

201306002A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成26（2014）年 5月

別添2

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	-----	15
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	---	23
長村登紀子		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	42

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 25 年度には 7 名のエントリーが承認され、第 1 相として予定された 15 例全例のエントリーが終了した。また、新たに承認された 8 例への培養骨移植を行い、平成 25 年度中に第 I 相 15 例への細胞移植が終了した。これまでに第 I 相 15 例の骨生検とインプラント埋入を行ない、全例で骨再生を確認している。細胞移植に関連が疑われる有害事象は発生しておらず、治療の安全性が示唆された。非脱灰標本を用いた骨占有率の評価では、標本作製が終了した 11 例の平均は 45%であった。これは比較対象である先行臨床研究と比較して同等以上である。また、本臨床研究の課題の一つである個体差については、細胞増殖、骨占有率ともに大幅な改善を認めた。

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

インプラントの埋入が困難な患者が少なくない。歯槽骨再生治療の対象となる患者は、国内だけでも年間 7-10 万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、骨量が不足して

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、早期に先進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、松本歯科大学、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（分担歯科医師）
- ・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
河野美那子（研究協力者）
大和田理代（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）
磯尾直之（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)

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髓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。

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6年間、経過観察は細胞移植後2年間である。

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。

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髓間質細胞の培養、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

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βTCP面積、骨髓腔面積、線繊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βTCP量、骨髓腔量、線繊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。

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。ヒトにおける骨再生のメカニズムの詳細を理解するために、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の確立を行なった。

④自己骨髓由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法の長期経過の検討

平成16年から平成21年まで、当院にて自己骨髓由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法の臨床研究が行われたが、研究期間は細胞移植後2年となっており、その後の長期経過については検討されていない。骨再生治療を確立するためには、再生した骨の長期経過を理解することが重要である。特に、再生された骨の量的変化、周囲骨との関係など、自家骨移植や人工骨のみによる再生との比較を行うことで、自己骨髓細胞由来細胞を用いた骨再生研究の有用性が明らかになると考えられる。

平成16年より平成21年の間に当院で歯槽骨再生の臨床研究に参加され、細胞移植を行った8名のうち、本研究への参加に同意された方とした。参加者への連絡は、医科学研究所内に保管されている連絡先を使用した。連絡がつかない場合は、インプ

ラント上部構造を担当した紹介先医療機関へ依頼し、診察時に本研究への協力の可否を尋ねていただき、協力可能と回答された被験者に対しては連絡先をご提供いただき、直接担当者より連絡することとした。なお、協力が得られない場合、および協力先医療機関への受診もない場合には、本研究の対象には含めない。

・検査項目

- 1) 全身状態の問診
- 2) 培養骨移植部位をパノラマレントゲン撮影
- 3) 培養骨移植部を中心にCT撮影を行う。
- 4) 頭部MRI撮影を行う。

・検査実施時期

臨床研究終了から5年以上経過後に行う。

・検討項目

安全性

治療後の全身状態の異常（臨床研究に関連するかどうかは問はない）を記載する。細胞移植後の局所の異常があれば、記載する

パノラマレントゲン、デンタルレントゲンおよびCTによる骨計測

骨移植部位の骨、特にインプラント周囲骨の状態について確認を行うとともに形態計測を行い、臨床研究中のデータと比較検討を行う。さらに、専用のソフトウェアを用いて、反対側や周囲の正常骨と骨梁パターンの比較を行うことで、その相同性について検討を行う。

CTによる骨量計測

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。先行臨床研究時のデ

ータと比較して、長期経過中の骨量の変化を調べる。特にインプラント周囲や部位別の骨量の変化を計測する。

MRIによる骨質評価

MRI画像により、再生骨および既存骨との骨質に関する比較検討を行う。

ペースメーカーを使用されている場合は金属埋め込みを行っているなど、MRI撮影が禁忌とされている被験者に対しては問診にて確認し、MRI撮影は行わない。

(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。

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。

購入した骨髄については対象外であるが、骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生法に関する基礎的研究については、東京大学医科学研究所倫理委員会およびヒトゲノム倫理委員会における承認を得ている。

