

飛田：ロードマップについて教えて頂きたいのですが、自己と同種が同時に走っているということなのですが、出口が2つあるということではよろしいのでしょうか。

佐藤：はいそうです。厚労科研の申請書には自己は先進医療、同種はヒト幹をやるというところが出口だったわけですが、同種の方が開発までかなり時間を要しますし、同じ出口ではありません。

飛田：最終的に対象疾患が違うなどは、あるのでしょうか。

佐藤：対象疾患は同じで考えています。

飛田：将来的には、こういった場合は自己で、こういった場合は同種で、ということになるのでしょうか。

佐藤：変形性膝関節症の患者さんは非常に多いので、自己の細胞でオーダーメイド的に治していると、コスト的にかなり大変になると思います。同種でユニクロ化して沢山の患者さんに広めることを考えないと、対象患者さんが多いようなものにはコストダウンの観点を考える必要があり同種という選択も考えました。

飛田：自己の部分は、あまり先生の中では・・・。

佐藤：ジャックさんでも自己ですし、やっぱり自分の細胞で治せるのであれば自分の細胞で治したいという方も多いと思うので、そういった方はオーダーメイド的に対応しますが、やはり手術侵襲が1回減らせる事や沢山の患者さんに適用する場合はあまり高額な再生医療製品になっても問題かなという観点から安全な同種の細胞で出来ればと思っています。

大和：ある意味、混合診療ですが、日本版 Compassionate Use という名前で、患者本位の混合診療といって制限等がありますが、混合診療が可になる方向で現在きています。この制度に本当に手を出す人がどの程度居るのかは分かりませんが、先生の product は有用です。この制度にチャレンジするという可能性も頭の隅に置いておいて頂いて、内部で議論して頂けたらと思います。

佐藤：はい。ありがとうございます。

大和：細胞のバンキングのところですが、意外ともう少し長く掛かるのではないかと考えたのですが。細胞を採ってきて凍結させておけばいいとお考えなのかもしれませんが、確かにそういう側面もありますが、いろいろなガイドラインに従ってバンクの細胞がちゃんとしているとか、function などを確認しようとする、整形外科領域などは特に評価の部分にも時間が掛かりますし、お金と手間も掛かるので、そこはもう少し余裕を見ておいた方がよいのかなと思うのですが、大丈夫でしょうか。

佐藤：ご指摘の通りかもしれません。バンキングした細胞で安全性、あるいは有効性が確立されたものでないと患者さんに移植出来ないと考えていますので、当初この部分を2年くらいで多指症の患者さんから10例から20例の検体で評価して、一番良いものを患者さんに移植しようと考えているのですが、ご指摘の通り、バンキング・評価の部分は、グレーゾーンというか時間もお金も掛かる場所かもしれません。

(2) 「多指症由来細胞の長期保管システムの構築」

研究協力者 高野りや（東海大学（セルシード））

多指症由来細胞の長期保管システムの構築までの取り組みについて発表いたします。はじめに、細胞の長期保管システム、すなわち細胞のバンク化について、ICH 品質ガイドライン Q5D の【2-2 細胞のバンク化】の項目に、生物薬品を製造するうえで、段階的に継代された細胞を使用することの最も有利の点の一つは、特性解析された同一の出発素材、すなわちセル・バンクを、全製造ロットで使用できることである、と記載されています。本臨床研究において、初代培養細胞基材を起源としたセル・バンクを構築することは、ICHQ5D の示すように、特性解析・品質解析のなされた有効性・安全性の高いと思われる同一ロットの細胞基材を細胞シート製造に用いることが出来る点で優位であると考えています。本セル・バンクは、*in vitro* で寿命を有する正常二倍体細胞である、多指症由来細胞を基材とし、初代培養から数継代拡大されたマスター・セル・バンクのみを用いる、一段階方式のセルバンクシステムです。

セルバンキングの手法として、細胞加工工程での汚染の防止、取り違えの防止、適切な条件下での細胞凍結、解凍後の細胞生存率の保持、超低温下での長期保管、保管システムのリスクマネジメント、以上6点について確立することを目指しました。1から順に説明します。

1. 細胞加工工程での汚染の防止

一連の細胞加工工程は、清浄度および浮遊微生物等を高度に管理したCPC内で行っています。最終製品はクリンベンチ内で1次容器（シリコンガasket付きインナーキャップ型・凍結保存用細胞バイアル）に密閉することで細胞基材の汚染を防いでいます。

2. 取り違え及びクロスコンタミネーションの防止

1 検体の加工工程期間中は他の検体は扱わない【1CPC1 ドナー制】を採用しています。すべての物品は1検体毎に新しいものを用意し、余剰分は破棄しています。1ロットごとに専用の保管箱にて保存しています。以上の工程は、標準作業手順書に従い作業毎に二人以上による確認をひとつひとつ行いながら実施することにより、検体の取違いおよび交差汚染を防ぎます。

3. 適切な条件下での細胞凍結

数種類での凍結保存液の性能比較試験を行いました。その中でタカラバイオ社の『STEM CELL-BANKER』を細胞凍結保存液として採用しました。細胞凍結の際には、緩速凍結処理容器『BICELL』を用いて-80℃まで穏やかに凍らせ、長期保管タンクへの入出庫の際は、冷却保持容器を用いて移動させています。

4. 解凍後の細胞生存率の保持

気相式液体窒素タンクに2か月保持し、解凍した時の細胞の生存率です。3ロットの平均値から90%以上の生存率を保持していることが確認されました。また、それぞれの細胞を5日間培養したときの細胞の増殖率の平均は10.9倍であり、生存率の平均は98.7%と、解

凍後安定した増殖能と生存率を保持していることを確認しました。

5. 超低温下での長期保管

細胞を超低温下で保管する為のタンクとして、アイソサーマル気相式液体窒素サンプル保管システム『V1500AB』というシステムを導入しました。こちらのタンクの特徴は、検体を保管する場所と液体窒素が入る場所が完全に独立していて、上方から気化した窒素が内部に噴出され、中の温度をコントロールする方式になっています。完全な気相状態であるために、未知のウイルス等によるコンタミネーションはありません。こちらの保管タンクは、13段のケーンを28本設置可能ですが、上部の方はフタの開閉時の温度変化を考慮し、下9段だけを使用するようにします。28本9箱で252検体分の保管がこのタンクひとつで可能です。

