

## 特別講演⑤

Special Session 5

講演日時: 5月9日(木) 13:00~14:30

Time & Date: 13:00-14:30, Thursday, May 9, 2013

## 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現

Realization of Cartilage Regeneration by Cell Sheets Accelerating Joint Treatment



東海大学 医学部医学科 外科学系 整形外科学 教授

Professor, Dept. of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine

佐藤 正人

Masato Sato

### 関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業  
事業内容: URL: <http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/>

BIO tech 2013

【特別講演-5】再生医療の挑戦 ~3次元細胞組織構築へ~



東海大学 医学部 外科学系 整形外科学

佐藤 正人

DEPARTMENT OF ORTHOPAEDIC SURGERY  
TOKAI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE



### 本日の講演内容

1. 関節軟骨は特別な軟骨
2. 変形性関節症とどう向き合うか
3. 軟骨再生医療の現状
4. 細胞シートによる軟骨再生医療
  - ・自己細胞によるヒト幹細胞臨床研究
  - ・同種細胞シートの可能性



### 軟骨を作るのはやさしいの？



### 関節軟骨の機能

- ・潤滑機能  
摩擦係数が0.005~0.03  
(スケートの1/10 ~ 1/100)
- ・優れた粘弾性

ショックアブソーバーとしての役割

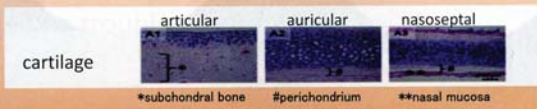






## 軟骨の差異 (関節・耳介・鼻)

Heterotopic Autologous Chondrocyte Transplantation -  
A Realistic Approach to Support Articular Cartilage Repair?  
El Sayed K, et.al. Tissue Eng Part B Rev. (2010)



Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes.  
Wachsmuth L, et.al. Histol Histopathol. (2006)

cartilage source	collagen I		collagen II		collagen IV		collagen V		collagen X		territorial matrix
	R/I	R/I	R	I	R	I	R	I	R	I	
knee											
superficial zone	+/+	+/+	+/+	-	+/+	-	+/+	-	+/+	-	-
transitional zone	-	++	+/+	++	-	+/+	++	+/+	++	++	-
upper radial zone	-	++	+/+	++	-	+/+	++	+/+	++	++	-
deep radial zone	-	++	++	++	-	+/+	++	+/+	++	++	+/+
calcified cartilage	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+/+
nose	-	++	-	-	-	+	+/+	++	-	-	++
ear	-	++	-	-	-	+/+	+/+	++	-	-	++



## 関節軟骨の再生は難しいです

- 耳や鼻の形を司る軟骨(弾性軟骨)は簡単に作れますが、関節の軟骨は難しいです。
- 関節軟骨は荷重に耐え、優れた潤滑性を発揮しなければなりません。そのため、組織学的に**硝子軟骨**という特殊な軟骨でできています。



## 変形性膝関節症



## 介護が必要となった主な原因 (要支援+要介護)の構成割合



要支援に限れば「関節疾患」が最多

<厚生労働省「国民生活基礎調査の概況」/平成22年>



## 我が国の高齢者の関節症

ロコモティブシンドロームの予防の重要性が認知されれば、個々人の行動変容が期待でき、国民全体として運動器の健康が保たれ、介護が必要となる国民の割合を減少させることが期待できる。

その端緒として、まずロコモティブシンドロームという言葉・概念の認知度を高める必要がある...

- 2000年「健康日本21」: 健康づくりの推進
- 2004年「健康フロンティア戦略」: 介護予防の推進
- 2006年「健康づくりのための運動指針」: 運動器疾患の予防のために策定
- 2007年「新健康フロンティア戦略」: 介護予防と運動器疾患対策の推進
- 2013年「第2次健康日本21」: ロコモティブシンドロームの認知度を高める

変形性関節症の克服と予防対策が急務

### メタボに匹敵する健康の大敵

## ロコモと変形性膝関節症

加齢に伴い運動器(骨・関節・筋肉)など体の動きを司る器官(組織の総称)の衰えを感じることは誰にでもあるが、それが寝たきりや要介護の大きな原因になっていることは知らない人も多いため、ロコモティブシンドローム(運動器症候群、以下ロコモ)と、その代表的疾患のひとつ変形性膝関節症(OA)の予防・治療について専門家に聞いた。

	健康寿命	平均寿命
男性	70.42	79.44
女性	73.62	85.90

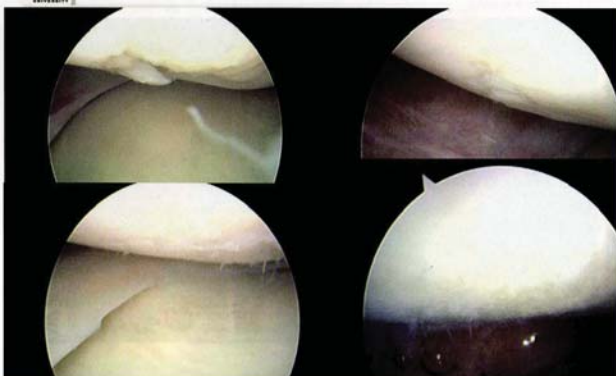
代表的な健康問題  
ロコモは高齢者全体の約10%に達している

若本幸英先生  
大阪府立医科大学 医学部 整形外科 教授  
日本整形外科学会 専門医  
日本関節学会 専門医  
日本変形性関節症学会 専門医  
日本ロコモティブシンドローム学会 専門医

