

201432002A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる
関節軟骨欠損修復

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 越智 光夫

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の再生医療実用化研究事業による委託業務として、国立大学法人広島大学が実施した平成26年度「自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復」の成果をとりまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復	----- 3
越智光夫	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 関節軟骨損傷患者を対象とした臨床研究	----- 10
安達伸生、亀井直輔、石川正和、中前敦雄、中佐智幸、田中純子	
2. 間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定	---- 18
味八木 茂	
3. 間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定	---- 20
菅原 桂、柳田 忍	
III. 学会等発表実績	----- 24

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復

業務主任者 越智 光夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院整形外科学 教授

研究要旨

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷に対して、磁性化した自己の骨髄間葉系細胞を関節鏡視下に関節内へ注入し、さらに体外から磁力で注入した磁性化間葉系細胞を軟骨欠損部へ集積させる磁気ターゲティングの臨床試験を開始した。また、臨床研究後の産業化を視野に入れて、薬事法に対応するために磁性化間葉系幹細胞の有効性に基づいた品質評価基準の策定を目指して、ヒト骨髄間葉系細胞由来の液性因子に関するプロファイリングを行った。また、ペレットカルチャーやコロニーアッセイによる間葉系幹細胞の分化方向の決定や増殖能に関する *in vitro* 評価系の確立を目指す研究も行った。

担当責任者

亀井 直輔

広島大学病院未来医療センター 助教

田中 純子

広島大学大学院医歯薬保健学研究院
疫学・衛生学 教授

安達 伸生

広島大学病院整形外科 准教授

味八木 茂

広島大学病院未来医療センター 講師

石川 正和

広島大学病院整形外科 助教

中前 敦雄

広島大学大学院医歯薬保健学研究院
整形外科学 助教

中佐 智幸

広島大学病院整形外科 助教

菅原 桂

株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング研究開発部・細胞加工製品
開発 部長

柳田 忍

株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング研究開発部・細胞加工製品
開発 研究員

A. 研究目的

関節軟骨は自然修復能力に乏しく、関節軟骨が障害されると変形性関節症となり、痛みや可動域制限を生じる。重度の変形性関節症には人工関節置換術が適用されるが、若年者や中等度までの変形性関節症に適用が困難である。その他の治療法として、骨髄刺激法では、本来の硝子軟骨ではなく線維軟骨で修復されるため、長期成績に問題があり、硝子軟骨による修復を目的とした自家骨軟骨柱移植法では、新たな軟骨障害の惹起や、対応できる欠損の大きさに限界があるなどの問題がある。私達は（株）ジャパンティッシュエンジニアリングとともに自家培養軟骨を開発し、保険収載されて（ジャック®）、一般の保険診療での実用化に成功した。この方法では採取する軟骨が少量であり、硝子軟骨を再生できる点で優れているが、移植時に関節を大きく展開する必要があるなどの改善すべき点がある。そこで、新たに低侵襲で有効性の高い治療として、MRI 用造影剤として使用されているナノ鉄粒子であるフェルカルボトランを細胞質に取り込ませて磁性化した骨髄間葉系細胞を関節内に注射し、体外から磁場によって細胞を軟骨欠損部へと誘導・集積させる磁気ターゲッティ

ング法を開発した。ミニブタを用いた前臨床試験によって軟骨修復における有効性を確認し、さらに臨床試験開始のために必要なヒト磁性化骨髄間葉系細胞の品質・安全性評価も終了した。

本研究では外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷を対象として磁性化自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングの臨床試験を開始し、3年以内に終了する事を目標とする。また、複数のロットのヒト間葉系細胞を用いてサイトカイン・増殖因子・マイクロRNA発現のプロファイリングを行い、ペレットカルチャーやコロニーアッセイなどの *in vitro* 評価系での結果やヌードラットの関節軟骨欠損モデルへの移植による軟骨修復効果の Lot 間比較を行って、軟骨修復に関与する液性因子の同定と品質基準の策定を行う。

B. 研究方法

1. 関節軟骨損傷患者を対象とした臨床研究

i) 臨床研究の開始準備

まず、購入した骨髄間葉系細胞を用いて細胞培養工程のみのコールドランをセルプロセッシングセンター（広島大学病院内）で行う。次にボランティア（当院整形外科医師）の腸骨から局所麻酔下に13G骨髄穿刺針を用いて骨髄液30mlを採取し、臨床研究のプロトコル通りに間葉系細胞の培養を行い、骨髄採取から細胞培養工程までのコールドランを行う。

ii) 臨床研究の開始

下記の基準で対象を選定し、臨床研究を行う。

対象疾患：

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷

選択基準：

1) 対象疾患に対して骨髄刺激法の施行が

予定されている患者

- 2) MRI で関節軟骨の 50%以上の損傷が認められる患者
- 3) MRI で損傷面積が 2cm²以上と診断された患者
- 4) 同意取得時年齢が 16 歳以上、70 歳以下の患者

