

201306002B

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23年度～25年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 各務 秀明

平成26（2014）年 5月

別添2

目 次

I. 総合研究報告	
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	
(添付資料)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 54

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、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ものである。臨床研究については平成23年3月15日に厚生労働大臣より承認され、学内における手続きの後、平成23年6月より被験者のリクルートを開始した。平成25年度中に第Ⅰ相15例全例のエントリーと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より3か月短い期間での骨生検にもかかわらず、先行臨床研究の42%と同程度の骨再生が得られたことを示している。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。さらに、歯槽骨再生治療の実用化に向けて、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として、細胞採取方法の検討、品質管理方法に関する検討、および先行臨床研究症例を対象とした長期経過に関する検討を行なった。

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 准教授

東條 有伸 東京大学医科学研究所

血液内科学 教授

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。2010年に歯槽骨の再生が必要となる患者は、国内だけでも年間103,000人と推定され、20万人程度の潜在患者がいるものと考えられている。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

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られる。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. 歯槽骨再生臨床研究

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 (分担歯科医師)
- ・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)
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）

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。

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取及び骨髄血採取し、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5 mm未満、あるいは歯槽骨高径が5 mm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。

2. 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。また、細胞を同系マウスへと異所性に移植することで、免疫正常動物を用いた骨再生モデルを確立した。

3. 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、自己骨髄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。

対象は、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。連絡が見つからない場合は、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) 全身状態の間診
- 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。

4. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

1) 細胞選択培養法の検討

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。

次に、増殖不良例に対する対応として、希釈ヒト骨髄液を用いた検討を行なった。

2) 増殖不良例に関する検討

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。検討数は限られてはいるが、これまで基礎研究および第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。

5. CPCの運営管理、血清調整に関する検討

1) 教育訓練

セルプロセッシングのために5名に対して、細胞調製施設（臨床細胞工学室）の使用に関する教育訓練を実施した。

教育訓練は、臨床細胞工学室、教育訓練実施基準書（RCCT-GP02）に従って行われた。

2) CPCの管理運営

本臨床研究のために細胞調製施設への後室設置などの工事が施行されており、研究開始前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23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。

3) 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、これまでエントリーが承認された5例中4例に対して、末梢血の採血と自己血清の調製を行った。

（自己血清調製手順）

- ① 骨髓液採取時または骨髓液採取前に被験者の上腕より200-400mLを採血する。
- ② 採取後約1時間4℃で静置する。
- ③ 10分間3000rpmで遠心分離し、無菌的に上清の血清を分取する。
- ④ 調製した血清は、-20℃で保管する。
- ⑤ 培養中血清の不足が予想される場合には追加採血を行う。なお採血量および期間はセルプロセッシング・輸血マニュアルSOP A17 自己血採取実施手順に準じ、必要な場合には鉄剤経口投与を適宜行う。

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た。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、今年度より血液成分分離バッグ（セルエイド）を導入した。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。表1に従来法との比較を示した。

表1 自己血清調製手順の相違概略

	従来分離バッグ法	セルエイド
形状	(NIPRO 89-111 瀉血バッグ) 単一バッグ	セルエイド 血清凍結バッグまで閉鎖系で連結している。
穿刺針	採血針はバッグに付属	採血針(AV フェイスチュラは別に接続)
容量	400ml まで	200ml まで。追加の場合はフェイスチュラ部分で再接続
凝固促進方法	採取後約1時間4℃で静置	室温で30分間以上振盪
遠心	3000rpm, 10分間, 4℃	3,000g, 22℃, 10min, ACE9, DEC8
血清移動	別の分離バッグを穿刺連結し、分離スタンドを用いて上清を移行。RBCやフィブリン等の混入が多い場合は移行後さらに1回遠心。	既に連結されたバッグに分離スタンドを用いて上清を移行。
血清の分注	分離バッグBB-TQ008Jを穿刺接続して分注(50mlx4バッグ)。	既に連結された凍結用分離バッグ(50ml x3バッグ)に分注。

4) 東大医科研細胞リソースセンター 細胞保管部門の新設

「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年度には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、学内外の臨床研究に対応可能な体制を構築した。

5) 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（ベリタス）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にて承認を得て行う。

