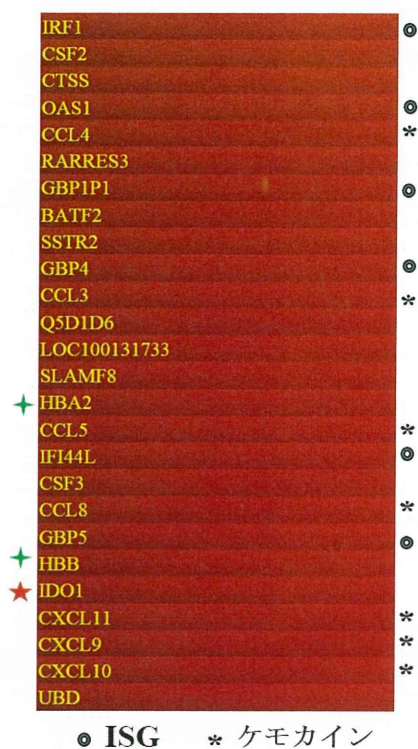


図3 MLRによるWJ-MSCの発現変化



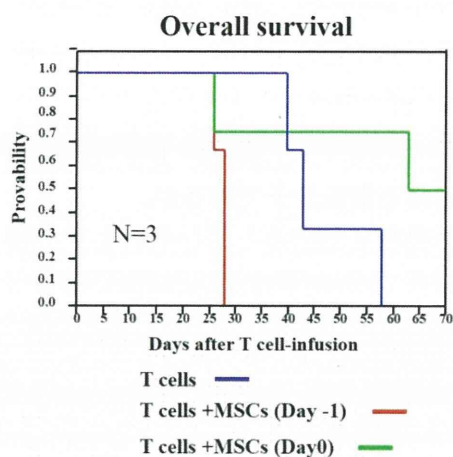
D. 考察

WJ-MSC の免疫抑制作用の要因は、環境中の IFN γ によって誘導される IDO 等の可溶性分子であり、その発現は IFN γ 濃度依存性であることから、WJ-MSC の生体における効果を *ex vivo* におけるプライミングによって増強できる可能性が示唆された。なお、ケモカインの役割はエフェクターT 細胞の局所へのリクルート作用と考えられるが、IFN γ で誘導されない Hba β の意義と併せて今後の検討課題である。

E. 結論

WJ-MSC は、炎症局所で産生される IFN γ が誘導する IDO 等の可溶性分子を主たるエフェクター分子として免疫抑制作用を発揮する。

図4 WJ-MSC の *in vivo* 効果



G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8): 1314-24, 2014
- 2) Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, *Tojo A. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- α mutant in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 22(26):4259-63, 2013
- 3) Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of *in vivo* administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett*. 6(2):323-8, 2013
- 4) Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T cell leukaemia-lymphoma. *Br J Haematol*. 163(5):683-5, 2013
- 5) Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(33):13410-5, 2013
- 6) Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, Tojo A, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm*. 454(1):478-85, 2013
- 7) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One*. 8(1):e53728, 2013
- 8) Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen

formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 97(1):103-8, 2013

- 9) Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. *Hemophilia.* 19:e87-9, 2013

2. 学会発表 (海外)

- 1) He H, Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Mori Y, Tsunoda H, Tojo A. The immunosuppressive effect of Wharton Jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA
- 2) Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Long-term ex vivo maintenance of murine iPSC-derived hematopoietic stem/progenitor cells by conditional HoxB4. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

(国内)

- 1) マイクロ RNA 制御性ワクシニアウイルスは多発性骨髄腫細胞選択的に細胞死をもたらす. 二見 宗孔、中村 貴文、東條 有伸. 第72回日本癌学会学術総会. 2013.10.3-5. 横浜

- 2) 大野伸広、田野崎隆二、福田隆浩、井上明威、藤 重夫、伊藤 歩、小林真之、佐藤広太、城 憲秀、川俣豊隆、湯地晃一郎、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸 薫、東條有伸. Significance of the allogeneic HSCT in the treatment of the aggressive ATL patients. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
- 3) 湯地晃一郎、佐藤広太、城 憲秀、小林真之、磯部優理、島田直樹、石橋通宏、小沼貴晶、大野伸広、小林誠一郎、小柳津直樹、内丸 薫、東條有伸. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
- 4) 城 憲秀、大野伸広、小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、湯地晃一郎、内丸 薫、東條有伸. Mogamulizumab treatment for ATL patients in IMSUT hospital. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
- 5) 佐藤広太、湯地晃一郎、津田真由子、大野伸広、内丸 薫、東條有伸. Marked Eosinophilia Caused by Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
- 6) 小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、湯地晃一郎、大野伸広、高橋 聡、内丸 薫、東條有伸. Clinical profile of adult Langerhans cell histiocytosis: A single-institute experience in Japan 第75回日本

