

201106003A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 持田 讓治

平成24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	活性化髓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	-----	13
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	-----	15
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	-----	18
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	-----	20
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	-----	21
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、腸骨骨髄から導出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2011年9月までに10症例で終了した。最短6カ月最長3年までの経過観察が行われ、有害事象は一切認められなかった。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、ウイルス、マイコプラズマ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

本研究は、腰椎椎間板の変性抑制、あるいは再生のために実施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が目的である。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、その固定椎間の隣接椎間板（頭側あるいは尾側）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、その細胞活性化の全工程における、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Pfirrmann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2011年度までに実施された10例（2009年度7例、2010年度2例、2011年度1例）は男性9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、また、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行った。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 1.0×10^6 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：10症例における摘出した椎間板から得られた採取髄核組織量は $3.6 \sim 11.9$ g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 90.6~99.0%、細胞数増加率は 2.80~6.29 倍であった。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室も別途設置した。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10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10例が経過、以下同様の表示)、3カ月時(10例)、6カ月時(10例)、1年時(9例)、2年時(7例)、3年時(4例)の

経過観察では、10例の全身所見、当該移植術施行の腰椎部所見ともに、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認められず、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、10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。すなわち、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。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Pfarrmann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、Pfarrmann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

察時のデータの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つの役割を持ち、腰椎はその中でも体幹の土台的役割が大きい。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を引き起こす。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) 成長因子、サイトカインの注入、2) 遺伝子導入治療、3) 細胞移植療法、4) 組織工学的手法、などがあげられるが、安全性の考慮、軽度の椎間板変性に対する過剰な治療を行わない点や、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。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10症例は、移植術後最短6カ月最長3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、3年までの経過観察では当該患者の全身所見、移植術実施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。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2.80~6.29倍であり、また、細胞生存率は90.6~99.0%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が、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、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10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なく、細胞環境を改善させ、組織再生の方向に向かう可能性も期待された。

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3年までの経過観察では画像上、臨床とともに有効である。

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. Arai F, Hiyama A, Sakai D, Yokoyama K, Mochida J. The expression and role of non-canonical (PKC) signaling in nucleus pulposus cell metabolism. *J Orthop Res.* 2012 Mar 2. doi: 10.1002/jor.22095.

2. Sakai D. Stem cell regeneration of the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am.* 2011; 42: 555-562.

3. Hiyama A, Sakai D, Arai F, Nakajima D, Yokoyama K, Mochida J. Effects of a glycogen synthase kinase 3 β inhibitor (LiCl) on c-myc protein in intervertebral disc cells. *J Cell Biochem.* 2011; 112:2974-2986

4. Hiyama A, Skubutyte R, Markova D, Anderson DG, Yadla S, Sakai D, Mochida J, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV. Hypoxia activates the notch signaling pathway in cells of the intervertebral disc: implications in degenerative disc disease. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 1355-1364.

5. 持田譲治. 特集 幹細胞治療 臨床応用の進歩 椎間板再生. *日本臨床* 2011 ; 69 : 2220-2224

6. 持田譲治. 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

7. 酒井大輔, 持田譲治.【運動器傷害における治療の新しい試み】脊椎 変性椎間板に対する治療の試み 変性椎間板に対する細胞移植療法. *整形外科* 2011; 62:744-748

2. 学会発表

1. 新井文征, 檜山明彦, 横山勝也, 酒井大輔, 持田譲治. 椎間板細胞における Wnt シグナルの役割 PKC signal の解析から. *日本整形外科学会雑誌* 85(8), S1243.2011.08

2. 酒井大輔, 中井知子, 持田譲治. 運動器の再生 椎間板再生 幹細胞生物学からのアプローチ. *日本整形外科学会雑誌* 85(8),

S1183.2011.08

3. 中島大輔, 酒井大輔, 田中真弘, 持田讓治. マウス椎間板脊索由来髄核細胞における培養環境の評価. 日本整形外科学会雑誌 85(8),

S1154.2011.08

4. 田中真弘, 酒井大輔, 檜山明彦, 新井文征, 中島大輔, 中井知子, 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2報).

