作成／更新日:令和 8 年 5 月 31 日
課題管理番号: 25bm1223014h0003

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（非臨床 PoC 取得研究課題）
事後評価報告書

公開

Ⅰ 基本情報

研究開発課題名： （日本語）iPS 細胞由来髄核を用いた髄核 replacement による椎間板変性の再生治療開発
（英　語）Study of regenerative therapy for intervertebral disk degeneration by replacement with iPS cell-derived nucleus pulposus.

研究開発実施期間：令和 5 年 6 月 19 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：(日本語) 海渡　貴司
（英　語）KAITO TAKASHI

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授
（英　語）Osaka University・Graduate school of Medicine・Associate Professor

II 研究開発の概要

1.研究開発の背景

椎間板変性に伴う椎間板性腰痛は、慢性腰痛の主要な原因の一つであり、既存治療では疼痛緩和や固定術が中心で、変性した椎間板そのものを再生する根本的治療法は確立されていない。研究代表者らはこれまでに、動物モデルにおいてヒト iPS 細胞由来髄核様組織（hiPS 髄核）を摘出後椎間板へ移植することで、生着と椎間板再生効果を示してきた。本研究は、この成果を臨床応用へ橋渡しするための非臨床 PoC 取得を目指すものである。

2.研究開発の目的

本研究の目的は、hiPS 細胞由来髄核様組織を「組織」として椎間板内に移植する新規椎間板再生治療について、臨床応用に必要な非臨床 PoC データを取得することである。具体的には、ラットおよびミニブタ髄核摘出モデルを用いて、移植物の生着、組織学的再生効果、疼痛緩和効果、力学的機能回復を評価するとともに、hiPS 髄核の製造法、品質管理法、不純物検出法を確立し、安全性評価および臨床研究開始に向けた基盤を整備する。

3.研究開発成果の概要

ラットおよびミニブタを用いた有効性評価、疼痛行動解析、力学特性解析、製造・品質管理に関するデータ収集をさらに進め、hiPS 細胞由来髄核様組織（hiPS 髄核）移植による椎間板再生治療の非臨床 PoC 取得に必要な主要データを取得した。

ヌードラット尾椎モデルを用いた hiPS 髄核移植の有効性試験の実施

- hiPS 細胞由来髄核様組織を移植し、移植方法、移植物脱転防止法、術後管理、画像評価および組織学的評価法を確立した。
- 移植後 6 か月の長期評価において、ヒトビメンチン免疫染色により移植組織の生着を確認するとともに、髄核摘出後に生じる椎間板の組織的・構造的破壊が抑制されることを示した。

ミニブタ有効性試験の実施

- 椎間板への荷重がかかる中大動物として、ミニブタ髄核摘出モデルを用いて、hiPS 髄核移植の有効性試験を実施した。
- 免疫抑制剤を使用するプロトコルおよび免疫抑制剤を使用しないプロトコルを設定し、術式、観察期間、CT・MRI による画像評価、H&E 染色、Safranin O 染色、Human Vimentin および human nuclear antigen 等を用いた組織学的評価法を確立した。
- さらに、AI を用いた疼痛行動解析を導入し、hiPS 髄核移植による椎間板再生効果および疼痛緩和効果を支持するデータを取得した。
- また、力学試験測定機を用いて、hiPS 髄核移植を実施した椎間板の力学特性解析を実施した。Sham 群、髄核摘出群、および hiPS 髄核移植群との比較により、hiPS 髄核移植後の椎間板が示す力学的特徴を評価するデータを取得した。
- これにより、hiPS 髄核移植による椎間板再生を、組織学的・構造的評価のみならず、機能的再建の観点から検証する基盤データを得た。

hiPS 髄核の製造方法の確立

- 非臨床試験および将来的な臨床応用に適した hiPS 髄核を安定して製造するため、製造条件の検討を行い、移植に適したサイズの hiPS 髄核様組織の作製が可能となる改良製造法を確立した（改良製造法として特許出願済み）。
- 分化誘導因子（2 種類）のロットの切り替えに伴い、それぞれのロットチェックを実施し、いずれの因子においても出荷基準を満たす製造が可能であることを確認した。
- 従来製造法との品質の同等性を確認するため、新旧それぞれの製造法で得た hiPS 髄核について scRNA-seq 解析で比較した結果、両者が遺伝子レベルでも同等であることが確認された。
- 製造した全ロットにおいて、設定した出荷基準を満たすことを確認し、非臨床試験に使用可能な製造物を得た。
- 力学試験測定機を用いて、hiPS 髄核の力学特性を計測するための至適条件の検討を行い、力学試験データ（応力）を取得した。