血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
7) Haiping He、長村登紀子、角田 肇、湯
沢美紀、山本由紀、東條有伸. SSEA4 i
s not a marker for proliferation and plu
ripotency in Wharton's Jelly-derived MS
Cs. 第75回日本血液学会学術集会、20
13.10.11-13、札幌

3. その他、専門医、一般医等医療従事者へ
の情報提供（シンポジウムの開催、講演
等での発表）

1) 東條有伸 「プライマリケアにおける
血液疾患診療のコツと医療連携」江東区
医師会学術講演会 2013/04/17（火）

4. 患者、家族、患者会や一般市民への情報

提供（シンポジウムの開催、講演等での
発表、マスコミでの発表など）

東條有伸 「骨髄異形成症候群（MDS）の病
態と治療」再生つばさの会札幌講演会
2013/08/31（土）

東條有伸 「iPS細胞の話」東京都難病相
談・支援センター医療講演会
2013/10/06（日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

臍帯由来 MSC による臍帯血移植における生着促進効果

研究分担者 松本太郎 日本大学医学部医学科機能形態学系細胞再生・移植医学分野・教授

研究要旨：臍帯血移植における課題の一つに生着不全があり、非悪性疾患である希少疾患、特に再生不良性貧血においては重要な合併症である。本研究では臍帯血移植における臍帯などに由来する間葉系幹細胞(MSC)の投与による造血幹細胞生着促進効果を検討する目的で、まず *in vitro* において、臍帯血とドナー胎児付属物から①臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC)、②羊膜上皮由来幹細胞(AEC)、③羊膜間質由来 MSC(AMC)を共培養し、その造血支持能を検討しいずれも支持能があることを確認した。また、免疫不全マウスを用いて、臍帯血生着不全モデルを作成した。

A. 研究目的

臍帯血移植において生着不全の克服が重要な課題である。近年、間葉系幹細胞(MSC)と臍帯血の共移植により生着不全を回避したとの報告がある。本研究では、臍帯や羊膜より調製した MSC を用いて臍帯血移植後の生着促進を目的とした細胞治療用ドナー細胞のスクリーニングおよび至適治療法の確立を目指す。

2 研究方法

放射線照射した免疫不全(NOD/SCID)マウスにヒト臍帯血 CD34⁺細胞を移植し、ヒト臍帯血生着不全モデルの作成を試みた。

同一ドナー胎児付属物から①臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC)、②羊膜上皮由来幹細胞(AEC)、③羊膜間質由来 MSC(AMC)を培養調製した。これらの細胞に対し、造血ニッチマーカーの発現解

析やヒト臍帯血 CD34 陽性細胞との共培養による造血幹細胞支持能の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた実験は、施設臨床研究委員会または東京臍帯血バンク倫理委員会にて承認を受け実施した。

3 研究結果

NOD/SCID マウスに 3 Gy の放射線照射を行った後、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (1 x 10⁴) を移植することにより、再現性のある臍帯血生着不全モデルを作出することができた。WJ-MSC、AEC、AMC は培養初期にはいずれも SDF-1、Nestin、SSEA4 の発現が認められ、その発現強度は、AEC>WJ-MSC>AMC の順であった。臍帯血 CD34⁺細胞との5日間の共培養において、WJ-MSC, AEC, AMC はそれぞれ臍帯血細

胞を 6.5 倍、5.8 倍、7.6 倍増加させ、造血前駆細胞(CD34+CD45)の割合は、それぞれ 27.3%、37.8%、38.8%であった。WJ-MSC, AEC, AMC 共培養後の臍帯血細胞はいずれも CFU-GM コロニー形成を認め、コロニー数は AEC>AMC>WJ-MSC の順に高値を示した。現在上記ヒト臍帯血生着不全モデルに対して、WJ-MSC、AEC、AMC を静脈内投与し、生着促進効果が得られるか検討中である。

