ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究
申請年月日	平成23年3月3日
実施施設及び 研究責任者	実施施設:東海大学医学部 佐藤 正人
対象疾患	外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷
ヒト幹細胞の種類	軟骨細胞および滑膜細胞
実施期間、対象症例数	実施期間(試験開始から3年間)、10症例
治療研究の概要	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し、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臨床研究。術前の関節鏡検査時に、上記診断を確定すると共に、滑膜と軟骨を少量採取し、セルプロセッシング室で細胞を単離後、温度応答性培養皿へ播種して細胞シートを作製する。安全性の評価を行うとともに、画像検査、病理検査にて軟骨再生の状態も評価する。
その他(外国での状況 等)	自己細胞を使用した軟骨再生医療に関して、国外では 既に20年近く前から研究が開始され、Genzyme 社の Autologous Chondrocyte Implantation(ACI)は既に2万 例近く世界で実施されている。国内では、広島大学で考 案したアテロコラーゲンゲル包埋培養軟骨細胞移植法を J-TEC 社が治験をほぼ終了した段階にある。 しかし、いずれも小さな軟骨欠損にのみ適用される問題 点がある。
新規性について	細胞シートによる関節軟骨再生医療で、 骨膜を使用しない新規性がある。変形性関節症で常に混在する全層欠損と部分損傷の両方での有効性を動物実験で確認している。

平成 23年 3月 3日

厚生労働大臣 殿

研	所 在 地	神奈川県伊勢原市下糟屋143(郵便番号259-1193)
究 機 関	名 称	東海大学 医学部 0463-93-1121 (代表電話番号) 0463-96-4404 (FAX番号)
	研究機関の長役職名・氏名	東海大学医学部 医学部長 今井 裕

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
細胞シートによる関節治療を目指した 臨床研究	東海大学医学部外科学系整形外科学 准教授 佐藤 正人

臨床	研究の名称	細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究							
研究	2機関								
	名称	東海大学医学部							
	所在地	〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143							
	電話番号	0463-93-1121(内線 2320)							
	FAX 番号	0463-96-4404							
研究	2機関の長								
	役職	医学部長							
. 57	氏名	今井 裕 印							
研究	責任者								
	所属	外科学系 整形外科学							
	役職	准教授							
	氏名	佐藤 正人 印							
	連絡先 Tel/Fax	Tel:0463-93-1121(内線 2320)/ Fax:0463-96-4404							
	E-mail	sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp							
	最終学歴	防衛医大学校 医学教育部 医学研究科							
	専攻科目	整形外科学							
その	他の研究者	別紙 1 参照							
臨床	研究の目的・意義	本研究の目的: 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。この新規治療法の客観的評価をプライマリーエンドポイントとして安全性を評価し、セカンダリーエンドポイントとして有効性を画像的・臨床的評価方法により実施することである。							
		本研究の意義: 関節軟骨欠損を放置すると 10 年から 20 年の経過で変形性関節症(以下OA)へ進行するとの見方が一般的である。OA は、関節の軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。OA は直接生命を脅かす疾患ではないが、日常生活動作(ADL)に著しい障害を及ぼし健康寿命に多大な影響を与えている。また、日本では、膝関節だけでも OA を罹患している患者は1000 万人以上と推定されており OA の克服は重要な課題である。疫学調査などから OA は遺伝的因子と環境因子の相互作用により発症する多因子遺							

伝病、生活習慣病であることが明らかとなってきている。変形性膝関節症は 加齢や膝関節への負担により軽度の軟骨損傷が生じ、この軟骨損傷が拡大 していくことによって生じる。軽度の軟骨損傷では自覚症状がない事が多い が、関節軟骨表面のけば立ち(fibrillation)程度の場合でも、粘弾性と潤滑に 重要な役割を担っている軟骨細胞の細胞外基質(細胞外マトリックス)の変 性が確認されており、軽度の軟骨損傷に対しても早期治療が望まれる。ま た、軟骨損傷が拡大して、高度の軟骨損傷となる場合、人工関節置換などの 侵襲の大きな手術が必要となり、患者自身への負担は計り知れない。現在、 中等度までの軟骨欠損に対しては、自己軟骨細胞移植が行われているが、 正常部を2箇所犠牲にしなくてはならないこと、採取可能なドナー部位に限り があること、高齢者では軟骨増殖能力が低いことなどの問題も指摘されてお り、新規の治療法の開発が待たれている。

我々は、以前より手術時に採取された軟骨組織・滑膜組織を用いて共培養することにより軟骨細胞シート作製に取り組み、軟骨細胞シートの特性やウサギ膝軟骨欠損に対する軟骨細胞シート・滑膜移植による研究を行っており有効性を確認してきた。細胞シートを積層化することにより、単層細胞シートと比べて Col2・fibronectin・SOX9・HAS2 などの軟骨再生に重要な遺伝子の発現が上昇することや、動物モデルにおいて軟骨欠損に積層化細胞シートを移植することで良好な修復再生が生じることを確認した。また、我々は軟骨細胞シート作製時に滑膜細胞との共培養を行うことで細胞増殖能が上昇することを見出し、細胞シート作製までの期間の短縮に成功した。一方、移植された細胞シートの異所への移動等を否定するために、ルシフェラーゼトランスジェニックラットの細胞で作製した細胞シートを軟骨欠損部へ移植し、経時的に体外より発光強度を IVIS system を用いて観察し、細胞シートが目的外組織へ、すなわち異所へ遊走することなく、移植された関節内に局在することを確認した。

軟骨細胞の培養には、温度応答性培養皿を用いる。温度応答性培養皿を 用いると、温度降下のみで細胞を培養皿から回収できるため、細胞外マトリックス等を維持したままの高い機能を保持した細胞が回収でき、細胞をコンフルエントまで培養した場合、全細胞が連結した1枚の軟骨細胞シートとして回収することができる。得られた軟骨細胞シートは、培養の間に沈着した細胞外マトリックスを底面に保持したまま回収されるため、容易に他の表面に接着することができる。既に、細胞シートは皮膚・角膜・心筋など様々な分野で臨床応用されているが、本研究で用いる軟骨細胞シートは上皮系以外の細胞では、はじめてのものであり日本発世界初の先端技術を動員して、難治性の関節軟骨治療に適用するものである。

臨床研究の対象疾患

名称

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

選定理由	膝関節の軟骨損傷を有する疾患で、軟骨変性度の異なる患者に適用し、安全性と有効性を確認するために選定した。
大阪大体の潜立士法	選択基準
皮験者等の選定基準	下記の選択基準を全て満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。
	① 20歳から60歳までの性別を問わない患者。
	② 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(別添 2「研究実施計画書」
	17. 臨床評価基準 参照) Grade III 以上のもの。
	④ 軟骨損傷を観血的整復固定術、靭帯再建術、高位脛骨骨切り術、関節
	鏡視下手術等の適応となるもの。
	36136 T 7 H 3 G 52216 C G G G 5 G
	除外基準
	下記の除外基準に1つでも当てはまる患者は対象としない。
	① 患者や御家族への特別な配慮が必要となり倫理的に困難な場合。
	② 重大な合併症を有している場合。
	③ 問題となるような感染症(HBV,HCV,HIV,HTLV, FTA-ABS 等の陽性を含
	む)を有している場合。
	0/2 HO CV 0-75 L 6
種類	軟骨細胞および滑膜細胞
由来	自己非自己·株化細胞 生体由来 死体由来
Water and the second	自己 非自己 株化細胞 生体由来 死体由来
採取、調製、移植又は	〇組織の採取
採取、調製、移植又は投与の方法	○組織の採取
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート系
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート科 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
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート科 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 フォー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
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート科 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 フォー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
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート科 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 フォー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
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート利 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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。
	〇組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シートを 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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。
	○組織の採取 対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シート利 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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 ○細胞シート作製 ①細胞の単離
	〇組織の採取対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 〇細胞シート作製 ①細胞の単離 軟骨細胞:50 mL 遠沈管①に生理食塩水を 10 mL 入れ、しっかりフタをする。
	〇組織の採取対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シートを植時に、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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 〇細胞シート作製 ①細胞の単離 軟骨細胞:50 mL 遠沈管①に生理食塩水を10 mL 入れ、しっかりフタをする。遠沈管①の重量を精密に量る。ディスポピンセットを用いて軟骨組織片を透
	〇組織の採取対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シートを植時に、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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 〇細胞シート作製 ①細胞の単離 軟骨細胞:50 mL 遠沈管①に生理食塩水を10 mL 入れ、しっかりフタをする。遠沈管①の重量を精密に量る。ディスポピンセットを用いて軟骨組織片を遠沈管①に入れ、遠沈管①の重量を測定する。組織湿重量[総重量(mg) - 原
	〇組織の採取対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 〇細胞シート作製 ①細胞の単離 軟骨細胞:50 mL 遠沈管①に生理食塩水を10 mL 入れ、しっかりフタをする。遠沈管①の重量を精密に量る。ディスポピンセットを用いて軟骨組織片を遠沈管①に入れ、遠沈管①の重量を測定する。組織湿重量[総重量(mg) - 属袋重量(mg)] mg を計算する。液を取り除き、生理食塩水を30 mL 入れ、よる
	〇組織の採取対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シートを植時に、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ー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取する。 〇細胞シート作製 ①細胞の単離 軟骨細胞:50 mL 遠沈管①に生理食塩水を10 mL 入れ、しっかりフタをする。遠沈管①の重量を精密に量る。ディスポピンセットを用いて軟骨組織片を遠沈管①に入れ、遠沈管①の重量を測定する。組織湿重量[総重量(mg) - 原

て、50mL チューブに組織片を移す。

50 mL 遠沈管 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、5%コラゲナーゼ溶液を 30 mL 入れ、10 回ピペッティングする。溶液を 125 mL ボトルに移し、フタをゆるめに閉め振蕩しながら 37°Cでインキュベートする。インキュベート開始 2 時間後、酵素処理の進行度を確認する。融解が足りないようなら、引き続きインキュベートを行い、開始から4時間まで酵素処理を続ける。酵素処理終了後 100 um セルストレイナーを通して、懸濁液を新しい遠沈管に入れ 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティングする。1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティング し 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティング し 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティング し 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 2 mL 入れ、10 回ピペッティング し 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。と清を除き、生食を 2 mL 入れ、10 回ピペッティングする。細胞懸濁液を 10 uL 採取し、トリパンブルー液 90uL とよく混ぜる。懸濁液を 10 uL 採取し血球計算盤で 4 区画の細胞数をカウントする。懸濁液の濃度 [4 区画の合計 × 250] cells/mLを計算する。細胞数 [懸濁液の濃度(cells/mL) × 2(mL)] cells を計算する。

滑膜細胞:50 mL 遠沈管②に生理食塩水を 5 mL 入れ、しつかりフタをする。遠沈管②の重量を精密に量る。ディスポピンセットを用いて滑膜組織片を遠沈管に入れ、遠沈管の重量を測定する。組織湿重量[総重量(mg) - 風袋重量(mg)]mg を計算する。液を取り除き、生理食塩水を 30 mL 入れ、よく振る(計 2 回繰り返す)。液を取り除き、生理食塩水を 10 mL 入れる。組織片の入った遠沈管から組織片を 10 cm ディッシュに液ごと移す。ディスポメスを用いて組織片を 5 mm 角程度まで細切する。25 mL ピペットと生理食塩水を用いて、50mL チューブに組織片を移す。

50 mL 遠沈管を 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、5%コラゲナーセ 溶液を 30 mL 入れ、10 回ピペッティングする。溶液を 125 mL ボトルに移し、フタをゆるめに閉め振蕩しながら 37℃でインキュベートする。インキュベート開始 1 時間後、酵素処理の進行度を確認する。融解が足りないようなら、引き続きインキュベートを行い、開始から 2 時間まで酵素処理を続ける。酵素処理終了後 100 um セルストレイナーを通して、懸濁液を新しい遠沈管に入れ 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティングする。1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティングし 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 20 mL 入れ、10 回ピペッティングし 1500rpm R.T.で 5 分間遠心する。上清を除き、生食を 2 mL 入れ、10 回ピペッティングする。 細胞懸濁液を 10 uL 採取し、トリパンブルー液 90uL とよく混ぜる。 懸濁液を 10 uL 採取し血球計算盤で 4 区画の細胞数をカウントする。 懸濁液の濃度 [4 区画の合計 × 250] cells/mL を計算する。 細胞数 [懸濁液の濃度(cells/mL) × 2(mL)] cells を計算する。