6. 保管システムのリスクマネジメント

1つ目は、アイソサーマル気相式液体窒素ですが、こちらは液体窒素によって温度を維持しているので長時間あるいは突発的な停電による細胞への影響はありません。2点目に、2台の液体窒素自動加圧型の供給タンクを設置しました。ロードセルと呼ばれる重さを測る機械で綿密に残量が計算されていて、それに加え自動切り替え装置で片方が空になったら自動的に満タンであるもう片方のタンクに切り替わるという装置です。3点目に、こちらがタンクの庫内温度と液体窒素残量の表示盤です。一目瞭然で今どちらのタンクが動いていて、どちらのタンクが空になっているか、日常点検でヒトの目で状態を監視・管理し、タンクが空の場合は新しいタンクと付け替えるということを日常的に行っています。4点目、こちらはV1500ABの純正のモニタリング装置『バースアラート』という装置ですが、こちらはインターネットを介したネットワークベースステーションになっていて、インターネットを介してタンク内の情報をWeb上で見ることが出来ます。大学の教室や、離れたオフィスからでもタンクの温度および液体窒素残量を見ることができるようになっています。またその記録は、クラウド上にあるWebストレージに記録されていきます。6点目、さらに停電や異常な温度上昇など緊急時には管理者の携帯電話にエラーメールが送信されるように設定しました。以上のシステムを用いてリスク管理を行っています。

これが実際のバースアラートのウェブ上での画面です。こちらは窒素残量を示しています。窒素が満タンの時は液面の高さが55cmです。自然蒸発で徐々に減っていき、液面が25センチになると加圧式液体窒素供給タンクから液体窒素が供給されて満タンになり、徐々に減っていくというサイクルを自動的に繰り返します。およそ37時間でこのサイクルが繰り返されています。こちらは実際のタンクの中の温度です。青い部分はフタの直下にある温度計です。こちらの温度計が、液体窒素が少なくなってくることによって徐々に上がってくるのですが、フタの直下の温度計が-170℃を超えると液体窒素が供給され、温度が一気に下がります。それがやはり37時間毎に繰り返されます。細胞が実際に保管されている部分の温度が緑で表示されているところですが、-190～-180℃以内の温度で管理されています。以上をもちまして、多指症由来細胞の長期保管システムの構築の紹介とさせていただきます。

ます。

<質疑応答>

大和：ICHのスライドで、『細胞基材』と仰っていたところがありましたが、確かにバイオロジクスの業界では細胞基材という言い方をしますので、cell substrate という表現は technical term としては確立されていると思いますが、通常は組み換えタンパクを作らせるヒト遺伝子が入っている培養細胞という意味で cell substrate という言葉を使います。その場合、Product は細胞が分泌したヒト組み換えタンパクとなり、今回の細胞製品の場合、細胞自身が Product となるので、細胞基材という表現が正しいか疑問に感じるのですが。

高野：ICHQ5D には、細胞基材の漢字の使い方が 2 種類あり、細胞そのものを用いる場合は『基材』と記載されていて、薬を作る原料として使用する場合は『基剤』と記載されていて、漢字の使い方で分けられていました。そのため、今回は『基材』と致しました。

大和：cell substrate の訳が 2 種類あるということなのですね。

高野：はい、そうです。今回は細胞そのものを用いるので、今回は『基材』と記載いたしました。ICHQ5D の別添に記載されております。

大和：わかりました、ありがとうございます。

光島：只今ご発表頂いたのは、マスターセルバンクを使ったバンキングシステムのお話かと思いますが、コールドランで 20 例のサンプルを取り、その中から良いものを選ぶということですが、最終的には、将来的にマスターセルバンクとは別にワーキングセルバンクを立てられる予定でしょうか。

高野：多指症由来の細胞の方が、拡大できる回数（継代数）が限られているので、何継代目が適切か検討中ですが、最大まで拡大致します。供給される指 1 本からも取れるサンプルの本数は異なりますが、最大まで拡大したものをすべて保管しておき、それを治療毎に使用するという形を想定しています。マスターセルバンクを増やしてワーキングセルバンクとして使用するという従来のバンクシステムとは異なって、マスターセルバンクそのものが治療に使われます。

光島：均一性ですが、多指症患者さんの軟骨細胞はいろいろなものに分化する能力があると伺っています。1 細胞に由来するのではなく組織（細胞集団）由来であり、1 つずつの細胞をとった際に均一かどうかというのが気になる点です。ある意味、ヘテロな部分もあるのではないのでしょうか。その場合、品質管理基準はどのようにするのでしょうか。

佐藤：確かに、手術的に軟骨と思われる部位から採取してくるのですが、ご指摘のように、指の細胞は、軟骨に分化する細胞や骨に分化する細胞などが混在するヘテロな集団です。その中からいかに質の良い細胞シートを作るかが我々の一つの目標でもあります。そのために細胞シートの品質をどこに設けるかを自己の時と比較しながら進めて行きます。それぞれバリデーション試験段階でシートまで作製して、このロットからは良いシートが出来るというところまで比較したいと考えています。

光島：一度細胞をとって、仮置きでバンキングし、シートを作製して、機能・分化を確認して、安全性が間違いないと分かたらフィードバックして、その時点で初めてマスターセルと称するというシステムを考えているのですね。

佐藤：はい、そうです。

嶽北：細胞製品は、もともとヘテロなもの和我々は認識していて、化学合成している医薬品や構造式をもってヘテロかどうかということを確認してきました。その中である程度均一なものホモなものという形で作ってきた歴史がありました。技術的革新があり、バイオ医薬品というものが出てきて、その中でも単純タンパクのようなものでしたら、ある程度化学合成品に近いものは、構造をもってヘテロかある程度均一なものかという評価をしていました。糖タンパクのエリスロポリチンというものができて、ある程度までは目的の糖鎖であったり目的外のものであったり、目的物質、関連物質とも言いますが、ある程度ヘテロなものというのを許容するような管理の概念みたいなものを作ってきました。再生医療等製品では、こういったものを **Critical quality attributes** として、その面においてホモなのかヘテロなのかという議論をするけれども、生物学的にみるとたぶんヘテロな集団というものを許容せざるを得ないという世界があるのではないかという考え方になります。今までバイオ医薬品までは、おそらく糖鎖の構造式をもってヘテロかなど均一性の概念があったのだと思いますが、再生医療においては、構造式という観点からホモなのかヘテロなのかという話は出来ないと思いますので、どういうふうな観点、コンセプト、この再生医療製品はシートが作れる事が重要だという能力からホモなのかヘテロなのかという議論をしていかざるを得ないと、我々規制当局側での議論の中にあります。その中で考えた時に、マスターセルバンクを作るかどうかの話で、おそらくマスターセルバンクとおっしゃっていますが、バイオ医薬品でいうマスターセルバンクのように一度作ったものを二度と作り変えずにワーキングセルバンクを作って、そこからタンパクを作ってというようなものではなくて、ある程度一人のドナーから何百例か使った後に使い切ったら、スクリーニングをした上で新しい細胞をスターティングマテリアルとする管理だと思いますが、こういった場合は、マスターセルバンクとは言わず、ドナー毎のロットなのだと思います。マスターセルバンクという使い方をすると、**Q5D** や **Q5A** 相当の解析をすることになると、おそらく細胞の数は相当足りなくて億の金が飛ぶような解析をしなければならなくなってしまいます。マスターセルバンクのように一度作ったある程度のロットの確保はできる細胞だが、マスターセルバンクでは無いものと言わないと、開発する側としては苦しくなると、個人としては思います。スターティングマテリアルとしての規格を有し、ある程度のロットを形成できる細胞の製品であるという形にしたほうがよいのではないのでしょうか。

佐藤：大変貴重なご意見をありがとうございました。

高野：その通りだと思います。

(3) 「ウサギ軟骨細胞シートの長期保存法の開発」

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します。

細胞シートの長期保存の確立によって、細胞シートの作製と移植時期の調整を容易にすることが出来るようになります。また治療用の細胞シートの大量ストックを可能にすることそれによって allograft の移植の促進が期待されます。そのため、必要な時にすぐに使える状態で細胞シートを安定的に長期間保存できるような技術が必要不可欠な課題となっています。

我々の細胞シートの凍結保存方法の手順の確認です。細胞シートを凍害保護剤の入ったガラス化処理液に細胞シートを浸漬して保護剤を浸透させ、パッケージング素材でシートをパッケージし、液体窒素の蒸気で細胞シートを凍結保存させます。その後、38 度に加温した加温板の上でシートを融解し、そのあと保護剤の希釈・洗浄を行うといった流れで行います。細胞シートのシート構造が破損なく保たれたまま、生存性高くガラス化保存出来る技術です。

今年度の取り組みですが、大きく分けて 2 つの項目で研究を行いました。1 つ目は実用化に向けての改良研究を行いました。こちらは第 1 回班会議で既にご報告致しましたので、本日は簡単にお話致します。まず、より脆弱な細胞シートを想定し、非積層化シートへの応用を行いましたところ、我々の開発した細胞シートのガラス化保存法は、非積層化シートにも有効であることが分かりました。また、ガラス化に必要な前処理の時間が通常 45 分のプロトコルであったものを大幅に短縮しても、シート構造の維持や細胞生存性に影響がないことが分かりました。また、長期保存を目的として、パッケージング素材を検討致しました。アルミ箔を使用した細胞シートのパッケージングが、液体窒素の気相中・液層中両方の保存状態に耐えうるということが分かり、長期保存に有効であるということが分かりました。市販予定ガラス化液の有効性の確認も行いまして、非常に有効な成績が得られました。

本日は、2 つめの項目である、実用的細胞シート保存用デバイスの開発と評価について詳しくご説明します。こちらが、今回新しく作製した細胞シートの長期保存用デバイスになります。箱型の枠の中に、保存デバイス(小箱)を 3 つしまうことのできる構造になっています。この 1 ユニットが、一般的な液体窒素タンクのキャニスターにそのまま収まるような作りになっています。小箱にはつまみが付いていて、つまみ部分をつかんでふたを開けると中に細胞シートを収容することが出来ます。1 つの箱に 1 枚のシートを保存することが出来ます。細胞シートのガラス化をする際、液体窒素の蒸気でガラス化することが大きなポイントとなります。シートが完全にガラス化する前に液体窒素に触れてしまうと、シート構造が破損してしまうことがこれまでの研究で分かっていることと、今後の臨床への応用を考えた際に、液体窒素内に直接細胞シートが触れることをなるべく避けた保存方法を

考えている為、液体窒素の蒸気での保存が重要となります。この細胞シート保存デバイスは、容器本体とフタの部分に液体窒素吸収剤が入っており、あらかじめデバイスを液体窒素中で冷却して吸収剤に液体窒素を吸収させておくことで、蓋を閉めた時にデバイス内が蒸気で満たされるような構造になっています。デバイス上で直接細胞シートをガラス化保存し、そのまま蓋を閉じて液体窒素タンクにしまうことが出来るような作りになっています。タンクへの収容の際に、デバイスに細胞シートを収納したまま空気中を短時間移動しても、デバイス内は安定的に液体窒素蒸気で満ちた状態になるようにしました。

細胞シートのガラス化手順は、先ほどもお話したように、細胞シートを凍害保護剤の入ったガラス化処理液に細胞シートを浸漬して保護剤を浸透させ、パッケージング素材でシートをパッケージし、デバイス上で細胞シートをガラス化保存します。そのままデバイスのふたを閉じ、液体窒素タンク中に保存しました。保存期間は2週間～1か月保存としました。タンク中では、液体窒素が細胞シートに直接触れないよう液面を管理し、シートが液体窒素気相中の-150℃の温度化に保存されるように留意しました。シートの融解は、38度に加温した加温板の上でシートを融解し、そのあと保護剤の希釈・洗浄を行うといった流れで行いました。

こちらが細胞シートの融解後の形態と細胞生存成績です。3層の積層化細胞シートを用いました。約2週間の保存期間です。非ガラス化シートの成績・ガラス化後に即時融解したシートと比較して、長期保存したシートの細胞生存成績は劣ることなく、シートの破損も生じることなく安定的に保存できています。さらに2層の細胞シートを作製し、1か月間保存しました。こちらでも非ガラス化シートの成績・ガラス化後に即時融解したシートと比較して、長期保存したシートの細胞生存成績は劣ることなく、シートの破損も生じることなく安定的に保存できました。

今回新たに開発した細胞シートガラス化保存デバイスを使用し長期間保存された細胞シートの生存性は、非常に高く保たれていました。非ガラス化細胞シート、従来法でガラス化・融解された細胞シートと比べて、長期保存後の形態維持、および細胞生存性に差は見られず、安定的にシートの凍結保存が可能になったと言えます。

今後の計画として、実用性と大量保存への応用性に優れたパッケージング素材と、細胞シート用ガラス化保存装置の開発を行なっていきます。ヒト細胞シートへの応用も行います。来年より東海大学に所属が移りますので、東海大学を拠点として取り組みます。

<質疑応答>

佐藤：補足させていただきますが、先ほど高野の方からご紹介したのは、スターティングマテリアルとしての規格を有する細胞のバンキングから始まり、同種の細胞シートをつくり、移植するというのがヒト幹細胞臨床研究で考えている要件で、厚労省の承認を得たやり方です。今、前原さんから紹介頂いたのは、将来的に細胞シートごと保存したものをパッケージを開けたらすぐに使えるようにできるようにできれば、その方が実用的だろうとい

