

201206004A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成25（2013）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	-----	11
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	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	35

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。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33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、12名が候補として選択された。症例検討会にて8名が承認され、これまでに7名に対して細胞移植が行われた。5名については骨生検を終了し、全例で骨再生を認めた。

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

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。

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。歯槽骨の再生が必要となる患者は、国内だけでも年間7-10万人

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)

井上実 (プロジェクトマネージャー)

- ・細胞リソースセンター、セルプロセッシング

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

河野 美那子 (研究協力者)

藤原紀子 (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（研究協力者）

2. 研究計画

①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23年3月15日に厚生労働省より承認を得た。被験者の募集は厚生労働省の承認から4年間、経過観察は細胞移植後2年間である。

②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相臨床研究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相臨床研究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相臨床研究

移植5週前に培養用血清のための末梢血採血及び骨髓血採取し、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、 β -TCP顆粒上に細胞を播種し、翌日よりデキサメタゾン、 β 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4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

・本臨床研究期間中に発現した有害事象の種類別の有無。

2) 効果評価

・骨生検における骨形態計測量（移植後16週後）

測定方法：骨生検で得られた組織から非脱灰標本を作製しVillanueva-Goldner染色を施した後、任意の10視野における単位面積あたりの新生骨面積、残留 β TCP面積、骨髓腔面積、線維性結合組織面積を算定したものを平均し、それぞれ新生骨量、残留 β TCP量、骨髓腔量、線維性結合組織量とする。

・頭部CT撮影画像から得られた骨形成量（移植後3か月、6か月、12か月、24か月）

測定方法：骨量解析ソフトを用いてCTデータを解析し、培養骨移植部の新生骨体積を測定して、骨形成量とする。また、インプラント埋入予定部位の骨高径を計測する。

・インプラントのオッセオインテグレーション

2次手術時にインプラント骨へのインテグレーションを確認し、インテグレーションが得られていないインプラント数を記録する。

・インプラントの脱落

オッセオインテグレーションが得られたインプラントについて、細胞移植後2年までの経過観察期間中に見られたインプラントの脱落数について記録する。

（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はらう。

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。

③臨床的課題に対する基礎的検討

骨再生については、細胞の種差による問題からヒト細胞を用いた実験が必須である。しかしながらそのためには免疫不全動物の使用が不可欠であり、炎症や免疫による骨再生への影響を検討することが困難であった。臨床では移植手術による炎症や免疫系細胞の骨再生への影響が考えられ、個体差の原因の一つとなっている可能性がある。われわれは、免疫不全および免疫正常マウスを用いた骨再生モデルとして、マウス脛骨由来骨芽細胞の抽出、培養およびキャラクタライズを行った。

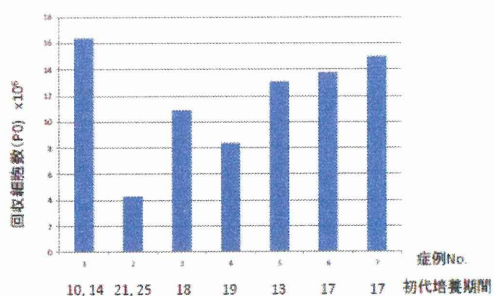
C. 研究結果

1. 臨床研究実施経過

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後、臨床研究を開始した。

これまでに第I相臨床研究として38名のスクリーニングを行い、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、12名が候補として選択された。症例検討会にて8名が承認され、うち7名への細胞移植を行った。また、7名中5例では骨生検とインプラント埋入を終了している。1例については培養初期に細胞増殖が不良であったが、最終的に必要細胞数を得ることが可能であった。その他の症例では安定した細胞培養が可能であった。