試験デザイン： 単施設非盲検非対照試験

方法：

1) 骨髄液の採取：

局所麻酔下に被験者の腸骨より約 30mL の自己骨髄液の採取を行う。

2) 細胞の調製：

骨髄液約 30mL に培養液（15%FBS 含有 DMEM）を加えて、約 3 週間培養し、1×10⁷ 個以上の間葉系細胞を得る。培養の最終段階で、培地中にフェルカルボトラン（リゾピスト®）を添加し、約 12 時間反応させた後、細胞を剥離、生理食塩水で 2 回洗浄する。

3) 骨髄刺激法および骨髄間葉系細胞の移植手術：

被験者に対して関節鏡下に関節軟骨欠損部に骨髄刺激法を施行し、軟骨欠損部の反対側に磁場発生装置を設置して磁性化した自己骨髄間葉系細胞を関節内に注入し、磁場に暴露したまま 10 分間静置した後、創部を縫合し手術を終了する。

目標被験者数： 5 例

研究期間：

承認日から 3 年（被験者登録期間 2 年および経過観察期間 1 年）

主要評価項目：

有害事象（種類、重症度、発現頻度、発現期間および因果関係）

副次評価項目：

臨床症状（スコアリング）、MRI、局所単純 X 線

（倫理面への配慮）

自己細胞移植を受ける患者に対して、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに施行する。

研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得て、さらに厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請し、承認を得た。

2. 間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定

i) 液性因子のプロファイリング

ヒト骨髄間葉系細胞（異なる 5 ロット）を用いて、マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイおよび ELISA によるサイトカイン・増殖因子・マイクロ RNA 発現のプロファイリングを行う。

ii) 分化・増殖の in vitro 評価

骨髄間葉系細胞の軟骨分化と増殖の in vitro 評価系として、各ロットの間葉系細胞のペレットカルチャーとコロニーアッセイを行う。

C. 研究結果

1. 関節軟骨損傷患者を対象とした臨床研究

i) 臨床研究の開始準備

購入した骨髄間葉系細胞をセルプロセッシングセンター（広島大学病院内）へ搬入し、プロトコールに沿って工程を確認しながら約 3 週間の培養を行った。細胞は順調に増殖し、コンタミなどの異常は認められなかった。

さらに、整形外科外来処置室でボランティア（当院整形外科医師）の左腸骨から

局所麻酔下に 13G 骨髄穿刺針を用いて骨髄液 30ml を採取し、プロトコールに沿って間葉系細胞の培養を行った。採取した骨髄液で一部血液の凝集を認めたが、間葉系細胞の培養は可能であった。

ii) 臨床研究の開始

臨床研究の対象症例の登録を開始し、平成 27 年 2 月 6 日に第 1 例目の手術治療を行った。症例は 18 歳の女性で、左膝の脛骨外側プラトーの軟骨欠損で、他院にて半月板損傷疑いで関節鏡手術を受けたが、脛骨外側プラトーに軟骨欠損を指摘され、その場では適切な治療法がなかったため、当院へ紹介となった。脛骨外側プラトーの軟骨欠損であるため、手技的な問題で自家培養軟骨移植（ジャック®）の適用が不可能であるため、本人および両親から本臨床研究への参加に関する同意を得て、登録された。左腸骨の骨髄穿刺では、約 30ml の骨髄を採取でき、プロトコールに沿って培養を行ったところ、約 2 週間の培養で 1×10^7 個以上の間葉系細胞を獲得でき、手術前日にフェルカルボトランによる磁性化を開始し、出荷前に顕微鏡で視野内のすべての細胞が磁性化されていることを確認した。無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験はすべて陰性であった。また、フローサイトメトリーでは 90%以上が CD44 および CD105 陽性であった。手術では、まず関節鏡視下に左膝の脛骨外側プラトーで剥離していた軟骨片をリフレッシュし、骨髄刺激法（マイクロフラクチャー）を行った。次に左膝関節外側下方に磁場発生装置を設置し、関節鏡視下に軟骨損傷部を確認しながら、磁性化間葉系細胞を膝関節内へ注入した。注入した細胞のほとんどは拡散することなく軟骨欠損部へ留まっていた。