4 考察

WJ-MSC, AEC, AMC はいずれも *in vitro* において造血幹細胞支持能を有し、造血ニッチマーカー SDF-1 の発現や CFU-GM コロニー形成能は、AEC で高いことが明らかになった。このモデルを用いた WJ-MSC, AEC, AMC 移植実験現在実施中であるが、これらの細胞は採取に伴う侵襲がなく臍帯血と同一ドナーからの調製も可能であるため、生着不全予防を目的とした細胞治療の新たな細胞源として期待できる。本研究成果は、生着不全ハイリスク症例に対する安全な臍帯血移植法の確立につながり、その社会的意義は大きいと思われる。

3) 今後の展望について

臍帯血移植の適応があるが生着不全が高率に起こるステロイド不応性の難治性再生不良性貧血を対象疾患とした、細胞治療の

確立を目指す。

4) 研究内容の効率性について

ヒト胎児付属物から単離増幅した細胞は個体差が大きく、同一ドナーに由来する細胞を用い、検体数を重ねて検討することが必要であった。同一条件のサンプル調製に予想していたより時間がかかり、効率的に研究成果が出ない原因となった。

6 結論

臍帯や羊膜由来 MSC は造血幹細胞支持能を有することが明らかになった。臍帯血・MSC 共移植は、臍帯血移植における生着不全を予防する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

7 研究発表

1) 国内

- ① 西川英里, 石毛美夏, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト胎児付属物由来間葉系幹細胞の機能解析. 第12回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013
- ② 小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の造血細胞生着促進効果に関する検討. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012
- ③ 小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 野呂知加子, 小林寿美子, 谷ヶ崎博, 鈴木孝, 麦島秀雄: 放射線照射が骨髄スト

- | | |
|---|--|
| <p>ローマ機能に及ぼす影響と最大悦生着
促進を目的とした新規細胞治療(ワーク
ショップ). 第34回日本造血細胞移植学
会総会,大阪, 2012</p> | <p>なし
2 実用新案登録
なし
3 その他</p> |
| <p>④ 松本太郎: 幹細胞に関する最近の知見
を新しい再生医療用細胞ソースの開発
(教育講演). 第35回日本呼吸器内視鏡
学会学術集会, 東京, 2012</p> | <p>研究成果の普及、活用に関わる活動:
① 東京都保健医療公社豊島病院平成24年
度臨床研修委員会主催講演会 (東京,
2013年 臨床医 35名参加、「幹細胞、
細胞治療に関する最近の話題を展望」
というテーマで特別講演を行った。)</p> |
| <p>⑤ 手塚里奈, 松本太郎, 石毛美夏,
Al-Bakri Zena, 藤田英寿, 麦島秀雄:
ヒト臍帯組織における間葉系幹細胞の
局在および形質解析(ワークショップ).
第33回日本造血細胞移植学会総会, 松
山, 2011</p> | <p>② 川崎・横浜呼吸器フォーラム (横浜、
2013年3月28日 臨床医30名参加
「成熟細胞を利用した細胞治療の試み」
というテーマで特別講演を行った。)</p> |
| <p>8 知的所有権の出願・取得状況 (予定を
含む)</p> | <p>④ 平成 24 年度日本大学獣医学部大学院
特別講義(藤沢, 2013年6月28日, 研究者,
大学院生, 80名参加, 「再生医療の現状と
展望」というテーマで講演会を行った。)</p> |
| <p>1 特許取得</p> | |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた
治療法の開発

研究分担者：海老原 康博 東京大学医科学研究所 助教

研究要旨：先天的に骨、軟骨に障害がある骨形成不全症、軟骨無形成症は、間葉系幹細胞移植による治療の可能性がある。その新たな間葉系幹細胞のソースとして、臍帯由来間葉系幹細胞を用いて検討した。その結果、クローン間に差はあるものの、樹立された臍帯由来間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できた。今後、現在作成中の骨・軟骨損傷モデルを用いて、臍帯由来間葉系幹細胞の修復能を検討する骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用を検討する。

A. 研究目的

先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

臍帯および臍帯血由来間葉系幹細胞の性状を解析する。また、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療法の現状を調査し、その治療への臍帯および臍帯血由来間葉系幹細胞の応用を検討する。

