

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10710

研究課題名(和文) 大脳白質障害に対する再生医療実現のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for regenerative medicine for white matter disorder in central nervous system

研究代表者

今井 英明 (Imai, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：70359587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：(A)細胞(細胞医薬品)移植と(B)ドラッグデリバリーシステム(DDS)によるmRNA遺伝子治療を、動物実験モデルで検証した。(A)SB623細胞は、ヒト骨髄由来である加工幹細胞である(サンバイオ社)。事情により、用いることができず、動物研究は断念したが、SB623細胞による外傷性脳損傷に起因する慢性運動障害患者に対する二重盲検比較対照第II相試験に、施設責任者として参加した。運動機能の改善に関して有効性を示した。(B)DDSを用いてBDNF(脳由来神経栄養因子)mRNAをラット前脳虚血モデルに投与した。BDNF mRNAを虚血後2日目に脳室内投与した群で50%以上の細胞生存を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物実験を用いての、SB623細胞移植による機能改善の機序の解明を行うことを目的としたが、その基礎研究は実行できなかった。一方で、国際共同試験に施設責任者として参画して、実際にSB623細胞をヒトの脳内に移植するという極めて貴重な経験をすることができた。主要評価項目である運動機能の改善に関しての有効性を科学的に示した。機序に関しては今後の基礎研究とサブ解析に任せるところが大きいが、本邦の再生治療の実用化に向けて加速させる一助になった。

動物研究では、ナノ・ドラッグデリバリーシステムによる中枢神経系へのBDNF mRNA遺伝子の導入の可能性を示し、薬剤送達の困難さを克服する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Both (A) cell transplantation and (B) drug delivery system for mRNA gene therapy were evaluated for neuronal regeneration in experimental animal model. (A) SB623 cells, which are allogeneic modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells (SunBio Inc.) cannot be used for basic research due to circumstances. However, we participated in the double-blind, controlled phase II trial for the purpose of evaluating safety and efficacy of SB623 transplantation therapy for patients with chronic motor disorders caused by traumatic brain injury. The change of Fugl-Meyer Motor score from baseline was significantly higher for SB623 treated compared to control patients at 6 months.

(B) The biocompatible nanomicelles encapsulating BDNF (brain-derived neurotrophic factor) mRNA were prepared. This was administered intraventricularly in a rat forebrain ischemia model. More than 50% cell survival was observed in the group to which BDNF mRNA was administered 2 days after ischemia.

研究分野：脳神経外科

キーワード：再生医療 大脳白質障害 骨髄由来間葉系幹細胞 加工幹細胞SB623 二重盲検比較対照第II相試験 全脳虚血モデル BDNF mRNA mRNA delivery

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳白質障害は、脳梗塞をはじめとして、脳腫瘍、外傷など脳外科的疾患と密接な関係がある。さらに近年、アルツハイマー病、多発性硬化症、老人性痴呆症などの変性疾患との関連が明かされ、ますますその重要性が認識されている。中枢神経であるがゆえに、現在、根本的な治療法は存在しないため再生治療による新たな治療法が望まれる。

昨今、本邦における神経再生医療へ向けての基礎研究並びに臨床応用への発展は目覚ましく、中枢神経に対する新たな治療法開発への期待が高まっている。iPS 細胞による、網膜への細胞移植治療をはじめとして、心筋あるいは角膜への自家細胞移植治療などが世界に先駆けて本邦で行われていることは周知のとおりである。2014 年秋に改正薬事法(医薬品医療機器等法)が施行され、再生医療へ向けての社会基盤もできつつある。中枢神経系に関しては、脳梗塞や脊髄損傷の患者では本人の骨髄から採取した細胞を培養し間葉系骨髄細胞を静脈投与する治験も進行しており、実用化への可能性がある。

一方で、これらの細胞移植による治療に関しては、すべて自家移植という限定条件から高コストであることや治療まで数か月を要するなど、一般医療の普及へ向けての観点からは根源的な問題に直面している。

2. 研究の目的

今回の申請課題として再生医療を実現化するために、基礎研究として何をすべきかということに注目し立案した。(A) Cell Biology と (B) Nanotechnology の 2 つの観点から、各々、もっとも実現可能性の高い、(A) 細胞(細胞医薬品)移植と (B) ナノ・ドラッグデリバリーシステム(DDS) による mRNA 遺伝子治療に注目し、その効果を動物実験モデルで検証する。

