

研究事業1．新規培養法による自己骨髄間質細胞による脳梗塞の再生医療

研究分担者 寶金 清博 北海道大学病院 脳神経外科 教授

研究要旨

脳梗塞はわが国の主要疾病の一つであり、その後遺症は日常生活に重大な支障を及ぼし、社会的コストは年々増加している。近年、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)を利用した再生医療が、後遺症を改善させる新たな治療法として期待され、自己 BMSC 移植は国内外で臨床試験が開始されつつある。しかし、BMSC の安全で効率的な培養法や移植法は確立されていない。

当院では、『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生治療 - 治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』(RAINBOW 研究)を、平成 27 年度中の開始をめざし準備中である。本研究では他家ヒト血小板溶解物(platelet lysate: PL)を添加物に用いた BMSC 培養と、細胞を脳内に定位的移植することをプロトコールとしている。現在は、他家 PL を用いて培養されたヒト BMSC の、品質と安全性についての非臨床試験を準備中である。

A. 研究目的

脳梗塞はわが国の主要疾病の一つであり、その後遺症は日常生活に重大な支障を及ぼし、社会的コストは年々増加している。近年、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)を利用した再生医療が、後遺症を改善させる新たな治療法として期待され、自己 BMSC 移植は国内外で臨床試験が開始されつつある。しかし、BMSC の安全で効率的な培養法や移植法は確立されていない。

今年度の本研究の目的は、他家ヒト血小板溶解物(platelet lysate: PL)を添加物に用いた BMSC 培養について、PL のパリエーション、培養細胞の品質と安全性に関し検討することである。

B. 研究方法

ボランティアから血小板を成分採血し、GMP 準拠の濃厚血小板血漿(PRP)15-20 単位を作成する。院内 CPC で PRP を凍結、解凍し細胞膜を破壊する。遠心分離の後、上清をとり PL を作成する。基本培地に PL、抗生物質を加え細胞培養に用いる。

ボランティアから、局所麻酔下で腸骨稜より約 50mL の骨髄液を採取する。CPC 内に搬入し遠心分離により単核球だけを採集する。

CPC で培養フラスコに単核球の播種を行う。播種 24 時間後に浮遊細胞を除去し、接着細胞のみの培養を開始する。コンフルエントになった時点で継代を行い、全培養細胞数が細胞移植手術に必要な量( $1\sim 5 \times 10^7$  個)に達するまで継代培養を行う。

培養終了時に細胞生存率、無菌検査(細菌感染、マイコプラズマ感染、エンドトキシン)、フローサイトメトリー(CD34、CD45、CD44、CD90、CD105、CD166)、グライコムクス解析を行う。さらに、ラット、マーモセットなどの脳内に BMSC を定位的に移植し、一般毒性試験など安全性を検討する。

(倫理面への配慮)

本申請では、健康成人ボランティアから採取した骨髄細胞を利用する計画のため、「北海道大学大学院医学研究科・医学部 医の倫理委員会」に申請し、承認を得ている。

C. 研究結果

今年度は、自家 BMSC 培養の品質と非臨床安全性について PMDA と薬事戦略相談を行った。品質に関する対面助言を 2013/10/25 に、非臨床安全性に関する対面助言を 12/20 に実施した。また、PL 作成に関して日赤北海道ブロック血液センターと共同で 7 名のボランティアから血小板成分採血を行い、PL 作成を行

った。今後、これらについてバリデーションを行い、PL 作成について臨床試験プロトコルを確定する。さらに、当院血液内科と共同でボランティアから骨髓液採取を行った。今後、少なくとも3名のボランティアから採取する予定である。これらの骨髓とPLを用いてBMSCを培養し、品質試験や非臨床安全性試験等を準備している。

#### D. 考察

本研究では、脳梗塞を対象疾患とした新規治療法の開発を推進しているが、対象となる患者はまず脳梗塞に対する現時点での標準的な急性期治療を行う。その後、亜急性期～慢性期において細胞移植を行うこととなる。よって本研究の成功の鍵のひとつに、急性期の適切な脳梗塞治療があげられる。

同時期に進行している国内の治験(札幌医大、脳梗塞に対する自家骨髓間葉系幹細胞治療)では、対象患者から脳主幹動脈狭窄合併例を除外するといった、試験後の脳梗塞再発に留意したプロトコルとなっている。特に、移植細胞が動脈硬化病変に集積し、主幹動脈狭窄を悪化させる懸念がもたれているからである。今後は本研究でも、適切な急性期治療と対象患者の選択を行ない再生医療の安全性を高めることを目的とした研究に目を向けていく必要がある。

#### E. 結論

今年度は臨床試験を見据えて、ボランティアからのPL作成、骨髓採取、BMSC培養を開始した。今後はボランティア由来のBMSCを他家PLにより培養し、品質試験、安全性試験を行うとともに、ヒトへの定量的脳内細胞移植の効率性、安全性に関してもさらに検証していく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Bone Marrow Stromal Cells Rescue Ischemic Brain by Trophic Effects and Phenotypic Change Toward Neural Cells. Shichinohe H, Ishihara T, Takahashi K, Tanaka Y, Miyamoto M, Yamauchi T, Saito H, Takemoto H, Houkin

K, Kuroda S. Neurorehabil Neural Repair. 2014 Mar 14. [Epub ahead of print]

- 2) Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of motor function after lacunar stroke in rats. Shichinohe H, Yamauchi T, Saito H, Houkin K, Kuroda S. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2013;73(3):354-63.
- 3) 123I-iomazenil single photon emission computed tomography visualizes recovery of neuronal integrity by bone marrow stromal cell therapy in rat infarct brain. Saito H, Magota K, Zhao S, Kubo N, Kuge Y, Shichinohe H, Houkin K, Tamaki N, Kuroda S. Stroke. 2013 Oct;44(10):2869-74.

##### 2. 学会発表

- 1) Saito H, Magota K, Zhao S, Kubo N, Kuge Y, Shichinohe H, Houkin K, Tamaki N, Kuroda S: 123I-iomazenil single photon emission computed tomography visualizes recovery of neuronal integrity by bone marrow stromal cell therapy in rat infarct brain. WFNS XV World Congress of Neurosurgery, Seoul, 2013.9.8-13

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし