

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業） 総括研究報告書

関節軟骨病変に対する自己滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織移植法に関する研究

研究代表者 中村 憲正 大阪大学招聘教授

研究要旨

我々は軟骨に対する新規再生医療法として、スキャフォールドを用いず関節軟骨欠損に応じて自在に三次元形態を成型できる間葉系幹細胞（MSC）由来人工組織（TEC）を開発し、大動物を用いた前臨床試験、さらに安全性・毒性試験（GLP 準拠）を終了させた。将来の産業化を見据え、本研究では、ヒト幹細胞臨床研究実施と安全で確実な医療体系構築を目的とする。特に、厚生労働省の高度医療申請に必要なエビデンスを確立させる。

平成 24-26 年度で 1) ヒト幹細胞臨床研究の実施、2) 安全性・有効性のデータ収集、3) 産業化を見据えた医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談、4) 高度医療申請に向けた医療体制の構築を行う。

上記の目的達成のために、臨床医（中村、吉川）、生物統計学者（山本）、トランスレーショナルリサーチ専門家（斉藤）、薬事専門家（早川）が連携し、研究の効率化、加速化に寄与できる体制を構築する。本研究においては産業化を目的に、ツーセル社と連携する。同社長、辻は分担研究者として早川とともにPMDAとの薬事戦略相談を担当し、高度医療への移行、将来の治験実施へ反映させる。

TEC の軟骨再生研究は、先端医療開発特区「先進的外科系インプラントとしての 3 次元複合再生組織製品の早期普及を目指した開発プロジェクト」として採択（分担研究）されている。本研究が実施、完結に至れば、自主臨床研究では得られない、薬事審査に直接使用できる高いエビデンスが収集できる。TEC の first in man の臨床試験を本研究で実現し、高度医療制度、さらには加速的な開発や円滑な企業主導治験への移行ができれば、再生医療の発展に大きく貢献でき、医学的、社会的意義も大きいと考えられる。また、再生型関節治療の実用化は年間 1000 億円とされる人工関節市場を再生型医療に変換する可能性があり、新産業創出の経済効果も期待される。

本研究は平成 24 年 2 月 10 日に厚生労働大臣より研究実施の承認を得た。

A．研究目的

本研究の目的は、ヒト幹細胞臨床研究を質の高い管理体制の下遂行し、安全性、有効性の科学的根拠を蓄積し、高度医療への移行を円滑に完了させることである。

B．研究方法

ヒト幹細胞臨床研究実施と安全で確実な医療体

系構築を目指し、再生軟骨組織の安全性・有効性データを収集し、厚生労働省の高度医療申請に必要な資料を取り揃える。技術開発者の中村、吉川、名井が臨床の実施を担当、臨床試験オーガナイザーの山本がモニタリング、データマネジメント、統計解析を担当、細胞調製等品質管理担当をトランスレーショナルリサーチ専門家の斉藤が担当、滑膜由来間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生医療のレギュラトリーサイエンスについての国内外の情報収集、解析独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との協議、折衝（薬事戦略

相談)を薬事専門家の早川、さらに本研究に関する技術移転と将来の産業化を希望する企業担当者の辻(株式会社ツーセル)が担当、実際TECを移植する際の外科的手術手技の開発・改良を過去に間葉系幹細胞による軟骨修復治療の臨床経験を持つ堀部が担当し、共同、協力して研究を実施する。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に留意し、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守して実施する。

ヒト幹細胞臨床研究審査委員会

ヒト幹細胞臨床研究審査委員会は、病院長の諮問を受け、臨床研究実施計画書、説明文書(患者さんへ)、症例報告書の様式の記載内容にもとづき、倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から臨床研究の実施及び継続について審議を行う。本臨床研究の実施期間中少なくとも1年に1回以上は進捗状況を上記ヒト幹細胞臨床研究審査委員会に報告する。(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究規程」を遵守)

被験者の人権及び個人情報の保護に関する事項

研究責任者及び分担者は、被験者の人権の保護の観点から被験者の健康状態、症状、年齢、性別、同意能力等を十分考慮し、本研究への参加を求めることの適否については慎重に検討する。また、社会的に弱い立場にある者を被験者とする場合には、特に慎重な配慮を払うこととする。被験者の同意取得後はデータ管理、製造管理など、症例の取り扱いにおいては全て連結可能匿名化された被験者識別コード又は登録番号により管理され、匿名化コードと氏名の対照表及び氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。また、公表に際しては被験者の名前が直接公表されることがない等、被験者の個人情報の保護については十分に配慮する。

