

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¹ 青山朋樹² 後藤公志³
柿木良介³ 笠井泰成⁴

Cell therapy for aseptic necrosis of femoral head

¹Junya Toguchida, ²Tomoki Aoyama, ³Koji Goto, ³Ryosuke Kakinoki, ⁴Yasunari Kasai

¹Department of Tissue Regeneration, Institute for

Frontier Medical Sciences, Kyoto University

²Human Health Sciences, ³Department of Orthopaedic Surgery,

Graduate School of Medicine, Kyoto University

⁴Center 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

¹京都大学再生医科学研究所 組織再生応用分野 ²京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 ³同 整形外科 ⁴京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は対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、理に適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らが報告したショ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¹⁾を若干改変した方法を採用することとした²⁾。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パuffyコート³⁾を回収する。この操作を2回繰り返す。間葉系幹細胞を含む有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 β -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、 β -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³⁾。

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 β -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

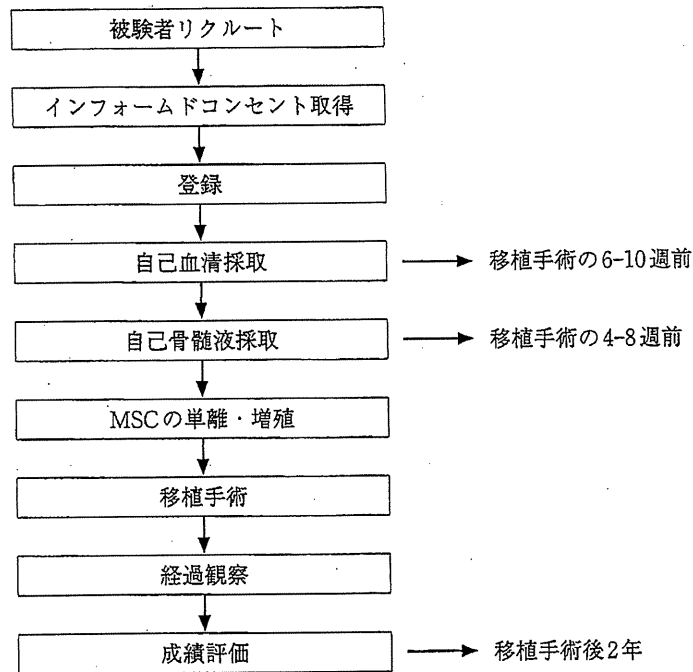


図1 臨床試験のスケジュール概要

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°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髄液を採取し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 ± 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(5×10^7 個以上)、エンドトキシン量(0.0078 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 1×10^8 個)を β -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、

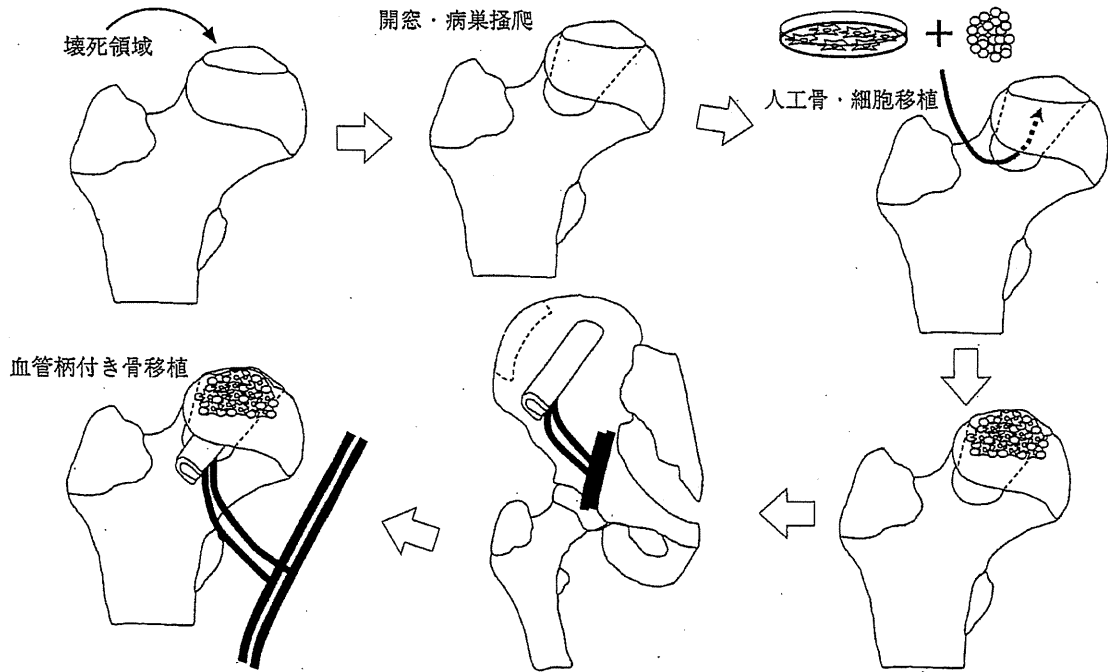


図2 移植手術概要

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な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) Caterson 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.