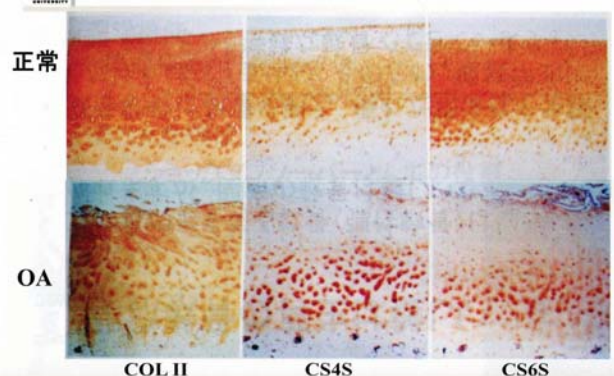
快適な高齢期のため  
ロコモの予防・改善を



## 初期の変形性膝関節症(関節鏡所見)



## 関節軟骨のマトリックス







## Hunter W. in 1743

Ulcerated cartilage is universally allowed to be a troublesome disease.

潰瘍化した軟骨は全く厄介な病気と言わざるを得ない



## 関節軟骨に関する問題点

- 変形性関節症の進行は防止できない。
- 根本的な治療はない。
- 適切な評価方法がない。
- 簡便なバイオマーカーがない。

正しく診断できないから治せない。  
早期診断、早期治療ができない。  
医者に行っても治らない。

患者は民間療法やサプリメントへ向かう。



## 変形性関節症の発症機序



薬局,2007,Vol58(4),858-865



## OA発症のリスク

- 靭帯損傷の上の方
  - 1321人
  - 発症し
  - 膝靭帯
  - リスク
  - 膝の関
  - がOAを
- 靭帯損傷or関節包損傷：10倍**  
**関節内骨折：20倍**

再生医療の主な分野と普及の経過

分野	普及時期
皮膚	2003年～2004年
軟骨	2004～2005年
骨	2008～2010年
中脳神経	2010～2012年
角膜	2008年

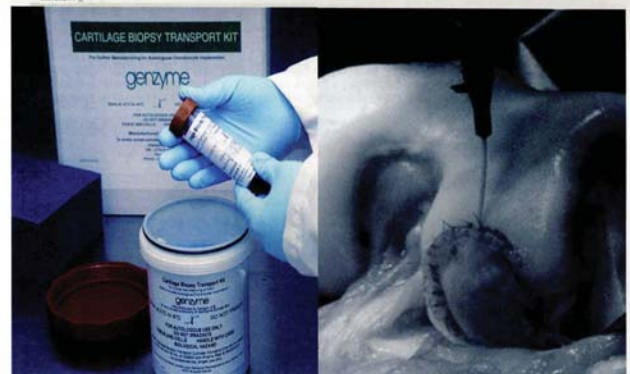
**再生軟骨細胞を一括生産**

低コストで高品質で

技術移転めざす



## Articular Cartilage Implantation (ACI)



## 各国で承認されている主な細胞・組織加工製品

国	皮膚	軟骨	その他
日本	ジェイス (2007)	ジャック (2012)	
アメリカ	Epicel (2007) Dermagraft (2001) Dermagraft-TC (2007) Aprigraf (1998) OrCel (2001)	Carticel (1997)	Provenge (前立腺がん, 2010) Lavi (しわ取り, 2011) GINTUIT (歯肉治療, 2012)
ドイツ	BioSeed-S EpiDex	Chondrolect (2009) ChondroTransplant Chondrosphere BioSeed-C CaReS (2002) MACI Hyalograft-C	
韓国	Holoderm (2002) Kaloderm (2005)	Chondron (2001) Article (2002) Cartistem (2012)	Adipocel (瘻瘻治療, 2007) Hearticelgram-AMI (心筋梗塞, 2011)

各社ホームページ等をもとに作成。( )内は承認年



## 第二世代の細胞・組織加工製品(軟骨)

企業名	国	製品名	スキャホールド	適応	承認状況
Fidia Advanced Biopolymer*	伊	Hyalograft®-C	ヒアルロン酸	外傷性軟骨欠損症、離断性軟骨炎	1999年承認(施設)
BioTissue Technology	独	BIOSEED®-C	Polyglactin Poly-p-dioxanone	外傷性または変性による軟骨欠損	2001年承認(施設)
Arthro Kinetics AG	独	CaReS®	コラーゲン	外傷性軟骨欠損症、離断性軟骨炎	承認(施設)
J-TEC	日本	ジャック®	アテロコラーゲン	外傷性軟骨欠損症、離断性軟骨炎	2012年製造販売承認

\*2009年,米国Anika Therapeuticalに吸収合併



Hyalograft®-C 5,000例以上



BIOSEED®-C 3,000例以上



CaReS® 2,000例以上

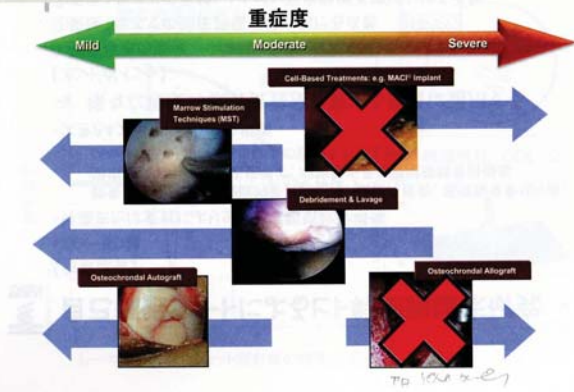


ジャック®

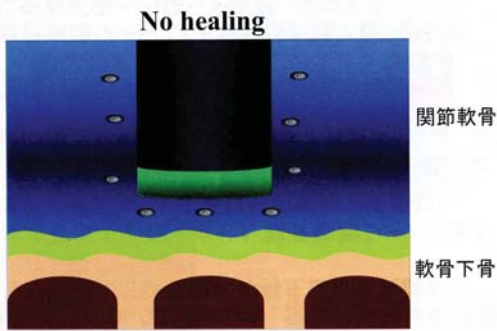
(各社HPからの情報)



## 軟骨欠損に対する治療法

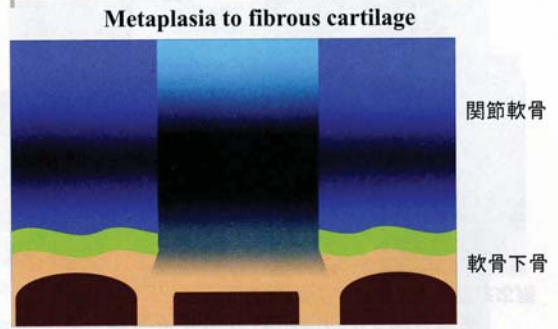


## 軟骨部分欠損（軟骨内損傷）



Mankin 1962

## 軟骨全層欠損（骨軟骨損傷）



Gospodarowicz 1976

## 細胞シートによる関節軟骨修復・再生



## 日本オリジナルな技術により、変形性関節症の治療にまで踏込んだ関節軟骨の再生医療を実現する

**Evidence 1** 共培養法で活性化させた軟骨細胞シートによる関節軟骨再生（上皮系以外の組織で世界初）

**Evidence 2** 変形性関節症で混在する軟骨全層欠損と部分欠損の両方で有効性を動物実験で実証済

**On going** ヒト幹細胞指針に則った臨床研究で初めて変性軟骨にも適用し現在実施中

**Goal 1** 自己細胞シートによる臨床研究終了後、速やかに先進医療への移行を申請し実施する。

**Goal 2** 同種細胞シートによる臨床研究をヒト幹細胞指針に則り申請し実施する。

## 再生医療推進法 1003 第3号

平成 23 年 10 月 3 日

東海大学医学部  
医学部長 今井 新 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子

ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成 23 年 3 月 31 日付で申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。  
なお、臨床研究の中止、終了などに伴う厚生労働大臣への報告については、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するようお願いする。

記

題 名：細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究  
研究責任者：佐藤 正人  
（東海大学医学部・外科学系整形外科・准教授）

## 自己細胞シートによるヒト幹細胞臨床研究

### 【対象患者】

- ・20～60歳
- ・外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷  
軟骨損傷を合併した靭帯の整復固定術、靭帯再建術、高位脛骨骨切り術、関節鏡視下手術の適応患者で、関節鏡所見で膝関節軟骨損傷部 Outerbridge分類Grade III以上の症例を対象とする。
- ・大きさ4.2cm<sup>2</sup>以下の軟骨損傷

→ 様々な程度の軟骨変性度を有する患者に適用する

### 【エンドポイント】

- ①有害事象の頻度
- ②術後1年までの臨床評価基準における点数
- ③術後1年ま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年までのMRI評価基準における点数
- ⑤術後1年時での超音波法検査による粘弾性評価（関節鏡）
- ⑥術後1年時での組織学的評価点数（関節鏡視下生検サンプル）

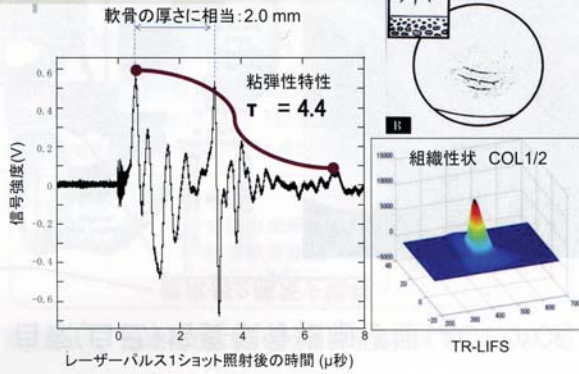
## レーザー誘起超音波法 (LIPA) による軟骨計測 2007年から東海大学で臨床応用



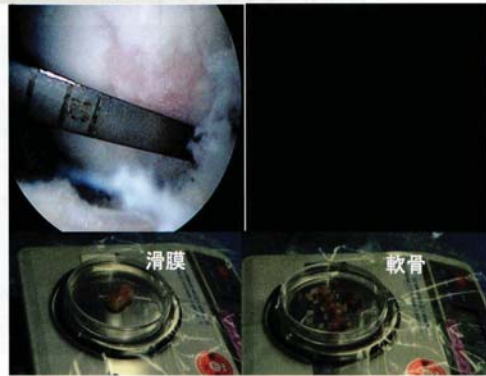




# LIPA結果



# 臨床研究第1例目 関節鏡視下診断と組織採取



# CPCモニタリングルーム

リアルタイム多項目モニタリングシステム

入室管理システム

モニタリング結果記録簿

モニタリング項目

1. 部屋圧
2. 部屋温度
3. 部屋湿度
4. 部屋0.3μmおよび0.5μm浮遊粉塵数
5. 安全キャビネット内0.3μmおよび0.5μm浮遊粉塵数
6. 培養器内温度、湿度、CO<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>濃度
7. 冷蔵庫、冷凍庫内温度



