唆されました。

一方、間葉系幹細胞はもともと免疫原性が低く免疫細胞の活性化を抑制するという性質を持つ細胞なのですが、その免疫細胞活性化抑制効果には液性因子による抑制と、接触に依存した抑制の両方の関与が示唆されています。このことと今回の結果から、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果には、液性因子よりも接触に依存した抑制の経路が強く関わっている可能性が考えられます。今後、非接触培養条件下にて検討すること、また別ルートからの検討も考えています。プレリミナリーなデータになりますが、これまでの結果から成人の軟骨細胞では T 細胞の活性化した状態での増殖活性を数パーセントまで抑えることが分かっているのですが、PDCCs は MLR との共培養系では T 細胞の増殖 20%ほどまで（他のロットでは 50%前後もあった）しか抑えていない結果をえられています。しかしながら、この系においては、PDCCs 自身の BrdU 取り込みも加味した値になっていることから、これを差し引くために PDCCs の増殖を抑制してから、MLR との共培養実験を行いました。増殖の抑制にはマイトマイシン(MMC)処理をすることで、PDCCs 自身の増殖を抑制しました。すると、増殖抑制した PDCCs では、活性化 T 細胞の増殖抑制効果が減弱していました。X 線照射により増殖抑制した PDCCs でも、増殖抑制効果が弱まる傾向が観察されたことから、PDCCs はそれ自身が増殖しない状況になると、抑制効果が減弱する可能性が高いことが考えられました。これまで、MSC や成人の膝軟骨細胞は増殖抑制しても活性化 T 細胞の増殖抑制効果にさほど影響はなかったということがあるので、PDCCs は大人の軟骨とは若干違ったキャラクターを持っているのではないかということを感じています。これらのことから、増殖抑制有りとなし PDCCs 間で、タンパク質もしくは RNA 発現の網羅的比較解析を行うことで、両者間で発現に違いのある分子を探索しようと思っています。発現に違いのある分子の中に増殖抑制に関わる候補因子が含まれる可能性は高いと考えられ、抑制機構のメカニズムの解明につなげたいと思っています。

<質疑応答>

佐藤：細胞をシート化すると、マトリックスができますから、細胞としての活性というか増殖が止まる方向にいきます。多指症由来の細胞シートでの系というのも検討するという方法でよいのでしょうか。

加藤：はい。是非やらなければならないと思っています。マトリックスが出てきて、単層培養しているのとは違う状況というのがありますので、その状況下での比較も重要かと思っています。

的場：同種の場合は単層でも移植できるような感じですが、分泌されているものが同種と自己と違うという印象なのではないでしょうか。

加藤：今回の結果からは、自己と同種で分泌されるものが違うとは言えませんが、どちらかと言うと多指症は液性因子というよりは実際に接触することで抑制している方が強いような印象が今のところあります。もう少し詰めた実験をしないとハッキリ言えませんが、若干、間葉系幹細胞や大人の軟骨細胞とは抑制のメカニズムも違っているのではないかと

思います。何が関与しているかは、今のところお答えすることができません。

佐藤：免疫抑制の効果があることは、確かなのですよね。

加藤：そうですね。はい。

(5)「アレイ CGH 解析による軟骨培養細胞の品質評価」

研究協力者 伊東紀子 (DNA チップ研究所)

軟骨培養細胞に特化した解析の設定値とカスタムアレイ作製について発表いたします。アレイ CGH 実験と解析の概要になります。本研究では、リファレンスゲノム DNA としてパッケージ 2 (P2) を使用します。テストサンプルとして P4,6,12 を使います。それぞれ異なる蛍光色素で標識し、競合ハイブリダイゼーションを行います。スキャナーでそれぞれの蛍光強度を読み取って、Cy5/Cy3 の Log_2 比をプロットします。実際のデータは図のようになり、染色体短腕から 10 プローブずつの移動平均をとると結果としてテストサンプルの増幅が認められれば＋方向へプロットされ、欠失が認められれば－方向へプロットされます。差異を検出する解析アルゴリズム Aberration Detection Method-2(ADM-2) を用いてアベレーション (Log_2Ratio の変化が大きい) 領域を検出します。続いて Agilent 社が行った解像度を示すデータになります。リファレンスに HAPMAP DNA の健常のものを、テストサンプルに HAPMAP DNA 一卵性双生児(片方が健常で片方が 22 番染色体に Partial trisomy を持っている)の各混合比を 10%ずつ変えた計 11 サンプルを用いた実験の結果になります。10%ずつ Partial trisomy の割合を増やしていくと、それぞれ＋側に線が別れて引けますので、こちらのアレイは 10%の差を検出できることになります。