(A) Cell Biology: SB623 細胞を用いる。成人ヒト骨髄由来神経再生細胞である。健康人骨髄液から採取した細胞に Notch-1 の細胞内ドメインをエンコードしたプラスミドを一過性に導入して、加工・培養して作製するものである。一人の donor から他家由来の細胞医薬品として数千人が作成される、という細胞医薬品である(サンバイオ社)。

(B) Nanotechnology (ナノ DDS): ポリエチレングリコール(PEG) と生体適合性カチオンポリマーを連結したブロックポリマーを基本とするキャリアを用いて目的とする mRNA を遺伝子導入する。mRNA とこのブロックポリマーを混合すると、周囲を PEG で覆われた内部に凝集した核酸分子を持つミセル型会合体が形成され、大きさや構造から天然ウイルスとも呼べる遺伝子キャリアとなる(東京大学片岡研究室)。ナノ DDS を用いて BDNF mRNA を白質障害部位に投与する。

3. 研究の方法

(A) ラット内包障害モデルの作成: ラット大脳白質(内包)へ定量的にエンドセリンを注入し(血管収縮により)選択的な白質梗塞を作成する。先行研究でエンドセリンの注入角度(20 30 度)の最適化をおこない再現性のよい脳梗塞の作成する(発表論文 1)。同部位に定量的に SB623 細胞を移植する。

動物実験のための SB623 細胞が入手困難となり動物実験は断念した。

一方、ほぼ同時期に SB623 を用いた国際共同治験への参加要請があり施設責任者として参加した。

以下に概略を述べる(発表論文 2 より抜粋し改変した)

(1) 治験の概要: 「外傷性脳損傷に起因する慢性運動障害患者における加工幹細胞(SB623)の安全性及び有効性の評価を目的とした二重盲検比較対照第 II 相試験」

本治験は受傷後 1 年以上経過した運動障害を有する外傷性脳損傷患者を対象に、再生医療ベンチャー「サンバイオ株式会社」が開発した細胞医薬品「SB623」の定位脳手術による投与による有効性を、対照となる偽手術群と比較することを主要目的とした、二重盲検比較対照試験である。本邦では本学を含めて 5 施設、海外も含めると計 30 施設程度が参加する国際共同試験であり、主要有効性評価項目は Fugl-Meyer Motor Scale、副次有効性評価項目は、Disability Rating Scale、Action Research Arm Test、歩行速度、被験者および治験担当医師による全般的な改善度、NeuroQOL(上肢機能、下肢機能)とし、SB623 の投与後 1 年間にわたり、有効性、安全性の評価を行うデザインとしている。偽手術群に加え、 2.5×10^6 、 5.0×10^6 、 10×10^6 個の SB623 投与群の 4 群を設定し、それぞれ 1:1:1:1 の割合で無作為割り付けされる。対象患者は、前述の受傷後 1 年以上経過した運動障害を有する外傷性脳損傷患者に加え、18 歳以上 75 歳以下で MRI にて確認可能な運動障害に起因する病変を有し、Glasgow outcome scale-extended にて 3 点以上 6 点以下であること等を条件としている。また、適切な評価及び被験者保護の観点から、他の重大な神経疾患およびその既往歴を有する患者、コントロール不良の高血圧、糖尿病等を有する患者等の除外基準を設定している。

