

骨・軟骨再生

# 細胞シートによる 関節軟骨再生治療

東海大学医学部外科学系整形外科学 佐藤 正人

## KEY WORDS

- 関節軟骨
- 細胞シート
- 再生医療

## はじめに

東海大学では、自己細胞シートによる関節軟骨再生医療をヒト幹細胞臨床研究として厚生労働省へ申請し、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、実施が認められ、2011年11月に第1例目の自己軟骨細胞シート移植を実施した。現在までに7例がエントリーされ、4例の移植が終了している。厚生労働科学研究費補助金再生医療実用化研究事業として行われているヒト幹細胞臨床研究 (<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/>) ではあるが、従来の軟骨再生医療とは一線を画し、日本ではじめて、変性した関節軟骨にも実施が認められたものである。しかし、現在の適応条件での臨床研究がわれわれの目指すゴールではなく、低侵襲で有効性の高い、そして普及しやすい治療法の開発が必要であると考えている。

われわれは、これまでに関節軟骨の

修復・再生に関する基礎的研究を、*in vivo*実験では、マウス、ラット、家兔、そしてミニブタを用いて有効性と安全性に関して実施してきた。一方、患者由来のヒト細胞を使用して、詳細な安全性の基盤となる*in vitro*の実験データを蓄積してきた。関節軟骨の修復・再生におけるレシピエント(宿主)側の細胞とドナー側の細胞との相互作用の重要性を確認し、組織修復・再生に軟骨誘導イニシエーターとして組織工学的軟骨が軟骨表層から浅層部分に必要最小限存在すれば、レシピエント側の細胞が主導的に修復促進することを見いだした<sup>1)3)</sup>。関節軟骨表層から浅層部分の再生が最も重要なポイントで、この部分が修復・再生されれば、それより深層は良好に自然修復される。つまり組織工学的軟骨の種類にかかわらず、積層化細胞シートでも、動物実験において関節軟骨の修復再生効果は同じであった。今回、細胞シート工学という日本オリジナルの技術によ

Regenerative medicine for  
articular cartilage using cell  
sheet.

Masato Sato (教授)

り、変形性膝関節症も適応条件に含め、ヒト幹細胞臨床研究として承認された<sup>4)</sup>。実際の患者を対象とした臨床研究により、安全性評価を現在実施しているところである。

一方、軟骨は免疫反応が著しく低いことが経験的にわかっており、海外では細かくチップ状にした軟骨片がすでに市販され、実際に臨床で使用されている。硬い軟骨を移植する場合、それを局所にしっかりと保持するために、縫合あるいはフィブリングルーでの固着など手技が煩雑になり、さらに脱転した場合に、関節内遊離体(関節鼠)として不具合を生じやすい。細胞シートの場合、たとえ脱転したとしても大きな有害事象を生じるとは考えにくく、関節内に留まる限りはサイトカインの持続的供給源として機能して、軟骨の修復・再生に寄与するものと考えられる。われわれは、将来的な普及を考慮した場合、同種軟骨細胞に着目し、セルソースに関しての検討と安全性をいかに担保すべきかという議論を、スーパー特区内の関係者と重ねている。明治大学農学部 長嶋比呂志教授との共同研究の成果から、同種軟骨細胞シートの保存法に関しての特許を出願し<sup>5)</sup>、臨床の現場で待機することなく使用可能なレディメイドの同種細胞シートによる再生医療の実現のために取り組んでいる。

## I. 細胞シートによる臨床研究

すでにこの温度応答性培養皿を用いて作製した細胞シートによる臨床研究または治験は、心筋、角膜、食道粘膜、歯根膜、関節軟骨の5つの異なる分野

で開始され、再生医療の実現を目指している。東京女子医科大学先端生命科学研究所長・教授 岡野光夫博士が開発し、自身が研究代表を務める先端医療開発特区(スーパー特区)内でこれら5つの臨床研究または治験を現在実施中である。

独自のナノ表面設計により温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)を器材表面に固定化することで、器材表面は32°Cを境に可逆的に疎水性(細胞接着表面)から親水性(細胞遊離表面)に変化する<sup>6)7)</sup>。この特性により、トリプシンなど、細胞に損傷を与える酵素を一切用いることなく、温度を20~25°Cにして10~30分程度待つと、無傷な細胞と細胞外マトリックスがシート状に回収可能である。温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートは、通常の培養皿で得られる培養軟骨細胞とは異なる特性を有し、損傷軟骨表層部に移植すると他の組織工学的軟骨と同等の組織修復再生効果を発揮する<sup>8)~10)</sup>。ただし、ヒト軟骨細胞での積層化細胞シートの作製は難しく、特に脱分化しなかった市販のヒト軟骨細胞では困難であり、短期間で活性の高い積層化軟骨細胞シートを作製するためには、滑膜細胞との共培養が必須である<sup>15)</sup>。