解析の設定値の検討を行いました。プラットフォームとしては、Agilent 社のカタログアレイを用い、サンプルはリファレンスに HAPMAP DNA の健常人、テストサンプルに骨肉腫の DNA を用いています。Moving Average を染色体 1 番から Y 染色体まで並べた図になります。normal と dye swap を行い、ユーザー側で設定できる数値 (閾値 : Threshold) を変え、6,7,8,9,10,11,12 とそれぞれ設定しました。例として Threshold 6 と設定した場合、normal サンプルでは 50 個 Aberration を検出し、dye swap では 41 個 Aberration を検出します。数だけ見ると差は 9 個なのかと思いますが、データを確認すると normal のみで検出されているものと、dye swap のみで検出されているものがあり、差を見ると 11 個ありました。この差というのは、擬陽性という事になり、Threshold 6 で設定すると擬陽性が 11 個あるということになります。同じ領域を判定していても、スタートとストップのポジションが若干違うことがあり、数えてみると 24 個ありました。グラフ化すると、Threshold の設定値を 10 にすると擬陽性が減ることがわかりました。Threshold の設定値を変えてもスタートとストップのポジションの違いにはあまり差は無いことがわかりました。そこで我々は Threshold の設定値は 10 が最適であると結論付けました。続いて Aberration call の際の疑陽性、疑陰性を排除するために使用する cut off の設定値ですが、通常の aCGH 解

析に用いる値にすると、軟骨の 7 番トリソミーが検出されないということがあります。Agilent の CGH 解析の解像度は 10% ですので、我々は 5% の差以内のものは擬陽性として排除するという cut off 値を設けたところ、7 番染色体のトリソミーも検出できることがわかり、軟骨培養細胞の品質評価に適した cut off 値として決定しました。

もう一つのトピックですが、品質評価に適したカスタムアレイの作製です。カタログアレイに搭載されている 6 万プローブが基本構成ですが、品質管理用に特化したアレイという事で、癌関連 1312 遺伝子のプローブ数については密に搭載しています。この 1312 遺伝子については 1 遺伝子につき 5 プローブ以上搭載する様に設計しています。このアレイは既に完成していて、8 比較の検討実験を行い既知の結果と同じであったことを確認しています。実験と解析の条件のまとめですが、佐藤先生の研究を始めて 3 年が経ち、実験のプロトコルや解析用のソフトウェアのバージョンが変わりましたが、我々は同じサンプルを用いて従来のバージョンと差が無いということを確認しています。ですので、実験は最新版を使用し、解析は Threshold が 10、cut off が 5% 以下を排除する値を設定値と定め、進めていきたいと思っています。

今後の展開としては、今回定めた設定値で多サンプルを実施しデータを蓄積することと、解析結果を比較し、妥当であり安定した結果が得られているかを確認したいと思っています。

<質疑応答>

光島：実際にこのシステムを用いて、多指症の患者さんのサンプルのバンキングの前の段階でチェックを掛けられるという理解でよいのでしょうか。

佐藤：バリデーションのところなので、そうです。

光島：実際にシート化するのには P2 でお聞きしましたが、パッセージの影響 P1,P2 もここで同時に分析して、実際使われるのは安全の為に P2 で行きましょうという判断基準に使われるということによろしいのでしょうか。

佐藤：はい。その通りです。

佐藤：私共、このアレイ CGH、G バンド解析と NOG マウスで安全性の担保として今回のヒト幹に申請しています。

(6) 「軟骨細胞シート専用器材の開発」

研究協力者 菊地鉄太郎 (セルシード)

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の実現において、当社として専用の器材、治具の開発、臨床研究データを活用した軟骨細胞シートの製品化の検討につきまして協力したいと考えております。今年度から専用器材に関して着手していますので報告いたします。

