

201406010A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関矢 一郎

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	関矢 一郎	東京医科歯科大学 再生医療研究センター	教授
研究分担者	宗田 大	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 運動器外科学	教授
研究分担者	森尾 友宏	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学	教授
研究分担者	清水 則夫	東京医科歯科大学 再生医療研究センター	准教授
研究分担者	赤澤 智宏	東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 分子生命情報解析学	教授

目 次

I. 総括研究報告

滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生……………7

研究代表者 関矢 一郎

(東京医科歯科大学 再生医療研究センター 教授)

II. 分担研究報告

1. MRI画像の3次元解析による半月板の評価……………31

分担研究者 宗田 大

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 運動器外科学 教授)

2. 滑膜幹細胞の製造管理……………39

分担研究者 森尾 友宏

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 准教授)

3. 滑膜幹細胞の品質管理……………41

分担研究者 清水 則夫

(東京医科歯科大学 再生医療研究センター 准教授)

4. 滑膜幹細胞の造腫瘍性の評価……………49

分担研究者 赤澤 智宏

(東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 分子生命情報解析学 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………55

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………67

I. 総括研究報告

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

「滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生」

研究代表者

関矢一郎 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 教授

研究要旨

平成 26 年度は、臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」の予定症例数の 5 例に滑膜幹細胞移植を終了した。平成 27 年 4 月に全例の術後観察を終了した。縫合術後に滑膜幹細胞を移植することにより、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させることを目的とし実施した。主要評価項目として、臨床研究開始前同意取得後に被験者に生じた有害事象の有無、重症度、重篤性、発現頻度から、自家滑膜幹細胞を半月板縫合部に移植する再生医療の安全性を総合的に評価した。また、滑膜幹細胞の薬事承認を目指しており、治験開始までに滑膜幹細胞の安全性を確認するのに必要な、ヌードラットを用いた埋植毒性試験を GLP 試験として実施した。

臨床研究中に発現した有害事象を集計した結果、有害事象は 39 件発現したが、重篤なものは発現しなかった。発現例数の多かった有害事象は、半月板縫合部の痛み、鏡視下操作後の膝痛、関節水腫であった。滑膜幹細胞の適用と有害事象発現の時間的な前後関係から、滑膜幹細胞との関連性を完全には否定できない有害事象として、関節水腫と関節熱感が 1 例に 1 件ずつ、また CRP 高値が 1 例に 1 件発現した。プロトコールに定めた安全性の判定基準に従い安全性を総合的に評価した結果、「きわめて安全」が 3 例、「安全」が 2 例と判定した。最終的な判定は効果安全性評価委員会の審議を待って報告する。

副次評価項目の滑膜幹細胞の安全性に関しては、分担研究者の清水と赤澤から詳細を報告するが、品質管理基準書に定めたすべての工程内管理試験の規格・判定基準に適合する滑膜幹細胞を供給することができた。

GLP 試験として実施した埋植毒性試験は埋植 3 日目の局所への影響まで評価した。

研究分担者

宗田 大 大学院医歯学総合研究科・
運動器外科学 教授
森尾友宏 大学院医歯学総合研究科・
発生発達病態学 教授
清水則夫 再生医療研究センター 准教授
赤澤智宏 大学院保健衛生学科・
分子生命情報解析学 教授

A. 研究目的

半月板損傷に対してわが国で唯一の温存手術は縫合術であるが、再断裂の可能性がある、必ずしも縫合術が積極的に行なわれている状況ではない。平成 24 年度厚労省社会医療診療行為別調査によると、半月板手術は年間に約 3 万 2 千件で、うち縫合術はわずか 10%のみであり 90%が切除術であった。本臨床研究では、半月板損傷部の状態が悪くて現状では縫合術

の適応にならない半月板損傷患者を対象とし、縫合術後に滑膜幹細胞を移植することにより、半月板損傷に対する半月板修復術の治療成績を向上させることを目的とする。半月板の消失・機能不全は、変形性膝関節症の原因となる。私たちの細胞治療により半月板を切除せず温存できれば、変形性膝関節症が原因の要介護を減らし、人工膝関節等の終末期高額医療に関わる医療費の軽減が見込まれる。

B. 研究方法

(1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」

治療計画

膝半月板損傷の患者にまず半月板縫合術を行い、その際に滑膜組織を約 0.5 g 採取する。採取した滑膜から滑膜幹細胞を単離し、14 日間培養して滑膜幹細胞を増殖させる。14 日後に滑膜幹細胞を回収し、細胞の安全性を確認後、手術室にて移植する。移植は腰椎麻酔により下半身を麻酔後、関節鏡視下に、注射器を使用して細胞浮遊液を半月板縫合部に滴下、10 分間静置する。後治療は、従来の半月板修復術と同等とする。術後観察は、半月板縫合術を基準日とし、術後 4、6、12、24 週に、全身所見、臨床検査、局所症状の観察、自覚症状のアンケート、画像検査を行う。

症例数

5 例（ただし、細胞移植まで実施した症例）

組み入れ基準

以下の選択基準に適合し除外基準に抵触しない膝半月板損傷の患者

[選択基準]

- 1) 横断裂、水平断裂、複合断裂、変性断裂等で、一般的に半月板切除術の適応となるような断裂形態の症例
- 2) 半月板損傷の臨床症状(不安定感、可動域障害、関節水腫、疼痛)を呈している症例
- 3) 臨床症状に対し手術治療の適応がある症例
- 4) 半月板修復術が技術的に可能と考えられる症例
- 5) 臨床研究開始前の同意取得時に20歳以上
- 6) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られた患者

[除外基準]

- 1) 文書での本臨床研究への参加の同意が得られない患者
- 2) 活動性の感染がある患者
- 3) ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1、HIV-2)、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) のいずれかが陽性の患者
- 4) 活動性の悪性腫瘍を有する患者
- 5) 抗生物質に過敏な患者
- 6) 妊娠している、または授乳中の患者
- 7) 糖尿病がある患者
- 8) 全身状態が悪い患者
- 9) 担当医が本臨床研究への参加を不相当と判断した場合

安全性の評価

主要評価項目として、臨床研究開始前同意取得後に被験者に生じた有害事象の有無、重症度、重篤性、発現頻度から、自家滑膜幹細胞を半月板縫合部に移植する再生医療の安全性を総合的に評価した。

