

8-1.再試験 A-1 および A-2

1. 本試験で用いた DNA サンプルおよび上清サンプルを希釈し直した上で、手順（4）に従い PCR を行う（A-1）。
2. 手順（3）で保管しておいた細胞懸濁液を用いて再度サンプルを調製し、手順（4）に従い PCR を行う（A-2）。
3. 手順（6）、（7）に従い、A-1 および A-2 の判定を行う。
 - ・どちらも陰性の場合、最終判定を陰性とする。
 - ・どちらか、または両方で陽性の場合、状況を品質管理責任者に報告する。

再試験 B

再試験 A でも陽性または擬陽性の判定が出た場合は凍結保存細胞を融解し、以下の手順で再試験 B-1 および B-2 を行う。

8-2.参考品からのサンプリング

1. 凍結保存しておいた細胞の参考品を 1 本 (5×10^5 cells/ml, 500 μ l) 融解する。
2. 融解した細胞懸濁液のうち、200 μ l は培地で洗浄した後、6 well plate の 1 well に播種し、培養を行い、再試験 B-2（手順 8-4）に用いる。
3. 残りの 300 μ l の細胞懸濁液を用いて再試験 B-1（手順 8-3）を行う。

8-3.再試験 B-1

- 1 手順 8-2 で採取した細胞懸濁液 300 μ l から DNA を抽出、精製して、手順（4）に従い PCR を行う。
- 2 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
- 3 手順（6）、（7）に従い判定を行う。
 - ・ 陰性の場合は手順 8-4 に進んで再試験を続行する。
 - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管

理責任者に報告する。

8-4.再試験 B-2

再試験 B-2 には手順 8-2 で培養を開始した参考品の細胞および再サンプリングした間葉系幹細胞の培養上清の計 2 サンプルを用いて試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に上清の再サンプリングを依頼する。
2. 2 回の培地交換を経た参考品の培養細胞を用いて、5-1 からの方法に従い DNA サンプルを作製する。
3. 手順（4）に従い PCR を行う。再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
4. 手順（6）、（7）に従い判定を行う。
 - ・ 陰性の場合、最終判定を陰性とする。ただし、再試験 B による判定であることを品質管理責任者に報告する。
 - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

（9）.陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

- 骨形成能の研究 -

研究分担者 大串 始（産業技術総合研究所健康工学研究部門 招聘研究員）

研究要旨

昨年につづき症例1の低ホスファターゼ症患者に対する同種間葉系幹細胞移植後のレントゲン像の解析をおこない、移植前にみられた骨端線のキャッピング変化が再度みられず、同部位での石灰化が継続して存在することを確認した。症例2では移植前には非石灰化骨端線の拡張がみられたが、移植後には改善した。症例1,2のCTの解析もレントゲンの解析結果を確認するものであった。また、予備実験であるが、症例2の骨生検中の骨細胞様細胞にドナー由来のシグナルと思われる輝度を検出し、ドナー細胞の生着とつづきの骨分化が示唆された。以上より、本疾患患者に対する同種幹細胞移植の有用性が確認されつつある。

A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種の間葉系幹細胞を患者に移植して骨形成能を付与することにある。しかし、その検証には間葉系幹細胞移植前にみられる骨格の脆弱性の改善とドナー間葉系幹細胞が生着して骨への分化を検出することが望ましい。以上の点をふまえて、分担研究者大串は移植前と移植後における患者の画像解析（レントゲン撮

影とCT撮影）をおこなうとともに、予備研究ではあるが、患者の生検骨組織よりドナー細胞の生着ならびに骨分化を組織的に検索した。すなわち、本研究の有用性を骨形成解析という側面から検討することを目的とする。

B. 研究方法

画像解析においては島根大学で通常のレントゲン撮影とCT撮影をおこなった。ドナー同種間葉系幹細胞の患者骨内への生着とつづきの骨分化は、島根大学から搬送された骨生検資料を用いて、以下の方法に

より In situ hybridizationをおこなった。

《試薬調製》

・ 10×TBS

Tris-HCl[DAKO S3001]を100mLのMQで溶解。オートクレーブ滅菌する。使用時に10倍希釈する(1×TBS)。

・ ProteinaseK/ 1×TBS

ProteinaseK[DAKO S3004]原液 80μLを1×TBS 2mLで希釈。

・ 20×SSC (20×SSC 500mL, pH7.0) 400mLのMQに132gのSSCを加え、溶解。pHメーターでpH7.0に調整(1N-HCl使用)。500mLにメスアップ。0.45μmフィルターを通し、不純物を取り除き、オートクレーブ滅菌。

・ Denature sol. (70% Formamide/ 2×SSC) 4°Cで1週間程度保存可。

49mL ホルムアミド

7mL 20×SSC

14mL MQ

Final 70mL pHメーターでpH7.0-8.0であることを確認。

・ Formamide wash sol. (50% Formamide/ 2×SSC)

75mL ホルムアミド

15mL 20×SSC

60mL MQ

Final 150mL pHメーターでpH7.

0-8.0であることを確認。

・ EtOH Wash sol.

