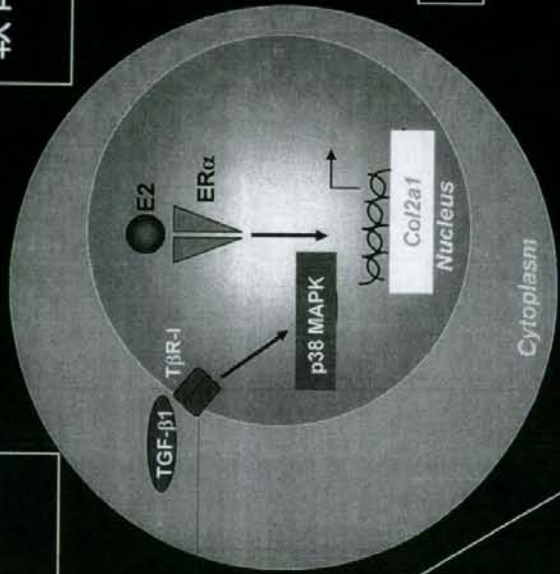


Discussion

エストロゲン欠乏

椎間板細胞に対する直接作用
Col2a1転写抑制

軟骨終板細胞に対する直接作用
Col2a1転写抑制



軟骨終板の変性

椎間板への拡散障害

椎間板変性

Conclusion

閉経に伴うエストロゲン欠乏は終板変性・椎間板変性・リスクファクターの1つである

活性化工程における感染所見も一切認められなかった。以上より、細胞移植療法で問題となる安全性が十分に担保され、本学内の本研究実施施設が細胞管理、品質保証上も至適な施設であることが確認できた。

E. 結論

自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養による自家髄核細胞は短期間に良好な細胞活性化を得ることができ、活性化後の髄核細胞の安全性が確認された。厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に申請した臨床研究課題が同審査委員会で承認され、現在その実施にむけて学内施設での最終的な調整が終了し、実施の直前となっている。

F. 健康危険情報：特になし

G. 発表業績

1. 論文

- 1) Hiyama A, Mochida J, Sakai D. Stem cell applications in intervertebral disc repair. *Cell Mol Biol.* 2008; 54: 24-32.
- 2) Lee CR, Sakai D, Nakai T, Toyama K, Mochida J, Alini M, Grad S. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J*, 2008, in press
- 3) Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, Omi H, Watanabe T, Serigano K, Tamura F, Sakai D. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res.* 2008; 26: 589-600.
- 4) Omi H, Mochida J, Iwashina T, Katuno R, Hiyama A, Watanabe T, Serigano K, Iwabuchi S, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation enhances TIMP-1 in nucleus pulposus cells and MCP-1 in macrophages in the rat. *J Orthop Res.* 2008; 26:865-871

2. 学会発表

- 1) 持田譲治：椎間板再生 臨床応用への橋渡し研究の現況 脊椎脊髄病学会 2008

2) Mochida J. Intervertebral disc. Repair of disc degeneration. *Spine and Pediatric Section Asia Pacific Orthopaedic Association.* June 2008

3) 持田譲治、酒井大輔、山本至宏、岩品徹、渡辺拓也、檜山明彦、大見博子、芹ヶ野健司、田村太：シンポジウム 椎間板の再生基礎から臨床の過程 日本炎症再生学会 2008

4) 持田譲治、酒井大輔、骨髄間葉系幹細胞

によって活性化された髄核細胞を用いた椎

間板再生治療 国際バイオフォーラム 2008

5) 持田譲治：細胞移植による椎間板再生医療 第16回日本腰痛学会 2008

H. 知的財産権

特許査定『椎間板再生用懸濁液又は包埋物』

起案日：平成19年9月28日

特許出願人：学校法人東海大学および

持田譲治

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
高齢者の腰痛症に係る効果的な診断、治療、リハビリテーション等の確立
分担研究報告書

再生医療を用いた高齢者腰痛症に対する新たな治療法の開発
研究分担者 持田讓治 東海大学医学部外科学系整形外科学 教授

研究要旨：椎間板変性抑制・再生を目的とした細胞移植療法において、元々存在する細胞の移植が生物学的に安全性が最も高く、また効率が高い。そこで、自家椎間板髄核細胞の変性椎間板髄核腔への移植実験系を考案し、髄核細胞の効率のよい活性化、活性化期間の短縮化を意図し、自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養法を確立した。動物での *in vitro*, *in vivo* 実験を経て、ヒト椎間板髄核細胞に対する自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養結果を検討したところ、1 髄核細胞あたりの DNA 活性、プロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べ、培養 5 日以内に 5 倍以上の活性亢進を示した。活性化終了後の髄核細胞の安全性に関して、4 日間の共培養では活性化髄核細胞の染色体異常は一切みられず、免疫不全マウスへの活性化髄核細胞移植による腫瘍化検査 (6 から 12 ヶ月観察) でも異常所見は全く認められなかった。この結果を踏まえ、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に臨床応用に関して申請し、本年 1 月に厚生労働大臣より承認の発出を得た。現在、cell processing center での細胞受け入れ、工程管理、最終製品試験のすべてにおいて、安全性検査項目、品質検査項目の基準値の全てを満たすことができ臨床応用の直前となっている。

