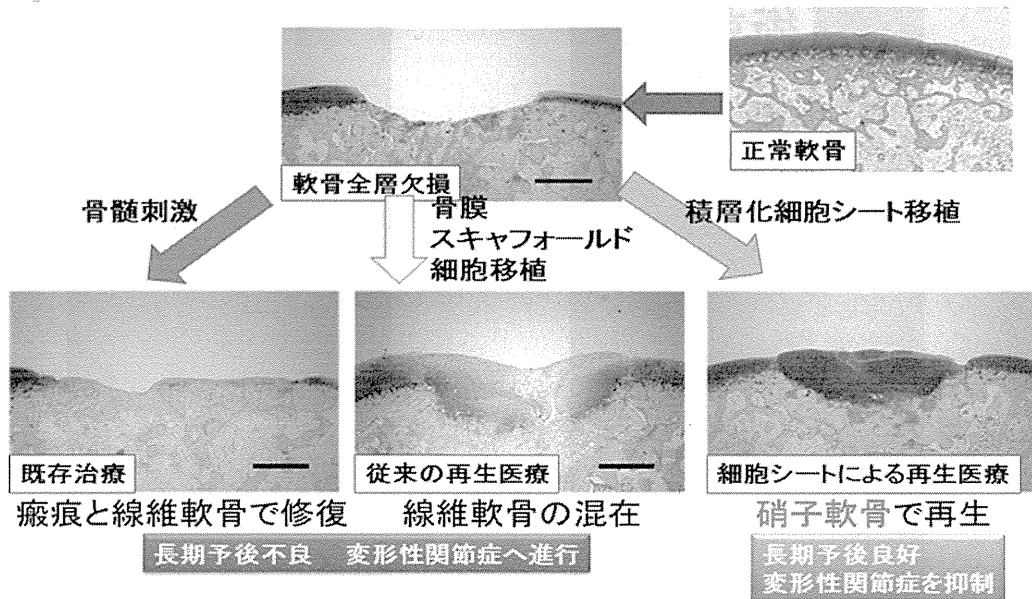


関節軟骨全層欠損の修復・再生



Ebihara G, et al, Biomaterials 2012
 Ito S, et al, Biomaterials 2012
 Takaku Y, et al, Biomaterials 2013

変形性膝関節症の克服のために

アライメント不良 ⇒ 骨切り術
 不安定性 ⇒ 前十字靭帯再建術、半月板縫合術
 軟骨欠損 ⇒ 細胞シート移植術 (縫合不要)

手術療法

骨棘
 骨質
 軟骨下骨

薬物療法

血管新生
 疼痛
 炎症

理学療法
 患者教育

筋力低下
 生活習慣、様式

自己細胞シートの問題点

- 組織採取のための関節鏡と移植手術の2回の手術を要する。
- 健常部からの採取量には限界があるため、複数回の手術は困難である。
- 必ずしも活きの良い細胞とは言えない。
- 高齢のOA患者では、遺伝子異常を認め易い。

同種軟骨細胞のセルソースの検討

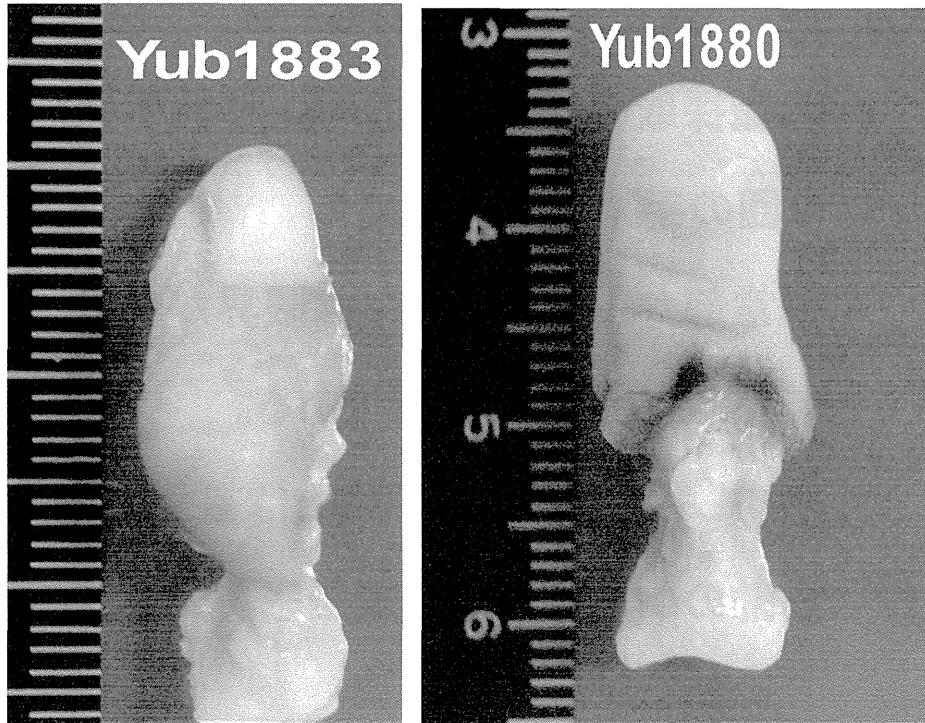
1. 手術時廃棄組織

多指症手術



多指症手術時切除検体

国立成育医療研究センターとの共同研究



1個の多指症手術時切除検体から 積層化細胞シートは何枚作れるか？

成育医療センターのストックリスト(年齢・部位・検体の大きさによりばらつきあり)

P0 : 1.00×10^6 cells ~ 9.00×10^6 cells

↓

P1 : 4.50×10^6 cells ~ 4.05×10^7 cells

4.5倍(経験値)

↓

P2 : 2.03×10^7 cells ~ 4.70×10^8 cells

4.5~11.6倍

↓

P3 : 9.11×10^7 cells ~ 4.98×10^9 cells

積層化細胞シート
約745枚分(P2)

