

---

---

# 大腿骨頭壊死に対する間葉系幹細胞移植治療

---

---

---

青山朋樹

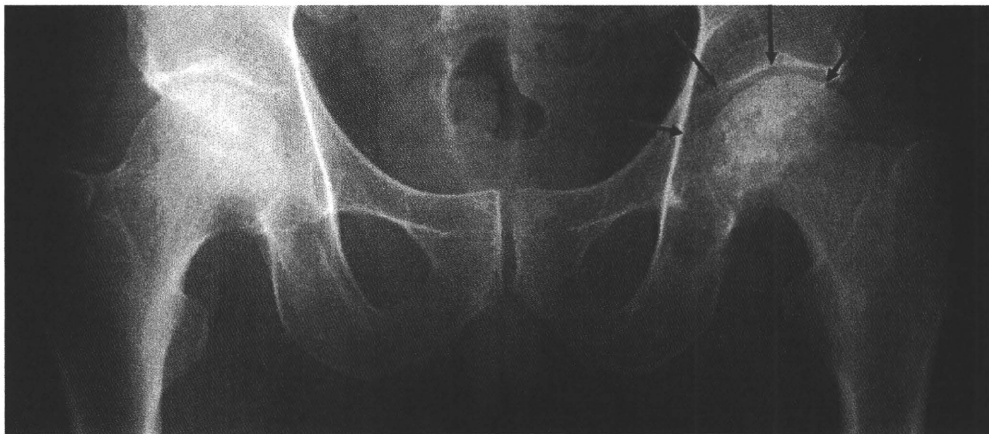
京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻

---

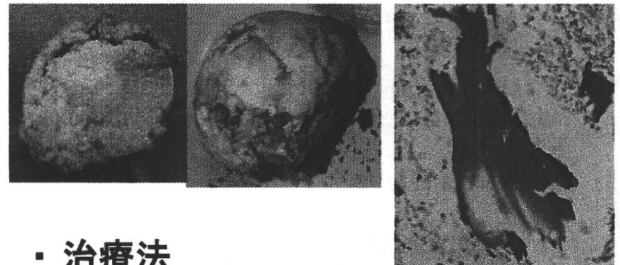


細胞育成学総論2011年1月7日

## 大腿骨頭無腐性壊死



- ・ 病態:  
骨頭の血流不全  
生細胞死による大腿骨頭の圧潰
- ・ 症状:  
股関節の疼痛、可動域制限
- ・ 病因:  
原因不明  
ステロイド  
アルコール多飲



