

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化  
とその希少性疾患に対する移植医療の技術確立に関する研究

研究分担者 麦島秀雄 日本大学医学部小児科学分野・教授（H24年度）

研究分担者 松本太郎 日本大学医学部細胞再生・移植医学分野・教授（H25年度）

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では重要である。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して種々の検討を行った。放射線照射した免疫不全(NOD/SCID)マウスにヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>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。また同一ドナー胎児付属物から①臍帯 Wharltton'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、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。その結果、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<sup>+</sup>細胞 ( $1 \times 10^4$ ) 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。また 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。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。

#### 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。

#### B. 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<sup>+</sup>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。このモデルに脂肪細胞に由来するMSC様細胞(DFAT,  $5 \times 10^5$ )を尾静脈より同時移植し、臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞の生着促進効果の有無をフローサイトメーターにて評価した。同一ドナー胎児付属物から①臍帯 Wharltton'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)

ヒト臍帯血を用いた実験は、施設臨床研究審査委員会および東京臍帯血バンク倫理委員会にて承認を受け、実施した。

#### C. 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<sup>+</sup>細胞 ( $1 \times 10^4$ ) 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。このモデルに対してDFATを同時移植した結果、12週後にはCD34<sup>+</sup>細胞移植のみの群(Control群, n=12)に比べ、CD34<sup>+</sup>細胞とDFATを同時移植した群(DFAT群, n=13)では、骨髄中のヒト造血幹細胞(CD34<sup>+</sup>)、B細胞(CD19<sup>+</sup>)、単球マクロファージ(CD11b<sup>+</sup>)、ミエロイド細胞(CD13<sup>+</sup>)、巨核球(CD41a<sup>+</sup>)の割合が有意( $p < 0.05$ )に増加した。また移植12週後の末梢血中のヒトCD45<sup>+</sup>細胞の比率もControl群に比べDFAT群で有意( $p < 0.05$ )に増加した。

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>)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。

#### D. 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。

#### E. 結論

免疫不全マウスを用いたヒト臍帯血生着不全モデルの作出に成功した。また臍帯や羊膜由来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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Han Y, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Ikeda K, Xueli Z, Matsumoto T, Soma M, Matsumoto K: Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 25(3):284-289, 2012
- 2) Tahira K, Ueno T, Fukuda N, Aoyama T, Tsunemi A, Matsumoto S, Nagura C, Matsumoto T, Soma M, Shibuya S, Matsumoto Y: Obesity alters the expression profile of clock genes in peripheral blood mononuclear cells. *Archives of Medical Science* 7(6):933-940, 2011
- 3) Iijima H, Daikonya A, Takamatsu S, Kanno A, Magariyama K, Yoshikawa K, Takamiya T, Ueda Y, Yakubo S, Matsumoto T, Ueno T, Yamori Y, Fukuda N, Kitanaka S: Effects of the herbal medicine composition "Saiko-ka-ryukotsu-borei-To" on the function of endothelial progenitor cells in hypertensive rats. *Phytomedicine*. 20(3-4):196-201, 2013
- 4) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuhashi Y, Matsumoto T. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 19(15-16): 1792-1802, 2013
- 5) Zhou X, Fukuda N, Matsuda H, Endo M, Wang X, Saito K, Ueno T, Matsumoto T, Matsumoto K, Soma M, Kobayashi N, Nishiyama A: Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 305(7): F957-967, 2013
- 6) Suzuki R, Fukuda N, Katakawa M, Tsunemi A, Tahira Y, Matsumoto T, Ueno T, Soma M: Effects of an angiotensin II receptor blocker on the impaired function of endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 27(5):695-701, 2014
- 7) Mikami Y, Matsumoto T, Kano K, Toriumi T, Somei M, Honda MJ, Komiyama K. Current status of drug therapies for osteoporosis and the search for stem cells adapted for bone regenerative medicine. *Anatomical Science International* 89(1):1-10, 2014
- 8) Kono S, Kazama T, Kano K, Harada K, Uechi M, Matsumoto T: Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. *The Veterinary Journal* 199(1):88-96, 2014
- 9) Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M: A novel gene regulator,

pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. Journal of Molecular Medicine, 92(5):509-521, 2014