なお、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。

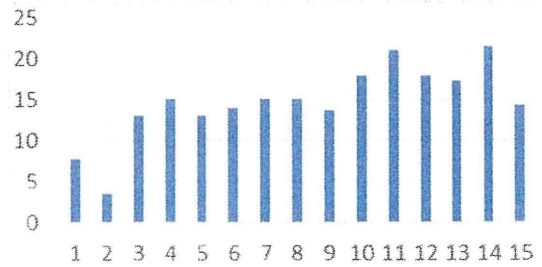
C. 研究結果

1. 歯槽骨再生臨床研究

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、平成 24 年度までの 7 症例と合わせて、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 1 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。

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

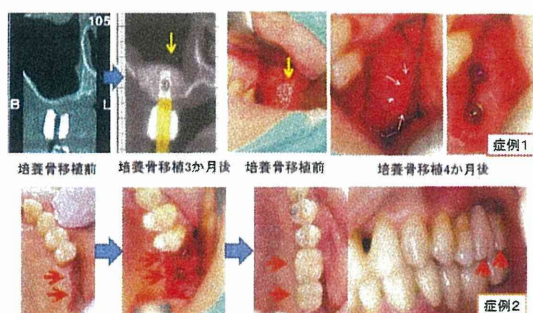
性が考えられる。その他の症例において、特記すべき問題は生じていない。

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。

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。



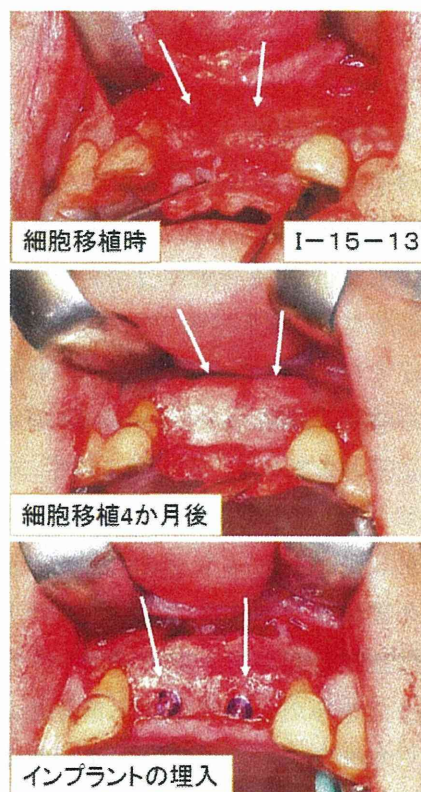
CTでは再生骨は徐々に周囲骨と一体化していた。再生骨量は経過観察機関中に徐々に減少する傾向が見られたが、周囲骨との区別が困難となるために、定量的な解析方法については検討中である。



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。

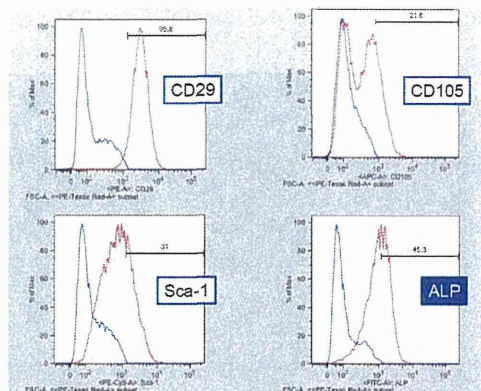


2. 骨再生治療の改良に関する基礎的検討

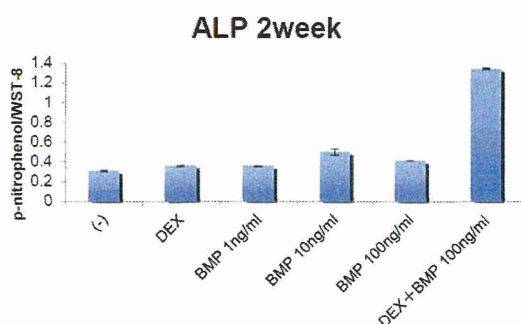
これまでのヒト細胞を用いた骨再生条件の検討には免疫不全動物 (BALB/C AJc1 nu/nu) を用いており、今回正常免疫動物 (BALB/c AJc1) を用いた骨再生モデルの可能性について検討した。

