

201006009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 持田 讓治

平成23年5月

研究班の構成

	研究者名	所属研究機関 ・役職	専門	分担研究項目
研究代表者	持田讓治	東海大学 整形外科学 教授	整形外科学	研究統括 臨床実技
分担研究者	酒井大輔	東海大学 整形外科学 講師	整形外科学	臨床実技 細胞処理実技指導
	山本至宏	東海大学 整形外科学 講師	整形外科学	臨床実技
	岩品徹	東海大学 整形外科学 助教	整形外科学	細胞処理実技
	渡辺拓也	東海大学 整形外科学 助教	整形外科学	細胞処理実技
	加藤俊一	東海大学 再生医療科学 教授	再生医療学	細胞管理（分離、調整）の責任者

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 中村嘉彦	-----9
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	-----12
3.	ヒト骨髄未分化細胞の細胞処理研究と、その技術応用研究 浅原孝之	-----14
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	-----17
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	-----20
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	-----21
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	-----22
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----25
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----29

I. 総括研究報告書

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：

腰椎椎間板から摘出され、腸骨から採取した自家骨髄間葉系幹細胞によって活性化された髄核細胞の、中等度変性椎間板への移植術が 2010 年度末までに 9 症例で終了した。最短 6 カ月最長 2 年までの経過観察が行われ、有害事象は全く認められなかった。画像上の改悪所見はなく良好であり、2 症例においては MRI 画像上の改善が観察された。活性化された髄核細胞の生存率は高く、細胞数の増加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、cell processing center 内での高い品質管理が示された。7 日間に亘る体外での椎間板髄核細胞の活性化は、安全かつ有効に行えることが示された。

【分担研究者】

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
整形外科学・教授

A. 研究目的

本研究の目的は、腰椎椎間板の変性抑制、あるいは再生のために意図される自家細胞移植療法の安全性と有効性を検証することである。本研究は平成 21 年度から継続している。

腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎椎間板症における 1 椎体間固定術適応例で、その固定椎間の頭側あるいは尾側の隣接椎間板が未だ固定術は不要だが、画像上中等度まで変性が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体外で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、その細胞活性化のすべての工程における、細胞の品質管理の状態や細胞活性を評価した。さらに活性化された椎間板髄核細胞が腫瘍化しないことを、短期間に確実に判定するための新手法の開発を行った。

B. 研究手法

対象患者は、ヒト幹細胞の臨床研究に関する審査委員会の承認事項に基づいた本プロジェクト申請書の基準に従った。20代で腰椎椎間板ヘルニア、腰椎分離症、腰椎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（頭側あるいは尾側）が固定は未だ不要だが、画像上の変性が以下の4つの基準を満たす例である。すなわち、①MRIでPfarrmann分類III、あるいは当該椎間板にヘルニアがある場合には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、である。実際に2010年度までに実施された9例(2009年度7例、2010年度2例)は男性8例、女性1例であった。

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の共培養を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：対象患者へのインフォームドコンセントは、本臨床研究決定時、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。

対象患者に対し、研究代表者(持田)が東海大学伊勢原病院臨床研究コーディネーター(千葉)の同席のもと、本臨床研究の内容について十分説明し、当該患者がその利点、欠点を十分に理解したことを確認した。患者本人が自ら本治療法を選択し、その実施に同意した。治療法決定から活性化髄核細胞移植後の経過観察期間のすべてを通じて、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することを説明し、研究計画を継続した。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：9症例における術中に摘出した椎間板から得られた採取髄核組織量は3.6~11.9gであった。分散後の髄核細胞数は $0.71 \times 10^6 \sim 3.42 \times 10^6$ 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 $1.25 \times 10^6 \sim 4.88 \times 10^6$ 個、骨髓間葉系幹細胞は $1.15 \times 10^6 \sim 4.88 \times 10^6$ 個であった。3日間の共培養終了時の髄核細胞数は $2.48 \times 10^6 \sim 11.8 \times 10^6$ 個であり、

細胞生存率は 90.0～99.0%、細胞数増加率は 4.48～6.29 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よりさらに良好であり、cell processing center 内で実施された本臨床研究においても、いずれの症例においても良好な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、骨髄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)を実施した。これらの感染症試験は学内再生医療委員会の管理の下、学内ですべて実施され、マイコプラズマ検査用の P2 室も設置した。細菌、マイコプラズマ、15 種類のウイルス検査はいずれも陰性であった。