うことで研究開発を進めています。

光島：前は液体窒素の気相と液相を發表されていたのですが、この時点では全てガラス化も保存も気相で行うということですか。

前原：はい。

光島：ガラス化のところは、予め液体窒素の気相下で冷やしておいた特殊な容器に挟んで、前は時間の短縮ができたということでしたが、今回は保存までもっていく時間はどのくらい掛かるのでしょうか。

前原：今回は従来の45分のプロトコルで行いました。今後、シートによっては、前報報告した通り、シートが薄層になればなるほど処理に必要な時間は短縮でき可能性は十分あると思います。今回の検討では2層、3層のシートを使っているの従来通りの方法で行いました。

光島：特にガラス化の段階で実際何度の動きをしているかの測定はされているのでしょうか。

前原：-150度を保っていることは確認しています。

光島：それは補償されているのですね。細胞の生存数の点から言うと、時間短縮も可能だということですね。

中谷：最終的な保存というか、期限はどのなのでしょう。現在、申請をやっているヒト幹臨床研究の終了後、企業治験開始までにとということでもよろしいですか。

佐藤：ヒト幹の方は、このプロトコルではありません。

中谷：ガラス化液が市販予定とか販売予定と書いていませんでしたか。市販予定、バイオベルテ社というのが出てきたのですが、今はガラス化保存液というのは市販されていないということなのでしょうか。

前原：現在我々が使用しているものは明治大学で自作しているものになります。

中谷：ではバイオベルテさんに技術移転して作ってもらうことになるのですか。

前原：はい、その方向で動いています。

中谷：この保存液が販売されなくなると、これが全部アウトになってしまいますので、そのバイオベルテさんがしっかりしたものでないと、と思うのですがそこは大丈夫なのでしょうか。

長嶋：これは、ただ研究用の培地を外注で作っているというだけの話なので、佐藤先生の臨的にやっている仕事とは切り離していただいた方が良いと思います。

中谷：それでは、臨床用のものは別にしっかり作ってもらうということなのでしょうか。

長嶋：佐藤先生が行っている臨床には、そもそも細胞シートをそのまま凍結するというのは入っていません。

中谷：将来、申請段階となったときにはどうするのでしょうか。

佐藤：どういったものが再生医療等製品を作るときにOKなのかは、基準があったと思います。再生医療等製品を作るときに原材料基準のようなものがあってと思います。

嶽北：おそらく、ガラス化したシートを製品として承認申請するにあたって、最終的にガラス化液は溶媒に相当すると思いますし、そういったものは医薬品では添加物という扱いになります。再生医療等製品では新しい規制ができています。そういったものの安全管理、品質管理それぞれ個別に考えていかなければならないと思います。懸念されているのは、臨床グレードでなければならないのか、Research Use Only ではだめなのか、どこが作るのかなどと思います。結局どこが作るのかは、どこに外注するのかというだけの話であって、ヒトに投与してもいいような categorize された成分として求められる基準をきちんと保っていれば良いだけの話です。安全性の評価の観点からは、製品を投与する観点、物によっては単独での評価も必要になってくると思います。勿論、ガラス化ができるかどうかは、だいぶ先の話ですから、今の段階から安全性を評価しなくても良いと思います。

佐藤：保存液なので、必ず洗浄という工程があります。そこでどのくらい、このような成分が薄まってくるのかをしっかりと見ていく必要もあると思います。現実にも今、ヒト幹細胞臨床研究で自己が終了しましたが、その時も牛由来の血清、抗生物質を使っていたので、どのくらいの洗浄で減ったかというところは、バリデーションとしてきちんと示しています。それと同じ様な方法になるのではないかと思います。

(4) 「軟骨細胞の同種 T 細胞に及ぼす影響」

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で、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致します。

これまでに開発された積層化軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生技術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。同種細胞移植の利点として、レディメイドで細胞シートを作ることが出来ること、また本研究では多指症の廃棄組織から細胞ソースを採取することを想定していますので移植患者さんの負担を軽減することが出来ること、計画的な移植を行うことが出来ること、さらに同一ドナーからの細胞移植の場合あらかじめ細胞の品質情報が分かるため品質の良い細胞の選択が可能になることが考えられます。その一方で、同種細胞移植は拒絶反応を起こす可能性があります。軟骨組織は免疫応答が低いと言われていますが、実際宿主でどのような挙動を示すかという報告がなかったことから、現在まで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。

マウス軟骨細胞、正常ヒト軟骨細胞、ヒト膝関節軟骨細胞、およびそれらの積層化細胞シート、そして多指症軟骨組織由来細胞シートを用いて 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ことや、活性化したリンパ球の増殖抑制能を報告してきました。今回はこの抑制機構のメカニズムの解析を行いました。

まずは、軟骨細胞側からの検討を行いました。積層化された軟骨細胞シートでは、TGF- β

やプロスタグランジン E2(PGE2)の発現が高いという報告があることから、これらの液性因子が免疫細胞の活性化を抑制するような因子なのではないかと考え、それぞれの中和抗体やインヒビターを用いてそれぞれの働きを抑えることで軟骨細胞による T 細胞増殖抑制効果が減弱するかを確認しました。

簡単に実験方法を示します。T 細胞を活性化させるリンパ球混合培養系に軟骨細胞を共培養すると T 細胞の増殖を抑制するのですが、そこに TGF- β 抗体や PGE2 合成酵素のインヒビターを加えることで、抑制効果が維持されるのか、もしくは増殖抑制効果がキャンセルされるのかを確認しました。接触培養の条件下においては、軟骨細胞が有する T 細胞増殖抑制効果にはインヒビターや中和抗体はほとんど抑制効果をキャンセルすることはなく、接触培養条件下においては、多指症軟骨細胞が有する T 細胞増殖抑制効果には、TGF- β 1 や PGE2 以外の要因の関与が強いことが示唆されました。TGF- β 1 は免疫細胞の活性化や増殖を抑制する液性因子なので、非接触条件下での検討や他のルートからの検討を考えています。