髄核分化メカニズムの解明

- hiPS 髄核の分化誘導過程を明らかにするため、分化誘導開始後、経時的に採取したサンプルを用いて scRNA-seq 解析を実施した。
- 次元削減およびクラスタリング解析により、分化の進行に伴う細胞集団の変化を確認した。
- また、髄核マーカー陰性の細胞集団を不純物に相当するクラスターとして同定し、これにより不純物マーカーを新たに見出し、この知見を品質管理法へと反映させた。

hiPS 髄核の特性解析試験の実施

- hiPS 髄核の特性解析として、scRNA-seq 解析により得られた知見をもとに、製造物に含まれ得る目的外細胞・不純物の評価に資するマーカーを検討した。
- その結果、新たに 2 種類の不純物マーカー遺伝子を同定し、これらを用いた real-time RT-PCR による追加の不純物検査法を設定した。

PMDA 相談

- 非臨床安全性試験パッケージの適切性に関して事前面談及び対面助言を実施した。
- その結果、一般毒性試験、in vivo 造腫瘍性試験、核型解析、細胞増殖特性解析、iPS 細胞混在検出試験等を実施することで安全性試験データパッケージが充足することを合意済み

臨床研究申請資料の作成

- hiPS 髄核を用いた臨床研究開始に向け、特定細胞加工物標準書、特定細胞加工物概要書、臨床研究実施計画書等の再生医療等安全性確保法に基づく臨床研究の申請に必要な資料を作成・整備した。

4.研究開発成果の科学的・社会的価値

- 本研究では、中大動物であるミニブタを用いて hiPS 細胞由来髄核様組織を用いた髄核 replacement が、椎間板変性に対する組織再生、AI 疼痛行動解析に基づく疼痛緩和、力学的機能回復の効果を有することを多面的に示した。
- 特に、組織再生における有効性評価に加え、AI 疼痛行動解析、scRNA-seq に基づく不純物マーカー同定、製造・品質管理法の整備を統合した点は、椎間板再生医療の科学的基盤を大きく前進させる成果である。
- 社会的には、慢性腰痛の主要因である椎間板変性に対し、根本的な椎間板再生治療の実現につながる可能性があり、患者 QOL の改善、社会経済的負担の軽減、再生医療産業への波及効果が期待される。

Ⅱ. Overview of Research and Development

Background and objective

Intervertebral disc (IVD) degeneration accounts for 22–42% of patients with low back pain (LBP). Existing treatments for LBP mainly focus on pharmaceutical treatment, physical therapy or surgical spinal fusion, and no fundamental therapy has been established to regenerate the degenerated intervertebral disc itself. We have demonstrated that transplantation of human iPS cell–derived nucleus pulposus-like tissue (hiPS-NP) into the intervertebral disc after discectomy results in survival of the transplanted cells and promotes intervertebral disc regeneration. This study aims to obtain non-clinical proof of concept (PoC) to bridge these findings toward clinical application.

Results and Discussion

Efficacy Study Using a Nude Rat Caudal Disc Model

Transplantation of hiPS-NP was performed, and methods for transplantation, prevention of hiPS-NP extrusion, postoperative management, imaging evaluation, and histological evaluation were established. In long-term evaluation up to 6 months post-transplantation, survival of the transplanted cells was confirmed by human vimentin immunostaining. Additionally, structural and histological destruction of the intervertebral disc following nucleus pulposus removal was shown to be suppressed.

Efficacy Study Using a Mini-pig Model

Using a mini-pig discectomy model as a large animal model subjected to disc loading, efficacy studies of hiPS-NP transplantation were conducted. Protocols with and without immunosuppressants were established, along with surgical procedures, observation periods, imaging evaluation using CT and MRI, and histological evaluation methods including tissue staining. Furthermore, AI-based pain behavior analysis was introduced, and data supporting both disc regeneration and pain relief effects of hiPS-NP transplantation were obtained. Mechanical property analysis of the intervertebral discs following hiPS-NP transplantation was also performed using a mechanical testing system, providing data to evaluate their biomechanical characteristics.

Establishment of hiPS-NP Production Method

To ensure stable production of hiPS-NP suitable for non-clinical studies and future clinical application, manufacturing conditions were optimized, and an improved method capable of producing nucleus pulposus-like tissue of appropriate size for transplantation was established. All manufactured lots passed quality standards, confirming their suitability for non-clinical studies. Optimal conditions for measuring mechanical properties of hiPS-NP using a mechanical testing system were also investigated, and mechanical test data were obtained.

Elucidation of Nucleus Pulposus Differentiation Mechanism

To clarify the differentiation process of hiPS-NP, scRNA-seq analysis was conducted using samples collected with time course after the differentiation of hiPS-NP. A cell population negative for nucleus pulposus markers was identified as a cluster corresponding to impurities, leading to the discovery of new impurity markers, which were subsequently incorporated into quality control methods.

Preparation of Clinical Research Application Documents

In preparation for initiating clinical research using hiPS-NP, necessary documents for application under the Act on the Safety of Regenerative Medicine were prepared and organized.