分化の指標であるALP Indexについては、平均2.66(1.25-8.13)(基準値1.0以上)であり、全例で基準値を満たしていた。

また、7名12か所への移植が行われた

が、部位あたりの平均移植予定量1.6ml、βTCP量として1名あたり1.45gであった。

2. 安全性に関する検討

- ・無菌検査：7例全例で陰性
- ・マイコプラズマ：PCR法、蛍光染色法ともに7例全例で陰性
- ・エンドトキシン検査：7例全例で陰性

現在まで細胞移植が行われた7症例においては、感染など品質管理上の問題は生じていない。

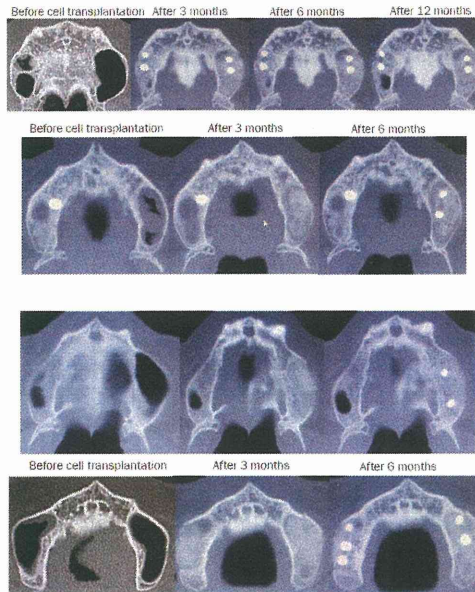
・有害事象について：I-15-5症例において、細胞移植3日目に片側の頬部の腫脹が認められた。瀰漫性の腫脹であったが膿瘍の形成はなく、抗菌薬の投与により3日程度で消退した。移植物に対する無菌検査では陰性であることが確認されたため、術後に生じた感染の可能性が考えられた。消炎後症状の再燃はなく、細胞移植後4か月時における同部の骨生検では骨再生が得られていた。また、手術時に局所の炎症や感染など異常所見は認められず、インプラント埋入を行うことが可能であった。その他の症例において、細胞移植に関連する有害事象や安全上の問題は生じていない。

3. 治療効果に関する検討

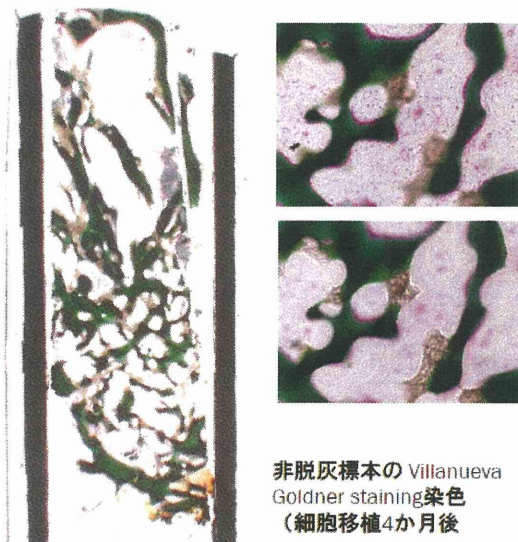
細胞移植の効果については、現在までに骨生検とインプラント埋入を行った5例全例で骨再生が認められた。

インプラント埋入後6か月が経過した2例についてインプラント2次手術が行われた。

移植後CTによる12週後の計測では、4症例6部位において1.66mlの骨再生量であった。



CTでは術後上顎洞の炎症は認められず、再生骨は徐々に周囲骨と一体化していた。

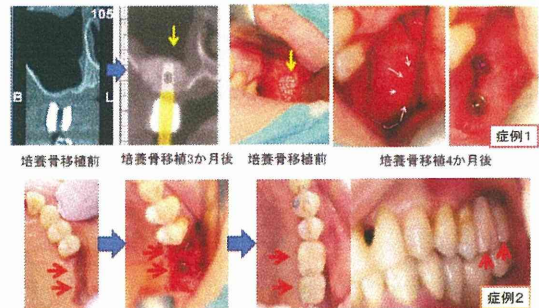


非脱灰標本の Villanueva Goldner staining染色 (細胞移植4か月後)