②共培養(単層細胞シート作製)

軟骨組織の分離工程前に、予め初回軟骨細胞培養用培地(「+20%FBS+

AB」)を温度 37±1°Cにてプレインキュベートしておく。プレインキュベートした 培地内に温度応答性インサートを介して軟骨細胞 50000/cm² および滑膜細胞 10000/cm²を播種し、軟骨細胞・滑膜細胞を共培養する。炭酸ガス培養装置にて、温度 37±1°C、炭酸ガス濃度 5±1%、湿度 95±5%環境下にて 3 日間培養する。

③積層化細胞シートの作製

プレート 1 枚を室温(R.T.)に 30 分間放置する。1 枚目のプレートから培地を全て吸い取らないように取り除き、静かに PVDF サポートメンブレンを載せる。シートの端を PVDF サポートメンブレン上にまくりあげる。2 枚目のプレートから培地を取り除く。1 枚目のプレートの中央に培地を1000 uLマイクロピペットを用いて 1 滴垂らし、なじませる。1 枚目のプレートからシートを剥離し、静かに 2 枚目のプレートに載せる。シートの端を PVDF サポートメンブレン上にまくりあげる。プレート 1 枚をインキュベーターから取り出し培地を取り除く。2 枚目のプレートからシートを剥離し、静かに 3 枚目のプレートに載せる。シートの端を PVDF サポートメンブレン上にまくりあげる。3 枚目のプレートからシートを剥離し、静かに 10cm プレートに置く。シート中央に PTFE リング状ウェイトを載せる。培地を 10 mL 入れ、静かにインキュベーターに戻す。これを繰り返し、必要数の積層シートを作製する。

〇移植

3週間後作製された軟骨細胞シート(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、病巣部を洗浄した後、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。

調製(加工)行程	御·無			
非自己由来材料使用	有∙∰	動物種()	
複数機関での実施	有∙∰			* - * *
他の医療機関への授与・販売	有∙無			9 2

安全性についての評価

111/18

24,598

〇細胞シートの安全性評価項目

患者由来細胞(自己細胞)から作製した細胞シートの移植前の安全性を確保するために、セルプロセッシング室(CPC)での製造前、製造中の中間試験、移植前日、及び最終製品の状態を評価するために、細胞形態観察、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、ウィルス否定試験、無菌性試験を検体提出日(検査日)に実施し、移植用組織としての安全性を確認する。

(別添 2「研究実施計画書」8 研究の方法 5)評価項目の概要 参照。)

〇非臨床安全性試験

(薬食発第 0208003 号 第 4 章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験」に係る項目)

細胞シートは、被験者由来の細胞を加工して作製し、被験者本人の体内に移植することを想定している。当加工により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、培養期間を超えて培養した細胞について、以下のような試験を実施し、安全性を確認した。

1. CGH 解析

軟骨細胞を培養し通常の培養期間を超えても細胞に変化が認められないことを確認するため第 6 継代(P6)まで培養を行い第 2・4・6 継代(P2・P4・P6)での培養細胞の遺伝子レベルでの異常がないかを CGH 解析を用いて評価し、明らかなコピー数異常が生じないことを確認した。

2. 生体内での造腫瘍性について

培養軟骨細胞シートが生体内にて造腫瘍性を持たないことを確認するため、 培養軟骨細胞シート由来の細胞をマウス皮下に移植し、腫瘍形成について 観察を行った。

免疫不全マウスの皮下に軟骨細胞シート(1.6×10⁶ cells/匹)、軟骨細胞シート+滑膜細胞(3.2×10⁶ cells/)を 200µ I の生理食塩水に懸濁した状態で 2 群に分けて注入した。評価は 9 週、12 週、24 週の期間で観察し移植部位を病理組織学的に観察した。9 週、12 週、24 週いずれの時期においても腫瘍形成は確認されなかったが、移植細胞自体も確認されなかった。

そこで、WHO の基準に則り免疫不全マウスの皮下に軟骨細胞 $(1.0 \times 10^7 \text{ cells/匹})$ 、軟骨細胞+滑膜細胞 $(2.0 \times 10^7 \text{ cells/匹})$ を移植した。Sham 群も作製し計 3 群として 3 週、12 週で評価を行った。

