

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成26年 4月

はじめに

本研究報告書は、平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金「再生医療実用化研究事業」に 5 年計画の事業として採択された「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 (H24-再生-一般-003)」に関する平成 25 年度の研究成果報告を纏めたものです。関係者の皆様のご尽力により研究期間を通じて一定の成果を上げることができましたのでご報告申し上げます。

私共は、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、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を世界で初めて報告し、修復能力に富んだ積層化軟骨細胞シートの特性を明らかにしてきました。軟骨細胞シートは強固な剛体ではありませんが、優れた接着性を有し、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクターから軟骨を保護し、サイトカインの持続的な供給源となり、さらに骨髄由来幹細胞を軟骨へ分化誘導するイニシエーターとして機能しており、単なる軟骨再生というよりは、むしろ自己修復能力を向上させた効果により軟骨は修復再生されています。軟骨全層欠損と部分損傷という両タイプの軟骨損傷に対して、軟骨細胞シートは動物実験で治療効果を認めています。これは、従来の軟骨再生医療では認められなかった治療効果であり、変形性関節症において常に混在するこれら 2 種類の軟骨損傷に治療効果が見込まれるため、将来的に変形性関節症まで適用を拡大できるポテンシャルを有します。

本事業は、先端医療開発特区「細胞シートによる再生医療実現化プロジェクト」(研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授)において、「対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられていたものです。厚生労働大臣通知(厚生労働省発医政 1003 第 3 号平成 23 年 10 月 3 日)により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例が東海大学医学部付属病院で実施されました。臨床研究で安全性評価を速やかに行い、所定の症例数を経て、治療効果を確認し先進医療での実施を目指します。一方、治療として普及させるためにはコストを下げ、患者の手術侵襲を減らし、治療までの待期期間を短くするためにも、免疫応答の低い軟骨組織では、大量生産によるレディメイドの同種細胞シートでの実施が不可欠であると考えます。企業治験の可能性を検討しながら、自己細胞シートの場合と同様に、まずはヒト幹細胞臨床研究の実施を検討していきます。

本研究成果が、外傷性の軟骨損傷といった限局的な軟骨病変ばかりでなく、変形性膝関節症の克服に貢献できることを目指して、研究分担者、研究協力者の方々と研究を進めております。いつも、本事業を支えてくださっている全ての関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

平成 26 年 4 月

東海大学医学部外科学系整形外科学 教授 佐藤 正人

目 次

| | | |
|-----------------|-------|---|
| ． 研究班の構成 | ----- | 1 |
|-----------------|-------|---|

． 総括研究報告

| | | |
|---|-------|---|
| 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 2 5 年度総括研究報告 - 佐藤正人 | ----- | 5 |
|---|-------|---|

． 分担研究報告

自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現

| | | |
|---|-------|----|
| 1．細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価 谷良樹 横山宗昂 石原美弥 三谷玄弥 高垣智紀 小林美由希 小久保舞美 岡田恵里 | ----- | 15 |
|---|-------|----|

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

| | | |
|---|-------|----|
| 2．同種軟骨再生医療のための安全性評価 岡田恵里 加藤俊一 小林広幸 三上礼子 小林美由希 横山宗昂 河毛知子 渡部綾子 的場亮 伊東紀子 | ----- | 25 |
|---|-------|----|

| | | |
|--|-------|----|
| 3．多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験 河毛知子 阿久津英憲 梅澤明弘 小久保舞美 岡田恵里 豊田恵利子 | ----- | 33 |
|--|-------|----|

| | | |
|---|-------|-----|
| 4 . 同種細胞シートの保存法に関する研究 長嶋比呂志 前原美樹 | ----- | 41 |
| 5 . 多指症軟骨組織由来細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 加藤玲子 小久保舞美 岡田恵里 河毛知子 | ----- | 55 |
| 6 . 細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による 経時的評価に関する研究 竹内護 村井邦彦 高久裕子 | ----- | 63 |
| . 研究成果の刊行（平成 25 年度）に関する一覧表 | ----- | 71 |
| . 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 77 |
| . 班会議 - 議事録・発表資料 - | ----- | 135 |

研究班の構成

| | 研究者名 | 所属研究機関・役職 | 専門 | 分担研究項目 |
|-------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---|
| 研究代表者 | 佐藤 正人 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・教授 | 整形外科学 軟骨再生医療 | 研究統括・研究計画立案 ヒト幹細胞臨床研究 |
| 研究分担者 | 三谷 玄弥 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師 | 整形外科学 軟骨再生医療 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 沓名 寿治 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師 | 整形外科学 軟骨再生医療 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 海老原吾郎 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師 | 整形外科学 軟骨再生医療 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 長井 敏洋 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師 | 整形外科学 軟骨再生医療 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 小久保舞美 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・特定研究員 | 化学 | ヒト幹細胞臨床研究、 分子生物学的解析評価、 CPC での細胞培養 |
| | 加藤 俊一 | 東海大学医学部基盤診療 学系再生医療科学・教授 | 造血幹細胞移植 再生医療 | 同種細胞処理とバンキ ング、安全性評価に関す る研究 |
| | 小林 広幸 | 東海大学医学部基盤診療 学系臨床薬理学・教授 | 臨床検査医学 | 同種細胞のレギュレー ションと安全性評価に 関する研究 |
| | 三上 礼子 | 東海大学医学部基盤診療 学系臨床薬理学・講師 | レギュラトリー サイエンス | 同種細胞のレギュレー ションに関する研究、 薬事戦略相談担当 |
| | 阿久津英憲 | 国立成育医療研究センタ ー研究所 生殖細胞医療 研究部・室長 | 産科婦人科学 | 同種細胞処理と品質評 価に関する研究 |
| | 長嶋比呂志 | 明治大学農学部生命科学 科発生工学研究室・教授 | 発生工学 | 同種細胞の保存法に関 する研究、大型動物実験 |
| 加藤 玲子 | 国立医薬品食品衛生研究 所・医療機器部・主任研 究官 | 分子生物学 免疫学 | 同種軟骨細胞移植の免 疫反応に関する研究 | |

研究班の構成

| | | | | |
|-------|----------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| 研究協力者 | 高垣 智紀 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師 | 整形外科学 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 小林美由希 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生 | 整形外科学 | 細胞処理と安全性評価 に関する研究 |
| | 横山 宗昂 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生 | 整形外科学 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 谷 良樹 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・大学院生 | 整形外科学 | ヒト幹細胞臨床研究、 自己細胞シート移植と 評価 |
| | 豊田恵利子 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・奨励研究員 | 細胞培養 | 細胞処理と安全性評価 に関する研究 |
| | 岡田 恵里 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・特定研究員 | 細胞培養 | 細胞処理と安全性評価 に関する研究 |
| | 河毛 知子 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・研究員 | 細胞培養 | 細胞処理と安全性評価 に関する研究 |
| | 渡部 綾子 | 東海大学医学部外科学系 整形外科学・研究員 | 細胞培養 | 細胞処理と安全性評価 に関する研究 |
| | 梅澤 明弘 | 国立成育医療研究センタ ー研究所 生殖細胞医療 研究部・部長 | 産科婦人科学 | 同種細胞処理と品質評 価に関する研究 |
| | 石原 美弥 | 防衛医科大学校医用工学 講座・教授 | 光応用技術 軟骨特性評価 | 光を用いた細胞シート の評価技術 |
| | 前原 美樹 | 明治大学農学部生命科学 科発生工学研究室・ 研究アシスタント | 発生工学 | 同種細胞の保存法に関 する研究、大型動物実験 |
| | 竹内 護 | 自治医科大学麻酔科学集 中治療医学講座・教授 | 麻酔科学 | 細胞シート移植後の動 態評価、 Bioluminescence によ る経時的評価 |
| 村井 邦彦 | 自治医科大学麻酔科学集 中治療医学講座・非常勤 講師 | 麻酔科学 | 細胞シート移植後の動 態評価、 Bioluminescence によ る経時的評価 | |

研究班の構成

| | | | | |
|-------|-------|--------------------------|-----------|--|
| 研究協力者 | 高久 裕子 | 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・大学院生 | 麻醉科学 | 細胞シート移植後の動態評価、 Bioluminescence による経時的評価 |
| | 的場 亮 | 株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長 | 遺伝子・ゲノム解析 | 培養細胞の安全性評価に関する研究 |
| | 伊東 紀子 | 株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部 | 遺伝子・ゲノム解析 | 培養細胞の安全性評価に関する研究 |
| | 坂井 秀昭 | 株式会社セルシード・知的財産部 | 細胞シート工学 | 専用器材やサポートする治具の設計検討 |
| 経理事務局 | 石田 秀一 | 東海大学伊勢原研究推進部伊勢原研究業務課・課長 | | 経理事務 |

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25年度 総括研究報告 -

研究代表者 佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学・教授

研究要旨：変形性関節症において常に混在する軟骨部分損傷（軟骨内に留まる損傷）と全層欠損（軟骨下骨まで達する損傷）の両タイプの軟骨損傷に対して、我々は軟骨細胞シートによる修復・再生効果を動物実験で確認してきた。本研究事業では、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、関節軟骨の再生医療の実現を目指している。本研究事業の柱は2つである。「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」と「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」であるが、それぞれに対して研究分担者、研究協力者の方々と共に実施した内容を、今年度の研究報告としてまとめる。

現在ヒト幹細胞臨床研究として実施中の「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」は、東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成23年3月3日に厚生労働省へ申請し、同年10月3日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認された。平成26年3月31日までに11症例がエントリーし、8症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1例から第4例は移植後1年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

【研究分担者】

三谷玄弥：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

沓名寿治：同・講師

海老原吾郎：同・講師

長井敏洋：同・講師

小久保舞美：同・特定研究員

加藤俊一：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授

小林広幸：東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授

三上礼子：東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師

阿久津英憲：国立成育医療研究センター研究所 生殖細胞医療研究部・室長

長嶋比呂志：明治大学農学部生命科学科発

生工学研究室・教授

加藤玲子：国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官

【研究協力者】

高垣智紀：東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

小林美由希：同・大学院生

横山宗昂：同・大学院生

谷良樹：同・大学院生

豊田恵利子：同・奨励研究員

岡田恵里：同・特定研究員

河毛知子：同・研究員

渡部綾子：同・研究員

梅澤明弘：国立成育医療研究センター研究所 生殖細胞医療研究部・部長

石原美弥：防衛医科大学校医用工学講座・教授

前原美樹：明治大学農学部生命科学科発生
工学研究室・研究アシスタント

竹内護：自治医科大学麻醉科学集中治療医
学講座・教授

村井邦彦：自治医科大学麻醉科学集中治療
医学講座・非常勤講師

高久裕子：自治医科大学麻醉科学集中治療
医学講座・大学院生

の場亮：株式会社 DNA チップ研究所・代
表取締役・社長

伊東紀子：株式会社 DNA チップ研究所・
研究開発部

坂井秀昭：株式会社セルシード・知的財産
部

A. 研究背景と目的

変形性関節症をはじめとする運動器疾患は、生命を直接脅かすものではないために、癌や心臓疾患など生命に直接関わる疾患と比べるとやや軽視されてきた。しかし、日常生活動作(ADL)を下げるばかりか、生活の質(QOL)の低下も招き、人的社会的損失は計り知れないものがある。我が国の65歳以上の高齢者人口は、総務省統計局の資料によると平成25年9月15日現在3,186万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も25.0%となり、未曾有の超高齢化社会が到来した。一方、平成22年国民生活基礎調査では、健康寿命を縮める原因（要支援となる原因）の第1位が関節疾患19.4%であるとも報告されている。

関節軟骨の再生医療は、軟骨細胞の培養が比較的容易であったため、再生医療の第1世代というような言われ方をされた時期もあった。そして軟骨の再生医療は1990年前半から海外で実施、報告され、米国をはじめ

めとする諸外国では既に2万例を超す手術症例の蓄積がある。しかしながら、その対象疾患は小さな軟骨の外傷性病変であり、再生医療が真に必要とされる変形性関節症の治療には20年近く経過した現在でも、いまだに到達する気配すら感じられない。それは、線維軟骨はできても硝子軟骨で関節軟骨を作ることが、想像以上に難しいことが明らかになったため、今まさに軟骨再生医療を実現するためのブレイクスルーが待望されている。

本研究事業では、先端医療開発特区「細胞シートによる再生医療実用化プロジェクト」（研究代表者：岡野光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授）において「事業期間中（H20~24年度）に対象疾患及びその治療法を選定し前臨床試験を実施する組織・臓器」として挙げられていた軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政1003第3号平成23年10月3日）により、東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。本臨床研究により安全性の評価を速やかに行うと共に、先進医療としての実施を目指す。また、将来的な普及の観点からすると、免疫応答の低い軟骨組織では、レディメイドの同種細胞シートで、大量生産によりコストを下げた実施が不可欠であり、まずは前臨床研究を行い、同種移植へ向けた周辺環境を整備し、企業治験の可能性を検討しながら、自己細胞シートの場合と同様にヒト幹細胞臨床研究の実施を目指すものである。

B. 研究課題

【1】自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現

- (1) 自己細胞シートによる臨床研究「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の実施（東海大学、防衛医科大学校）

【2】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

- (1) 「複数の同種細胞ソースの検討」と「細胞ソースの選択とバンキングシステムの構築」（国立成育医療研究センター研究所、東海大学、株式会社DNAチップ研究所）
- (2) 「細胞シートの保存技術開発」と「パッケージ技術開発」（明治大学）
- (3) 軟骨細胞シートの同種免疫反応に関する研究（国立医薬品食品衛生研究所、東海大学）

研究課題毎の役割としては、今年度は、研究分担者、研究協力者を下記のようなグループに分け、研究代表者統括下に、各研究課題を鋭意継続中であるが、必要に応じてグループ間でも討議を行い、人的交流をグループ間で行いながら、効率的な研究が実施できるような体制を整えている。分担研究報告は上述の課題毎に報告する。

1. 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価」に関する研究グループ

- 研究分担者 三谷 玄弥（東海大学）
研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
研究協力者 石原 美弥（防衛医科大学校）
研究協力者 高垣 智紀（東海大学）

- 研究協力者 小林 美由希（東海大学）
研究協力者 横山 宗昂（東海大学）
研究協力者 谷 良樹（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（東海大学）

2. 「同種軟骨再生医療のための安全性評価」に関する研究グループ

- 研究分担者 加藤 俊一（東海大学）
研究分担者 小林 広幸（東海大学）
研究分担者 三上 礼子（東海大学）
研究協力者 小林 美由希（東海大学）
研究協力者 横山 宗昂（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（東海大学）
研究協力者 河毛 知子（東海大学）
研究協力者 渡部 綾子（東海大学）
研究協力者 伊東 紀子（株式会社DNAチップ研究所）
研究協力者 的場 亮（株式会社DNAチップ研究所）

3. 「多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験」に関する研究グループ

- 研究分担者 阿久津 英憲（国立成育医療研究センター研究所）
研究分担者 小久保 舞美（東海大学）
研究協力者 梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）
研究協力者 豊田 恵利子（東海大学）
研究協力者 岡田 恵里（東海大学）
研究協力者 河毛 知子（東海大学）

4. 「同種細胞シートの保存法に関する研究」に関する研究グループ

- 研究分担者 長嶋 比呂志（明治大学）
研究協力者 前原 美樹（明治大学）

5 「多指症軟骨組織由来細胞の同種 T 細胞
におよぼす影響」に関する研究グループ

研究分担者 加藤 玲子(国立医薬品食品衛生研究所)

研究分担者 小久保 舞美(東海大学)

研究協力者 岡田 恵里(東海大学)

研究協力者 河毛 知子(東海大学)

6 「細胞シート移植後の動態評価
Bioluminescence による経時的評価に関する研究」に関する研究グループ

研究協力者 竹内 護(自治医科大学)

研究協力者 村井 邦彦(自治医科大学)

研究協力者 高久 裕子(自治医科大学)

C. 研究結果

【1】自己軟骨細胞シートによる先進医療 の実現

「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」に関して東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成23年3月3日にヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請し、同年10月3日に厚生労働大臣の「ヒト幹細胞臨床研究について」の意見書の発出(厚生労働省発医政1003第3号)をもって、同年11月29日に第1例目の臨床研究を開始した。本臨床研究による安全性の評価を速やかに行うとともに、先進医療の実現を目指している。

(1) 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価(東海大学、防衛医科大学校)

軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認

められ、平成23年11月29日に第1例が実施された。

平成26年3月31日までに11症例がエントリーし、8症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1例から第4例は移植後1年を経過し臨床研究を終了した。これまでに移植後1年経過した4症例に関しては、術後1年後の臨床評価スコア、単純レントゲン写真、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

今後は移植症例数をさらに追加し、軟骨細胞シート移植による関節治療効果の検討を進め、先進医療としての実現を目指す予定である。

【2】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

(1) 同種軟骨再生医療のための安全性評価(東海大学、株式会社 DNA チップ研究所)

我々は、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過である。将来的な普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を検討している。この細胞ソースとして多指症軟骨組織由来細胞を検討した。

自己軟骨細胞をシート化する際に確立した試験評価方法の Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)、Gバンド分染法により、細胞ソースの確認及び培養

により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、通常の培養継代期間を超えて培養した細胞について安全性評価を実施した。G バンド分染法により細胞ソース由来の染色体異常は認められなかった。また、aCGH 解析、G バンド分染法により細胞培養中によるコピー数の異常は生じないことが確認された。両解析により、多指症軟骨組織由来細胞は、試験法の一般的な基準においては、すべてのサンプルにおいて異常は認められなかった。この結果、多指症軟骨組織由来細胞は、試験評価方法を通じて安全性を判断することができた。

（２）多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験（国立成育医療研究センター研究所、東海大学）

変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。

我々が同種細胞移植として検討している多指症軟骨組織由来の細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症軟骨組織由来細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する為、造腫瘍性否定試験を実施した。

造腫瘍性とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。我々は、同種移植による造腫瘍性否定試験では、より重

度な免疫不全を呈する NOG マウスを用いて検討をした。結果、腫瘍形成は認められなかった。

（３）同種細胞シートの保存法に関する研究（明治大学）

ヒト軟骨細胞シートの凍結保存法の確立を最終目的として、既に開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化凍結保存法の改良を行った。これまでに、哺乳動物胚・卵子に有効なガラス化法のコンセプト、すなわちMinimum Volume Cooling (MVC) が細胞シートの保存に適用し得ることを明らかにしてきた。

この方法の臨床応用を実現するために、今年度は(1) より脆弱な薄層シートへの適用、(2) 細胞生存性向上を目的とする融解条件の検討、(3) より操作性・安全性に優れたパッケージング素材の検討を行った。その結果、(1) 積層化しない単層軟骨細胞シートのガラス化も可能なこと、(2) 融解速度を高める工夫によって、細胞生存性を向上させ得る可能性があること、(3) パッケージング素材としてアルミフィルムが優れていること、などが明らかとなった。

（４）多指症軟骨組織由来細胞の同種T細胞におよぼす影響（国立医薬品食品衛生研究所、東海大学）

すでに自己積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生の有効性が示されてきている。本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、現在、同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、

PDCCs は T 細胞の免疫応答を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを認めた。今回の結果から、関節軟骨損傷の治療には自己軟骨細胞だけでなく、同種である多指症由来軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆された。

（５）細胞シート移植後の動態評価

Bioluminescence による経時的評価に関する研究

軟骨細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うため、

BLI (Bioluminescence Imaging) 法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートの最適な評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定した。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用シート群の 3 群とも 21 ヶ月以上の発光を確認した。実験経過中の移植細胞からの発光は移植右膝に留まり他に移動しないことを確認し、細胞シートの安全性を実証した。

D . 結論

本研究事業の 2 つの大きな課題である「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」並びに「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」は何れも、当初の予想以上の成果が得られた。特筆すべきは、平成 26 年 3 月 31 日までに 11 症例がエントリーし、8 症例に軟骨細胞シート移植を施行したことである。

第 1 例から第 4 例は移植後 1 年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨再生効果が得られている。

E . 倫理面への配慮

東海大学では臨床研究審査委員会並びに医の倫理委員会を設けており、厳格な審査の上に臨床研究を行っている。厚生労働省が定めた「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究対象者に対してのインフォームドコンセント、患者の権利、守秘義務、プライバシーの保護に十分に留意している。本研究内容に関しては平成 17 年から臨床研究審査委員会の承認の下、東海大学においてヒトサンプルを用いた臨床研究を実施している。また、動物実験においては、東海大学動物実験委員会並びに共同研究施設での動物実験施設主催の動物実験講習会に本プロジェクトの動物実験担当研究員は全員受講し、動物実験に関する理念：3R の原則を理解し、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保育並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、動物愛護の精神に基づいた十分な配慮がなされている。

F . 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 小久保舞美, 佐藤正人, 田畑泰彦 (編集). 遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元組織化-その最先端技術と材料技術, 第3章 細胞3次元組織化のための培養技術, 6. 細胞積層化技術, 3) 滑膜細胞との共培養法により作製した軟骨細胞シートの特性評価, *メディカル ドゥ*, 270 - 276, 2014.
- 2) 佐藤正人. 再生医療における臨床研究と製品開発, 第6章 非臨床安全性試験・臨床試験における評価, [4] 軟骨再生における評価. 技術情報協会, 384-387, 2013.

2. 論文発表

- 1) Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, Sato M. In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint. *Biomaterials*, 35(7), 2199-2206, 2014.
- 2) Sato M, Yamato M, Hamahashi K, Okano T, Mochida J. Articular cartilage regeneration using cell sheet technology. *The Anatomical Record*, 297(1), 36-43, 2014.
- 3) Mitani G, Sato M, Yamato M, Kokubo M, Takagaki T. Potential utility of cell sheets derived from the anterior cruciate ligament and synovium fabricated in temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013. [Epub ahead of print]

- 4) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H. Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnol*, 13(58), 2013. [Epub ahead of print]
- 5) Kokubo M, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Ebihara G, Okano T, Mochida J. Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with temperature-responsive culture inserts. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013. [Epub ahead of print].
- 6) Hamahashi K, Sato M, Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J. Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012. [Epub ahead of print]
- 7) 佐藤正人. 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現. 日本再生医療学会誌, 13(1), 64-68, 2014
- 8) 佐藤正人. 軟骨再生医療の現状・今後の展望. 日本機械学会誌, 117(1142), 16-19, 2014.
- 9) 佐藤正人. 細胞シートによる関節軟骨の治療. *CLINICAL CALCIUM*, 23(12), 59-65, 2013.
- 10) 佐藤正人. 細胞シートによる関節治療. *CLINICIAN*, 60(620), 74-81, 2013.
- 11) 長井敏洋, 佐藤正人, 持田譲治. 血管新生阻害剤 その適応の拡大をめざして. *整形外科*, 64(5), 468, 2013.
- 12) 佐藤正人, 持田譲治. 細胞シート技術

を応用した軟骨再生法の開発. 整形・災害外科, 56(5), 565-572, 2013.

13) 佐藤正人. 細胞シートによる関節軟骨再生治療. Pharma Medica, 31(4), 15-19, 2013.

3. 学会発表

1) Nagai T, Sato M, Kobayashi M, Mochida J. Prevention of post-traumatic osteoarthritis by administration of intra-articular anti-VEGF antibody (bevacizumab; Avastin). 2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, 15-18 Mar 2014.

2) Tani Y, Sato M, Yokoyama M, Takagaki T, Kobayashi M, Kokubo M, Ebihara G, Ito S, Ukai T, Ishihara M, Mochida J. Diagnosis for degenerative articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation. TERMIS-AM 2013, Atlanta, 10-13 Nov 2013.

3) Sato M. Articular Cartilage Regeneration Using Cell Sheet. Gordon Research Conference, Switzerland, Apr 2013.