有害事象は実施された研究との因果関係の有無を問わず、臨床研究開始前同意取得後に被験者に生じた全ての好ましくない又は意図し

ない疾病、もしくはその徴候（臨床検査値の異常を含む）と定義した。

有害事象の重症度の判定基準を表1に、重篤性の判定基準を表2に示した。

安全性については、滑膜幹細胞に起因する有害事象の発生から、「きわめて安全」、「安全」、「安全性に疑問あり」、「安全性に問題あり」の4段階で評価した(表3)。滑膜幹細胞に起因するとは、滑膜幹細胞との因果関係の判定基準(表4)で、「関連あるかもしれない」、「おそらく関連あり」、「関連あり」と判定されるものとした。

表1. 有害事象の重症度の判定基準

判定	判定基準
軽度	無処置で研究が可能である程度
中等度	何らかの処置により研究が可能である程度
高度	研究の継続が不可能である程度

表2. 有害事象の重篤性の判定基準

判定	判定基準
重篤	死亡、死亡につながるおそれのあるもの、入院または治療のために入院期間の延長が必要とされるもの、障害（日常生活に支障をきたす程度の機能不全の発現を示すもの）、障害につながるおそれのあるもの、後世代における先天性の疾病または異常
重篤でない	上記以外のもの

表3. 安全性の判定基準

判定	判定基準
きわめて安全	滑膜幹細胞に起因する有害事象が発生せず、滑膜幹細胞の使用において安全性に問題はない
安全	滑膜幹細胞に起因する重篤ではなく重症度が軽度の有害事象が発生したが、滑膜幹細胞の使用において安全性に問題はない
安全性に疑問あり	滑膜幹細胞に起因する重篤ではないが重症度が中等度の有害事象が発生し、滑膜幹細胞の使用において安全性にやや問題がある
安全性に問題あり	滑膜幹細胞に起因する重篤な有害事象が発生し、滑膜幹細胞の使用において安全性に問題がある

表4. 滑膜幹細胞との因果関係の判定基準

判定	判定基準
関連なし	滑膜幹細胞の適用と有害事象発現との間に時間的な合理性がない。または、併用薬剤や原疾患・合併症等、患者の要因の影響が大きいと考えられるもの
関連あるかもしれない	滑膜幹細胞の適用と有害事象発現との間に時間的な合理性がある。かつ、併用薬剤や原疾患・合併症等、患者の要因を考えても、滑膜幹細胞の適用との関連を否定できないもの
おそらく関連あり	滑膜幹細胞の適用と有害事象発現との間に時間的な合理性がある。かつ、併用薬剤や原疾患・合併症等、患者の要因を考えても、おそらく滑膜幹細胞の適用と関連が考えられるもの
関連あり	滑膜幹細胞の適用と有害事象発現との間に時間的な合理性がある。かつ、併用薬剤や原疾患・合併症等、患者の要因を考えても、明らかに滑膜幹細胞の適用と関連が考えられるもの
不明	評価のための材料あるいは情報が不足し、滑膜幹細胞の適用との関連性が判定できないもの

滑膜幹細胞移植の効果の評価

本臨床研究は安全性の評価を目的としているが、将来的には滑膜幹細胞の薬事承認を目標としている。治験で滑膜幹細胞の有効性を評価するための評価項目を探索するために、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)、Numerical Rating Scale (NRS)、McMurray test、Pivot shift test、Lysholm score、MRI 画像診断、膝関節 X 線検査を実施した。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は東京医科歯科大学医学部ヒト幹倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として厚生労働大臣の了承を得て実施した。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」および臨床研究実施計画書を遵守し、「医療機器GCP省令」に準

抛して実施した。

(2) ノードラットを用いた滑膜幹細胞の埋植毒性試験

滑膜幹細胞の薬事承認を目指し PMDA と事前面談を実施し、承認には GLP 準拠の安全性試験が必要であること確認した。「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 2 号)、「医療機器の製造販売承認申請に必要な生物学的安全性評価の基本的な考え方について」(平成 24 年 3 月 1 日付薬食機発 0301 第 20 号) で考慮すべき評価項目として挙げられている試験項目について検討し、平成 26 年度は、ノードラットを用いた埋植毒性試験を実施した。生物学的安全性試験法ガイダンスをもとに試験計画書を作成し、試験の実施は医療機器 GLP 適合の認証を受けた株式会社ボゾリサーチセンターへ委託した。滑膜幹細胞をノードラットの膝関節腔に埋植し、埋植初期（投与 3 日後）における埋植局所への影響を評価した。

滑膜幹細胞を投与する試験試料投与群、細胞を含まないアセトキープ（移植時の細胞懸濁液）を投与する対照群ともに 5 匹とした。投与量は、 5×10^7 個/ $500 \mu\text{L}$ が細胞懸濁液として調製可能な上限濃度であること、体重 170g 前後のラットの膝関節腔に投与可能な最大液量は $30 \mu\text{L}$ と考えられることから、 3×10^6 個/膝（左右の膝に投与するため、 6×10^6 個/動物）と設定した。ラットへの投与量 6×10^6 個/170g は、体重換算でヒト投与量の 35 倍程度に相当する。

剖検は埋植部位の周囲組織と、体外表、頭部、胸部、腹部を含む全身の器官について行った。病理組織学的検査は埋植部位および剖検で異常のみられた器官/組織について行った。

病理組織学的検査は、特に炎症性細胞の有無に注意し観察した。埋植部位については、医療

機器の生物学的評価における埋植試験の基準 ISO10993-6 に準じ、表 5 に基づき炎症性細胞の有無をスコア化した。また、表 6 に基づき血管新生、線維化、脂肪浸潤の有無もスコア化した。

表 5. 炎症性細胞の有無に基づくスコア化

Cell type/ response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorpho- nuclear cells	0	Rare, 1-5/ phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Lymphocyte s	0	Rare, 1-5/ phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/ phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Macrophage s	0	Rare, 1-5/ phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/ phf	3-5/ phf	Heavy infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

表 6. 血管新生、線維化、脂肪浸潤のスコア化

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neo- vasculari- sation	0	Minimal capillary Proliferati- on, focal, 1-3buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulatio- n of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surroundin- g the implant