2. 間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定

i) 液性因子のプロファイリング

5 種類の異なるロットのヒト骨髄間葉

系細胞から RNA を抽出し、またコントロールとしてヒト皮膚線維芽細胞からも RNA を抽出し、マイクロアレイ(東レ 3D-Gene)を行った。(図 1)

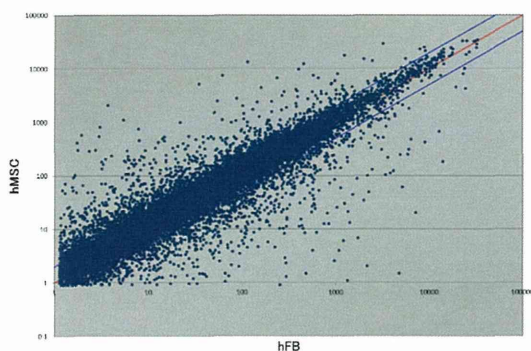


図 1: マイクロアレイ (骨髄間葉系細胞と線維芽細胞の比較)

例えば、軟骨との関連因子では間葉系細胞において TGF β の発現が高く、BMP2 はむしろ低いなどの特徴があり、BMP などはロット間のバラツキが非常に大きかった。マイクロ RNA の発現についても TaqMan[®] Array MicroRNA Cards を用いて発現解析を行った。例えば、軟骨分化に関連した miR-140 は間葉系細胞において発現が高く、ロット間で著明な発現のバラツキを認めた。また、ELISA による間葉系細胞の培養上清中のタンパク発現評価では、まず条件設定のため、別の 3 ロットのヒト骨髄間葉系細胞を使って軟骨形成に関連した因子の発現評価を行った。間葉系細胞の培養上清に含まれるサイトカイン・増殖因子として以下の因子を認めた。

SDF-1、TGF- β 1、TGF- β 2、FGF-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-4、IL-6、IL-8、HGF、VEGF、pro-MMP-1、MMP-13

また、以下の因子は検出不可能または微量には含まれるが定量性に問題がある因子であった。

BMP-7、RANTES、MMP-8、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- α 、MMP-9、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、PDGF-AA、PDGF-BB、IGF-1

ii) 分化・増殖の in vitro 評価

軟骨分化の評価として、5 種類の異なるロットのヒト骨髄間葉系細胞を用いてペレットカルチャーを行った。形成されたペレットのサイズにロット間での差は認められなかったが、サフラニン O 染色での染色性には差を認め、3 ロットで良好に染色されたのに対して、残りの 2 ロットでは染色性が低かった。コロニー形成能 (以下 CFE) の評価では、5 ロットの MSC においてコロニー形成率は 8.3%、1.1%、1.1%、0.7%、0.2%であった。また、磁性化した MSC については、15.5%、7.4%、4.5%、4.5%、0.2%であった。磁性化した MSC で CFE が高くなる傾向が見られた。

D. 考察

臨床研究では、開始前の準備として骨髄穿刺からセルプロセッシングセンターでの間葉系細胞の培養までのコールドランを行い、安全な骨髄採取と無菌での培養が可能なことを確認できた。この結果を受けて、臨床研究を開始した。臨床研究でも明らかな有害事象の発生なく、骨髄穿刺から間葉系細胞の培養および細胞移植まで行うことができた。術後 3 週の現在においても明らかな有害事象は発生しておらず、経過良好である。今後臨床症状のスコアリングや MRI による有効性の評価を行っていく予定である。また、目標被験者数である 5 例の患者登録はすでに終了しており、随時細胞移植治療を行っていく予定である。

間葉系細胞の液成因子プロファイリングに関しては、mRNA およびマイクロ RNA のアレイを終了し、線維芽細胞をコントロールとすることで、間葉系細胞に特徴的に高発現している因子やその因子のロット間のバラツキについて確認できた。今後はこれらのデータとペレットカルチャーやヌードラット膝関節軟骨欠損モデルへの移植実験の結果との対比によって、必要な因子を選別していく予定である。また、タンパクレベルの発現評価に関してはバリデーションが完了し、今後異なる 5 ロットの間葉系細胞を用いた発現評価を行っていく予定で

ある。間葉系細胞の軟骨分化と増殖の in vitro 評価系としてペレットカルチャーとコロニーアッセイを行い、ペレットカルチャーではロット間でサフラニン O 染色での染色性にバラツキを認めた。今後は細胞外基質の含有について定量評価する予定である。また、コロニーアッセイの結果についても、他のパラメーターとの対比による意味づけを行って行く予定である。