A. 研究目的

ヒト椎間板変性抑制、再生のための細胞移植療法として椎間板髄核細胞の移植術を確立し、その安全性と効率を検証する。

B. 研究方法


小型動物、大型動物の *in vitro*, *in vivo* 研究で確立した細胞間接着を伴う共培養を用いて、自家骨髄間葉系幹細胞による椎間板髄核細胞の活性化を *in vitro* で検討し、活性化終了後の髄核細胞の異常、腫瘍化の有無をさらに症例を増やして検討する。平成 19 年度実施分も含めて 36 例を対象とし、椎間板髄核細胞と自家骨髄間葉系幹細胞 (ともに 1×10^5 個) を細胞間接着を伴う共培養で 5 日間培養し、髄核細胞の活性化状態と染色体異常の有無、免疫不全マウスへの移植後 6 カ月から 12 カ月での腫瘍化の有無について検討し、さらに活性化過程における各種感染をはじめとする安全性項目について検討する。

C. 研究結果

1 髄核細胞あたりの DNA 活性、プロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べ、培養 5 日以内に 5 倍以上の活性亢進を示した 5 日間の共培養では、活性化髄核細胞の染色体異常は一切確認されず、また免疫不全マウスへの活性化髄核細胞移植による腫瘍化検査でも異常所見は全く認められなかった。ヒトへの将来的な応用を控え、cell processing center における髄核細胞活性化過程の試行をつづけているが、活性化髄核の質、量的な品質の保証だけではなく、細菌、ウイルス、エンドトキシン、マイクロプラズマなどの感染に関する細胞受け入れ時、工程管理時、最終製品時の試験のすべてにおいて、安全性検査項目、品質検査項目の基準値のすべてを満たすことができた。

D. 考察

髄核細胞の体外での活性化が高効率で可能となり、活性髄核細胞自体の器質的異常 (染色体異常) や腫瘍化などが否定され、



再生医療を用いた高齢者腰痛症
に対する新たな治療法の開発

東海大学医学部外科学系整形外科学
持田讓治



臨床への橋渡し研究

骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) による髄核細胞の活性化

骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) による
髄核あるいは椎間板組織の導出の可能性



ヒト椎間板細胞のcharacterの検討

椎間板組織温存

=

椎間可動性温存の考え方

椎間板変性の抑制・再生

=

人工椎間板

成長因子注入療法

残余細胞数に依存

遺伝子治療

安全性の課題、組織再生は？

◎細胞移植療法

椎間板の変性は細胞数に依存する
中等度までの変性に対応可能

組織移植

体外での作成が困難

同種椎体椎間板移植

自己移植ができない

髄核細胞

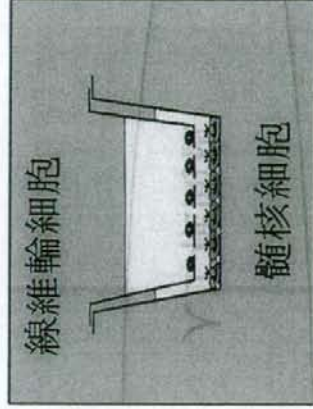
用いる細胞 髄核細胞の選択

理由：髄核細胞の減少が変性の引き金

元々ある細胞の復元が生物学的に理想

髄核部の温存 □ → その後の椎間板変性抑制（臨床）

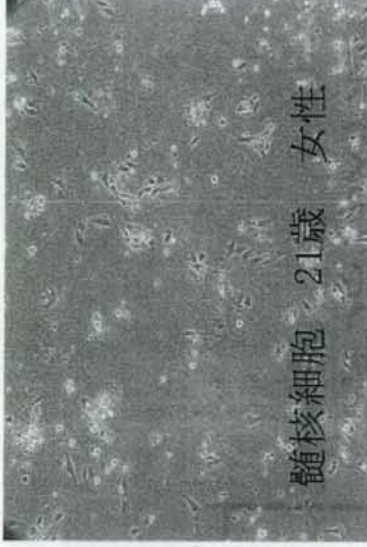
胎生期の遺物とされ不要と考えられていた髄核細胞による
線維輪細胞活性化の証明（共培養）（体外実験：動物、人）