結果の判定は、動物ごとのスコアの合計点（cell type/response の小計 $\times 2$ + other findings response の合計）を算出し、試験試料投与群の群平均値 - 対照群平均値 = 炎症指数とした。炎症指数が 3.0 以上の場合に、埋植局所への反応が有意に強いと判定した。

C. 研究結果

(1) 臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」

臨床研究の実施

2013年12月から2014年10月にかけて、組み入れ基準を満たす膝半月板損傷患者7例を登録した。登録された7例のうち1例は、半月板縫合術まで行ったが、滑膜幹細胞の増殖が途中で悪化し細胞を移植することができなかつたため、中止症例とした。また1例は、滑膜幹細胞の増殖悪化の原因が明らかになってから研究へ参加したいと同意を撤回したため、中止症例とした。組み入れ後すぐ同意撤回した1例を除いた6例の有害事象を収集したが、細胞移植を完遂した5例を、自家滑膜幹細胞を半月板縫合部に移植する再生医療の安全性評価対象とした。

表7. 移植を行った5症例の背景因子

背景因子	分類	例数(%)
年齢	34~58	
性別	男性	5 (100)
罹病期間	1年未満	4 (80)
	1年以上	1 (20)
非介入側半月板の状態・処置の有無	損傷・部分切除	3 (60)
	損傷・処置無	1 (20)
	損傷無	1 (20)
介入側半月板の損傷部位	内側	5 (100)
	外側	0 (0)
断裂形態	フラップ+水平	4 (80)
	縦+水平	1 (20)
	+小さなフラップ	
半月板の変性	変性あり	5 (100)
	変性なし	0 (0)

安全性の評価

研究期間中、有害事象は39件(6/6例)発現したが、重篤なものは発現しなかった(表6)。発現例数の多かった有害事象として、「半月

板縫合部の痛み」は6例に、「関節水腫」、「鏡視下操作後の膝痛」は4例に発現した。「半月板縫合部の痛み」には消炎鎮痛剤の処方に対応した(中等度の有害事象)。この痛みが回復するには長期間かかり、術後24週の観察終了時に回復した症例は1例のみで、5例は軽快であった。「鏡視下操作後の膝痛」にも消炎鎮痛剤を処方したが、この痛みは退院時には4例とも回復した。「関節水腫」に関して、4例中3例は細胞移植の前日に発現を確認しており、滑膜幹細胞との因果関係は否定された。4例中1例は、細胞移植の前日には発現しておらず、術後4週(細胞移植後2週)に発現した。「関節熱感」も術後4週に発現している。この症例は細胞移植時に断裂部の内縁が一部反転していることを確認したため追加縫合した症例で、関節水腫や熱感の発現は追加縫合の影響である可能性が高いが、滑膜幹細胞の適用と有害事象発現の時間的な前後関係からは、滑膜幹細胞との関連性を完全には否定できないと考え、滑膜幹細胞とは「関連あるかもしれない」と判断した。

また、CRP高値が細胞移植後に2件発現した。これは同一被験者に発現しており、術後24週に発現した1件は感冒との可能性が高いと考え滑膜幹細胞とは「関連なし」と判断した。術後4週に発現した1件は縫合術後の炎症を反映していると考えて良いと思うが、滑膜幹細胞の適用と有害事象発現の時間的な前後関係からは、滑膜幹細胞との関連性を完全には否定できないと考え、滑膜幹細胞とは「関連あるかもしれない」と判断した。

細胞移植後に「ASTの上昇」が2件、「ALTの上昇」が2件、「LDHの上昇」が1件、同一の1例に発現した。これらの数値は筋疾患でも上昇するが、問診により術後6週および12週の検査前にハードな筋トレをしていたことがわかった。筋トレを控えさせ再検査した結果、こ

これらの数値は正常に戻ったことから、滑膜幹細胞とは「関連なし」と判断した。上記以外の細胞移植後に発現した事象はいずれも患者の要因によるものであり、滑膜幹細胞とは「関連なし」と判断した。

表 6. 研究期間中に発現した有害事象

事象名	発現例数 (件数) n=39	滑膜幹細胞に起因する有害事象
半月板縫合部の痛み	6例(6件)	0例(0件)
追加縫合による半月板縫合部の痛み	1例(1件)	0例(0件)
半月板縫合不全	1例(1件)	0例(0件)
鏡視下操作後の膝痛	4例(4件)	0例(0件)
関節水腫	4例(5件)	1例(1件)
関節熱感	1例(1件)	1例(1件)
接触皮膚炎	2例(3件)	0例(0件)
下腿痛	1例(1件)	0例(0件)
右第5趾しびれ	1例(1件)	0例(0件)
右下腿のしびれ	1例(1件)	0例(0件)
頭痛	1例(1件)	0例(0件)
歯肉炎	1例(1件)	0例(0件)
感冒	2例(2件)	0例(0件)
血圧高値	1例(1件)	0例(0件)
ASTの上昇	1例(2件)	0例(0件)
ALTの上昇	1例(2件)	0例(0件)
LDHの上昇	1例(1件)	0例(0件)
CRP高値	1例(2件)	1例(1件)
血液採取後の低血圧	1例(1件)	0例(0件)
肝機能検査値の上昇	1例(1件)	0例(0件)
左まぶたの痛み	1例(1件)	0例(0件)

滑膜幹細胞移植の効果の評価

・ KOOs

膝の症状(5項目)、膝関節の拘縮(2項目)、痛み(9項目)、日常生活(17項目)、スポーツ・レクリエーション活動(5項目)、生活の質(4項目)の42項目を質問紙法にて評価した。各項目とも1~5点の選択肢で、点数が高いほど状態は悪い。滑膜幹細胞移植を行った5症例のうち、術前と比較して術後24週の「膝

の症状」が改善したと答えたのは5例中1例、「膝関節の拘縮」が改善したと答えたのは5例中3例、「痛み」が改善したと答えたのは5例中4例、「日常生活」が改善したと答えたのは5例中4例、「スポーツ・レクリエーション活動」が改善したと答えたのは5例中3例、「生活の質」が改善したと答えたのは5例中3例であった(図1)。