従来の UpCell インサートで既存の培養器材ですが、実際は市販されている培養器材の表面に温度応答性ポリマーを固定しています。その為に、市販の培養皿の培養面積 4.2cm^2 で、専用の 6 ウェルプレート上で培養する形になっています。この為、積層化やインサートのメンブレンを切り抜いたりする際に最適化されていませんし、 4.2cm^2 の培養面積より大きな軟骨欠損に対応できないという問題があります。また、1 枚のシートでも、6 ウェルプレートが必要となり効率の面からも最適化されていないということで、軟骨細胞シート専用の温度応答性器材が望ましいと考えています。こちらは自家の軟骨細胞シートを剥離する際の作業ですが、インサートのメンブレンを切り抜いて積層化しています。操作上のやり易さでこの様なやり方で行っていますが、既存の培養皿を用いていますので最適化されていないという事で、最適化した形状を考えて行きたいと思っています。培養面積ですが、ジャックの審査報告書のデータですが、軟骨欠損のサイズとして 2cm^2 までは骨穿孔法が適応であり、 $2\sim 4\text{cm}^2$ までは自家骨軟骨柱移植術が適応であるとなっています。従来法では修復の難しい 4cm^2 以上のサイズの治療を目指すには、より大きな面積の温度応答性インサートが必要と考えられます。試作した大型の温度応答性インサートですが、手作りで作り始めて現在 3D プリンターを用いて 2 度ほど試作を行いました。この形状を色々と検討して、3 回目の 3D プリンターによる試作を現在検討しており、この大型の温度応答性インサートの設計の基本的な方針としては、現在行われている自己の軟骨細胞シートや同種の軟骨細胞シートの移植も始まりますので、現在使っているインサートと培養条件を踏襲したいことが設計の方針になっています。こちら、3D プリンターで 2 回目から 3 回目の試作では、インサート部の耳を扱い易さを変更、現在使っているインサートと培養条件を同じにする観点で下側の受け皿の培養表面と温度応答性インサート間の隙間を現行と同じ 0.9mm にする変更、容器内へのインサートの収まりを改善、培養容器の高さ自体を現行の 21mm へ近づける等の改良をして、現在 3 回目の試作を行っています。この様に 3D プリンターで形状を検討しており、次はプラスチックの射出成型に金型の作製を行って、実際に培養可能な大型のインサートの試作を行って行きたいと思います。

今後のスケジュールですが、大型インサートの試作は今年中に金型作製に着手して、金型によってできたプラスチックの射出成型を実際に使用して頂いて培養やり易さや細胞を実際に増殖するかなどの培養評価を行って頂き、それを元に改良を行い最終的には包装や滅菌の工程を開発して、材質試験や溶出物試験などの安全性試験を行って臨床研究や治療に用いられるものを作って行きたいと思っています。現在取組んでいるのは、金型作製ですが、温度応答性処理条件については最適化を進めていく方針です。また、この様な器材を用いて臨床研究のデータを元に軟骨細胞シートによる関節軟骨治療の製品化の検討の方も行って行きたいと思っています。PMDA の薬事戦略相談で、実際にどの様なことを今後検討していけば治験や製品化に持っていきけるか検討して行きたいと思っています。

<質疑応答>

光島：自家でやっているのは 4.2cm² 以下で、他家の場合はどのくらいのサイズを考えているのでしょうか。

佐藤：他家の場合は必要枚数が十分確保できるので、大きさの制限を外して頂くことが出来ました。実際問題として、人工関節が適用となるような末期のものは難しいと思います。ただ、変形性膝関節症の中で末期に至るまでの患者さんで、アライアメント矯正と一緒に軟骨の損傷部を治すという患者さんに対しては、大きさの制限は無しに是非使って行きたいと考えています。

光島：実際にセルシードさんの大型インサートではどのようなサイズをやっているのでしょうか。

菊地：面積にして 2 倍程度です。

佐藤：私共は自己細胞の臨床研究を終えて先進医療の準備をしているところですが、最初の臨床研究で設定した、この 4.2cm² というのが先進医療としても生きてくるのではないかと危惧しているところです。1 枚の細胞シートでおおえる大きさというところから設定がまっていますので、このような大きな器材が出来てくるのであれば、この制限以上のものも適応にさせていただけるのではないかと考えてやっています。

3. 総合討論

光島：佐藤先生の発表で、これから薬事申請承認を目指されると思いますが全体のスケジュールの所で、自己の場合は臨床研究 8 例で終了と考えてよろしいのですね。これで、先進医療のほうへ行くと。今のスケジュールでは、先進医療への申請時期というのはいつごろを予定されているのでしょうか。

佐藤：はい。今年度、来年度始めまでは学内の倫理委員会始め 3 つの会議の承認が必要ですので、現在準備中です。できれば来年度中に一度、研発課の方に先進医療の相談を考えています。

光島：来年度中に相談ということですね。

佐藤：はいそうです。この事業プロジェクト自体が自己細胞で先進医療の実現までもっていくと、同種の方はヒト幹を通すということが最終目標でありますので、是非やっていないかと思っています。

光島：嶽北さんの方で前回盛んに治験までもっていかないのかという事が言われていましたが。最初の計画通り今後進められるという事でよろしいのですね。

佐藤：勿論、この事業にプラス α として医師主導治験あるいは企業治験というところまで話が盛り上がってくれば良いとは思いますが、企業様相手のところがありますので是非そういう方向も視野に入れて進めて行きたいと思っています。