同意取得

スクリーニングを行う前に外来において同意説明を行い、被験者本人による同意を得る。

研究責任者又は分担者は、本研究への参加候補となる被験者本人に対して、同意説明文書(添付文書「患者さんへ」参照)を提供し、口頭で十分な説明を行った後、本研究への参加の同意を文書で取得する。(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究におけるインフォームド・コンセントに関する手順書」を遵守)

被験者本人の自由意思に基づき文書による同意を得る。

同意取得にあたり研究責任者等は被験者強制するなどにより、不利益、危険性等、被験者に不当な影響を及ぼすことの無いよう留意する。

C. 研究結果

本年度は最終5症例目への移植と、既に移植した症例について48週後の評価を行った。

移植後の関節鏡視では、1症例目と同様軟骨損傷部は隣接組織との癒合良好な修復組織を認めた。生検組織標本上ではサフラニン0で染色される軟骨組織再生を認め、再生組織は軟骨下骨との良好な接触を形成していた。

また臨床スコア、MRI 所見のいずれにおいても術前からの改善を認めた。また将来の事業化を見据えた薬事戦略相談においては、当該年度までに継続している薬事戦略相談の事前相談および厚生労働省医薬食品局、厚生労働省医政局との打ち合わせにより、より実用的な仕様、デザイン、設計に係る試案の実現性調査と、必要な試験・治験に関する指導・助言を受けるに至った。また、国内外の情報収集や交流を行い、これらを踏まえた対応策を検討した結果、本相談へのステップアップが決定された。

さらに国内外での情報収集や交流を行い、本研究事業の薬事戦略支援を進める上で必要な情報収集ネットワークを強化し、有用な知見を蓄積した。

移植の際の低侵襲手術手技についても検討をすすめ、今後、関節鏡による移植手技も検討している。

D. 考察

TEC移植によりヒトでも軟骨修復が促進されることが示唆された。また現在移植に伴う大きな有害事象は認めておらず、安全性に関しても良好な結果が得られることが期待される。

E. 結論

全5例のTEC移植が完了し、最終評価を行うことができた。試験と並行したPMDAとの薬事戦略相談、情報収集、さらには手術手技改良も順調に推移している。

F. 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

- Shimomura K, Moriguchi Y, Murawski CD, Yoshikawa H, Nakamura N. Osteochondral tissue engineering with biphasic scaffold: Current strategies and techniques. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print]
- Ando W, Kutcher JJ, Kurawetz R, Sen A, Nakamura N, Frank CB, Hart DA Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy* 2014 Feb Epub ahead of print
- Amano H, Iwahashi T, Suzuki T, Mae T, Nakamura N, Sugamoto K, Shino K, Yoshikawa H, Nakata K. Analysis of displacement and deformation of the medial meniscus with a horizontal tear using a three-dimensional computer model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014 Mar 15. [Epub ahead of print]
- Sakai T, Koyanagi M, Nakae N, Kimura Y, Sanada Y, Nakamura N, Nakata K. Evaluation of a new quadriceps strengthening exercise for the prevention of secondary cartilage injury in patients with pcl insufficiency: comparison of tibial movement in prone and sitting positions during the exercise. *Br J Sports Med*. 2014 Apr;48(7):656.
- Shimomura K., Moriguchi, Y., Ando, W, Nansai, R., Fujie, H., Hart, D.A., Gobbi, A., Kita, K., Horibe, S, Shino, K., Yoshikawa, H., Nakamura, N. Osteochondral Repair Using a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Derived from Synovial Mesenchymal Stem Cells and a Hydroxyapatite-Based Artificial Bone. *Tissue Eng Part A*. 2014 Mar 21. [Epub ahead of print]
- Nakamura N., Hui J., Koizumi K., Yasui Y., Nishii T., Lad D., Karnatzikos G, Gobbi A. Stem Cell Therapy in Cartilage Repair- Culture-free and Cell Culture-based Methods – *Oper Tech Orthop*. 24:54-60, 2014 i
- Kita K, Tanaka Y, Toritsuka Y, Yonetani Y, Kanamoto T, Amano H, Nakamura N, Horibe S. Patellofemoral chondral status after medial patellofemoral ligament

reconstruction using second-look arthroscopy in patients with recurrent patellar dislocation. *J Orthop Sci*. 2014 Aug 8. [Epub ahead of print]

