

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。

(6) 引渡し後の最終試験判定

製品引渡し後も培養を続けていた平板培地および培養ボトルについて、平板培地の培養7日目に最終判定を行うこととする（培養ボトルは培養8日目にあたる）。

手順（4）と同様に、判定と処理を行う。

- ・ 引渡し後の判定ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を適合とする。
- ・ 引渡し後の判定でどれか1つ以上で陽性が疑われる場合、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

(7) 平板培地の写真撮影

1. BacT/ALERT のボトルグラフをプリントアウトする。平板培地（8枚）はインキュベータから取り出して、写真撮影を行う。
2. 培養7日目に判定を行った後の平板培地をデスクに並べる。
3. シャーレのフタを取りデジタルカメラで上から撮影する。

マイコプラズマ否定試験

- 市販の“Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR”（minerva biolabs, 一段 PCR 法）を用いる。
- 使用する市販の試薬、キットは、全てロット番号と使用期限を確認する。作業はすべてゴム手袋を着用して行う。

(1) DNA回収

細胞溶解および DNA 抽出には PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation Kit (QIAGEN)を用いる。

1. 培養担当者より検体細胞培養プレート (6 well) を受け取る。
2. プレートから上清を除去し、Cell Lysis solution 300 μ l ずつ 2 well に添加する。
3. セルスクレーパーで細胞を掻きとり、ピペッティングによりしっかりと懸濁する。1.5 ml チューブ 2 本に分けて回収し(1 well 分/tube)、1 本を DNA 抽出用として以下に用いる。残りの 1 本は再試験に備えるため、試験結果の確認および判定が終わるまで冷蔵庫で保管する。
4. RNase A solution 1.5 μ l を添加し、よく混合した後、37 $^{\circ}$ C、30 min インキュベートする。
5. 室温に戻した後、Protein PPT Solution 100 μ l を添加する。
6. 白濁するまで激しく vortex する。
7. 15,000 rpm、3 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
8. 2-propanol 300 μ l を加え、ゆっくりと約 50 回転倒混和する。DNA が見えてくることを確認する。
9. 15,000 rpm、3 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
10. ペレットを確認しながら上清を除去し、70%エタノール 300 μ l を添加する。
11. 15,000 rpm、1 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
12. 上清を全て除去する。
13. ペレットを乾燥させる。
14. 注射用水 15 - 30 μ l に溶解し、DNA サンプルとする。溶解する注射水の量は、ペレットの大きさに判断する。

○以下に使用する水は全て同一ロットの注射用水とする。

(2) DNA 定量

1. 測定の 30 分前に吸光光度計のスイッチを入れる。
2. 吸光値測定用サンプル (DNA サンプル 10 倍希釈液) を用意する。(DNA サンプル 2 μ l + 注射用水 18 μ l)
3. パソコンを立ち上げ Genespec-III (DNA) を起動させ、プリンタの電源を入れる。
4. 測定条件を入力する。
5. [編集]→

[測定条件編集] ・波長範囲：上限 300 nm、下限 220 nm

・光路長：5mm

・積算回数：32

[核酸条件編集] ・計算モード：dsDNA

・希釈率：10

6. 10 μ l 測定用セルを注射用水で洗う。
7. セルに注射用水 10 μ l を入れてベースラインを測定する。
8. ベースラインが決定したら測定用 サンプルを 10 μ l 入れて測定する。
9. 複数のサンプルを測定するときはサンプルごとにシートを替える。
10. シートにサンプル名(検体 ID、培養時期)、コメント (試験担当者名) を入力する。
11. [保存]→[一括ファイル保存]で全てのシートを1つのファイルとして保存する。
12. 波形をプリントアウトし、記録用紙の所定の欄に貼り付ける。
13. Genespec-IIIを終了し、吸光光度計の電源を切る。
14. 測定用サンプルを捨て、使用したセルは MQ 水で洗浄して所定の位置に戻す。

(3) 上清サンプルの準備

1. 冷蔵庫から最終検査用培養上清を取り出す。
2. 安全キャビネット内で、少量を クライオチューブに分注する。
3. 実験台で 0.2 ml チューブに 50 μ l を分注する。
4. PCR 機で 95°C、5 min 加熱し、5 秒間スピンドウンする。
5. Sample A として以下に用いる。

(4) PCR

PCR には以下のキットを用いる。

- ・ Venor GeM Mycoplasma detection kit for conventional PCR (minerva biolabs)
- ・ Ampdirect Plus (島津製作所)
- ・ Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)

1. DNA 定量で得られたデータに基づき、DNA サンプルを 100 ng/ μ l になるように注射用水で希釈し、Sample B として以下に用いる。
2. 冷凍保存の Venor GeM PCR キットのケースから、Ampdirect Plus (Buffer)、PCR grade water、Primer/Nucleotide Mix 及び Internal control DNA を取り出し、解凍する。
3. 8 連チューブを用意し、検体 ID と日付を記入する。
4. 下表に従い 1.5 ml チューブに (必要サンプル数+1) サンプル分の PCR Mixture

を調整する。

	1 サンプル分	6 サンプルで 試験を行う場合
Ampdirect Plus	12.5 µl	87.5 µl
PCR grade water	4.87 µl	34 µl
Primer/Nucleotide Mix	2.5 µl	17.5 µl
Nova Taq *	0.13 µl	1 µl
合計	20 µl	140 µl

* Nova Taq (酵素)は混合直前まで冷凍庫で保管し、使用後は直ちに冷凍庫に戻す。

- よく混合した後、8 連チューブに 20 µl ずつ添加する。
- 下記の表にしたがって **Sample, Internal control DNA, Extra H₂O** (注射用水)を加える。
- *添加時、内容液がチューブ外面に付着しないように注意する。交差汚染を防ぐため、残りのサンプル、試薬類は確実にキャップをして片付ける。マイコプラズマ DNA はコントロールとして使用しない。

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Sample name	Negative control	Positive control	Sample A (培養上清)	3 + Internal control	Sample B (細胞 DNA)	5 + Internal control
PCR mixture	20	20	20	20	20	20
Sample	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Internal Control DNA	-	2.5	-	2.5	-	2.5
Extra H ₂ O	5	-	2.5	-	2.5	-
Total	25	25	25	25	25	25

- キャップを確実に閉めて混合し、スピンドウンする。
- 以下の条件で PCR を行う。

Thermal Profile

1 cycle	95°C for 10 min
39 cycles	94°C for 30 sec
	55°C for 30 sec
	72°C for 30 sec
cool down	15°C for ∞

* 最終の保持温度は PCR 機の結露を防ぐため 15°C とする。

10. PCR が終了したら、PCR 産物は電気泳動を行うまで冷蔵庫で保存する。

(5) 電気泳動

1. 以下の通り、サンプルを 2% agarose gel にロードし 100 V、1×TAE で 30 分程度泳動する。

Lane M . 100 bp Ladder Marker

Lane 1. Negative control

Lane 2. Positive control

Lane 3. Sample A

Lane 4. Sample A + Internal control

Lane 5. Sample B

Lane 6. Sample B + Internal control

2. EtBr で染色して UV 照射下で写真を撮る。

(6) 結果の確認

1. 電気泳動写真を見て、以下の試験成立基準を確認する。これら全てが満たされていない場合は試験が成立していないと判断し、PCR をやり直す。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- Lane 1 にバンドが認められない
- Lane 2 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。
- Lane 4, 6 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。

(lane 3, 5 で標的のバンド (265-278 bp) が認められた時は、この基準を満たさなくてよい)

* 191 bp・・・Internal control DNA 増幅産物サイズ

- Lane2, 4, 6 にバンドが認められない場合は、サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性があるため、当該サンプルを希釈して PCR をやり直す。培養上清サンプルは 5 倍に希釈し、加熱処理を行う。
- 再測定の前には試薬の有効期限、操作手順及び試験機器の点検・校正状況の再確認を行う。PCR をやり直しても基準を満たさない場合は試験不成立として、品質管理責任者に状況を報告する。

