

201106013A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業  
課題番号 (H23-再生-一般-002)

自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成24(2012)年 5月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究	-----	1
各務秀明		
II. 分担研究報告		
1. 臨床研究（患者全身管理）の実施と骨髄液採取に関する検討	-----	12
東條有伸		
2. 骨髄間質細胞のセルプロセッシング体制の整備と品質管理、自己血清の調製	---	19
長村登紀子		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31



厚生科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究

研究代表者 各務 秀明 東京大学医科学研究所 特任准教授

研究要旨

本事業では、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出し、薬事法下での実用化を目指した第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施する。特に先行する臨床研究によって得られた課題について検討し、実用化に向けて改良された細胞調製法による歯槽骨再生の効果を、先行する臨床試験の結果と比較する。平成 23 年 4 月学内における最終承認後、平成 23 年 6 月より被験者のリクルートを開始した。これまでに 25 名の参加希望者に対し口腔状態、歯槽骨の残存骨量、および全身状態などの評価を行い、選択基準と除外基準に鑑み、8 名が候補として選択された。症例検討会にて内 5 名の検討が行われ、4 名は承認、1 名は条件付き承認となった。3 例は平成 24 年度に症例検討の予定である。平成 23 年度中には 1 例、現在までに 3 例の被験者へ細胞移植が行われ、これまで有害事象は見られていない。

分担研究者

長村登紀子 東京大学医科学研究所  
輸血・細胞治療学 講師  
東條 有伸 東京大学医科学研究所  
血液内科学 教授

103,000 人と推定されている。歯科領域での骨欠損は小さく形態が複雑であるために、複雑な形態の骨欠損に適合する顆粒状などの担体を用いる必要がある。しかしながら、顆粒状の担体と細胞の組み合わせによる骨再生の条件については十分に最適化されておらず、また先行臨床研究で問題となった細胞の個体差の影響を解決する方法についても知られていない。

A. 研究目的

自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出し、薬事法下での実用化を目指した第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施する。特に先行する臨床研究によって得られた課題について検討し、実用化に向けて改良された細胞調製法による歯槽骨再生の効果を先行する臨床試験の結果と比較する。

近年歯科用インプラントは長期的に安定した予後が得られるようになり、普及しつつある。しかしながら、実際にインプラントを必要とする患者では、骨量が不足する患者が大半である。2010 年に歯槽骨の再生が必要となる患者は、国内だけでも年間

これまで行ってきた歯槽骨再生の臨床研究の結果からは一定の有効性が示されたものの、細胞には個体差が大きく、安定した骨再生の障害となる可能性も明らかとなった。自己細胞を用いた歯槽骨再生治療は、自家骨移植と比べ遥かに低侵襲ではあるが、自家骨移植と同等の有効性、効果の安定性が期待できなければ、医療としての定着は難しい。

われわれは、骨再生効果の不安定性解消のため、ヒト骨髄間質細胞の個体差とその解消法について検討を行った。その結果、

細胞培養条件、顆粒状担体への播種方法、分化誘導法の最適化を行うことで、個体差や年齢に影響を受けにくい骨再生が可能であることを見出した。さらに、骨再生を予測するための複数の指標を明らかにし、その結果を品質管理に導入した。

細胞を用いた骨再生治療法の効果は、骨の再生量が多いほど細胞の個体差の影響を受けやすいことが示唆されている (Meijer et al., 2008)。本臨床研究の対象症例は重度歯槽骨萎縮症であるため、われわれが新たに開発した骨再生法に最適な症例であると考え。本臨床研究で新プロトコルによる歯槽骨再生治療の有効性と安全性を確認するとともに、早期に高度医療への移行を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 研究体制

本研究は、東京大学医科学研究所における臨床研究体制、TRコーディネーターを含む人員を活用して実施される。細胞培養は本研究所臨床細胞工学室で行う。臨床試験は本研究所附属病院において臨床試験監視グループの管理下で、臨床試験支援チームの支援を受けて実施される。

また、本臨床試験のために本研究所を中心に、東京医科歯科大、横浜市立大、およびインプラント専門医とのネットワークを形成しており、患者紹介を受けて実施される。

#### ①東京大学医科学研究所

##### 臨床試験実施チーム

- ・組織工学研究グループ、骨再生診療科  
骨再生臨床試験の実施

各務秀明 (研究代表者、研究総括)

縣秀樹 (プロジェクトマネージャー)

- ・細胞リソースセンター、セルプロセス  
シング

CPCの管理運営

長村登紀子 (研究分担者)

- ・血液腫瘍内科

内科的診療および骨髄穿刺

東條有伸 (研究分担者)

内丸 薫 (研究分担者)

湯地 晃一郎 (研究分担者)

大野信広 (研究分担者)

- ・手術部

手術時麻酔管理

鎮西美栄子 (研究協力者)