- ・ 治療法  
免荷  
血管柄付き骨移植  
進行すれば人工関節置換

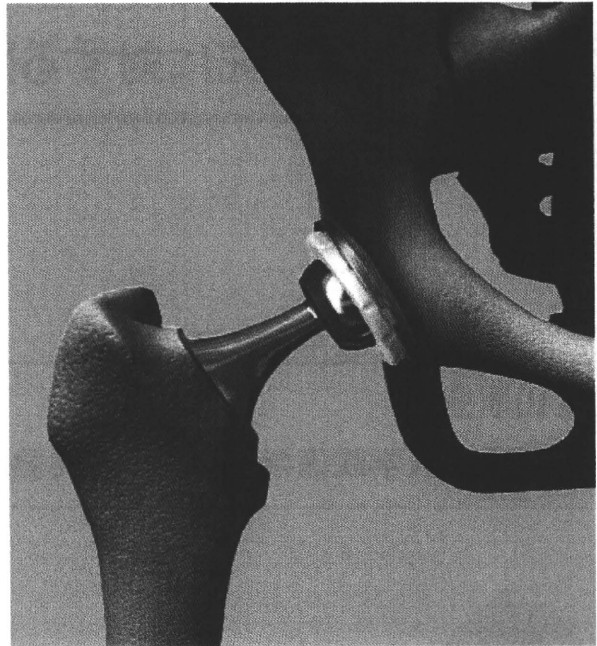
# 人工股関節置換術

## 利点:

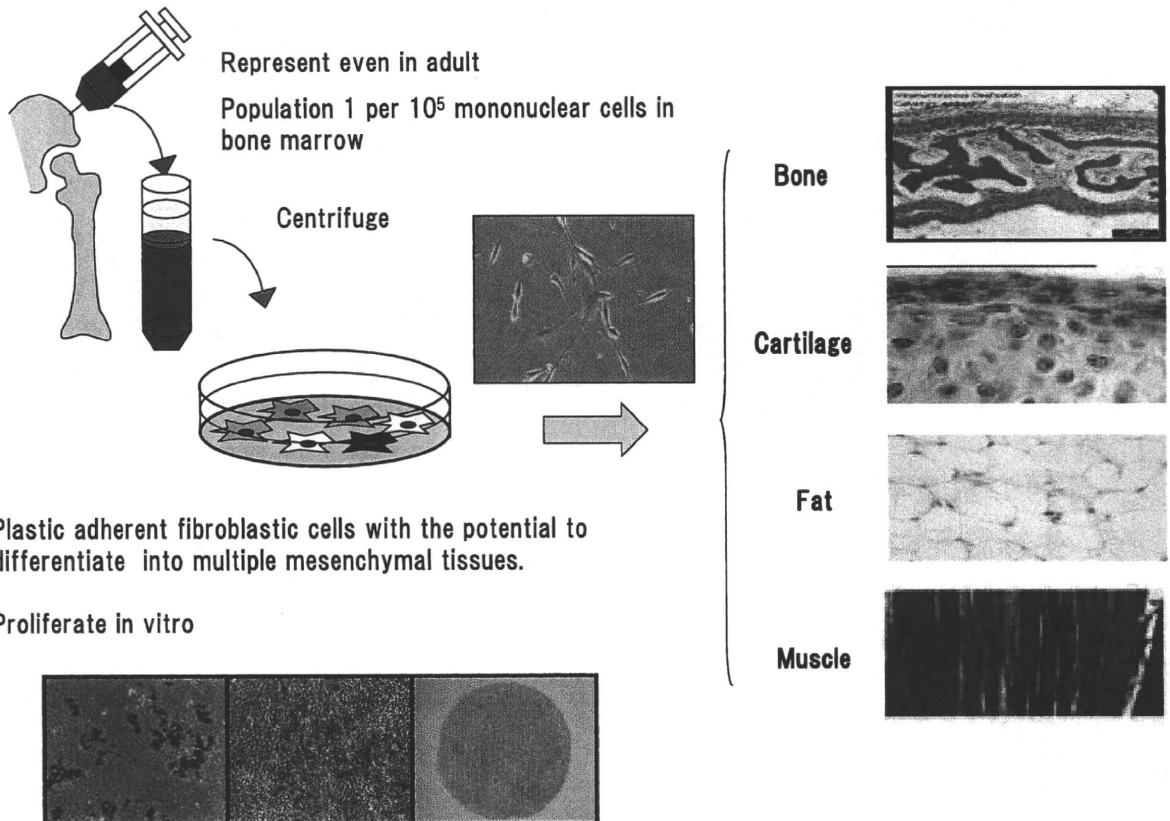
- 疼痛改善
- 可動域改善
- アライメント改善
- 早期の社会復帰

## 欠点:

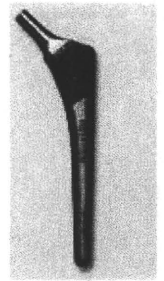
- 摩耗(入れ替えが必用)
- ゆるみ
- 脱臼
- 感染



## 間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC)



# Biomaterial (バイオマテリアル)

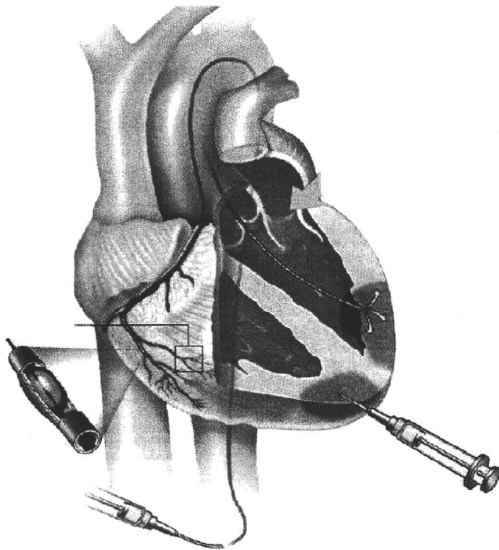


「ヒトの生体に移植することを目的とした素材」

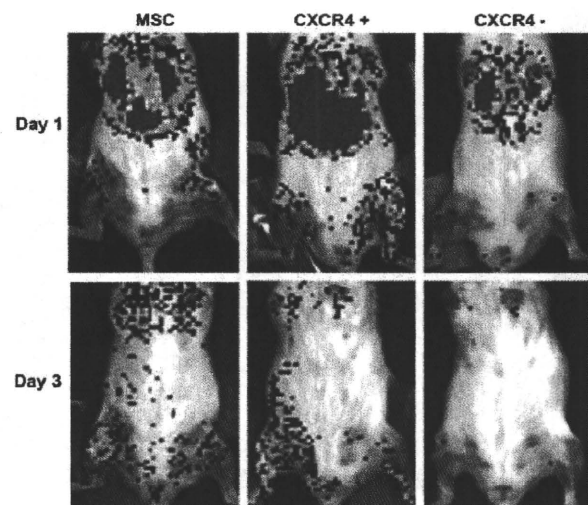
## 必須要項

- ・ 移植部位において目的とする機能を果たすこと  
= 有効性
- ・ 生体に悪影響をもたらさないこと  
= 生体適合性

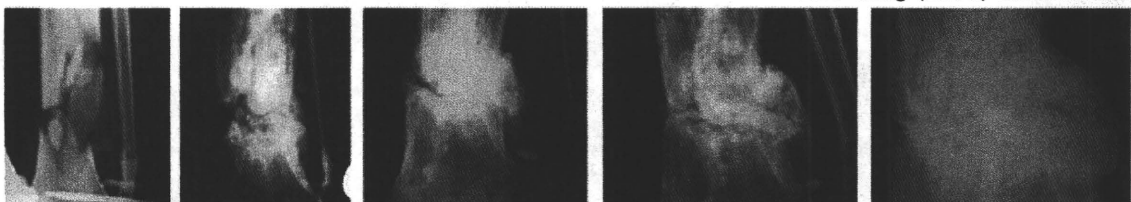
## 間葉系幹細胞は傷害部に集積し治癒を促す？



YH Choi (2010) Hum Gene Therapy

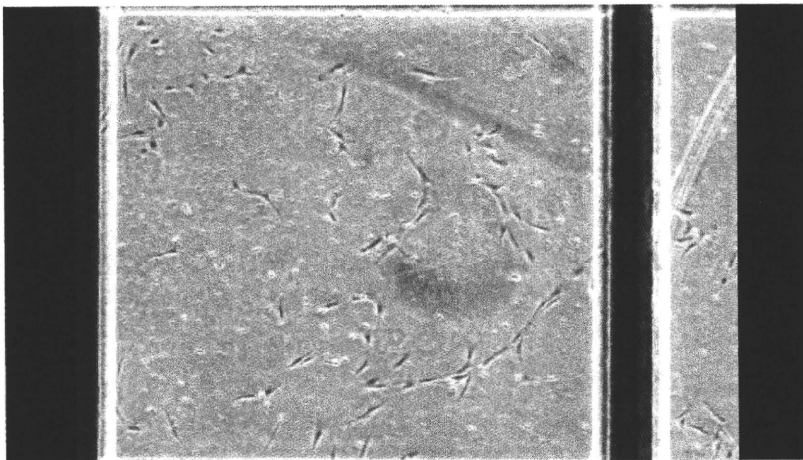


ELS Gong (2010) Biomaterials



- ・ 基礎細胞生物学的研究
- ・ 前臨床試験
- ・ 臨床用細胞調製実験
- ・ 臨床試験
- ・ 今後の発展

間葉系幹細胞の基礎細胞生物学的検討  
 : 京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野



撮影協力: 笠井泰成先生 (京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター)

- Okamoto T (2002) *BBRC*
- Aoyama T (2004) *JBC*
- Shima Y (2007) *BBRC*
- Shibata KR (2007) *Stem Cells*
- Fukiage K (2008) *BBRC*
- Aoyama T (2008) *BBRC*
- Ito K (2009) *Tissue Eng*
- Jin Y (2009) *BBRC*
- Aoyama T (2010) *JBC*
- Jin Y (2010) *BBRC*

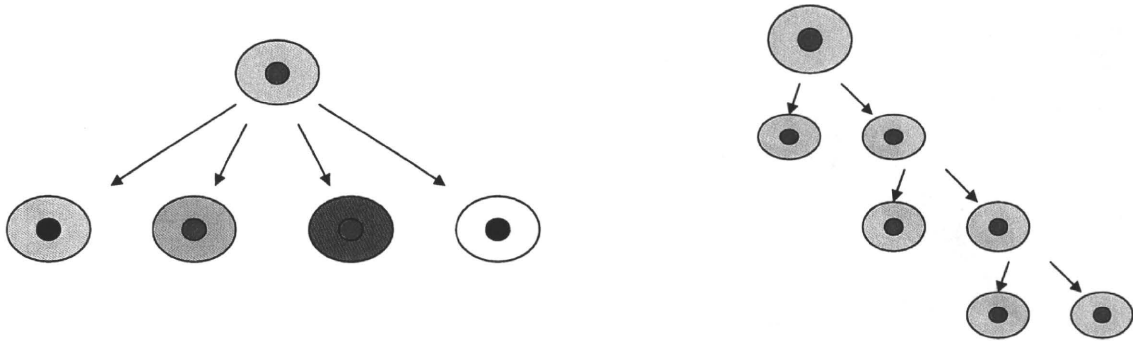




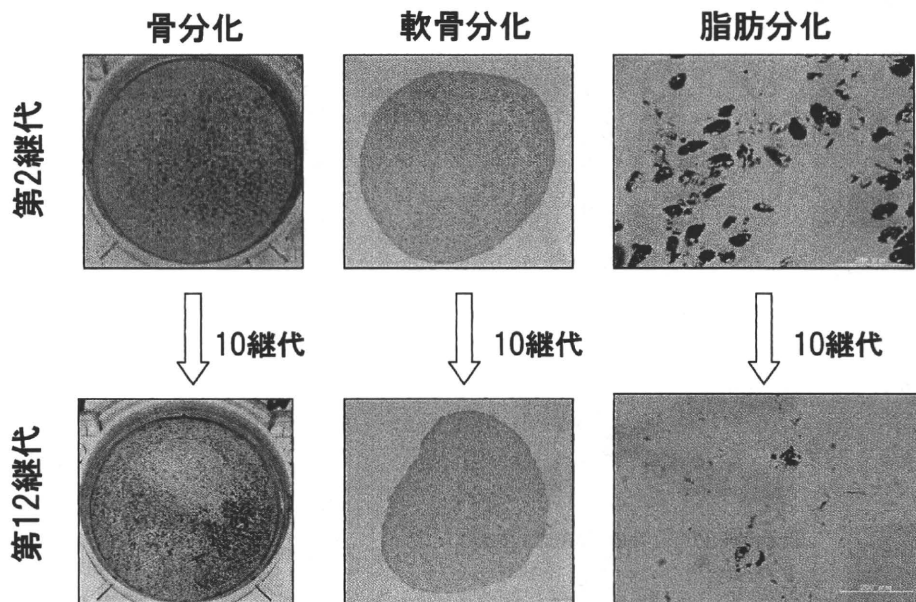
# 幹細胞の定義

多分化能 Multi-potency

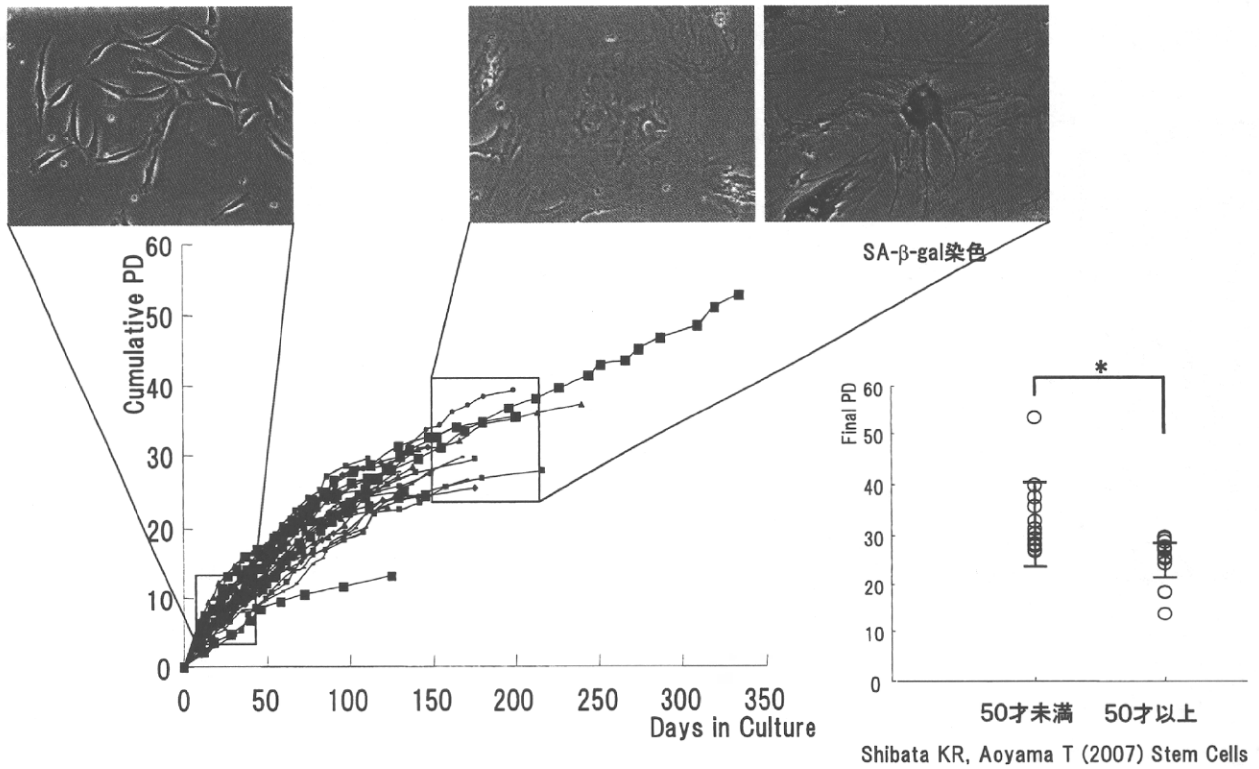
無限自己増殖能 Self-renewal



MSCは体外培養においては分化能を維持できない



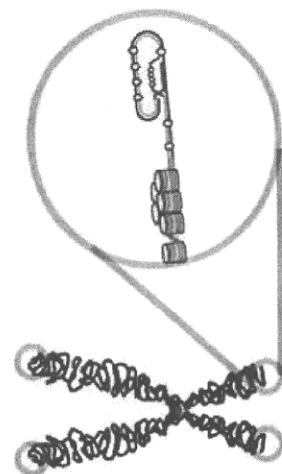
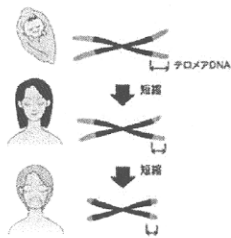
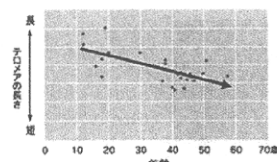
# MSCは体外培養においては細胞老化により増殖を停止する