光島：同種の方ですが、8 月 6 日にヒト幹に承認されて、新法への対応で再申請書を出されるのですよね。そうするとよりハードルが高くなるかと思うのですが、学内の委員会の設

置や再申請への対応はどのように考えていらっしゃるのですか。遅れそうですか。

佐藤：その混乱が非常に危惧されたので、今までの旧法のうちにヒト幹を通したいと何とかそこを目標にやってきました。目標より1年度繰り上げてやってきた事になります。来年の11月までの1年間は移行期間ですので、その間に新しい法律に則って申請し直す形をとりたいと思っています。ただ、移行期間中も旧法に則ったものに関しては、臨床研究を実施して良いという事になっています。

光島：進捗管理という事で、皆様をお願いしていますが、最新のロードマップを作成して頂きたいと思います。特に、新法に対する対応がこれから始まると思いますが、自家細胞の場合と同種の2つを、薬事承認申請に至るまでの今現在考えられる研究開発のストーリーをロードマップで示して頂きたいと思います。1ヶ月くらいで仕上げて頂けると、お願い致します。

佐藤：本日の議事録と共に提出させていただきます。

橋本：今年の11月から新法が施行され薬事法も改正されるということで、再生医療の事業化が現実のものとなってきましたが、私共も社内で軟骨シートの研究をより早く臨床に届けられるような形の体制を整えたいと努力しているところです。ロードマップのご要請が出ておりますが、佐藤先生と相談しながら作成させて頂きたいと思っています。

的場：品質評価のところ、LDT(Laboratory Developed Test)というところで、品質評価のデータをお出しするという体制を整えてやっています。宜しくお願いいたします。

佐藤：DNAチップ研とはPMDAの事前相談に伺わせて頂きました。

佐藤：昨年度の評価ですが、色々な評価委員の先生方に評価いただいて、PO様のコメントも評価出来る点など研究をご理解頂いて評価して頂けて感謝しています。ありがとうございます。ご指摘頂いた点も、粛々と進めて、自己細胞の方は先進医療に向けて準備中ですし、同種の方も現在バンキングのところを行っています。どのようなバンキングシステムにかにつきましては次回の班会議の時にご報告させて頂きたいと思います。同種の方も今年度無事にヒト幹で承認されまして順調に進んでいます。私共の軟骨細胞シートによる再生治療は、ジャックとはそもそも対象疾患が違っていますので、あくまで私共は小さな外傷性の軟骨を治すというところは考えていません。目指すものは変形性膝関節症を有した患者さんの軟骨損傷に関して細胞シートが効くとアピールしていきたいと思っています。是非、自己細胞シートの系は先進医療でやっていきたいと思っています。

花井：そのあたりのアピールが足りなかったのでしょうか。変形性膝関節症をやるという。そこまで言うと言いすぎになるのでしょうか。

佐藤：外傷と変形性膝関節症と両方を目指していますと、最初広く対象を言っていたところが少し分りにくかったのかもしれませんが。実際に、ヒト幹細胞臨床研究を行った8例の患者さんは、皆さん変形性膝関節症を合併して持っている患者さんですので、今回はその点を考慮して頂けたらと思います。

光島：先進医療のほうですが、10例のところ8例で行くとのことですが、それは開発課の

ところと確認して、それで先進医療に申請してよいという確認済みなのでしょうか。

佐藤：これは5例以上あればよいと伺っていますし、エントリーは11例ありますので、適応外で移植に至らなかった等で実際は8例ということなので、この臨床研究の期限が3年間でしたので、この11月で終了というところで纏めたいと思っています。

木下：次年度の研究計画書も参考に進捗確認をしていきたいと思っていますので、継続申請が出た後にまたご連絡させて頂きたいと思っています。

4. 事務連絡

今回は2015年3月の日本再生医療学会がパシフィコ横浜で開かれますので、例年通り学会期間中にパシフィコ横浜の会議室で行いたいと思います。お忙しいとは思いますが、ご指導頂けたらと思います。本日はありがとうございました。今後ともよろしく願いいたします。

5. 閉会

以上

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 2 回班会議

日 時：平成 27 年 3 月 19 日（木）12:00～14:00

場 所：パシフィコ横浜 会議センター4階【413号室】

出席者：光島健二、花井荘太郎、中谷知右（医薬基盤研究所）

飛田護邦（厚生労働省）

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）

長嶋比呂志、松成ひとみ、前原美樹（明治大学）

加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

大和雅之、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）

片山勝見、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、高橋匠、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）