長期的な造腫瘍性否定試験については、本製品の適用が局所的であること より、実験担当者が定期的に観察した。

試行 (識別 No.)		ートの細胞 試順	WHO の基準に則った 試験							
	6 weeks		12 weeks		24 weeks		3 weeks		12 weeks	
	移植部	転移	移植部	転移	移植部	転移	移植部	転移	移植部	転移
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

臨床研究の実施が可能であると判断した理由

The state of the s

9-94

私共は、これまでに関節軟骨の修復・再生に関して基礎的研究を主に家 兎並びにミニブタを用いて行なってきた。例えば、組織工学的手法による軟 骨再生に適した担体作製に関する研究¹、至適細胞外環境の構築に関する研究²³、組織工学的に作製した軟骨の同種移植による修復・再生に関する研究⁵¹、並びに軟骨細胞シート移植による軟骨修復・再生に関する研究⁵²、並びに軟骨細胞シート移植による軟骨修復・再生に関する研究⁵²・もいの研究から軟骨の修復・再生におけるホスト(レシピエント)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・再生に必要最小限の軟骨誘導イニシエーター(組織工学的軟骨)があれば、ホスト(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出した⁴¹¹。そして、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⁵、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た¹¹²。また、ミニブタを用いた全層欠損モデルにおいても軟骨修復効果を確認し、積層化細胞シートは関節軟骨部分損傷と全層欠損の双方に効果があることを確認した¹³。

以上の一連の研究により、変形性関節症において常に混在しながら存在 する両タイプの軟骨損傷に対して、細胞シートによる治療効果を示したもの で、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、将来的には、変形性 関節症の治療にまで踏み込んだ軟骨再生医療として期待できるものである。 1) Sato M. et al, J Biomed Mate Res A 2003; 64(2):248-256. 2) Ishihara M. et al. Biomaterials 2002: 23(3):833-840. 3) Ishihara M. et al. J Biomed Mater Res 2001; 56(4):536-544. 4) Masuoka K. et al, J Biomed Mater Res B 2005; 75(1):177-84. 5) Sato M. et al, J Biomed Mater Res B 2007 Mar 23;83(1):181-8. 6) Kaneshiro K. et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 20; 349(2): 723-31. 7) Kaneshiro N,et. Al. Eur Cell Mater. 2007 May 22; 13: 87-92. 8) 国際出願番号: PCT/JP2006/303759 出願日: 2006年2月28日 出願人:(株)セルシード,発明者:佐藤正人他 9) Nagai T. et al, Tissue Engineering - Part A. 2008; 14 (7), 1183-1193. 10) Nagai T. et al, Tissue Engineering - Part A 2008; 14 (7): 1225-1235. 11) Sato, M. et al Med Biol Eng Comput. 2008; 46 (8):735-743. 12) Mitani, G. et al BMC Biotechnology 2009 9:17 13) Sato, M. et al J Jpn Orthop Assoc 2008 82(8) S930.

動物を対象とした前臨床試験により細胞シートの有効性を確認でき、新規治療法となり得ることが期待されたため、平成21年10月以降東海大学医の倫理委員会の承認の下、「細胞シートの安全性並びに性状評価に関する研究」を実施してきた(別添8「製品標準書参照」)。その結果、患者由来細胞を使用して作製した移植用培養組織としての細胞シートの安全性の確認と製造方法が確定できた。実際にセルプロセッシング室内でヒト培養軟骨細胞シートの試験製造を2度に渡り実施しており、医の倫理委員会の承認も得られ

t- . よって、本臨床研究が実施可能であると判断した。 対象疾患:外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷 臨床研究の実施計画 方法:対象患者に対して、細胞シート移植3週間前の関節鏡検査時と細胞シ 一ト移植時に、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 てインフォー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(1g以上)と大腿側関節面非荷重部の軟骨(3g以上)を採取 する。手術室からセルプロセッシング室へ採取した組織を運搬し、同室内で 細胞を単離し、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製する。 3週間後作製された軟骨細胞シート(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、病巣部を洗浄した後、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。 評価項目: 1.安全性:有害事象の発生の有無 2.有効性: 術前、術後 1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年における臨床評価、単純レ ントゲン写真、MRI 検査。術後 1 年の時点での関節鏡、光音響法、病理検査 による評価(別添 2「研究実施計画書」9 術後検査・評価項目とスケジュール 参照)。 エンドポイント:細胞シート移植後 1 年まで 研究実施予定期間:承認後~3年間 予定症例数:10 例 東海大学医学部付属病院における年間の関節軟骨損傷に対する手術件数 は30 例程度であるが、選択基準等を鑑み、また培養期間に約3週間を要し、 この間クロスコンタミネーションの防止からセルプロセッシング室には他の被 験者の細胞を持ちこまないように実施するため、当該実施期間で適当と思わ

