

201106003B

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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 持田 讓治

平成24年5月

## はじめに

本総合研究報告書は、平成 21 年度から 23 年度に、厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)で実施された「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」に関する研究成果をまとめたものである。

従来、個体誕生後には椎間板髄核組織、細胞は不要なものと考えられていた。東海大学医学部整形外科学の椎間板研究グループではこの考え方に疑問を持ち、臨床的な研究データを参考としながら 1994 年から基礎的研究を開始した。小型、中型、大型の実験動物を用いた *in vitro* 並びに *in vivo* の研究で、髄核細胞が椎間板全体の代謝制御や変性進行の抑制に重要な働きを持つことが判明した。また、同一個体の骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養によって髄核細胞が著しく活性化されることも示された。この結果を受けて、手術中に摘出したヒト椎間板組織を用いた研究が実施された。ヒト椎間板髄核細胞が実験動物と同様に、同一患者から採取分離された骨髄間葉系幹細胞によって著しく活性化されること、またその際に活性化された細胞の腫瘍化や染色体異常などが一切起こらないことも示された。

この結果を受けて、平成 19 年 3 月に東海大学医の倫理委員会の承認を受けた後、「厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従って、同省の審査委員会に臨床研究の実施に関する申請書を平成 19 年 4 月に提出した。多岐にわたるご審査、ご教示をいただき、平成 20 年 1 月に厚生労働大臣よりその臨床研究の実施に関する承認を得ることができた。その後 1 年間をかけてこの臨床研究実施のための準備を整え、平成 21 年 2 月に第 1 例目の患者に活性化髄核細胞移植術を実施した。平成 23 年 9 月に、予定された 10 症例への移植術が終了し、現在全症例の経過を観察中である。

本厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)はその臨床研究が実施された 3 年間に供与されたものであり、この臨床研究ならびに付随する基礎研究が実施できた大きな源であり、採択頂き、研究費の供与を頂いたことにあらためて深謝したい。また、本臨床研究ではこの新しい細胞移植療法の安全性をまず確認することが大きな目標であり、その目的のために多くの分担研究者、研究協力者の皆様方、ならびに東海大学伊勢原研究支援課の皆様方から大きな英知を頂いたことに深謝したい。

医学は実学の学問である。従って、医学部や大学院医学研究科で実施される研究は、臨床現場に還元できることを常に念頭に置いた研究計画の実施でなくてはならない。本臨床研究が、整形外科学の研究グループを主軸として、基礎研究、橋渡し研究を経て 15 年目に臨床研究の実施に至ったことは、大きな喜びである。

平成 24 年 5 月

東海大学医学部外科学系整形外科学  
教授 持田讓治

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 教授	整形外科	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.	総合研究報告		
	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
	資料：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	-----	23
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	-----	28
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	-----	30
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	-----	32
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	-----	36
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	-----	38
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	-----	39
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	49

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
総合研究報告書

「自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髓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：

腰椎椎間板ヘルニア、分離症、椎間板症の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髓核細胞の、中等度変性隣接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。活性化された髓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髓核細胞の活性化は、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椎間板髓核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23年度の3年間実施された。

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髓核

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、厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の審査委員会の承認事項に基づいた本プロジェクトの基準に従った。20～29歳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組織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

1.0X10<sup>6</sup>個を基準として移植した。

（図1、2、3、4、5参照）

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(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。

対象患者へのインフォームドコンセントは、外来診察時の本臨床研究決定時、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、その度に、説明と質疑を行い、同意を得た。

## 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3.6～11.9gであった。分散後の髄核細胞数は0.71X10<sup>6</sup>～3.42X10<sup>6</sup>個、4日間の単培養を終了

した共培養前の髓核細胞数は  $1.25 \times 10^6 \sim 4.88 \times 10^6$  個 (図 6 参照)、骨髄間葉系幹細胞は  $1.15 \times 10^6 \sim 4.88 \times 10^6$  個であった (図 7 参照)。3 日間の共培養終了時の髓核細胞数は  $2.48 \times 10^6 \sim 11.8 \times 10^6$  個であり (図 8 参照)、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。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* の研究結果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髓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：髓核細胞、骨髄間葉系幹細胞の受け入れ時、工程管理時(単培養終了時)、最終製品時(共培養終了時)の髓核細胞の無菌試験(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 室も新たに設置した。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(表 1 参照)。

3) 活性化髓核細胞の腫瘍化否定のための新しい方法の開発：活性化髓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 例の活性化髓核細胞を移植し、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  $5 \times 10^5$  個/頭の皮下移植で 6 週間で腫瘍が確認されるために、活性化髓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(図