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。

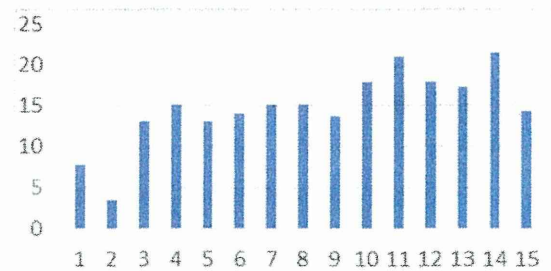
C. 研究結果

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日厚生労働大臣の承認を得た。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。

第I相臨床研究として、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、平成24年度までの8例に加えて平成25年度には7名のエントリーが承認され、第I相予定15例のエントリーが終了した。なお、平成25年度中に8例への培養骨移植を行い、第I相15例への細胞移植が終了した。現在までに15例全例の骨生検を行ない、骨再生を確認した。細胞移植後2年間のフォローアップ期間中であり、第I相臨床研究のエンドポイントとして、安全性と骨再生の程度に関

する評価を行なった。これまでに細胞移植に関連が疑われる有害事象は発生しておらず、治療の安全性が示唆された。また、非脱灰標本を用いた骨占有率の評価では、標本作製が終了した11例の平均は45%であり、比較対象である先行臨床研究と比較して、同等以上と考えられた。また、本臨床研究の課題の一つである個体差については、細胞増殖、骨占有率ともに大幅な改善を認めた。さらに、本研究期間中に先行臨床研究症例の長期フォローアップを行ない、5年以上の経過で安全性の問題が無いことと再生骨上のインプラントの脱落を認めないことを確認した。



グラフは第I相15例の回収細胞数を示す。本年度細胞移植が行なわれた8例において、安定した細胞増殖が得られた。

分化の指標であるALP Indexについては、15症例の平均2.51(1.03-8.13)(基準値1.0以上)であり、全例で基準値を満たしていた。

2. 安全性に関する検討

- ・無菌検査：本年度実施8例全例で陰性
 - ・マイコプラズマ：PCR法、蛍光染色法ともに8例全例で陰性
 - ・エンドトキシン検査：8例全例で陰性
- 現在までに細胞移植が行われた15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：本年度中に細胞移植を行なった8例およびこれまでに細胞移植を行なった7例において、細胞移植に関連した有害事象は認められていない。

なお、本年度細胞移植を行なった8例の中で歯槽部への細胞移植を行ない、GBR膜を用いたI-15-9, I-15-14, I-15-15症例において、細胞移植後にGBR膜の露出を認めた。消炎後1か月以上の経過を待ってメンブレンを除去した。GBR膜の露出は、細胞移植に関わらず骨移植など手術による合併症として知られており、今回骨再生量が多いために歯肉の血流障害が生じた可能性が考えられる。その他の症例において、特記すべき問題は生じていない。

なお、これまでに3症例が細胞移植後2年のフォローアップ期間を終了した。

3. 治療効果に関する検討

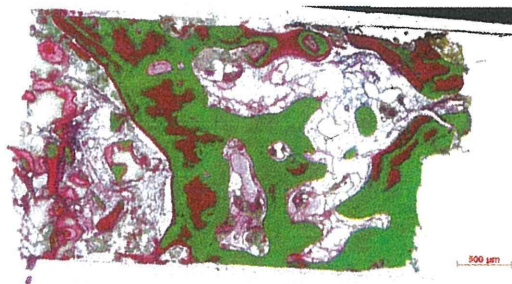
細胞移植の効果については、現在までに骨生検とインプラント埋入を行った15例全例で骨再生が認められた。

インプラント埋入後6か月が経過した9例について、インプラント2次手術が行われた。9例全例でインプラントの骨との結合が得られていた。

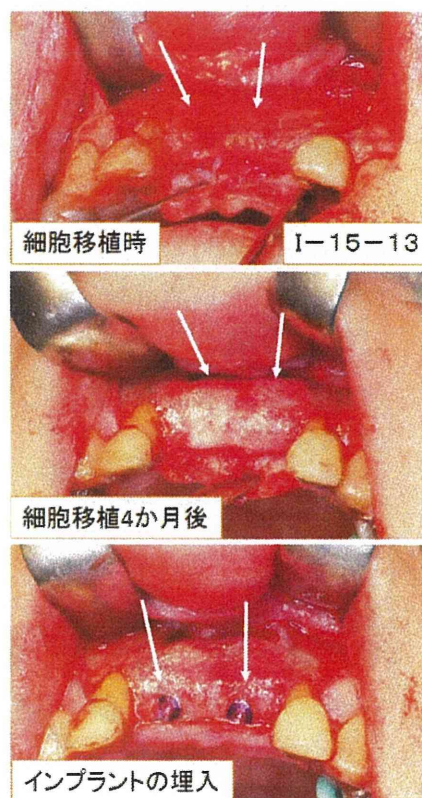
CTでは再生骨は徐々に周囲骨と一体化していた。再生骨量は経過観察機関中に徐々に減少する傾向が見られたが、周囲骨との区別が困難となるため

