

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390405

研究課題名 (和文) 活性化髄核細胞移植療法による椎間板変性抑制・細胞保存法の確立と安全性の検討

研究課題名 (英文) Disc repair with transplantation of activated nucleus pulposus cells-how to preserve the cells and its safety-

研究代表者

持田 讓治 (MOCHIDA JOJI)

東海大学・医学部 教授

研究者番号：30129697

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学 整形外科

キーワード：髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞、凍結保存、椎間板移植、変性抑制

1. 研究計画の概要

我々が種々の点で確立した骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化された髄核細胞の臨床応用における適応拡大を考え、動物実験で過去2年間に確認した手法を手術中に得られたヒトの椎間板髄核組織、髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞を用いて検証した。すなわち、髄核組織そのものの凍結群、分散した髄核細胞を凍結前に骨髄間葉系幹細胞によって活性化する群、髄核細胞を凍結後の再解凍した後に同様に活性化する群の3群を比較検討した。

2. 研究の進捗状況

10人のヒト髄核組織と自家骨髄間葉系幹細胞を取り出し使用した。共に3等分に分けA:非凍結群、B:細胞凍結群、C:組織凍結群として、A群は当院のプロトコルドおりに6well plateを使用し4日間の単層培養、3日間の細胞間接着を伴う共培養を行った。凍結B,C群の凍結期間は2週間で行い、解凍後は非凍結群と同様の培養を行った。評価はviability、MTT assay、GAG/DNA、Aggrecan 転写活性、コロニ-形成、遺伝子発現 profiling を行った。安全性の評価のため染色体検査が3群それぞれの活性化髄核細胞に行われ、腫瘍性評価のため活性化髄核細胞をNOD-scid mouseに皮下注射し組織学的評価を行った。A群と比較してB群は細胞のviability、細胞増殖能、基質合成能に明らかな差はなかった。これは過去に我々がビーグル犬を用いて行った実験と同

様の結果となった。また、非凍結群(A群)、凍結群(B,C群)ともに染色体異常、腫瘍性病変は認められずRT-PCRにて共に同様の遺伝子発現を示していた。結論として細胞凍結ではviability、細胞増殖能、基質合成能に明らかな差はなく今後細胞凍結による活性化髄核細胞移植の実現の可能性が示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)凍結群ではviability、細胞増殖能、基質合成能に関して非凍結群と明らかな差はなく、今後細胞、組織の凍結による活性化髄核細胞移植の実現の可能性が示唆された。

4. 今後の研究の推進方策

これらin vitroの研究結果から、腰椎椎間板変性の色々な病態に対して、採取した椎間板髄核細胞組織を、患者の色々な病態の進行に合わせて活性化し移植する複数の臨床系の樹立を検討する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, Iwashina T, Serigano K, Tamura F, Mochida J. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous

mesenchymal stem cells. Journal of
Orthopaedic Research 査読あり Vol 28,
2010, 623-630

〔学会発表〕(計2件)

- ① 田中真弘、酒井大輔、新井文征、持田讓治。活性化髄核細胞の凍結保存法についての基礎的検討 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 2010年10月14日 京都市
- ② 酒井大輔、田中真弘、新井文征、持田讓治。椎間板再生のための細胞移植療法臨床研究の進捗および幹細胞研究による新展開 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 2010年10月14日 京都市