

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業  
(英語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology:  
Evaluation for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発/  
自己軟骨細胞シートのための統合的評価手法の開発  
(英語) Development of the comprehensive evaluation methods for the efficacy  
of autologous chondrocyte sheets

研究開発担当者 (日本語) 株式会社DNAチップ研究所 代表取締役社長 的場 亮  
所属 役職 氏名： (英語) DNA Chip Research Inc. President Ryo Matoba

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 自己軟骨細胞シートの機能的評価  
開発課題名： (英語) Functional evaluation of autologous chondrocyte sheets

研究開発分担者 (日本語) 東海大学医学部 教授 佐藤 正人  
所属 役職 氏名： (英語) Tokai University School of Medicine Professor Masato Sato

分担研究 (日本語) 自己軟骨細胞シートの作製  
開発課題名： (英語) Manufacturing of autologous chondrocyte sheets

研究開発分担者 (日本語) 株式会社セルシード 研究員 佐藤 千香子  
所属 役職 氏名： (英語) CellSeed Inc. Researcher Chikako Sato

## II. 成果の概要（総括研究報告）

佐藤正人教授（東海大学医学部 外科学系整形外科学）、佐藤千香子研究員（株式会社セルシード）らのグループとともに、自己軟骨細胞シートを評価するための遺伝子パネルを作製し、それを用いた解析を行うことによって、自家移植（ヒト）及びヒト細胞シートの異種移植モデル評価での有効性予測が可能であることを確認した。また、実験データ、臨床情報を統合するためのデータベース、それらを解析するためのアプリケーションシステムを構築した。

変形性膝関節症は国内だけで約 2,500 万人以上と推定されており、国民健康寿命や介護費、医療費を考える上で、喫緊に対処すべき非常に重要な疾患である。その解決手段として、東海大学医学部において、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づく臨床研究「自己軟骨細胞シートによる関節軟骨再生治療」を実施しており、術後の 1 年間フォローアップを終了、全症例で重篤な有害事象は認められず、この治療の安全性と有効性について確認している。この治療法の特徴は、欠損部分を積層化細胞シートでカバーするだけで、欠損部に誘導された骨髄液中の幹細胞が軟骨に分化することにより、通常の軟骨細胞移植で不可能であった硝子軟骨による修復が可能となることである。

佐藤正人グループでは、細胞シート（最終製品）の性能試験として、自己軟骨細胞シートの機能評価項目の設定及び、機能評価プロトコルの検討を行い、データベースに統合する項目の選定を行った。また、自己軟骨細胞シートの軟骨形成能の指標となる臨床成績データおよび細胞性能評価について、これまでのデータの収集とデータベース用の整理を実施した。

佐藤千香子グループでは、細胞シート（最終製品）の製造工程における品質評価として、自己軟骨細胞シート作製プロトコルの確立及び、品質評価試験の予備検討を行い、工程で使用する酵素に関して検討を行うとともに、製造工程内に実施するマイコプラズマ否定試験に関して、バリデーション試験を実施した。

的場グループでは、少量の細胞から感度良く安定して測定できる、微量サンプルからの遺伝子発現測定系を確立し、品質評価用遺伝子パネルを作製した。本パネルを用いて、すでに臨床サンプルで予後良好な細胞シートを含む軟骨細胞の遺伝子発現データを取得、合わせて、佐藤正人グループ、佐藤千香子グループより、品質評価、細胞評価及び臨床情報データを取得し、データベースを構築した。また、統合的に解析を行うための解析プラットフォームを作成した。このシステムを用いて、移植前の細胞シートのデータと移植後の臨床指標との関連解析を行った結果、有効性を示す遺伝子マーカー候補を同定した。さらに検証を行うため、由来やドナーの異なる複数の軟骨細胞シートを用いて評価を行い、これらのマーカーの有用性を確認した。

Tokai University School of Medicine, CellSeed Inc. and DNA Chip Research Inc. have been collaborating in this project to establish a quality assessment system for the efficacy of autologous chondrocyte sheets. We have identified candidates of gene markers of the efficacy and subsequently constructed a gene panel to predict the efficacy of autologous chondrocyte sheets before transplantation. Furthermore, we have constructed an application system comprising of comprehensive analysis tools for the analysis of the database aimed to combine experimental and clinical information.

There are over 25 million osteoarthritis patients estimated in Japan. It is an urgent issue how to tackle osteoarthritis to maintain the quality of life of elderly society while lowering the burden on national medical and welfare expenses. To treat osteoarthritis, the articular cartilage regeneration therapy using autologous chondrocyte cell sheets has been developed at Tokai University in accordance with the guidelines on clinical research using human stem cells. The efficacy and the safety of chondrocyte sheets have been demonstrated in clinical research. Feature of this therapy is hyaline-cartilage can be regenerated by simply covering the defect area with chondrocyte sheets and bone marrow stem cells will be induced to differentiate in the cartilage defect area.

Tokai University School of Medicine has been investigating the relationship between the properties (morphology, physical property and secreted proteins) of chondrocyte sheets and the clinical symptoms of the individual transplanted with chondrocyte sheets to determine the specifications of chondrocyte sheets.

CellSeed Inc. is responsible for establishment of the production protocol and validation of quality assessment tests of chondrocyte sheets. It has been analyzing enzyme activities which were used in the production steps. Essentially, a negative test of Mycoplasma in culture medium has been established and validated.

DNA Chip Research Inc. has been establishing an evaluation gene panel using q-PCR system from small amount of mRNA sample collected from cells attached to chondrocyte sheets. A database comprising of gene expression data from original transplantation chondrocyte sheets, clinical data from Tokai University School of Medicine and manufacturing data from CellSeed Inc. has been constructed. By analyzing the system, we have identified the candidates of gene markers to predict the efficacy using autologous chondrocyte sheets before transplantation. A validation analysis by comparing clinical outcomes after transplantation demonstrated the robustness and utility of these gene markers to predict the efficacy of chondrocyte sheets produced using different donors and origins.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）  
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 軟骨関連因子分泌に対する軟骨細胞の積層化培養の影響，口頭，豊田恵利子，佐藤正人，高橋匠，前原美樹，滝澤大智，高垣智紀、浜橋恒介，幸得友美，阿久津英憲，梅澤明弘，渡辺雅彦，第 16 回 日本再生医療学会，2017/3/7-9，国内.
2. SOMAscan を用いた軟骨細胞シートと滑膜細胞シートの液性産生因子解析，ポスター，十河泰之，佐藤正人，豊田恵利子，高橋匠，岡田恵里，前原美樹，滝澤大智，渡辺雅彦，第 16 回 日本再生医療学会，2017/3/7-9，国内.
3. Comparison of Humoral Factors Produced by Chondrocyte and Synovocyte Sheets using SOMAscan™ ，ポスター，Yasuyuki Sogo, Masato Sato, Eriko Toyoda, Takumi Takahashi, Eri Okada, Miki Maehara, Takizawa Daichi, Masahiko Watanabe, ORS 2017 Annual Meeting, 2017/3/19-22, 国外.
4. ヒト軟骨組織由来細胞シートの製造開発に向けた取り組み，ポスター，幸得友美，佐藤千香子，豊田恵利子，高橋匠，滝澤大智，十河 泰之，前原 美樹，岡田 恵里，橋本 せつ子，佐藤正人，第 16 回 日本再生医療学会，2017/3/7-9，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 軟骨細胞シートのための統合的評価手法の開発，的場亮，関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現 公開シンポジウム，2016/12/01，国内.

(4) 特許出願

なし