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ーズについて検討を行った。次に in vivo に

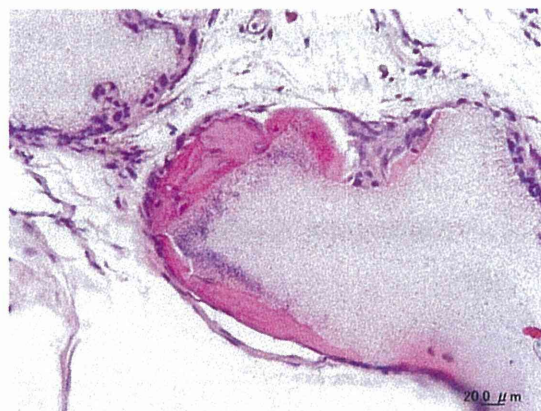
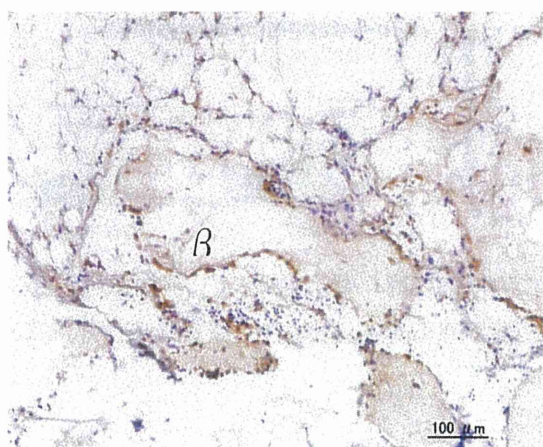
おける移植実験を行なった。



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。

3. 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

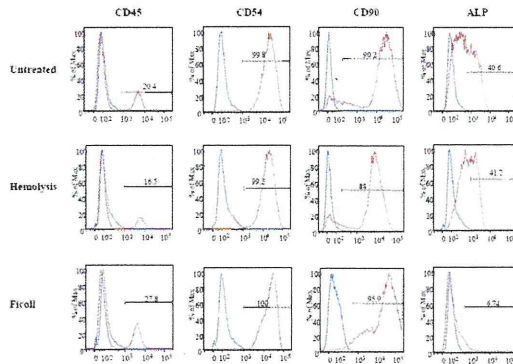
先行臨床研究(H16~21)にて細胞移植を行なった8例は、全例細胞移植後5年以上経過症例であった。長期経過の検討については、東大医科研治験審査委員会にてH25.10承認が得られたため、実施した(25.21)。転居等で連絡先が不明であった3名を除き、5名と連絡可能であり、全員から参加への同意を得た。

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

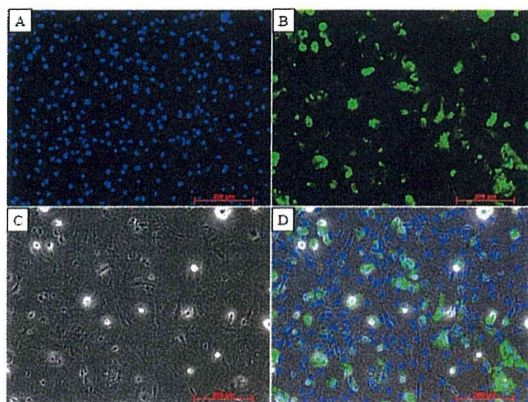
ラント中動揺、脱落は0本であった。

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。

4. 効率的な骨形成性細胞採取法の基礎的検討

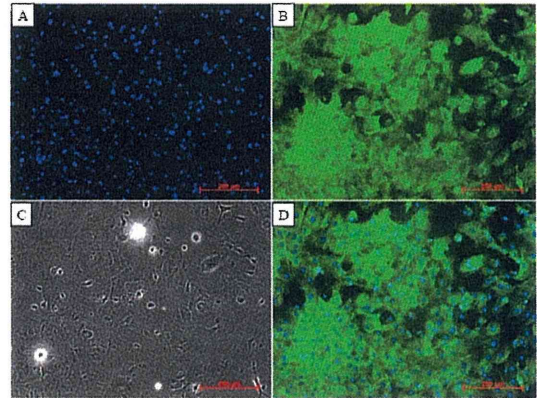


フローサイトメトリーによる比較では、ALP 陽性細胞に大きな差が認められている。一方 CD45 には部分的に陽性の細胞分画が含まれ、CD54 では大半の細胞が陽性であった。CD45 は造血系細胞、あるいは白血球細胞マーカーである。したがって、接着性細胞にみられる CD45 陽性細胞の存在を確認するため、免疫蛍光法による検討を行った。