日本整形外科学会雑誌 85(8), S1072.2011.08

5. Hiyama A, Sakai D, Arai F, Yokoyama K, Mochida J. Effects of a glycogen synthase Kinase 3 β inhibitors (LiCl) on Wnt signaling pathway induced c-myc protein in intervertebral disc cells.

ISSLS Annual Meeting, 2011.06.

6. 田中真弘, 酒井大輔, 中井知子, 新井文征, 中島大輔, 持田讓治. マウスの椎間板変性初期に髄核内に出現する軟骨様細胞の起源に関する基礎的研究. *Journal of Spine Research* 2(3) 695.2011.03.

7. 新井文征, 檜山明彦, 酒井大輔, 持田讓治. 椎間板細胞における Wnt シグナルの役割 PKC pathway(non-canonical pathway)の解析から. *Journal of Spine Research* 2(3) 650.2011.03.

8. Sakai D. Identification and characterization of stem/progenitor population from nucleus pulposus of the intervertebral disc. Invited lecturer. Gordon Research Conference on cartilage biology and pathology. Ventura, CA 2011.03.

9. 持田讓治, 酒井大輔. 椎間板再生のための細胞移植療法 臨床研究の進捗. 日本整形外科学会雑誌 85(3) S300.2011.3.

10. Hiyama A, Arai F, Sakai D, Mochida J.

Wnt/ β -catenin signaling and its downstream target c-myc regulate cell proliferation in the intervertebral disc cell. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.01.

11. Arai F, Hiyama A, Sakai D, Mochida J.

Non-canonical Wnt signaling (PKC pathway) regulates intervertebral disc cells. Presented at Orthopaedic Research Society, Long Beach 2011.01.

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

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
分担研究報告書

「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」

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、23年度に10例目の臨床研究を実施し、当初の目標を完了することができた。

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。

今年度は、平成23年4月～23年9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1例において、椎間板髄核と骨髄の採取を行い、プロトコルに沿って自己髄核細胞の体外培養を行った。

<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8.3g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 1.43×10^6 個であった。

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83.8%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 1.77×10^6 個であった。

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93.09%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1.77であった。

7. 培養5日目骨髄間葉系細胞数

培養5日目の骨髄間葉系細胞数は 1.04×10^5 個であった。

8. 培養8日目髄核細胞数

培養8日目の髄核細胞数は 2.80×10^6 個であった。

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96.4%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2.80倍であった。

1.1. 保存細胞数

後日の検討用に冷凍保存された細胞数は 2.13×10^6 個であった。

1.2. 投与細胞数

1.0×10^6 個の培養髄核細胞が投与された。

D. 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。

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. Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, Horii M, Ishihara T, Isobe K, Isozaki M, Itoh J, Itoh Y, Okada Y, McIntyre BA, Kato S, Asahara T. Methodological development of a clonogenic assay to determine progenitor cell potential. *Circ Res.* 2011 Jun 24;109(1):20-37.
2. Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, 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.* 2011 Jul;46(7):1023-5.
3. 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.* 2011 Aug;46(8):1148-50.
4. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Brit J Haematol.* 2011 Aug; 154(3):363-72.
5. Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J,

Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan: The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Dec; 17(12):1814-21.

6. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011 Sep 15; 118(11):2941-50.
7. Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Koderia Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood.* 2011 Sep 15;118(11):3186-90..
8. Kawaguchi AT, Aokawa J, Yamada Y, Yoshida F, Kato S, Kametani Y. Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Antigen-Presenting Cells in Mice. *Artif Organs.* 2011 Jul 25. doi: 10.1111/j.1525-1594.
9. Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone Marrow Transplantation of Unwashed Cord Blood Using Reduced-Intensity Conditioning Treatment: A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Aug 23. [Epub ahead of print]
10. Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Koderia Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
11. Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y,

- Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Oct 28. doi: 10.1002/pbc.23384. [Epub ahead of print]
12. Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S. High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec 23. [Epub ahead of print]
13. Kanda J, Hishizawa M, 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. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
14. Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S, Shiraishi K, Minemura T, Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jan 14 [Epub ahead of print]
15. Matsumura T, Kami M, Yamaguchi T, Yuji K, Kusumi E, Taniguchi S, Takahashi S, Okada M, Sakamaki H, Azuma H, Takanashi M, Kodo H, Kai S, Inoue-Nagamura T, Kato K, Kato S. Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. *Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. Leukemia*. 2012 Jan 17. doi: 10.1038/leu.2012.11. [Epub ahead of print]
16. Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant*. 2012 Mar 8. doi: 10.1111/j.1399-3046.2012.01669.x. [Epub ahead of print]
2. 著書
1. 加藤俊一. 造血細胞移植. 衛藤義勝編: ライソゾーム病. 診断と治療社、東京、pp93-99, 2011.
2. 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). 折居忠夫編: ムコ多糖症 UPDATE. イーエヌメディアックス、東京、p p 212-218, 2011.
3. 学会発表
1. 加藤俊一. 造血幹細胞移植の現状と展望. 第28回日本医学会総会. 東京. 2011.4.
2. Kato S, et al. High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma (RICH) in long-term survivors who underwent blood and marrow transplantation (BMT) in childhood. *ESLCCC2011, Amsterdam, Sept, 2011.*
3. Kato S, et al. Early and quantitative assay to detect HHV-6 viremia and evaluation of cellular response specific against HHV-6 after hematopoietic stem cell transplantation. *The Joint Meeting of The XVIIth International Symposium on Gnotobiology and The XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Yokohama, Nov, 2011.*
- 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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

「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」

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) を外部と遮断された仮想ネットワーク上で臨床研究コーディネータに試用させて各種機能の確認し、本格的な運用に備えてセキュリティ管理についても検討した。

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 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、外れ値のチェックを含めたデータクリーナ機能、SAS・R・STATA・SPSS といった主要な統計ソフトパッケージ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、外部と遮断された仮想ネットワーク上で臨床研究コーディネータに試用させて各種機能の確認し、本格的な運用に備えてセキュリティ管理についても検討した。

(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

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実際に臨床研究のコーディネータに携わっている CRC に試用させて、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、外れ値のチェックを含めたデータクリーナ機

能、データ出力、基本的な統計解析への利用。

- ・ データベースのアクセス制限では、ログイン時のユーザー名とパスワードでの制限はもちろん、ユーザーごとに権限の設定、各機能の使用や、データの入力閲覧に制限が掛けられることを確認。
- ・ 生年月日や受診年月日など個人情報が含まれている場合には、ユーザーによって、個人情報をダウンロードできないといった設定も可能であることを確認。

D. 考察

今後、本格的な運用におけるセキュリティ管理では、ソフトウェアのセキュリティに加えて、ファイアウォールやバックアップといった、サーバーに対するセキュリティも重要である。

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、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

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

「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」

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： 開発したヒト末梢血、骨髄、臍帯血に含まれる純化血管幹細胞の生体外無血清分化増幅培養法を基盤にして、非純化血管幹細胞（単核球）生体外無血清分化増幅培養を行い、純化血管幹細胞と比較して非純化血管幹細胞の血管再生能の増強作用を確認した。これは、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への技術的基盤概念を提供する。

A. 研究目的

事前に開発した純化血管幹細胞、非純化細胞（単核球）の生体外増幅培養法による細胞活性化の比較を行い、共培養髄核細胞活性化における無血清培養化への技術的基盤概念の確立を目指す。