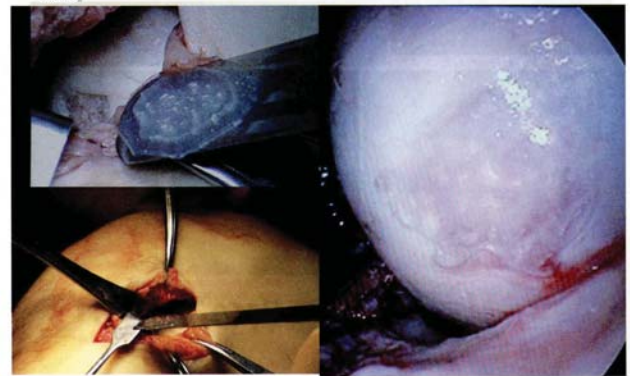
# CPCでの培養



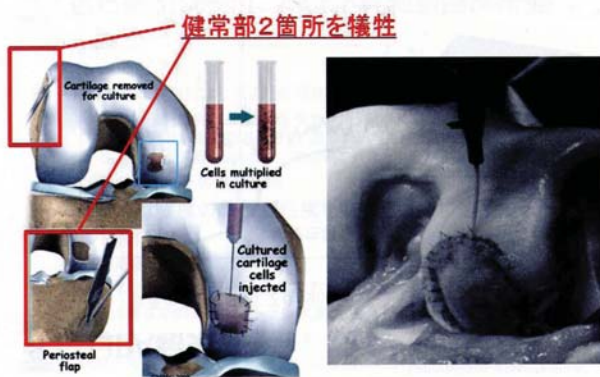
# 臨床研究第1例目 CPCから手術室へ細胞シート搬入



# 臨床研究 第2例目



# 自家(自己)培養軟骨細胞移植 (ACT/ACI)



# 培養軟骨細胞移植の問題点

なぜ今までの軟骨再生ではダメなのか？

- 健康部2箇所(軟骨採取部位と骨膜採取部位)に侵襲
- 再生組織の構築の不具合(組織過形成、石灰化、適合性)
- 部分損傷や変形性関節症は適応外

再生軟骨 = { 骨膜  
骨髄由来細胞 (内在性)  
培養軟骨細胞  
スキャフォールド } 組織工学的軟骨

➡ 多数要素の最適化は困難  
至適修復・再生は困難



# 培養軟骨細胞移植の問題点

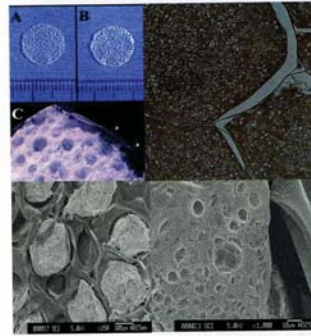
修復機序を考慮した再生医療であるべき

- 健常部 2箇所 (軟骨採取部位と骨膜採取部位) に侵襲
- 再生組織の構築の不具合 (組織過形成、石灰化、適合性)
- 部分損傷や変形性関節症は適応外

再生軟骨 = { 骨髄由来細胞 (内在性)  
培養軟骨細胞  
スキャフォールド } 組織工学的軟骨

→ 組織修復に適した環境を提供することが重要

# Atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS) scaffold



### Intervertebral Disc Cell

- J Biomed Mater Res A. 2003, 64:248-51
- Spine. 2003, 28:548-53.
- Med Biol Eng Comput. 2003,41:365-71

### Articular Chondrocyte

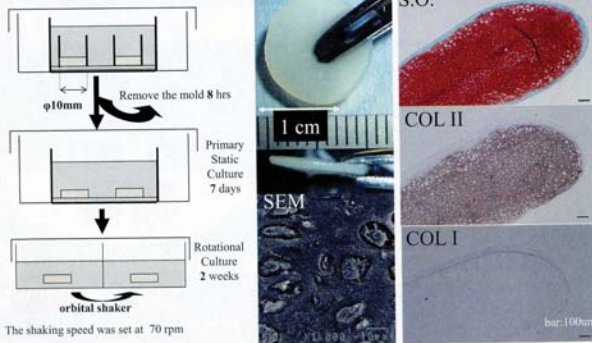
- Tissue Engineering 2005, 11:1234-43.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005, 75:177-84.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007, 83:181-88.

### Adipose Tissue-derived Stromal Cell

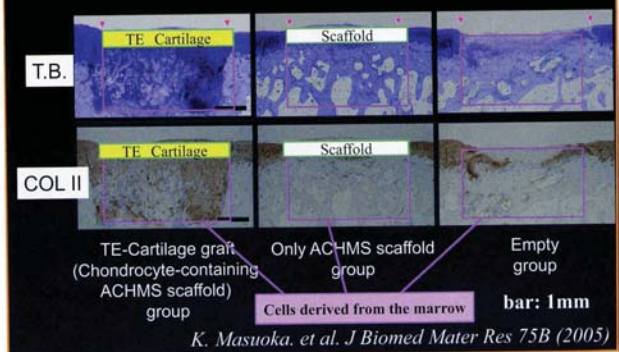
- Bone and Cartilage
- Cells Tissues Organs. 2004, 178:2-12.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006, 76:230-9.
- J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006, 79:25-34.

# Chondrocyte Plate Scaffold-free Tissue Engineered Cartilage

Nagai, T et al Tissue Eng. 2008 S.O.