(7) 判定

手順 (6) で基準を満たしたサンプルについて、以下の判定を行う。

試験に使用した機器に間違いはないか、点検・校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- ・ Lane 3, 5 のいずれにもバンドが認められない場合、陰性と判断する。
- ・ Lane 3, 5 のいずれかで 265 – 278 bp 間にバンドが認められる場合、陽性と判断する。

(8) 再試験および再判定

再試験 A

陽性または擬陽性の判定が出た場合は、品質管理責任者の指示を受け、以下の手順で再試験 A-1 および A-2 を行う。

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動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

同種間葉系幹細胞の移植をおこなった2症例の長期でのレントゲン像ならびにCT像の解析をおこなった。症例1では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。また、頭蓋骨の良好な石灰化は持続していた。しかし、長菅骨脆弱性は残存していた。症例2では移植前にみられた非石灰化骨端線の拡張は改善し、さらに長菅骨の変形も生じなかった。しかし、症例1と同様、骨の脆弱性は残存していた。また、これらの症例には複数回の移植をおこなったが、この複数回に用いた間葉系幹細胞の*in vitro*での骨形成能をALP活性やカルセインの取り込みにより生化学的に検証した。これらの検証により、複数回用いた間葉系幹細胞は全て骨分化能を有することが確認できた。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るも、骨の脆弱性の問題を解決すべく、さらなる研究が必要である。

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成長不全の改善と、移植に用いる間葉系幹細胞が骨分化能を有することが必須で

ある。以上の点をふまえて、分担研究者大串は、今回長期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、これまでに複数回用いたドナー間葉系幹細胞の骨分化能を検証した。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

骨成長の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骨分化は、島根大学から搬送された骨髄から培養増殖された間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いて以下の方法によりおこなった。

《骨分化能解析》

・MSCを基礎培地に浮遊し 2×10^4 cells/1.5mL/wellで12well plateに播種する。

(この時の濃度は5000cells/cm²となる)

・播種翌日 (又は細胞接着後)、6wellを基礎培地に添加因子3種をそれぞれ100分の1ずつ加えた誘導培地

(Dex(+)) に交換する。(コントロールとして残りの6 wellは β -GPのみ加えた培地 (Dex(-)) に交換する。)

・Dex(+), Dex(-)各6 wellのうち、5wellにCalceinを100分の1加える。

・添加因子を加えた培地で週2-3回培地交換をおこない、2週間培養する。

・イメージアナライザー (タイフーン) で蛍光強度を測定し、石灰化基質の定量を行う。

・DNA bufferを0.5mLずつ各wellへ添加し、細胞を回収する。

・回収した細胞を超音波破砕する。

・DNA量を定量する。

・ALP活性を測定する。

・DNA 1 μ gあたりのALP活性を計算する。

基礎培地: 15%FBS/ α MEM (抗生物

質+)

添加因子

・ β -GP: β -Glycerophosphate disodium salt (CALBIOCHEM: 35675)

作成法 β -GPを精製水に1Mとなるように溶解→ろ過滅菌

・Vit.C: L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物 (Wako: 013-12061)

作成法 Vit.C をPBSに2.05mg/mLとなるように溶解→ろ過滅菌

・Dex: Dexamethasone (SIGMA: D-8893)

作成法 1mg入りの瓶に1mLのエタノールを添加→24mLのPBSを添加→PBSでさらに10倍希釈→ろ過滅菌

・Calcein (3,3'-Bis[N,N-bis(carboxyethyl)-aminomethyl] fluorecein): (Dojin:344-00431)

作成法 CalceinをPBSに0.1mg/mLとなるように溶解→ろ過滅菌

・DNA Buffer: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA[pH 7.4]溶液

(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、骨形成能の解析についても、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。以上より倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

症例1の患者の4才6ヶ月の時点でのレントゲン像(図1)を示す。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)が見られたが、これは消失したままであった。なお、大腿骨や下腿骨全体に骨の脆弱性がみられ、さらに右大腿骨の中央にこれまでに生じなかった骨折がみられた。