- Shimomura K, Kanamoto T, Kita K, Akamine Y, Nakamura N, Mae T, Yoshikawa H, Nakata K. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 and TNF- . *Bone Joint Res*. 2014 Sep;3(9):280-8.

- Gobbi A, Chaurasia S, Kamatzikos G, Nakamura N. Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation versus Multipotent Stem Cells for the Treatment of Large Patellofemoral Chondral Lesions: A Non-randomized Prospective Trial. *Cartilage* in Press.

- 間葉系幹細胞由来組織再生材料と人工骨補填材による軟骨修復, 中村亮介, 望月翔太, 中村憲正, 藤江裕道, *臨床バイオメカニクス* 35, 381-385, 2014.

- 組織再生材料 (TEC) / コラーゲン複合体の引張特性, 池谷基志, 大家 溪, 鈴木大輔, 小倉孝之, 小山洋一, 杉田憲彦, 中村憲正, 藤江裕道, *臨床バイオメカニクス* 35, 401-405, 2014.

- ナノ周期構造上で作製した幹細胞自己生成組織 (scSAT) の引張特性, 谷 優樹, 大家 溪, 杉田憲彦, 中村憲正, 藤江裕道, *臨床バイオメカニクス* 35, 407-411, 2014.

2 . 学会発表

- 60th Orthopaedic Research Society. (March, 2014)

Shimomura K, Bean AC, Lin H, Nakamura N, Tuan RS. A novel repair method for meniscal radial tear in vitro using aligned electrospun nanofibrous scaffold.

- 60th Orthopaedic Research Society. (March, 2014)

Shimomura K, Moriguchi Y, Ando W, Nansai R, Fujie H, Horibe S, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Comparison of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate for osteochondral repair using the hybrid implant of artificial bone with a scaffold-free tissue engineered construct derived from mesenchymal stem cells.

- 1st APKASS meeting, April 14, 2014, Nara, Japan

Norimasa Nakamura "Cartilage Treatment with MSC"-From Bench to Clinic-
1st APKASS meeting, April 14, 2014, Nara, Japan

Norimasa Nakamura "Cartilage Treatment with MSC"-From Bench to Clinic-

・第87回日本整形外科学会 平成26年5月 神戸

中村憲正 名井陽 吉川秀樹 厚生労働省
ヒト幹細胞臨床研究 関節軟骨病変に対する
自己滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織移植法

・第87回日本整形外科学会 平成26年5月 神戸

中村憲正 山田裕三 澤口毅 竹内良平 大森豪 Sabine Goldhahn 日本版「膝外傷と変形性膝関節症評価スコア」(J-KOOS)- その有用性と課題 -

・第58回 日本リウマチ学会総会 平成26年4月24日 高輪

中村憲正 下村和範 森口悠 藤江裕道 吉川秀樹 スキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織を用いた骨軟骨再生

・第6回 JOSKAS meeting 平成26年7月25日 広島

小泉宏太 米田憲司 山田裕三 黒田早苗 鳥塚之嘉 内田良平 米谷泰一 前達雄 中田研 史野根生 中村憲正

ACL再建術時における半月手術と関節軟骨損傷発生との関連性の検討

・ナノ周期構造上で培養・生成した幹細胞自己生成組織(scSAT)の力学特性, 谷 優樹, 大家 溪, 杉田 憲彦, 中村 憲正, 藤江 裕道, 第41回日本臨床バイオメカニクス学会 (2014/11/21-22, 奈良)

・組織再生材料(TEC)のコラーゲンシートとの複合による高強度化

池谷 基志, 大家 溪, 鈴木 大輔, 小倉 孝之, 小山 洋一, 杉田 憲彦, 中村 憲正, 藤江 裕道, 第41回日本臨床バイオメカニクス学会 (2014/11/21-22, 奈良)