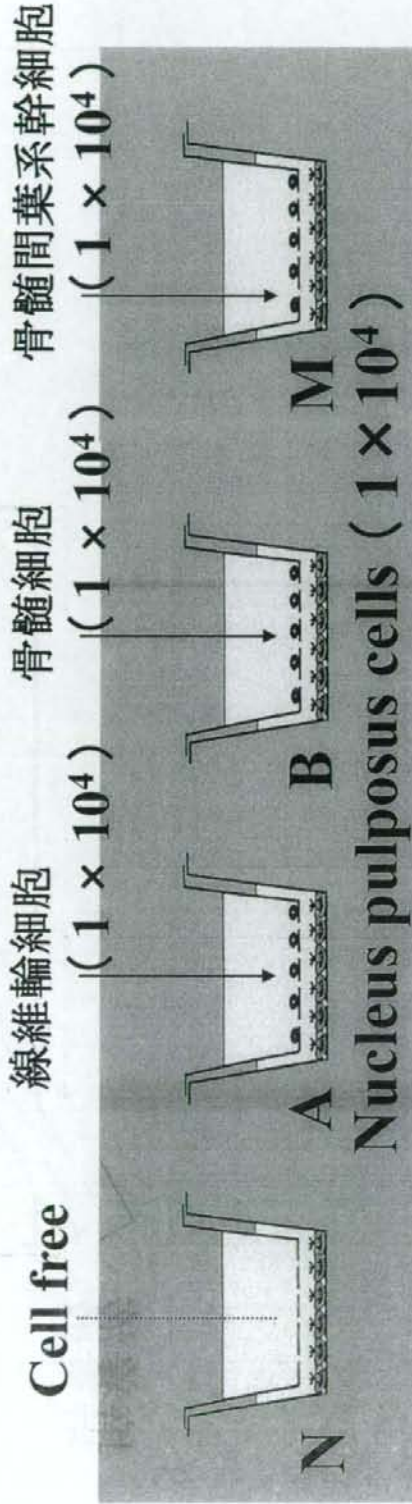
髄核細胞の変性椎間板移植による椎間板変性進行の抑制
（椎間板変性動物モデル）

髓核細胞の問題点

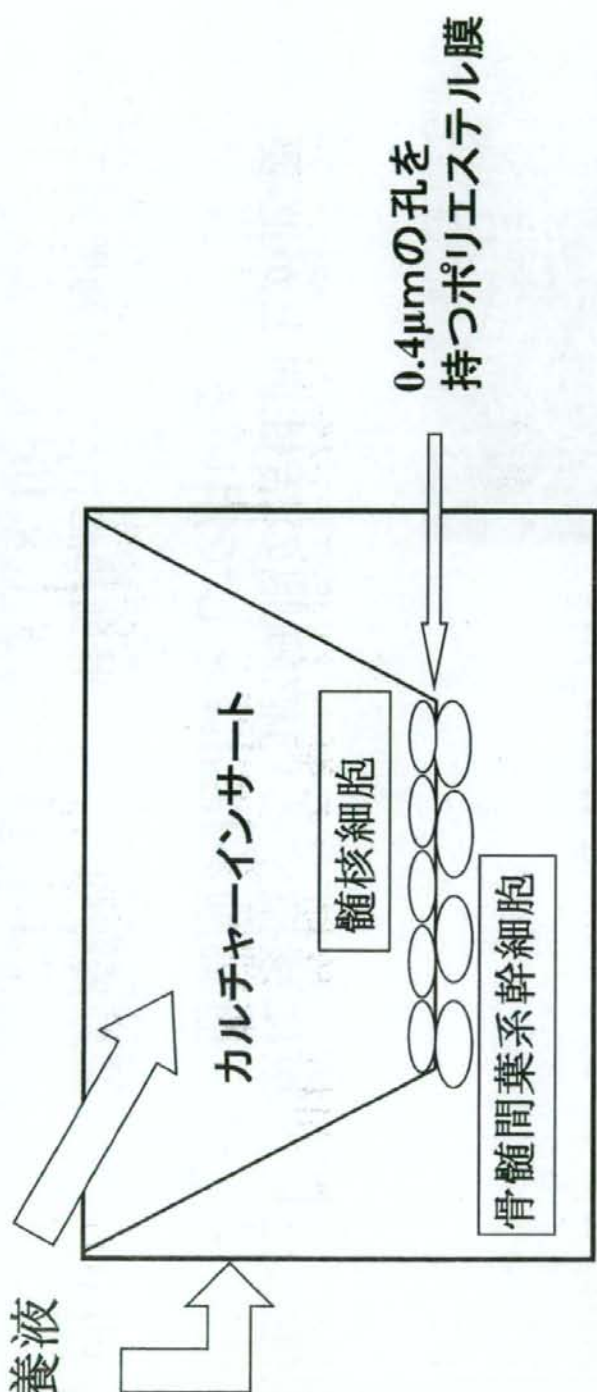
細胞数が少なく、細胞活性が低い



