

「椎間板変性症に対する再生医療の実用化を目指した 同種髄核細胞製品の研究開発」

【研究概要】

椎間板は中心の髄核における細胞の量的質的減衰が椎間板変性症の主因の一つである。椎間板は中心の髄核における細胞の量的質的減衰が椎間板変性症の主因の一つである。髄核細胞の分化カスケードは明らかになっていなかったが、前駆細胞から成熟細胞へまでの特徴的な細胞表面マーカーとしてTie2、GD2、CD24を発見した(Sakai Det al. Nat Comm 2012)。これらマーカーを発現する髄核細胞は椎間板変性症に対する効能を評価した非臨床試験において椎間板の再生能力が有意に高いことが示された。そこで若年者ヘルニア患者の手術時に破棄される組織を原材料に製品製造を進めた。しかしながら、若年者ヘルニア患者から得られる髄核組織は平均1-2g程度と少量であるため、大量増幅する必要があったが、新規特許技術により、機能性を維持しながらの細胞の大量培養が可能となり、1ドナーの原材料から1000名を超える患者へ投与可能な製造技術を得た。そこで同種椎間板細胞製品の国内生産を目指し、若年者椎間板ヘルニア組織を収集、特許技術を用いて分離される同種椎間板細胞の最終製品の規格化を行っている。現在の製品は非臨床の有効性推定データにおいて他の同種髄核細胞の類似製品と比較して椎間板の再生能が有意に高く薬効を長期に示している。その後PMDAとの品質（原材料）の対面助言を完了させ、CDMOと製造委託を行い最終製品の前臨床試験並びにProof-of-Concept(POC)取得に取り組んでいる。

【研究成果】

【目的】細胞移植療法による椎間板再生医療は臨床への橋渡しプロセスにあり、若年椎間板ヘルニア組織をドナーソースとした同種髄核細胞製品開発において、一度に大量の製品を凍結保存する際、一定時間、凍結保存液に室温で晒されることが不可避である。今年度は大量培養中にTie2発現を維持する方策についてラミニンの培養髄核細胞への影響を調べた。

方 法: ヒト髄核細胞を Non Coat / Laminin Coat ディッシュへそれぞれ播種し、培養により得た細胞を評価した。細胞表面マーカーはフローサイトメトリー、タンパク質発現評価はWestern Blotting、遺伝子発現についてはRNA-Seqにより解析を行った。

結 果: 4週間培養された髄核細胞の細胞内に発現する Col2 をフローサイトメトリーで評価したところ、Laminin Coat は Col2 の発現率を有意に増加させた (Non Coat: 10.2% (±1.8%)、Laminin Coat: 26.2% (±7.5%)、p=0.01)。同サンプルのWestern Blotting 評価においても、Laminin Coat によるCol2産生亢進が確認され、Laminin Coat は Non Coat と比較し、Col2の発現レベルが約2倍と有意に増強した (p<0.015)。RNA-Seqでは培養期間の経過にかけて Col2 遺伝子の発現が徐々に減衰することが確認された。

まとめ: 本研究では、我々が研究開発を進める再生医療等製品における髄核細胞の幼若性を維持するために、培養過程でヒト組み換え型ラミニンフラグメントとして精製された iMatrix-511 を使用した際の髄核細胞への影響について評価を行った。Laminin 上で培養された細胞は、タンパク質レベルで Col2 が高発現することを確認したが、RNAレベルでの特異性は確認できなかった。RNA-seqではECM関連シグナル系を含むシグナル系の解析を行い、培養期間の経過にかけCol2 遺伝子の発現が徐々に減衰することが確認された。また、Lamininにより細胞増殖に関わる遺伝子発現が増強されることを確認した。

【今後の展望】

2020年度にはAMED橋渡しpreBに採択され、PMDAとRS戦略相談(安全性・その他原料試薬に関する品質)を完了した。また椎間板組織の採取、収集および原材料の供給システム構築を完了し、2023年度AMED橋渡しシーズFの支援の下、新特許技術で製造した最終製品のPMDA対面助言(安全性)を完了し、非臨床試験(有効性、毒性予備試験)、製品の品質を担保する解析を実施中である。

再生医療学研究部門



隅山香織
Suyama Kaori
生体構造学 准教授

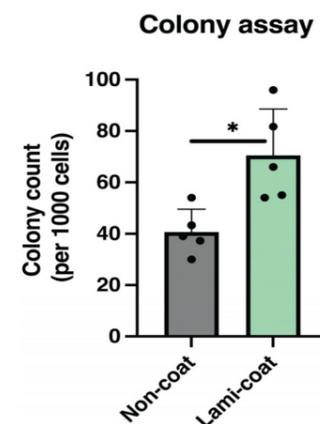


檜山明彦
Hiyama Akihiko
整形外科学 准教授



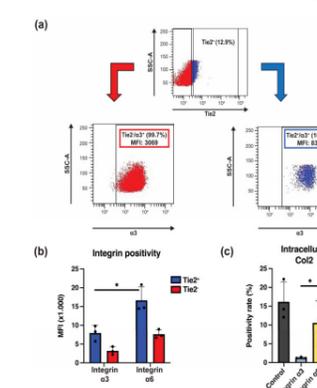
プロジェクトリーダー: 酒井大輔
Sakai Daisuke
医学部医学科外科学系整形外科学 教授
医学部付属病院診療部次長