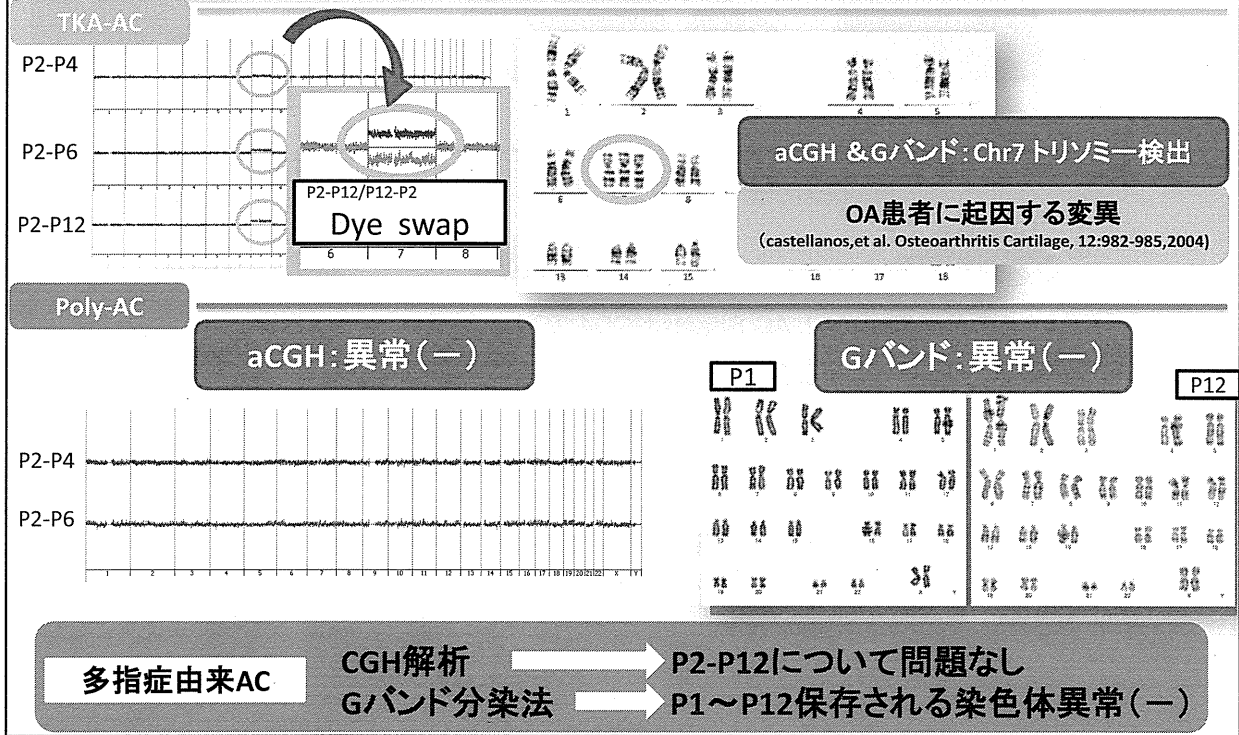
P0ストックを起こしてから約3週で
最大49億 cells に増殖(P3予測値)

積層化細胞シート
約7,904枚分(P3)



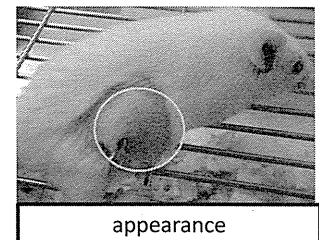
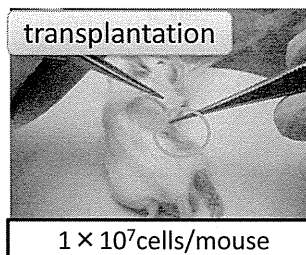
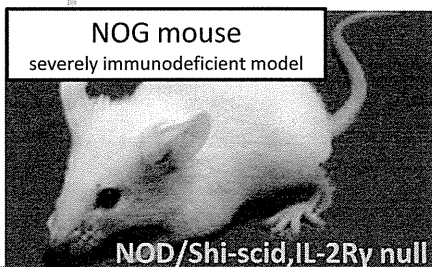
in vitro : aCGH解析, Gバンド分染法

国立成育医療研究センターとの共同研究
株式会社DNAチップ研究所との共同研究



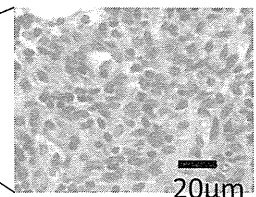
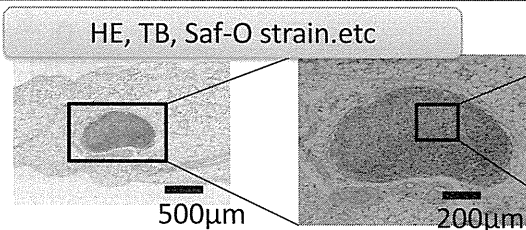
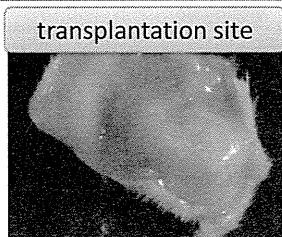
Tumorigenicity Analysis *in vivo*

