

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03809

研究課題名（和文）椎間板細胞のリプログラミング手法の確立と再生医療への橋渡しへ向けた基盤技術開発

研究課題名（英文）Basic development for reprogramming methods and translation of regenerative medicine in intervertebral disc cells

研究代表者

酒井 大輔（Sakai, Daisuke）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10408007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞移植療法による椎間板再生医療は臨床応用への橋渡し段階にあり、若年椎間板ヘルニア組織をドナーとする同種髄核細胞製品の開発において、大量の製品が凍結保存液に晒されることが避けられない。最終年度は椎間板再生医療の最適化を目指し、Tie2発現を維持するためのラミニンの影響を調査した。iMatrix-511を使用して髄核細胞の幼若度を評価し、ラミニン上でのCol2高発現を確認したが、RNAレベルでの特異性は認められなかった。RNA-seq解析でECM関連シグナル系を含む解析を行い、培養期間中にCol2遺伝子の発現減衰を確認、またラミニンにより増殖遺伝子の発現が増強されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。さらに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。このように、社会的意義が高いと判断されている。

研究成果の概要（英文）：The process of translating cell transplantation therapy for disc regeneration into clinical application is underway. As for the final year of the project, we investigated the effects of laminin on cultured nucleus pulposus cells to maintain Tie2 expression during mass culture. To maintain the youthfulness of the nucleus pulposus cells in the regenerative medicine products we are developing, we evaluated the effects of iMatrix-511, a purified human recombinant laminin fragment, on nucleus pulposus cells during the culture process. Cells cultured on laminin showed high Col2 expression at the protein level, but specificity was not confirmed at the RNA level. RNA-seq analysis of signaling pathways, including ECM-related pathways, confirmed that Col2 gene expression gradually decreased over time during culture. Additionally, laminin was found to enhance gene expression related to cell proliferation.

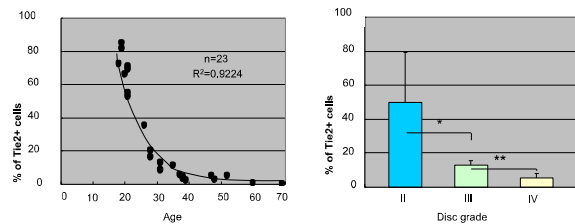
研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：椎間板 再生医学 腰痛

1. 研究開始当初の背景

腰痛、肩こり、坐骨神経痛などの原因となる椎間板変性は、椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症など様々な脊椎疾患の原因となる。すなわち、正常な加齢変化を逸脱して変性が進行、症状を発症する患者を早期に対症療法ではない、再生医療にて正常な加齢速度に戻す事が出来れば、罹患率を減少できる。本邦では現在 2800 万人の腰痛患者が存在しており、中・高齢者のロコモティブシンドロームの増加、医療費増加に深く関与しており、超高齢化が進むわが国では、実益的な治療・予防法の開発が急務である。

椎間板変性の予防、診断、治療についての基礎研究は過去 10 年で飛躍的に進歩し、椎間板変性の根幹に関わる様々な細胞、組織学的現象が明らかとなっている。中でも 2012 年に申請者らの研究チームが報告した、「椎間板変性の進行に髄核前駆細胞の消耗が関わる」事実(右図)は椎間板の治療法開発において、椎間板細胞としての機能を持つ細胞を人体最大の無血管環境で生き存えさせることの重要性を明らかとした。



Sakai D et al. Nature Communications 2012

細胞を人体最大の無血管環境で生き存えさせることの重要性を明らかとした。

そこで我々は実現可能な順から第一世代を新鮮屍体由来同種椎間板細胞製品と位置づけ、米国企業の治験を開始した。次に第二世代としてより高機能、長寿命であるが、若年者椎間板からしか作成できない、同種椎間板前駆細胞製品の開発に着手。平成 29 年度日本医療研究開発機構革新的医療技術創出拠点プロジェクト橋渡し研究戦略的推進プログラム・シーズ F「同種髄核細胞製品の産業化を目指した椎間板変性症に対する再生医療の実用化」へ採択された後、現在製薬企業支援の下、治験準備中である。

2. 研究の目的

しかしながら、同種細胞製品を用いた移植においては免疫応答への対応がたとえ無血管組織であっても懸念される。そこで京都大学 iPS 研究所と共同でより安価にかつ HLA 適合製品が製造可能な iPS 細胞バンクからのドナー細胞を用い、in vitro で椎間板髄核前駆細胞へ誘導法を探索した(平成 28 年度採択 基盤研究(B) iPS 技術と In Silico 創薬による髄核前駆細胞の分化制御と椎間板修復)。その結果、未分化多能性幹細胞や線維芽細胞、間葉系幹細胞などに 3 つの転写因子を強制発現させることで、髄核前駆細胞様に分化誘導可能となり、知財確保を展開した(特願 2019-066535、髄核細胞マスターレギュレーター転写因子を含む分化誘導剤、誘導髄核細胞の製造方法、および誘導髄核細胞の用途)。そこで本研究の目的は、第三世代の椎間板細胞製品として、先行研究で見出した分化誘導法を用いてリプログラミング技術により椎間板髄核前駆細胞を作成する方法を固める為の基盤技術開発を行う。

