

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業））
分担研究報告書

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行っており、PMDA と臨床プロトコールについて協議中である。

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 のパリティーション、培養細胞の品質と安全性に関し検討することと、臨床試験におけるプロトコールを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 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(5×10^7 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などを行い、培養細胞の品質を検討する。また、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験、一般毒性試験など安全性を検討する。

さらに臨床試験におけるプロトコールについて、対象患者、除外基準、評価項目、観察スケジュール、併用療法などを検討する。

(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

昨年度、自家 BMSC 培養の品質と安全性について PMDA と行った薬事戦略相談に基づき、ボランティア由来の PL 作成と骨髄採取、BMSC 培養を行った。PL

作成に関しては、日赤北海道ブロック血液センターと共同でこれまでに 20 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。これらについてバリデーションを行い、PL 作成法を確立した。この結果は原著論文として、国際学術誌に投稿準備中である。さらに当院血液内科と共同で、現在までに 6 名のボランティアから採取し、BMSC 培養を行った。これらの培養 BMSC を用いて、品質試験や非臨床安全性試験等を行っている。臨床試験プロトコールについては、現在 PMDA と協議中である。

D. 考察

本研究のような自家BMSC移植治療では、骨髄採取の際の費用、Cell Processing Center(CPC)での細胞培養の費用に加え、移植治療に関わる入院費、また脳内への直接移植の場合は移植手術にも費用が発生し、自ずと高額な費用が発生する。一方脳梗塞は、失語、片麻痺、認知症などの重篤な合併症を生じることが多く、また寝たきり患者を生み出す大きな原因として取りざたされるが、直接の医療費、介護費用に加え、患者本人および家族の生活の質が低下することによる社会的損失も重要である。再生医療を実施することにより、患者本人の生活の質をどの程度向上させることができれば、その高額な医療費と見合うのか、このことは治療の適応範囲に密接に関連する。今後、本研究ではBMSC移植治療に関する費用対効果などの医療経済学的な観点からも検討する必要があると考えられる。

E. 結論

今年度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、安全性試験を行った。来年度は検討中の臨床プロトコールを確定させ、年度中の臨床試験開始を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, Kuroda S. Therapeutic effects of human multilineage-differentiating stress

enduring (MUSE) cell transplantation into infarct brain of mice. PLoS One. 2015 Mar 6;10(3):e0116009.

2) Tan C, Shichinohe H, Abumiya T, Nakayama N, Kazumata K, Hokari M, Hamauchi S, Houkin K. Short-, middle- and long-term safety of superparamagnetic iron oxide-labeled allogeneic bone marrow stromal cell transplantation in rat model of lacunar infarction. Neuropathology. 2014 Nov 6. [Epub ahead of print]

3) Yamauchi T, Saito H, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S. Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for stroke therapy. Transl Stroke Res. 2014 Dec;5(6):701-10.

4) Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S. Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat brain infarct. J Tissue Eng Regen Med. 2014 Jun 12.

5) Shichinohe H, Ishihara T, Takahashi K, Tanaka Y, Miyamoto M, Yamauchi T, Saito H, Takemoto H, Houkin K, Kuroda S. Bone marrow stromal cells rescue ischemic brain by trophic effects and phenotypic change toward neural cells. Neurorehabil Neural Repair. 2015 Jan;29(1):80-9.

2. 学会発表

第14回日本再生医療学会総会 特別シンポジウム (平成27年3月21日、パシフィコ横浜) 七戸 秀夫、竇金 清博:細胞移植による脳梗塞再生医療-日本発の前臨床/臨床試験ガイドラインの必要性

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