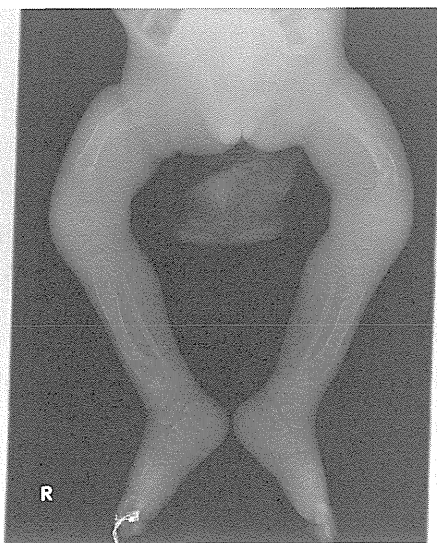


図1. 症例1の4才6ヶ月でのレントゲン像

症例1の患者の4才6ヶ月の時点でのCT像(図2)においても、右大腿骨の骨折が確認できる。また、全体に大腿骨が湾曲しているのも見られる。なお、頭蓋骨の骨形成は非常に良好である。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るも、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。特に大腿骨では脆弱性がみられ、結果として骨折を生じた。



図2. 症例1の4才6ヶ月でのCT像

症例2においては、レントゲンにおいて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ていた。この非石灰化骨端線は移植後長期(2才の時点)でも改善していた(図3)。CTの画像でも同様の所見を得た(図4)。ただし、症例1と同様に骨皮質の石灰化は不十分で脆弱性が示唆された。

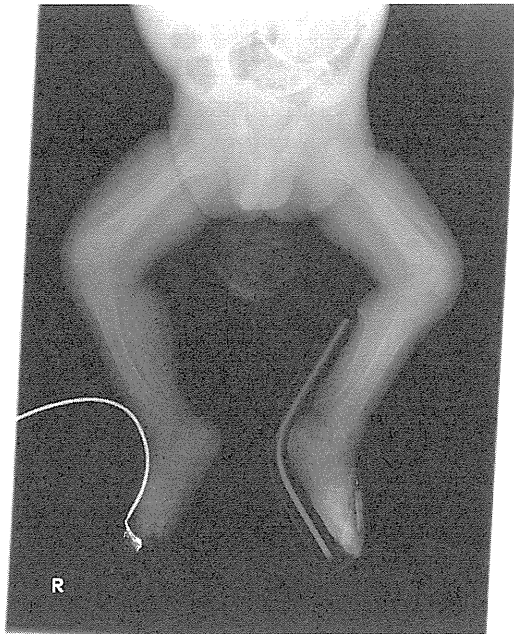


図 3. 症例 2 の 2 才でのレントゲン像

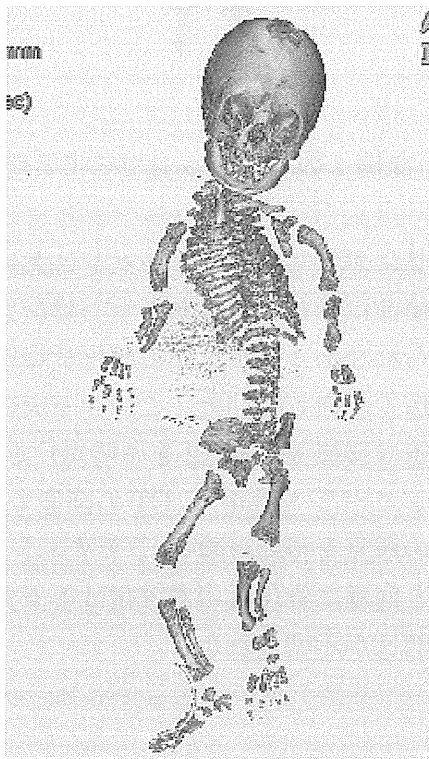


図 4. 症例 2 の 2 才での CT 像

これまでに、両症例に対して複数回の間葉系幹細胞の移植をおこなってきた。レントゲン像や CT では、移植間葉系幹細胞が患者の骨に生着して新たな骨形成を生じていることを示唆され、この同種の幹細胞移植が有効であると思われた。しかし、骨の脆弱性は残存し、移植された幹細胞の骨分化能に関する検証が必要である。特に、同じドナーから複数回移植しているが、これらの移植ごとにおける骨分化能の比較が重要と思われ、今回これまでに移植された幹細胞の移植毎の骨形成の比較を ALP 活性とカルセインの取り込みにより行った。