#### ②臨床試験監視チーム

- ・医療安全管理部

臨床試験監視、臨床試験の安全管理

長村文孝

#### ③臨床試験支援チーム

- ・TR コーディネーター

松本 和史 (研究協力者)

角野 久美子 (研究協力者)

- ・臨床検査部、TR検証室

品質管理 (無菌検査等)

小柳津直樹 (研究協力者)

- ・研究倫理支援室

臨床試験の倫理的問題への対応

武藤香織

- ・医療統計専門家

統計解析に関する助言と協力

大橋 靖雄 (研究協力者)

飯室 聡 (研究協力者)

田栗 正隆 (研究協力者)

#### ④他施設における協力者

長崎大学

培養技術の助言、手術への協力

朝日奈泉（研究協力者）

東京医科歯科大学

口腔外科的診療への協力、患者紹介

春日井昇平（研究協力者）

横浜市立大学

口腔外科的診療への協力、患者紹介

藤内祝

## 2. 研究計画

### ・全体計画

本臨床研究については平成22年9月28日に学内「ヒト幹細胞臨床研究審査委員会」にて承認を受け、平成22年10月1日に厚生労働省へ申請が行われている。事業申請時には厚生労働省の委員会において審査中であり、承認が得られ次第臨床試験を開始する計画であった。

### ・臨床試験の概要

Rational：歯槽骨萎縮症患者を対象として顆粒状の担体に対して最適化された自家骨髄間質細胞の培養、分化誘導条件を用いて、移植材料（以下「培養骨」）の安全性と歯槽骨再生能を評価する。従来自家骨移植が必要とされた患者に対して、インプラントの埋入に必要な歯槽骨を再生し、最終的にはインプラント義歯による治療を可能にする。第Ⅰ相試験における主要エンドポイントは安全性、副次エンドポイントは骨生検における骨形態計測量、第Ⅱa相試験における主要エンドポイントは骨生検における骨形態計測量、副次エンドポイントは、安全性、頭部CT撮影画像から得られた骨形成量、インプラントのオッセオインテグレーション、インプラントの脱落とする。

細胞調製法：第Ⅰ相/第Ⅱa相試験

移植5週前に培養用血清のための末梢血採血及び骨髄血採取し、最適化された条件にて骨髄間質細胞の培養をする。継代の後、 $\beta$ -TCP顆粒上に細胞を播種し、翌日よりデキサメタゾン、 $\beta$ グリセロリン酸、アスコルビン酸による分化誘導を開始する。2週間分化誘導を行った後で骨欠損部に移植する。

安全性評価：本培養法による細胞の安全性については、ボランティア由来の細胞を用いた核型試験により染色体異常を起こさないこと、免疫不全動物への移植により造腫瘍性を持たないことが示されている。また、連続した3回のプロセスバリデーション試験により作業全体の無菌性を確認済みである。

対象：上顎あるいは下顎歯列に連続した2歯以上の欠損を認め、ブリッジによる補綴処置によって機能回復が望めないもの。可撤式義歯（いわゆる入れ歯）ではなくデンタルインプラントを用いた補綴処置を希望するもの。さらにデンタルインプラント埋入のための十分な骨量が存在せず、歯槽頂の幅径が5mm未満、あるいは歯槽骨高径が5mm未満で骨移植を必要とするものとする。

研究期間：登録期間は承認より3年間、追跡期間は細胞移植より2年間とする。

目標症例数：第Ⅰ相（15例）、第Ⅱa相として10例を含む25例で評価。

評価方法：

1) 安全性評価

- ・全身状態—バイタルサイン・血液検査
- ・局所状態—患部の腫脹・発赤・熱感・疼痛

2) 効果評価

- ・臨床評価（インプラント成績）
- ・画像評価：パノラマX線撮影、頭部CT（骨量解析）
- ・骨生検（移植後16週後）

（倫理面への配慮）

本臨床研究は、臨床研究に関する倫理指針、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守し、被験者の尊厳と人権を尊重し、被験者の不利益が利益を越えることがないように十分に配慮して実施される。特に、被験者に危険が及ぶことのないよう、被験者骨髄細胞の採取、骨髄間質細胞を高品質に維持するように努め、骨髄間質細胞の移植には細心の注意を払う。

また、被験者には、事前に、TRコーディネーターの同席のもとで、研究責任者又は研究分担者から、本研究の意義、目的、方法、予期される危険、いつでも同意を撤回できること等を平易な用語で説明し、自由意志に基づいて被験者となることを、文書により同意を受ける。

被験者の個人情報、個人情報管理者を置き、鍵のかかるロッカー等で厳重に保管される。

### C. 研究結果

本臨床研究については平成22年9月28日に学内「ヒト幹細胞臨床研究審査委員会」にて承認を受け、平成22年10月1日に厚生労働省へ申請が行われた。平成23年3月15日厚生労働省での承認を得た。平成23年4月に修正プロトコルに対する学内承認後、テストランを施行。細胞調製および品質管理にかかわる人材を新たに雇用し、細胞調製施設の維持管理、細胞調製、評価に関するトレーニングを実施した。