多指症の軟骨細胞は非常に増殖能が高いです。リンパ球の混合培養系にそれぞれ違うドナー3人からの多指症軟骨組織由来細胞を共培養すると、リンパ球の活性化を抑制する結果を得ていますが、BrdU の取り込みで見た時に、この中には多指症軟骨組織由来細胞が取り込んだ BrdU の値も入ってきてしまう為、これを完全にキャンセルする為に多指症軟骨組織由来細胞の増殖をマイトマイシン C 処理することで抑制した状況で実験したところ、この抑制効果がキャンセルされてしまいました。同様に、X 線照射でも増殖抑制したのですが、同様に抑制効果がキャンセルされました。このことから、多指症軟骨組織由来細胞は、未処理の軟骨細胞と比較して、それ自身の増殖を抑制してしまうと T 細胞の増殖抑制効果も減弱してしまう、ほとんどなくなることがわかりました。今後は、活性化 T 細胞増殖抑制効果が高い条件と低い条件の軟骨細胞間で、タンパク質もしくは RNA 発現の網羅的比較解析を行い、両者間で発現に違いのある分子を探索していきます。この中にはおそらく増殖抑制に関わる候補因子が含まれている可能性が高いと考えられるので、得られた結果を抑制機構のメカニズムの解明につなげていきたいと考えています。

次に、影響を受ける同種 T 細胞側からの解析を行いました。CD4⁺T 細胞は大きく 3 つのエフェクター細胞、Th1 (細胞性免疫)、Th2 (液性免疫)、Th17 (自己免疫疾患) と他のサブセットの T 細胞を抑制する作用のあると言われている Treg (免疫寛容) があります。それぞれのサブタイプに特異的に発現しているサイトカインがあります。IFN- γ 、INF- α は炎症性サイトカイン、IL-4、IL10、TGF- β は抗炎症性サイトカインです。今回は、IFN- γ 、INF- α 、IL17、IL-4、IL10、TGF- β について、共培養系の上清におけるサイトカインの測定を行いました。Th1 タイプでは、IL2 は、軟骨細胞が共培養されると有意差をもって減少しており、TNF- α も非常に少なくなっていました。ただし、IFN- γ は逆に数値が上がっていました。白血病患者さんにおいて骨髄幹細胞移植の際に起きる GVHD を抑制するのに間葉系幹細胞 MSC が細胞治療として用いられ、これも免疫抑制効果を持っているため GVHD

の治療に用いられているのですが、そちらの研究でも同様の報告があります。この作用機序は詳しく調べなければならないのですが、TH1 タイプサイトカインの生産は下がってきている傾向です。次に、Th2 タイプについて、IL4 に関してはほとんどの結果が検出限界以下でした。共培養系で若干上がってはいるのですが、かなり低い値でした。Th17 タイプに関しても、IL17 はいずれも検出限界以下でした。これら 2 つのサブタイプに関しては、ほとんど存在していないのではないかと思います。Treg タイプに関しまして、IL10 ですが軟骨細胞と共培養すると有意差をもって発現量が上がっていました。TGF- β に関しては軟骨細胞自身が高発現しているので、培養上清中に T 細胞のみでなく軟骨細胞由来のタンパク質も含まれると考えられることから、T 細胞由来のみの検出は出来ていません。今後、FACS などを用いて T 細胞だけに着目し、細胞表面抗原や細胞内タンパク質を染色することで軟骨細胞によってどのような影響を受けているか検討したいと思っています。

今後の予定として、同種リンパ球の挙動に及ぼす影響の検討として、多指症軟骨組織由来細胞のシートでの抑制効果の検証、継代数による抑制効果への影響の検討、共培養中の T 細胞のプロファイリングを綿密に行いたいと思います。また、抑制効果のメカニズムの解明として、活性化 T 細胞増殖抑制効果が高い条件と低い条件の軟骨細胞間で、タンパク質や RNA 発現の網羅的比較解析により、抑制効果に関わる因子を同定することで抑制メカニズムの解明につなげたいと考えています。

<質疑応答>

光島：最後のサイトカインの話は、軟骨細胞共培養下での話だと思いますが、前回の時に軟骨細胞と多指症細胞とでは性質が機能的に違うのではないかという話があったかと記憶しているのですが、いかがでしょうか。

加藤：はい。実は大人の軟骨細胞は、X 線照射で増殖抑制をしても、増殖効果が維持されているという結果が出ていますので、多指症由来と成人由来とではそのあたりで違いがあるかもしれません。何も処理しなければ多指症細胞でも活性化リンパ球の抑制効果も持っていますので、例えば外傷があるときに軟骨細胞シートを入れることで、治療効果もあるし、炎症の抑制という副次的効果もあると思います。

光島：来年度以降の予定を示されていましたが、ここで使われる軟骨細胞はヒト由来の成人の細胞と多指症の 2 種類の細胞を使うのですか。

加藤：そうですね。両方の比較をしたいと考えていますが、研究の問題上、多指症由来細胞は東海大学でしか扱えないという制限がありますので、研究室では市販の細胞しか使えないという制限はあります。

中谷：免疫チェックポイントの発現は見ていますか。

加藤：現在は見ていないのですが、今後プロファイリングは軟骨細胞の方もやらなければならないと考えております。

中谷：癌のほうでは、CTL が侵入ってきて抗腫瘍作用があるのですが、例えばそこで CTL

が INF- γ を出すと腫瘍組織側のカウンターで PD-L1 が誘導され、がん免疫抑制への影響があるという報告もされているようなので、INF- γ が上がっているのは、そのようなフィードバックがあった可能性もあるのではないのでしょうか。

加藤：はい、ありがとうございます。実は間葉系幹細胞の方も INF- γ で刺激されて初めて抑制効果を示すという報告もあるので、軟骨細胞も同様かもしれません、調べてみます。

(5) 「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）

本日の発表内容は、2点あります。はじめに、軟骨細胞シート専用着器材の開発の進捗状況について、2点目は、弊社の自己軟骨細胞シートの臨床治験に向けた取組みについてご報告致します。

現在、軟骨細胞シートの培養に使用しているのは、アップセルインサートという製品です。これは、カルチャーインサートと呼ばれる多孔膜上で細胞を培養する器材に対して温度応答性を付与したもので、既存の細胞培養器材を利用しており、培養面積が 4.2 cm² になっています。また、こちらを利用する際には専用の 6 ウェルプレート上で培養します。そのため、積層化やメンブレンの切り抜きに最適化されていない、培養面積より大きな軟骨欠損に対応できない、1枚のシートでも 6 ウェルプレートが必要などの課題があります。そこで、弊社では軟骨細胞シート専用の温度応答性器材の開発に取り組んでいます。

軟骨欠損の大きさについてですが、マイクロフラクチャー法として知られる骨穿孔法では 2 cm² まで、モザイクプラスティ法として知られる自家骨軟骨柱移植術 2~4 cm² までと考えられています。そこで、従来法では修復の難しい 4 cm² 以上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であると考えています。