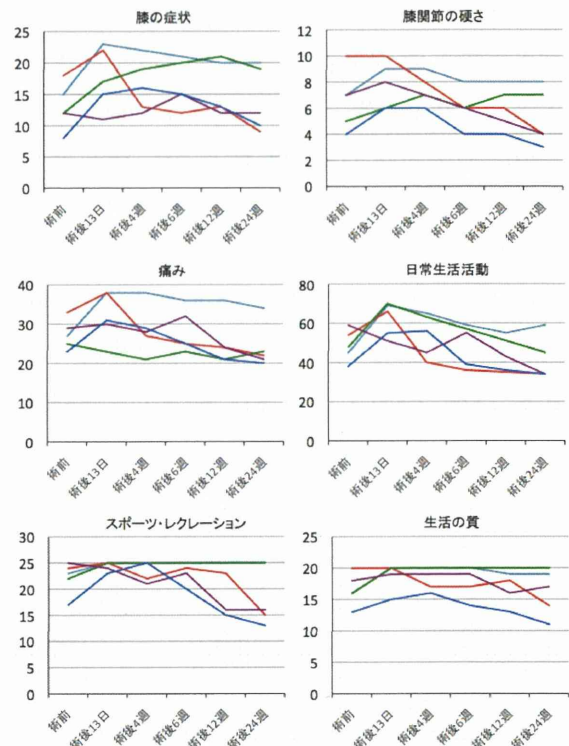


図 1. KOOs の経時的変化

・ NRS

平地を歩く時の痛み、じっとしているときの痛み、朝の動きだしの痛み、階段を歩く時の痛み、スポーツをするときの痛み、階段を歩く時の不安定感の6項目を質問紙法にて評価した。各項目とも0~11点の選択肢で、点数が高いほど状態は悪い。滑膜幹細胞移植を行った5症例のうち、術前と比較して術後24週の「平地を歩く時の痛み」が改善したと答えたのは5例中4例、「じっとしているときの痛み」が改善したと答えたのは5例中4例、

「朝の動きだしの痛み」が改善したと答えたのは5例中4例、「階段を歩く時の痛み」が改善したと答えたのは5例中4例、「階段を歩く時の不安定感」が改善したと答えたのは5例中3例であった。5例中4例は術後24週でもスポーツに復帰できなかった。(図2)

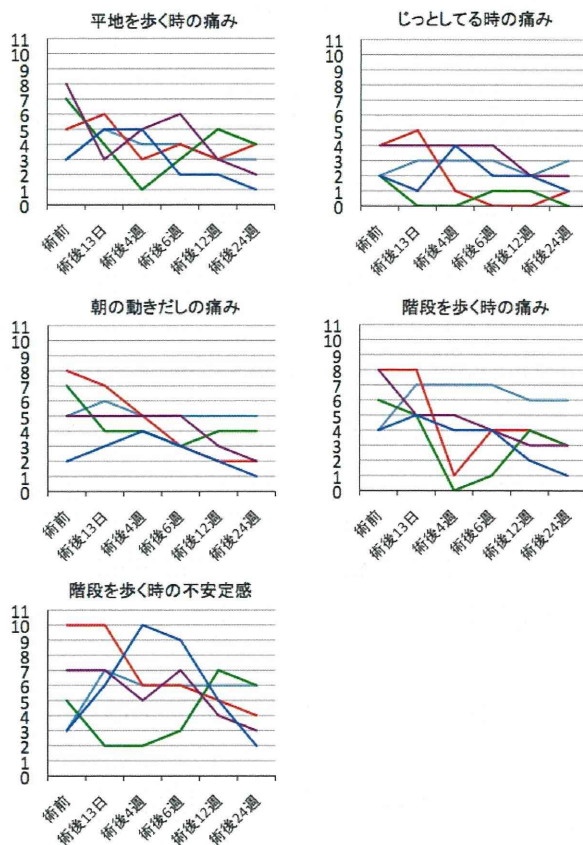


図2. NRSの経時的変化

• McMurray test

患者の下腿を内旋、外旋する手技により、損傷部位を触知する McMurray test を実施した。術前および術後 4, 6, 12, 24 週に実施するプロトコールであったが、痛みと可動域制限のため、術後 4 週は全例、術後 6 週は 3 例、術後 12 週は 1 例で実施できなかった。術後 24 週には全例実施できた。5 例とも内側に損傷があったが、術前と比較して術後 24 週に内側の痛みが改善したのは 5 例中 4 例で

あった。

• pivot shift テスト

患者の膝を伸展位から屈曲する手技により、膝の不安定感を触知する pivot shift テストを実施した。術前および術後 4, 6, 12, 24 週に実施するプロトコールであったが、痛みと可動域制限のため、術後 4 週は 4 例、術後 6 週は 2 例で実施できなかった。術後 12, 24 週には全例実施できた。5 例とも内側に損傷があったが、術前と比較して術後 24 週に内側の痛みが改善したのは 5 例中 3 例であった。