図1



標準(ノンコート)またはiMatrix(ラミコート)コートされたディッシュで6日間培養された髄核(NP)細胞から形成される球状コロニーの数の定量、その後メチルセルロースコロニー形成アッセイを行った結果、ラミニンコートで有意に球状コロニー数の増加が見られた(p<0.05, n=5)。

図2



ラミニンコーティングから得られる有益な結果に対するインテグリン-α3および-α6の関与の評価。(a)フローサイトメトリー分析におけるゲーティング手順。青色はTie2陽性、赤色はTie2陰性の髄核(NP)細胞を示す。(b) Tie2陽性およびTie2陰性のNP細胞集団におけるインテグリン-α3およびインテグリン-α6に対する染色強度の定量。(c) インテグリン-α3またはインテグリン-α6をブロックした後のNP細胞における細胞内Col2の陽性率、未ブロックの抗体処理を受けたNP細胞との比較。(p<0.05, n=3)。

Soma H, Sakai D, Nakamura Y, et al. Recombinant Laminin-511 Fragment (iMatrix-511) Coating Supports Maintenance of Human Nucleus Pulposus Progenitor Cells In Vitro. Int J Mol Sci. 2023 Nov 24;24(23):16713. doi: 10.3390/ijms242316713. PMID: 38069038; PMCID: PMC10706138. より引用

Selected Papers.

- Hiyama A, Sakai D, Sato M, Watanabe M. Evaluating the Efficacy of IL-6 as Predictors of Lateral Lumbar Interbody Fusion Success: Insights From Pain Scores and JOABPEQ Assessments. Global Spine J. 2024 Mar 21;21925682241241518. doi:10.1177/21925682241241518. Epub ahead of print. PMID: 38511353.
- Ambrosio L, Schol J, Ruiz-Fernandez C, Tamagawa S, Soma H, Tilotta V, Di, Giacomo G, Cicione C, Nakayama S, Kamiya K, Papalia R, Sato M, Vadalà G, Watanabe M, Denaro V, Sakai D. ISSLS PRIZE in Basic Science 2024: superiority of nucleus pulposus cell- versus mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in attenuating disc degeneration and alleviating pain. Eur Spine J. 2024 Feb 28. doi: 10.1007/s00586-024-08163-3. Epub ahead of print. PMID: 38416190.
- Tamagawa S, Sakai D, Nojiro H, Nakamura Y, Warita T, Matsushita E, Schol J, Soma H, Ogasawara S, Munesada D, Koike M, Shimizu T, Sato M, Ishijima M, Watanabe M. SOD2 orchestrates redox homeostasis in intervertebral discs: A novel insight into oxidative stress-mediated degeneration and therapeutic potential. Redox Biol. 2024 May;71:103091. doi: 10.1016/j.redox.2024.103091. Epub 2024 Feb 19. PMID: 38412803; PMCID: PMC10907854.
- Nemoto H, Sakai D, Watson D, Masuda K. Nuclear Factor-κ B Decoy Oligodeoxynucleotide Attenuates Cartilage Resorption In Vitro. Bioengineering (Basel). 2024 Jan 1;11(1):46. doi: 10.3390/bioengineering11010046. PMID: 38247922; PMCID: PMC10813736.
- Ambrosio L, Schol J, La Pietra VA, Russo F, Vadalà G, Sakai D. Threats and opportunities of using ChatGPT in scientific writing-The risk of getting spine less. JOR Spine. 2023 Dec 13;7(1):e1296. doi: 10.1002/jsp2.1296.PMID: 38222818; PMCID: PMC10782071.
- Soma H, Sakai D, Nakamura Y, Tamagawa S, Warita T, Schol J, Matsushita E, Naiki M, Sato M, Watanabe M. Recombinant Laminin-511 Fragment (iMatrix-511) Coating Supports Maintenance of Human Nucleus Pulposus Progenitor Cells In Vitro. Int J Mol Sci. 2023 Nov 24;24(23):16713. doi: 10.3390/ijms242316713. PMID: 38069038; PMCID: PMC10706138.
- Munesada D, Sakai D, Nakamura Y, Schol J, Matsushita E, Tamagawa S, Sako K, Ogasawara S, Sato M, Watanabe M. Investigation of the Mitigation of DMSO-Induced Cytotoxicity by Hyaluronic Acid following Cryopreservation of Human Nucleus Pulposus Cells. Int J Mol Sci. 2023 Jul 31;24(15):12289. doi: 10.3390/ijms241512289. PMID: 37569664; PMCID: PMC10419032.
- Ruiz-Fernández C, Ait Eldjoudi D, González-Rodríguez M, Cordero Barreal A, Farrag Y, García-Caballero L, Lago F, Mobasher A, Sakai D, Pino J, Gualillo O. Monomeric CRP regulates inflammatory responses in human intervertebral disc cells. Bone Joint Res. 2023 Mar 7;12(3):189-198. doi:10.1302/2046-3758.123.BJR-2022-0223.R1. PMID: 37051830; PMCID: PMC10032231.