（倫理面への配慮）

臍帯のドナーとなる母親には、本研究について十分に説明を行った後に同意を得て、臍帯を採取した。

C. 研究結果

臍帯由来間葉系幹細胞を樹立し、その性状を検討した。その結果、臍帯由来間葉系幹細胞

は、骨髄由来間葉系幹細胞と同様の表面抗原および骨・軟骨・脂肪への分化能を有していた。

D. 考察

今回臍帯から樹立された間葉系幹細胞は脂肪細胞、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できたが、クローン間に増殖の差異が認められるため、適切なクローンを選択する必要がある。今後は骨・軟骨損傷モデルを用いて、臍帯由来間葉系幹細胞の修復能を検討することで、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用について検討していく予定である。

4) 研究内容の効率性について

臍帯由来 MSC からの骨・軟骨へのより効率的分化方法を確立し、できるだけ早期に前臨床試験に移行する。

E. 結論

樹立された間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有しており、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用が期待される。

F. 研究発表

1) 国内

論文発表

該当無し。

学会発表

- 1) 海老原康博、平本貴史、山本将平、望月慎史、辻浩一郎、溝口洋子、中村和洋、小林正夫、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞の樹立とその分子生物学的解析、日本小児科学会 広島
- 2) Drug screening for the 8p11 myeloproliferative syndrome using patient iPS cells. Mai Nanya, Shohei Yamamoto, Yasuhiro Ebihara, Shinji Mochizuki, Makoto Otsu, Minoru Tozuka, Hiromitsu Nakauchi, Kohichiro Tsuji, 日本血液学会 札幌
- 3) Generation and analysis of a novel model for CMML with acquired expression of CBL Q367P. Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Akiko Nagamachi, Keiyo Takubo, Yasuhiro Ebihara, Masashi Sanada, Seishi Ogawa, Kohichiro Tsuji, Toshio Suda, Toshiya Inaba, Hiroaki Honda 日本血液学会 札幌
- 4) ヒト iPS 由来肥満細胞の機能解析. 五十嵐晃、熊谷智明、平井博之、永田欽也、花田佐智代、海老原康博、辻浩一郎第 63 回日本アレルギー学会 東京
- 5) 自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた血友病関節症に対する治療の可能性. 海老原康博、望月慎史、大津真、竹谷英之、

辻浩一郎. 第 55 回小児血液がん学会
福岡

2) 海外

論文発表

1. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. Haemophilia 19: e87-e89, 2013
2. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. Transpl Infect Dis. 15: 181-186, 2013
3. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative polymerase chain reaction detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 myeloproliferative syndrome. Leuk Lymphoma. 54: 2068-2069, 2013
4. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Nariai N, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Kohichiro Tsuji. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 110 : 3023-3028, 2013

5. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, Tsukada M, Taya Y, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Tsuji K. Pneumothorax in an early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Rep.* 28: 34-35, 2013
 6. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, Tsukada M, Taya Y, Sato A, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Tsuji K. Unusual extramedullary relapse after haploidentical bone marrow transplantation in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Blood Disorders Transf* 4: 155, 2013
 7. Ebihara Y, Ishikawa K, Mochizuki S, Tanaka R, Manabe A, Iseki T, Maekawa T, Tsuji K. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia developing from severe congenital neutropenia. *Br J Haematol.* In press.
 8. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monn M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruk, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation following G-CSF-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* In press.
 9. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruk, Tojo A, Takahashi S. The effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation following myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* In press.
 10. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLOS ONE.* In press.
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**
- 1 特許取得
該当無し。
 - 2 実用新案登録
該当無し。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨分化能解析と骨系統疾患治療への応用可能性検討
分担研究者：縣 秀樹

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 顎口腔再生外科学分野 助教

研究要旨：本研究は骨系統疾患治療への応用可能性検討を目指して臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)の骨分化能を解析を行った。ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)は、東大医科研で樹立した hUCMSC を市販骨髄由来 MSC と比較検討した。in vitro における hUCMSC の骨分化能は種々の条件においても hBMSC よりはるかに低かった。一方、ヌードマウスの頭蓋骨上に、アパタイト顆粒処理した hUCMSC を移植した実験においては、hUCMSC は、HE 染色と免疫染色の結果、結合組織、血管組織、類骨、皮質骨へ分化していることが示された。以上より、hUCMSC は hBMSC に比べて骨分化能が低いため、in vitro での骨分化誘導は難しいが、骨周囲に移植すれば自発的に骨分化する可能性が示唆された。in vitro での骨分化誘導は難しいが、骨周囲に移植すれば自発的に骨分化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は骨系統疾患治療への応用可能性検討を目指して臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)の骨分化能を解析を行った。

