

## 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）

の場亮、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す。

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り組んでいます。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コラーゲンで濃染され、組織染色のサフランin 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、各種のスク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 0 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という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のでしょうか。

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は思いますが、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います。

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事でよろしいでしょうか。

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です。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います。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も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という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か。

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す。

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。どちらかというところ、トロフィック効果のほうが強いです。

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も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 は有用ですので、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思ったのですが。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せん。窒素が満タンの時は液面の高さが 55 cm 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、 $-190 \sim -180$  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、確かにバイオリ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こと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っ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と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できて、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との話で、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だと言わないと、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分のプロトコー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气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。こちらも非ガラス化シートの成績・ガラス化後に即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発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 分のプロトコールで行いました。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も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、期限はどうなのでしょう。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によろしいですか。

佐藤：ヒト幹の方は、このプロトコールではありません。

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しょうか。

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、佐藤先生の臨床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：こ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の原材料基準のようなものがあったと思います。

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、どこで作るのかなどと思います。結局どこで作るのかは、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- $\beta$



やプロスタグランジン E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)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- $\beta$  抗体や PGE<sub>2</sub> 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- $\beta$ 1 や PGE<sub>2</sub> 以外の要因の関与が強いことが示唆されました。TGF- $\beta$ 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<sup>+</sup>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- $\gamma$ 、INF- $\alpha$  は炎症性サイトカイン、IL-4、IL10、TGF- $\beta$  は抗炎症性サイトカインです。今回は、IFN- $\gamma$ 、INF- $\alpha$ 、IL17、IL-4、IL10、TGF- $\beta$  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- $\alpha$  も非常に少なくなっていました。ただし、IFN- $\gamma$  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われます。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- $\beta$  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 が侵入してきて抗腫瘍作用があるのですが、例えばそこで CTL

が INF- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 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。何をもち、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良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 だと思いたすが。

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 cm<sup>2</sup>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、今と同じプロトコールで行くので4.2 cm<sup>2</sup>以下でやることになると思います。そもそも、4.2 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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、今のままだ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 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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 cm<sup>2</sup>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：同種にしろ、自己にしろ、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り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