

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。

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

この研究期間内に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移植後長期にわたり消失することを確認し、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、移植前にみられた頭蓋骨の形成不全も改善し、この良好な石灰化も移植後持続していた。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、継時的な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した。

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)、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 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 の移植前のレントゲンの像を図 1 に示す。これに見られるように長骨の両端には骨形成不全の像がみられる。これはビタミン D の不足によって生じる、くる病の変化と類似であり、膝関節での脛骨の下端と大腿骨の上端に凹状のレントゲン透過像（キャッピング）として見られる。

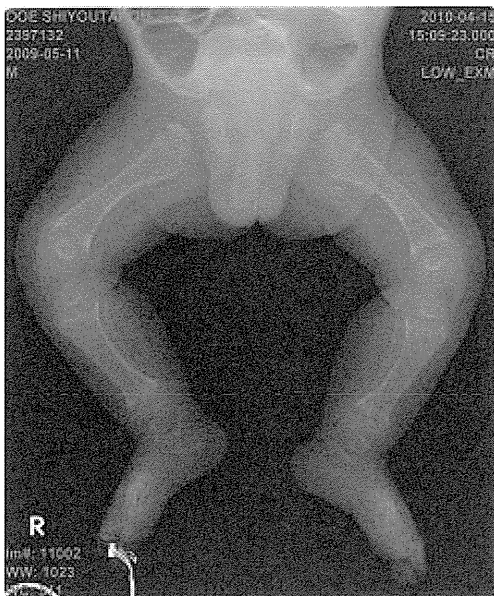


図 1. 症例 1 の移植前のレントゲン

このキャッピングは間葉系幹細胞移植後に消失し、骨端部での骨形成不全は改善された。このキャッピングが再度あらわれることは無く、症例 1 の患者の 4 才 6 ヶ月の時点でのレントゲン像(図 2)でも、この消失は長期にわたり確認できた。しかし、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。

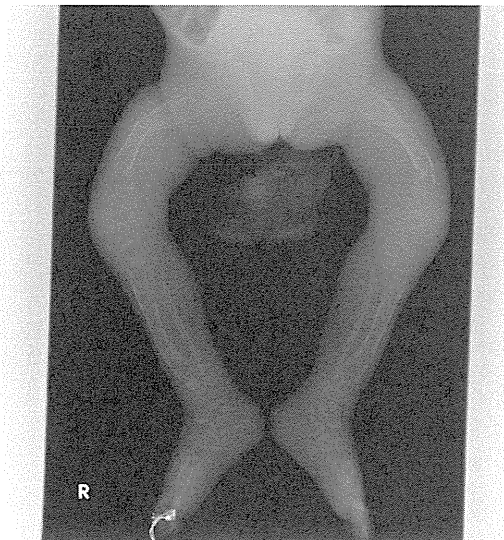


図 2. 症例 1 の 4 才 6 ヶ月でのレントゲン像

症例 1 の移植前の CT 像を図 3 に示す。この像に見られるように、レントゲンでみられた骨端部の骨形成不全が CT 像でもみられる。また、この CT では頭蓋骨の顕著な骨形成不全がみられ、頭蓋骨に著名な骨透過像が見られる。これらの骨形成不全は移植により改善される。図 4 に見られるように、移植後 1 年で、頭蓋骨はほぼ正常の骨にまで回復している。また、骨端部の骨形成も改善した。これらの骨形成の改善は引きつづき確認でき、患者の 4 才 6 ヶ月の時点での CT 像 (図 5) においても見られる。しかし、骨強度の改善は不完全であり、レントゲン (図 2) にみられる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。

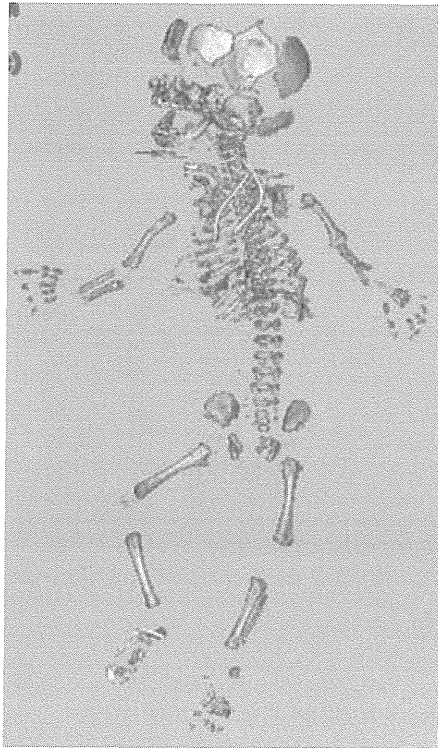


図 3. 症例 1 の移植前の CT 像



図 4 症例 1 の移植後 1 年の CT

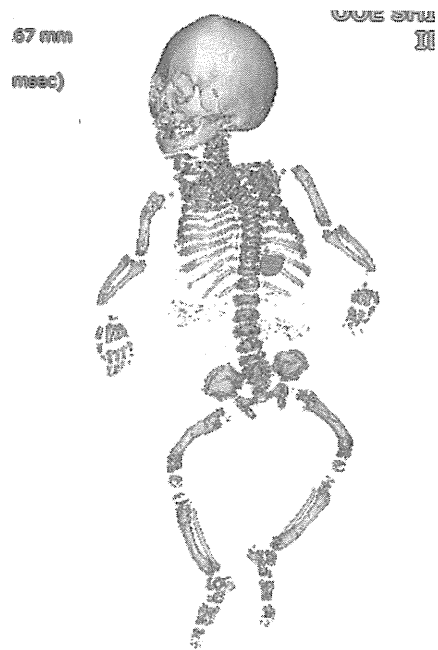


図 5. 症例 1 の 4 才 6 ヶ月での CT 像

以上より、症例 1 では移植による骨形成の促進、特に頭蓋骨や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、長管骨の皮質骨部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と思われる。

症例 2 においては、症例 1 のレントゲン像にみられるような移植前の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 (図 6)。この非石灰化骨端線は移植後に改善し、長期 (2 才の時点) でも改善していた (図 7)。CT の画像でも同様の所見を得た (図 8)。しかし、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。

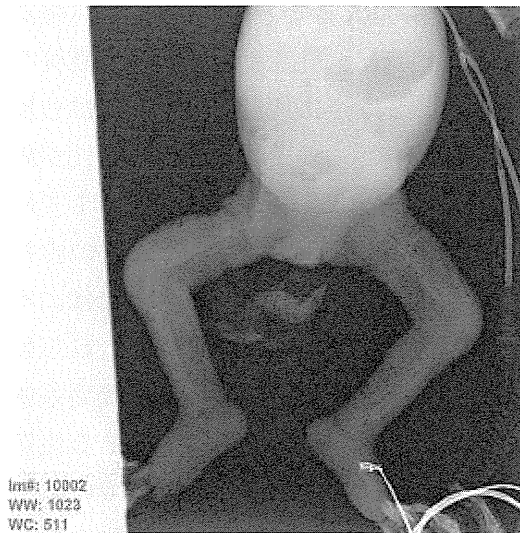


図 6 症例 2 の 1 歳のレントゲン像



図 7. 症例 2 の 2 才でのレントゲン像

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。

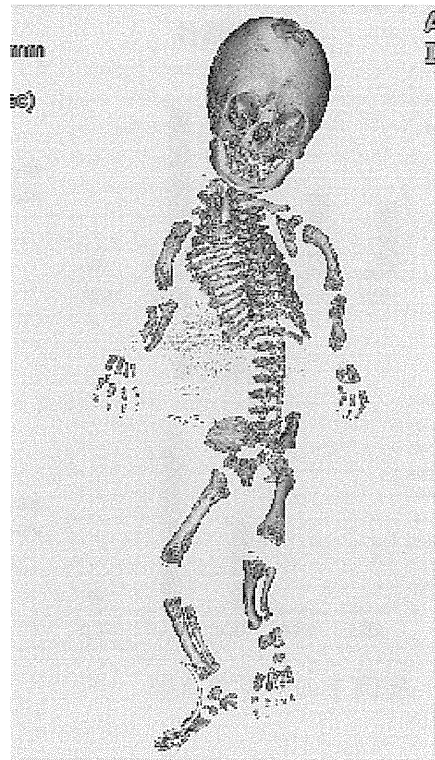


図 8. 症例 2 の 2 才での CT 像

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おこなった。

図 9,10 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。

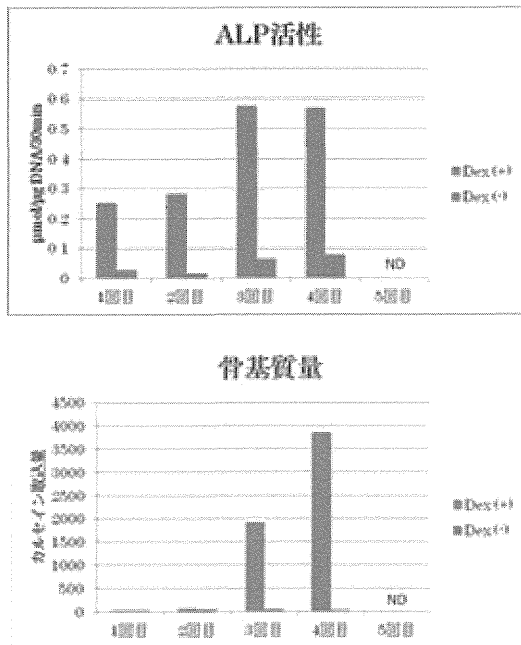


図 9. 症例 1 の骨形成比較

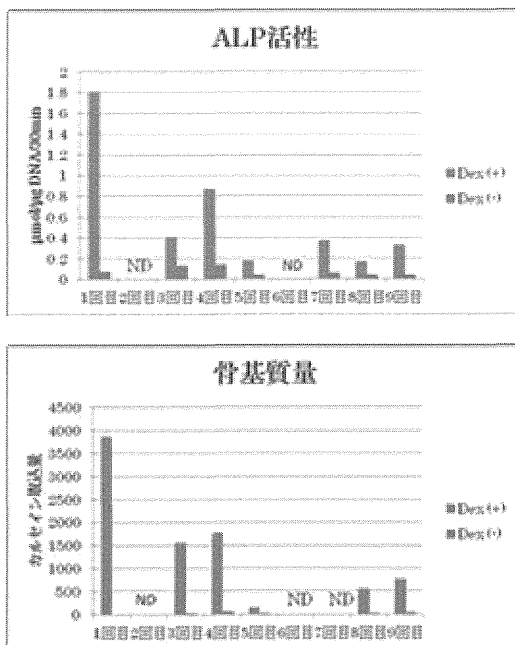


図 10. 症例 2 の骨形成比較

D. 考察

この研究において、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

この研究期間におけるレントゲンと CT 像の継時的な画像比較で、間葉系幹細胞の移植後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。また、移植された間葉系幹細胞が骨形成分化能を有していたことも確認できた。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

(巻末に別記載)

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 23-25 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

-キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性、疾患特異的 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

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して、骨の石灰化を回復させる骨再生医療である。間葉系幹細胞の効果を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、*TNSALP* 遺伝子変異解析および疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。さらに、間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。キメリズム解析において、ドナー由来間葉系幹細胞が頻度は少ないが生着していることを証明できた。生着率が低い理由として、間葉系幹細胞の遊走能や生着能が低いことが考えられた。また、この病態に関して、間葉系幹細胞および骨芽細胞の遺伝子発現について、健康人と患者で異なる遺伝子発現パターンを示す遺伝子群は、骨代謝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、中枢神経系や肺の形成に関わる遺伝子も変動していた。*TNSALP* 遺伝子変異解析では、疾患の重症度と ALP 活性が比例することが明らかとなった。患者の皮膚線維芽細胞に 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化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。さらに、間葉系幹細胞移植の効果を高めるために、骨髄および臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。臍帯由来間葉系幹細胞は、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。

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、臨床効果が不十分である。また、この疾患は骨以外に中枢神経系や肺などにも合併症を引き起こす。したがって、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、ドナー由来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疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。さらに、ドナーは *TNSALP* 遺伝子異常を有する保因者であるため、*TNSALP* 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。したがって、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ため、臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討した。

B. 研究方法

1. キメリズム解析

移植前後に患者から造血細胞および骨髄からフローサイトメトリー (FCM) で単離した間葉系幹細胞の由来（ドナー由来、レシピエント由来）を検討するために、個人識別マーカである short tandem repeat を増幅させ、シーケンス解析で塩基配列を決定した。また、ALP 遺伝子変異の有無を調べた。

2. 病態解明

Microarray 法を用いて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の網羅的遺伝子発現を解析した。また、*TNSALP* 遺伝子変異体を作成して、ALP 活性、ドミナントネガティブ効果、骨の石灰

化能を検討した。さらに、患者線維芽細胞に5つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28）を導入してiPS細胞の樹立を試みた。

3. 間葉系幹細胞の細胞特性

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。

また、臍帯由来間葉系幹細胞のALP活性、骨石灰化能および遊走能を検討した。

（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。また、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. 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。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。

2症例ともに、骨髄中のドナー由来間葉系幹細胞が少ないことが予想されたため、骨髄からFCMで単離した間葉系幹細胞のキメリズム解析を行った。単離した間葉系幹細胞数が少なかったため、short tandem repeatの増幅が困難であった。したがって、*TNSALP*遺伝子変異を調べたところ、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)。

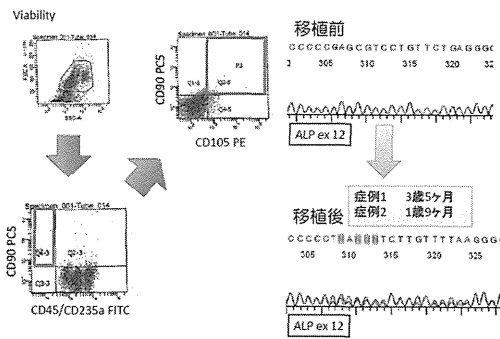


図 1. 間葉系幹細胞のキメリズム解析

2. 病態解明

1) 網羅的遺伝子解析

間葉系幹細胞に関して、正常健康人と骨髄提供者（保因者）の遺伝子発現に大きな差は認めなかったが、骨芽細胞においては、正常健康人と骨髄提供者（保因者）の遺伝子発現に大きな開きがあった（図 2）。移植細胞は間葉系幹細胞であるが、その細胞が骨芽細胞に分化して石灰化に貢献することを想定している。保因者であっても臨床的に骨の石灰化は問題ないことから、個々の遺伝子において、詳細な検討を行った。

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。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。

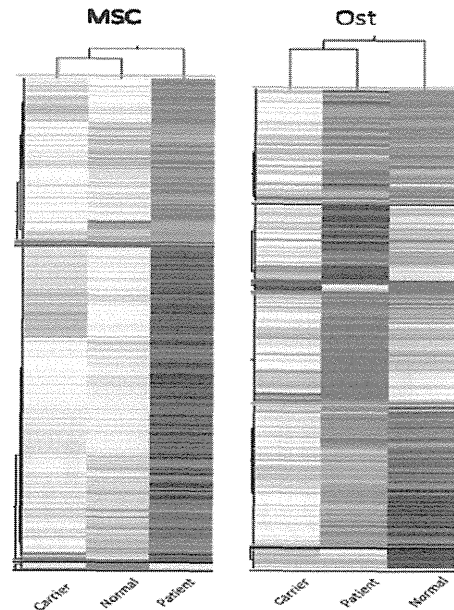


図 2. クラスタ解析ヒートマップ図

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。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。

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)

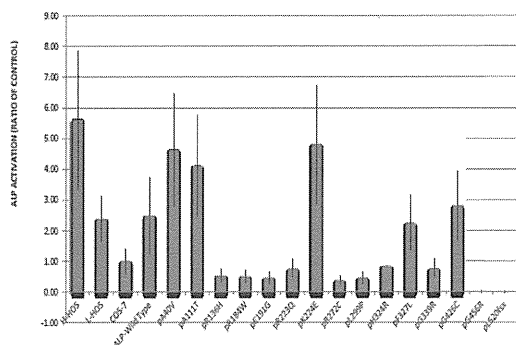


図 3. TNSALP 変異体の ALP 活性

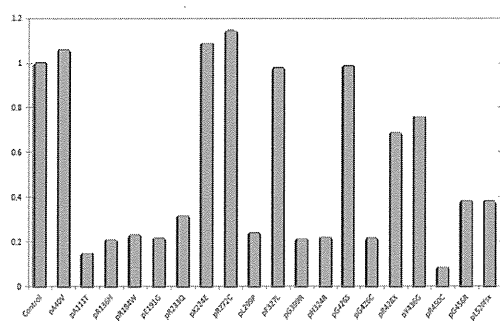


図 4. TNSALP 変異体の dominant

negative 効果

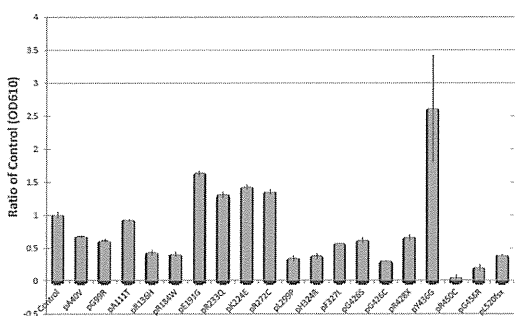


図 5. TNSALP 変異体の石灰化能

3) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

5 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28) を患者由来皮膚線維芽細胞に導入した結果、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が、クローン No.6 のみ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 (図 6)。しかし、iPS 細

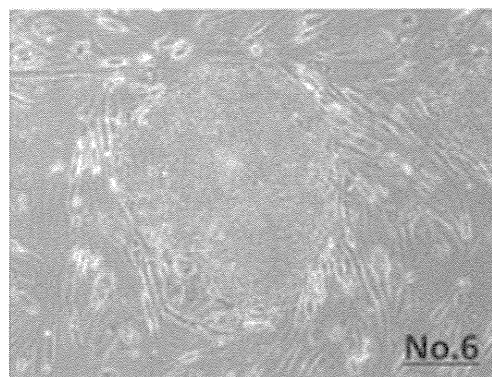


図 6. iPS 細胞クローンの顕微鏡写真(40倍) 胞様の外観を示しているにも関わらず、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。なお、ALP 染色において、呈色反応が確認できず陰性を確認した (図 7)。

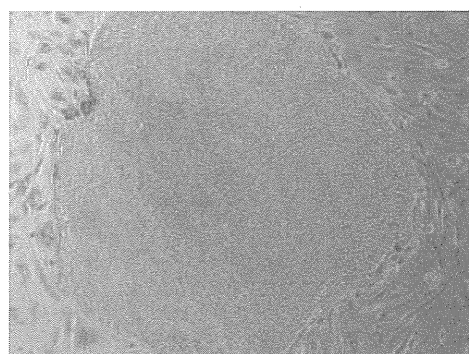


図 7. iPS 細胞の ALP 染色(40倍)

3. 間葉系幹細胞の細胞特性

1) 細胞剥離剤の検討

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

トリプシンに比べて、試薬 A で細胞を剥離した場合、細胞の遊走能が改善した (図 8)。

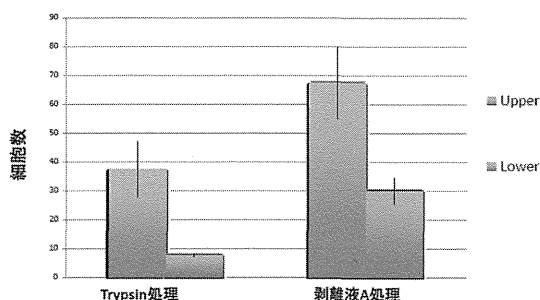


図 8.細胞剥離液の違いによる遊走能の変化

2) 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

ALP 発現は骨髄由来間葉系幹細胞と同程度であった。しかし、CD44 の発現は骨髄由来よりも発現レベルが高かった。

骨分化能に関して、基礎培地で臍帯由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞のように骨芽細胞に分化し、石灰化能および ALP 活性を認めた (図 9)。しかし、ロット間の差が認められた。(図 9)。