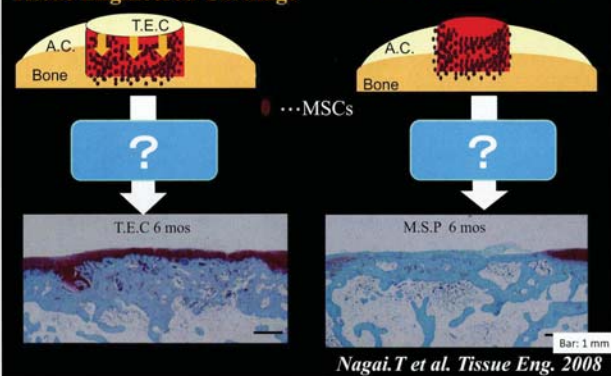


# The reparative tissue 12 weeks after surgery



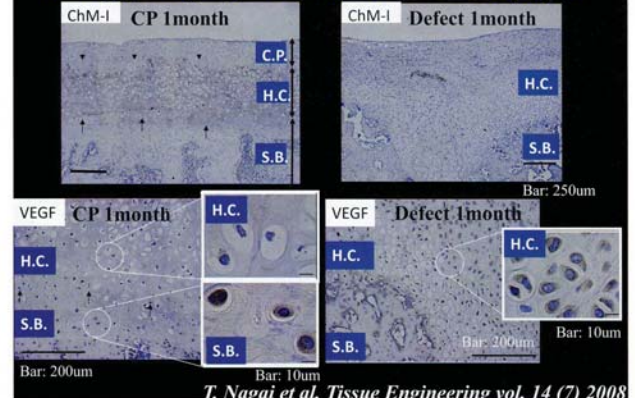
# Implantation of Tissue Engineered Cartilage

# Osteochondral Defect



Nagai, T et al. Tissue Eng. 2008

Host MSC-derived hypertrophic chondrocytes were altered to acquire the cartilage phenotype by the implantation of the chondrocyte plate.



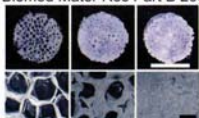
T. Nagai et al. Tissue Engineering vol. 14 (7) 2008

# どの組織工学的軟骨でも同じ結果!

(軟骨全層欠損に対する動物実験での治療効果に関して)

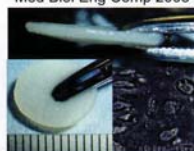
## TE Cartilage with Scaffold

- J Biomed Mater Res Part B 2005
- J Biomed Mater Res Part B 2006
- J Biomed Mater Res Part B 2007



## TE Cartilage without Scaffold

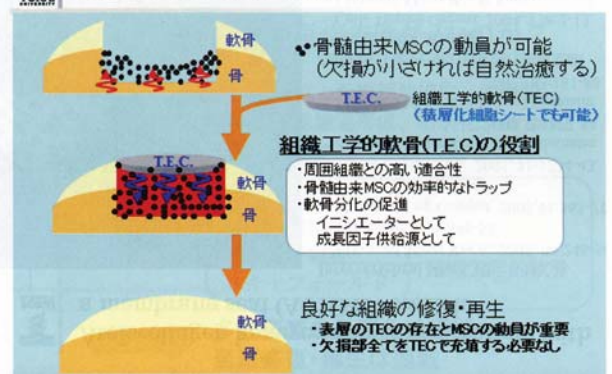
- Tissue Eng Part A 2008-a
- Tissue Eng Part A 2008-b
- Med Biol Eng Comp 2008



## Layered Chondrocyte Sheet

- BBRC 2006
- Eur Cells Mater 2007
- BMC Biotechnol 2009
- CBC Press LLC 2010
- Biomaterials 2012-a
- Biomaterials 2012-b
- JTERM 2012 in press