再生骨の組織学的評価では、比較的成熟した骨による骨梁が認められた。

2次手術が行われた2症例について、インプラントの脱落は認めず、インテグレーションが得られていた。症例2

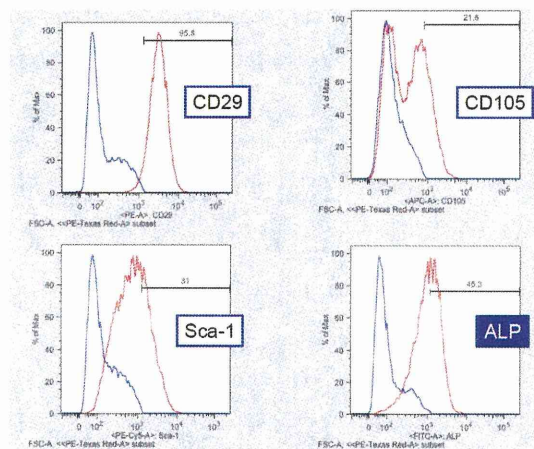
については上部構造の仮着を行い、咀嚼力の改善がみられている。



4. 骨再生治療の改良に関する基礎的検討

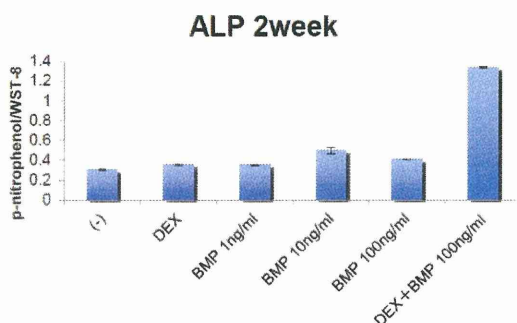
これまでのヒト細胞を用いた骨再生条件の検討にはBALB/C AJc1 nu/nuを用いているため、今回BALB/c AJc1を正常免疫動物における骨再生モデルとして使用することとした。

マウス骨髄間質細胞はヒトやラット骨髄間質細胞と異なり、安定して増殖することが困難である。また、近年皮質骨中に存在する間葉系幹細胞が優れた細胞源であることが報告されている。そこでわれわれは、マウス皮質骨中に存在する間葉系幹細胞を抽出し、培養とキャラクタライズを行った。

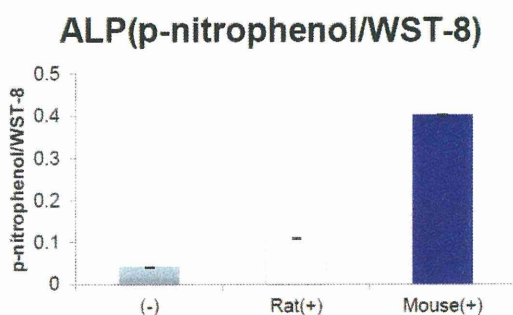


得られた細胞には、骨髄間質細胞と同様に間葉系幹細胞マーカー陽性の細

胞と骨分化マーカー陽性の細胞が認められた。また、この細胞は安定して増殖可能であり、マウスMSCと同様に、BMP-2とDEXとの併用にて骨分化を示す。



さらに、ラット骨髄間質細胞と比較しても、高いALP活性を示すことが明らかとなった。



また、BALB/c AJc1 および nu/nu への移植によって骨再生が得られることを確認した。

D. 考察

1. 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ため、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8例について培養を行い、全例において必要な細胞数を得ることが可能であり、骨分化も確認された。臨床効果については今後の検討が必要であるが、

本プロトコルは、骨再生目的の骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）の標準的細胞調製法となることが期待される。

2. 臨床研究のこれまでの結果について

本研究では、先行臨床研究と比較して早期（細胞移植後6か月から4か月）にて再生骨の評価を行っている。同時にインプラント埋入を行うが、その時点では5例全例で骨再生が得られ、インプラントの初期固定を得ることができた。今後の症例についてはさらなる検討が必要であるが、これまでのところ安定した骨再生が得られており、骨再生治療としては有用と考えられた。

再生骨に関する組織学的評価では、非脱灰標本を用いて成熟骨と幼弱な骨とを区別している。これまでの標本では、比較的成熟した骨が多く、早期の骨化が認められた。

一方、先行臨床研究の結果と同様に、得られた骨梁は周囲骨とは異なり、また人工骨の吸収割合も症例による差異が認められた。骨再生の個体差については、今後標本を用いて検討を行う必要がある。

本研究においては、細胞を用いた骨再生治療体制の整備として、病院内への歯科の新設や関連施設とのネットワーク構築、試料保管のための東京大学医科学研究所内への細胞リソースセンター内細胞保管部門の新設などを行ってきた。今後骨再生治療の普及に関しては、これらの基盤設備を活用することで、普及を側面からサポートすることが可能な体制となっている。