これまで、従来のアップセルインサートの 2 倍の面積を持つ大型アップセルインサートの設計を行ってきました。まず、実績のある現行インサートによる培養条件を踏襲し、かつ大型化に伴い予測される課題を解消することを基本方針としています。前回までに 3D プリンターを用いて 2 回の試作を行い、操作性等を確認してきました。今回さらにいくつかの点を改善し、3 回目の試作を行っています。まず、細胞シートの剥離時の操作性を上げるために、インサート部の耳を 4 か所へ変更しました。また、自己の軟骨細胞の培養の際に、インサートを入れる容器の方に滑膜細胞をインサートに軟骨細胞を播種する共培養系を想定し、できるだけ滑膜細胞と軟骨細胞の距離が現行と同じになるように、培養容器表面とインサートの間の距離を現行の 0.9mm としています。その他、培養容器全体の高さを現行の 21mm に近づける等の変更を行っています。3 次試作品を先生方に見て頂きましたところ、ピンセット使用時のインサートの持ちやすさを改善させる必要がある等のご意見を頂き、さらに多少の設計変更を加えています。以上のような点を踏まえ、使いやすい大型アップセルインサートを設計し実際に金型による試作が出来ればと考えています。実際にこ

れまで 3D プリンターでの試作結果を踏まえて、現在最終形状案を検討中です。現在、図面がほぼ出来上がっており、成型業者との打ち合わせを行っている段階です。

次に、当社の臨床治験に向けた取り組みについて御報告します。先月、大筋ですが弊社の方針を決定することが出来ました。日本で自己細胞、同種細胞の開発を推進致します。企業治験については、自己細胞の治験を来年上期より開始したいと考えています。また、販売承認申請については平成 29 年度を目標としています。同種については、自己細胞の開発データを参考に今後推進していければと考えています。

自己軟骨細胞シートの臨床治験の開始に向けて、現在、以下のような項目を検討中です。この中で、品質管理体制(QMS)の構築、細胞シート製造体制の構築、治験実施体制(GCP)の構築については、現在着手して進めている段階です。

<質疑応答>

大和：インサートですが、多孔膜はどこから入手する予定ですか。

菊地：今のところ、現行のアップセルインサートと同じ膜を入手しようと考えています。

大和：入手することは可能なのですか。

菊地：安定して入手できるというところまでは進んではいませんが、入手することはできます。

大和：治験開始とは、どのような意味でしょうか。何をもって、開始と定義しているのでしょうか。

片山：治験開始につきましては、治験を実施する実施施設との契約完了、もしくは **first patient** を治験開始と考えています。

大和：前者の場合、我々は治験開始とは呼ばないと思います。もう少し厳密に喋った方がよいのではないかと思います。治験開始というのは非常にクリティカルなことなので、患者さんに導入することが **must** だと思いますが。

菊地：ありがとうございます。

大和：大きなインサートは何に入れて培養するのですか。

菊地：インサート部分と受ける側の容器も専用に作製しています。

大和：わかりました。

大和：現行のインサートの問題点の最後に、1枚のシートでも 6well プレートが必要とのことですが、1枚のプレートで複数のシートを培養すると、ハンドリングミスによる影響が大きいというのは納得しにくいです。手技者の都合であり、インサートが原因ではないと思うのですが。

菊地：はい、インサート自体の問題の指摘ではなく、あくまでの専用の受け皿を作ることの説明を強調するために申し上げました。

大和：わかりました。

光島：インサートの話が出ましたが、それ以外の専用器材は佐藤班の研究に関して用意さ

れているのですか。

菊地：現在のところ、開発が始まっているのは今回紹介したこの器材のみです。

光島：前回もお話しがあったかと思いますが、セルシートの方でPMDAによる戦略相談を受けるとのことですが、それは膝関節の再生医療に特化した形での医療機器としての申請ということでしょうか。

菊地：先行するのは、自己の軟骨細胞シート自体の製造販売承認申請です。

光島：時期はいつごろを予定されていますか。

片山：まだ具体的な日付は決まっておりませんが、先ほど冒頭でお話しがあったように、先進と合わせて足並みを揃えて準備を進めています。

光島：先進医療Bの相談に合わせてということでしょうか。

片山：そうです。

佐藤：先進の方は粛々と進めていきます。企業治験の方は、薬事戦略相談もまだ行っていませんので、そこでどういった立付けでいいのかなども含めてご指導頂ければと思っています。

中谷：今は、シートの大きさとしては4.2 cm²以下のものを先進医療Bでもやるだろうし、その先の自己の企業治験の方も現在検討している大型のものではなく、従来の6wellプレートで行ったデータを使うのですよね？

佐藤：この先変更があるかもしれませんが、現時点では先進で考えているのは、今と同じプロトコルで行くので4.2 cm²以下でやることになると思います。そもそも、4.2 cm²の大きさの根拠ですが、厚労省の再生医療推進室の当時の室長と相談した際に、大きさと年齢の制限をある程度決めた方が良いということになりました。今の器材で作れる1枚の大きさが4.2 cm²ですので、もしシートが1枚しかできなかった際に、それより大きな欠損の患者さんが来た時に移植できないということになってしまうため4.2 cm²としました。将来的に器材で大きなシートが作れるのであれば、4.2 cm²以上の欠損も治せるのであればということで、このような開発も行っています。とは言え、実際は欠損部位がまん丸く空いている患者さんは少なく、だいたい楕円形になっていますので、1枚で覆えない患者さんもいらっしゃいます。自己細胞の臨床研究では、2~6枚の細胞シートが作製出来ていましたので、それを重ね合わせて1か所に対して何枚も移植しているという現実があります。実際、今のままでも大きなものを沢山作れば被えない欠損はないのですが、4.2 cm²という決まりを設けた理由がそもそも器材の大きさが4.2 cm²だからという理由でしたので、それならば大きなものも開発しようということで、開発を進めております。

中谷：細胞シートの大きさというのは、規格のところでも重要になってくるのではないかと思います。企業治験になった時に、従来の4.2 cm²でやって、申請で完成した大きいのでするのは、どうなのでしょう。

佐藤：どのタイミングでこちらに移行するかというのは、今の段階では私の口からは申し上げられませんが、実際にできているのは4.2 cm²以下の患者さんにしか適応していませんの

で、それよりも大きな欠損をお持ちの患者さんに適応を広げるのであれば、そのときにこのようなものも使うことになるかもしれません。

中谷：同種にしる、自己にしる、初回申請の時から大きい方の細胞シートで申請するのか、追加的にやっていくのか、その部分の戦略は考えておいた方がよいのではないのでしょうか。

