

200906011A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた
椎間板再生研究における細胞、組織の安全性、品質確保に関する
技術開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 持田 讓治

平成 22 年 5 月

分担研究者	小林広幸	東海大学 臨床薬理学 教授	臨床薬理学 臨床研究デ ザイン	研究デザインに関 する指導
	浅原孝之	東海大学 再生医療科学 教授	再生医療学	細胞処理に係る指 導
	安藤潔	東海大学 血液・腫瘍内科学 教授	血液腫瘍学	細胞管理（品質管 理）の責任者
	中村雅登	東海大学 再生医療科学 教授	再生医療学	活性化髄核細胞の 安全性確認試験担 当
	波呂浩孝	山梨大学大学院 整形外科学 教授	整形外科学	細胞処理の均一化 検討 外部評価
研究協力者	中村嘉彦	東海大学医学部付 属病院細胞移植再 生医療科 室長補佐	細胞培養	細胞処理実技 細胞の安全管理・ 品質管理

目次

I.	総括研究報告	
	自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた 椎間板再生研究における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発 持田 讓治	-----1
II.	分担研究報告	
1.	椎間板髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞の管理（分離、調整）に関する研究 加藤俊一	-----7
2.	椎間板再生臨床研究に寄与するデータベース構築に関する研究 小林広幸	-----10
3.	自家骨髄間葉系幹細胞による活性化椎間板髄核細胞培養法の 基礎的手技の指導及び確立に関する研究 浅原孝之	-----11
4.	椎間板髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞の管理（品質管理）に関する研究 安藤潔	-----13
5.	活性化ヒト髄核細胞の腫瘍原性に関する研究 中村雅登	-----16
6.	活性化椎間板髄核細胞の変性椎間板への移植術に関する研究 酒井大輔、山本至宏、岩品徹、渡辺拓也	-----17
7.	適応患者選択ならびに細胞の均一化に関わる外部評価に関する研究 波呂浩孝	-----19
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----21
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----23

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
統括研究報告書

自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発

研究代表者 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：

自家骨髄間葉系幹細胞によって活性化された椎間板髄核細胞の中等度変性椎間板への移植術が有害事象なく安全に実施され、最長1年までの経過観察が行われた。画像上の改悪所見はなく良好である。Cell processing center において活性化された髄核細胞の生存率は高く、細胞活性度も極めて良好であった。細胞処理工程において細菌、マイコプラズマ、ウイルスなどの感染は全く認められず、高い品質管理が示された。体外での椎間板髄核細胞の活性化が安全かつ有効に行えることが示された。

【分担研究者】

整形外科学・教授

酒井大輔：東海大学医学部外科学系整形外科

学・講師

山本至宏：同・講師

岩品徹：同・助教

渡辺拓也：同・助教

加藤俊一：東海大学医学部基盤診療学系再生医

療科学・教授

小林広幸：東海大学医学部基盤診療学系臨床薬

理学・教授

浅原孝之：東海大学医学部基盤診療学系再生医

療科学・教授

安藤潔：東海大学医学部内科学系血液・腫瘍

内科学・教授

中村雅登：東海大学医学部基盤診療学系再生医

療科学・教授

波呂浩孝：山梨大学大学院医学工学総合研究部

A. 研究目的

腰椎椎間板の変性抑制、再生に対する細胞移植療法の安全性と有効性を検証することを目的とした。具体的には、腰椎椎間板ヘルニア、分離症、椎間板症における1椎体間固定術例でその固定隣接椎間板が固定術は不要だが画像上の変性が中等度まで進行している例を対象とし、自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された自家椎間板髄核細胞を固定隣接椎間板へ移植し、画像上、臨床上の安全性、有効性を評価した。また、この活性化髄核細胞を作成する工程における、細胞の品質管理の状態や細胞活性を評価し、腫瘍化がないことを短期間で判定するための新しい手法の開発も目標とした。

B. 研究手法

対象とした患者は本プロジェクトの申請書の基準に従い、20代で腰椎椎間板ヘルニア、分離症、椎間板症の椎体間固定術の適応例の内、その固定隣接椎間板が固定は不要だが、画像上変性変化が以下の4つの基準(①MRIでPfarrmann分類III、あるいはMochida分類でmoderate、②単純X線立位側面動態画像で15度以内の椎間可動性、③同中間位側面画像で5度以内の後方開大、④同立位側面画像で前方、後方すべりなし)を満たす例である。実際に2009年度に実施した例は7例でいずれも男性であった。椎間固定術の際に摘出した髄核から髄核細胞を分散し、同じく術中に腸骨から骨髓液を採取し、比重分離法で骨髓間葉系幹細胞を導出した。両細胞を各々4日間単層培養の後、細胞間接着を伴う形で共培養を3日間行い、骨髓間葉系幹細胞による髄核細胞の活性化を遂行した。活性化を終了した髄核細胞を椎間固定術から7日間経過時に、当該固定椎間に隣接する変性椎間板内に 0.9×10^6 個を基準として移植した。