## II. 関節軟骨損傷に対する軟骨細胞シートの効果

われわれは、家兔の関節軟骨部分損傷モデルを作製し、軟骨細胞シートを3層に積層化したものを移植して、その治療効果を組織学的に観察した<sup>8)9)</sup>。関節軟骨部分損傷モデルでは4週もすると軟骨変性が進行し変形性関節症に

移行するのに対し、積層化軟骨細胞シート移植群では、表層部に細胞シートが留まり、変性抑制効果が認められた。組織学的に関節表層に残存している軟骨細胞シートは、サフラニンO染色では染色性を失ってはいるが、移植部位の変性抑制効果は顕著であり、非移植群との差は明らかであった(図)。これは細胞シートの優れたバリア機能により、関節液のカタボリックファクターから損傷軟骨を保護し、細胞外マトリックスの流出を阻止し、持続的な成長因子の供給源として軟骨の修復再生に寄与したものと考えられる。

さらに、われわれは、組織工学的に作製した軟骨を軟骨損傷の表層から浅層部分にのみ移植することで、深部に至るまで良好に修復再生すること<sup>1)3)13)18)19)</sup>などをこれまでに報告してきた。ミニブタを用いて自然修復しない関節軟骨全層欠損モデルを作製し、積層化軟骨細胞シートの治療効果を組織学的に確認したところ<sup>11)</sup>、積層化軟骨細胞シート移植群では表面が平滑で軟骨様の、正常軟骨と類似した色調の組織により置換されていた。組織学的にサフラニンOの染色性および、周辺組織とのintegrationも良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていた。一方、コントロール群では欠損部の充填は不十分であり、主として瘢痕性組織で置換され、一部では軟骨下骨の露出もみられた。全例でサフラニンOの染色性も乏しく、組織学的にも修復、再生状況は不十分であった。

## III. ヒト軟骨細胞シートの作製とその特性

ヒト細胞では、増殖活性の個人差が

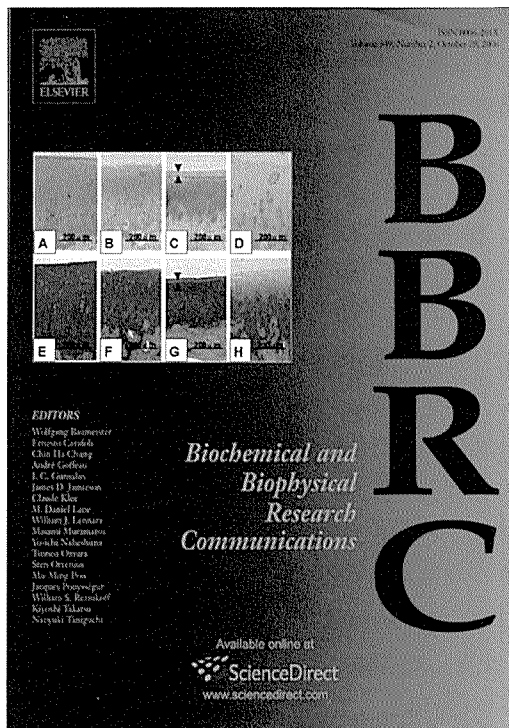


図. 関節軟骨部分損傷の修復・再生機序

関節軟骨部分損傷にも治療効果があることが確認され、変形性膝関節症のように2種類の軟骨損傷、すなわち軟骨全層欠損と部分損傷が常に混在する疾患に対しても治療効果が期待できる。この結果は雑誌「Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)」の表紙を飾ることとなった。

大きく、細胞シートの作製は難しい。特に市販されているヒト軟骨細胞は脱分化が進んでおり、増殖活性も低く、細胞シートは作製できないことが多い。われわれは、関節内環境を疑似するため、軟骨細胞と滑膜細胞を共培養することによって、短期間で確実に軟骨細胞シートを作製可能な共培養法を開発した<sup>15)</sup>。本学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと東海大学医学部付属病院で前十字靭帯再建術時に得られた10例10膝の軟骨および滑膜組織を酵素的に単離し使用して実験に供した。初代培養(P0)、継代培養(P1, P2)ともに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、P0~P1間は7日間、P1~P2間は5日間の培養期間で継代し、P1、