100% EtOHをオートクレーブ処理済みMQにて70%に調整。

・ 2×SSC (pH7.0-7.5) 室温で6ヶ月保存可能。

900mL MQ

100mL 20×SSC

Final 1000mL 1M NaOHにてpH7.0-7.5にあわせて、メスアップし、0.45μmフィルターを通す。

・ エージング溶液 (2×SSC/0.1% NP-40) 室温で6ヶ月保存可能。

849mL MQ

100mL 20×SSC

1mL NP-40

Final 1000mL 1M NaOHにてpH7.0-7.5に調整。

《組織標本の前処理》

1. 脱パラフィン、MQで親水化
2. MQで洗浄、1×TBSに浸漬。
3. ProteinaseK/1×TBSで室温で10分処理。
4. 1×TBSで洗浄×3回。
5. MQで洗浄×3回。

《Denature of Sample DNA》

1. 42°Cにハイブリオープンを設定。ウォーターバスを37°Cと73°Cに設定。

2. エージング溶液を37°Cで加温、前処理済みスライドガラスを30min浸漬。
3. エタノール脱水系で脱水、冷風乾燥。
4. Denature sol.を染色瓶(コプリンジャー)にいれ、73~74°Cで加温する。
5. サンプルを浸漬し、73~74°Cで5分おく。
6. すぐに室温の70% EtOH wash sol.に浸漬。ホルムアミドを除くため、スライドをよくすすぐ。EtOH wash sol.にてスライドを1分以上おく。
7. 6.を繰り返す。
8. 85% EtOH →100% EtOHと脱水させる
9. 45-50°Cのスライド加温器に2分程度おく。

《Probe Preparation》

1. 室温に戻した5~10 μ Lのプローブ液を目的サンプル上にアプライする。カバーガラスで組織を覆い、プローブ液の伸展および乾燥防止とする。エアが入っている場合は取り除く。
2. 少量の水を入れた湿潤箱にスライドを入れ、42°Cのハイブリオーブンに入れる。30分(最小)~24時間(最大)静置。

《Post hybridization Washes》

1. ウォーターバスを37°Cと73°Cに設定。
2. 2 \times SSC(pH7.0-7.5 室温)をコプリンジャーに入れて、染色瓶の中へカバーしたままスライドをいれ、カバーを

- 取り除く。
3. コプリンジャーに45°Cに加温したFormamide wash sol. (50% Formamide/ 2 \times SSC)を入れ、10分浸漬 \times 3回。
4. 45°Cに加温した2 \times SSCに10分浸漬。
5. 45°Cに加温したエージング溶液(2 \times SSC/0.1%NP-40)に5分浸漬。
6. 室温の2 \times SSCで軽くリンス。
7. 室温で乾燥させ、10 μ LのDAPI IIをアプライし、カバーガラスをかける。

(倫理面への配慮)

患者のレントゲン撮影やCT撮影に関しては、本計画提案時の研究計画ならびに患者(家族)への説明文章にかかっている。さらに、患者から骨生検をおこなうことについても同様に記載され、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

移植前の症例1の患者のレントゲンと移植後のレントゲン像(図1)を比較したところ、移植前には膝関節部分においてくる病様の変化(キャッピング変化; 矢印)がみられたが、移植後においてはキャッピングは消失し、関節近くの骨端線に移植前にみられなかった石灰化がみられた。この変化は昨年報告したが、今回長期にわたってのフォローにおいても石灰化は継続してみられた。またキャッピングは消失したままであった。CT撮影(図2)においても同様の所見が得られた。以上より移植による骨形成の促進、特に関節近傍の骨端部分におけ

る骨形成促進が示唆された。ただし、皮質骨の十分な石灰化の確認は困難であり、菲薄化の改善は不十分であった。特に下腿脛骨の末梢 1/4 の部位では脆弱性がみられた。

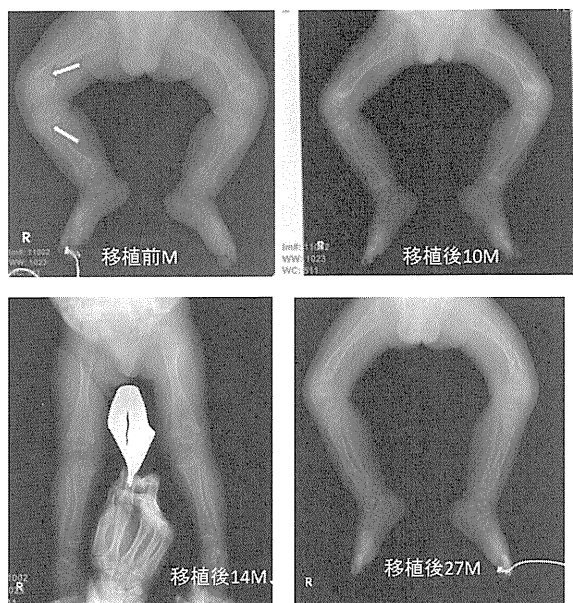


図 1. 症例 1 の初回 MSC 移植前後のレントゲン像 (矢印はキャッピング)