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：活性化髄核細胞の腫瘍原性を否定するために、超免疫不全 NOG マウスを用いた *in vivo* 安全性試験系を作成し、検討した。同マウスの皮下に、移植術が施行された 9 例中 7 例の活性化髄核細胞を移植し、6 週間観察し腫瘍形成の有無を検討した。対照としたヒト脊索細胞腫株では 5×10^5 個/頭の皮下移植で 6 週間で腫瘍が確認されるために、活性化髄核細胞では更に感度を上げ、 10^6 個/頭の細胞皮下移植を行った。7 例全例で腫瘍形成は一切認められなかった。

4) 活性化髄核細胞移植後の全身ならびに局所所見、臨床症状、および画像上所見：活性化髄核細胞移植時、1 カ月時(全 9 例が経過、以下同様の表示)、3 カ月時(9 例)、6 カ月時(9 例)、1

年時(7 例)、2 年時(3 例)の経過観察では、9 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、新たに生じた異常所見、などは一切認められなかった。また、血液生化学、末梢血検査上も、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おらず、活性化髄核細胞移植術と関連する有害事象は一切生じていない。

術前の自他覚所見の改善は良好であり、全例、復職あるいは復学している。これは椎間固定手術の効果と考えられる。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、9 例全例で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。従って、固定椎の隣接椎間板の画像変化に対する活性化髄核細胞移植術の影響を判定する条件が全例で整った。その観点から観察すると、活性化髄核細胞を移植した頭側あるいは尾側の固定隣接椎間では、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は一切認められていない。MRI 上、術前の変性度、すなわち Pfirrmann 分類 III、あるいはヘルニアを有する場合には Mochida 分類で moderate の所見からの改悪所見はいずれも認められない。一方、活性化髄核細胞移植後 6 カ月目の 1 例と 1 年目の 1 例で、Pfirrmann 分類 II への MRI 画像の改善が見られているが、経時的な観察による再現性検討が必要と考えられる。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を経時的検討が必要である。

D. 考察

脊柱は体重の支持、関節、神経のコンテナの3つの役割を持つが、腰椎はその中でも体幹の土台的役割が大きい。その構造体の中で椎間板は体重支持と関節機能を持ち、その破綻は腰痛をはじめ多彩な愁訴の原因となる。椎間板変性が著明となった場合には、当該椎間を固定する必要が生じるが、この治療は当該椎間の運動単位としての機能を損ない、また隣接椎間板への悪影響ももたらず。従って、変性が中等度までの段階で椎間板変性のその後の進行を予防する事の意義は極めて大きい。

椎間板変性抑制、再生の方法として、1) サイトカイン、成長因子の注入、2) 遺伝子治療、3) 細胞移植療法、4) 組織工学的手法、などがあげられるが、軽度の椎間板変性に対する過剰な治療を行わない点や、安全性の考慮、中等度までの変性に対応できる点で細胞移植療法が優れていると考えられる。本研究では、骨髄間葉系幹細胞の持つ feeding cell としての役割に注目し、体外での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変性椎間板への移植術を考案し、基礎研究、橋渡し研究を経て、臨床研究に至った。

活性化髄核細胞移植術実施の9症例は、移植術後最短6カ月最長2年の経過観察を経ている。移植術周術期、1、3、6カ月、1年、2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。血液生化学的検査、末梢血検査上も本移植術との関連が考えられる異常データは一切認められない。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、本学 cell processing center における細胞活性化の手技では、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。

単層培養、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養の両過程で7日間の培養がもたらす髄核細胞の活性化は良好であった。すなわち、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4.48~6.29倍であり、また、細胞生存率は90.0~99.0%の値を示し、優れた細胞の活性化技術であることが示された。