• Lysholm score

跛行、歩行補助装具、腫脹、膝の屈伸、ロッキング・ひっかかり感、膝の不安定性、疼痛、階段昇降の 8 項目を、表 7 に基づき医師の聞き取り調査にて評価した。

表 7. Lysholm score の判定基準

<p>➢ 跛行 (Limping)</p> <table border="1"> <tr><td>なし</td><td>5</td></tr> <tr><td>わずか/時々</td><td>3</td></tr> <tr><td>重度/いつも</td><td>0</td></tr> </table>		なし	5	わずか/時々	3	重度/いつも	0	<p>➢ 歩行補助装具 (Walker)</p> <table border="1"> <tr><td>なし</td><td>5</td></tr> <tr><td>杖/松葉杖</td><td>2</td></tr> <tr><td>荷重負荷不可能</td><td>0</td></tr> </table>		なし	5	杖/松葉杖	2	荷重負荷不可能	0												
なし	5																										
わずか/時々	3																										
重度/いつも	0																										
なし	5																										
杖/松葉杖	2																										
荷重負荷不可能	0																										
<p>➢ 腫脹 (Swelling)</p> <table border="1"> <tr><td>なし</td><td>10</td></tr> <tr><td>激しい運動の時あり</td><td>6</td></tr> <tr><td>普通の運動の時あり</td><td>2</td></tr> <tr><td>いつもあり</td><td>0</td></tr> </table>		なし	10	激しい運動の時あり	6	普通の運動の時あり	2	いつもあり	0	<p>➢ 膝の屈伸 (Squatting)</p> <table border="1"> <tr><td>問題なし</td><td>5</td></tr> <tr><td>若干問題あり</td><td>4</td></tr> <tr><td>90° 以内</td><td>2</td></tr> <tr><td>できない</td><td>0</td></tr> </table>		問題なし	5	若干問題あり	4	90° 以内	2	できない	0								
なし	10																										
激しい運動の時あり	6																										
普通の運動の時あり	2																										
いつもあり	0																										
問題なし	5																										
若干問題あり	4																										
90° 以内	2																										
できない	0																										
<p>➢ ロッキング・ひっかかり感 (Blockage)</p> <table border="1"> <tr><td>なし/ひっかかり感なし</td><td>15</td></tr> <tr><td>ひっかかり感あるがロッキングはない</td><td>10</td></tr> <tr><td>時々ロッキングする</td><td>6</td></tr> <tr><td>しばしばロッキングする</td><td>2</td></tr> <tr><td>ロッキングし動かない</td><td>0</td></tr> </table>		なし/ひっかかり感なし	15	ひっかかり感あるがロッキングはない	10	時々ロッキングする	6	しばしばロッキングする	2	ロッキングし動かない	0	<p>➢ 階段昇降 (Stairs)</p> <table border="1"> <tr><td>問題なし</td><td>10</td></tr> <tr><td>若干問題あり</td><td>6</td></tr> <tr><td>1段のみ昇降可能</td><td>2</td></tr> <tr><td>昇降できない</td><td>0</td></tr> </table>		問題なし	10	若干問題あり	6	1段のみ昇降可能	2	昇降できない	0						
なし/ひっかかり感なし	15																										
ひっかかり感あるがロッキングはない	10																										
時々ロッキングする	6																										
しばしばロッキングする	2																										
ロッキングし動かない	0																										
問題なし	10																										
若干問題あり	6																										
1段のみ昇降可能	2																										
昇降できない	0																										
<p>➢ 不安定性 (Instability)</p> <table border="1"> <tr><td>問題なく立てる</td><td>25</td></tr> <tr><td>運動や激しい運動の時に稀に立てない</td><td>20</td></tr> <tr><td>運動や激しい運動の時にしばしば不安定</td><td>15</td></tr> <tr><td>日常生活で時々不安定</td><td>10</td></tr> <tr><td>日常生活でしばしば不安定</td><td>5</td></tr> <tr><td>歩行の時にいつも不安定</td><td>0</td></tr> </table>		問題なく立てる	25	運動や激しい運動の時に稀に立てない	20	運動や激しい運動の時にしばしば不安定	15	日常生活で時々不安定	10	日常生活でしばしば不安定	5	歩行の時にいつも不安定	0	<p>➢ 疼痛 (Pain)</p> <table border="1"> <tr><td>なし</td><td>25</td></tr> <tr><td>激しい運動の時たまに/わずかにあり</td><td>20</td></tr> <tr><td>激しい運動の時に激しい疼痛</td><td>15</td></tr> <tr><td>2km 以上の歩行中/歩行後に激しい疼痛</td><td>10</td></tr> <tr><td>2km 未満の歩行中/歩行後に激しい疼痛</td><td>5</td></tr> <tr><td>常に疼痛あり</td><td>0</td></tr> </table>		なし	25	激しい運動の時たまに/わずかにあり	20	激しい運動の時に激しい疼痛	15	2km 以上の歩行中/歩行後に激しい疼痛	10	2km 未満の歩行中/歩行後に激しい疼痛	5	常に疼痛あり	0
問題なく立てる	25																										
運動や激しい運動の時に稀に立てない	20																										
運動や激しい運動の時にしばしば不安定	15																										
日常生活で時々不安定	10																										
日常生活でしばしば不安定	5																										
歩行の時にいつも不安定	0																										
なし	25																										
激しい運動の時たまに/わずかにあり	20																										
激しい運動の時に激しい疼痛	15																										
2km 以上の歩行中/歩行後に激しい疼痛	10																										
2km 未満の歩行中/歩行後に激しい疼痛	5																										
常に疼痛あり	0																										

Lysholm score は点数が低いほど状態は悪い。滑膜幹細胞移植を行った 5 症例のうち、術前と比較して術後 24 週の「跛行」が改善したと答えたのは 5 例中 3 例、「歩行補助装具」が改善

したと答えたのは5例中2例、「腫脹」が改善したと答えたのは5例中1例、「膝の屈伸」が改善したと答えたのは5例中2例、「ロッキング・ひっかかり感」が改善したと答えたのは5例中2例、「膝の不安定性」が改善したと答えたのは5例中3例、「疼痛」が改善したと答えたのは5例中3例、「階段昇降」が改善したと答えたのは5例中2例であった。8項目の合計点数の推移を図3に示した。

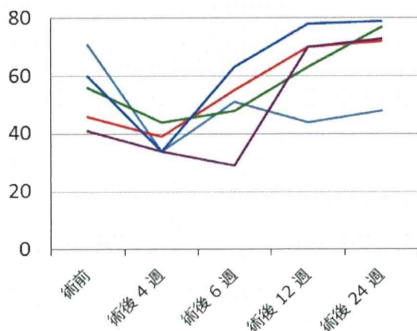


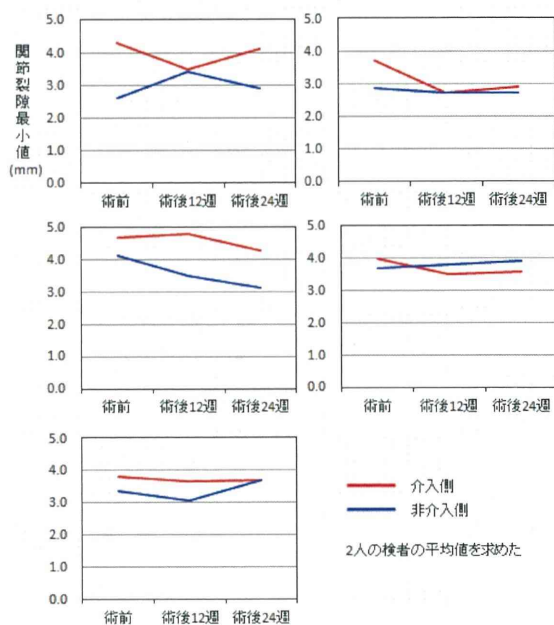
図3. Lysholm score 合計点数の推移

・ MRI 画像診断

3.0 テスラ MRI で撮影した 3D 等方性ボクセルの MRI 画像を精査した結果、臨床研究 5 症例のいずれにも、軟骨過形成、腫瘍化、関節内遊離体の所見は認められなかった。骨棘形成に関しては、2 例では術前から認められたが、経過観察中に骨棘の増大は認められなかった。他の 3 例に骨棘形成の所見は認められなかった。