4) 佐藤正人. 【シンポジウム】軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究と今後の課題. 第13回日本再生医療学会, 京都, 2014.3.4-6

5) 岡田恵里, 佐藤正人, 高垣智紀, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 河毛知子, 阿久津英憲, 伊東紀子, 梅澤明弘, 持田讓治. 同種軟骨再生医療のための安全性評価. 第13回日本再生医療学会, 京都, 2014.3.4-6

6) 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 内山善康, 繁田明義, 持田讓治. 低

酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価. 第13回日本再生医療学会, 京都, 2014.3.4-6

7) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 松村幸奈, 坂井理恵子, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 持田讓治, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1. 第13回日本再生医療学会, 京都, 2014.3.4-6

8) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田讓治, 新見信吾. 多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響. 第27回日本軟骨代謝学会, 京都, 2014.2.28-3.1

9) 高垣智紀, 佐藤正人, 三谷玄弥, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治. 細胞シートを用いた関節軟骨再生治療. 第27回日本軟骨代謝学会, 京都, 2014.2.28-3.1

10) 佐藤正人. コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨再生に関する研究開発. 農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト・医薬品作物等開発分科会, 推進会議プログラム, 東京, 2014.2.24

11) 佐藤正人. 【特別講演】軟骨再生医療の現状と未来. 第3回三浦半島地区膝関節疾患懇話会, 神奈川, 2014.2.22

12) 佐藤正人. 【特別講演】細胞シートによる関節軟骨の再生医療. 第13回かわごえ並木の会, 川越, 2014.2.7

13) 佐藤正人. 【ランチョンセミナー】再生医療で変形性膝関節症は治せるか? 第28回日本臨床リウマチ学会, 幕張, 2013.11.30-12.1

14) 佐藤正人. 【パネルディスカッション】細胞シートが拓く新しい再生医療, 最先端

研究開発支援（FIRST）プログラム 市民公開シンポジウム，東京，2013.11.23

15) 佐藤正人. 【教育研修講演】軟骨再生医療の現状と細胞シートによる関節治療の展望. 防衛医科大学校整形外科同門会，埼玉，2013.11.30

16) 佐藤正人. 【教育セミナー】軟骨再生医療の現状と未来. 小田原整形外科医会，神奈川，2013.11.20

17) 佐藤正人. 【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療の可能性. 第3回 DDS 徐放化再生医療研究会，東京，2013.11.23

18) 長井敏洋，佐藤正人，小林美由希，持田讓治. ウサギ膝前十字靭帯切離モデルを用いた抗 VEGF 抗体ヒト化モノクローナル抗体（bevacizumab）の関節内投与による軟骨変性抑制効果の検討. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会，幕張，2013.10.17-18

19) 佐藤正人. 【招待講演】軟骨の再生医療の現状. 第386回横浜市立大学整形外科同門会談話会，横浜，2013.8.3

20) 佐藤正人. 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨の再生（ヒト幹細胞臨床研究）. 第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会，札幌，2013.6.20-22

21) 佐藤正人. 【特別講演】関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現. 第12回国際バイオテクノロジー展・技術会議，東京，2013.5.8-10

22) 佐藤正人. 【教育セミナー】細胞シートによる関節軟骨の再生医療（ヒト幹細胞臨床研究）. 第29回日本医工学治療学会，神奈川，2013.4.19-21

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の評価

| | | |
|-------|--------|------------------------|
| 研究協力者 | 谷 良樹 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生 |
| 研究協力者 | 横山 宗昂 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生 |
| 研究協力者 | 石原 美弥 | 防衛医科大学校医用工学講座医用工学・教授 |
| 研究分担者 | 三谷 玄弥 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師 |
| 研究協力者 | 高垣 智紀 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師 |
| 研究協力者 | 小林 美由希 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生 |
| 研究分担者 | 小久保 舞美 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員 |
| 研究協力者 | 岡田 恵里 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員 |

研究要旨：本研究事業の目的は「自己軟骨細胞シートによる先進医療の実現」と「同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指した臨床研究の実現」である。軟骨細胞シートによる再生医療は、厚生労働大臣通知により東海大学医学部付属病院においてヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例が実施された。平成 26 年 3 月 31 日までに 8 例の軟骨細胞シート移植が終了し、第 1 例から第 4 例は移植後 1 年を経過し、臨床研究を終了した。今後は本臨床研究による安全性の評価を速やかに行うとともに、先進医療の実現を目指している。

研究実施予定期間：承認後～3 年間

予定症例数：10 例（プライマリーエンドポイントである安全性の評価が十分に達成できたと判断した場合、本臨床研究は予定症例数に達しなくても終了する。）

A. 選択基準

以下の選択基準を全て満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

1. 20 歳から 60 歳までの性別を問わない患者
2. （外傷または変性により生じた）膝関節軟骨損傷を有するもの
3. 関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類で Grade 以上のもの
4. 膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに 1.0cm² 以上 4.2cm² 未満の軟骨欠損を有し、従来骨髄刺激法やモザイクプラスチックなどが適応となる患者

B. 除外基準

下記の除外基準に 1 つでも当てはまる患者は対象としない。

1. 患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合
2. 重大な合併症を有している場合
3. 問題となるような感染症（HBV、HCV、HIV、HTLV、FTA-ABS 等の陽性を含む）を有している場合

以上より、「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の被験者としての確であると判断した患者に対して、時期を変えて 2 回の臨床研究に関するインフォームドコンセントが取れた場合に開始し、細胞シート作製のために軟骨および滑膜組織を採取した。

C. 検査・評価項目とスケジュール

1) 臨床評価

臨床評価基準として、Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale、Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score での評価を術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施する。

2) 単純レントゲン写真

関節裂隙、軟骨下骨の状態、関節症の進行の有無を評価する。関節症の進行度はKellgren-Lawrence grading scale (1)を用いて術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

3) MRI 検査

経時的な軟骨の厚み、性状の変化を評価し、Nelson MRI Grading (2)を用いて、術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年で実施して、客観的に評価する。

4) 関節鏡

術後1年の時点での関節表面の軟骨性状（色調、硬さ、平滑性）、Outerbridge分類(3)を評価する。また痛みや関節の腫脹などが生じた場合には適宜実施し軟骨の状態を評価する。

5) 光音響法検査

術後1年の時点での関節軟骨の粘弾性特性を定量的に評価するために、我々が独自に開発した機能診断装置により、関節鏡視下に移植部と周辺軟骨部の軟骨を評価する。本評価法は東海大学医学部臨床研究審査委員会承認下で、東海大学医学部付属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

6) 病理検査

関節鏡を行った際に再生組織の一部を生検し、Safranin-O 染色を行い、Modified Mankin Score(4)を用いて客観的に組織学的評価を行う。

D. 軟骨細胞シート移植症例報告

Entry No.1

43歳男性

2011.12.21 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 36

KOOS score Total : 47.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

関節鏡 : grade3

【術後1ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 67.9

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade3

【術後3ヶ月】

Lysholm score : 67

KOOS score Total : 76.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後6ヶ月】

Lysholm score : 75

KOOS score Total : 86.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後1年】

Lysholm score : 85

KOOS score Total : 79.8
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade1
関節鏡 : grade1
超音響検査法 : 表 1 参照
病理検査 : Mankin score : 1
→2013.01.07 臨床研究終了

Entry No.2

46 歳男性

2012.3.7 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 72

KOOS score Total : 58.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 59

KOOS score Total : 60.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 88

KOOS score Total : 63.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 96

KOOS score Total : 78.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 85

KOOS score Total : 88.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade1

関節鏡 : grade1

超音響検査法 : 表 2 参照

病理検査 : Mankin score : 1

→2013.03.19 臨床研究終了

Entry No.3

48 歳女性

術前関節鏡評価にて軟骨損傷が

Outerbridge grade で適応外のため逸脱

Entry No.4

52 歳男性

細胞数が基準細胞数に満たず逸脱

Entry No.5

31 歳男性

2012.12.19 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 58

KOOS score Total : 72.0

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 86

KOOS score Total : 72.6

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 81
KOOS score Total : 75.0
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 78
KOOS score Total : 84.5
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 95
KOOS score Total : 96.4
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade1

関節鏡 : grade1

超音響検査法 : 解析中

病理検査 : Mankin score : 1

→2014/5 月臨床研究終了

Entry No.6

50 歳男性

2013.02.06 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 45
KOOS score Total : 29.2
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 39
KOOS score Total : 66.7
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 81
KOOS score Total : 62.5
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 94
KOOS score Total : 81
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

【術後 1 年】

Lysholm score : 99
KOOS score Total : 84.5
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade1

関節鏡 : grade2

超音響検査法 : 解析中

病理検査 : Mankin score : 1

→2014/4 月臨床研究終了

Entry No.7

37 歳女性

剥離試験不適合で逸脱

Entry No.8

53 歳男性

2013.6.26 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 27
KOOS score Total : 42.1
単純レントゲン写真 : grade3
MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade4

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 69

KOOS score Total : 54.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 42

KOOS score Total : 64.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 57

KOOS score Total : 69.6

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

Entry No.9

59 歳女性

2013.8.1 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 28

KOOS score Total : 29.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade3

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 62

KOOS score Total : 70.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 73

KOOS score Total : 75.6

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 93

KOOS score Total : 85.7

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

Entry No.10

55 歳女性

2013.9.12 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 52

KOOS score Total : 54.2

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade3

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 50

KOOS score Total : 67.9

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 78

KOOS score Total : 67.9

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 6 ヶ月】

Lysholm score : 67

KOOS score Total : 78

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

Entry No.11

54 歳男性

2013.11.21 移植施行

【術前評価】

Lysholm score : 60

KOOS score Total : 66.1

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

関節鏡 : grade3

【術後 1 ヶ月】

Lysholm score : 58

KOOS score Total : 54.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

【術後 3 ヶ月】

Lysholm score : 63

KOOS score Total : 67.3

単純レントゲン写真 : grade3

MRI 検査 : grade2

E. 結果

以上、2014年3月31日までに11症例がエントリーし、8症例に軟骨細胞シート移植を施行した。第1～4例は移植術後1年が経過し、臨床研究を終了している。

F. 考察

これまでに移植後1年経過した4症例に関しては、術後1年後の臨床評価スコア(表3,4参照)、単純レントゲン写真、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において術前から軟骨変性の改善を認めている。また臨床研究中の重篤な有害事象の発生も認めず、

軟骨細胞シート移植による有効な関節軟骨再生効果が得られている。

今後は移植症例数をさらに追加し、軟骨細胞シート移植による関節治療効果の検討を進め、先進医療としての実現を目指す予定である。

G. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

H. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

I. 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

1 Kellgren-Lawrence Grading Scale

Grade1 : doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping

Grade2 : definite osteophytes, definite narrowing of joint space

Grade3 : moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joints space, some sclerosis and possible deformity of bone contour

Grade4 : large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone contour

2 Nelson の MRI 分類

Grade0 : normal

Grade1 : intact cartilage with signal change

Grade2 : high signal breach of cartilage

Grade3 : thin, high signal rim extending behind the osteochondral fragment indicating synovial fluid around the fragment

Grade4 : mixed or low signal loose body in the center of lesion or free within the joint

3 Outerbridge-Brittberg

grade1 : 関節軟骨の軟化を認める

grade2 : 軟骨表面の羽毛立ち、浅い亀裂を認める

grade3 : 軟骨下骨の深さまでの軟骨損傷があるが、軟骨下骨の露出は認めない

grade4 : 軟骨下骨の露出を認める

4 Mankin score system

: 構造

a. 正常 : 0

b. 表面の不整 : 1

c. 表面の不整、パンヌス形成 : 2

d. 中間層までの亀裂 : 3

e. 深層までの亀裂 : 4

f. 石灰化層までの亀裂 : 5

g. 完全な破壊 : 6

：細胞

- a. 正常：0
- b. びまん性の細胞数増加：1
- c. クローニング：2
- d. 細胞数減少：3

：サフラニン-O 染色性

- a. 正常：0
- b. 軽度の低下：1
- c. 中等度の低下：2
- d. 重度の低下：3
- e. 染色性の消失：4

：Tidemark の状態

- a. 正常：0
- b. 血管の横断：0

総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：> 7

表 1. 第 1 症例の超音響検査法評価結果

| Day | 手術前 | 12 ヶ月 |
|-------|--------------|------------|
| 評価日 | 2011 12 / 21 | 2013 1 / 7 |
| 移植部 | 0.65 | 0.87 |
| 周辺軟骨部 | 1 | 1 |

表 2. 第 2 症例の光音響検査法評価結果

| Day | 手術前 | 12 ヶ月 |
|-------|--------------|------------|
| 評価日 | 2012 02 / 14 | 2013 3 / 8 |
| 移植部 | 0.60 | 1.06 |
| 周辺軟骨部 | 1 | 1 |

表 3. 第 1 ~ 4 症例の Tegner-Lysholm Knee Scoring Scale 推移

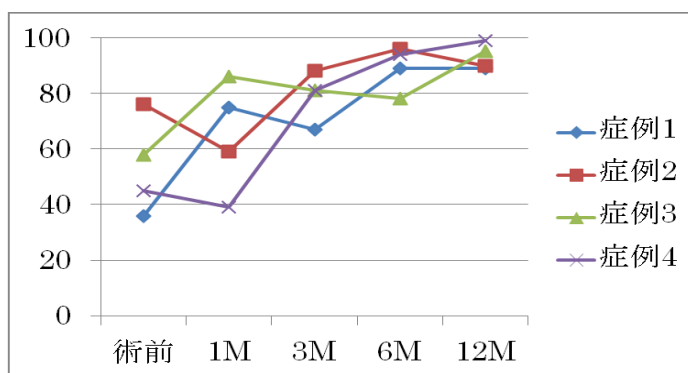
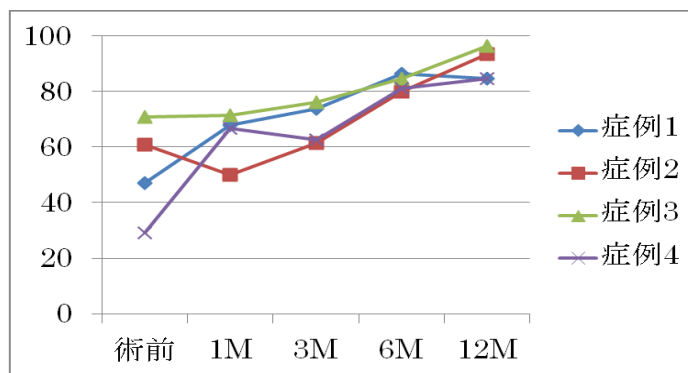
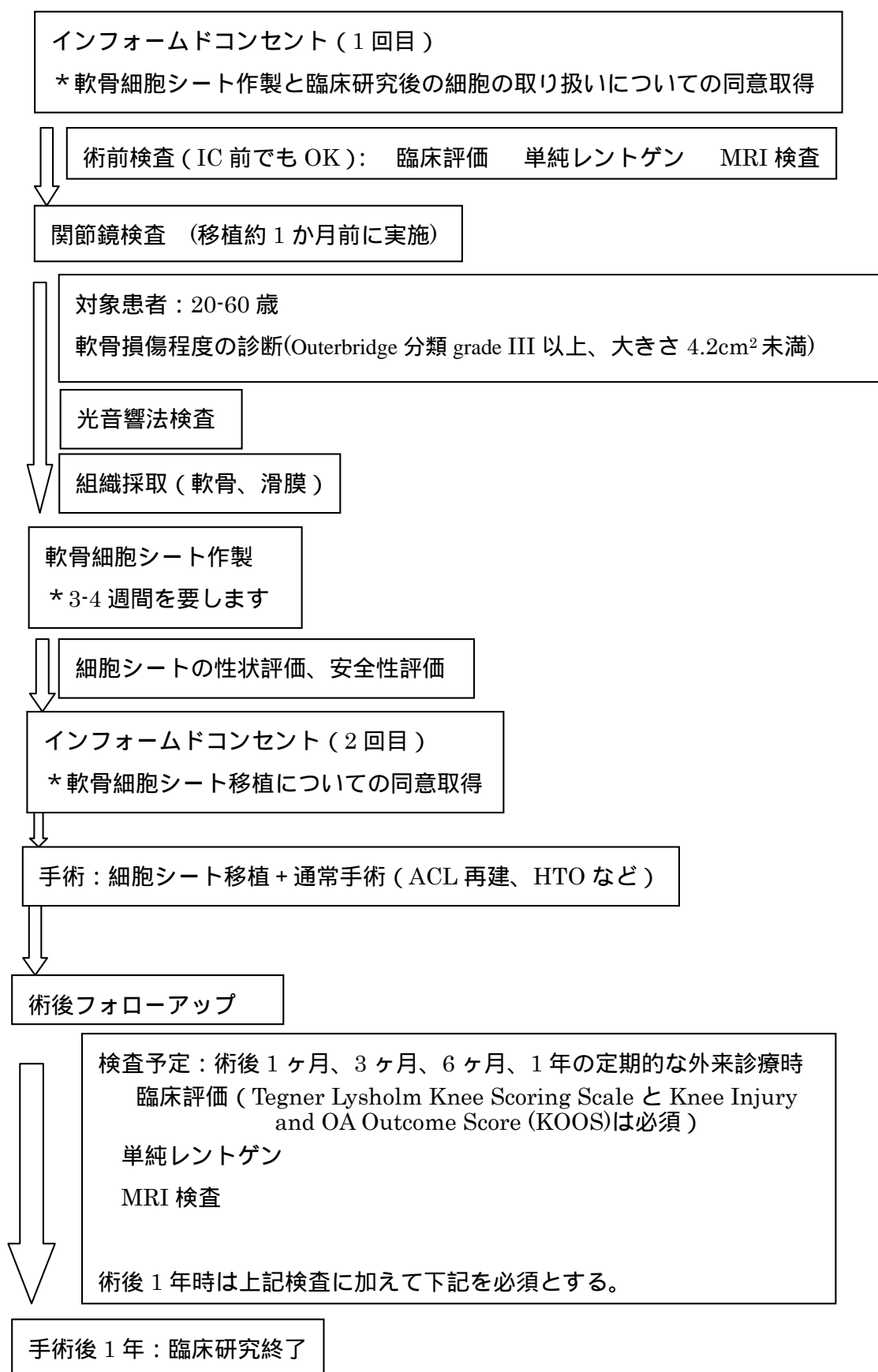


表 4. 第 1 ~ 4 症例の Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score 推移



付記 「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」 研究実施の流れ



同種軟骨再生医療のための安全性評価

| | | |
|-------|--------|--------------------------|
| 研究協力者 | 岡田 恵里 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員 |
| 研究分担者 | 加藤 俊一 | 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授 |
| 研究分担者 | 小林 広幸 | 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授 |
| 研究分担者 | 三上 礼子 | 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・講師 |
| 研究協力者 | 小林 美由希 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生 |
| 研究協力者 | 横山 宗昂 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生 |
| 研究協力者 | 河毛 知子 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員 |
| 研究協力者 | 渡部 綾子 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員 |
| 研究協力者 | 的場 亮 | 株式会社 DNA チップ研究所・代表取締役・社長 |
| 研究協力者 | 伊東 紀子 | 株式会社 DNA チップ研究所・研究開発部 |

研究要旨：我々は、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過である。将来的な普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を検討している。この細胞ソースとして多指症軟骨組織由来細胞を検討した。

自己軟骨細胞をシート化する際に確立した試験評価方法の Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)、Gバンド分染法により、細胞ソースの確認及び培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、通常の培養継代期間を超えて培養した細胞について安全性評価を実施した。この結果、多指症軟骨組織由来細胞は、試験評価方法を通じて安全性を判断することができた。

A. 研究目的

平成 23 年 10 月 3 日に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政 1003 第 3 号）により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、自己細胞を使用した「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を実施している。現在までに 11 例をエントリーし、8 症例に実施した。第 1-4 症例は移植後 1 年を経過し臨床研究を終了した。臨床研究中に重篤な有害事象の発生も認めず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節治療効果が得られており、細胞シート移植による関節治療効果の検討を進めている。細胞シートの原料として、自己細胞は、関節軟骨組織の健常部と滑膜組織を採取し、採取量に制限があり、シート作製枚数やシート移植の

可能性の有無は事前に判断できない。また、対象として自己で 1 人、1 回程度の実施が可能である。今後、細胞シートによる関節治療の将来的な普及を目指すためには、自己細胞の課題を解決すべく、細胞の原料として同種細胞の可能性を検討することにした。同種細胞として、手術時に廃棄される多指症由来関節軟骨組織を採取することにより、シートを必要数作製可能となり、また、シートを移植前に試験的に作製するため、移植の有無が事前に判断できる。対象として複数人に複数回の実施が可能となる。

細胞シートの原料を同種細胞にすることにより、将来的な普及を目指し、同種細胞シート移植を念頭に自己の安全性評価で用いた試験方法に従い、同種細胞の安全性を

確認することを目的とした。薬食発法第 0208003 号第 4 章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること」を確認するため、通常の培養期間を超えて継代培養した細胞について微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常、がん遺伝子、染色体異常の検出などの網羅的な解析により遺伝子異常を検出することが出来るとされている aCGH 解析を実施し、継代培養中の変化を評価した。また、細胞が保有している核型について異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出することが出来るとされている G バンド分染法により染色体核型解析を実施し、細胞の変異と継代培養中の変化を評価した。

B. 研究方法

サンプル

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究名「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」）により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡された多指症軟骨組織由来細胞を用いて本研究を実施した。

多指症の手術時に廃棄する指関節の軟骨組織を分離し、細切後培養して増殖した細胞を酵素処理により回収し、多指症軟骨組織由来細胞とした。検体 12 症例（平均年齢 1 歳 4 箇月）を用いて継代培養し、供試する細胞を調整した。（例 第 2 継代（P2））

細胞培養

培地：DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Co. Japan)

培養条件：37 度、5% CO₂

播種数：0.5 × 10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

| No. | gender | age |
|-----|--------|-------|
| 1 | M | 0y11m |
| 2 | M | 1y3m |
| 3 | F | 0y11m |
| 4 | F | 1y2m |
| 5 | F | 0y11m |
| 6 | M | 1y1m |
| 7 | F | 0y11m |
| 8 | F | 1y6m |
| 9 | F | 1y0m |
| 10 | M | 4y6m |
| 11 | F | 1y1m |
| 12 | M | 0y8m |

（平均年齢：1y4m）

aCGH 解析

上述の各 12 サンプルの細胞を継代培養して P2、P4、P6、P12 の細胞を調整し、DNA を抽出した。解析は、チップサイズ 8 × 60K、Moving Average10pt で実施して細胞培養中における細胞への影響の有無を確認するため、同一人物の細胞について P2 を標準試料とし、組み合わせを P2 と P4、P2 と P6、P2 と P12 それぞれについて解析を実施した。さらに、各組み合わせは蛍光

色素を入れ替えての dye swap 解析も実施することにより、データを再確認してデータの信頼性を高め、ゲノム DNA の変化がみられた領域数を数値として検知する。標準試料との差異を検出するアルゴリズムとして Aberration Detection Method-2 (ADM-2) Threshold 6、7、8、9、10 を用いて解析を行う。また、細胞培養中に顕微鏡下で細胞形態の観察を実施する。

G バンド分染法

と同様の細胞（12 サンプル）の細胞を継代培養して P1、P6、P12 の細胞を調整し、解析バンドレベル 300bp ~ 400bp で、細胞分裂中期（M 期）のよく広がった細胞を用いて、評価基準であるヒト染色体に関する国際命名規約 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature : ISCN) に従い、20 細胞を核型解析に用いて、細胞ソース由来の核型解析及び同一人物による各継代の核型解析結果を比較検討した。

C. 結果

aCGH 解析

P2 から P12 まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった。各検体の組み合わせの解析では、Threshold 6、7、8、9、10 により $\text{Log}_2\text{Ratio}=0、1、2$ と検出され(表 2)、Threshold 6、7、8、9、10 のうち、Threshold 10 であるとすべて解析数値は $\text{Log}_2\text{Ratio}=0$ と検出された。また、dye swap 解析を実施すると $\text{Log}_2\text{Ratio}=1、2$ の値が 0 と検出さ

れた。(表 3)。

表 2 解析結果 (標準試料 : P2)

| No. | P4 | P6 | P12 |
|-----|----|----|-----|
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 2 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 0 | 0 |
| 12 | 2 | 2 | 2 |

表 3 解析結果 (表 2 の dye swap)

| No. | P4 | P6 | P12 |
|-----|----|----|-----|
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |

また、プローブ 10pt 毎に Moving Average(移動平均)の値を算出してライングラフ化し、染色体毎に染色体のコピー数異常の検出を基線からのずれとして可視化させて実施した。可視化した図(図 1)より、細胞は、12 例とも P4、P6、P12 すべてにおいて、基線からのずれは正常とみなされる範囲であった。

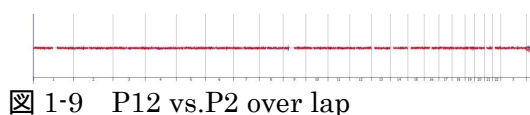
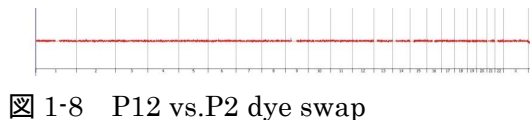
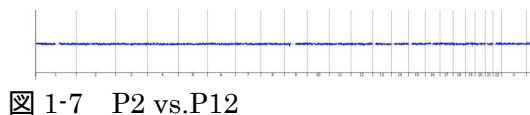
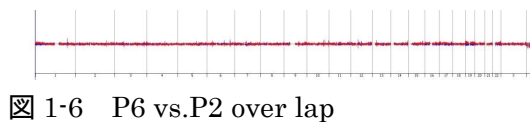
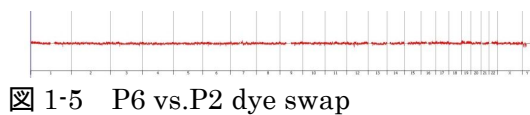
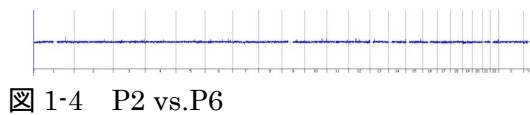
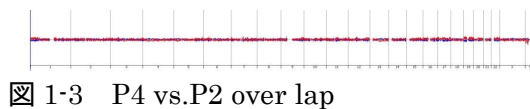
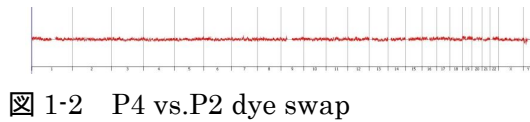
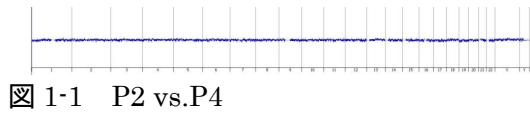


図 1-1 ~ 図 1-9 Genome View

G バンド分染法

解析結果は、各サンプル各継代数ともに ISCN の基準によると染色体異常と判断される細胞はなかった。構造変化が検出され

た細胞もあったが、一般的に認められる変異であるものは基準では正常とみなされるものであった（図 2、表 4）。



図 2 G バンド分染法 (P1)

表 4 核型分析結果

| No. | P1 | | P6 | | P12 | |
|-----|----------------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|
| | 細胞 | ISCN | 細胞 | ISCN | 細胞 | ISCN |
| 1 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[19] 変異[1] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 2 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 3 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 4 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 5 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 6 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 7 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 8 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 9 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 10 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 11 | 正常核型[18] 変異[1] 変異[1] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 |
| 12 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[20] | 正常 | 正常核型[19] 変異[1] | 正常 |

D. 考察

通常用いる培養期間を超えて培養した細胞は、顕微鏡下において形態に異常は認められなかった。また、自己の場合は細胞培養の継代数が進むにつれて、細胞の増殖性の低下が認められたため、自己軟骨細胞は、過継代はシート化に適さないことが示唆されたが、同種細胞の場合は、細胞の増殖性の低下は認められなかった。

aCGH 解析により、少量の DNA から解析が可能であり、遺伝子の異常検知やがん関連遺伝子の異常を数値として得られる。そして、微細な変化を捉えることが可能なため、継代培養中における細胞への影響の有無は、同一人物の細胞の継代数の若いサンプルを標準試料として継代が進んだサンプルを解析することにより、継代培養中による明らかな遺伝子異常は認められなかったため、細胞への影響は認められないと考えられた。

G バンド分染法での染色体核型解析では、細胞ソース由来の染色体異常の有無を確認でき、また、継代培養した細胞についてもほかの変異は、培養過程で継続的に観察されることはなかったため、生体内で自然淘汰される可能性が高い変化であることが推察され、細胞に対する継代培養中による影響は認められないと考えられた。

また、染色体異常が保存される変異は認められなかった。

E. 結論

G バンド分染法により細胞ソース由来の染色体異常は認められなかった。

aCGH 解析、G バンド分染法により細胞培養中によるコピー数の異常は生じないことが確認された。

両解析により、多指症軟骨組織由来細胞は、試験法の一般的な基準においては、すべてのサンプルにおいて異常は認められなかった。

しかし、私どもが臨床研究として、細胞

ソースを採用する際の基準としては、より安全性を担保するために、aCGH 解析、G バンド分染法の両解析結果において、陽性ではないが、1 つでも変異がみとめられた場合は採用せず、陰性の結果のみであるサンプルを臨床研究の細胞ソースとして選択することにした。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表（研究分担者：加藤俊一）

1) Okamoto Y, Nagatoshi Y, Kosaka Y, Kikuchi A, Kato S, Kigasawa H, Horikoshi Y, Oda M, Kaneda M, Mori T, Mugishima H, Tsuchida M, Taniguchi S, Kawano Y. Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplant*. 2014 Feb 8. [Epub ahead of print]

2) Ohnishi H, Sasaki H, Nakamura Y, Kato S, Ando K, Narimatsu H, Tachibana K. Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adh Migr*. 2013 Sep 1;7(5):426-33. Epub 2013 Aug 5.

3) Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of KIR ligand incompatibility on

clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* 2013 Nov 29;3:e164.

4) Kasahara M, Sakamoto S, Horikawa R, Koji U, Mizuta K, Shinkai M, Takahito Y, Taguchi T, Inomata Y, Uemoto S, Tatsuo K, Kato S. Living donor liver transplantation for pediatric patients with metabolic disorders: The Japanese multicenter registry. *Pediatr Transplant.* 2014 Feb;18(1):6-15. Epub 2013 Nov 28.

5) Masaoka N, Morooka M, Nakajima Y, Ogata H, Kodo H, Kato S. Study for the improvement of umbilical cord blood sampling using a new trial apparatus. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Feb;40(2):405-9. Epub 2013 Nov 18

6) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A. PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):195-200. Epub 2013 Sep 30.

7) 加藤俊一. 先天代謝異常症に対する造

血細胞移植療法の確立とガイドラインの作成に向けて. *内分泌・糖尿病・代謝内科*, 2013,37(5):567-577.

8) 加藤俊一. 小児造血細胞移植. *日本小児血液・がん学会雑誌*, 2013,50(3):297-310.

9) Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol.* 2013 Aug;98(2):206-13. Epub 2013 Jul 17.

10) Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Morishima S, Spellman S, Kashiwase K, Kato S, Cesbron A, Tiercy JM, Senitzer D, Velardi A, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Significance of Ethnicity in the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease and Leukemia Relapse after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Aug;19(8):1197-1203. Epub 2013 Jun 6.

2. 論文発表（研究分担者：小林広幸）

1) Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of

intracerebroventricular administration of D-serine on formalin-induced pain. J Anesth. 2013 Sep 19. [Epub ahead of print]

2) Miura M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. Tokai J Exp Clin Med. 2013 Jul 20;38(2):62-70.

3) Moriya Y, Mizuma A, Uesugi T, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W, Kobayashi H, Kawada H, Ando K, Takagi S, Takizawa S. Phase I study of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute and subacute ischemic stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2013 Oct;22(7):1088-97.

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

多指症軟骨組織由来細胞についての造腫瘍性否定試験

| | | |
|-------|--------|--|
| 研究協力者 | 河毛 知子 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員 |
| 研究分担者 | 阿久津 英憲 | 国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 生殖技術研究室・室長 |
| 研究協力者 | 梅澤 明弘 | 国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部・部長 |
| 研究分担者 | 小久保 舞美 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員 |
| 研究協力者 | 岡田 恵里 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員 |
| 研究協力者 | 豊田 恵利子 | 東海大学医学部外科学系整形外科学・奨励研究員 |

研究要旨：変形性関節症は軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し、自己軟骨細胞を用いた移植が行われているが、術中に採取できる軟骨は少量であり、かつ侵襲なく採取することは難しい。軟骨は免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器・組織の1つであり、同種での細胞ソースの確保は非常に重要である。

我々が同種細胞移植として検討している多指症軟骨組織由来の細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。この多指症軟骨組織由来細胞を同種細胞移植の細胞ソースとして検討する為、造腫瘍性否定試験を実施した。

造腫瘍性とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。我々は、同種移植による造腫瘍性否定試験では、より重度な免疫不全を呈するNOGマウスを用いて検討をした。

A. 研究目的

我々は、温度応答性培養皿を用いた軟骨細胞と滑膜細胞の共培養法により作製した積層化軟骨細胞シートを軟骨損傷を有する患者へ移植し、当該細胞シートの安全性及び修復再生効果を確認している。しかし術中に成人の関節軟骨から採取できる軟骨組織は量・質共に個人差がある。軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷の治療を安定して、多くの患者に適応する為には、自己細胞による治療では限界がある。このことにより、同種細胞を用いた同種軟骨細胞シート移植が必須であると考えられる。

このため同種細胞移植で用いる細胞ソースの確保は非常に重要である。国立成育医療研究センター研究所から譲渡を受けた多

指症軟骨組織由来細胞（以下、「PD細胞」と示す。）は優れた増殖性を持ち、かつ手術時に廃棄する組織であることから、採取にあたり、現在、自己細胞で実施している臨床研究と比較して、低侵襲でレシピエントにとって負担がかからないという特徴がある。

このように有用な細胞ソースとして期待される、PD細胞のin vivoにおける造腫瘍性を否定するために検討を行ったのでそれを報告する。

B. 研究方法

多指症軟骨細胞について

国立成育医療研究センター研究所と東海大学との間で締結した細胞譲渡契約（研究

名「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」)により、国立成育医療研究センター研究所から東海大学へ譲渡されたPD細胞を用いて本研究を実施した。

手術時に廃棄される検体から軟骨組織を分離し、細切後培養皿上に増殖した細胞を酵素処理により回収したPD細胞を造腫瘍性試験に用いた。

今回、同種移植の安全性の確認として、3例の検体を使用し、評価した。

軟骨細胞の分離と培養

国立成育医療研究センター研究所から譲渡されたPD細胞を東海大学にて 0.5×10^4 cells/cm² で播種、DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) and 50 µg/ml ascorbic acid (Wako junyakukougyou Corp. Japan)の培地を使用し培養した。全ての培養は37度、5% CO₂、95% O₂の条件下で行った。

移植には第2継代目の培養細胞を用いた。1週間順化後、イソフルラン吸引麻醉下にて、NOGマウス右腰部を約1cm切開し(図1)、PD細胞を1匹あたり 1×10^7 乗個になるようにペレット状態で皮下に移植する(図2)。切開した皮膚を医療用クリップで留める(図3)。Sham群には切開のみを行い、同様にクリップで留める。

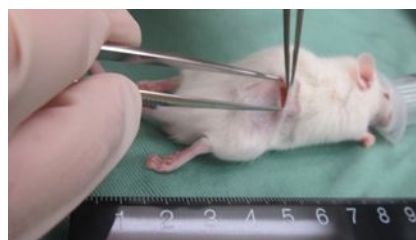


図1 右腰部を約1cm切開



図2 ペレット状態で皮下に移植



図3 医療用クリップで留める

移植後は観察及び体重測定を継続的に実施した。移植後3週、12週、24週で病理解剖する。移植部位の皮下組織、血清を採取し、灌流後にリンパ節(腋窩・鼠径部)、肺(全葉)、脾臓、腎臓、肝臓、脳を採取する。

摘出した臓器を病理組織学的に観察し、移植部位は標本作製し染色をして造腫瘍性を評価する。

NOGマウス(正式名:NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic、簡略名:NOD/Shi-scid, IL-2Rynull)は公益財団法人実験動物中央研究所により樹立された、極めて重度な複合型免疫不全を呈し、ヒト細胞の生着性がNOD-scidマウスと比

べて著しく高いことから、造腫瘍性細胞を検出する試験方法で用いられている実験モデル動物である。

C. 結果

PD細胞移植後24週までの体重の変化について示す（図4）。各群の体重の推移は大きな変化は認められなかった。また、移植直後は、移植部は膨隆しているが、どの群においても4～5週後には非移植部の皮膚と区別がつかない程度まで膨隆は縮小した（図5、6）。

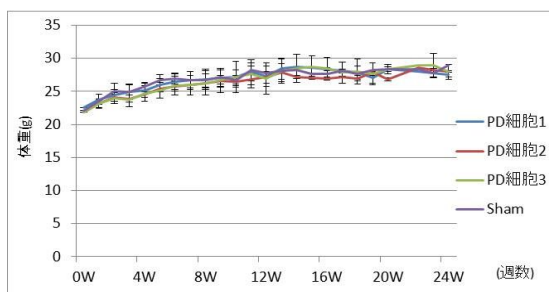


図4 体重の推移



図5 移植後1週間外観



図6 移植後5週間外観

PD細胞移植後3週及び12週、24週で、剖検し、移植部位の皮膚を摘出した。移植後3週では中央に移植した細胞塊が認められるが（図7）、移植後12週では移植した細胞塊は縮小し、軟骨基質を染めるSafranin-O染色でも染色される箇所は少なく（図8）、継時的に分解されていくことが示唆された。

観察倍率を120倍まで上げて、HE染色により観察したが、目立った異常は認められなかった（図9）。

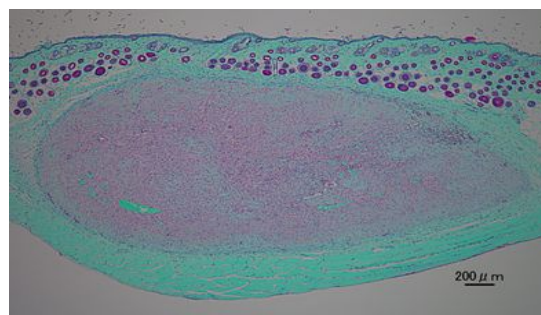


図7 移植後3週 Safranin-O染色

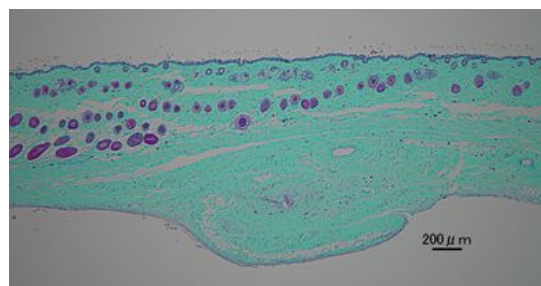


図8 移植後12週 Safranin-O染色

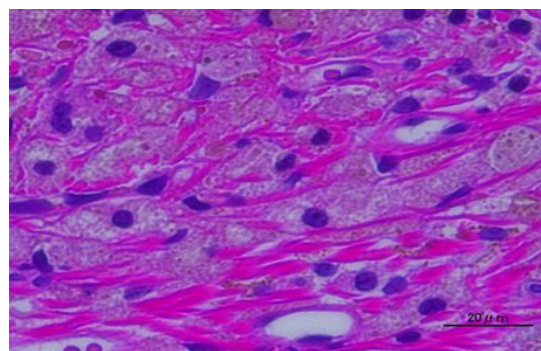


図9 移植後12週 HE染色

D. 考察

本研究では、腫瘍性否定試験の国際的なガイドラインとなっているWHOのTRS 878(Requirements for Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” in WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report (1998) (technical report series number 878)に準じて試験を行った。

一般的に細胞・組織加工製品の原材料となるヒト幹細胞は大きく2種に分けられる。一つは我々が用いているヒト体細胞、ヒト体性幹細胞であり、もう一つは胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)である。

ES細胞やiPS細胞を移植した場合、残存していた未分化幹細胞が腫瘍形成しうる為に問題となる。造腫瘍性と未分化能の密接な関連を考慮した場合、我々が用いている軟骨細胞は間葉系幹細胞ではあるが、最終分化した細胞であると考えられる。

このことから、スタートの段階から懸念されるヒト幹細胞の造腫瘍性としてはリスクが低いことが分かる。

もう一つ造腫瘍性は検討するにあたり、考慮しなければならない点として、最終製品を作製するために行われる調整段階がある。

我々の研究では、組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養という人為的操作が該当する。細胞をシート状に回収する温度応答性培養皿を用いることについては、温

度応答性培養皿はGMPに則った製造工程で生産が行われており、医療機器に準拠した品質が保証されていること、温度応答性培養皿の製造を行っているセルシード社が海外で実施した治験で用いたものと同じ製品であり、欧州医薬品庁(EMA)が求める基材の安全性については十分検討されていることから、造腫瘍性に影響を及ぼすものとは考え難い。このことから、本研究で用いた検体は、最終製品を作製するまでの調整(組織からの単離、酵素処理、凍結保存、培養)を経たものを模した検体といえるであろう。

本研究は、細胞の調整という人為的操作により、細胞が造腫瘍性を獲得していないか、検討することを主目的としてTRS 878を準じて、造腫瘍性を確認したものである。

PD細胞を用いた同種移植の最終製品を免疫不全動物モデルに移植したが、移植した細胞の異常な増殖は確認されず、代謝され、分解されたと考えられる。

多指症は様々な合併症を持つことが多く、絶対的な原因はわかっていない。In vitro試験で染色体や遺伝子の異常の有無を確認しているが、それも移植された側の患者へ影響があるのか絶対的な確認は不可能である。このことから、in vivo試験である、本研究で細胞の異常増殖が否定されたことは、造腫瘍性の確認以上に有益な情報を得たと示唆される。

E. 結論

我々が同種細胞移植として検討している

PD 細胞は、手術時に廃棄する組織であるが、高い細胞増殖活性を有し、細胞ソースとして非常に期待できるものである。

この PD 細胞の造腫瘍性否定試験を実施した結果、腫瘍形成は認められなかった。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

- 1) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, 2014; 33: 643-652.
- 2) Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2: 265-273.

3) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet*. 2013; 14: 32.

4) Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics*. 2013; 8: 635-645.

5) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *PLoS One* 2013; 8: e63265.

6) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Jul 2. Epub ahead.

- 7) Terai M, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 2013; 45: 407-413.
- 8) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S. An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 9) Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 23): 5391-5399.
- 10) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 2013; 4: 2.
- 11) 阿久津英憲, 小野寺成実, 梅澤明弘: 「ヒト ES/iPS 細胞と生殖補助医療」, 産科と婦人科, 診断と治療社: 2014.
- 12) 阿久津英憲: 挑戦する人これが私の医きる道 (第3回) 阿久津英憲, レジデントノート, 2014; 15(18).
- 13) 阿久津英憲, 川崎友之, 梅澤明弘: 第3章 「ES/iPS細胞の培養法」, The Frontiers in Life Sciences 幹細胞研究と再生医療, 中内啓光 (編集) 南山堂: 35-41, 2013.
- 14) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 「ES細胞-その基礎と臨床応用に向けた展望-」 整形・災害外科 (再生医療の現況と最前線), 56(5):501-506, 2013.

3. 学会発表

- 1) Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A: Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster). 11th ISSCR 2013 Annual Meeting, Boston, MA, June 12-15, 2013.
- 2) 奥村典子, 阿久津英憲, 浜谷敏生, 山田満稔, 菅原かな, 小川誠司, 井上 治, 上條慎太郎, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔,

吉村泰典：「β-カテニンは分化多能性に必須でありその機能不全は悪性胚細胞腫瘍発生に関与している」(口頭) 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5月 10~12日, 2013年

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

同種細胞シートの保存法に関する研究

研究分担者 長嶋 比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授

研究協力者 前原 美樹 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・研究アシスタント

研究要旨：ヒト軟骨細胞シートの凍結保存法の確立を最終目的として、既に開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化凍結保存法の改良を行った。これまでに、哺乳動物胚・卵子に有効なガラス化法のコンセプト、すなわち Minimum Volume Cooling (MVC) が細胞シートの保存に適用し得ることを明らかにしてきた。この方法の臨床応用を実現するために、今年度は(1)より脆弱な薄層シートへの適用、(2)細胞生存性向上を目的とする融解条件の検討、(3)より操作性・安全性に優れたパッケージング素材の検討を行った。その結果、(1)積層化しない単層軟骨細胞シートのガラス化も可能なこと、(2)融解速度を高める工夫によって、細胞生存性を向上させ得る可能性があること、(3)パッケージング素材としてアルミフィルムが優れていること、などが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに開発した細胞シートガラス化保存法の適用拡大と改良を目的として、以下の項目について実験を行った。

- (1) 薄層シートへのガラス化法の適用
- (2) ガラス化された細胞シートの融解条件の検討
- (3) パッケージング素材の検討およびガラス化細胞シートの保存法の検討

B. 研究方法

1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞 (株式会社プライマリーセル) を温度応答性培養皿 (35 mm, UpCell®, CellSeed) に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/dish の濃度で播種し、20% FBS を添加した DMEM/F12 培地 (GIBCO) で培養した。培養 3-4 日目に細胞がコンフルエントに達したことを確認して、10% FBS および $100 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸を添加した RPMI1640 培地 (GIBCO) に置き換えた。

培養 14 日目に薄層 (1 層) 形成を確認し、実験に用いた。2 層化シートを実験に供する際は、得られた単層シートを Cell shifter (CellSeed) を用いて積層化した後、更に 1 週間追加培養した。

2. 細胞シートの凍結保存

これまでに開発したガラス化法を用いた。これは、胚や卵子のガラス化に用いられる MVC 法 (Kuwayama et al., 2005) のコンセプトを、細胞シートに適用したものである。

細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には 10% DMSO および 10% ethylene glycol (EG) を用いた。ガラス化液の DMSO および EG 濃度は、それぞれ 20% とした。細胞非浸透性凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5M sucrose および 10% (w/v) カルボキシル化ポリリジン (COOH-PLL) を加えた。平衡液およびガラス化液に、それぞれ 25 分および 30 分間浸漬した細胞シートを、パッケ

ージング素材で被覆しガラス化した。

3. パッケージング素材の比較

食品用ラップフィルム((株)クレハ、ポリ塩化ビニリデン、厚さ10.5 μ m)、もしくはアルミホイル((株)三菱アルミニウム、アルミニウム、厚さ12 μ m)を用いた。パッケージングした細胞シートを、液体窒素蒸気(-140)に暴露してガラス化した。また、パッケージングした細胞シートを液体窒素蒸気中でガラス化した後に、液体窒素中に保管し得るかについても調べた。

4. 融解条件の検討

細胞シートを 38 の加温盤上に静置して融解する従来法を基準として、より急速な融解が期待できる 2 種の方法と比較した。すなわち、加温版の温度を 45 とする方法、および 45 の加温盤上に静置した細胞シート上に 38 の加温パックを重ねて置く方法を試行した。融解した細胞シートを、ピンセットを用いてパッケージから回収し、1M、0.5M、0M sucrose を含む 20mM HEPES 緩衝 TCM199 (20% FBS 添加) に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

5. ガラス化後の細胞シートの評価

融解後の細胞シートをコラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

C. 結果

1. 薄層シートへのガラス化法の適用

単層(6例)および2層化シート(6例)のガラス化を行った結果、融解後のシート構造の破損は全く認められなかった(図 1, 表 1)。

細胞の生存性は、単層シートおよび2層化シートともに、非ガラス化シートに比較して若干劣る傾向であった(84.9% vs. 88.4%; $p < 0.05$, 84.9% vs. 86.3%; 有意差無し)(表 1)。

2. ガラス化された細胞シートの融解条件の検討

2層化シートを用いて融解条件を検討した結果を表 2 にまとめた。細胞シートの融解に用いる加温盤温度を 45 とし、さらに細胞シートを上下から加温する方法によって、非ガラス化試料に匹敵する細胞生存性が得られた(84.8% vs. 86.8%)。

また、いずれの区においても、融解後に細胞シートの破損は全く見られなかった(図 2)。

3. パッケージング素材の検討およびパッケージングした細胞シートの保存法の検討

パッケージング素材に食品用ラップフィルム(従来法)もしくはアルミフィルムを用いて、2層化シートのガラス化を行った。いずれの方法においても、融解時の細胞シートの破損は、全く生じなかった(表 3, 図 3)。両区の細胞生存性(83.3% vs 82.6%)は同等であったが、非ガラス化区(86.7%, $P < 0.05$)に比して若干低下した(表 3)。

液体窒素蒸気中で細胞シートをガラス化

した後に液体窒素に浸漬した結果、ラップフィルムでパッケージされた細胞シートでは、5例中の1例において軽微な破損がみられた。一方、アルミフィルムでパッケージされた細胞シート(5例)では、破損の発生は全く見られなかった(表4, 図4)。細胞生存率は、ガラス化区と非ガラス化区で同等であった(85.1% vs. 84.2% vs. 85.4%)。

上記試験から、アルミフィルムでパッケージされたシートは、液体窒素に浸漬保存し得る可能性が示されたので、追試を行った。表5、図5に示す通り、アルミフィルムでパッケージを用いてガラス化されたシートを、液体窒素中に浸漬後に融解しても、シート構造や細胞生存性への影響は見られなかった。

D. 考察

従来我々は、3層に積層化したウサギ軟骨細胞シートを対象として、ガラス化法の開発を行ってきた。将来のヒト軟骨細胞シートへの応用を考えると、より脆弱なシートもガラス化出来ることが求められる。そこで、今年度は1層および2層構造のウサギ軟骨細胞シートのガラス化を試みたところ、1層のシートにおいても優れた成績が得られた。

より脆弱な細胞シートのガラス化に対しては、パッケージングが有利に働いている可能性がある。特にアルミフィルムは、液体窒素への暴露時にも変形することがないので、内部の細胞シートを保護する効果が

高いと考えられる。今後は、アルミフィルムを用いた試験も行う予定である。また、アルミフィルムは食品用ラップよりも加工や滅菌が容易なので、研究段階の使用には適している。将来の臨床応用を視野に入れて、アルミフィルムを素材とする細胞シート用パッケージの製品化も必要であろう。

細胞シートのガラス化保存において、融解時の温度上昇速度は、細胞生存性に大きな影響を及ぼすと考えられる。今年度の研究では、より急速な温度上昇を実現する工夫によって、細胞生存性を高く維持し得ることが示された。より効率的な融解装置の開発等によって、細胞生存性のさらなる向上が期待できる。

E. 結論

1. 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、より薄層(1および2層)の細胞シートのガラス化保存にも有効である。
2. 細胞シートの融解をより急速に行うことによって、細胞生存率が改善される。
3. 細胞シートのパッケージング素材として、アルミフィルムが適している。アルミフィルムを用いてパッケージングされた細胞シートは、液体窒素蒸気でのガラス化後、液体窒素内で保存することも可能である。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

< 著書(共著) >

1) 長嶋比呂志: 哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: 繁殖生物学. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.

2) 松成ひとみ, 長嶋比呂志: 動物個体内での臓器再生. In: 幹細胞研究と再生医療. 南山堂; 2013: 130-135.

<原著論文>

1) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. J Reprod Dev 60:in press. 2014.

2) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. PLoS One DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone.0092219 PONE-D-13-45932 [pii], 2014.

3) Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in

single- and multitransgenic pigs. Transplantation ,DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.

4) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. PLOS ONE 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.

5) Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. Hum Mol Genet 22:4368-82, 2013

6) Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraehe K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R,

Wolf E: Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. BMC Biotechnol 13:43. DOI: 1472-6750-13-43 [pii], 10.1186/1472-6750-13-43, 2013

7) Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M, Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. Surg Today 43:782-6. DOI: 10.1007/s00595-012-0274-x, 2013

8) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. Genesis, 51(11):763-776, 2013.

9) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. BMC Biotechnology , 13:58, 2013.

10) Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H, Miyagawa S: A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters.

Journal of Surgical Research , 183(1):412-418,DOI 10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.

11) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the res fluorescent protein kusabira-orange as a nobel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. Transplantation Proceedings, 45:1808-1810, 2013.

12) Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. J Reprod Dev 59(6): 599-603, 2013.

<総説>

1) 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志：卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、再生医療 13, 48-51, 2014

<その他>

<招待講演・海外>

1) Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov

2013; Osaka.

<招待講演・国内>

- 1) 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタによるトランスレショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.
- 2) 長嶋比呂志: トランスレショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京.
- 3) 長嶋比呂志: クローンブタをプラットフォームとするトランスレショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京.
- 4) 長嶋比呂志: 生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京.
- 5) 長嶋比呂志: クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島.
- 6) 長嶋比呂志: クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催): 18 Jun 2013; 東京.

<国際学会>

- 1) Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of

the hollow fiber vitrification method for cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 2) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 3) Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.

- 4) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H, Okada Y, Toyama Y: The analyses of collagen fascicle remodeling along with cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction in Kusabira-Orange transgenic pigs. In:

- 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: 15-18 Mar 2014; New Orleans, USA.
- 5) Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M, Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 6) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 7) Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 8) Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 9) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Evolution of glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: KIDNEY WEEK 2013: 5-10 Oct 2013; Georgia, USA.
- 10) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing kusabira-orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society: 13-16 Oct 2013; Venice.
- 11) Hara S, Yokoo T, Umeyama K, Nagashima H, Nagata M: Pathological analysis of glomerular nodular lesion in diabetic pigs carrying a

dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: The International Society of Nephrology World Congress of Nephrology 2013: 31 May- 4 Jul 2013; Honk Kong.

<国内学会>

- 1) 松成ひとみ、浅野吉則、小林美里奈、内倉鮎子、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志: 脾臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来脾臓形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 2) 前原美樹、佐藤正人、松成ひとみ、内倉鮎子、松村幸奈、坂井理恵子、小久保舞美、松村和明、玄丞然、長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 3) 松田泰輔、渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、小林美里奈、林田豪太、倉本桃子、金井貴博、山口智之、中内啓光、長屋昌樹、長嶋比呂志: ブタ卵における mRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 4) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells

based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.

- 5) 渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、松田泰輔、金井貴博、小林美里奈、松村幸奈、坂井理恵子、倉本桃子、林田豪太、浅野吉則、高柳就子、新井良和、梅山一大、長屋昌樹、花園豊、長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 6) 内倉鮎子、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存. In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸.
- 7) 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、佐原寿史、山田和彦、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用. In: 第1回日本先進医工学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪.
- 8) 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウンドの更新. In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪.
- 9) 内倉鮎子、松成ひとみ、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、前原美樹、若山清香、若

山照彦, 長嶋比呂志: 中空系ガラス化法の
実用化に関する研究-1: 融解速度の胚生存
性への影響. In: 第106回日本繁殖生物学会
大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

10) 牧野智宏, 東大, 内田奈緒美, 坂本望,
新井良和, 松本守雄, 長嶋比呂志, 大鐘潤:
ブタにおけるFbn1遺伝子のエピジェネテ
ィック制御解析. In: 第106回日本繁殖生物
学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

11) 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 牧野智宏,
新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 骨格筋分
化抑制遺伝子MstnのDNAメチル化による
発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大
会: 11-14 Sep 2013; 東京.