自己骨髄間葉系幹細胞による自己椎間板髄核細胞の活性化による腫瘍化が起きないことは、先立って行われた36例の研究で示されている。しかし、その判定には動物に移植後5カ月から13カ月を要しており、より可及的短期間での腫瘍化否定が望まれる。このため活性化髄核細胞の腫瘍化否定のための新しい方法を検討した。すなわち、超免疫不全NOGマウスの皮下組織への移植を行い、 10^6 個の活性化髄核細胞の移植後6週間で腫瘍化がないことが確定できる段階に至っているが、さらに少数の細胞でより短期間での判定を目指し検討を続けている。

更に髄核細胞の活性化によって、その細胞群の中により未分化で多分化能を持つ細胞集団も同定されてきており、より高効率な髄核細胞移植術を考案する上で重要な知見と思われる。

移植が終了した9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、2例では経過観察の一時期中において、MRI上の改善傾向が示されている。

このことから、活性化椎間板髄核細胞移植が当該椎間板の変性進行抑制だけではなく、その組織内の細胞環境を改善させ、組織再生の方向に向かう可能性も否定できないと考えられた。

活性化椎間板髄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。骨髄間葉系幹細胞の持つ **feeding cell** としての役割を椎間板変性抑制に利用した臨床研究は世界で初めての試みであり、その意義は極めて大きい。

E. 結論

自己骨髄間葉系幹細胞により体外で7日間で活性化され自己椎間板髄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術後経過の検討から、安全な方法で優れた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2年までの経過観察では画像上、臨床上ともに有効である。

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. Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on

mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 2010; 28 : 1267-1275.

2. Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, Arai F, Nakajima D, Abe K, Mochida J. The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell. *J Cell Physiol.* 2011; 226:1139-1148.

3. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cell Mater.* 2010;19:13-21.

4. Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, Tanaka M, Arai F, Abe K, Mochida J. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by WNT/ β -catenin signaling-induced matrix metalloproteinase expression. *Arthritis and Rheumatism* 2010; 62 :3036-3047

5. Sakai D, Mochida J, Grad S, Alini M. Cells and biomaterials for intervertebral disc regeneration. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering; Morgan and Claypool:* 1-96, 2010

6. 持田讓治. 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. *日本再生医療学会雑誌* 2010; 9: 428-432.

7. 持田讓治. 椎間板再生の展望 からだの科学 2010; 266:126-129.

8. 持田讓治. 椎間板代謝とバイオロジー 椎間板再生への細胞移植法も含めて. *医学の歩み* 2011; 236: 540-544

9. 酒井大輔、持田讓治：運動器の基礎研究 椎

間板変性の分子メカニズムと再生医療 【ロコモティブシンドローム 高齢社会における運動器障害の予防】治療学 2010 ; 44 : 757-761

2. 学会発表

1. 酒井大輔、持田讓治. 椎間板再生のための細胞移植療法 臨床研究の進捗および幹細胞研究による展開 第25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 84 (8)、S1032, 2010
2. 田中真弘、酒井大輔、檜山明彦、中村嘉彦、三島大志、中井知子、新井文征、持田讓治. 活性化髄核細胞の凍結保存方法についての基礎的検討 第25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 84 (8)、S1159, 2010
3. 檜山明彦、酒井大輔、持田讓治. 椎間板細胞における Wnt シグナルの関わりについて—分子学的機能解析から— 第25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 84 (8)、S1161, 2010
4. 新井文征、檜山明彦、酒井大輔、持田讓治. ラット椎間板細胞における β -catenin 非依存性経路について 第25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 84 (8)、S1162, 2010
5. 中井知子、三島大志、中村嘉彦、酒井大輔、持田讓治. NOD-SCID マウスへ皮下移植した髄核細胞の生着とマトリックスの重要性 第25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 84 (8)、S1163, 2010
6. 中村嘉彦、酒井大輔、三島大志、中井知子、持田讓治. 運動器細胞のコロニーアッセイ法およびフローサイトメトリー法による解析 第25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 84 (8)、S1238, 2010