骨分化能の評価にはアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を用いた。

移植実験： 5×10^5 個の hUCMSC を 25mg のハイドロキシアパタイト顆粒 (APACERAM-AX, PENTAX) に播種し、ポリプロピレンチューブ内で 1 週間培養。培養には DAG+BMP2 を加えた培地を使用し、培養 4 日目で培地交換。1 週間後、上清を捨て、フィブリノゲン溶液とトロンビン溶液を加えゲル化させ、ヌードマウスの頭蓋骨上に移植。10 週後にサンプルを取出し、固定、脱灰、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と免疫染色 (Anti-Human PCNA antibody) で解析。

B. 研究方法

細胞：ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)は、東大医科研で樹立、バンキングされ、個人情報匿名化されたものを使用した。コントロールとして、研究用に販売されているヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBMSC)を購入し、実験に用いた。

in vitro 骨分化誘導：hUCMSC の骨分化誘導には、DAG(dexamethasone, ascorbic acid, β -glycerophosphate) 試薬の他、recombinant human bone morphogenetic protein (BMP), 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ (VitD), Parathyroid hormone (PTH), Platelet derived growth factor (PDGF)を用いた。

(倫理面への配慮)

本実験は、東大医科研および長崎大学の倫理委員会、東大医科研動物実験倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

初めに、hUCMSC の *in vitro* での骨分化誘導に有効な試薬、成長因子の探索を行った。10%FBS を含有した培地に DAG、DAG+BMP2,DAG+BMP3, DAG+BMP4, DAG+BMP5, DAG+BMP6, DAG+BMP7, DAG+VitD, DAG+PTH, DAG+PDGF を加え、培養を行った。培養 1 週間後、3 週間後に骨分化の指標である ALP の活性を測定したところ、hUCMSC の ALP 活性はいずれの条件においても 3 週間後の方が高い値を示しており、中でも DAG+BMP2 の条件が比較的安定した ALP の上昇を示した。しかしながら、hUCMSC の ALP 活性はいずれの条件においても hBMMSC よりはるかに低かった。

続いて、移植実験にて hUCMSC の *in vivo* 分化能解析を行った。ヌードマウスの頭蓋骨上に移植した hUCMSC は、HE 染色と免疫染色の結果、結合組織、血管組織、類骨、皮質骨へ分化していることが示された。

D. 考察

上記試験の結果から、hUCMSC は hBMMSC に比べて骨分化能が低いため、*in vitro* での骨分化誘導は難しいが、骨周囲に移植すれば自発的に骨分化する可能性が示唆された。

E. 結論

hUCMSC は hBMMSC に比べ骨分化能が低い、骨周囲に移植することで骨分化可能であることが示された。

F. 研究発表

1.国内

なし

2.海外

- 1) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnology & Bioengineering*. 2014 in press.
- 2) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Agata H, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng Part A*. 2014 in press.
- 3) Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, WanJ, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors*. 2013 31(5):165-73.
- 4) Agata H, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol*. 2013 28(8):985-91.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1 特許取得

なし

2 実用新案登録
なし

3 その他
なし

低フォスファターゼ症に対する臍帯由来間葉系幹細胞の臨床応用に向けた研究

研究分担者 竹谷健 島根大学医学部 講師

研究要旨：骨の石灰化障害をきたし、致死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 MSC 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。これら課題を克服するため、臍帯由来 MSC が骨髄由来 MSC の問題点を克服できるか調べた。

臍帯由来 MSC の ALP 発現および ALP 活性；陽性コントロールである ALP 強発現骨肉腫細胞株である H-HOS と同程度に ALP 発現および ALP 活性が認められた。骨芽細胞の ALP 発現および石灰化能；基礎培地でも臍帯由来 MSC が骨芽細胞に分化して、石灰化能および ALP 活性を認めた。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。しかし、MSC のロット間の差が認められた。