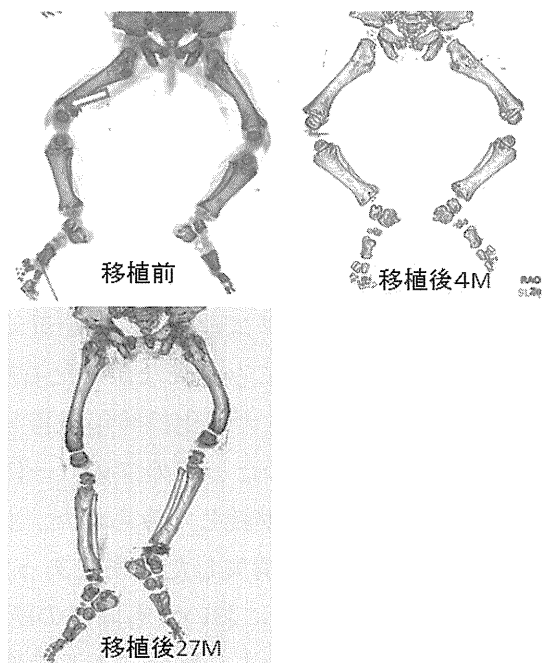


図 2. 症例 1 の初回 MSC 移植前後の CT 像 (矢印はキャッピング)

症例 2 においては、移植前にはあきらかなキャッピングはみられなかったが、非石灰化骨端線が幅広く存在した (図 3、4 矢印)。この非石灰化骨端線は移植後改善した。CT の画像でも同様の所見を得た。ただし、症例 1 と同様に骨皮質の石灰化は不十分であり、下腿の脛骨末梢 1/4 の部位の脆弱性が示唆された。

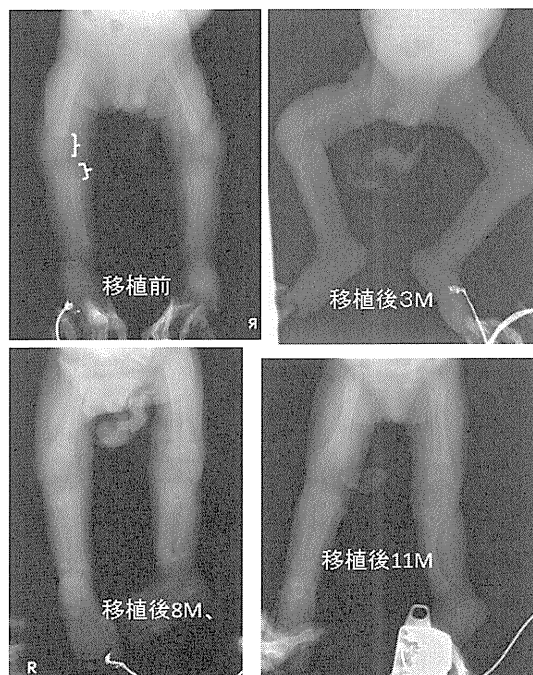


図 3. 症例 2 の初回 MSC 移植前後のレントゲン像

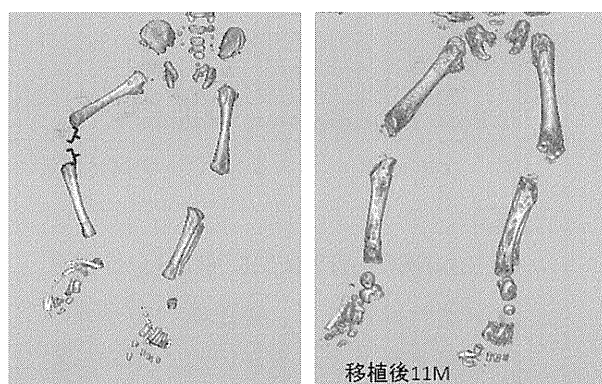


図 4. 症例 2 の初回 MSC 移植前後の CT 像

今回、ドナーの同種間葉系幹細胞が患者生体内、特に骨組織内に生着し、引きつづき骨分化を生じるかの検討をおこなった。症例 2 の骨生検資料を固定して切片を作成し、X あるいは Y 染色体のシグナル検出を In situ hybridization により試みた。図 5 にみられるように、骨小腔内に存在する骨細胞様細胞に XX のシグナルが検出され、患者（男児）にドナー（母親）の細胞が存在することが示唆された。ただし、本実験は予備実験であり、シグナルのバックグラウンドも高く、今後の検討を必要とする。

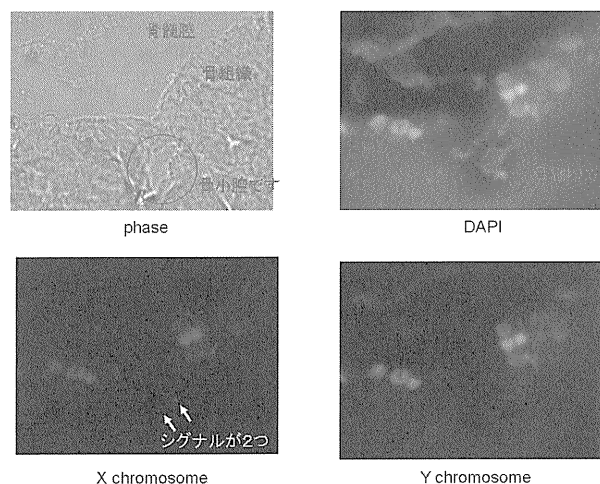


図 5. 骨生検試料の In situ hybridization

D. 考察

今年度の研究において、ドナー間葉系幹細胞の移植により、長期にわたり骨端における骨格の改善がみられることが確認できた。ただし、皮質骨の菲薄化、すなわち骨の脆弱性が持続しているレ