変性した椎間板に移植する髓核細胞の活性向上が必要
⇨ 他細胞をfeederとして用いる



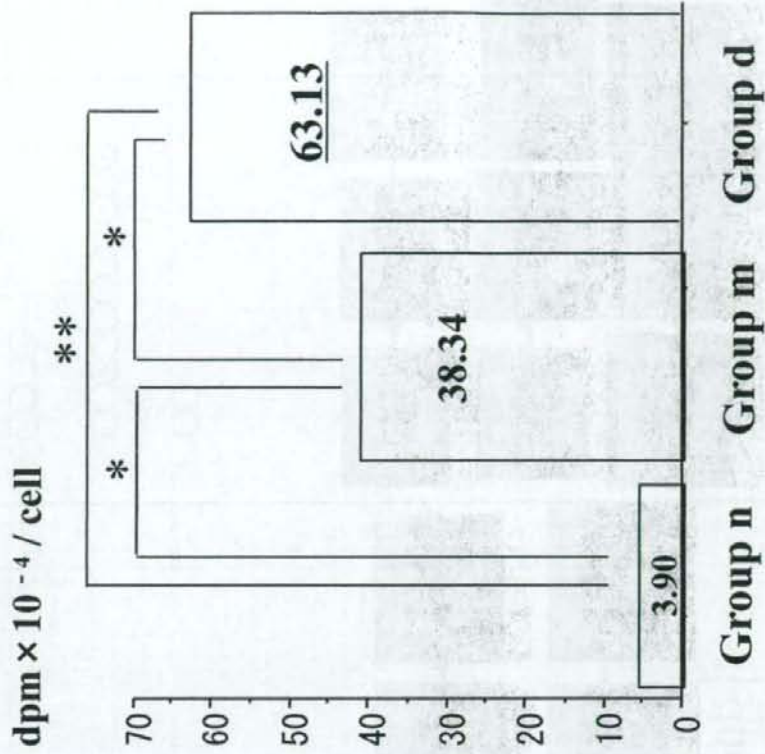
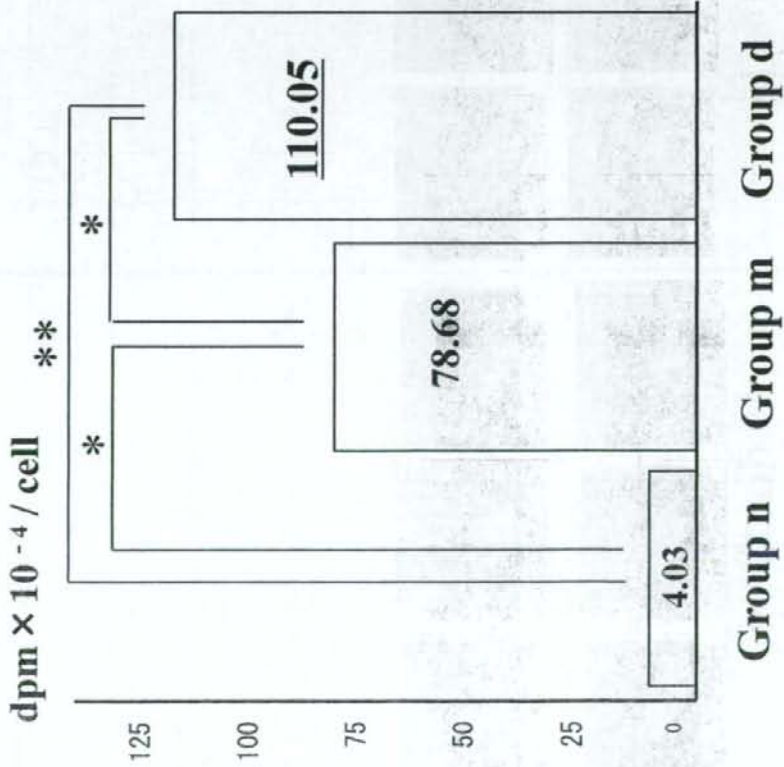
培養液