E. 結論

「自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復」の臨床研究の第一例目の治療を開始し、有害事象なく細胞移植治療を行うことができた。また、間葉系細胞由来の液性因子のプロファイリングや軟骨分化・増殖能の in vitro 評価系を用いたデータを収集した。

F. 健康危険情報

業務主任者・担当責任者ともに無し

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Mitsuo Ochi, (Presidential Lecture) Biological Reconstruction of the Knee Joint. APKASS 2014. (2014.4.14 奈良)

越智光夫、膝関節の生物学的再建術 2014. 整形外科 Expert セミナー 学術講演会. (2014.4.19 札幌)

Mitsuo Ochi, (Keynote Speech) Cutting edge technique for cartilage repair. International Forum of Orthopaedics Sports Medicine & Arthroscopy Surgery. (2014.5.8, China)

Mitsuo Ochi, Biological reconstruction of the knee. Sacred Heart Catholic

University. (2014.5.12, Italy)

Mitsuo Ochi, Cartilage repair using magnet. ESSKA CONGRESS. (2014.5.14, Netherlands)

越智光夫、関節軟骨局所欠損から変形性関節症に対する治療法. 第87回日本整形外科学会学術総会. (2014.5.23 神戸)

越智光夫、(招待講演) 膝関節再建術 -基礎から臨床へ-. 第138回愛媛整形外科集談会. (2014.6.7 松山)

Mitsuo Ochi, Cartilage Repair; Past, Present, and Future. ConMed Linvatec Asia Arthroscopy Symposium. (2014.6.28, Indonesia)

Mitsuo Ochi, (招待講演) Cartilage repair: past, present and future: lessons learned. TUSYAD Congress. (2014.9.24, Turkey)

越智光夫、(教育研修講演) 軟骨欠損治療に関する世界の情勢. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. (2014.10.9 鹿児島)

Mitsuo Ochi, (招待講演) Basic researches on cell transplantation and microRNA. Translational Research in Orthopedics and Traumatology. (2014.11.15, Italy)

Mitsuo Ochi, (招待講演) Cartilage repair using magnets. SFA Annual Congress 2014. (2014.12.3, Luxembourg)

Mitsuo Ochi, Cutting edge techniques of cartilage repair. Asian Cartilage Repair Society 2nd annual congress 2014. (2014.12.7, Korea)

亀井直輔、越智光夫、自家骨髄間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生. 第14回日本再生医療学会総会. (2015.3.19 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし
3.その他
なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

関節軟骨損傷患者を対象とした臨床研究

担当責任者	広島大学病院 整形外科 准教授	安達伸生
	病院 未来医療センター 助教	亀井直輔
	病院 整形外科 助教	石川正和
	大学院医歯薬保健学研究院 整形外科学 助教	中前教雄
	病院 整形外科 助教	中佐智幸
	大学院医歯薬保健学研究院 疫学・衛生学 教授	田中純子

研究要旨

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷に対して、磁性化した自己の骨髄間葉系細胞を関節鏡視下に関節内へ注入し、さらに体外から磁力で注入した磁性化間葉系細胞を軟骨欠損部へ集積させる磁気ターゲティングの臨床試験を計画し、まず骨髄穿刺から細胞培養までのコールドランを行い、その後に臨床試験の第1例目の治療を開始した。

A. 研究目的

関節軟骨は自然修復能力に乏しく、関節軟骨が障害されると変形性関節症となり、痛みや可動域制限を生じる。重度の変形性関節症には人工関節置換術が適用されるが、若年者や中等度までの変形性関節症に適用が困難である。その他の治療法として、骨髄刺激法では、本来の硝子軟骨ではなく線維軟骨で修復されるため、長期成績に問題があり、硝子軟骨による修復を目的とした自家骨軟骨柱移植法では、新たな軟骨障害の惹起や、対応できる欠損の大きさに限界があるなどの問題がある。私達は（株）ジャパンティッシュエンジニアリングとともに自家培養軟骨を開発し、保険収載されて（ジャック®）、一般の保険診療での実用化に成功した。この方法では採取する軟骨が少量であり、硝子軟骨を再生できる点で優れているが、移植時に関節を大きく展開する必要があるなどの改善すべき点がある。そこで、新たに低侵襲で有効性の高い治療として、MRI 用造影剤として使用されているナノ鉄粒子であるフェルカルボトランを細胞質に取り込ませて磁性化した骨髄間葉系細胞を関節内に注射し、体外から磁場によって細胞を軟骨欠損部へと誘導・集積させる磁気ターゲティング法を開発した。