ントゲン像がみられ、これについては今後の検討を必要とする。なお、予備実験において、患者骨組織内にドナー由来と思われるシグナルが検出できたが、この結果においてはさらなる検証を必要とする。

E. 結論

今回のレントゲンと CT 撮影による患者の継時的なフォローにより、長期にわたって骨端部分の骨構築が改善されたことより、同種間葉系幹細胞を用いたの本疾患治療の有用性が示されたと思われる。今後さらなる症例を積み重ね、同種間葉系幹細胞の移植前と後における画像解析が必須である。また、これらの画像解析と臨床症状との相関についての検証も必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi H, Oda Y, Ohgushi H(CA) "Human Mesenchymal Stem Cells and iPS Cells (Preparation Methods)" "Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Lineage-Specific Differentiation Protocols" Chapter14 Springer Protocols Handbook, 2011
2. Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahane M, Tanaka Y. Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem

- cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 Feb;6(2); 96-102
3. Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H(CA). Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and β -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 Apr; 6(4): 253-260
 4. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori K, Yuba S. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012 Apr;6(4): 261-271
 5. Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 Jul; 6(7): 550-558
 6. Ogawa M, Tohma Y, Ohgushi H(CA), Takakura Y, Tanaka Y. Early Fixation of Cobalt-Chromium Based Alloy Surgical Implants to Bone Using a Tissue-engineering Approach. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):5528-41. Epub 2012 May 9.
 7. 大串 始
- 骨再生医療の現況と将来展望 - 生体材料からみた骨再生 - 「先端医療」 p67- p80, 2012, (株) 技術情報協会編集
8. 勝部好裕、弓場俊輔、大串 始 間葉系幹細胞を使った骨再生、再生医療叢書 (朝倉書店) 第6巻 骨格系 p92-110, 2012
 2. 学会発表
 1. Term Stem 2012 (10/10 Guimaraes, Portugal) H. Ohgushi, Y. Katsube, M. Tadokoro, Y. Oda, S. Yuba and K. Taketani. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering : Transplantation of Allogeneic MSCs for Treatment of Hypophosphatasia Patients (Invited speaker)
 2. Siriraj Orthopaedic Alumini Society (10/19 Bangkok, Thailand) H. Ohgushi, Y. Katsube, M. Tadokoro, Y. Oda, S. Yuba and K. Taketani Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering : - Tissue engineering approaches for total ankle joints and for treatment of genetic disease - (Invited speaker)
 3. 大串 始 産業技術総合研究所インテレクチャルカフェ「再生医療用細胞製造システムの将来と事業展望」(2/15 シンポジスト、産総研関西センター、尼崎市) 間葉系幹細胞を用いた再生医療の動向、
 4. 大串 始

技術情報協会主催 「関節疾患治療薬
の開発とメディカルニーズ」(3/28 招
待講演 ゆうぼうと 東京・五反田)
関節疾患再生医療の現況

5. 大串 始

第11回日本再生医療学会 シンポジウ
ム(アログラフトは再生医療の起爆剤
になるか)(6/13 シンポジスト、座長。
パシフィコ横浜) 再生医療におけるア
ログラフト、

6. 大串 始、勝部好裕、田所美香、弓場俊
輔、竹谷 健

第27回日本整形外科基礎学術集会
骨形成シンポジウム「骨形成研究の
種々アプローチとその臨床応用」(10/25
シンポジスト、名古屋国際会議場、名
古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

- キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性 -

研究分担者 福田 誠司（島根大学医学部小児科 准教授）

研究要旨

低ホスファターゼ症は、骨の石灰化障害を来す疾患である。今回の臨床研究では骨髄移植を行い、その後骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を複数回移植する。間葉系幹細胞の効果は明らかにするために、移植後の造血および間葉系幹細胞のキメリズム解析を行った。また、この疾患の病態を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析および *TNSALP* 遺伝子変異解析を行った。さらに、培養した間葉系幹細胞の細胞特性を改善させる方法を検討した。キメリズム解析において、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることを証明できた。臨床的には改善していることのエビデンスとなりうるが、長期間生着するか、今後経時的に検討していく必要がある。病態解析では、ALP 変異体の機能を明らかにすることができただけでなく網羅的遺伝子解析で骨だけでなくそれ以外の症状を引き起こす機序が明らかとなった。今後、疾患特異的 iPS 細胞を樹立して、それぞれの組織について検証を行う必要がある。さらに、培養した間葉系幹細胞の細胞特性を改善させる剥離液を同定できたが、さらなる細胞特性の改善にむけて、特に、骨への homing 効率を高める細胞の樹立を行っていく予定である。

研究協力者

服部美保（島根大学医学部附属病院輸血部）

江田理恵（島根大学医学部附属病院輸血部）

永瀬真弓（島根大学医学部附属病院輸血部）

内藤真佑美（島根大学医学部附属病院輸血部）

竹谷健（島根大学医学部附属病院輸血部）

安部真理子（島根大学医学部小児科）

平出智裕（島根大学医学部小児科）

勝部好裕（産業技術総合研究所）

小田泰昭（産業技術総合研究所）

A. 研究目的

低ホスファターゼ症は、骨および歯の石灰化障害を来たす常染色体劣性疾患である。本研究では、石灰化を改善するために、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植を行っている。これまでの研究・報告

では、この疾患で石灰化障害を来たす原因が明らかではないこと、骨髄移植では石灰化は改善しないこと、間葉系幹細胞移植により骨の石灰化は改善するが、臨床的には不十分であることがわかっている。そのために、移植細胞が骨の石灰化を促進しているか明らかにするために、キメリズム解析を行い、また、本疾患の病態を明らかにするために網羅的遺伝子発現解析および ALP 変異体解析を行い、さらに、培養した間葉系幹細胞の細胞特性を向上するための検討を行った。

B. 研究方法

骨髄からの間葉系幹細胞の培養

骨髄液を遠心（900 rpm, 10 min, 4 °C）したのち、赤血球層と有核細胞層に、FBS 培地を添加（計 15 mL）して、インキュベータ（37 °C、CO₂ 濃度 5%）で培養した。目視で培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べ、培養上

清を吸引除去した。FBS 培地は 13 mL/Flask で、出来るだけゆっくり注いだ。この操作を週 3 回繰り返し行い、細胞が増殖した後、PBS で洗浄後、TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素) を添加し、インキュベータ内で 3 分間反応させた。FBS 培地で反応を停止させ、数回 Suspension し、フラスコ内に残っている細胞を FBS 培地で回収した。

Nucleo Counter で死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算し、回収した細胞 (間葉系幹細胞) 浮遊液は遠心 (900 rpm, 5 min, 4 °C) 後、 5×10^5 cell/mL に調整した。

(1) キメリズム解析

移植後に患者から造血細胞および培養した間葉系幹細胞 (上述) および骨髄からフローサイトメトリー (FCM) でソーティングした間葉系幹細胞 (CD45 および CD235a を negative selection した後、CD90 および CD105 陽性細胞を選択) を

単離して、それぞれの細胞の由来 (ドナー由来、レシピエント由来) を検討するために、AmpFlSTR SGM Amplification kit (PE Biosystems, San Jose, CA) を用いて個人識別マーカーである short tandem repeat を増幅させ、シークエンス解析で塩基配列を決定した。また、*TNSALP* 遺伝子変異を解析して、ドナー由来細胞の検出を行った。

(2) 病態解析

1) 網羅的遺伝子解析

患者および骨髄提供者 (保因者)、正常健康人の間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現を解析して、遺伝子発現パターンの違いから、本疾患の病態を検討した。それぞれの細胞から RNA を抽出し、RNA 品質を確認した後、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。

2) *TNSALP* 遺伝子変異解析

TNSALP 遺伝子ベクターを作成後、日本人に低ホスファターゼ症の患者に同定された *TNSALP* 遺伝子変異体を構築した。その後、COS7 細胞株（ALP 未発現細胞株）、H-HOS 細胞株（ALP 高発現骨肉腫細胞株）、L-HOS 細胞株（ALP 低発現骨肉腫細胞株）に正常および変異体のベクターを導入して、ALP 変異体の ALP 活性、ドミナントネガティブ効果、石灰化能（カルセインの取り込みによる評価）を検討した。

(3) 間葉系幹細胞の細胞特性の検討

培養した間葉系幹細胞は静脈内投与した場合、骨への遊走能が悪く、ほとんど肺でトラップされる。したがって、間葉系幹細胞の遊走能を高めるために、培養した細胞を剥離する剥離液の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年度 12 月 28 日)に従い、島根大学医の倫理委員会および産業技術総合研究所の倫理委員会の承認を得た後、行っている。書面によるインフォームド・コンセントを取得後に検体を採取して、使用している。

C. 研究結果

(1) キメリズム解析

症例 1 に関して、骨髄移植 1 か月後の造血細胞は、100% ドナータイプであったが、移植 8 か月頃から、10~20% 台にまでドナー細胞が低下した。その後、現在までこの比率を維持している。間葉系幹細胞は、これまで 4 回移植しているが、骨髄から採取して培養した間葉系幹細胞は、100% レシピエント由来のままである。

症例 2 に関して、骨髄移植 1 か月後から現在まで、100% ドナータイプを維持している。骨髄から採取して培養した間葉

系幹細胞は、100%レシピエント由来のままである。

症例 1,2 とともに、骨髄から FCM で単離した間葉系幹細胞のキメリズム解析では、細胞数が少ないためドナー由来細胞の割合は不明であるが、ドナー由来の正常な *TNSALP* 遺伝子を検出することができたため、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることが明らかとなった (図 1)。

(2) 病態解析

1) 網羅的遺伝子解析

階層クラスタリング解析 (図 2) において、間葉系幹細胞は正常人と保因者が同じ遺伝子発現パターンを示していたため、患者と正常人の比較を行った (表 1)。変動倍率 3 で解析した結果、骨に関わる遺伝子だけでなく、炎症、細胞内シグナル、細胞接着に関わる遺伝子も変動していた。さらに、肺や脳の形成に関わる遺伝子も変動していた (表 3)。