(2) 治験実施までの流れ

本邦では、サンバイオ株式会社が本治験の治験届を医薬品医療機器総合機構(PMDA)に提出し、

審査を終えたのち、本学を含む各参加施設において治験審査委員会の承認を受けた上で、治験の準備が開始された。

治験準備にあたり、SB623 の調製や、定位脳手術を用いた投与など、通常の薬剤を用いた治験とは異なる手順やそのトレーニングが必要であり、そのため、院内の関連する部門との連携体制を構築した。具体的には、SB623 は凍結状態で保存されており、投与前に院内にて解凍し、調製した後で使用するため、凍結状態での保存場所および解凍・調製をするための適切な場所、必要となる資材やスタッフを確保する必要があった。本学では学内のセルプロセッシングセンターの協力を得て、スタッフに対して手順のトレーニング、実際の細胞を用いた練習を行った。投与についても、SB623 を定位脳手術で投与するための機器が、通常の定位脳手術で用いられている機器と接続可能かどうか、リハーサルを行って確認した。加えて、SB623 の投与は手術が必要となるため、脳神経外科が実施するが、術者は偽手術群か SB623 投与群かがわかるため、有効性評価は盲検性維持の観点から、脳神経外科とは異なる科や部門にて実施することとなった。本学ではリハビリテーション科が、すべての参加国で共通した評価方法のトレーニングを受講し、機能評価を担当している。

これらの準備を完了して被験者の組み入れが可能となり、2016 年秋に本邦で第 1 例目の手術を実施した。治験終了時(2017 年 12 月)までに本学では合計 4 例の治験を実施した。症例はスポーツ外傷 1 例と交通外傷 3 例の合計 4 症例を経験した。年齢は 22 歳から 36 歳ですべて男性である。外科治療は、割付に従い脳神経外科医が担当した。割付け結果は、患者を含め他医療関係者は知らない。運動機能評価は、リハビリ医が担当した。

(3) 細胞移植手術の実際

細胞は生物であるため、製品の解凍・調整から脳内への移植までの時間をできる限りロスタイムなく行う必要がある。したがって、細胞移植手術当日の time table は 厳密である。2 つのチームが必要である。一つは手術を担当するチームともう一つが細胞調整のチームであり、密に相互に連絡を取りながら独立して各々の準備を進める。当日の朝、web 上で対象患者が 4 つの治療群のうちのいずれか一つに割り付けられる。結果がわかり次第、細胞調整チームは、細胞調整室(CPC)にて細胞の準備を開始する。溶解した細胞数をカウントし(生存率を確認し)、至適な細胞濃度に調整する。この一連の過程に 2 時間を要する。一方、手術担当チームは、病室へ向かう。定位脳手術用のフレームを固定し、MRI 撮影室まで移動する。画像撮影後ただちにナビゲーションシステムを用いてターゲットポイントと trajectory(侵入経路)を決定する。このターゲットおよび trajectory の決定に関しては、治験実施医療機関の神経外科医が、患者独自の神経解剖学的構造に基づき、運動神経路に最も近い目標部位を選択することができる。細胞調整の進行を確認したのち、手術室に患者とともに入室し、手術の準備を整える。手術は基本的に局所麻酔で行う。ナビゲーションシステムに従い、穿頭部位をマーキングし、皮膚切開をデザインする。移植細胞の最終確認がなされ、CPC から手術室へ向かったことを確認し、執刀を開始する。執刀から 15 分以内で穿頭とレクセルフレームの準備が整う。3 本予定されている Trajectory の一つを選択し、レクセルフレームに安定化針プローブを固定する。それに Pittsburgh 移植カニューレを挿入し、初回移植のための最深の目標点まで挿入する。カニューレの脳内留置に先立ち、移植カニューレを通じて、100 μ l シリンジ内に移植細胞を準備する。移植部位に 20 μ l の細胞懸濁液をゆっくり(10 μ l/分)注入する安定化針プローブをゆっくりと引き抜き、損傷部位の下方から上方にかけての損傷周囲部に等間隔(5 mm)で、一つの trajectory に対して 5 か所に移植を行う。残りの 2 本の trajectory(軌道が異なる刺入経路)に関しても、同一の穿頭孔を通じて、上記の手順を繰り返す。合計で 15 点の移植部位となりトータルで 300 μ l の注入を行う。1 分あたり 20 μ l の即であるため、注入だけで 30 分を要する。カニューレの移動や trajectory の変更などを含めると 1 時間弱の時間を要する。型のごとく閉創して手術を終了する。手術時間は約 1 時間 15 分である。手術終了後、CT スキャンを施行し、患者を脳神経外科病棟に入院させ、観察する。手術翌日の退院前に MRI 検査を行い、重大な出血リスクがないことを確認する。術後 7 日目に抜糸を行い、患者を退院させる。

(4) 治験結果

結果は、AANS (American Association of Neurological Surgeons) 2019 で発表した。(学会発表 1)