に、定量的な解析方法については検討中である。

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と一部に幼弱な骨組織が認められた。



インプラント埋入時の術中所見の例を以下に示す。

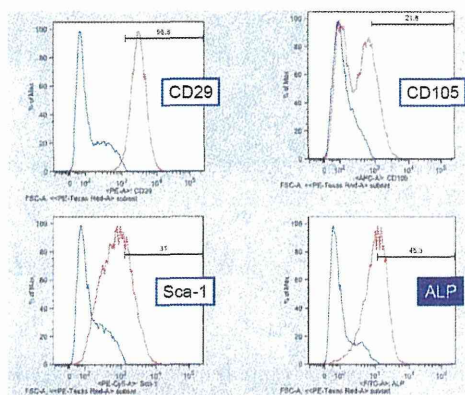


4. 骨再生治療の改良に関する基礎的検討

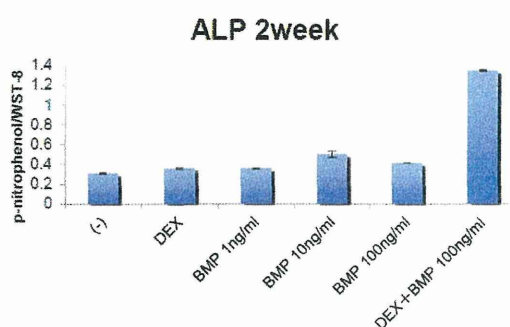
これまでのヒト細胞を用いた骨再生条件の検討には免疫不全動物 (BALB/c AJcl nu/nu) を用いており、今回正常免疫動物 (BALB/c AJc1) を用いた骨再

生モデルの可能性について検討した。

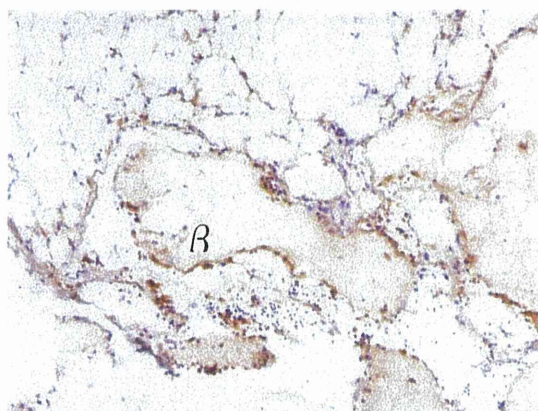
昨年度までの検討にて、マウス皮質骨中に存在する間葉系幹細胞が骨再生には優れた細胞源であり、その培養とキャラクタライズについて検討を行っている。したがって、平成25年度はin vivoにおける移植実験を行なった。



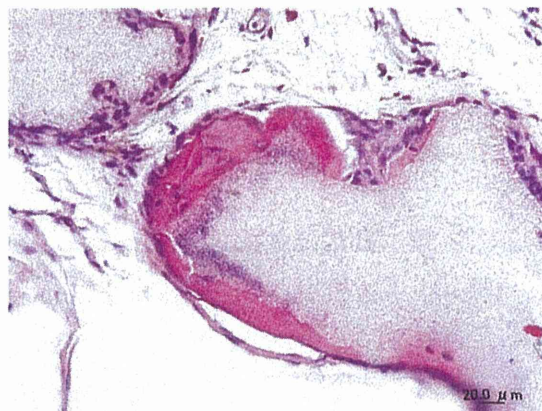
マウス長管骨由来骨芽細胞様細胞は、骨髄間質細胞と同様に間葉系幹細胞マーカー陽性の細胞と骨分化マーカー陽性の細胞が認められた。また、この細胞は安定して増殖可能であり、マウスMSCと同様に、BMP-2とDEXとの併用にて骨分化を示すことが示されている。