この過程において、1)椎間板髄核細胞の活性化状態、2)7日間の活性化工程における品質管理の状態、3)活性化髄核細胞の腫瘍化否定のための新しい方法の開発の状態、4)活性化髄核細胞移植後の画像上、臨床上所見について研究した。

倫理面への配慮：対象患者に対し、研究代表者が臨床研究コーディネーターの同席のもと、本臨床研究の内容について十分な説明を行い、対象患者がその利点、欠点を十分に理解したことを確認し、患者本人が本治療法を選択し、同意した。どのような場合にも本臨床研究における安全性確保を最優先とし、研究計画を継続し

た。インフォームドコンセントは、臨床研究決定時、第1回目の手術日直前、第2回の手術(活性化髄核細胞移植術)の直前の3回実施し、その都度、説明と質疑を繰り返し、同意を得た。

本研究は国の定めるヒト幹細胞の臨床研究に該当することから、『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年7月制定)』に則り実施された。

C. 研究結果

1)椎間板髄核細胞の活性化：7症例における術中に摘出した椎間板から得られた分散後の髄核細胞数は $0.7 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^6$ 個、4日間の単層培養を終了した共培養前の髄核細胞数は $1.3 \times 10^6 \sim 4.9 \times 10^6$ 個、骨髓間葉系幹細胞は $1.1 \times 10^6 \sim 4.9 \times 10^6$ 個であった。3日間の共培養終了時の髄核細胞数は $3.0 \times 10^6 \sim 11.8 \times 10^6$ 個であり、細胞生存率は91~98%、細胞数増加率は4.2~6.3倍であった。本臨床研究開始前の段階で36例について実施されたin vitroの研究で得られたデータとほぼ同様であり、本臨床研究における症例においても、極めて安定した髄核細胞数の増加が得られた。

2)活性化工程における品質管理：髄核細胞、骨髓間葉系幹細胞の受け入れ時、工程管理時(単層培養終了時)、最終製品時(共培養終了時)の髄核細胞の無菌試験(好気性、嫌気性)、マイコプラズマ否定試験(PCR法、培養法)、最終製品時のエンドトキシン、ウイルス否定試験(対象15ウイルス)ともに異常所見は一切認められなかった。

3)活性化髄核細胞の腫瘍化否定のための新しい方法の開発：超免疫不全NOGマウスの尾椎

椎間板内への活性化髄核細胞の移植の前段階として、ヒト脊索腫細胞株の細胞を対照として同動物椎間板内ならびに皮下組織への移植を行い検討を開始した(分担研究者、中村雅登報告書参照)。同細胞株細胞 5×10^5 個の皮下移植を行った同マウスに 6 週間で腫瘍形成が確認できた。細胞腫により異なるが、短期間に腫瘍形成の有無を確認しうる動物種であることが確認された。

4) 活性化髄核細胞移植後の画像上、臨床上所見：活性化髄核細胞移植時、1 カ月時(7 例が経過、以下同様の表示)、3 カ月時(7 例)、6 カ月時(6 例)、1 年時(3 例)の経過観察では、当該 7 例の全身所見、移植術を行った腰椎部所見ともに、改悪所見、新たに生じた所見、症状などは一切認められず、有害事象の発生はないと判定した。

末梢血、血液生化学検査上も、活性化髄核細胞移植術との関係が考えられる異常データは一切得られていない。

術前の自他覚所見は椎間板摘出+固定術を施行した椎間の変性、不安定性に起因すると考えられるが、術後の改善は良好である。中等度の変性がみられ、今回の活性化髄核細胞移植術の対象となった隣接椎間と関係する新たな愁訴は、臨床観察上認められていない。

さらに画像所見では、7 例中 6 カ月以上の経過観察を終了した 6 例では、椎体間固定術を施行した椎間の骨癒合を単純 X 線像、MRI にて確認できた。活性化髄核細胞を移植した固定隣接椎間では、活性化髄核細胞移植術直前の画像と比較して、椎間高の $1/3$ 以上の狭小化、動態撮影における不安定性出現、前方、後方へのすべりの出現などは認められていない。MRI 上、術前の変性度、すなわち Pfirrmann 分類 III、あるいは