# In Vitroで細胞老化を引き起こす因子

## Intrinsic factor

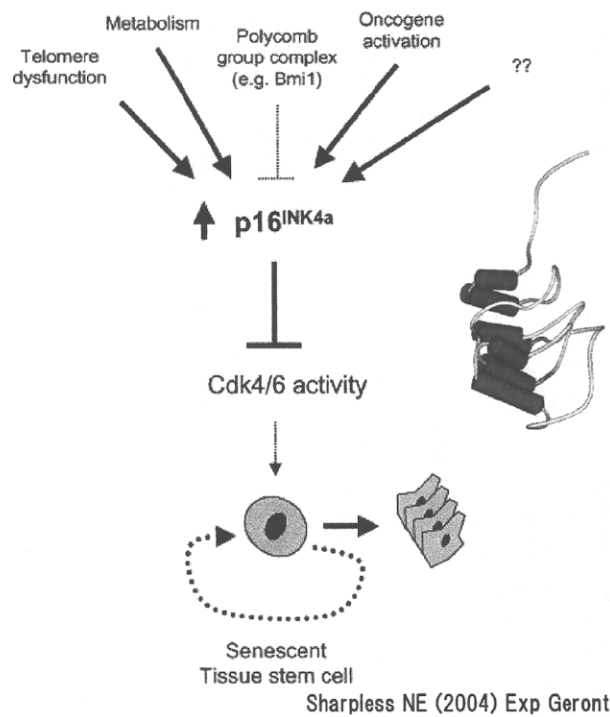
テロメア長の短縮=細胞分裂回数に依存



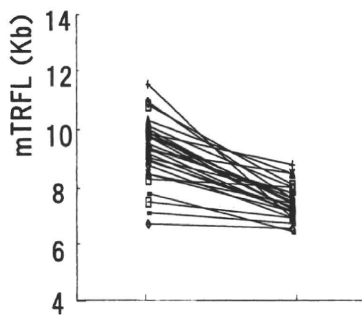
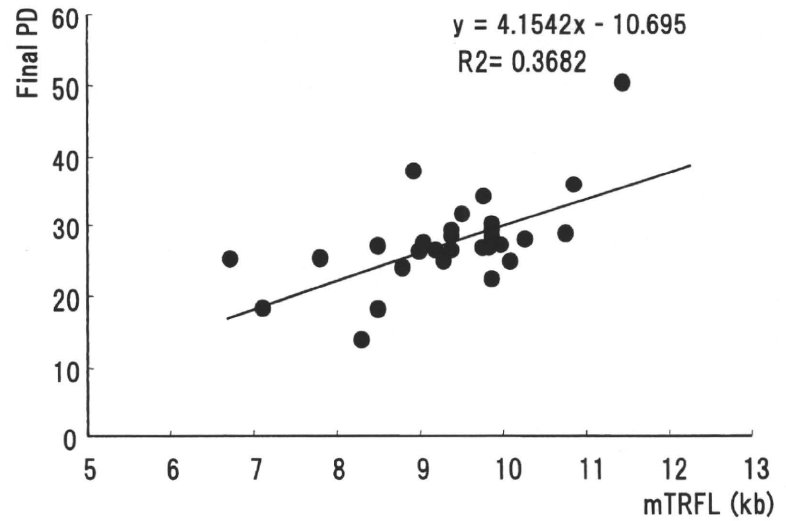
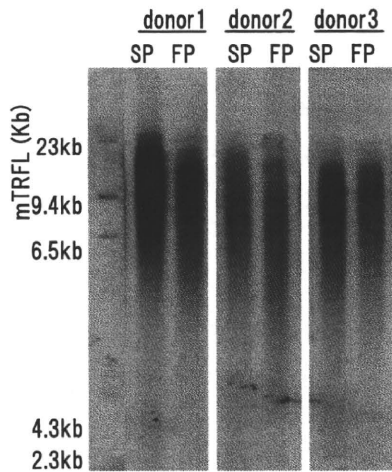
Chen JH (2007) Nucleic Acids Res.

## Extrinsic factor

p16遺伝子の発現=細胞分裂回数に依存



## テロメア長の測定は長期的な倍加可能回数を予想しうる

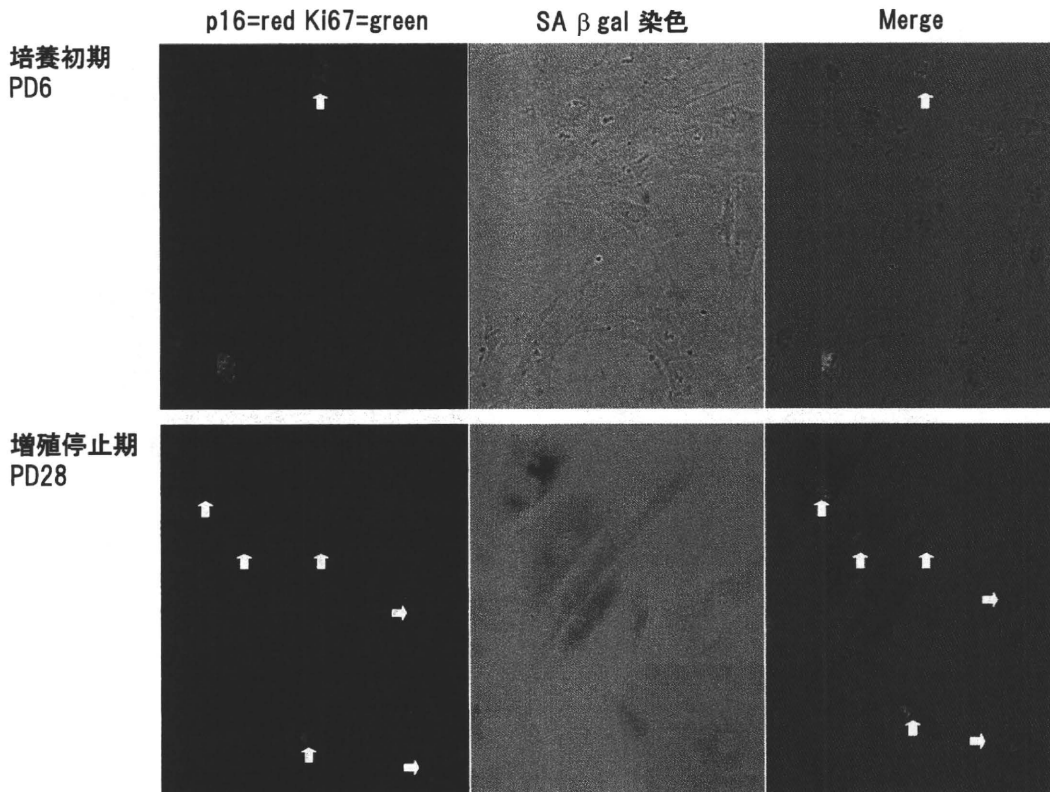


SP: 培養開始時  
FP: 増殖停止時

培養開始時 増殖停止時

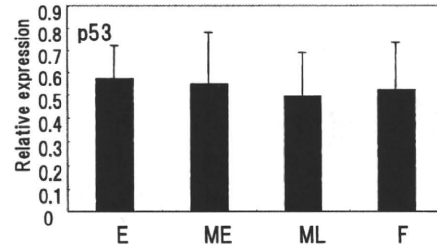
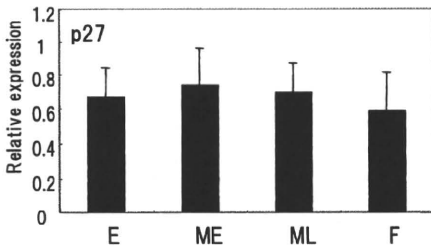
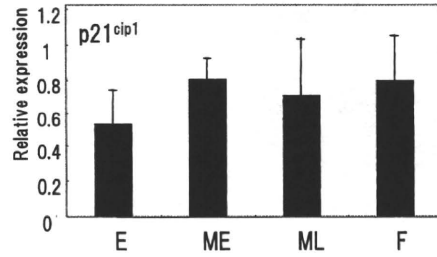
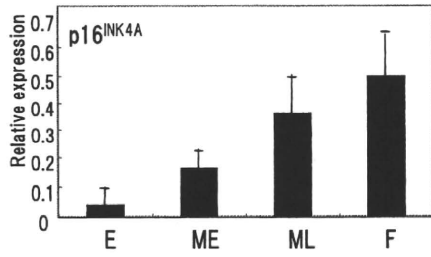
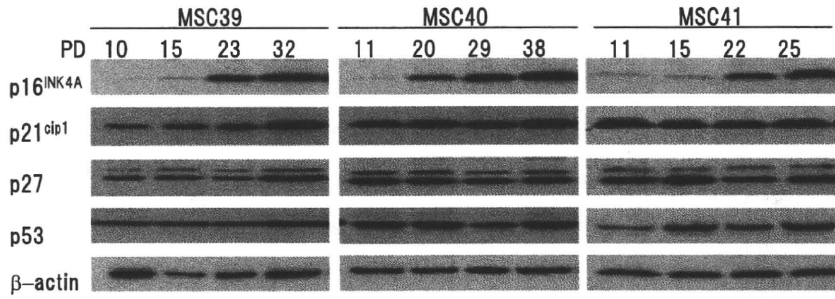
Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells

## 長期体外培養によりp16遺伝子を発現し増殖が停止する



Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells

# 細胞周期調節因子p16の発現は細胞継代に伴い上昇した



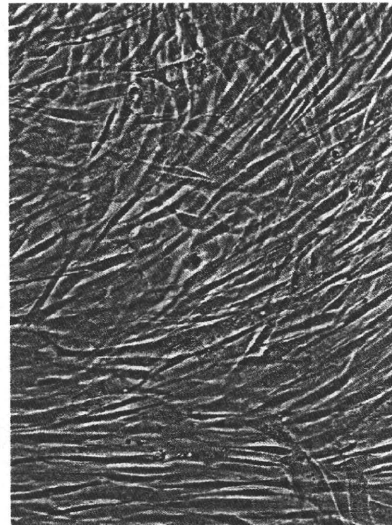
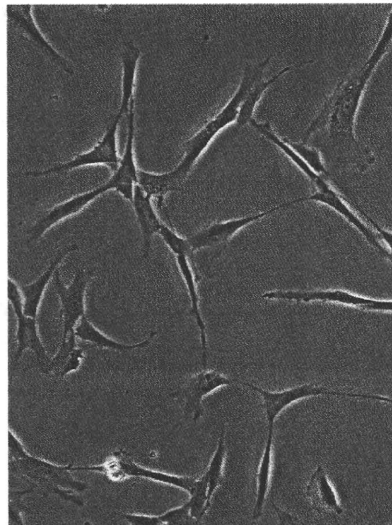
E:培養開始時  
ME:培養前期  
ML:培養後期  
F:増殖停止時

Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells

# 細胞はストレスに应答してp16遺伝子を発現する

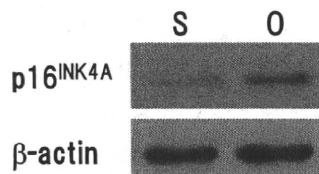
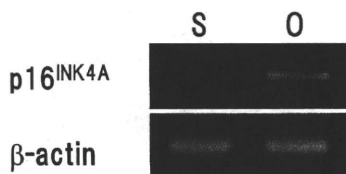
Spars

Over-confluent



RT-PCR

Western blotting

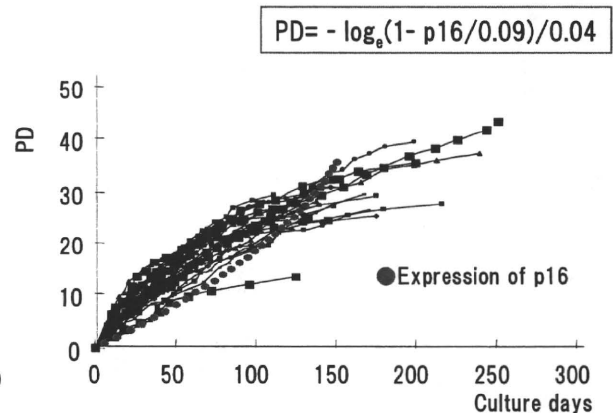
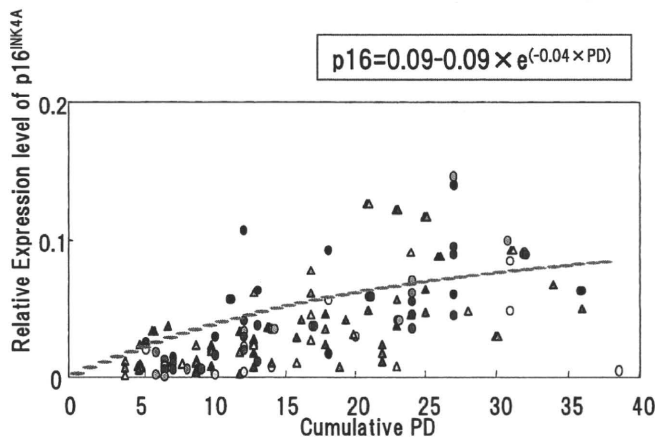
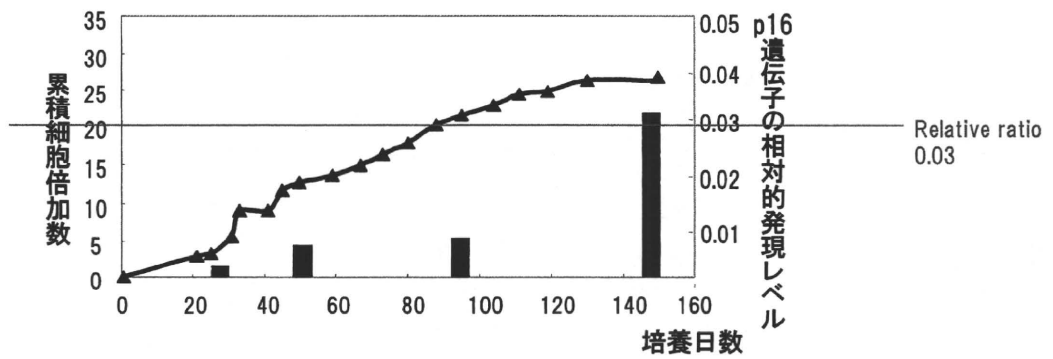


S : Spars

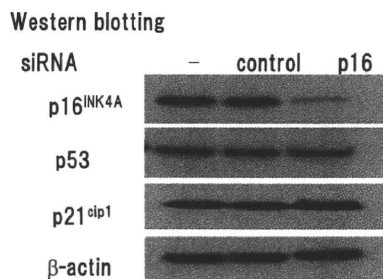
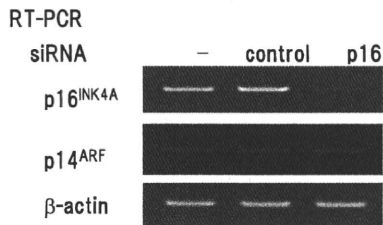
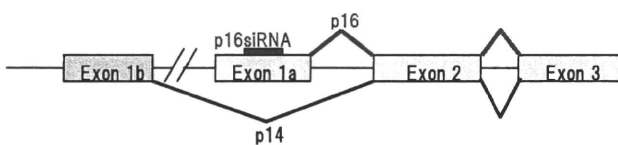
O : Over-confluent

Jin Y, Aoyama T (2010) BBRC

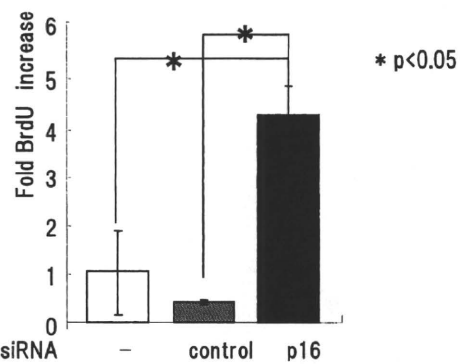
# p16 mRNAの発現値の測定は継代可能回数を予想できる



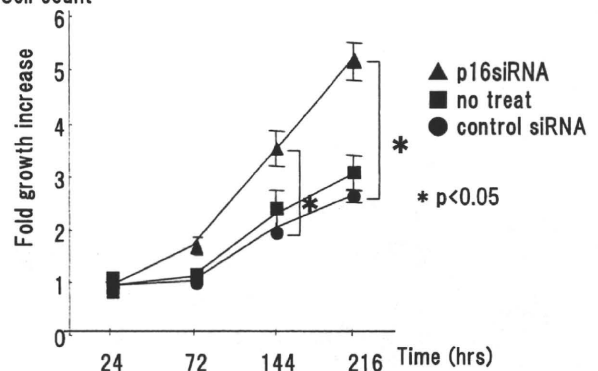
# RNA干渉によるp16発現抑制により細胞増殖は亢進する



BrDU assay

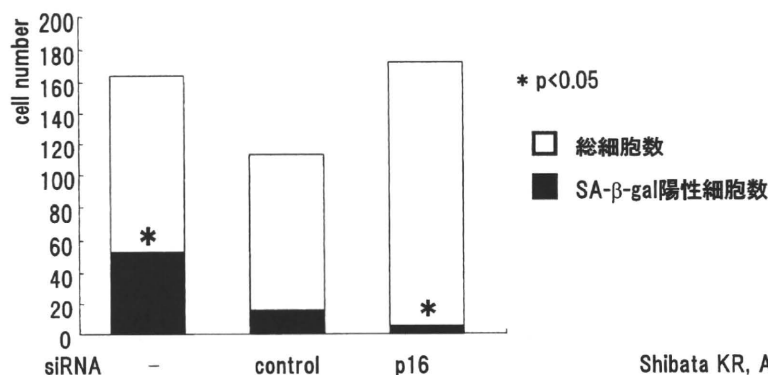
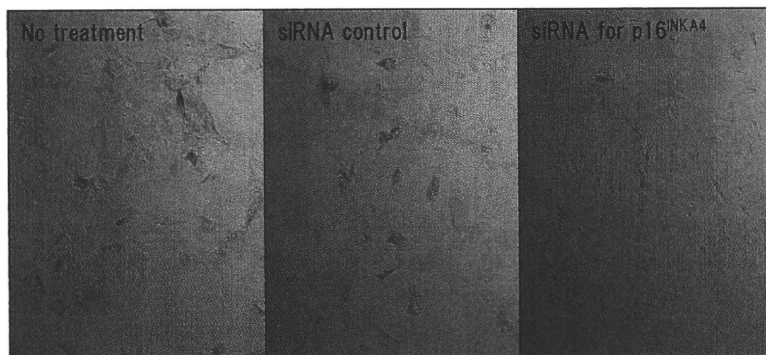