平成23年6月24日に被験者募集を開始し、これまで25名の参加希望者が来院された。口腔状態、歯槽骨の残存骨量、および全身状態など選択基準と除外基準に鑑み、8名が候補として選択された。平成23年10月の第1回症例検討会にて2例、平成23年12月の第2回症例検討会にて3例の検討を行い、内4名は承認、1名は条件付き承認となった。また、3名は今後継続して検討のうえ、第3回の症例検討委員会にて審議予定である。

平成23年度中には1例、現在までに3例の被験者へ細胞移植が行われ、これまで有害事象は見られていない。平成24年7月より移植後の骨再生について評価が開始される予定である。

また、ヒト幹細胞を用いた臨床研究においては、治療に使用された細胞、試薬等を10年間保管することが義務付けられているが、実際にはプロジェクト担当者による長期保管は困難であるため、病院として長期的に細胞や資料を管理する体制を構築した。東京大学医科学研究所附属病院内の細胞リソースセンターにヒト幹細胞を用いた臨床研究用の細胞バンク、およびサンプル保管のための部門を新設した。今後当院における臨床研究や、拠点として他施設における幹細胞治療のサポートが可能である。

#### D. 考察

##### ・新たな細胞調製法について

先行する臨床研究では、8 例中 1 例に細胞増殖不良例が認められた。本臨床研究では、増殖不良に対する対応と骨再生能の維持のために、bFGF を用いた培養を行っている。これまで平成 23 年度中の 1 例を含む 4 例について細胞培養を行い、全例において必要な細胞数を得ることが可能であった。今後症例を増やして増殖不良の有無を検証する必要があるが、今回用いた細胞培養プロトコルが有効であれば、今後骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）を用いた再生医療の標準的細胞調製法となることが期待される。また、これまで調製された細胞では感染や分化不良などの品質管理上の問題は起こっていない。

##### ・人材育成について

本臨床研究を開始するにあたり、平成 23 年度には新たに 4 名の人材を雇用し、細胞培養手技、品質管理方法、そして細胞調製施設への入室、使用方法に関する教育を行った。将来の骨再生医療の普及には、細胞培養に関する知識と経験を持った人材育成が急務であり、臨床研究を通じた教育により、今後これらの研究員が技術指導などの役割を担う人材となることが期待される。

##### ・歯槽骨再生医療のネットワーク構築について

平成 23 年度には、橋渡し拠点としてネットワーク構築を行った。ヒト幹細胞を用いた臨床研究においては、治療に使用された細胞、試薬等を 10 年間保管することが義務付けられている。東京大学医科学研究所内の細胞リソースセンター内にヒト幹細胞を用いた臨床研究用の細胞バンク、および

サンプル保管のための部門を新設した。今後当院における臨床研究用試料、あるいは他施設における臨床研究用試料についても拠点として受け入れる体制を構築した。これにより幹細胞治療の普及を側面からサポートすることが可能となる。

#### E. 結論

細胞移植による治療効果は平成 24 年度以降に評価が開始される。その結果が先行臨床研究と同等であり、骨再生効果の安定性が示されれば、今後実用化に向けた重要なステップになると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kagami H, Agata H, Sumita Y, Tojo A. Heterogeneous responses of human bone marrow stromal cells (multipotent mesenchyme stromal cells) to osteogenic induction. Ed. Hayat MA, Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 2, Springer 2011.

Kagami H, Agata H, Kato R, Matsuoka F, Tojo A. Fundamental technological developments required for increased availability of tissue engineering. Ed. Regenerative Medicine and Tissue Engineering: From Cells to Organs. Intech 2011



Kagami H, Agata H, Satake M, Narita Y. Considerations on designing scaffold for soft and hard tissue engineering. Ed. Gilson Khang. *The Handbook of Intelligent Scaffold for Regenerative Medicine* Pan Stanford Publishing 2011

Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow. *Cytotherapy*. 2012 Apr 12. [Epub ahead of print]

Kagami H., Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Int J Biochem Cell Biol* 43:286-289, 2011.

Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:6584-9, 2012

Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or

-intolerant Ph<sup>+</sup> CML or relapsed/refractory Ph<sup>+</sup> ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. *Int J Hematol*. 95:409-19, 2012

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. *Blood*. 119:3123-7, 2012

Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchimarui K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis*. 2:1-10, 2012

Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma*. 2012 Jan 31. [Epub ahead of print] PMID:22204454

Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leuk Res*. 6:128-31, 2012

Tsai HJ, Kobayashi S, Izawa K, Ishida T,

- Watanabe T, Umezawa K, Lin SF, Tojo A. Bioimaging analysis of NF- $\kappa$ B activity in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells unveils its synergistic up-regulation by TNF $\alpha$ -stimulated changes to the microenvironment. *Cancer Sci.* 102:2014-21, 2011
- Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, Watanabe M, Harnprasopwat R, Izawa K, Tojo A, Ohtomo K. Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol Imaging.* 10:377-85, 2011
- Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol.* 93:771-8, 2011
- Tsuda M, Ebihara Y, Mochizuki S, Uchimaru K, Tojo A, Tsuji K. Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome. *Brit J Haematol.* 15:130-2, 2011
- Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tojo A, Tani K, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3dimCD7low subpopulation of CD4+ T cells in acute-type adult T cell leukemia. *Cancer Sci.* 102:569-77, 2011
- Sato A, Ooi J, Takahashi S, Tsukada N, Kato S, Kawakita T, Yagyu T, Nagamura F, Iseki T, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant,* 46:257-61, 2011
- 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, Kodera Y, Kato S. Comparison of unrelated cord blood transplantation and HLA-mismatched unrelated bone marrow transplantation for adults with leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Oct 15. [Epub ahead of print]
- 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 May 25. [Epub ahead of print]
- 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; Japanese Cord Blood Bank Network.

Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br J Haematol.* 154, 363-72, 2011

Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Takano R, Nidom CA, Le MQ, Nagamura-Inoue T, Horimoto T, Yamashita N, Kawaoka Y. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *J Gen Virol.* 92,1428-34, 2011

Miki Yuzawa, Nagamura-Inoue T, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Tomoki Tamura, Atsuko Takahashi, Hideki Kodo, Satoru Yamaguchi, and Arinobu Tojo, Time from cord blood collection to processing and temperature influence the quality of mononuclear cell products isolated using a density-gradient protocol., *The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy.*(日本輸血・細胞治療学会誌), 57,139-145, 2011

Tanosaki R., Muroi K., Nagamura-Inoue T., Ishida A., Mizuta S., Maekawa T., Ito T., Kishino K., Uemura T., Takahashi AT., Ohto H. for the Cell Processing Guideline Working Group of the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JSTMCT). Guideline for processing cellular therapy products routinely used for hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy.*(日本輸血・細胞治療学会誌(報告)), 57,184-187, 2011

長村登紀子. 造血細胞の処理・操作・アッセイのためのテキスト. 造血細胞の処理・操作・アッセイのためのテキスト., 2012

長村登紀子.尾上和夫 コロニー培養とコロニー形成細胞の測定. 造血細胞の処理・操作・アッセイのためのテキスト.2012 (確認中)

## 2. 学会発表

各務秀明 「実用化を目指した新たな歯槽骨再生臨床研究の開始について」 第10回松本ボーンフォーラム、2011年5月28日、松本

Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *The Second Chinese National Conference on Oral Maxillofacial Development and Regeneration* July 28-31, 2011 in Wuyishan city, Fujian Province, China

各務秀明 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞による歯槽骨」再生スーパー特区:「医工連携による先進医療機器の実用化プロジェクト」第三回シンポジウム、\*文部科学省橋渡し研究支援推進プログラム:「先端医療の開発支援拠点形成と実践」第五回シンポジウム、2011年2月28日、東京

Kagami H. Tissue engineering and regenerative medicine in dentistry: from

basic science to clinical translation. August 2, 2011, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, China

Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. October 12, 2011, Section of Biological Chemistry, NIDCR, NIH

第73回日本血液学会総会 OS-3-36 臍帯血からの制御性T細胞の誘導増幅による免疫抑制療法の開発 2011年10月16日

Tokiko Nagamura-Inoue<sup>1</sup>, Seiichiro Kobayashi<sup>2</sup>, Kazuo Ogami<sup>1</sup>, Yuki Yamamoto<sup>1</sup>, Kiyoko Izawa<sup>2</sup>, and Arinobu Tojo<sup>1, 2</sup> The Significance of mTOR Inhibitor, Everolimus in TGF- $\beta$ -Induced Regulatory T cells from Cord Blood., 2180, American Society of Hematology Annual meeting, San Diego Convention Center, USA, Dec. 11, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

厚生科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

臨床研究（患者全身管理）の実施と骨髄液採取に関する検討

研究分担者 東條有伸 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

本事業は、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出するための第Ⅰ相/第Ⅱa相臨床研究を実施するものである。分担研究として、被験者の全身状態の評価、骨髄液採取、および骨髄より効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討を行った。平成23年6月より被験者のリクルートを開始し、エントリー予定5例の全身状態について、選定基準および除外基準に基づいた評価を行った。平成23年度中には1例、現在までに4例の被験者からの骨髄穿刺を施行した。全例で骨髄間質細胞の培養は可能であったが、症例により採取された骨髄液からのコロニー形成数には大きな差が認められた。骨髄液中の骨形成性細胞の採取効率を高めるための基礎的検討を行い、溶血および密度勾配遠心による方法と従来法の比較を行った。その結果、骨形成性細胞の中で、それぞれの方法によって採取される細胞の分画に違いがあることが明らかとなった。