DNA

Proteoglycan

* P < 0.01, ** P < 0.001

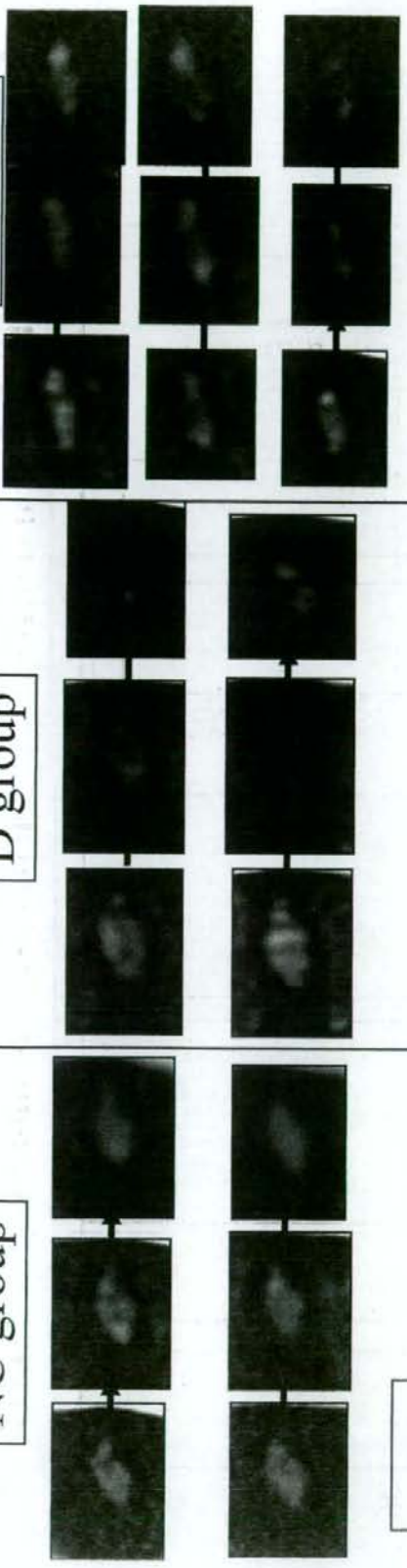


MRI assessment

NC group

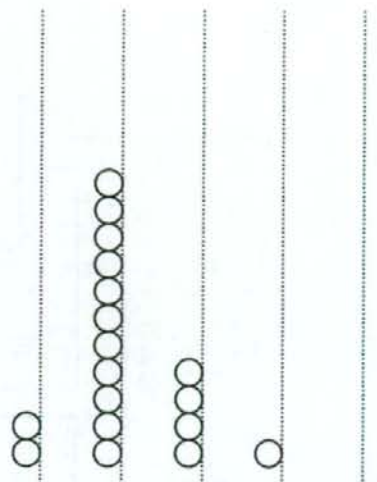
D group

Tx group



grade

- I
- II
- III
- IV
- V

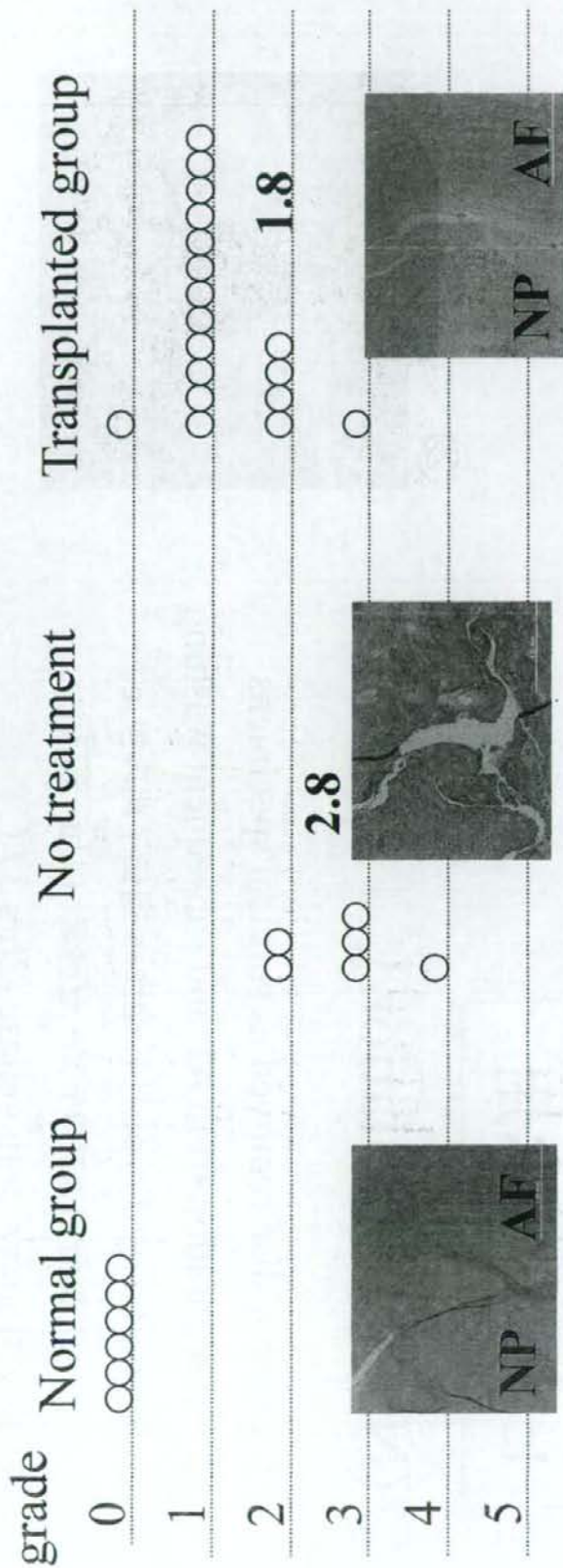


at 24 weeks (22 weeks after cell transplantation)

Degenerative changes in the anulus fibrosus

- Grade 0: normal structure
- Grade 1: mildly serpentine with rupture
- Grade 2: moderately serpentine with rupture
- Grade 3: severely serpentine with mildly reversed contour
- Grade 4: severely reversed contour
- Grade 5: indistinct

(Kazuhiro Nishimura et al., Spine, 1998)



at 24 weeks (22 weeks after cell transplantation)

ヒトでの応用

(NP cells isolation)

- ① Lumbar disc removed as surgical specimens
- ② NP separation from AF and subsequent washing
- ③ digestion by TrypLE Express 遺伝子組み換え
真菌由来プロテアーゼ酵素 (1hr 37°C)
- ④ digestion by collagenase (2hrs 37°C)

②



③

⇨ 0.27%
pronase
(1hr)



