

17. 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* (doi: 10.1002/term.1674), 2012

平成 25 年度

18. Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J. Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells. *J Biosci Bioeng* 116(3): 380-385, 2013
19. 弓場俊輔, 竹谷健. 間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療. *血液フロンティア* 23: 487-493, 2013
20. Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ohgushi H, Fukuda S, Yamaguchi S. Therapy-related Ph+ Leukemia after both BMT and MSCT for Hypophosphatasia. *Pediatr Int* 55: e52-55, 2013
21. Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child* (doi:10.1136/archdischild-2013-305037), 2013
22. 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* 101(12): 3571-3579, 2013
23. 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*. 438(4): 753-759, 2013
24. 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* 7(1): 51-60, 2013
25. Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 14(2): 197-208, 2014
26. 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，社団法人
日本整形外科学会，pp1-52, 2013

学会発表

平成 23 年度

1. 大串 始. 整形外科における再生医療（骨・関節疾患－重度先天性骨代謝疾患治療）. 第 13 回なにわ整形外科研究会, 大阪, 2011 年 1 月 29 日
2. 大串 始. バイオマテリアル上での幹細胞の増殖と分化. 大阪市立大学重点研究「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第一回シンポジウム, 大阪, 2011 年 2 月 14 日
3. 大串 始. 骨・関節の再生テクノロジー（体性幹細胞を用いての臨床から iPS 細胞まで）. 第 17 回青森県骨軟骨シンポジウム, 青森, 2011 年 3 月 4 日
4. 竹谷健. 低ホスファターゼ症に対する同種骨髄移植併用間葉系幹細胞移植. 第 59 回日本輸血・細胞治療学会, 東京, 2011 年 4 月 14-16 日
5. 廣田篤史, 奈良昇之助, 竹田知洋, 久枝義也, 天方秀輔, 櫻井裕子, 中尾厚, 川上義, 竹谷健. 低フォスファターゼ症に対する間葉系幹細胞移植. 第 21 回城南新生児・未熟児研究会, 東京, 2011 年 5 月
6. 小山千草, 竹谷健, 三原綾, 高野勉, 美根潤, 山口清次. 骨髄移植と間葉系幹細胞移植を併用して治療した周産期型低ホスファターゼ症の 2 例. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 札幌, 2011 年 7 月 10-12 日
7. 竹谷健. 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. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011 年 7 月 28-30 日
8. 大串 始. 骨再生医療の現況と展望. 第 29 回骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011 年 7 月 28-30 日
 9. 竹谷健, 金井理恵, 小山千草, 安部真理子, 斎藤敦郎, 鬼形和道, 福田誠司, 山口清次, 三原綾, 勝部好裕, 大西弘恵, 小田泰昭, 田所美香, 服部耕治, 弓場俊輔, 大串始. 低ホスファターゼ症に対する骨髄移植を併用した間葉系幹細胞移植治療の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011 年 11 月 25-27 日
 10. 大串 始. 幹細胞を用いた骨再生医療. 骨粗鬆症財団主催 第 57 回教育ゼミナール講演, 東京, 2011 年 12 月 2 日
 11. 大串 始. 骨・関節領域における再生医療の現況. 技術情報協会主催 「実用化に向けた骨・関節領域における再生医療の現況と展望」研修会（招待講演）, 東京, 2011 年 12 月 21 日
 12. 大串 始. 間葉系幹細胞を用いた再生医療の動向. 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」（シンポジスト）, 尼崎, 2012 年 2 月 15 日
 13. 大串 始. 関節疾患再生医療の現況. 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」（招待講演）, 東京, 2012 年 3 月 28 日

平成 24 年度

14. Taketani T, Onigata K, Kanai R, Kobayashi H, Mushimoto Y, Mihara A, Oyama C, Fukuda S, Yamaguchi S . Clinicogenetical Characteristics of Japanese patients with Hypophosphatasia. the 6th International Alkaline Phosphatase Symposium, Huningue, France, May 16-19, 2012
15. 竹谷健. 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. 第11回日本再生医療学会, 横浜, 2012年6月12-14日
16. 大串 始. (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: 再生医療におけるアログラフト. 第11回日本再生医療学会, 横浜, 2012年6月12-14日
17. 竹谷健. 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. 第88回幹細胞研究会, 広島市, 2012年9月12日
18. Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, Taketani T. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering: Transplantation of Allogeneic MSCs for Treatment of Hypophosphatasia Patients. (Invited speaker), Term Stem 2012, Guimaraes, Portugal, October 9-12, 2012
19. Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, Taketani T. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering: -Tissue engineering approaches for total ankle joints and for treatment of genetic disease-. (Invited speaker) Siriraj Orthopaedic Alumini Society. Bangkok, Thailand, October 19, 2012
20. 大串 始, 勝部好裕, 田所美香, 弓場俊輔, 竹谷 健. 骨形成研究の種々アプローチとその臨床応用. 第27回日本整形外科基礎学術集会 骨形成シンポジウム (シンポジスト), 名古屋, 2012年10月25日
21. 田部有香, 竹谷健, 柴田直昭, 山口清次. 周産期型低フォ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: 3例の経験. 第57回日本未熟児新生児学会, 熊本, 2012年11月25-27日
22. 竹谷健. 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. 第10回日本胎児治療学会・第5回胎児骨系統疾患フォーラム, 仙台, 2012年11月30日-12月2日
23. 大串 始. 再生医療技術と工学技術の融合. 第25回バイオエンジニアリング講演会 (特別講演), つくば, 2013年1月9日
24. 大串始. 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. 奈良県立医科大学特別講演, 橿原, 2013年1月10日
25. 大串始. 間葉系幹細胞を用いた再生医療の実. 近畿大学医学会学術講演