B. 方法及びC. 結果

末梢血単核球を採取し、抗体磁気ビーズ法により、純化血管幹細胞（CD34 陽性細胞）、及び非純化血管幹細胞（単核球）を増殖因子添加無血清培養（StemLine II 培地、VEGF, IL-6, SCF, TPO, Flt-3 ligand）を用いて7日間培養を行うと、純化血管幹細胞では4倍、単核球では0.3倍程度に細胞数が減少した。しかしながら、血管幹細胞の分化動態解析法（コロニー形成アッセイ）による検討の結果、純化血管幹細胞、培養前非純化血管幹細胞（単核球）と比較して培養後単核球のコロニー形成能が20～30倍に上昇している。in vivo 虚血モデルへの移植実験による血管再生能の血流評価では、培養前単核球と比較して、有意に培養後単核球の血流改善効果、虚血下肢組織機能改善効果が認められた。

D. 考察およびE. 結論

当該研究では、基礎的動物モデル研究で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須である。非純化血管幹細胞（単核球）の生体外増幅培養法における無血清培養基礎技術の基盤確立によって、当該研究の培養系隔離に関して一

定の成果を出したものとする。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda H, Shizuno T, Asahara T. Development of Serum-Free Quality and Quantity Control Culture of Colony Forming Endothelial Progenitor Cell Expansion for Vasculogenesis. Stem Cells Translational Medicine. 2012 in press.
2. Masuda H, Kato S, Asahara T. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. Circ Res. 2011;109(1):20-37.
3. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. Stem Cells. 2011;29(11):1650-1655.
4. 浅原孝之（編者）、再生医療シリーズ、血管再生治療、診断と治療社、2012、1.11

2. 学会発表

主要講演

1. 浅原孝之. Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. 3rd International Collaborative Symposium on Stem Cell Research (ソウル). 2011.4.29～30
2. 浅原孝之. Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. Lisbon-Summer meeting (リスボン) 2011.7.1～3
3. 浅原孝之. 糖尿病疾患における血管再生治療. 第43回日本動脈硬化学会総会（札幌）2011.7.15～16
4. 浅原孝之. 血管医学研究の最前線. 第75回日本循環器学会総会 夏期セミナー AM Fプレセミナー7. 2011.8.2

5. 浅原孝之. Endothelial Progenitor Cells for Medicine. American Heart Association Scientific Sessions. 2011.11.16

6. 浅原孝之. 血管医学の幹細胞基盤研究. 第 19 回日本血管生物医学会 The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting. 2011.12.10

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）
分担研究報告書

「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」

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：本年度までに臨床応用された 10 例の活性化髄核細胞の安全性を評価するために、最終産物の感染症検査（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。本年度は症例 10, 11 の安全性検査を行った。症例 10 は東日

本大震災後の電力事情から、投与に至らなかった。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) Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Yabe T, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y. Single Nucleotide Polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched Haematopoietic Stem Cell Transplantation: An exploration study. Blood, in press, 2012
- 2) Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Iwato K, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Hashino S, Ninomiya H, Mori S, Yonemura Y, Usuki K, Wei H, Lizambri R. An Open-Label Extension Study Evaluating the

Safety and Efficacy of up to 3.5 years of Romiplostim in Thrombocytopenic Japanese Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) Int J Hematol, in press, 2012

3) Matsushita H, Nakamura N, Tanaka Y, Ohgiya D, Tanaka Y, Damdinsuren A, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. Clinical and pathological features of B-cell non-Hodgkin lymphomas lacking surface expression of immunoglobulin light chains. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, in press, 2012

4) Ogura M, Hatake K, Ando K, Tobinai K, Tokushige K, Ono C, Ishibashi T, Vandendries E. Phase I Study of Anti-CD22 Immunoconjugate Inotuzumab Ozogamicin Plus Rituximab in Relapsed/Refractory B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. Cancer Science, in press, 2012

5) Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor. Blood, in press, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし