

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹谷 健

平成26(2014)年 3月

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 報告書 目次

I . 総括研究報告

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 -----1

竹谷健

II . 分担研究報告

1 . 細胞治療 ----- 15

竹谷健

(資料) 症例経過

2 . インフォームドコンセント、当該臨床研究の発展に対する方策、

成長発達評価 ----- 31

山口清次

3 . 間葉系幹細胞培養増殖 ----- 37

弓場俊輔

(資料) 細胞培養工程

4 . 骨形成能の研究 ----- 65

大串始

5 . 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からのiPS細胞の樹立

----- 73

福田誠司

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 89

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 91

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

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

研究代表者 竹谷 健（島根大学医学部附属病院輸血部・講師）

研究要旨

低ホスファターゼ症は、骨の石灰化障害を来たす疾患で、周産期および乳児期に発症した多くの症例は致死的な経過をとる。今回、我々はこの患者を救命するために、同種骨髄移植を行った後、同じドナーからの間葉系幹細胞を繰り返し投与する臨床研究を行った。これまで、2 症例に細胞治療を行い、骨の石灰化の回復により臨床症状および画像所見の改善を認めており、生命予後に貢献できた。また、間葉系幹細胞の投与による有害事象は発生しておらず、乳幼児でも安全に行うことができることを明らかにした。さらに、骨髄からの間葉系幹細胞の培養および輸送を適切に行うことができた。しかし、正常の骨構造および正常の運動精神発達には到達していないため、当該臨床研究が根治療法にはなり得ないことが明らかとなった。根治療法の確立のために、この疾患の病態解明だけでなく、最適な間葉系幹細胞移植方法の確立、間葉系幹細胞の細胞特性（遊走能、増殖能、免疫寛容効果）の向上を行う必要がある。国内外でこの疾患を含めた骨系統疾患における正常な機械特性を有する骨を再生する包括的な根治療法は確立されておらず、正常骨を再生する細胞移植治療の確立は急務である現在、骨化能が正常の同種間葉系幹細胞による骨再生医療は、患者およびその家族の QOL・ADL が改善し、医療費/社会福祉費の削減につながる。さらに、新規再生医療の確立により国益の向上を促す。

研究分担者 所属機関名及び所属機関における職名

山口清次 島根大学医学部小児科 教授

福田誠司 島根大学医学部小児科 准教授

弓場俊輔 産業技術総合研究所・健康工学研究部門 研究グループ長

2. インフォームドコンセント、当該臨床 研究の発展に対する方策、成長発達評価

この臨床研究が確立した治療ではなく、致死的な疾患に対する治療であるため、インフォームドコンセントの対応によっては、患者および家族に過度の期待を与えたり、不必要な負担をかけることが予想される。したがって、患者および家族が、この臨床研究を出来る限り正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、インフォームドコンセントを繰り返しかつ慎重に行った。また、それぞれの分野の専門家から当該臨床研究をより適切にかつ行うことができるために開催した外部評価委員会からの指摘から、当該臨床研究の発展に活かすための方策を検討した。さらに、これまでに当該治療を受けた患者の身体発育および精神発達を評価した。

A. 研究目的

低ホスファターゼ症は組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) 遺伝子変異によってALPが生まれつき働かないことで正常な骨形成が障害される常染色体優性遺伝性疾患である。特に、生後6か月以内に発症した場合、重篤な骨形成障害により、全身の骨が徐々に菲薄化・消失して、呼吸不全などで乳幼児期に死亡する。これまで、本疾患に対しては有効な治療法がなかった。しかし、この患者に、健常人の骨髄および骨、骨をつくる骨芽細胞や骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を移植することによりその提供者の細胞が患者の骨に到達して骨を作り、患者が救命されたことが報告されている。このことから、我々は2004年に当該疾患の患者に骨髄、間葉系幹細胞ならびに産業技術総合研究所(産総研)が独自に開発した培養骨の移植を行い、救命することができた経験を持つ。しかし、まだその方法や効果は確立していない。

3. 間葉系幹細胞培養

本臨床研究に不可欠で骨形成に必要な品質を保証した同種間葉系幹細胞をセルプロセッシングセンターで培養した。

1. 細胞治療

重症の致死的な低ホスファターゼ症の患者を救命するために、骨髄移植を行った後、繰り返し間葉系幹細胞移植を行う臨床研究を行った。

4. 骨形成能の研究

間葉系幹細胞移植前にみられる骨格の脆弱性の改善とドナー間葉系幹細胞が生着して骨へ分化しているか明らかにするために、移植前と移植後における患者の

画像解析を行うとともに、ドナー間葉系幹細胞の骨分化能を検証した。

5. 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

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、キメリズム解析を行い、また、本疾患の石灰化の機序ならびに中枢神経系などへの影響を明らかにするために病態解析を行った。さらに、培養した間葉系幹細胞が移植に適した細胞特性を持つための検討を行った。

B. 研究方法

1. 細胞治療

致死的な重症低ホスファターゼ症の診断後、ALP が正常なドナーから骨髄を提供していただき、まず患者に骨髄移植を行う。次に、採取された骨髄の一部を用いて産総研で培養・増殖した間葉系幹細胞を、患者に移植する。その後、症状および骨の状態などをみながら、間葉系幹細胞移植を繰り返し行う。評価項目として、生存率、臨床症状（呼吸状態、身体計測など）、骨の石灰化（生化学検査{ALP、骨型 ALP など}、画像検査{全身骨レントゲン、胸部レントゲン、骨塩定量など}、組織学的検査）および有害事象の検討を行う。

2. インフォームドコンセント、当該臨床研究の発展に対する方策、成長発達評価

当該臨床研究の計画書ならびに説明書を用いて、3 回説明を行い、また、医療従事者がいない状態でご家族同士の話し合いの場を設けた上で、同意を確認する。また、当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、また、重篤な有害事象や予期せぬトラブルが生じた場合、ご助言を頂くために、それぞれの専門分野の第一人者に外部評価委員になって頂き、過去 2 年間開催した外部評価委員会の指摘から、当該臨床研究の発展のための方策を検討した。さらに、患者の身体発育および精神発達に関して、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に評価した。

3. 間葉系幹細胞培養

島根大学で採取された骨髄を産総研に搬送し、セルプロセッシングセンターで骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。培養は牛胎児血清を含んでいる液体培地に採取した骨髄を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器内で行った。培養期間および継代回数は安全性を考え、1 ヶ月以内で継代回数 3 回（3 次培養）までとした。移植当日に間葉系幹細胞を剥離し、PBS に浮遊させた状態で島根大学へ搬送した。また、移植細胞の安全性は、ドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査で確認した。

の病態を解明するために、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試みた。

4. 骨形成能の研究

MSC 移植後の患者の骨形成に関しては、島根大学に出張し、実際の患者のレントゲン像および CT により検討をおこなった。また、ドナー同種間葉系幹細胞の骨分化を、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を用いて ALP 活性およびカルセインの取り込みにより行った。

5. 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞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。この理由として、間葉系幹細胞の遊走能や生着能が低いことが挙げられる。また、ALP 遺伝子変異の保因者をドナーとしていることが挙げられる。ALP 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ため、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必要がある。この課題を克服するために、臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。

我々の疫学調査において、この疾患は骨だけではなく中枢神経系や呼吸器にも

(倫理面への配慮)

当該研究は、島根大学医の倫理委員会および産総研の倫理委員会の承認を得た後、「ヒト幹細胞に用いる臨床研究に関する指針」において平成 22 年 6 月 21 日に厚生労働大臣の認可を得て行っている。また、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。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、治療法の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. 細胞治療

これまでの 2 症例について、細胞治療を行った。

症例 1

骨髄移植：1歳2か月の時に、父（HLA2座ミスマッチ）から骨髄移植を行った。骨髄は移植17日目に生着して、造血細胞は100%ドナータイプであることを確認した。移植合併症として、急性GVHD（skin; grade1, Liver; grade0, Gut; grade0）、粘膜障害（気切口）、肝機能障害を認めたが、対症療法で軽快した。なお、移植後8か月で骨髄はキメラ状態となり、ドナー細胞が10%前後まで低下して、そのままの状態を維持している。

間葉系幹細胞移植：これまで5回（1歳2か月、1歳6か月、2歳3か月、2歳8か月、3歳6か月）行った。平均移植細胞数 $1.4 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主目的：現在、4歳9か月で生存中である。

副目的：

1) 臨床症状

呼吸機能に関して、間葉系幹細胞移植を2回行った後から原病の合併症である気管攣縮が消失して、呼吸状態の明らかな改善を認め、2回目の移植後5か月頃からは日中は呼吸器を離脱でき、睡眠時に補助呼吸を行っている。胸郭もベル状から樽状に改善している。3歳6か月ごろから、息をとめる動作が出現して、脳波からてんかんと診断し、抗けいれん薬で発作は消失して、脳波上もてんかん波