骨芽細胞は、階層クラスタリング解析 (図 2) において、正常人、保因者、患者でそれぞれの遺伝子発現パターンを示していたが、正常人と保因者が臨床的には正常であることから、正常人と保因者をまとめて、患者との比較を行った (表 2)。変動倍率 3 で解析した結果、間葉系幹細胞同様に、骨に関わる遺伝子だけでなく、炎症や細胞接着に関わる遺伝子も変動していた (表 4)。

2) *TNSALP* 遺伝子変異解析

19 個の *TNSALP* 遺伝子変異体を作成して、ALP 活性を行った (図 3)。*TNSALP* 遺伝子野生型に比べて、19 個中 15 個の変異体は ALP 活性が低く、4 個は ALP 活性が高かった。また、ALP を高発現している H-HOS 細胞株に変異体を導入したところ、ドミナントネガティブ効果が 19 個中 14 個の変異体で認められた (図 4)。さらに、変異体の石灰化能を、ALP を低発現している L-HOS 細胞株に導入したところ、19 個中 14 個の変異体で石灰化能が低下していた (図 5)。

(3) 間葉系幹細胞の細胞特性の検討

間葉系幹細胞の細胞特性を向上させるために、剥離液の検討を行った。トリプシンに比べて、試薬 A で細胞を剥離した場合、細胞表面の突起が多く認められ(図 6)、細胞の遊走能が改善した(図 7)。

D. 考察

(1) キメリズム解析

2 症例ともに、骨髄移植後に造血細胞はドナータイプに置き換わったが、症例 1 はレシピエント優位のキメラとなっている。間葉系幹細胞のキメリズムに関して、骨髄から培養した間葉系幹細胞では、レシピエントタイプしか検出できないが、フローサイトメトリー法により骨髄液から間葉系幹細胞を単離して、そのキメリズムを解析行ったところ、ドナータイプを検出できたが、ドナータイプとレシピエントタイプの間葉系幹細胞の割合を同

定するほどの検体が得られなかった。臨床的には、骨化の改善が認められているあるいは石灰化障害の進行を食い止めることができていることから、生着したドナータイプの間葉系幹細胞の効果があると思われる。また、症例 1 は、造血細胞がレシピエント優位な状況にも関わらず骨の石灰化が改善していることから、間葉系幹細胞と造血細胞の免疫寛容が生体内で起こっている可能性が示唆された。今後、長期間ドナータイプの間葉系幹細胞が生着するか経時的に検討していく必要がある。

(2) 病態解析

1) 網羅的遺伝子解析

間葉系幹細胞と骨芽細胞に関して、ALP 活性が低下することにより代償的に骨に関わる遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。しかし、ALP 活性が低下することで、直接的にあるいは間接的に骨化に関わる遺伝子発現が低下し

ていることから、ALPに関わる骨化（骨の石灰化）の機序が明らかにすることができると思われる。今後、これらの遺伝子を詳細に検討して、この疾患の病態を解明していく予定である。また、特に間葉系幹細胞において、骨に関わる遺伝子だけでなく、細胞内伝達、炎症、細胞接着に関わる遺伝子の変動していた。さらに、この疾患に合併する肺や中枢神経に関与する遺伝子も変動していた。したがって、この疾患が、骨だけでなくさまざまな症状に寄与することが遺伝子発現解析で明らかとなった。今後、この疾患からiPS細胞を作成して、それぞれの組織に分化させて、詳細に検討していく予定である。

2) *TNSALP* 遺伝子変異解析

日本人のこの疾患に認められた遺伝子変異体を作成したところ、ALP活性および石灰化能が70%以上の変異体で低下していた。同様に、ドミナントネガティブ効果も70%以上の変異体でみとめられた。ALP活性と石灰化能に関して、臨床の重

症度と一致する変異体が多く認められたが、一部は臨床像と合わずにALP活性が高い変異体もみられたこと、ドミナントネガティブ効果を認めた変異体を有する保因者が、臨床的に正常であること、同じ*TNSALP*遺伝子変異体を有する患者でも骨の石灰化の程度に開きがあることから、ALP以外に骨の石灰化に関わる因子が存在する可能性が示唆された。

(3) 間葉系幹細胞の細胞特性の検討

間葉系幹細胞の細胞特性を向上させるために、細胞剥離液を検討したところ、トリプシンよりは遊走能が維持できる剥離液を同定できた。しかし、生体内で骨へのhomingが高くなるかは明らかでない。さらに、他の因子の検討も重ねて、高い遊走能を有する培養間葉系幹細胞を樹立できるよう検討していく必要がある。

E. 結論

今回の検討では、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることを証明できた。臨床的には改善していることのエビデンスとなりうるが、長期間生着するか、検討する必要がある。病態解析では、ALP変異体の機能を明らかにすることができただけでなく網羅的遺伝子解析で骨だけでなくそれ以外の症状を引き起こす機序が明らかとなった。今後、疾患特異的iPS細胞を樹立して、それぞれの組織について検証を行う必要がある。さらに、培養した間葉系幹細胞の細胞特性を向上させる方法を検討したが、さらなる細胞特性の改善にむけて、特に、骨へのhoming効率を高める細胞の樹立を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：
 - 1) 小田泰昭、田所美香、勝部好裕、大西弘恵、大串始、竹谷健、弓場俊輔. 低フォスファターゼ疾患患者からのiPS細胞樹立と機能解析. 第11回再生医療学会、横浜、2012年6月12-14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1. 間葉系幹細胞のキメリズム解析

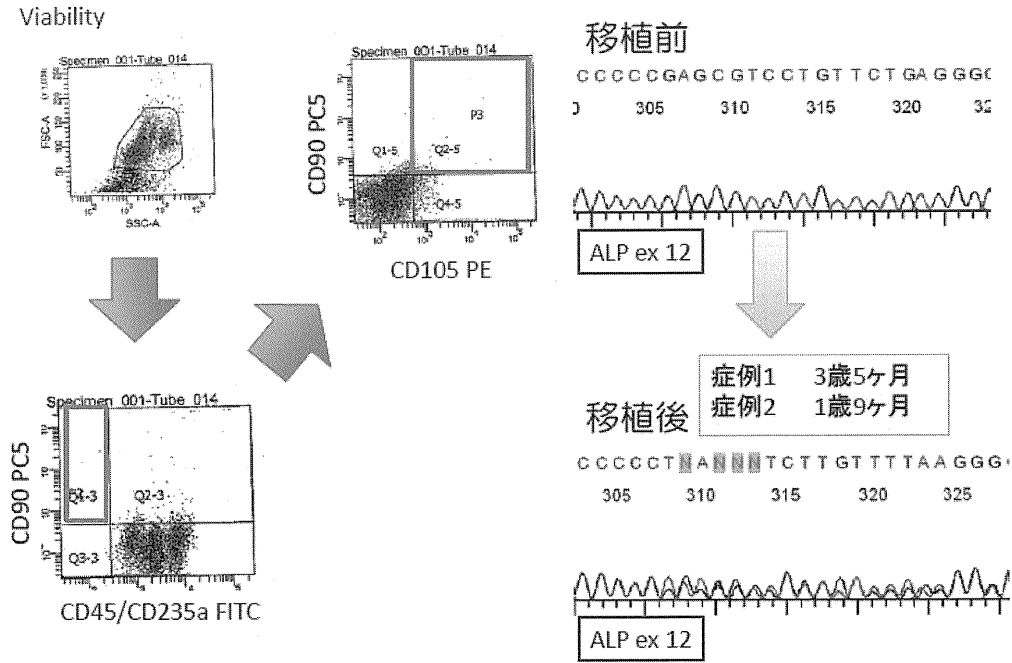


図 2. 階層クラスタリング解析

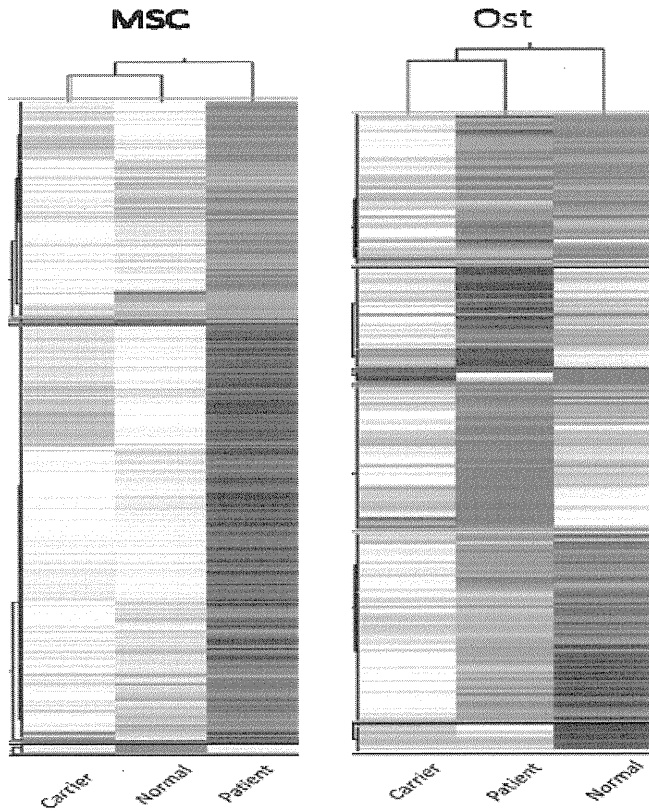


図 3. *TNSALP* 変異体の ALP 活性

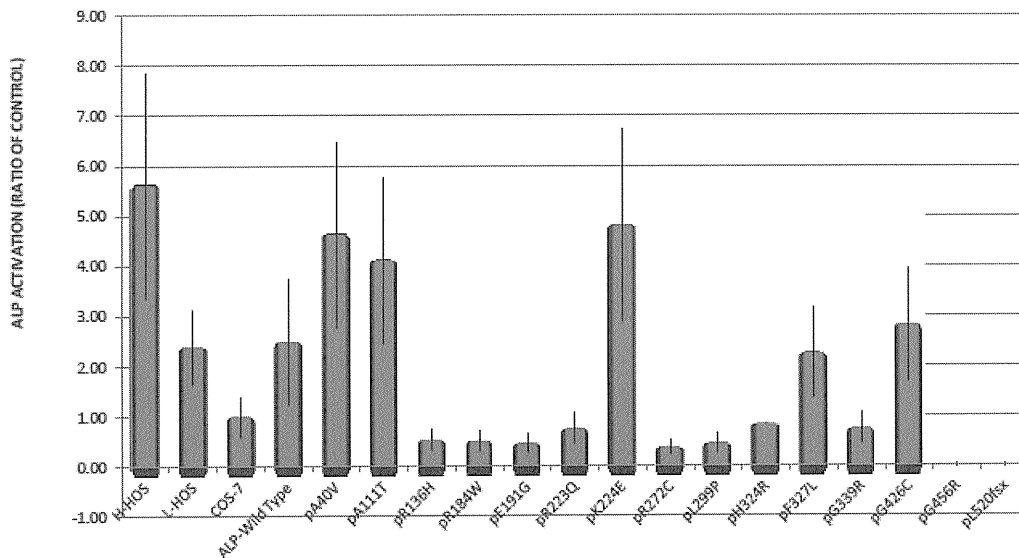