- (招待講演), 大阪狭山, 2013 年 1 月 30 日
26. 小田泰昭, 田所美香, 勝部好裕, 大串始, 竹谷健, 弓場俊輔. 低フォスファターゼ疾患患者 iPS 細胞樹立. 第 12 回再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
 27. 竹谷健, 弓場俊輔, 大串始. (パネルディスカッション) 幹細胞療法の可能性: 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. 第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
 28. 上山善弘, 柳生貴裕, 前田雅彦, 大串始, 桐田忠昭. 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. 第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
 29. 前田雅彦, 大串始, 桐田忠昭. 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. 第 12 回再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
 30. 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. 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. 第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
 31. 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. 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. 第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日
- 平成 25 年度
32. 大串始, 弓場俊輔, 竹谷健. (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. 第 86 回日本整形外科学会総会, 広島, 2013 年 5 月 23 日
 33. 川手 健二, 矢島弘嗣, 大串始, 田中康仁, 高倉義典. 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. 第 86 回日本整形外科学会総会, 広島, 2013 年 5 月 23 日
 34. 大串始, 弓場俊輔, 竹谷健. 同種間葉系幹細胞を用いた骨再生治療. 第 86 回日本整形外科学会, 広島, 2013 年 5 月 23-26 日
 35. 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, Kobe, May 28-Jun 1, 2013
36. 大串始. 再生医療とは？体性幹細胞～iPS細胞. 奈良県立医科大学特別講演（生化学教室主催），橿原，2013年6月13日
 37. 竹谷健. 再生医療の夜明け - 再生医療の現状と待ち望まれる臨床応用 - . 島根県保険医協会/出雲支部・第53回勉強会，出雲，2013年7月2日
 38. 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, Tokyo, July 27, 2013
 39. 弓場俊輔. 先天性骨代謝疾患に対する間葉系幹細胞治療. BioJapan2013, 横浜，2013年10月9-11日
 40. 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. 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. 第28回整形外科基礎学術集会，千葉，2013年10月17日
 41. 大串始. 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. 第22回泉大津市医師会病診連携懇話会（招待講演），泉大津市，2013年10月19日
 42. 弓場俊輔. 先天性骨代謝疾患に対する間葉系幹細胞治療. 産総研オープンラボ，2013年10月31日-11月1日
 43. 竹谷健，金井理恵，三原綾，小山千草，田部有香，山本慧，山口清次，勝部好裕，笹尾真理，弓場俊輔，大串始. 低フォスファターゼ症2例に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植. 第36回日本造血細胞移植学会，沖縄，2014年3月7-9日

Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名		書籍名	出版会社	ページ	出版年
竹谷健	低フォスファターゼ症	先天性代謝異常ハンドブック	中山書店	412-413	2013
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	エヌ・ディー・エヌ	217-226	2013
大串始	再生医療技術の実用化における環境整備	Web Journal	アクトライム	7-10	2013

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
竹谷健、鬼形和道、小林弘典、山口清次	日本における低ホスファターゼ症の臨床像.	ホルモンと臨床	58	1091-1095	2011
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
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		doi: 10.1002/term.460	2011
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
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

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
Ohnishi H, Yuba S, Ohgushi H	Forced Expression of Transcription Factors in Human Mesenchymal Cells to Promote Proliferation and Osteogenic Differentiation.	Bioceramics Development and Applications	1	doi:10.4303/bda/D110166	2011
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
大串 始、有馬靖佳、竹谷健	間葉系幹細胞研究（臨床研究からみた同種間葉系幹細胞移植）	日本臨床	69	2121-2127	2011
Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori H, Yuba S	A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	JTissue Eng Regen Med	6	261-267	2012
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
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	6	253-260	2012
Ogawa M, Tohma Y, Ohgushi H, Takakura Y, Tanaka Y.	Early Fixation of Cobalt-Chromium Based Alloy Surgical Implants to Bone Using a Tissue-engineering Approach	Inn J Mol Sci	13	5528-5541	2012
弓場俊輔、竹谷健	間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療	血液フロンティア	23	487-493	2013
Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ohgushi H, Fukuda S, Yamaguchi S	Therapy-related Ph ⁺ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia	Pediatr Int	55	e52-55	2013
Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S	Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients	Arch Dis Child		doi: 10.1136/archdisc hild-2013-305037	2013

Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J.	Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells	J Biosci Bioeng	116	380-385	2013
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	101	3571-35 79	2013
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.	438	753-759	2013
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.	7	51-60	2013
Ohgushi H	Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering	Expert Opin Biol Ther.	14	197-208	2014

低フォスファターゼ症

SUMMARY

低フォスファターゼ症は、組織非特異的アルカリフォスファターゼ (TNSALP) 遺伝子変異により ALP 活性が低下して骨の石灰化障害をきたす疾患である。

骨の石灰化に必要なヒドロキシアパタイト結晶は、カルシウムと無機リン酸などから形成される。その構成成分である無機リンは、ALP がピロリン酸を加水分解することにより産生される。また、ピロリン酸は無機リンに拮抗してヒドロキシアパタイト結晶の形成を阻害する。すなわち、本疾患は ALP 活性が低下していることにより、ピロリン酸から無機リンへの合成が阻害され、ピロリン酸が蓄積するためにヒドロキシアパタイト結晶の形成が障害され、骨の石灰化が起こらなくなる (図 1)。

臨床症状は発症時期により重症度が異なっており、一般的に周産期に発症した場合は致死的な経過をとり、生後 6 か月以降に発症する場合は生命予後は良好であるが、低身長や乳歯の早期脱落などをきたす。血清 ALP の低値で診断され、ほとんどの症例が常染色体劣性遺伝形式をとり、遺伝子型と表現型との間に関連がある。確立した治療法はないが、酵素補充療法や間葉系幹細胞移植などの臨床研究が進んでいる。

代謝障害と病態

骨の石灰化は、骨芽細胞と軟骨細胞由来の基質小胞で始まる。この基質小胞の中に含まれるカルシウムと無機リン酸が最初に形成されるヒドロキシアパタイト結晶の構成成分である。この結晶が細胞外に放出されて、コラーゲンやオステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチンなどのタンパク質とリン酸カルシウムが結合して骨が形成される。しかし、細胞外に存在するピロリン酸は無機リンに拮抗してヒドロキシ

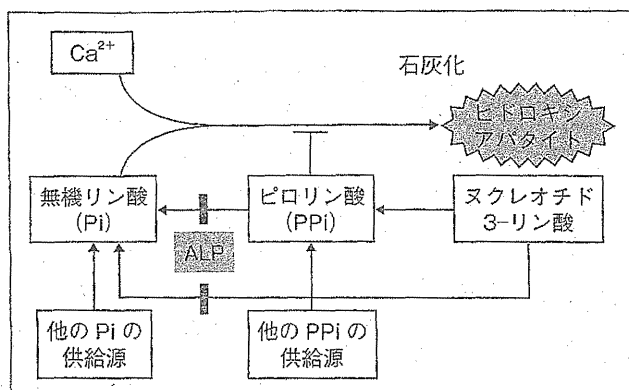


図 1 石灰化の機序

アパタイトの結晶形成を阻害する (図 1)。すなわち、正常の石灰化には無機リンとピロリン酸のバランスが保たれていることが必要である。

この無機リンとピロリン酸を調節する因子として、ALP, plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1), ankylosis (ANK), osteopontin (OPN) などがある。ALP は基質小胞や骨芽細胞膜に存在してピロリン酸を加水分解して無機リンを増加させる。PC-1 は基質小胞や骨芽細胞膜に存在してヌクレオチド 3-リン酸からピロリン酸を産生する。ANK は、骨芽細胞膜に存在してピロリン酸を細胞内から細胞外に運び出す無機リン酸トランスポーターである。OPN はヒドロキシアパタイト結晶の形成を阻害する。このように、ALP は石灰化を促進し、PC-1, ANK, OPN は石灰化を抑制する。

臨床病型

低フォスファターゼ症は、多くは常染色体劣性遺伝形式をとるが、致死的でない軽症の場合、常染色体優性の遺伝形式を示す例もある。その障害部位は、主に骨と歯に症状が限定されている。

臨床症状は、胎内で死亡する重症から、成人してから発症するタイプまで、発症時期や重症度がさまざまである。同胞間でも異なった臨床像を示すことがあるが、発症年齢と臨床症状に基づいて、6 つの臨床型に分類される (表 1)。

表 1 低フォスファターゼ症の臨床病型

臨床型	遺伝形式	臨床像	歯の特徴
1. 周産期型 (致死型)	AR	呼吸障害, けいれん, 石灰化障害	—
2. 周産期型 (良性)	AD	長幹骨の変形, 骨折 出生後石灰化が改善	±
3. 乳児型	AR	体重増加不良, 高カルシウム血症, 石灰化障害, くる病様変化	早期脱落 (乳歯)
4. 小児型	AD AR	低身長, 歩行障害, 骨痛, 骨折, 骨幹端から骨幹に向かう舌状突出	早期脱落 (乳歯)
5. 成人型	AD AR	ストレス骨折 (中足骨), 偽骨折 (大腿骨), 軟骨石灰化症	±
6. 歯限局型	AD AR	早期脱落 (乳歯), う歯, 歯槽骨喪失, 歯髓腔の拡大	左に同じ

診断

①生化学検査：血清 ALP の低下は全例で認められる。臨床症状の重症度と血中 ALP 値には相関がみられる。乳児型では高 Ca 血症と高 Ca 尿症のみられることが多い。小児型と成人型において、無機リンはしばしば高値を示す。また、ALP の基質であるホスホエタノールアミンは高値を示す。これは、血中・尿中アミノ酸分析で調べることができるが、いくつかの骨代謝疾患でも上昇する。

②X線検査：臨床病型により骨・歯のX線所見は異なるが、石灰化障害、長幹骨の変形、骨幹端の不整、狭胸郭、骨幹端から骨幹に向うX線透過性の舌状突出、骨幹端の拡張、肋軟骨の念珠形成などが認められる (図 2)。

③遺伝子検査：ほとんどの患者 (95% 以上) で *TNSALP* 遺伝子変異が見つかった。遺伝子変異の集中している領域はなく、翻訳領域全領域にわたって変異が認められ、79% がミスセンス変異であり、常染色体劣性遺伝形式をとる重症型はホモ接合体よりも複合ヘテロ接合体の頻度が高い。TNSALP 変異タンパクの ALP 残存活性と臨床的重症度が相関する。日本人では、c1559delT と pPhe327Leu の 2 つの変異が多く認められるが、前者は周産期型 (致死型) と相関が高いのに対して、後者は周産期に発症するにも

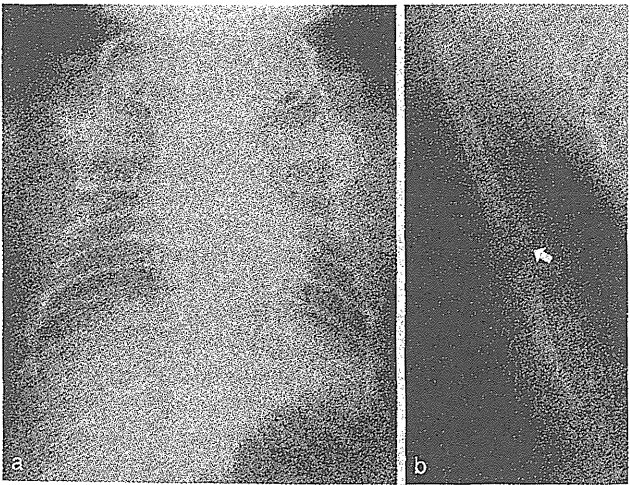


図 2 低フォスファターゼ症のX線写真
a: 胸部. 狭胸郭, 肋骨の菲薄化. b: 上腕骨. 矢印は、骨幹端から骨幹に向かうX線透過性の舌状突出を示す。

かかわらず致死的不是である。

治療

現在、これまで確立した根治療法はなく、対症療法が中心となる。しかし、最近、ALP を効率的に骨に到達させるために、アミノ酸を付加した酵素補充療法や骨芽細胞・軟骨に分化する間葉系幹細胞の移植治療の臨床研究が行われており、根治療法として期待されている。

予後

予後は病型によって異なる。周産期・乳児期に呼吸障害を認める例は致死的な経過をとるが、周産期発症でも呼吸障害がない場合は、生命予後は良好である。しかし、予後良好な乳児型や小児型も、乳歯が早期に脱落したり、低身長を合併するため、QOL は必ずしも良くない例が多い。

文献

1) Whyte MP. Ann N Y Acad Sci 2010 ; 1192 : 190-200.
2) Mornet E. Best Pract Res Clin Rheumatol 2008 ; 22 : 113-27.
3) 竹谷健ほか. 小児科 2009 ; 50 増刊 : 1169-76.
4) Whyte MP, et al. N Engl J Med 2012 ; 366 : 904-13.
5) Tadokoro M, et al. J Pediatr 2009 ; 154 : 924-30.