以下に免疫正常マウス BALB/c AJc1 への



細胞移植によって得られた組織の免疫染色 (F4/80)とHE染色を示す。



細胞移植直後より炎症細胞浸潤が認められ、3日目にはもっとも顕著であった。F4/80陽性のマクロファージが多数認められ、周囲にはCD8陽性リンパ球の浸潤を認めた。

その一方で細胞移植8週後のサンプルを解析したところ、ヌードマウスのみでなく、免疫正常マウスであるBALB/c AJc1においても骨再生は認められた。また、これまでの検討では、ノードマウスと免疫正常マウスへの移植において、骨再生の程度に差は認められなかった。

5. 自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法の長期経過の検討

先行臨床研究(H16~21)にて細胞移植を行なった8例は、全例細胞移植後5年以上経過症例であった。長期経過の検討については、東大医科研究治験審査委員会にてH25.10承認が得られたため、実施した(25-21)。転居等で連絡先が不明であった3名を除き、5名と連絡可能であり、全員から参加への同意を得た。

5例全例において、これまでに細胞移植に関連した有害事象は認められなかった。また、再生骨中に埋入された19本のインプ

ラント中動揺、脱落は0本であった。

再生骨量は経時的に減少傾向にあるが、徐々に周囲骨と同化しており、境界は不明瞭となっていた。

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、またこれまでの基礎研究でも10例中1例程度に増殖不良が起こっていた。本臨床研究では、細胞の播種密度の検討や骨再生能の維持のために増殖因子（bFGF）を用いるなど対応をおこなっている。その結果、これまで培養を行なった15症例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。当初は細胞回収数にばらつきが認められたものの、経験にともなって解消されており、本プロトコルは、骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）の細胞調製法として有用と考えられた。

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7か月程度から4か月程度へ）に再生骨の骨生検による評価を行っている。現在までに第I相として15症例への細胞移植と骨生検を行なっているが、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。予後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、本年度には上顎洞のみで無く、歯槽頂部への培養骨移植（GBR法）も4例に行なわれた。歯槽頂部への培養骨移植には、骨の形態を整えるためにチタン製の補強剤の入った隔離膜を用いている。しかしながら、この隔離膜の欠点として術後に露出やそれに伴う感染が多いことが報告されている。

本臨床研究の症例でも、隔離膜としてGBR膜を用いた4例中、3例で術後膜の露出が認められ、内2例ではメンブレン周囲からの排膿など感染所見と認めた。メンブレンは細胞移植後少なくとも4週を待つて除去しているが、感染部位の培養骨には骨再生が得られていなかった。一方内部の骨は再生しており、結果としてインプラントの埋入は可能であった。

培養骨の形態の維持はその後のインプラント治療には必要であるが、感染によって移植細胞は失われるため、骨再生に影響を及ぼすことが懸念される。本臨床研究の症例では、術後の適切な管理によってメンブレン露出症例においても必要な骨量を確保することが可能であったが、今後は細胞移植の術式についても検討が必要と考えられた。

なお、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、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。症例の確保やサンプルの長期保管など、臨床研究の実施に重要な役割を担っている。今後骨再生治療の普及に関しては、これらの基盤設備を学外の研究にも開放し、

活用することが重要と考えられた。

3. 骨再生治療の改良に関する基礎的検討

細胞を用いた再生医療研究では、*in vitro*の解析のみでなく、*in vivo*における解析が重要である。その一方で間葉系幹細胞に代表される体性幹細胞では、種差が大きいことが知られている。従って、これまでの検討では、大動物による検討のみでなく、ヒト細胞を免疫不全動物へと移植する系による検討が重要と考えられてきた。ヒト細胞を用いた検討の重要性は否定されていないが、近年移植部位における局所の炎症反応が移植された細胞に大きな影響を与えることが報告されている。免疫不全動物と正常免疫動物においては局所における免疫応答が異なることから、免疫不全動物における検討結果と実際の臨床における結果とに乖離がある可能性も指摘されている。そこで、われわれは骨再生治療の基盤となっている*in vivo*における骨再生課程を検証する目的で、臨床と近い動物実験モデルとして、同系の免疫正常マウスを用いた骨再生モデルを確立し、免疫不全マウスにおける骨再生との違いについて検討することとした。