・ 膝関節 X 線検査

関節裂隙の狭小化は変形性膝関節症の病態を把握するために重要な指標であり、治験で滑膜幹細胞の有効性を評価するための評価項目になり得ると考えた。再現性の高い、検者間誤差の小さな、関節裂隙の測定方法を確立する必要がある。そこで、本研究では変形性膝関節症を定量評価する診断支援ソフト KOACAD を導入し、測定方法の確立を試みた。KOACAD は自動



測定モードもあるが、自動測定では測定部位を実際より狭い範囲で評価する場合があるので、その場合は手動測定で調整する必要があった。手動での調整方法を検討し手順書を定めた。被験者ごとに介入側および非介入側の関節裂隙の最小値を計測した結果を図4に示した。

図4. 関節裂隙最小値の経時的変化

(2) ヌードラットを用いた滑膜幹細胞の埋植毒性試験

滑膜幹細胞をヌードラットの膝関節内に埋植して、埋植3日目の局所への影響を評価する GLP 試験を実施した。

試験の結果、いずれの群にも死亡動物は見られなかった。いずれの動物にも一般状態の異常は見られなかった。体重は滑膜幹細胞投与群と対照群で有意差は見られなかった。試験試料投与群の摂餌量は、投与1日後に対照群を有意に下回ったが、投与2日目以降は同様に推移した。剖検の結果、いずれの動物にも埋植部位の異常は見られず、その他の全身毒性を示唆する異常所見も見られなかった。埋植部位(膝関節腔内)

における炎症性細胞として、試験試料投与群の2/10 膝に多形核細胞(好酸球)の浸潤がみられ、スコアは1であった。その他の所見として、試験試料投与群の9/10 膝において滑膜の肥厚(スコア 1~2)、8/10 膝において関節腔/滑膜における好酸性物質(スコア 1~2)、2/10 膝において被験細胞(ヒト滑膜由来間葉幹細胞)と軟骨表面の癒着(スコア 1)がみられた。これらの内、関節腔/滑膜の好酸性物質と被験細胞の軟骨表面との癒着については、炎症性の変化ではないと判断し、炎症指数算出のためのスコアの合計からは除外した。炎症指数(試験試料投与群の群平均値-対照試料投与群平均値)は2.0であり、非刺激性の範囲内(0.0~2.9)であった。また、膝窩リンパ節では、リンパ洞内への好酸球浸潤がみられたものの、ごく軽度な変化にとどまっていた。なお、埋植部位における多形核細胞の浸潤及び被験細胞の軟骨表面との癒着は、細胞濃度が低く細胞の凝集塊がみられていた投与液を投与した例でのみみられ、適正な試験試料を投与された動物ではみられなかった。その原因は不明であるが、試験試料中の凝集細胞塊が関与している可能性が疑われた。

D. 考察

今回の縫合術は本来適応外の断裂を対象としているが、適応内の症例と比較して安全性に問題がなかったかを考察した。年齢分布が同等の過去の適応内の5 症例では、関節水腫が消失するまで4 週から16 週を要していた。臨床研究の症例では関節水腫の継続時間はこれより長くなっているが、これは半月板損傷が広範囲に及んでいたことと、変性が強かったことが要因で、回復に時間がかかった可能性がある。また、関節水腫が最も長引いた症例では、膝に負担のかかる労働に復帰するのが早すぎたこと

も要因の一つと考えられた。臨床研究のプロトコールでは、後療法は従来の半月板修復術と同等とするとしていたが、全荷重歩行は患者の症状を見て正常歩行が可能になるまでは制限することが望ましいと考えられた。次回の臨床研究では、リハビリに関しては荷重コントロールに注意すべきと考える。また術前から軽度の水腫(スコア 0.5)を認めていた3 例のうち2 例においては、術後12 週時点でも中等度の水腫(スコア 1)を認めていたのに対して、術前に水腫が認められなかった2 例においては、術後12 週時点では軽度の水腫(スコア 0.5)または水腫なし(スコア 0)となっていたことから、術前から水腫の認められる例では、術後も関節水腫が遷延化しやすい可能性があると考えられた。

再生医療製品として既に薬事承認を得ている「ジャック」の審議結果報告書でPMDAは、“本品自体が引き起こす有害事象以外にも、本品に起因する手技に起因する有害事象、本品との因果関係が否定できない有害事象についても関連性を十分考察すること”とコメントしていたので、これに関して考察した。

本品に起因する手技に起因する有害事象としては、①半月板縫合に起因する有害事象、②滑膜採取に起因する有害事象、③縫合2 週後の関節鏡操作に起因する有害事象が挙げられる。①半月板縫合に起因する有害事象としては、今回の臨床研究では全例に「半月板縫合部の痛み」が発現したが、本臨床研究ではこの影響が最も大きかったと考える。②滑膜採取に起因する有害事象は、滑膜採取部の疼痛を訴える被験者はいなかったため、本臨床研究ではこの影響はなかったと考える。③縫合2 週後の関節鏡操作に起因する有害事象は、5 例中4 例の被験者が鏡視下操作後の膝痛を訴えたが、術後4 日後の退院までには全例回復したので、この影響は大き

くなかったと考える。

本品との因果関係が否定できない有害事象としては、細胞投与との関連は不明であるが、縫合術後4週のCRP高値、関節水腫の長期化が発現した。今回の中止症例で、細胞投与しなかった症例も関節水腫が長期化しているため受傷形態や変性度が影響している可能性が大きいと考えられるが、関節水腫など術後の炎症には十分注意して術後管理をすることが必要と考える。