Cell count



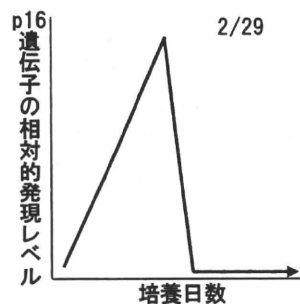
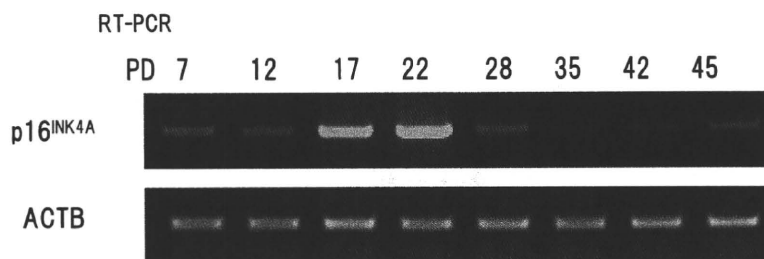
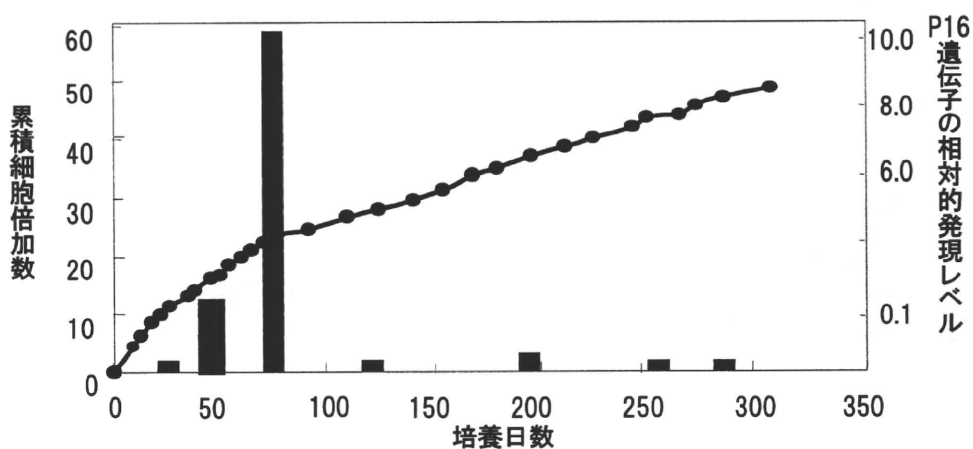
# p16のノックダウンにより細胞老化は抑制される

SA-β-gal 染色



Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells

## p16遺伝子発現の推移: 亢進後低下群(2/29例)



Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells



# p16遺伝子の変異検出法

## 1. 遺伝子の機能消失

- ・機能消失型ゲノム変異: 欠失、フレームシフト変異、ミスセンス変異、etc.
- ・機能消失型エピゲノム変異: 転写調節領域のメチル化、etc.

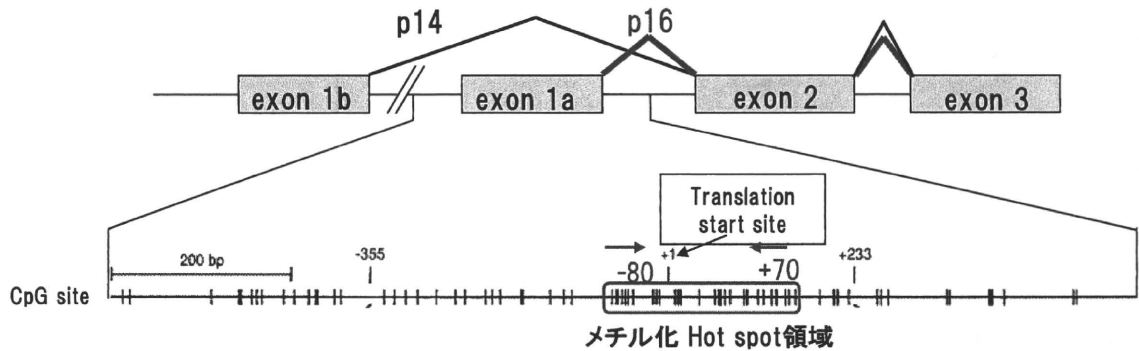
## 2. *in vitro*で自然に不死化した細胞の多くで、p16遺伝子がメチル化されている

3. 突然変異発生率:  $10^{-10}$ /塩基/細胞/細胞分裂  
 メチル化発生率:  $10^{-3}$ /CpG部位/細胞/細胞分裂

## 4. ヒト癌において検出されるp16遺伝子の変異は、ゲノム変異よりメチル化変異が圧倒的に多い



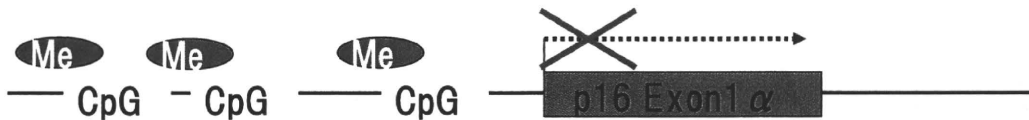
p16遺伝子に関してはメチル化を解析すべき



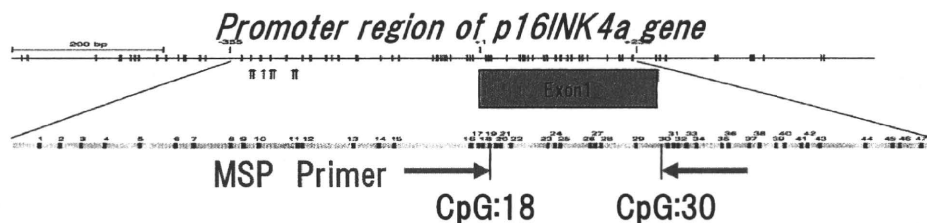
## メチル化による遺伝子発現抑制

Loss of expression p16<sup>INK4A</sup> in cancers

Transcriptional repression by DNA methylation in the core promoter region



Down regulation of p16<sup>INK4A</sup> in hMSC is also due to DNA methylation in the core promoter region?



Genomic DNA from hMSC

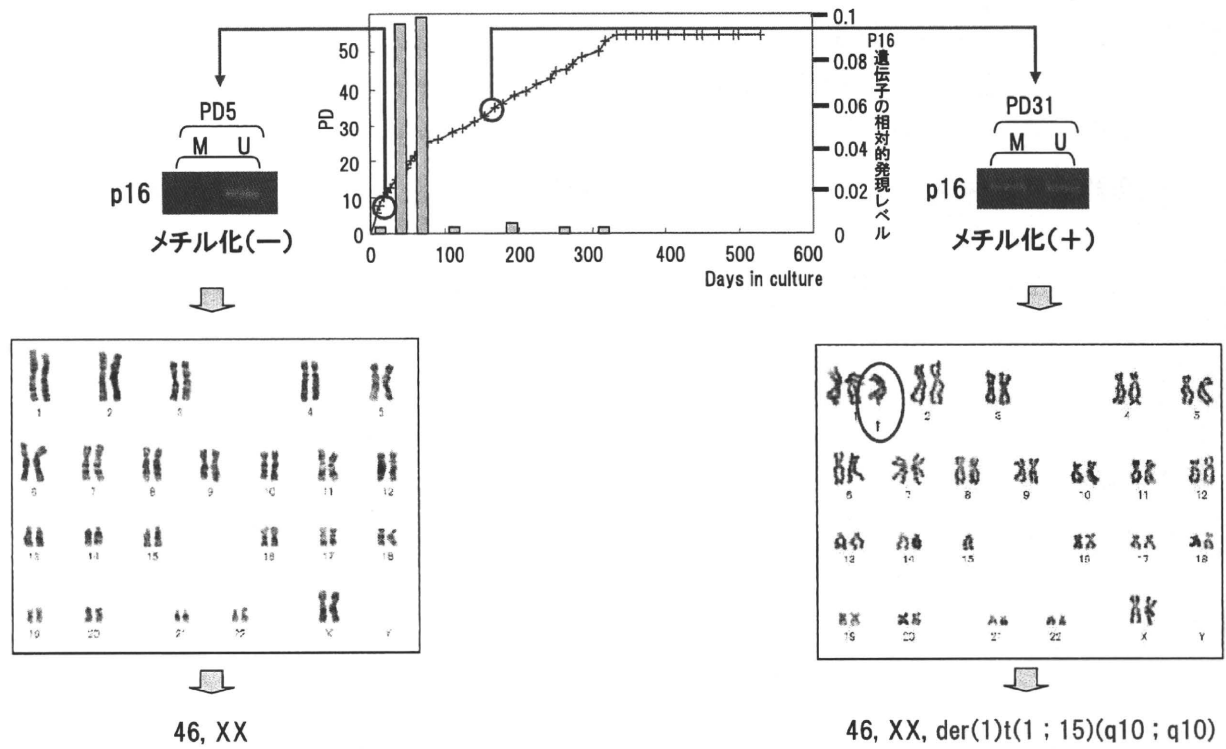


Bisulfite modification



Methylation specific PCR

# p16遺伝子メチル化は悪性転換の初期マーカー？

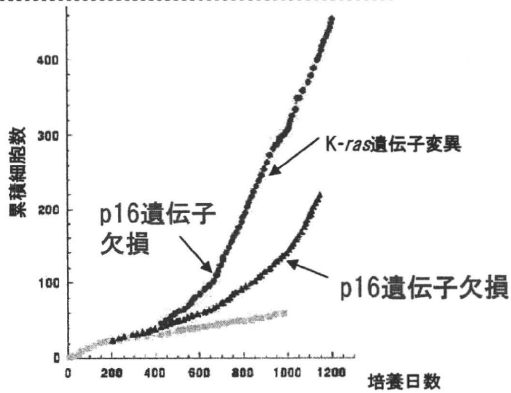


⇒ p16遺伝子のメチル化は、染色体異常発生の前兆？

Shibata KR, Aoyama T (2007) Stem Cells

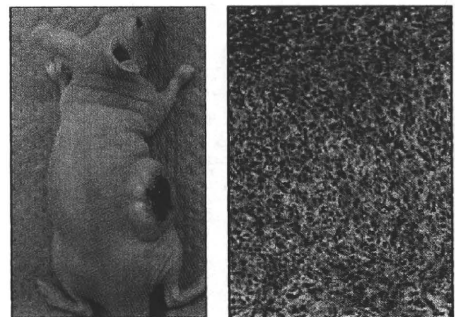
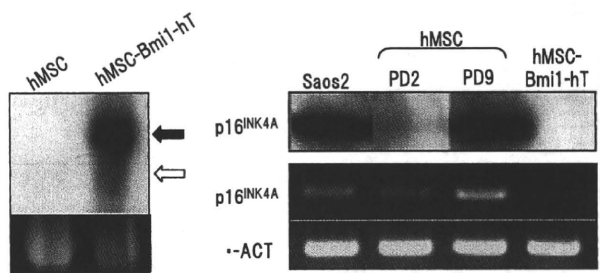
# MSCの形質転換におけるp16遺伝子の意義と モニター候補としての可能性

## 遺伝子操作を施行したMSCの形質転換



Serakinci, N., et al. *Oncogene*, 23: 5095-8, 2004.

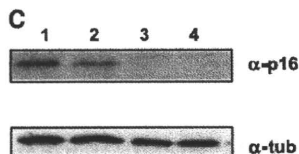
## p16遺伝子を不活化したMSCの形質転換



Shima Y, Aoyama T (2007) BBRC

## 遺伝子操作を施行していないMSCの形質転換

### p16遺伝子の不活化

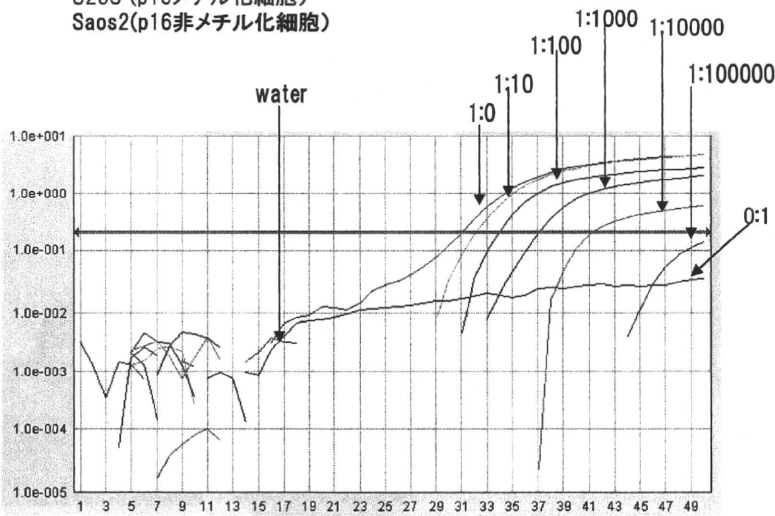


Rubio DI (2005) Cancer Res

# p16 real time MSP法は検出感度1万分の1の有効な検査法である

U2OS (p16メチル化細胞)  
Saos2(p16非メチル化細胞)

資料3-3



# TR

間葉系幹細胞 p16 遺伝子メチル化の解析方法

TR X XXXX 300

公益 財団法人 日本再生医療推進協会  
 〒100-0001 東京都千代田区千代田 1-1-1  
 日本工業標準化委員会 標準部 402  
 ○〇 専任委員 山本 浩二

NEDO再生医療評価研究開発事業(平成18年~21年)  
 再生医療の早期実現化を目指した再生評価技術開発  
 間葉系幹細胞のゲノムおよびエピゲノム変異の定量計測技術に関する研究開発

Designation of clones <sup>a</sup>	Differentiation potential			Number of clones
	Adipogenic	Osteogenic	Chondrogenic	
AOC	+	+	+	2
AO	+	+	-	6
OC	-	+	+	4
A	+	-	-	10
O	-	+	-	7
C	-	-	+	5
N	-	-	-	66

Okamoto T, Aoyama T (2002) BBRC



**数を確保するために体外培養は必須!  
 しかし、短期間の培養が必要!**

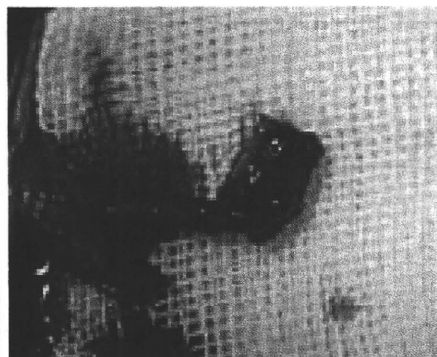


間葉系幹細胞の周辺環境を良くしないといけないのではないか

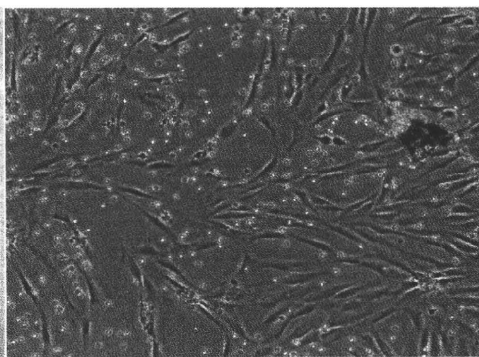


間葉系幹細胞はけっこうデリケートな細胞ですよ！

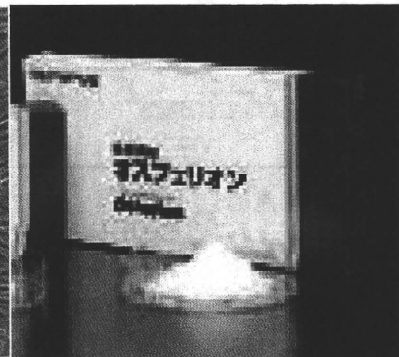
### 間葉系幹細胞＋人工骨＋血管柄付き骨移植



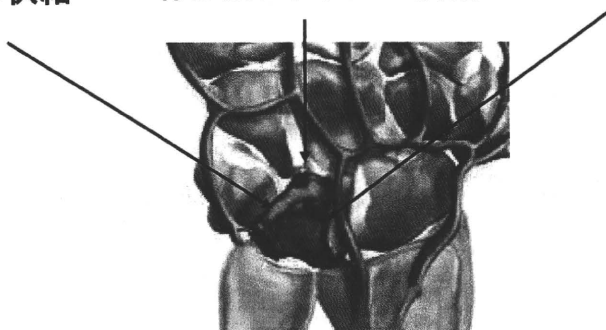
**血管付き骨移植**  
途絶した血管の再還流  
血球成分、栄養素の供給



**間葉系幹細胞**  
骨形成細胞の補充  
骨形成シグナルの供給



**人工骨**  
細胞の母床  
初期強度を与える



骨壊死

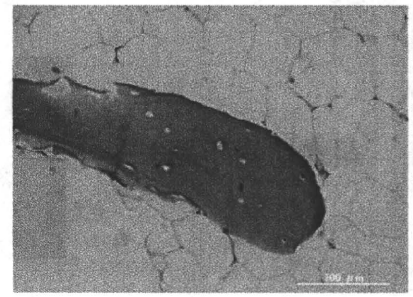
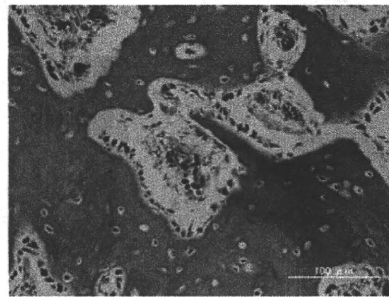
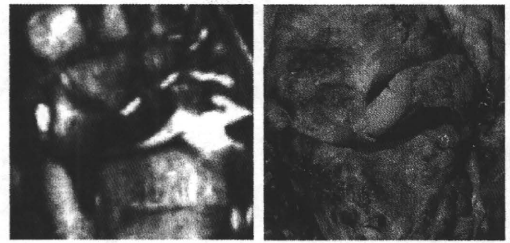
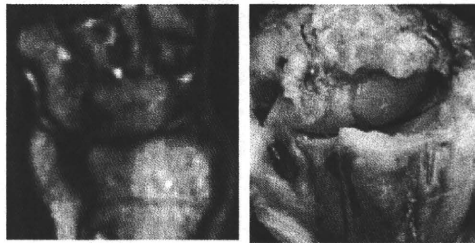
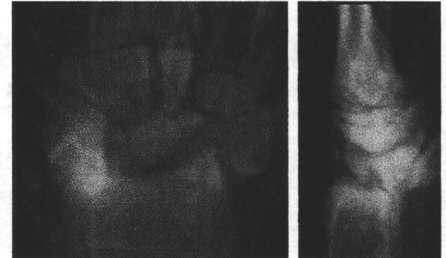
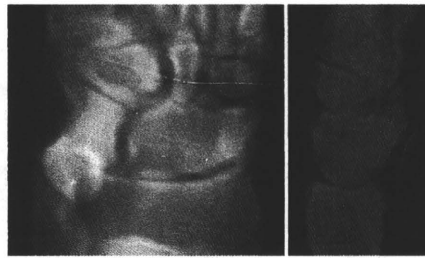


# イヌを用いた月状骨壊死モデルの作成

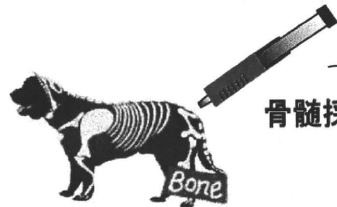


正常

搔爬+液体窒素処理



# イヌ月状骨壊死に対する 間葉系幹細胞+血管柄付き骨+人工骨移植治療



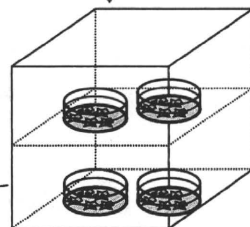
骨髓採取



遠心分離

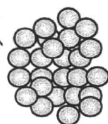


培養皿に播種



体外培養

移植



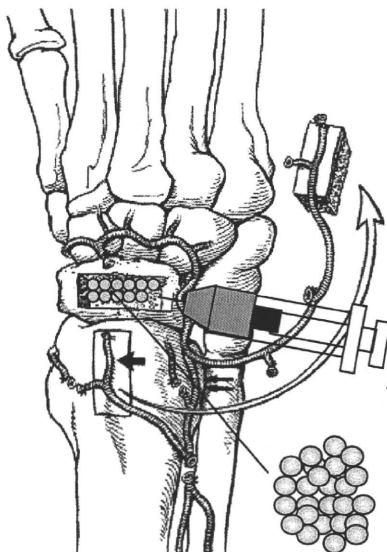
人工骨基質:  $\beta$  TCP



$\beta$ -TCPに含有した間葉系幹細胞



血管茎 移植骨





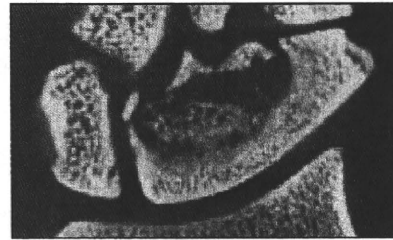
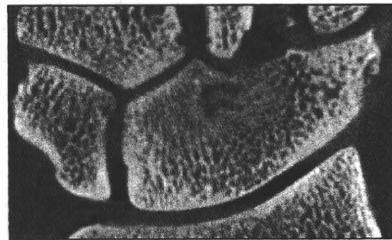
# 間葉系幹細胞+血管柄付き骨+人工骨移植治療 は有効な治療法である



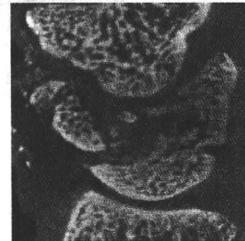
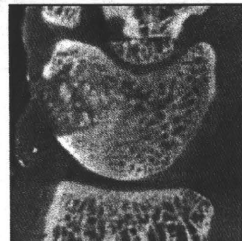
間葉系幹細胞+血管柄付き骨+人工骨移植

繊維芽細胞+血管柄付き骨+人工骨移植

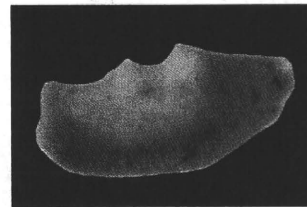
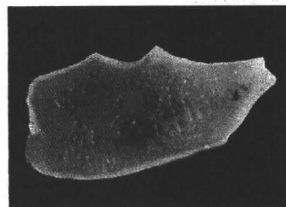
マイクロCT  
冠状断面



マイクロCT  
矢状断面



組織切片断面



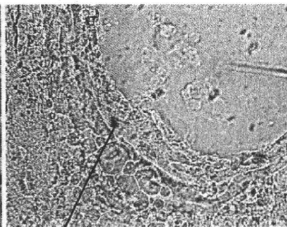
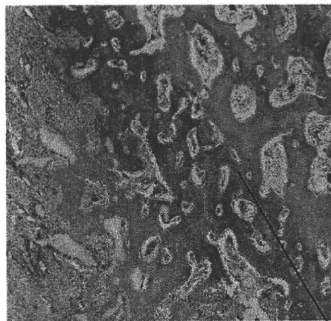
Ikeguchi R, Aoyama T (2007) Cell Transplantation

## 間葉系幹細胞は移植部に生着し、骨リモデリングに寄与している

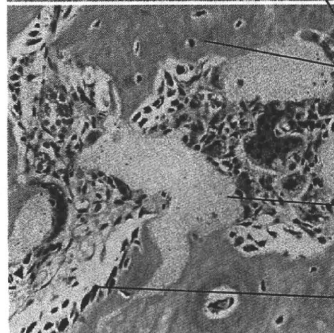
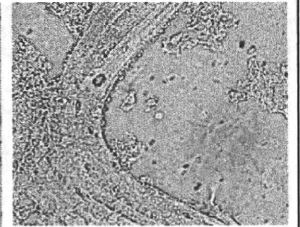
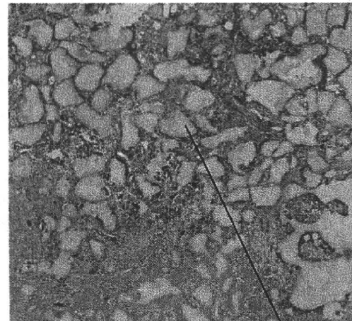


間葉系幹細胞+血管柄付き骨+人工骨移植

繊維芽細胞+血管柄付き骨+人工骨移植



Lac Zでラベルした間葉系  
幹細胞(骨芽細胞に分化)



新性骨

吸収されつつある人工骨

骨芽細胞

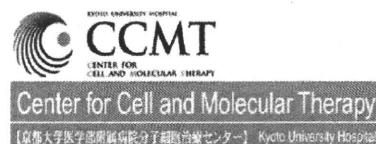


溶け残った人工骨

Ikeguchi R, Aoyama T (2007) Cell Transplantation



# 臨床用細胞調製実験 →分子細胞治療センターと共同研究

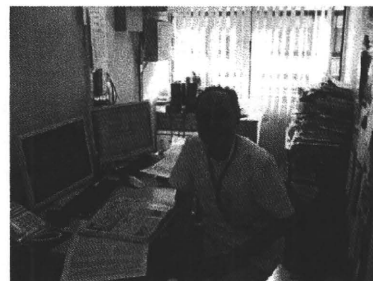


GMP講習  
1.5時間×5回

品質マニュアル、標準操作手順書(SOP)の作成  
A06-1 採血と血清分離の記録書  
A06-2 試薬調整の記録書  
.....  
A06-43 p16メチル化検査の記録書

責任体制の整備  
研究責任者  
品質管理者  
バリデーション責任者  
製造管理責任者  
品質管理責任者

定期サニテーション



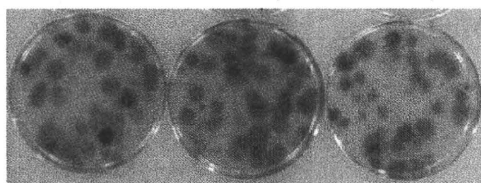
## 細胞調製用機器の選定



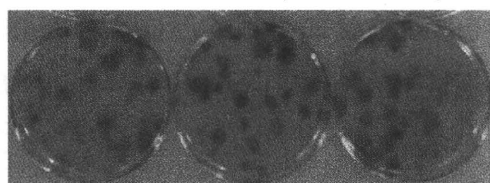
### ・培養液

$\alpha$ -MEM glutamax (Invitrogen) FDAよりcGMPグレード認可

$\alpha$  MEM (10% FBS )



DMEM (10% FBS )



### ・細胞解離液

TrypLE Select (Invitrogen)