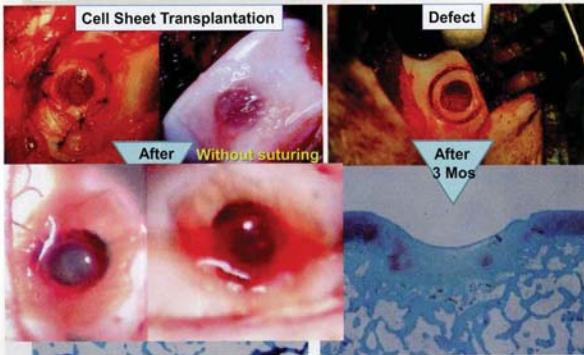
# 関節軟骨全層欠損の修復・再生機序







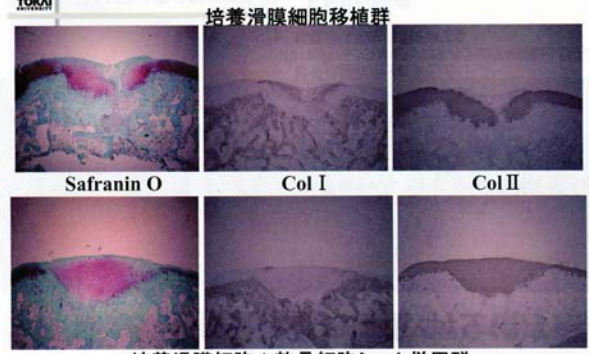
### ミニブタ軟骨全層欠損に対する積層化軟骨細胞シートの効果



Ebihara G, et al, Biomaterials 2012



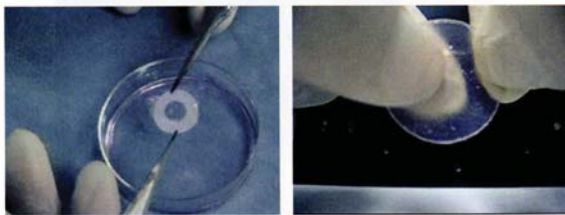
### 培養滑膜細胞単独 VS. 軟骨細胞シート併用



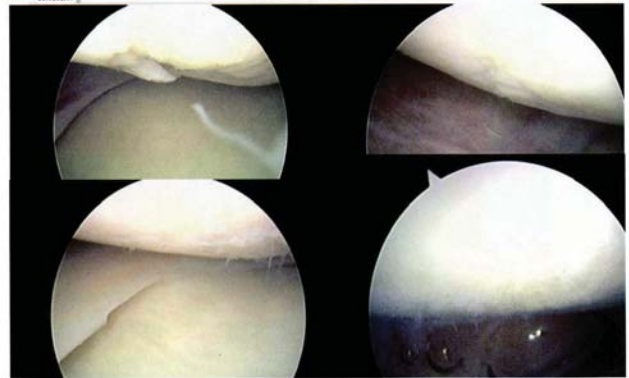
Ito S et al, Biomaterials 2012



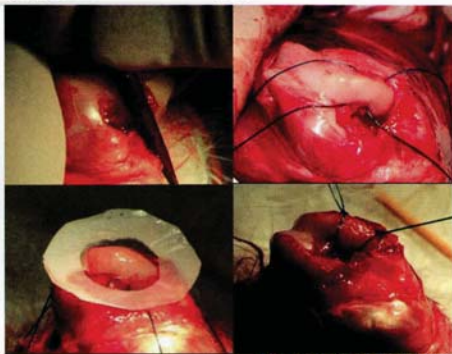
### 軟骨細胞シート



### 初期の変形性膝関節症(関節鏡所見)



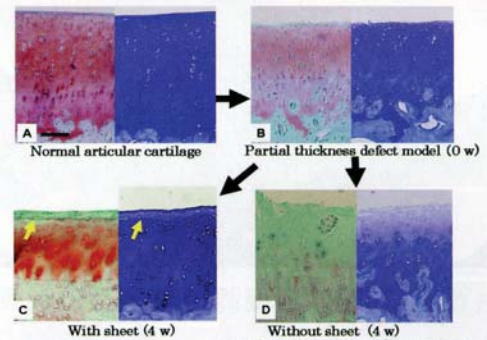
### 家兎軟骨部分欠損に対する積層化軟骨細胞シートの移植



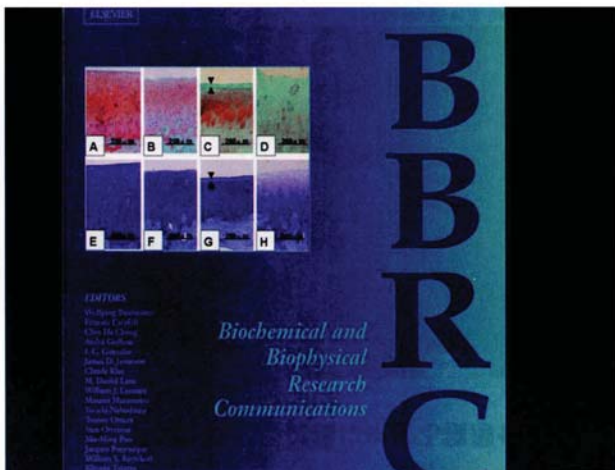
Kaneshiro N et al, BBRC 2006



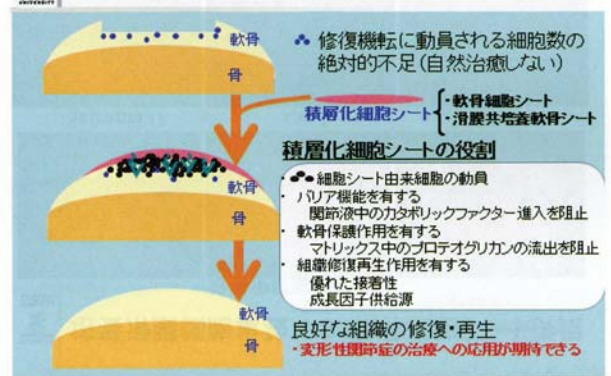
### 軟骨部分欠損に対する軟骨細胞シートの効果



Kaneshiro N et al, Eur Cells and Mater 2007



### 関節軟骨部分損傷の修復・再生機序







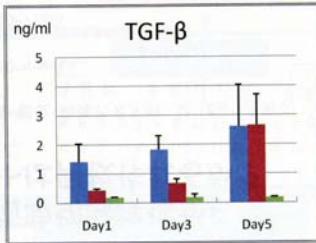
## 軟骨細胞シートの有する組織修復効果

Key Pathway( Relevant factors / Total factors )

- TGFβ signaling pathway 13/19
- Integrin-mediated adhesion 8/13

TGFβ (ELISA)濃度

- : chondrocyte sheet A
- : chondrocyte sheet B
- : chondrocytes

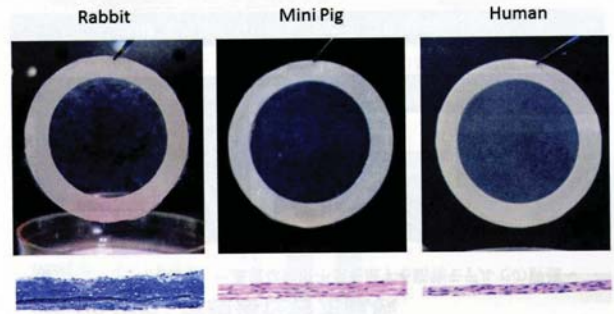


Hamahashi K, et al JTERM 2012 in press

2~5枚/c



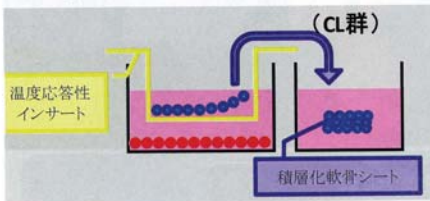
## 積層化細胞シート 種差



Kokubo M et al, Journal Tissue Eng Regen Med 2013 in press



## 積層化軟骨細胞シートの作製方法

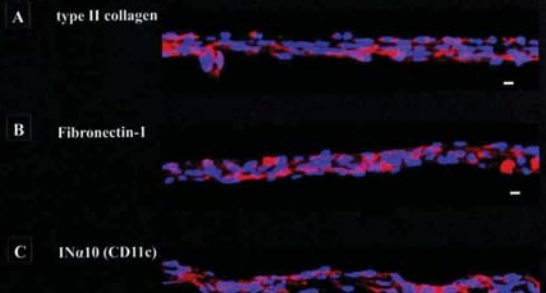


温度応答性インサートを用いた滑膜細胞との共培養

→ 増殖活性にばらつきがある細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能

Kokubo M et al, Journal Tissue Eng Regen Med 2013 in press

## IHC



Kokubo M et al, Journal Tissue Eng Regen Med 2013 in press

Alexa 594/DAPI Scale: 10 μm

-111-



## 同種細胞ソース

### 1. 多指症軟骨細胞

優れた増殖性、手術時廃棄組織



## 1個の多指症手術時切除検体から積層化細胞シートは何枚作れるか?

11枚は作れる

成育医療センターのストックリスト(年齢・部位・検体の大きさによりばらつきあり)

- P0:  $1.00 \times 10^6$  cells ~  $9.00 \times 10^6$  cells
- ↓
- P1:  $4.50 \times 10^6$  cells ~  $4.05 \times 10^7$  cells (4.5倍(経験値))
- ↓
- P2:  $2.03 \times 10^7$  cells ~  $4.70 \times 10^8$  cells (4.5~11.6倍)
- ↓
- P3:  $9.11 \times 10^7$  cells ~  $4.98 \times 10^9$  cells

積層化細胞シート 約745枚分(P2)

P0ストックを起こしてから約3週で最大49億 cells に増殖(P3予測値)

積層化細胞シート 約7,904枚分(P3)