ミニブタを用いた前臨床試験によって軟骨修復における有効性を確認し、さらに臨床試験開始のために必要なヒト磁性化骨髄間葉系細胞の品質・安全性評価も終了した。

本研究では外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷を対象として磁性化自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングの臨床試験を開始し、3年以内に終了する事を目標とする。

B. 研究方法

i) 臨床研究の開始準備

まず、購入した骨髄間葉系細胞を用いて細胞培養工程のみのコールドランをセルプロセッシングセンター（広島大学病院内）で行う。次にボランティア（当院整形外科医師）の腸骨から局所麻酔下に13G骨髄穿刺針を用いて骨髄液30mlを採取し、以下のプロトコル通りに間葉系細胞の培養を行い、骨髄採取から細胞培養工程までのコールドランを行う。

1) 骨髄液の採取

定められた手順書に従って約30mLの自己骨髄液の採取を行い、検体搬送容器に

保存して試験物調製施設に搬送する。

2) 細胞の調製

培養液に15%ウシ胎児血清 (FBS) を加える。セルプロセッシングセンターに運び込まれた骨髓液約30mLに培養液を加えT-75フラスコで培養する。3日ごとに培養液を交換する、約3日後に接着細胞が出現する。赤血球等の非接着細胞は培養液交換の時に除去される。約10日後、培養細胞がサブコンフルエントに達したところで継代培養して、T-75フラスコに播種する。約10日後、細胞がほぼコンフルエントに達したところで培地中にリゾピスト35.2 μ Lを添加し、約12時間反応させる。細胞を剥離、遠心分離し、生理食塩水で2回洗浄した後、さらに生理食塩水を加え細胞浮遊液を作成しそこにヒアルロン酸を加え攪拌する。

ii) 臨床研究の開始

下記の基準で対象を選定し、臨床研究を行う。

対象疾患：

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷

選択基準：

- 1) 対象疾患に対して骨髓刺激法の施行が予定されている患者
- 2) MRI で関節軟骨の 50%以上の損傷が認められる患者
- 3) MRI で損傷面積が 2cm² 以上と診断された患者
- 4) 同意取得時年齢が 16 歳以上、70 歳以下の患者

試験デザイン： 単施設非盲検非対照試験

方法 (図 2)：

1) 骨髓液の採取：

局所麻酔下に被験者の腸骨より約 30mL の自己骨髓液の採取を行う。

2) 細胞の調製：

骨髓液約 30mL に培養液 (15%FBS 含有 DMEM) を加えて、約 3 週間培養し、 1×10^7 個以上の間葉系細胞を得る。培養の最終段階で、培地中にフェルカルボトラン (リゾピスト®) を添加し、約 12 時間反応させた後、細胞を剥離、生理食塩水で 2 回洗浄する。

3) 骨髓刺激法および骨髓間葉系細胞の移植手術：

被験者に対して関節鏡下に関節軟骨欠損部に骨髓刺激法を施行し、軟骨欠損部の反対側に磁場発生装置を設置して磁性化した自己骨髓間葉系細胞を関節内に注入し、磁場に暴露したまま 10 分間静置した後、創部を縫合し手術を終了する。

目標被験者数： 5 例

研究期間：

承認日から 3 年 (被験者登録期間 2 年および経過観察期間 1 年)

主要評価項目：

有害事象 (種類、重症度、発現頻度、発現期間および因果関係)

副次評価項目：

臨床症状 (スコアリング)、MRI、局所単純 X 線

(倫理面への配慮)

自己細胞移植を受ける患者に対して、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに施行する。

研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得て、さらに厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請し、承認を得た。

C. 研究結果

1. 臨床研究

i) 臨床研究の開始準備

購入した骨髄間葉系細胞をセルプロセッシングセンター（広島大学病院内）へ搬入し、プロトコールに沿って工程を確認しながら約3週間の培養を行った。細胞は順調に増殖し、コンタミなどの異常は認められず、問題無く細胞培養を終了した。（図3）