~ using severely immunodeficient animal model ~



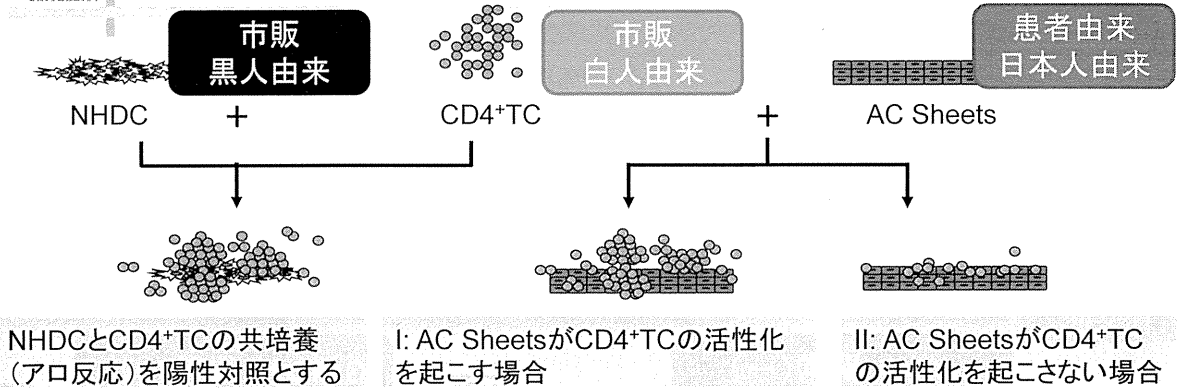
The chondrocytes derived from patient transplanted into immuno-deficient animal.
evaluated by WHO and FDA reports

Histopathological evaluation at main internal-organs and transplanted site of tissue



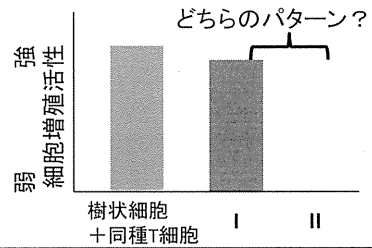


同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響 国立医薬品食品衛生研究所との共同研究

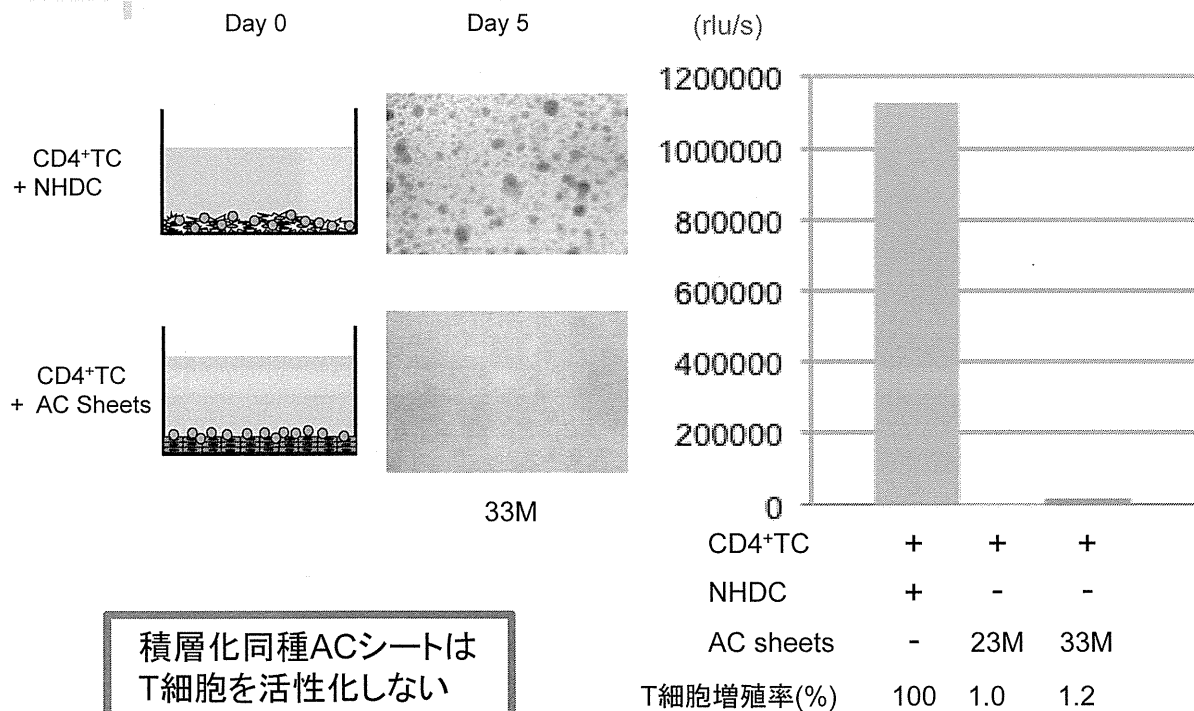


[細胞増殖解析]

増殖している細胞をBrdUで標識し、それらを検出することで、細胞増殖活性を測定する。



同種軟骨細胞シートが同種T細胞におよぼす影響 国立医薬品食品衛生研究所との共同研究





同種細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究の承認

平成26年8月6日厚生労働大臣通知
平成26年8月16日読売新聞夕刊1面

大

厚生労働省発医政0806第9号
平成26年8月6日

東海大学医学部
医学部長 今井 裕 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成26年4月25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25年厚生労働省告示第317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：同種細胞シートによる関節治療を旨とした臨床研究

研究責任者：佐藤 正人
(東海大学医学部 外科学系整形外科 教授)