7. 檜山明彦、酒井大輔、持田讓治、Risbud M. TGF- β /BMP シグナルは AP-1, TonEBP を介して椎間板内硫酸化グルコサミノグリカン代謝に関与する 第25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 84 (8)、S1248, 2010
8. 田中真弘、酒井大輔、中井知子、新井文征、持田讓治. 軟骨異栄養犬種髄核細胞の TGF β 刺激による増殖促進と基質合成制御は cMyc を介する 第25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 84 (8)、S1251, 2010
9. Hiyama A, Sakai D, Arai F, Mochida J. Wnt/ β catenin signaling and its downstream target c-myc regulate cell proliferation in the intervertebral disc cell. Presented at Orthopaedic Research Society, Feb, 2011, Long Beach
10. Arai F, Hiyama A, Sakai D, Mochida J. Non-canonical Wnt signaling (PKC pathway) regulates intervertebral disc cells. Presented at Orthopaedic Research Society, Feb, 2011, Long Beach

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. そのほか なし

II. 分担研究報告書

平成 22 年度厚生労働科学研究・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セルプロセッシング室・技師

研究要旨：

東海大学医学部では整形外科持田譲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。

本分担研究においては、適格性基準に合致し、本研究に参加する同意書が得られて椎間板髄核細胞の体外増殖培養が実施された 9 例における採取細胞数、培養後の細胞数、投与細胞数などについて検討したが、いずれも研究計画書どおりに実施することができた。

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

整形外科の持田譲治教授・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。

平成 21 年 2 月～23 年 3 月までの期間に、適格性基準を満たし、本研究への参加同意が得られた 9 例において、椎間板髄核と骨髄の採取を行い、プロトコールに沿って自己髄核細胞の体外培養を行った。

なお、同意が得られて髄核細胞の体外培養が行われたものの、計画的停電の影響により培養された髄核細胞を自家移植できなかった 1 例におけるデータは含めなかった。

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. 採取髄核量

採取された髄核の重量は 3.6～11.9g (平均 7.88g、中央値 8.2g) であった。

2. 培養前分散後髄核細胞数

採取された髄核を酵素処理にて分散し、得られた髄核細胞数は $0.71 \sim 3.42 \times 10^6$ 個 (平均 1.25、中央値 1.0) であった。

3. 培養前分散後髄核細胞生存率

上記髄核細胞の生存率 (viability) は 71.9～92.5% (平均 85.5、中央値 86.8) であった。

4. 培養 5 日目髄核細胞数

培養 5 日目の髄核細胞数は $1.25 \sim 4.88 \times 10^6$ 個 (平均 2.35、中央値 2.23) であった。

5. 培養 5 日目髄核細胞生細胞率

上記髄核細胞の生細胞率 (viability) は 84.6～94.9% (平均 90.4、中央値 91.0) であった。

6. 培養 5 日目細胞増加率

- 培養5日目の髄核細胞の増加率は1.34～3.29倍(平均2.29、中央値2.23)であった。
7. 培養5日目骨髄間葉系幹細胞数
培養5日目の骨髄バンク間葉系細胞数は $1.15\sim 4.88 \times 10^6$ 個(平均2.24、中央値1.85)であった。
8. 培養8日目髄核細胞数
培養8日目の髄核細胞数は $2.48\sim 11.8 \times 10^6$ 個(平均5.00、中央値3.36)であった。
9. 培養8日目髄核細胞生細胞率
培養8日目の髄核細胞の生細胞率は90.0～99.0%(平均96.0、中央値96.7)であった。
10. 培養8日目髄核細胞増加率
培養8日目の髄核細胞の増加率は4.48～6.29倍(平均5.33、中央値7.74)であった。
11. 保存細胞数
後日の検討用に冷凍保存された細胞数は $0.13\sim 8.1 \times 10^6$ 個(平均2.38、中央値0.84)であった。
12. 投与細胞数
9例のすべてにおいて 1.0×10^6 個の培養髄核細胞が投与された。

D. 考察とE. 結論

研究計画書に沿い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採取、処理、培養の結果について報告した。

9例のすべてにおいて計画書どおりの採取、処理、培養と投与を行うことができた。

細胞の安全性や機能評価については他の分担研究者の報告に委ねるが、いずれも計画書どおりに実施することができている。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2723-4.
- 2) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood*. 2010