12) 内田奈緒美, 東大, 坂本望, 牧野智宏,
新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 脂肪細胞
分化に関わる遺伝子の発現制御. In: 第106
回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013;
東京.

13) 坂本望, 東大, 内田奈緒美, 牧野智宏,
新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: ブタHnf1a,
Hnf4aの肝臓特異的発現にはDNAメチル化
とアンチセンス非コードRNAが関与する.
In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14
Sep 2013; 東京.

14) 林田豪太, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中
野和明, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈,
倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎
子, 前原美樹, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌
樹, 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞
周期可視化蛍光プローブFucci を発現する
ブタ体細胞核移植胚の作出. In: 第106回日
本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東

京.

15) 浅野吉則, 松成ひとみ, 小林美里奈,
内倉鮎子, 中野和明, 林田豪太, 松村幸奈,
倉本桃子, 坂井理恵子, 金井貴博, 松田泰
輔, 新井良和, 渡邊将人, 長嶋比呂志: DNA
メチル化阻害剤およびヒストン脱アセチル
化酵素阻害剤がブタ体細胞核移植胚の発生
能に及ぼす影響. In: 第106回日本繁殖生物
学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.

16) 松村幸奈, 前原美樹, 本田香澄, 林田
豪太, 倉本桃子, 中野和明, 松成ひとみ, 小
林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊将人,
梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ガラス
化保存された体外成熟/体外受精胚を用い
た糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. In:
第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep
2013; 東京.

17) 相澤守, 中島佑亮, 小西敏功, 水本み
のり, 本田みちよ, 新井良和, 中野和明, 長
屋昌樹, 長嶋比呂志: ケイ素含有アパタイ
トによる高い骨伝導性を備えたキレート硬
化型セメントの創製とその硬組織に対する
生体内反応. In: 第26回日本セラミックス
協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep 2013; 長
野.

18) 水本みのり, 小西敏功, 本田みちよ,
木南啓司, 有村英俊, 新井良和, 中野和明,
長屋昌樹, 長嶋比呂志, 相澤守: キレート
硬化型アパタイトセメントの材料特性およ
び生体適合性に及ぼす α -リン酸三カルシウ
ム粒子添加の影響. In: 第26回日本セラミ
ックス協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep
2013; 長野.

19) 新井良和, 大鐘潤, 藤城修平, 中野和明, 塩田邦郎, 花園豊, 長嶋比呂志: 実物としてのマウス多能性幹細胞DNAメチル化プロファイルに基づく幹細胞評価: プタ iPS細胞を例として. In: 第7回日本エピジェネティクス研究会年会: 30-31 May 2013; 奈良.

20) 原怜史, 横尾隆, 梅山一大, 長嶋比呂志, 長田道夫: Dominant-negative変異型 hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α)導入糖尿病ブタにおける糸球体結節性病変の解析. In: 第56回日本腎臓学会学術総会: 10-12 May 2013; 東京.

<特許>

1) 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット. 特願2014-027655. In.; 2014.

<新聞等>

1) 日経バイオテク (net) 2013.10.11. 「科学技術振興機構、明治大学、自治医科大学、効率的な方法で、短期間に免疫のないブタを作ることに成功」

2) 時事通信社 (net) 2013.10.10. 「免疫不全ブタ、半年で作成 = 再生医療を促進-明大など」

3) 日経バイオテク (net) 2013.10.10. 「明治大と自治医大、JST、mRNA を用いた ZFN と体細胞核移植技術で免疫不全ブタを短期間で作出」

4) 読売新聞テレビ朝日 報道ステーション 2013.7.4. 「軟骨細胞シートを使った変形性ひざ関節症の治療法」

<受賞>

1) The JRD Outstanding Paper Award
受賞年月: 2013年9月

受賞機関: 日本繁殖生物学会

受賞論文: 「Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device」Matsunari H ら他9名. *J. Reprod. Dev.* 58(5): pp. 599-608 (2012).

表 1. パッケージング¹⁾された薄層細胞シート(ウサギ軟骨細胞)のガラス化・融解後の形態維持と細胞生存性

| 細胞シートの種類 | | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
|------------------------|---------|------------|--------------------------|
| 1 層 | ガラス化 | 100% (6/6) | 84.9% (n=3) ^a |
| | 非ガラス化対照 | 100% (6/6) | 88.4% (n=6) ^b |
| ^{a, b} p<0.05 | | | |
| 細胞シートの種類 | | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
| 2 層 | ガラス化 | 100% (6/6) | 84.9% (n=2) |
| | 非ガラス化対照 | 100% (6/6) | 86.3% (n=6) |

1) ラップフィルムによりパッケージングした

有意差なし

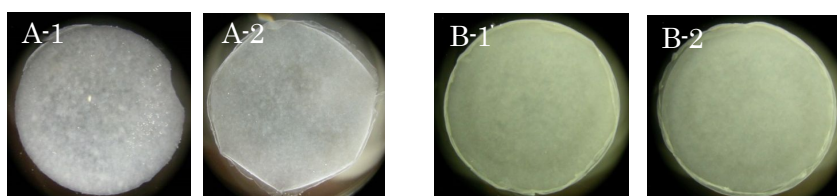


図 1. ガラス化された薄層細胞シートの融解後の形態

A-1: 非ガラス化細胞シート(1層)、A-2: ガラス化・融解後の細胞シート(1層)

B-1: 非ガラス化細胞シート(2層)、B-2: ガラス化・融解後の細胞シート(2層)

表 2. ガラス化ウサギ軟骨細胞シートの融解温度の検討

| 融解条件(温度) | | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
|----------|----|--------------|---------------------------|
| 上面 | 下面 | | |
| - | 38 | 100% (13/13) | 82.5% (n=11) ^a |
| - | 45 | 100% (9/9) | 83.1% (n=9) ^a |
| 38 | 45 | 100% (13/13) | 84.8% (n=9) ^{ab} |
| 非ガラス化対照 | | 100% (11/11) | 86.8% (n=12) ^b |

^{a, b}p<0.05

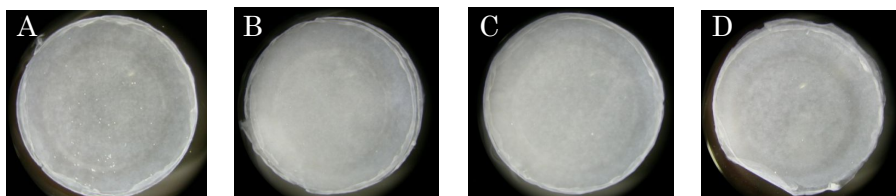


図 2. ガラス化されウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態に対する融解条件の影響

A: 下面のみを 38°C で加温、B: 下面のみを 45°C で加温、C: 下面を 45°C、上面を 38°C で加温、

D: 非ガラス化対照

表3. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態維持と細胞生存性

| パッケージング素材 | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
|-----------|--------------|---------------|
| アルミ | 100% (12/12) | 83.3% (n=12)a |
| ラップ | 100% (15/15) | 82.6% (n=13)a |
| 非ガラス化対照 | 100% (14/14) | 86.7% (n=14)b |

a, b p<0.05

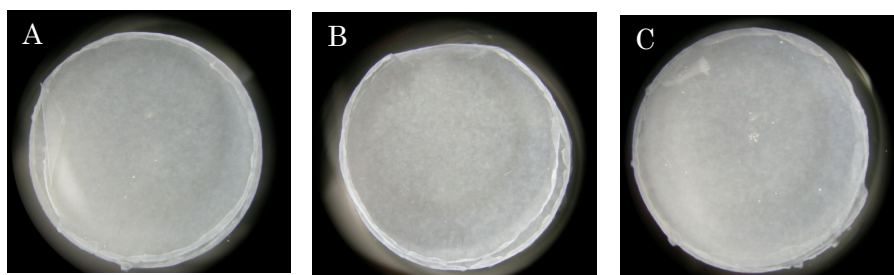


図3. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの融解後の形態比較

A: アルミフィルム、B: ラップフィルム、C: 非ガラス化対照

表4. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中保存の検討

| パッケージング素材 | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
|-----------|-----------|------------|
| アルミ | 100%(6/6) | 85.1%(n=6) |
| ラップ | 80%(4/5) | 84.2%(n=5) |
| 非ガラス化対照 | 100%(5/5) | 85.4%(n=5) |

有意差なし

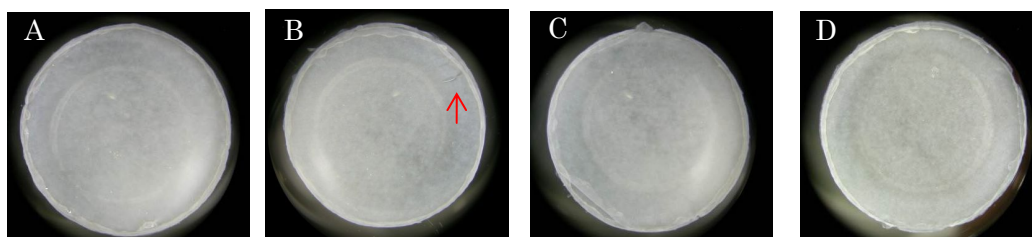


図4. パッケージング法によりガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中浸漬後の形態

A: アルミフィルム、B: ラップフィルム(破損例)、C: ラップフィルム(成功例)、D: 非ガラス化対照

表 5. アルミパッケージを用いてガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素中保存の影響

| | 液体窒素への 浸漬の有無 | 無傷での回収率 | 細胞生存率(n 数) |
|---------|-----------------|-----------|------------|
| ガラス化 | + | 100%(3/3) | 84.8%(n=3) |
| | - | 100%(2/2) | 84.2%(n=2) |
| 非ガラス化対照 | - | 100%(2/2) | 87.4%(n=2) |

液体窒素蒸気への暴露によってガラス化を行った。

有意差なし

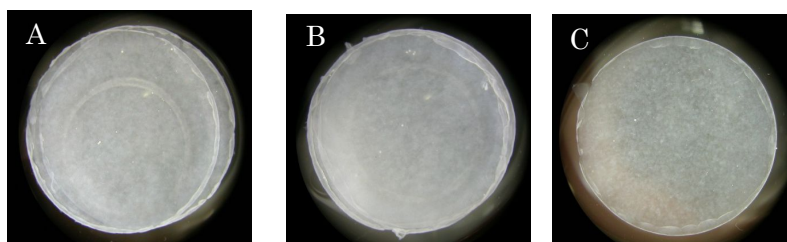


図 5 . アルミパッケージを用いてガラス化されたウサギ軟骨細胞シートの液体窒素浸漬後の形態

A: 液体窒素中に浸漬した細胞シート、B: 液体窒素蒸気によるガラス化のみ行った細胞シート、
 C: 非ガラス化対照

多指症軟骨組織由来細胞の同種 T 細胞におよぼす影響

研究分担者 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官
研究分担者 小久保 舞美 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者 岡田 恵里 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
研究協力者 河毛 知子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員

研究要旨：本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって、すでに自己積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生の有効性が示されてきている。本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、現在、同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。その結果、PDCCs は T 細胞の免疫応答を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを認めた。今回の結果から、関節軟骨損傷の治療には自己軟骨細胞だけでなく、同種である多指症由来軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節軟骨再生修復を目指し、自己積層化軟骨細胞シートを用いた臨床研究がすでに、本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって進められてきているが、この技術を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。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。

昨年度は、より臨床応用に近い状態での検討を目指し、実際に同種軟骨細胞シートの移植を行えるようになった場合と同様の手順に従って、採取、分離された軟骨細胞から作製されたシートが免疫調節効果を有しているかを検討し、同種積層化軟骨細胞シートは免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを認めた。

現在のところ同種細胞のソースとして、多指症患者の手術時廃棄組織由来軟骨細胞

を想定している。多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、短期間に多くの積層化シートを作製することが可能であり、魅力的な細胞ソースになると考えられる。しかしながら、同種細胞移植の際、拒絶反応が起こることが懸念される。そこで本年度は、*in vitro* において多指症由来軟骨細胞が同種 T 細胞におよぼす影響を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞

多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと、国立成育医療研究センターで多指症手術時に得られた 3 例の軟骨組織から単離された細胞を使用した。(以下、PDCC1, PDCC2, PDCC3 と記す。) ヒト抹消血由来 CD4⁺T 細胞 (CD4⁺TC) および正常ヒト樹状細胞 (NHDC) は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入した。

2. 各種細胞の培養

全ての培養は 37 °C, 5% CO₂ 下で行った。PDCCs は DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社)、4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou 社) を加えたもので培養した。実験に使用する際は、血清濃度を 10% に減らした培地に交換した。

NHDC は LGM-3TM (Lonza 社) にインターロイキン-4 (IL-4) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) をそれぞれ最終濃度 50 ng/ml になるように添加した培地に懸濁し、温度応答性培養皿である UpCell^B に播種して 1~3 日培養した後、室温で 30 分以上放置して UpCell^B から剥がし、必要数播種した。

CD4⁺TC は反応当日に細胞融解後、LGM-3TM に再懸濁して、必要数播種した。

3. 混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 ウェルに NHDC (3 x 10⁴ cells) と CD4⁺TC (2 x 10⁵ cells) を播種し共培養した。

4. CD4⁺TC と PDCCs との共培養

PDCCs (2 x 10⁴ cells) が播種された各ウェルに CD4⁺TC (4 x 10⁵ cells) を撒き、共培養した。

5. MLR と PDCCs の共培養

PDCCs (2 x 10⁴ cells) が播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養し

た。

6. 細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-deoxyuridine 化学発光キット (Roche 社) を用いて測定した。培養 5 日目に各ウェルに BrdU を加え 6~8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BrdU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

7. TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β の生理活性抑制

培養開始日の上清に 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) もしくは 5 µg/ml IgG 1 isotype control (Clone No. 11711; R&D System 社) を添加した。

8. TGF-β の測定

培養 5 日目の上清中の TGF-β の量は Quantikine^B ELISA Human TGF-β1 (R&D System 社) を用いて測定した。同一条件を 3 ウェル測定し、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

9. 倫理面への配慮

研究に用いた PDCCs は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHDC および CD4⁺TC は LONZA 社より購入しているこ

とから、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 結果

1. PDCCs が同種 CD4⁺TC におよぼす影響の検討

細胞増殖解析の結果、陽性コントロールである MLR の T 細胞増殖活性を 100%とした場合、PDCC1 で 3.5%、PDCC2 で 11.8%、PDCC3 で 8.9%の増殖活性しか観察されなかった。（図 1）

2. PDCCs が MLR におよぼす影響の検討

MLR の写真では T 細胞の大きな芽球形形成が観察されているのに対して、MLR と PDCCs を共培養した写真では小さな芽球形形成しか観察されなかった。（図 2-A）一方、細胞増殖解析ではコントロールの MLR での T 細胞増殖活性を 100%とした場合、その増殖活性は PDCC1 で 21%、PDCC2 で 33%、PDCC3 で 20%になっていた。（図 2-B）

3. 培養上清中の TGF-β1 量

TGF-β1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインであるが、一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがある。昨年度、積層化軟骨細胞シートにおいて TGF-β1 が高発現していることを報告している。そこで PDCC1 の抑制効果にも TGF-β1 の関与が考えられたことから、培養上清中の TGF-β1 を測定した。（図 3）その結果、PDCC1 で 2383 pg/ml、PDCC2 で 1710 pg/ml、PDCC3 で 1980 pg/ml と非常に高

い TGF-β1 の発現がみられた。

4. 接触培養条件における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF-β1 の影響についての検討

PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への TGF-β1 の関与を検証するため、MLR と PDCCs の共培養系に TGF-β 中和抗体を添加し、培養上清中の TGF-β1 の生物活性をベースレベルまで減少させた。TGF-β 中和抗体の添加有り、無しの間で T 細胞増殖活性を比較したところ、有意な差は見られなかった。（図 4）

D. 考察

本研究は、同種細胞を用いた積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞が免疫系に与える影響を *in vitro* で検討している。同種軟骨細胞の使用が可能になれば、レディメイドの細胞シートを作製することができ、患者の負担軽減および、より計画的な移植が行える上、細胞の品質や種々の情報を予め知ることができる利点がある。これまでの研究で、マウス軟骨細胞および成人関節軟骨細胞とその積層化シートが同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の細胞増殖も抑制することを明らかにしてきている。そこで今年度は、現在同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種 T 細胞におよぼす影響を *in vitro* で検討した。まず、CD4⁺TC に対する PDCCs の影響をみたところ、陽性コントロ

ールである MLR の T 細胞増殖活性に対して PDCCs と共培養した T 細胞増殖活性は、個体差はみられたが、平均 8.1 % と非常に低かった。(図 1) このことは PDCCs が同種 T 細胞の活性化(細胞増殖)をほとんど誘発しないことを示唆している。また、PDCCs が活性化 T 細胞に与える影響を検討したところ、PDCCs が活性化 T 細胞の増殖を抑制できることが分かった。(図 2) 以上のことより、PDCCs も成人関節軟骨細胞と同様に免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することを示唆している。

成人関節軟骨細胞を用いた先行実験から、T 細胞増殖抑制効果には、1: 液性因子(その候補の一つとして TGF- β 1) と、2: 細胞間接触の両方が関与していることを示唆する結果を得ている。(厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 H23 年度: 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究および H24 年度: 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現の報告書の加藤分担の項参照)そこで、PDCCs 培養上清中の TGF- β 1 量を測定した結果、PDCCs においても高発現していることが分かった。(図 3) このことより、PDCCs による同種 T 細胞の活性化抑制に TGF- β 1 が関与することが推測されたが、実際に TGF- β 1 が関わっているか、TGF- β 中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- β 1 の生物活性をベースレベルまで減少させ検討した。その結果、接触培養条件下においては、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果を減弱させる

ことはなかった。(図 4) このことは、MLR と PDCCs が接触する培養条件下では、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への TGF- β 1 の寄与が低いことを示唆している。

我々は、同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を見据えた場合の細胞ソースとして、現在のところ、多指症軟骨組織由来細胞(PDCCs)を想定している。PDCCs は 1: 手術時廃棄組織から単離できる、2: 優れた増殖性を有し、一検体から複数人分の積層化シートを作製することが可能である、といったことなどから、魅力的な細胞ソースになると考えられる。

今後、PDCCs の有用性を確実なものにするために、1: 検体数を増やした再現性の確認、2: PDCCs 抑制効果の一部分に TGF- β 1 の関与があるかの再検証; 今回は MLR と PDCCs が接触する培養条件下で検討していたので、トランスウェルなどを用いて、MLR と PDCCs を物理的に離し(非接触培養条件)、液性因子のみ行き来できる条件下で、抗 TGF- β 抗体を添加することで、PDCCs による抑制効果が相殺されるかの検証などを行う予定である。

E. 結語

PDCCs は免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖抑制効果を有することから、同種積層化軟骨細胞シート移植の際の細胞ソースとして PDCCs を利用出来ることが示唆された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1.学会発表

1) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A. Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)

2) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響」. 第 27 回日本軟骨代謝学会 (京都, 2014.2)

3) 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)

4) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)

5) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾. 「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)

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

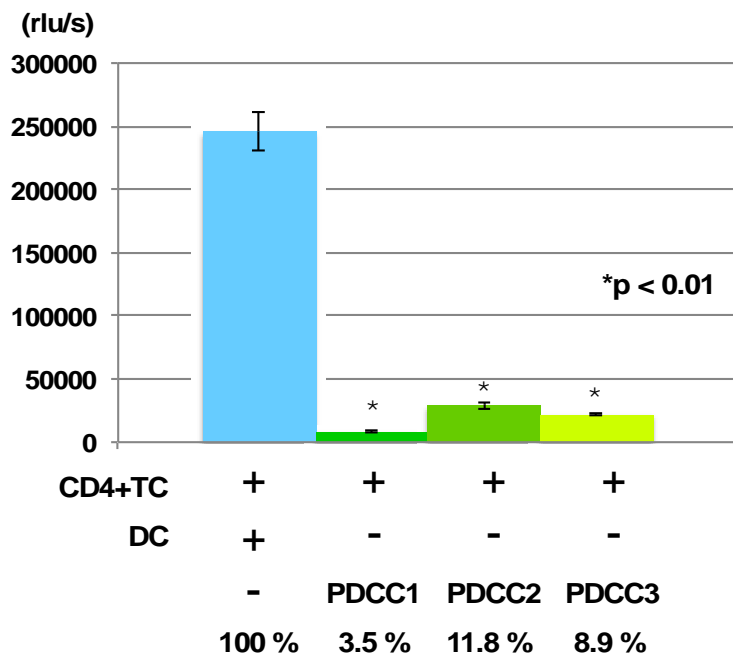


図1：多指症軟骨組織由来細胞が同種 T 細胞におよぼす影響

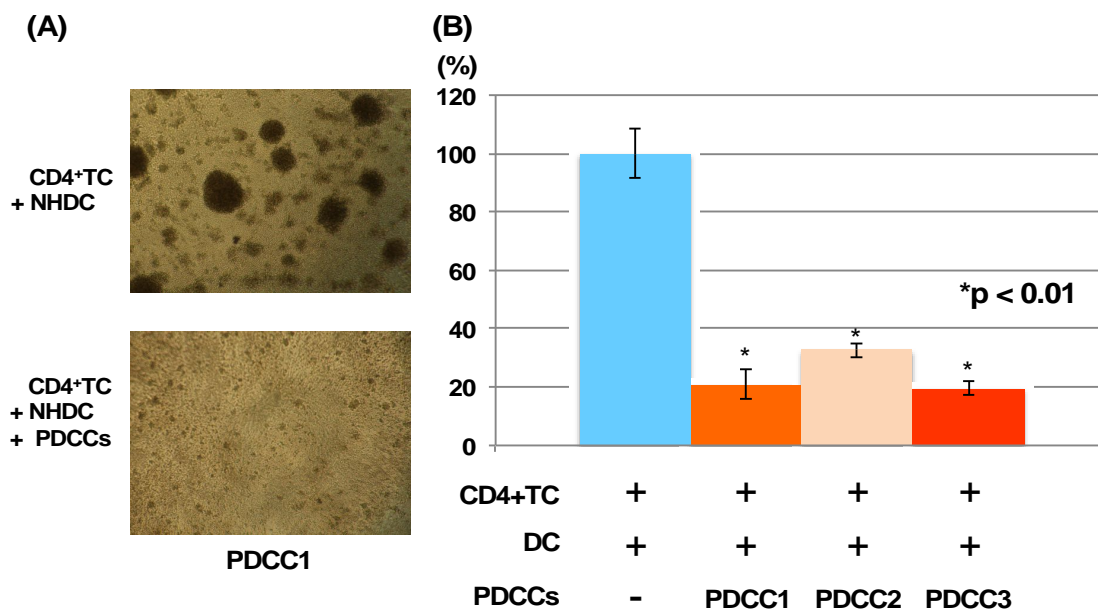


図2：多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞の増殖におよぼす影響

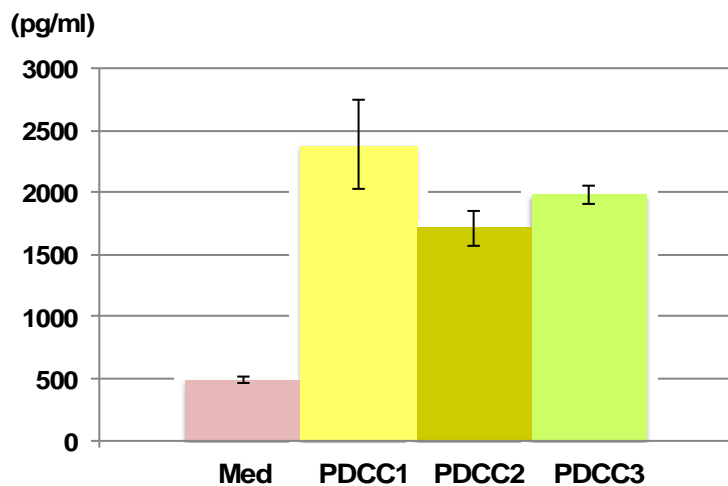


図3:培養上清中の TGF-β1 量

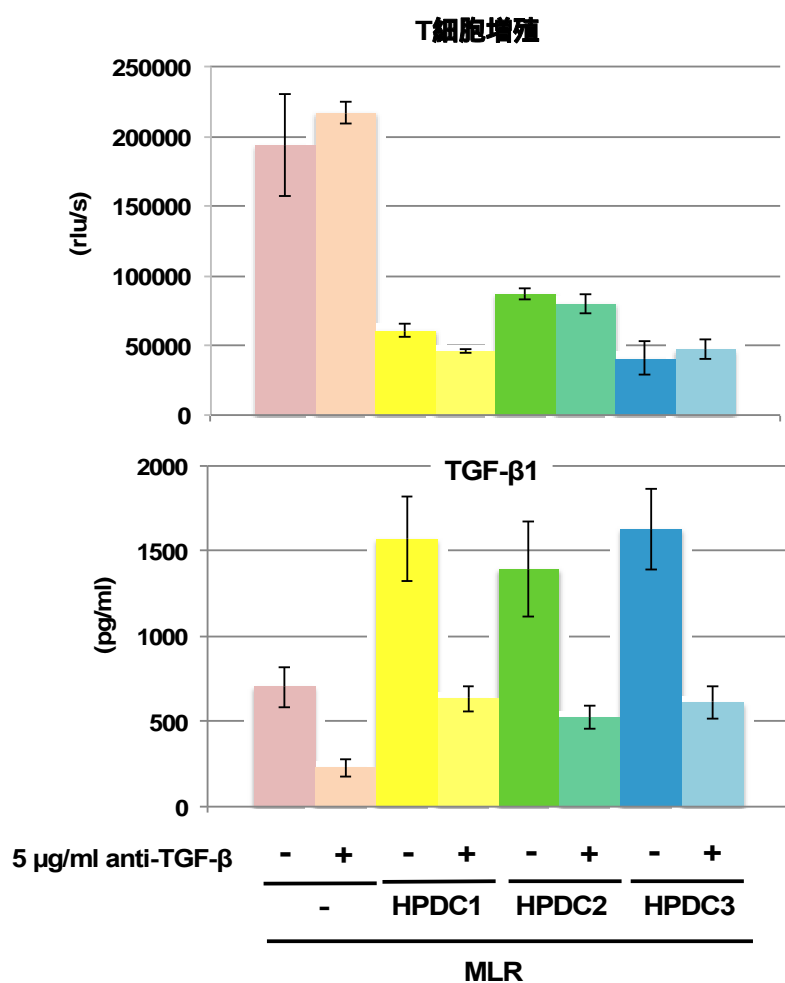


図4:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF-β1 の関与

細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による経時的評価 に関する研究

研究協力者 竹内 護 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・教授
研究協力者 村井 邦彦 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・非常勤講師
研究協力者 高久 裕子 自治医科大学麻醉科学集中治療医学講座・大学院生