班会議は今年度 2 回目となります。進捗がありましたので、私のほうから概要を説明させていただきます。後日、PO の先生方には資料と議事録を送付致します。

このスライドはいつもお見せするものですが、私たち整形外科医は運動器を取り扱っていますのでロコモティブシンドローム（ロコモ）を啓蒙することを 1 つのミッションとして日本整形外科学会が挙げています。ロコモの代表的な疾患である変形性膝関節症を再生医療の観点からどのように克服していくかという所が私共の 1 つのテーマであります。

健康寿命と平均寿命がよく言われていますが、この差は男性で 10 歳、女性で 12～13 歳と言われていて、これをなんとかしたいと思っています。整形外科医の立場からは、ロコモの代表的な疾患である変形性膝関節症、骨粗鬆症などの高齢者に特異的なこの様な病気を克服したいと思っていますところでは。

本事業で提示しているロードマップです。この事業は大きく 2 つの事業から成っています。1 つは「自己細胞シートによる先進医療の実現」、もう 1 つは「同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指したヒト幹細胞臨床研究の実現」で、自己で先進医療 B を、同種でヒト幹細胞臨床研究を実施するというのがこの事業のミッションです。今回自己の方は、今年の 1 月 27 日に総括終了報告書を厚労省研究開発振興課に提出し、ヒト幹細胞臨床研究を終了致しました。3 年間で 11 例エントリーし 8 例の患者さんに移植できましたが、重篤な有害事象を認めずに、皆さん経過良好で改善してきています。安全に終了することができて本当に良かったと思っております。この成果を元に、出口の 1 つである先進医療として実現するというところの事前の相談を、1 月末に厚労省研究開発振興課の先進医療専門官の真田先生に相談致しました。その時にご指導頂いたのは、今すぐ先進医療というよりも、まずは PMDA の薬事戦略相談へ行って、薬事的な出口を相談、確認しなさいということでした。先日、PMDA の佐藤大作先生と嶽北先生に面談の機会を得て、ご相談させて頂きました。同種の方は、昨年 8 月にヒト幹細胞臨床研究が承認され、現在実施に向けて準備をしている段階です。移植に資する細胞を安全に保管する技術、バンキングに関して構築し準備を進めています。これが完了した後、コールドランを経て、移植しても大丈夫かどうかの判定のために 10 検体あるいは 20 検体程度細胞を集め、この 1-2 年で評価し、安全性が確認された細胞で最良と思われるものを増やして移植患者さんに移植するという流れでヒト幹細胞臨床研究を行います。新法の下で、特定認定再生医療等委員会でも再度諮り直しなどが予定されますが、現在はこのように取組んでいます。また、新法下で細胞加工物製造許可申請の経過措置が 5 月 24 日で終了ということがあり、CPC の申請を一度行ったのですが、書類上の不備で戻ってきています。こちらでも再度届け出を提出して受理された後に、東海大学で引き続き CPC を稼動するようにしていきたいと思っております。

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 年間施行致しました。対象患者さんは 20-60 歳、対象は外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷としています。年齢や大きさの制限など、当時の再生医療推進室との相談の中で決まった規定がありますが、私共がこだわった変性により生じた、いわゆる変形性膝関節症を有した患者さんにも適応するという部分は認めて頂いて、変形性膝関節症の患者さんも含めて行ってきたものです。この変形性膝関節症の患者さんも、どの方でも含めるというのではなく、変形性膝関節症で骨切り術が必要となるような O 脚の患者さんや前十時靭帯損傷で 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さんで、必ず手術を予定していて、さらに軟骨の損傷もある患者さんを対象としています。エンドポイントは、安全性を見るための有害事象の頻度、有効性の評価としては、術後 1 年までの患者立脚型の臨床症状の変化、レントゲン、MRI、さらに術後 1 年で必ず関節鏡を実施して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し、さらにバイオプシーもするというプロトコールで実施しています。

滑膜細胞と軟骨細胞で共培養した細胞シートを患部に置く場合は、5cm 程度切開し細胞

シートを移植しています。大腿骨内側の荷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。大腿膝蓋関節という部分で、上がお皿（膝蓋骨）で下が大腿骨となります。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。海外で講演した際にも、PF部分の修復効果は非常に注目されました。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。

