

## 座長のまとめ

木村 貴文<sup>\*1</sup>  
前川 平<sup>\*2</sup>

本シンポジウム「細胞治療」は、細胞治療・再生医療を臨床の現場で先駆的に展開されている、あるいは今後の展開がおおいに期待されているリーダーの方々の発表を通して、多くの研究者や医師が関心を寄せるがんや難治性疾患に対する治療戦略の現状と問題点および将来への展望についての認識を共有いただくことを目的として企画した。

そのためにまず、現在すでに厚生労働省の承認を経て進められているがん特異的 T 細胞輸注療法および骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の2つの臨床研究についてそれぞれご発表いただいた。続いて本邦発の革命的医療として実現に向けた加速化がはかられている人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた再生医療の現状と問題点について自家移植および同種移植を目指す立場からそれぞれご発表いただくこととした。

研究的意味合いの強い先端医療についてのセッションであることから、まずは個々の発表の十分な情報量の確保をはかるためにパネルディスカッションは行わず、発表に続く質疑応答という従来の形式で進めさせていただいた。

## 1. がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開

最初のシンポジストの池田裕明先生からは、三重大学を拠点として実施されている分子標的がん免疫療法の実際について詳しい解説をいただいた。悪性黒色腫以外のがんにおいて従来はほとんど不可能とされてきたがん特異的 T 細胞の大量調整であるが、長期培養後の細胞の老化とその数の少なさという2つの問題を克服するためにユニークな工夫が凝らされた。すなわち、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) を人工的に

患者 T リンパ球に発現させてしまおうという発想である。研究は、多くの固形腫瘍が悪性黒色腫抗原 MAGE-4 を発現していることを確認することから始まった。その結果、食道がんでは50%以上、頭頸部がんや卵巣がんでは30%以上、その他にも肺がんや胃がんあるいは子宮体がん等においても20%前後の症例で MAGE-4 を発現していることが明らかとなった。これらの知見は、MAGE-4 特異的 HLA-A24 拘束性キラー T 細胞から単離した TCR を患者の CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現させた「人工キラー T 細胞」の誕生へとつながる。三重大学では現在、MAGE-4 や NY-ESO-1 などの腫瘍抗原が陽性の固形腫瘍患者を対象とする「がんワクチン療法」と同時に、治療抵抗性進行期食道がん症例を対象とする「T 細胞受容体遺伝子導入リンパ球輸注療法 (TCR 遺伝子治療)」が臨床試験としてすでに実施されている。

また、MAGE-4 特異的 TCR 導入による内因性 TCR ( $\alpha$  と  $\beta$  によって構成される) とのミスペア形成についても言及された。導入 TCR の発現低下や予期せぬペア形成による自己免疫反応の惹起が懸念されることから、siRNA による内因性 TCR の発現抑制を試みたところ、導入 TCR の発現効率と腫瘍細胞障害性のいずれもが改善されたという。さらには、がん特異的 TCR 導入 T 細胞輸注療法の効果がワクチンとの併用によってさらに増強されること、がん特異的 TCR 導入 CD8<sup>+</sup>細胞を CD4<sup>+</sup>T 細胞と混合培養すると CD8<sup>+</sup>細胞の生存性向上と抗腫瘍効果が増強することなども新たな知見として報告された。治療効果のさらなる改善に期待を抱かせる研究成果として興味深い。

## 2. 難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞 (MSC) を用いた臨床試験

続いて京都大学医科学研究所を中心に行われている臨床研究について青山朋樹先生から報告いただいた。大腿骨頭無腐性壊死症 (10例) と月状骨無腐性壊死症

\*1 京都大学 iPS 細胞研究所規制科学部門  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

\*2 京都大学医学部附属病院輸血・細胞治療部、分子細胞治療センター  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

(10例)に対する自家骨髄由来MSCを用いた骨再生治療が目的である。両疾患とも原因不明であり若年層にも好発する。また、有効な根治療法はこれまで存在しなかった。本臨床研究を開始するにあたっては、(1)骨髄MSCの生物学的検討、(2)前臨床試験、(3)GMP対応と細胞調整施設(CPC)との連携、(4)臨床試験実施申請という4つのステップが設定された。(1)、(2)および(4)の詳細については青山先生の稿に委ねたい。本臨床研究では(3)GMP対応とCPCとの連携を重要なステップと位置づけ、従前よりさまざまな細胞製剤の調製ですでに実績のあった京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター(CCMT)と早い段階からの連携をはかった。この取組みによってGMPをはじめとする種々の規制への対応が可能となり、細胞治療で最も重要な調製細胞の安全性と有効性および品質が担保されるのである。

これまで治療をうけた大腿骨頭壊死症例10例(ほとんどが20~30歳代)に移植後1年を経過した時点で有害事象は認められず、日常生活の改善度も極めて良好との報告があり、高度先進医療への展開が期待される場所である。

### 3. iPS細胞を用いた網膜疾患治療

理化学研究所の高橋政代先生からは、山中伸弥博士(現京都大学iPS細胞研究所所長)らによって2007年に発表されたヒトiPS細胞の世界初の臨床応用例として期待されている研究計画についてご報告いただいた。ES細胞を用いたこれまでのご自身の研究によって網膜色素上皮細胞(RPE)への非常に効率よい*in vitro*分化誘導法をすでに開発されていたこともあり、加齢黄斑変性(AMD)の視機能維持や改善を目的とした自家iPS細胞由来RPE移植が実現可能となった。これを臨床研究として実施するためには、移植片としての有効性と安全性が担保されなければならない。そこで、細胞調製施設と連携し、製剤と品質管理の整備を行うとともに、規制当局への相談や面談を通じて安全性と品質の担保に必要な検証項目を整理し、動物実験も含めて安全性についての検討を十分に行ったとの

報告がなされた。一日も早いFirst-in-manの実施を期待したい。また、AMDの原因遺伝子によってアポトーシスの機序が異なり、薬剤の効果も異なることが明らかとなったことから、細胞治療にとどまらず、病態解明および治療法の判定や開発にもiPS細胞の貢献が期待されるとの興味深い研究成果も報告された。

### 4. iPS細胞研究の現状と課題

最後に、難治性疾患に対する同種移植片の原料細胞として期待されるiPS細胞の臨床応用を可能にするためにどのような研究が行われており、新たな規制的枠組の制定も含めてどのような社会的取組みが必要となってくるかについて、京都大学iPS細胞研究所の青井貴之先生から包括的なご講演をいただいた。iPS細胞作製技術の問題点として「多様性」が提起された。つまり、樹立法の多様性とクローンの多様性である。現在、iPS細胞を樹立するための主要な要素は、由来細胞、導入因子、遺伝子導入法(ベクターなど)であるが、それぞれ多岐にわたり、それらの組合せは理論上膨大な数となる。安全で高品質の移植用iPS細胞を作製するための最適の組合せを選択しなければならないが、そのためにはiPS細胞の特性や機能を正当に評価する項目の設定が急務であるとの解説があった。新たな規制的枠組の設定を意味することから、規制当局との連携が重要と考えられる。また、同じドナーから作製したiPS細胞であってもクローンごとにその増殖性や分化指向性に違いがあることも分かってきており、クローン選択基準についても評価項目の設定が重要とのことである。あらかじめ分化多能性に優れたクローンが選択できれば、多くの患者に使用可能な移植用細胞として保存しておくことができる。この方法は、適切な病期での移植やiPS細胞治療のコストダウンの観点から有望であるので、HLAホモタイプ・ドナーからiPS細胞を作製しバンク化することを目指しているとの紹介がなされた。世界に先駆けてiPS細胞技術が多くの難病に対する細胞治療に応用されることに期待したい。

