

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 正人

平成27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 26 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これまでの 3 年間の研究期間で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、その前身として先端医療開発特区「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。自己細胞を用いた「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」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)によりヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、8 症例に施行され、平成 26 年 12 月に臨床研究を終了しました。今後は、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。同種細胞を用いた「同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」が厚生労働大臣通知(厚生労働省発医政 0806 第 9 号平成 26 年 8 月 6 日)により、ヒト幹細胞臨床研究の実施が認められ、臨床研究が開始されました。現在移植に適した細胞の選定作業中です。企業治験の可能性を検討しながら、First in human の臨床研究で安全性評価を行い、所定の症例数を経て治療効果を確認いたします。

本研究成果が、従来の再生医療の適応である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27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26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総括 三谷玄弥 高垣智紀 石原美弥 谷良樹 横山宗昂 小林美由希 小林広幸 三上礼子	-----	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．多指症軟骨由来細胞シートの作製 岡田恵里 豊田恵利子 白砂早織 渡部綾子 阿久津英憲 梅澤明弘 小久保舞美	-----	23
---	-------	----

3．多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析 豊田恵利子 岡田恵里 白砂早織 渡部綾子 河毛知子 高野りや 中村嘉彦	-----	29
--	-------	----

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	-----	35
5 . 軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 加藤玲子 岡田恵里	-----	43
. 研究成果の刊行（平成 26 年度）に関する一覧表	-----	53
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	59
. 班会議 - 議事録・発表資料 -	-----	111

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 再生医療セン ター 生殖医療研究部・部 長	産科婦人科学 生殖発生学 幹細胞学	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

研究班の構成

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	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
	白砂 早織	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
	中村 嘉彦	東海大学医学部付属病院 中央診療部セルプロセッ シング室・室長補佐	軟骨再生医療	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・副所長	病理学 再生医療 分子生物学	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・ 研究員	発生工学	同種細胞の保存法に関 する研究、大型動物実験
小久保舞美	東京女子医科大学・先端 生命医科学研究所・博士 研究員	再生医療 組織工学	細胞処理と安全性評価 に関する研究	

研究班の構成

	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
	片山 勝見	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
	菊地鉄太郎	株式会社セルシード・開発部門・主任研究員	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
	河毛 知子	株式会社セルシード・知的財産部	細胞培養	細胞処理と安全性評価に関する研究
	高野 りや	株式会社セルシード・開発部門・主任研究員	細胞培養	細胞処理と安全性評価に関する研究
	佐藤千香子	株式会社セルシード・開発部門・研究員	細胞培養	細胞処理と安全性評価に関する研究
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26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。

本研究事業で実施した自己細胞を用いた「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」は、平成23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、総症例数11症例中8症例に軟骨細胞シート移植を施行し、平成26年12月12日に最終症例の移植後1年の経過観察を終えて臨床研究を終了した。移植術後は、全例が順調に回復し臨床研究中の重篤な有害事象は生じていない。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おり、今後は先進医療としての実施を目指している。また、同種細胞を用いた「同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」が平成26年8月6日に厚生労働大臣の意見書の発出をもって承認され、臨床研究が開始された。現在移植に適した細胞の選定作業を行っている。企業治験の可能性を検討しながら、First in humanの臨床研究で安全性評価を行い、所定の症例数を経て治療効果を確認していく。

【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 再生医療センター 生殖医療研究部・部長

長嶋比呂志：明治大学農学部生命学科発
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・助教

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

白砂早織：同・研究員
渡部綾子：同・研究員
中村嘉彦：東海大学医学部附属病院中央診療部・セルプロセッシング室・室長補佐
梅澤明弘：国立成育医療研究センター研究所・副所長
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学科発生工学研究室・研究員
小久保舞美：東京女子医科大学先端生命医科学研究所・博士研究員
的場亮：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
片山勝見：株式会社セルシード・開発部門長
菊地鉄太郎：株式会社セルシード・開発部・主任研究員
河毛知子：株式会社セルシード・知的財産部
高野りや：株式会社セルシード・開発部・主任研究員
佐藤千香子：株式会社セルシード・開発部・研究員

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10月1日現在3,190万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も25.1%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、米国をはじめとする諸外国では既に4～5万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。

本研究事業は、その前身として先端医療開発特区「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ものである。自己細胞を用いた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、東海大学医学部附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。8症例に移植を施行し、平成26年12月12日に移植術後1年の経過観察を終えて臨床研究を終了し、今後は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ての実施が不可欠である。企業治験の可能性を検討しながら、First in human の臨床研究で安全性評価を行い、所定の症例数を経て治療効果を確認していく。

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) 同種細胞シートによる臨床研究「同種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）
- (2) 「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）
- (3) 「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）
- (4) 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。分担研究報告は下記の課題について報告する。

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

- 研究分担者 三谷 玄弥（東海大学）
研究協力者 高垣 智紀（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 谷 良樹（東海大学）
研究協力者 横山 宗昂（東海大学）
研究協力者 小林 美由希（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）

2. 「多指症軟骨細胞由来細胞シートの作製」に関する研究グループ

- 研究協力者 岡田 恵里（東海大学）
研究協力者 豊田 恵利子（東海大学）
研究協力者 白砂 早織（東海大学）
研究協力者 渡部 綾子（東海大学）
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 小久保 舞美（東海大学）

3. 「多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析」に関する研究グループ

- 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 白砂 早織（東海大学）
研究協力者 渡部 綾子（東海大学）
研究協力者 河毛 知子（セルシード）
研究協力者 高野 りや（セルシード）
研究協力者 中村 嘉彦（東海大学医学部付
属病院）

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. 「軟骨細胞の同種 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）
研究協力者 岡田 恵里（東海大学）

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実施計画について」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総括（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附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。その後、総症例数としては11症例エントリーし、8症例に積層化軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった3症例の内訳は、2例が選択基準に合致せず、1例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全8症例が移植後1年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行して平成26年12月12日に臨床研究を終了した。全8症例において、術後1年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は生じず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療としての実施を目指す。

【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

平成27年度の目標であった同種軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究「同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の実施は、東海大学「医の倫理委員会」の承認を得て、平成26年4月25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8月6日に厚生労働大臣の「ヒト幹細胞臨床研究実施計画について」の意見書の発出（厚生労働省発医政0806第9号）により承認された。

（１）多指症軟骨細胞由来細胞シートの作製（東海大学、国立成育医療研究センター研究所）

我々は、これまでに自己軟骨細胞シートによる関節治療を目指したヒト幹細胞臨床研究を実施し、重篤な有害事象は認められることなく終了した。平成 26 年 8 月に同種軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究の承認を得て、現在実施準備中である。

本研究では、多指症手術で廃棄される軟骨組織から細胞シートの作製及びその特性の解析を実施した。本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取し、細胞を調整・播種・培養し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解し速やかに平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。細胞シートの組織切片を作製し、構造および厚みを解析した。

その結果、多指症軟骨細胞の凍結ストックから重層化した細胞シートの作製が可能であった。

（２）多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析（東海大学、東海大学医学部付属病院中央診療部）

軟骨欠損に対し自己軟骨細胞を用いた細胞シートによる関節軟骨治療を実施し、重篤な有害事象もなく、移植部に硝子軟骨の再生を認めている。さらに、本治療法をレディメイド型の医療として確立するために、多指症手術時廃棄組織から得られる軟骨細胞を同種細胞ソースとして使用することを目指して、これまでに多指症軟骨細胞の安

全性を確認した。本研究では、多指症由来軟骨から作製した細胞シートの特性を解析し、自己膝軟骨細胞による細胞シート治療で移植された細胞シート（成人膝軟骨細胞シート）のデータと比較した。その結果、多指症由来軟骨から作製した細胞シートは、成人膝軟骨細胞シートと同等の細胞数から構成され、生細胞率は 95%以上を示した。また、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31, CD45 陰性、CD81, CD90 陽性を示すことを確認した。

（３）同種細胞シートの保存法に関する研究（明治大学）

これまでに開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の改良として、(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価を行った。その結果、(1) 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、非積層化シートに有効であり、特に非積層化細胞シートでは前処理時間の大幅な短縮が可能であること、(2) アルミフィルムでパッケージングされたガラス化細胞シートは、液体窒素ガス気相中（約-150℃）、液体窒素中（-196℃）いずれの保存状態にも耐え得ること、(3) 市販ガラス化液の使用によって、自家作製液と同等の成績が得られること、(4) 細胞シートの長期安定保存が可能であること、などが示された。

（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）

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、同種軟骨細胞の免疫細胞に対する反応性について検討してきている。昨年度、同種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、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示した。今年度は *in vitro* の接触培養条件下において、PDCCs による活性化T細胞の増殖抑制効果へのPGE2およびTGF- β 1の影響を検討した。その結果、接触培養条件下ではPDCCs が有するT細胞増殖抑制効果には、PGE2やTGF- β 1といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。また、NHACsと共培養されたMLR中のCD4⁺T細胞がどのようなサブセットになっているか検討したところ、IL-2およびTNF- α といったTh1細胞タイプサイトカインは、軟骨細胞と共培養することで有意に減少しており、IL-4やIL-17といったTh2細胞、Th17細胞タイプのサイトカイン量はほとんど産生されていなかった。一方、Treg細胞が産生するIL-10は有意に発現量が増えていた。再現性の確認が必要であるが、軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に関与するTreg細胞が優位になっていることが示唆された。

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23年10月3日に承認された自己細胞シートによるヒト

幹細胞臨床研究が総症例数11症例エントリーし、8症例に軟骨細胞シート移植を施行し、平成26年12月12日に移植術後1年の経過観察を終えて臨床研究を終了したことである。臨床研究中の重篤な有害事象は生じず、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。また、平成27年度の目標であった同種細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究も平成26年8月6日に実施が認められ、臨床研究が開始された。企業治験の可能性を検討しながら、First in humanの臨床研究で安全性評価を行い、所定の症例数を経て治療効果を確認していく。

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) 菊地鉄太郎, 佐藤正人. 再生医療の細胞培養技術と産業展開, 第5編 応用研究ビジネスプラン, 第27章 関節軟骨治療研究. シーエムシー出版, 293-303, 2014.

2. 論文発表

1) Ukai T, Sato M, Yamashita T, Imai Y, Mitani G, Takagaki T, Serigano K, Mochida J. Diffusion tensor imaging can detect the early stages of cartilage damage: a comparison study. BMC Musculoskeletal Disorders 16:35, 2015.

2) Nagai T, Sato M, Kobayashi M, Yokoyama M, Tani Y, Mochida J. Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis. Arthritis Research & Therapy, 16(5), 427 2014.

3) 佐藤正人. 健康のカギは口コモの予防. 望星, 45(12), 24-29, 2014.12.

4) 佐藤正人. セルシートエンジニアリング, 関節軟骨再生. 最新医学, 69(7月増刊号), 144-153, 2014.7.

5) 石原美弥, 佐藤正人. 骨・軟骨イメージング(光音響を用いて). The BONE, 28(2), 105-110, 2014.6

6) 佐藤正人. 細胞シートによる関節治療の再生医療. 日本臨牀, 72(増刊号3), 722-727, 2014.4

3. 学会発表

1) Tani Y, Sato M, Takezawa T, Yokoyama M, Kobayashi M, Toyoda E, Kawake T, Okada E, Mochida J. The effect on articular cartilage repair using collagen vitrigel and chondrocyte sheets. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting, Las Vegas, 2015.3.28-3.31.

2) Maruki H, Sato M, Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Kobayashi M, Kokubo M, Kawake T, Okada E, Mochida J, Kato Y. The effect of using collagen vitrigel containing transforming growth factor beta 1 on articular cartilage repair. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting, Las Vegas, 2015.3.28-3.31.

3) Sato M. 【Keynote lecture】Clinical Application of Chondrocyte Sheet and Future Perspectives. The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization(ACTO), Osaka, 2014.11.9-10.

4) Sato M. Regenerative Medicine & Innovative Therapies. France-Japan Symposium, Tokyo, 2014.11.20.

5) Sato M. Cell sheet technology for biological articular cartilage repair and regeneration. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Annual Conference 2014, TERMIS-AP, Daegu, 2014.9.24-27.

- 6) Sato M. miRNA and chondrocyte function. Orthopaedic Research Society International (OARSI), Paris, France, 2014.4.24-27.
- 7) 谷良樹, 佐藤正人, 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治. ビトリゲルと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 8) 丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治, 加藤義治. 細胞を用いないTGF β 1含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 9) 岡田恵里, 佐藤正人, 豊田恵利子, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田譲治. 多指症軟骨由来細胞シートの作製. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 10) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 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-2. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 11) 豊田恵利子, 佐藤正人, 岡田恵里, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田譲治. 多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 12) 大脇敏之, 小久保舞美, 菊地鉄太郎, 熊代善一, 深井文雄, 佐藤正人, 大和雅之, 岡野光夫. インテグリン活性化によるヒト初代軟骨細胞機能制御. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 13) 小久保舞美, 大脇敏之, 菊地鉄太郎, 河毛知子, 熊代善一, 大和雅之, 佐藤正人, 岡野光夫. 幼若動物由来軟骨細胞シートの特性評価. 第14回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.
- 14) 豊田恵利子, 佐藤正人, 鷓養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田譲治. マイクロアレイを用いた多指症軟骨細胞と成人膝軟骨細胞の特性比較. 第28回日本軟骨代謝学会, 東京, 2015.3.6-7.
- 15) 谷良樹, 佐藤正人, 横山宗昂, 小林美由希, 高橋匠, 岡田恵里, 丸木秀行, 加藤義治, 持田譲治. EP2 アゴニストを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第28回日本軟骨代謝学会, 東京, 2015.3.6-7.
- 16) 佐藤正人. 【特別講演】変形性膝関節症のエビデンスと再生治療の役割. 第38回厚木整形外科医会学術講演会, 厚木, 2015.3.5.
- 17) 佐藤正人. 【シンポジウム】他家軟骨再生医療. 第15回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京, 2015.2.7.
- 18) 佐藤正人. 【基調講演】関節治療を加速する同種細胞シートによる再生医療の実現. 第1回再生医療産業化展, 大阪, 2015.2.4-6.
- 19) 佐藤正人. 【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療. 運動器疾患/骨・関節フォーラム, 東京, 2014.12.6.
- 20) 佐藤正人. 【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療(ヒト幹細胞臨床研究). 第56回神奈川医学会総会・学術大会, 神奈川, 2014.11.22.

- 21) 佐藤正人. 【パネルディスカッション】関節軟骨損傷に対する治療戦略. 第 42 回日本関節病学会, 東京, 2014.11.6-7.
- 22) 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 持田讓治. 初代培養軟骨細胞に ascorbic acid が及ぼす影響. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 23) 横山宗昂, 佐藤正人, 谷良樹, 小林美由希, 小久保舞美, 持田讓治. 血小板活性化血清関節内投与による軟骨治療効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 24) 丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治, 加藤義治. 細胞を用いない TGF- β 1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 25) 谷良樹, 佐藤正人, 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治. Vitrigel と細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 26) 谷良樹, 佐藤正人, 長嶋比呂志, 前原美樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治. 同種移植を目指したガラス化凍結保存細胞シートを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 27) 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, 新見伸吾. 多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9-10.
- 28) 佐藤正人. 【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療 . 運動器疾患/骨・関節フォーラム, さいたま, 2014.9.27.
- 29) 佐藤正人. 【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療 . 運動器疾患/骨・関節フォーラム, 名古屋, 2014.8.30.
- 30) 佐藤正人. 【カレントコンセプト】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 32 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2014.07.24-26.
- 31) 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治. 【シンポジウム】細胞シートを用いた関節軟骨の修復再生. 第 6 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 広島, 2014.07.24-26.
- 32) 佐藤正人. 【講演】メタボより怖い口コモってなに? 運動器疾患の予防と未来医療 . 東海大学医学部付属病院 抗加齢ドック設立 8 周年記念講演会, 東京, 2014.7.5.
- 33) 佐藤正人. 【特別講演】軟骨再生医療の現状と展望. 大和市整形外科医会, 相模原, 2014.6.14.
- 34) 佐藤正人. 【教育研修講演】再生医療で変形性膝関節症は治るのか? 金沢区整形外科医会, 横浜, 2014.6.19.
- 35) 横山宗昂, 佐藤正人, 谷良樹, 高垣智紀, 鶴養拓, 三谷玄弥, 今井裕, 山下智裕, 持田讓治. レーザー誘起光音響法と MRI による変形性膝関節軟骨診断の比較検討. 第 87 回日本整形外科学会学術総会, 神戸, 2014. 5.22-25.
- 36) 鶴養拓, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 芹ヶ野健司. DT imaging による関節軟

骨損傷の検討. 第 87 回日本整形外科学会学術総会, 神戸, 2014. 5.22-25.

37) 佐藤正人. 【シンポジウム】関節軟骨を再生する医療技術の開発状況. 日本組織培養学会第 87 回大会サテライトシンポジウム, 東京, 2014.5.31.

38) 佐藤正人. 【講演】軟骨再生医療の現状と未来. 東海大学医学部附属病院 第 4 回医療連携セミナー, 東京, 2014.4.19.

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」の総括

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	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	小林 美由希	東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
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。その後、総症例数としては11症例エントリーし、8症例に積層化軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった3症例の内訳は、2例が関節鏡にて選択基準に合致せず、1例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全8症例が移植後1年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行して平成26年12月12日に臨床研究を終了した。全8症例において、術後1年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は生じず、軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療としての実施を目指す。

A．研究目的

膝関節軟骨損傷患者を対象として、関節内組織より単離した細胞を、温度応答性培養皿を用いて培養、細胞シートを作製し、軟骨損傷が生じている部位へ移植する。この新規治療法の安全性をプライマリーエンドポイントとして客観的に評価する。また、各種の臨床的評価を実施して、効果に関するデータを収集する。

B．研究方法

1．症例数

総エントリー 11 例

移植実施 8 例

2．対象疾患

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

3．選択基準と除外基準

1) 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。

20歳から60歳までの性別を問わない患者

(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

関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類で Grade 以上のもの

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
ティなどが適応となる患者

2) 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。

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

重大な合併症を有している場合

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
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。

4. 細胞シート作製と移植

1) 組織の採取

対象患者に対して、術前関節鏡検査時と
細胞シート移植時に、それぞれ事前に十分
な時間をかけて患者本人と家族に対して
インフォムドコンセントを行い、合計 2 回
の同意書を取得して本臨床研究を行う。関
節鏡検査時に軟骨損傷程度を確認し、その
際に細胞シート作製のために必要な、滑膜
(1 g 以上) と大腿側関節面非荷重部の軟骨
(1.5 g 以上) を採取する。

2) 細胞シート作製

細胞の単離

採取した軟骨組織と滑膜組織をそれぞれ
細切し、コラゲナーゼによる酵素処理を行
い、細胞を単離、得られた細胞数を確認す
る。

共培養 (単層細胞シート作製)

培地内に温度応答性インサートを介して
軟骨細胞 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ および滑膜細胞
 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ を播種し、軟骨細胞・滑膜細胞
を共培養する。温度 37 ± 1 、炭酸ガス濃度
 $5 \pm 1\%$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ 環境下にて培養する。

積層化細胞シートの作製

共培養で作製した軟骨細胞シートを 3 枚
に積層化する。これを繰り返し、必要数の
積層シートを作製する。

3) 積層化細胞シート移植

作製された積層化軟骨細胞シート (最終
製品) を対象患者に対して計画された予定
手術時に軟骨損傷部へ移植する。軟骨損傷
部の大きさに合わせて、複数枚を移植する
事もある。軟骨損傷部が不良組織で充填さ
れている場合はこれを切除して、病巣部を
郭清した後、損傷部の直上に損傷部が覆わ
れるように細胞シートを移植する。細胞シ
ートを周辺組織へ縫合する操作は行わない。

5. 評価項目と評価基準

1) 主要評価項目

安全性：有害事象の発生の有無

2) 副次評価項目

有効性：術前、術後 1、3、6 ヶ月、1 年における臨床評価項目、単純レントゲン検査、MRI 検査並びに術後 1 年の時点での関節鏡、超音響法、病理検査による評価。

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、3、6 ヶ月、1 年で実施する。

単純レントゲン検査

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、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

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、3、6 ヶ月、1 年で実施して、客観的に評価する。

関節鏡検査

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。

超音響法検査

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、東海大学医学部附属病院で既に臨床応用されている機能評価法である。

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。

C. 結果

[発生した有害事象]

なし

[安全性の評価]

積層化軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、いずれも術後経過は良好であり、移植後 1 年を経過して臨床研究中有害事象は発生しなかった。

[有効性の評価]

軟骨細胞シート移植を施行した 8 症例は、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。

D. 考察

移植後 1 年を経過した全 8 症例に関しては、術後 1 年後の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、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は発生せず、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。

E. 結論

自己細胞を用いた軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究は、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実施が認められ、臨床研究保険に加入後、平成 23 年 11 月 29 日に第 1 例目の移植を施行した。その後、総症例数としては 11 症例エントリーして、8 症例に軟骨細胞シート移植を施行した。移植できなかった 3 症例の内訳は、2 例が関節鏡にて選択基準 又は に合致せず、1 例が予定培養期間中に細胞シートの製造ができなかった症例である。移植術後の経過はいずれも良好である。全 8 症例が移植後 1 年を経過し、各種検査等で臨床評価を施行し、平成 26 年 12 月 12 日に臨床研究を終了した。全 8 症例において、術後 1 年の臨床評価スコア、単純レントゲン検査、MRI 検査、関節鏡検査、病理検査において、明らかに治療効果を認めている。臨床研究中に重篤な有害事象は発生せず、自己軟骨細胞シート移植による安全で有効な関節軟骨の再生治療による効果が得られており、今後は先進医療での実施を目指す。

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

なし

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

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、バンヌス形成 : 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

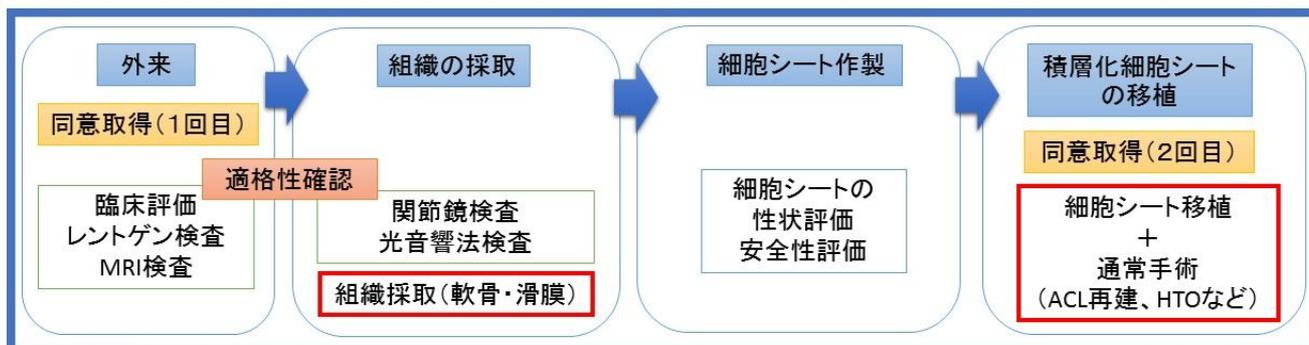
総得点：0～14

軽度変性：1-3

中等度変性：4-7

重度変性：> 7

「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



多指症軟骨由来細胞シートの作製

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
研究協力者	白砂 早織	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
研究分担者	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター 生殖医療研究部・部長
研究協力者	梅澤 明弘	国立成育医療研究センター研究所・副所長
研究協力者	小久保 舞美	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所・博士研究員

研究要旨：我々は、これまでに自己軟骨細胞シートによる関節治療を目指したヒト幹細胞臨床研究を実施し、重篤な有害事象は認められることはなく終了した。平成 26 年 8 月に同種軟骨細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究の承認を得て、現在実施準備中である。

本研究では、多指症手術で廃棄される軟骨組織から細胞シートの作製及びその特性の解析を実施した。本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取し、細胞を調整・播種・培養し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解し速やかに平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。細胞シートの組織切片を作製し、構造および厚みを解析した。

その結果、多指症軟骨細胞の凍結ストックから重層化した細胞シートの作製が可能であった。

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」を実施した。移植が実施された全 8 症例は移植後 1 年を経過し、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解析を進めている。細胞シートの基材として、自己細胞は、関節軟骨組織の非荷重部の健常部と滑膜組織を採取することや採取量に制限があること、及び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さらなる普及を目指すために自己細胞の課題を解決すべく、細胞シートの基材となる細胞を同種細胞に代替することにより、自己組織の侵襲がなくなるため、軟骨及び滑膜組織の採取量によるシートの作製数の制限がなくなり、各患者に応じて移植に必要な枚数が作製可能となる。また、患者の移植前にシートを作製することが可能となり、バリデーション試験として細胞シートの特性解析が実施できる。したがって、特性解析により、基材としての細胞の適合性を判定し、合格した細胞の中から、シート作製によりよく適応する細胞をシート作製の基材として選抜することが可能となる。この選抜された細胞を基材とすることにより、多数の患者に複数回の移

