

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)。

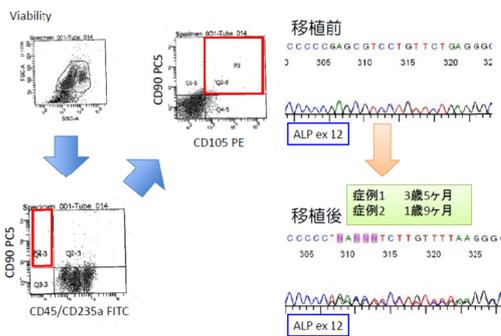


図 1. 間葉系幹細胞のキメリズム解析

2. 病態説明

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。

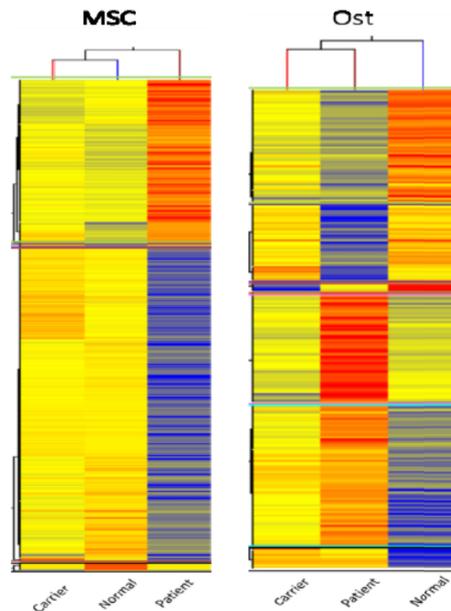


図 2. クラスタ解析ヒートマップ図

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

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)。

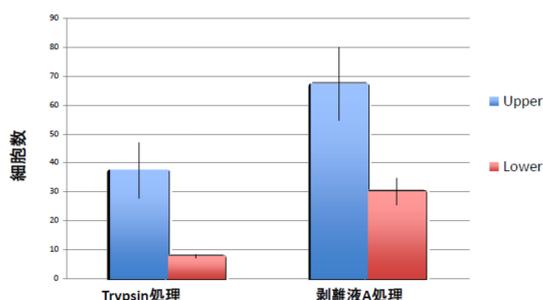


図 8.細胞剥離液の違いによる遊走能の変化

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)。

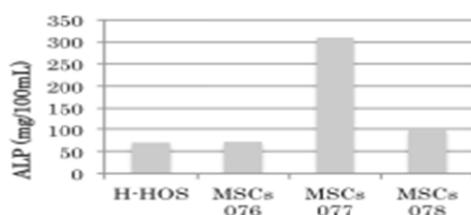


図 9. 骨分化後の ALP 活性

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 により骨髄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）の機序が明らかにす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遺伝子が発現しており、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