全体 61 例の内、国内で 17 例を施行した。治験実施責任者として東大病院では 4 例実施を実施した。

この試験では、SB623 投与群 46 名、コントロール群 15 名の合計 61 名の被験者で行われ、主要評価項目は FMMS のベースラインからの改善量としています。24 週時点の Fugl-Meyer Motor Scale(FMMS)のベースラインからの改善量が、SB623 投与群 8.7 点、コントロール群 2.4 点となり主要評価項目を達成した。運動機能障害の変化を測定する FMMS において、10 点以上の改善は外傷性脳損傷における臨床的に意味のある改善量とされているなかで、この試験では SB623 投与群 18 名(39.1%)、コントロール群 1 名(6.7%)で 10 点以上を達成し、統計学的な有意差を認めた(p 値=0.044)。

(B)ラット全脳虚血モデルを作成し、ナノ DDS による脳由来神経栄養因子メッセンジャー-RNA (BDNF mRNA) を投与する。投与開始期に関しては急性期から亜急性期にかけて脳室内への投与術を行う。

(1)手法: レポータータンパク発現 mRNA による動態評価を踏まえ、ラット一過性前脳虚血モデルに対し BDNF mRNA を生体適合性ナノミセルに内包し、虚血後種々のタイミングで側脳室内投与した。組織切片の NeuN 免疫染色にて神経細胞の生存割合を定量した。また、神経系マーカーと BDNF との二重染色により、BDNF を発現する細胞を同定した。

(2)結果

ナノミセルを用いた mRNA 側脳室内投与により 2 日間以上の持続的タンパク質産生が得られた。ラット前脳虚血モデルに対し BDNF mRNA を虚血後種々のタイミングで単回投与し 6 日目の脳切片で評価したところ、BDNF mRNA を虚血後 2 日目に投与した群で 50%以上の細胞生存を認め、これは虚血直後を含む他のタイミングより優れていた。免疫二重染色の結果、アストロサイトが特異的に BDNF を発現している所見が得られた。

(3)結論: mRNA による BDNF 導入は中枢神経系の薬剤送達の困難さを克服する神経保護薬として有望である。一般的にアストロサイトは恒常性維持機能により薬剤排泄に関わるが、mRNA であればむしろ治療タンパク産生拠点として働きうる可能性が示された点は画期的と言える。

4. 研究成果

申請課題として、(A) Cell Biology と (B) Nanotechnology の 2 つの観点から、実現可能性の高い、(A)細胞(細胞医薬品)移植と(B)ナノ・ドラッグデリバリーシステム(DDS) による mRNA 遺伝子治療に注目し、動物実験モデルで検証することを計画した。

(A)成人ヒト骨髄由来である加工幹細胞である SB623 細胞は、健康人骨髄液から採取した細胞医薬品である(サンバイオ社)。事情により、基礎研究に用いることができず、動物実験による基礎研究は断念した。一方、SB623 細胞による外傷性脳損傷に起因する慢性運動障害患者に対する安全性及び有効性の評価を目的とした二重盲検比較対照第 II 相試験には、施設責任者として参加した。主要評価項目である運動機能の改善に関しての有効性と安全性を示した。SB623 は、健康な人の骨髄から採取した間葉系幹細胞を加工・培養したもので、1 人から採取した骨髄液から約 500-1000 人分の治療が賄える。細胞医薬品としてストックしておけるということが最大特徴である。細胞移植治療に関しては、自家移植か他家移植に大きく分類できる。自家移植は自分の細胞を培養して使うという性格上、移植細胞としての精製までに相当の時間と経費がかかるということで臨床応用においては大きな課題を抱える。一方、他家移植に分類される SB623 細胞は、細胞移植は必要時にいつでも使えるという大きな利点がある。他家移植であるが故に、移植による免疫応答を懸念する声がある。SB623 細胞に関しては、詳細な機序は不明であるが、免疫応答を抑制する機能があり、他家細胞の移植にも関わらず免疫抑制剤を使用する必要がないことも一つの大きな利点である。