## 2. 学会発表

(国内)

- 1) 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.
- 2) 風間美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の臍帯血移植生着促進効果に関する検討. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 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
- 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
- 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

(海外)

なし

## 3. その他

研究成果の普及、活用に関わる活動:

- 1) 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム (東京, 2013年1月29日, 研究者、学生、大学院生, 120名参加, 胎児付属物由来細胞を含む幹細胞生物学や組織医工学に関連する情報交換を趣旨とした研究会を主催した。)
- 2) 平成25年度日本大学医学部大学院特別講義(東京, 2013年10月19日, 研究者、大学院生、学生、55名参加、「ヒト幹細胞研究の現状と今後について」というテーマで講演会を主催した。)
- 3) 平成25年度日本大学生物資源科学部市民講座(藤沢, 2013年6月22日 一般市民、200名参加、「細胞を使って病気を治す」といったテーマで特別講演を行った。)
- 4) 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。)
- 5) 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。)
- 6) 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。)

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))  
総合研究報告書

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 辻 浩一郎 東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科 准教授  
(H24 年度)

研究分担者 海老原康博 東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科 助教  
(H25 年度)

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細  
胞ソースとして、臍帯を使用することを検討した。その結果、臍帯から容易  
に胎児由来間葉系幹細胞を樹立することができた。樹立された間葉系幹細胞  
は、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できたため、今後、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。

#### A. 研究目的

骨形成不全症(Osteogenesis imperfecta) は、I型コラーゲン遺伝子の変異によるI型コラーゲンの量的、質的異常に起因する様々な結合組織の障害が出現する遺伝性疾患で、その発生頻度は約2万人に1人とされている。骨脆弱性に起因する易骨折性、四肢・脊柱・胸郭・頭蓋などの進行性骨変形、低身長などのほかに、青色強膜、歯牙形成不全、難聴、関節・皮膚の弛緩性、腱断裂、心大血管などの異常を合併することがある。これらの症状の組合せにより、4～6型の病型に分類される(Sillence Provisional 分類)。骨形成不全症に対しては、骨髄移植や骨髄間葉系幹細胞移植の有

効性が示されている。

一方、軟骨無形成症 (Achondroplasia) は、繊維芽細胞成長因子受容体3 (FGFR3)遺伝子の変異に起因する軟骨細胞の異常による骨形成不全で、その発生頻度は1～2万人に1人とされる。四肢(主に上腕骨、大腿骨)短縮型低身長、肘の進展障害、短い指(三尖手)、内反膝(O脚)、幼少時の胸腰椎突背、歩行開始とともに進展する腰椎の前弯曲、前額部が突出した大きな頭部、顔面中央部の低発育(鼻根部の陥凹)、大後頭孔狭窄に伴う神経症状などの症状を呈する。軟骨無形成症も間葉系幹細胞移植による治療の可能性が期待されるが、いまだ具体的な治療法は開発され

ていない。

これらの難治性疾患に対する間葉系幹細胞を用いた治療法の開発のための基盤研究として、臍帯から間葉系幹細胞を樹立し、その性状を検討した。

## B.研究方法

### 1. 臍帯由来間葉系幹細胞の培養

ドナーの母親の同意を得た後、臍帯・胎盤を採取した。Wharton's jelly から explant culture 法にて樹立された3クローンの臍帯由来間葉系幹細胞を実験に用いた。10%ウシ胎仔血清を含む培養液で継代培養を行い、confluent になったところで継代を継続した。胎盤は絨毛膜の一部を、細切後トリプシン処理して得られた単細胞を、15%ウシ胎仔血清を含む $\alpha$ メディウムで、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で、付着細胞を継代培養して得たものである。