図 5, 6 のように、variation がみられるも、測定した全てで dexamethasone による ALP 活性と骨基質産生の誘導がみられた。これにより、ドナー骨髄から得られた間葉系幹細胞の骨分化能が確認された。

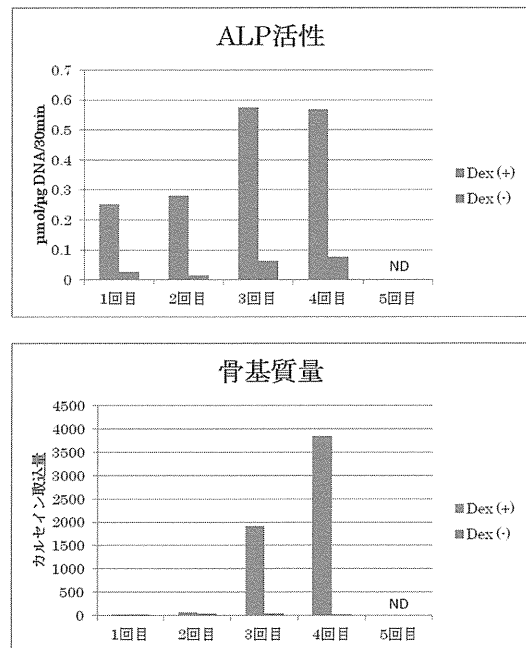


図 5. 症例 1 の骨形成比較

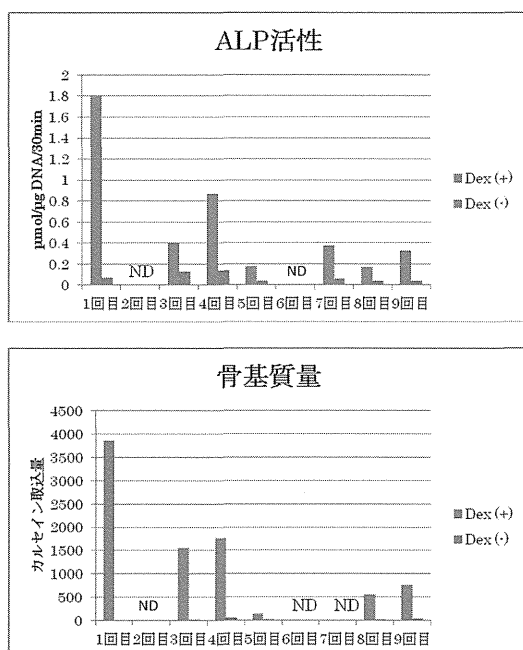


図 6. 症例 2 の骨形成比較

D. 考察

今年度ならびにこれまでの研究において、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。特に、頭蓋骨の骨形成は良好であった。この点に比し、四肢における皮質骨の菲薄化、すなわち骨の脆弱性が両症例と残存していた。特に、症例 1 ではこれまで見られなかった大腿骨の骨折がみられ、皮質骨の機械特性が非常に不十分であることが示唆された。これらの結果にみられるように、同種の間葉系幹細胞の移植は患者の長期にわたる生存をもたらし、有用であると思われるも、今後長期にわたり、さらなる検証を必要となる。

E. 結論

今回のレントゲンとCT像、ならびに

これまでの画像による比較で、長期にわたって骨端部分の骨構築が改善されたことが確認できた。しかし、四肢の皮質骨の脆弱性は残存し、特に症例 1 においては大腿骨骨幹部の骨折がみられた。以上を踏まえると、同種間葉系幹細胞を用いての本疾患治療の有用性が示されるも、さらなる症例において同種間葉系幹細胞の移植研究を引きつづき行うことが重要である。また、今後の研究においては、移植細胞数を増やすなどの計画の変更も視野に入れるべきかと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Ohgushi H. Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012 Dec 18. doi: 10.1002/term.1674. [Epub ahead of print]
2. Teraoka K, Kato T, Hattori K, Ohgushi H. Evaluation of the capacity of mosaic-like porous ceramics with designed pores to support osteoconduction. *J*

- Biomed Mater Res A. 2013
Dec;101(12):3571-9
3. Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Sep 6;438(4):753-9
 4. Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y. Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model. J Tissue Eng Regen Med. 2013 Jan;7(1):51-60
 5. Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. Expert Opin Biol Ther. 2014 Feb;14(2):197-208.
 6. 松末吉隆、勝呂 徹、大串始、佐藤正人、中村憲正、松田秀一、和田佑一
- 自家培養軟骨 使用要件等基準策定ワーキンググループ報告書 (pp1-52),2013 社団法人日本整形外科学会
7. 大串始、赤羽学
間葉系幹細胞を用いた種々骨再生「骨形成最前線」 pp217-226 株式会社 エヌ・ティー・エヌ 2013年10月14日発行
 8. 大串始
再生医療技術の実用化における環境整備 Web Journal No.143,pp7-10, 2013 アクトライム発行
2. 学会発表(2013年)
 1. 奈良県立医科大学特別講演 (1/10 奈良県立医大、橿原市)「研究・臨床における常識と非常識：私の再生医療経験からみた方法論について」大串始
 2. 第25回バイオエンジニアリング講演会、特別講演「再生医療技術と工学技術の融合」(1/9 産業技術総合研究所 つくばセンター) 大串始
 3. 近畿大学医学会学術講演、「間葉系幹細胞を用いた再生医療の実」(1/30 招待講演 大阪府狭山市近畿大学医学部) 大串始
 4. 第12回日本再生医療学会 (3/21、横浜パシフィコ横浜) パネルディスカッション「幹細胞療法の可能性」における“先天性骨系統疾患に対する骨髄移植併用同種間葉系

- 幹細胞移植” 竹谷 健、弓場俊輔、大串始
5. 第 12 回日本再生医療学会 (3/21、横浜パシフィコ横浜) 一般口演、再生培養骨評価のためのラット “先天性骨癒合不全” モデル開発、上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、大串始、桐田忠昭
 6. 第 12 回日本再生医療学会 (3/23、横浜パシフィコ横浜) 一般口演、骨再生のための培養骨移植における骨芽細胞分化度の違いによる骨形成能への影響についての検討、前田雅彦、大串始、桐田忠昭
 7. 第 12 回日本再生医療学会 (3/21-23、横浜パシフィコ横浜) ポスターセッション、ヒト間葉系幹細胞で高心筋分化能を示す新規細胞表面マーカー、石嶺久子、山川哲生、笹尾真理、田所美香、上大介、徳原真、梅澤明弘、大串始、浅島誠、栗崎晃
 8. 第 12 回日本再生医療学会 (3/21-23、横浜パシフィコ横浜) ポスターセッション、間葉系幹細胞に対する培養環境中の過酸化水素の影響について、田所美香、笹尾真理、越田一朗、大門誠、廣瀬志弘、小久保譲、大串始、紀ノ岡正博、弓場俊輔
 9. 第 12 回日本再生医療学会 (3/21-23、横浜パシフィコ横浜) ポスターセッション、低フォスファターゼ症患者 iPS 細胞の樹立、小田泰昭、田所美香、勝部好裕、大串始、竹谷健、弓場俊輔
 10. 第 86 回日本整形外科学会総会 (5/23-26 広島リーガロイヤルホテル、広島) シンポジウム「運動器再生医療研究の最先端」同種間葉系幹細胞を用いた骨再生治療、大串始、弓場俊輔、竹谷健
 11. 第 86 回日本整形外科学会総会 (5/24 広島リーガロイヤルホテル、広島) 遊離血管柄付き腓骨と培養骨髄間葉系幹細胞搭載 TCP 顆粒を移植したステロイド性大腿骨頭壊死症例の成績 川手 健二、矢島弘嗣、大串始、田中康仁、高倉義典
 12. 奈良県立医大特別講演 (生化学教室主催) (6/13 奈良県立医大、橿原市) 「再生医療とは？体性幹細胞へiPS細胞」 大串始
 13. 第 22 回泉大津市医師会病診連携懇話会 (10/19 招待講演 ホテルレイクアルスターアルザ泉大津、泉大津市) 「再生医療の経験から得た研究・臨床における常識と非常識」大串始
 14. 第 28 回整形外科基礎学術集会 (10/17 幕張メッセ 千葉 ポスター) Fibronectin をコートした b-TCP の骨形成能 (bTCP の気孔率の影響について) 谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、岩田栄一郎、赤羽学、川手健二、田中康仁、大串始