〔記録〕第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3：細胞治療

## 1. がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開

池田 裕明\*

### 1. がん抗原の発見は特異的免疫療法を可能とした

腫瘍免疫学の歴史、とくにヒトがんの治療への応用を考えると、重要な道標として、1990年代はじめの Boon らや Kawakami らの仕事が始まる。T 細胞が認識するがん抗原の同定が挙げられる<sup>1,2)</sup>。ヒトがん抗原の発見は、特異的免疫療法の開発を可能とした。ひとつの方法は、同定されたがん抗原を直接がん患者に投与し、体内で当該のがん抗原に対する特異的免疫応答を誘導する、がんワクチン療法である。もう1つの方法は患者のリンパ球とがん抗原を体外で混合培養し、腫瘍反応性リンパ球を大量に調整しこれを患者に輸注する、免疫細胞輸注療法である。いずれの場合も誘導/調整されたがん抗原特異的なリンパ球ががん細胞を攻撃、破壊することを目指している。

### 2. 期待される腫瘍特異的 T 細胞輸注療法

近年、上記第2の方法である、抗原特異的な T 細胞の輸注療法が有効ながん免疫療法として期待されている。具体的には、末梢血やがん浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes : TIL) を、腫瘍抗原ペプチドや腫瘍細胞等により体外で刺激し、腫瘍特異的な T 細胞を大量調整し輸注する方法である<sup>3)</sup>。

本療法も初期には臨床的な効果や輸注した T 細胞の患者体内生存が限られているという結果が多かった<sup>4~6)</sup>。これらの報告例にはおもに2つの問題点があったと考えられる。第1には、担がん生体における免疫抑制機構の存在がある<sup>7~10)</sup>。第2には、輸注する T 細胞のクオリティーの問題がある。初期の輸注療法では長期に *in vitro* 培養を繰り返した T 細胞が用いられる場合が多かった。近年の T 細胞研究が示すところでは、長期培養 T 細胞は *in vitro* におけるエフェクター機能は強いが、*in vivo* における生存性に劣り、輸注療法に用いた場合の抗腫瘍効果が弱い<sup>11~16)</sup>。

米国の Rosenberg らのグループは T 細胞輸注療法実施患者に化学療法剤や放射線照射の前処置を加え、担がん生体の免疫抑制機構の解除を目指している<sup>3)</sup>。これらの前処置により、がん患者中の Treg が抑制されるとともに、輸注されたリンパ球がホメオスタティック拡大により活性化され増殖する<sup>17)</sup>。同時に、輸注する T 細胞の *in vitro* 調整時間は短く設定される傾向にある。実際、彼らは進行期の悪性黒色腫患者を対象として、化学療法剤にて前処置をした後に、TIL を用いた特異的 T 細胞輸注を行い、50% 近く

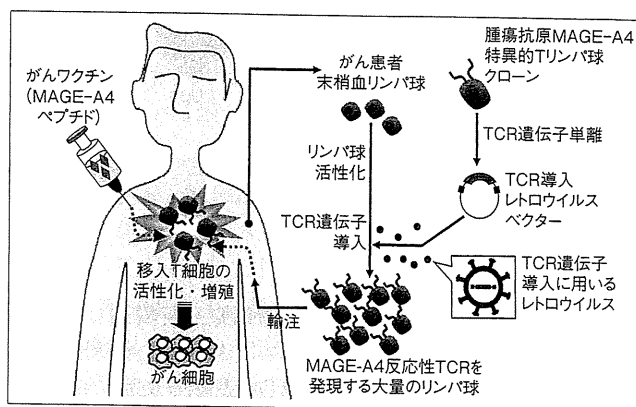


Fig. 1

抗原受容体 (TCR) 改変 T 細胞輸注. ここではさらにペプチドワクチンを加えて生体内での輸注細胞の活性化と増殖をめざす複合的免疫療法を示す。

の患者に RECIST 基準で有効性 (PR+CR) を認めたと報告した。さらに前処置に放射線照射を加えることにより、RECIST 基準で 72% という有効率を報告している<sup>18)</sup>。進行期悪性黒色腫では標準的な化学療法の奏効率は 20% 未満と考えられ、免疫療法が抗癌剤による治療成績を大きく上回る可能性を示している。

### 3. TCR 遺伝子治療

以上のごとく、大きく期待される腫瘍特異的 T 細胞輸注療法であるが、現在克服すべきいくつかの大きな課題がある。ひとつには、悪性黒色腫を除く多くのがん種では十分な数の腫瘍特異的 T 細胞を体外で調整することが極めて困難であり、この治療法の適用は現在ほぼ悪性黒色腫に限られている。また、大量の特異的リンパ球の調整には患者リンパ球を体外で長期培養することが必要な場合が多く、長期培養 T 細胞は輸注後に *in vivo* 生存性が低い。これらの問題点の克服法の1つとして、がん抗原特異的キラー T 細胞クローンから得られた TCR 遺伝子を患者末梢血より得られた CD8<sup>+</sup> T 細胞に導入し、がん特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を短期間に人為的に大量に作製し輸注するアプローチ、いわゆる TCR 遺伝子治療が検討されている (Fig. 1)。

我々はタカラバイオ(株)との共同研究として、がん精巢抗原 MAGE-A4 を標的とした TCR 遺伝子治療を開発している。MAGE-A4 特異的キラー T 細胞クローン (HLA-A24 拘束性) 由来の TCR 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター (ベクター A) を作製した。この遺伝子導入細胞は

\* 三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学  
〒514-8507 津市江戸橋 2-174

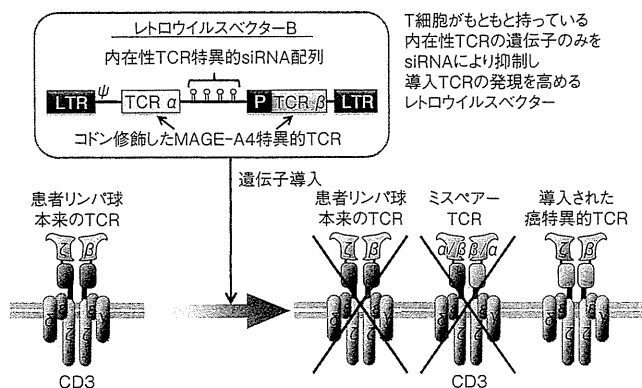


Fig. 2

レトロウイルスベクター B の開発は内在性 TCR の発現抑制と導入 TCR の更なる高発現を可能にした (一部文献 21 より改変引用)。

MAGE-A4 陽性 HLA-A24 陽性腫瘍細胞を特異的に傷害した<sup>19)</sup>。さらに、重度免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性ヒト腫瘍細胞株を皮下接種し、この TCR 遺伝子改変 T 細胞を輸注することにより腫瘍の成長を抑制することを確認した。