- Aug 26, 116(8);1369-76. May 17. [Epub ahead of print]
- 3) Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]
 - 4) Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Ogawa A, Nakajima K, Kato S. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2839-46. Jul 13. [Epub ahead of print]
 - 5) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, Kato S, Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
 - 6) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N, Kato S, Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]
 - 7) 渡辺修大、足立壮一、堀部敬三、永利義久、加藤剛二、田淵 健、吉見礼美、加藤俊一、矢部善正. 日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)SCT委員会 小児急性骨髄性白血病第一寛解期でのHLA一致同胞間骨髄移植におけるGVHD予防(MTX単独vs. CyA群)の比較 日本小児血液学会雑誌 2010;24(1):32-36.
 - 8) 加藤俊一. ライソゾーム病の治療. 1)造血細胞移植. *血液フロンティア* 2010;20(4):565-573.
 - 9) 加藤俊一. ライソゾーム病の治療. 造血細胞移植. *小児科診療* 2011(印刷中).
 2. 著書
 - 1) 加藤俊一. よくわかる造血細胞移植コーディネート. 医薬ジャーナル社 2010 pp1-2 (編集)
 - 2) 加藤俊一. よくわかる小児の造血細胞移植 医薬ジャーナル社 2010 (監修および共著)
 - 3) 加藤俊一. ムコ多糖症に対する造血幹細胞移植の現状と課題(骨髄、臍帯血、末梢血). 「ムコ多糖症UPDATE」. イーエヌメディアックス社 2011(印刷中).
 3. 学会発表
 - 1) Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kato S, Osaki T. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its pathogenesis. 33rd International Congress on Microbial Ecology and Disease. Sep. 6-10, 2010, Athen, Greece.
 - 2) Kato S. Cord blood banking and cord blood trans-

plantation in children in Japan. 22nd International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.

- 3) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, Kato S. High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence. 2011 BMT Tandem Meeting. Feb.17-21,2011, Honolulu, USA.
- 4) Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia. 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.
- 5) Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010,USA.
- 6) Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第72回日本血液学会総会 2010年9月、横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 22 年度厚生労働科学研究・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：

椎間板再生臨床研究における細胞、組織の安全性確保に役立つデータベースとして開発を進めてきた web データ収集システムである REDCap (Research Electronic Data Capture) を本格的に運用する前段階として、外部と遮断された仮想ネットワーク上で試用し各種機能を確認した。

A. 研究目的

質の高い臨床研究を実施する上で、データ管理が重要である。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

東海大学とVanderbilt大学と共同開発を進めている RED Cap (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、本格的に運用する前段階として、外部と遮断された仮想ネットワーク上で試用し各種機能を確認した。

(倫理上の配慮)

実際の臨床研究データは個人情報と連結可能匿名化し、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

個人情報を除き匿名化された臨床情報のコピーを、REDCapシステムのデータベ

ースに入力し以下の機能を確認した。

・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、データ出力、基本的な統計解析への利用

D. 考察

今後、実際のネットワーク上でのセキュリティを確保した上で、さらに本格的な運用を検討したい。

E. 結論

REDCapは、椎間板再生臨床研究における組織、細胞の安全性確保に寄与するデータベースとして、セキュリティを確保した上で運用することが可能である。

G. 研究発表

2. 学会発表

1. データベース構築の意義と課題, 第36回日本熱傷学会総会, 6月4日
2. 教育講演・臨床研究における多変量解析の活用, 第36回日本熱傷学会総会, 6月4日
3. 招待講演・臨床研究における多変量解析の構築, 日本麻酔科学会第57回学術集会, 6月3日
4. ランチョンセミナー・臨床研究の枠組みと進め方, 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 10月15日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 22 年度厚生労働科学研究・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：ヒト骨髄未分化細胞の細胞処理研究と、その技術応用研究

研究分担者 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：

本研究室では、近年血管再生療法を確立するに当たって、骨髄由来血管内皮前駆細胞の採取・培養方法の臨床細胞処理の標準化を探究してきた。この骨髄未分化細胞の培養処理技術の髄核細胞・骨髄間葉系細胞培養への標準化技術への応用を目的として、研究代表者・分担者と定期的に研究会議を持ち、検討を続けている。