(竹谷 健)

第4節 間葉系幹細胞を用いた種々骨再生医療

大隈病院／独立行政法人産業技術総合研究所 大串 始 奈良県立医科大学 赤羽 学

1 はじめに

間葉系幹細胞は、英語では mesenchymal stem cell であり、頭文字を取って略語として MSC (複数形として MSCs) と表記される。数多く臨床応用されている間葉系幹細胞は骨髓から得られることが多い。骨髓には間質細胞 (stromal cell) が存在し、微少環境を構築して同じ骨髓に含まれる造血系細胞の維持・増殖をサポートしている。骨髓に存在する間葉系幹細胞は間質細胞に含まれると考えられる。間質細胞は英語では marrow stromal cell であり、略語として MSC と表記される。

このように、間葉系幹細胞も間質細胞も略語では同じ MSC となる。厳密には両者は区別されるべきかと思われるが、間質細胞は浮遊系の血液系細胞と異なり、培養により培養皿に接着する細胞である。この点に関して、本稿で述べる間葉系幹細胞は採取した骨髓を培養皿に静置し、培養皿に接着する細胞を増殖した細胞群である。すなわち、細胞のプレパレーションから見て、本稿における間葉系幹細胞 (MSC) は間質細胞と同義と捉えられる。なお、間葉系幹細胞には幹細胞としての言葉が付加されている。幹細胞とは、自己増殖能と種々の分化細胞への分化能である多分化能を有するとされている。間葉系幹細胞の分化能が限定的であることから、間葉系幹細胞と呼ばずに、間葉系細胞 (mesenchymal cell) と表現される場合もある。しかし、MSC が骨あるいは軟骨への分化能を持つのみならず、この 10 年ほどの研究により神経系の細胞や肝細胞などへ分化する能力を有することが報告されている。実際、筆者らも MSC がこれらの種々分化能力を持つこと報告し、MSC の多分化能を確証している。以上より、本稿では間葉系“幹”細胞 (MSC) という言葉を用い、筆者らの臨床応用に関する MSC 研究を最近の成果を踏まえて概説する。

2 間葉系幹細胞 (MSC) の骨分化能

MSC の骨・軟骨分化に関する研究はロシアの Friedenstein やイギリスの Owen 女史などの先駆的な業績がある¹⁾。これらの報告においては、細胞を保持する diffusion chamber という小さなチャンバーの中に MSC を密封し生体内へ移植する方法、あるいは腎臓の皮膜内へ MSC を移植する方法等を用いて、移植した部位での骨・軟骨の形成を組織学的に検証している。これらの研究により、間葉系幹細胞が生体内への移植により骨・軟骨への分化能を有することが実証された。しかし、臨床応用、特に整形外科や口腔外科領域における臨床応用を考えると、これらの方法論

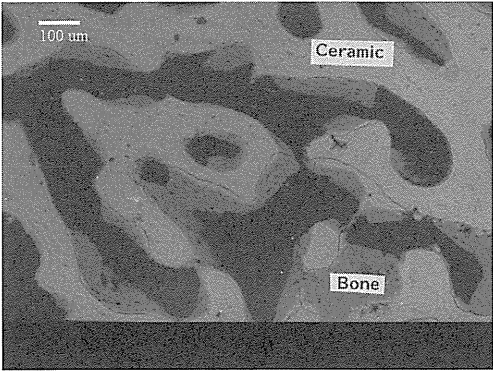


図1 ハイドロキシアパタイトセラミックとラット骨髄の複合体の皮下移植4週後の走査電顕像

白色のセラミック（Ceramic）に接して灰色の新生骨（Bone）が形成される。文献4）の図より許可を得て転載

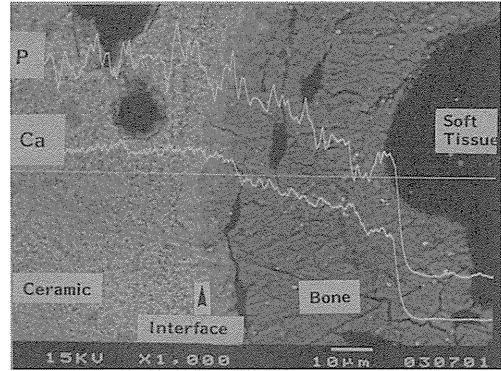


図2 図1の拡大像

セラミック（Ceramic）と新生骨（Bone）の界面（Interface）には軟部組織（Soft tissue）の介在は見られず、セラミックと骨が直接接している。このことは、界面でカルシウム（Ca）とリン（P）の高いカウントが連続していることから確認できる。文献4）の図より許可を得て転載

を用いることはできない。筆者らは1989年に、当時すでに臨床応用されていたリン酸カルシウムセラミックを細胞担体として用いることに注目した。骨髄細胞を個々の細胞にまで分散、あるいは骨髄からMSCを増殖した後にこのセラミック担体と複合化し、既存の骨のない皮下という移植しやすい部位に移植した。結果として、効率良くセラミック内に新生骨形成を検出することができ、骨髄細胞そのものやMSCが生体内への移植により骨分化能を有することを証明した⁴⁾（図1，2）。用いた担体が臨床応用されている生体適合性材料であり、また骨髄組織でなく、分離した骨髄細胞や骨髄由来MSCを用いて新生骨形成能を証明したことは、細胞レベルでの骨形成が可能であることを実証し、MSCを用いる骨再生治療へ向けての飛躍を示したと自負している。実際、その後の筆者らの研究を踏まえて、後述のように2000年に世界に先駆けて間葉系幹細胞が組み込まれたセラミック人工関節による関節症の治療が行われた³⁾。