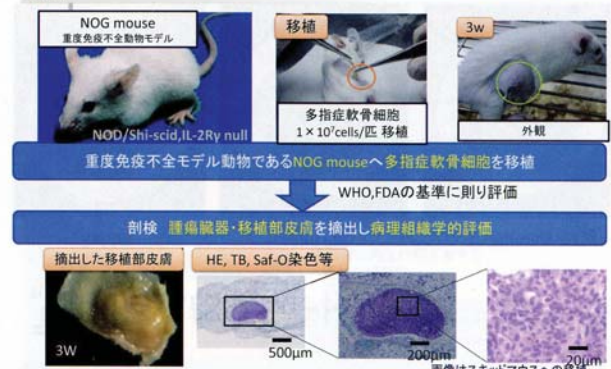
## 多指症手術時切除検体

国立成育医療研究センターとの共同研究



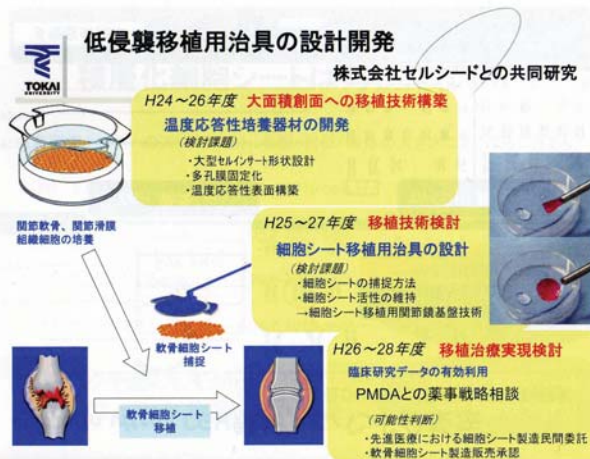
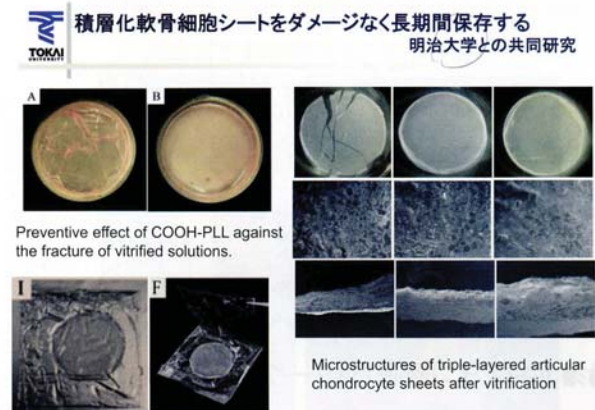
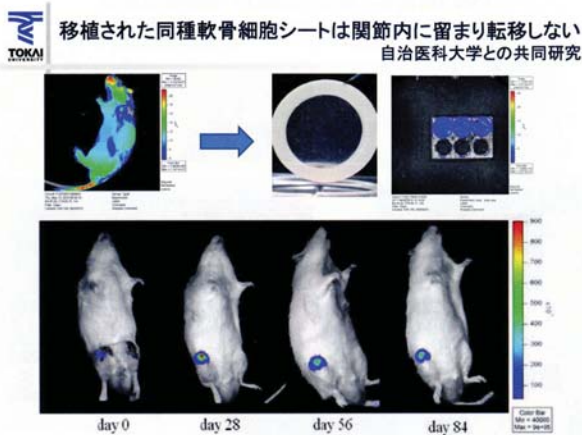
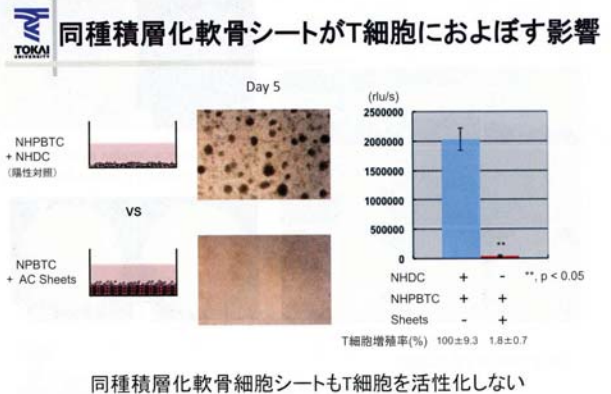
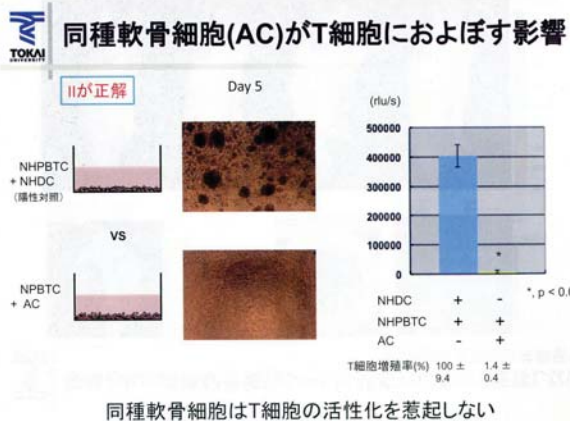
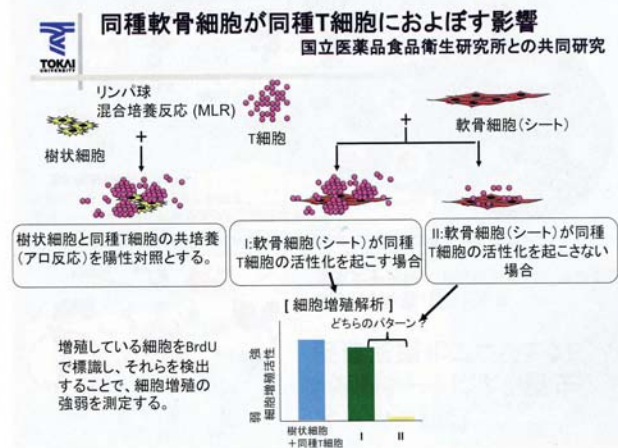
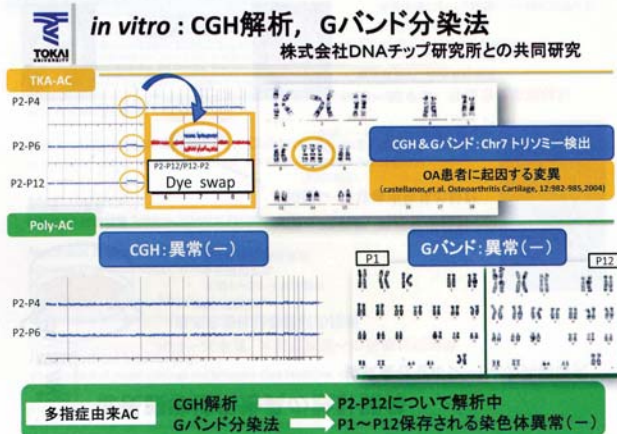
## in vivo : 造腫瘍性否定試験

~重度な免疫不全を呈する動物モデルでの評価~



-112-







## Acknowledgements

### Tokai University School of Medicine

- Department of Orthopaedic Surgery: Nagatoshi Kaneshiro, Genya Mitani, Toshihiro Nagai, Toshiharu Kutsuna, Naoshi Ohota, Satoshi Ito, Taku Utsui, Kousuke Hamahashi, Tomonori Takagaki, Miyuki Kobayashi, Munetaka Yokoyama, Mami Kokubo, Eri Okada, Tomoko Kawake, Ayako Watanabe, Joji Mochida,
- Research Center for Regenerative Medicine and Cancer Stem Cell: Shunichi Kato
- Department of Clinical Pharmacology: Ayako Mikami, Hiroyuki Kobayashi
- Cell Processing Center: Yoshihiko Nakamura

### National Research Institute for Child Health and Development

- Department of Reproductive Biology and Pathology: Hidenori Akutsu, Akhiro Umezawa

### Meiji University

- Department of Life Sciences, School of Agriculture: Hiroshi Nagashima, Miki Maehara

### National Institute of Health Sciences

- Division of Medical Devices: Reiko Kato

### National Defense Medical College

- Department of Medical Engineering: Miya Ishihara

### Jichi Medical University

- Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine: Kunihiko Murai, Yuko Takaku, Mamoru Takeuchi

### Tokyo Women's Medical University

- Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science: Teruo Okano, Masayuki Yamato

ご静聴ありがとうございました

事業内容: URL:<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

Email: [sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp](mailto:sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp)

