

**課題名:** 「自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究」

**分担研究報告書**

分担課題名: 「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」

分担研究者: 長村登紀子 (東京大学 医科学研究所 附属病院・講師)

**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 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、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、自己血清の調製を行った。本臨床研究のために細胞調製施設へ設置された遠心機や冷蔵庫設置、空調施設などの工事が施行されており、環境モニタリングを行って清浄度の確認を行った。その後は東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準書に基づいて、浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行し、これまで問題は認めていない。本臨床研究に使用する機器について、平成 25 年度中に必要とされるバリデーションを施行した。平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、平成 25 年度中に 8 例に対して末梢血の採血と自己血清の調製を行った。なお、平成 25 年度には、骨髄間質細胞の品質管理方法の改良のため、A L P 活性の測定法に関する検討を行なった。

**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 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。本臨床研究では治療用の骨髄間質細胞の培養を行うため、細胞培養施設(セルプロセッシングルーム、CPC)の整備、およびその運用管理を行うことが重要である。分担研究者として、セルプロセッシングを安全に行うために CPC の整備と運用を担当する。また、細胞培養に必要となる自己血清の調製を行う。東大医科研細胞リソースセンターとして、本事業による細胞プロセッシングが安全に運営されるよう支援することを目的とする。

**B. 研究方法**

1. CPC の管理運営

平成 25 年度には、通常予定されている環境モニタリングに加えて、空調設備の点検とその後のバリデーションとして環境モニタリングを施行した。

CPC の管理のために、東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準

書 RCCT-GP01 に基づいて、1 週毎に浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行した。

同様に CPC 内で使用する機器については、定期的な保守管理が義務付けられている。本臨床研究に使用する機器について、平成 24 年度中に必要とされる定期保守点検および校正を施行した。手順は SOP D01 から SOP - D21 に従った。

2. 自己血清の調製

平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、本年度は 8 例に対して、末梢血の採血と自己血清の調製を行った。

昨年度より患者からの採血時のリキャップ防止のため、単回使用透析用針 JMS AV フェイスチュラを導入して採血している。また血清分離の際に、血餅が分離バッグのチューブ部に詰まることが多かったことから、血液成分分離バッグ(セルエイド)を導入している。セルエイドは自己血清採取用に独自に開発されたバッグで、バッグ内に 3 個のビーズが核となり、血液凝固を促進させるものである。これまでの症例において、採取された血清量に有意差は認められていないが、変更後血清凝固の問題は生じておらず、セルエイドは細胞培養用血

清の分離用として有用と考えられた。

### 3. 東大医科研細胞リソースセンター 細胞保管部門

「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」では、細胞や検体の10年間の保管が義務付けられている。しかしながら、それぞれのプロジェクト担当者が責任を持って長期間の試料保管を行うことは困難な場合も想定される。今後のヒト幹細胞を用いた臨床研究の支援体制の整備として、平成23年度に細胞リソースセンター内にこれら検体保管のための「細胞保管部門」を設置している。引き続き臨床研究に用いられる細胞および培地の一部の長期保管を担当する。

### 4. ALP測定法に関する検討

ALP活性は骨髄間質細胞の品質管理のために用いられる指標であり、特に骨形成性細胞の確認のため使用されている。しかしながら、検査には7から14日間程度の分化誘導期間が必要であることから、細胞増殖能が高い場合には検査期間中に剥がれるなどの問題が見られていた。剥離した場合には測定値が不正確になるものの臨床で用いる細胞の増殖能を事前に予測することは困難である。したがって、品質管理に使用する分化誘導期間と手順書を見直し、ALP活性の基準値に関する再検討が必要と考えられた。

研究には購入したヒト骨髄液（ペリタス）を用い、2継代目の骨髄間質細胞を用いた。培養3日目、7日目、11日目におけるALP活性を測定した。また、現在の評価には分化誘導群と非分化誘導群との比であるALPインデックスを用いている。しかしながら、この値は非分化誘導群のALP活性に影響を受ける。したがって、より安定した指標として、分化誘導前と分化誘導後の細胞のALP活性を比較するALPの有有用性についても検討を行なった。

（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する。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。