Mochida 分類で moderate の所見からの改悪、改善所見はいずれも認められない。MRI 画像をより定量化する試みとして、T2 値の測定、ADC(apparent diffusion coefficient)に関しても、研究計画提出時の必須検討項目に追加して参考値として測定している。3 年間の全観察時のデータの経時的検討が必要である。

D 考察：

移植術周術期、1、3、6 ヶ月、1 年までの経過観察では当該患者の全身所見、移植術を行った腰椎部分ともに有害事象は一切生じていない。末梢血、血液生化学検査上も本移植術との関連が考えられる異常データも一切得られていない。髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞の受け入れ時、工程管理時、最終製品時の髄核細胞の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、最終製品時のエンドトキシン、ウイルス否定試験とも、すべて陰性であり感染に対する防御が十分に行われていることが示された。

移植する髄核細胞の活性化は良好であった。すなわち、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養による活性化終了時の髄核細胞の増殖率は、椎間板から摘出し分散した直後の 4 から 6 倍であり、また、細胞生存率は 90%後半の値を示し、極めて良好であった。

当該移植術において残余した活性化髄核細胞を凍結保存し、腫瘍化否定のための新しい方法を検討している。すなわち、超免疫不全 NOG マウスの尾椎椎間板内への活性化髄核細胞の移植の前段階として、ヒト脊索腫細胞を対照として同動物の皮下組織および椎間板内への移植を行い検討を開始した。また、活性化髄核細胞をコ

ロニー形成と表面マーカーで分別し、より活性の高い髓核細胞の分画の同定研究も開始した。椎間板再生、変性抑制のためにより有効な髓核内細胞を検索するためである。

実施した 7 症例の画像経過検索上、移植椎間板部の不安定性出現や MRI 上の変性変化の改悪を生じておらず、活性化椎間板髓核細胞を用いた変性椎間板への移植術は臨床研究の計画通りに順調に進捗している。他の feeding cell によって椎間板固有の細胞を活性化し、移植する方法は世界で初めての試みであり、その意義は極めて大きいと考えられる

E. 結論

骨髄間葉系幹細胞により体外で活性化された椎間板髓核細胞の変性椎間板への移植術は、細胞の活性化工程ならびに手術経過の検討から、安全な方法であると考えられる。移植術の有効性についてはさらに長期間の観察が必要であるが、最長 1 年までの経過観察では画像上、臨床上也ともに有効と考えられる。

F. 健康危険情報：本研究による健康危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, Iwashina T, Serigano K, Tamura F, Mochida J. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2010; 28: 623-630

2. Umeda M, Kushida T, Sasai K, Asada T, Oe K, Sakai D, Mochida J, Ikehara S, Iida H. Activation of rat nucleus pulposus cells by coculture with whole bone marrow cells collected by the perfusion method. *J Orthop Res* 2009; 27: 222-228.

3. Hiyama A, Gajghate S, Sakai D, Mochida J, Shapiro IM, Risbud MV. Activation of TonEBP by calcium controls β 1,3-glucuronosyltransferase-I expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc. *J Biol Chem* 2009; 284: 9824-9834.

4. Kobayashi Y, Sakai D, Iwashina T, Iwabuchi S, Mochida J. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater* 2009; 17: 15-22.

5. Sakai D, Nakai T, Mochida J, Alini M, Grad S. Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Spine* 2009; 34: 1448-1456

6. Rutges J, Creemers LB, Dhert W, Milz S, Sakai D, Mochida J, Alini M, Grad S. Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 18:416-423

7. Gajghate S, Hiyama A, Shah M, Sakai D, Anderson DG, Shapiro IM, Risbud MV. Osmolarity and intracellular calcium regulate aquaporin2 expression through TonEBP in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J Bone Miner Res*

2009; 24: 992-1001

8. Nakai T, Mochida J, Sakai D. Synergistic role of c-Myc and ERK1/2 in the mitogenic response to TGF beta-1 in cultured rat nucleus pulposus cells.