佐藤：ご指導ありがとうございます。今後、薬事戦略相談等含めて検討していきたいと思えます。

中谷：大きさが大きくなった時に、ガラス化して保存するときの容器は対応できるのですか。

佐藤：細胞シートのガラス化のことでしょうか。

中谷：将来、大きくした際に問題はないのでしょうか。

佐藤：たぶん大丈夫だと思いますが、長嶋先生いかがでしょうか。

長嶋：例えば、今より大きさが 10 倍になるとすると原理から変わってくると思いますが、2-3 倍であれば今と同様の原理で対応できると思います。

中谷：わかりました。

3. 事務連絡

光島：医薬基盤研の方からお伝えしたいことがあります。4 月から AMED が発足します。厚労科研のこの研究事業ですが、全て AMED に移管されます。進捗管理について、主体は AMED に移りますが、具体的な活動については従来通り基盤研の方に委託されまして、実施させて頂く事になりました。来年度の事業管理スケジュールは未定ですが、5 月をメドに決定されますので、その時にご連絡させていただきます。AMED に移っても、これまでの進捗管理については変わらないということになります。

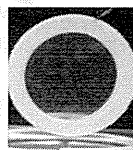
佐藤：本日は第 2 回班会議にご出席頂きましてありがとうございました。5 年プロジェクトの 3 年が終了致しますが、順調に進んでいますので、今後とも PO の先生方、厚労省、PMDA の方々、細胞シートの専門家として大和先生にご指導頂きながらプロジェクトを進めていきたいと思っています。本日は誠にありがとうございました。

4. 閉会

以上

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現

厚生労働省科学研究費補助金再生医療実用化研究事業
平成26年度第2回班会議
2015年3月18日パシフィコ横浜



研究代表者
東海大学医学部外科学系整形外科学
佐藤正人

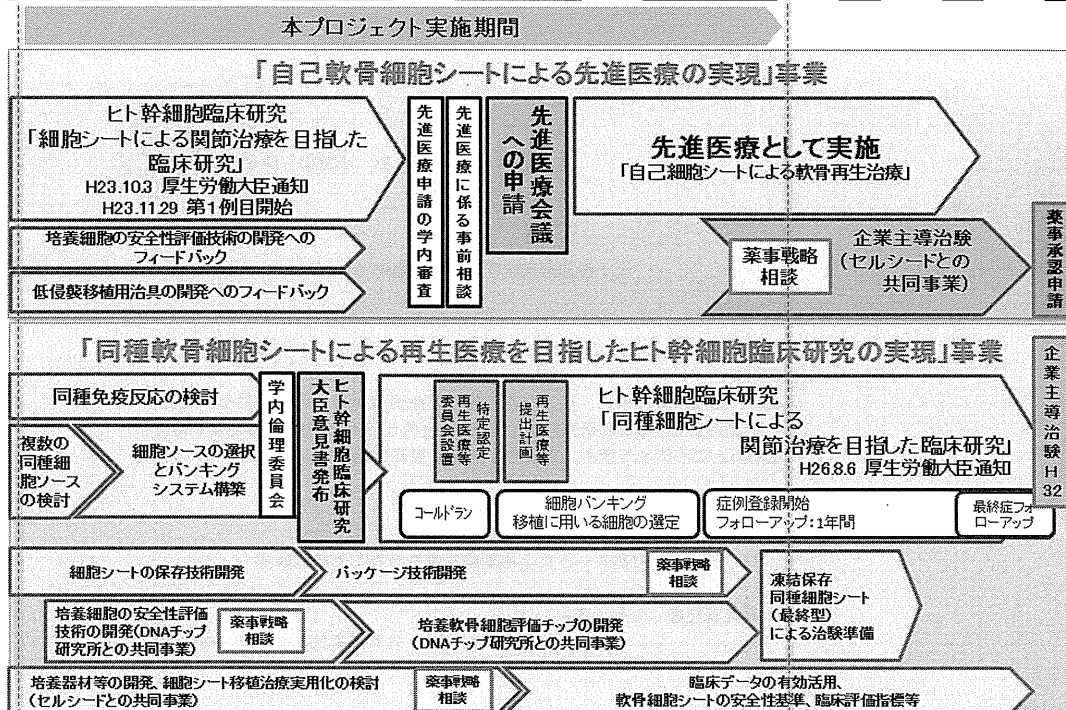


DEPARTMENT OF ORTHOPAEDIC SURGERY
TOKAI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE



厚生労働省科学研究費補助金 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」 ロードマップ

H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31





再生医療等安全性確保法説明会(特定細胞加工物製造関係) 実施要領

1 目的

平成26年11月25日再生医療等安全性確保法が施行され、特定細胞加工物を製造する際には製造の許可又は届出が必要となった。

法施行日において特定細胞加工物を製造している細胞培養加工施設は、6か月間は許可を受けずに又は届出せずに特定細胞加工物を製造できるが、この経過措置は平成27年5月24日で終了することから、経過措置終了前に、

- ・許可申請又は届出を行う必要性について認識してもらうことを徹底したい。
 - ・許可申請又は届出に係る必要な手続き等について正確に理解してもらうことを徹底したい。
- これらを目的として説明会を開催する。

2 主催者

厚生労働省関東信越厚生局

3 開催日時

平成27年3月19日(木)午後2時～4時

4 開催場所

さいたま市中央区新都心1番地1

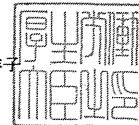
さいたま新都心合同庁舎1号館2階講堂(450名収容)



厚生労働省発医政 1003 第 3 号
平成 23 年 10 月 3 日

東海大学医学部
医学部長 今井 裕 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子



ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成23年3月3日付で申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。

なお、臨床研究の中止、終了などに伴う厚生労働大臣への報告については、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成22年厚生労働省告示第380号)の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するようお願いする。

記

課 題 名：細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

研究責任者：佐藤 正人

(東海大学医学部・外科学系整形外科学・准教授)



自己細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究

【対象患者】

終了(H27年1月27日総括報告書提出)