3 MSCを用いた種々骨再生治療の方法論（生体材料の視点より）

3.1 MSCの骨形成の様式

発生段階の骨形成には軟骨形成を介する内軟骨性骨化と軟骨形成を介さない膜性骨化の2つの様式がある。上記のように筆者らはMSCを用いて生体内での骨形成研究を数多く行い、この骨形成は膜性骨化の様式であることを明らかにしてきた⁴⁾⁵⁾。すなわち、MSCが前骨芽細胞への分化を経て骨芽細胞へ分化し、この骨芽細胞により直接骨形成を営むのである（図3）。生じた骨組織はセラミックス表面と強固に結合することが判明した⁴⁾（図2）。また、筆者らはMSCの生体内移植でなく、生体外の細胞培養操作によりMSCが*in vitro*で骨形成（この骨形成を筆者らは再生培養骨と呼称している）を生じる方法論も確立している⁶⁾。この骨形成も培養によって、MSCが骨芽細胞へ分化し、その骨芽細胞により骨基質を培養皿表面に形成するという膜性骨化

の様式である。これらの軟骨形成を介さない骨形成は骨再生医療では有利である。後述のように、筆者らは種々生体材料上で再生培養骨構築を行い、種々患者の骨欠損部への移植を行っている。この場合、軟骨組織の形成が介在すると、その部分での機械特性の弱点が生じると想定され、骨形成が膜性骨化の様式での生じるのは臨床的に見ても重要である。

3.2 種々生体材料を用いる骨再生

我々はセラミックを含む種々生体材料に MSC を播種して、あらかじめ *in vitro* での骨形成を生じさせ（再生培養骨形成）、その後に生体内へ移植するという骨再生医療技術を開発してきた。この方法を用いるには種々のセラミック上での *in vitro* の骨形成が効率良く形成されるかの検証が必要である。例えば、細胞培養に用いる培養皿の表面は plasma 処理をされていることが多く細胞との親和性が高い。この培養皿での MSC による骨形成は上記の様に膜性骨化の様式で骨形成を営み、その骨組織は通常の生体に存在する骨組織に生化学的あるいは物理化学的にも匹敵することを報告している⁶⁾。このように、再生培養骨は生体の骨と同様であり、患者自身の MSC からの再生培養骨は自家骨に匹敵しうると考えられ、臨床応用への展開が十分に考えられた。しかし、培養皿は生体適合性材料ではなく、培養皿に構築された再生培養骨を培養皿と一緒に移植することはできない。その点、生体適合性材料、すなわち種々セラミック上での再生培養骨形成を生じるなら、これら培養骨/セラミックがそのまま移植可能となる。しかし、このような *in vitro* の骨組織が果たして種々のセラミックの上でも形成され、さらに生体内への移植後においてさらなる新生骨を生じるかの疑問がある。この点に関して、ヒト MSC を用いてハイドロキシアパタイトセラミックあるいはリン酸三カルシウムセラミック上での *in vitro* 骨形成（再生培養骨形成）を行い（図4）、その後にヌードラット皮下に移植したところ、新生骨形成が見られ、さらにその新生骨が再生培養骨由来であることも証明している⁷⁾（図5）。すなわち、これらのセラミックを再生培養骨の基盤として臨床応用されることがわかり、実際の骨再生の臨床に用いられている³⁾⁸⁾⁹⁾。

さて、以上述べたように、筆者らは MSC をあらかじめ種々生体材料で *in vitro* の骨形成を構築し、患者に移植する再生医療を行っている。すなわち、生体材料と細胞の複合化による骨再生医療である。生体材料は種々の材料があるが、それらを用いるには対象とする骨疾患によって異なる。volume のある骨形成を必要とし、さらに比較的機械特性を重要視しない疾患においては多孔体のリン酸カルシウムセラミックを用いている。用いたセラミックが生体内で最終的に吸収され、移植されたセラミックが残存しないことが要求される疾患においては、リン酸三カルシウムセラミックを用いている（図6）。また、多大な荷重がかかる部位で高い機械特性を必要とす