Arthritis Res Ther 2008; 10: R140.1-12

9. 酒井大輔、持田讓治. 細胞レベルからの椎間板再生—細胞移植療法のその先に—

日本腰痛学会雑誌 2009; 15: 95-98

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. そのほか なし

2. 学会発表

1. 檜山明彦、酒井大輔、持田讓治. 糖転位酵素 galactose-beta1, 3-glucuronyltransferase - 1 (GlcAT-1) の椎間板中の発現解析 第24回日本整形外科学会基礎学術集会、日本整形外科学会雑誌 83 (8)、S1208, 2009

2. 酒井大輔、中村嘉彦、三島大志、田村太、中井知子、持田讓治. 椎間板内在性幹細胞の同定とその評価における基礎的研究 第24回日本整形外科学会基礎学術集会、日本整形外科学会雑誌 83 (8)、S1209, 2009

3. 田村太、酒井大輔、芹ヶ野健司、中井知子、持田讓治. 髄核細胞における CD56 の存在意義 第24回日本整形外科学会基礎学術集会、日本整形外科学会雑誌 83 (8)、S1210, 2009

4. 村井邦彦、酒井大輔、中井知子、中村嘉彦、持田讓治. 椎間板ヘルニアにおける免疫機序の関与 第24回日本整形外科学会基礎学術集会、日本整形外科学会雑誌 83 (8)、S1212, 2009

5. 持田讓治. 椎間板再生のための細胞移植療法 第24回日本整形外科学会基礎学術集会、日本整形外科学会雑誌 83 (8)、S1100, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発
分担研究報告書

分担研究課題：椎間板髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞の管理（分離、調整）に関する研究

研究分担者 加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授

研究協力者 中村 嘉彦 東海大学医学部附属病院細胞移植再生医療科・室長補佐

研究要旨：

東海大学医学部では整形外科持田讓治教授らのグループにより開発された椎間板再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、学内のプロジェクト研究チームによる総合的な研究体制が構築された。

本分担研究では自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞の品質の評価法の確立を目的とし、①細胞表面マーカーによる細胞分化の評価、②コロニー形成法による増殖能力の評価、③免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築の確認などの検討を行った。

A. 研究目的

椎間板再生医療プロジェクトの中で、体外培養を行う椎間板髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞の品質管理を行い、安全性と有効性を科学的に検証することを目的とした。

B. 研究方法

整形外科の持田讓治教授・酒井大輔講師を中心とするグループが椎間板の再生に関する基礎的研究を行い、骨髄間葉系幹細胞（MSC）と髄核細胞を隔膜共培養する形の細胞培養系を開発した。

体外で培養した髄核細胞由来の細胞が所期の目的どおりに髄核細胞としての性格を保持し、正常に機能するかどうかを評価する方法として、酒井大輔講師が考案した方法（①細胞表面マーカーによる細胞分化の評価、②コロニー形成法による増殖能力の評価、③免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築の確認など）にて、附属病院細胞移植再生医療科セルプロセッシング室の加藤俊一室長・中村嘉彦室長補佐らが、品質評価を行った。

1.細胞表面マーカー

血液細胞、皮膚細胞および間葉系細胞などに発現している表面分子に対する抗体を中心に、100種類以上の抗体との反応性を検討した。反応性のある抗体を機能面との整合性を見極めながら選択した。

2.コロニー形成試験

上記抗体との反応性、発現率の増減を確認しながら、細胞増殖能（コロニー形成法）との比較を行い、コロニー形成法の適否を検討した。

3.免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築試験

細胞表面マーカーおよびコロニー形成法によって選択された幾つかの細胞分画を用いて、in vivo 可移植性の有無を検討した。

4.書類管理

品質評価や安全性評価の業務については綿密な研究計画と SOP（作業手順書）に基づいて実施し、その記録は詳細に記述して厳格に保管した。また、作業工程毎に定められた試料の保存も厳格に行った。

5.倫理的事項

本研究は国の定めるヒト幹細胞の臨床研究に該当することから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月制定)に則り、また動物実験に関しては平成17年改正の動物愛護法に基づき適正な実験を行った。

C. 研究結果

1. 細胞表面マーカー

様々な抗体の反応性から、培養前後における髄核細胞の分化度、変性の程度、年齢との関係を考慮して3つの分子の測定が、また、活性化程度として2つの分子が、髄核細胞以外の細胞測定目的として1分子が適切であると判断され、その再現性につき検討中である。