高齢者のひざ痛治療 他人の軟骨細胞移植

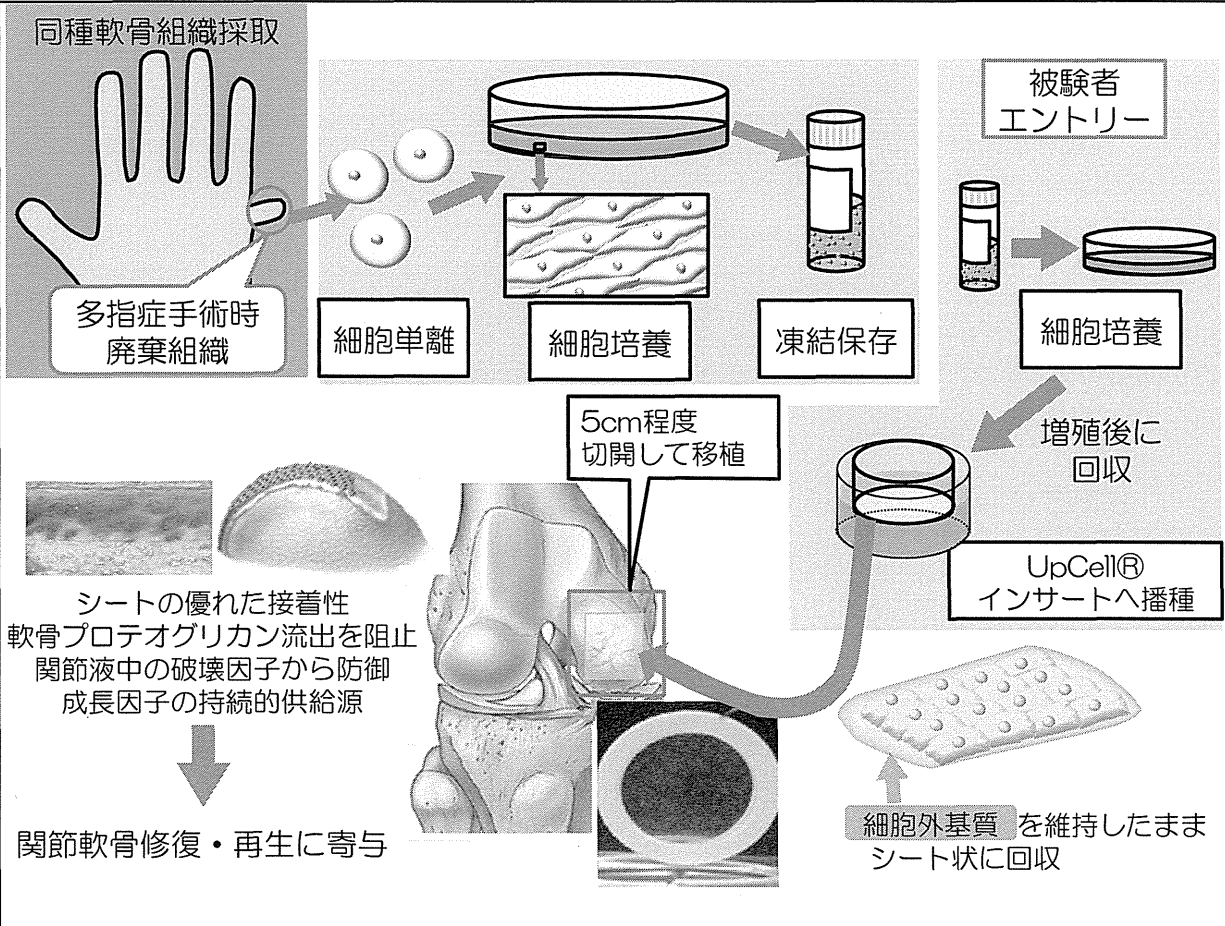
東海大臨床へ

加齢で膝の軟骨がすり減って痛みが出る「変形性膝関節症」の患者に、培養した他人の軟骨細胞を移植し、機能を回復させる試みが行われる。今後5年間で患者10人に移植する計画で、他人からの軟骨細胞を移植する仕組みが、変形性膝関節症を治療する仕組みと位置づけられている。計画によれば、子供などの手術で軟骨を切除した際に、同種移植した軟骨細胞が再生する。

「変形性膝関節症」は、加齢や過剰な運動、肥満などで、膝に過大な負担がかかることになりやすい。重症の場合は、人工関節に置き換えるため、手術が必要になる。その中でも、関節の機能を回復させるために、軟骨移植が行われる。移植した軟骨細胞は、移植された部位で増殖し、機能を回復させる。移植した軟骨細胞は、移植された部位で増殖し、機能を回復させる。移植した軟骨細胞は、移植された部位で増殖し、機能を回復させる。

患者は国内で1000万人以上と推定され、「高齢者が多い。症状が悪化し、歩行が困難になると、そのまま、介護が必要になる人も少なくない。高齢化が進む中、国は「重点的に予防などの対策を進める」と位置づけられている。計画によれば、子供などの手術で軟骨を切除した際に、同種移植した軟骨細胞が再生する。

変形性膝関節症は、膝関節の軟骨の表面を覆い、クッションの役割を果たす軟骨が、すり減って痛みを病む。加齢や過剰な運動、肥満などにより、膝に過大な負担がかかることになりやすい。重症の場合は、人工関節に置き換えるため、手術が必要になる。その中でも、関節の機能を回復させるために、軟骨移植が行われる。移植した軟骨細胞は、移植された部位で増殖し、機能を回復させる。移植した軟骨細胞は、移植された部位で増殖し、機能を回復させる。



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

多指症由来細胞の 長期保管システムの構築

高野りや 高橋匠 佐藤千香子
(東海大学)

はじめに

ICH (日米EU医薬品規制調和会議) 品質ガイドラインQ5D

【2-2 細胞のバンク化】

生物薬品を製造する上で、段階的に継代された細胞を使用することの最も有利な点の1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、全製造ロットに使用できることである。

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・品質管理のなされた有効性・安全性の高い同一ロットの細胞基剤を、細胞シート製造に用いることができる点で優位である。

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ており、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1段階方式のバンキングシステムである。

セル・バンク化の手法

- ① 細胞加工工程での汚染の防止
- ② 取り違えの防止
- ③ 適切な条件下での細胞凍結
- ④ 解凍後の細胞生存率の保持
- ⑤ 超低温化での長期保管
- ⑥ 保管システムのリスクマネジメント

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内で行う。最終製品はクリーンベンチ内で、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ぐ。

② 取違えおよ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を扱わない。
- ・ 全ての物品は1検体毎に新しいものを用意し、余剰分は破棄する。
- ・ 1ロットごとに専用の凍結保管箱にて保存する。