移植された細胞は、術後約 1 カ月間で脳内から消滅することが動物実験より示されている。すなわち、移植した細胞が脳内に生着して、神経ネットワークを構築させるわけではない。これらから推論できることは、移植細胞から分泌される何らかのサイトカイン(既知あるいは未知の栄養因子)が神経機能改善という点において関与している可能性が示唆される。今回、臨床試験の二重盲検試験で有効性が科学的に示されたことは重要である。今後機序に関して、基礎研究を通じて明らかにされていくことが望まれる。神経機能の改善に寄与する分子あるいは機構が明かされれば薬の開発をはじめとして、神経機能改善に関する画期的な治療法開発に直結する可能性がある。

(B)ポリエチレングリコール(PEG)と生体適合性カチオンポリマーを連結したブロックポリマーを基本とするキャリアを用いて BDNF(脳由来神経栄養因子)mRNA を内包する生体適合性ナノミセルを作成した。これをラット前脳虚血モデルの脳室内に投与した。BDNF mRNA を虚血後 2 日目に投与した群で 50%以上の細胞生存を認めた。mRNA による BDNF 導入は中枢神経系の薬剤送達の困難さを克服する神経保護薬として可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Ono H, Imai H, Miyawaki S, Nakatomi H, Saito N. Rat white matter injury model induced by endothelin-1 injection: technical modification and pathological evaluation. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2016;76(3):212-24.

2. 今井 英明, 齊藤 延人【中枢神経疾患における細胞治療】外傷性脳損傷における加工幹細胞(SB623)治療 二重盲検比較対照第 II 相試験の実施(解説/特集) 医学のあゆみ (0039-2359)260 巻 7 号 Page573-577(2017.02)

3. 福島 雄大, 今井 英明, 内田 智士, 中富 浩文, 片岡 一則, 位高 啓史, 斉藤 延人
mRNA デリバリーによる虚血性神経細胞死治療 Enhancement of neuroprotective effect of astrocytes(会議録) 脳循環代謝 (0915-9401)29 巻 1 号 Page221(2017.11)

4. 福島 雄大, 内田 智士, 小野 秀明, 今井 英明, 位高 啓史, 中富 浩文, 片岡 一則, 斉藤 延人
mRNA デリバリーによる海馬遅発性神経細胞死の治療と経時変化に着目した病態解析(会議録) 脳循環代謝 (0915-9401)28 巻 1 号 Page190(2016.11)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. David O. Okonkwo, Ihor Semeniv, Jaroslav Zinkevych, Peter McAlliste, Masahito Kawabori, Jefferson W. Chen, Benjamin M. Frishberg, Achal K. Achrol, Albert Lai, Robert E. Gross, Alan H. Weintraub, Gary K. Steinberg, Hideaki Imai, Daniel Lu, Takao Yasuhara, Susan Paadre, Mena Niakian, Takehiko Kaneko, Damien Bates
Safety and Clinical Outcomes of Implanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (SB623) in Patients with Chronic Motor Deficits from Traumatic Brain Injury: Interim Analysis of the Phase 2 STEMTRA Trial.
2019 AANS Annual Scientific Meeting Late Breaking Presentation

2. 今井英明、唐沢 康暉、長谷川洋敬、辛正廣、斉藤延人
他家間葉系幹細胞由来の細胞治療薬移植による頭部外傷治療
A clinical trial of modified stem cells (SB623) transplantation therapy in traumatic brain injury (TBI-01)
2018 第 77 回日本脳神経外科学術総会 特別シンポジウム

3. 今井 英明
本邦における SB623 移植再生治療(治験)の現状
Current status of regenerative medical treatment of SB623 transplantation in Japan
2016 第 75 回日本脳神経外科学会 学術総会 特別企画-1 細胞治療の「いま」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石崎 泰樹

ローマ字氏名：Ishizaki Yashuki

所属研究機関名：群馬大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：教授

研究者番号(8桁)：90183003

研究分担者氏名：位高 啓史

ローマ字氏名：Itaka keijii

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：特任准教授

研究者番号(8桁)：60292926

研究分担者氏名：宮脇 哲
ローマ字氏名：Miyawaki Satoru
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部付属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：70407914

研究分担者氏名：斉藤 延人
ローマ字氏名：Saito Nobuhito
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部付属病院
職名：教授
研究者番号（8桁）：60262002

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福島雄大
ローマ字氏名： Fukushima Yuta

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。