H. 研究目的

本研究では、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出し、薬事法下での実用化を目指した第Ⅰ相/第Ⅱa相臨床研究を実施する。特に先行する臨床研究によって得られた課題について検討し、実用化に向けて改良された細胞調製法による歯槽骨再生の効果を、先行する臨床試験の結果と比較する。そのため、分担研究者として被験者の全身状態の評価、骨髄液採取を担当する。さらに、骨髄からの効率的な骨形成性細胞採取法に関する基礎的検討を行う。

I. 研究方法

1. 被験者候補者の全身状態の評価

臨床研究への参加希望者に対して、治療

開始予定日の3ヶ月以内に検査項目を全て実施、内科的見地から以下の除外基準に基づいて診断を行う。登録前検査の結果に基づいて症例検討会にて検討を行なう。

1) 選定基準

- ① 上顎あるいは下顎歯列に連続した2歯以上の欠損を認め、固定式架橋義歯（いわゆるブリッジ）による補綴処置によって機能回復が望めないもの
- ② 可撤式義歯（いわゆる入れ歯）ではなくデンタルインプラントを用いた補綴処置を希望するもの
- ③ デンタルインプラント埋入のための十分な骨量が存在せず、骨移植を必要とする患者。具体的には、インプラント埋入部位の最小歯槽骨幅径が



5mm以下、また上顎においては上顎洞底までの、下顎においては下顎管までの最小歯槽骨高径が5mm以下の患者を目安とするが、実際の骨移植の必要性については、CT画像によるシミュレーションソフト(SimPlant, 株式会社マテリアライズデンタルジャパン製)にて確認の上決定する。近年short implantと呼ばれる5-8mmのインプラントでも比較的良好な予後が得られることが明らかになっており<sup>27)</sup>、short implantによる治療が困難である症例を対象とするため5mm以下を基準としている。

- ④ 治療前処置として、歯石除去と歯ブラシ指導を受けており、良好なプラークコントロールが維持されていること
- ⑤ 年齢は20歳以上、70歳以下であること
- ※ 成人であることと移植細胞の増殖率を考慮して設定
- ⑥ 文書による同意が得られるもの
- ⑦ 通院の意思と能力を有するもの

## 2) 除外基準

- ① 糖尿病または自己免疫疾患に罹患しているもの
- ② 血液凝固異常を有しているもので以下の値を外れる場合  
PT(プロトロンビン時間): 50%以上  
APTT(活性化部分トロンボプラスチン時間): 23.5~42.5秒  
あるいは抗血小板薬や抗凝固薬を使用しているもので服薬の中止が困難であるもの
- ③ 梅毒、HBV 抗原, HCV 抗体, HTLV-1 抗

体, HIV 抗体のいずれかが陽性であるもの

- ④ 骨粗鬆症など骨代謝疾患の者やビスフォスフォネート製剤使用者
- ⑤ 肝臓機能障害のあるもの(以下の値を外れる場合)  
GOT (AST): 10~40 IU/L  
GPT (ALT): 5~45 IU/L
- ⑥ 妊娠しているあるいは妊娠の疑いのあるもの(妊娠可能な年齢においては男女とも避妊処置を行なうこととする)。
- ⑦ 本研究で使用される薬剤に対してアレルギーの既往のあるもの、もしくは継続的な全身投与の治療を要するアレルギー疾患を有するもの
- ⑧ 喫煙者
- ⑨ 責任医師、副責任医師が不適と認めたもの

## 2. 骨髄穿刺

### 1) 採取場所

骨髄液採取は東京大学医科学研究所附属病院の外来処置として外来処置室にて行う。

### 2) 採取方法

骨髄液採取部に局所麻酔(1%キシロカイン)を行う。片側の後上腸骨稜に穿刺針を刺入し骨髄液を10mLのシリンジを用いて5mL採取し、深さや方向を変え5mLをさらに3回採取する(5mL×4回計20mLを目標とする)。片側で吸引量が不十分であった場合には対側からの穿刺・吸引を試みる。