次に、整形外科外来処置室でボランティア（当院整形外科医師）の左腸骨から局所麻酔下に13G骨髄穿刺針を用いて骨髄液30mlを採取し、骨髄液をセルプロセッシングセンター（広島大学病院内）へ搬入し、プロトコールに沿って間葉系細胞の培養を行った。採取した骨髄液で一部血液の凝集を認めたが、3週間の培養で細胞は順調に増殖し、コンタミなどの異常は認められず、問題無く間葉系細胞を培養可能であった。

ii) 臨床研究の開始

臨床研究の対象症例の登録を開始し、平成27年2月6日に第1例目の手術治療を行った。症例は18歳の女性で、左膝の脛骨外側プラトーの軟骨欠損で、他院にて半月板損傷疑いで関節鏡手術を受けたが、脛骨外側プラトーに軟骨欠損を指摘され、その場では適切な治療法がなかったため、当院へ紹介となった。脛骨外側プラトーの軟骨欠損であるため、スペースが無く、手技的に骨軟骨柱移植や自家培養軟骨移植（ジャック®）の適用が不可能であり、従来の治療法の中では骨髄刺激法以外に適応できる治療法がなかった。本人および両親から本臨床研究への参加に関する同意を得て、登録された。局所麻酔下に左腸骨からの骨髄穿刺で、約30mlの骨髄を採取でき、プロトコールに沿って培養を行った（図4）。約2週間の培養で 1×10^7 個以上の間葉系細胞を確保できた。手術前日にフェルカルボトランによる磁性化を開始し、出荷前に顕微鏡で視野内のすべての細胞が磁性化されていることを確認し

た（図5）。無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験はすべて陰性であった。また、フローサイトメトリーでは90%以上がCD44およびCD105陽性であった。手術では、まず関節鏡視下に左膝の脛骨外側プラトーで剥離していた軟骨片を切除して局所をリフレッシュし、骨髄刺激法（マイクロフラクチャー）を行った。次に左膝関節外側下方に磁場発生装置を設置し、関節鏡視下に軟骨損傷部を確認しながら、磁性化間葉系細胞を膝関節内へ注入した。注入した細胞のほとんどは拡散することなく軟骨欠損部へ留まっていた。

D. 考察

臨床研究では、開始前の準備として骨髄穿刺からセルプロセッシングセンターでの間葉系細胞の培養までのコールドランを行い、安全な骨髄採取と無菌での培養が可能であることを確認できた。この結果を受けて、臨床研究を開始した。臨床研究でも明らかな有害事象の発生なく、骨髄穿刺から間葉系細胞の培養および細胞移植まで行うことができた。術後3週の現在においても明らかな有害事象は発生しておらず、経過良好である。今後臨床症状のスコアリングやMRIによる有効性の評価を行っていく予定である。また、目標被験者数である5例の患者登録はすでに終了しており、随時細胞移植治療を行っていく予定である。

E. 結論

「自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復」の臨床研究の第一例目の治療を開始し、有害事象なく細胞移植治療を行うことができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

亀井直輔、越智光夫、自家骨髄間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生. 第14回日本再生医療学会総会. (2015.3.19 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

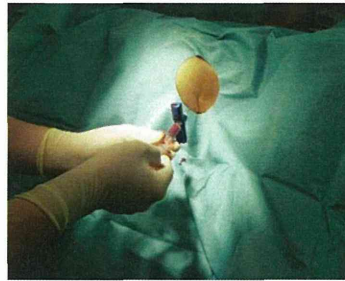
2. 実用新案登録

なし

3. その他

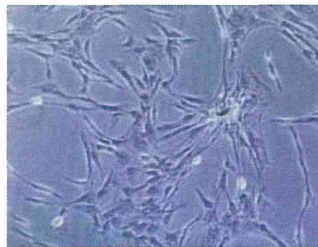
なし

整形外科外来処置室（診療棟2階）



局所麻酔下に腸骨から
骨髓液30mlを採取

広島大学病院未来医療センター内CPC（診療棟2階）



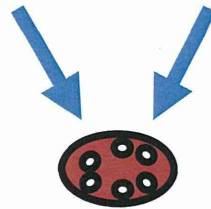
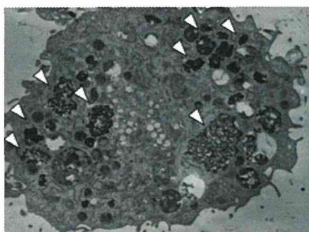
CPCで骨髓細胞を培養
約2週間で 1×10^7 個以上
の間葉系細胞を樹立



フェルカルボトラン



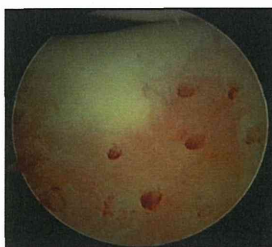
間葉系細胞



磁性化細胞

培養の最終段階で
フェルカルボトラン
を添加し、約12時間で
間葉系細胞を磁性化

手術室（診療棟4階）



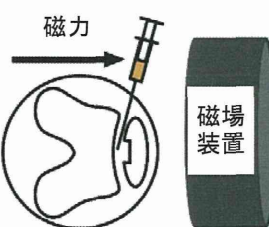
骨髓刺激法



磁性化細胞

磁場装置

磁気ターゲティング



磁力

磁場装置

関節軟骨欠損患者に
関節鏡視下に骨髓刺
激法を行った直後に
磁気ターゲティング
による細胞移植を行
う

図 2

細胞の播種



細胞の確認

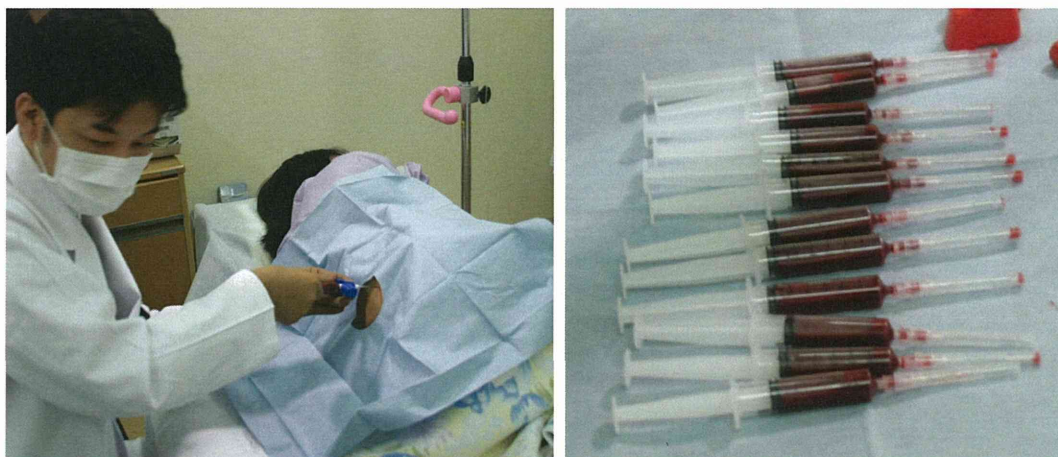


インキュベーター
で培養



図3 (コールドラン)

骨髓採取



セルプロセッシングセンターで播種



インキュベーターで培養

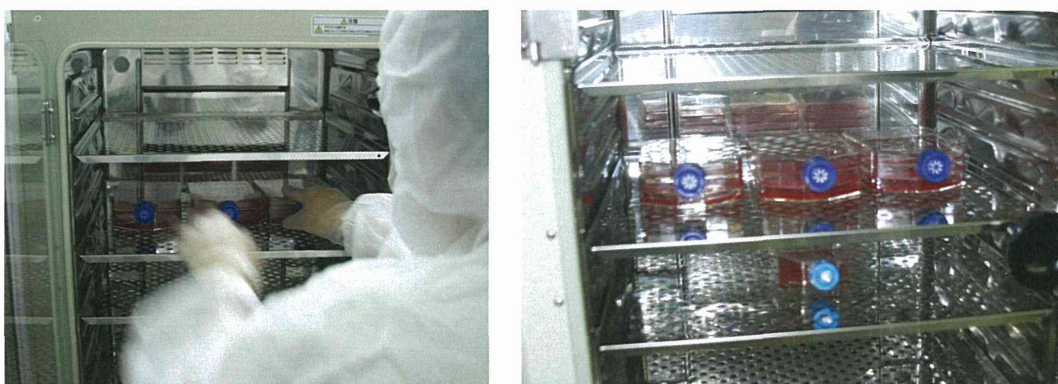
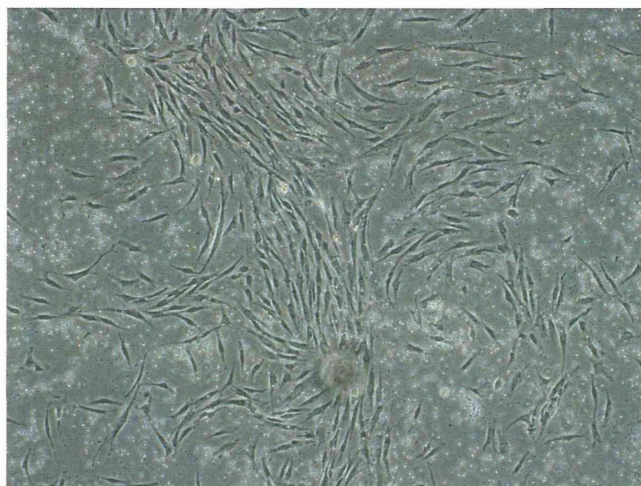
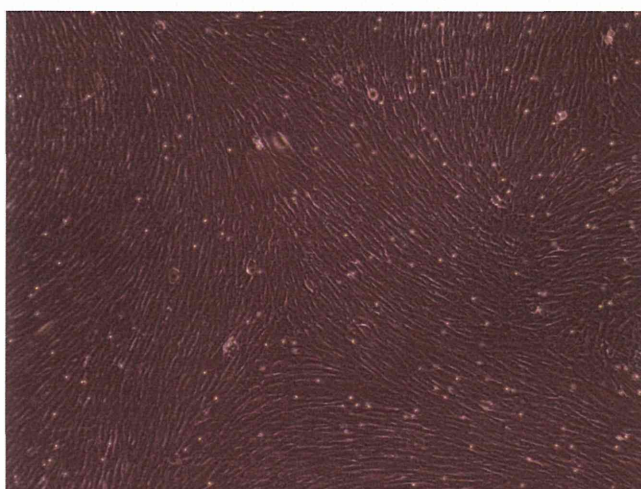