3. 今後の課題について

プロトコルについては実用化に向けて改善されているが、細胞増殖速度や初代培養

におけるコロニー数など個体差が完全に解消されてはいない。また、臨床的な骨再生には、手術方法や術後の管理、個々の患者の状況などさまざまな要因の影響を受けるものと考えられる。今後は、臨床研究のデータを蓄積することで、個体差に関してさらに情報を集めることが重要と思われた。また、骨再生のメカニズムについても基礎的検討を行うことで、安定した治療効果につながることを期待される

E. 結論

細胞移植によって骨再生については良好な経過が得られている。また、移植材料の安全性についても問題は生じていない。今後のエンドポイントにおける評価において有用性が示されれば、実用化に向けた体制へとつながるものと考えられる。

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

1. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. Plos One in press.
2. 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 Aug;14(7):791-801. Epub 2012 Apr 12.

3. Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Yamawaki-Ogata A, Sumita Y, Wadagaki R, Narita Y, Agata H, Kagami H, Ueda M. Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendo/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells. Oral Dis 2012 Mar;18(2):206-12
4. Agata H, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. Histol Histopathol in press <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629696>.

2. 学会発表

1. Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Thursday, February 28, 2013 Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, NIDCR, NIH
2. 各務秀明、縣秀樹、住田吉慶、朝比奈泉 歯槽骨・唾液腺の再生研究今後の展開 第12回日本再生医療学会総会シンポジウム 5「歯科における再生医療の将来 2013.3.19-21 横浜
3. 各務秀明 「骨再生医療の現状と展望について」第57回日本口腔外科学会総

- 会・学術大会 シンポジウム I 歯・
歯周組織・骨の再生医療 2012.10.19-21
横浜
4. 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 2012.2.18、東京大学医学部附属病院
 5. 各務秀明 「再生医療における品質管理の課題:歯槽骨再生治療について」日本臨床試験研究会第3回学術集会総会分科会:再生医療 「再生医療と規制」 2012.2.24 福岡国際会議場 第1会場 501室
 6. 各務秀明 「骨髄細胞を用いた骨再生とインプラント治療」バイオインテグレーション学会第2回学術大会・総会 東京医科歯科大学 2012.1.29
 7. 堀 暁子、縣 秀樹、山崎 美香、上嶋 伸知、東條 有伸、各務 秀明 放射線性唾液腺萎縮の *in vitro* モデルに関する検討 第11回日本再生医療学会総会 2012.6.12
 8. 山崎 美香、縣 秀樹、上原 真理子、堀 暁子、住田 吉慶、東條 有伸、各務 秀明 Osteogenic characteristics of rat BMSCs isolated from untreated, hemolyzed, or Ficoll-treated marrow. 第11回日本再生医療学会総会 2012.6.12
 9. 丸川和也、高橋美穂、堂東亮輔、丹羽 崇、高田匡基、李 憲起、篠原 淳、各務秀明、上松隆司 唾液腺癌の抗癌剤耐性獲得機構—GST-pi/MRPの誘導により多剤耐性形質を獲得する—: 第37回日本口腔外科学会中部地方会(金沢) 2012.6.2
 10. Marukawa K, Takahashi M, Niwa T, Akita D, Chihara T, Shinohara A, Kagami H, Uematsu T. Acquisition of multidrug resistance in salivary gland adenocarcinoma cells 第71回日本癌学会学術総会(札幌) 2012.9.20
 11. 丸川和也、高橋美穂、堂東亮輔、丹羽 崇、高田匡基、李 憲起、篠原 淳、各務秀明、上松隆司 唾液腺癌の抗癌剤耐性獲得機構—GST-pi/MRPの誘導により多剤耐性形質を獲得する—第30回日本口腔腫瘍学会総会(大宮) 2012.1.26
 12. 高谷達夫、小林明人、竹中真治、伊藤香那、丸川和也、丹羽 崇、小野裕輔、中山洋子、上松隆司、各務秀明、篠原 淳 低侵襲治療の試み—ビスフォスフォネート骨壊死での腐骨除去法の1例—: 第13回長野口腔外科談話会(松本) 2012.11.10
 13. 千原隆弘、下地茂弘、秋田大輔、岡山政樹、高田匡基、高橋昌宏、李 憲起、中山洋子、上松隆司、各務秀明、篠原 淳 低侵襲治療の試み—顎下腺唾石における開窓自然排出法の1例—: 第13回長野口腔外科談話会(松本) 2012.11.10
 14. 青山祐紀、大澤雅樹、篠原 淳、各務秀明、影山 徹、山田一尋 Rigid External Distraction (RED) Systemによる上顎骨化骨延長術と下顎枝矢状分割骨切術により治療をおこなった重