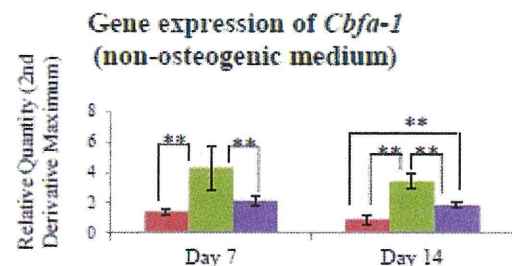
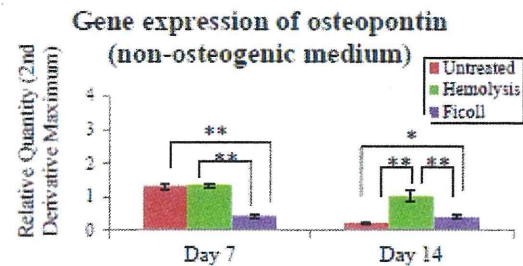
その結果、CD45 陽性細胞はフローサイトメトリー同様に20%程度に認められ、

分布は培養細胞中に拡散していた。



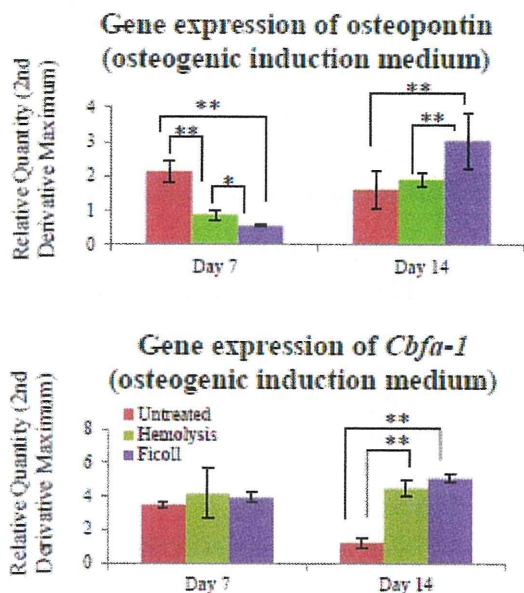
一方、CD54 は、ほぼすべての細胞で陽性であり、フローサイトメトリーの結果を裏付けるものであった。

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。



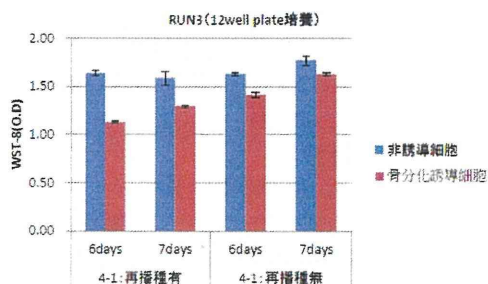
一方分化誘導後 14 日では osteopontin, cbfa-1 ともに Ficoll 群での発現が最も高くなり、ALP assay の結果を裏付けるものであった。

次に、十分な初代培養において十分なコロニー数が得られない場合の対応に関する基礎的検討を行なった。

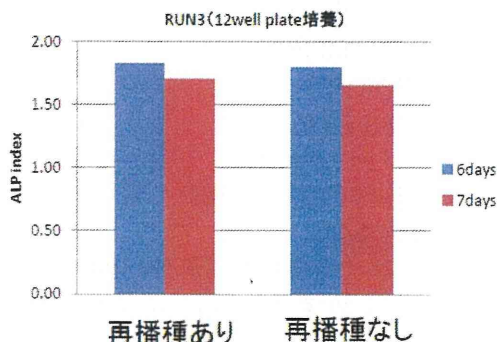
これまでの臨床研究では、2 度目の培地交換時以降 (培養 7 日目以降) にコロニー数やコンフルエンスの観察が可能であった。それ以前では骨髓液中の血球によって顕微鏡下でコロニーの確認は困難であった。したがって、2 度目の培地交換時以降に、目視によるコンフルエンスとその後の細胞回収日程についての検討を行なった。その結果、培養 7 日目から 10 日目までに 10%未満の細胞では、回収までに 17 日以上必要であった。臨床データからは厳密な解