先進医療事前相談の際に薬事的な出口を確認することが必要だと専門官よりアドバイスがあったので、先進医療を行いながら企業治験を目指すという二段構えの方法でよいのかという点についてPMDAとの事前の相談でロードマップを見て頂いて、立付けはこれでよいだろうというコメントを頂きました。企業治験を待っている間に先進医療を止めてしまうと、この間何も東海大学で実施できないとなると、施設維持の観点や研究員等の教育などの点で問題があると思いますし、少ない症例でも動かしていた方が学内連携の維持ができます。特に学内での安全性評価等の流れを止めたくないという部分もあり、是非この二段構えでやっていきたいと思っています。現在考えているのは、ヒト幹細胞臨床研究で8例終了していますが、同じプロトコルで実施していきたいと思っています。

変形性膝関節症（OA）はO脚のひどい方は、軟骨が傷つき骨まで達するような状態になります。部分的に損傷を受けている部分から、徐々に進行していく非常にやっかいなもので、リウマチのように急激に悪化するようなものとはちがって、OAの場合は非常に経過が長いということが特徴です。私共は、骨同士がぶつかり合っている場所に細胞シートを移植しても治るわけがないと思っていますし、骨切り術というアライメント矯正の手段を持っていますので、手術で直せる部分はしっかりと治します。移植した細胞を維持できる環境をきちんと整えてあげて、同時に合併する軟骨損傷に対して細胞シートを移植することで細胞がそこできちんと生着して治す、というストラテジーで行きたいと思っています。

現在海外で4万から5万例実施されたと言われている自家培養軟骨細胞移植（ACT/ACI）という方法は、非荷重部の軟骨を1ヶ月くらいで増やします。脛骨から骨膜を採取して、パッチ状に患部の周囲に縫い合わせ、縫い合わせの隙間から培養した細胞を入れるという方法で治療しています。日本で保険収載されたJ-TECさんのジャック®も、入れ方が違うだけでゲルの中に包埋した細胞を入れているだけです。骨膜を使うところは同じやり方です。骨膜を縫い合わせて使うというのがスタンダードなものとなっています。私共は細胞シートと出会う前にも組織工学的な軟骨を作ってきました。動物実験で骨軟骨欠損を作って、各種のスキヤフォールドだけや、間葉系細胞の中でも有用と思われる滑膜由来の細胞などを使ってきましたが、見た目は白く治っているように見えますが、組織学的には線維性の軟骨の混在を防げないことが分かっていたので、私共は表層の部分をしっかり治すというところで研究を続けてきました。表層に蓋をするように色々な組織工学的な軟骨を使ってきましたが、表層をきちんと治せることができれば、その下は自己修復で治ることが分か

りましたし、それは細胞シートでも実現できましたので組織工学的に作製が最も簡便な細胞シートに特化して研究を続けているところです。

変形性膝関節症は非常に治療が難しいです。手術療法、薬物療法、理学療法、患者教育などあらゆるやり方を動員しないと長期予後は良くありません。私共は外科医として、手術的に治せる部分はきっちり治さないとうまくいかないだろうと考えて、アライメント不良の場合はO脚の肢をまっすぐに治したり、前十時靭帯が切れて不安定性があればそこをしっかりと治してあげて、半月板が痛んでいたなら縫合や切除したりなどを行い、最後に軟骨が痛んでいる部分には細胞シートで治すということを行っています。

自己の臨床についてですが、総症例11例エントリーして、2例は関節鏡検査時に大きさが規定外や採取細胞数不足だったために適応とならず、1例は残念ながらプロトコルにある3-4週間以内で細胞シートができなかったものがありました。これまで共培養法では、かなり安定的に細胞シートが作製できていたのですが、この1例は非常に残念でした。移植できた8名の患者さんは非常に経過良好で喜んで頂いています。だいたい3ヶ月から半年経つと、新しい軟骨がMRIで確認できるようになってきます。上が膝蓋骨で下が大腿骨となります。だいたい1年で皆さん関節鏡で見るとこれくらい治ってきています。これが8例の患者さん全例のバイオプシーの結果です。2型コラーゲンの免疫染色ですが、硝子軟骨の程度や修復程度はもちろん個人差がありますので全部が100%硝子軟骨とは言い切れませんが、2型コラーゲンの発現が顕著で、サフラニンOでも濃染されていて、硝子軟骨できちんと治っています。これは、患者立脚型の臨床評価です。骨切りなどをすると、骨折をするのと同じ事ですから、やはり術後1ヶ月はスコアが下がります。3ヶ月以降は、徐々に回復されて皆さん90%近く治っていますので、非常に満足されています。ただ、自己細胞の問題点として、組織を最初に採らなくてはいけない為に2回の手術を要することや、健常部分の採取量には限界があり、複数回の手術は困難であるということ、非常に個人差がある細胞なので必ずしも活きの良い細胞ということは言えませんし、ご高齢の患者さんでは第7染色体のトリソミーが報告されていますので、そういったものが分かっているでも自分の細胞だからいいのかなどの問題点があります。これらの点を踏まえて、同種の細胞を検討しました。同種の軟骨というのは既に海外では臨床で使用されています。国内の骨バンクや海外の同種組織というのはトレーサビリティの問題があるということをご指導頂き、必ず手術時に廃棄組織となる多指症の組織から軟骨が取れないかということで多指症手術に注目しました。この患者さんは親指が2本あり、この1本を手術で切除するのですが、整形外科でも行いますし形成外科でも手術が行われています。足の趾の場合もあり、そこから軟骨を採ってきたりもします。共同研究先である、国立成育医療研究センター研究所では、多指症手術を日本で一番多く行っていますので、そこから細胞を頂いて安全性の評価やプロパティのチェックなどを行いました。この細胞は非常に良く増えて、沢山の細胞シートが作製可能です。多くの細胞を一人の患者さんのサンプルから得ることが可能です。こういった細胞は非常に魅力的であると感じています。安全性の評価では、人工関