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 25 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

- 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立 -

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

骨の石灰化障害をきたし、致命的な経過をとる低ホスファターゼ症に対して骨髄移植後、骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を移植する臨床研究の問題点の 1 つは、不十分な骨の石灰化である。この理由として、間葉系幹細胞の遊走能や生着能が低いことが挙げられる。この課題を克服するために、臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。また、この疾患の病態を解明するために、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試みた。臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性に関して、骨髄由来間葉系幹細胞と比べて、ALP 発現、骨分化および遊走能には大きな差はなかったが、細胞接着に関する CD44 の発現は高かった。このことは、移植後に生着する間葉系幹細胞が少ないことを回復させる可能性が示唆された。また、疾患特異的 iPS 細胞に関して、患者の皮膚繊維芽細胞に 5 つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28）を導入して iPS 細胞を樹立することに成功した。しかし、細胞増殖能が低く未分可能を維持することが困難であったため、未分化マーカーである ALP（この疾患では遺伝的に欠損している）がこれらの機能に関与している可能性が示唆された。これらの結果から、ALP が正常かつ HLA が一致したドナーからの臍帯血移植後に同一ドナーからの臍帯由来間葉系幹細胞を骨髄内に移植する治療の有効性を検討する必要がある。また、疾患特異的 iPS 細胞から骨だけでなく中枢神経や肺などに分化させて、病態の解明を行うことが重要である。

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）

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す常染色体劣性遺伝疾患である。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す原因が明らかでないこと、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。臨床効果が不十分な理由の1つとして、ALP遺伝子異常を有する保因者をドナーとしていることが挙げられる。ALP遺伝子変異を認めず（ALPが正常）かつHLAが一致したドナーからの造血幹細胞移植および間葉系幹細胞移植が臨床

像の更なる改善に有効であると思われるため、上記条件を満たすドナーを得やすい、臍帯血移植および同一ドナーの臍帯由来間葉系幹細胞移植を検討する必要がある。したがって、臍帯由来間葉系幹細胞（uMSC）の細胞特性を検討した。また、この疾患の病態解明を行うために、患者から疾患特異的iPS細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

(1) ALP染色

uMSC（ 1×10^4 個）を24ウェルにまき、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 濃度下で24時間培養後、培養上清を取り除き、 $1 \times \text{PBS}$ で1度洗浄した。固定液を各ウェルに $250 \mu\text{L}$ ずつ加え、室温で5分間放置し、細胞をウェルに固定した。滅菌蒸留水を各ウェルに 2mL ずつ加えて固定液を希釈し、液を取り除いた。細胞を固定したウェルに $250 \mu\text{L}/\text{well}$ のALP基質液（TRACP&ALP double-stain Kit, TakaRa）を入れ、 37°C で30分間反応させた。反応液を取り除き、滅菌蒸留水で3回洗浄後、顕微鏡下で観察した。

(2) Flow cytometryによるCD44とALPの発現

PBSに懸濁した細胞にALP抗体（Anti-Alkaline Phosphatase, Tissue

Non-Specific antibody [2F4], Abcam) および CD44 抗体(Beckman coulter) をそれぞれ 5 μ L 添加し、15 分間氷上で静置し、洗浄後、BD FACS Calibur で ALP および CD44 を測定した。H-HOS 細胞 (ALP 強発現骨肉腫細胞株) をコントロールとした。

(3) ALP 活性

同様に培養後、超音波粉碎器を用いて細胞抽出液を作り、ラボアッセイ™ ALP kit (WAKO)を用いて ALP 基質を染色し、蛍光プレートリーダーで 405nm で測定した。