植の実施が可能であると想定される。

細胞シートの基材となる多指症手術時廃棄組織由来細胞でシート作製が可能かを検討した。

B. 研究方法

サンプル

本学臨床研究審査委員会承認の下、多指症手術（男女含め 4 症例、平均年齢 1 歳 1 か月）廃棄組織より軟骨組織を採取し、細切して酵素処理を行い単離した細胞を多指症軟骨組織由来細胞とし、本研究を実施した（表 1）

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)及び DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)

培養条件：37 °C、5% CO₂

播種数：1 × 10⁴cells/cm²

表 1 サンプル情報

No.	gender	months
1	F	16
2	M	12
3	M	8
4	M	17

（平均年齢：1 歳 1 箇月）

シート作製

多指症手術廃棄組織より軟骨組織を採取して単離した細胞を培養し、増殖させた細胞を酵素処理により回収し、凍結細胞ストックを作製した。凍結細胞ストックを融解して平面培養して増殖させた後、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製した。シートは剥離試験を実施し、剥離できた結果をもとにシート作製が可能であると判断した。

シートの生細胞数及び細胞生存率

細胞シートは、酵素処理を行い細胞に単一化した。単離した細胞を死細胞が染色されるトルイジンブルーで生細胞と死細胞を染め分けて、生細胞を計数し、シート当たりの生細胞数と細胞生存率を算出した。

細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフランin O 染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し、顕微鏡下で厚みを計測した。

C. 結果

シート作製

自己軟骨細胞シート作製時と同様に軟骨組織から細胞を単離し、培養して増殖した細胞を酵素処理により単離して凍結細胞ストックを作製した。一定期間保管した後、この凍結細胞ストックを融解して細胞生存率を測定し、高い生存率を保っていること

が確認された（表 2）。融解後、速やかに平面培養すると、多指症軟骨由来細胞は増殖性がよく、サブコンフルエントに増殖する期間は、4~5 日間であり、少なくとも P7 で細胞集団倍加数は 15 であった（表 3）。また、サブコンフルエントに達した時に細胞を酵素処理で単一に単離して、温度応答性カルチャーインサートに再播種して細胞シートを作製し、14 日間で細胞シートとして剥離が可能であった（図 1）。

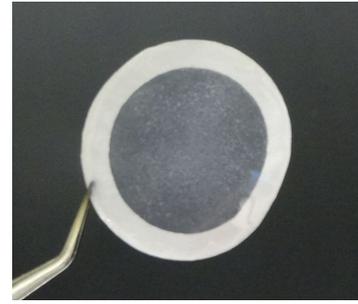
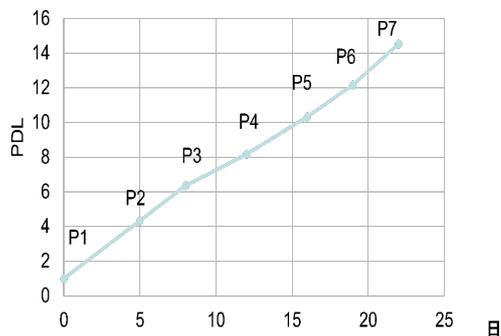


図 1 細胞シート

表 2 凍結細胞ストックの生存率

サンプル	%
1	93.2
2	97.8
3	98.2
4	97.4
5	99.6
6	96.9
平均	97.2 ± 0.8

表 3 細胞集団倍加数



シートの生細胞数及び細胞生存率
 各シート 1 層あたりの生細胞数の平均値
 は

190.2 ± 51.4 cells/cm² (表 3)であり、また、細胞シートの細胞生存率は 97.7±0.8%であった（表 4）。

表 4 細胞シートの細胞数

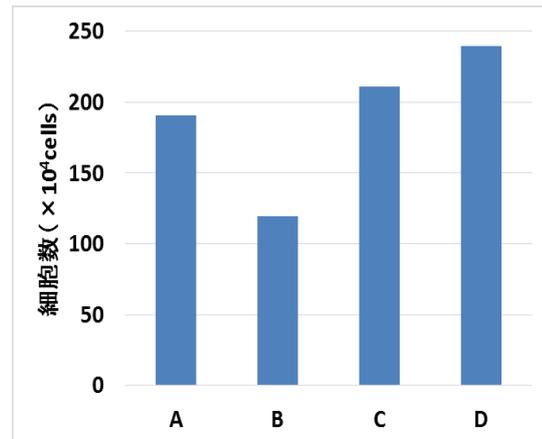
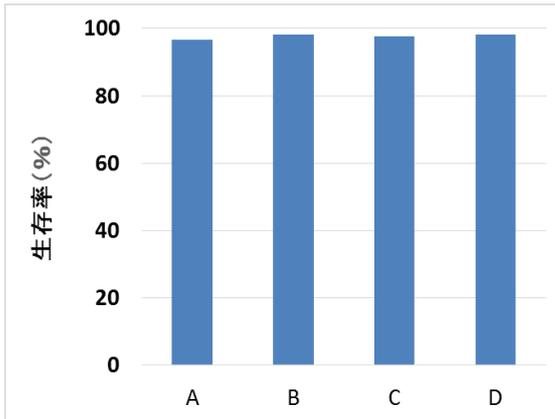


表5 細胞シートの細胞生存率



細胞シートの厚み

細胞シートをトルイジンブルー染色液、サフラニンO染色液、ヘマトキシリン染色液の各染色液で染色し（図2）顕微鏡下で細胞シートの構造を観察したところ、細胞の重層化が認められた。また、各サンプルの細胞シートの厚みを計測したところ、平均の厚みは21.5 μ mであった。

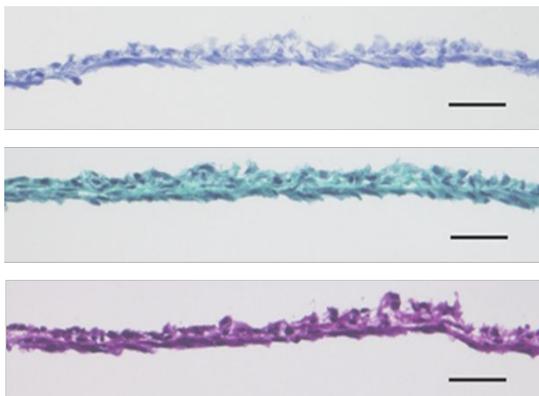


図2 細胞シートの厚み

D. 考察

我々が同種細胞ソースとして検討している多指症由来の軟骨細胞は、手術時に廃棄する組織であり、高い細胞増殖活性を有した。

これまで自己軟骨細胞シートは、作製には、自己の軟骨組織を関節鏡視下で採取を行う侵襲工程から3週間を要し、採取箇所による採取量の制限もあり、作製枚数に制限があった。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るため、自己軟骨細胞を継代する工程はシート化に適さないことが示唆されてきた。

一方、同種細胞を基材とすると、自己侵襲することはなくなる。また、多指症由来軟骨細胞は増殖能が高く、各患者の必要に応じた移植枚数のシートを作製することが可能となる。

多指症軟骨組織から細胞を単離し、培養することによって細胞を増やし、細胞ストックを作製した。細胞ストック工程を経ても細胞の起き具合は高い生存率をっており、その後の増殖性も安定していた。この細胞を基材にして細胞シート作製が可能であった。作製した多指症軟骨細胞シートは、1層のシートであり、3層に積層化した自己細胞シートと遜色ない生細胞数と細胞生存率であった。

E. 結論

本研究において、細胞シートの作製工程の検討を行い、この工程で細胞シート作製

が可能であることが判明した。作製された細胞シートは、生細胞数、細胞生存率、厚みの各項目において、3層に積層化された自己細胞シートと遜色ない結果が得られた。

このことから、多指症軟骨由来細胞シートは、細胞の凍結ストックから1層での重層化した細胞シートの作製が可能であり、同種細胞シートの基材になりう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. 著書

なし

2. 論文発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*, 1, 18-29, 2015.

2) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome

inactivation and embryogenesis in mice. *Nature communications*, 5, 5464, 2014.

3) 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*, 29, 44-51, 2014.

4) Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 1039-1050, 2014.

5) Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of Reprogramming Transgenes Improves the Tissue Reconstitution Potential of Keratinocytes Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*, 3, 992-1001, 2014.

6) Ichida JK, T C W J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H*, Meissner A*, Eggan K* (*;corresponding author) . Notch inhibition allows

oncogene-independent generation of iPS cells. Nat Chem Biol, 10, 632-639, 2014.

7) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞iPS細胞研究のこれから - 再生医療の実用化に向けたルールを学ぼう」 Medical Technology, 42(11), 1156-1159, 2014.

8) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞・iPS細胞の基本, ES細胞, iPS細胞で何ができるの? 何が変わるの?」 Medical Technology, 42(10), 1037-1042, 2014.

9) 阿久津英憲, 川崎友之. 「ES細胞とiPS細胞, どこがどう違うの?」 Medical Technology, 42(9), 920-926, 2014.

3.学会発表（研究分担者：阿久津英憲）

1) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H. Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors (F-2142). 12th Annual Meeting of ISSCR（国際幹細胞学会）, Vancouver, Canada, 2014.6.17-22.

2) 阿久津英憲. 「生殖医学における ES細胞と iPS 細胞の意義」. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会 教育講演 3（招待）, 東京, 2014.12.4.

4. 学会発表（研究協力者：岡田恵里）

1) 岡田恵里, 佐藤正人, 豊田恵利子, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. 多指症軟骨由来細胞シート作製.

第 14 回日本再生医療学会総会, 東京, 2015.3.19-21

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

多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析

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	白砂 早織	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	河毛 知子	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	高野 りや	株式会社セルシード・共同研究員
研究協力者	中村 嘉彦	東海大学医学部付属病院中央診療部 セルプロセッシング室・室長補佐

研究要旨：これまで本事業において、軟骨欠損に対し自己軟骨細胞を用いた細胞シートによる関節軟骨治療を実施し、重篤な有害事象もなく、移植部に硝子軟骨の再生を認めている。さらに、本治療法をレディメイド型の医療として確立するために、多指症手術時廃棄組織から得られる軟骨細胞を同種細胞ソースとして使用することを目指して、これまでに多指症軟骨細胞の安全性を確認した。本研究では、多指症由来軟骨から作製した細胞シートの特性を解析し、自己膝軟骨細胞による細胞シート治療で移植された細胞シート（成人膝軟骨細胞シート）のデータと比較した。その結果、多指症由来軟骨から作製した細胞シートは、成人膝軟骨細胞シートと同等の細胞数から構成され、生細胞率は95%以上を示した。また、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31, CD45陰性、CD81, CD90陽性を示すことを確認した。

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8名の患者へ移植し、1年間の観察期間を終了した。これまでに重篤な有害事象はなく、1年後の細胞シート移植部の組織学的評価で硝子軟骨の再生が認められ、細胞シートによる関節治療の安全性及び有効性を確認している。しかし、軟骨細胞シートによる関節軟骨損傷治療を、多くの患者に医療として提供するためには、オーダーメイドとなる自己細胞を用いた方法には限界があり、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。

我々は、これまでに多指症軟骨組織由来細胞の安全性を確認するため、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由来細胞を用いて造腫瘍性否定試験を行い、多指症由来軟骨細胞が造腫瘍性を示さないことを示した。また、aCGH および核型解析を行うことにより、培養による遺伝子コピー数異常の有無を評価して、安全性の高い多指症由来軟骨細胞を選別できることを確認した。これらの成果に基づき、同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究は、2014年8月に厚生労働大臣通知（厚生労働省発医政0806第9号平成26年8月6日）による承認を得て、現在移植用の多指症軟骨細胞ストックの作製保管を始めている。本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製される細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同等の機能を示すか検証するために、多指症軟骨細胞シートの特性を

成人膝軟骨細胞シートと比較した。

B. 研究方法

多指症由来軟骨細胞

本学臨床研究審査委員会承認のもと多指症手術廃棄組織（男性 7 症例:平均年齢 1 歳 2 カ月）より、細切した軟骨片、または、コラゲナーゼにより単離した軟骨細胞を培養皿に播種し、培地（20%ウシ胎児血清添加 DMEM/F12 (FBS; GIBCO)、1% antibiotics-antimycotic (GIBCO)）で培養した。細胞がサブコンフルエントまで増殖した時点で剥離し、凍結細胞ストック（第 1 継代細胞）を作製した。

細胞シートの作製

凍結細胞ストックを融解後、平面培養して増殖させたのち、第 2 継代または第 3 継代の軟骨細胞を、 1×10^4 cells/cm² で温度応答性インサートに再播種し、0.01%アスコルビン酸（日新製薬株式会社）を添加した培地で 14 日間培養した。14 日間培養後、細胞シートを PVDF 膜を用いて剥離し、細胞がシートを形成していることを確認した（剥離試験）。

細胞数の測定

細胞シートを TrypLE™ Express (Life Technologies) 中で 37 °C で 30~60 分加温後、遠心（1500rpm × 5min）し TrypLE™ Express を除去した。細胞ペレットに 0.25 mg/mL collagenase P (Roche) を含む培地を加え、37 °C で 20~45 分加温して細胞を分散させた。遠心により collagenase 液を除去し、FACS 緩衝液（0.2%BSA, 1 mM

EDTA, DPBS(-)）に懸濁した。トリパンブルーと血球計算盤を用いて、細胞数、生細胞率を求めた。

細胞表面マーカーの解析

細胞シートから調整した細胞を FITC 標識抗 CD31 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗 CD45 抗体 (Beckman Coulter)、APC 標識抗 CD81 抗体 (BD Pharmingen) および APC 標識 CD90 抗体 (BD Pharmingen) およびアイソタイプコントロール (Beckman Coulter) で標識し、FACS Vantage (BD) を用いて解析した。

C. 結果

多指症由来軟骨細胞は滑膜との共培養を必要とせず増殖し、培養開始後 14 日目で全例の細胞シートの剥離が可能であった（表 1）。

多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートの一枚当たり細胞数を調べたところ、平均 $2.39 \pm 0.97 \times 10^6$ cells で、生細胞率は平均 $96.8 \pm 2.6\%$ であった（表 2）。

多指症軟骨細胞シートを構成する細胞の純度を解析するため、血液系細胞で発現する CD31 および白血球共通抗原である

表 1. 多指症軟骨細胞シート剥離試験

細胞ID	月齢	性別	剥離検査
PD-1	12	M	○
PD-2	8	M	○
PD-3	17	M	○
PD-4	20	M	○
PD-5	13	M	○
PD-6	15	M	○
PD-7	13	M	○

表2 多指症軟骨細胞シートの細胞数

細胞ID	細胞数 ($\times 10^4$ cells/sheet)	生細胞率(%)
PD-1	239.8	98.2
PD-2	376.2	95.8
PD-3	225.5	98.6
PD-4	246.4	92.0
PD-5	198.6	99.4
PD-6	204.6	94.1
PD-7	195.8	97.8
平均 \pm SD	239.0 \pm 96.8	96.8 \pm 2.6

CD45、間葉系細胞に発現する CD81 および結合組織や一部幹細胞など広く発現が認められる CD90 の細胞表面への発現をフローサイトメーターにより解析した（図 1）。

多指症軟骨細胞シートの各マーカー陽性細胞率は、平均で CD31 (0.22 \pm 0.21%)、CD45 (0.42 \pm 0.48%)、CD90 (99.71 \pm 0.19%)、CD81 (99.78 \pm 0.23%) で、成人膝軟骨細胞シートと同様に、CD31 および CD45 陰性、CD81 および CD90 陽性であることが確認された。

D. 考察

本研究では、多指症由来軟骨細胞から作製した細胞シートを膝軟骨損傷の治療に用いることを目標としている。移植する細胞シートの品質の指標として評価すべき項目は、ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発第 0912006 号）や、関節軟骨再生に関する評価指標（薬食機発 1215 第 1 号）等で示されており、細胞数、生存率、細胞の純度試験は基本的な試験項目として挙げ

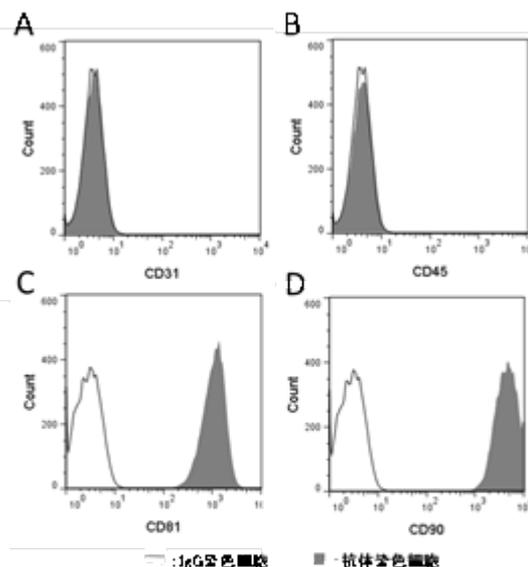


図1. 多指症軟骨細胞シートと成人膝軟骨細胞シートの各マーカー発現
 A)CD31 B)CD45 C)CD81 D)CD90

られている。また、細胞シートの軟骨修復促進メカニズムとして、関節液中のカタボリックファクターから軟骨損傷部位を保護することや、細胞シートから産生される TGF などの寄与があると考えており、移植する細胞シートの細胞数、生細胞率は、細胞シートの有効性に関与する重要な因子であると考えられる。

これらの評価項目の基準を考えるうえで、臨床研究により有効性が示された成人膝軟骨細胞シートの特性評価から得られている知見が一つの指標となると考えられることから、多指症由来軟骨細胞シートが成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すかどうか解析をおこなった。

多指症軟骨細胞からは、全例のドナーから剥離可能な強度をもつシートを作製することができ、多指症軟骨細胞シートには軟骨損傷部を保護する機能が期待できる。ま

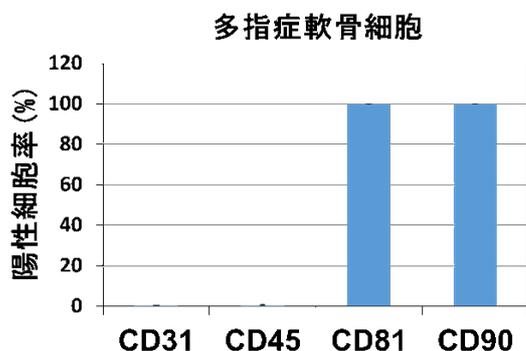


図2. 多指症軟骨細胞の陽性細胞率 (n=7)

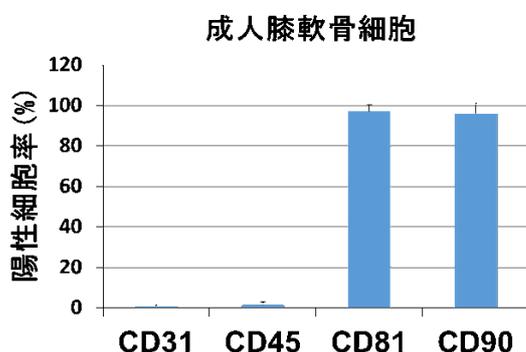


図3. 成人膝軟骨細胞の陽性細胞率 (n=8)

た、自己軟骨細胞を用いた臨床研究で成人膝軟骨細胞シートを構成する細胞数の平均値は、 2.3×10^6 cells で、生細胞率は 93%であったことから、多指症細胞シートに含まれる細胞数および生細胞率は成人膝軟骨細胞シートと同等であり、トロフィックファクター産生に寄与しうる細胞が同程度含まれることが確認された。今後、細胞シートあたりのトロフィックファクターの産生についても、成人膝軟骨細胞シートと同程度の能力を持つのか、明らかにする必要がある。また、細胞の純度の指標となる各種マーカーの陽性細胞率の検討では、血液細胞、内皮細胞に発現する CD31、白血球共通抗原である CD45 の陽性細胞率は 1%以下で、

血球系細胞の混入はほぼないと考えられた。間葉系由来細胞に発現する CD81 および結合組織などに広く発現する CD90 の陽性細胞率は 99%であり、これらのマーカーの発現では、多指症軟骨細胞シートは成人膝軟骨細胞シートと同様の特性を示すことが確認された。CD81 および CD90 は、成人膝軟骨細胞シートでドナー間でのばらつきがほとんどなく発現を認めたマーカーであったことから、これらのマーカーの発現は、細胞シートの評価指標として最低限満たすべき必要条件と考えられる。しかし、CD81 および CD90 の発現と細胞シートの有効性との関係は明らかではないため評価指標として十分条件とはいえず、有効性と相関するサロゲイトマーカーを同定することが今後の課題である。

E. 結論

多指症軟骨細胞シートは、細胞数、生存率、CD31、CD45、CD81 および CD90 の発現パターンで、成人膝軟骨細胞シートとほぼ等しい特性を示すことを確認した。

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
なし
3. 学会発表

- 1) 豊田恵利子, 佐藤正人, 鵜養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. マイクロアレイを用いた多指症軟骨細胞と成人膝軟骨細胞の特性比較. 第28回日本軟骨代謝学会（東京, 2015.3）
- 2) 豊田恵利子, 佐藤正人, 岡田恵里, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. 多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析. 第14回日本再生医療学会総会（横浜, 2015.3）

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・研究員

研究要旨：今年度は、これまでに開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の改良として、(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価を行った。その結果、(1) 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、非積層化シートに有効であり、特に非積層化細胞シートでは前処理時間の大幅な短縮が可能であること、(2) アルミフィルムでパッケージングされたガラス化細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約-150℃)、液体窒素中(-196℃)いずれの保存状態にも耐え得ること、(3) 市販ガラス化液の使用によって、自家作製液と同等の成績が得られること、(4) 細胞シートの長期安定保存が可能であること、などが示された。

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) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価

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)コスモバイオ)を温度応答性培養皿(35mm, 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層もしくは3層化細胞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および融解

既に開発したガラス化法を用いた(Maehara et al., 2013)。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、細胞非浸透性凍害保護剤として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(自家作製液)。

細胞シートをパッケージング素材に収容し、液体窒素蒸気(-150℃)に暴露してガラス化し

た。

保存後のシートは、38℃に加熱したウォームプレート上に静置することで融解した。ピンセットを用いて細胞シートをパッケージから回収し、1M、0.5M sucrose を含む 20mM HEPES 緩衝 TCM199 (20% bovine calf serum 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。

3. ガラス化後の細胞シートの評価

融解後の細胞シートは、形態評価(シート構造の破損の有無)の後、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。

4. 実験内容

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

従来法ではガラス化前の平衡液(ES)およびガラス化液(VS)への浸漬時間(前処理時間)は、それぞれ 25 分および 20 分としていた。本年度は、前処理時間の短縮を検討した。表 1 に示す様に、非積層化細胞シートに対してはそれぞれ 10 分および 10 分、もしくは 10 分および 5 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。2 層化細胞シートに対してはそれぞれ 20 分および 12.5 分、もしくは 12.5 分および 10 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。

(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

前処理が終了した細胞シートを、食品用ラップフィルム((株)クレハ、ポリ塩化ビニリデン、10.5 μ m)もしくはアルミフィルム((株)三菱ア

ルミニウム、アルミ фольド、厚さ 12 μ m)を用いてパッケージングし、液体窒素蒸気(-150℃)に暴露してガラス化した。

ウサギ軟骨細胞シートが液体窒素液相中での保存に耐え得るかを確認するために、以下の実験を行った。2 層化細胞シートを用いて、従来通りの液体窒素液相中でのガラス化あるいは液体窒素液相中への浸漬を行い融解後のシートの形態維持、細胞生存性を評価した。

(3) 市販ガラス化保存液の検討

自家作製液と同組成の市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)を使用し、その有効性の確認を行った。

(4) 長期保存後の細胞シートの評価

ガラス化細胞シートを、液体窒素タンク中(気相、-150℃)で 2 週間~1 か月間保存し、融解後の形態維持ならびに細胞生存性を評価した。

C. 結果

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

非積層化シート(計 9 例)において、融解後のシート構造に破損は全く生じることなく(図 1, A-D)、細胞生存性も高く保たれていた(89.5%)。この成績は、非ガラス化対照区(95.5%)と比較しても同等であった。また、非積層化シートでは、ガラス化前の前処理時間を従来の 45 分から 15 分に大幅に短縮しても、シートの構造(無傷での回収率: 100%)、細胞生存性(87.8%)ともに良好に保たれることが分かった。積層化シート(2 層, 計 13 例)を従来法でガラス化した結果、融解後のシート構造に破損は全く生じるこ

となく(図 1, E-H)、細胞生存性も高く保たれていた(86.1%)。ガラス化前の前処理時間を 32.5 分に短縮しても、同等の成績は保たれていた。しかし、前処理時間を大幅に短縮した場合(ES 12.5 分/VS 10 分処理)には、7 例中 2 例において融解時に氷晶形成が生じた(表 1)。

(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

ラップフィルムによりパッケージングされた細胞シートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中で保存した場合、5 例中 1 例のシートに破損が生じた(図 2-A)。

パッケージングにアルミフィルムを用いた場合、液体窒素ガス気相中でガラス化する従来法では、融解後のシート構造の破損は全く生じることなく、細胞生存性は 85.0%であった。この成績は、非ガラス化試料(85.8%)に匹敵するものであった。アルミフィルムでパッケージングされたシートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中に浸漬した場合も、シートの破損は生じず、また細胞の生存性も高く維持された(84.2%)。しかし、アルミフィルムでパッケージングされたシートを液体窒素液相中に浸漬してガラス化した場合は、細胞生存性(82.4%)は高く保たれたものの、シート構造の破損が顕著であった(無傷回収率 0%, 図 2-C)。

(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認

市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に有効であることが確認された。融解後のシートの構造

は無傷に保たれており(無傷回収率 100%, 図 3-B)、細胞生存性は 82.2%であった。この成績は、自家作製液(無傷回収率 100%, 細胞生存性 83.5%)および非ガラス化試料(無傷回収率 100%, 細胞生存性 84.5%)と同等であった。

(4) 長期保存後の細胞シートの評価

3 層化細胞シートを 2 週間液体窒素ガス気相中に保存し融解した結果、シート構造の破損は全く生じることなく(無傷回収率 100%, 図 4-B)、細胞生存率も 83.2%と高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

次に、2 層化細胞シートを 30 日間保存し融解した結果、融解後のシート構造の破損は見られず(無傷回収率 100%, 図 5-B)、細胞生存率(79.2%)も高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

D. 考察

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大試験において、2 層化シートの前処理時間を大幅に短縮した際には、融解時に氷晶形成が見られた。積層数の多い細胞シートをガラス化する場合には、凍害保護剤を十分に浸透させるために、ある程度の長さの前処理時間は必要であると考えられる。

(2) アルミフィルムによるパッケージングは、細胞シートのガラス化だけでなく長期保存にも適していると思われる。今後はより長期保存後の検証が必要である。

E. 結論

1. 細胞シートの積層数に応じて、凍害保護剤の浸透に要する前処理時間の短縮が可能である。
2. パッケージング素材として、アルミフィルムが有望である。アルミフィルムでパッケージングされた細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約-150)、液体窒素液相中(-196)いずれの保存状態にも耐える。
3. 市販(予定)ガラス化保存液(バイオベルデ社製)の有効性が検証された。
4. 軟骨細胞シート²の長期ガラス化保存が可能である。

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

<招待講演・国内>

1. 長嶋比呂志. 受精卵凍結保存のノウハウは組織・臓器の保存にどこまで応用可能か?. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会, 28-29 Nov 2014; 大阪.