研究要旨：東海大学で開発された軟骨細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うため、BLI (Bioluminescence Imaging)法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートの最適な評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定した。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用シート群の3群とも21ヶ月以上の発光を確認した。実験経過中の移植細胞からの発光は移植右膝に留まり他に移動しないことを確認し、細胞シートの安全性を実証した。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人教授らによって開発された細胞シートの移植後に動物を生かしたまま経時的にグラフトの動態を評価するために、経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、動物モデルにおける BLI (Bioluminescence Imaging)法による評価系を決定し、細胞シート膝関節移植後の滞在時間を測定することを目的とした。同時に、細胞シートは軟骨細胞と滑膜細胞の共培養による臨床応用を目指している。軟骨細胞シートと滑膜細胞シート単体移植と両シートを併用した移植の結果、細胞シート滞在期間に差が生じるかについて比較検討を試みた。我々は次の2つの仮説を立てた。

1. 軟骨細胞、滑膜細胞からなる細胞シートは移植部位にとどまりレシピエント自身の

軟骨再生を促しながら減り続けて短期に消失する。

2. 関節内環境に似せた滑膜細胞シートと軟骨細胞シートの併用移植は、それぞれの単独細胞シートより長期に生存して自己軟骨細胞の組織修復効果を高める。

本研究の主目的は以下の3つである。

1. ラット膝関節同種移植後の細胞シートの生存期間を BLI を用いて確認する。

2. 移植細胞生存期間について軟骨細胞シート単独移植、軟骨シート滑膜シート併用移植、滑膜細胞シート単独移植を比較する。

3. 細胞シート移植後の移植細胞の生体内遊走の有無を BLI から確認する。

近年 BLI 法による移植細胞の in vivo 追跡が盛んに報告されるようになったが、中でもホタルの発光遺伝子ルシフェラーゼ (*Luc*) が最も頻用されている。発光基質ルシフェリンとの反応による発光を高感度

CCD カメラで捕捉し、イメージ化することで実験動物を殺すことなく移植細胞の長期追跡が可能である。また、光子(フォトン)を単位とした発光強度は細胞数およびルシフェリン量に比例することが一般に知られている。移植細胞の追跡を行なうことを主目的とした他、以下を副目的とした。

1. 細胞シート移植後の細胞数推移を発光強度の変化から考察する。
2. ラットにおける細胞シート移植後の軟骨全層欠損における修復効果を組織学的に確認する。

B. 研究方法

全ての動物実験は自治医科大学実験動物委員会および関連する委員会のガイドライン勧告に従って行なった。

1. 研究チームの構成

東海大学においては研究統括者の佐藤正人らが自治医科大学から提供された Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats 由来の組織より細胞シートを作製し、自治医科大学にて大腿骨膝関節面に骨軟骨欠損を作製した野生型 Lewis rats に同種移植を行った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（竹内護教授）らが Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats より採取した細胞シートの材料を提供した。

2. 細胞シートの作製・移植

自治医科大学において先端医療技術開発センター先端治療開発部門（小林英司教授）

より同部門で開発した 16 週令のルシフェラーゼ Tg Lewis Rats の提供を受け、ラットを犠牲死して膝関節および股関節より軟骨・滑膜組織を採取し、東海大学にて酵素処理後に発光するルシフェラーゼ発現細胞シートを作製した。温度応答性培養皿 UpCell を用いて 6 ウェルプレートにて軟骨・滑膜細胞シートを作製した。これらは移植に用いることのできる品質であり、ルシフェリンを加えることで全てのシートが発光することを IVIS によるイメージングで確認した（図 1）。

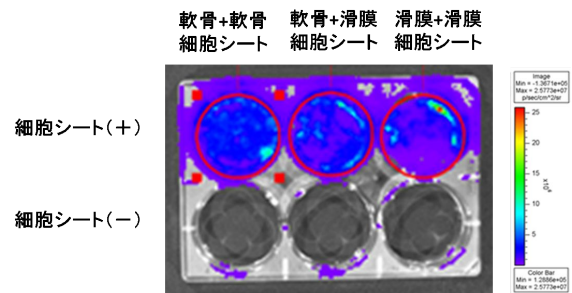


図 1. 細胞シートを置いたシャーレ上にルシフェリンを添加した後の IVIS の画像
左から軟骨細胞シート、軟骨滑膜併用細胞シート、滑膜細胞シートからの発光が青くイメージ化されている。

自治医大において 16 週令の野生型 Lewis rats スラット 36 匹(オス)をレシピエントとし、2%イソフルラン麻酔下で右膝に正中傍膝蓋骨切開を行い、膝蓋骨を脇に処理した。展開された膝関節の右膝大腿骨膝蓋面を充分に露出した後に、骨髓から間葉系幹細胞が動員されても自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を 18G 針を用いて作製 (ϕ ; 3

mm)した。そのうえで同部位に16週齢のルシフェラーゼトランスジェニックラット（オス）由来の軟骨組織および滑膜組織から作製したルシフェラーゼ発現軟骨細胞シートと滑膜細胞シートを同種移植した（図2）。軟骨細胞と滑膜細胞単独シートと両細胞併用シートの生存期間に対する相乗効果を見るために、ルシフェラーゼ発現軟骨細胞シート(AC)とルシフェラーゼ発現滑膜細胞(SY)シートの2種類を作製した。それらを組み合わせて軟骨細胞シート単独群(AC-AC群)と滑膜細胞(SY-SY群)シート単独群、両シート併用群(AC-SY群)の3群を作製した(各 $n = 12$)。各種細胞シートの膝関節内滞在期間の影響について比較検討を試みた。

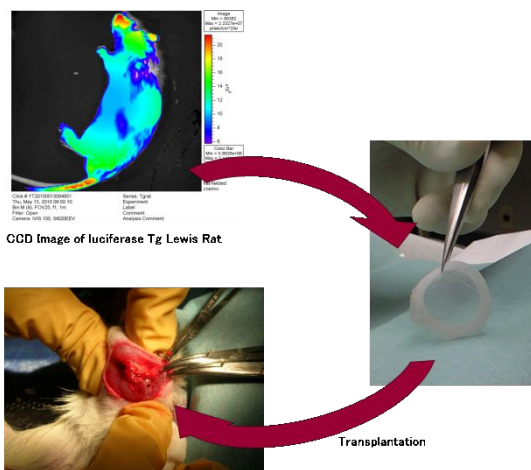


図2. ルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞シートの移植手順

それぞれ、ルシフェラーゼトランスジェニックラットのイメージング画像（左上）作製したルシフェラーゼを発現する細胞シート（右）野生型リスラットに作製した骨軟骨欠損（左下）を示す。

3. BLI法による評価方法、ルシフェリン投与方法の検討

D-ルシフェリン（Biosynth AG、Staad、Switzerland）150 mg/kg を肩甲骨下より皮下投与後、CCDカメラを搭載したIVIS(Xenogen Corp; Alameda、CA)でイメージングを確認した。イメージングの際にはもっとも強いルシフェラーゼ発光強度を測定することにした。次いで、ルシフェリンの投与方法を検討した。ルシフェラーゼ陽性軟骨細胞シート移植後1ヶ月目のリスラット1匹を試験的に用いた。3種類の方法でルシフェリンの投与方法を比較検討した。飽和濃度に近い50 mg/mlの濃度のルシフェリン溶液を蒸留水で作製した。イソフルラン麻酔下に投与した。ルシフェリンの投与経路と投与量は、陰茎静脈から静脈注射(IV)60 mg/kg、肩甲骨付近から皮下注射投与(SC)150 mg/kg、および移植膝間隙から膝関節内注射(IA)30 mg/kgとした。ルシフェリン投与後のラットをIVISの高感度CCDカメラを搭載した小動物用チャンバーに静置した。そのうえで1分毎に放出される光子量から発光強度を計測した。発光強度の経時的変化を図3に示す。ルシフェリン投与方法に従って異なる発光強度曲線となることが判明した。

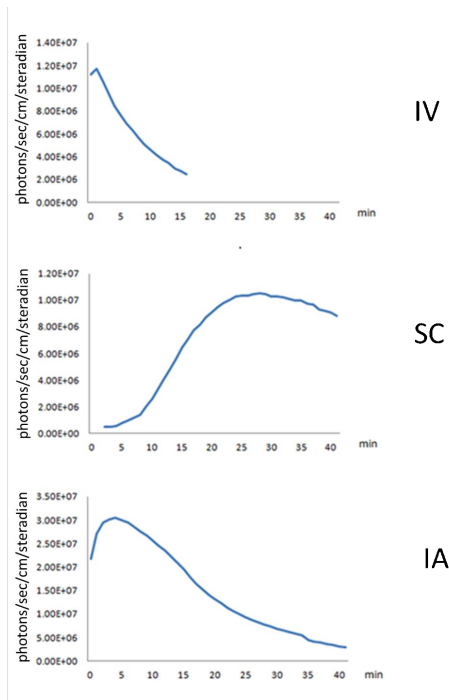


図 3. IVIS によって測定した異なる投与方法の発光強度の経時的変化
上から順に静脈注射 (IV) 投与方法、皮下注射 (SC) 投与方法、関節内注射 (IA) を示す。

IV では発光強度の最高値は 1~2 分で達し、その後急速に低下した。そのため発光強度の計測を開始する前にピーク値の計測を逃すことがあった。また陰茎静脈からの投与は技術を必要とした。一度失敗すると大きな皮下出血をきたすため再投与は困難となった。SC では緩やかに発光強度は上昇した。発光強度は 20~30 分後に最高値に達して緩やかに低下した。薬液投与は難しい手技を必要としなかった。ただし、同じ発光強度を得るのに IV 投与方法に比べて 2 倍以上のルシフェリンが必要であり、3 種の投与方法のなかで最も多くのルシフェリ

ンを必要とした。IA では発光強度は 4~5 分で最高値に達した。手技は静脈注射に比較して簡易であったが投与に失敗することがあった。この方法は血流を介せず直接ルシフェリンが移植細胞に作用するために最少量のルシフェリンによる最大の発光強度を確認することができた。しかしながら、薬液の投与量は 0.2 ml 程度であったが、ラットの膝関節包は過膨張した。このことは膝関節圧の上昇の原因となり、移植細胞や骨軟骨欠損部の再生に何らかの影響を与えることが懸念された。以上の予備実験から、皮下注射(SC) が一番簡易であり、手技によるバイアスが生じる危険性が小さいと判断した。また IA と比べて移植部位への影響は少ないと判断し、ルシフェリンの投与は皮下注射で行った。

4. 組織学的評価

前述した右膝に骨軟骨欠損を作製し細胞シートを同種移植した 36 匹のレシピエントルイスラットの中から 24 匹を用いた。AC-AC 群(n = 8)、AC-SY 群(n = 8)、SY-SY 群(n = 8)から、移植後 2、4、6、8 週に各群 2 匹ずつ CO₂ 吸入にて安楽死させた。それらの移植膝の骨軟骨欠損部の標本作製した。組織検体は 4%パラホルムアルデヒドで 1 週間固定したのち、3 週間 10% EDTA で脱灰した。パラフィン包埋したのち骨軟骨欠損部の中央部分で 5 μ m 厚の薄切り標本作製した。各切片は再生軟骨の評価のためサフラニン O 染色を施した後に光学顕微鏡で観察した。この染色法は硝子軟骨細

胞外基質の構成要素であるグルコサミノグリカンを含む酸性粘液多糖に反応した部分が赤く染色され、軟骨基質が線維化すると染色されない。再生の評価は International Cartilage Research Society (ICRS) histological grading system を用いて点数化による評価を行った（表1）。この方法は国際軟骨再生会議が提唱している。骨軟骨欠損部の再生所見を硝子軟骨組織の有無、組織統合性、表層組織の性状、軟骨下骨といった組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。評価は2名の観察者で行った。点数は平均値をグラフ化した。

| | | |
|--|--|--|
| <p>再生組織の形態</p> <p>4: 大部分が硝子軟骨 3: 大部分が線維軟骨 2: 軟骨組織ではない 1: 軟骨組織以外</p> <p>軟骨基質染色</p> <p>1: 無染 2: わずかに染まる 3: 中等度染まる 4: 強く染まる</p> <p>細胞形態の組織統合性</p> <p>1: 網様像 2: 裂隙や途絶 3: 軟骨細胞の構成ではない 4: 柱状軟骨細胞を認める 5: 正常またはそれに近い軟骨細胞</p> <p>軟骨細胞のクラスター形成</p> <p>1: 細胞のクラスター形成が25-100% 2: 25%以下のクラスター形成 3: クラスター形成を認めない</p> | <p>Tidemark の形成</p> <p>1: 石灰化軟骨層の形成が25%以下 2: 石灰化軟骨層の形成が25%-49% 3: 石灰化軟骨層の形成が50%-75% 4: 石灰化軟骨層の形成が76%-90% 5: 完全な石灰化軟骨層の形成</p> <p>軟骨下骨の形成</p> <p>1: 形成されない 2: わずかに形成されている 3: しっかり形成されている</p> <p>表層の構造</p> <p>1: 強度の線維化または途絶 2: 中等度の線維化、非整合性 3: 低度の線維化、非整合性 4: 正常</p> <p>組織学的欠損部充填率</p> <p>1: 25%以下 2: 26-50% 3: 51-75% 4: 76-90% 5: 91-100%</p> | <p>移植部断面の性状</p> <p>1: 結合していない 2: 骨髄か関節の一部 3: 両側の結合</p> <p>基底部の統合性</p> <p>1: 50%以下 2: 50-70% 3: 71-90% 4: 91-100%</p> <p>炎症反応</p> <p>1: 炎症所見を認めない 2: わずかに炎症反応を認める 5: 強い炎症反応を認める</p> |
|--|--|--|

計45点

表1. ICRS histological grading system

軟骨組織の再生所見について組織学的特徴や変性の程度を合計11点から45点で点数化し、点数が高いほど軟骨組織の良好な修復であることを示す。

C. 結果

1. 細胞シートの関節内滞在時間

BLI から移植細胞由来と推察する細胞の21ヶ月以上生存を全てのラットにおいて

確認した。イメージングでは発光は移植膝に局限して他所での発光は認めなかった。また明らかな運動機能異常も観察されなかった（図4）。

これ以上の計測は、おそらく寿命と思われるラットの死亡が続いたため中止した。

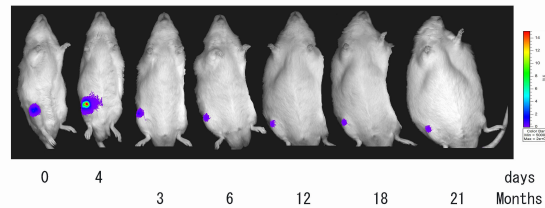


図4. 右膝から検出されたルシフェラーゼ発光の CCD 画像の経時的変化

図は AC-AC 群のうちの1匹のイメージングを経時的にしめす。ルシフェラーゼの発光を右膝部に局限して認める。

2. 軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、両細胞シート併用移植による滞在期間の差の検討

発光強度の推移は各群とも移植後3~4日後にピーク値に達した。移植0日の発光強度に比べて AC-AC 群で16倍、AC-SY 群で5倍、SY-SY 群で7倍に達した。発光強度は暫時減少して3~4週間後には3群とも移植0日の発光強度の1/10程度の値になって安定した。これは言い換えると各群においてピーク時の発光強度から1/160、1/50、1/70以下に減少したことになる。しかし発光は微弱ながらも消失することはなく21ヶ月以上計測された（図5上図）。発光強度の群間差は移植後1ヶ月までは3群間にばらつきを認める傾向があっ

たが、それ以降の長期の経過では各群とも同程度の変化率で推移した（図5下図）。

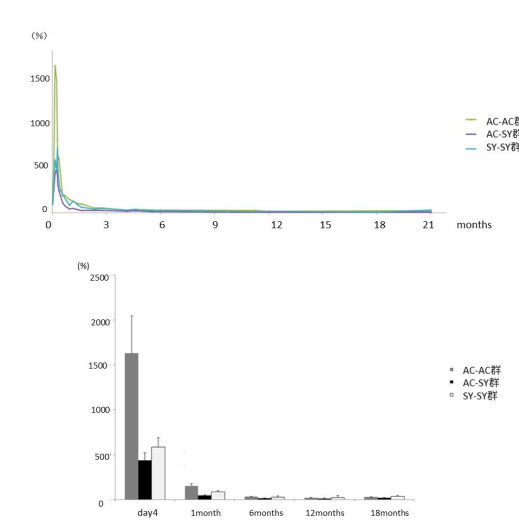


図5. 長期にわたる発光強度変化の推移
 移植0日（day0）の発光強度比を100とした場合の発光強度の推移を示す。

上図：発光強度曲線の推移、各群とも移植後3-4日のピーク値に達した後に低値で安定した発光強度を示すようになった。しかし21ヶ月間発光は途切れることはなかった。下図：ある地点の発光強度比の各群の値を抽出してグラフ化した。各群とも半年以降は初期の1/10以下に安定した。

3. 組織所見

組織所見では3群ともに軟骨細胞の再生所見を認めた。6週目まではAC-AC群、SY-SY群で軟骨基質の赤染がAC-SY群よりも著明であるが、8週目にはAC-SY群の赤染が長く続く印象をうけた。SY-SY群では移植後8週の顕鏡所見において線維化の所見を強く認めた（図6）。ICRS grading systemの点数はAC-AC群での値が他の群

よりも高かった。8週目の時点でAC-AC群とSY-SY群は値の低下を認めたが、AC-SY群のスコアは6週目から横ばいを示した（図7）。

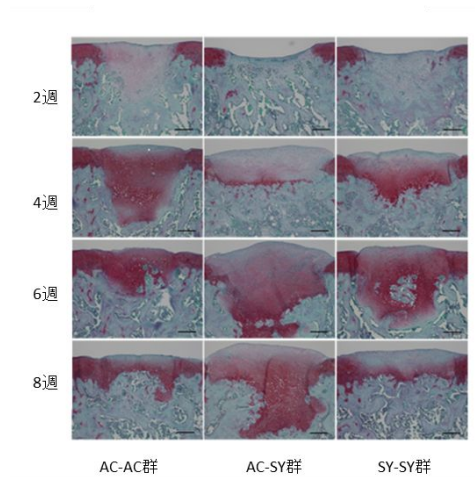


図6. 軟骨組織修復の組織学的評価。サフランインO染色した標本の光学顕微鏡画像。軟骨細胞が産生するグリコサミノグリカンを含む産生粘液多糖が赤く染色されている。スケールバーは500μmを表す。

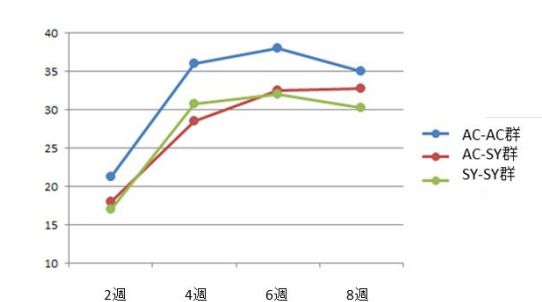


図7. ICRS grading systemによる点数の変化

AC-SY群の値が8週目の地点でも低下を認めていない。

D. 考察

今回の研究で予想以上の細胞シートの長

期生存を BLI を用いて確認することに成功した。また移植した軟骨細胞シートは 21 ヶ月以上膝関節内で生存することを確認した。さらに BLI 画像から移植した細胞が他所に移動しないで膝に留まることが確認できた。これは細胞シートの安全性を証明する結果であったと考えられる。細胞シートは軟骨組織の修復および再生の誘導因子として働いてシートを移植後に移植部周囲の宿主細胞による主導的な修復が行なわれると考えている。その後、細胞シート由来の細胞自身は移植後に消失すると考えていた。成熟した細胞からなる軟骨細胞シートの細胞はそのままの形で生存することは考えにくく、例えば脱分化した形で存在する可能性も考えられる。軟骨組織におけるニッチ環境についてまだ不明の部分が多いためこれらの機序解明は今後の課題である。次に生存期間に関する軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用効果について調べた。細胞シートにおける軟骨細胞と滑膜細胞の併用は、軟骨下骨の再生や再生軟骨細胞の構築において軟骨細胞単独シートより優れた効果があることを実証している。これらの先行研究を参考として生存期間においても軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用が単独細胞シート移植よりも長い細胞の生存期間が記録されると仮説をたてた。しかしながら 3 群とも 21 ヶ月以上の長期生存することを確認したため、生存期間に関して軟骨細胞シートと滑膜細胞を併用する効果は今回の研究では明らかではなかった。

BLI で計測される発光強度の変化を記録

したが、3 群とも移植時より 3~4 日目に最高の発光強度を記録し、その後、AC-AC 群、AC-SY 群、SY-SY 群の発光強度はそれぞれピーク 時の 1/160、1/50、1/70 まで低下して経過した。この現象について考察する。In vitro では同量のルシフェリンを同一種のルシフェラーゼ導入細胞に投与するとその発光強度は細胞数にほぼ比例することが一般的に知られている。即ち半定量的に BLI の発光強度を利用して細胞数を推測することが可能である。今回の In vivo の実験では術後数日の移植直後の細胞を取り巻く環境が一定ではなく厳密な細胞数の比較はできない。移植部周囲の環境は移植後に大きな変化が生じるとともに、移植術を施行する時には移植細胞には大きなストレスがかかる。そのため移植された細胞の周術期の生体活性の変化の程度については不明である。つまり今回の発光強度曲線の変化の 1 つの説明としては、移植時はストレスによって移植細胞の生体活性が低いため計測される発光強度は低くなり、経過とともに移植細胞の生体活性は回復して発光強度も高値をしめすと考えられる。その後、移植時より細胞シートの細胞は死滅していくため経過とともに移植時に比べてごくわずかな細胞シートの細胞が移植部位に生存したのではないかと考える。今回の実験でこの発光強度は微弱ではあるが 21 ヶ月以上途切れることなく続くことが証明された。これ以降はおそらく寿命によるレシピエントラットの死亡が相次いだため計測を中止しており、より長期の変化は不明であるが、

細胞シートは移植後生涯にわたって移植部位にわずかにせよ生存しうることが示唆された。実際の移植細胞の同定、およびその形態の確認は今後の研究課題となる。軟骨細胞シートは再生した軟骨組織が時間の経過によって線維軟骨に置き換わることなく、完全に硝子軟骨の状態が保たれる状態を目指して開発されている。今回の組織所見ではSY-SY群の組織像で線維軟骨の再生所見が著明であった。このことは他種の動物実験の成果と一致した。

E. 結論

BLI の手法を用いて、ラット膝関節における大腿骨軟骨全層欠損モデルに対する細胞シートの同種膝関節移植後に移植細胞シート細胞が長期生存することを確認した。本研究期間において移植細胞は追跡中に膝関節から他臓器の移動を認めなかったことから細胞シート移植後の安全性を確認した。以上をまとめ 2014 年 2 月号の Biomaterials 誌上で報告した。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

1) Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E,

Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, Sato M. In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint. Biomaterials, 2014 Feb;35(7):2199-2206.