2. コロニー形成試験

2つの分子の発現がコロニー形成能と優位に相関した。また、本コロニー形成試験は髄核細胞の分化程度および年齢とも良く相関した。

3. 免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築試験

上記マーカーにより選択された髄核細胞は、免疫不全マウスの皮下移植ないしは尾椎への移植実験により、軟骨様の長期生着を示すことが確認された。

4. 資料と試料の保管

一連の作業工程の資料についてはそれぞれの担当者が作業記録を作成し、作業工程毎に定められた試料の保存も実施した。

このようなGMP準拠の作業と管理には膨大な時間と労力が必要であった。

D. 結論

GMP基準に準じて実施している椎間板再生医療プロジェクトにおける細胞治療の安全性と有効性の検証方法と結果について報告した。

平成21年度に実施した症例においては当初の目的どおりの細胞調製と管理を実施できた。

GMPに準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針. 「腎移植のすべて」高橋公太編集、2009、pp506-507.
- 2) 加藤俊一、矢部普正編. 「小児の造血細胞移植」、医薬ジャーナル社、東京、2010、pp1-107.

2. 論文発表

- 1) Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1631-8.
- 2) Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2009 Apr;89(3):374-82.
- 3) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Apr;15(4):439-46.
- 4) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May 11.
- 5) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Sep 21.
- 6) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Feb;54(2):299-306.
- 7) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of

matched pair analysis. Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Dec;15(12):1603-8. Epub 2009 Oct 4.

- 8) 田渕 健、気賀沢寿人、吉見礼美、熱田由子、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊地 陽、小林良二、土屋 滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺 新、加藤俊一 小児期造血幹細胞移植全国集計（1983～2005）－細胞源ドナー別移植成績 日本小児血液学会雑誌 2009;23:142-154.
- 9) 加藤俊一. 小児期に造血幹細胞移植を受けた長期生存者におけるQOL評価法ガイドライン作成に向けて. 日本小児血液学会雑誌, 2009;23:161-164.
- 10) 渡辺 新、掛江直子、坂本なほ子、加藤俊一. 同胞小児ドナーになることの正確な理解に役立つ年齢群別パンフレットの作成. 日本小児血液学会雑誌, 2009;23:155-160.

2. 学会発表

- 1) Takakura H, Shimizu T, Moromoto T, Koike T, Yanagimachi N, Yabe M, Yabe H, Tanaka A, Kato S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Inborn Errors in Metabolism (IEM) - A single institute experiences – The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. 2009 Sep.26-27, Nagoya.
- 2) 加藤俊一. 多様化する造血細胞移植. 第 51 回日本小児血液学会総会. 2009 年 11 月、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許：第 4437335 号

名称：「ヒト未分化造血幹細胞およびその分離方法ならびに分離装置」

発明者：加藤俊一、中村嘉彦

取得日：平成 22 年 1 月 15 日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発
分担研究報告書

分担研究課題： 椎間板再生臨床研究に寄与するデータベース構築に関する研究

研究分担者 小林 広幸 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学・教授

研究要旨：Web データ収集システムである REDCap (Research Electronic Data Capture) は、椎間板再生臨床研究における細胞、組織の安全性確保に寄与するデータベースとして、活用することが可能であることが確認された。

A. 研究目的

質の高い臨床研究を実施する上で、データ管理は非常に重要である。臨床研究においてデータ管理の関わりは、臨床研究の計画時から計画書作成への参画、調査票の作成、データのコード化や入力方法の検討、データベースの設計・管理、解析のためのデータセットの作成など多岐に渡る。本研究では、椎間板再生臨床研究における細胞、組織の安全性確保に寄与するデータベースの構築を目指す。

B. 研究方法

Vanderbilt大学と共同開発を進めている REDCap (Research Electronic Data Capture) は、臨床研究に特化したwebデータ収集システムで、このシステム1つで多くの臨床研究に対応できる。データ入力時の即時データチェック機能やダブルエントリーシステム、各統計ソフトウェアに対応した形式でデータを出力など、臨床研究をスムーズに進めるための機能を持っている。このようなwebデータ収集システムが椎間板再生臨床研究で活用できるかどうか、仮想データを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

実際の臨床研究データは個人情報を連結可能匿名化し、対応表は研究代表者が施錠された保管庫で管理している。

C. 研究結果

実際に収集している臨床情報を入力できるように、REDCapシステムのデータベースをデザインした。IDとPasswordを付与した複数人による同時入力、ダブルエントリーによる整合性チェック機構が機能することを確認した。また、データ出

力や基本的な統計解析に利用可能なことを確認した。

D. 考察

今後、セキュリティを確保した上で、実際のデータを入力しての運用を検討したい。

E. 結論

REDCapは、椎間板再生臨床研究における細胞、組織の安全性確保に寄与するデータベースとして、活用することが可能と考えられる。

G. 研究発表

2. 学会発表

・ REDCap コンソーシアムプロジェクト-国際共同開発型臨床研究EDCシステム-, 第29回医療情報学連合大会, 11月21日
・ 医療情報とその社会的共有, 日本記号学会第29回大会「いのちとからだのコミュニケーション-医療と記号学との対話」, 5月17日