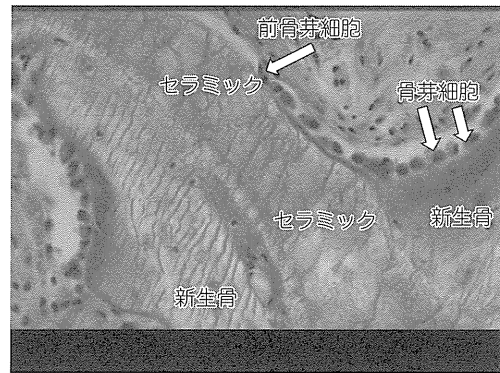


図3 ハイドロキシアパタイトセラミックとラット骨髄の複合体の皮下移植4週後の非脱灰組織像

セラミックに接して間葉系細胞から分化した前骨芽細胞を思われる細胞が出現し、引き続いて骨形成が生じる。文献4)の図より許可を得て転載

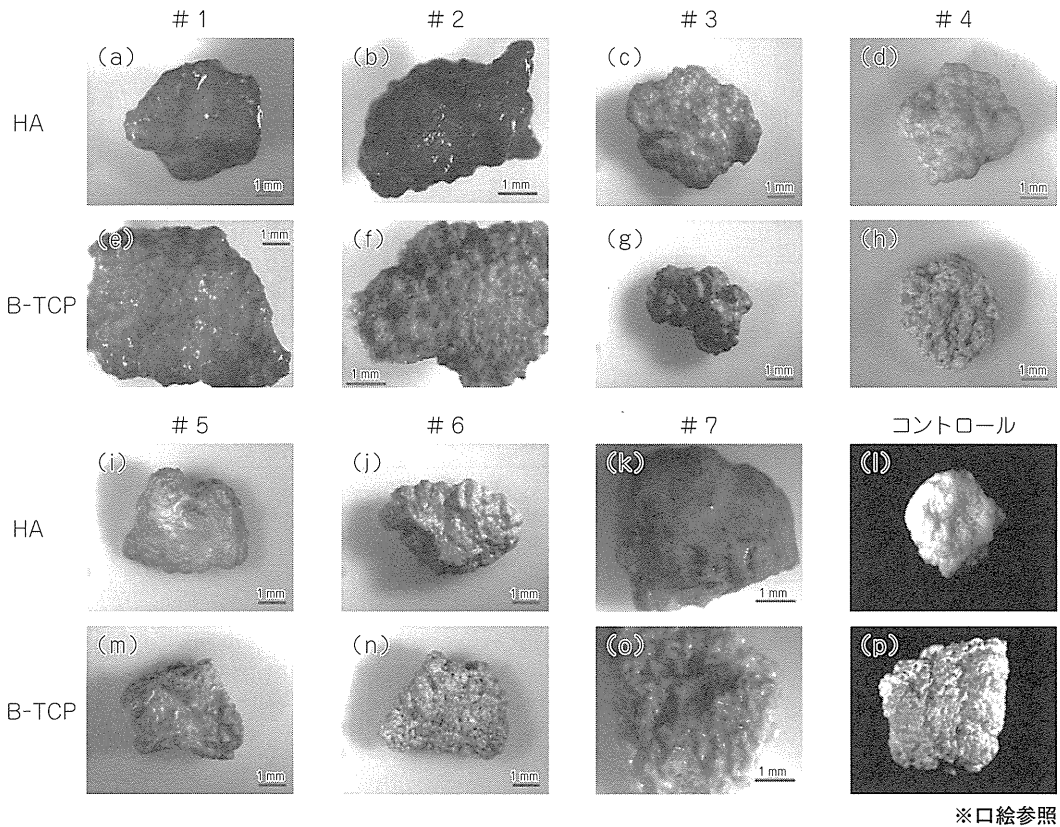


図 4 ヒト間葉系幹細胞の多孔体セラミック上での再生培養骨形成

7 例（# 1～# 7）のヒト骨髄から培養増殖した間葉系幹細胞（MSC）を多孔体のハイドロキシアパタイトセラミック（HA）あるいはリン酸三カルシウム（ β -TCP）上に播種し、骨分化条件で二次培養を行い、アルカリフォスファターゼ染色を行う。症例によっては染色が弱いものもあるが、明らかに MSC を播種していないコントロールに比して高い活性を認め、再生培養骨が形成されているのがわかる。文献 7）の図より許可を得て転載

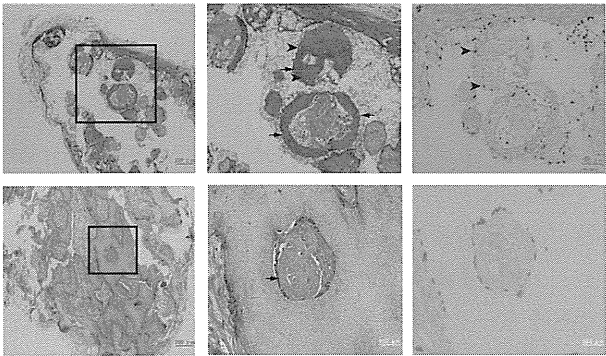


図 5 再生培養骨のヌードマウス皮下への移植

図 4 で見られる # 2 の症例の培養骨をヌードラットの皮下に移植して 8 週で摘出。上段はハイドロキシアパタイトセラミック上での培養骨、下段はリン酸三カルシウムセラミック上での培養骨。左端図は脱灰組織で真中図は拡大像、赤く染まる新生骨がセラミックの気孔内に見られる。右端図はヒトのマーカーである Alu の in situ hybridization で、陽性細胞（ドナー細胞）が茶色に染まっている。文献 7）の図より許可を得て転載

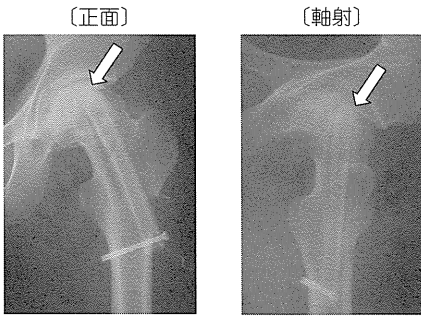
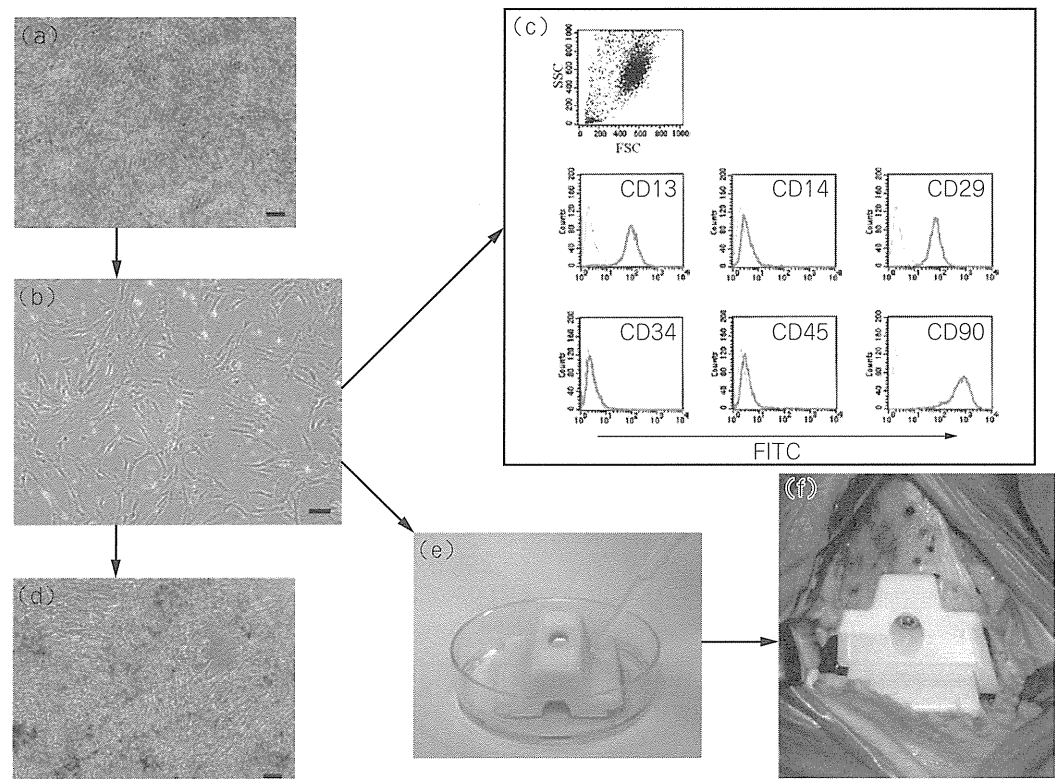