以上の工程は標準作業手順書に従い、作業毎に2人以上による確認を行いながら実施することにより、検体の取違えや交差汚染を防ぐ。

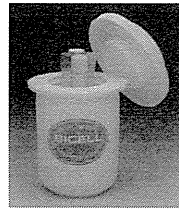
③ 適切な条件下での細胞凍結

細胞凍結方法

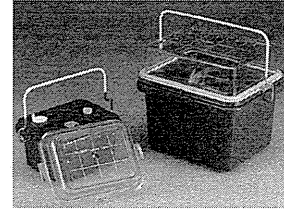
凍結保存液 (STEM-CELLBANKER ※1) に懸濁・分注
 ↓
 凍結処理容器 (BICELL ※2) にて -80°C まで緩速凍結
 ↓
 液体窒素細胞保管タンクに移動 ※3



※1 「STEM-CELLBANKER」
 タカラバイオ社
 原薬等登録原簿(MF)登録



※2 「BICELL」
 日本フリーザー社



※3 冷却保持容器
 「LabTopCooler」
 サーマフィッシャー社

④ 解凍後の細胞生存率の保持

窒素タンク気相保存2ヶ月後の細胞生存率

		1	2	3	Average
解凍時の 細胞生存率	生細胞数 ($\times 10^4$ cells)	17.0	24.8	22.0	21.3
	生存率	93.2%	99.0%	97.8%	96.6%

解凍培養後5日目の細胞生存率

		1	2	3	Average
培養5日目の 細胞増力率と 生存率	増殖率	12.2	8.6	11.9	10.9倍
	生存率	100.0%	96.6%	99.4%	98.7%

⑤ 超低温下での長期保管

アイソサーマル気相式液体窒素サンプル保管システム
形式『V-1500AB』（カスタム・バイオジェニック社）

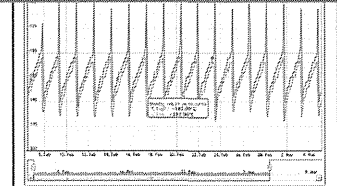
- サンプル貯蔵スペースに完全に液体窒素がない(気相)状態で超低温を維持
- 液体窒素の飛散がない
- 内部がよく見えるため開閉作業が容易

13段ケーンを28本設置可能
上部の温度変化を考慮し下9段使用
28本×9箱 = 252検体の保管可能

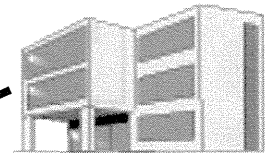
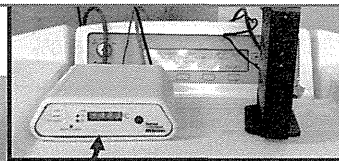


⑥ 保管システムのリスクマネジメント

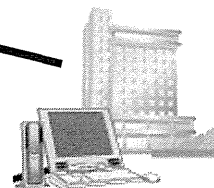
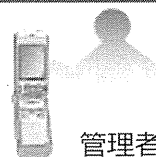
⑤ LAN/クラウド(Web Storage)



④ ネットワークベースステーション(VerseAlert)