9 参照)。

4) 活性化髓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：活性化髓核細胞移植時、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、全症例の全身所見、移植術施行の当該腰椎部局所見ともに、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、活性化髓核細胞移植術との関係が考えられる異常データは一切見られず、活性化髓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。今回の活性化髓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髓核細胞移植術の影響を判定する条件が全例で整った。活性化髓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、活性化髓核細胞移植術直前の画像と比較して、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、椎間高の 1/3 以上の狭小化は一切認められていない。MRI 上、術前の変性度(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、活性化髓核細胞移植後 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、今後移植後 3 年時までの経時的な観察による再現性検討が必要である。MRI 画像をより定量化する試みとして、T2 値測定、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。全例で 3 年間の全観察時のデータの経時的検討を行う予定である。

尚、この 10 例以外に、同意が得られて髄核細胞の体外培養が行われたものの、東日本大震災後の計画的停電の影響により培養期間中に短時間ながら停電があった 1 症例では、患者への細胞移植は実施しなかった。

#### 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。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す。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。

一方、椎間板変性は非可逆的過程であるとされ、変性が始まると坂道を下るようにその進行は加速するという意見も多い。椎間板組織、特にその中心に位置する髄核組織や線維輪内層部では血行がなく、体重の負荷が大きく、また関節として動きの大きな腰椎部、とりわけ腰椎下部の椎間板ではその変性進行が著明となること

が多い。従来、椎間板髄核組織は胎生期の遺物であり、脊椎の発生が終わった段階以降は機能しない組織と言われて来た。この定説に疑問を持った東海大学整形外科学の椎間板研究グループは、臨床的な研究をもとに「椎間板髄核は個体誕生後も一定の機能を担っている」という仮説をたて、1994 年以来基礎研究を継続してきた。小型、中型、大型の実験動物を用いた *in vitro* 並びに *in vivo* の研究で、髄核細胞が椎間板全体の代謝制御や変性進行の抑制に重要な働きを持つことが判明した。

過去 20 年間に国内外で実施された椎間板変性抑制、再生の研究として、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と考えられた。このため、細胞移植療法に研究の主眼を置き、元々椎間板内にある髄核細胞を細胞ソースとして用いることが最も安全性が高いと判断した。さらに細胞学的に見て活性の弱い髄核細胞を移植ソースとして用いるために、同一個体の骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養によって髄核細胞が著しく活性化されることも示し、髄核細胞を用いた細胞移植療法を臨床上現実的な方法と考える基礎的データを集積し続けてきた。

すなわち、本研究では、骨髄間葉系幹細胞の持つ feeding cell としての役割に特に注目し、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、移植術を行った腰椎局所部分ともに有害事象は一切見られていない。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、すべて陰性であった。以上より本学 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 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 カ月を要していた。このため、より短期間での腫瘍化否定が望まれ、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 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 上の改善傾向が見られている。

以上の研究結果から、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 日間で活性化された自己椎間板髄核細胞の変性椎間板への移植術は、細胞の活性化工程及び術後経過の検討から、安全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

欧文

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 $\beta$  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. Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, Arai F, Nakajima D, Abe K, Mochida J. The relationship between the Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ /BMP signals in the intervertebral disc cell. *J Cell Physiol.* 2010; 226: 1139-1148.
6. 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.
7. Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, Tanaka M, Arai F, Abe K, Mochida J. Enhanced intervertebral disc cells senescence by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-induced matrix metalloproteinase expression. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:3036-3047.
8. 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.
9. 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.
10. 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.* 2010;18: 416-423.
11. 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.
12. 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 anulus fibrosus. *Spine.* 2009; 34: 1448-1456.

13. 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.

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

#### 著書

15. Sakai D, Mochida J. Cells and Biomaterials for Intervertebral Disc Regeneration. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering.* Morgan and Claypool Publishers. 2010; 1-104.

16. Sakai D, Gantenbein-Ritter B. Chapter 210. Biomaterials for intervertebral disc regeneration. *Comprehensive Biomaterials.* Elsevier Science. 2011; 210-225.

#### 和文

17. 持田讓治. 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

18. 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

19. 酒井大輔, 持田讓治. 【運動器傷害における治療法の新しい試み】 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

20. 酒井大輔, 持田讓治. 【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】 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. *治療学* 2010;44:757-761.

21. 酒井大輔. ヒト髓核細胞を用いた人工髓核組織構築の試み. *Journal of Spine Research* 2010;2:191-192.

22. 持田讓治. 自家骨髓間葉系幹細胞により活性化された椎間板髓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.

23. 酒井大輔, 持田讓治. 【腰痛疾患に対する interventional therapy 現在から未来へ】 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.