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発
分担研究報告書

分担研究課題：自家骨髄間葉系幹細胞による活性化椎間板髄核細胞培養法の
基礎的手技の指導及び確立に関する研究

分担研究者 浅原孝之 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授

研究要旨：

我々が開発したヒト末梢血、骨髄、臍帯血に含まれる血管幹細胞(CD133 又は CD34 陽性細胞)の生体外無血清増幅培養法の当該研究への応用技術を選定した。その結果、feeding cell としての自家骨髄間葉系幹細胞を用いた髄核細胞活性化共培養法の無血清培養化に向けた研究を次年度は行う。

A. 研究目的

開発中の血管幹細胞(CD133 又は CD34 陽性細胞)の生体外増幅培養法の基礎的技術の本研究への基礎的応用手技の選定を行う。

B. 方法及び C. 結果

血管幹細胞(CD133 又は CD34 陽性細胞)の無血清生体外増幅培養法において、臍帯血、末梢血、骨髄中血管幹細胞(CD133 又は CD34 陽性細胞)を増殖因子添加無血清培養(Stem Span, Stem Cell Tec.)を用いて7日間培養を行うと臍帯血では50倍、末梢血では10倍、骨髄では20倍前後に細胞数が増加した。さらにいずれも培養後の細胞の接着性・萌芽性が高まり、生体内での血管新生能力が格段に上昇した。本研究において、無血清培養細胞の品質管理・評価に関する技術的な標準化を確立することができた。

D. 考察及び E. 結論

当該研究では、基礎的動物モデル研究では間葉系幹細胞培養及び共培養においてウシ血清を用い、また臨床応用段階で患者自己血清を用いており、基礎的データ及び臨床応用データにおける整合性及び移植治療効果の安定化を考慮すると培養系の無血清化が必要と考えられる。そこで血管幹細胞(CD133 又は CD34 陽性細胞)の生体外増幅培養法における無血清培養基礎技術の当該研究の培養系への応用を選定し、次年度は当該研究培養法の無血清化の研究を行う。本年度において確立された、無血清培養細胞の品質管理・評価に関する技術的な標準化を応用できるものとする。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka R, Masuda H, Asahara T, Miyasaka M, et al. The Biological Activity of circulating endothelial progenitor cell (EPC) is the

putative key factor to determine the efficacy of autologous G-CSF mobilized EPC therapy for diabetic patients with chronic non healing ulcer. *Plast Reconstr Surg.* 120:59. 2009.

2. Shirakura K, Masuda H, Asahara T et al. Establishment of two liver fibrosis models to examine endothelial progenitor cell kinetics. *Tissue Engineering & Regenerative Med.*, 6: 1128-1133. 2009.

3. Duc M Vu, Masuda H, Asahara et al, CD133+endothelial progenitor cells as a potential cell source for a bioartificial glomerulus. *Tissue engineering*, 15:3173-3182. 2009.

4. 増田治史、浅原孝之、「血管老化からみた Stem cell aging, 酸化ストレスと血管内皮前駆細胞の老化」、*メディカルサイエンスダイジェスト*、ニューサイエンス社、第36巻、136号、p614-617、2010年1月。

5. 増田治史、浅原孝之、「血管内皮前駆細胞」、*循環器科*、p447-452. 2009.

2. 学会発表

1. Masuda H, Asahara T et al; 2009.7.8-11, ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain; Establishment of hemato-endothelial lineage commitment assay to determine single human cord blood CD133 positive cell fate regulating hematopoiesis and vasculogenesis.

2. 白倉克也、増田治史、伊藤理恵、志津野朋子、小尾正太郎、栗原祐輔、峰 徹哉、浅原孝之、第9回日本再生医療学会総会、2010.3.18-3.19、広島、肝線維症モデルマウスにおける血管内皮前駆細胞分化能の検討

3. 田中里佳、増田治史、加藤俊一、浅原孝之、宮坂宗男、第9回日本再生医療学会総会、2010.3.18-3.19、広島、難治性糖尿病性潰瘍患者に対する自己末梢血血管内皮前駆細胞移植療法

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記なし。
2. 実用新案登録 特記なし。
3. その他 特記なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発
分担研究報告書

