

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。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% 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、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 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。

(4) iPS 細胞誘導因子の遺伝子導入

RetroNectin(TaKaRa)を用いてレトロウイルスベクターを患者由来皮膚線維芽細胞に感染させ、iPS 細胞誘導因子群の遺伝子を導入した。20 µg/mL に調整した RetroNectin 溶液をノントリート 6well プレートに 2mL/well 添加、4 日に一晩静置する事で RetroNectin 固定化プレートを作製した。

RetroNectin 溶液を除去後、(1)で作製したレトロウイルスベクター溶液を、DMEM 培地を用いて 30 倍に希釈し、RetroNectin 固定化プレートに添加した。32 °C、2,000 × g の条件でプレートを 2 時間遠心し、溶液中のレトロウイルスを RetroNectin 固定化プレートに吸着させた。ウイルス溶液の除去と 1.5% HSA/PBS での洗浄の後、 1×10^5 cells/well の細胞数で患者由来線維芽細胞をプレートに播種し、遺伝子導入を行った。播種約 24 時間後の細胞を回収、同様の操作で作製した RetroNectin 固定化・レトロウイルス吸着プレートに播き直すことで、さらに再び遺伝子導入を行った。

(5) iPS 細胞誘導

iPS 細胞誘導因子の遺伝子を導入したヒト皮膚線維芽細胞を、STO 細胞(ATCC)上に播種し、霊長類 ES 細胞培地(ReproCELL)を用いて培養する事で、iPS 細胞の誘導培養を行った。細胞培養用 100mm シャーレに 0.1%ゼラチン溶

液を添加、室温で 30 分間静置する事で、ゼラチンの固定化を行った。ゼラチン固定化シャーレにマイトマイシン C 処理(最終濃度 12µg/mL, 協和発酵工業)で培養上清に添加後、2 時間 15 分以上培養を施した STO 細胞を

1.5×10^6 cells/dish で播種し、一晩培養する事でフィーダー細胞を準備した。

(4)の遺伝子導入 6 日後の細胞を回収し、 1×10^5 cells/dish で STO 細胞上に播種した。培養 24 時間後に上清を霊長類 ES 細胞用培地に交換、以降 2 日ごとに培地を交換し、遺伝子導入 35 日後まで培養を継続する事で iPS 細胞誘導を行った。

(6) iPS 細胞のクローン化

iPS 細胞コロニーをピックアップし、ES 細胞様の外観を示したクローンの拡大培養を試みた。(5)の誘導培養を実施したシャーレから実体顕微鏡での観察下、単一の iPS 細胞コロニーをピペットマンやシリンジを用いて分取し、数回のピペッティングによる細分化後、ゼラチン固定か 24well プレートにあらかじめ用意したフィーダー細胞上に播種した。以降約 24 時間ごとに、ES 細胞培養用培地を用いて培養上清を交換し、7~10 日ごとに継代を実施する事で拡大培養を行った。その過程で ES 細胞様の形態を示す 6 クロニーを選別した。iPS 細胞の継代方法は、上清の除去と PBS 洗浄の後、霊長類 ES 細胞培養用培地を添加、先に剥離するフィーダー

細胞を除去し、ES 細胞培養用培地添加後、残った iPS 細胞をセルスクレーパーで剥がした、iPS 細胞懸濁液を回収し、ピペティングによる細分化後、6 well プレートに用意した新たなフィーダー細胞上に播種し直した。しかし、これらの iPS 細胞株は、一般的な iPS 細胞と比較して増殖速度が著しく低かったため、継代の際に細胞死を抑制する Rho 結合キナーゼ ROCK の阻害剤 Y27632(WAKO)の使用を試みた。継代の前に培養上清を 10 μ M の ROCK 阻害剤 Y-27632 を含む iPS 細胞培養用培地に交換、1 時間以上培養した後、上記の方法で継代を行った。iPS 細胞コロニーのピックアップから数えて 81 日間の培養を行った。

(7) ALP 染色

(6)で選別した iPS 細胞クローン 3 株 (No.2、No.4、No.6)について、TRACP&ALP double stain kit(TaKaRa)を用いた ALP 染色を行った。

(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。提供された臍帯は、(1)再生医療、(2)血液疾患、(3)患者数の少ない難治性疾患の治療方法の開発や創薬を目指した研究、ならびに臍帯の保存技術の開発、バンキングを目指した研究等、医学の発展を目指した研究に使用する事を、臍帯を提供して頂く妊婦に説明し、同意を得ている。また、患者由来 iPS 細胞も病態解明、治療法の開発のための使用することを患者の親権者に説明して同意を得ている。

C. 研究結果

1. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

(1) uMSC の ALP 活性および ALP の発現

陽性コントロールである ALP 発現株である H-HOS と同程度に ALP 発現が認められた(図 1A)。また、CD44 の発現は H-HOS よりも発現レベルが高かった(図 1B)。ALP 免疫染色でも uMSC は呈色が得られた(図 2)。

(2) uMSC の骨分化能および骨分化後の ALP 活性

基礎培地において、uMSC が骨芽細胞に分化したところ、石灰化能および ALP 活性を認めた(図 3B、図 4)。骨分化促進剤(RA, CyA, FK506, VD3, SB+LiCl, SB, BMP-2)、骨分化阻害剤(LiCl)で検討したところ、石灰化能は

FK506, VD3, BMP-2 で認められ、ALP 活性化はすべての薬剤で認められた (図 3B, 図 4)。しかし、uMSC のロット間の差が認められた。(図 3B, 図 4)。

(3) 遊走能

Boyden chamber assay において、uMSC と骨髄由来 MSC は、同じ割合で遊走能が認められた (図 5)。

2 . 患者由来 iPS 細胞の樹立

One step リアルタイム RT-PCR 解析結果より、取得したレトロウイルスベクター溶液は 2.55×10 copies/mL の RNA Titer を示し、感染試験に適するウイルス溶液が取得できたことを確認した(表 1)。また、マイコプラズマ陰性も確認した。

患者由来皮膚繊維芽細胞からの iPS 細胞様コロニーを計 21 個ピックアップし、拡大培養を試みたところ、6 クローンが iPS 細胞様コロニーの外観を示した(図 6)。しかし、クローン No.1 と No.5 については継代を重ねるごとに増殖速度が低下し、増殖が停止した。クローン No.2、No.3、No.4 については未分化能が維持できず、ES 細胞様の外観のコロニーが消失し、分化したと思われる細胞のみとなった。クローン No.6 については一定の増殖速度を示し、ES 細胞様の外観を示すコロニーが生育し続けた。しかし、iPS 細胞様の外観を示し

ているにも関わらず、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。

ALP 染色において、全てのクローンについて呈色反応が確認できず陰性を確認した(図 7)。

D. 考察

1 . 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

uMSC は、骨分化や遊走能において、骨髄由来 MSC との著しい差は見られなかった。しかし、接着因子である CD44 が H-HOS 細胞よりも発現量が多いことから、in vivo での生着能が高い可能性がある。また、骨分化能に関してはロット間での差が大きかった。このことは、骨髄由来 MSC の培養条件で骨芽細胞へ分化させたことが原因かもしれない。したがって、uMSC が十分に骨分化する条件を詳細に検討する必要がある。しかし、骨髄由来 MSC もロット間(個人間)で差があることが報告されている。さらに、FK506, VD3, BMP2 が、ALP の発現および骨の石灰化を増強させることが明らかとなった。これらのことから、in vivo でもロット間の差が大きいかどうか、あるいは薬剤における骨分化の影響があるかどうかを検討することが重要であると思われる。

2. 患者由来 iPS 細胞の樹立

今回患者由来の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞を樹立することに成功した。しかし、iPS 細胞様コロニーが多数見られるものの、増殖および未分化能維持が乏しい結果が示された。また、ALP 染色は今回作成した iPS 細胞ではすべて陰性であった。これらの結果は、ALP 染色が陽性反応を示す事が iPS 細胞の確認試験として用いられているが、今回の iPS 細胞は低ホスファターゼ症患者由来の細胞（先天的に ALP 遺伝子に変異しており、ALP の発現がみられない）から作製されたものであり、ALP の発現が iPS 細胞の増殖および未分化能の維持に重要な役割を果たしているかもしれない。今後、iPS 細胞の長期的な維持、および樹立までの増殖能の保持を経時的に検討していき、また、正常健康人から樹立した iPS 細胞の ALP をノックダウンすることによって、これらの機序を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

今回の検討では、uMSC が骨髄由来 MSC よりも接着能が高いが、遊走能や骨分化は変わらないことが明らかとなった。したがって、ALP 正常かつ HLA が一致した臍帯血移植を行った後に、同一ドナーからの uMSC を骨髄内に移植することで臨床効果が高くなる可能性が示唆された。今後、これらを明ら

かにするために in vivo での効果を検討する必要がある。また、疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功したことで、本疾患の障害部位である骨、中枢神経、肺などの細胞に分化させて、それぞれの機能解析を行い、病態解明を進めていくことが重要であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ogushi H, **Fukuda S**, Yamaguchi S. Therapy-related Ph + leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia *Pediatr Int.* 2013 Jun;55(3):e52-5.
- 2) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, **Fukuda S**, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 2013 Nov 25. doi:10.1136/archdischild-2013-305037.

2 . 学会発表 :

1) Taketani T, Mihara A, Oyama C, Tanabe Y, Kanai R, **Fukuda S**, Yamaguchi S, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improved Osteogenesis in Patients with severe Hypophosphatasia- Three case reports of MSC infusions followed by bone marrow transplantation-. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (President; Hank Kronenberg and Masaki Noda), Kobe, May 28-Jun 1, 2013

2) Taketani T, Hattori M, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H, Abe M, Hirade T, **Fukuda S**, Yamaguchi S. The functional analysis of TNSALP mutants in Hypophosphatasia with Japanese patients . 10th ALPS meeting(president Hieo Orimo), Tokyo, July 27, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

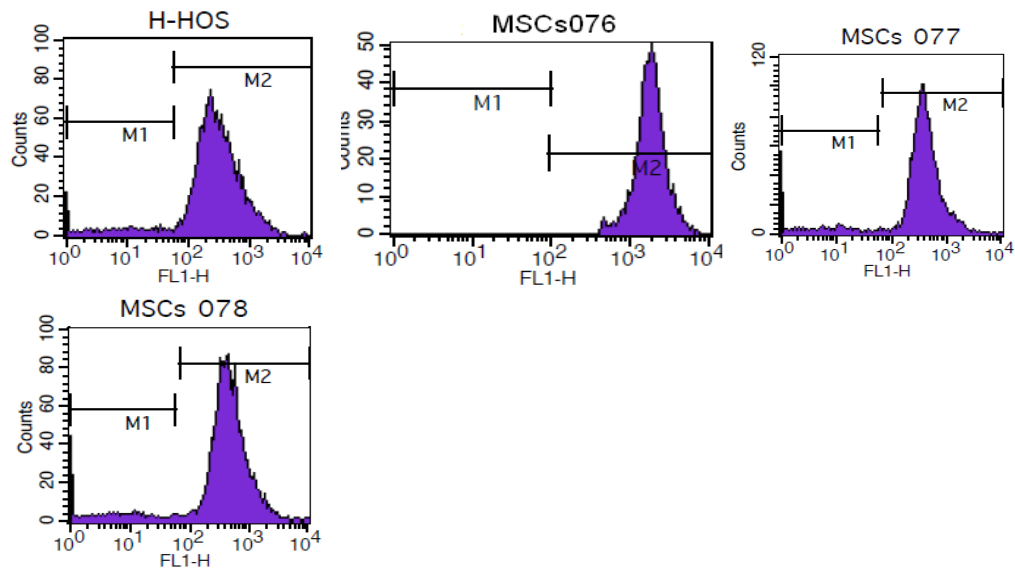
1 . 特許所得 : なし

2 . 実用新案登録 : なし

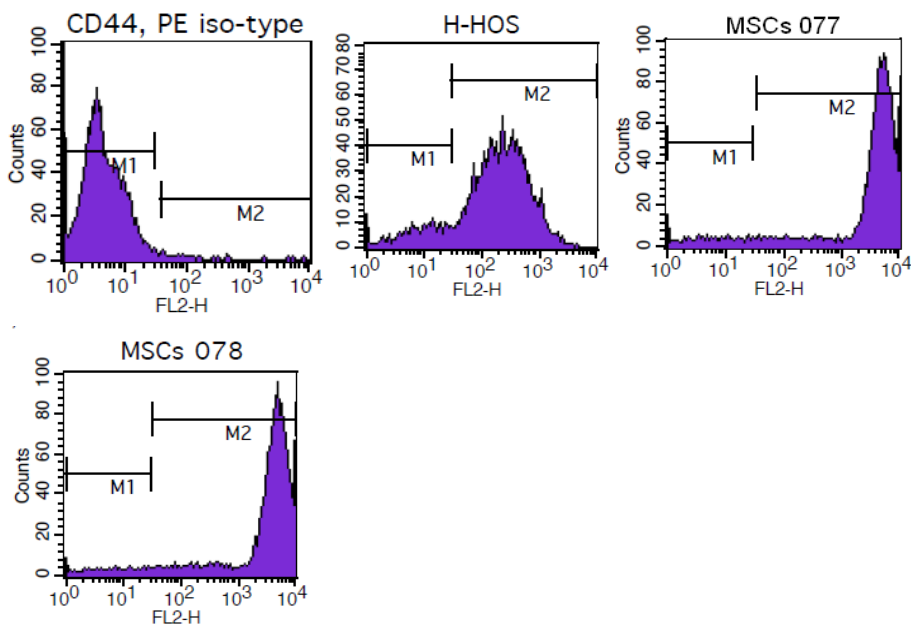
3 . その他 : なし

図 1. 臍帯由来間葉系幹細胞の発現解析

A. ALP の発現



B. CD44 の発現



M1:死細胞または未発現領域 M2:抗体発現領域

図 2. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 免疫染色

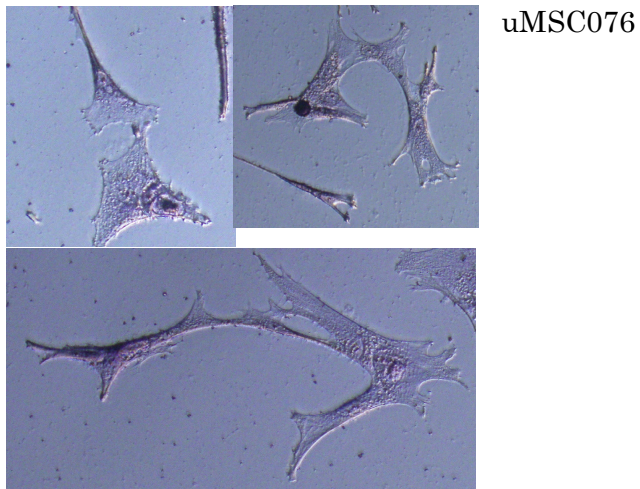
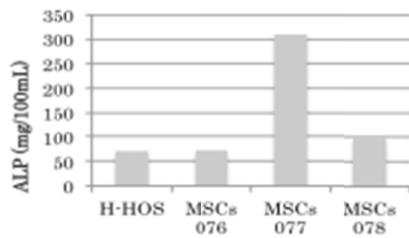


図 3. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 活性

A. ロット別



B. 骨分化誘導後の ALP 活性測定

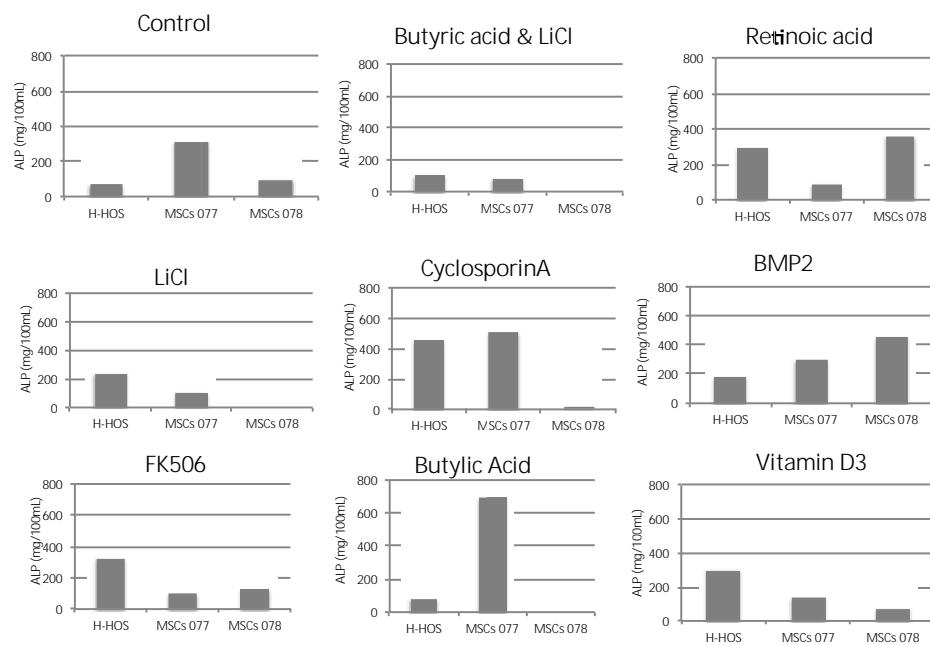


図 4. 臍帯由来間葉系幹細胞の骨分化誘導のカルセリンによる石灰化

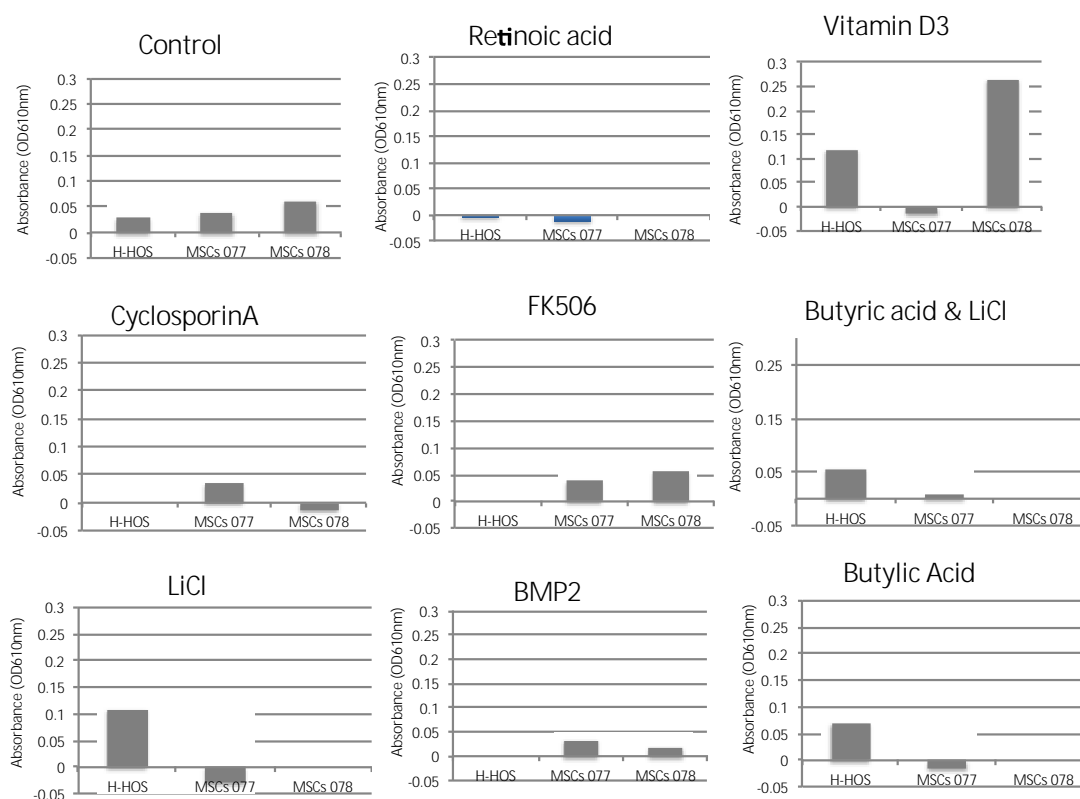
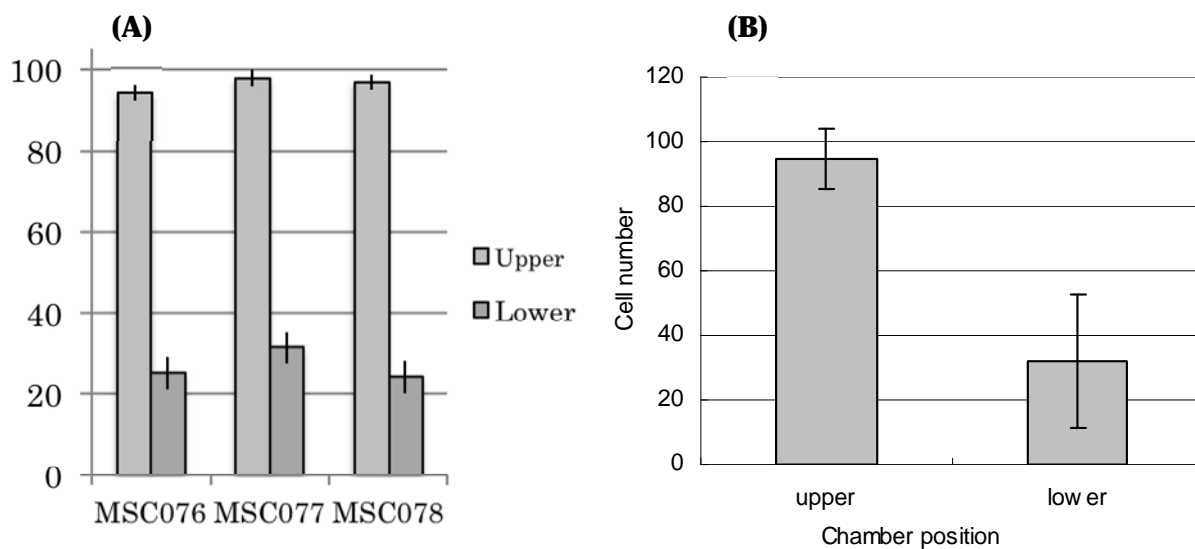


図 5. 遊走能



(A)uMSC のロット別遊走能の比較。ボイデンチャンバーを用いて Upper chamber position および Lower chamber position の細胞数をカウントした。

(B)骨髄由来 MSC の遊走能の比較。uMSC 同様、各 chamber position でセルカウントした。細胞数は百分率で示し、 1×10^5 cells/mL でセットした細胞を 100 とした。

図 6. 選別した iPS 細胞クローンの顕微鏡写真(40 倍)

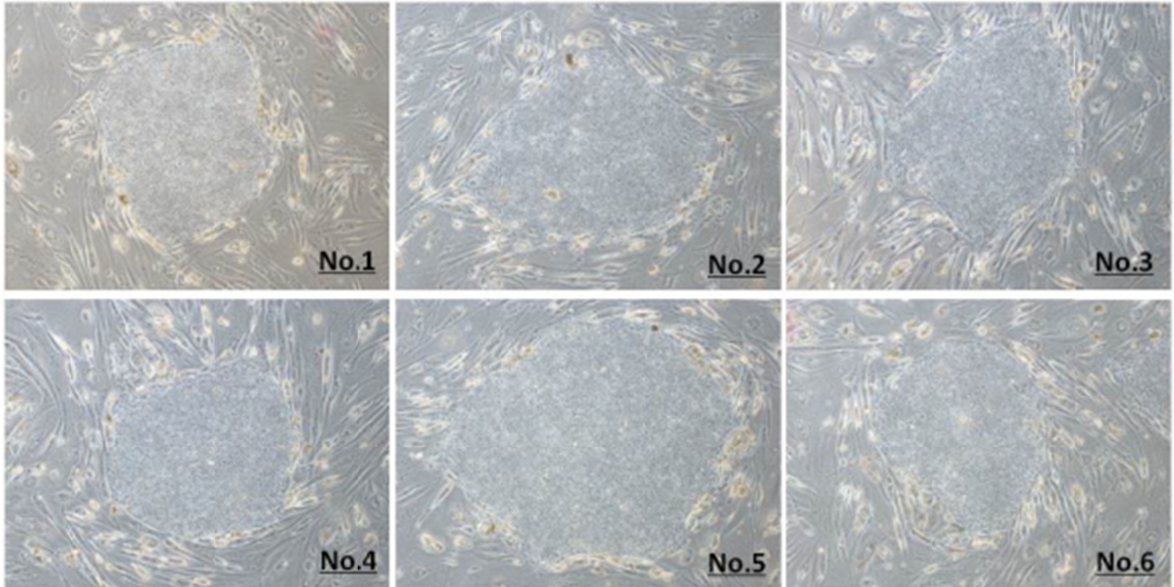
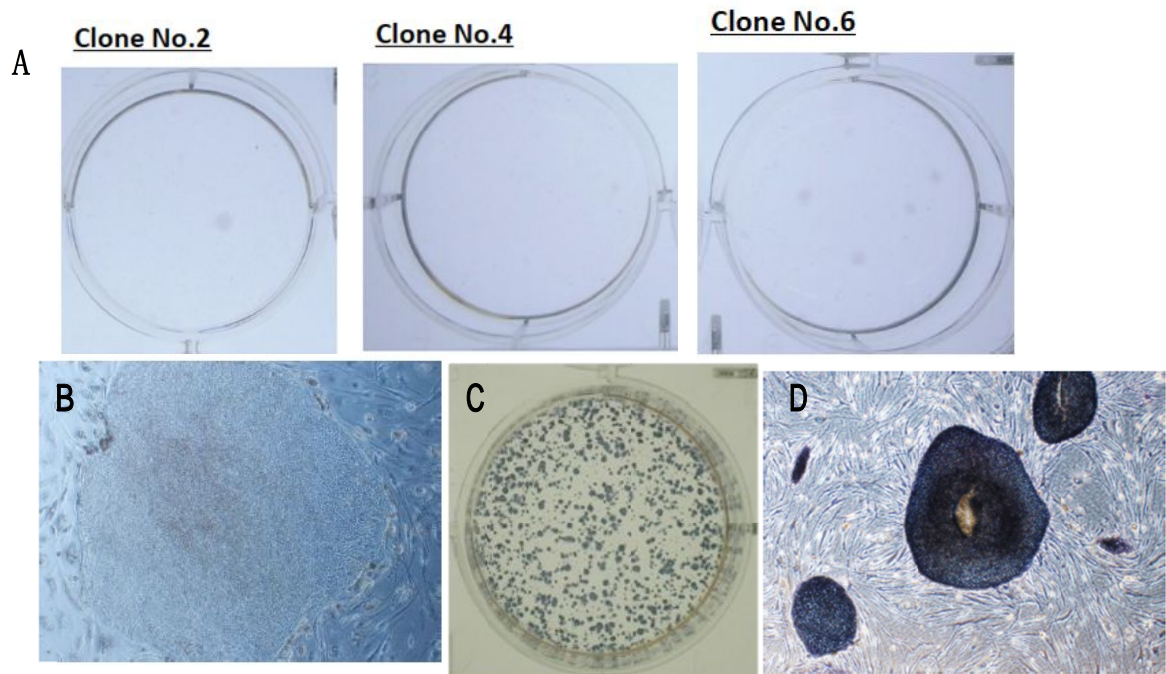


図 7. アルカリホスファターゼ染色



A: アルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

B: アルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(クローン No.6, 40 倍)

C: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

D: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(40 倍)

表 1 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数

Sample name	Ct 値	RNA copy No. (copies/mL)	RNA copy No.平均 (copies/mL)
All-in-One Vector	17.52	2.43×10^{10}	2.55×10^{10}
	17.38	2.67×10^{10}	
Non template control	34.91	検出限界以下	-
	35.43	検出限界以下	