#### 2. 学会発表

1. 新井文征, 檜山明彦, 横山勝也, 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 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, 持田讓治. 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髓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. 活性化髓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 $\beta$  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, Sakai D, Arai F, Mochida J. Wnt/ $\beta$ catenin signaling and its downstream target c-myc regulate cell proliferation in the intervertebral disc cell. Presented at Orthopaedic Research Society, Long Beach 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.
12. Sakai D. Biological treatment: future beyond cell transplantation. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Kyoto. 2010.
13. Sakai D. Stem Cell therapy for disc repair. 16th Triennial Congress of the Asia Pacific Orthopaedic Association, Taipei, 2010.
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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  $\beta$  - 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
18. 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

19. 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
20. 檜山明彦、酒井大輔、持田讓治、Risbud M. TGF- $\beta$ /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
21. 田中真弘、酒井大輔、中井知子、新井文征、持田讓治. 軟骨異栄養犬種髓核細胞の TGF  $\beta$  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
22. 酒井大輔、持田讓治. 軟骨再生の基礎と臨床の進歩(椎間板を含む) 椎間板再生 細胞移植療法その先に. 日本整形外科学会雑誌 84(3), S55. 2010.
23. 檜山明彦、酒井大輔、阿部幸一郎、谷河麻耶、持田讓治. 椎間板細胞の発生分化における Wnt-betacatenin と BMP-Smad シグナルの制御機構の解析. *Journal of Spine Research* 1(3)401. 2010.03
24. 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/ $\beta$ -catenin シグナルは MMP の活性化を引き起こす. *Journal of Spine Research* 1(3)400. 2010.03
25. 田中真弘、酒井大輔、中井知子、新井文征、持田讓治. 軟骨異栄養犬種髓核細胞の TGF  $\beta$  刺激による増殖促進と基質合成制御は cMyc を介する日本整形外科学会雑誌 84(8), S1251.2010.08
26. 持田讓治、酒井大輔、山本至宏. 幹細胞治療最前線 骨髄間葉系幹細胞により活性化された髓核細胞を用いた椎間板再生医療. 日本バイオマテリアル学会大会予稿集(31),51.2009.11
27. 酒井大輔、持田讓治. 細胞レベルからの椎間板再生 細胞移植療法その先に. 日本腰痛学会雑誌 15(1),192.2009.10
28. 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
29. 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
30. 田村太、酒井大輔、芹ヶ野健司、中井知子、持田讓治. 髓核細胞における 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
31. 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
32. 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
33. 檜山明彦、酒井大輔、持田讓治、RisbudMakarand V. 椎間板細胞における硫酸化グルコサミノグリカン代謝に及ぼす Ca シグナルの影響. 日本整形外科学会雑誌 83(8)S1278. 2009.08

34. 田村太, 酒井大輔, 芹ヶ野健司, 中井知子, 持田讓治. ヒト椎間板研究モデルとしての軟骨異栄養犬種の有用性 同一個体内での脊索性髄核細胞と軟骨性髄核細胞の相違. 日本整形外科学会雑誌 83(8), S1277. 2009.08

35. 田村太, 酒井大輔, 芹ヶ野健司, 持田讓治. ヒト椎間板研究モデルとしての軟骨異栄養犬種の有用性 同一個体内での脊索性髄核細胞と軟骨性髄核細胞の相違. 移植 44(1), 139. 2009.02

36. Sakai D. Translational research in developing innovations in spinal surgery: application of stem cell biology to clinical trials. The 5th International Symposium of Chosun University Hospital 2009, Gwanju, Korea, 2009.

37. Sakai D. Biological treatments: cells—how do they work? Global Spine Conference, San Francisco, 2009.

38. Sakai D. Stem cell therapy in disc: What happens to transplanted disc cells? The 24th Annual Meeting of the North American Spine Society, San Francisco. 2009.

39. 檜山明彦, 酒井大輔, 持田讓治, Risbud Makarand V. 椎間板細胞における硫酸化グリコサミノグリカン代謝に及ぼす Ca シグナルの影響. 第 82 回日本整形外科学会学術総会 2009.5 福岡

#### 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

図 1

活性化椎間板髓核細胞移植術の 7 日間の工程

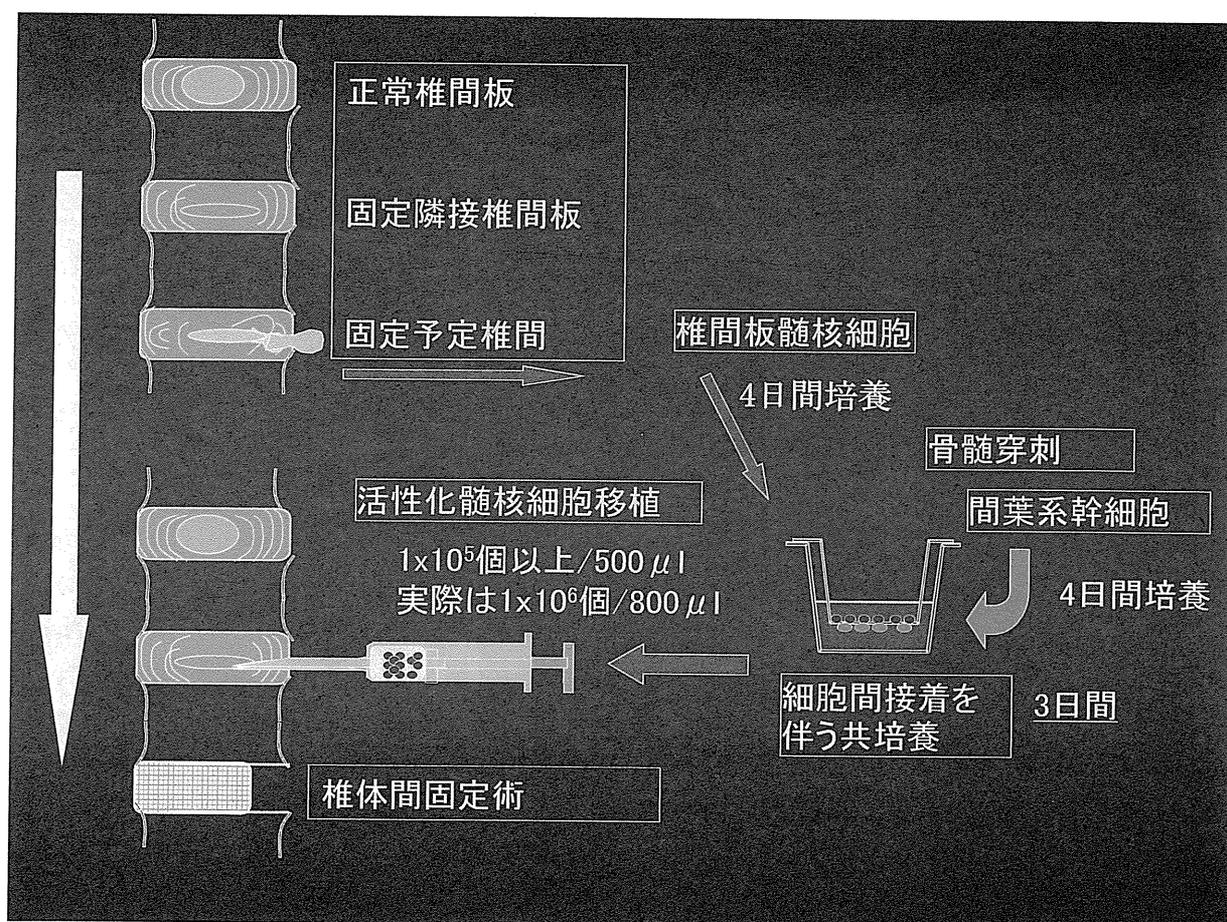
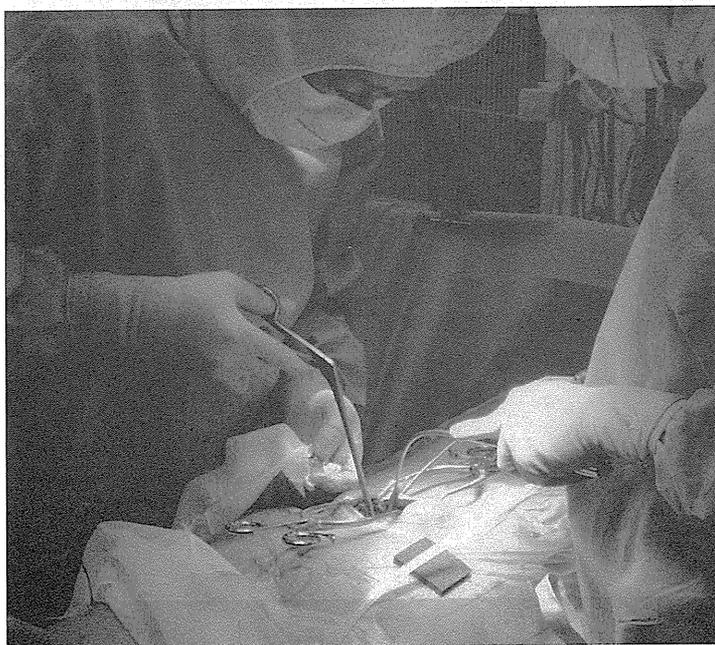


図 2

第 1 回目手術 椎間板摘出+椎間固定術の施行

共培養に用いる幹細胞を得るために、腸骨から骨髓液を採取する

## 第1回目手術



椎間板摘出+固定術



骨髓液採取

図3

第1回目手術で得られた椎間板髓核組織、幹細胞導出用の骨髓液  
ならびに細胞培養に用いる末梢血



図 4

培養が終了し、cell processing center から手術室に搬送された  
活性化椎間板髄核細胞の入ったキット

### 移植直前の活性化髄核細胞キット