#### 4. TCR ミスペアリングを防ぐ新規ベクターの開発

TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた治療法において、現在問題点のひとつと考えられているのが、患者 T 細胞がもともと持つ内因性 TCR の存在である。遺伝子導入された腫瘍特異的 TCR と内因性 TCR はリンパ球上の CD3 分子を競合し、結果的に導入 TCR の発現を阻害する。さらに、遺伝子導入された TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は内因性 TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖との間で望まれないヘテロダイマー (ミスペア TCR) を形成する可能性がある。このことは腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させるとともに、予測不可能な特異性や自己反応性をもつ TCR が出現する可能性もはらむ<sup>20,21)</sup>。

我々は、この問題の解決策として、内因性 TCR の発現を特異的に阻害する siRNA を含む新規レトロウイルスベクター (ベクター B) を開発した (Fig. 2)。導入する腫瘍特異的 TCR にはコドン修飾を施し、siRNA の効果を受けないようにした。本ベクターを用いると、内因性 TCR の発現が特異的に低下し、導入 TCR の発現が向上した。その結果、TCR 改変 T 細胞は効率良く腫瘍細胞を傷害した<sup>22)</sup>。当然、内因性 TCR の発現減少はミスペアリングの減少を意味する<sup>21)</sup>。さらに、本ベクターは導入されたベクターコピー数が少ない状況においても効率良く導入 TCR を発現し、安全に高効率な TCR 遺伝子導入を可能とした。

#### 5. 免疫抑制機構を防ぐ手だて

担癌宿主の免疫抑制機構が T 細胞輸注療法に及ぼす障壁について我々は腫瘍抗原特異的 TCR トランスジェニックマウスを用いた研究を行ってきた。この研究の中で、輸注した T 細胞が生体内でマルチファンクショナル性 (1 つの細胞がさまざまなサイトカインや細胞障害顆粒産生などの

多機能を持つこと) を獲得することが重要であり、しかし腫瘍の進展に伴い Treg を介してこのマルチファンクショナル性獲得が阻害されることを見いだした<sup>23,24)</sup>。この解決策として、TCR 遺伝子導入 T 細胞を輸注後、抗原ペプチドによるワクチンを接種し *in vivo* の活性化を付加し、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞とともに CD4 陽性 T 細胞を混合し培養すると CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクショナル性が向上し、抗腫瘍効果が増強することが明らかとなった。

これらの基礎的検討の結果、臨床試験のプロトコールにおいても T 細胞輸注療法に引き続き抗原ペプチドによるワクチンを付加すること、TCR 遺伝子導入 T 細胞の *in vitro* 培養の際に CD8 陽性 T 細胞に純化せずに CD4 陽性 T 細胞とともに培養を行うことを計画した。この TCR 遺伝子改変 T 細胞を用いた T 細胞輸注療法の臨床試験は厚生労働省により承認され、三重大学において実施中である。登録された患者において、輸注したリンパ球が投与患者の末梢血中に輸注後 100 日を超えて生存し、機能を維持し続けていることが確認されている。

このように、腫瘍特異的 T 細胞の輸注療法とがんワクチン療法を複合することにより、担癌宿主における免疫抑制機構を一定程度防ぐことができると考えられる。今後はより積極的に免疫抑制機構を防ぐ手だてを組み合わせることが肝要である。具体的には STAT3, IDO 等のがん局所における免疫抑制機構に関わる分子に対する低分子阻害剤や、免疫抑制性細胞やその機能分子に対する抗体医薬等が挙げられる。がんワクチン、細胞療法、免疫抑制阻害剤の有効な組合せにより、単なる補助療法を超えた強力ながん免疫療法が開発されると期待される。

#### 文 献

- 1) Boon T, et al. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 175-208.
- 2) Kawakami Y, et al. *J Exp Med.* 1994; 180(1): 347-52.
- 3) Gattinoni L, et al. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(5): 383-93.
- 4) Topalian SL, et al. *J Clin Oncol.* 1988; 6(5): 839-53.
- 5) Rosenberg SA, et al. *N Engl J Med.* 1988; 319(25): 1676-80.
- 6) Rosenberg SA, et al. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(15): 1159-66.
- 7) Sakaguchi S, et al. *Immunol Rev.* 2001; 182: 18-32.
- 8) Bronte V, et al. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8): 641-54.
- 9) Pure E, et al. *Nat Immunol.* 2005; 6(12): 1207-10.
- 10) Khong H, et al. *Nat Immunol.* 2002; 3(11): 999-1005.
- 11) Jameson SC, et al. *Immunity.* 2009; 31(6): 859-71.
- 12) Klebanoff CA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(27): 9571-6.
- 13) Hinrichs CS, et al. *Blood.* 2008; 111(11): 5326-33.
- 14) Mueller K, et al. *Eur J Immunol.* 2008; 38(10): 2874-85.
- 15) Araki K, et al. *Nature.* 2009; 460(7251): 108-12.
- 16) Gattinoni L, et al. *Nat Med.* 2009; 15(7): 808-13.
- 17) Dudley ME, et al. *Semin Oncol.* 2007; 34(6): 524-31.
- 18) Dudley M, et al. *J Clin Oncol.* 2008; 26(32): 5233-39.
- 19) Hiasa A, et al. *Gene Ther.* 2008; 15(9): 695-9.
- 20) Bendle GM, et al. *Nat Med.* 2010; 16(5): 565-70.
- 21) Brenner M. *Nat Med.* 2010; 16(5): 520-1.
- 22) Okamoto S, et al. *Cancer Res.* 2009; 69(23): 9003-11.
- 23) Imai N, et al. *Eur J Immunol.* 2009; 39(1): 241-53.
- 24) Imai N, et al. *Cancer Sci.* 2009; 100(7): 1317-25.

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3:細胞治療

## 2. 難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞を用いた臨床試験

青山 朋 樹<sup>\*1,\*2</sup> 笠井 泰 成<sup>\*3</sup> 上田 路 子<sup>\*1,\*2</sup>  
前川 平<sup>\*3,\*4</sup> 中村 孝 志<sup>\*5</sup> 戸口田 淳 也<sup>\*1</sup>

### 1. はじめに

再生医療とは病変組織を自家あるいは他家の細胞、組織を輸注あるいは移植することで、新しい組織に置換する治療であり、これまでの治療で治癒が困難であった難治性疾患に対する新しい治療法として大きな期待が寄せられている。用いられる細胞の中で間葉系幹細胞は比較的調製が容易なこと、*in vitro*の実験でさまざまな細胞に分化する能力が証明されていることなどから、最も早く臨床応用が進められている組織幹細胞の1つである。

本臨床試験で対象にした疾患は大腿骨頭壊死症と月状骨壊死症（キーンベック病）である。両者とも無腐性骨壊死という原因も治療法も明らかになっていない疾患である。病理像としては血流の途絶と生細胞の消滅が認められ、関節軟骨の近傍に生じた際には、関節破壊による強い痛みと可動域低下による日常生活能力の低下が引き起こされる。現状においては壊死部を治癒するための根本的治療法は存在しない。

本稿においては臨床試験までの概要、臨床試験の実施経過を提示し、探索的医療における細胞治療の実際を解説する。

### 2. 基礎細胞生物学的検討

現時点では間葉系幹細胞に明確な定義はなく、その存在部位も骨髄、脂肪、滑膜、臍帯血等さまざまであり、調製法も一定ではない。そこではじめに世界中で最もポピュラーな調製法である骨髄液から遠心法によって間葉系幹細胞の調製を行い、その性質を調べてみた。29人のドナー由来の骨髄から調製した間葉系幹

細胞は、培養初期では全例、明確に骨、脂肪、軟骨の三方向への分化する能力を示したが、長期間培養（10継代）後には脂肪、軟骨への分化能は低下していた。増殖能に関しては、平均151日で増殖が停止したが、1例では300日以上培養可能であった。この細胞を精査すると染色体異常とp16遺伝子転写調節領域のメチル化を認めた。この細胞が腫瘍を形成することはなかったが、100日以上という長期間の培養工程中には、ゲノムあるいはエピゲノムの異常が発生する可能性があることが示された<sup>1)</sup>。これらの基礎細胞生物学的検討から間葉系幹細胞を臨床応用する際には、そのパフォーマンスと安全性の観点から“調製を短期間に終了することが必要”という結論が導き出された。

### 3. 前臨床試験

無腐性骨壊死における病巣部は前述のように血流が途絶し、生きた細胞が存在しない壊死組織が充満した極めて劣悪な環境である。ここに間葉系幹細胞を移植しても、その機能を十分に発揮することは困難であると想定される。そこで血流を回復させるために血管柄付き骨移植を、さらに新たな骨母床を構築するために生体分解性人工骨であるベータリン酸三カルシウム（オスフェリオン<sup>®</sup>）を足場として併用する治療法を考案した。まずヒトの月状骨に相当するイヌ月状舟状骨（イヌでは月状骨と舟状骨が癒合）内の海綿骨を搔爬した後、搔爬部を液体窒素で凍結する処理により無腐性月状骨壊死モデルを作成した。そこにあらかじめ体外培養した間葉系幹細胞を人工骨とともに移植し、さらに血管柄付き骨を移植した。結果として、移植手術後わずか1カ月で極めて良好な骨形成が認められ、1年間の観察でも安全性に問題は生じなかった。この組織所見ではLacZでラベルした間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化して定着しているだけでなく、一緒に移植した人工骨が良好に分解され新しい骨に置き換わる骨リ

\*1 京都大学再生医科学研究所

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

\*2 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

\*3 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター

\*4 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

\*5 京都大学大学院医学研究科整形外科

モデリング像を呈していることから、移植した間葉系幹細胞が単に分化するだけでなく、良好な骨環境を構築していることが示された<sup>2)</sup>。

#### 4. 臨床用細胞調製実験

ヒトの体に移植する細胞を調製する操作は、手技的には通常の細胞培養実験と同等であっても、高い品質の操作が必要であり、医薬品と同等の調製が要求される。そのためにはGMP (Good Manufacturing Practice) の知識を十分習熟してから開始する必要がある。そこで、これまでに樹状細胞移植、膝移植を実施しており、GMP基準の細胞治療に関する知識が蓄積されている京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy, 以下CCMT) において、GMP講習(1.5時間×5回)を受講した。GMP習熟の後に細胞を調製するための標準作業手順書の作成を行い、一つ一つの作業手順がGMP基準にのっとっているかを検証した。作業の際に用いる物品についてもすべて品質保証、ロット管理、トレーサビリティが可能なものという観点から医薬品、GMP準拠、ISO対応、JIS対応のものを選定した。そこで完成した標準作業手順書に沿って、実際のCCMTの無菌細胞調製室内で模擬培養実験を繰り返し、標準作業手順書の微調整、動線の確認を行った。また最終製品の出荷判定のために最も妥当な判定項目を選定し、判定項目に対するバリデーションを十分にを行い、最終製品に対する責任体制を構築した。

#### 5. 臨床試験実施申請

予備検討を十分にを行い、臨床試験実施申請を行った。対象とした疾患は月状骨無腐性壊死および大腿骨頭無腐性壊死それぞれ10例で、いずれも画像診断分類上Stage 3とこれまでに有効な治療方法が確立されていない病期である。治療の概要は、はじめに腸骨より採取した自家骨髄液から間葉系幹細胞を分離し、自己血清を用いて約1000~10000倍まで体外培養する。骨壊死部を搔爬した後に人工骨(オスフェリオン®)と間葉系幹細胞を移植し、血管柄付き骨移植を併用し、血行を再建するというものである。エンドポイント評価は術後2年とし、評価項目は厚生労働省粗案に基づくX線画像診断、CT画像から算出した海綿骨占有体積と臨床評価点数による。本試験の目的を第I~II相試験と位置付け、これらの実施計画を京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院 医の倫理委員会に2006年7月19日に提出した。2006年9月1日から施行予定であった「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に

関する指針」に沿った臨床試験に対応するために、審査が長期化し、最終的に倫理委員会から許可を得たのは2007年5月17日である。そのうち厚生科学審議会での審査を経て最終的に臨床試験「大腿骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」「月状骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」の実施許可を得ることができたのは2007年11月7日である。

#### 6. 臨床試験実施経過

本臨床試験の第1例の症例登録は2007年11月29日である。以後順調に臨床試験は遂行され2010年12月の時点で月状骨壊死症例5例、大腿骨頭壊死症例10例(いずれも10例予定)に対して移植治療が実施されている。これらの移植治療1年後の追跡調査を終了しているが、全例において手術時出血による貧血や発熱、手術創部痛などの軽微な有害事象以外に本臨床試験に関する大きな有害事象は認めていない<sup>3)</sup>。

#### 7. おわりに

今回の臨床試験の最終結果は10例の移植治療後2年の安全性、有効性判定による。今後この治療を推進していくにあたっては、本臨床試験の安全性、有効性の結果はもちろんであるが、本治療と従来の治療法との優位性を比較し、適切な症例に対して応用することが重要である。

#### 謝辞

臨床試験を遂行するにおいて、多大なる協力をいただいた探索医療センターをはじめとする医学部附属病院の関連部署の方々に深謝する。本臨床試験は京都大学医学部附属病院負担患者経費、厚生労働省科学研究費、文部科学省科学研究費、文部科学省橋渡し研究支援プログラム、および新エネルギー産業技術研究開発機構プロジェクトからの助成により実施された。

#### 文 献

- 1) Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells*. 2007; 25(9): 2371-82.
- 2) Ikeguchi R, Kakinoki R, Aoyama T, Shibata KR, Otsuka S, Fukiage K, et al. Regeneration of osteonecrosis of canine scapohumeral using bone marrow stromal cells: possible therapeutic approach for Kienbock disease. *Cell Transplant*. 2006; 15(5): 411-22.
- 3) 青山朋樹, 笠井泰成, 上田路子, 前川平, 中村孝志, 戸口田淳也. 大腿骨頭無腐性壊死症に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験: 細胞調製の安全性管理体制に関して. *再生医療*. 2010; 9(4): 437-43.

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3：細胞治療

### 3. iPS細胞を用いた網膜疾患治療

高橋 政代\*

iPS細胞はES細胞と同様に身体のあらゆる組織細胞を作ることが可能な多能性幹細胞である。その中でも網膜色素上皮細胞(RPE)は*in vitro*で成熟細胞にまで分化誘導することができ、色素を持っているためにFACSを用いることなく純化することが可能である。また、必要な移植細胞数が10の5乗個と少ないために1枚の培養皿で移植細胞を確保できるという大きな利点もある。これらの性質からiPS細胞を用いた細胞移植の中でも最も臨床応用に近い細胞と考えられている。現在は、移植用網膜色素上皮細胞の臨床応用可能な作成法や品質管理法の整備、そして移植治療が安全であることを動物実験で確認している。

RPEは視細胞の維持に必須であり、その障害は2次的な視細胞変性による視機能の低下につながるが、RPE細胞移植の効果は移植の際の視細胞の状態によって異なる。視細胞の回復力が残存している場合は視機能の向上が望めるが、最初の臨床研究のように安全性が重視され重篤な患者への応用であれば、視細胞はすでに変性しているの見えるようになるというわけではなく、疾患にとっては進行を止める、遅らせるという効果のみと考えられる。視機能の真の再生には

視細胞移植を待たねばならない。

iPS細胞のもうひとつの応用として疾患の発生機序の解明や薬物の効果判定がある。我々は原因遺伝子が異なる5症例の網膜色素変性患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作成し視細胞を分化誘導した。正常iPS細胞では視細胞分化後30日以上培養しても視細胞数は変化しないが、網膜変性患者由来iPS細胞から分化した視細胞は30日の培養によってその数が有意に減少した。これは遺伝子変異に伴う酸化ストレス、小胞体ストレスなどによるアポトーシスと考えられた。それぞれのアポトーシスの機序は変異遺伝子によって異なり、抗酸化作用のあるビタミンEの保護効果も遺伝子変異によって異なった。このように、同じ網膜色素変性であっても、原因遺伝子によってアポトーシスの機序が異なり、薬剤の効果も異なることがiPS細胞によって確認された。上記のような薬剤効果判定システムが簡便に安価に可能となれば個別医療へとつながる可能性がある。

【当日のプログラム・抄録集より転載】

\* 理化学研究所発生再生科学総合研究センター  
〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2-2-3



〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都  
シンポジウム3:細胞治療

## 4. iPS細胞研究の現状と課題

青井 貴之\*

### 1. はじめに

人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem, iPS) 細胞は、体細胞に少数の因子を導入して樹立される多能性幹細胞である。これは、既知の因子により体細胞を初期化することができるという、基礎生物学における重大なインパクトを持つとともに、その種々の応用により研究・開発・医療に新たな方法をもたらすものとして大きく注目されている。iPS細胞は、ES細胞と同様に分化多能性と自己複製能を有している。一方、ES細胞が受精卵から樹立されるのに対し、iPS細胞は体細胞から樹立するという違いがあるが、このことは、胚の滅失という倫理的問題の回避に加え、個性の明らかにされているさまざまな個人に由来する多能性幹細胞が樹立可能であることを意味する。ここでいう個性とは、人種や性別といった遺伝的背景であり、また、何らかの遺伝性疾患を有しているか否かであり、さらには、移植免疫に関わるHLAタイプなどである。このことから、iPS細胞の応用法として、その開発の原点となった「自己由来の多能性幹細胞による再生医療」というモデルのみならず、他家移植も含む再生医療や創薬、病態研究等への幅広い展開が期待されている。

### 2. iPS細胞の応用方法

従来、創薬における毒性等の試験はおもに動物を用いて行われ、実際のヒトに投与する臨床試験を行う前にヒト細胞を用いた検討を行うには、初代培養細胞を用いた検討のみが可能であって、これは使用できる細胞数が限定的であるし、さまざまな遺伝的背景の各種初代培養細胞を揃えることは困難である。薬剤の副作用は遺伝的背景によって異なるものがあることから、種々の遺伝的背景を有するiPS細胞から目的の細胞を大量に作製して試験に用いることは有用であろう。また、何らかの遺伝性疾患を有する患者の体細胞からiPS細胞を作製し、その疾患の標的細胞を作製し病態を再現することができれば、その病態の解明に大きく資する可能性が考えられるし、そうして得られた細胞を用いた薬剤スクリーニングなどにより、治療法の開発が可

能となる。たとえば、心筋が侵される疾患の患者から心筋を多量に採取して実験に用いることは不可能であるが、その患者の皮膚等の組織を僅かに採取し、そこからiPS細胞を経て心筋細胞を作りさまざまな実験に供することは、すでに現実の技術となっている。現在、薬剤の候補となる多数の化合物からなるライブラリーをさまざまな研究機関や企業が保有しており、一方で、細胞培養工程等の自動化により、これらライブラリーを用いたハイスループット・スクリーニングを可能とする技術もすでに稼働している。iPS細胞の医療における具体的成果は、まず初めにこうした手法による創薬、とくに、何らかの遺伝子異常による単因子疾患に有効な薬剤の同定という形で出てくるものと筆者は考えている。

iPS細胞を用いた細胞移植治療については、上述の病態研究や創薬に比べて実施には時間を要すると考えられるものの、その実現に向けた積極的な取り組みは続いている。

### 3. iPS細胞研究の現状と課題

iPS細胞をさまざまな分野に真に役立てるためには、我々は品質の安定性や、感染や造腫瘍のリスクなどを制御しなければならない。このためには、iPS細胞を用いた細胞移植に特徴のないいくつかの点に留意する必要がある。

#### 1) iPS細胞における2つの多様性

##### ① 樹立法の多様性

iPS細胞とES細胞との比較において、上で述べた点に加え、もうひとつ重要な相違点がある。それは、その樹立法について、ES細胞は基本的には受精卵を培養するという1つの方法であるのに対し、iPS細胞では樹立法が多様であるということがある。最初に報告されたiPS細胞は、線維芽細胞をその由来とし、4つの転写因子を、レトロウイルスベクターを用いて導入することで樹立された。その後、現在に至るまでに、由来細胞、導入因子、因子導入法において、さまざまな手法によるiPS細胞樹立が報告されている。そして、これらの樹立方法の違いは、iPS細胞の性質の違いに繋がることが分かっている。

たとえば、樹立の際にcMycを用いることは、iPS細胞樹立効率を上昇させるとともに、キメラマウスにおけるキ

\* 京都大学 iPS 細胞研究所 規制科学部門  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53



メラ率や生殖細胞へ寄与する能力に対して正の効果がある。一方、cMyc をレトロウイルスベクターで導入することは iPS 細胞のキメラマウスにおける造腫瘍性につながる、すなわち安全性に負の効果があることが分かっている。

ここで注意すべきことは、「よい樹立法」を明らかにするための総合的評価の必要性である。三浦らは、種々の樹立法によるマウス iPS 細胞から *in vitro* で神経分化誘導を行い、これを免疫不全マウスの脳に移植する実験を行った。すべての iPS 細胞株は *in vivo* で神経組織に寄与したが、一部の株では移植片に由来する奇形腫を発症することが分かった。樹立方法と奇形腫発生の有無の関係を検討した結果、由来細胞がそれに大きく関与していることが分かった。一方、意外なことにこの系においては、樹立時における cMyc 導入の有無は結果に影響を与えなかった。

このように、評価方法によって、得られる結果が異なるのである。現在、iPS 細胞の樹立法は、由来細胞、導入因子、因子導入法のそれぞれにおいて多様であり、その組み合わせは膨大なものとなる。また、個々の iPS 細胞の評価には多くのコストがかかる。樹立方法の最適化を目指すには、系統的に選ばれた株のレパートリーを用いて、包括的な評価を、綿密なマネージメントの下に進めることが重要であり、それを可能とする体制整備は急務である。

#### ② クローンごとの多様性

樹立法による多様性に加え、現状の技術では iPS 細胞の株（クローン）ごとの多様性が重大な問題である。たとえ同一のドナーに由来する細胞から、同じ方法、さらには1回の樹立工程で得られる複数の株間でも、クローンごとに性質が異なることが明らかになってきている。その差異を決定づける因子が何であるのかを明らかにし、さらには制御する方法の開発への取組みが盛んに行われているが、現時点では未解決である。