⑥ 緊急時アラート



③ タンク庫内温度/液体窒素残量表示盤



② 液体窒素供給自動切替装置

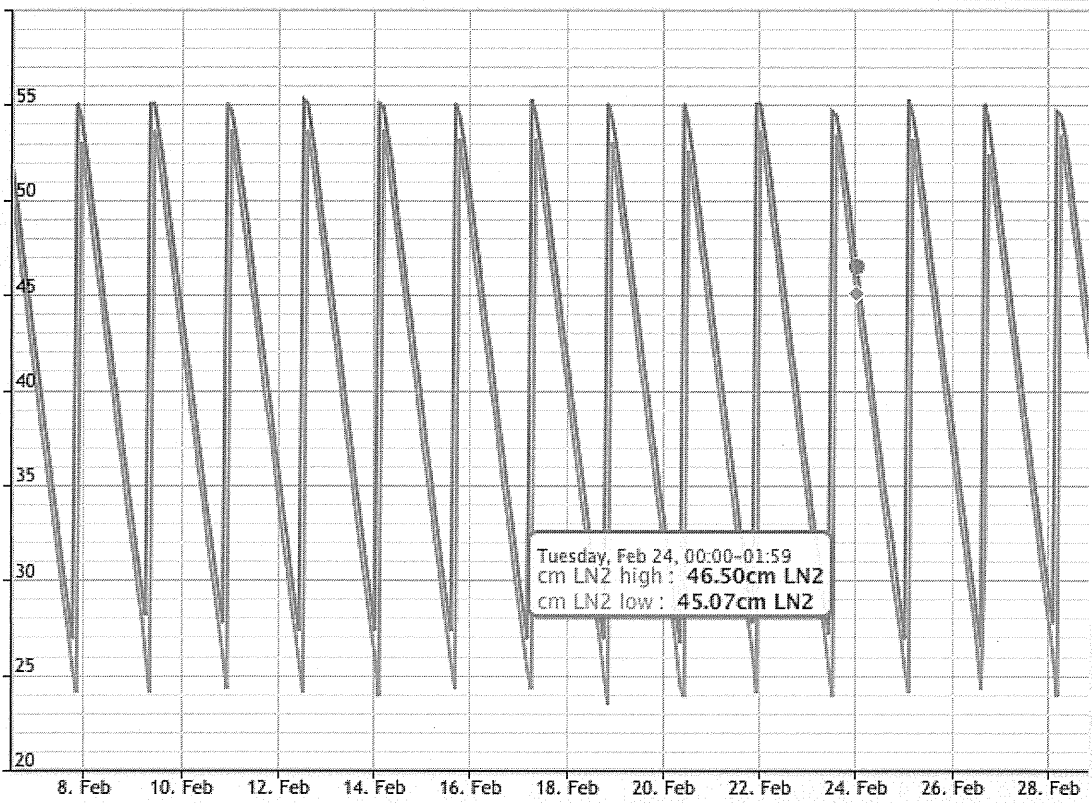


① 気相式細胞保管タンク

MAC: 0003941A7D60, Channel: 0, Sensor: LEVEL

Zoom 3d 1w 1m All

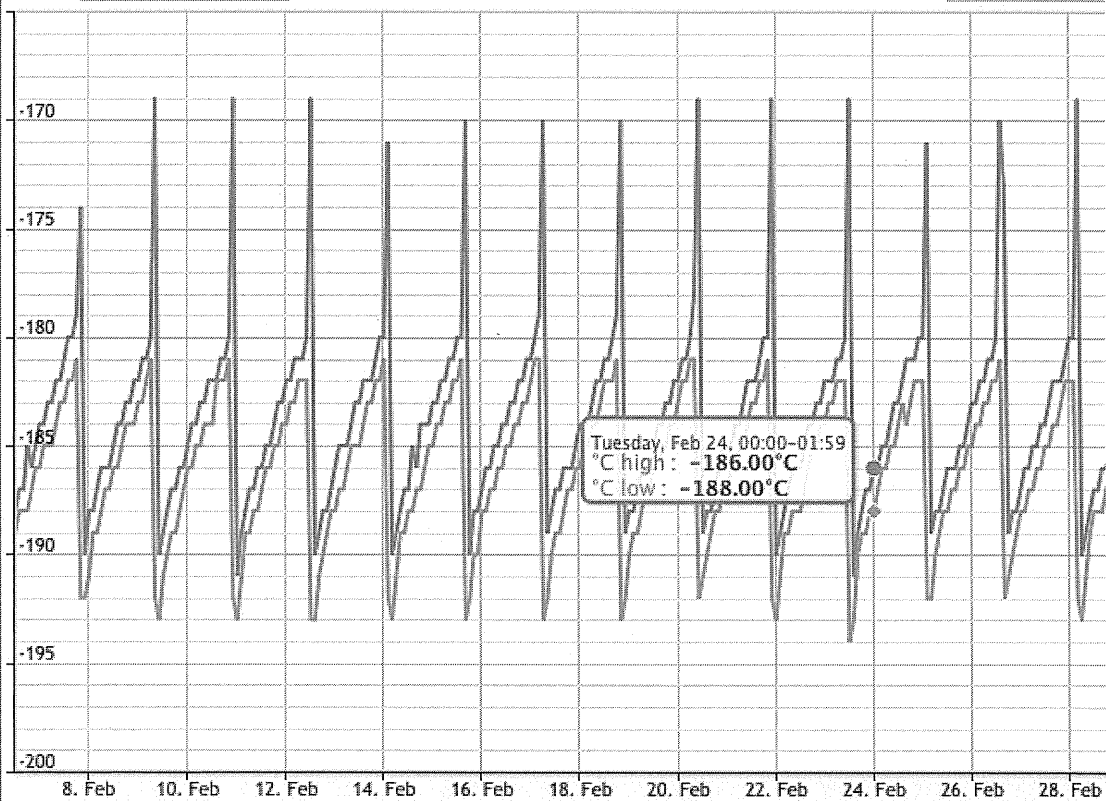
From Feb 6, 2015



MAC: 0003941A7D60, Channel: 0, Sensor: Temperature

Zoom 3d 1w 1m All

From Feb 6, 2015



ウサギ軟骨細胞シートの 長期保存法の開発

明治大学 発生工学研究室
前原美樹、松成ひとみ、長嶋比呂志
2015/03/19

背景と目的

◆背景◆

細胞シートの凍結保存は・・・

- 細胞シートの作製と移植実施時期の調整を容易にする
- 治療用シートのストックを可能にし、allograftの移植を促進する

◆目的◆

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保存する、実用的方法の開発

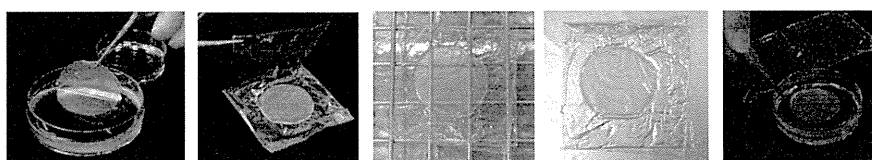
細胞シートのガラス化法

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets

Miki Maehara^{1,2}, Masato Sato³, Masahito Watanabe^{1,2}, Hitomi Matsunari^{1,2}, Mami Kokubo³, Takahiro Kanai¹, Michio Sato⁴, Kazuaki Matsumura⁵, Suong-Hyu Hyon⁶, Munetaka Yokoyama³, Joji Mochida³ and Hiroshi Nagashima^{1,2*}



今年度の取り組み

□ 実用化に向けた改良研究 (第1回班会議にて報告済み)

—非積層化細胞シートへの応用拡大

→ 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ることが示された。また、前処理時間の短縮が可能であることが分かった。

—長期保存を目的とするパッケージング素材の検討

→ アルミニウム箔による細胞シートのパッケージングは、液体窒素ガス気相中 (約-150C)、液体窒素中 (-196C) いずれの保存状態にも耐えうる。

—市販予定ガラス化保存液 (バイオベルデ社) の有効性の確認

→ 市販予定ガラス化保存液の有効性が確認された。

□ 長期保存後の細胞シートの評価

(凍結保存デバイスの開発; 特許出願準備中)

細胞シートの凍結保存デバイス (特許出願予定)

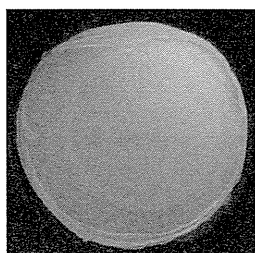
特許出願準備中につき
写真削除

長期保存されたガラス化細胞シートの評価

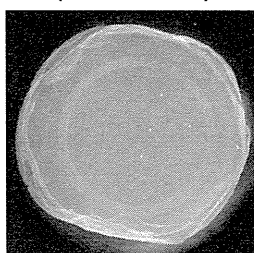
実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率
ガラス化区	0日間※	100% (1/1)	83.4% (n=1)
ガラス化保存区	2週間	100% (2/2)	83.2% (n=2)
非ガラス化区	-	100% (1/1)	84.1% (n=1)