### 2. 臍帯由来間葉系幹細胞の性状の解析

樹立された間葉系幹細胞について、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞などの間葉系細胞への分化能と各々のマーカー遺伝子の発現を検討した。

### 3. 臍帯由来間葉系幹細胞を用いた関節内投与による軟骨再生

NOD/Scid マウスの両側膝関節に1N塩酸を50マイクロリットル投与して軟骨欠損モデルを作製し、一方の関節腔に臍帯由来間葉系幹細胞を注入して軟骨再生を試みた。

(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

### 1. 胎盤・臍帯由来間葉系幹細胞の樹立

胎盤・臍帯由来の3クローンの間葉系幹細胞(3クローン)は10%ウシ胎仔血清を含む培養液で継代培養を行い、confluent になったところで継代を継続している(資料1)。

### 2. 臍帯由来間葉系幹細胞の性状解析

フローサイトメトリー解析により、臍帯由来の付着細胞は、CD45<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD31<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD166<sup>+</sup>であることから間葉系幹細胞であることが確認された。また、間葉系幹細胞に発現が認められているマーカー遺伝子解析ではFlk1、PDGFRa、PDGFRb、CXCR4の発現が認められた(資料2)。

### 3. 間葉系細胞への分化能の解析

臍帯由来間葉系幹細胞についても分化誘導により、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞の誘導が可能であり、各々マーカー遺伝子発現が確認された(資料3)。

### 4. 臍帯由来間葉系幹細胞を用いた関節内投与による軟骨再生

NOD/Scid マウスの両側膝関節に塩酸を投与して軟骨欠損モデルを作製し、一方の関節腔に臍帯由来間葉系幹細胞を注入して軟骨再生を試みたが、3ヶ月後に関節内の軟骨に左右差が認められなかった。

#### D. 考察

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。今後は、in vivo での効率的な分化誘導法を確立して、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。

#### E. 結論

臍帯由来間葉系幹細胞は、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. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(雑誌)

- 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*. 164: 459-461, 2014.
- 8) 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*. 9: e87425.
- 9) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monn M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruk K, 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.
- 10) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruk K, Asano S, 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.
- 2.学会発表  
(学会)
- 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) Nanya M, Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Otsu M, Tozuka M, Nakauchi H, Tsuji K, Drug screening for the 8p11 myeloproliferative syndrome using patient iPS cells. 日本血液学会 札幌
- 3) Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Nagamachi A, Takubo K, Ebihara Y, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Suda T, Inaba T, Honda H, Generation and analysis of a novel model for CMML with acquired expression of CBL Q367P. 日本血液学会 札幌
- 4) 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、ヒト iPS 由来肥満細胞の機能解析、第 63 回日本アレルギー学会 東

京

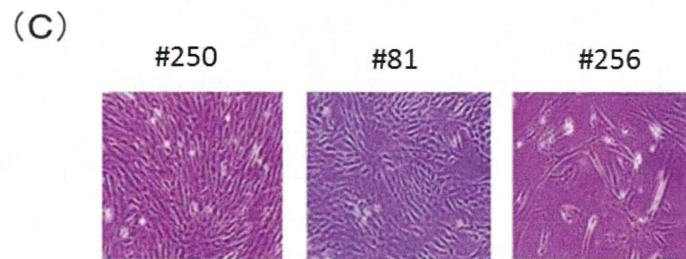
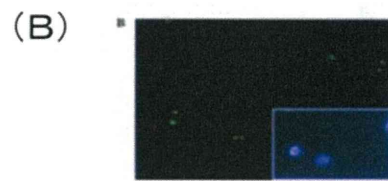
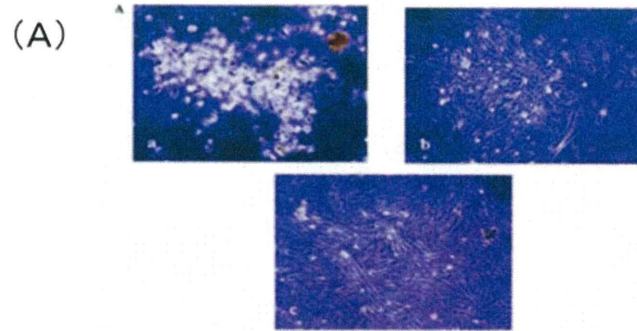
- 5) 海老原康博、望月慎史、大津真、竹谷英之、辻浩一郎,自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた血友病関節症に対する治療の可能性,第55回小児血液がん学会 福岡
- 6) 加藤せい子、小沼貴晶、川俣豊隆、海老原康博、望月慎史、東條有伸、高橋聡,骨髄破壊的前処置による臍帯血移植後の移植後リンパ増殖性疾患,第36回日本造血細胞移植学会 沖縄