その結果として、マウス骨由来細胞を培養、分化誘導し、ヌードマウス背部皮下へと移植することで、本臨床研究とほぼ同様の手法で異所性に骨再生が得られることを示した。さらに、細胞を採取した動物と同系の免疫正常マウスの背部皮下に移植したところ、細胞移植後の炎症反応は認められるもの *in vivo* における骨再生が得られた。また、ヌードマウスを比較しても再生骨量に有意差は認められなかった。現在サンプル数を増やして検討を行なっているが、

少なくとも本研究に用いた同系マウス間においては、骨再生に対する局所の炎症反応の影響は少ないと考えられた。同系マウスへの移植は臨床における自己細胞を用いた骨再生治療と相応することから、本研究は自己骨髄間質細胞を用いた骨再生治療の妥当性を支持するものと考えられた。

4. 長期フォローアップ研究の結果について

東大医科研病院における歯槽骨再生臨床研究の症例について、今回の検討で細胞移植後5年から最長9年までの経過を追うことが可能であった。その間に細胞移植に伴う有害事象は認められず、治療の安全性が示された。また、再生骨中のインプラントには動揺・脱落はみられず、予後は良好と考えられた。

一方、長期的な骨量は経過観察終了後も減少傾向が見られたが、再生骨と周囲骨との境界が不明瞭であり、定量的な解析は困難であった。今後画像解析ソフトを用いて詳細を検討する予定である。

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。今後第Ⅱ相臨床研究を実施し、そのエンドポイント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期待される。

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. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 2014 Jan 14. doi: 10.1002/bit.25189. [Epub ahead of print]
 2. Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors.* 2013 Oct;31(5):165-73. doi: 10.3109/08977194.2013.830611.
 3. 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.* 2013;8(2):e55082. doi: 10.1371/journal.pone.0055082. Epub 2013 Feb 21.
 4. Miyashita M, Taguchi A, Ochiai T, Kawahara I, Hasegawa H, Kagami H. An aberrant parotid gland duct with a cutaneous orifice, accompanied by sialolithiasis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Jan;71(1):77-82. doi: 10.1016/j.joms.2012.04.007. Epub 2012 Aug 15.
 5. Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng. Part B.* in press.
 6. Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami A. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol.* 2013 Aug;28(8):985-91. Epub 2013 Apr 30.
 7. 井上実、縣秀樹、朝比奈泉、各務秀明 特集高齢者医療における再生医療の可能性 3. 歯科領域における再生医療。老年医学 *Geriat Med.*52(3):131-134,印刷中
- ### 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. *Biobridge. Generation regeneration conference.* September 24, 2013, Venice, Italy.
 2. Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent

- mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Thursday, February 28, 2013, NIDCR, NIH
3. 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
 4. 高谷 達夫、伊藤 香那、下地 茂弘、丸川 和也、高田 匡基、中山 洋子、林 富雄、風岡 宜暁、各務 秀明、篠原 淳 ビスフォスフォネート関連顎骨骨壊死 (Stage 2) に対する低侵襲反復腐骨除去法の試み 第38回日本口腔外科学会中部地方会 2013年6月15日 名古屋
 5. 下地茂弘、高田匡基、丸川和也、伊藤香那、嶋田勝光、落合隆永、中野敬介、内田啓一、長谷川博雅、田口明、篠原淳、各務秀明 Focal osseous dysplasia の1例 第56回日本口腔科学会学術総会 2013年9月28日 金沢
 6. 竹中真治、小林明人、千原隆弘、落合隆永、中野敬介、長谷川博雅、内田啓一、田口 明、各務秀明、篠原 淳 口蓋に発生した線維脂肪腫の1例 第14回長野県口腔外科談話会 2013年11月16日 塩尻
 7. 李 憲起、楊 静、水木信之、高田匡基、篠原 淳、各務 秀明 スタチン短期投与と中止がインプラント周囲骨の骨形成に与える影響 第17回日本顎顔面インプラント学会学術大会 2013年11月30日～2013年12月1日 東京
 8. 堀 暁子、縣 秀樹、上嶋 伸知、東條 有伸、各務 秀明 In vitro 唾液腺萎縮モデルによる唾液腺再生メカニズムの検討 第12回日本再生医療学会総会 2013.3.19-21 横浜
 9. 山崎 美香、縣 秀樹、上原 真理子、堀 暁子、東條 有伸、各務 秀明 マウス皮膚線維芽細胞由来 sphere colony の性質に関する検討 第12回日本再生医療学会総会 2013.3.19-21 横浜
 10. 中根 知恵、縣 秀樹、上原 真理子、東條 有伸、各務 秀明 凍結保護剤を用いない新たな細胞凍結保存技術の開発 第12回日本再生医療学会総会 2013.3.19-21 横浜
 11. 井上 実、各務 秀明 自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生の臨床研究 第43回公益社団法人日本口腔インプラント学会・学術大会 2013.09.14 福岡
- 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。