図 4

培養 7 日目



培養 14 日目



磁性化細胞



図 5 (骨髓間葉系幹細胞)

間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定

担当責任者 広島大学病院 未来医療センター 講師 味八木茂

研究要旨

外傷性損傷あるいは離断性骨軟骨炎に起因する膝関節軟骨損傷に対して、磁性化した自己の骨髄間葉系細胞を関節鏡視下に関節内へ注入し、さらに体外から磁力で注入した磁性化間葉系細胞を軟骨欠損部へ集積させる磁気ターゲティングの臨床試験の終了後の治験開始を視野にいれて、薬事法に対応するために磁性化間葉系幹細胞の有効性に基づいた品質評価基準の策定を目指して、ヒト骨髄間葉系細胞由来の液性因子に関するプロファイリングを行った。また、ペレットカルチャーによる間葉系幹細胞の軟骨分化に関する *in vitro* 評価系の確立を目指す研究も行った。

A. 研究目的

関節軟骨は自然修復能力に乏しく、関節軟骨が障害されると変形性関節症となり、痛みや可動域制限を生じる。重度の変形性関節症には人工関節置換術が適用されるが、若年者や中等度までの変形性関節症に適用が困難である。その他の治療法として、骨髄刺激法では、本来の硝子軟骨ではなく線維軟骨で修復されるため、長期成績に問題があり、硝子軟骨による修復を目的とした自家骨軟骨柱移植法では、新たな軟骨障害の惹起や、対応できる欠損の大きさに限界があるなどの問題がある。私達は（株）ジャパンティッシュエンジニアリングとともに自家培養軟骨を開発し、保険収載されて（ジャック®）、一般の保険診療での実用化に成功した。この方法では採取する軟骨が少量であり、硝子軟骨を再生できる点で優れているが、移植時に関節を大きく展開する必要があるなどの改善すべき点がある。そこで、新たに低侵襲で有効性の高い治療として、MRI 用造影剤として使用されているナノ鉄粒子であるフェルカルボトランを細胞質に取り込ませて磁性化した骨髄間葉系細胞を関節内に注射し、体外から磁場によって細胞を軟骨欠損部へと誘導・集積させる磁気ターゲティング法を開発した。ミニプタを用いた前臨床試験によって軟骨修復における有効性を確認し、さらに臨床

試験開始のために必要なヒト磁性化骨髄間葉系細胞の品質・安全性評価も終了した。

本研究では複数のロットのヒト間葉系細胞を用いてサイトカイン・増殖因子・マイクロ RNA 発現のプロファイリングを行い、ペレットカルチャーやコロニーアッセイなどの *in vitro* 評価系での結果やヌードラットの関節軟骨欠損モデルへの移植による軟骨修復効果の Lot 間比較を行って、軟骨修復に関与する液性因子の同定と品質基準の策定を行う。

B. 研究方法

i) 液性因子のプロファイリング

ヒト骨髄間葉系細胞（異なる 5 ロット）およびヒト皮膚線維芽細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイによる mRNA およびマイクロ RNA の網羅的発現解析を行い、サイトカイン・増殖因子・マイクロ RNA 発現のプロファイリングを行う。ヒト皮膚線維芽細胞のデータはコントロールとして使用する。

ii) 分化・増殖の *in vitro* 評価

骨髄間葉系細胞の軟骨分化の *in vitro* 評