

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  
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、長管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、さらに長管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 $2 \times 10^4$  cells/1.5mL/wellで12well plateに播種する。

(この時の濃度は5000cells/cm<sup>2</sup>となる)

・ 播種翌日(又は細胞接着後)、6 well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、5 well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碎する。

・ DNA量を定量する。

・ ALP活性を測定する。

・ DNA 1μgあたりのALP活性を計算する。

基礎培地：15%FBS/αMEM(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ナトリウム塩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, 10 mM 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。

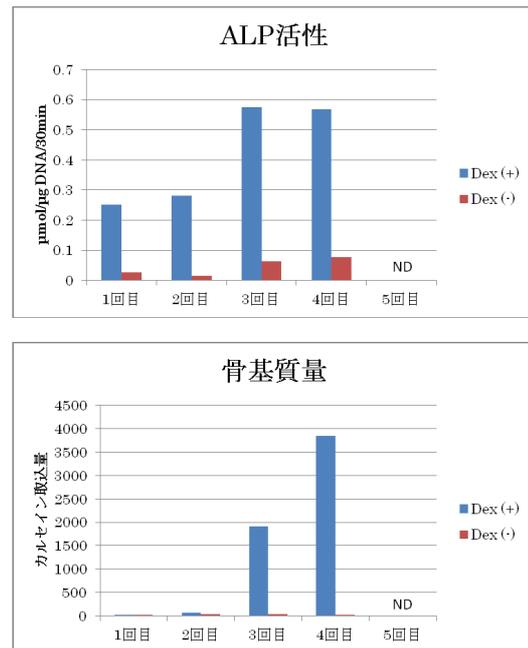


図 5. 症例 1 の骨形成比較

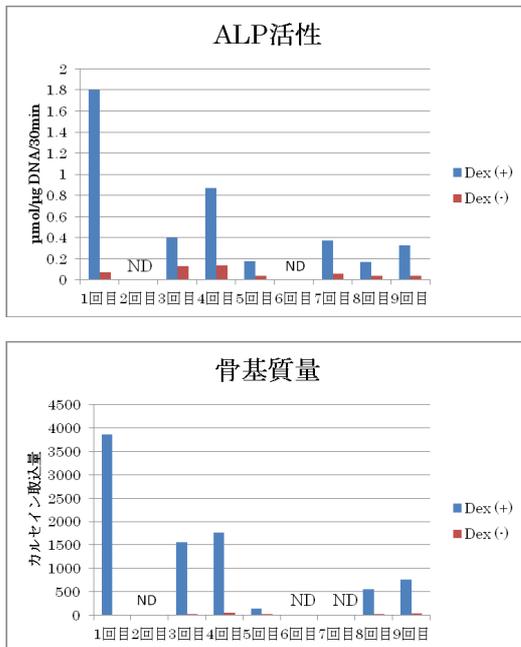


図 6. 症例 2 の骨形成比較

#### 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す、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する。

#### 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い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、小久保謙、**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  
アターゼ症患者 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~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