・Mechanical and structural properties of stem cell-based tissue engineered constructs (TEC) cultured with collagen sheets, Ikeya M, Suzuki D, Oya K, Ogura T, Koyama Y, Sugita N, Nakamura N, Fujie H, 3rd International Scientific Tendinopathy Symposium (ISTS2014) (2014/9/5-7, Oxford)

・Patella tendon regeneration using collagen Peptide and Collagen sheet, Suzuki D, Ikeya M, Fujie H, Ogura T, Koyama Y, Nagoya S,

Yamashita T, 3rd International Scientific Tendinopathy Symposium (ISTS2014) (2014/9/5-7, Oxford)

・Friction properties of articular cartilage repaired with a stem-cell based tissue engineered construct (TEC) and porous synthetic bones, Fujie H, Mochizuki S, Nakamura N, International Union of Materials Research Societies - The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA2014), Symposium B-3 (Materials in Biomechanics and Biotribology), B3-029-014, (2014/8/24-30, Fukuoka)

・Tensile property of stem cell-based self-assembled tissues (scSAT) cultured on a nanoporous structured titanium surface, Tani Y, Oya K, Sugita N, Nakamura N, Fujie H, 7th World Congress of Biomechanics(WCB 2014) (2014/7/6-11, Boston)

・第14回日本再生医療学会総会 平成27年3月19日 横浜

安井行彦 千々松良太 小泉宏太 杉田憲彦 阪上守人 名井陽 吉川秀樹 中村憲正

ステロイド大量療法後に滑膜間葉系幹細胞の機能低下を認めた1例

・第14回日本再生医療学会総会 平成27年3月20日 横浜

杉田憲彦 森口悠 阪上守人 安井行彦 小泉宏太 千々松良太 下村祥一 池田康利 吉川秀樹 中村憲正

滑膜から間葉系幹細胞を分離する至適条件の検討

・第29回日本整形外科学会基礎学術集会 平成26年10月10日 鹿児島

安井行彦 杉田憲彦 千々松良太 小泉宏太 阪上守人 名井陽 吉川秀樹 中村憲正

ステロイド大量療法後に滑膜間葉系幹細胞の機能低下を認めた1例

3. 講演

・整形外科レジデントセミナーin京都 2014年2月16日 京都

中村憲正 Save the Meniscus!

・3rd UK cartilage club meeting May 8, 2014, Kent, UK

Norimasa Nakamura Cartilage Repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells

・2nd International Congress on Cartilage

Repair of the Ankle, May 12-13, Prague, Czech Republic

Norimasa Nakamura "Cartilage Treatment with MSC" -From Bench to Clinic-

ICRS Focus Meeting The Knee July 4, FIFA Auditorium, Zurich

Norimasa Nakamura Stem Cells- Fairytale or fairly true?

• ESSKA Congress May 17, 2014, Amsterdam
Norimasa Nakamura ESSKA-ICRS symposium The role of stem cells and surgery in cartilage defects Future Development

• CUMC International Knee Symposium Sept 13, 2014 Seoul

Norimasa Nakamura Osteochondral Tissue Engineering with Biphasic Scaffold with MSCs

• Mayo Knee Dislocation course 2014 Sept 17-18, 2014 Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

Norimasa Nakamura Fresh combined ACL, PCL, MCL injury Unless Allograft is available

• 第2回 大阪HTO研究会 平成26年10月25日 大阪

中村憲正 骨切り術と軟骨修復

• 第42回 日本関節病学会 平成26年11月7日 東京

中村憲正 Cartilage Repair using a scaffold-free Tissue Engineered Construct derived from synovial MSCs

• 大阪大学大学院医学系研究科 English lecture 平成26年12月12日 大阪

Nakamura N. Scaffold-free Tissue Engineered Construct (TEC) derived from synovial mesenchymal stem cells to repair and regenerate cartilage

H. 知的財産権の出願・登録状況

• 胚性幹細胞由来間葉系幹細胞による3次元人工組織の作成とそれを用いた骨軟骨再生治療出願中 PCT

• 骨軟骨再生のためのスキャフォールドフリー自己組織化3次元人工組織と人工骨複合体出願中 PCT/JP2012/008410