

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：自己軟骨細胞シートのための統合的評価手法の開発
2. 研究開発代表者：的場 亮（株式会社DNAチップ研究所）
3. 研究開発の成果

本研究事業では、自己軟骨細胞シートの品質管理項目を設定し、細胞シート作製時の細胞形態、細胞シートの物性や移植後の機能との関連解析を行い、その品質評価系を確立することを目標としています。株式会社DNAチップ研究所、東海大学医学部整形外科学並びに株式会社セルシードが共同で実施し、自己軟骨細胞シートの品質管理項目の設定および安定性試験等の必要な非臨床試験データの取得を行いました。品質管理項目として感染症検査、遺伝子発現、ゲノム構造等の分子的な情報を取得し、客観的な数値情報により細胞シートの評価を行いました。

軟骨細胞シートの性能を評価する上で重要と思われる遺伝子とコントロール遺伝子を含む約 50 遺伝子について、データベースより最適と思われるプライマー/プローブセットをデザインしカスタムパネルを作製しました。これを用いて軟骨細胞及び幹細胞から抽出した mRNA の RT-PCR の確認実験を行い、遺伝子発現が測定できることを確認しました。さらに、プロトコルの改良を行い、非常に微量なサンプルでもバイアスなく遺伝子発現解析が可能な系を確立することができました。この系を用いて、東海大学医学部で実施された自己軟骨細胞シートによる関節軟骨再生治療症例について、遺伝子発現データ取得を行いました。

次に、自己軟骨細胞シートの製造工程における品質評価のために、作製プロトコルの確立と、品質評価試験の予備検討を行いました。具体的には、自己軟骨細胞シート製造で使用する酵素に関して、哺乳類や鳥類組織由来原料を使用していない酵素の検討を行い、従来の酵素処理と比較して、同等もしくはより多くの生細胞を回収することが可能であることがわかりました。また、製造工程の組織受け入れの際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行い、第十七改正日本薬局方に例示されている方法に則り、7種の試験用菌株すべての検出が確認できました。

さらに、自己軟骨細胞シートの性能試験のための、機能評価項目の設定とそのプロトコルの検討を行いました。患者背景情報のデータ項目、細胞シートの臨床的品質の指標を選定し、栄養因子産生能、力学的物性試験、表面マーカー発現解析、細胞数、生細胞率測定および組織学的解析（組織染色、免疫染色）等の項目を選定しました。臨床成績については、J-KOOS と Lysholm score についてタイムコースのデータを収集、整理しました。

最後に、以上のデータを用いて、プロトタイプデータベースを構築しました。データベースの構造は取得するデータセット項目を整理し、対応するサンプルセットとそれに付随する測定条件を紐づけする形で、「測定対象」x「サンプル」のマトリックスを測定データとしました。入力生データで、データベース上で様々な解析可能な仕様になっています。今後はさらにデータを蓄積するとともに、自己軟骨細胞シートにおける品質を評価する指標を明らかにしたいと考えています。