<国内学会>

1. 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 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-2. 第14回日本再生医療学会総会, 19-21 Mar 2015; 横浜.

表1. 非積層および積層化(2層)ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：前処理時間短縮の検討

シート積層数	前処理時間	無傷での回収率 ¹	融解時氷晶形成	細胞生存率 ²
非積層	ES 25分/VS 20分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.0% (n=3)
	ES 10分/VS 10分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.1% (n=3)
	ES 10分/VS 5分	100% (3/3)	0% (0/3)	87.8% (n=3)
	非ガラス化対照	100% (1/1)	0% (0/1)	95.5% (n=1)
2層	ES 25分/VS 20分	100% (6/6)	0% (0/6)	86.4% (n=6)
	ES 20分/12.5分	100% (7/7)	0% (0/7)	88.5% (n=6)
	ES 12.5分/VS 10分	100% (7/7)	28.6% (2/7)	84.8% (n=7)
	非ガラス化対照	100% (5/5)	0% (0/5)	89.0% (n=5)

ES: 平衡液; VS: ガラス化液; ^{1,2} 各区間に有意差なし

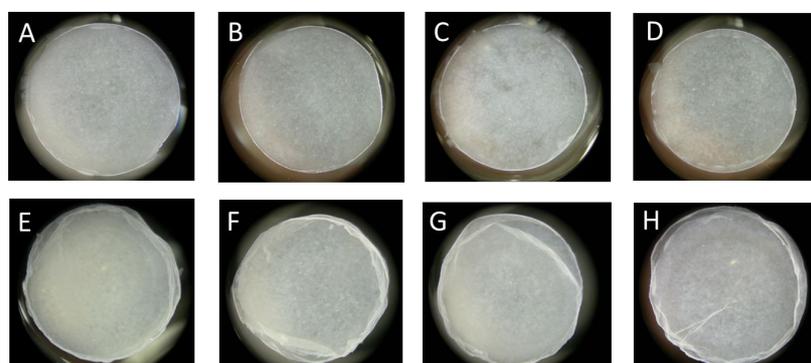


図1. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

A-D. 非積層化細胞シート; E-H. 2層化細胞シート; A. ES25分/VS20分処理区; B. ES 10分/VS 10分処理区; C. ES 10分/VS 5分処理区; D. 非ガラス化対照区; E. ES 25分/VS 20分処理区; F. ES 20分/VS 12.5分処理区; G. ES 12.5分/VS 10分処理区; H. 非ガラス化対照区

表2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：液体窒素液相への浸漬の影響

パッケージング素材	ガラス化条件		無傷での回収率	細胞生存率 [*]
	液体窒素気相でガラス化	液体窒素液相に浸漬		
食品用ラップフィルム	+	+	80.0% (4/5)	84.2% (n=5)
	+	-	100% (8/8)	85.0% (n=8)
アルミフィルム	-	+	0.0% (0/2)	82.4% (n=2)
	+	+	100% (2/2)	84.2% (n=2)
非ガラス化対照			100% (8/8)	85.8% (n=8)

2層化細胞シートを用いた; ^{*} 各区間に有意差なし

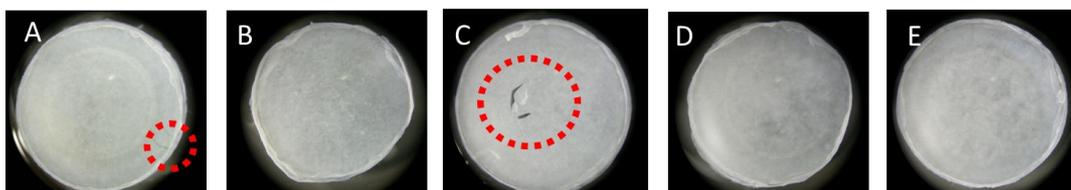


図2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

- A. 食品用ラップフィルムでパッケージングしたシートを、液体窒素蒸気でガラス化後に液体窒素液相中に浸漬した結果、シート構造の破損が見られた (赤丸印) ; B. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素気相中でガラス化された細胞シート ; C. アルミフィルムでパッケージングした細胞シートを液体窒素中に直接浸漬してガラス化した結果、シート構造の破損が生じた (赤丸印) ; D. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素ガス気相中でガラス化後に液体窒素液相中に保存された細胞シート ; E. 非ガラス化対照区

表3. 市販予定(バイオベルデ社製)ガラス化液の有効性の確認

ガラス化液	無傷での回収率	細胞生存率
自家(明治大学)製	100% (7/7)	83.5% (n=7) ^{ab}
バイオベルデ社製	100% (9/9)	82.2% (n=9) ^a
非ガラス化対照	100% (5/5)	84.5% (n=5) ^b

2層化細胞シートを用いた ; ^{a,b}異符号間に有意差あり(p>0.05)

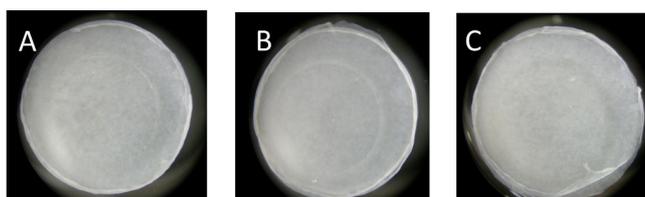


図3. ガラス化および融解後のウサギ軟骨細胞シートの形態

- A. 自家(明治大学)製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート ; B. バイオベルデ社製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート ; C. 非ガラス化対照区

表4. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：3層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率
ガラス化区	0日間	100% (1/1)	83.4% (n=1)
ガラス化保存区	2週間	100% (2/2)	83.2% (n=2)
非ガラス化対照区	-	100% (1/1)	84.1% (n=1)

ガラス化直後に融解した

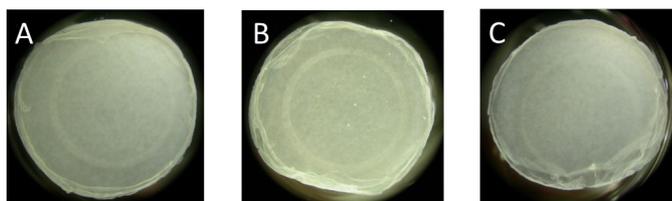


図4. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(3層化細胞シートを2週間保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 2週間保存； C. 非ガラス化対照

表5. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：2層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率*
ガラス化区	0日間	100% (3/3)	78.0% (n=3)
ガラス化保存	30日間	100% (3/3)	79.2% (n=3)
非ガラス化対照区	-	100% (2/2)	82.2% (n=2)

ガラス化直後に融解した； *各区間に有意差なし

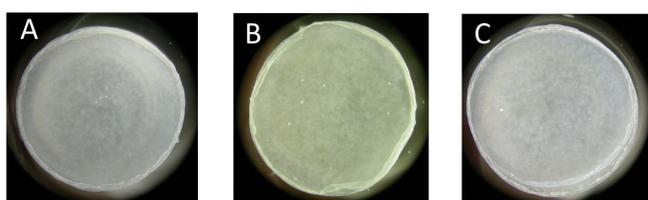


図5. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(2層化細胞シートを1ヶ月保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 1ヶ月保存； C. 非ガラス化対照

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・医療機器部・主任研究官
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：本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞の免疫細胞に対する反応性について検討してきている。昨年度、同種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、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示した。今年度は *in vitro* の接触培養条件下において、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果への PGE2 および TGF- β 1 の影響を検討した。その結果、接触培養条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- β 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。また、NHACs と共培養された MLR 中の CD4⁺T 細胞がどのようなサブセットになっているか検討したところ、IL-2 および TNF- α といった Th1 細胞タイプサイトカインは、軟骨細胞と共培養することで有意に減少しており、IL-4 や IL-17 といった Th2 細胞、Th17 細胞タイプのサイトカイン量はほとんど産生されていなかった。一方、Treg 細胞が産生する IL-10 は有意に発現量が増えていた。再現性の確認が必要であるが、軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に關与する Treg 細胞が優位になっていることが示唆された。

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、既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おり、その関節軟骨修復再生の有効性が示されてきているが、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。しかし実際に宿主内で、同種軟骨細胞が、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がなかったことから、我々はこれまでに同種軟骨細胞の T 細胞におよぼす影響について検討してきている。

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 (PDCCs)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。昨年度は、*in vitro*においてPDCCsが同種T細胞におよぼす影響を検討し、PDCCsは免疫原性が低だけでなく、活性化T細胞の増殖抑制効果を有することを明らかにし、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を利用出来る可能性を示した。また、軟骨細胞による免疫調節効果のメカニズムの解明をめざして、軟骨細胞で高発現しているTGF- β 1に着目し、PDCCsによるT細胞増殖抑制効果への影響を検討したところ、接触培養条件下では、中和抗体でTGF- β 1の生理活性を減弱させても、抑制効果に影響がないことを示した。そこで今年度は、積層化軟骨細胞で高い発現がみられているPEG2のPDCCsによるT細胞増殖抑

制に対する影響を検討した。さらに、軟骨細胞が CD4⁺T 細胞の分化にどのような影響を与えるかを、各 T 細胞サブセットに特徴的なサイトカイン量を測定し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。) 正常ヒト関節軟骨細胞-膝(NHAC-kn 以下 NHACs)、ヒト抹消血由来 CD4⁺T 細胞 (CD4⁺TCs)および正常ヒト樹状細胞(NHDCs)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。

NHACs は、Chondrocyte Basal Medium (CBM)に Supplements and Growth Factors を加えた培地 (CGM) で培養した。

NHDCs は LGM-3™ (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®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®から剥がし、必要数播種した。

CD4⁺TCs は反応当日に細胞融解後、LGM-3™ 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 NHDCs (3 x 10⁴ cells) と CD4⁺TCs (2 x 10⁵ cells)を播種し共培養した。

4. MLR と軟骨細胞の共培養

PDCCs (2 x 10⁴ cells)もしくは NHACs (2 x 10⁴ cells)が予め播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養した。

5. Cox2 インヒビターによる PGE2 産生抑制および TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β1 の生理活性抑制

培養開始日の上清に最終濃度 1 µM NS398 (Sigma 社) の Cox2 インヒビターを添加した。PEG2 と TGF-β1 の同時抑制の場合は、最終濃度 1 µM NS398 と最終濃度 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) を併せて添加した。

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 3~5 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 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

7. IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL17 の測定

培養上清中の各サイトカインの量は BD™ Cytometric Bead Array (BD Biosciences 社)を用いて測定した。同一条件の培養上清を 3 つ測定し、統計的有意差を Student's T 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

8. TGF- β 1 の測定

培養上清中の TGF- β 1 の量は Quantikine[®] ELISA Human TGF- β 1 (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および東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHACs、CD4⁺TCs および NHDCs 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. 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 PGE2 の影響についての検討

積層化軟骨細胞では PGE2 の発現が高いことから、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への PGE2 の関与を検討するため、MLR と PDCCs の共培養系に PGE2 産生に関わるシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox2) の阻害剤である NS398 を添加し、PGE2 の産生を抑えた。NS398 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 1)

2. 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 PGE2 および TGF- β 1 の影響についての検討

昨年度、接触培養条件下においては TGF- β 1 を単独で抑制しても、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がないことを報告した。また今回 PGE2 を単独抑制しても、同条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果を減弱されることがないことが分かったことから、両者活性を同時に抑えた場合の影響について検討した。その結果、それぞれ単独抑制の場合と同様に、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がみられなかった。(図 2)

3. 軟骨細胞が CD4⁺TCs のサブセットに与える影響についての検討

今回は NHACs による MLR 中の CD4⁺TCs のサブセットへの影響を検討し

た。図 3-1 に示す条件で培養した培養上清中の各サイトカインの量を測定した。

3-1. Th1 細胞：IL-2, TNF- α , IFN- γ 量の測定

IL-2 および TNF- α は CD4⁺TCs や NHACs のみの培養上清中では、検出限界以下だった。MLR では IL-2 が約 2050 pg/ml、TNF- α が約 380 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では IL-2 が約 1645 pg/ml、TNF- α が約 44 pg/ml と有意に低くなっていた。一方、IFN- γ は逆に MLR で約 392 pg/ml であるのに対して、共培養系では約 766 pg/ml と有意に高くなっていた。（図 3-2）

3-2. Th2 細胞：IL-4 量の測定

MLR と NHACs の共培養系で約 5.7 pg/ml であったが、それ以外は検出限界(4.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。（図 3-3）

3-3. Th17 細胞：IL-17 量の測定

IL-17 は、いずれも検出限界(18.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。

3-4. Treg 細胞：IL-10 および TGF- β 1 量の測定

IL-10 は MLR で約 11 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では約 45 pg/ml と有意に高くなっていた。一方、TGF- β 1 は CD4⁺TCs や MLR の上清中では共に約 100 pg/ml であるのに対して、NHACs と MLR の共培養中では約 340 pg/ml と高発現が見られたが、NHACs 単独と比較して（約 320 pg/ml）有意差がなかった。（図 3-4）

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。我々は昨年度までに、マウス軟骨細胞、成人関節軟骨細胞とその積層化シート、および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いる。さらに昨年度においては、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た（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）ことから、接触培養条件下における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF- β 1 の影響について検討したところ、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ても PDCCs の T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがないことを明らかにした。そこで今年度、積層化軟骨細胞で高発現しており、T 細胞増殖に抑制的に働くことが知られている PGE2 の産生抑制および TGF- β 1 の生理活性と PGE2 量を同時に減少させることで、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える影響を検討した。その結果、PGE2 を単独で

減少させても、TGF- β 1 の生理活性と同時に減少させても、T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがなかった。(図 1, 2) このことから、接触培養条件下においては細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

さらに今年度は NHACs が CD4⁺TCs のサブセットにどのような影響を与えているか検討した。従来 CD4⁺TCs は、産生するサイトカインの種類によって、Th1 細胞 (IL-2, TNF- α , IFN- γ) と Th2 細胞 (IL-4, IL-5) に大別されていたが、近年、新たなサブセットとして Th17 細胞 (IL-17, IL-21, IL-22) や制御制 T (Treg) 細胞 (IL-10, TGF- β) が分類された。Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞が免疫応答を促進するのに対して、Treg 細胞は免疫応答の抑制に働くことが知られている。これらのうちどのサブセットになるかは CD4⁺TCs が受ける刺激によって決められる。一方、NHACs は TGF- β 1 を発現しているが、TGF- β 1 は Th17 細胞や Treg 細胞の分化に関わるサイトカインであることから、NHACs との共培養によって MLR 中の CD4⁺TCs が Th17 細胞もしくは Treg 細胞に分化している可能性が高いと考えられた。そこで共培養中の CD4⁺TCs が実際にどのサブセットに分化しているか検討するため、MLR の培養上清と MLR と NHACs の共培養の培養上清中の IL-2, TNF- α , IFN- γ (Th1 細胞)、IL4 (Th2 細胞)、IL-17 (Th17 細胞)、IL-10 および TGF- β 1 (Treg 細胞) を測定し比較した。その結果、共培養上清中で Th1 細胞タイプの

サイトカインでは、IL-2 および TNF- α は有意に減少していたが、IFN- γ は有意に増加していた。この結果より Th1 細胞に分化していないことを否定できないが、免疫調節能を有すると報告のある間葉系幹細胞でも、今回の結果同様に IL-2 は減少させるが IFN- γ は増加させたとの報告もある。今後、Th1 細胞に特異的な転写因子である T-bet の発現を確認する等の検討の余地がある。Th2 細胞タイプの IL-4 は解析系の検出限界が 4.9 pg/ml であるのに対して、共培養系で 5.7 pg/ml 測定された以外は検出できなかった。さらに Th17 細胞タイプの IL-17 も検出限界以下で測定できなかった。これらの結果より、Th2 細胞および Th17 細胞への分化はほとんどないと考えられる。Treg 細胞タイプサイトカインでは IL-10 は共培養系で有意に増加していた。一方、TGF- β 1 は NHACs も発現していることから、Treg 細胞由来と区別できないが、共培養系が NHACs 単独培養中の TGF- β 1 量より若干高い傾向がみられたが、有意な差はなかった。今後、フローサイトメトリーを用いた解析により、T 細胞だけに着目して、各サブセットに特異的な細胞表面抗原や細胞内タンパク質を検出することで、NHACs によって影響を受けた CD4⁺TCs のプロファイルを明らかにする必要があるが、今回の培養条件下では、TGF- β 1 の刺激により IL-10 を産生する Treg 細胞が優位になっている可能性が高いと考えられる。

E. 結語

接触培養条件下において、PDCCs の活性化 T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- β 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

活性化条件下にある CD4⁺TCs は軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に關与する Treg 細胞が優位になっている可能性が高い。

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, Kawakami T, Komoriya K, Kato R, Niimi S, Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

2) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京,2014.11)

3) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京,

2014.11)

4) 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. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10)

5) Miyajima-Tabata A, Kato R, Komoriya K, Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

6) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)

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

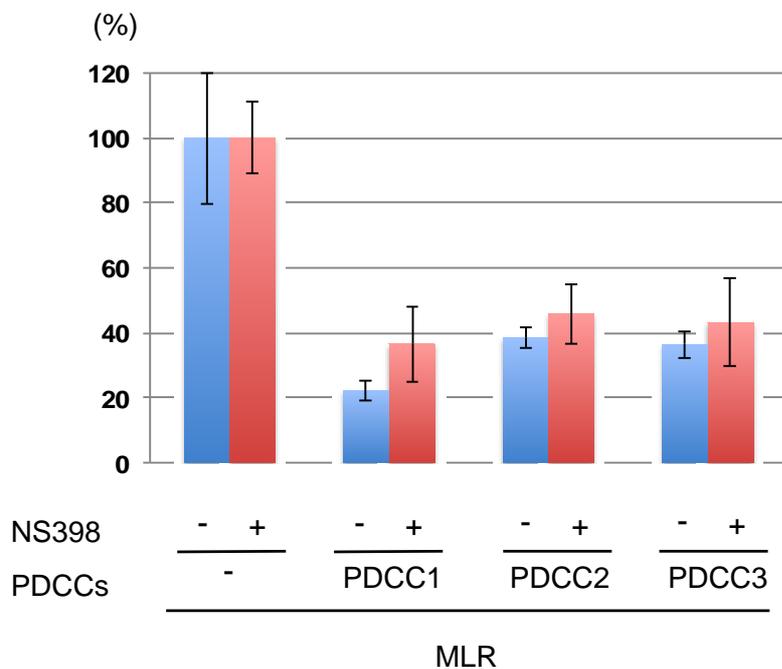


図1:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への PGE2 の関与

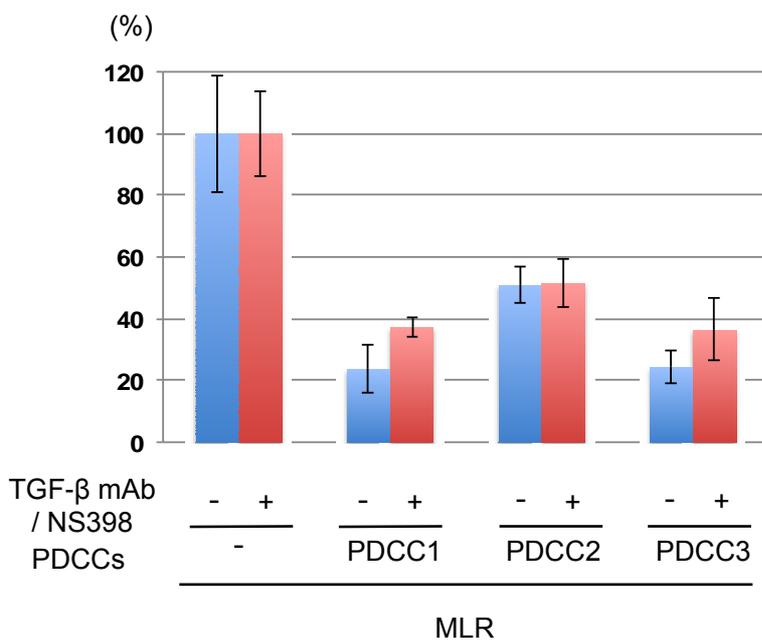
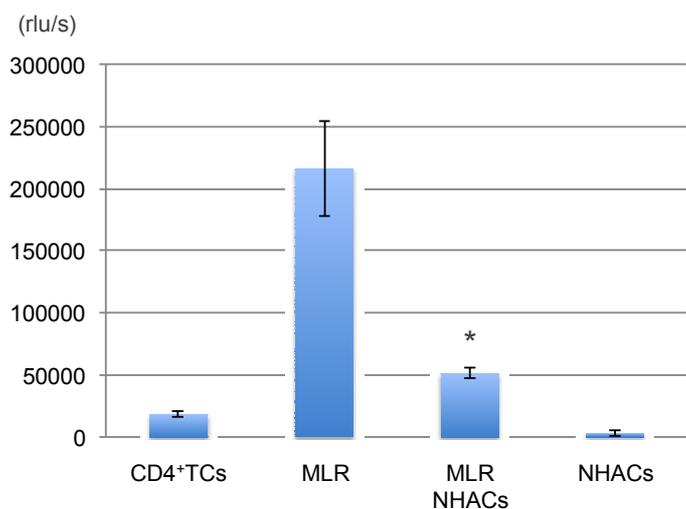
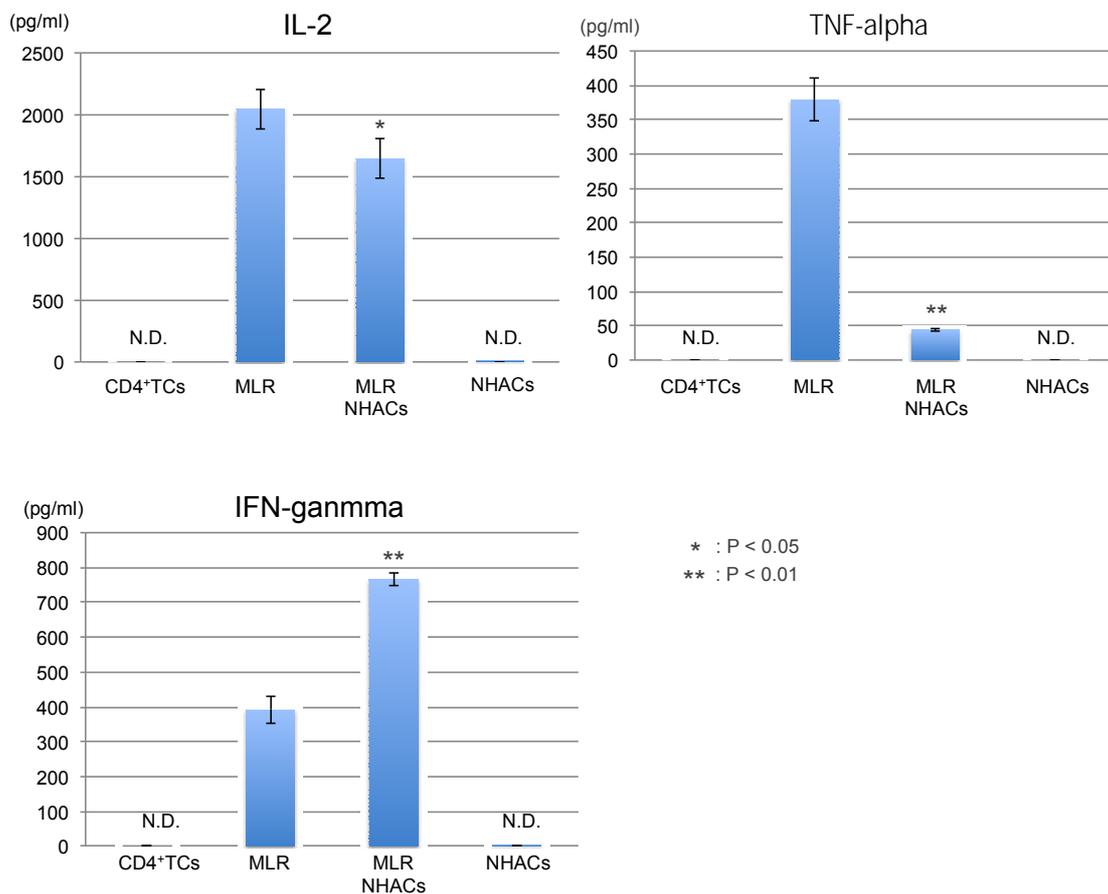