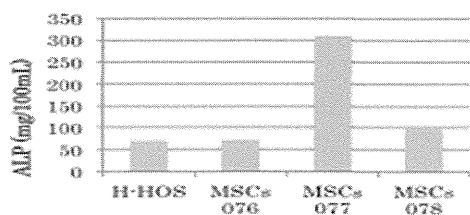


図 9. 骨分化後の ALP 活性

また、臍帯由来と骨髄由来の間葉系幹細胞の遊走能の違いはみられなかった。

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、FCM により骨髓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ら、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、骨の石灰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. 病態解明

1) 網羅的遺伝子発現

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）の機序が明らかにな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。

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) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

今回患者由来の皮膚線維芽細胞から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遺伝子の変異しており、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。

3. 間葉系幹細胞の細胞特性

1) 細胞剥離剤の検討

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

る、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。

2) 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

骨分化や遊走能において、骨髄由来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 の発現量が高いことから、*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、臍帯由来間葉系幹細胞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、骨髄由来間葉系幹細胞もロット間（個人間）で差があることが報告されている。*in vivo* でもロット間の差が大きいかどうかを検討することが重要であると思われた。

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。疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功したことで、今後、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。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。臍帯由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の細胞特性（ALP 活性、骨分化能、遊走能）に大きな違いは認められなかった。また、培養した間葉系幹細胞は剥離液を変えた程度では細胞特性も大きな違いはでない。この疾患の根治療法を目指すためにも、骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果の優れた間葉系幹細胞の樹立が不可欠であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(巻末に別記載)

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

III. 研究発表

論文

平成 23 年度

1. Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, Kubo Y, Hattori K, Saito S, Horimoto K, Yuba S, Ohgushi H. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 285: 29270-29278, 2010
2. Kihara T, Haghparast SM, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J. Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 1-6, 2011
3. Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, Ohgushi H, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. *J Tissue Eng Regen Med* 10: 798-805, 2011
4. Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H. 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* (doi:10.1002/term.427), 2011
5. Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. *Hum Cell* 24: 2-8, 2011
6. Oliveira JM, Sousa RA, Malafaya PB, Silva SS, Kotobuki N, Hirose M, Ohgushi H, Mano JF, Reis RL. In vivo study of dendronlike nanoparticles for stem cells "tune-up": from nano to tissues. *Nanomedicine* 7: 914-924, 2011
7. 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* (doi: 10.1002/term.401), 2011
8. Hagiwara Y, Hattori K, Aoki T, Ohgushi H, Ito H. Autofluorescence assessment of extracellular matrices of a cartilage-like tissue construct using a fluorescent image analyser. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 163-168, 2011
9. Matsumoto T, Hattori K, Matsushima A, Tadokoro M, Yagyuu T, Kodama M, Sato J, Ohgushi H. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells on expanded polytetrafluoroethylene

- coated with both a poly-amino-acid urethane copolymer and collagen. *Tissue Eng Part A* 17: 171-180, 2011
10. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 146-150, 2011
 11. Shimizu Y, Kihara T, Haghparast SM, Yuba S, Miyake J. Simple display system of mechanical properties of cells and their dispersion. *PLoS One* 7: e34305, 2012
 12. 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* 6(4): 261-271, 2012
 13. 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* 6(4): 253-260, 2012
 14. 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* 6(2): 96-102, 2012
 15. 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* 6(7): 550-558, 2012
 16. 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* 13(5): 5528-5541, 2012

平成 24 年度