### 3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

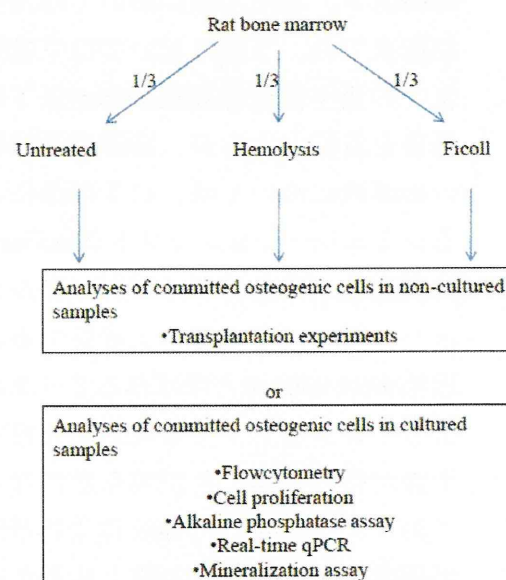
現在骨髓液より骨形成性細胞を分離する手順は、フラスコに対して接着する細胞を選択することにより行われている。しかしながら、臨床例においては同様の手技で骨髓液の穿刺を行ったにもかかわらず、得られる接着性細胞（コロニー形成性細胞）の数にはばらつきがある。

これまで、骨髓液の採取後に間葉系幹細胞を効率的に回収する方法として、培養前に間葉系幹細胞を含む分画を濃縮するいくつかの方法が報告されている。しかしながら、それらの方法が骨形成性細胞の濃縮について有用であるかについては明らかではなかった。

本研究では、ラット骨髓細胞を用いて骨髓液中に大量に存在する血球を溶血により除去する方法と、骨髓中の単核球分画を密度勾配遠心にて選択後培養する方法を用いて、事前選択なく培養する方法との比較検討を行った。

6週令のオスSDラットを麻酔薬の過量投与によって安楽死させたのち、大腿骨と脛骨を採取した。骨髓細胞をHBSSにてフラッシュアウトして採取し、3つのチューブに分注後遠心し、DMEMに再懸濁した。Ficollによる密度勾配遠心群、lysis bufferによる溶血群、およびそのまま移植を行う群とした。

それぞれの群において、細胞数、フローサイトメトリー・免疫蛍光法による細胞分画の比較、骨分化度（ALP活性、骨マーカー遺伝子の発現）、ヌードマウス皮下への移植によるin vivo骨形成能の比較を行った。



（倫理面への配慮）

本臨床研究は、臨床研究に関する倫理指針、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守し、被験者の尊厳と人権を尊重し、被験者の不利益が利益を越えることがないように十分に配慮して実施される。特に、被験者に危険が及ぶことのないよう、被験者骨髓細胞の採取、骨髓間質細胞を高品質に維持するように努め、骨髓間質細胞の移植には細心の注意を払う。

また、被験者には、事前に、TRコーディネーターの同席のもとで、研究責任者又は研究分担者から、本研究の意義、目的、方法、予期される危険、いつでも同意を撤回できること等を平易な用語で説明し、自由意志に基づいて被験者となることを、文書により同意を受ける。

被験者の個人情報には、個人情報管理者を置き、鍵のかかるロッカー等で厳重に保管される。

動物実験については学内の規定に基づいて行い、プロトコルは動物実験倫理委員会で承認を得て行う。ヒト細胞を用い

た実験については、東京大学医科学研究所倫理委員会にて承認を得て行う。本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、ボランティアからはインフォームドコンセントを取得した後に組織の採取を行う。

## J. 研究結果

### 1. 被験者候補者の全身状態の評価

エントリー予定5例の全身状態について、選定基準および除外基準に基づいた評価を行った。

第1症例：血中グルコース値が高値であり（随時測定で167 mg/dl）、糖尿病の除外が問題となった。空腹時血糖値を測定し、糖尿病の除外診断を厳密に行った結果、適格として承認された。

第2症例：両眼中心静脈閉塞症の既往があるため、血栓症リスクの評価が問題となった。また、軽度貧血（ヘモグロビン13.1 g/dl）について精査が必要と判断された。FDP、d-dimerの測定と再検査を行い、適格として承認された。

第3症例：全身状態には問題がないが、検査後時間が経過しているため、再検査後の条件付き承認となった。

第4症例：WPW症候群のためアブレーションを受けた既往があるが、心電図にて問題は認められなかった。適格として承認された。

第5症例：血液検査にて、FBS 117 mg/dl, HbA1C 5.9, 尿糖 (-) とやや耐糖能の低下が認められた。ただし、再検では Glu 93 mg/dl, HbA1C 5.6 で異常は認められず、適格として承認された。