図2:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF- β 1 および PGE2 の関与



* : P < 0.05

図3-1 : NHACs による MLR 中の CD4⁺TCs の増殖抑制
 (以下、この培養条件の培養上清中の各サイトカイン量を測定)



* : P < 0.05
 ** : P < 0.01

図3-2 : Th1 サイトカインの測定

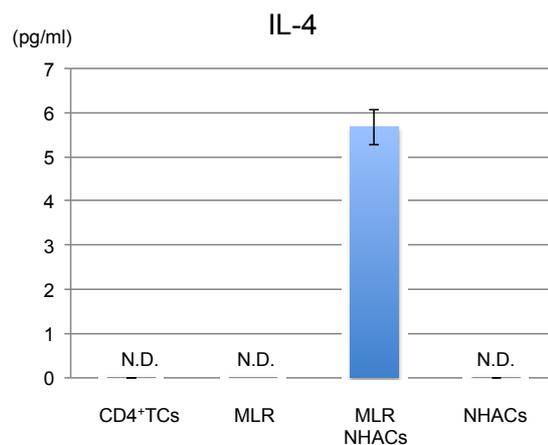


図3-3: Th2 サイトカインの測定

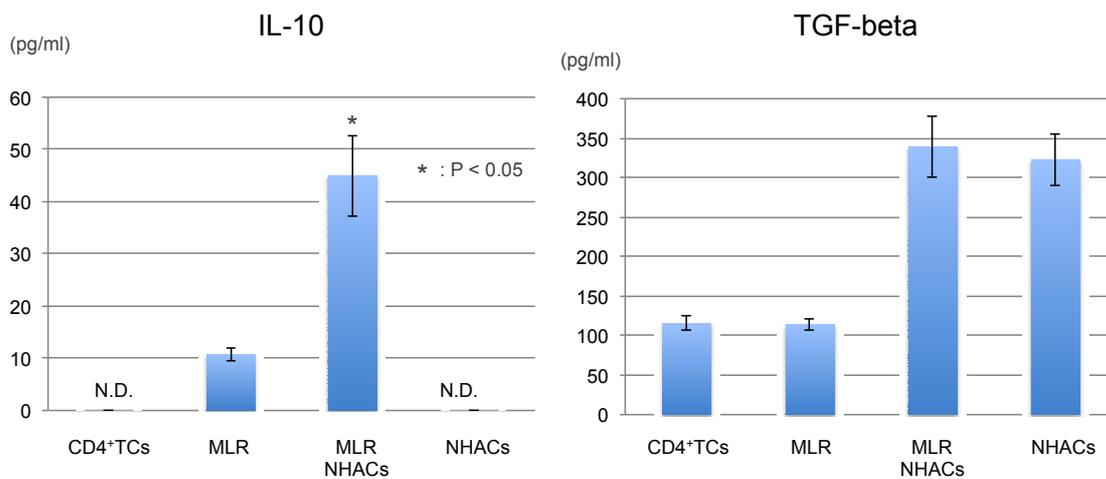


図3-4: Treg サイトカインの測定

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	再生医療の細胞 培養技術と産業 展開 (シーエムシー 出版)	第5編 応用研究ビジネスブ ラン, 第27章 関節軟骨治療 研究	293-303	JPN	菊地鉄太郎, <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
2015年	BMC Musculoskelet al Disorders	Diffusion tensor imaging can detect the early stages of cartilage damage: a comparison study	16:35	Ukai T, <u>Sato M</u> , Yamashita T, Imai Y, Mitani G, Takagaki T, Serigano K, Mochida J
2014年	Arthritis Research & Therapy	Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis	16(5), 427	Nagai T, <u>Sato M</u> , Kobayashi M, Yokoyama M, Tani Y, Mochida J
2014年	望星	健康のカギは口コモの予防	45(12), 24-29	<u>佐藤正人</u>
2014年	最新医学	セルシートエンジニアリン グ	69(7月増 刊号), 144-153	<u>佐藤正人</u>
2014年	The BONE	骨・軟骨イメージング(光 音響を用いて)	28(2), 105-110	石原美弥, <u>佐藤正人</u>
2014年	日本臨牀	細胞シートによる関節治療 の再生医療	72(増刊 号3), 722-727	<u>佐藤正人</u>

雑誌(その他)

出版	誌名	タイトル
2014.11.12	夕刊フジ	「東海大学医学部附属病院・整形外科 最先端の軟骨再生研究」
2014.8.16	読売新聞(夕刊)	高齢者の膝痛、他人の軟骨細胞移植で治療計画
2014.7.23	読売新聞(朝刊)	[医療ルネサンス]進む再生医療 < 3 > 膝軟骨補う細胞シート
2014.7.16	日刊ゲンダイ	世界初「軟骨細胞シート」変形性膝関節症に効果あり
2014.6.30	日経バイオテク On Line	「国内初の他家軟骨再生医療、東海大が実施を計画、乳児指軟 骨細胞から作製」
2014.6.13	週刊朝日	名医の最新治療 外傷性の痛みへの再生医療が保険適用に 膝の痛み(軟骨再生)

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			
2015 年	Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting	The effect on articular cartilage repair using collagen vitrigel and chondrocyte sheets	Tani Y, <u>Sato M</u> , Takezawa T, Yokoyama M, Kobayashi M, Toyoda E, Kawake T, Okada E, Mochida J
2015 年	Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting	The effect of using collagen vitrigel containing transforming growth factor beta 1 on articular cartilage repair	Maruki H, <u>Sato M</u> , Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Kobayashi M, Kokubo M, Kawake T, Okada E, Mochida J, Kato Y
2014 年	The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization (ACTO)	【Keynote lecture】 Clinical Application of Chondrocyte Sheet and Future Perspectives	<u>Sato M</u>
2014 年	France-Japan Symposium	Regenerative Medicine & Innovative Therapies	<u>Sato M</u>
2014 年	Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Annual Conference 2014, TERMIS-AP	Cell sheet technology for biological articular cartilage repair and regeneration	<u>Sato M</u>
2014 年	Orthopaedic Research Society International (OARSI)	miRNA and chondrocyte function	<u>Sato M</u>
2015 年	第 14 回日本再生医療学会総会	ビトリゲルと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治
2015 年	第 14 回日本再生医療学会総会	細胞を用いない TGF- β 1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	丸木秀行, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治, 加藤義治
2015 年	第 14 回日本再生医療学会総会	多指症軟骨由来細胞シートの作製	岡田恵里, <u>佐藤正人</u> , 豊田恵利子, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲,

			梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	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-2	前原美樹, <u>佐藤正人</u> , 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞然, 長嶋比呂志
2015年	第14回日本再生医療学会総会	多指症軟骨細胞シートのフローサイトメーターによる解析	豊田恵利子, <u>佐藤正人</u> , 岡田恵里, 白砂早織, 高橋匠, 河毛知子, 高野りや, 小久保舞美, 中村嘉彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第14回日本再生医療学会総会	インテグリン活性化によるヒト初代軟骨細胞機能制御	大脇敏之, 小久保舞美, 菊地鉄太郎, 熊代善一, 深井文雄, <u>佐藤正人</u> , 大和雅之, 岡野光夫
2015年	第14回日本再生医療学会総会	幼若動物由来軟骨細胞シートの特性評価	小久保舞美, 大脇敏之, 菊地鉄太郎, 河毛知子, 熊代善一, 大和雅之, <u>佐藤正人</u> , 岡野光夫
2015年	第28回日本軟骨代謝学会	マイクロアレイを用いた多指症軟骨細胞と成人膝軟骨細胞の特性比較	豊田恵利子, <u>佐藤正人</u> , 鷓養拓, 高橋匠, 中村誠二, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治
2015年	第28回日本軟骨代謝学会	EP2 アゴニストを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 横山宗昂, 小林美由希, 高橋匠, 岡田恵里, 丸木秀行, 加藤義治, 持田讓治
2015年	第38回厚木整形外科医会学術講演会	【特別講演】変形性膝関節症のエビデンスと再生治療の役割	<u>佐藤正人</u>
2015年	第15回医薬品等ウィルス安全性シンポジウム	【シンポジウム】他家軟骨再生医療	<u>佐藤正人</u>
2015年	第1回再生医療産業化展	【基調講演】関節治療を加速する同種細胞シートによる再生医療の実現	<u>佐藤正人</u>
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム 東京	【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療	<u>佐藤正人</u>
2014年	第56回神奈川医学会総会・学術大会	【特別講演】細胞シートによる関節軟骨再生治療(ヒト幹細胞臨床研究)	<u>佐藤正人</u>
2014年	第42回日本関節病学会	【パネルディスカッション】関節軟骨損傷に対する治療戦略	<u>佐藤正人</u>
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	初代培養軟骨細胞に ascorbic acid が及ぼす影響	小久保舞美, <u>佐藤正人</u> , 内山善康, 小林美由希, 横山宗昂, 谷良樹, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	血小板活性化血清関節内投与による軟骨治療効果の検討	横山宗昂, <u>佐藤正人</u> , 谷良樹, 小林美由希, 小久保舞美, 持田讓治

2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	細胞を用いないTGF-β1含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	丸木秀行, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治, 加藤義治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	Vitrigelと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	同種移植を目指したガラス化凍結保存細胞シートを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討	谷良樹, <u>佐藤正人</u> , 長嶋比呂志, 前原美樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治
2014年	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析	加藤玲子, <u>佐藤正人</u> , 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, 新見伸吾
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム さいたま	【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療	<u>佐藤正人</u>
2014年	運動器疾患/骨・関節フォーラム 名古屋	【講演】変形性膝関節症 治療の実際と未来医療	<u>佐藤正人</u>
2014年	第32回日本骨代謝学会学術集会	【カレントコンセプト】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	<u>佐藤正人</u>
2014年	第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学	【シンポジウム】細胞シートを用いた関節軟骨の修復再生	<u>佐藤正人</u> , 三谷玄弥, 高垣智紀, 海老原吾郎, 浜橋恒介, 持田讓治
2014年	東海大学医学部付属病院 抗加齢ドック設立8周年記念講演会	【講演】メタボより怖い口コモってなに? 運動器疾患の予防と未来医療	<u>佐藤正人</u>
2014年	大和市整形外科医会	【特別講演】軟骨再生医療の現状と展望	<u>佐藤正人</u>
2014年	金沢区整形外科医会	教育研修講演】再生医療で変形性膝関節症は治るのか?	<u>佐藤正人</u>
2014年	第87回日本整形外科学会学術総会	レーザー誘起超音響法とMRIによる変形性膝関節軟骨診断の比較検討	横山宗昂, <u>佐藤正人</u> , 谷良樹, 高垣智紀, 鶴養拓, 三谷玄弥, 今井裕, 山下智裕, 持田讓治
2014年	第87回日本整形外科学会学術総会	DT imagingによる関節軟骨損傷の検討	鶴養拓, <u>佐藤正人</u> , 三谷玄弥, 高垣智紀, 芹ヶ野健司
2014年	日本組織培養学会第87回大会サテライト	【シンポジウム】関節軟骨を再生する医療技術の開発状況	<u>佐藤正人</u>

	シンポジウム		
2014年	東海大学医学部附属病院 第4回医療連携セミナー	【講演】軟骨再生医療の現状と未来	<u>佐藤正人</u>
研究分担者 阿久津英憲			
2014年	12 th Annual Meeting of ISSCR	Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors (F-2142)	Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, <u>Akutsu H</u>
2014年	第59回日本生殖医学会学術講演会	生殖医学におけるES細胞とiPS細胞の意義	<u>阿久津英憲</u>
研究分担者 長嶋比呂志			
2014年	第41回日本臓器保存生物医学会学術集会	受精卵凍結保存のノウハウは組織・臓器の保存にどこまで応用可能か？	<u>長嶋比呂志</u>
研究分担者 加藤玲子			
2015年	The 54 th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells	Miyajima-Tabata A, Kawakami T, Komoriya K, <u>Kato R</u> , Niimi S, Isama K
2014年	Eurotox 2014	Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials	Miyajima-Tabata A, <u>Kato R</u> , Komoriya K, Niimi S
2014年	第36回日本バイオマテリアル学会	ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索	<u>加藤玲子</u> , 藪島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾
2014年	第36回日本バイオマテリアル学会	血液適合性評価におけるHEMA/MEAランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカの挙動について	宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, <u>加藤玲子</u> , 新見伸吾
2014年	第41回日本毒性学会	酸化金属ナノマテリアルに対するTHP-1細胞の細胞応答	宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, <u>加藤玲子</u> , 新見伸吾, 伊佐間和郎

議事録

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業
【関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現】
平成 26 年度 第 1 回班会議

日時：平成 26 年 11 月 6 日（木）14:00～16:00

場所：霞ヶ関ビル 35 階 東海大学交友会館【三保の間】

出席者：光島健二、花井荘太郎、木下奈津美（医薬基盤研究所）

長嶋比呂志、前原美樹、高草木大地（明治大学）

加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

丸木秀行、小久保舞美（東京女子医科大学）

的場亮、平賀育英、伊東紀子（DNA チップ研究所）

橋本せつ子、初岡政典、菊地鉄太郎、高野りや、河毛知子、

佐藤千香子（セルシード）

佐藤正人、豊田恵利子、岡田恵里、白砂早織、渡部綾子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：渡部綾子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告

（1）「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

私共の厚労科研究事業は今年度で 3 年目になり、進捗は順調です。まずは研究事業の概要をご説明いたします。PO の先生方には、本日の資料と議事録を後日お送りいたします。

現在、細胞シートは自己細胞で臨床研究を実施しています。3 層に積層化したものを患部に貼って治すという方法で非常にシンプルな系で行っています。軟骨細胞シートは、動物実験において、軟骨の全損欠損と部分損傷の両方に作用するというのがユニークな点です。世界中で既に行われている軟骨の再生は、全損欠損を対象としているものです。部分損傷の方が治すのが非常に難しいと言われていたのですが、私共の軟骨細胞シートは、全損欠損と部分損傷の両方に動物実験で効果があることを確認しています。また、臨床研究においても変形性膝関節症に適応していて、そのような患者さんを集めて軟骨の欠損部に対して移植するというような研究をしています。この部分損傷にも効果があった結果は、以前 BBRC の雑誌の紙面で取り上げられました。

各国で承認されている主な再生医療製品ですが、軟骨に限ってもかなり多くのところが

行っています。日本で昨年保険収載されたジャック®も、外傷あるいは離断性骨軟骨炎のものが対象で、変形性関節症は対象外となっています。また世界のこのようなメーカーもほぼ全て外傷の軟骨損傷が対象であって、変形性関節症に踏み込んだものはありません。ジャック®の保険収載の要件設定に際して、整形外科学会で委員会を設置し、こういったものに適応するのかなどの事案を議論しましたが、「外傷性の軟骨欠損、離断性骨軟骨炎（変形性膝関節症を除く）」としっかり明記されていますので、私共の系は決してジャック®と同じではありません。対象疾患が明らかに違うということをご承知いただければと思います。

私共の自己細胞シートのヒト幹細胞臨床研究は、平成 23 年 10 月に厚労大臣の意見書の発布をもって約 3 年間施行しています。対象患者さんは 20-60 歳、対象は外傷または変性（変形性膝関節症を有した患者様も含まれています）により生じた膝関節軟骨損傷で、変形性膝関節症あるいは靭帯損傷で 10 年以上放置して明らかに不安定性が原因で膝関節症が進んでいるような患者様を対象としています。軟骨の欠損が 4.2cm^2 以下という大きさの制限が厚労省との話し合いの中で決められましたが、これは 1 枚の細胞シートでおおえる大きさでまずはやりなさいという事でこの大きさが基準となっています。エンドポイントの根拠は、安全性を見るための有害事象の頻度、術後 1 年までの臨床症状の変化、レントゲン、MRI、さらに私共のユニークな点は術後 1 年で必ず関節鏡でセカンドルックを行って直視下に再生した軟骨の粘弾性特性を超音響法で評価するという事です。その部分のバイオプシーを行い組織学的にもしっかり評価をします。手術は、骨切り術というアライメント矯正あるいは靭帯再建術をして、同時に合併する軟骨損傷に対して細胞シートを移植して、細胞を組織で評価する流れとなります。現在、5cm 程度切開し、直視下に細胞シートを移植しています。移植後 3 ヶ月もすると MRI で新しい軟骨の修復が確認できるようになってきます。大腿骨内課の加重部の軟骨損傷に対して、細胞シートを移植した 1 年後の結果です。上がお皿（膝蓋骨）で下が大腿骨です。お皿と大腿骨が擦れ合う、いわゆる PF 関節と呼ばれる部位は非常に治りにくいという事が従来の軟骨の再生医療では言われていますが、ここもきれいに治りました。先日、ドイツとオランダで講演した際にも、PF 部分の修復効果は非常に注目されました。術後 1 年のバイオプシー時には、再生した軟骨が盛り上がった感じで治っている事が多くあります。プローブで触れたり、超音響法で粘弾性特性を直接評価し、患者様の許可を頂いてバイオプシーを行い評価しています。超音響法の粘弾性特性では、厚さと粘弾性特性比が半定量的に分かり、プローブを変えると組織学的なプロパティの差も測定できます。私共と防衛医大との共同研究で開発したものを使用しています。組織学的にも Type コラーゲンで濃染され、組織染色のサフラニン O でも強く染まり、明らかに硝子軟骨で再生しているという事を確認しています。現在までに 11 例エントリーし、移植できたのは 8 例となっています。これは大きさの基準の 4.2cm^2 以下に合わなかった患者様 2 例と、1 例は基準細胞数に満たなかったという例がありました。11 月の末に 8 例目の最終の患者さんのセカンドルックでバイオプシーを予定しています。患者立脚型の術後の評価ですが、これは患者さんへの問診で、こういった日常生活に影響が

あるのか、またスポーツアクティビティなどを点数評価したものです。おおむね術後 3 か月以上経つと、ほぼ術前より回復してきています。

こちらは、先日の再生医療学会の市民公開シンポジウムでの 6 例目の患者さんの VTR 紹介です。この患者さんは両膝手術されていて、片方は骨切り術のみでシートの移植には損傷の大きさが対象には合わず、もう片方は 4.2cm² のサイズに適合したので再生の治療を合わせて行いました。全て東海大で手術しています。

自己細胞シートは非常に成績が良いのですが、自分の細胞で治す限り目の前の病変を直ぐに治療できない問題点があります。また、自分の組織を犠牲にするので正常な部分から採取できる大きさには限界があり、また悪くなったときに繰り返し治療を受けることはできません。さらに、必ずしも活きの良い細胞とは言えませんし、高齢者の変形性膝関節症の患者さんでは 7 番染色体のトリソミーや遺伝子異常も頻繁に認める事があるため、そのような細胞を自分の細胞だから自分に戻して良いのかという問題もあります。

私共が現在取り組んでいるのは、同種の軟骨細胞シートです。私共が着目しているのは多指症患者様由来の細胞です。この細胞を 1 度凍結保存して、十分に細胞シートの特性や安全性を評価し、必要な時に培養してシート状にしたものを移植するという事を考えています。将来的には、細胞シートの状態になった所で保存出来ないかと考えています。ヒト幹細胞臨床研究を始めるにあたり、厚労省と細胞ソースを何にするかについて相談しました。多指症由来のもの、地域ごとにあるボーンバンクの骨に付いている軟骨、あるいは既に海外でチップ状にして売られている軟骨を輸入して使用する等の 3 つを提案しましたが、トレーサビリティの観点から、自施設内で得られる手術時に廃棄処分となる多指症の軟骨でという方向に決まりました。

共同研究先である阿久津先生と梅澤先生の国立成育医療研究センター研究所からサンプルをたくさん頂き、安全性のチェックを行いました。36 例以上検討し、多指症の細胞が使えるということになりました。この細胞は非常に良く増えます。あくまで予測値ではありますが、パッセージ 2 (P2) で 2 週間の培養で細胞シート 745 枚分、P3 まで含めると 8000 枚近く 1 本の多指症由来の軟骨から作製できることが分かりました。自分の細胞で治す場合、これまで臨床研究で患者さんに移植できたのは 2-6 枚でしたので、この数値は非常に驚くべき数であると思っています。超免疫不全マウスの NOG マウス皮下に移植して腫瘍化しないこと、また IVIS システムを用いて移植細胞の残存する細胞を観察したところ 21 ヶ月以上関節内に留まって他に転移しないことなど、安全性評価として確認しました。平成 26 年の 8 月 6 日に同種細胞シートのヒト幹細胞臨床研究の承認を得ました。これは 27 年度中に実施予定だったところ、非常に早く安全性の確認ができたので今年度申請し承認を得ています。現在、移植に適した細胞の選定準備に入りました。8 月 16 日の読売新聞の一面でも紹介され、同種細胞シートの臨床研究が始まるという事を取り上げて頂きました。東海大での多指症の手術症例は年間 10 症例程度ありますので、形成外科の先生とタイアップして、院内で協力体制を整えて準備を進めているところです。

私共は、変形性膝関節症は単なる軟骨損傷だけではないので、患者様には O 脚をアライメント矯正し不安定性を治して、同時に軟骨が無い所には移植して治すという方法で行っています。変形性関節症はリウマチまではいきませんが、炎症あるいは血管新生などがあります。こういった変形性関節症にトータルで取り組むという事を考えて、Anti-VEGF の抗体(市販薬)が変形性膝関節症に効果があることを動物実験で確認したところですので、再生医療と一緒に使うことも視野に現在検討している所です。

自己細胞シートは平成 23 年 8 月に承認されて現在 8 例の移植が完了し、有害事象はなく本年 11 月末で 1 年フォローアップが終了して臨床研究を完了する予定です。現在、先進医療として実施するために、病院長、医学部長などの了解を得て学内会議に諮る準備をしているところです。同種細胞シートに関しては、ヒト幹細胞臨床研究として今年度 8 月に承認されて、現在移植に適した細胞の選定作業を開始したところです。

(2)「ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究：長期保存の実現に向けての基礎的検討」

研究協力者 前原美樹(明治大学)

私共はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究を担当しています。長期保存の実現に向けての基礎的検討を行いましたのでご報告いたします。研究背景として、軟骨細胞シートの凍結保存が実現することによって、細胞シートの作製と移植時期の調整が容易になる点や、治療用シートのストックが可能になる事で、同種移植の促進が可能になると考えられます。実用的な細胞シートの凍結保存方法の確立が不可欠な課題となっています。

我々は、これまでに細胞シートのガラス化保存に受精卵を凍結保存する技術を応用してきました。対象の細胞に対して、なるべく容量の少ないガラス化保存液で保存する(ミニマムボリュームクーリング)により細胞の生存性が保たれるコンセプトが受精卵の凍結保存法であり、それを細胞シートに応用して研究を進めています。また、ガラス化の効果の非常に高いカルボキシル化ポリリジン(化合物)を用いて、細胞シートのガラス化保存に応用し、これらが細胞シートガラス化保存のポイントとなっています。2011 年に特許出願し、2013 年には BMC Biotechnology で論文が掲載されました。