④

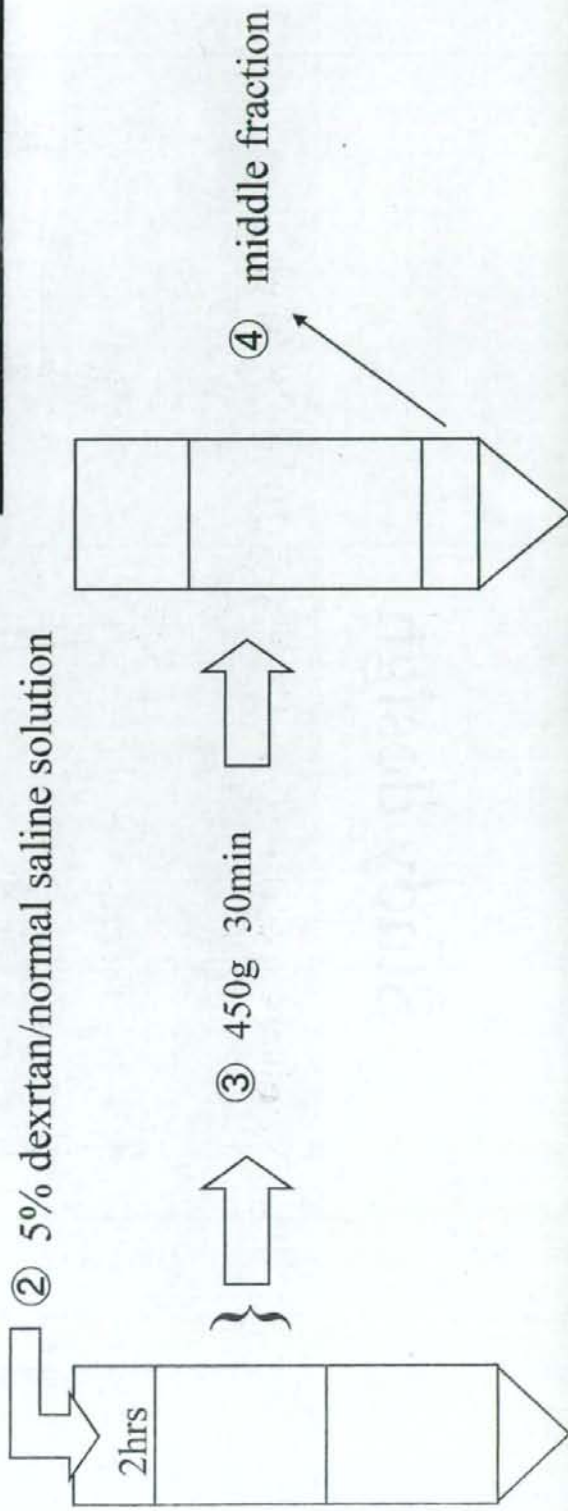
⇨ 0.025%
collagenase
(2hrs)



(MSCs isolation)

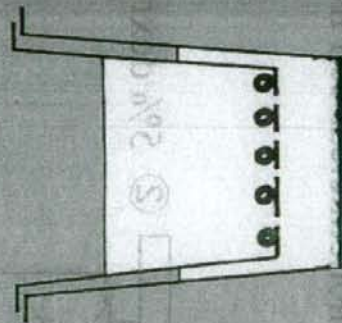


- ① bone marrow from patient's vertebral body or iliac bone
- ② mixed with 5% dextran/normal saline solution(2hrs)
- ③ gradient separation (450g 30min)
- ④ the mononuclear cell fraction were cultured

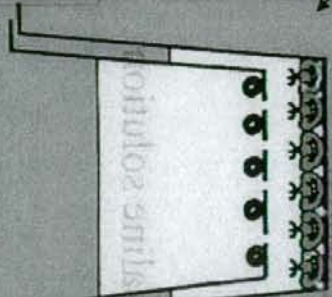


Study design

Nucleus pulposus cells (1×10^4 cells/well)