3. 研究の方法

再生医療等製品の作成に関わる技術開発：ラミネンコートを用いた製品作成：

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ネ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。

4. 研究成果

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。さらに 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Schol J, Sakai D	4. 巻 13
2. 論文標題 Comprehensive narrative review on the analysis of outcomes from cell transplantation clinical trials for discogenic low back pain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 N Am Spine Soc J .	6. 最初と最後の頁 100195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xnsj.2022.100195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamagawa S, Sakai D, Schol J	4. 巻 5
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOR Spine	6. 最初と最後の頁 e1223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsp2.1223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Volleman TNE, Schol J, Morita K, Sakai D, Watanabe M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Wnt3a and wnt5a as Potential Chondrogenic Stimulators for Nucleus Pulposus Cell Induction: A Comprehensive Review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurospine	6. 最初と最後の頁 19-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14245/ns.2040040.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Long Rose G., Ferguson Stephen J., Benneker Lorin M., Sakai Daisuke, Li Zhen, Pandit Abhay, Grijpma Dirk W., Eglin David, Zeiter Stephan, Schmid Tanja, Eberli Ursula, Nehrbass Dirk, Di Pauli von Treuheim Theodor, Alini Mauro, Iatridis James C., Grad Sibylle	4. 巻 3
2. 論文標題 Morphological and biomechanical effects of annulus fibrosus injury and repair in an ovine cervical model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOR SPINE	6. 最初と最後の頁 e1074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsp2.1074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamagawa Shota, Sakai Daisuke, Nojiri Hidetoshi, Nakamura Yoshihiko, Warita Takayuki, Matsushita Erika, Schol Jordy, Soma Hazuki, Ogasawara Shota, Munesada Daiki, Koike Masato, Shimizu Takahiko, Sato Masato, Ishijima Muneaki, Watanabe Masahiko	4. 巻 71
2. 論文標題 SOD2 orchestrates redox homeostasis in intervertebral discs: A novel insight into oxidative stress-mediated degeneration and therapeutic potential	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 103091 ~ 103091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2024.103091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ambrosio Luca, Schol Jordy, Ruiz-Fernandez Clara, Tamagawa Shota, Soma Hazuki, Tilotta Veronica, Di Giacomo Giuseppina, Cicione Claudia, Nakayama Shunya, Kamiya Kosuke, Papalia Rocco, Sato Masato, Vadala Gianluca, Watanabe Masahiko, Denaro Vincenzo, Sakai Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 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	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Spine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00586-024-08163-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nemoto Hitoshi, Sakai Daisuke, Watson Deborah, Masuda Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Nuclear Factor- B Decoy Oligodeoxynucleotide Attenuates Cartilage Resorption In Vitro	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 46 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering11010046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Soma Hazuki, Sakai Daisuke, Nakamura Yoshihiko, Tamagawa Shota, Warita Takayuki, Schol Jordy, Matsushita Erika, Naiki Mitsuru, Sato Masato, Watanabe Masahiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Recombinant Laminin-511 Fragment (iMatrix-511) Coating Supports Maintenance of Human Nucleus Pulposus Progenitor Cells In Vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16713 ~ 16713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242316713	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Munesada Daiki, Sakai Daisuke, Nakamura Yoshihiko, Schol Jordy, Matsushita Erika, Tamagawa Shota, Sako Kosuke, Ogasawara Shota, Sato Masato, Watanabe Masahiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Investigation of the Mitigation of DMSO-Induced Cytotoxicity by Hyaluronic Acid following Cryopreservation of Human Nucleus Pulposus Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12289 ~ 12289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241512289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ruiz-Fernandez Clara, Ait Eldjoudi Djedjiga, Gonzalez-Rodriguez Maria, Cordero Barreal Alfonso, Farrag Yousof, Garcia-Caballero Lucia, Lago Francisca, Mobasher Ali, Sakai Daisuke, Pino Jesus, Gualillo Oreste	4. 巻 12
2. 論文標題 Monomeric CRP regulates inflammatory responses in human intervertebral disc cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bone & Joint Research	6. 最初と最後の頁 189 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1302/2046-3758.123.BJR-2022-0223.R1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 椎間板変性に対する再生医療の産業化への挑戦
3. 学会等名 第51回 日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 椎間板再生医療とリハビリテーションによる腰痛治療の変革への期待
3. 学会等名 第95回 日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 椎間板再生医療は腰痛治療となり得るか?
3. 学会等名 第95回 日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 髄核細胞マスターレギュレーター転写因子を含む分化誘導剤、誘導髄核細胞の製造方法、および誘導髄核細胞の用途	発明者 酒井大輔、ジョル ディシヨール、中村 嘉彦	権利者 学校法人東海大 学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-557862	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

椎間板再生医療の研究 http://sekitsui.med.u-tokai.ac.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	升井 伸治 (Masui Shinji) (20342850)	山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------