#### 2) クローン選抜の重要性

iPS 細胞は同一の作製方法、同一の作製工程で樹立されたクローンであってもその質が多様である現状において取るべき方策は、質の良いクローンを選抜する方法を確立することである。iPS 細胞は自己複製能、すなわち「同じ性質を保ったまま無限に増殖する性質」を有しているので、いったん良いクローンを選抜できれば、それを多量に増やして用いることが、現実的な対応である。実際、種々の評価法において、「良い」クローン、「悪い」クローンは各々、再現性をもって同様の結果を示すことが観察されている。

#### 3) 「良いクローン」とは何か

では、「良いクローン」とはいかなるものであろうか。iPS 細胞はそもそも通常の発生過程には存在しない人工的

な細胞であり、「本来あるべき姿」というものがあるわけではない。多能性幹細胞の維持機構等の基礎的研究を別にすれば、iPS 細胞は未分化状態のままに用いられることはなく、何らかの細胞に分化させて有用性を発揮するものである。すなわち、iPS 細胞は最終的な目的の細胞からみると、材料であるともいえる。したがって、応用の立場からみれば、種々の応用への目的に照らして、その材料とするのに適した iPS 細胞であることをもって「良いクローン」と言えるのである。

#### 4) 現状における2つの方策

このような現状において、考えられる方策は2つある。

第1に少数の「選りすぐり」そして「汎用性の高い」クローンをできるだけ広く有効に活用することである。たとえば、細胞移植に用いるならば、HLA3座(A, B, DR)がホモのドナーから樹立した iPS 細胞のうち、再生医療のターゲットとして有望な細胞への分化能力が高い iPS 細胞クローンとそこからの分化細胞を多量にストックし、供給できる体制を構築することが考えられている。クローン選抜に費やすコストや時間を鑑みたとき、HLA が適合する iPS 細胞を用いた他家移植は現実的に有力なモデルと考えられる。また、脊髄損傷等、治療が有効な時期が発症後限定される疾患には他家細胞を用いた移植のみが適応となる。

第2の方策としては、分化誘導後、あるいは移植後の振る舞いを反映する、未分化状態における特性（評価項目）を明らかにするものである。これができれば、クローン選抜の効率を大幅に上昇させることができ、自家 iPS 細胞を用いた再生医療をより安全に行う道も開かれ、さらに、「良いクローン」を増幅する際に「良い状態」を保ってそれを行うことができているかの有効な指標ともなる。このことは、応用面からみた iPS 細胞研究の現時点での最も重要な課題の1つといえるだろう。

#### 4. おわりに

iPS 細胞が誕生してからわずか数年の間に、それに関連する研究は急速な進歩を遂げている。これは、iPS 細胞を用いてのみ成し得ると考えられることへのニーズの大きさとともに、ES 細胞研究等、過去の知見の蓄積が強力な基盤となっていることによる。関連する種々の科学技術の導入のみならず、規制の枠組みや社会・倫理的問題への対応なども含め、横断的、融合的に取り組むことが、iPS 細胞を1日も早く、有効に社会に役立てるためにますます重要となっている。

## III. 臨床応用の進歩

## 大腿骨頭無腐性壊死症に対する細胞治療

戸口田淳也<sup>1</sup> 青山朋樹<sup>2</sup> 後藤公志<sup>3</sup>  
柿木良介<sup>3</sup> 笠井泰成<sup>4</sup>

## Cell therapy for aseptic necrosis of femoral head

<sup>1</sup>Junya Toguchida, <sup>2</sup>Tomoki Aoyama, <sup>3</sup>Koji Goto, <sup>3</sup>Ryosuke Kakinoki, <sup>4</sup>Yasunari Kasai

<sup>1</sup>Department of Tissue Regeneration, Institute for  
Frontier Medical Sciences, Kyoto University

<sup>2</sup>Human Health Sciences, <sup>3</sup>Department of Orthopaedic Surgery,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

<sup>4</sup>Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital

## Abstract

As the clinical application of mesenchymal stem cell(MSC), we have engaged in the development of cell transplantation therapy for aseptic necrosis of femoral head. Based on the results obtained by *in vitro* and *in vivo* preclinical experiments, we established the protocol for the clinical trial combining MSC with vascularized bone grafts. The protocol was approved by IRB on November 25, 2007, and the first case was operated on February 22, 2008. Since then 10 cases have been successfully treated and were followed at least 24 months with satisfactory results.

**Key words:** osteonecrosis, mesenchymal stem cell, cell therapy

## はじめに

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は間葉系の種々の細胞に分化する能力をもつ細胞として、機能面から定義されている幹細胞である。密度勾配遠心法を用いた物理的単離法に始まり、特定の細胞表面抗原を用いたソーティングによる分離法、あるいは低酸素、低栄養などの特殊な培養条件による選択(誘導?)法などにより、均一な細胞集団を獲得する試みがなされ、それぞれが機能面からの定義に該当する細胞が得られたと報告されている。これら細胞が、

異なる方法で単離された同一細胞なのか、あるいは類似した機能をもつ異なる細胞なのかなどの疑問については、いまだ結論が得られていない。

一方で、骨髄間質組織あるいは脂肪組織から単離された付着性細胞の集団は‘MSCを含む細胞集団’という概念で、再生医療の細胞源として用いられてきた。‘ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針’(以下、指針と略す)においても、指針の対象となる細胞の定義の中に‘MSCを含む骨髄間質細胞’と明記されている。両者から単離された細胞群が集団として異なる

<sup>1</sup>京都大学再生医科学研究所 組織再生応用分野 <sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 <sup>3</sup>同 整形外科 <sup>4</sup>京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター

ことは明らかであるが、MSCとしての機能をもつ細胞が含まれているという点では共通しており、MSCを用いた臨床研究の多くはいずれかの組織を細胞源として用いている。

著者らはMSCを用いた骨再生医療として、骨髄由来のMSCを用いた大腿骨頭壊死に対する細胞治療の臨床研究を施行した。

本稿では臨床研究に至る工程および臨床研究の内容を紹介し、今後の展望について述べる。

### 1. 治療対象の選定

いうまでもなく細胞治療の実践において最も重要な点是对象疾患の選定である。病態の理解と細胞治療の有効性を支持する理論的裏づけ、新規性に伴う危険性、医療経済的な観点からの妥当性など、幾つかのキーとなる点を考慮しなければならない。著者らは、骨壊死を対象として選定した。骨壊死の病因・病態は様々であるが、基本的には、局所の血行不全による細胞死から始まり、そのための荷重によるmicrofracture後の修復能の低下、その結果の部分的な海綿骨の消失とそれによる力学的脆弱部位の発生、そして関節面の陥没へと至る。この過程はある程度可逆的なものであり、壊死巣が発生しても、陥没変形に至る前に修復機転が作用すれば、治癒しうる。ゆえに細胞治療の適応に関しては病期の選定も重要である。壊死発生から修復期に至るStage 1から2では、単純な免荷でも治癒しうる。しかし陥没変形が始まったStage 3では、一般に病態は進行性であり、関節軟骨の変性、すなわち関節症変化が認められるStage 4へと移行する症例が多い。つまり、細胞治療を応用するとすれば、Stage 3が対象となる。