組み換えプロテアーゼ(動物成分フリー) FDAよりcGMPグレード認可

エンドキシン擬陽性→添加回収試験

### ・細胞凍結保存液

CP-1

細胞生存率 90%

### ・抗生剤

ペニシリン、ストレプトマイシン(Invitrogen) FDAよりcGMPグレード認可

## 血漿由来の血清作成の必要性

### 全血由来の血清は血液採取量が多く、患者負担が大きい

1×10<sup>7</sup>個の細胞確保

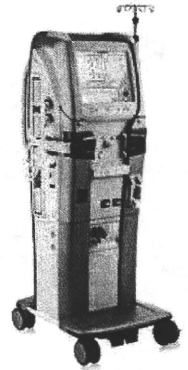
→培地に10%で添加し、3週間培養する場合150mlの血清が必用

→400ml採血が必用

5×10<sup>7</sup>個の細胞確保

→培地に10%で添加し、3週間培養する場合350mlの血清が必用

→800ml採血が必用



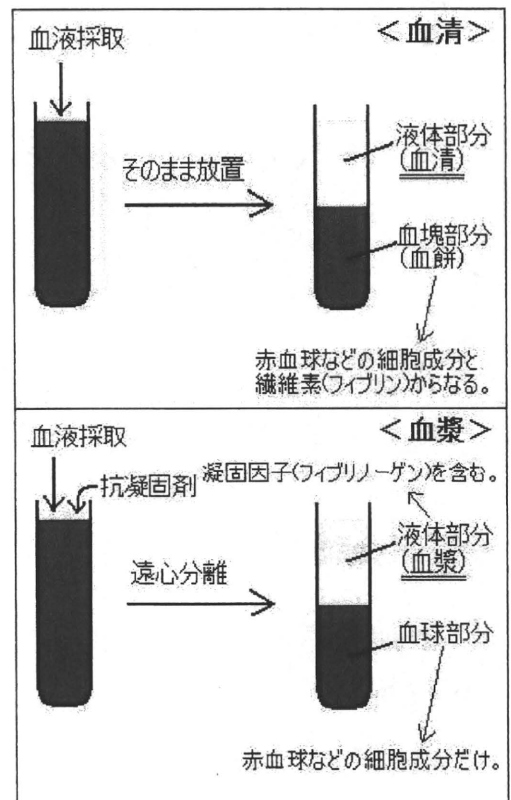
## 血清(serum)と血漿(plasma)

### 血清

- 全血を凝固させ血小板や凝固因子を除いたもの
- 血小板成分が含まれる

### 血漿

- 全血を凝固させず遠心分離により細胞成分(赤血球、白血球、血小板)を除いたもの
- 血清より多くの収量が得られる



## 血漿由来血清作成

血漿分離装置を用いた血漿採取を想定した血漿作成  
全血100mlに対してACD-A液14.3ml加えて血液採取  
→遠心分離

- 1.コンクライトCa のみを添加  
→37°C内で3時間経過してもフィブリンは析出してこない
- 2.Ca を添加せずにガラス片のみ加えた  
→37°C内で3時間経過してもフィブリンは析出してこない
- 3.コンクライトCa を添加し、ガラス片も加えた  
→37°C内で30分後にはガラス片周辺にフィブリンが析出  
→1時間後、フィブリンは遠心管内全体に形成され、  
→2時間後にはフィブリン塊が少し収縮し始めた

37°Cで3時間放置後、上清のフィブリノーゲン量を測定  
血漿(無添加)418 mg/dl  
1.→412 mg/dl  
2.→406 mg/dl  
3.→ < 50 mg/dl

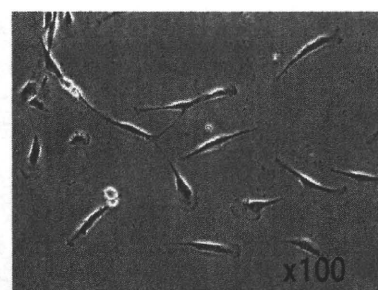
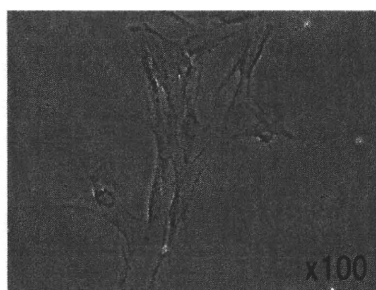
## 血漿由来の血清で培養した際には細胞型が変化する

FBS

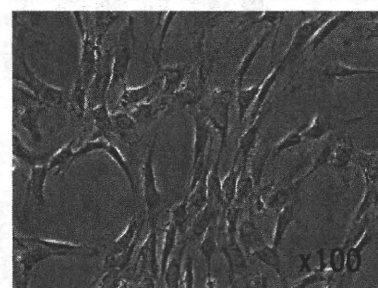
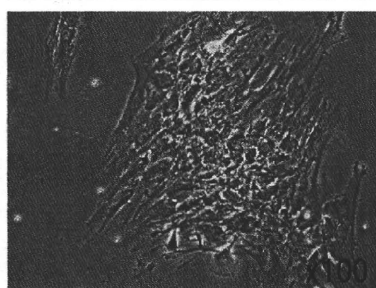
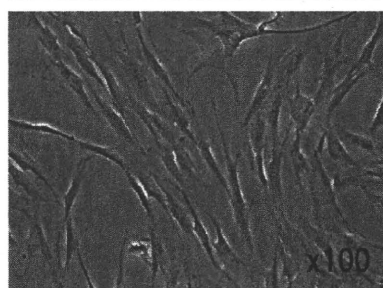
血漿→血清

全血→血清

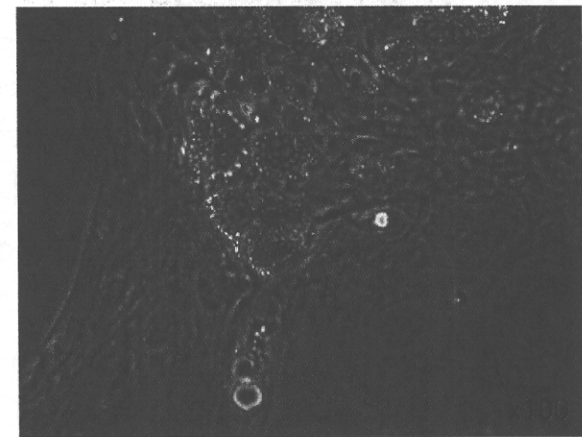
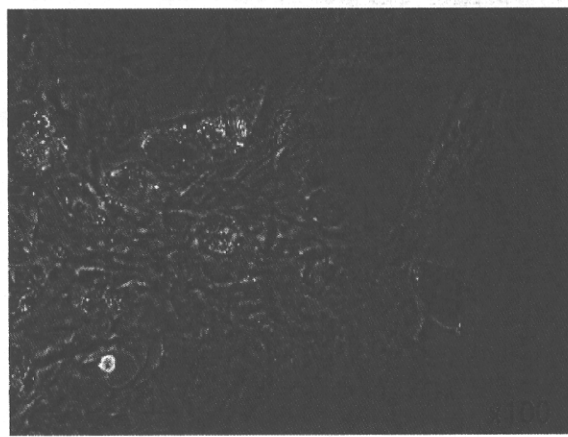
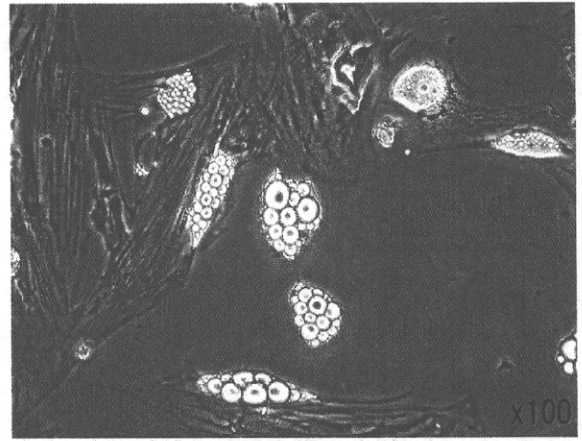
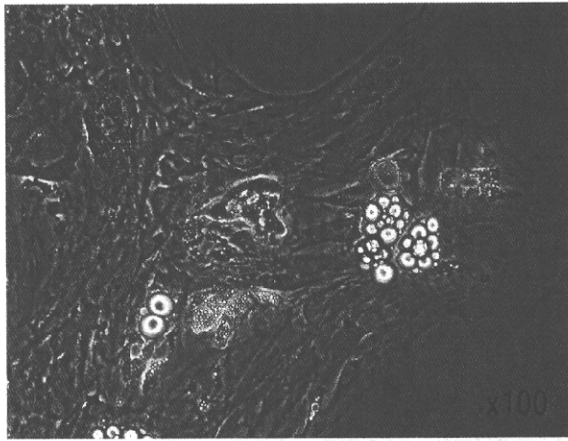
Day6



Day9



血漿由来の血清では誘導しなくても脂肪を形成する？ 23日目 Oil Red O staining



## 血漿由来の血清で細胞型が変化した理由？

1. Ca濃度

2. ACD-A液による影響

3. PHの変化

血漿由来血清  
全血由来血清

カルシウム濃度  
26.5 mg/dl  
8.7 mg/dl

$\alpha$ -MEM のみ  
 $\alpha$ -MEM + 血漿由来血清  
 $\alpha$ -MEM + 全血由来血清

7.2 mg/dl  
9.1 mg/dl  
7.4 mg/dl