別添 4

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、全身管理、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25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。平成25年度には7例のエントリーが承認されて、平成24年度承認の1例と合わせて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った。特に、本年度は初期コロニー数の少ない症例に関する効率的な細胞培養法を検討するために、希釈した骨髄液を用いた研究を行なった。初代培養時のコロニー数が十分得られない症例では、早期継代が有用である可能性が示唆された。

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

2. 骨髓穿刺

1) 採取場所

骨髓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

骨髓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髓液を 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

これまでの検討から、自己血清を用いたヒト骨髓間質細胞の培養において、10 例に 1 例程度増殖不良が見られているが、その原因や対応法は明らかではない。細胞治療

の実用化に際しては、増殖不良例に関する対応は重要な課題である。

増殖不良の原因としては、2つの因子が考えられる。一つは初期コロニー数の影響である。骨髄間質細胞の培養に用いる骨髄液は、腸骨へ刺入した骨髄穿刺針からの吸引によって得られた骨髄液を用いている。しかしながら、刺入部の状態を直視することができないため、部位による採取幹細胞数の違いが起こることが懸念される。実際の臨床研究、あるいはボランティア由来の骨髄液からの培養においても、初代培養時に得られるコロニー数には大きな違いがみられている。

もう一つの原因として、得られた細胞の増殖抑制が考えられる。自己血清に含まれる成分は個体差があるため、それを含む培地が増殖に対しても異なる影響を与えることが懸念される。

本臨床研究で用いるプロトコルでは、細胞増殖を安定化させるための手段として、増殖因子（線維芽細胞増殖因子、bFGF）を添加している。これまでの検討数は限られてはいるが、基礎研究および第Ⅰ相臨床研究15例においても必要十分な細胞増殖が得られており、その有用性が示唆された。その一方で初期に得られる骨髄間質細胞のコロニー数のばらつきの問題は解消されておらず、今後その対応が望まれる。

本研究では、細胞の回収数に与える初代培養時のコロニー数や大きさの影響について検討を行なった。次に、コロニー数のばらつきを補完するための方法として、初代培養時に早期継代を行なうことの有用性について検討を行なった。

始めに、これまでの臨床研究症例におけ

る初代培養時のコロニー数と回収細胞数との関係について検討を行なった。

次に購入したヒト骨髄液（ベリタス）を用いた検討を行なった。骨髄液を通常のプロトコル通りの濃度と10分の1に希釈した2群を作成し、さらに10分の1希釈群では早期に継代する群とそのまま培養を継続する群とで、回収細胞数およびALP活性の比較を行なった。

（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。

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。

購入した骨髄については対象外であるが、骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生法に関す

る基礎的研究については、東京大学医科学研究所倫理委員会およびヒトゲノム倫理委員会における承認を得ている。

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。

J. 研究結果

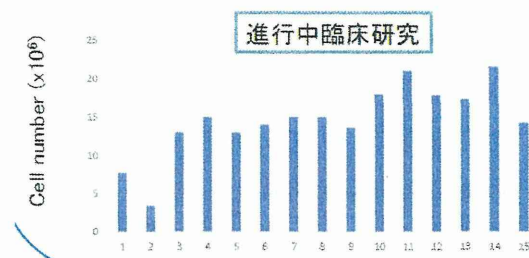
1. 被験者候補者の全身状態の評価

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第9症例から第15症例において、臨床研究所問題となる全身疾患はなかった。