P2細胞を得た。培養方法は、温度応答性カルチャーインサート内で軟骨細胞のみ培養を行う群(S群)、コンパニオンプレートに滑膜細胞を、インサート内に軟骨細胞を播種し、インサートを介して共培養を行う群(C群)を作製した。共培養後14日目に3層に積層化し、さらに7日間培養した群(CL群)を作製した。滑膜細胞との共培養によって、S群と比較してC群の細胞増殖度は継代数に関わらず有意に増加し、培養3日目で2.23倍以上の細胞数を示した。本条件での培養の場合、P0では平均2週間、P1, P2では平均1週間より短期間で軟骨細胞シートの作製が可能であった。CL群では、S群と比較して、COL2, AGC1などの関節軟骨

形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。その差はS群と比較し、COL2は平均1.91倍、AGC1は平均1.35倍、TIMP1は1.37倍の増加であった。一方COL1, MMP3, MMP13, ADAMTS5は0.8以下に抑制された。本条件で作製された積層化軟骨細胞シートでは、COL2およびFN1, Integrin  $\alpha 10$ の局在は、従来の温度応答性培養皿で培養した場合の底面に限局される場合と異なり<sup>10)</sup>、積層化細胞シート全体に広く分布していることが確認された<sup>15)</sup>。これらの結果は、共培養により作製された積層化軟骨細胞シートは接着性に優れ、軟骨の形質を発現し維持しながら、組織修復に関与することを示唆するものである。

また、われわれは、積層化軟骨細胞シートが分泌する液性因子についても検討した<sup>16)</sup>。本学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと東海大学医学部付属病院で人工膝関節置換術を行った4例4膝で、手術時に採取した軟骨細胞と滑膜細胞を単離後、前述の条件で継代し、P0, P1の細胞を使用して本実験に供した。液性因子の測定は、培地を超低濃度血清培地にかえて7日間培養し、単層細胞シート群(ML群)、積層化細胞シート群(CL群)、およびCL群と同細胞数で単層培養を行った群(M群)を作製した。P0ではCL群においてCOL2, MIA, TGF $\beta$ の分泌は上昇しており、培養5日目に有意に高値を示した。また、MMP-13は0.05ng/mL以下と常に抑制されていた。一方、P1においてはCL群でTGF $\beta$ は有意に高値を示したが、COL2, MIAは経時的に低値を示していた。細胞シートは多くの液性因子を産生しており、特に積層化細胞シートは、P0

において軟骨の分化や組織修復に関与するCOL2, MIA, TGF $\beta$ の分泌が有意に上昇していた。一方MMP-13は0.05ng/mL以下と常に抑制されていることを確認した。MIAは可溶性蛋白質で、悪性メラノーマ細胞と軟骨細胞から分泌され、COL2と同様に軟骨分化マーカーとして知られている。これらの結果から積層化軟骨細胞シートそのものの機能に加えて、細胞シートが産生する液性因子が軟骨を保護し、修復、再生に寄与している可能性が示唆された。

#### IV. ヒト幹細胞臨床研究

現在、東海大学医学部付属病院で実施しているヒト幹細胞臨床研究「細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究」の概要を以下に示す。現在までに7例がエントリーされ2012年度までに4例の移植が終了しているが、大きな有害事象はなく、いずれも術後経過は良好である。臨床研究の詳細はホームページ (<http://cellsheet.med.utokai.ac.jp/about.html>) を参照いただきたい。

研究期間：2011年10月3日から3年間  
予定症例数：10症例

被験者の選択：

##### 1) 対象患者

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷を有する患者。

##### 2) 被験者の選択、除外基準

###### (1) 選択基準

以下の選択基準をすべて満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。

- ①20歳から60歳までの性別を問わない患者。
- ②膝関節軟骨損傷を有するもの。

③関節鏡所見で軟骨損傷がOuterbridge分類GradeⅢ以上のもの。

④膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに1.0cm<sup>2</sup>以上4.2cm<sup>2</sup>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