分担研究課題：椎間板髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞の管理（品質管理）に関する研究

研究分担者 安藤 潔 東海大学医学部内科学系血液・腫瘍内科学・教授

研究要旨：

本年度臨床応用された7例の活性化髄核細胞の安全性を評価するために、受け入れ時、工程管理時、最終産物完成時の感染症検査（各種ウイルス、マイコプラズマ、細菌）、細胞生存率、細胞数を評価した。

A. 研究目的

本研究の目的は、自家骨髄間葉系細胞と椎間板髄核細胞を共培養して髄核細胞を活性化した後患者椎間板に移入することにより、椎間板変性を防止することである。

自家移植ではあるが、培養期間中の感染、細胞の変化が移植結果に影響する可能性があり、移植直前の細胞の安全性評価が重要な課題である。本研究課題では、そのための標準手順書を作成し、それに則り実際の臨床例に関して安全性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

DNA ウィルス（HBV, ParvovirusB19NS1, ParvovirusB19VP2, HSV, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8）は最終産物より抽出した DNA, RNA ウィルス（HCV, HIV-1, HTLV-1）は最終産物より抽出した RNA 由来 cDNA を template として PCR によりウイルス検出を行った。またマイコプラズマについても PCR 法を併用した。マイコプラズマは更に培養法により確認を行った。細菌は培養液の好気性培養、嫌気性培養により検出した。

C. 研究結果と考察

結果は次ページの表で示す。培養期間中に DNA ウィルス（HBV, ParvovirusB19NS1,

ParvovirusB19VP2, HSV, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8), RNA ウィルス (HCV, HIV-1, HTLV-1)、マイコプラズマ、細菌の感染は検出されなかった。また培養後の細胞増幅率は 4.5-6.3 倍であり、細胞生存率は 90.6-98.0%であった。

E. 結論

以上の結果から、本研究における細胞プロセス工程は無菌的に安定した結果を得られることが確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsushita H, Yamamoto M, Tsuboi K, Masukawa A, Arakawa S, Asai S, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. A novel aberrant form of e13a2 BCR-ABL1 transcript in chronic myelogenous leukemia undetectable with the standardized real-time quantitative polymerase chain reaction from the Europe Against Cancer Program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47, 885-887, 2009
2. Shirasugi Y, Ando K, Hashino S, Nagasawa T, Kurata Y, Kishimoto Y, Iwato K, Sonehara T, Ohtsu T, Berger D. A phase II, open-label, sequential-cohort, dose-escalation study of romiplostim in Japanese patients with chronic

- immune thrombocytopenic purpura. . Int J Hematol. 90, 157-165, 2009
3. Suzuki R, Kikuchi A, Ohgiya D, Murayama H, Toyosaki M, Suyama T, Watanabe S, Ogawa Y, Kawada H, Ando K. A case of acquired aplastic anemia with repeated cerebral infarctions at the beginning of immunosuppressive therapy. Tokai J. Exp. Clin. Med. 54, 58-62, 2009
4. Tobinai K, Ishizawa K, Ogura M, Morishima Y, Ando K, Taniwaki M, Watanabe T, Yamamoto J, Uchida T, Nakata M, Terauchi T, Nawano S, Matsusako M, Hayashi M, Hotta T. Phase II study of oral fludarabine in combination with rituximab for relapsed indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. Cancer Sci. 100, 1951-1956, 2009
5. Matsushita H, Masukawa A, Arakawa S, Ogawa Y, Asai S, Yabe M, Ando K, Miyachi H. Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myelogenous leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene Int J Hematol. 90,623-625,2009
6. Hatanaka K, Nakamura N, Kojima M, Ando K, Irie S, Bunno M, Nakamine H, Uekusa T. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders mimicking angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Pathology Research and Practice. 2010 in press
7. Moriuchi M, Ohmachi K, Kojima M, Tsuboi K, Ogawa Y, Nakamura N, Ando K. Three cases of bortezomib-resistant multiple myeloma with extramedullary masses. Tokai J. Exp. Clin. Med. 2010 in press
8. Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto N, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R. Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. 189, nt J Hematol. 332-341, 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況なし