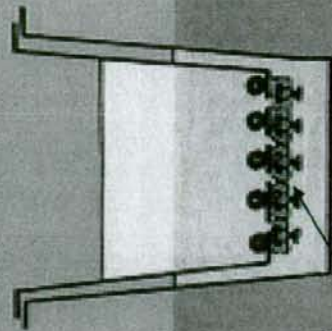


A



B

co-culture



C

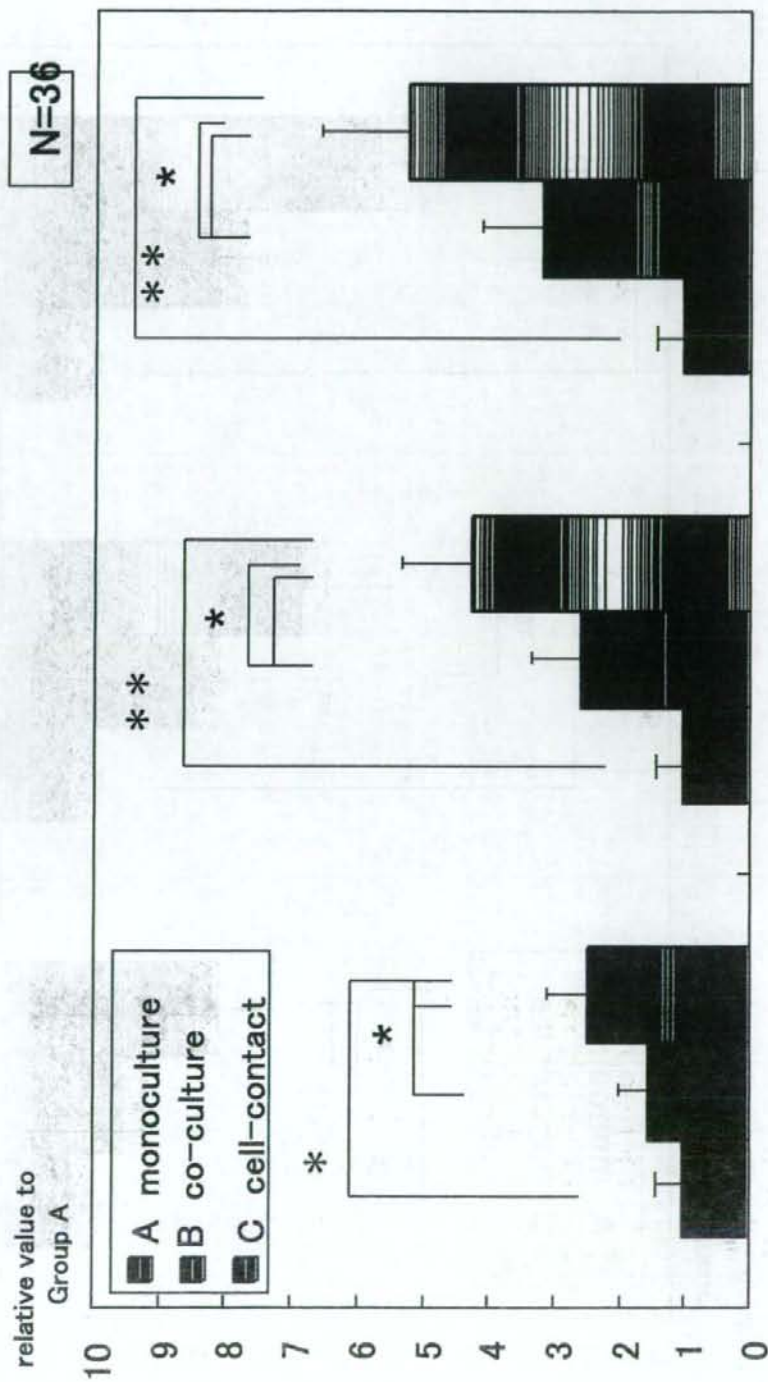
MSCs

(1×10^4 cells/well)