### 2. 現行の治療法との比較検討

Stage 3の病態に対する現行の治療法は、病型、すなわち壊死巣の範囲によって異なる。壊死領域が比較的限定されている場合、陥没変形の進行を阻止できれば壊死部は修復されるという理論に基づいて、壊死部を荷重から避け、非壊死部を荷重部とする大腿骨頭回転骨切り術が

行われる。当然非壊死領域がほとんどないような場合には適応がない。そのような場合、壊死部を積極的に修復するという発想から、血管柄付き骨移植術が行われている。この治療法は、血行再建と骨形成能を有する細胞の局所への供給という点で、理に合った治療法であるが、壊死が広範な場合は、修復過程が遅延し、結果的にStageが進行することがある。著者らはこの血管柄付き骨移植術を基盤として、新規治療法の開発を試みた。

### 3. 細胞源としての骨髄間質細胞の培養実験

まずヒト骨髄間質細胞の初代培養実験を行った。腸骨よりの骨移植術を予定された患者より、倫理委員会に承認された説明書に基づいて同意を取得し、採骨部より骨髄液を採取し、細胞培養実験を行った。この実験において種々の骨髄液からの単離法を検討し、最終的にはCatersonらが報告したシヨ糖密度勾配遠心媒体などを用いない比較的簡便な分離法<sup>1)</sup>を若干改変した方法を採用することとした<sup>2)</sup>。まず骨髄液に等量の培地を加え、250gという低速度で5分間遠心分離を行う。最上層の脂肪成分を除去し、上清および血球成分との境界面にあるバッフィーコート回収する。この操作を2回繰り返す。間葉系幹細胞を含む核細胞懸濁液とする。この方法で回収した細胞を用いて、骨、軟骨および脂肪細胞への分化誘導実験を行い、分化能を確認した。これらの実験は仔牛血清を用いて行ったが、同時に成人ヒト血清を用いた培養が可能かどうかについても検討し、増殖能および増殖した細胞の分化能において遜色ないものであることを確認した。

### 4. 前臨床試験としての動物モデル治療実験

次に考案した細胞移植治療の有効性と安全性を動物実験により検証した。幾つかの大腿骨頭壊死症動物モデルが作製されているが、前臨床試験としては大型動物のデータが望ましいこと、細胞治療の効果判定のためには、均一な病態が

表1 臨床研究に至る工程

ヒト細胞を用いた基礎実験	平成15年8月～
病態モデル動物を用いた治療実験	平成16年4月～
多部局共同臨床試験体制の確立	平成17年3月～
臨床研究計画書・概要書の作成	平成18年4月～
京都大学医の倫理委員会への申請	平成18年7月12日
‘ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針’施行	平成18年9月1日
京都大学医の倫理委員会への審査終了	平成19年3月5日
厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会の審査終了	平成19年8月29日
厚生労働大臣による承認	平成19年10月25日
京都大学医の倫理委員会の最終承認	平成19年11月25日
大腿骨頭壊死・第1例登録(試験開始)	平成19年11月31日
第1例移植手術	平成20年2月22日

必要であることなどを考慮し、液体窒素処理により内部を無細胞化したイヌの月状舟状骨を壊死骨として治療することとした。そこへ、同一イヌからあらかじめ採取して培養したMSCを移植した。移植に際しては、直前に人工骨である $\beta$ -TCPと混合して、複合体として移植することで細胞の漏出を防いだ。結果として、対照として用いた皮膚線維芽細胞を移植した群では、 $\beta$ -TCPが残存し、陥没変形が生じたのに対し、MSC移植群では良好な骨再生像が得られ、変形の発生も認めなかった<sup>3)</sup>。

### 5. 臨床研究遂行体制の構築

前臨床試験で有効性を示す結果が得られたことから、臨床研究に進むための体制を構築した。まず最も重要な京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター(CCMT)における無菌培養のトレーニングを開始し、同時に標準手順書(SOP)の作成に着手した。製品としての細胞の概要書、試験計画書、被験者への説明書、同意書などの書類の作成にあたっては探索医療センターの支援を仰いだ。

### 6. 臨床研究の申請・承認

‘大腿骨頭無腐性壊死患者に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討’と題した臨床研究を、平成18年7月に京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院医の倫理委員会に申請し、平成19年3月にその承認を受けた後、厚生科学審議会における

‘ヒト幹細胞臨床研究に関する倫理委員会’の審査を経て、最終的に平成19年11月25日に承認を得た。そして‘ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針’に沿った国内初の臨床研究として、京都大学医学部附属病院において平成20年2月22日に第1例の移植手術を施行した(ここまでの経過を表1に示す)。

### 7. 臨床研究計画の概要

臨床研究は試験登録、血清採取、細胞採取および培養、移植手術、経過観察、成績評価のステップから構成される(図1)。試験登録後、細胞培養用の血清調製のために全血採血を2回実施する。次に附属病院デイ・サージェリー診療部(DSU)において腸骨より骨髓液を採取し、CCMTに搬送し、骨髓液からMSCを分離し、自己血清を用いて1-2週間の体外培養を行う。目的の細胞数まで増殖させた後、いったん凍結し、手術日より4日前に解凍して移植に向けて再度培養する。移植手術では、大腿骨頭内の骨壊死部を搔爬した後に $\beta$ -TCPと混合したMSCを移植し、更に腸骨よりの血管柄付き骨移植を併用し、血行を再建する。術後3カ月より全荷重歩行を開始し、定期的に診察および画像検査を行い、最終的には術後2年での成績で治療効果を判定する。

#### a. 試験登録

整形外科外来に細胞移植外来を設置し、候補者が適応基準を満たしているかを検討し、有資格者に対して臨床研究コーディネーターとともに

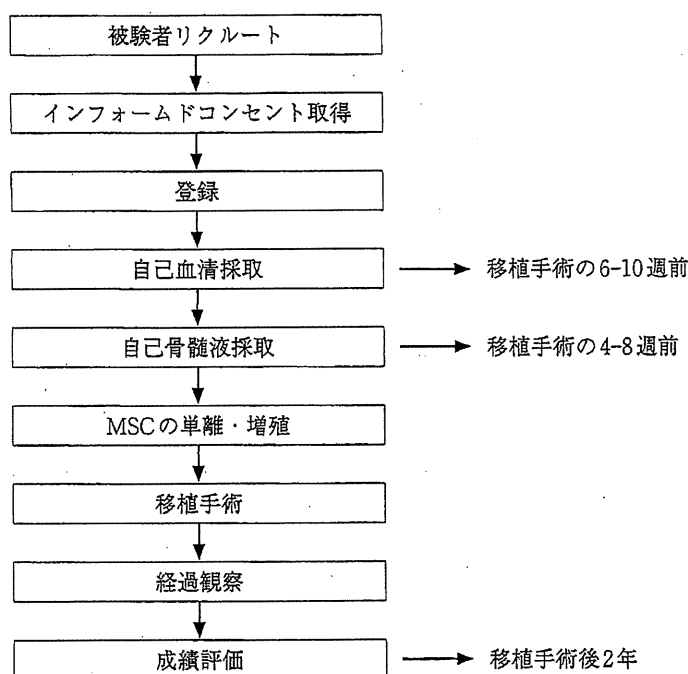


図1 臨床試験のスケジュール概要

に承認された書類に基づいて試験内容を説明し、同意書を取得する。

#### b. 血清採取

附属病院輸血治療部において細胞培養に使用する自己血清の調製を行う。採血当日ヘモグロビン濃度が基準値内であることを確認後、400 mLの採血を行う。採取した血液はCCMTに搬送し、同センター内にて約12時間振盪して十分に凝固させる。大型遠心分離機で採血バッグのまま遠心分離を行う。上清を回収し、再び遠心分離後、血清を採取分注後、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存する。