以下の除外基準に1つでも該当する患者は対象としない。

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

###### (3) エンドポイント

- ①有害事象の頻度。
- ②術後1年での臨床評価基準における点数。
- ③術後1年での単純レントゲン写真評価基準における点数。
- ④術後1年でのMRI評価基準における点数。
- ⑤術後1年での超音響法検査による粘弾性評価。
- ⑥術後1年での組織学的評価点数。

#### V. 今後の展望

自己細胞を用いる場合は、患者は組織採取のための侵襲的な手術をまず受けなければならない、その後3～4週間かかる培養工程がある。こうしたタイムラグを排除するため、同種細胞シートにより、目の前の患者をすぐに治療できるようにしたほうがよいとわれわれは考えている。また、年齢により、あるいはその他の影響により、ヒト軟骨細胞の増殖活性はさまざまである。

安定した増殖活性と形質発現維持による品質が保証され、感染症の伝播防止にも十分に配慮されているのであれば、同種軟骨細胞の使用は医療経済的にも安全性の評価の点からもメリットは大きい。それは、ロット化して管理できることで、自己細胞では1例ごとに毎回実施しなければならない種々の安全性検査を、何度でも、そしておそらく細胞数の消費をあまり考慮する必要なく、必要かつ十分な検査を実施できるものとする。将来的にはiPS由来軟骨細胞による治療が理想的かもしれないが、腫瘍化の問題を孕むため完全な分化誘導制御が要求され、十分な安全性の担保にはまだ多くの時間を要すると思われる。骨・軟骨は昔から同種組織移植が経験的に行われてきたことからわかるように、免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器(組織)の1つであるため、近未来的には同種細胞による治療が現実的ではないだろうか。こうした臓器(組織)特異性を生かして、安全性と免疫応答に関してのエビデンスを蓄積し、同種細胞シートによる軟骨再生を実現すべく現在準備を進めている。同種細胞の使用に積極的な方々との連携を深めていくことが急務と考えている。

#### 文 献

- 1) Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, et al : Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). J Biomed Mater Res B Appl Biomater 75 : 177 -184, 2005
- 2) Nagai T, Furukawa KS, Sato M, et al : Characteristics of a scaffold-free articular chondrocyte plate grown in rota-

- tional culture. *Tissue Eng Part A* **14** : 1183–1193, 2008
- 3) Nagai T, Sato M, Furukawa KS, et al : Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A* **14** : 1225–1235, 2008
  - 4) 厚生労働省発医政1003第3号「ヒト幹細胞臨床研究実施計画について」平成23年10月3日
  - 5) 出願番号：特許出願2011-260318, 出願日：2011.11.29, 出願人：学校法人明治大学, 学校法人東海大学, 株式会社バイオベルテ, 発明者：長嶋比呂志, 佐藤正人, 他
  - 6) Okano T, Yamada N, Okuhara M, et al : Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* **16** : 297–303, 1995
  - 7) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* **27** : 1243–1251, 1993
  - 8) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al : Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **349** : 723–731, 2006
  - 9) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, et al : Cultured articular chondrocyte sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* **13** : 87–92, 2007
  - 10) Mitani G, Sato M, Lee JI, et al : The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol* **9** : 17, 2009
  - 11) Ebihara G, Sato M, Yamato M, et al : Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* **33** : 3846–3851, 2012
  - 12) Sato M : Cell sheet technologies for cartilage repair. *Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues*. Woodhead Publishing Limited, CBC Press LLC, 251–265, 2010
  - 13) 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤 聡 : 分子レベルからみた整形外科疾患—シリーズⅧ 関節軟骨損傷修復のための軟骨細胞シート. *整形・災害外科* **53** : 1554–1555, 2010
  - 14) Ito S, Sato M, Yamato M, et al : Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. *Biomaterials* **33** : 5278–5286, 2012
  - 15) Kokubo M, Sato M, Yamato M, et al : Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with temperature-responsive culture inserts. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013 (in press)
  - 16) Hamahashi K, Sato M, Yamato M, et al : Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012 Nov 19. doi: 10.1002/term.1610. [Epub ahead of print]
  - 17) Sato M, Ishihara M, Ishihara M, et al : Effects of growth factors on heparin-carrying polystyrene-coated atelocollagen scaffold for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **83** : 181–188, 2007
  - 18) Sato M, Ishihara M, Furukawa K, et al : Recent technological advancements related to articular cartilage regeneration. *Med Biol Eng Comput* **46** : 735–743, 2008
  - 19) Sato M, Shin-ya K, Lee JI, et al : Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential. *BMC Musculoskelet Disord* **13** : 51, 2012