被験者等に関するインフォームド・コンセント

手続

1)被験者の選定

数に達しなくても終了する。

研究責任医師及び分担医師は、被験者の健康状態、症状、年齢、同意能力等を考慮し、被験者を本臨床試験の対象とすることの適否を慎重に検討す

れる症例数を目標症例数とした。なお、プライマリーエンドポイントである安全性の評価が十分に達成できたと判断した場合、本臨床研究は、予定症例

		る。
		2)同意取得
		研究責任医師及び分担医師は、本臨床試験の対象として適切と判断した被
	4	験者に対して、本臨床試験の説明を十分に行い、文書による同意を取得す
		a .
		3)適格性判定
		研究責任医師及び分担医師は、「選択規準」及び「除外規準」に基づく検査
		を実施し、適格性を判定する。
		 諸検査の結果、対象者となりえると判断された場合、入院後、病棟におい
		て、本人並びに家族へ説明書と各種画像並びに動画等を用いたコンピュー
		タプレゼンテーションを併用して、術前関節鏡検査施行前と細胞シート移植
		前に、十分なインフォームドコンセントを実施し、2回の同意を確認する。
		以下の項目について説明する。(別添3「同意書参照」)
	説明事項	1.臨床研究とは
		2.細胞シートについて
		3.臨床研究の目的
		4.臨床研究に参加していただく患者さまの人数及び臨床研究期間
		5.臨床研究の方法
		6.あなたに守っていただきたいこと
	1	7.予想される効果(利益)及び副作用(不利益)
	2 (\frac{1}{2} \f	8.臨床研究への参加の自由と参加のとりやめについて
		9.他の治療方法について
	2 N 2 1	10.臨床研究が中止される場合
	and and an	11.細胞シートに関する新しい情報の提供について
	*** ax s X	12.あなたの人権・プライバシーの保護について
	and the space of the state of t	13.臨床研究に関連して健康被害が発生した場合の治療及び補償について
	E.	14.費用の負担について
		15.利益相反について
		16.この臨床研究を担当する医師の氏名、連絡先
	 でインフォームド・コンセン	トを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合
	研究が必要不可欠で ある理由	単独でインフォームドコンセントを与えることが困難な者を被験者とはしない。
	80 JOHN SHOW SHOWS BY JUNE 1830	単独でインフォームドコンセントを与えることが困難な者を被験者とはしないたぬ
	代諾者の選定方針	代諾者は選定しない。
h FA	************************************	有害事象取り扱い
	者等に対して重大な事 生じた場合の対処方法	1)症状または疾患
		手術後に発現した、あらゆる好ましくないあるいは意図しない徴候、症状また

は疾患は、有害事象として取り扱う。合併症の程度が悪化した場合も、有害事象として取り扱う。なお、有効性評価指標の程度が悪化した場合は、有害事象として扱わない。

2)他覚所見

臨床研究開始前検査値*と比較し、最終検査日までに、異常化(正常→異常、 異常→さらに異常)を示した場合は、有害事象として取り扱う。また、臨床研 究開始前検査値*が欠測しており、細胞移植投与後に異常値となった場合 は、有害事象として取り扱う。ただし、欠測している場合は、同意取得日の30 日前までの値を判断の参考値として利用する。

*:同意取得後、観察期に実施された検査値(複数回実施されたものは、治療期開始時に近い値とする)

本研究実施計画書に規定された項目、規定されていない項目を問わず、有 害事象とされたものについては、発現時、最大悪化時、転帰判定時及び関 連性の判定に必要と考えられたデータについてカルテに記載する。