#### c. 細胞採取および培養

DSUにおいて全身麻酔下に腸骨より骨髓液を採取しCCMT内へ搬送後、細胞調製室でMSCの分離を行う。培養皿に播種し10%自己血清を含む培地を用いて培養を行う。経時的に細胞数計測用培養皿の細胞数を計測することで、本培養の細胞数を概算し、目的の細胞数に達したと判断した後、動物由来およびヒト由来原料不含の細胞解離剤を使用して、細胞を剥離・回収し、細胞凍結保護液を用いてプログラムフリーザーで凍結する。凍結までの培養に要した日

数は $9.6 \pm 2.3$ 日であった。

以上の培養工程において、細胞の安全性試験としては、培地交換作業後に回収された培養液について、エンドトキシン量の測定および無菌試験(一般細菌、真菌、マイコプラズマなど)を実施した。

最終的に使用する細胞の出荷時の判定は生細胞数( $5 \times 10^7$ 個以上)、エンドトキシン量( $0.0078 \text{ EU/mL}$ 以下)およびグラム染色による無菌性(陰性)を用いた。出荷判定には用いることができないが、最終細胞の一部を用いて染色体検査および免疫不全マウスへの移植による形質転換の判定を行った。

#### d. 移植手術

大腿前面から大腿骨に至るアプローチで、頸部を開窓し、そこから病巣部を透視下に搔爬した後に、MSC(約 $1 \times 10^8$ 個)を $\beta$ -TCP(約5g)と混合し移植した。その後、同側の腸骨より採取した血管柄付き腸骨を移植した(図2)。

#### e. 経過観察および成績評価

術後は、徐々に荷重をかけ、術後3カ月で全荷重歩行を許可した。定期的にX-pおよびCT撮像を行い、画像所見および骨量を測定し、

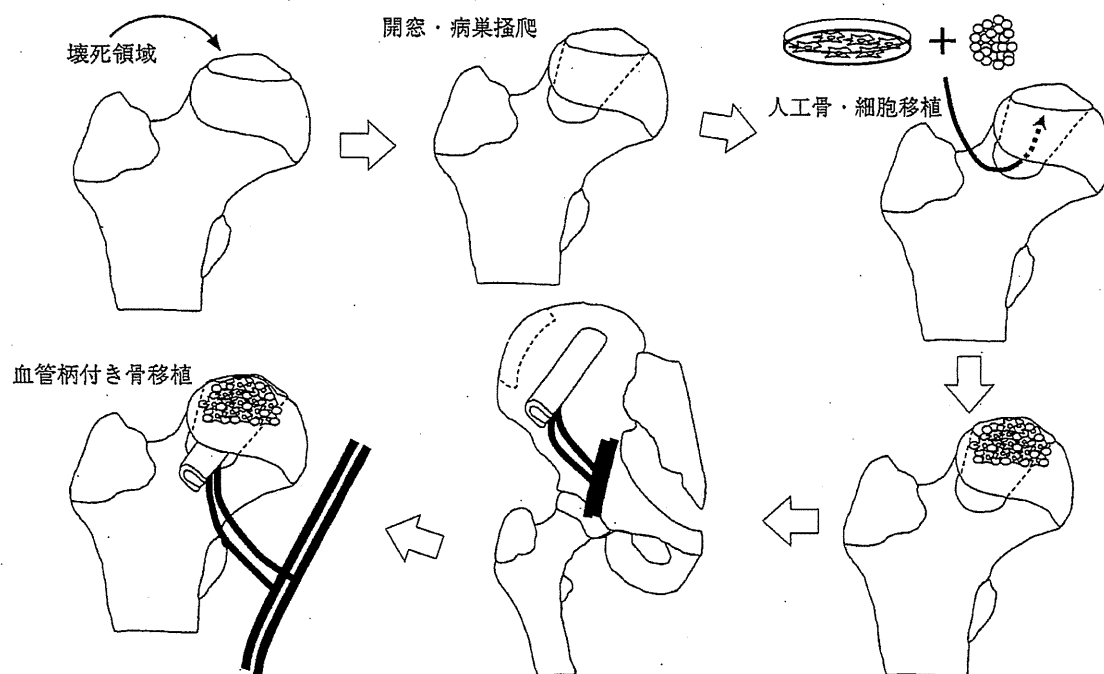


図2 移植手術概要

Stageの進行の有無および日整会股関節機能評価法による機能評価を行った。最終的には術後2年の時点での病期の進行の有無、骨量および臨床所見の評価で治療法の有効性を判定する予定である。

### 8. 考 察

京都大学医学部附属病院における最初の骨再生医療として施行した10例は、細胞培養、移植手術、そしてその後の経過においても、特に大きな有害事象もなく施行することができた。現在最終的な治療成績を検討中であり、有効と判定できる結果が得られれば、次のステップとして先進医療へと進む予定である。

もちろん著者らは今回の治療法が大腿骨頭壊死に対する細胞治療の方法として、ベストのものであるとは考えておらず、幾つかの改善すべき点を有していると認識している。

#### a. 細胞に関して

今回用いた細胞は、比較的シンプルな方法によって単離された細胞群であり、当然異なる機能をもった細胞の集団である。このようなヘテロの集団を用いるべきなのか、あるいはより均

一な細胞とすべきなのか、移植治療という観点から考えるといまだ結論が出ない。また分化させた細胞を用いるべきなのか、未分化な状態のままの細胞を用いるべきのかも論議のあるところである。

#### b. 培養に関して

まず培養面では、自己血清を用いたが、他家の血清での実験でも良好な成績が得られた。他家血清はいわば輸血と同等であると評価できれば、他家、最終的には無血清培地での培養法の開発が望まれる。

#### c. 手術に関して

更に、血管柄付き骨移植術は、血行再建のみならず、生きた骨を同時に供給できるという点で、極めて有力な方法ではあるが、同時に侵襲を伴う治療法であることも事実である。また将来的に大腿骨頭以外の骨壊死に対してもこの方法を応用する際に、解剖学的に適切な血管柄付き骨が採取できない部位には応用できない。ミクロなレベルの血行再建を促すという観点からの血管増殖作用をもつ因子の供給などの新たなアプローチが必要であると考えている。

### おわりに

細胞治療は、大きな可能性をもった治療であると同時に、未知・不確定な部分を含んだ治療でもある。科学的根拠を伴わないにもかかわらず、過大な期待を抱かせる治療が横行している現況に対して、再生医療学会などより警鐘が鳴らされている。著者らも、自らの治療や臨床研

究の結果を謙虚に把握し、改善を重ねて次のステップに進むという姿勢を堅持していきたいと考えている。

謝辞 臨床試験を遂行するにおいて、多大なる協力をいただいた探索医療センターをはじめとする医学部附属病院の関連部局の方々に深謝します。

### ■ 文 献

- 1) Catersón EJ, et al: Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 20: 245-256, 2002.
- 2) Shibata KR, et al: Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells, and potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells* 25: 2371-2382, 2007.
- 3) Ikeguchi R, et al: Regeneration of osteonecrosis of canine scapho-lunate using bone marrow stromal cells: possible therapeutic approach for Kienböck disease. *Cell Transplant* 15: 411-422, 2006.