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。

なお、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。

## C. 結果

### 1. CPCの管理運営

（空調装置メンテナンス後のバリデーション）

メンテナンス後の環境モニタリングの結果、CPC（臨床細胞工学室）において清浄度が確認された。結果の一部を（添付資料1、添付資料2）に示す。

（CPC管理）

（機器のメンテナンス）

本臨床研究にかかわる機器として、以下の機器の使用時点検、定期保守点検、および校正を行った。

・CO<sub>2</sub>インキュベーター

週1回の保守点検、年1回の定期点検。

・遠心機

年1回定期保守点検。

- ・パーティクルカウンター  
年1回校正
- ・エアサンプラー  
年1回校正
- ・電子天秤  
年1回校正
- ・クリーンベンチ  
年一回の定期点検

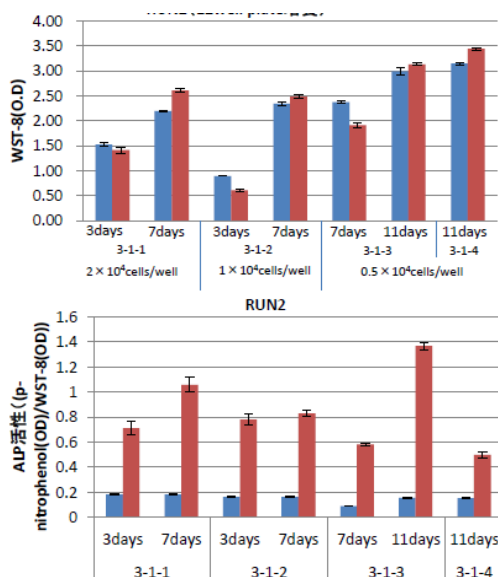
## 2. 自己血清の調製

これまで細胞培養が行われた8例について自己血清の分離を行っており、全例で必要とされる血清量が確保された。

## 3. 東大医科研細胞リソースセンター 細胞保管部門

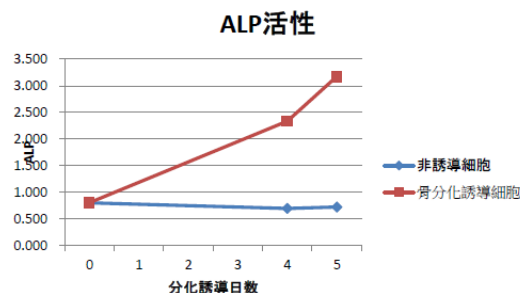
「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づく細胞、試料の保管体制については(添付資料3)を参照。平成25年度には、新たに培養、移植が行われた8例の血清および細胞の一部を同部門にて保管した。

## 4. ALP測定法に関する検討



分化誘導期間によるALP活性の違いを検討するために、異なる細胞播種密度のウエルを作成し、3日、7日、11日におけるALP活性の比較検討を行った。ALP活性は分化誘導期間のみでな

く播種細胞密度にも影響を受けるため、単純に分化誘導期間による比較は困難であった。同じ細胞播種密度で比較した場合には分化誘導期間が長期化することでALP活性は上昇したが、非分化誘導群との差は明らかであり、骨形成性細胞の確認操作は、分化誘導期間の影響をあまり受けていないものと考えられた。



次に、ALPインデックスとALPの相関について検討を行なった。上図のグラフはALP活性の経時的变化を表す。このサンプルにおけるALPインデックスは4.37、ALP比は3.96であった。検討した5例すべてで同様の傾向が得られたことから、ALP活性を7日程度で測定する限りにおいては、ALP比とALPインデックスはほぼ同様の傾向を示す事が明らかとなり、ALPインデックスを使用することは妥当と考えられた。

## D. 考察

CPCの管理については東大医科研細胞リソースセンターの手順書に従って実施されている。当院CPCは、国内初に設立(1997年)されたものであり、パイプやパネルの劣化等の老朽化の問題はあるが、これまでのところ細胞培養の環境については施設の基準内で推移しており、安全に細胞を培養できる環境が維持されているものと考えられる。これまで使用している機器に関する故障等に対しても適切に対応できている。

血清分離については、個体差はあるものの従来の分離バッグ法と比較して、セルエイドによる分離では、血清量の増加にはつながらなかったが、予定した十分量の血清は確保できた。また、セルエイ

ドではバッグが予め全て閉鎖系で連結してあるため、煩雑な分離バッグの接続が不要であり、15例全例1回の遠心により血清分離が可能であり、プロセスの時間短縮につながった。なお、これまでのところ血清分離バッグ変更による細胞の増殖への明らかな影響は認めない。

臨床研究に用いられた細胞や試料の保管体制については、今回の臨床研究をきっかけとして設置されたものではあるが、将来的には広く他施設における臨床研究にも対応することを検討している。今後細胞の調製から保管までを一貫して扱う施設として整備を行なっていく予定である。

再生医療に用いる細胞の品質管理は重要であるが、特に細胞機能の評価法については未だ確立していない。骨形成性細胞にはALP活性を用いており、細胞同一性の指標として有用である。しかしながら、異なる増殖能を持つ細胞を扱う臨床研究では、すべての細胞に同一の手順を適応することが困難な場合もある。したがって、増殖能や分化能の異なる細胞に対しても対応可能な検査プロトコルを確立することが実際的である。今回の検討から、本臨床研究で用いているALPインデックスは、もとの細胞の分化程度に影響を受けにくい指標であることが示された。一方、分化誘導期間を固定することは増殖能の異なる細胞には不具合もある。ALP活性については培養3日後から14日までほぼ一定の傾向を示す。したがって、細胞の増殖に応じて適切な分化誘導期間を設定することが重要と考えられた。本研究の結果から、臨床におけるALP活性の評価法についても修正を行なっていく予定である。