Lysholm scoreの総合点で、術前と比較して術後24週時に増悪した例（腫脹、不安定性、疼痛が悪化）が1例あったが、その後のフォローアップで、術後32週には術前より改善していた。この患者は膝に負担のかかる仕事に従事しており、職場の都合で早期に復帰せざるを得ない環境であったことから、結果として術後の重労働復帰が早すぎたのが、回復するのに時間がかかった1つの要因と考えられる。被験者の組み入れの際、重労働への復帰までの期間が調整可能な被験者を組み入れる必要があった。

E. 結論

プロトコールに定めた安全性の判定基準に従い、細胞移植まで実施した5症例を安全性の評価対象として総合的に評価した結果、「きわめて安全」が3例、「安全」が2例であった。本臨床研究の責任医師および分担医師の共通見解として、自家滑膜幹細胞を半月板縫合部に移植する再生医療は安全であったと評価する。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

国際誌

1. **Sekiya I**, Muneta T, Horie M, Koga H. Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees with Cartilage Defects. *Clin Orthop Relat Res*. Published online 30 April, 2015
2. Otabe K, Nakahara H, Hasegawa A, Matsukawa T, Ayabe F, Onizuka N, Inui M, Takada S, Ito Y, **Sekiya I**, Muneta T, Lotz M, Asahara H. Transcription factor Mohawk controls tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *J Orthop Res*. 33(1);1-8, 2015
3. Nakagawa Y, Muneta T, Kondo S, Mizuno M, Takakuda K, Ichinose S, Tabuchi T, Koga H, Tsuji K, **Sekiya I**. Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal repair in microminipigs. *Osteoarthritis Cartilage*. Feb 13 2015 Epub ahead of print
4. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Miyatake K, Yamada J, Abula K, Koga H, Tomita M, **Sekiya I**. Mouse synovial mesenchymal stem cells increase in yield with knee inflammation. *J Orthop Res*. 33(2); 246-253, 2015
5. Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, Koga H, Nakagawa Y, Tsuji K, Hishikawa S, Kobayashi E, **Sekiya I**. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthr. Cartil*. 22(7);

941-950, 2014

6. Okuno M, Muneta T, Koga H, Ozeki N, Nakagawa Y, Tsuji K, Yoshiya S, Sekiya I. Meniscus regeneration by syngeneic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat model. *J. Orthop. Res.* 32(7); 928-936, 2014

著書
なし

国内雑誌

1. 中川裕介, 関矢一郎, 川端賢一, 近藤伸平, 宗田 大. Tlrhoマッピングにおける半月板変性の評価 別冊整形外科 67 ; 36-41, 2015
2. 関矢一郎, 宗田 大. 骨関節の再生医療の現状と展望 日本整形外科学会雑誌 89(1);8-14, 2015
3. 関矢一郎, 梅原寿太郎, 黒田良祐, 古賀英之. 【中高年齢者の半月板変性】中高年齢者の半月板変性 Bone Joint Nerve. 4(1);147-161, 2014
4. 関矢一郎, 宗田大. 【中高年齢者の半月板変性】(Part5) 展望 変性半月板に対する細胞治療(基礎と今後の展開) Bone Joint Nerve. 4(1);141-146, 2014
5. 宗田大, 関矢一郎. 【中高年齢者の半月板変性】(Part1) 基礎 半月板変性と変形性膝関節症(半月板の逸脱を含めてのReview) Bone Joint Nerve. 4(1);35-39, 2014

6. 古賀英之, 宗田大, 関矢一郎. 【中高年齢者の半月板変性】(Part4) 外側半月板に対する治療 逸脱外側半月板への対応 逸脱外側半月板に対する鏡視下centralization法 Bone Joint Nerve. 4(1); 115-120, 2014
7. 関矢一郎. 滑膜幹細胞による軟骨再生医療の開発 今日の移植. 27(1); 53-60, 2014
8. 二村昭元, 関矢一郎, 宗田大. 【手指の変形性関節症】変形性手関節症(hand OA) に対する軟骨再生の可能性 滑膜間葉系幹細胞による膝関節軟骨再生を例として リウマチ科. 51(2);191-199, 2014
9. 小田邊浩二, 関矢一郎, 宗田大. 【高齢者医療における再生医療の可能性】間葉系幹細胞を用いた運動器再生医療 Geriatric Medicine. 52(3);273-277
10. 齋藤知行, 脇谷滋之, 関矢一郎, 岩崎倫政. 軟骨再生と将来展望 Arthritis-運動器疾患と炎症-. 11(3); 191-200, 2014
11. 関矢一郎, 清水則夫, 森尾友宏, 宗田大. 運動器再生医療研究の最先端滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順 日本整形外科学会雑誌. 88(4);212-215, 2014
12. 小田邊浩二, 関矢一郎, 宗田大. 整形外科最新トピックス 滑膜幹細胞による軟骨再生医療整形外科Surgical Technique. 4(3);385-390, 2014
13. 小田邊浩二, 関矢一郎, 宗田大. 滑膜幹

細胞の採取 Organ Biology.
21 (2);254-259, 2014

14. 小田邊浩二, 宗田大, 関矢一郎. 【関節軟骨修復の現状と実際】滑膜由来間葉系幹細胞を用いた関節軟骨修復 整形・災害外科. 57(9); 1089-1096, 2014

15. 初鹿大祐, 関矢一郎, 宗田大. 整形トピックス滑膜幹細胞の関節内投与は家兎半月板前方1/2 切除後の半月板再生を促進する 整形外科. 65(10);1068, 2014

16. 小田邊浩二, 関矢一郎, 宗田大. 【半月(板) 損傷の治療-現状と未来-】治療の未来 半月板損傷に対する滑膜幹細胞を用いた再生医療 関節外科. 33(9);970-976, 2014

17. 関矢一郎, 宗田大, 松本秀男, 土屋明弘. スポーツ障害-最新の知識と治療法- Bone Joint Nerve. 4(4);735-757, 2014

2. 学会発表 (研究代表者分)
国際学会

1. Sekiya I. Cartilage and meniscus regeneration with synovial stem cells. GCOE Symposium, 2014. 2.18 Tokyo, Japan

2. Sekiya I. Introduction for the “Center for Stem Cell and Regenerative Medicine” at TMDU: “Cartilage and meniscus regeneration with synovial MSCs” as a representative case to establish a platform for the realization of regenerative medicine. GCOE Symposium, 2014. 2.18 Tokyo, Japan