一方、薬剤アレルギーの既往について責任医師からのコンサルトが有り、対応を行なった。第13症例では骨髄穿刺後に第3世代セフェム系抗菌薬に関する皮疹の既往があることを思い出したとのことで、報告があった。すでに骨髄穿刺後であり、患者の利益を優先して抗菌薬を変更し、臨床研究を続行した。その後アレルギー等の問題は生じていない。第14症例では、自己申告にて使用する鎮痛消炎剤の一つ（ロキソプロフェン）に対するアレルギーの可能性があるとのことであった。使用可能な薬剤のうち、ジクロフェナクナトリウムへと変更し、問題なく経過した。第15症例では、抗菌薬（メイアクト）服用後に嘔気の訴えがあった。内服薬との関連は明らかではなく、事前の問診でも同様の訴えはなかったものの、過去にセフェム系抗菌薬服用後に気分不快の既往があったことを思い出したとのことであった。関連が否定できないため、抗菌薬を変更し、その後問題なく経過した。

2. 骨髄穿刺

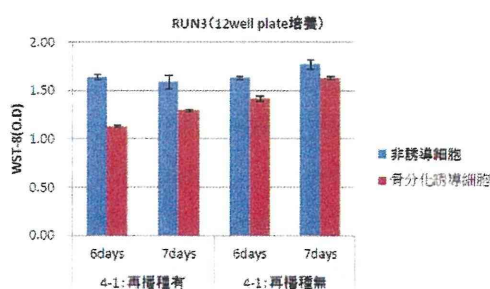
平成25年度には8症例について骨髄穿刺を行った。採取中および採取後の全身状態には問題は認められなかった。当初回収細胞数にはばらつきが見られたが、徐々に安定化している（下図）。



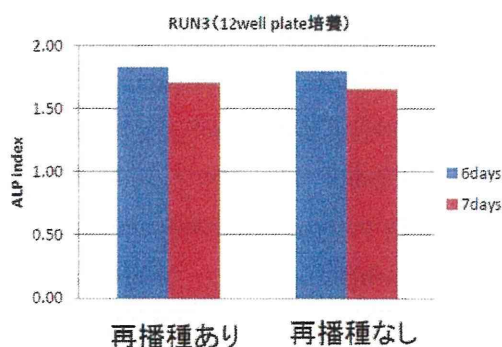
3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

これまでの臨床研究では、2度目の培地交換時以降（培養7日目以降）にコロニー数やコンフルエンスの観察が可能であった。それ以前では骨髄液中の血球によって顕微鏡下でコロニーの確認は困難であった。したがって、2度目の培地交換時以降に、目視によるコンフルエンスとその後の細胞回収日程についての検討を行なった。その結果、培養7日目から10日目までに10%未満の細胞では、回収までに17日以上必要であった。臨床データからは厳密な解析が困難であったが、培養7日から10日までのコンフルエンスあるいは初期コロニー数と細胞回収までの日数や回収細胞数との間に相関があることが示唆された。

次に、ヒト骨髄液を10分の1に希釈を行なった場合の影響について検討を行なった。



細胞回収数については、早期継代による再播種あり、無しの群で有意差を認めなかった。ただし、実験の日程上再播種あり群ではコンフルエントになる手前での回収となったため、回収細胞数が減少した。



次に、得られた細胞のALP活性について比較を行なった。両群のALP活性に差は認められなかった。一方再播種群では細胞の均質な増殖が認められた。

K. 考察

1. 被験者候補者の全身状態の評価

本年度検討を行った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

本年度骨髄穿刺を行った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差があったものの安定した増殖が得られ、P0における回収細胞数は安定している。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

初期コロニー数が少ない場合の対応について検討を行なった。今回用いた購入骨髄液による検討では、10分の1に希釈しても十分な細胞数の回収が可能であった。再播種あり群と無し群において回収細胞数に有意差はみとめなかったが、その原因として、10分の1希釈でも臨床にける増殖不良例と比較し、十分なコロニーが見られたことがあげられる。その一方で再播種後の細胞増殖は促進されることや、再播種後にはプラスチック全体に均一に細胞増殖が得られることから、より少ないコロニー数では再播種の有用性が増すことが考えられた。今後例数を重ねて検討する予定である。また、再播種によって得られる細胞の骨分化には影響を認めなかった。

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。一方、臨床における細胞のばらつきに影響を与える因子について実験的な検証が難しい部分もある。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。