- 度の骨格性下顎前突症の1例：第75
回松本歯科大学学会（塩尻）2012.12.1
15. 竹中真治，宮下みどり，田口 明，
落合隆永，長谷川博雅，川原一郎，
篠原 淳、各務秀明 皮膚への開口
を伴う異所性耳下腺管の1例：第75
回松本歯科大学学会（塩尻）2012.12.1
16. 小林明人，深山 実，竹中真治，千原
隆弘，岡山政樹，高田匡基，各務秀明，
篠原 淳 ストレプトゾトシン誘発糖尿病
が下顎骨組成に及ぼす影響：第55回
日本口腔科学会中部地方会（長久手）
2012.12.15

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ているが、平成24年度についてもエントリー予定症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。現在までに8例のエントリーが承認されており、この8名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。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差が認められたが、得られる細胞数については徐々に安定化している。昨年度より引き続き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、それぞれの方法によって採取される骨形成性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 – 8 mmのインプラントでも比較的良好的な予後が得られることが明らかになっており²⁷⁾、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。片側の後上腸骨陵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

現在骨髄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髄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。

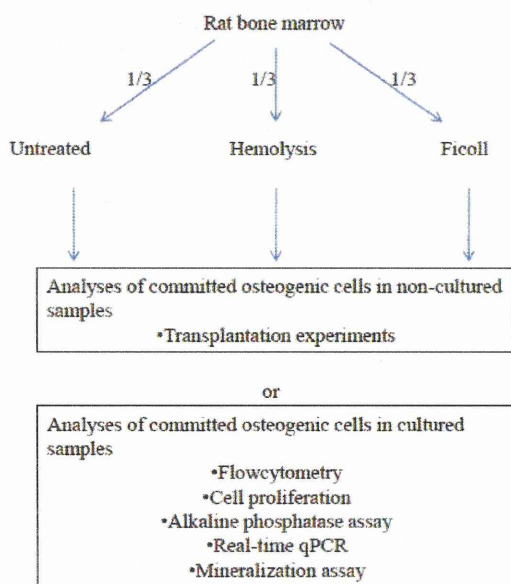
これまで、骨髄液の採取後に間葉系幹細胞を効率的に回収する方法として、培養前に間葉系幹細胞を含む分画を濃縮するいくつかの方法が報告されている。しかしながら、それらの方法が骨形成性細胞の濃縮に

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、ラット骨髄細胞を用いて骨髄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、骨髄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。骨髄細胞を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。

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

平成24年5月以降に追加でスクリーニングを行った中で、これまでに症例検討会にて検討された3例の全身状態について、以下の結果であった。

第6症例：#1 高血圧、#2 前立腺肥大、この他PSA高値にて経過観察中。2010年の生検では悪性所見は認められていない

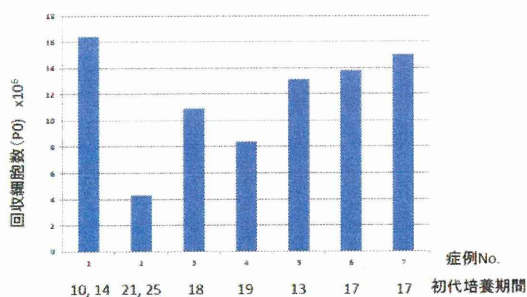
とのことであった。血圧 122/81mmHg、脈拍 90bpm と血圧のコントロールは良好であり、適格として承認された。