**H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。



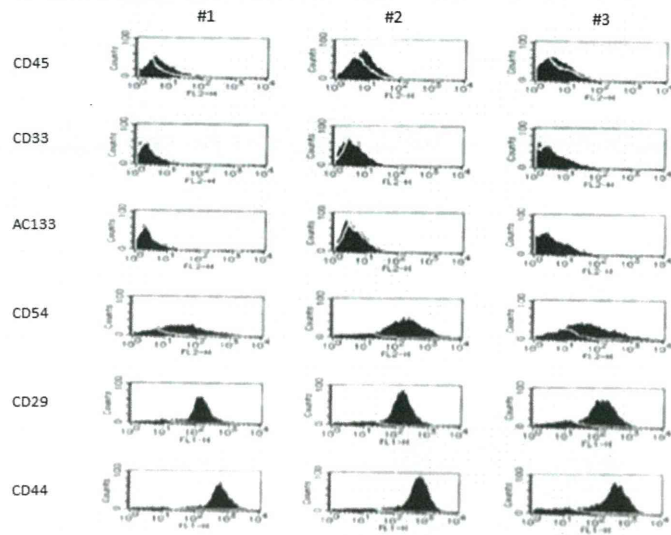
(資料1)



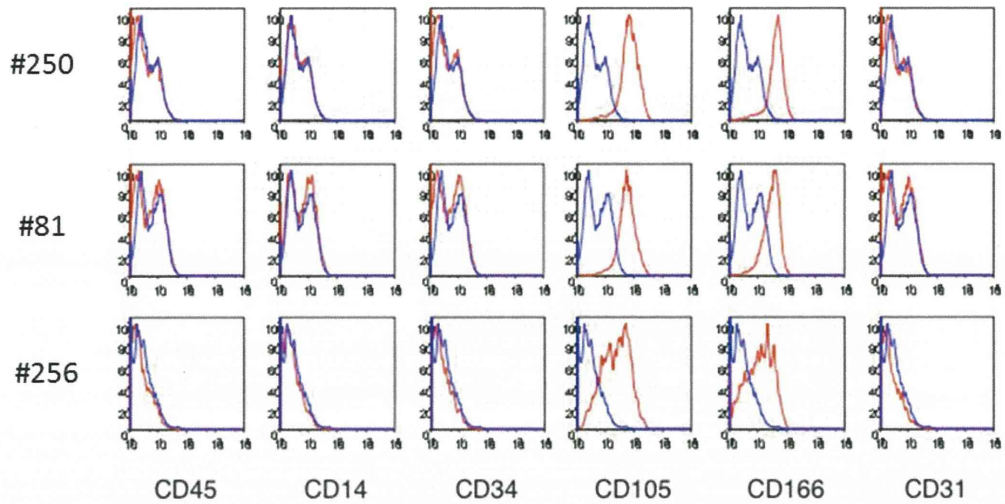
- (A) 培養6週目の胎盤由来間葉系幹細胞  
(B) 胎盤から培養された間葉系幹細胞で確認されたY染色体(FISH法)  
緑色のシグナルがY染色体、黄色のシグナルがX染色体を示す。  
(C) 臍帯由来間葉系幹細胞