節などを行う高齢者の方のアレイ CGH ではコピーナンバーバリエーションの異常が見られたり、7番染色体のトリソミーが高い割合で確認されるのですが、多指症由来の細胞では、ほぼ異常が検出されないということが分かってきています。さらに、超免疫不全マウスである NOG マウスに移植して腫瘍化しないことを確認し、この細胞をセルソースに使うことを決めました。さらに、国立医薬品食品衛生研究所の加藤玲子先生にご協力頂いて、細胞シートが T cell を活性化しない、免疫反応を起こさないということのエビデンスが、文献的に不足していましたので、免疫反応を起こさないということを確認して頂いています。患者由来の日本人、白人、黒人で Allo をポジコンとして混ぜた時、どういった反応を示すかを見たときに、軟骨細胞シートでは免疫反応を起こさないことを示して頂いて、多指症由来の細胞を使えるだろうというエビデンスとして構築して頂きました。去年8月に、ヒト幹細胞臨床研究として認めて頂きました。私共は多指症由来の細胞を採取する所からスタートしますが、それを培養して、ストックします。ストックについては、セルシードとの共同研究で行っており、セルシードから東海大に来て頂いている研究員の高野が保存方法の技術について、本日発表致します。

<質疑応答>

光島：自己細胞シートですが、先進医療と企業治験の二本立てとはどういうことかと思っていたのですが、今の先生のお考えでは、先進医療をある程度進まれて、セルシードさんが準備出来次第企業治験に移るということでよろしいのでしょうか。

佐藤：先進医療を実施するには、新法下では特定認定再生医療等委員会を経なければならず、すぐというわけにはいかないですし、また、治験がスタートできるまで薬事戦略相談やドキュメント作成など、いろいろとあると思うので、そういった理解でいいかと思えます。片山さん、よろしいでしょうか。

片山：そうです。

光島：先進医療は8例か9例とかそのあたりで組まれるのでしょうか。ある程度そのデータが出ないと、薬事の相談には行けないということなのでしょう。

佐藤：いいえ。相談はヒト幹細胞臨床研究のものでも行けると思いますが、先進医療で実施予定の症例はもちろん参考データとして使えると思えます。

光島：平行して進められるという事なのですね。

佐藤：そうです。先進医療は評価医療として準備して進めていきます。

光島：平行して、PMDAの薬事相談の方も受けていくということなのですね。

佐藤：そうです。

光島：同種の方で、コールドランとありましたが、これは本来の意味で言うプレランという意味で受け取るのですが、CPCでのチェックを兼ねながら実際に患者さんから多指症の細胞を頂いて調整するということがよろしいのでしょうか。

佐藤：自己の時にも行ったのですが、スタートは多指症患者さんの手術時廃棄組織を手術

室に取りに行くところから始まって、ここの部分は自己と異なるのでしっかり行って、ストックまで行います。

光島：コールドランといいながらも、まさしく本番同様に行くという事なのですね。

佐藤：そうです。移植の部分だけ行わないという事です。

花井：一般的に評価委員会などで委員の先生がおっしゃる事は、企業治験が控えているのに、なぜ企業治験からやらないのかということ。それが理解できないという意見が結構あります。それなりの理屈をつけていかないといけないと思うのですが。