第7症例：全顎的な歯周疾患があり、紹介先病院にて管理されている。全身的には特記事項なく、検査値でも異常は認められなかった。適格として承認された。

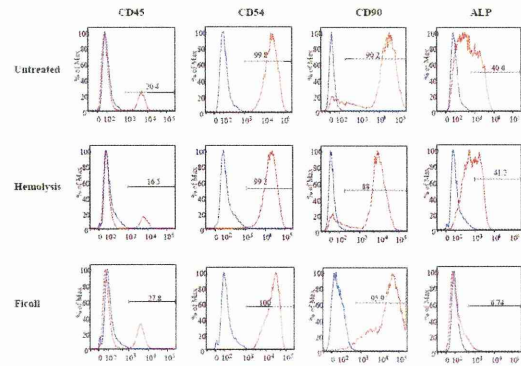
第8症例：既往歴として#1 小腸破裂（19歳時 交通事故による）、#2 帯状疱疹（38歳時 入院、点滴加療）#3 子宮頸癌（40歳時手術）、#4 子宮内膜症、#5 便秘。#3について主治医に対診したところ、2008年に手術済（円錐切除）、上皮内癌で0期のもので根治性は高いと考えられるとのことであった。また、#4に対して子宮内膜症治療薬1錠中 ジエノゲスト 1mgを内服中であり、骨密度への影響が懸念されるとの意見があったため、主治医へ骨密度測定を依頼。異常なしとの報告であった。適格として承認された。

2. 骨髄穿刺

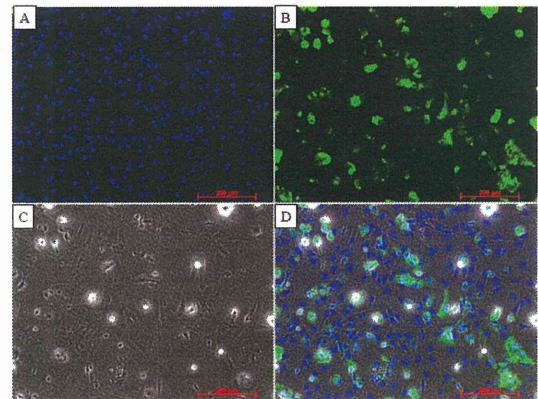
これまで8症例について骨髄穿刺を行った。採取中採取後の全身状態には問題は認められなかった。当初回収細胞数にはばらつきが見られたが、徐々に安定化している。



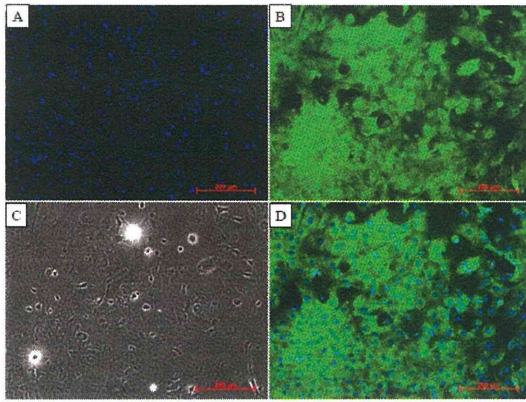
3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討



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ている。一方 CD45 には部分的に陽性の細胞分画が含まれ、CD54 では大半の細胞が陽性であった。CD45 は造血系細胞、あるいは白血球細胞マーカーである。したがって、接着性細胞にみられる CD45 陽性細胞の存在を確認するため、免疫蛍光法による検討を行った。

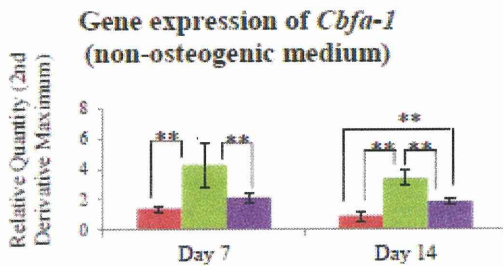
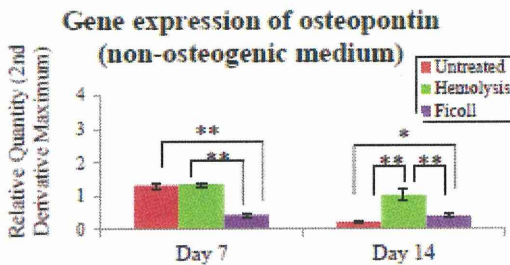