(4) 骨分化能

α -MEM に 15%FBS, 2mL penicillin/streptomycin (10,000 units/mL penicillin, 10,000 μ g/mL streptomycin, in 0.85% NaCl, nacalaitesque, Kyoto), 10mM β -glycerophosphate (β -GP), 0.07mM アスコルビン酸、および 100nM dexamethazone を添加した培地を基礎培地とし、そこに 1 μ M retinoic acid (RA), 10nM cyclosporin A (CyA), 10nM tacrolimus (FK506), 10nM calcitriol (Vitamin D3), 0.5mM sodium butyrate (SB) and LiCl, 0.5mM LiCl, 0.5mM SB, 100ng/mL BMP-2 をそれぞれ加えた培地で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 21 日間培養して骨分化能

を検討した。その間に培地は 3 日置きに交換した。

培養後、超音波粉碎器を用いて細胞液を作り、ラボアッセイ™ ALP kit (WAKO)を用いて ALP 基質を染色し、蛍光プレートリーダーで 405nm で測定した。

また、アリザリンレッド染色で骨分化を確認し、カルシウムテストワコー (WAKO) を用いて骨基質(calcein)を蛍光プレートリーダーで 610nm で測定した。

(5) 遊走能の検討

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、骨髄由来間葉系幹細胞の遊走能との差を検討する為に、uMSC を用いて検討を行った。24-well プレートに 1 \times 10⁵cells/mL の細胞を 3 日間培養した uMSC を boyden chamber assay で migration を評価した。

2. 患者由来皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

(1) iPS 細胞誘導用組換えレトロウイルスベクターの調整

TransIT-293 トランスフェクション試薬を用いて、G3T-hi 細胞に

Human iPS Cell Generation

All-in-One Vector (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 の 5 つの遺伝子を組み込んだベクター、TaKaRa), pGP Vector (TaKaRa), pE-Ampho Vector (TaKaRa) を共導入し、組換えレトロウイルスベクターを調整した。

コラーゲンコート 60mm シャーレに 2×10^6 cells/dish で G3T-hi 細胞を播種、24 時間培養した後、TransIT-293 トランスフェクション試薬を用いて遺伝子導入を行った。シャーレ 1 枚当たり、Human iPS Cell Generation All-in-One Vector (2 μ g), pGP Vector (gag-pol 遺伝子発現ベクター, 2 μ g)、および pE-Ampho Vector (Amphotropic envelope 遺伝子発現ベクター, 1 μ g) を共導入した。導入方法は試薬付属のマニュアルに従った。DNA トランスフェクションから 24 時間後、新たな培地に交換し、さらに 24 時間の培養を行った。トランスフェクションから 48 時間後、各シャーレより培養上清を回収、0.8 μ m および 0.2 μ m フィルターで濾過したものをレトロウイルス溶液とし、1mL/vial で分注後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

(2) 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数の算出

(1) で調整した組換えレトロウイルスベクター溶液の RNA ゲノムコピー数を Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR, TaKaRa) を用いて算出した。

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて DNase I 処理 (反応条件は表 1 を参照) を施したウイルス液を ONE Step リアルタイム RT-PCR 反応に供した。One step リアルタイム RT-PCR 反応は、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR kit (perfect Real Time, TaKaRa) のプロトコールに従い、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いて行った (表 1)。Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) に含まれる RNA Control Template を用いて、二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値と RNA コピー数の挿管を示す検量線を作成し、被検サンプルの RNA コピー数、RNA Control Template の測定データ、被検サンプルの RNA コピー数を算出した。

(3) 標的細胞の培養とマイコプラズマ検出試験

患者由来ヒト皮膚線維芽細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地 (GIBCO) を用いて培養した。拡大培養後、必要数の細胞を iPS 細胞誘導試験に供し、 5×10^5 cells の細胞ペレットを同一性確認試験用に凍結保存した。また MycoAlert Mycoplasma detection Kit (TaKaRa) を用いたマイコプラズマ検出試験を実施した。検体には拡大培養中の培養上清を使用した。