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

書籍

| 出版 | 書籍名 (出版社) | タイトル | ページ | 出版地 | 著者氏名 |
|-------|---|---|---------|-----|-----------------------|
| 2014年 | 遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元組 織化-その最先端 技術と材料技術 (メディカル ドゥ) | 第3章 細胞3次元組織化のた めの培養技術 6. 細胞積層化技術 3)滑膜細胞との共培養法によ り作製した軟骨細胞シートの 特性評価 | 270-276 | JPN | 小久保舞美, <u>佐藤正人</u> |
| 2013年 | 再生医療におけ る臨床研究と製 品開発 (技術情報協会) | 第6章 非臨床安全性試験・ 臨床試験における評価 [4] 軟骨再生における評価 | 384-387 | JPN | <u>佐藤正人</u> |

雑誌

| 出版 | 発表誌名 | 論文タイトル | ページ・ 巻号 | 著者氏名 |
|-------|--|---|-------------------------------------|--|
| 2014年 | Biomaterials | In vivo cell tracking by bioluminescence imaging after transplantation of bioengineered cell sheets to the knee joint | 35(7), 2199-2206 | Takaku Y, Murai K, Ukai T, Ito S, Kokubo M, Satoh M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T, Takeuchi M, Mochida J, <u>Sato M</u> |
| 2014年 | The Anatomical Record | Articular cartilage regeneration using cell sheet technology | 297(1), 36-43 | <u>Sato M</u> , Yamato M, Hamahashi K, Okano T, Mochida J |
| 2013年 | Journal of Biomedical Materials Research. Part A | Potential utility of cell sheets derived from the anterior cruciateligament and synovium fabricated in temperature- responsiveculture dishes | Epub ahead of print | Mitani G, <u>Sato M</u> , Yamato M, Kokubo M, Takagaki T |
| 2013年 | BMC Biotechnology | Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets | 13(58) Epub ahead of print | Maehara M, <u>Sato M</u> , Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H |
| 2013年 | Journal of Tissue Engineering and | Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with | Epub ahead of print | Kokubo M, <u>Sato M</u> , Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Ebihara G, Okano T, |

| | | | | |
|-------|---|---|---------------------|---|
| | Regenerative Medicine | temperature-responsive culture inserts | | Mochida J |
| 2012年 | Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine | Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets | Epub ahead of print | Hamahashi K, <u>Sato M</u> , Yamato M, Kokubo M, Mitani G, Ito S, Nagai T, Ebihara G, Kutsuna T, Okano T, Mochida J |
| 2014年 | 日本再生医療学会誌 | 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 | 13(1), 64-68 | <u>佐藤正人</u> |
| 2014年 | 日本機械学会誌 | 軟骨再生医療の現状・今後の展望 | 117(1142), 16-19 | <u>佐藤正人</u> |
| 2013年 | CLINICAL CALCIUM | 細胞シートによる関節軟骨の治療 | 23(12), 59-65 | <u>佐藤正人</u> |
| 2013年 | CLINICIAN | 細胞シートによる関節治療 | 60(620), 74-81 | <u>佐藤正人</u> |
| 2013年 | 整形外科 | 血管新生阻害剤 その適応の拡大をめざして | 64(5), 468 | 長井敏洋, <u>佐藤正人</u> , 持田譲治 |
| 2013年 | 整形・災害外科 | 細胞シート技術を応用した軟骨再生法の開発 | 56(5), 565-572 | <u>佐藤正人</u> , 持田譲治 |
| 2013年 | Pharma Medica | 細胞シートによる関節軟骨再生治療 | 31(4), 15-19 | <u>佐藤正人</u> |

雑誌（その他）

| 出版 | 発表誌名 | タイトル | ページ・巻号 | 著者氏名 |
|-------|-----------------|-------------------------|---------------|-------------|
| 2013年 | 週刊文春 | ひざ痛治療革命「軟骨再生」最前線レポート | 2013年9月12日号 | <u>佐藤正人</u> |
| 2013年 | MEDICAMENT NEWS | 特集 = 再生医療の現状と展望「軟骨再生治療」 | 第2117号, 10-12 | <u>佐藤正人</u> |

学会発表

| 発表 | 発表学会名 | タイトル | 著者氏名 |
|------------|---|--|--|
| 研究代表者 佐藤正人 | | | |
| 2014年 | 2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society | Prevention of post-traumatic osteoarthritis by administration of intra-articular anti-VEGF antibody (bevacizumab; Avastin) | Nagai T, <u>Sato M</u> , Kobayashi M, Mochida J |
| 2013年 | TERMIS-AM 2013 | Diagnosis for degenerative articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation | Tani Y, <u>Sato M</u> , Yokoyama M, Takagaki T, Kobayashi M, Kokubo M, Ebihara G, Ito S, Ukai T, Ishihara M, Mochida J |
| 2013年 | Gordon Research Conference | Articular Cartilage Regeneration Using Cell Sheet | <u>Sato M</u> |

| | | | |
|-------|---|--------------------------------------|---|
| 2014年 | 第13回日本再生医療学会 | 【シンポジウム】軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究と今後の課題 | 佐藤正人 |
| 2014年 | 第13回日本再生医療学会 | 同種軟骨再生医療のための安全性評価 | 岡田恵里, 佐藤正人, 高垣智紀, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 河毛知子, 阿久津英憲, 伊東紀子, 梅澤明弘, 持田讓治 |
| 2014年 | 第13回日本再生医療学会 | 低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価 | 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 内山善康, 繁田明義, 持田讓治 |
| 2014年 | 第13回日本再生医療学会 | ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1 | 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 松村幸奈, 坂井理恵子, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 持田讓治, 長嶋比呂志 |
| 2014年 | 第27回日本軟骨代謝学会 | 多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響 | 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田讓治, 新見信吾 |
| 2014年 | 第27回日本軟骨代謝学会 | 細胞シートを用いた関節軟骨再生治療 | 高垣智紀, 佐藤正人, 三谷玄弥, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治 |
| 2014年 | 農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト・医薬品作物等開発分科会, 推進会議プログラム | コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨再生に関する研究開発 | 佐藤正人 |
| 2014年 | 第3回三浦半島地区膝関節疾患懇話 | 【特別講演】軟骨再生医療の現状と未来 | 佐藤正人 |
| 2014年 | 第13回かわごえ並木の会 | 【特別講演】細胞シートによる関節軟骨の再生医療 | 佐藤正人 |
| 2013年 | 第28回日本臨床リウマチ学会 | 【ランチョンセミナー】再生医療で変形性膝関節症は治せるか? | 佐藤正人 |
| 2013年 | 最先端研究開発支援(FIRST)プログラム | 【パネルディスカッション】細胞シートが拓く新しい再生医療 | 佐藤正人 |
| 2013年 | 防衛医科大学校整形外科同門会 | 【教育研修講演】軟骨再生医療の現状と細胞シートによる関節治療の展望 | 佐藤正人 |
| 2013年 | 小田原整形外科医会 | 【教育セミナー】軟骨再生医療の現状と未来 | 佐藤正人 |
| 2013年 | 第3回DDS徐放化再生医療研究会 | 【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療の可能性 | 佐藤正人 |
| 2013年 | 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 | ウサギ膝前十字靭帯切離モデルを用いた抗VEGF抗体ヒト化モノク | 長井敏洋, 佐藤正人, 小林美由希, 持田讓治 |

| | | | |
|-------------|------------------------------------|---|---|
| | | ローナル抗体 (bevacizumab) の関節内投与による軟骨変性抑制効果の検討 | |
| 2013 年 | 第 386 回横浜市立大学整形外科同門会談話会 | 【招待講演】軟骨の再生医療の現状 | 佐藤正人 |
| 2013 年 | 第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 | 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨の再生 (ヒト幹細胞臨床研究) | 佐藤正人 |
| 2013 年 | 第 12 回国際バイオテクノロジー展・技術会議 | 【特別講演】関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 | 佐藤正人 |
| 2013 年 | 第 29 回日本医工学治療学会 | 【教育セミナー】細胞シートによる関節軟骨の再生医療 (ヒト幹細胞臨床研究) | 佐藤正人 |
| 研究分担者 阿久津英憲 | | | |
| 2013 年 | 11th ISSCR 2013 Annual Meeting | Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster) | Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A |
| 2013 年 | 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 | β -カテニンは分化多能性に必須でありその機能不全は悪性胚細胞腫瘍発生に關与している | 奥村典子, 阿久津英憲, 浜谷敏生, 山田満稔, 菅原かな, 小川誠司, 井上 治, 上條慎太郎, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典 |
| 研究分担者 長嶋比呂志 | | | |
| 2013 年 | Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session | 【招待講演】Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO | Nagashima H |
| 2013 年 | 第 4 回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム | 【招待講演】遺伝子改変ブタ・クローンブタによるトランスレショナルリサーチの展開 | 長嶋比呂志 |
| 2013 年 | 第 5 回愛宕 Nephrology Forum | 【招待講演】トランスレショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性 | 長嶋比呂志 |
| 2013 年 | 東京医科歯科大学大学院特別講義 | 【招待講演】クローンブタをプラットフォームとするトランスレショナルリサーチ | 長嶋比呂志 |
| 2013 年 | 第 106 回日本繁殖生物学会市民公開講座 | 【招待講演】生殖工学技術が拓く未来の動物生産 | 長嶋比呂志 |
| 2013 年 | 第 28 回福島移植フォーラム | 【招待講演】クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望 | 長嶋比呂志 |
| 2013 年 | 第 5 回産学連携情報交換会 (農林水産省主催) | 【招待講演】クローン動物の医学・医療への利用 | 長嶋比呂志 |

| 研究分担者 加藤玲子 | | | |
|------------|--------------------|--|--|
| 2014年 | 第27回日本軟骨代謝学会 | 多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響 | 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾 |
| 2013年 | 第35回日本バイオマテリアル学会大会 | 生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(2): タンパク質発現の網羅的解析 | 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾 |

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 25 年度 第 1 回班会議

日時：平成 25 年 11 月 28 日（木）14:00～16:00

場所：霞が関ビル 35 階 東海大学校友会館（東海の間）

出席者：光島健二（独立行政法人医薬基盤研究所）、眞鍋孝司（独立行政法人医薬基盤研究所）、花井荘太郎（独立行政法人医薬基盤研究所）、木下奈津美（独立行政法人医薬基盤研究所）、阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）、加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、長嶋比呂志（明治大学）、前原美樹（明治大学）、的場亮（DNA チップ研究所）、平賀育英（DNA チップ研究所）、伊東紀子（DNA チップ研究所）、坂井秀昭（セルシード）、丸木秀行（東京女子医科大学）、佐藤正人（東海大学）、浜橋恒介（東海大学）、谷良樹（東海大学）、小久保舞美（東海大学）、河毛知子（東海大学）、岡田恵里（東海大学）、豊田恵利子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：岡田恵里

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）

このプロジェクトは今年度で 2 年目になり、3 月に中間評価があります。変形性膝関節症が再生医療としてターゲットとすべきことは、小さな損傷を治すだけでは仕方がないため、究極的にはこの疾患を治すこととなります。最終的には人工関節としてコストパフォーマンスがよいものがありますが、生物学的な膝で生涯を終えていただきたいと考えてプロジェクトを進めています。

関節症の初期は軟骨がささくれであったり、毛羽立ったりしている状態です。この状態でも、中のマトリックスは抜けているため、本当は治さなければなりません、この段階を治す術がありません。270 年前から潰瘍化した軟骨は治りづらいといわれていますが、進歩していません。軟骨の下に軟骨下骨がありますが、ここまで達する損傷は、ある大きさまでは質の悪い線維軟骨では治るといわれています。軟骨内損傷といわれる部分損傷は、中の骨髄からの細胞動因が非常に少なく軟骨マトリックスが邪魔して修復されず、きちんと治癒されません。

我々は、温度応答性培養皿を用いた細胞シートを作製し、動物実験において全層欠損と部分損傷に効果があることを確認しました。将来的に細胞シートは両方の損傷が混在している変形性膝関節症の治療になるのではないかとデータを蓄積しているところです。温度応答性培養皿は、イソプロピルアクリルアミドポリマーの作用により 37℃ で疎水性、20℃ で親水性を獲得します。細胞播種し、コンフルエントになったところで温度を下げると細胞シートとして回収できます。シートは細胞と細胞が自ら分泌した細胞外マトリックスが集積した成分で人工物は一切含まれていません。

ー昨年より臨床研究を開始し、現在、8例の移植が終了しています。

(TVで放映された映像により細胞シートの作製と今後の展望の解説)

自己細胞の移植は厚労省による年齢制限と大きさの制限がありますが、安全性と有効性を術後1年のエンドポイントで評価しています。今まで対象とされてきた損傷は外傷性損傷だけでしたが、東海大学では唯一変性した軟骨にも適用してよいことになりました。

シートは、5cmの小切開で直接患部に移植します。3箇月でMRIにより軟骨ができてきたことが確認されます。評価方法として、レーザーを用いた超音響法(厚さと粘弾性特性)により、プローブを変えることでType I, Type II コラーゲンの組織性状の差が検出できます。軟骨は、よい軟骨も悪い軟骨も白く修復されるので、移植一年後に抜釘術の際に修復された軟骨を超音響法(厚さと粘弾性特性)とバイオプシーによる組織学的評価を実施して、95%以上硝子軟骨でしっかり治っていることを確認しています。

臨床研究で有効性と安全性を確認することを進めています。

(TVの放映による移植2例目の患者さまの治療後の状態を紹介。回復がよくて喜んでいます。患者さまのコメント、移植をしているいろいろチャレンジできて、大きなプラスだったと思います。)

現在11例のエントリー中、8例に実施しました(3例は厚労省の基準外で中止になった患者)。移植を実施した8例の患者さまは経過良好で今のところ、有害事象はありません。現在、世界で実施している治療はACIで、アメリカで2万例以上行なわれ、健常部から採取した骨膜を縫い付けて1箇月培養した細胞を挿入し、治療しています。細胞組織加工製品は、日本ではJ-TECの皮膚と軟骨、米国では約20年前からカーティセルの軟骨、欧州ではコンドロセレクト、韓国では10種類ほどあります。

承認されているJ-TECのジャックは、骨膜との併用であり、骨膜と軟骨の間にアテロコラーゲンゲルに包埋した軟骨細胞を挿入している点が新しい点です。ジャック:0.9個細胞/1mm³、東海:4500個細胞/1mm³の細胞を使用しています。このことから、組織修復はより効果的だと推察されます。ジャックの使用について、厚労省とのワーキンググループで定められた使用基準は、外傷性、大きさの制限、安全性を理解した医師(ワークショップと実技指導)、使用実施基準を満たした施設等の条件がついています。

我々は健常部1、2箇所から骨膜を採取し、貼りつけて小さな損傷を治療する方法から脱却し、骨膜を採取しません。骨膜を用いた治療法は、多くが線維軟骨で修復され、硝子軟

骨での修復がみられません。これは、複合体の形状での修復が問題であると考えられ、多数要素の最適化の検討は困難であり、骨膜やスキャホールドは用いません。軟骨細胞シートと骨髄由来細胞の相互作用により硝子軟骨で治癒していることを動物実験で確認しています。この結果を踏まえて、前臨床試験で大型動物ミニブタモデルを用いてシートの縫合も検討したところ、縫合なしでの治療に成功しています。動物実験において部分損傷のモデルの開発並びに作製を行ない、表層にシートを移植すると変性が遅れる結果が得られ、細胞シートの変性抑制効果が認められています(学会誌の表紙)。細胞シートの効果の作用機序を検討し、サイトカインの TGF- β に着目し研究しました(浜橋参照)。ラット、ウサギ、ミニブタ、ヒトと種がヒトに近づくにつれ、細胞シートが作製しにくくなります。ヒトに応用するにあたり、3 週間でより均一な細胞シートの作製を研究し、生体内の環境を擬似するような共培養法を開発しました(小久保参照)。一連の研究により、臨床試験を実施しています。

細胞シートの治療は、自己細胞もよいのですが、2 回の手術が必要であること、高齢であると必ずしも活きのよい細胞ではないこと、採取量に限界があり複数回の手術が難しいこと、OA 患者は遺伝子異常をもっている場合があることを解決するために同種軟骨細胞の使用を考案しました。外国では軟骨チップが市販されていますが、トレーサビリティの問題があり、国内で手術時に廃棄される多指症の軟骨組織(1 歳前後)を同種細胞のソースとして期待し、国立成育医療研究センター研究所との共同研究で供与された細胞を用いて安全性試験を実施しています。この細胞は P2、P3 で爆発的に増殖します。シート化すると多くの患者さまに適用できる魅力的な細胞ソースと考えています。NOG マウスを用いた安全性の評価や、既に世界でヒトの軟骨細胞が 2 万件移植されていますが、腫瘍化した報告はされていません。G バンド分染法、アレイ CGH 解析により、継代培養中に遺伝的变化があるかを評価しました(河毛参照)。軟骨は免疫拒絶されない組織であるといわれていますが、免疫について国立医薬品食品衛生研究所と共同研究をしています(加藤参照)。また、シートを作製し、シート状で保存することにより、細胞シートの作製日数を待たずにいつでもレディメイドで治療できるように明治大学と共同研究し、保存の開発を進めています。株式会社セルシードと温度応答性培養皿の大きさや治療地部について、DNA チップ研究所とアレイ CGH 解析について共同研究を行っています。

上皮系以外の細胞で、世界で初めての技術を用いて軟骨の部分損傷と全層欠損の両方に効果の認められた方法で臨床研究を行っています。自己細胞シートを先進医療へ移行できるよう、また、同種細胞シート of 臨床研究を行えるように準備しています。

< 質疑応答 >

質問：自己細胞シート of 臨床研究は 10 症例とありますが、あと 2 例実施しますか。

回答：8 症例実施しています。1 年後フォローまでもっていきたいです。1 症例につき 350 万円の費用がかかりますので、今年度は実施しないかもしれません。厚生労働省との協議

が必要ですが、仮に HP で患者さまが集まれば来年の今頃までに 10 例まで実施するかもしれません。

(2) 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響」

研究分担者 加藤玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)

これまでに東海大学佐藤班で、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨の部分損傷に対して、温度応答性培養皿で作製した自己積層化軟骨シートによる関節軟骨修復効果を世界で初めて明らかにしてきています。しかしながら、本技術の将来的な普及を考えると同種細胞移植が望ましいと考えられます。同種移植は、予め細胞の品質が確認でき、レディメイドでの細胞シート作製が可能になり、患者さまの負担の軽減や計画的な移植が行える利点があります。軟骨組織は免疫応答が低いといわれていますが、実際に同種軟骨細胞が宿主内で免疫反応において、どのような挙動を示すのか詳細な報告がないため、同種軟骨細胞の免疫応答に関する研究を行ってきました。これまでの成果として、マウス軟骨細胞、市販ヒト軟骨細胞およびヒト膝関節軟骨細胞といった成人軟骨細胞(AC)、さらに成人ヒト軟骨積層化シートがリンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、リンパ球混合培養反応(MLR)において活性化リンパ球の増殖を抑制することを示してきました。

今回は、同種軟骨細胞ソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞を用いて検討を行いました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、これまで検討した成人軟骨細胞と同様に T 細胞の活性化を惹起しませんでした。さらに、多指症軟骨組織由来細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討した結果、MLR を抑制していることが確認でき、患部周辺の炎症を抑制できる可能性が考えられました。一方、先行実験から、抑制効果には液性因子の関与が示唆されていました。TGF- β 1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインの 1 つであるが、一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがあります。MSC においても TGF- β 1 がその免疫調節効果に関与する液性因子の 1 つである報告があることから、多指症軟骨組織由来細胞の培養中の TGF- β 1 を測定しました。その結果、多指症軟骨組織由来細胞は、TGF- β 1 を高発現しており、同種 T 細胞の活性化抑制に関与している可能性が確認できました。来年度は、in vitro では多指症患者由来軟骨細胞シートが AC と同様の性質を持っているかの検討および、軟骨細胞の T 細胞増殖抑制効果に TGF- β が関与しているかに関しては、TGF- β 中和抗体を用いて、培養上清中の TGF- β 量を減少させ検討します。in vivo ではウサギ同種異系間での積層化軟骨シート移植を行い、免疫応答に対する影響の検討の開始を考えています。次年度以降、短期中期長期の経過観察をしたいと考えています。

< 質疑応答 >

質問：この結果は多指症軟骨に限ったことですか。

回答：これまでの成果として、マウスの軟骨細胞でもリンパ球活性化を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖の抑制効果を確認しています。さらに、市販の軟骨細胞、成人

の患者さまの膝軟骨細胞を用いた先行実験でも同様な結果が出ています。

将来的に同種の細胞ソースとして、廃棄組織から採取できる点で多指症由来軟骨細胞が有用と考え、今回検討対象の細胞といたしました。

質問：効果としてはどうですか。

回答：T細胞の活性化をほとんど惹起しない点では、先行実験で用いた成人の軟骨細胞と差はないと考えています。抑制効果についても、今のところ、多指症由来軟骨細胞が特別に強いわけではないと考えています。

質問：多指症由来軟骨細胞は、増殖がよいとのことでしたので、免疫抑制作用がより強く出るのかと思ったのですが。

回答：成人の軟骨と横並びにしたときも多指症由来軟骨細胞の方が強く抑えていることはなかったのですが、成人の細胞と比較しても十分抑えています。

質問：TGF- β は型がいろいろとあると思いますがどれをみていますか。

回答：TGF- β 1 をみています。

質問：レセプターは、関節の移植したあたりの細胞にどのようにでていますか。

回答：関節は1と3がメインです。市販の分化誘導培地もTGF- β 1か3が入っています。

質問：膝関節症の病変部の免疫状態は、どのようになっていますでしょうか。免疫が病態として関与していますか。

回答：変形性関節症はリウマチとはかなり違います。リウマチはTNF抗体治療（免疫抑制剤）があり、かなり免疫抑制剤が効くようです。OAもわずかに、抗TNF抗体、ステロイド系、MPXなどが効くと論文にあります。免疫はリウマチとは比較できないくらい小さい影響だと思います。

回答：この実験は同種の細胞活性化を惹起しないということを確認することが第一の目的です。活性化T細胞の増殖を抑制することは、付加的な効果として考えています。元々、*in vivo*で軟骨細胞の親細胞であるMSC細胞が、免疫原性が低いだけでなく、さまざまな免疫細胞の活性化や分化を抑制する性質があるといわれています。同様な性質が軟骨細胞にもあればなおよいと思います。したがって、本研究では、患者さまのT細胞の活性化を惹起させないことを示すことが大事です。

（3）「セルソースの安全性評価」

研究協力者 河毛知子（東海大学）

同種軟骨細胞シートの細胞ソースとして用いるマテリアル検討の結果、手術時廃棄組織であり、かつ優れた増殖性をもつ多指症由来軟骨細胞が適していることがわかりました。多指症由来軟骨細胞を用いて安全性評価を実施しました。

各実験のマテリアルは国立成育医療研究センター研究所から凍結細胞（n=12、平均年齢1歳4か月）の分与を受けたものを用いました。

自己細胞を用いた臨床研究の安全性評価としては、アレイCGHにより培養中に生じる変

化を確認してきました。同種移植の安全性評価としては、同様にアレイ CGH により培養処理による変化の確認と、セルソースとしての核型の確認が必要だと考えられます。

培養処理による変化の確認にアレイ CGH が適している理由について本解析は、第 2 継代のサンプルを reference とし、その reference サンプルから継代した細胞を用いて test サンプルを作製する為、培養処理による変化を的確に捉えることが可能です。

G バンド分染法はセルソースの核型と培養処理による変化を確認することができます。アレイ CGH とは異なり、それぞれの継代毎に染色体の変化を確認することができる手法です。

安全性評価の 2 つの手法を組み合わせることで、安全性の高い細胞ソースを選び出すことができますと考えられます。適合するサンプルは擬陽性を除きますが、G バンドで擬陽性としたサンプルは、国際規約ではクローンと解されないものです。今回の解釈にあたり、国際規約では正常核型と解されるものも除外したのは、同種移植を目指しているため、より高い安全性を担保する為に検討項目としました。

造腫瘍性否定試験についても現在実施しています。培養した多指症由来軟骨細胞を NOG マウスに移植し 24 週まで観察し、病理組織学的に評価します。研究進捗ですが、予定しておりました平成 25 年度の安全性評価について進めています。次年度は同種軟骨細胞シートの品質評価を進めていく予定です。

< 質疑応答 >

質問：培養して異常が起きているのですか。患者さまの核型は何でみていますか。TKA の患者さまが元々もっている異常はありますか。

回答：患者さまの核型は培養した細胞で G バンドにより P2 と P12 までのサンプルで比較しています。患者さまが元々もっている異常は 7 番トリソミーと X 染色体でトリソミーがあることは報告されています。ジャックの参考資料として引用されているものもあります。

質問：CGH 擬陽性がいくつかあったものはサンプル間ででるのですか。出やすいホットスポットのようなものがあるのでしょうか。

回答：ホットスポットはダイスワップで消えます。プローブの癖というか、擬陽性が出やすい場所があると考えられますが、ダイスワップで確認します。閾値を下げたときに出ることがあるのでダイスワップ等で確認することにしています。

質問：将来使用する細胞シートは P12 まで考えているのでしょうか。実際の細胞シートはどの段階ものを使用するのですか。

回答：同種でも P1、P2 くらいまでの使用を考えています。P12 は使用しません。生体内で移植した後を完全に擬似できるわけではないですが、長期培養した場合を考慮し、より安全なものを考えて P12 まで実施しました。

(4) 「ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：細胞生存性向上への条件検討」

研究分担者 長嶋比呂志（明治大学）

研究の背景として、シート作製と移植実施時期の調整が容易になること、治療用のシートのストックが可能になること、同種移植を推進することのために、実用的な細胞シートの凍結保存技術がこの臨床応用に不可欠です。

前年度までの成果は、細胞シートを破損することなくガラス化や融解可能な方法（コーティング法；特許出願 2011-260318, BMC Biotechnology, Maehara et al.2013）を確立しました。これは、受精卵の凍結保存法を踏襲したものであり、軟骨細胞シートへの応用も可能でした。また、臨床応用を想定し、細胞シートをパッケージに収納後ガラス化する方法（envelop 法）の検証を実施しました。ガラス化後の細胞シートの構造的正常性確認を実施しました。シート構造の正常性は保たれていました（細胞外マトリックス）が、個々の細胞の生存性が少し落ちました。この現象はどの保存方法でも生存性は落ちてしまうので、生のもと同様なくらいの生存性を目指したいと考えています。ウサギだけでなく適用拡大を図るため、他種シート（ブタ軟骨細胞シート）を用いた実験を実施し、ガラス化が成功しました。

今年度の取り組みは、細胞生存性向上への条件検討として、薄層シートへのガラス化の適用を検討し、3層シートだけでなく2層、1層の試料ともガラス化が成功しました。また、融解条件の検討をし、ラップとアルミも同等な結果がでたので、アルミを用いてパッケージング方法の改良を進めることにしました。アルミパッケージを開発することは、将来医療機器メーカーが商品開発に参入した場合にもつながっていくので、この材料でよいのではないかと考えています。そして、より薄いシートの凍結も可能になったため、ヒトのシートもできるのではないかと思います。より急速な解凍条件で細胞生存性が上がりました。

今後の計画は、現行法では衛生面を考えてシートを液体窒素の中につけるのではなく、クロスコンタミ防止のため、液体窒素の蒸気中に保存するので、そのような条件で長期保存しても大丈夫であるとのデータを収集します。今は、既存の液体窒素タンクを用いているので実用的な装置の開発を考えています。ヒトへの応用を考えて、細胞生存性をより生ものものに近づけるように方法を開発していきます。

< 質疑応答 >

質問：ラップの材質は何ですか。

回答：ビニレンです。

質問：水分の浸透性があるのではないですか。

回答：非常に低いですが、長期的にはあります。

質問：今後は保存の形態としてはラップよりアルミの方がよいとのことですね。

回答：はい。

質問：ガラス化層でコーティングしているとのことですが、使用している溶液は、使用する

る際に除去していますか。また、溶液は何ですか。

回答：シートにまとわりついている非常に粘張性のある溶液です。組成は、シュウクロース、DMSO、エチレングリコール、ポリリジン、普通のバッファーが含まれています。

保存にタンパクが必要なので、今は実験で牛血清を使用していますが、実用化を考えてリコンビナントのアルブミンや他の血清に入れ換えていくことを考えています。溶液はシートを洗うことで除いています。

質問：カルボキシル化ポリリジンは非常に重要な物質とのことですが、凍結し、融解するときにも安定化として重要ですか。

回答：細胞は水の結晶化で影響を受けるのですが、ガラス化は凍結するとき（温度が下がるとき）の水の結晶化、融解するとき（温度が上がるとき）の再結晶化を抑制しています。

質問：この物質は特許をとった物質ですか。

回答：既に、別の方が特許を取っています。

質問：このような作用があることはわかっていたことですか。

回答：はい。

(5) 「温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養により作製した軟骨細胞シートの特性」

研究分担者 小久保舞美（東海大学）

動物実験により、温度応答性培養皿 UpCell™ を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨損傷部分に接着し組織修復に寄与し、その特性解析から軟骨保護作用を有していることを確認しましたが、細胞外基質を豊富に含む軟骨組織から採取される軟骨細胞の数は少なく、また乏しい増殖能や個体により、採取から移植可能な組織作製まで多くの時間を要します。本実験では、個体差の大きいヒト細胞でも、ばらつきなく、より短時間で、優れた軟骨細胞シートを作製する培養法を検討し、ヒト臨床研究にて用いられている培養法を開発しました。関節軟骨は、滑膜が分泌する関節液から栄養を得ているため、生体内に近い環境で培養することにより、滑膜細胞から栄養の供給を受けて増殖が促進することを期待し共培養を実施しました。

シートは、軟骨組織および滑膜組織を酵素的に単離後継代し、P0、P1、P2の細胞を使用し、軟骨細胞のみ培養を行う群（S群）、共培養を行う群（C群）、C群を培養14日目に3層に積層化しさらに7日間培養した群（CL群）を作製しました。P0、P1、P2それぞれC群、S群の軟骨細胞増殖能をMTT assayを用いて計測しました。S群と比べC群はP0では培養7日目から、P1、P2では培養3日目から有意に増殖しました。軟骨形質維持に重要な遺伝子の有意な発現をreal time PCRで確認し、全ての継代数でCOL2はCL群がS群と比べ1.7倍以上の発現を示し、接着因子の発現は1.5倍以上の発現を示し、一方、カタリックファクター遺伝子発現は特にP0細胞においてCL群がS群と比較し有意な抑制を示しました。免疫組織染色では、積層化シートはCOL2や接着因子の発現がシート全体で確

認められましたが、単層シートでは接着因子の発現は確認されませんでした。

正常関節内において、滑膜による関節液は軟骨の栄養原であり、慢性炎症のない滑膜組織から採取された滑膜細胞と共培養することで、軟骨細胞増殖にプラスになる液性因子のみを軟骨細胞に作用させることができ、軟骨細胞の増殖が促進したと推察されました。この結果、培養期間は単独培養と比べて平均 10.5 日短縮でき、患者さんの入院期間が短縮し、QOL の向上になると考えられます。滑膜細胞との共培養法は増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを積層化できるとともに、より軟骨細胞に適した環境を作り出すことができました。

< 質疑応答 >

質問：同種を想定した場合、滑膜は使用しますか。

回答：同種の場合は滑膜細胞を用いなくとも細胞の増殖がよいので、滑膜細胞の使用は考えていません。インサートを使ったほうが栄養供給源がよいです。滑膜と共培養しなくともシートがつくれます。

質問：軟骨共培養の細胞数と細胞比率はどうか。

回答：軟骨細胞は $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ の播種数で、滑膜細胞は $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ の播種数です。

質問：5 : 1 の比率がよかったということですか。

回答：はい。

質問：プレートは直径どのくらいですか。

回答：軟骨細胞は底面積 4.2cm^2 インサートを使用しています。滑膜細胞は底面積 9.6cm^2 ディッシュを使用しています。

(6) 「温度応答性培養皿を使用して作製した積層化軟骨細胞シートが分泌する液性因子の検討」

研究協力者 浜橋恒介 (東海大学)

我々は温度応答性培養皿を用いて細胞シート工学を応用した関節軟骨修復・再生を目指し、日本白色家兎やミニブタを用いた軟骨部分欠損および全層欠損モデルを作製し、軟骨細胞シート移植によって欠損部が良好に修復されることを確認しています。研究の結果から、積層化軟骨細胞シートは軟骨損傷部からのプロテオグリカン流出を防止し、関節液中のカタボリックファクター進入を阻止することで局所を保護する役割を持つことが確認できています。一方で軟骨再生に寄与するサイトカインや成長因子などの液性因子の供給源となっていることが推察されます。本研究の目的は積層化軟骨細胞シートが分泌する液性因子を測定し、その作用機序に関して検討することです。

人工関節置換術時に採取した軟骨組織と滑膜組織から細胞を単離後継代し P0、P1、P2 のサンプルで積層化軟骨細胞シートを作製しました。共培養法にて作製した単層細胞シートを ELISA 用培地に変更して 7 日間培養した群を M 群、単層細胞シートを 3 層に積層化

し、ELISA 用培地に変更して 7 日間培養した群を L 群、L 群と同細胞数の単層培養群を C 群としました。培養上清を 5 日間経時的に同量採取し、ELISA にて MIA、TGF- β 、PGE2、COL1、COL2、MMP13 を測定しました。その結果、軟骨分化や組織修復に関わる MIA、TGF- β 、PGE2 を分泌していること、また COL2 の分泌上昇と MMP13 の抑制が確認され、細胞外マトリックスの維持効果と軟骨保護作用を有していることが明らかとなり、軟骨欠損に対する積層化軟骨細胞シート移植の有用性が改めて確認されました。

先行研究において積層化軟骨細胞シートは、SOX9、COL27、fibronectin、integrin α 10 を強く発現していることが PCR 法で確認され、軟骨本来のフェノタイプを維持し、また優れた接着性を有していることを報告しましたが、今回の検討で積層化軟骨細胞シートは多くの液性因子を分泌し、特に軟骨組織修復に重要な役割を果たす MIA、TGF- β および PGE2 の高い分泌能が確認され、その供給源としての役割を担っていることが示唆されました。

< 質疑応答 >

質問：細胞数について。積層化すると細胞数は変わってくると思いますが、1 枚と積層化したものでは細胞数は揃えていますか。

回答：3 層に積層化したシートと従来の単層培養群は細胞数を揃えています、シングルシートと 3 層に積層化したシートは揃っていません。

質問：積層化は 3 枚ですので、1 層の 3 倍になるのですか。

回答：はい。細胞数は 3 倍になります。

質問：1 枚のシートと 3 枚の積層化したシートで液性成分に差はなかったのですか。

回答：液性成分の量としては、1 層も 3 層もあまり変わらないです。しかし少なくとも積層化によって液性成分の分泌が減少することはなかったです。

質問：今は臨床で P0 を用いられていますが、P0、P1、P2 と比較してどれがよいですか。P0 がよいですか。

回答：自己の場合ですと P0 がよいと思います。シートといいましても継代を重ねると軟骨細胞は脱分化の方向へ進みますので、培養期間の関係もありなるべく早い継代数で行いたいと思います。同種の場合は、継代が進んでも軟骨のフェノタイプが維持されるような傾向にあるので、P1 或いは P2 でも使用できるのではないかと考えています。

質問：MMP3、13 に対する遺伝的な抑制があるということは、本来軟骨細胞が持っている性質を維持しているということですか。

回答：MMP3、13 は変形性関節症において、カタボリックな影響として関節内にできてしまうので、それを抑制する効果があります。PCR の結果からも細胞シートにすることで MMP3、13、ADAMTS5 などが抑制されることが分かっており、シートのプロパティとして OA の抑制効果が期待されます。

3. 総合討論

自己の臨床試験は 8 例行われてきて、錬度が上がってきています。東海大学学内で CPC の運営・管理、シートの作製、手術が成熟してきていると思われます。自己細胞シートの 1 年後フォローを行います。学内同種細胞シートの申請を自己細胞シートのときと同様に行うことを目指しています。再生医療関連の法律が 3 つ改正されるので、ヒト幹細胞臨床研究の審査方法も変更されることになり、厚労省で行われていた審議が全国 12~20 箇所で開催することになるようです。iPS/ES 細胞に関しては厚労省が担当するようです。

旧制度のうちに同種細胞シートのヒト幹細胞臨床研究の準備をしたいと考えています。同種の安全性、有効性は自己細胞との比較に努めています。しかし、同種ならではの問題として免疫作用、細胞やシートの保存方法を検討しなくてはなりません。最終的にはシートを保存しておいて患者さまがいたらすぐに移植できるようなかたちで進めたいと思っています。細胞ソースとして培養したものを確保する必要があります。ステージを経て最終系に持って行きたいと考えています。バンキングとして、細胞シートを作るところまで確認してから、細胞を選んで使用することを念頭においているので、細胞の決定に 1 年以上かかると予想されます。それからヒトの移植へ進む予定です。

質問：適用する検体が 4/12 とありますが、すべて使用するのですか。それとも 1 つに絞りますか。

回答：組織の提供元は東海大学と国立成育医療研究センター研究所がありますが、東海大学の組織を使用することにより、申請のハードルがさがるので、こちらのほうから先行して実施したいと思います。バンキング化、サンプル採取だけでも 1 年以上かかってしまいます。有効性を確認してから、使用を考えています。

質問：どのくらいの頻度で多指症の検体はありますか。

回答：国立成育医療研究センター研究所は週に 1 件、東海大学は年に 5~6 件です。

質問：先進医療、今後の治験はどうですか。薬事法も変わってきて、医療機器として実施しやすくなると思いますが、培地の組成等、検討したほうがよいのではないのでしょうか。同等性を考えたほうがよいと思います。

回答：臨床研究は PMDA に持っていくと、参考データでしかないことは承知しています。澤先生からは、参考データとして後押ししてもらっていると聞いています。変形性膝関節症の臨床でのデータをかなり使えると思いますが、詳細は詰めたと思います。そのまま治験に応用できるものかどうかわかりませんが、PMDA の方に会議に入っただき、ご意見やご理解をいただけるようにしています。企業が参入していないので、自己細胞シートは先進医療へ進めたく、同種細胞シートは学内でのデータ収集を考えています。

質問：凍結保存の溶液は DMSO、エチレングリコールが入っています。昨年の班会議で PMDA 方から、患者さまに移植する前に洗って残存していなかったらよいとのことですが、PMDA 試験段階なので牛の血清を使っているけれども、ヒトのリコンビナントのもの

を使用していくことになりますか。その実験もしておいたほうがよいのでしょうか。血清に関しての扱いはどのようになりますか。

回答：血清は牛血清を絶対使用してはならないというものではないと思います。角膜も使用しています。

質問：胎児血清ならばよいとのことですか。

回答：きちんとトレースしているものならば大丈夫です。

回答：私共は、BSEの発症例のないニュージーランドから購入して、国内で35Gの線照射しているものを使用しています。安全性は、かなり担保されていると思います。アルブミンはどのくらい洗ったらどのくらい少なくなるか、バリデーションデータを取っています。検出限界以下ではないが、かなり低くなることは確認しています。

質問：当面は牛血清の凍結保存法で大丈夫ですか。

回答：大丈夫だと思っています。

コメント：自己評価シートの作成の依頼をします。今年度の進捗状況の報告をお願いします。班会議の内容と自己評価シートを確認して報告書を厚労省に提出します。

コメント：5年間の研究となっていますが、ロードマップ1~3年は詳しく書かれていますが、中間期になってきているので、4~5年も詳細を書かれたほうがよいと思います。書面評価される先生方がわかるように書かれたほうがよいかと思います。

回答：来年度は重要な期間であり、自己細胞シートを先進医療に、また同種細胞シートをヒト幹に通したいと考えているので、これによりかなり変わってくると思います。

コメント：まだ、厚労省のヒアリングの対象になるかわかりませんが、期間が5年間ですと、もう一回あるかもしれません。

4. 事務連絡

細胞シートの臨床応用のシンポジウムが開催されます。次回、再生医療学会、京都の国際会議場3月4-6日の期間中に開催します。3月4-5日を予定しています。

5. 閉会

以上

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 25 年度 第 2 回班会議

日時：平成 26 年 3 月 5 日（水）13:30～14:45

場所：国立京都国際会館 1F 【Room104】

出席者：光島健二（独立行政法人医薬基盤研究所） 眞鍋孝司（独立行政法人医薬基盤研究所） 花井莊太郎（独立行政法人医薬基盤研究所） 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） 加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所） 長嶋比呂志（明治大学） 松成ひとみ（明治大学） 的場亮（DNA チップ研究所） 平賀育英（DNA チップ研究所） 伊東紀子（DNA チップ研究所） 坂井秀昭（セルシード） 丸木秀行（東京女子医科大学） 佐藤正人（東海大学） 小久保舞美（東海大学） 岡田恵里（東海大学） 河毛知子（東海大学）

順不同、敬称略
記録者：河毛知子

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）

平成 24 年度から研究費を頂いて本研究を進めています。現在の状況ですが、自己細胞シートによる臨床研究を終了させて、その次の先進医療につなげることを目的としています。もう一つ同種細胞シートをどのように発展させていくかというところで、現在、新たなヒト幹指針の承認を目指しています。

最初に私の方から再度概要をお話させていただきます。各国で承認されている主な細胞組織加工製品（再生医療製品）もありますが、日本でも皮膚と軟骨があります。米国では 20 年以上前からあるカーティセル 1 社のみ、欧州ではコンドロセレクトが承認を受け、後は韓国では現状沢山あります。日本もここに負けないようにと頑張っていきたいと思えます。第二世代として組織工学的な軟骨を作ったものもあります。J-TEC のように白い組織工学的な軟骨を作って移植するというような時代になってきましたが、白っぽく見えるのは軟骨の色ではなくアテロコラーゲンの色です。1 立方センチメートル当たり 4 万 5 千個の細胞が含まれているということです。なお 0.6g 採取して、2 個供給されるということですが、一辺を 1mm 四方で区切り細胞の厚さでスライスすると、この中に 0.9 個の細胞が

いるということになります。これが本当に機能するかというのは臨床の結果をみて評価していただくということになると思います。因みに細胞シートはこの中に4千5百個の細胞がいます。

基準ですが、ジャックの使用基準要件等々こちらのスライドにいろいろ書かれていますが、学会等の意見を反映させていただいて、外傷の軟骨欠損と損傷の欠損面積が4.2平方センチメートル以上となっています。このような厳しい条件が付いていますし、実施施設も大学病院と教育研究施設であればよいのですが、膝関節の手術症例が年間100例以上行っていて、万が一の為のレスキューできる体制が整っているとどこでしかないということが挙げられています。

今のACIに代表されている治療では、体重がかからない非荷重部から骨膜をとり、さらに健常部を2箇所とって行うというスキームは変わっておりませんし、入れる培養のやり方が先ほどのジャックは組織工学的な塊として入れるということで、この骨膜を使用して入れるというのは、一切変わっていません。私共は軟骨の再生の研究をやっているなかで、このように出来てくるものは再生軟骨が不十分なのです。論文でもピュアレビュージャーナルにマイクロフラクチャーと従来の手術手技と変わらないという発表もあります。再生軟骨の出来具合にかなりばらつきがあること、原因としてこのような複合体（骨膜、スキャホールド、骨髄刺激法、骨髄由来細胞、培養）では多数要素の最適化は難しいことに注目して、骨膜もスキャホールドも使わない細胞シートと内因性の骨髄由来細胞で治すというアプローチで行なっています。

私共は始めからこの細胞シートを使い始めていたわけではなく、組織工学的な軟骨や、スキャホールドフリーで堅い軟骨を作ることに命を懸けていた時代もありましたが、細胞シートでも上手くいくということが分かりました。表層の修復が一番重要となります。細胞シートは軟骨に接着し、ある程度高密度で培養すると指で引っ張っても破れない細胞シートができます。堅い軟骨を作り移植してしまうと、それが関節内で動き回り、引っ掛かりやロッキングの原因となってしまうので、このようにしなやかなものであれば、例え外れたとしても、関節内で悪さをしないだろうと考えています。

変形性関節症は部分損傷から徐々に骨がむき出しになるような状態になりますが、このような部分損傷と全損欠損が混在するものです。骨にまで達する損傷はある程度の大きさまでは、変性した軟骨ではありますが治ります。私共もミニブタを使った実験で、はじめは縫い合わせていましたが、置くだけでこのように血豆状態にすれば治ることがわかりました。

いろいろな治し方がありますが、私共も滑膜細胞との併用等を検討しましたが、細胞シートできちんと治るのであれば細胞シートで硝子軟骨を作っていこうというアプローチにしています。部分損傷のような、軟骨内に留まる損傷は治癒しません。それはマトリックスが邪魔をしてしまい、修復細胞が十分に修復部分に集まらないということが原因です。関節鏡で見るとこのように毛羽立った状態に見えるものは、マトリックスが抜けてきて変

性は進んでいます。

私共は部分損傷をウサギで実験をしました。あらかじめ骨に穴をあけて糸を通してその間で切片を作り評価をしました。細胞シートを置いておくと元通りとはいきませんが変性抑制効果がみられました。雑誌の表紙にもなりました。

細胞シートの作用機序として注目しているのは、圧倒的に多くのグロースファクターを出すことがあります。特に TGF- β が多く放出されています。細胞シートの細胞をバラバラにして入れた場合に比較して約 30 倍から 50 倍の高濃度で TGF- β が出てきます。このようにトロフィックエフェクトがあるのではないかと思います。細胞シートの液性因子は TGF- β に限らず PGE2 など様々な液性因子が供給されることと、細胞シートそのものが動員されるバリア機能として働くなどいろいろな作用機序があり、全損欠損と部分損傷の両方に効果があるということがわかってきました。

とはいえ、このような細胞シートを作るときに種差があり、ウサギでは厚い細胞シートができるのですがヒトではそのようになりません。特に市販されている軟骨では細胞シートを作るとは困難ですが、私共は温度応答性のインサートを使用して滑膜細胞との共培養で関節内を疑似することで均一な細胞シートを短期間で作製することが可能となりました。これをもって臨床研究をしているところです。細胞シートという形でありながら軟骨のフェノタイプは維持され、さらに接着因子を持っています。

また CPC におけるコールドランを行って、品質の評価まで行なったうえで自己細胞シートによる臨床研究について、大臣から「実施して差し支えない」と承認していただき、現在 8 例実施しています。

岡野先生が開発された温度応答性培養皿を使って細胞シートを 3 層に積層化して行うというのですが、イソプロピルアクリルアミドポリマーの作用により 37 で疎水性、20 で親水性となり、このようにひげが伸びたり縮んだりすることを利用して、ひげが縮んだ状態で細胞を培養してコンフルエントに達したところで、温度を下げて細胞をシート状に回収するというものです。この操作は非侵襲的に行うことができるので、細胞やマトリックスに一切のダメージを与えることなく回収することが可能となります。

報道ステーションで取り上げられました。作用機序の説明がございますのでご覧ください。(報道ステーション特集 2013 年 7 月の VTR のうち 3 分程度の紹介)

現在の自己細胞シートの臨床研究は、20 歳から 60 才以下で損傷が 4.2 平方 cm 以下で限定して実施しています。エンドポイントとしては、有害事象の頻度をみますが、術後 1 年まで、臨床成績、MRI、超音響法、最後にはバイオプシーまで行なって、評価して終了となります。超音響法は防衛医大の石原先生との共同研究で、2007 年から東海大でも手術時の診断に行っているものです。軟骨の厚さと粘弾性特性を定量的に見ることができます。プローブを変えることで Type I, Type II コラーゲンの組織性状の差の検出も可能です。

今はだいたい 5 センチメートルくらいの傷で直接移植をしています。大体 3 か月経つと MRI でも修復が分かるくらいになります。術後 1 年のバイオプシーの時には、盛り上がり

た軟骨ができており、超音響法での測定やバイオブシーをして組織化学的に評価をして白黒をつけています。約 95%以上が硝子軟骨で修復しています。

(術後 1 年経過した患者さんの紹介する VTR の紹介)

移植した方は 8 例になりましたが、みなさん術後良好ですのうれしく思います。有害事象も大きなものもなく経過しています。

しかし、エントリー 11 例に対して、移植できたのは 8 例となっています。これは基準の 4.2 平方センチメートルは術前の MRI では正確にわからない為、そのことで 2 例外れています。もう 1 例はシート状に剥離できなかったということがありました。この技術及び手技に自信を持っていますが、100%ではないなと感じています。移植できた 8 例の患者さんは良好に推移しています。患者さんの立脚型の臨床スコアですが、おおよそ 1 か月から良くなり、その後、だんだんと良くなっていくことが分かっています。

繰り返しになりますが、私共は術後 1 年に超音響法での測定や、バイオブシーをすることをエンドポイントとしております。軟骨は白っぽいので癒痕であっても硝子軟骨であっても、MRI の現在の技術では質的なものは評価しきれないので、軟骨の粘弾性や組織を用いて評価しています。

自己細胞シートでの治療ではすぐに治療をすることができません。健常部の範囲、軟骨を採取するために複数回の手術となります。また、良い細胞を得られるとは限りませんし、ご高齢の患者さまから採取した細胞は遺伝子異常を起こしやすいということもわかっています。2 月 20 日に同種軟骨細胞シートによる臨床研究の学内の倫理委員会の承認を得ました。これをもとに先週、厚労省の専門官の方へご相談をしているところです。これは、多指症の細胞を使います。細胞ソースをどのようにするか検討した際に、谷室長より下二つ(骨バンク、市販の軟骨チップ)はトレースサビリティの問題があるとご指摘を頂いたこともあり、同施設内で入手可能な多指症なら良いのではないかと思いました。国立成育医療研究センターは日本で一番多指症の手術をしていますので、細胞を頂いて安全性の評価を現在 36 例位行っています。細胞の増殖能は、大体 2 週間で今までの細胞シート 700 枚くらい、3 週間では 8000 枚程度作ることが可能な計算になります。造腫瘍性否定試験を NOG マウスで実施して腫瘍化しないということを確認し、アレイ CGH と G バンドで異常が認められないということを確認しています。この際に人工関節の患者さまから頂いた細胞では 7 番染色体や性染色体の異常が高頻度でみつきり、こちらは論文でも報告されていて OA に起因する後天的に獲得された異常であることが分かっているものです。

移植した細胞シートは、関節内に 21 か月以上も追跡すると残存して他に転移しないことを確認しています。国立医薬品食品衛生研究所の加藤先生との共同研究では、軟骨細胞シートは免疫を惹起しないかということを確認して頂いています。先ほどお示した、同種の臨床研究はシート状態で保存ということはまだ通ることができていませんが、細胞の状態を保存して、必要に応じて起こしてシートを作製するという内容で倫理委員会を通しています。将来的には、明治大学の長嶋教授との共同研究で検討しているシート状でパッケ

ージして保存したものを移植することを考えています。セルシードの方、DNA チップ研究所の方と、治具の開発あるいは軟骨細胞シートの評価を考えています。

私共のターゲットは変形性膝関節症としていますが、例えば O 脚の患者様に細胞だけを移植しても治るわけではありません。細胞だけを移植しても同じ箇所が傷んでしまいます。このような患者様には O 脚を矯正し、前十字靭帯が切れていたら前十字靭帯を再建し、アライメント、不安定性を治して、最後に細胞を移植して治すという方法をとっています。何も無いところ、例えば砂漠にオアシスを作り、生着しやすい薬等を併用しながら環境を整えよりよい再生医療の実現を目指していきたいと考えております。

昨年からの研究に関する HP を立ち上げています。アクセス数は 4 万件を超えています。患者様からの質問も受けています。

< 質疑応答 >

嶽北：自家のものを他家に変えて臨床研究を行う予定ですか。

佐藤：そうですね、自家のものを他家に変えて臨床研究を行う予定です。しかし、自己のときは一枚で覆えるようにするように面積に規定が設けられましたが、他家ですと何枚でも作製できるので大きさの規定を排除して学内の倫理委員会をクリアしています。あとの評価項目等は一切同一になっております。

嶽北：ヒト幹臨床研究はやらなければならないのですが。話を伺っていると治験をやればいいのに、と思いますが。

佐藤：おっしゃる通りですね。ご存知の通り次の法律では同種はすべて 1 種になってしまいます。iPS、ES と同様に同種すべて 1 種になってしまいます。ほとんどのヒト幹は第 2 種なのです。しかも軟骨なのに同種だから第 1 種なのです。解せないことです。この前ご相談させていただきましたけれども、今回の新法には違和感を感じているところではございます。

嶽北：2 つ前のスライドですが PMDA の相談は 26 年度ですか。

佐藤：この時は自己で先進医療を相談にいこうというものです。

嶽北：臨床研究をして先進といくと、お金がもったいなく感じますね。これだけ治験に持っていきそうなものは治験に進めた方が良いのではないのでしょうか。

佐藤：また改めてご相談させてください。

(2) 「多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞に及ぼす影響 (その 2)」

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の中で多指症由来、先ほど佐藤先生のお話にも出てきましたが、同種を考えた時の細胞ソースとして多指症由来の軟骨細胞を想定していることから、多指症由来軟骨細胞が同種 T 細胞に及ぼす影響について検討いたしましたのでご報告いたします。

自己の軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生効果というのは、佐藤研究室での研究より明らかになってきていますが、この技術の将来的な応用を考えると、同種移植によるものでなければ難しいと考えられます。

同種移植の利点ですが、あらかじめ細胞シートを作製することが可能となり、患者さんの負担が軽減される、より計画的な移植が行えるということ等が考えられます。また同一ドナーからの細胞であれば、あらかじめ品質が分かるという利点があります。

多指症由来の軟骨細胞は、優れた増殖能をもち、手術時廃棄組織であることから、患者様に余計な負担をかけないという大きなメリットがあります。ただし、同種細胞移植ということで、拒絶反応を引き起こす可能性があるということから、本研究では多指症軟骨細胞が免疫応答に及ぼす影響を *in vitro* で検討することを目的として検討を始めています。

宿主の免疫反応を惹起しないことが示せれば、同種由来の細胞シートの可能性が開けることになると考えています。今回用いた細胞ですが、多指症由来の軟骨細胞は、国立成育医療研究センター研究所から譲渡された組織から単離された細胞を用いています。ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞(CD4⁺TCs)および正常ヒト樹状細胞は、ロンザ社より市販されているものを用いています。細胞増殖測定及び TGF-β1 測定はスライドに示したものをを用いています。