図 6 大腿骨頭骨壊死症例に対する再生培養骨移植

本症例では血管柄付き腓骨移植と矢印に見られる培養骨移植を行った。この症例に対する再生治療では、生体吸収性のリン酸三カルシウム（ β -TCP）セラミック上での培養骨形成を行う。文献 9）の図より許可を得て転載



※口絵参照

図 7 人工足関節上での再生培養骨形成

患者骨髓(a)をシャーレ上で培養することにより、繊維芽細胞様の細胞（MSC）がシャーレにへばりつくように増殖する(b)。この細胞が間葉系幹細胞（MSC）であることは、細胞表面抗原の解析で確認される(c)。この細胞（MSC）を骨分化条件でさらにシャーレ上に播種して培養すると石灰化（(d)の黒色部分）が見られる。再生治療においては、MSC をシャーレに播種するのではなく、アルミナセラミック(e)の上に播種する。そして、さらに培養を行い再生培養骨をセラミック上で形成した後に患者に移植される(f)。文献 3）の図より許可を得て転載

る疾患においては、アルミナセラミックなどの材料を用いる。特に、本法によるアルミナセラミック上での培養骨形成は移植後においてホスト側の既存骨組織と強固な結合を示し¹⁰⁾、関節症疾患患者に対する人工関節の緩みの問題の 1 つの解決策として臨床応用されている³⁾ (図 7)。最近、筆者らは整形外科領域で多く用いられている金属材料でも MSC による培養骨が効率良く形成され、生体内における骨欠損部位への移植により既存骨組織の強固に結合を示す基礎研究結果を報告した¹¹⁾。これらの材料はアルミナセラミックより多くの患者に用いられ、今後の臨床応用への展開が期待できる。また、これら金属やセラミックのみならずポリマー上でも培養骨は形成可能であり、骨疾患によってはこれらのポリマーを用いる骨再生も考えられる¹²⁾¹³⁾。

3.3 生体材料を用いない骨再生治療

上記に述べたように、種々生体材料を用いる方法に比し、材料を全く使用しない骨再生治療も考えられる。例えば、MSC そのものを直接患者に移植する方法である。筆者らは骨代謝疾患の患者（低フォスファターゼ症）に、父親あるいは母親の骨髓から MSC を増殖し、この培養増殖

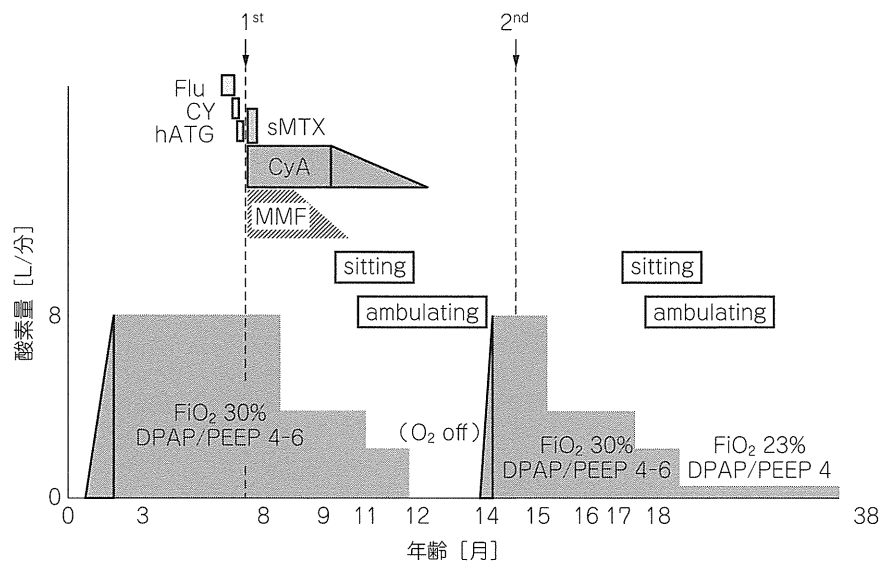


図8 低フォスファターゼ症に対する同種間葉系幹細胞（MSC）移植

患者は生後まもなく呼吸不全を起こし、インファントフローシステム（n-DPAP）を装着した。骨髓移植と種々免疫抑制剤投与の後に第一回（1st）の同種 MSC 移植を行い、呼吸不全は改善された。その後生後 14 ヶ月で再度呼吸不全に陥り、2 回目（2nd）の MSC 移植を行い、呼吸不全が改善して座位（sitting）や移動（ambulating）も可能となる。文献 14）の図より許可を得て転載

された MSC を直接患者の体内へ経静脈的に投与する骨再生治療を行っている¹⁴⁾。この方法は培養増殖された MSC そのものを用いる方法である（図 8）。

また、上述のように、MSC を種々の因子の存在の下に培養することにより、MSC は骨芽細胞へ分化して骨形成を営む（再生培養骨構築）。この骨形成において大事なポイントは、MSC から分化して生じた骨芽細胞により細胞外基質（骨基質）が産生されることである。また、この骨芽細胞は骨細胞へさらに分化して骨基質内へ埋入される。すなわち、*in vitro* の骨形成（再生培養骨）はその表面に骨芽細胞が存在し、その内部に骨細胞を含む骨基質が存在する三次元構造を有することである¹⁵⁾。また、重要な点として、その骨基質は生体の骨組織の成分である低結晶性の炭酸含有ハイドロキシアパタイトで構成される⁶⁾。すなわち、*in vitro* で生じる再生培養骨は生体の骨組織に匹敵しうるものである。さて、この再生培養骨組織の高さ（培養皿からの高さ）はせいぜい数百 μm であり、volume のある骨組織の形成は培養皿の上では困難である。しかし、培養皿の全面に形成することが可能で、薄い膜状の骨形成となる。この、膜状の骨（骨芽細胞シート）は容易に回収することが可能で、筆者らは回収された骨を生体内へ移植することにより、さらなる新生骨を誘導して、骨欠損が治癒することも報告している¹⁶⁾¹⁷⁾（図 9, 10）。この方法は動物モデルでの段階であるが、特殊な培養皿や細胞担体を用いずに骨再生を行うという期待される方法である。以上のように、MSC を用いての骨再生は生体材料（細胞担体）を用いる方法と材料を用いない方法の 2 つに分類されるが、どちらの方法を用いるかは対象とする疾患で決められる。