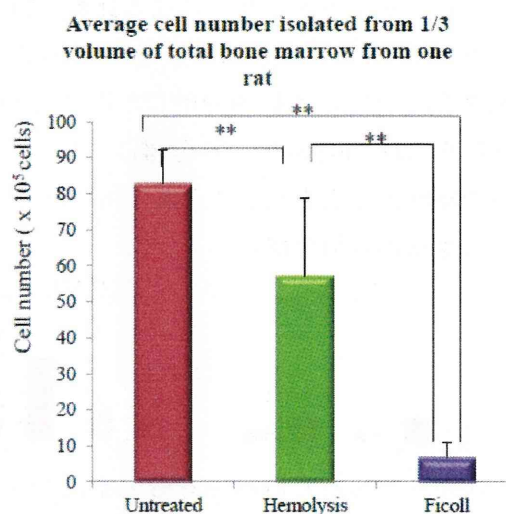
### 2. 骨髄穿刺

これまで4症例について骨髄穿刺を行

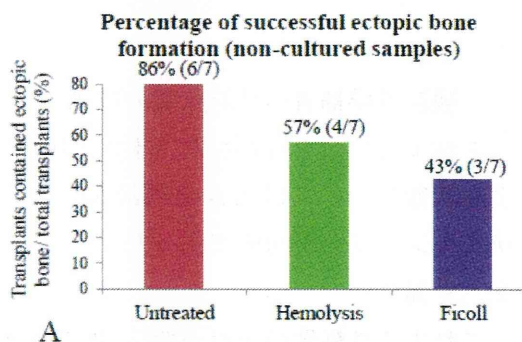
った。採取中採取後の全身状態には問題は認められなかった。全例で骨髄間質細胞の培養は可能であったが、得られたコロニー数には個人差が大きく、それにより必要とされる培養期間にも差が認められた。

### 3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

(回収細胞数)



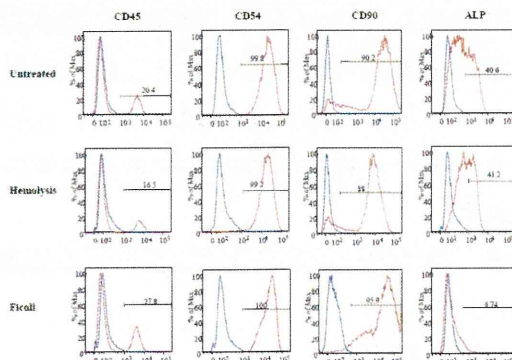
それぞれの群において回収細胞数には差が認められ、未処置群と比較して、溶血群、Ficoll群では有意に少ない細胞数であった。（骨形成能）



分離したのみ（培養を行わない）状態で細胞の移植を行った。骨形成能には差を認め、未処置群が最も高い骨形成率であった。

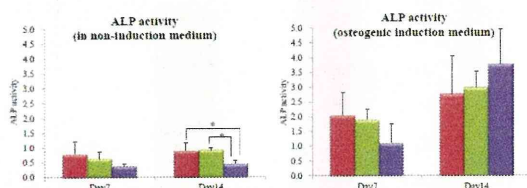


(得られた細胞分画の差)



フローサイトメトリーによる比較では、ALP 陽性細胞に大きな差が認められた。ALP 陽性細胞は比較的分化した骨形成細胞と考えられ、Ficoll による分離により、これらの細胞は除去されることが示唆された。

(細胞の骨分化能)



次に、得られた細胞の骨分化能について検討を行った。その結果、すべての群で骨分化する細胞が得られたため、Ficoll により分離された細胞には比較的未分化な骨形成細胞（前駆細胞、幹細胞）分画が多く含まれる可能性が示唆された。

## K. 考察

### 1. 被験者候補者の全身状態の評価

これまで検討が行われた 5 例について、全身状態については大きな問題はなく、全例でエントリーが可能であった。

### 2. 骨髄穿刺

これまで骨髄穿刺を行った 4 例について、採取に関する問題、合併症などは認めていない。しかしながら、得られたコロニー数には個体差が大きく見られた。この差がも

ともと骨髄中に存在する細胞数の差に由来するのか、骨髄穿刺の方法によるものかは明らかではないが、今後安定した細胞培養のためにはさらなる検討が必要と考えられる。

### 3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

今回動物実験ではあるが、培養前の骨髄細胞の前処置の効果について検討を行うことができた。これまで溶血、あるいは密度勾配遠心により幹細胞分画が効率的に採取することができるという報告されている。しかしながら、骨再生治療に関しては、今回用いた 3 群において、既存の方法より優れているとする根拠は得られなかった。

興味深いことに、採取後の骨髄細胞には、ALP 陽性の比較的分化した骨芽細胞が存在し、培養や分化誘導することなく骨形成をすることができる。その一方で幹細胞分画や前駆細胞はどの方法でも採取が可能であり、分化誘導を行った後は同様の骨分化が得られた。

ヒトの骨髄においても分化した骨芽細胞と比較的未分化な前駆細胞、幹細胞が共存していると考えられる。骨再生治療にはそれぞれの分画を利用する戦略についても検討する余地があると考えられた。

## L. 結論

これまでの研究では、被験者のリクルートおよび骨髄穿刺のステップについては比較的順調に行われていると考えられる。その一方で骨形成細胞の採取効率については、今後の症例でも引き続き検討を行う必要があると考えられた。