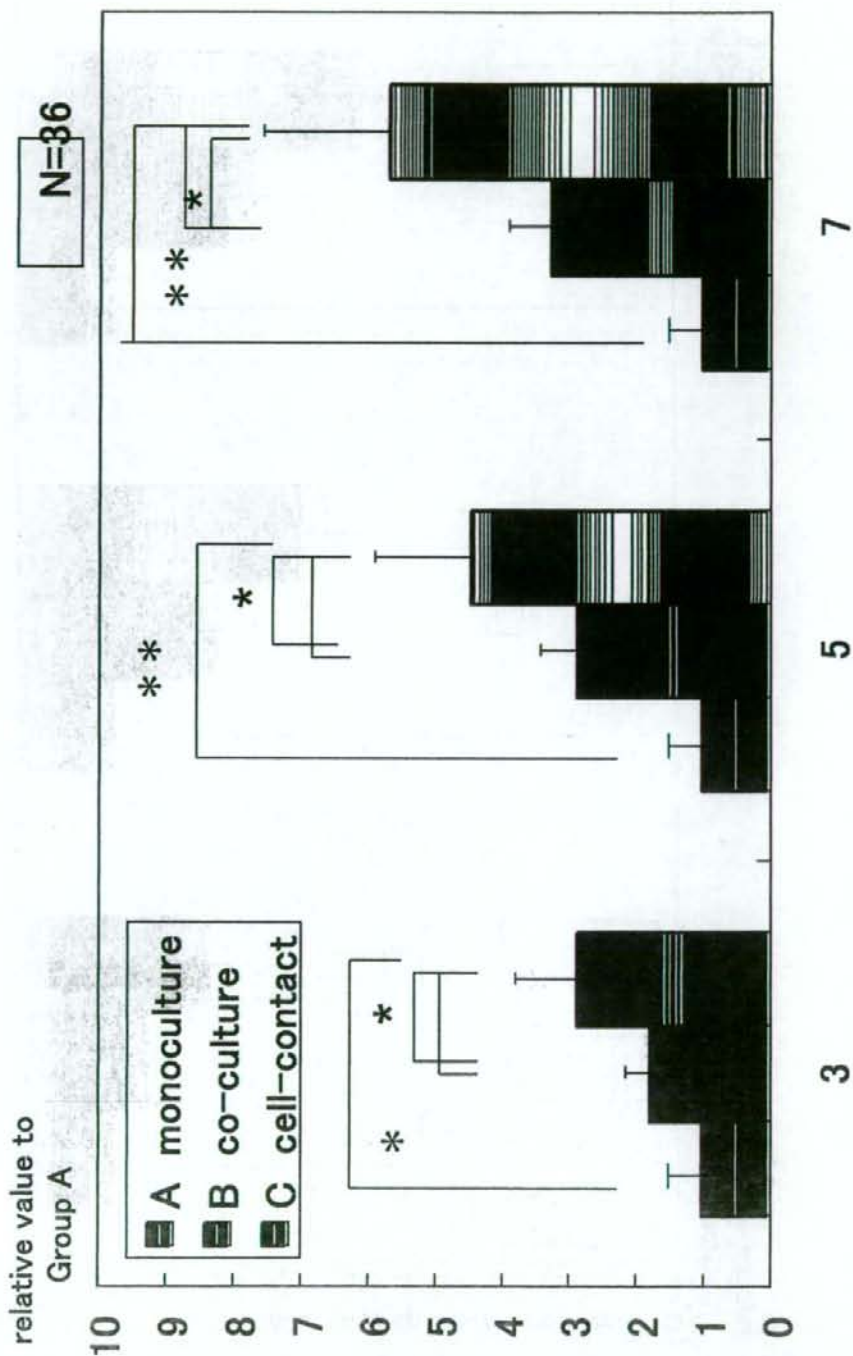
cell-contact

Medium : DMEM/F12 + 10% autologous serum

DNA synthesis



PG synthesis



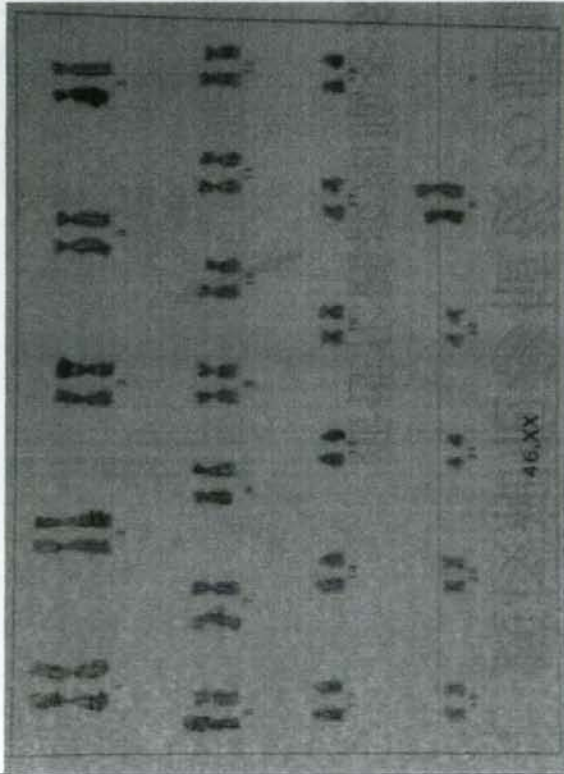
* ($P < 0.01$)

** ($P < 0.005$)

活性化髓核の安全性検証

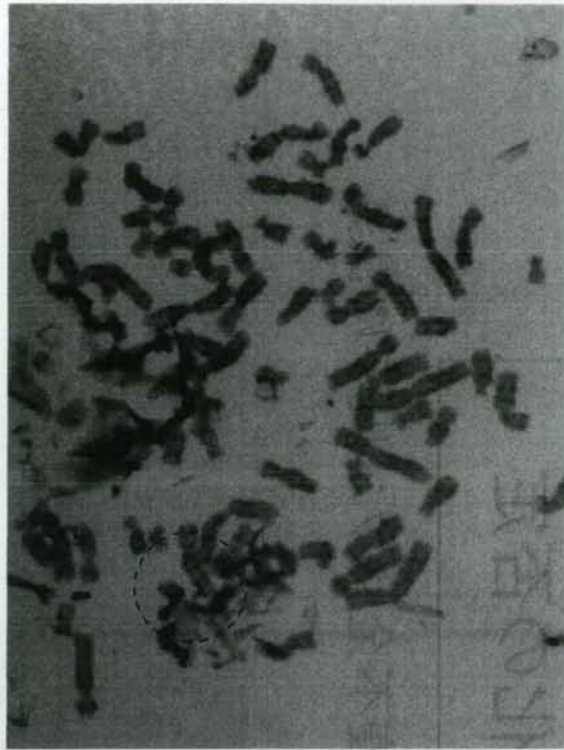
染色体検査

症例6：22歳 女性



7日間共培養
その他全例で異常なし

(27歳 男性)

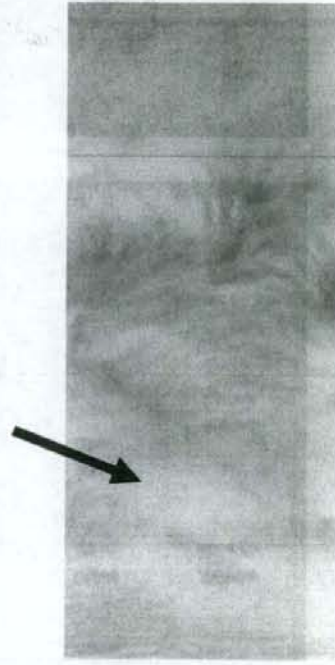


長期間の培養
8継代後：1/12で3倍体の出現
より短期間の培養が望まれる

活性化髄核の安全性検証

髄核細胞移植後の腫瘍化の否定

活性化髄核細胞を免疫不全マウス皮下に注入



6ヵ月以上経過後、組織採取し評価

細胞の癒痕化、髄核組織の吸収はみられるが腫瘍細胞は一切認められない