3. Sekiya I. Synovial stem cells promote healing after surgical meniscal repair. International Early Knee OA Symposium, 2014.11. 5 Tokyo, Japan

4. Sekiya I. Synovial Mesenchymal Stem Cells to Repair/Reverse Knee OA: From Bench to Clinic. ORS2015, 2015.3.29 Las Vegas, USA

国内講演

1. 関矢一郎, 宗田 大. 滑膜幹細胞による軟骨再生. 第 27 回日本軟骨代謝学会 2014. 3. 1 京都市

2. 関矢一郎. 関節破壊 破壊制御から再生滑膜間葉系細胞による半月板再生. 第58回 日本リウマチ学会総会学術集会2014. 4. 24 東京

3. 関矢一郎. 変形性膝関節症に対する再生医療の試み. 第58回日本リウマチ学会総会学術集会 2014. 4. 24 東京

4. 関矢一郎, 堀江雅史, 小田邊浩二, 古賀英之, 中村智祐, 渡邊敏文, 中川裕介, 松倉遊, 大関信武, 大川淳, 宗田大. 滑膜間葉系幹細胞投与による縫合半月板治癒促進. 第87回日本整形外科学会学術集会 2014. 5. 22 神戸市

5. 関矢一郎. 関節疾患の幹細胞の役割と再生医療への応用. 第87回日本整形外科学会学術集会 2014. 5. 22 神戸市

6. 関矢一郎, 古賀英之, 小田邊浩二, 堀江雅史, 中村智祐, 渡邊敏文, 中川裕介, 松倉遊, 宗田大. 滑膜幹細胞による軟骨再生.

第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2014. 7. 24 広島市

2015. 3. 20 横浜

7. 堀江雅史, 宗田大, 初鹿大祐, 中川裕介, 近藤伸平, 小田邊浩二, 中村智祐, 古賀英之, 渡邊敏文, 関矢一郎. 半月板損傷の治療の現状と再生への試み滑膜幹細胞を用いた半月板再生. 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2014. 7. 24 広島市

8. 小田邊浩二, 中原啓行, 長谷川彰彦, 松川哲也, 関矢一郎, 宗田大, 大川淳, Lotz Martin, 浅原弘嗣. Mohawk は骨髄間葉系幹細胞の腱靭帯分化を促進する. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014. 10. 9 鹿児島市

9. 尾島美代子, 宗田大, 辻邦和, 豊田雅士, 梅澤明弘, 大川淳, 関矢一郎. 滑膜採取前後の関節液中間葉系幹細胞の遺伝子発現変化. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014. 10. 9 鹿児島市

10. 関矢一郎, 古賀英之, 小田邊浩二, 堀江雅史, 中村智祐, 渡邊敏文, 中川裕介, 大川淳, 宗田大. 変形性膝関節症に対する滑膜幹細胞移植による再生医療の試み. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014. 10. 16 鹿児島市

11. 堀江雅史, 宗田大, 中川裕介, 小田邊浩二, 関矢一郎. 半月損傷治療の過去・現在・未来 滑膜幹細胞を用いた半月板再生. 第42回日本関節病学会 2014. 11. 6 東京

12. 関矢一郎. 滑膜幹細胞による変性半月板の温存. 第14回日本再生医療学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成26年10月31日に下記の国内特許査定を受領し、平成26年12月5日付で特許原簿に登録された。

発明の名称	滑膜由来間葉幹細胞(MSCs)の軟骨・半月板再生への応用
発明者	関矢 一郎、宗田 大
特許権者	国立大学法人東京医科歯科大学株式会社サイメッド
出願番号/出願日	特願 2009-52560 /平成19年8月22日
出願区分	国内
登録日	平成26年12月5日

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

臨床研究で使⽤したチャート・質問⽤紙

KOOS KNEE SURVEY

記載日： 平成____年____月____日

生年月日： 大正 昭和 平成 ____年____月____日 年齢： ____歳

お名前： _____

はじめに：

あなたの膝の状態についてお聞きします。この調査により、あなたが膝について「どの様に感じているのか」、「どのぐらいの活動が可能であるのか」を把握することができます。

それぞれの質問で、1つだけ□に印（レ）をつけて下さい。はっきりと分からない場合は、自分の現在の状態に、より近いものに印を付けてください。

症状について

最近の一週間に感じた、あなたの膝の症状についてお聞きします。

S1. 膝に腫張（はれ）はありますか？

全くない まれに 時々 しばしば いつも
□ □ □ □ □

S2. 膝を動かすときに、ギスギスしたり、コキッとしたり、他にも何か音が鳴ったりしますか？

全くない まれに 時々 しばしば いつも
□ □ □ □ □

S3. 膝を動かすときに、膝が引っ掛かったり、動かなくなったりしますか？

全くない まれに 時々 しばしば いつも
□ □ □ □ □

S4. 膝を完全にまっすぐ伸ばすことができますか？

いつも しばしば 時々 まれに 全くできない
□ □ □ □ □

S5. 膝を完全に曲げることができますか？

いつも しばしば 時々 まれに 全くできない
□ □ □ □ □

拘縮について

最近の一週間に感じた、膝の拘縮についてお聞きします。

「膝の拘縮」とは“膝がかたい”“ゆっくりしか動かせない”と感ずることです。

S6. 朝起床直後の、膝の拘縮はどの程度ですか？

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

S7. 日中のうちで、座ったり、横になったりした後の、膝の拘縮はどの程度ですか？

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

痛みについて

P1. どのくらいの頻度で、あなたは膝に痛みを感じますか？

全くない ほぼ毎月 ほぼ毎週 ほぼ毎日 常に感じる

最近の一週間で、次の活動中に感じた「膝の痛み」は、どの程度ですか？

P2. 膝をひねったり、方向転換するとき

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

P3. 膝をまっすぐに伸ばしたとき

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

P4. 膝を完全に曲げたとき

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

P5. 平坦なところを歩くとき

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

P6. 階段の昇り降りするとき

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い

P7. 夜寝ているとき（就寝中）

全くない 軽度 中程度 強い 非常に強い