※3層化ウサギ軟骨細胞シートをガラス化直後に融解した。

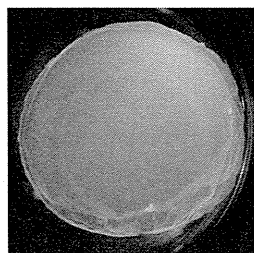
ガラス化区
(ガラス化直後に融解)



ガラス化保存区
(2週間保存)



非ガラス化区

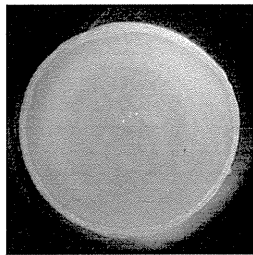


長期保存されたガラス化細胞シートの評価

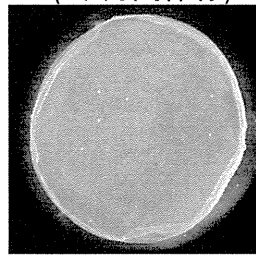
実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率*
ガラス化区	0日間※	100% (3/3)	78.0% (n=3)
ガラス化保存区	1ヶ月間	100% (3/3)	79.2% (n=3)
非ガラス化区	-	100% (2/2)	82.2% (n=2)

※2層化ウサギ軟骨細胞シートをガラス化直後に融解した。
*各区間に有意差なし。

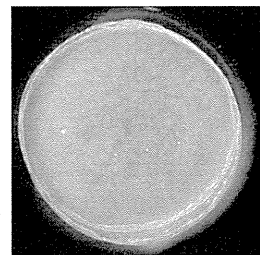
ガラス化区
(ガラス化直後に融解)



ガラス化保存区
(1ヶ月間保存)



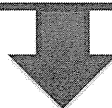
非ガラス化区



まとめ

◆液体窒素気層中で長期間保存(最大1ヶ月)された細胞シートは、シート構造の維持、細胞生存性ともに良好であった。

◆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なかった。



安定的に細胞シートの長期保存が可能

今後の計画

- ◆ 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
- ◆ ヒト細胞シートへの応用拡大

厚生労働科学究事業 H24-再生-一般-003
「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

同種細胞シートの特性と安全性に関する研究

—軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響—

2015.3.19(木)

パシフィコ横浜 会議センター4階(413号室)
国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 加藤玲子

研究の背景・目的

これまでに、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷に対して、温度応答性培養皿上で作製した自己積層化軟骨シートを用いた臨床研究により、その関節軟骨修復再生の有効性を示してきている。しかしながら、本技術を用いた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る。

○ 同種細胞利用の利点

- ・ レディメイドの細胞シートを作製することが可能になり、患者さんの負担軽減および、より計画的な移植が行える。
- ・ 同一ドナーからの細胞だと、細胞の品質(情報)が予め分かる。
➡ 品質のよい細胞の選択も可能になる。

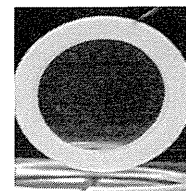
○ 同種細胞ソースの候補: 多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs)

- ・ 優れた増殖性
- ・ 手術時廃棄組織 ➡ 倫理上の問題も少ない。

○ 同種細胞移植において懸念される問題

- ・ 拒絶反応を引き起こす可能性がある。

これまでの経験上、軟骨組織は免疫応答が低いと言われているが、実際に同種軟骨細胞が宿主内で、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い。我々は、同種軟骨細胞およびその積層化シートが免疫反応に及ぼす影響を*in vitro*で検討してきた。