3)有害事象の記録と調査

有害事象が発現した場合は、その症状または疾患、他覚所見の内容、発現 日、程度、重篤度、処置の有無およびその内容、転帰およびその判定日、本 臨床研究との関連性およびその理由をカルテに記載する。なお、疾患名を記 載する場合、その疾患に付随する症状は、有害事象として記載しない。

治療期中に観察された症状または疾患、他覚所見において、有害事象が認められた場合は、本臨床研究との因果関係の有無に係わらず、原則として正常化または有害事象として促えないレベルに回復するまで追跡調査を行う。ただし、研究責任医師または分担医師が回復と判断した場合はその限りではない。その場合は回復と判断した根拠をカルテに記載するものとする。器質的な障害(脳梗塞・心筋梗塞など)で不可逆的な有害事象が認められた場合は、症状が安定または固定するまで追跡調査を行うこととする。

4)有害事象の分類

有害事象の程度は、以下の基準で分類する。

- ①軽 度:患者の日常生活を損なわない程度
- ②中等度:患者の日常生活に支障があるが、かなり我慢すれば活動が行える程度
- ③高 度:患者の日常生活の遂行を大きく妨げる程度

有害事象の転帰は、以下の基準で分類する。

- ①回復:正常化または有害事象として促えないレベルまでに回復したもの
- ②継続:その時点で回復に至っていないもの
- ③不明(死亡):患者死亡のため転帰が不明だったもの
- 5)有害事象と本臨床研究との関連性の判定

本臨床研究との関連性は、被験者の状態、治療との時間関係、その他の要因による可能性等を勘案し、以下の関連性の判定基準に従い判定する。

- ①明らかに関連あり
- ②おそらく関連あり
- ③関連があるかもしれない
- ④関連なし

有害事象については、本臨床研究との関連性が①~③と判定されたものを本臨床研究との関連性が否定できない有害事象、本臨床研究との関連性が ④と判定されたものを本研究との関連性が否定できる有害事象とする。

6) 重篤な有害事象

治療期中に、本臨床研究との因果関係の有無にかかわらず重篤な有害事象が発現した場合、研究責任医師または研究分担医師は、被験者に対して直ちに適切な処置を行う。研究責任医師は、速やかに医学部長、病院長及び医の倫理委員長に報告する。また、本臨床研究が10例に満たなくても、研究を中止する。

【重篤な有害事象】

- 1)死亡
- 2)死亡につながる恐れのある症例
- 3) 障害
- 4) 障害につながる恐れのある症例
- 5)1)から4)に掲げる症例に準じて重篤である症例
- 6)後世代における先天性疾病または異常

7)新たな情報の提供

実施者は本臨床研究の安全性に関する新たな情報を得た場合には、速やかに病院長、医学部長、臨床研究責任医師および分担医師に文書で報告する。臨床研究責任医師および分担医師は被験者へ追加説明し、必要に応じて説明文書・同意文書の改定を行う。

臨床研究終了後の追跡調査 の方法

通常の手術療法と同様に、術後3年間は定期的に外来診療を行い、安全性及 び有効性に係る情報を収集する。

臨床研究に伴う補償

補償の有無	無
補償が有る場合、その内容	臨床研究賠償責任保険に加入しており、その補償範囲内での補償が可能であ る。

個人情報保護の方法

連結可能匿名化の 方法

細胞シートの作製は、被験者を一人ずつ行うので、臨床研究責任者及び研究分担者を含めて整形外科に所属する医師は全て被験者が誰であるかを知ってしまう事、また、臨床データ(カルテ情報や術前術後の検査データ、画像データ)は全て電子カルテに保存されるので、患者情報に関しては、東海大学医学部付属病院に勤務している医師であれば、業務上アクセス可能なものである為、本臨床研究に特化した匿名化は行わない。しかし、一般の入院患者と同様の匿名性は維持されており、個人情報の管理は患者IDによって管理される。また、臨床試験終了後のデータ等は連結可能匿名化し、臨床データの解析や学会発表時などには、個人情報の保護に努め、被験者のプライバシーを保護する。

その他

本研究で得られた細胞は手術でしか得られない大変な貴重なものであり、 本研究終了後に余剰となった試料(軟骨細胞、滑膜細胞)は、被験者の同意 を得た上で(同意書参照)、連結不可能匿名化して他の研究に用いることが ある。

その他必要な事項 (細則を確認してください)

① 当該研究に係る研究資金の調達方法

本臨床研究は、厚生労働省科学研究補助金 再生医療実用化研究事業からの 研究資金を充てるものとする。

②既に実施されているとト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項

自己細胞を使用した軟骨再生医療に関しては、国外では既に20年近く前から、Genzyme 社の Autologous Chondrocyte Implantation(ACI)が既に2万例近く世界で実施されているが、小さな軟骨欠損にのみ適用されている。この手法では骨膜を使用するため、その石灰化や肥厚がしばしば問題になっている。さらに健常部を2箇所犠牲にするなど手術的側面からも問題が多く、治療成績も骨髄刺激法と有意差がないとする報告もあり、評価は分かれている。国内では、広島大学で考案したアテロコラーゲンゲル包埋培養軟骨細胞移植法を J-TEC が治験をほぼ終了し、保険収載前段階にある。信州大学では、Type I collagen を担体とする培養自己骨髄間葉系細胞移植による軟骨欠損修復が臨床応用されている。しかしながら、いずれも骨膜を使用して、小さな軟骨欠損に適用されるもので従来の ACI と同様の問題点を抱えている。

当該研究の新規性は下記4点である。

- ・細胞シートによる関節軟骨再生医療(上皮系以外の組織で世界初)である。
- ・骨膜を使用しない。
- ・変形性関節症で常に混在する2種類の軟骨損傷型(全層欠損と部分損傷) の両方での有効性を動物実験で確認している。
- ・従来から行われている外傷性の軟骨損傷だけでなく、変性による軟骨損傷 にも適用する。

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類(添付した書類にチェックを入れること)

- ■研究者の略歴及び研究業績(別紙1、別紙2)
- ■研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況(別添12:CPC 概要、別添13:衛生管理基準書、別添14:バリデーション基準書)
 - ■臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果(別紙3)
 - ■同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況(別紙4)
 - ■臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨(別紙5)
 - ■インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式(別添3:同意書)
 - ■その他(資料内容:別紙6:倫理委員会の承認書)
 - ■その他(資料内容:別添1:臨床研究等審査申請書)
 - ■その他(資料内容:別添2:研究実施計画書)
 - ■その他(資料内容:別添4:臨床研究責任者・分担者・協力者・履歴書)
 - ■その他(資料内容:別添5:臨床研究業務分担リスト)
 - ■その他(資料内容:別添6:参考文献)
- ■その他(資料内容:別添7:東海大学伊勢原キャンパス利益相反マネジメント委員会;臨床研究等に係る利益相反自己申告書)
 - ■その他(資料内容:別添8:ヒト培養軟骨細胞シート製品標準書)
 - ■その他(資料内容:別添9:ヒト培養軟骨細胞シート作業標準書)
 - ■その他(資料内容:別添10:ヒト培養軟骨シート品質検査標準書・記録書)
 - ■その他(資料内容:別添11:細胞移植再生医療運営委員会活動報告・委員会名簿)
 - ■その他(資料内容:別添15:逸脱管理手順書)

研究の概要

1. 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し、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。この新規治療法の客観的評価をプライマリーエンドポイントとして安全性を評価し、セカンダリーエンドポイントとして有効性を画像的・臨床的評価方法により実施する。

2. 研究対象

外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷

3. 研究方法

術前の関節鏡検査時に、上記診断を確定すると共に、滑膜と軟骨を少量採取する。採取した組織をセルプロセッシング室へ運搬し、そこで細胞を単離後、温度応答性培養皿へ播種して細胞シートを作製する(ヒト培養軟骨細胞シート製品標準書及び品質管理標準書・記録書参照)。軟骨損傷部の不良組織を切除し洗浄後、細胞シートを移植する。術後評価としては、臨床評価基準をもとに評価する。また、単純レントゲン写真、MRI、関節鏡、レーザー誘起光音響法、生検による病理検査などを術後プロトコールに従って実施し、術後の軟骨再生状態を評価する。

4. 研究期間および予定症例数

承認後から3年間

10 症例

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

5. 研究組織

東海大学医学部外科学系整形外科学 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科 東海大学医学部付属病院整形外科 東海大学医学部附属病院診療協力部セルプロセッシング室

細胞シートによる関節軟骨修復・再生