佐藤：先程も申し上げましたが、治験としてすぐにできればいいのですが、この間何も出来ない時期というのが大学であるとなると、CPC も動きませんし、結局人で動かしているものですので2年3年止まってしまうと問題があるかなということが一番大きな理由です。この間少しずつでも、症例を治し続けるというのが我々のモチベーションにもなりますし、CPC の維持管理の観点からも研究員等も入れ替わりますので継続性や教育の面からも役に立つと思っています。

花井：理屈はよく分かるのですが、開発期間が長くなるとか、大学や研究者の都合じゃないかと思われることもあるかと思えます。ロードマップですが、先進医療をやりつつ、またはやってから薬事戦略相談という記載ですが、話の内容では先進医療相談へ行ったらまずは薬事戦略相談へ行ってくださいということになったのですね。

佐藤：そうです。PMDA の事前の面談を先日受けてきましたので、なるべく早く薬事前略相談を受けて、きちっとご指導頂きながら進めていくことを考えています。

花井：先進医療でやっている評価療養の分を申請時のデータに使えるように、できるだけ努力するというのが通例のやり方なのですが、例えば GCP 基準でやるというような話にはなるのでしょうか。

佐藤：なるべく GCP 準拠でやりたいとは思いますが、基本は今のヒト幹の時と同じ体制になってくると思っています。第 3 者評価機関を入れることなどについては、今後相談することになると思います。先進医療の実施について、東海大学の病院長からは了承されていますので、どういったグレードで行っていくのが適切なのかについて、厚労省や PMDA との話し合いとなると思います。

花井：出来るだけ短い間で、早く導出していけるように、その辺の説明をきちっとされていったほうがいいのではないかと思います。

光島：今の計画では先進医療 B への申請は、平成 27 年 7 月頃までにという表現になっていますが、現在の予定はどうでしょうか。

佐藤：先進医療 B 申請についてのドキュメントは既に作成済みで、事前相談に行って専門官に見て頂き、PMDA とも面談致しましたので、再度厚労省へ相談に行ってなるべく早い時期に申請したいと考えています。

中谷：先進医療 B でやっても、特定認定再生医療等委員会には諮る必要があるのですね。

佐藤：届出が必要かどうかということでしょうか。東海大学でも、特定認定再生医療等委員会を医学部長、法人ともに設置の方向で動いていますので、そちらに諮ることになると思います。

中谷：順番としては、先進医療 B で一度諮られて、それから特定認定再生医療等委員会にも諮ることになるということですか。厚労省の第一認定を二回受けることになるのという気がするのですが。こちらは第 1 種、第 2 種どちらでしたか。

佐藤：自己は第 2 種になります。同種は第 1 種です。

飛田：再生新法の提出をして頂くということになります。特定認定再生医療等委員会での意見を添えて提出して頂くということになると思います。

中谷：企業治験ですが、こちらはセルシードさんとの共同事業となるということでしょうか。治験依頼者はセルシードさんになるということなのですね。

片山：そうです。

中谷：最終的に、製造販売業承認申請はセルシードさんがされるということなのですね。許可もお取りになって、今取られていませんよね。将来的には、製造販売業許可申請もお取りになるということなのですね。

片山：はいそうです。

中谷：細胞シートを移植して、シート自体が軟骨になるのか、一種のトロフィック効果で良くなるのか、どちらの方なのでしょう。

佐藤：トロフィック効果の方が強いと感じています。私共は、細胞シートを長期にトレーシングした実験があります。ルシフェラーゼで標識されたラットを、体外から IVIS を用いて検出しトレーシングすると、細胞シート自体は 21 ヶ月以上膝の中に残っていることが分かっています。ただ非常に少ない量で、殆どが 4 週以内で細胞シートの残存ピークは過ぎてしまうので、最初の 4 週までの、おそらくトロフィック効果、あるいは細胞シートのカバーリングだけでも効果があるかもしれませんが、再生というよりは修復のほうに上手く働いているのかなと思います。

中谷：同種の場合は、フレッシュというか増殖能力が非常に高いのですが、その場合にもトロフィック効果がメインと考えるのでしょうか。

佐藤：そうです。細胞シートそのものが分泌する液性因子を自己と同様に細胞シートを複製して比較していますが、残念ながら現在のところは自己ほど沢山の液性因子は出てきてはいません。それをいかに自己の細胞シートに近づけていくかという研究も取組んでいるところでは。

中谷：気になったのは、同種で、生着するのであれば拒絶等の問題があると思ったのですが、トロフィック効果で徐々に治っていくのであれば、長期的な安全性の確立などはあまり心配しなくてもよいのですかね。

佐藤：そうですね。どちらかという、トロフィック効果のほうが強いのかなと思いますので。