

## 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 Ⅱ 相/第 a 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。

#### 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 Ⅱ 相/第 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。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。

#### B. 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

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

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

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。

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

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

文書による同意が得られるもの  
通院の意思と能力を有するもの

## 2) 除外基準

糖尿病または自己免疫疾患に罹患しているもの

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

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

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

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

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)

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

喫煙者

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

これまでの検討から、自己血清を用いたヒト骨髄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。

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

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

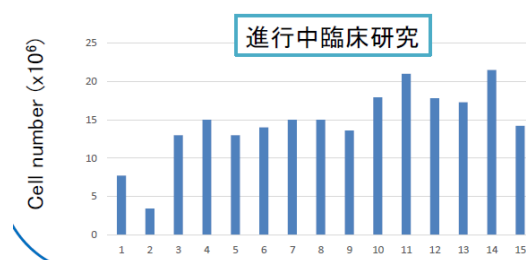
### 1. 被験者候補者の全身状態の評価

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

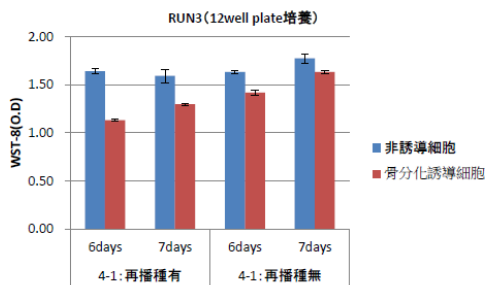
平成25年度には8症例について骨髄穿刺を行った。採取中および採取後の全身状態には問題は認められなかった。当初回収細胞数にはばらつきが見られたが、徐々に安定化している（下図）。



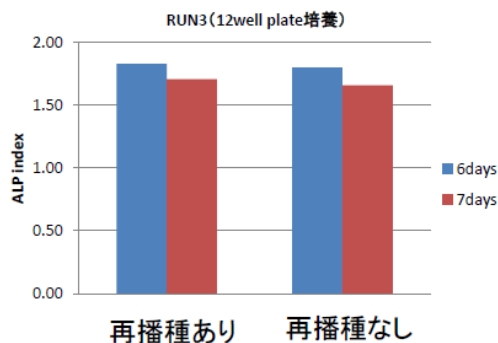
### 3. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

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。

#### D. 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、再播種後にはフラスコ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。

#### E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 20(7-8), 1314-24, 2014
4. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.*, 93(6), 1071-2, 2014
5. Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, Tojo A. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- $\alpha$  mutant in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 22(26), 4259-63, 2013
6. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimarui K, Tojo A, Takahashi S. The effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation following myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(4), 577-81, 2013
7. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Uchimarui K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation following G-CSF-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(3), 396-401, 2013
8. Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of *in vivo* administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett.* 6(2), 323-8, 2013
9. Oshima Y, Yuji K, Tanimoto T, Hinomura Y, Tojo A. An association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in

- immune thrombocytopenia patients. *Int Med.* 52(19), 2193-2201, 2013
10. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol.* 23(4), 694-704, 2013
  11. Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(33), 13410-5, 2013
  12. Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, Tojo A, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm.* 454(1), 478-85, 2013
  13. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One.* 8(1), e53728, 2013
  14. 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 Infect Dis.* 15, 181-6, 2013
  15. 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.* 97, 103-8, 2013
  16. 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.* 19, e87-9, 2013
  17. 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.* 4(9), 2068-9, 2013
- 2 . 学会発表  
(国内)
1. 第74回血液学会学術集会  
2012/10/19 (金) 小林誠一郎、東條有伸、他 . 口演 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」

- 2012/10/19(金)塚田端夫、東條有伸、他 .  
ポスター 「リウマチ性多発筋肉痛症を合併したt(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」
- 2012/10/19(金)何 海萍、東條有伸、他 .  
ポスター 「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」
- 2012/10/20(土) Chanda Bidisha、東條有伸、他 . 「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」
- 2012/10/20(土)大野伸広、東條有伸、他 .  
「CD3とCD7の展開によるATL細胞の同定：急性型ATLの治療反応性とTCRレパトア解析」  
(海外)  
1. 第54回米国血液学会学術集会
- 2012/12/08(土)臼杵憲祐、東條有伸、他 .  
「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」
- 2012/12/10(日)幸谷 愛、東條有伸、他 .  
「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」
- 2012/12/10(日)湯地晃一郎、東條有伸、他 . 「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」
- 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。