・20～60歳

・外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

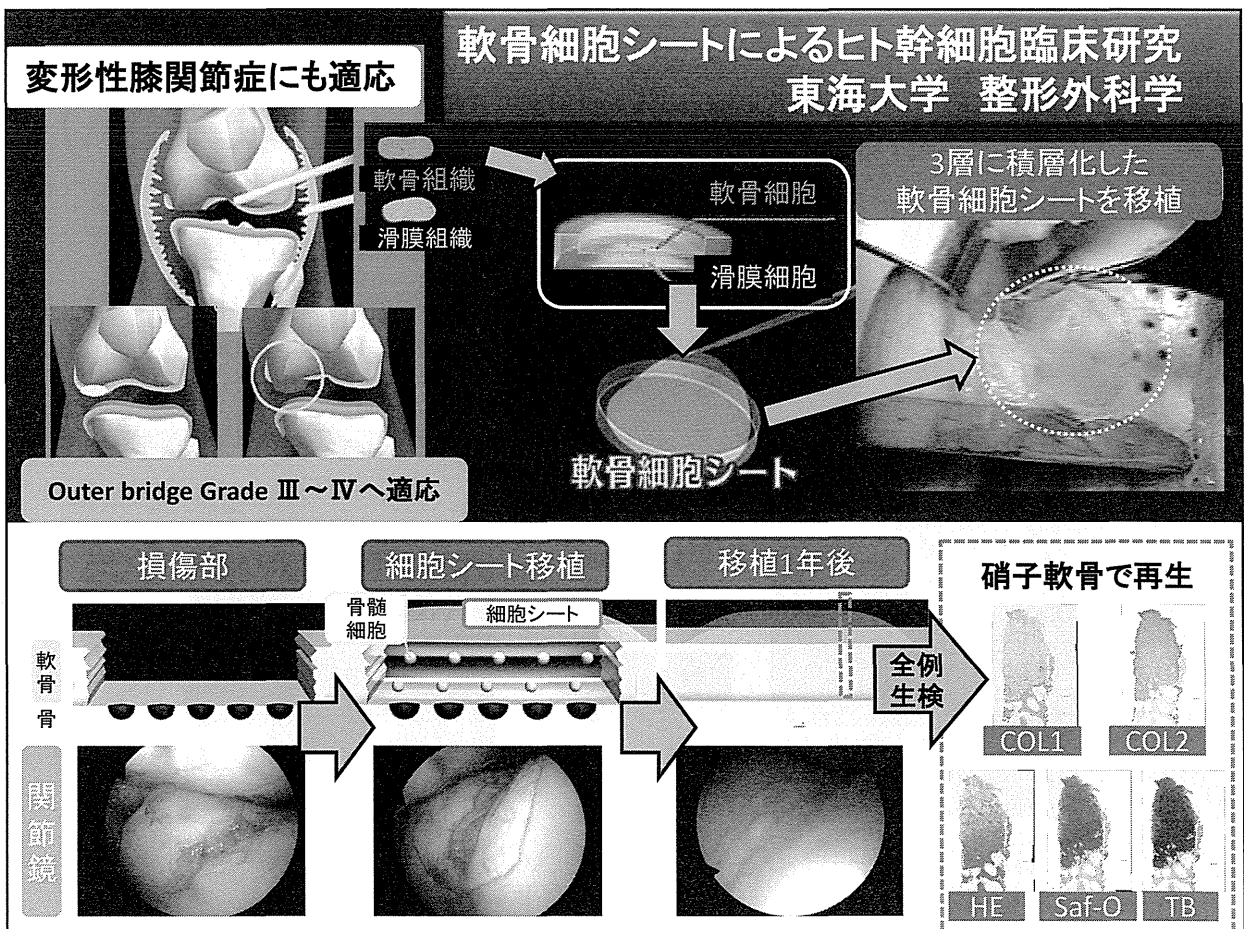
軟骨損傷を合併した観血的整復固定術、靱帯再建術、高位脛骨骨切り術、関節鏡視下手術の適応患者で、関節鏡所見で膝関節軟骨損傷部 Outerbridge分類Grade III以上の症例を対象とする。

・大きさ4.2cm²以下の軟骨損傷

→ 様々な程度の軟骨変性度を有する患者に適用する

【エンドポイント】

- ①有害事象の頻度
- ②術後1年までの臨床評価基準における点数
- ③術後1年までの単純レントゲン写真評価基準における点数
- ④術後1年までのMRI評価基準における点数
- ⑤術後1年時での超音波検査による粘弾性評価（関節鏡）
- ⑥術後1年時での組織学的評価点数（関節鏡視下生検サンプル）





「自己軟骨細胞シートによる先進医療実現」事業 薬事承認までのロードマップ改訂



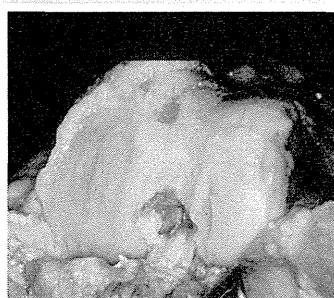
対象患者: 外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷を対象患者とする。

選択基準:
 ・20歳から60歳、性別不問
 ・膝関節軟骨損傷を有し、軟骨損傷がOuterbridge分類Grade III以上
 ・1.0 cm²以上4.2cm²未満の軟骨欠損

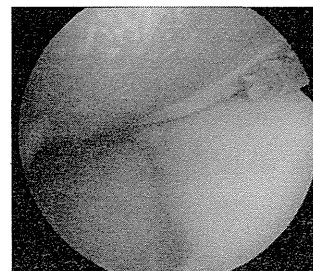
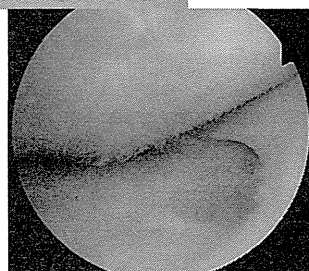
除外基準:
 ・患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合。
 ・重大な合併症を有している場合。
 ・問題となるような感染症を有している場合。



変形性膝関節 (Osteoarthritis: 以下OA)



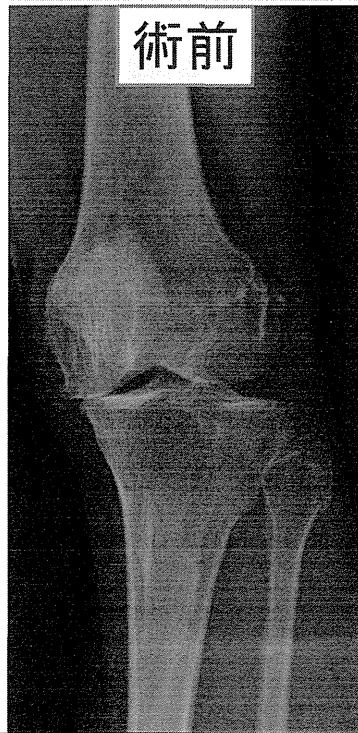
- ・ 中年から高齢者
- ・ 下肢荷重関節に好発
- ・ 疼痛・可動域制限
- ・ ADL低下
- ・ 徐々に進行する軟骨変性



初期から中期
軟骨部分欠損: 毛羽立ち、亀裂

末期
全層欠損: 軟骨下骨の露出

高位脛骨骨切り術



自家(自己)培養軟骨細胞移植 (ACT/ACI)

健康部2箇所を犠牲