臍帯由来 MSC は、ALP の発現および骨の石灰化能を有しているが、ロット間での差が大きかった。また、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。

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、同一ドナーからの臍帯由来 MSC を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。

A. 研究目的

先天性骨系統疾患は 450 種類以上も存在する希少疾患で、骨だけでなく免疫系や中枢神経系などにも障害を引き起こす。この疾患に対する根治療法が存在する疾患はほとんどなく、酵素補充療法や造血幹細胞移植が行われる場合もあるが、その効果は限定的である。そこで、間葉系幹細胞移植 (Mesenchymal Stem Cell Transplantation ; MSCT) に注目した。すでに MSC は骨芽細胞や軟骨細胞に分化することから、自己 MSC を用いた骨・軟骨再生治療に用いられてい

る。しかし、先天性骨系統疾患の自己 MSC は骨形成能が障害されているため、同種 MSC を用いた骨再生治療が必要となる。また、全身の骨機能を回復するため、局所投与ではなく経静脈的に MSC を移植し全身の骨に MSC が到達する（遊走する）ことが重要である。さらに、骨へ遊走した MSC が骨芽細胞に分化すること、また、MSC 自体が自己複製能を維持して骨に生着し続けることが不可欠である。

先天性骨系統疾患の 1 つである、低フォスファターゼ症は、アルカリフォスファタ

一ゼ(ALP)遺伝子変異により骨の石灰化障害をきたす。この致命的な患者に対して、我々は同種骨髄移植を行った後同じドナーの骨髄から ex vivo に増殖した MSC を経静脈的に複数回移植して、全身骨の石灰化の再生を試みている。その結果、骨の石灰化は改善し、骨が全く消失した部位の石灰化も認められている。また、MSC により GVHD が劇的に改善した症例も経験した。キメリズム解析でドナー由来 MSC が骨髄および骨で生存しているため、この臨床的効果が MSC に起因すると思われる。なお、ドナー由来 MSC は有害事象なく投与でき、腫瘍化も認めず、同種 MSC は乳児において安全に行える治療であることが明らかとなった。しかし、MSCT の有効性は全症例で認められたが解決すべき問題も生じた。最大の課題は移植後の生着細胞が十分でないため、血清 ALP 値が上昇していないこと、骨構造が正常に到達するまでの改善に至っていないことである。その原因として、①骨へ遊走生着する MSC が少ないこと、②生着した MSC の増殖能が低いことなどが挙げられる。

MSC は骨髄だけでなく、脂肪、軟骨、滑膜などに存在するが、それぞれの組織中の MSC は非常に少なく、組織の採取にはドナーの負担を要する。そこで我々は臍帯に注目した。臍帯は、出産後に廃棄される組織であるため妊婦や新生児に負担なく採取することができる。また、臍帯に存在する MSC は他の組織由来 MSC よりも増殖能および自己複製能が優れていることが報告されている。

したがって、骨髄由来 MSC の問題点(生着した MSC の増殖能が低い、骨へ遊走生着

する MSC が少ないなど)を臍帯由来 MSC が克服することができるか検討した。

B. 研究方法

1. ALP 活性

MSC (1×10^4 個)を 24 ウェルにまき、37°C、5%CO₂ 濃度下で 24 時間培養後、培養上清を取り除き、1×PBS で 1 度洗浄した。固定液各ウェルに 250μl 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 250μl/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、蛍光プレートリーダー (610nm) で測定した。

2. Flow cytometry による 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) を 5 μl 添加し、15 分氷上で精置させ、BD FACsCalibur で ALP 発現を測定した。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. 骨分化能および石灰化能の測定

α-MEM に 15%FBS, 2mL penicillin/streptomycin, 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 1μM retinoic acid(RA), 10nM cyclosporin A(CyA), 10nM tacrolimus(FK506), 10nM calcitriol (Vitamin D3), 0.5mM sodium butyrate and LiCl, 0.5mM LiCl, 0.5mM sodium

butyrate,100ng/mL BMP-2 を加えた培地で骨分化を検討した。37°C、5%CO₂ 下で 21 日間培養した。その間に培地は 3 日置きに交換した。最終的に、ALP 活性で骨分化能を評価した。

また、骨分化誘導後、カルシウムテストワコー (WAKO) を用いて骨基質を蛍光プレートリーダー (610nm) で測定して、石灰化能を測定した。また、アリザリンレッド染色でも石灰化を確認した。

(倫理面への配慮)

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等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ことを、臍帯を提供して頂く妊婦に説明し、同意を得ている。

C. 結果

1. 臍帯由来 MSC の 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 1)。ALP 免疫染色でも MSC は呈色を得られた (図 2)。また、ALP 活性もすべての MSC で認められた (図 3A)。

2. 骨分化能および石灰化能

基礎培地でも MSC が骨芽細胞に分化して、ALP 活性および石灰化能を認めた (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。しかし、MSC の

ロット間の差が認められた。

D. 考察

臍帯由来 MSC は、ALP の発現、ALP 活性、骨分化能および石灰化能が求められた。しかし、骨分化能および石灰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 MSC 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た。

E. 結論

今回の検討では、臍帯由来 MSC が骨髄由来 MSC と同等に ALP 活性および骨分化能を有する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、同一ドナーからの臍帯由来 MSC を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。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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.* 55:e52-5, 2013
- 3) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 99;211-215, 2014

2. 学会発表

(国内)

- 1) 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(会長 越智光夫)、広島、2013 年 5 月 23-26 日
- 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

(海外)

- 3) 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

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1. ALP の発現

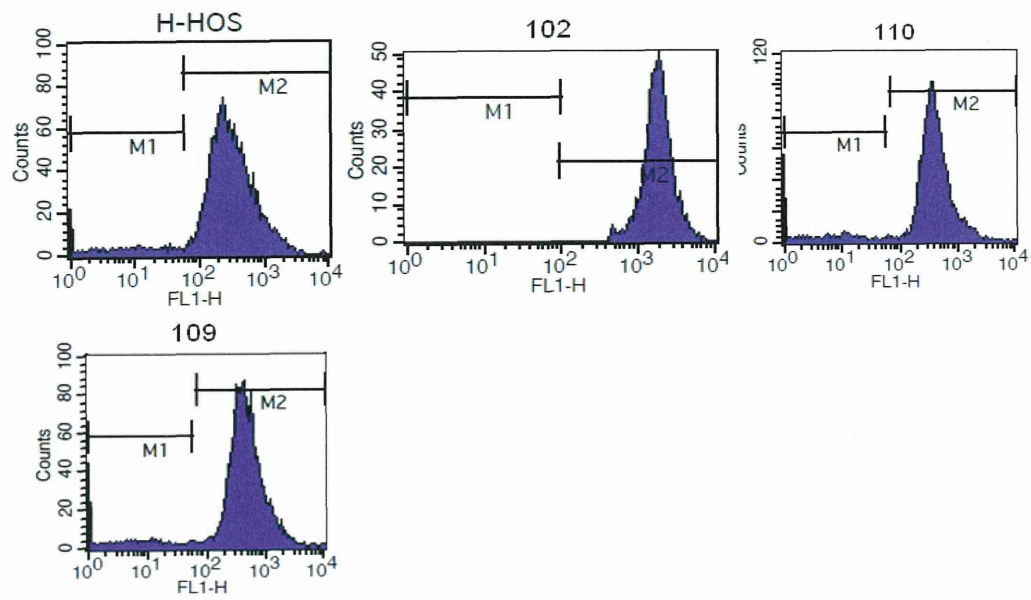
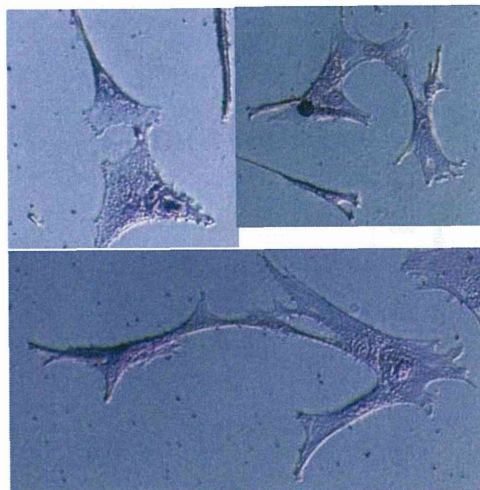