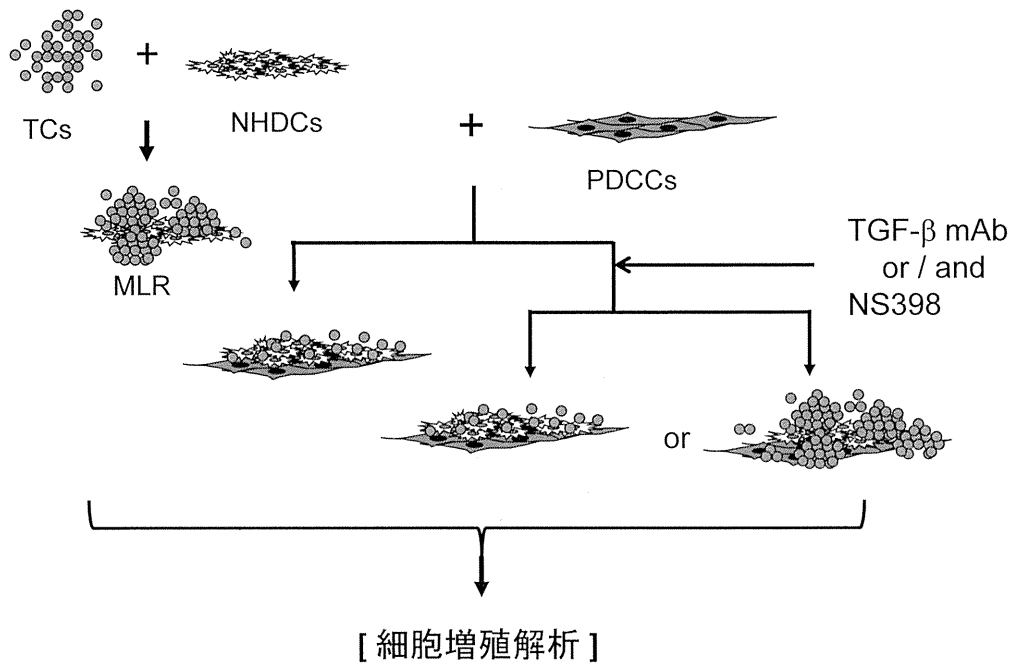
抑制機構のメカニズムの解明

軟骨細胞側からの検討

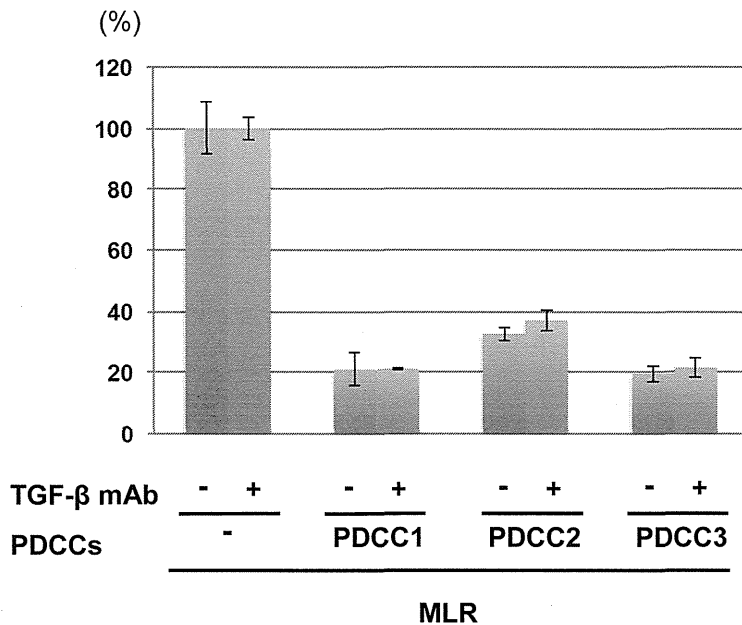
液性因子の影響

- ・TGF- β : TGF- β mAB(中和抗体)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？
- ・PGE2: アラキドン酸カスケードで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、PDCCsによる増殖抑制効果が減弱するか？
- ・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？

実験方法

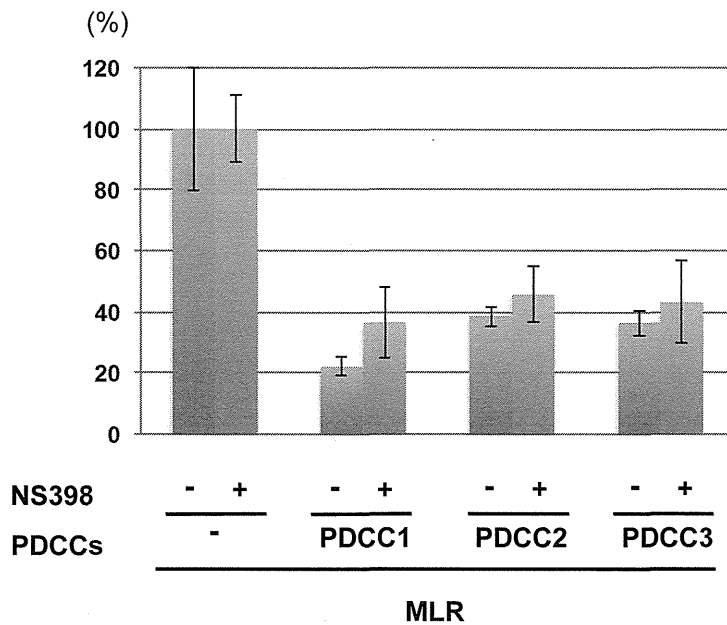


TGF- β の影響



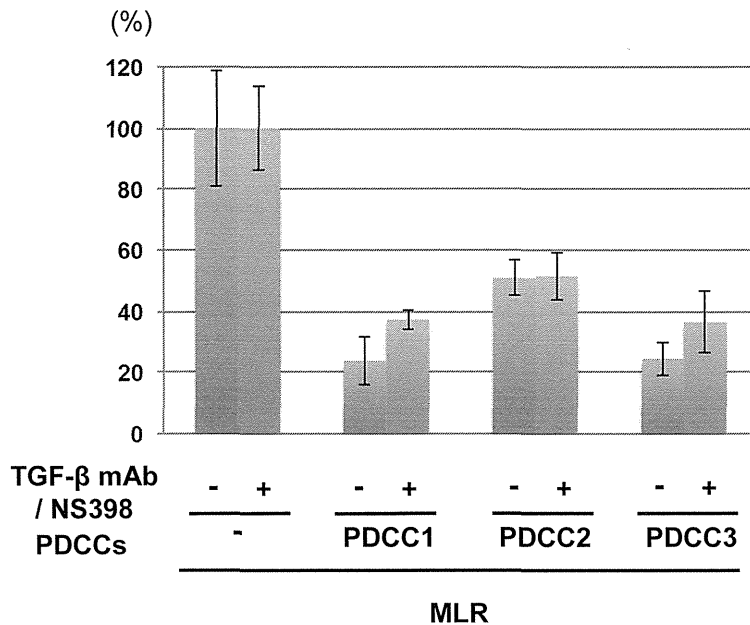
TGF- β 中和抗体により、培養液中のTGF- β 1量はMLRのみと同等レベルまで低下してしたが、PDCCsとの共培養により抑制されていたT細胞の増殖活性には影響がみられない。

PGE2の影響



NS398を添加してPGE2量を減少させても、PDCCsとの共培養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ない。

TGF- β / PGE2の影響



TGF- β 1およびPGE2を同時に抑制しても、PDCCsによるT細胞増殖抑制効果には影響がみられない。

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やPGE2以外の要因の関与が強いことが示唆された。

間葉系幹細胞免疫原性が低く、免疫細胞の活性化を抑制するという性質を有しているが、その免疫細胞活性化抑制効果には

- 1: 液性因子による抑制
 - 2: 接触に依存した抑制
- の両方の関与が示唆されている。

接触培養条件下における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ある。

非接触培養条件下にて検討

別ルートからの検討