その結果、CD45 陽性細胞はフローサイトメトリー同様に 20%程度に認められ、分布は培養細胞中に拡散していた。



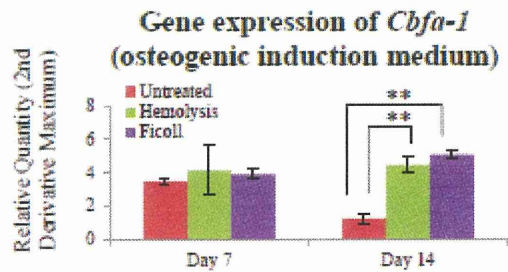
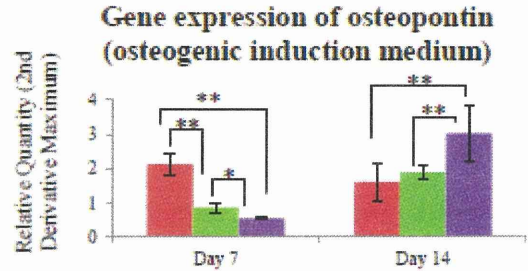
一方、CD54 は、ほぼすべての細胞で陽性であり、フローサイトメトリーの結果を裏付けるものであった。

昨年度の検討から、Ficoll による分離によって分化した骨芽細胞は除去されるため、Ficoll 分離では比較的未分化ではあるが、分化誘導刺激に反応する幹細胞あるいは骨芽細胞の前駆細胞分画が増加することが示唆されている。その結果を裏付けるために、real-time PCR により骨関連マーカーの発現について比較を行った。



非分化誘導培地において、Ficoll による分離では osteopontin の発現は低下していた (Day7)。一方 Day14 では、untreated 群においても osteopontin の発現は低下した。

Cbfa-1 の発現については Ficoll 群、untreated 群とも hemolysis 群と比較して低下していた。



一方分化誘導後 14 日では osteopontin, cbfa-1 とともに Ficoll 群での発現が最も高くなり、ALP assay の結果を裏付けるものであった。

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 8 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 8 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。得られたコロニー数には個体差が大きく見られ、培養に要する期間にも 10 日から 25 日と差が認められたが、P0 における回収細胞数は安定しつつある。骨髄穿刺吸引による細胞採取方法では、採取部位や採取時期によって得られる細胞数に差が生じることが報告されている。穿刺による骨髄採取方法そのものの改良は困難であるため、

培養操作によって回収細胞数を安定化させることが必要である。現在のプロトコルは、一定の細胞数を得るためには有用と考えられた。

3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

安定した細胞数を得るための方法として、骨髄細胞の前処置の有用性は示されなかったが、本研究から骨髄中には比較的分化した骨芽細胞様細胞と未分化な間葉系幹細胞分画が混在することが確認された。臨床においても、これら分化度の異なる細胞の混合物を移植しているものと考えられる。現在のところ分画の違いを考慮したプロトコルを作成することはできていないが、今後の検討課題である。

L. 結論

これまでの研究では、被験者のスクリーニング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。一方骨髄間質細胞中にはさまざまな分化度の細胞が共存しており、骨再生への貢献度など不明な点も多い。今後さらに基礎的検討を行うことで、骨再生治療の基盤の強化を図ることが重要と考えられた。

M. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimar K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with

HTLV-I. **PLoS One**. 2013;8(1):e53728. doi: 10.1371/jour

2. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome (letter to the editor). **Leuk Lymphoma**. 2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
3. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. **Transplant Infectious Disease**. 2012 Dec 20. doi: 10.1111/tid.12038. [Epub ahead of print]
4. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. **Int J Hematol**. 2012 Dec 16. [Epub ahead of print]
5. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone

- marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. **Hemophilia**. 2012 Dec 4. doi: 10.1111/hae.12056. [Epub ahead of print]
6. Chi HT, Ly BT, Kano Y, Tojo A, Watanabe T, Sato Y. ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012 Nov 3. doi:prii: S0006-291X (12)02079-7. 10.1016/j.bbrc.2012.10.087. [Epub ahead of print]
 7. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochiduki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaru, Tojo A, Tsuji K. Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1 Fusion in an Adult Male with Down Syndrome. **Acta Haematol**. 128:242-243, 2012
 8. Oshima Y, Yuji K, Tojo A. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. **New Engl J Med**. 367:1162-3, 2012
 9. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. **Mod Rheumatol**. 2012 Jul 18. [Epub ahead of print] PMID: 22802011
 10. 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**. 14:791-801, 2012
 11. 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-κB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. 109:6584-9, 2012
 12. 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+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. **Int J Hematol**. 95:409-19, 2012
 13. 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
 14. 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