まず初めに、同種軟骨細胞が T 細胞におよぼす影響をみました。つまり免疫原性があるかどうか確認している実験系です。多指症由来の軟骨細胞と同種の T 細胞を混合培養します。混合培養のコントロールとして、免疫原性が高いと知られている樹状細胞と同種の T 細胞の混合培養をアロ反応の陽性対照として用いています。以下 MLR と略します。たとえば、多指症由来の軟骨細胞が樹状細胞と同様に免疫原性が高ければ、T 細胞が活性化してどんどん増えていくと予想されます。それに対して、もし同種の T 細胞の活性化を惹起しなければ、ほとんど T 細胞の増殖は見られなくなると考えられます。実際の結果では、MLR では同種の T 細胞の活性化がかなり高くみられましたが、多指症由来の軟骨細胞と共培養したものでは、殆ど T 細胞の活性化が起きていませんでした。このことから、多指症由来の軟骨細胞は、免疫原性が非常に低いと示唆されました。

軟骨細胞は間葉系幹細胞、以下 MSC と略しますが、MSC は T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞を含む種々の免疫細胞の機能（活性化や分化など）を抑制するとの報告があります。もし軟骨細胞が同様の性質を有していれば、損傷部位の炎症反応を抑制できる可能性があります。そこで、多指症由来軟骨細胞が活性化 T 細胞に与える影響を検討しました。軟骨細胞が由来する間葉系幹細胞は免疫原性が低いだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することが知られていることから、軟骨細胞ではどうか検討しました。アロ反応で活性化され活発に増殖するような状況になっている同種 T 細胞の活性化を、多指症由来軟骨細胞を共培養することで、おさえることができればスライドのグラフのようになります。細胞増殖は DNA 合成の観点から評価します。もし軟骨細胞が同種 T 細胞を活性化するならば、グラフの I のように取り込み量が高くなるのに対して、活性化を起こさな

い場合はグラフの II のように取り込み量が少なくなります。実際の結果は、MLR の反応だけを 100%とした場合、多指症由来の細胞を共培養すると 3 割弱まで T 細胞の増殖を抑制するということがわかりました。

先行実験で、MLR の反応に、トランスウェルを用いて物理的に離れた状況で成人の軟骨細胞シートを共培養した際の影響を確認しました。その結果、抑制効果は減弱しますが、MLR の反応を抑制していることがわかりました。このことより、抑制効果に何らかの液性因子の関与が考えられました。TGF- β 1 は軟骨細胞の分化を促進するサイトカインであります。一方で免疫担当細胞の増殖と作用を抑制する働きがあるという報告があります。MSC においても TGF- β 1 が、その免疫調節効果に関与する液性因子の一つである報告があることから、多指症由来軟骨細胞の培養上清中の TGF- β 1 を測定しました。その結果、個体差はありますが、多指症由来軟骨細胞は TGF- β 1 を高発現していることがわかりました。このことから TGF- β 1 が同種免疫調節効果に関与している可能性が示唆されました。

ここからは、プレリミナリーなデータですが、TGF- β 1 の中和抗体により細胞上清中の TGF- β 1 の生理活性を落とすことで、T 細胞の増殖抑制効果が解除されるかどうか検討しました。結果は、TGF- β 1 中和抗体により、培養液中の TGF- β 1 の生理活性は低下しているが、今回の様に接触培養条件下においては、多指症軟骨細胞による T 細胞の増殖抑制効果には影響がでていないようでした。

今後の予定ですが、シート化した多指症患者由来軟骨細胞が同様の性質を維持しているかの検討を行います。また、非接触培養条件下で、T 細胞増殖抑制効果への TGF- β 1 の関与の再検討を行いつつ、他の因子の関与について検討したいと考えています。

以上、まとめますと、多指症由来軟骨細胞は免疫応答を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することがわかりました。これらのことより、関節軟骨損傷の治療に自己だけでなく、同種である多指症由来軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆されました。

< 質疑応答 >

阿久津：見逃したのかもしれませんが、多指症の細胞は TGF- β が発現していたのか確認させてください。

加藤：発現しています。多指症由来軟骨細胞でもかなり高く発現しています。

阿久津：一度落ちた増殖活性がほかの細胞や条件で戻るといえるのでしょうか。

加藤：間葉系幹細胞との共培養により増殖活性が落とされた T 細胞を回収して、新たに刺激を加えると再増殖するという報告はあります。

光島：多指症患者由来軟骨細胞の培養条件はどの条件を用いているのか、どの時点でのものを用いていますか。

加藤：東海大でシート化して移植すると考えられている、P2 の軟骨細胞を用いています。

光島：パッセージの影響はどのように考えていますか。

加藤：非常に興味があるところですが、まだ早い段階や継代を進めた時のものは実施して

いません。ただ、軟骨細胞は継代を重ねると軟骨細胞の性質を失っていくといわれていますので、今のところは臨床研究で用いるパッセージを揃えています。

光島：液性因子は多種類を同時に網羅的に調べるのは出来るのか。

加藤：お金をかければできるので検討したいと思います。

佐藤：やりましょう。

(3) ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：細胞生存性向上への条件検討 (その2)

研究分担者 長嶋比呂志 (明治大学)

私共は軟骨細胞シートの凍結保存を担当しています。凍結保存することの意義は最終的にはアログラフで随時移植できるストックをすることを目標としています。

本来我々の研究室は受精卵を凍結保存する技術に取り組んでいます。なるべく容量の少ない保存液で保存する主流となっているコンセプトです (ミニマムボリュームクーリング)。細胞シートの保存に成功した鍵となっています。もう一つカルボキシル化ポリリジンによりガラス化を安定化させたことが鍵となりました。カルボキシル化ポリリジンがあることでクラックの発生が抑制でき細胞シートの保存が可能となりました。これまでの成果は特許出願や論文で報告しています。

11 月にも途中経過をご報告しましたが、凍結保存は細胞の生存性が低下することが凍結保存の宿命ですが、なるべく生存性の低下を防ぎたいということがあらゆる凍結保存研究の究極目標となっています。また、ウサギの細胞シートに取り組んでいますが、経験としてウサギやブタ、ヒトを経験しましたが、細胞シートの構造が弱いものの方が凍結保存としては難しく、また基本的には3層を検討していましたが、より脆弱なシート、2層や1層を想定して凍結保存できるのか検討しています。

凍結保存の研究の常識となっていますが、温度を下降させるフェーズと温度を上昇させるフェーズがありますが、実は細胞の融解のところが重要だとわかっています。従来、細胞の凍結方法は緩慢法と呼ばれるものですが、ガラス化法も融解方法が非常にクリティカルになるため、融解方法の検討を行っています。また、昨年から実施していますが、最終的には医療応用を考えた時にパッケージすることを想定して、今からパッケージを検討しています。

例数を重ねていくつか結論がでました。薄層細胞シートは2層と1層をそれぞれ6枚ほど検討したところ、1層でも破れることはなく、生存性もほとんど低下しませんでした。これにより非常に構造上脆いものも現在の方法で可能となっています。これが一つの結論となっています。

今までの融解方法は加温版の上で融解しています。溶液の中につけると一番早く融解できますが、それをすると破れてしまうことが多く、安全面を考えて加温版を用いています。

温度を急速に上げることやゆっくり上げること、また上からもはさむことをなどを検討しました。加温版の温度を若干上げると、有意差は出ませんが、悪くありませんでした。45度というのは細胞にとってはハームフルですが、一瞬ですので、加温版の温度を45度まで上げて問題はありませんでした。さらに上から温かくしたパックで挟み込む形で融解する方法を比較したところ、有意差は見られなかったが生存性が若干上がりました。このように良さそうな条件をスタンダードにしました。以降、我々の実験は加温版を45度まであげ、上からも挟み込む形を採用しました。細胞シートにクラックが入ることはありませんでした。これらの実験は2層を用いています。

パッケージは熱伝導率の素材ということで、アルミ、ラップを検討しました。実際に試すとアルミホイルもラップも意外と良く、破れることもありませんでした。生の状態で86%ですが、アルミでは83%、ラップでは82%でした。ハンドリングを考えラップが好ましいと考えられました。シートの保存を考えると保管が問題となり、液体窒素の気相での保管が好ましいと考えました。完全にシールするもの考えると、工業的になってしまいます。研究段階では完全にシールするのは難しいので、今後の研究の進め方によりますが、検討が必要です。

気相での保存、従来の液体窒素に浸けて保存する方法について確認しました。液体窒素の蒸気でガラス化した後に液体窒素に浸ける方法を試すと、ラップは破れてしまったものが1枚だけありました。しかし、生存性は低下しませんでした。アルミは完全に封をすることが難しいが、シートにヒビが入ることもアルミが破れてしまうこともなかった為、一番有望であると考えられました。アルミをパッケージ素材に選んで、ガラス化は最適化したものを用いて、保管は液体窒素の蒸気又は液体窒素に浸ける形で、今後の臨床研究に合ったものを選ぶこととなります。液体窒素の蒸気で保管するのは、シートをうまく収められるような保管箱が必要となります。しかし、年度内の検討は困難でした。来年度の班会議では見本をお見せできると思います。

まとめると従来開発したガラス化法で、より脆弱な薄層細胞シートへのガラス化の運用は可能でした。佐藤先生の報告によると多指症の軟骨細胞シートは非常に脆弱にみえるので、そちらにも適応可能であると思われます。パッケージの方法は、アルミでパックされたレトルト食品のようなものもあるので、実際に医療に用いる素材として使えろと考えています。保存の方法も液体窒素の蒸気でも液に浸けるものでも適応可能であるということがわかりました。

< 質疑応答 >

坂井：以前質問させて頂いたかもしれませんが、細胞生存率はどのように測定しているのか。

長嶋：単純にコラゲナーゼで細胞をばらしまして、トリパンブルーで細胞の生き死にを測定しています。

坂井：シートの細胞はまんべんなく全体的にダメージをうけているのか、部分的なのかわかりますか。

長嶋：おそらく、論文の報告ではコラーゲンをみましたが、どこかダメージを受けたスポットのようなものは見られませんでした。構成する細胞数が多いので、全体的にたとえば5%などダメージを受けているのではないかと考えられます。

佐藤：本件に関しては、今厚労省の事業に関しては企業の方と共同で研究開発を進めていくことを言われています。今回の継続申請では、セルシード、DNA チップ研究所そして、大日本印刷の方がこの事業に協力してくれる予定で、東海大と契約を結びました。なにが得意かと申しますと、パッケージが得意ですので、ぜひ長嶋先生と交えてディスカッションしたいと考えております。

阿久津：凍結融解した時の評価方法のマーカーは考えられていますか。画像での評価も大日本印刷は得意としているのでそのように考えた方がいいのではないのでしょうか。

長嶋：そうですね、先ほどの報告もありましたし、考えたいと思います。はじめはこんなに薄いシートは保存が難しいだろうと考えていましたが、実際にできていますので、今後実用化を考えると生化学的なことを見たいと考えてみたいと思います。

嶽北：今まではこれは研究レベルでの話だと思って聞いていましたが、事業化されるということですので、大日本印刷が参加するということは、ゆくゆくは医薬品ですとか製品レベルで考えられるのだらうと思います。その上の話として、再生医療に限らず、品質管理の観点から、液体窒素での保存であれば、液相を推奨していませんでした。液相での保存はコンタミネーションを起こすといわれているので、再生医療の分野で保管については気相での保存で考えてほしいと思っています。佐藤先生の出荷する前に保管し、流通は保管した状態となると考えられますね。薬事で考えるとベットサイドまでもっていくのではなく物の流通の観点から、物がどのような形で流通されるかが重要となると思います。佐藤先生の研究では溶かした状態でベッドまでもっていくのだと思いますが、大日本印刷は保管した状態でベッドまでもっていく方向へ考えられるのかなと思います。そのようになれば、薬事では一時包装として、容器の完全性、漏れないか、中のものが溶け出さないかという観点が必要になると思います。それを含めて素材を考えるべきだと思います。

佐藤：貴重なご意見ありがとうございます。実は気相での保存は、東海大にあった臍帯血バンクから気相で保存するタンクを譲りうける予定なのでそれで進めたいと思います。

(4)「同種軟骨再生医療のための安全性評価」

研究協力者 岡田恵里(東海大学)

同種軟骨再生医療のための安全性評価についてご報告いたします。私どもは、ヒト幹細胞指針に則り、温度応答性培養皿を用いた積層化軟骨細胞シートによる自己軟骨細胞シート移植を実施し、現在までのところ重篤な有害事象は認めず、良好な術後経過をたどっています。自己細胞では関節軟骨の健常部の一部を犠牲にし、シート作製枚数は採取量など

により制限があり、移植の可能性は実際にシートを作製しないと判断できません。また、自己での移植手術は一人一回程度になります。同種細胞として、手術時廃棄組織から多指症軟骨を採取した場合は、シートの作製は必要数可能であり、移植の可能性もバリデーション試験として、シートの試作時に判断できます。また増殖性が良いので不特定の方に複数枚移植することができます。将来の普及を目指し、同種軟骨細胞シート移植を考え、細胞ソースとして多指症組織由来の細胞を検討しました。

評価項目として、自己細胞の際と同様に 3 試験行いました。G バンド分染法では、細胞が保有している染色体異常の有無の確認と、細胞の培養による影響を確認しました。アレイ CGH 解析では、細胞の培養による影響を確認しました。また造腫瘍性否定試験では、腫瘍形成の有無を確認しました。これらの評価方法を通じて同種細胞は安全であることを確認しました。

G バンド分染法は、継代数 P1、P6、P12 継代の細胞を用い、分裂中期に 20 細胞をバンドレベルが 300 ~ 400bp で解析し、異数性の検出や、転座、欠失等の染色体異常を検出しました。また判定に際しては、国際核型記載規約の判断によって判断しました。構造変化が検出された細胞もありましたが、普遍的にみられる変異や継代すると見られなくなる変異であり、生体内で淘汰される変異であると考えられました。また核型記載国際規約ではすべて正常とみなされるものでした。したがって、細胞ソースの染色体異常は認められず、また、細胞培養中の変化においても染色体異常は認められませんでした。

アレイ CGH 解析では継代数 P2 をリファレンスとして、P4、P6、P12 の細胞を用いて解析しました。また、色素を入れ替えるダイスワップでも確認を行い、微細ゲノム異常の探索、ゲノムコピー数異常など網羅的な解析を行いました。結果として、多指症軟骨細胞は、各サンプルの P4、P6、P12 すべてにおいて、基線からのずれは正常とみなされる範囲でした。Aberration Detection Method-2 Threshold 10 では変異の箇所が認められませんでした。Aberration Detection Method-2 Threshold 6、7、8、9 のアルゴリズムでは、変異の箇所が、1 ~ 2 箇所と認められるものもありましたが、色素入れ替え実験ダイスアップでは、変異の箇所が 0 箇所となり再現性のみられないものでした。したがって、染色体のコピー数の異常は認められませんでした。

造腫瘍性否定試験では、重度免疫不全マウスにドナー細胞を 3 種類用いて P2 の細胞を 1×10^7 の 7 乗個を皮下移植しました。剖検は、3 週、12 週、24 週にコントロールと移植マウス 6 匹を供しました。その際、マウスの外観観察と剖検時の観察、組織の観察等を行いました。外観や臓器、移植部の観察は、コントロールと比較し、異常は認められませんでした。また 3 週では、軟骨を呈していますが、12 週ではその色は薄くなり、24 週ではほとんど見られないサンプルもありました。これは組織によって吸収されているのかと考えられました。組織染色においても異常は認められませんでした。体重の変化をみますと、コントロールとほぼずれはなく同じように増加しています。また、移植した細胞の縮小がみられた 12 週からはほぼ同じ推移となりました。

これらの結果より、G バンド分染法では染色体異常はないこと、及び細胞の培養中の影響による染色体異常は認められないことが確認されました。アレイ CGH 解析においても細胞培養中の影響は認められませんでした。造腫瘍性否定試験では腫瘍形成は認められませんでした。以上の結果より、多指症の細胞の安全性は確認されました。

また、臨床試験では、より安全性を担保するために、基準では陰性とみなされる変異であっても、擬陽性とみなし、G バンド分染法またはアレイ CGH で 1 つでも擬陽性と思われる細胞は用いないことにしました。

今年度は同種軟骨細胞シートの安全性評価を行いました。来年度は、同種軟骨細胞シートの品質評価に移りたいと思います。

< 質疑応答 >

光島：前回の報告では国立成育医療研究センター研究所の細胞を 12 種検定されて、擬陽性を除くと 4 種残るという結果でしたが、今回の発表と同様ですか。

岡田：同じです。

光島：擬陽性が 8 個か 7 個あったということですね。安全の為に擬陽性は使わずセレクトしたという結論で変わりないですね。

岡田：結論は変わりません。

佐藤：だいたい 30% が全く何もない状態で、アレイ CGH でも G バンドでも引っかからない状態です。

光島：実際それからシート作製に取り掛かっているのですか。

佐藤：まだ品質チェックですね、学内の倫理委員会は通ったので、今回のヒト幹では学内の多指症サンプルを使って移植するので、国立成育医療研究センター研究所からの輸送等の懸念なく使えるサンプルです。

光島：今の発表は国立成育医療研究センター研究所のサンプルのものでですね。東海大のものも同じように 33% でしょうか。

佐藤：それはこれから検討していきます。同意書等も全く違うものなので。

(5) 「低酸素環境で作製した軟骨細胞シートの特性評価」

研究分担者 小久保舞美 (東海大学)

現在までに温度応答性培養皿により軟骨細胞シートを作製し、共培養を用いて臨床研究を行っています。軟骨細胞を使用する課題と目的になりますが、採取する細胞数が少ないということ、また増殖能が低いということがあります。また個体差が大きくシート作製に影響が大きいという課題があります。より短期間で個体差が少なく細胞シートを作製することを目的としました。現在行っている臨床研究では、滑膜細胞との共培養法を用いることで培養期間を短縮することが可能となりました。

生体内の軟骨の環境は、酸素濃度は表層が 6% 程度、深層になりますと 1% 程度となりま

す。実験では酸素濃度 5%と 2%にしました。細胞は ACL (前十字靭帯再建術の際に採取) 軟骨と滑膜細胞を用いて共培養を行いました。臨床の方で行っている 20%と低酸素濃度 5%で比較しました。評価軟骨の増殖能について MTT アッセイを用いて評価しました。また ECM の蓄積量について DMMP 法を用いて評価しました。またリアルタイム PCR 法を用いてコラーゲンタイプ 2 及びコラーゲンタイプ 1 の評価を行いました。MTT の結果では、すべての継代数 P0、P1、P2 におきまして 5%と 20%の差はありませんでした。PG 量とコラーゲンタイプ 2 及びコラーゲンタイプ 1 についても有意な差はありませんでした。

そこで次に、より深層に近い 2%の酸素濃度で検討しました。結果ですが、5%対 20%では差が見られなかったのですが、細胞増殖能が P0 初代培養の細胞では、培養 7 日目から有意な差が見られました。P0、P1、P2 でも有意な差をもって増殖しました。また基質産生量についても 2%は 20%に対して有意な差をもって細胞外基質の増殖が見られました。リアルタイム PCR 法の結果では 2%、5%も 20%に対してアナボリックなファクター (COL2,AGC1,SOX9,TIMP1,ITG 10,COL27,FN1) で高い発現が見られました。特に COL2,AGC1,SOX9, ITG 10 の高い発現が確認されました。カタボリックなファクター (COL1,MMP3,MMP13,ADAMTS5) はすべて低値に抑えることが可能でした。

考察になりますが、現在の方法で剥離を行う期間になるのですが、現在臨床研究を行っている 20%の環境ですと平均 14.7 日掛かりますが、2%にすると 11.8 日とより短期間で短縮することが可能となりました。これによって入院期間の短縮であったり退院するのが早くなったりといった QOL の向上が考えられます。低酸素環境に置くだけで MSC が軟骨分化に分化能を有するというので、2%の環境に置き PCR の結果で有意な結果を得たことから、軟骨特異的遺伝子の向上や、基質産生量を向上させる低酸素環境が有用であるということが確認できました。

結語になります。軟骨細胞の培養環境を生体環境に近づけることによって、より個体差の大きいヒト細胞でも、より短期間で細胞外基質を多く含む軟骨細胞シートを作製することが可能となりました。

< 質疑応答 >

光島：増殖性が良くなると細胞シートの作製期間が早まるのですか。

小久保：細胞シートの剥離が早まるということです。

坂井：通常の方法と低酸素では培地は同じですか。

小久保：培地は全く同じです。低酸素環境にただけです。

阿久津：共培養している滑膜が良くなっているのか、それともそのものが良くなっているのですか。

小久保：滑膜はまだ評価していません。

佐藤：もちろんその可能性があるのですが、いまご報告した結果はすべて軟骨細胞を評価したものです。みると面白いかと思います。

小久保：少しだけ検討したデータがあるのですが、若干上がるという結果が確認されています。nが少ないのですが。

長嶋：低酸素の濃度はいろいろ検討されたのですか。

小久保：はじめは論文を参考にして5%で実施しましたが、差がみられなかったので2%としました。低酸素環境にするインキュベーターがほかの研究室と共同にしておりましたので今のところ実施しているのは2%と5%のみとなっております。

長嶋：増殖期のところとコンフルエントになっていくところと2回環境がガラッとかわりますよね。増殖期のところは酸素を要求するのでそこは普通でよいかもしれないけれども、コンフルエントになって細胞シートになって重ねていくところについては、細胞はほとんど増えていないはずだから、酸素があるとただ単に酸化ストレスを受けるだけなのでそこで低酸素にするのが良いのではないかと考えられますが、そのような感触はありますか。

小久保：そちらも考えたのですが、20%より低酸素の方が増殖が良かったので、やはり軟骨には低酸素の方が良いのではないかと思います。

長嶋：受精卵の培養は低酸素が当たり前で、特に培養した受精卵を凍結保存しようと思うと、低酸素での培養が必須条件なのです。だから軟骨細胞は低酸素が向いていないと思っていたのですが、低酸素で今後進むのであれば、低酸素で培養して凍結という方向に持っていくと生存性が上がるかもしれませんね。検討してみます。

3. 総合討論

光島：全体のロードマップに関わる内容になりますが、前回の先生の発表では、8例目の移植が昨年11月で1年の観察期間があり、うまくいけばその時点で先進医療の申請を行うということでしたよね。今年の秋冬にかけて実施するのは自己細胞シートですか。

佐藤：8例で充分かどうかというのは、私共では判断出来なのですが、8例の安全性を確認できるのが、11月から12月にかけてですので、そこまでのデータをまとめて先進医療として申請を準備するという一区切りにしようと思っています。と申しますのは、臨床症例10例ということでヒト幹を出しておりますが、ロット購入している血清の有効期限が今年の7月なので、4月に新しい研究費を頂いて臨床研究をまたできることという環境になりますが、その3か月間に新しい患者さまをリクルートできるかにもよります。後ろが決まっているので追加で新しい患者さんを1例か2例行くと、1年フォローアップを待つのかどうかということがありますので、10例まで行くとするとまとめる期間が遅くなってしまいます。8例で充分というのであれば、そこまでのデータをまとめてということになります。

光島：PMDAとの相談はどのようにされていますか。

佐藤：先進医療はPMDAではないので。

花井：研発課が窓口ですね。

光島：8例での評価で良いのか事前相談は可能でしょうかね。

佐藤：もちろん相談するつもりです。BSEが発生していない国から購入した血清の有効期

限がきてしまって、35 グレイの 線まで当てているものなのでそれを入れ替えるということとは、莫大なお金が掛かってしまうので。

光島：9 例目を実施するとなると、途中から培養に使う血清が変わってしまうということになるのですね。わかりました。もう一つ、同種細胞シートについてですが、前回の班会議では、再生医療関連法案の関係で、旧法で通したいとおっしゃっていたと思いますが。それも今年の 11 月までにということでしょうか。

佐藤：それについてですが、2 月 20 日に学内の倫理委員会が通ったところでして、その次の週の火曜日に研発課の原専門官と相談しています。時期的に厳しく非常にタイトであること、現ヒト幹で出すにしても時間的に 6 か月、7 か月どんなに早くても掛かるので、間に合うかどうかということになります。もし新法の下でやるとなると、同種は 1 種に分類されるということになりますので。

光島：それは确实ですか。

佐藤：そのようなのです。iPS や ES と同じように評価されるのは困るなと思います。軟骨で同種だからと 1 種というのは。また嶽北先生に相談もさせて頂いて、医師主導治験というルートがあるのであれば、そちらも考えたいと思います。

光島：基本的なところですが、同種の場合ですと、軟骨組織から細胞を採取するのであって、幹細胞を単離して増やすわけではないのに、1 種ですか。組織から採取した細胞を増やすだけですよね。ちょっと解せないところがありますね。

佐藤：我々は最終分化した細胞にこだわっていて、その方が液性因子等を沢山出しますので、それに組織修復能力に長けていますし、私共は植えた細胞シートが局所に留まって大きくなって生着するとは考えていません。組織修復には最終分化した細胞がいいと思います。細胞シートが 1 か月くらい植えた細胞シートがそこに留まってくればよいと考えています。なかなかどのように持っていくのが良いかというのは様々な人に相談して決めたいと思っています。

光島：シートは 1 か月くらいでなくなりますか。

佐藤：自治医大との共同研究でルシフェラーゼ、蛍の光で発行する細胞シートを作ってそれをラットに植えますと、ほんのわずかですが、21 か月まで発光していました。しかし、殆どの発光はだいたい 4 週間くらいで、急激に発光強度が落ちてきますから、細胞シートがシートとして機能しているのは最初の 4 週程度ではないかと考えています。

花井：共培養した滑膜を一緒に入れていたわけではないのですよね。

佐藤：滑膜はフィーダーとして使っているだけで、軟骨細胞のシートだけを入れています。

嶽北：先ほど申し上げました通り、治験でもっていくべきだと思います。

的場：大変参考になりました。またいろんな方向で我々の技術を生かしていきたいと考えています。

佐藤：是非私共はシートの評価方法を確立したいと考えています。出荷前検査が煩雑ですので。DNA チップ研究所の方と開発したいと考えています。

光島：来年度目標の一つとしては、シートの品質管理基準を確立するのが目標ですね。

佐藤：そうです、来年度中です。

嶽北：相談を承っています。このプロジェクトの予算は年間1億円いかないで、15万円で相談できますので、議事録に残せばよいと思います。

佐藤：是非、薬事戦略相談をさせて頂いて進めて行きたいと思います。

4. 事務連絡

今年度の報告書の作成時期となっています。事務局の方からフォーマットと共に、報告書の提出を3月末でお願いしています。ご協力いただければと思います。よろしくお願いいたします。

5. 閉会

以上