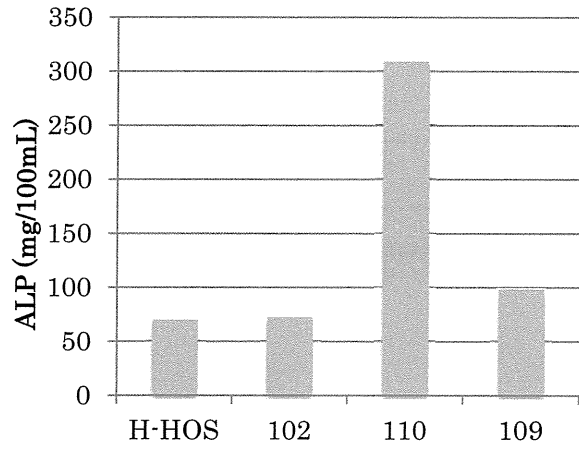
図 2. ALP 免疫染色



102

図 3. ALP 活性

A. MSC



B. 骨分化誘導後

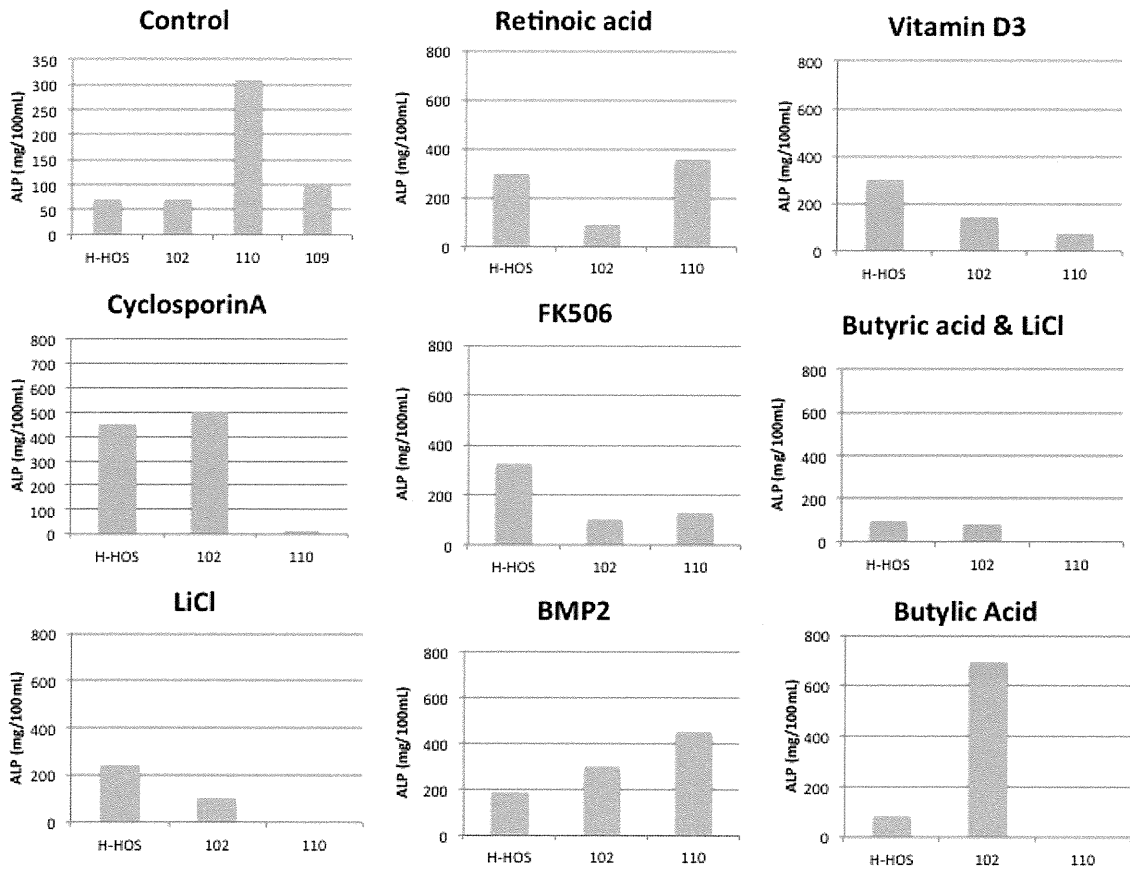


図 4. 間葉系幹細胞の骨分化誘導のカルセリンによる石灰化