## M. 研究発表

### 1. 論文発表

Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:6584-9, 2012

Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph<sup>+</sup> CML or relapsed/refractory Ph<sup>+</sup> ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. *Int J Hematol*. 95:409-19, 2012

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. *Blood*. 119:3123-7, 2012

Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchimaru K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis*. 2:1-10, 2012

Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma*. 2012 Jan 31. [Epub ahead of print] PMID:22204454

Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leuk Res*. 6:128-31, 2012

Tsai HJ, Kobayashi S, Izawa K, Ishida T, Watanabe T, Umezawa K, Lin SF, Tojo A. Bioimaging analysis of NF- $\kappa$ B activity in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells unveils its synergistic up-regulation by TNF $\alpha$ -stimulated changes to the microenvironment. *Cancer Sci*. 102:2014-21, 2011

Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, Watanabe M, Harnprasopwat R, Izawa K, Tojo A, Ohtomo K. Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol Imaging*. 10:377-85, 2011

Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the



NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol.* 93:771-8, 2011

Tsuda M, Ebihara Y, Mochizuki S, Uchimaru K, Tojo A, Tsuji K. Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome. *Brit J Haematol.* 15:130-2, 2011

Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaïke Y, Watanabe N, Tojo A, Tani K, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3dimCD7low subpopulation of CD4+ T cells in acute-type adult T cell leukemia. *Cancer Sci.* 102:569-77, 2011

Sato A, Ooi J, Takahashi S, Tsukada N, Kato S,

Kawakita T, Yagyu T, Nagamura F, Iseki T, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant,* 46:257-61, 2011

## 2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

**課題名:「自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究」****分担研究報告書**

分担課題名:「骨髄間質細胞のセルプロセッシング体制の整備と品質管理、自己血清の調製」

分担研究者:長村登紀子 (東京大学医科学研究所 附属病院・講師)、

**研究要旨:** 本事業は、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出するための第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施するものである。分担研究として、骨髄間質細胞のセルプロセッシング体制の整備と品質管理、自己血清の調製を行った。臨床研究に先立ち、セルプロセッシングのために新たに雇用された 5 名に対して、細胞調製施設(臨床細胞工学室)の使用に関する教育訓練を実施した。本臨床研究のために細胞調製施設への後室設置などの工事が施行されており、環境モニタリングを行って清浄度の確認を行った。その後は東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準書に基づいて、浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行し、これまで問題は認めていない。本臨床研究に使用する機器について、平成 23 年度中に必要とされるバリデーションを施行した。平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、これまでエントリーが承認された 5 例中 4 例に対して末梢血の採血と自己血清の調製を行った。なお、ヒト幹細胞を用いた臨床研究では、細胞や検体の長期保管が義務付けられている。平成 23 年度には細胞リソースセンター内にこれら検体保管のための部門を設置し、学内外の臨床研究に対応可能な体制を構築した。

**A. 研究目的**

本研究では、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出し、薬事法下での実用化を目指した第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施する。特に先行する臨床研究によって得られた課題について検討し、実用化に向けて改良された細胞調製法による歯槽骨再生の効果を、先行する臨床試験の結果と比較する。本臨床研究では治療用の骨髄間質細胞の培養を行うため、細胞培養施設(セルプロセッシングルーム、CPC)の整備、およびその運用管理を行うことが重要である。分担研究者として、セルプロセッシングを安全に行うために CPC の整備と運用を担当する。また、細胞培養に必要となる自己血清の調製を行う。東大医科研細胞リソースセンターとして、本事業による細胞プロセッシングが安全に運営されるよう支援することを目的とする。

**B. 研究方法****1. 教育訓練**

セルプロセッシングのために 5 名に対して、細胞調製施設(臨床細胞工学室)の使用に関する教育訓練を実施した。教育訓練は、臨床細胞工学室、教育訓練実施基準書(RCCT-GP02)に従って行

れた。

**2. CPC の管理運営**

本臨床研究のために細胞調製施設への後室設置などの工事が施行されており、研究開始前のバリデーションとして環境モニタリングを施行した。

CPC の管理のために、東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準書 RCCT-GP01 に基づいて、1 週毎に浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行した。

同様に CPC 内で使用する機器については、定期的な保守管理が義務付けられている。本臨床研究に使用する機器について、平成 23 年度中に必要とされる定期保守点検および校正を施行した。手順は SOP-D01 から SOP-D21 に従った。

**3. 自己血清の調製**

平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、これまでエントリーが承認された 5 例中 4 例に対して、末梢血の採血と自己血清の調製を行った。(自己血清調製手順)

- ① 骨髄液採取時または骨髄液採取前に被験者の上腕より 200-400mL を採血する。
- ② 採取後約 1 時間 4℃で静置する。
- ③ 10 分間 3000rpm で遠心分離し、無菌的に上清の血清を分取する。
- ④ 調製した血清は、-20℃で保管する。