今年度の取組みとして、実用化に向けた改良研究、実用的な細胞シート凍結保存デバイスの開発、融解した細胞シートの機能解析を行ってきたので報告いたします。実用化に向けた改良研究は、細胞シートをガラス化保存する際のガラス化処理時間について検討しました。これまで 1 枚の細胞シートをガラス化保存するのに、ガラス化保存が完了するまで 45 分と非常に時間が掛かっていたため、操作の簡略化を目的としてガラス化処理時間短縮の検討を行いました。結果、ガラス化処理の時間を約半分の 23 分に短縮しても、細胞シートの生存性を高く保つ事ができることが分かりました。ただし、ガラス化保存状態が不安

定なサンプルも数枚出てきたため、今後は最適な時間の条件検討が必要であると思われる。また、これまで積層化細胞シートを用いて検討してきましたが、より薄いシートを想定して凍結保存方法を応用できるかを検討しました。非積層化細胞シートでも、ガラス化によって構造が崩れず、生存性も低下することはなく保存できることが分かりました。この実験に関しても、ガラス化の処理時間の短縮の検討を行ったところ、45 分間から 15 分に短縮することが可能でした。

シートの長期保存を目的とした細胞シートのパッケージング素材と保存方法について、食品用ラップフィルムとアルミホイルを用いて液相内での保存による細胞シートの構造変化と細胞生存性について確認しました。予め液体窒素の蒸気で細胞シートをガラス化した後に液体窒素に浸漬する方法（液相内保存）を試しました。液体窒素に浸漬すると、ラップは一部の細胞シートで破損してしまったものがありましたが、アルミはシートが破損することなく保存が可能でした。しかし、アルミでパッケージしても、予め液体窒素の蒸気で細胞シートのガラス化処理をしていないと、液体窒素へ浸漬させた際に破損してしまいました。パッケージングの素材として、アルミホイルが有用であること、予め液体窒素の蒸気でガラス化処理されていれば、液体窒素の気相中、液相中でも保存に耐え得る事が分かりました。また、これまで手作業で少量ずつ作製していたガラス化保存液について、今後安定的に大量処理することを想定して、市販のガラス化保存液の効果の比較検討を行ったところ、同等の成績が得られ市販品を使用できることが確認できました。

次に、実用的なガラス化凍結保存デバイスの開発では、凍結保存デバイスの作製を行いました。イメージとして箱型のデバイスを現在作製中で、箱の中に引出し状のラックが複数個入っているようになっています。1つのラックの中に1枚の細胞シートの保存が出来るようになっています。液体窒素のタンクの中に箱ごと収納することができます。タンクの半分程度液体窒素を入れると上部の気相の部分が 150 くらいに冷却されるので、気相中で細胞シートを大量に保存できるというものを現在開発しています。実物は、来週納品予定となっています。このデバイスが完成することによって、より長期的に細胞シートを保存することが可能となり、長期保存した細胞シートの融解後の機能性評価ということを今後中心に行っていく予定です。

細胞シートの融解後の機能解析についてですが、細胞シートから生産される TGF- β の生産量を測定することによって評価しています。凍結保存後の細胞シートにそれぞればらつきがないということを確認しています。細胞シート融解後の生存性を Live/dead 染色法によって評価しています。現在は非ガラス化細胞シートを用いて条件検討を行っているところです。今後、ガラス化された細胞シートに応用して機能解析の評価を進めていく予定です。

今後の計画として、細胞シートをより長期的に保存することを目標として、加えてガラス化された細胞シートの融解後の機能解析を行っていきます。実用的なガラス化保存装置の開発も視野に入れていきます。最終目的としては、ヒト細胞への応用となります。

<質疑応答>

佐藤：ヒト幹細胞臨床研究で同種細胞シートが承認されましたが、細胞の状態でストックし、それを患者様がいらっしゃった時に3週間かけて培養して移植するというやり方です。明治大学との共同研究は、最終的に細胞シートごと保存するということを目標に行っている研究になります。

光島：確認ですが、ヒト細胞シートはこれからということで、今はウサギの細胞シートということですね。

前原：はい、そうです。

光島：ヒトの細胞シートは薄いので、ウサギの方で3層、2層、単層ということですね。ヒトの場合はやはり3層が基本ということになりますか。

佐藤：そうですね。自己細胞は3層なのですが、同種は自然に重層化してきますが、それでもだいたい3層くらいと考えていいかと思います。

光島：ヒトの細胞シートはいつごろになりますか。もうすぐ取り掛かれる状況なのですか。

佐藤：ヒトのサンプルを他施設に出して実験するには両方の倫理委員会を通したりなどでなかなか時間が掛かってしまいます。前原さんは来年度から東海大で研究員として働く事になりますので、そこはスピードアップできると思います。

光島：凍結融解のところですが、前回報告されたと思いますが凍結融解条件の基本はほぼきまったと思ってよいのですか。

長嶋：はい。条件は決まったと思います。当初はほとんどヒト幹の申請段階に入っても凍結したシートは使われるか分からないし、おそらく手作業的に作るものになるであろうと。PMDAの嶽北先生のお話にもありましたが、そうなると衛生条件を担保するためには液体窒素に漬けるのは厳しいとのご意見があったので、液体窒素蒸気で長期保存するというのを前提としました。このところ佐藤先生と相談しましたが、場合によってはメーカーの力を借りて完全に密閉できるパッケージを考えようということにもなってきています。完全に密閉してあれば、液体窒素に漬けても衛生条件は担保されますから、実験段階ではありますが、今後液体窒素の蒸気で保存するとなっても、液相に漬けることになっても、どちらでも対応できるだろうと思います。パッケージ素材としては、実験当初は食品用ラップで始めましたが、アルミが一番扱いやすく性能も良いので、アルミの薄膜のようなパッケージを作れば臨床に十分適応に向かだろうと確定したと考えています。

花井：製品化を目指すのであれば、ある程度規格を決めていかないといけないのではありませんか。

長嶋：はい。

花井：方向性を決めておかないと、あれもこれもあるとなると、全部検討するのは大変ですよね。ガラス化して、液相で、アルミホイルパックで、基本的にはヒト由来細胞は3層でということが最終形と考えてよいのですね。

長嶋：最終形は、そのようなイメージを持っています。どういうメーカーさんが協力して

くれるか、パートナー選びといたしますか。

花井：例えば、メーカーとしての製造工程の管理とか扱い易さとか、実際に製造されるメーカーさんのご意見は伺っているとかないのですか。

長嶋：大手医療機器メーカーの技術系の人と佐藤先生も含めて話をした事がありますが、あまり食いつきは良くなかったです。

花井：会社となると、コストとか技術とかそういうものがたぶんあるので、またちょっと違った視点が得られるのかなと思ひまして。是非、いろんなところにあたられるといいのかなと思ひます。

佐藤：ありがとうございます。今回長嶋先生には、気相と液相の両方を検討して頂きました。今日はバンク化の話は議題にはありませんでしたが次回ご説明したいと思ひますが、今東海大では専用のタンクを購入してバンキング出来るようなシステム作りが大体整って、コールドランの時から保存に使うという取組みで行っています。

光島：以前の時に大日本印刷が共同研究でスタートされると聞いたのですが、大日本印刷はどういった役割分担をされるのでしょうか。

佐藤：パッケージングのところですか。長嶋先生のこうした技術を優れたパッケージングで活かせるメーカーであればどこでも良いと思ひます。大日本印刷さんの社内事情等もありまして、共同研究契約はありますが、そこと進捗は確認しながら少しずつ進めるという形になっております。

光島：アルミパッケージのところも担当されるのでしょうか。

佐藤：凍結のところに関しては、長嶋先生にご提案頂いたやり方が良さそうですけれど、医療現場となると何重にもパッケージングされるものになりますので、こういった物が最終的に良いのか、いろいろ工夫が必要になってくると思ひます。

的場：長期保存用の入れ物を新しく開発されているということで、構造的なもので何か特徴があるのでしょうか。

長嶋：はい。細胞シートの凍結というのは、お金を掛ければおそらく自動化できると思ひます。細胞の普通の凍結は、バイアルの様な物をフリーザーに入れるとか液体窒素にボンと入れるとか、容器の中で徐々に凍っていく、あるいは瞬間に凍っていくというのが凍結のイメージだと思ひます。細胞シートは容器の外、つまり実験室の環境の中でオペレーターがデリケートに扱いながら容器の外で一旦凍結が完成するわけです。その後に、液体窒素のタンクなどにしまわないといけません。しまう間に溶けてしまうので、目の前で溶けないようなアイスボックスのようなものに一旦入れて、それを持って数歩移動出来る程度にしないと、フリーザー等にしまうにしても出来ません。作製したのはただの箱に見えますが、ドライシッパーという液体窒素の吸収材がぎっしり詰まっていて、箱そのものが非常に冷気を保ちやすい構造になっています。引き出しの中にシートを入れてしまえば、その中は非常に低温に保てますので、その状態で液体窒素タンクの中にしまい込むためのものを作りました。見た目は簡単ですが、中身は手が込んでいます。

的場：温度コントロール出来ている箱ということですね。

長嶋：そうです。これをタンクにしまうのか、あるいは太陽日産に相談したのですが、iPS用のフリーザーが既にあるので、多分それをそのまま流用できるのではないかと思いますと聞いています。あの箱で、大量に処理するようなものがおそらく作れるであろうと思います。メドはたっているのですが、あとはどの程度メーカーが協力してくれるかによります。

的場：或いは、シート状の細胞に特徴的にカスタムメイドしているというものではないのですね、今のところ。

長嶋：カスタマイズされています。非常に弱いので、アルミでパックしても加重で割れますから、シート用に1枚が1つの引き出しに入っているような感じになって、大事に守られるよう担保されています。

加藤：これまでガラス化保存液はカルボキシルカポリリジンなど色々検討されて最適化したと認識していますが、市販のガラス化保存液でも同じようにガラス化出来たというのは、市販品は先生方の組成と同じなのでしょうか。

長嶋：全く同じです。バイオベルテという会社から、カルボキシルカポリリジンの粉末を我々が供給を受けていて、ポリリジンを供給している会社に溶液を作製して頂きました。彼らの得意の分野ですので、全く同じ組成で作っています。いわゆる、市販化された商品にはなっていませんが、そういう培地メーカーのような所できちっと作れるという事を確認したので、今後大量消費の段階になっても大丈夫だろうと思います。

佐藤：融解時の白濁の原因は、何でしょうか。

前原：シートが白濁するという事は、ガラス化状態がきちんと成立していないという事で、原因としてはガラス化処理液が細胞に染込んでいないこと、温度の下降が不完全であったなどが考えられます。先ほどのガラス化状態が不完全だったというのは、処理時間が短かったために、細胞へのガラス化液の浸透が十分でない状態でガラス化してしまうと、白濁して細胞の生存性が低下してしまいます。

(3)「多指症軟骨由来細胞シートの作製」

研究協力者 岡田恵里（東海大学）

多指症軟骨細胞シートの作製についてご報告いたします。多指症軟骨由来細胞から多指症軟骨細胞シート作製を検討して、CPCのコールドランの準備を整えました。前回までの報告の内容ですが、多指症軟骨由来細胞の安全性評価をGバンド、アレイCGH、NOGマウスで行い安全性を確認し、多指症由来の細胞を細胞ソースとして採用しました。実際の細胞の増殖性ですが、継代しても増殖性を維持しています。増殖性が良いので、細胞ストックを作製可能であることが分かりました。バンキングシステムの目的としては、いつでも、どこでも、どの年齢の患者様にでも治療できる事を期待して細胞ストックを作製します。あらゆる検体の細胞を集めることにより、より安全性や質の高い細胞を選択すること

ができます。選択した細胞を移植用の細胞としてストックできます。バンキング化による細胞への影響は、細胞を起こした時の生存率は97%以上あり、その後培養すると増殖性も3-5日でサブコンフルエントになり、継代が出来る量まで増え、実際播種した量の7-8倍ほど増殖しているので細胞をストックすることは問題ないと思います。

次にシート作製の最適化を検討しました。検討項目として、日数と播種数、積層化の有無を条件にしました。結果は、14日間で 1.0×10^4 cells/cm²で播くと、積層化しなくても自然に重層化したシートが作製できました。自然に積層化した多指症の細胞シートと自己細胞の細胞シートと比較してみると、自己細胞は3層積層化シートで 2.32×10^6 の細胞数で生存率が93.4%、多指症細胞シートは単層シートでも 1.73×10^6 の細胞数で生存率が97.5%と、自己細胞シートに比べ単層でも同等もしくは同等以上の細胞シートを作製できることが分かりました。シート作製の条件を纏めると、自己の播種細胞数 5×10^4 cells/cm²が、多指症細胞だと1/5量の 1×10^4 cells/cm²でできます。培養方法は、自己細胞は滑膜を共培養に使用しましたが、多指症細胞では共培養は必要ありませんでした。また、シートの作製は多指症細胞だと事前にバンキング化してストックをするので、患者さんが決まり次第、細胞シートを移植出来るようになります。シートも3層から1層になることで、積層化という人為的な操作段階を1つ省く事ができ、その面でも省力化が図れることとなります。また、シート作製日数も、短縮できることとなります。シートの作製枚数ですが、自己細胞も多指症細胞も個人差がありますが、多指症細胞だとバンキング化により事前に安全性を確認できますし、シート作製枚数も自己で1枚作製する細胞量で、多指症細胞は15枚できる計算となります。この条件で「同種細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」を申請し承認されました。

全体の工程は 多指症細胞から細胞を凍結するまでの段階、 実験室でバリデーション試験により安全性と質の良いものを確認して移植に用いるかの適正判定の段階、 患者様が決まったら移植に適した細胞を起こして培養しシートを作製し品質確認ができたものを移植する段階の3つとなります。この工程内検査で安定性試験やエンドトキシンなどの各種の試験で安全性の担保を取ります。

CPCでのコールドランは、3つの工程を全て行います。本来ならば、昨日予定していましたが、患者様の体調により中止となりました。いつでも開始出来る準備を整えています。

本年度は、細胞ソースの評価と増殖性の評価を行い、CPCでのコールドランの準備もできています。次年度は、細胞を収集して評価をしていきます。

< 質疑応答 >

花井：自己細胞と、多指症由来の細胞では増殖性がかなり違う原因は、多指症の方が小児だからということなのでしょうか。

佐藤：はい、そうですね。全然、活きが違います。やはり、細胞自体が未分化なものも勿論ありますし、指の軟骨のプロパティチェックをしています。小児の関節の部分ですと、

軟骨になる部分と骨になる部分が多少含まれているのではないかという点を非常に気にして、そういったところのプロパティチェックを沢山しているところです。キャラクターが同じでありながら見た目は同じ軟骨ではありますが、全然違います。

花井：そうすると安全性上の懸念として、異所性に骨化を起こしてしまうのではないかということが懸念されますか。

佐藤：ただ異所性の骨化に関しては、Type10 コラーゲンや Runx など骨になるようなものは強くは発現してないので、異所性骨化を起こすような事はないと思いますし、関節の中に MSC に近いものがあったとしても関節内に移植したものが骨化を起こすようなことはないと考えています。別の実験で、あまり沢山 MSC を関節内投与すると小さな軟骨の塊ができる、それは細胞浮遊の状態で 10^7 レベルのような非常に高密度で入れると軟骨の欠片が沢山できるという報告はあります。

光島：確認ですが、軟骨組織を採ってきて、ゆくゆくはシングルセルになるまで純化されるのでしょうか。

岡田：多指症細胞は手術室で医師によって軟骨組織を採取して頂いて、コラゲナーゼ処理でバラバラにして、それをストックして実際に安全性と品質検査でその細胞が適しているかどうかを判断します。

光島：シングルセルアイソレーションというか、個々の細胞からスタートしていると思うてよいのですか。コラゲナーゼ処理でバラバラにした時に、一部の集団の塊を持ってくるのか、細胞一つ一つを分けて持ってきているのか。

佐藤：それは、1 細胞由来ということでしょうか。1 細胞由来という事ではありませんが、ストックは 10 の何乗かレベルではしています。

光島：スタート時は、いわゆる細胞集団なのですね。

佐藤：そうです。一応その集団をもって、同一ロットであるとしています。

光島：バンキングなのですが、一人の多指症の患者さんから幾つかコラゲナーゼ処理した塊を数個とって安全性評価までもっていくのか、一人の多指症の患者さんには一つの組織由来の細胞単位としてやられるのか、どういうようにするのでしょうか。

岡田：一人の患者さんに対して 1 つの塊とみなして、コラゲナーゼ処理の時点で組織全体を同じ液で溶かすので、一人の患者さんは 1 ロットで、バッチのように細胞数が取れると、ストック時点で一人の患者さんから 5 本とか、多い方だともっと本数が取れるようになります。均一という事で管理します。

光島：今まで何例くらい多指症患者さんのストックがあるのでしょうか。

佐藤：ヒト幹が通ってからは、実は昨日第 1 例目だったのですが、患者さんが熱発してキャンセルになってしまいました。そのために CPC のサニテーションなど準備していたのですが、延期になってしまいました。

光島：今ご説明頂いていたのは、こういうふうにやりますよということなのですね。

佐藤：そうです。安全性のことがあって、今までの積み重ねが成育とありますので、同じ

事を CPC 内でやるというところを準備しているところです。

光島：計画では、何症例くらい多指症の患者さんの組織を banking される予定なのですか。

佐藤：厚労省に出しているのは、20 症例です。東海大の年間の多指症の手術件数が大体 10 例程度です。ただ、多指症の組織は大きいものから小さいものまで様々ですので、あまり小さいと評価もできない事が予想されるので、この件数を取らせていただく事になっています。

花井：細胞としては、1 症例 1 ロットで症例を集めるのでしょうか。

佐藤：ある程度ストックをして、一番良い細胞で何人かの患者さんを治したいと思っていますので、その為にも一番良い細胞を得るために 20 症例くらい計画しています。

光島：一番良い細胞というのは、移植される患者さんと細胞ストックの何をマッチングして見られるのですか。

佐藤：マッチングのところは、実際やってみないと分からないところがあります。ただ、細胞シートの質の評価に関しては、自己細胞の時のデータもあり、見た目にも培養の仕方が全然違った多指症由来の細胞シートができあがっていくので、その条件設定もかなり最適化されていますので、過去の自己の細胞とのデータを見比べながら一番良いものという形にしたいと思っています。

光島：前回の発表で、低酸素環境下で生育が良いとありましたが、あの成果はこちらでは検討しないのでしょうか。

佐藤：低酸素下でとなると CPC 室内に装置を持ち込む必要があって、それはかなり大変なことです。基礎研究レベルあるいは将来的な発展としての選択肢はあると思いますが、今現在 CPC にその装置を持ち込むというのはバリデーションのやり直しなどあって現実的ではないので、この事業には入らないと思います。

(4) 「多指症軟骨由来細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 (その3)」

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、多指症軟骨由来細胞(PDCCs)が同種 T 細胞に及ぼす影響について検討していますのでご報告いたします。

これまでに、自己の軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生の有効性が示されてきていますが、この技術の再生治療の将来的な普及を考えると、同種細胞移植が必須になると考えられます。同種細胞利用の利点ですが、予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、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、品質の良い細胞の選択も可能になることが考えられます。

現在、同種細胞移植の細胞ソースとして多指症軟骨由来細胞を考えています。これは優れた増殖性を持ち、手術時廃棄組織であることから、倫理上の問題も少ないと考えられま

す。しかしながら同種細胞を移植するということで、拒絶反応を引き起こす可能性があるということが懸念されます。そもそも軟骨細胞は、経験上免疫応答が低いといわれている組織ですが、宿主内でこの軟骨細胞が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かったことから、同種軟骨細胞およびその積層化シートが免疫応答に及ぼす影響をこれまでに *in vitro* で検討してきました。

マウス、ウサギおよびヒトの軟骨細胞シートが T 細胞に及ぼす影響を見てきましたが、T 細胞の活性化を惹起しない、活性化した T 細胞の増殖も抑制する報告をしてきています。また、患者さん由来の積層化シートで、液性因子である TGF- β 1 が高発現しているという報告があることなどから、TGF- β 1 を抑制効果に關与する候補因子の一つと考えています。

このように、PDCCs は活性化 T 細胞の増殖を抑制できるということから、抑制機構のメカニズムの解明をめざしたいと思っています。変形性膝関節症の患者さんの場合、病態の周辺部は炎症が起きていますが、炎症には T 細胞など他の免疫細胞も関わっているのですが、そのような活性化を抑制できれば、移植した軟骨細胞シートが構造的に治療部分に役立つだけでなく炎症なども抑制できればと考え、この抑制メカニズムを解明することを一つの目標として研究を行っています。まず、メカニズムの一端として、液性因子の影響をみました。TGF- β 1 が高発現しているということから、TGF- β mAB(中和抗体)を培養液中に添加することにより、培養反応中の TGF- β レベルを低下させることで、PDCCs による増殖抑制効果が減弱するかどうか、さらに積層化軟骨細胞シートでは、PGE2 の発現も高いと報告されていたので、アラキドン酸カスケードの PGE2 の上流にある、Cox2 のインヒビターである NS398 により PGE2 量を減少させることで、同様に PDCCs による増殖抑制効果が減弱するか、さらに両方を同時に抑えることで、PDCCs による増殖抑制効果が減弱するか、ということを確認しました。

実験方法は、T 細胞と樹上細胞を混合培養（リンパ球混合培養）すると T 細胞が増殖します。そこに多指症軟骨由来細胞を共培養すると、T 細胞の増殖が抑えられることがこれまでに分かっています。この培養系にさらに TGF- β の中和抗体、もしくは同時に Cox2 のインヒビターを加えることで、この反応が抑制されたままになるのか、もしくは抑制効果が減弱して T 細胞の活性化が起こるかというのを細胞増殖解析により確認しました。その結果、TGF- β 中和抗体により、培養液中の TGF- β 1 量は MLR のみと同等レベルまで低下している環境下でも、MLR と PDCCs との共培養系で抑制されていた T 細胞の増殖活性には影響がみられない、つまり抑制されたままであるということが示されました。さらに NS398 を添加して PGE2 量を減少させても、PDCCs により抑制されていた T 細胞の増殖活性には影響がみられず、抑制されたままでした。次に、TGF- β 中和抗体と Cox2 インヒビターを加えて、TGF- β 1 および PGE2 を同時に抑制しても、有意な差はみられず、PDCCs による T 細胞増殖抑制効果には影響がみられないという結果が得られました。これらの結果より、今回のように接触培養条件下においては、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果には、TGF- β 1 だけでなく PGE2 の寄与も少ないことが示唆されました。

一方、間葉系幹細胞はもともと免疫原性が低く免疫細胞の活性化を抑制するという性質を持つ細胞なのですが、その免疫細胞活性化抑制効果には液性因子による抑制と、接触到依存した抑制の両方の関与が示唆されています。このことと今回の結果から、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果には、液性因子よりも接触到依存した抑制の経路が強く関わっている可能性が考えられます。今後、非接触培養条件下にて検討すること、また別ルートからの検討も考えています。プレリミナリーなデータになりますが、これまでの結果から成人の軟骨細胞では T 細胞の活性化した状態での増殖活性を数パーセントまで抑えることが分かっているのですが、PDCCs は MLR との共培養系では T 細胞の増殖 20%ほどまで（他のロットでは 50%前後もあった）しか抑えていない結果をえられています。しかしながら、この系においては、PDCCs 自身の BrdU 取り込みも加味した値になっていることから、これを差し引くために PDCCs の増殖を抑制してから、MLR との共培養実験を行いました。増殖の抑制にはマイトマイシン(MMC)処理をすることで、PDCCs 自身の増殖を抑制しました。すると、増殖抑制した PDCCs では、活性化 T 細胞の増殖抑制効果が減弱していました。X 線照射により増殖抑制した PDCCs でも、増殖抑制効果が弱まる傾向が観察されたことから、PDCCs はそれ自身が増殖しない状況になると、抑制効果が減弱する可能性が高いことが考えられました。これまで、MSC や成人の膝軟骨細胞は増殖抑制しても活性化 T 細胞の増殖抑制効果にさほど影響はなかったということがあるので、PDCCs は大人の軟骨とは若干違ったキャラクターを持っているのではないかということを感じています。これらのことから、増殖抑制有り無しとの PDCCs 間で、タンパク質もしくは RNA 発現の網羅的比較解析を行うことで、両者間で発現に違いのある分子を探索しようと思っています。発現に違いのある分子の中に増殖抑制に関わる候補因子が含まれる可能性は高いと考えられ、抑制機構のメカニズムの解明につなげたいと思っています。

< 質疑応答 >

佐藤：細胞をシート化すると、マトリックスができますから、細胞としての活性という増殖が止まる方向にいきます。多指症由来の細胞シートでの系というのでも検討するという方法でよいのでしょうか。

加藤：はい。是非やらなければならないと思っています。マトリックスが出てきて、単層培養しているのとは違う状況というのもありますので、その状況下での比較も重要かと思えます。

的場：同種の場合は単層でも移植できるような感じですが、分泌されているものが同種と自己と違うという印象なのでしょうか。

加藤：今回の結果からは、自己と同種で分泌されるものが違うとは言えませんが、どちらかと言うと多指症は液性因子というよりは実際に接触することで抑制している方が強いような印象が今のところあります。もう少し詰めた実験をしないとハッキリ言えませんが、若干、間葉系幹細胞や大人の軟骨細胞とは抑制のメカニズムも違うのではないかと

思います。何が関与しているかは、今のところお答えすることができません。

佐藤：免疫抑制の効果があることは、確かなのですよね。

加藤：そうですね。はい。

(5)「アレイ CGH 解析による軟骨培養細胞の品質評価」

研究協力者 伊東紀子 (DNA チップ研究所)

軟骨培養細胞に特化した解析の設定値とカスタムアレイ作製について発表いたします。アレイ CGH 実験と解析の概要になります。本研究では、リファレンスゲノム DNA としてパッケージ 2 (P2) を使用します。テストサンプルとして P4,6,12 を使います。それぞれ異なる蛍光色素で標識し、競合ハイブリダイゼーションを行います。スキャナーでそれぞれの蛍光強度を読み取って、Cy5/Cy3 の \log_2 比をプロットします。実際のデータは図のようになり、染色体短腕から 10 プローブずつの移動平均をとると結果としてテストサンプルの増幅が認められれば + 方向へプロットされ、欠失が認められれば - 方向へプロットされます。差異を検出する解析アルゴリズム Aberration Detection Method-2 (ADM-2) を用いてアベレーション (\log_2 Ratio の変化が大きい) 領域を検出します。続いて Agilent 社が行った解像度を示すデータになります。リファレンスに HAPMAP DNA の健常のものを、テストサンプルに HAPMAP DNA 一卵性双生児 (片方が健常で片方が 22 番染色体に Partial trisomy を持っている) の各混合比を 10% ずつ変えた計 11 サンプルを用いた実験の結果になります。10% ずつ Partial trisomy の割合を増やしていくと、それぞれ + 側に線が別れて引けますので、こちらのアレイは 10% の差を検出できることになります。

解析の設定値の検討を行いました。プラットフォームとしては、Agilent 社のカタログアレイを用い、サンプルはリファレンスに HAPMAP DNA の健常人、テストサンプルに骨肉腫の DNA を用いています。Moving Average を染色体 1 番から Y 染色体まで並べた図になります。normal と dye swap を行い、ユーザー側で設定できる数値 (閾値: Threshold) を変え、6,7,8,9,10,11,12 とそれぞれ設定しました。例として Threshold 6 と設定した場合、normal サンプルでは 50 個 Aberration を検出し、dye swap では 41 個 Aberration を検出します。数だけ見ると差は 9 個なのかと思いますが、データを確認すると normal のみで検出されているものと、dye swap のみで検出されているものがあり、差を見ると 11 個ありました。この差というのは、擬陽性という事になり、Threshold 6 で設定すると擬陽性が 11 個あるということになります。同じ領域を判定していても、スタートとストップのポジションが若干違うことがあり、数えてみると 24 個ありました。グラフ化すると、Threshold の設定値を 10 にすると擬陽性が減ることがわかりました。Threshold の設定値を変えてもスタートとストップのポジションの違いにはあまり差は無いことがわかりました。そこで我々は Threshold の設定値は 10 が最適であると結論付けました。続いて Aberration call の際の疑陽性、疑陰性を排除するために使用する cut off の設定値ですが、通常の aCGH 解

析に用いる値にすると、軟骨の 7 番トリソミーが検出されないということがあります。Agilent の CGH 解析の解像度は 10% ですので、我々は 5% の差以内のものは擬陽性として排除するという cut off 値を設けたところ、7 番染色体のトリソミーも検出できることがわかり、軟骨培養細胞の品質評価に適した cut off 値として決定しました。

もう一つのトピックですが、品質評価に適したカスタムアレイの作製です。カタログアレイに搭載されている 6 万プローブが基本構成ですが、品質管理用に特化したアレイという事で、癌関連 1312 遺伝子のプローブ数については密に搭載しています。この 1312 遺伝子については 1 遺伝子につき 5 プローブ以上搭載する様に設計しています。このアレイは既に完成していて、8 比較の検討実験を行い既知の結果と同じであったことを確認しています。実験と解析の条件のまとめですが、佐藤先生の研究を始めて 3 年が経ち、実験のプロトコルや解析用のソフトウェアのバージョンが変わりましたが、我々は同じサンプルを用いて従来のバージョンと差が無いということを確認しています。ですので、実験は最新版を使用し、解析は Threshold が 10、cut off が 5% 以下を排除する値を設定値と定め、進めていきたいと思っています。

今後の展開としては、今回定めた設定値で多サンプルを実施しデータを蓄積することと、解析結果を比較し、妥当であり安定した結果が得られているかを確認したいと思っています。

< 質疑応答 >

光島：実際にこのシステムを用いて、多指症の患者さんのサンプルのバンキングの前の段階でチェックを掛けられるという理解でよいのでしょうか。

佐藤：バリデーションのところなので、そうです。

光島：実際にシート化するのには P2 でお聞きしましたが、パッセージの影響 P1, P2 もここで同時に分析して、実際使われるのは安全の為に P2 で行きましょうという判断基準に使われるということによろしいのでしょうか。

佐藤：はい。その通りです。

佐藤：私共、このアレイ CGH、G バンド解析と NOG マウスで安全性の担保として今回のヒト幹に申請しています。

(6) 「軟骨細胞シート専用器材の開発」

研究協力者 菊地鉄太郎 (セルシード)

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究の実現において、当社として専用の器材、治具の開発、臨床研究データを活用した軟骨細胞シートの製品化の検討につきまして協力したいと考えております。今年度から専用器材に関して着手していますので報告いたします。

従来の UpCell インサートで既存の培養器材ですが、実際は市販されている培養器材の表面に温度応答性ポリマーを固定しています。その為、市販の培養皿の培養面積 4.2cm^2 で、専用の 6 ウェルプレート上で培養する形になっています。この為、積層化やインサートのメンブレンを切り抜いたりする際に最適化されていませんし、 4.2cm^2 の培養面積より大きな軟骨欠損に対応できないという問題があります。また、1 枚のシートでも、6 ウェルプレートが必要となり効率の面からも最適化されていないということで、軟骨細胞シート専用の温度応答性器材が望ましいと考えています。こちらは自家の軟骨細胞シートを剥離する際の作業ですが、インサートのメンブレンを切り抜いて積層化しています。操作上のやり易さでこの様なやり方で行っていますが、既存の培養皿を用いていますので最適化されていないという事で、最適化した形状を考えていきたいと思っています。培養面積ですが、ジャックの審査報告書のデータですが、軟骨欠損のサイズとして 2cm^2 までは骨穿孔法が適応であり、 $2\sim 4\text{cm}^2$ までは自家骨軟骨柱移植術が適応であるとなっています。従来法では修復の難しい 4cm^2 以上のサイズの治療を目指すには、より大きな面積の温度応答性インサートが必要と考えられます。試作した大型の温度応答性インサートですが、手作りで作り始めて現在 3D プリンターを用いて 2 度ほど試作を行いました。この形状を色々と検討して、3 回目の 3D プリンターによる試作を現在検討しており、この大型の温度応答性インサートの設計の基本的な方針としては、現在行われている自己の軟骨細胞シートや同種の軟骨細胞シートの移植も始まりますので、現在使っているインサートと培養条件を踏襲したいことが設計の方針になっています。こちら、3D プリンターで 2 回目から 3 回目の試作では、インサート部の耳を扱い易さを変更、現在使っているインサートと培養条件を同じにする観点で下側の受け皿の培養表面と温度応答性インサート間の隙間を現行と同じ 0.9mm にする変更、容器内へのインサートの収まりを改善、培養容器の高さ自体を現行の 21mm へ近づける等の改良をして、現在 3 回目の試作を行っています。この様に 3D プリンターで形状を検討しており、次はプラスチックの射出成型に金型の作製を行って、実際に培養可能な大型のインサートの試作を行って行きたいと思います。

今後のスケジュールですが、大型インサートの試作は今年中に金型作製に着手して、金型によってできたプラスチックの射出成型を実際に使用して頂いて培養やり易さや細胞を実際に増殖するかなどの培養評価を行って頂き、それを元に改良を行い最終的には包装や滅菌の工程を開発して、材質試験や溶出物試験などの安全性試験を行って臨床研究や治療に用いられるものを作って行きたいと思っています。現在取り組んでいるのは、金型作製ですが、温度応答性処理条件については最適化を進めていく方針です。また、この様な器材を用いて臨床研究のデータを元に軟骨細胞シートによる関節軟骨治療の製品化の検討の方も行って行きたいと思っています。PMDA の薬事戦略相談で、実際にどの様なことを今後検討していけば治験や製品化に持っていけるか検討して行きたいと思っています。

<質疑応答>

光島：自家でやっているのは 4.2cm^2 以下で、他家の場合はどのくらいのサイズを考えているのでしょうか。

佐藤：他家の場合は必要枚数が十分確保できるので、大きさの制限を外して頂くことが出来ました。実際問題として、人工関節が適用となるような末期のものは難しいと思います。ただ、変形性膝関節症の中で末期に至るまでの患者さんで、アライメント矯正して一緒に軟骨の損傷部を治すという患者さんに対しては、大きさの制限は無しに是非使って行きたいと考えています。

光島：実際にセルシードさんの大型インサートではどのようなサイズをやっているのでしょうか。

菊地：面積にして2倍程度です。

佐藤：私共は自己細胞の臨床研究を終えて先進医療の準備をしているところですが、最初の臨床研究で設定した、この 4.2cm^2 というのが先進医療としても生きてくるのではないかと危惧しているところです。1枚の細胞シートでおおえる大きさというところから設定が始まっていますので、このような大きな器材が出来てくるのであれば、この制限以上のものも適応にさせていただけるのではないかと考えてやっています。

3. 総合討論

光島：佐藤先生の発表で、これから薬事申請承認を目指されると思いますが全体のスケジュールの所で、自己の場合は臨床研究8例で終了と考えてよろしいのですね。これで、先進医療のほうへ行くと。今のスケジュールでは、先進医療への申請時期というのはいつごろを予定されているのでしょうか。

佐藤：はい。今年度、来年度始めまでは学内の倫理委員会始め3つの会議の承認が必要ですので、現在準備中です。できれば来年度中に一度、研発課の方に先進医療の相談を考えています。

光島：来年度中に相談ということですね。

佐藤：はいそうです。この事業プロジェクト自体が自己細胞で先進医療の実現までもっていくと、同種の方はヒト幹を通すというところが最終目標でありますので、是非やっけないかと思っています。

光島：嶽北さんの方で前回盛んに治験までもっていかないのかという事が言われていたが。最初の計画通り今後進められるという事でよろしいのですね。

佐藤：勿論、この事業にプラスとして医師主導治験あるいは企業治験というところまで話が盛り上がってくれば良いとは思いますが、企業様相手のところがありますので是非そういった方向も視野に入れて進めて行きたいと思っています。

光島：同種の方ですが、8月6日にヒト幹に承認されて、新法への対応で再申請書を出されるのですね。そうするとよりハードルが高くなるかと思うのですが、学内の委員会の設

置や再申請への対応はどのように考えていらっしゃるのですか。遅れそうですね。

佐藤： その混乱が非常に危惧されたので、今までの旧法のうちにヒト幹を通したいと何とかそこを目標にやってきました。目標より 1 年度繰り上げてやってきた事になります。来年の 11 月までの 1 年間が移行期間ですので、その間に新しい法律に則って申請し直す形をとりたいと思っています。ただ、移行期間中も旧法に則ったものに関しては、臨床研究を実施して良いという事になっています。

光島： 進捗管理という事で、皆様をお願いしていますが、最新のロードマップを作成して頂きたいと思います。特に、新法に対する対応がこれから始まると思いますが、自家細胞の場合と同種の 2 つを、薬事承認申請に至るまでの今現在考えられる研究開発のストーリーをロードマップで示して頂きたいと思います。1 ヶ月くらいで仕上げ頂けると、お願い致します。

佐藤： 本日の議事録と共に提出させていただきます。

橋本： 今年の 11 月から新法が施行され薬事法も改正されるということで、再生医療の事業化が現実のものとなってきましたが、私共も社内で軟骨シートの研究をより早く臨床に届けられるような形の体制を整えたいと努力しているところです。ロードマップのご要請が出ておりますが、佐藤先生と相談しながら作成させて頂きたいと思っています。

的場： 品質評価のところ、LDT(Laboratory Developed Test)というところで、品質評価のデータをお出しするという体制を整えてやっています。宜しくお願いいたします。

佐藤： DNA チップ研とは PMDA の事前相談に伺わせて頂きました。

佐藤： 昨年度の評価ですが、色々な評価委員の先生方に評価いただいて、PO 様のコメントも評価出来る点など研究をご理解頂いて評価して頂けて感謝しています。ありがとうございます。ご指摘頂いた点も、粛々と進めて、自己細胞の方は先進医療に向けて準備中ですし、同種の方も現在バンキングのところを行っています。どのようなバンキングシステムかにつきましては次回の班会議の時にご報告させて頂きたいと思います。同種の方も今年度無事にヒト幹で承認されまして順調に進んでいます。私共の軟骨細胞シートによる再生治療は、ジャックとはそもそも対象疾患が違っていますので、あくまで私共は小さな外傷性の軟骨を治すというところは考えていません。目指すものは変形性膝関節症を有した患者さんの軟骨損傷に関して細胞シートが効くとアピールしていきたいと思っています。是非、自己細胞シートの系は先進医療でやっていきたいと思っています。

花井： そのあたりのアピールが足りなかったのでしょうか。変形性膝関節症をやるという。そこまで言うと言いすぎになるのでしょうか。

佐藤： 外傷と変形性膝関節症と両方を目指していますと、最初広く対象を言っていたところが少し分かりにくかったのかもしれません。実際に、ヒト幹細胞臨床研究を行った 8 例の患者さんは、皆さん変形性膝関節症を合併して持っている患者さんですので、今回はその点を考慮して頂けたらと思います。

光島： 先進医療のほうですが、10 例のところ 8 例で行くとのことですが、それは研発課の

ところと確認して、それで先進医療に申請してよいという確認済みなのでしょうか。

佐藤：これは5例以上あればよいと伺っていますし、エントリーは11例ありますので、適応外で移植に至らなかった等で実際は8例ということなので、この臨床研究の期限が3年間でしたので、この11月で終了というところで纏めたいと思っています。

木下：次年度の研究計画書も参考に進捗確認をしていきたいと思いますので、継続申請が出た後にまたご連絡させて頂きたいと思います。

4. 事務連絡

今回は2015年3月の日本再生医療学会がパシフィコ横浜で開かれますので、例年通り学会期間中にパシフィコ横浜の会議室で行いたいと思います。お忙しいとは思いますが、ご指導頂けたらと思います。本日はありがとうございました。今後ともよろしく願いいたします。

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 26 年度 第 2 回班会議

日 時：平成 27 年 3 月 19 日（木）12:00～14:00

場 所：パシフィコ横浜 会議センター4 階【413 号室】

出席者：光島健二、花井荘太郎、中谷知右（医薬基盤研究所）

飛田護邦（厚生労働省）

嶽北和宏（PMDA）

阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）

長嶋比呂志、松成ひとみ、前原美樹（明治大学）

加藤玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

大和雅之、丸木秀行、小久保舞美（東京女子医科大学）

の場亮、平賀育英、伊東紀子（DNA チップ研究所）

片山勝見、菊地鉄太郎、高野りや、河毛知子、佐藤千香子（セルシード）

佐藤正人、豊田恵利子、岡田恵里、高橋匠、白砂早織、渡部綾子（東海大学）

順不同、敬称略

記録者：渡部綾子

1. 開会

研究代表者あいさつ

2. 研究報告

（1）「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」

研究代表者 佐藤正人（東海大学）

班会議は今年度 2 回目となります。進捗がありましたので、私のほうから概要を説明させていただきます。後日、PO の先生方には資料と議事録を送付致します。

このスライドはいつもお見せするものですが、私たち整形外科医は運動器を取り扱っていますのでロコモティブシンドローム（ロコモ）を啓蒙することを 1 つのミッションとして日本整形外科学会が挙げています。ロコモの代表的な疾患である変形性膝関節症を再生医療の観点からどのように克服していくかという所が私共の 1 つのテーマであります。

健康寿命と平均寿命がよく言われていますが、この差は男性で 10 歳、女性で 12～13 歳と言われていて、これをなんとかしたいと思っています。整形外科医の立場からは、ロコモの代表的な疾患である変形性膝関節症、骨粗鬆症などの高齢者に特異的なこの様な病気を克服したいと思っていますところです。

本事業で提示しているロードマップです。この事業は大きく 2 つの事業から成っています。1 つは「自己細胞シートによる先進医療の実現」、もう 1 つは「同種軟骨細胞シートによる再生医療を目指したヒト幹細胞臨床研究の実現」で、自己で先進医療 B を、同種でヒト幹細胞臨床研究を実施するというのがこの事業のミッションです。今回自己の方は、今年の 1 月 27 日に総括終了報告書を厚労省研究開発振興課に提出し、ヒト幹細胞臨床研究を終了致しました。3 年間で 11 例エントリーし 8 例の患者さんに移植できましたが、重篤な有害事象を認めずに、皆さん経過良好で改善してきています。安全に終了することができて本当に良かったと思っております。この成果を元に、出口の 1 つである先進医療として実現するというところの事前の相談を、1 月末に厚労省研究開発振興課の先進医療専門官の真田先生に相談致しました。その時にご指導頂いたのは、今すぐ先進医療というよりも、まずは PMDA の薬事戦略相談へ行って、薬事的な出口を相談、確認しなさいということでした。先日、PMDA の佐藤大作先生と嶽北先生に面談の機会を得て、ご相談させて頂きました。同種の方は、昨年 8 月にヒト幹細胞臨床研究が承認され、現在実施に向けて準備をしている段階です。移植に資する細胞を安全に保管する技術、バンキングに関して構築し準備を進めています。これが完了した後、コールドランを経て、移植しても大丈夫かどうかの判定のために 10 検体あるいは 20 検体程度細胞を集め、この 1-2 年で評価し、安全性が確認された細胞で最良と思われるものを増やして移植患者さんに移植するという流れでヒト幹細胞臨床研究を行います。新法の下で、特定認定再生医療等委員会で再度諮り直しなどが予定されますが、現在はこのように取り組んでいます。また、新法下で細胞加工物製造許可申請の経過措置が 5 月 24 日で終了ということがあり、CPC の申請を一度行ったのですが、書類上の不備で戻ってきています。こちらも再度届け出を提出して受理された後に、東海大学で引き続き CPC を稼働するようにしていきたいと思っております。

私共の自己細胞シートのヒト幹細胞臨床研究は、平成 23 年 10 月に厚労大臣の意見書の発布をもって約 3 年間施行致しました。対象患者さんは 20-60 歳、対象は外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷としています。年齢や大きさの制限など、当時の再生医療推進室との相談の中で決まった規定がありますが、私共がこだわった変性により生じた、いわゆる変形性膝関節症を有した患者さんにも適応するという部分は認めて頂いて、変形性膝関節症の患者さんも含めて行ってきたものです。この変形性膝関節症の患者さんも、どの方でも含めるというのではなく、変形性膝関節症で骨切り術が必要となるような O 脚の患者さんや前十時靭帯損傷で 10 年以上放置して明らかに不安定性が原因で膝関節症が進んでいるような患者さんで、必ず手術を予定していて、さらに軟骨の損傷もある患者さんを対象としています。エンドポイントは、安全性を見るための有害事象の頻度、有効性の評価としては、術後 1 年までの患者立脚型の臨床症状の変化、レントゲン、MRI、さらに術後 1 年で必ず関節鏡を実施してセカンドルックを行って直視下に再生した軟骨の粘弾性特性を超音響法で評価し、さらにバイオプシーもするというプロトコールで実施しています。

滑膜細胞と軟骨細胞で共培養した細胞シートを患部に置く場合は、5cm 程度切開し細胞

シートを移植しています。大腿骨内側の荷重部の軟骨損傷に対して、細胞シートを移植した1年後の結果です。大腿膝蓋関節という部分で、上がお皿（膝蓋骨）で下が大腿骨となります。お皿と大腿骨が擦れ合う、いわゆるPF関節と呼ばれる部位は非常に治りにくいという事が従来の軟骨の再生医療では言われていますが、ここもきれいに治りました。海外で講演した際にも、PF部分の修復効果は非常に注目されました。組織学的にもTypeコラーゲンで濃染され、組織染色のサフラニンOでも強く染まり、明らかに硝子軟骨で再生しているという事を確認しています。

先進医療事前相談の際に薬事的な出口を確認することが必要だと専門官よりアドバイスがあったので、先進医療を行いながら企業治験を目指すという二段構えの方法でよいのかという点についてPMDAとの事前の相談でロードマップを見て頂いて、立付けはこれでよいだろうというコメントを頂きました。企業治験を待っている間に先進医療を止めてしまうと、この間何も東海大学で実施できないとなると、施設維持の観点や研究員等の教育などの点で問題があると思いますし、少ない症例でも動かしていた方が学内連携の維持ができます。特に学内での安全性評価等の流れを止めたくないという部分もあり、是非この二段構えでやっていきたいと思っています。現在考えているのは、ヒト幹細胞臨床研究で8例終了していますが、同じプロトコルで実施していきたいと思っています。

変形性膝関節症(OA)はO脚のひどい方は、軟骨が傷つき骨まで達するような状態になります。部分的に損傷を受けている部分から、徐々に進行していく非常にやっかいなもので、リウマチのように急激に悪化するようなものとはちがって、OAの場合は非常に経過が長いということが特徴です。私共は、骨同士がぶつかり合っている場所に細胞シートを移植しても治るわけがないと思っていますし、骨切り術というアライメント矯正の手段を持っていますので、手術で直せる部分はしっかりと治します。移植した細胞を維持できる環境をきちんと整えてあげて、同時に合併する軟骨損傷に対して細胞シートを移植することで細胞がそこできちんと生着して治す、というストラテジーで行きたいと思っています。

現在海外で4万から5万例実施されたと言われている自家培養軟骨細胞移植(ACT/ACI)という方法は、非荷重部の軟骨を1ヶ月くらいで増やします。脛骨から骨膜を採取して、パッチ状に患部の周囲に縫い合わせ、縫い合わせの隙間から培養した細胞を入れるという方法で治療しています。日本で保険収載されたJ-TECさんのジャック®も、入れ方が違うだけでゲルの中に包埋した細胞を入れているだけです。骨膜を使うところは同じやり方です。骨膜を縫い合わせて使うというのがスタンダードなものとなっています。私共は細胞シートと出会う前にも組織工学的な軟骨を作ってきました。動物実験で骨軟骨欠損を作って、各種のスキャフォールドだけや、間葉系細胞の中でも有用と思われる滑膜由来の細胞などを使ってきましたが、見た目は白く治っているように見えますが、組織学的には線維性の軟骨の混在を防げないことが分かっていたので、私共は表層の部分をしっかり治すというところで研究を続けてきました。表層に蓋をするように色々な組織工学的な軟骨を使ってきましたが、表層をきちんと治せることができれば、その下は自己修復で治ることが分か

りましたし、それは細胞シートでも実現できましたので組織工学的に作製が最も簡便な細胞シートに特化して研究を続けているところです。

変形性膝関節症は非常に治療が難しいです。手術療法、薬物療法、理学療法、患者教育などあらゆるやり方を動員しないと長期予後は良くありません。私共は外科医として、手術的に治せる部分はきっちり治さないとうまくいかないだろうと考えて、アライメント不良の場合は 0 脚の肢をまっすぐに治したり、前十時靭帯が切れて不安定性があればそこをしっかりと治してあげて、半月板が痛んでいたなら縫合や切除したりなどを行い、最後に軟骨が痛んでいる部分には細胞シートで治すということを行っています。

自己の臨床についてですが、総症例 11 例エントリーして、2 例は関節鏡検査時に大きさが規定外や採取細胞数不足だったために適応とならず、1 例は残念ながらプロトコルにある 3-4 週間以内で細胞シートができなかったものがありました。これまで共培養法では、かなり安定的に細胞シートが作製できていたのですが、この 1 例は非常に残念でした。移植できた 8 名の患者さんは非常に経過良好で喜んで頂いています。だいたい 3 ヶ月から半年経つと、新しい軟骨が MRI で確認できるようになってきます。上が膝蓋骨で下が大腿骨となります。だいたい 1 年で皆さん関節鏡で見るとこれくらい治ってきています。これが 8 例の患者さん全例のバイオプシーの結果です。2 型コラーゲンの免疫染色ですが、硝子軟骨の程度や修復程度はもちろん個人差がありますので全部が 100% 硝子軟骨とは言い切れませんが、2 型コラーゲンの発現が顕著で、サフラニン O でも濃染されていて、硝子軟骨できちんと治っています。これは、患者立脚型の臨床評価です。骨切りなどをすると、骨折をするのと同じ事ですから、やはり術後 1 ヶ月はスコアが下がります。3 ヶ月以降は、徐々に回復されて皆さん 90% 近く治っていますので、非常に満足されています。ただ、自己細胞の問題点として、組織を最初に採らなくてはいけない為に 2 回の手術を要することや、健常部分の採取量には限界があり、複数回の手術は困難であるということ、非常に個人差がある細胞なので必ずしも活きの良い細胞ということとは言えませんし、ご高齢の患者さんでは第 7 染色体のトリソミーが報告されていますので、そういったものが分かっている自分の細胞だからいいのかなど問題点があります。これらの点を踏まえて、同種の細胞を検討しました。同種の軟骨というのは既に海外では臨床で使用されています。国内の骨バンクや海外の同種組織というのはトレーサビリティの問題があるということをご指導頂き、必ず手術時に廃棄組織となる多指症の組織から軟骨が取れないかということで多指症手術に注目しました。この患者さんは親指が 2 本あり、この 1 本を手術で切除するのですが、整形外科でも行いますし形成外科でも手術が行われています。足の趾の場合もあり、そこから軟骨を採ってきたりもします。共同研究先である、国立成育医療研究センター研究所では、多指症手術を日本で一番多く行っていますので、そこから細胞を頂いて安全性の評価やプロパティのチェックなどを行いました。この細胞は非常に良く増えて、沢山の細胞シートが作製可能です。多くの細胞を一人の患者さんのサンプルから得ることが可能です。こういった細胞は非常に魅力的であると感じています。安全性の評価では、人工関

節などを行う高齢者の方のアレイ CGH ではコピーナンバーバリエーションの異常が見られたり、7番染色体のトリソミーが高い割合で確認されるのですが、多指症由来の細胞では、ほぼ異常が検出されないということが分かってきています。さらに、超免疫不全マウスである NOG マウスに移植して腫瘍化しないことを確認し、この細胞をセルソースに使うことを決めました。さらに、国立医薬品食品衛生研究所の加藤玲子先生にご協力頂いて、細胞シートが T cell を活性化しない、免疫反応を起こさないということのエビデンスが、文献的に不足していましたので、免疫反応を起こさないということを確認して頂いています。患者由来の日本人、白人、黒人で Allo をポジコンとして混ぜた時、どういった反応を示すかを見たときに、軟骨細胞シートでは免疫反応を起こさないということを示して頂いて、多指症由来の細胞を使えるだろうというエビデンスとして構築して頂きました。去年8月に、ヒト幹細胞臨床研究として認めて頂きました。私共は多指症由来の細胞を採取する所からスタートしますが、それを培養して、ストックします。ストックについては、セルシードとの共同研究で行っており、セルシードから東海大に来て頂いている研究員の高野が保存方法の技術について、本日発表致します。

< 質疑応答 >

光島：自己細胞シートですが、先進医療と企業治験の二本立てとはどういうことかと思っていたのですが、今の先生のお考えでは、先進医療をある程度進まれて、セルシードさんが準備出来次第企業治験に移るということでよろしいのでしょうか。

佐藤：先進医療を実施するには、新法下では特定認定再生医療等委員会を経なければならず、すぐというわけにはいかないですし、また、治験がスタートできるまで薬事戦略相談やドキュメント作成など、いろいろとあると思うので、そういった理解でいいかと思えます。片山さん、よろしいでしょうか。

片山：そうです。

光島：先進医療は8例か9例とかそのあたりで組まれるのでしょうか。ある程度そのデータが出ないと、薬事の相談には行けないということなののでしょうか。

佐藤：いいえ。相談はヒト幹細胞臨床研究のものでも行けるとは思いますが、先進医療で実施予定の症例はもちろん参考データとして使えると思います。

光島：平行して進められるという事なのですね。

佐藤：そうです。先進医療は評価医療として準備して進めていきます。

光島：平行して、PMDAの薬事相談の方も受けていくということなのですね。

佐藤：そうです。

光島：同種の方で、コールドランとありましたが、これは本来の意味で言うプレランという意味で受け取るのですが、CPCでのチェックを兼ねながら実際に患者さんから多指症の細胞を頂いて調整するという事でよろしいでしょうか。

佐藤：自己の時にも行ったのですが、スタートは多指症患者さんの手術時廃棄組織を手術

室に取りに行くところから始まって、ここの部分は自己と異なるのでしっかり行って、ストックまで行います。

光島：コールドランといいながらも、まさしく本番同様に行くという事なのですね。

佐藤：そうです。移植の部分だけ行わないという事です。

花井：一般的に評価委員会などで委員の先生がおっしゃる事は、企業治験が控えているのに、なぜ企業治験からやらないのかということです。それが理解できないという意見が結構あります。それなりの理屈をつけていかないといけないと思うのですが。

佐藤：先程も申し上げましたが、治験としてすぐにできればいいのですが、この間何も出来ない時期というのが大学であるとなると、CPC も動きませんし、結局人で動かしているものですので2年3年止まってしまうと問題があるかなということが一番大きな理由です。この間少しずつでも、症例を治し続けるというのが我々のモチベーションにもなりますし、CPC の維持管理の観点からも研究員等も入れ替わりますので継続性や教育の面からも役に立つと思っています。

花井：理屈はよく分かるのですが、開発期間が長くなるとか、大学や研究者の都合じゃないかと思われることもあるかと思います。ロードマップですが、先進医療をやりつつ、またはやってから薬事戦略相談という記載ですが、話の内容では先進医療相談へ行ったらまずは薬事戦略相談へ行ってくださいということになったのですね。

佐藤：そうです。PMDA の事前の面談を先日受けてきましたので、なるべく早く薬事前略相談を受けて、きちっとご指導頂きながら進めていくことを考えています。

花井：先進医療でやっている評価療養の分を申請時のデータに使えるように、できるだけ努力するというのが通例のやり方なのですが、例えば GCP 基準でやるというような話にはなるのでしょうか。

佐藤：なるべく GCP 準拠でやりたいとは思いますが、基本は今のヒト幹の時と同じ体制になってくると思っています。第 3 者評価機関を入れることなどについては、今後相談することになると思います。先進医療の実施について、東海大学の病院長からは了承されていますので、どういったグレードで行っていくのが適切なのかについて、厚労省や PMDA との話し合いとなると思います。

花井：出来るだけ短い間で、早く導出していけるように、その辺の説明をきちっとされていったほうがいいのではないかと思います。

光島：今の計画では先進医療 B への申請は、平成 27 年 7 月頃までにという表現になっていますが、現在の予定はどうでしょうか。

佐藤：先進医療 B 申請についてのドキュメントは既に作成済みで、事前相談に行って専門官に見て頂き、PMDA とも面談致しましたので、再度厚労省へ相談に行ってなるべく早い時期に申請したいと考えています。

中谷：先進医療 B でやっても、特定認定再生医療等委員会には諮る必要があるのですね。

佐藤：届出が必要かどうかということでしょうか。東海大学でも、特定認定再生医療等委員会を医学部長、法人ともに設置の方向で動いていますので、そちらに諮ることになると思います。

中谷：順番としては、先進医療 B で一度諮られて、それから特定認定再生医療等委員会にも諮るということになるということですか。厚労省の第一認定を二回受けることになるのという気がするのですが。こちらは第 1 種、第 2 種どちらでしたか。

佐藤：自己は第 2 種になります。同種は第 1 種です。

飛田：再生新法の提出をして頂くということになります。特定認定再生医療等委員会での意見を添えて提出して頂くということになると思います。

中谷：企業治験ですが、こちらはセルシードさんとの共同事業となるということでしょうか。治験依頼者はセルシードさんになるということなのですね。

片山：そうです。

中谷：最終的に、製造販売業承認申請はセルシードさんがされるということなのですね。許可もお取りになって、今取られていませんよね。将来的には、製造販売業許可申請もお取りになるということなのですね。

片山：はいそうです。

中谷：細胞シートを移植して、シート自体が軟骨になるのか、一種のトロフィック効果で良くなるのか、どちらの方なのでしょうか。

佐藤：トロフィック効果の方が強いと感じています。私共は、細胞シートを長期にトレーシングした実験があります。ルシフェラーゼで標識されたラットを、体外から IVIS を用いて検出しトレーシングすると、細胞シート自体は 21 ヶ月以上膝の中に残っていることが分かっています。ただ非常に少ない量で、殆どが 4 週以内で細胞シートの残存ピークは過ぎてしまうので、最初の 4 週までの、おそらくトロフィック効果、あるいは細胞シートのカバーリングだけでも効果があるかもしれませんが、再生というよりは修復のほうに上手く働いているのかなと思います。

中谷：同種の場合は、フレッシュというか増殖能力が非常に高いのですが、その場合にもトロフィック効果がメインと考えるのでしょうか。

佐藤：そうです。細胞シートそのものが分泌する液性因子を自己と同様に細胞シートを複製して比較していますが、残念ながら現在のところは自己ほど沢山の液性因子は出てきてはいません。それをいかに自己の細胞シートに近づけていくかという研究も取組んでいるところです。

中谷：気になったのは、同種で、生着するのであれば拒絶等の問題があると思ったのですが、トロフィック効果で徐々に治っていくのであれば、長期的な安全性の確立などはあまり心配しなくてもよいのですかね。

佐藤：そうですね。どちらかというところ、トロフィック効果のほうが強いです。

飛田：ロードマップについて教えて頂きたいのですが、自己と同種が同時に走っているということなのですが、出口が2つあるということでもよろしいのでしょうか。

佐藤：はいそうです。厚労科研の申請書には自己は先進医療、同種はヒト幹をやるというところが出口だったわけですが、同種の方が開発までかなり時間を要しますし、同じ出口ではありません。

飛田：最終的に対象疾患が違うなどは、あるのでしょうか。

佐藤：対象疾患は同じで考えています。

飛田：将来的には、こういった場合は自己で、こういった場合は同種で、ということになるのでしょうか。

佐藤：変形性膝関節症の患者さんは非常に多いので、自己の細胞でオーダーメイド的に治していると、コスト的にかなり大変になると思います。同種でユニクロ化して沢山の患者さんに広めることを考えないと、対象患者さんが多いようなものにはコストダウンの観点を考える必要があり同種という選択も考えました。

飛田：自己の部分は、あまり先生の中では・・・。

佐藤：ジャックさんでも自己ですし、やっぱり自分の細胞で治せるのであれば自分の細胞で治したいという方も多いと思うので、そういった方はオーダーメイド的に対応しますが、やはり手術侵襲が1回減らせる事や沢山の患者さんに適用する場合はあまり高額な再生医療製品になっても問題かなという観点から安全な同種の細胞で出来ればと思っています。

大和：ある意味、混合診療ですが、日本版 Compassionate Use という名前で、患者本位の混合診療といって制限等がありますが、混合診療が可になる方向で現在きています。この制度に本当に手を出す人がどの程度居るのかは分かりませんが、先生の product は有用ですので、この制度にチャレンジするという可能性も頭の隅に置いておいて頂いて、内部で議論して頂けたらと思います。

佐藤：はい。ありがとうございます。

大和：細胞のバンキングのところですが、意外ともう少し長く掛かるのではないかと思ったのですが。細胞を採ってきて凍結させておけばいいとお考えなのかもしれませんが、確かにそういう側面もありますが、いろいろなガイドラインに従ってバンクの細胞がちゃんとしているとか、function などを確認しようとする、整形外科領域などは特に評価の部分にも時間が掛かりますし、お金と手間も掛かるので、そこはもう少し余裕を見ておいた方がよいのかなと思うのですが、大丈夫でしょうか。

佐藤：ご指摘の通りかもしれません。バンキングした細胞で安全性、あるいは有効性が確立されたものでないと患者さんに移植出来ないと考えていますので、当初この部分を2年くらいで多指症の患者さんから10例から20例の検体で評価して、一番良いものを患者さんに移植しようと考えているのですが、ご指摘の通り、バンキング・評価の部分は、グレーゾーンというか時間もお金も掛かる場所かもしれません。

(2) 「多指症由来細胞の長期保管システムの構築」

研究協力者 高野りや（東海大学（セルシード））

多指症由来細胞の長期保管システムの構築までの取り組みについて発表いたします。はじめに、細胞の長期保管システム、すなわち細胞のバンク化について、ICH 品質ガイドライン Q5D の【2-2 細胞のバンク化】の項目に、生物薬品を製造するうえで、段階的に継代された細胞を使用することの最も有利の点の一つは、特性解析された同一の出発素材、すなわちセル・バンクを、全製造ロットで使用できることである、と記載されています。本臨床研究において、初代培養細胞基材を起源としたセル・バンクを構築することは、ICHQ5D の示すように、特性解析・品質解析のなされた有効性・安全性の高いと思われる同一ロットの細胞基材を細胞シート製造に用いることが出来る点で優位であると考えています。本セル・バンクは、*in vitro* で寿命を有する正常二倍体細胞である、多指症由来細胞を基材とし、初代培養から数継代拡大されたマスター・セル・バンクのみを用いる、一段階方式のセルバンクシステムです。

セルバンキングの手法として、細胞加工工程での汚染の防止、取り違えの防止、適切な条件下での細胞凍結、解凍後の細胞生存率の保持、超低温下での長期保管、保管システムのリスクマネジメント、以上 6 点について確立することを目指しました。1 から順に説明します。

1. 細胞加工工程での汚染の防止

一連の細胞加工工程は、清浄度および浮遊微生物等を高度に管理した CPC 内で行っています。最終製品はクリンベンチ内で 1 次容器（シリコンガasket付きインナーキャップ型・凍結保存用細胞バイアル）に密閉することで細胞基材の汚染を防いでいます。

2. 取り違え及びクロスコンタミネーションの防止

1 検体の加工工程期間中は他の検体は扱わない【1CPC1 ドナー制】を採用しています。すべての物品は 1 検体毎に新しいものを用意し、余剰分は破棄しています。1 ロットごとに専用の保管箱にて保存しています。以上の工程は、標準作業手順書に従い作業毎に二人以上による確認をひとつひとつ行いながら実施することにより、検体の取違いおよび交差汚染を防ぎます。

3. 適切な条件下での細胞凍結

数種類での凍結保存液の性能比較試験を行いました。その中でタカラバイオ社の『STEM CELL-BANKER』を細胞凍結保存液として採用しました。細胞凍結の際には、緩速凍結処理容器『BICELL』を用いて-80℃まで穏やかに凍らせ、長期保管タンクへの入出庫の際は、冷却保持容器を用いて移動させています。

4. 解凍後の細胞生存率の保持

気相式液体窒素タンクに 2 か月保持し、解凍した時の細胞の生存率です。3 ロットの平均値から 90%以上の生存率を保持していることが確認されました。また、それぞれの細胞を 5 日間培養したときの細胞の増殖率の平均は 10.9 倍であり、生存率の平均は 98.7%と、解

凍後安定した増殖能と生存率を保持していることを確認しました。

5. 超低温下での長期保管

細胞を超低温下で保管する為のタンクとして、アイソサーマル気相式液体窒素サンプル保管システム『V1500AB』というシステムを導入しました。こちらのタンクの特徴は、検体を保管する場所と液体窒素が入る場所が完全に独立していて、上方から気化した窒素が内部に噴出され、中の温度をコントロールする方式になっています。完全な気相状態であるために、未知のウイルス等によるコンタミネーションはありません。こちらの保管タンクは、13 段のケーンを 28 本設置可能ですが、上部の方はフタの開閉時の温度変化を考慮し、下 9 段だけを使用するようにします。28 本 9 箱で 252 検体分の保管がこのタンクひとつで可能です。

6. 保管システムのリスクマネジメント

1 つ目は、アイソサーマル気相式液体窒素ですが、こちらは液体窒素によって温度を維持しているので長時間あるいは突発的な停電による細胞への影響はありません。2 点目に、2 台の液体窒素自動加圧型の供給タンクを設置しました。ロードセルと呼ばれる重さを測る機械で綿密に残量が計算されていて、それに加え自動切り替え装置で片方が空になったら自動的に満タンであるもう片方のタンクに切り替わるという装置です。3 点目に、こちらがタンクの庫内温度と液体窒素残量の表示盤です。一目瞭然で今どちらのタンクが動いていて、どちらのタンクが空になっているか、日常点検でヒトの目で状態を監視・管理し、タンクが空の場合は新しいタンクと付け替えるということを日常的に行っています。4 点目、こちらは V1500AB の純正のモニタリング装置『バースアラート』という装置ですが、こちらはインターネットを介したネットワークベースステーションになっていて、インターネットを介してタンク内の情報を Web 上で見ることが出来ます。大学の教室や、離れたオフィスからでもタンクの温度および液体窒素残量を見ることができるようになっています。またその記録は、クラウド上にある Web ストレージに記録されていきます。6 点目、さらに停電や異常な温度上昇など緊急時には管理者の携帯電話にエラーメールが送信されるように設定しました。以上のシステムを用いてリスク管理を行っています。

これが実際のバースアラートのウェブ上での画面です。こちらは窒素残量を示していません。窒素が満タンの時は液面の高さが 55 cm です。自然蒸発で徐々に減っていき、液面が 25 センチになると加圧式液体窒素供給タンクから液体窒素が供給されて満タンになり、徐々に減っていくというサイクルを自動的に繰り返します。およそ 37 時間でこのサイクルが繰り返されています。こちらは実際のタンクの中の温度です。青い部分はフタの直下にある温度計です。こちらの温度計が、液体窒素が少なくなってくることによって徐々に上がってくるのですが、フタの直下の温度計が -170 を超えると液体窒素が供給され、温度が一気に下がります。それがやはり 37 時間毎に繰り返されます。細胞が実際に保管されている部分の温度が緑で表示されているところですが、 $-190 \sim -180$ 以内の温度で管理されています。以上をもちまして、多指症由来細胞の長期保管システムの構築の紹介とさせていただきます。

ます。

<質疑応答>

大和：ICHのスライドで、『細胞基材』と仰っていたところがありましたが、確かにバイオリジクスの業界では細胞基材という言い方をしますので、cell substrate という表現は technical term としては確立されていると思いますが、通常は組み換えタンパクを作らせるヒト遺伝子が入っている培養細胞という意味で cell substrate という言葉を使います。その場合、Product は細胞が分泌したヒト組み換えタンパクとなり、今回の細胞製品の場合、細胞自身が Product となるので、細胞基材という表現が正しいか疑問に感じるのですが。

高野：ICHQ5D には、細胞基材の漢字の使い方が 2 種類あり、細胞そのものを用いる場合は『基材』と記載されていて、薬を作る原料として使用する場合は『基剤』と記載されていて、漢字の使い方で分けられていました。そのため、今回は『基材』と致しました。

大和：cell substrate の訳が 2 種類あるということなのですね。

高野：はい、そうです。今回は細胞そのものを用いるので、今回は『基材』と記載いたしました。ICHQ5D の別添に記載されております。

大和：わかりました、ありがとうございます。

光島：只今ご発表頂いたのは、マスターセルバンクを使ったバンキングシステムのお話かと思いますが、コールドランで 20 例のサンプルを取り、その中から良いものを選ぶということですが、最終的には、将来的にマスターセルバンクとは別にワーキングセルバンクを立てられる予定でしょうか。

高野：多指症由来の細胞の方が、拡大できる回数（継代数）が限られているので、何継代目が適切か検討中ですが、最大まで拡大致します。供給される指 1 本からも取れるサンプルの本数は異なりますが、最大まで拡大したものをすべて保管しておき、それを治療毎に使用するという形を想定しています。マスターセルバンクを増やしてワーキングセルバンクとして使用するという従来のバンクシステムとは異なって、マスターセルバンクそのものが治療に使われます。

光島：均一性ですが、多指症患者さんの軟骨細胞はいろいろなものに分化する能力があると同っています。1細胞に由来するのではなく組織（細胞集団）由来であり、1つずつの細胞をとった際に均一かどうかというのが気になる点です。ある意味、ヘテロな部分もあるのではないのでしょうか。その場合、品質管理基準はどのようにするのでしょうか。

佐藤：確かに、手術的に軟骨と思われる部位から採取してくるのですが、ご指摘のように、指の細胞は、軟骨に分化する細胞や骨に分化する細胞などが混在するヘテロな集団です。その中からいかに質の良い細胞シートを作るかが我々の一つの目標でもあります。そのために細胞シートの品質をどこに設けるかを自己の時と比較しながら進めて行きます。それぞれバリデーション試験段階でシートまで作製して、このロットからは良いシートが出来るということまで比較したいと考えています。

光島：一度細胞をとって、仮置きでバンキングし、シートを作製して、機能・分化を確認して、安全性が間違いないと分かったらフィードバックして、その時点で初めてマスターセルと称するというシステムを考えているのですね。

佐藤：はい、そうです。

嶽北：細胞製品は、もともとヘテロなものと我々は認識していて、化学合成している医薬品や構造式をもってヘテロかどうかということを確認してきました。その中である程度均一なものホモなものという形で作ってきた歴史がありました。技術的革新があり、バイオ医薬品というものが出てきて、その中でも単純タンパクのようなものでしたら、ある程度化学合成品に近いものは、構造をもってヘテロかある程度均一なものかという評価をしていました。糖タンパクのエリスロポリチンというものが出てきて、ある程度までは目的の糖鎖であったり目的外のものであったり、目的物質、関連物質とも言いますが、ある程度ヘテロなものというのを許容するような管理の概念みたいなものを作ってきました。再生医療等製品では、こういったものを Critical quality attributes として、その面においてホモなのかヘテロなのかという議論をするけれども、生物学的にみるとたぶんヘテロな集団というものを許容せざるを得ないという世界があるのではないかという考え方になります。今までバイオ医薬品までは、おそらく糖鎖の構造式をもってヘテロかなど均一性の概念があったのだと思いますが、再生医療においては、構造式という観点からホモなのかヘテロなのかという話は出来ないと思いますので、どういうふうな観点、コンセプト、この再生医療製品はシートが作れる事が重要だという能力からホモなのかヘテロなのかという議論をしていかざるを得ないと、我々規制当局側での議論の中にあります。その中で考えた時に、マスターセルバンクを作るかどうかとの話で、おそらくマスターセルバンクとおっしゃっていますが、バイオ医薬品でいうマスターセルバンクのように一度作ったものを二度と作り変えずにワーキングセルバンクを作って、そこからタンパクを作ってというようなものではなくて、ある程度一人のドナーから何百例か使った後に使い切ったら、スクリーニングをした上で新しい細胞をスターティングマテリアルとする管理だと思いますが、こういった場合は、マスターセルバンクとは言わず、ドナー毎のロットなのだと思います。マスターセルバンクという使い方をすると、Q5D や Q5A 相当の解析をすることになると、おそらく細胞の数は相当足りなくて億の金が飛ぶような解析をしなければならなくなってしまいます。マスターセルバンクのように一度作ったある程度のロットの確保はできる細胞だが、マスターセルバンクでは無いものだと言わないと、開発する側としては苦しくなると、個人としては思います。スターティングマテリアルとしての規格を有し、ある程度のロットを形成できる細胞の製品であるという形にしたほうがよいのではないのでしょうか。

佐藤：大変貴重なご意見をありがとうございました。

高野：その通りだと思います。

(3)「ウサギ軟骨細胞シートの長期保存法の開発」

研究協力者 前原美樹 (明治大学)

私共はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に関する研究を担当しています。長期保存の実現に向けての基礎的検討を行いましたのでご報告します。

細胞シートの長期保存の確立によって、細胞シートの作製と移植時期の調整を容易にすることが出来るようになります。また治療用の細胞シートの大量ストックを可能にすることそれによって allograft の移植の促進が期待されます。そのため、必要な時にすぐに使える状態で細胞シートを安定的に長期間保存できるような技術が必要不可欠な課題となっています。

我々の細胞シートの凍結保存方法の手順の確認です。細胞シートを凍害保護剤の入ったガラス化処理液に細胞シートを浸漬して保護剤を浸透させ、パッケージング素材でシートをパッケージし、液体窒素の蒸気で細胞シートを凍結保存させます。その後、38 度に加温した加温板の上でシートを融解し、そのあと保護剤の希釈・洗浄を行うといった流れで行います。細胞シートのシート構造が破損なく保たれたまま、生存性高くガラス化保存出来る技術です。

今年度の取り組みですが、大きく分けて 2 つの項目で研究を行いました。1 つ目は実用化に向けての改良研究を行いました。こちらは第 1 回班会議で既にご報告致しましたので、本日は簡単にお話致します。まず、より脆弱な細胞シートを想定し、非積層化シートへの応用を行いましたところ、我々の開発した細胞シートのガラス化保存法は、非積層化シートにも有効であることが分かりました。また、ガラス化に必要な前処理の時間が通常 45 分のプロトコルであったものを大幅に短縮しても、シート構造の維持や細胞生存性に影響がないことが分かりました。また、長期保存を目的として、パッケージング素材を検討致しました。アルミ箔を使用した細胞シートのパッケージングが、液体窒素の気相中・液層中両方の保存状態に耐えうるということが分かり、長期保存に有効であるということが分かりました。市販予定ガラス化液の有効性の確認も行いまして、非常に有効な成績が得られました。

本日は、2 つめの項目である、実用的細胞シート保存用デバイスの開発と評価について詳しくご説明します。こちらが、今回新しく作製した細胞シートの長期保存用デバイスになります。箱型の枠の中に、保存デバイス(小箱)を 3 つしまうことのできる構造になっています。この 1 ユニットが、一般的な液体窒素タンクのキャニスターにそのまま収まるような作りになっています。小箱にはつまみが付いていて、つまみ部分をつかんでふたを開けると中に細胞シートを収容することが出来ます。1 つの箱に 1 枚のシートを保存することが出来ます。細胞シートのガラス化をする際、液体窒素の蒸気でガラス化することが大きなポイントとなります。シートが完全にガラス化する前に液体窒素に触れてしまうと、シート構造が破損してしまうことがこれまでの研究で分かっていることと、今後の臨床への応用を考えた際に、液体窒素内に直接細胞シートが触れることをなるべく避けた保存方法を

考えている為、液体窒素の蒸気での保存が重要となります。この細胞シート保存デバイスは、容器本体とフタの部分に液体窒素吸収剤が入っており、あらかじめデバイスを液体窒素中で冷却して吸収剤に液体窒素を吸収させておくことで、蓋を閉めた時にデバイス内が蒸気で満たされるような構造になっています。デバイス上で直接細胞シートをガラス化保存し、そのまま蓋を閉じて液体窒素タンクにしまうことが出来るような作りになっています。タンクへの収容の際に、デバイスに細胞シートを収納したまま空气中を短時間移動しても、デバイス内は安定的に液体窒素蒸気で満ちた状態になるようにしました。

細胞シートのガラス化手順は、先ほどもお話ししたように、細胞シートを凍害保護剤の入ったガラス化処理液に細胞シートを浸漬して保護剤を浸透させ、パッケージング素材でシートをパッケージし、デバイス上で細胞シートをガラス化保存します。そのままデバイスのふたを閉じ、液体窒素タンク中に保存しました。保存期間は2週間~1か月保存としました。タンク中では、液体窒素が細胞シートに直接触れないよう液面を管理し、シートが液体窒素気相中の-150の温度化に保存されるように留意しました。シートの融解は、38度に加温した加温板の上でシートを融解し、そのあと保護剤の希釈・洗浄を行うといった流れで行いました。

こちらが細胞シートの融解後の形態と細胞生存成績です。3層の積層化細胞シートを用いました。約2週間の保存期間です。非ガラス化シートの成績・ガラス化後に即時融解したシートと比較して、長期保存したシートの細胞生存成績は劣ることなく、シートの破損も生じることなく安定的に保存できています。さらに2層の細胞シートを作製し、1か月間保存しました。こちら是非ガラス化シートの成績・ガラス化後に即融解したシートと比較して、長期保存したシートの細胞生存成績は劣ることなく、シートの破損も生じることなく安定的に保存できました。

今回新たに開発した細胞シートガラス化保存デバイスを使用し長期間保存された細胞シートの生存性は、非常に高く保たれていました。非ガラス化細胞シート、従来法でガラス化・融解された細胞シートと比べて、長期保存後の形態維持、および細胞生存性に差は見られず、安定的にシートの凍結保存が可能になったと言えます。

今後の計画として、実用性と大量保存への応用性に優れたパッケージング素材と、細胞シート用ガラス化保存装置の開発を行なっていきます。ヒト細胞シートへの応用も行います。来年より東海大学に所属が移りますので、東海大学を拠点として取り組みます。

< 質疑応答 >

佐藤：補足させていただきますが、先ほど高野の方からご紹介したのは、スターティングマテリアルとしての規格を有する細胞のバンキングから始まり、同種の細胞シートをつくり、移植するというのがヒト幹細胞臨床研究で考えている要件で、厚労省の承認を得たやり方です。今、前原さんから紹介頂いたのは、将来的に細胞シートごと保存したものをパッケージを開けたらすぐに使えるようにできるようにできれば、その方が実用的だろうとい

うことで研究開発を進めています。

光島：前は液体窒素の気相と液相を発表されていたのですが、この時点では全てガラス化も保存も気相で行うということですか。

前原：はい。

光島：ガラス化のところは、予め液体窒素の気相下で冷やしておいた特殊な容器に挟んで、前は時間の短縮ができたということでしたが、今回は保存までもっていく時間はどのくらい掛かるのでしょうか。

前原：今回は従来の45分のプロトコルで行いました。今後、シートによっては、前報報告した通り、シートが薄層になればなるほど処理に必要な時間は短縮でき可能性は十分あると思います。今回の検討では2層、3層のシートを使っているのも従来通りの方法で行いました。

光島：特にガラス化の段階で実際何度の動きをしているかの測定はされているのでしょうか。

前原：-150度を保っていることは確認しています。

光島：それは補償されているのですね。細胞の生存数の点から言うと、時間短縮も可能だということですね。

中谷：最終的な保存というか、期限はどうなのでしょう。現在、申請をやっているヒト幹臨床研究の終了後、企業治験開始までにとということによろしいですか。

佐藤：ヒト幹の方は、このプロトコルではありません。

中谷：ガラス化液が市販予定とか販売予定と書いていませんでしたか。市販予定、バイオベルテ社というのが出てきたのですが、今はガラス化保存液というのは市販されていないということなのでしょう。

前原：現在我々が使用しているものは明治大学で自作しているものになります。

中谷：ではバイオベルテさんに技術移転して作ってもらうことになるのでしょうか。

前原：はい、その方向で動いています。

中谷：この保存液が販売されなくなると、これが全部アウトになってしまいますので、そのバイオベルテさんがしっかりしたものでないと、と思うのですがそこは大丈夫なのでしょうか。

長嶋：これは、ただ研究用の培地を外注で作っているというだけの話なので、佐藤先生の臨床的にやっている仕事とは切り離していただいた方が良いでしょう。

中谷：それでは、臨床用のものは別にしっかり作ってもらうということなのでしょう。

長嶋：佐藤先生が行っている臨床には、そもそも細胞シートをそのまま凍結するというのは入っていません。

中谷：将来、申請段階となったときにはどうするのでしょうか。

佐藤：どういったものが再生医療等製品を作るときにOKなのかは、基準があったと思います。再生医療等製品を作るときの原材料基準のようなものがあってと思います。

嶽北：おそらく、ガラス化したシートを製品として承認申請するにあたって、最終的にガラス化液は溶媒に相当すると思いますし、そういったものは医薬品では添加物という扱いになります。再生医療等製品では新しい規制ができています。そういったものの安全管理、品質管理それぞれ個別に考えていかなければならないと思います。懸念されているのは、臨床グレードでなければならないのか、Research Use Only ではだめなのか、どこが作るのかなどと思います。結局どこが作るのかは、どこに外注するのかというだけの話であって、ヒトに投与してもいいような categorize された成分として求められる基準をきちんと保っていれば良いだけの話です。安全性の評価の観点からは、製品を投与する観点、物によっては単独での評価も必要になってくると思います。勿論、ガラス化ができるかどうかは、だいぶ先の話ですから、今の段階から安全性を評価しなくても良いと思います。

佐藤：保存液なので、必ず洗浄という工程があります。そこでどのくらい、このような成分が薄まってくるのかをしっかりと見ていく必要もあると思います。現実にも今、ヒト幹細胞臨床研究で自己が終了しましたが、その時も牛由来の血清、抗生物質を使っていたので、どのくらいの洗浄で減ったかというところは、バリデーションとしてきちんと示しています。それと同じ様な方法になるのではないかと思います。

(4) 「軟骨細胞の同種 T 細胞に及ぼす影響」

研究分担者 加藤玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)

同種細胞シートの特性と安全性に関する研究で、同種 T 細胞に及ぼす影響について検討していますのでご報告致します。

これまでに開発された積層化軟骨細胞シートを用いた関節軟骨修復再生技術の将来的な普及を考えると、同種細胞移植が必須になると考えられます。同種細胞移植の利点として、レディメイドで細胞シートを作ることが出来ること、また本研究では多指症の廃棄組織から細胞ソースを採取することを想定していますので移植患者さんの負担を軽減することが出来ること、計画的な移植を行うことが出来ること、さらに同一ドナーからの細胞移植の場合あらかじめ細胞の品質情報が分かるため品質の良い細胞の選択が可能になることが考えられます。その一方で、同種細胞移植は拒絶反応を起こす可能性があります。軟骨組織は免疫応答が低いと言われていますが、実際宿主でどのような挙動を示すかという報告がなかったことから、現在まで同種軟骨細胞およびその積層化シートが免疫応答に及ぼす影響をこれまでに *in vitro* で検討してきました。

マウス軟骨細胞、正常ヒト軟骨細胞、ヒト膝関節軟骨細胞、およびそれらの積層化細胞シート、そして多指症軟骨組織由来細胞シートを用いて T 細胞に及ぼす影響を見てきましたが、T 細胞の活性化を惹起しないことや、活性化したリンパ球の増殖抑制能を報告してきました。今回はこの抑制機構のメカニズムの解析を行いました。

まずは、軟骨細胞側からの検討を行いました。積層化された軟骨細胞シートでは、TGF- β

やプロスタグランジン E2(PGE2)の発現が高いという報告があることから、これらの液性因子が免疫細胞の活性化を抑制するような因子なのではないかと考え、それぞれの中和抗体やインヒビターを用いてそれぞれの働きを抑えることで軟骨細胞による T 細胞増殖抑制効果が減弱するかを確認しました。

簡単に実験方法を示します。T 細胞を活性化させるリンパ球混合培養系に軟骨細胞を共培養すると T 細胞の増殖を抑制するのですが、そこに TGF- β 抗体や PGE2 合成酵素のインヒビターを加えることで、抑制効果が維持されるのか、もしくは増殖抑制効果がキャンセルされるのかを確認しました。接触培養の条件下においては、軟骨細胞が有する T 細胞増殖抑制効果にはインヒビターや中和抗体はほとんど抑制効果をキャンセルすることはなく、接触培養条件下においては、多指症軟骨細胞が有する T 細胞増殖抑制効果には、TGF- β 1 や PGE2 以外の要因の関与が強いことが示唆されました。TGF- β 1 は免疫細胞の活性化や増殖を抑制する液性因子なので、非接触条件下での検討や他のルートからの検討を考えています。

多指症の軟骨細胞は非常に増殖能が高いです。リンパ球の混合培養系にそれぞれ違うドナー3人からの多指症軟骨組織由来細胞を共培養すると、リンパ球の活性化を抑制する結果を得ていますが、BrdU の取り込みで見た時に、この中には多指症軟骨組織由来細胞が取り込んだ BrdU の値も入ってきてしまう為、これを完全にキャンセルする為に多指症軟骨組織由来細胞の増殖をマイトマイシン C 処理することで抑制した状況で実験したところ、この抑制効果がキャンセルされてしまいました。同様に、X 線照射でも増殖抑制したのですが、同様に抑制効果がキャンセルされました。このことから、多指症軟骨組織由来細胞は、未処理の軟骨細胞と比較して、それ自身の増殖を抑制してしまうと T 細胞の増殖抑制効果も減弱してしまう、ほとんどなくなることがわかりました。今後は、活性化 T 細胞増殖抑制効果が高い条件と低い条件の軟骨細胞間で、タンパク質もしくは RNA 発現の網羅的比較解析を行い、両者間で発現に違いのある分子を探索していきます。この中にはおそらく増殖抑制に関わる候補因子が含まれている可能性が高いと考えられるので、得られた結果を抑制機構のメカニズムの解明につなげていきたいと考えています。

次に、影響を受ける同種 T 細胞側からの解析を行いました。CD4⁺T 細胞は大きく 3 つのエフェクター細胞、Th1 (細胞性免疫)、Th2 (液性免疫)、Th17 (自己免疫疾患) と他のサブセットの T 細胞を抑制する作用のあると言われている Treg (免疫寛容) があります。それぞれのサブタイプに特異的に発現しているサイトカインがあります。IFN- γ 、INF- α は炎症性サイトカイン、IL-4、IL10、TGF- β は抗炎症性サイトカインです。今回は、IFN- γ 、INF- α 、IL17、IL-4、IL10、TGF- β について、共培養系の上清におけるサイトカインの測定を行いました。Th1 タイプでは、IL2 は、軟骨細胞が共培養されると有意差をもって減少しており、TNF- α も非常に少なくなっていました。ただし、IFN- γ は逆に数値が上がっていました。白血病患者さんにおいて骨髄幹細胞移植の際に起きる GVHD を抑制するのに間葉系幹細胞 MSC が細胞治療として用いられ、これも免疫抑制効果を持っているため GVHD

の治療に用いられているのですが、そちらの研究でも同様の報告があります。この作用機序は詳しく調べなければならないのですが、TH1 タイプサイトカインの生産は下がってきている傾向です。次に、Th2 タイプについて、IL4 に関してはほとんどの結果が検出限界以下でした。共培養系で若干上がってはいるのですが、かなり低い値でした。Th17 タイプに関しても、IL17 はいずれも検出限界以下でした。これら 2 つのサブタイプに関しては、ほとんど存在していないのではないかと思われます。Treg タイプに関しまして、IL10 ですが軟骨細胞と共培養すると有意差をもって発現量が上がっていました。TGF- β に関しては軟骨細胞自身が高発現しているので、培養上清中に T 細胞のみでなく軟骨細胞由来のタンパク質も含まれると考えられることから、T 細胞由来のみの検出は出来ていません。今後、FACS などを用いて T 細胞だけに着目し、細胞表面抗原や細胞内タンパク質を染色することで軟骨細胞によってどのような影響を受けているか検討したいと思っています。

今後の予定として、同種リンパ球の挙動に及ぼす影響の検討として、多指症軟骨組織由来細胞のシートでの抑制効果の検証、継代数による抑制効果への影響の検討、共培養中の T 細胞のプロファイリングを綿密に行いたいと思います。また、抑制効果のメカニズムの解明として、活性化 T 細胞増殖抑制効果が高い条件と低い条件の軟骨細胞間で、タンパク質や RNA 発現の網羅的比較解析により、抑制効果に関わる因子を同定することで抑制メカニズムの解明につなげたいと考えています。

< 質疑応答 >

光島：最後のサイトカインの話は、軟骨細胞共培養下での話だと思いますが、前回の時に軟骨細胞と多指症細胞とでは性質が機能的に違うのではないかという話があったかと記憶しているのですが、いかがでしょうか。

加藤：はい。実は大人の軟骨細胞は、X 線照射で増殖抑制をしても、増殖効果が維持されているという結果が出ていますので、多指症由来と成人由来とではそのあたりで違いがあるかもしれません。何も処理しなければ多指症細胞でも活性化リンパ球の抑制効果も持っていますので、例えば外傷があるときに軟骨細胞シートを入れることで、治療効果もあるし、炎症の抑制という副次的効果もあると思います。

光島：来年度以降の予定を示されていましたが、ここで使われる軟骨細胞はヒト由来の成人の細胞と多指症の 2 種類の細胞を使うのですか。

加藤：そうですね。両方の比較をしたいと考えていますが、研究の問題上、多指症由来細胞は東海大学でしか扱えないという制限がありますので、研究室では市販の細胞しか使えないという制限はあります。

中谷：免疫チェックポイントの発現は見ていますか。

加藤：現在は見ていないのですが、今後プロファイリングは軟骨細胞の方もやらなければならないと考えております。

中谷：癌のほうでは、CTL が侵入してきて抗腫瘍作用があるのですが、例えばそこで CTL

が INF- γ を出すと腫瘍組織側のカウンターで PD-L1 が誘導され、がん免疫抑制への影響があるという報告もされているようなので、INF- γ が上がっているのは、そのようなフィードバックがあった可能性もあるのではないのでしょうか。

加藤：はい、ありがとうございます。実は間葉系幹細胞の方も INF- γ で刺激されて初めて抑制効果を示すという報告もあるので、軟骨細胞も同様かもしれません、調べてみます。

(5) 「軟骨細胞シート専用器材の開発」

研究協力者 菊地鉄太郎（セルシード）

本日の発表内容は、2点あります。はじめに、軟骨細胞シート専用着器材の開発の進捗状況について、2点目は、弊社の自己軟骨細胞シートの臨床治験に向けた取組みについてご報告致します。

現在、軟骨細胞シートの培養に使用しているのは、アップセルインサートという製品です。これは、カルチャーインサートと呼ばれる多孔膜上で細胞を培養する器材に対して温度応答性を付与したもので、既存の細胞培養器材を利用しており、培養面積が 4.2 cm²になっています。また、こちらを利用する際には専用の 6 ウェルプレート上で培養します。そのため、積層化やメンブレンの切り抜きに最適化されていない、培養面積より大きな軟骨欠損に対応できない、1枚のシートでも6ウェルプレートが必要などの課題があります。そこで、弊社では軟骨細胞シート専用の温度応答性器材の開発に取り組んでいます。

軟骨欠損の大きさについてですが、マイクロフラクチャー法として知られる骨穿孔法では 2 cm²まで、モザイクプラスティ法として知られる自家骨軟骨柱移植術 2~4 cm²までと考えられています。そこで、従来法では修復の難しい 4 cm²以上サイズの治療を目指すには、より大きな面積の温度応答性インサートが必要であると考えています。

これまで、従来のアップセルインサートの 2 倍の面積を持つ大型アップセルインサートの設計を行ってきました。まず、実績のある現行インサートによる培養条件を踏襲し、かつ大型化に伴い予測される課題を解消することを基本方針としています。前回までに 3D プリンターを用いて 2 回の試作を行い、操作性等を確認してきました。今回さらにいくつかの点を改善し、3 回目の試作を行っています。まず、細胞シートの剥離時の操作性を上げるために、インサート部の耳を 4 か所へ変更しました。また、自己の軟骨細胞の培養の際に、インサートを入れる容器の方に滑膜細胞をインサートに軟骨細胞を播種する共培養系を想定し、できるだけ滑膜細胞と軟骨細胞の距離が現行と同じになるように、培養容器表面とインサート間の距離を現行の 0.9mm としています。その他、培養容器全体の高さを現行の 21mm に近づける等の変更を行っています。3 次試作品を先生方に見て頂きましたところ、ピンセット使用時のインサートの持ちやすさを改善させる必要がある等のご意見を頂き、さらに多少の設計変更を加えています。以上のような点を踏まえ、使いやすい大型アップセルインサートを設計し実際に金型による試作が出来ればと考えています。実際にこ

れまで 3D プリンターでの試作結果を踏まえて、現在最終形状案を検討中です。現在、図面がほぼ出来上がっており、成型業者との打ち合わせを行っている段階です。

次に、当社の臨床治験に向けた取り組みについて御報告します。先月、大筋ですが弊社の方針を決定することが出来ました。日本で自己細胞、同種細胞の開発を推進致します。企業治験については、自己細胞の治験を来年上期より開始したいと考えています。また、販売承認申請については平成 29 年度を目標としています。同種については、自己細胞の開発データを参考に今後推進していければと考えています。

自己軟骨細胞シートの臨床治験の開始に向けて、現在、以下のような項目を検討中です。この中で、品質管理体制(QMS)の構築、細胞シート製造体制の構築、治験実施体制(GCP)の構築については、現在着手して進めている段階です。

< 質疑応答 >

大和：インサートですが、多孔膜はどこから入手する予定ですか。

菊地：今のところ、現行のアップセルインサートと同じ膜を入手しようと考えています。

大和：入手することは可能なのですか。

菊地：安定して入手できるというところまでは進んではいませんが、入手することはできます。

大和：治験開始とは、どのような意味でしょうか。何をもって、開始と定義しているのでしょうか。

片山：治験開始につきましては、治験を実施する実施施設との契約完了、もしくは first patient を治験開始と考えています。

大和：前者の場合、我々は治験開始とは呼ばないと思います。もう少し厳密に喋った方がよいのではないかと思います。治験開始というのは非常にクリティカルなことなので、患者さんに導入することが must だと思いたすが。

菊地：ありがとうございます。

大和：大きなインサートは何に入れて培養するのですか。

菊地：インサート部分と受ける側の容器も専用に作製しています。

大和：わかりました。

大和：現行のインサートの問題点の最後に、1 枚のシートでも 6well プレートが必要とのことですが、1 枚のプレートで複数のシートを培養すると、ハンドリングミスによる影響が大きいというのは納得しにくいです。手技者の都合であり、インサートが原因ではないと思うのですが。

菊地：はい、インサート自体の問題の指摘ではなく、あくまでの専用の受け皿を作ることの説明を強調するために申し上げました。

大和：わかりました。

光島：インサートの話が出ましたが、それ以外の専用器材は佐藤班の研究に関して用意さ

れているのですか。

菊地：現在のところ、開発が始まっているのは今回紹介したこの器材のみです。

光島：前回もお話しがあったかと思いますが、セルシートの方でPMDAによる戦略相談を受けるとのことですが、それは膝関節の再生医療に特化した形での医療機器としての申請ということでしょうか。

菊地：先行するのは、自己の軟骨細胞シート自体の製造販売承認申請です。

光島：時期はいつごろを予定されていますか。

片山：まだ具体的な日付は決まっておりませんが、先ほど冒頭でお話しがあったように、先進と合わせて足並みを揃えて準備を進めています。

光島：先進医療Bの相談に合わせてということでしょうか。

片山：そうです。

佐藤：先進の方は粛々と進めていきます。企業治験の方は、薬事戦略相談もまだ行っていませんので、そこでどういった立付けでいいのかなども含めてご指導頂ければと思っています。

中谷：今は、シートの大きさとしては4.2 cm²以下のものを先進医療Bでもやるだろうし、その先の自己の企業治験の方も現在検討している大型のものではなく、従来の6wellプレートで行ったデータを使うのですよね？

佐藤：この先変更があるかもしれませんが、現時点では先進で考えているのは、今と同じプロトコールで行くので4.2 cm²以下でやることになると思います。そもそも、4.2 cm²の大きさの根拠ですが、厚労省の再生医療推進室の当時の室長と相談した際に、大きさと年齢の制限をある程度決めた方が良いということになりました。今の器材で作れる1枚の大きさが4.2 cm²ですので、もしシートが1枚しかできなかった際に、それより大きな欠損の患者さんが来た時に移植できないということになってしまうため4.2 cm²としました。将来的に器材で大きなシートが作れるのであれば、4.2 cm²以上の欠損も治せるのであればということで、このような開発も行っています。とは言え、実際は欠損部位がまん丸く空いている患者さんは少なく、だいたい楕円形になっていますので、1枚で覆えない患者さんもいらっしゃいます。自己細胞の臨床研究では、2~6枚の細胞シートが作製出来ていましたので、それを重ね合わせて1か所に対して何枚も移植しているという現実があります。実際、今のままだでも大きなものを沢山作れば被えない欠損はないのですが、4.2 cm²という決まりを設けた理由がそもそも器材の大きさが4.2 cm²だからという理由でしたので、それならば大きなものも開発しようということで、開発を進めております。

中谷：細胞シートの大きさというのは、規格のところでも重要になってくるのではないかと思います。企業治験になった時に、従来の4.2 cm²でやって、申請で完成した大きいのでするのは、どうなのでしょう。

佐藤：どのタイミングでこちらに移行するかというのは、今の段階では私の口からは申し上げられませんが、実際にできているのは4.2 cm²以下の患者さんにしか適応していませんの

で、それよりも大きな欠損をお持ちの患者さんに適応を広げるのであれば、そのときにこのようなものも使うことになるかもしれません。

中谷：同種にしろ、自己にしろ、初回申請の時から大きい方の細胞シートで申請するのか、追加的にやっていくのか、その部分の戦略は考えておいた方がよいのではないのでしょうか。

佐藤：ご指導ありがとうございます。今後、薬事戦略相談等含めて検討していきたいと思えます。

中谷：大きさが大きくなった時に、ガラス化して保存するときの容器は対応できるのですか。

佐藤：細胞シートのガラス化のことでしょうか。

中谷：将来、大きくした際に問題はないのでしょうか。

佐藤：たぶん大丈夫だと思いますが、長嶋先生いかがでしょうか。

長嶋：例えば、今より大きさが 10 倍になるとすると原理から変わってくると思いますが、2-3 倍であれば今と同様の原理で対応できると思います。

中谷：わかりました。

3. 事務連絡

光島：医薬基盤研の方からお伝えしたいことがあります。4 月から AMED が発足します。厚労科研のこの研究事業ですが、全て AMED に移管されます。進捗管理について、主体は AMED に移りますが、具体的な活動については従来通り基盤研の方に委託されまして、実施させて頂く事になりました。来年度の事業管理スケジュールは未定ですが、5 月をメドに決定されますので、その時にご連絡させていただきます。AMED に移っても、これまでの進捗管理については変わりないということになります。

佐藤：本日は第 2 回班会議にご出席頂きましてありがとうございました。5 年プロジェクトの 3 年が終了致しますが、順調に進んでいますので、今後とも PO の先生方、厚労省、PMDA の方々、細胞シートの専門家として大和先生にご指導頂きながらプロジェクトを進めていきたいと思っています。本日は誠にありがとうございました。

4. 閉会

以上