A. 研究目的

本研究室では、近年血管再生療法を確立するに当たって、骨髄由来血管内皮前駆細胞の採取・培養方法の臨床検討を探究してきた。本分担研究では、この血管内皮前駆細胞培養処理技術をヒト髄核細胞および骨髄間葉系細胞に応用し、その標準培養を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1)骨髄由来未分化細胞の細胞培養技術の確立
血管内皮前駆細胞の培養方法確立をプロトコール化し、それに準じた培養法の確立を目指した。
EPC 増幅培養では、血清を用いず stem span(STEMCELL Technologies, Inc.)に human recombinant TPO 20ng/ml、human recombinant Flt-3 ligand 100ng/ml、human recombinant SCF 100ng/ml、human recombinant VEGF 50ng/ml、human recombinant IL-6 20ng/ml を添加し EPC

増幅培養液を作成して調整し、未分化 EPC (CD133+細胞)を懸濁した。7日間培養し、回収後は新たに開発された EPC コロニーアッセイを施行し、EPC 増幅能を評価した。

C. 研究結果

この培養法の確立により、EPC が未分化なまま、そのコロニー産生能を高めた状態で増幅することが判明し、複数検体における増幅再現性も高いことが確認された。

この細胞培養での高い増幅能力は、血清を含まず分化を進めないような培養処理（たとえば非接着性培養・抗酸化作用因子添加）に起因するもので、髄核細胞・骨髄間葉系細胞の臨床培養の確立にも重要なファクターとなることが考えられた。

D. 考察

細胞移植のソースとして種々の幹細胞が使用される一方でその差異は必ずしも明らかでない。本分担研究では、骨髄由来血管内皮前駆細胞の内容法確立と、そのプロトコール化を進め、本研究課題でのこの培養プロトコールの応用を検討してきた。培養の確立において、最も重要な事項として、培養効果の科学的な評価方法の確立があげられた。EPC培養の開発では、コロニーアッセイが完成して、この評価法によって培養の開発が可能になった。本プロジェクトでも、髄核細胞・骨髄間葉系細胞の適切な評価法が、培養開発の鍵になると示唆された。これらの、研究・検討は定期的な研究代表者・分担者による会合によって進められた。

E. 結論

ヒト髄核細胞・骨髄間葉系細胞の採取・培養開発・標準化には、評価法の検討が必須で、研究室でその支援研究が進行している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa S, Ochi M, Asahara T. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells*. 2010 Feb;28(2):365-75.
- 2.Matsumoto T, Ii M, Nishimura H, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Fukui T, Kawakami Y, Kuroda T, Kwon SM, Iwasaki H, Horii

M, Yokoyama A, Oyamada A, Lee SY, Hayashi S, Kurosaka M, Takaki S, Asahara T. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2207-23. Epub 2010 Sep 20.

3.Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kawakami Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, Shoji T, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Ono T, Koibuchi Y, Kawamata S, Fukushima M, Kurosaka M, Asahara T. Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34+ cells in a patient with tibial nonunion: A case report. *Cell Transplant*. 2010 Dec 22. [Epub ahead of print]

4.Ii M, Horii M, Yokoyama A, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Asahi M, Asahara T. Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest*. 2010 Dec 6. [Epub ahead of print]

5.Alev C, Ii M, Asahara T. Endothelial Progenitor Cells: A "novel" tool for the therapy of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jan 22. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1.Asahara T, Vascular regeneration for organogenesis. *Centro Nacional de Investigaciones Cardio vasculares*, 2010

2.Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *International Society Blood Transfusion*, 2010

3. Asahara T. Stem cell therapy in peripheral artery disease (PAD). *6th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis*, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 特願 2005-047816 [2005/02/23] : 「血管内皮前駆細胞の生体外増幅方法」
2. 特願 2005-047422 [2005/02/23] : 「血管内皮前駆細胞分化動態解析方法」
3. 特願 2005-052944 [2005/02/28] : 「成体幹細胞の体外増幅方法」
4. 特願 2007-224782 [2007/08/30] : 「細胞運命の解析方法」
5. 特願 2007-204732 : 「ヒト末梢血由来 CD133/CD34 陽性細胞移植による筋損傷の修復」
6. 特願 11/711,898 : 「AC133 陽性細胞移植による神経再生治療 Neural regeneration with transplanted AC133 positive cells」
7. 特願 PCT/JP2006/321598 : 「METHOD OF FRACTURE HEALING」

2. 実用新案登録 特記なし。

3. その他 特記なし。

I. 研究協力者

増田治史 東海大学医学部 再生医療科学准教授