

## 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 $2 \times 10^4$  cell/s/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-アスコルビン酸リソステルマゲネツム塩水和物 (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。

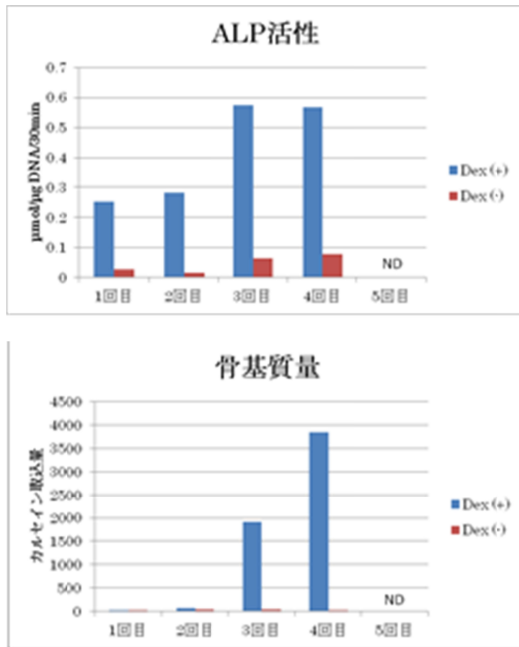


図 9. 症例 1 の骨形成比較

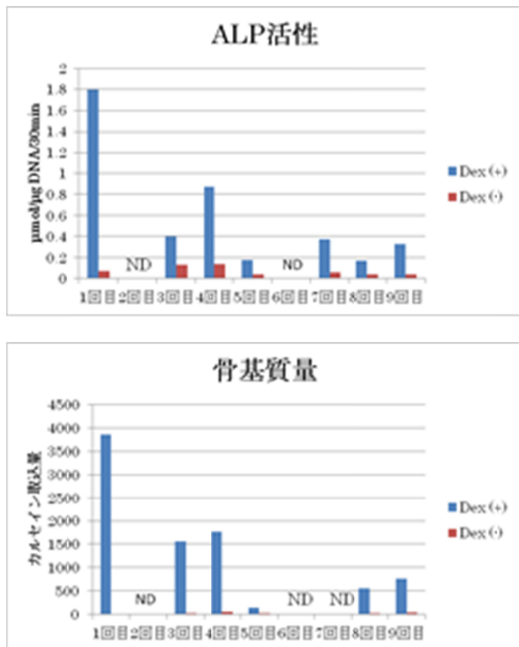


図 10. 症例 2 の骨形成比較

#### 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