図 4. *TNSALP* 変異体の dominant negative 効果

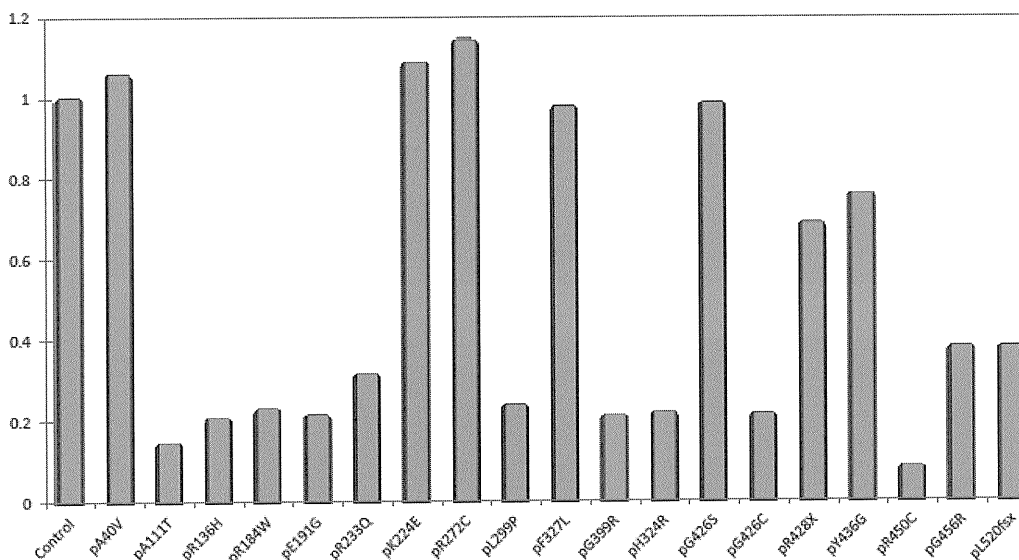


図 5. *TNSALP* 変異体の石灰化能

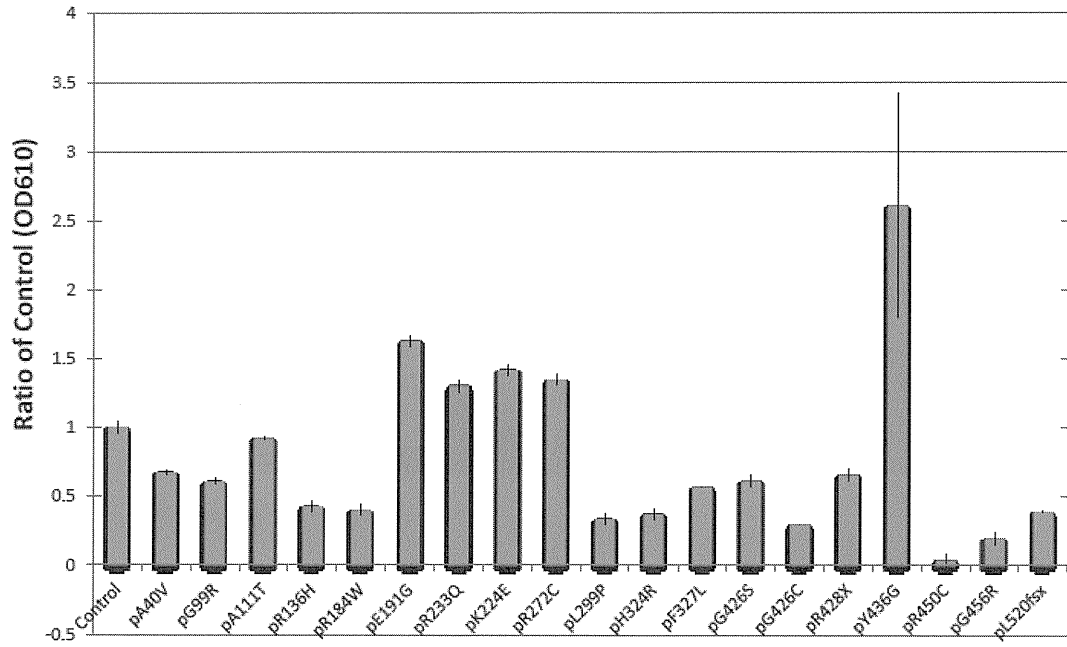


図 6. 細胞剥離液の違いによる細胞形状の変化

