

再生医療学研究部門

「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要の一つである。これまで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。我々は機能性を維持した細胞の大量培養を可能とし、1ドナーの原材料から1000名を超える患者へ投与可能となる特許製造技術を新たに取得した。以降、特許技術を用いて分離された若年者椎間板ヘルニア組織の同種椎間板細胞を最終製品として、規格化・国内生産を目指している。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から品質(原材料)の対面助言を受け、CDMOに製造委託し最終製品の非臨床試験ならびにProof-of-Concept(POC)取得に励んでいる。

【研究成果】

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、若年者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。ジメチルスルホキシド(DMSO)は、凍結時に生じる細胞内の水晶形成を低減させるため凍結保存液に必要不可欠であるが、高濃度のDMSOは細胞毒性を示すことが報告されている。そこでDMSOのヒト髄核細胞への影響および酸化ストレス関連細胞傷害メカニズムを調査し、抗酸化剤N-アセチルシステイン(NAC)の凍結保存液への添加が凍結融解後の細胞生存率に与える影響を検討した。方法として、腰椎手術時に採取したヒト椎間板組織(n=12、平均20.5歳)より髄核細胞を抽出し、凍結保存液に使用される0-10%濃度のDMSO添加培地で培養したのち、CellTiter Glo Assayによる細胞生存率評価、flow cytometryによるアポトーシス評価を行った。また酸化ストレスマーカーであるDHE、MitoSOX染色の蛍光強度をflow cytometryで評価し、主要な抗酸化酵素のmRNA発現をRT-PCRで解析した。さらにDMSO10%含有凍結保存液にNACを添加し、凍結融解後の細胞生存率を評価した。結果、DMSO24時間の曝露時、濃度1%以下では細胞生存率の低下は認めなかったが、5%以上では時間・濃度依存的に低下しアポトーシスも有意に増加した。また細胞内スーパーオキシドはDMSO濃度依存的に増加し、特にミトコンドリア内で顕著に増加した。抗酸化酵素のmRNA発現はDMSO濃度依存的に低下した。さらに凍結保存液へのNAC添加により凍結融解後の細胞生存率は有意に上昇、アポトーシスも抑制した。DMSOによる細胞生存率低下、アポトーシス増加は細胞内スーパーオキシドの増加が関連していた。凍結保存液へのNAC添加は凍結融解後のDMSOによる酸化ストレスを軽減することで細胞生存率の上昇をもたらし、細胞製品開発の一助となりうると考える。

【今後の展望】

2020年度には、AMED橋渡しpre B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)を行い、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た。今後は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する予定である。



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 准教授

図1) DMSO24時間の曝露時、濃度1%以下では細胞生存率の低下は認めなかったが、5%以上では時間・濃度依存的に低下しアポトーシスも有意に増加した。

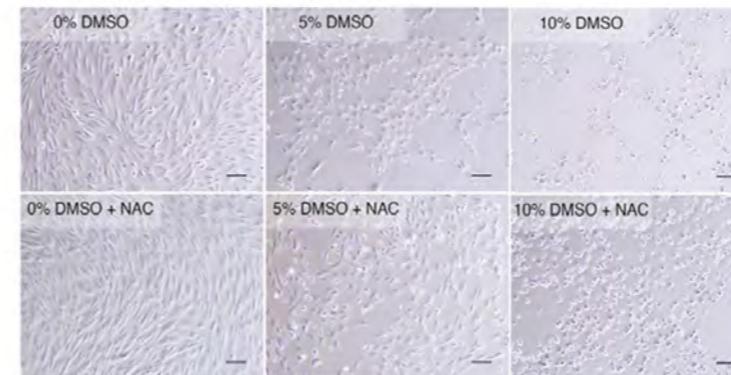
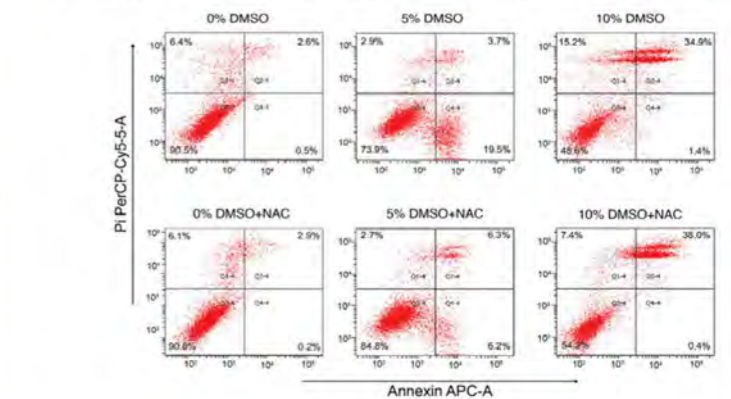


図2凍結保存液へのNAC添加により凍結融解後の細胞生存率は有意に上昇、アポトーシスも抑制した。



Selected Papers

- 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.
- Schol J, Sakai D, Warita T, Nukaga T, Sako K, Wangler S, Tamagawa S, Zeiter S, Alini M, Grad S. Homing of vertebral-delivered mesenchymal stromal cells for degenerative intervertebral discs repair - an in vivo proof-of-concept study. JOR Spine. 2022 Nov 14;6(1):e1228. doi: 10.1002/jsp2.1228. PMID: 36994461; PMCID: PMC10041374.
- Suyama K, Sakai D, Hayashi S, Qu N, Terayama H, Kiyoshima D, Nagahori K, Watanabe M. Bag-1 Protects Nucleus Pulposus Cells from Oxidative Stress by Interacting with HSP70. Biomedicine. 2023 Mar 12;11(3):863. doi: 10.3390/biomedicine11030863. PMID: 36979842; PMCID: PMC10045753.
- Tamagawa S, Sakai D, Schol J, Sako K, Nakamura Y, Matsushita E, Warita T, Hazuki S, Nojiri H, Sato M, Ishijima M, Watanabe M. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress-mediated cell viability loss induced by dimethyl sulfoxide in cryopreservation of human nucleus pulposus cells: A potential solution for mass production. JOR Spine. 2022 Oct 1;5(4):e1223. doi: 10.1002/jsp2.1223. eCollection 2022 Dec. PMID: 36601378
- Schol J, Sakai D. Comprehensive narrative review on the analysis of outcomes from cell transplantation clinical trials for discogenic low back pain. N Am Spine Soc J. 2022 Dec 22;13:100195. doi: 10.1016/j.xnsj.2022.100195. eCollection 2023 Mar. PMID: 36655116
- Oshita Y, Matsuyama D, Sakai D, Schol J, Shirasawa E, Emori H, Segami K, Takahashi S, Yagura K, Miyagi M, Saito W, Imura T, Nakazawa T, Inoue G, Hiyama A, Katoh H, Akazawa T, Kanzaki K, Sato M, Takaso M, Watanabe M. Multicenter Retrospective Analysis of Intradiscal Condoliase Injection Therapy for Lumbar Disc Herniation. Medicina (Kaunas). 2022 Sep 15;58(9):1284. doi: 10.3390/medicina58091284. PMID: 36143959; PMCID: PMC9501482.
- Yurube T, Han I, Sakai D. Concepts of Regeneration for Spinal Diseases in 2022. Int J Mol Sci. 2022 Aug 26;23(17):9710. doi: 10.3390/ijms23179710. PMID: 36077105; PMCID: PMC9456518.