(資料2)

(A) 胎盤由来間葉系幹細胞(3クローン)の細胞表面マーカーの解析

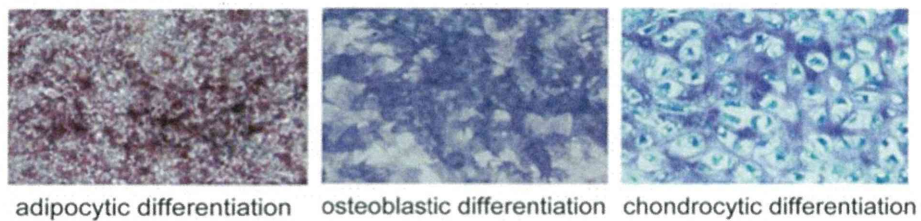


(B) 臍帯由来間葉系幹細胞(3クローン)の細胞表面マーカーの解析

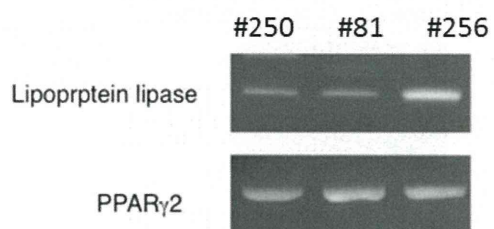
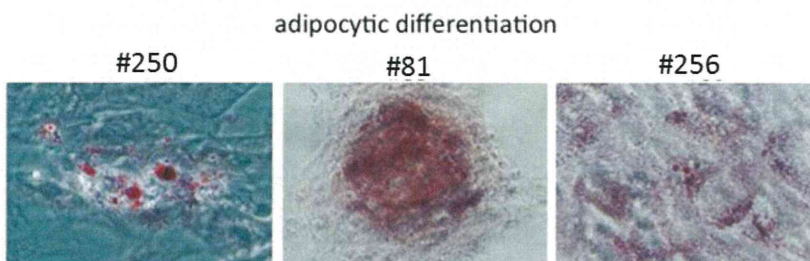


(資料3)

(A)胎盤由来間葉系幹細胞の間葉系細胞への分化能



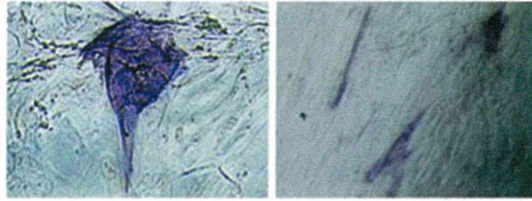
(B)臍帯由来間葉系幹細胞の間葉系細胞への分化能



osteoblastic differentiation

#250

#81



#250

#81

Osteopontin

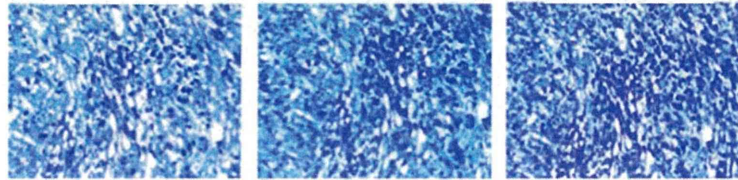


chondrocytic differentiation

#250

#81

#256



#250

#81

#256

CD44



Aggrecan



Sox 6



Sox 9



Collagen II



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hBMMSC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。*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

本分担研究では臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)の骨系統疾患治療への応用可能性検討を目的にhUCMSCの骨分化能解析を行った。

## B. 研究方法

hUCMSCは、東大医科研細胞リソースセンターで樹立、バンキングされ、個人情報情報が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(hBMMSC)を用いた。