ID	1	2	3	4	5	6	7
検査項目	2009.02.10	2009.02.17	2009.04.21	2009.06.23	2009.07.07	2009.08.18	2010/3/2
HBV	-	-	-	-	-	-	-
HIV-1	-	-	-	-	-	-	-
HTLV-1	-	-	-	-	-	-	-
Parvo.B19NS1	-	-	-	-	-	-	-
Parvo.B19VP2	-	-	-	-	-	-	-
HSV	-	-	-	-	-	-	-
VZV	-	-	-	-	-	-	-
CMV	-	-	-	-	-	-	-
EBV	-	-	-	-	-	-	-
HHV6	-	-	-	-	-	-	-
HHV7	-	-	-	-	-	-	-
HHV8	-	-	-	-	-	-	-
HCV	-	-	-	-	-	-	-
HIV-1(RNA)	-	-	-	-	-	-	-
HTLV-1(RNA)	-	-	-	-	-	-	-
結果受け取り日	2009/2/18	2009/2/18	009.04.27	2009/7/6	2009/7/8	2009/8/19	2010/3/8
エンドトキシン		0.1716pg/ml以下					
結果受け取り日	(0.004865EU/ml未満)	(0.000858EU/ml未満)	0.004491EU/ml未満	0.003725EU/ml未満	0.00319EU/ml未満	0.01324EU/ml	0.004366EU/ml未満
マイコプラズマ (RT-PCR法)	2009/2/10	2009.02.18	2009.04.21	2009.06.26	2009.07.08	2009.08.18	2010/3/2
結果受け取り日	-	-	-	-	-	-	-
マイコプラズマ(nested)	2009/2/10	2009.02.18	2009.04.21	2009.06.26	2009.07.08	0.002291EU/ml未満	2010/3/3
結果受け取り日	-	-	-	-	-	-	-
マイコプラズマ (培養法)	2009/3/12	2009.03.17	2009.05.21	2009.06.26	2009.07.08	2009.08.19	2010/3/30
結果受け取り日	-	-	-	-	-	-	-
細菌培養(好気性)	2009/3/12	2009.03.17	2009.05.21	2009.07.21	2009.08.04	2009.08.21	2010/3/30
細菌培養(嫌気性)	-	-	-	-	-	-	-
結果受け取り日	2009/2/17	2009.02.25	2009.04.30	2009.07.01	2009.07.14	2009/9/15	2010/3/10

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生研究
における細胞、組織の安全性、品質確保に関する技術開発
分担研究報告書

分担研究課題：活性化ヒト髄核細胞の腫瘍原性に関する研究

研究分担者 中村 雅登 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授

研究要旨：

活性化髄核細胞の腫瘍原性を否定するための安全性確認システムの構築を行った。超免疫不全NOGマウスへの低悪性度ヒト脊索腫の皮下移植実験により高感度、高精度のヒト髄核腫瘍原性確認システム確立のための基礎研究を実施した。

A. 研究目的

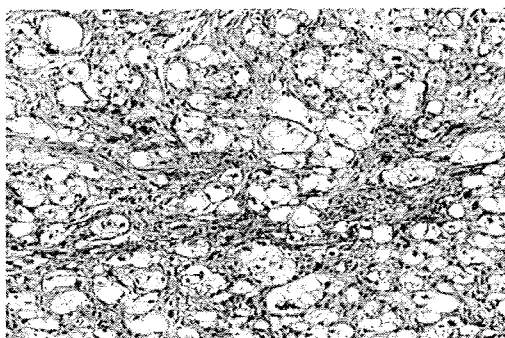
活性化髄核細胞の腫瘍原性を否定するための超免疫不全NOGマウスを用いたin vivo安全性試験系を開発する。

B. 研究方法

超免疫不全NOGマウスの皮下あるいは椎間に再生医療に用いる活性化髄核細胞を移植し、一定期間観察し腫瘍形成の有無を組織学的に確認する。本年度は確実に腫瘍形成を確認できる技術、すなわち陽性対照系を確立することを目標とし、病理学的に髄核細胞にもっとも近縁と考えられ、悪性度も低い脊索腫細胞株の移植実験を行った。

C. 研究結果

ヒト脊索腫細胞株を 5×10^5 個/頭で皮下に移植した場合、移植後6週間で腫瘍形成が確認できた。椎間移植では腫瘍形成は確認できなかった。



D. 考察

低悪性度のヒト脊索腫細胞株の皮下移植、6週間観察で腫瘍形成が確認できたことから、現時点ではこの条件で腫瘍形成能を判定するのが、もっとも高感度の腫瘍形成能確認試験と考えられる。より実際の再生移植環境に近い椎間移植については細胞移植の方法などの技術的問題点を克服する必要があると考えられる。

E. 結論

平成22年度からの再生医療に用いられた活性化髄核細胞の移植実験、腫瘍原性否定—安全性確認システムの基盤は確立できたと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
特になし