析が困難であったが、培養 7 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、ヒト骨髓液を 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。

5. CPC の運営管理、血清調整に関する検討 教育訓練

本臨床研究を開始するにあたり、平成 23 年度に本事業によって新たに雇用さ

れた4名を含む5名、および平成24年度に新たに雇用された2名に対し、細胞培養手技、品質管理方法、そして細胞調製施設への入室、使用方法に関する教育を行った。現在も引き続き細胞調製、品質管理業務に従事している。

CPCの管理運営

(後室設置工事後のバリデーション)

工事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。

- ・CO2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

自己血清の調製

これまで細胞培養が行われた15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ている。分離された血清については、培養中の検査にて細菌、マイコプラズマのコンタミネーションは生じていない。

これまで細胞培養が行われた15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。

また、従来の分離バッグとセルエイドの比較では、表2に示す通り、採血量に対する回収率および200ml採取換算にて分離回収した血清量は分離バッグの方がやや良好であった。従来の分離バッグ法による血清の回収率は

Median 54.9%(range 52.9~64.1%), 200ml採血から109.85ml (range105.8~128.2ml)であり、セルエイドでは各々50.0%(range 49.1~52.7%), 99.8ml(98.15~105.3ml)であった(P=0.02)。

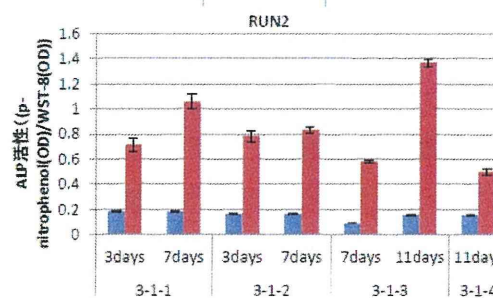
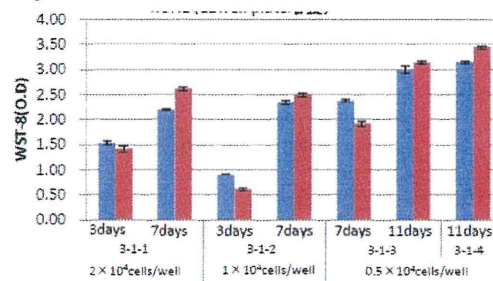
一方、従来の分離バッグでは全例2回以上の遠心を必要としたのに対して、セルエイドでは1回の遠心にて分離でき、プロセス時間の大幅な短縮につながった。

東大医科研細胞リソースセンター細胞保管部門

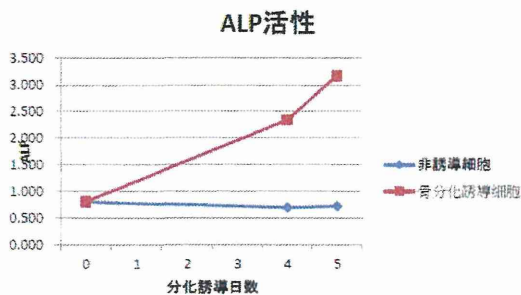
「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づく細胞、試料の保管体制については(添付資料3)を参照。

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ェルを作成し、3日、7日、11日におけるALP活性の比較検討を行なった。



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活性の経時的変化を表す。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

1. 歯槽骨再生臨床研究

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。

骨髄穿刺

骨髄穿刺を行った15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。

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)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週を待って除去しているが、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。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

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。

5. CPCの運営管理、血清調整に関する検討

細胞調製に関する人材教育は本臨床研究の遂行のためであるが、将来の骨再生医療の普及には、細胞培養に関する知識と経験を持った人材育成が必要である。本臨床研究を通じた教育により、今後これらの研究員が技術指導などの役割を担う人材となることが期待される。現在、細胞を調製する人材の資格については、日本輸血・細胞治療学会や再生医療学会でも議論されているところであるが、こうした人材はほぼ全期有期雇用であり、長期的な安定した雇用と技術を認める制度が今後の課題である。

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、5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