## E. 結論

歯槽骨再生の臨床研究を支援するために、CPCの運営、維持、管理に関する検討を行い、これまでのところ細胞培養を安全に行うことのできる環境を提供することができた。また、新規血清分離用バッグセットであるセルエイドは、

閉鎖系かつ効率的な自己血清分離において有用であった。今後も必要に応じて機器の更新や品質管理に伴うSOPの整備を行い、さらに安定した細胞調製の環境整備と手順の効率化を図りたい。

## F. 研究発表:

### 論文発表:

#### 1. 論文発表:

- 1) Nagamura-Inoue T., and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility, *World J Stem Cells* 2014, 6,195-202
- 2) He H, Nagamura-Inoue T., Tsunoda H., Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng Part A*. 20,1314-24,2014
- 3) Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T., Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. 25,435-41.,2014
- 4) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T.

- Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant.* 49, 355-60,2014
- 5) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 49,228-35,2014
- 6) Kanamori H, Mizuta S, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Imai K, Shigematsu A, Nakamae H, Tanaka M, Ikegame K, Yujiri T, Fukuda T, Minagawa K, Eto T, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Tanaka J. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 48,1513-8,2013
- 7) Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy: An Analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19,1183-9, 2013
- 8) Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1198-22, 2013
- 9) Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int.* 26, 631-9, 2013
- 10) Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic

- hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* 88,144-6, 2013
- 11) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica.* 98,814-22, 2013.
2. **学会発表**  
(国内)
- 1) 何海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs, 臍帯由来間葉系幹細胞における SSEA4 発現の意義について, 第 75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/11
- 2) 長村登紀子, 内丸薫、高橋聡、大井淳、加藤せい子、河北敏郎、大野伸広、湯地晃一郎、東條有伸, 当院における輸血後鉄過剰症診療の現状 Current Clinical Practice in Post-transfusion Iron Overload in IMSUT Hospital, 第 75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/12
- 3) 長村登紀子、岸野光司、上村知恵, 造血細胞移植に必要な細胞処理・検査に関する技術講習会; こんな時どうする? Q and A テクニカルセミナー 第 61 回日本輸血・細胞治療学会(横浜)2013/5/16
- 4) 長村登紀子、何海萍、東條有伸. 臍帯由来間葉系幹細胞の分離とその応用について 第 34 回日本炎症・再生医学会(京都) 2013/7/2 (海外)
- 1) H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, ASH in Asia, Singapore, 2014/3/29
- 2) H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, 55<sup>th</sup> ASH annual meeting, New Orleans 2013/12/8
- 3) R. Tanosaki, Y. Okuyama, T. Iseki, M. Handa, S. Kino, T. Kumazawa, S. Yoshida, K. Haraguchi, N. Shimizu, S. Sakai, N. Watanabe, T. Uemura, K. Ikuta, Y. Kawahara, K. Muroi, T. Nagamura-Inoue, M. Takanashi, for the HPC Study Group, the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JST MCT), ASH meeting, New Orleans 2013/12/7,
- 4) H. Itonaga, M. Iwanaga, K. Aoki, J. Aoki, K. Ishiyama, T. Kobayashi, T. Sakura, T. Fukuda, T. Yujiri, M. Hirokawa, Y. Morishima, T. Nagamura-Inoue, Y. Atsuta, T. Ishikawa, Y. Miyazaki. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic

myelomonocytic leukemia, New Orleans, 2013/12/7,

- 5) Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013
- 6) Nagamura-Inoue T, Kodo H, Quality Control for New type of Cord Blood/ Cord Bank for HSCT and others, W S-1, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013
- 7) Nagamura-Inoue T, He H, and Tojo A. Wharton jelly is a rich source of mesenchymal stem cells Symposium 2-2, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013

び登録商標; cellamigo®、セルアミオーゴ®

- 3) 長村 登紀子、森 有加、島津 貴久、佐瀬 孝一 出願人：国立大学法人東京大学 日本全薬工業との共同出願、発明の名称：臍帯組織の凍結保存方法、特許出願日：2013/12/27, 特願2013-273536

2. 実用新案登録なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎 発明の名称：生体組織切断用抑え具、出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願、出願日:2013/10/02 特許 2013-006923
- 2) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎、出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願、発明の名称：培養組織剥離防止プレート 出願日:2013/10/04 特許 2013-209095 およ