*in vitro* 骨分化誘導：hUCMSCの骨分化誘導には、DAG(dexamethasone, ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate)試薬の他、recombinant human bone morphogenetic protein (BMP),  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  (VitD), Parathyroid hormone (PTH), Platelet derived growth factor (PDGF)を用いた。骨分化能の評価にはアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、活性定量試験を用いた。

移植実験： $5 \times 10^5$  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。

(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

平成24年度：東大医科研細胞リソースセンターから46サンプルのhUCMSCを譲受し、そこから3サンプル抽出し、hBMMSCとの骨分化能比較を行った。DAG+BMP2を添加した培地で1週間培養したところ、ALP活性の上昇は2/3のサンプルで認められた

が、その値は同条件で培養した hBMMSC より有意に低かった。この結果から hUCMSC の骨分化能には個体差があることが明らかになったため、全 46 サンプルの骨分化能を ALP 染色法を用いて解析したところ、hUCMSC の骨分化能には個体差があるが、その能力は hBMMSC に比し一様に低いことが明らかになった。

平成 25 年度 : 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* 骨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ですが、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, Wan J, 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) Matsuoka F, Takeuchi I, **Agata H**, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, & Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation

potential of human mesenchymal stem cells. *Plos One*, 8(2):e55082. doi: 10.1371/journal.pone.0055082.

それ以外（レビュー等）の発表 3件

- 1) Kagami H, **Agata H**, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 in press
- 2) 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.
- 3) **Agata H**. Isolation of Bone Marrow

Stromal Cells: Cellular Composition is Technique-Dependent, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, Prof. Jose A. Andrades (Ed.), ISBN: 978-953-51-1108-5, InTech, DOI: 10.5772/55543. Available from: <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/isolation-of-bone-marrow-stromal-cells-cellular-composition-is-technique-dependent>. 2013

#### 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、致命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しており腫瘍化も認めず、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 ( $1 \times 10^4$  個)を 24 ウェルにまき、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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 250  $\mu$ l 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 250  $\mu$ l/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  $\mu$ l 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

$\alpha$ -MEM に 15%FBS, 2mL penicillin/streptomycin, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -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 1 $\mu$ M 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%CO<sub>2</sub> 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 は呈色が得られた (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)

- 1) 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

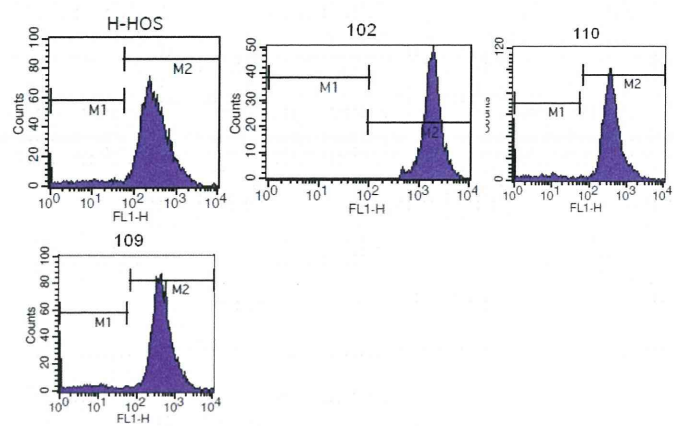
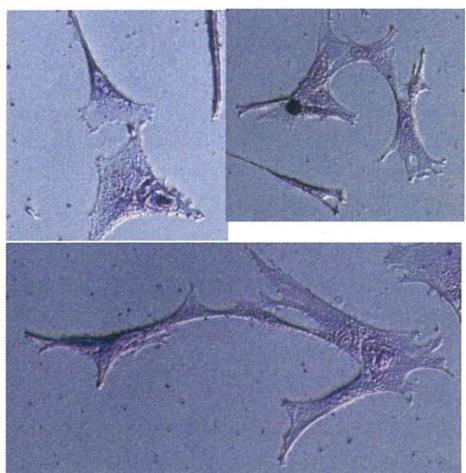


図 2. ALP 免疫染色



102