図 9 骨芽細胞シートの外観とラット大腿骨の骨欠損への移植

(a)骨芽細胞シートの外観。MSC をデキサメサゾンとアスコルビン酸添加培地で培養後スクレーパーを用いて細胞シートとして採取できる。(b)ラット偽関節モデル。骨膜と骨髄搔扱を行うことで小動物（ラット）でも大腿骨偽関節が作製できる。(c)骨芽細胞シート移植。骨芽細胞シートは細胞担体（スキャホールド）なしで移植が可能であり、複雑な形状の骨切り部へも適合させることが容易である。文献 17) の図より許可を得て転載

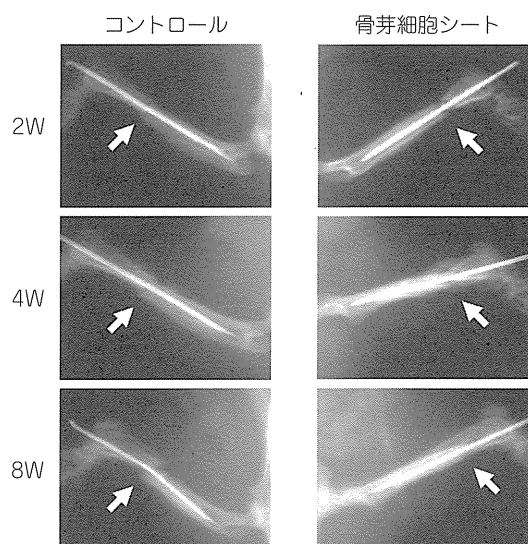


図 10 ラット大腿骨偽関節モデルにおける骨芽細胞シート移植後のレントゲン像

コントロール群では骨癒合が起こらず 8 週後には偽関節となったが、骨芽細胞シート移植群では 4 週で仮骨形成が見られ、8 週で骨癒合が得られた。文献 17) の図より許可を得て転載

4 MSC の細胞ソースと MSC の問題点

以上、筆者らが行っている MSC を用いての骨再生の方法論について述べてきた。用いた MSC はすべて骨髄由来である。しかし、近年 MSC が骨髄のみならず種々の組織に存在することが報告されている。特に、脂肪には MSC が多く含まれ、美容目的で採取された脂肪が破棄されていることに注目されて、近年脂肪由来 MSC の臨床応用が考えられている。この点において、骨再生にとって MSC が骨髄由来か脂肪由来のどちらが優位であるかの検証が必要である。これについては議論のあるところで、種々の結果が報告されている。しかし、これらの報告の多くは

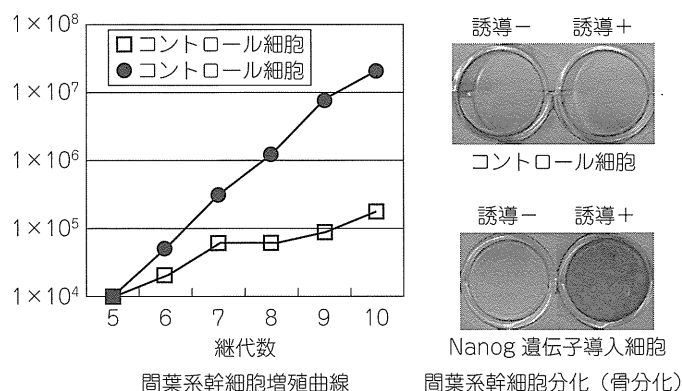


図 11 ヒト間葉系幹細胞 (MSC) への Nanog 遺伝子導入

Nanog 遺伝子非導入 (通常の MSC) は継代を経るに従い、増殖能が落ちる (左図)。しかし、遺伝子導入 MSC は増殖能を維持しつつ、骨分化誘導培地 (誘導+) において、骨分化能も維持する。左図は増殖曲線で右図は培養による骨分化能をアリザリンレッド染色 (赤色) で示す。文献 19) の図より許可を得て転載

MSC の由来、すなわち細胞ソースとしての脂肪あるいは骨髄が同一のドナー由来でなかったり、脂肪と骨髄 MSC の培養の継代数が異なっているものであった (継代数が増えると骨分化能は低下する)。そこで、筆者らはラットのモデルを用いて、脂肪ならびに骨髄を同一のドナーより採取し、それらの組織から MSC を増殖して *in vitro* ならびに *in vivo* での生体内移植による骨形成を比較した。用いた MSC の培養において継代数を揃えた。結果として、骨形成は明らかに骨髄由来 MSC が脂肪由来 MSC より高いものであり、骨再生を念頭においた場合は脂肪でなく骨髄 MSC を使用するのが有利であると考え¹⁸⁾。また、この実験において継代数を揃えたが、これは MSC が培養をくり返す (継代を増やす) ことにより増殖能と分化能が低下するためである。この MSC の能力低下に関して、筆者らは基礎研究として ES 細胞に多く発現している Nanog あるいは Sox2 遺伝子を MSC に導入することにより、この増殖・分化能の低下を回復できることを報告している¹⁹⁾ (図 11)。また、種々細胞に Oct4, Sox3, Klf4 の 3 遺伝子を同時に導入することにより人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作ることが可能であるが、筆者らは MSC が iPS 細胞創製のための細胞ソースとしても有用な細胞であることも報告している^{20/21)}。

なお、前項において、筆者らは MSC がスキャホールドを用いずに骨再生に使用できることを記述した。特に、骨代謝疾患患者への MSC の投与は経静脈的に全身投与である。また、患者は骨形成に必須のアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) 遺伝子の異常により骨形成の不全が生じている。すなわち、筆者らが通常行っている骨再生治療は患者自身の細胞 (自己細胞) を用いての再生治療であるが、この骨代謝疾患においては、ALP 遺伝子の異常があるので患者自身の細胞を用いることはできない。そのため、父親あるいは母親といった同種の MSC を用いて移植された。他の細胞と異なり、MSC は免疫抑制作用を有して移植免疫を回避できうとの報告もある。しかし、筆者らの以前の研究において、たとえ遺伝背景の近い MSC すなわち、免疫バリアーの低い同種 MSC を用いても、生体内への移植により骨形成を示すには、