は改善している。身長、体重および四肢の長さは3歳までは徐々に上昇していたが、3歳以降は横ばいである。知能は、原病による気管攣縮に伴う低酸素性脳症後遺症を合併しているが、視力や聴力（補聴器装着中）は徐々に改善しており、人見知りが激しく、好き嫌いがはっきりするようになった。

2) 骨の石灰化

画像検査では、長幹骨の骨端部から徐々に回復して、骨の石灰化の改善を認めているが、3歳すぎから石灰化が停滞している。また、長幹骨の長さも伸びなくなっている。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続している。骨形成マーカーは3歳以降低値を維持している。骨吸収マーカーのNTXと1CTPは低下してきた。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、骨塩定量は少しずつ上昇しているが、筋肉量は3歳以降横ばいである。しかし、4歳になって、骨面積が低下している。

3) 重篤な有害事象

骨髄移植の有害事象として、甲状腺機能低下症を合併しているが、甲状腺薬内服でコントロールが良好である。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

症例 2

骨髄移植：生後7か月の時に、母（HLA1座ミスマッチ）から骨髄移植を行った。骨髄は移植19日目に生着して、造血細胞は100%ドナータイプであることを確認し、現在までその状態を維持している。移植合併症として、急性GVHD（皮膚、消化管）を発症した。皮膚症状はステロイドで軽快したが、消化器症状（下痢、血便）はステロイドやその他の免疫抑制剤で改善しなかったが、2回目の間葉系幹細胞を移植した後から、劇的に改善した。その後、慢性GVHD（黄疸、肝機能障害）を来たしたが、間葉系幹細胞移植と免疫抑制剤により治癒した。

間葉系幹細胞移植：これまで9回（7か月、8か月、10か月、1歳、1歳2か月、1歳5か月、1歳9か月、2歳、2歳9か月）行った。平均移植細胞数 $1.8 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主目的：現在、3歳0か月で生存中である。

副目的：

1) 臨床症状

4回目の間葉系幹細胞移植以降は、気管れん縮が消失し、胸郭もベル状から樽状に改善しているが、人工呼吸管理中である。しかし、1歳9か月から、息をとめる動作が頻発して、脳波からてんかんと診断して、抗けいれん薬内服後、症状が消失した。1歳11か月の時に、てんかん発作および気管支喘息発作が重なり、気管れん縮が再増悪したため、2歳0か月

の時に8回目の間葉系幹細胞移植を行い、移植後1か月ごろから気管れん縮は消失した。2歳5か月に、重症肺炎および敗血症を発症し、抗菌薬の投与などで治癒したが、気管れん縮が再燃したため、2歳9か月に9回目の間葉系細胞移植を行い、移植後2か月からは認められなくなった。身長、体重および四肢の長さは徐々に上昇していたが、2歳以降その上昇スピードが停滞している。頸定および座位が可能となり、食事は経口摂取であったが、現在は経管栄養を併用している。知能は遅れているが少しずつ伸びており、難聴（補聴器装着中）も徐々に改善している。

2) 骨の石灰化

画像検査では、長幹骨および扁平骨ともに骨の石灰化が徐々に改善しており、特に頭蓋骨は骨の石灰化を全く認めなかったが、移植後に大泉門だけ残してすべて石灰化が回復していたが、2歳以降石灰化が低下している部分がみられている。生化学検査では、ALPは1歳8か月ごろから低下していたが、2歳6か月頃から、再上昇してきている。尿中PEAは1歳頃をピークに徐々に低下しており、現在はピーク時の25%まで下がった。骨形成マーカーは2歳からの半年間低下したが、それ以降再上昇している。また、骨吸収マーカーは一定の変化がみられない。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定し

たところ、どちらも上昇傾向がみられたが、骨面積は2歳以降低下している。

3) 重篤な有害事象

骨髄移植の有害事象として、急性 GVHD (skin; grade 2, Liver; grade 0, Gut; grade 4)および慢性 GVHD (Liver; grade 2)を発症したが、間葉系幹細胞と免疫抑制剤により軽快した。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

2. インフォームドコンセント、当該臨床研究の発展に対する方策、成長発達評価

1) インフォームドコンセント

これまで延べ12例の患者さんのご家族へインフォームドコンセントを行った。現時点で、臨床研究に参加、不参加、検討中がそれぞれ、2例、8例、2例である。不参加あるいは検討中の10例中8例が治療開始基準を満たさなかったり、経過中に死亡した。臨床研究を開始している2例については、骨髄移植を1回、間葉系幹細胞移植を複数回(5回および9回)行っている。そのたびに臨床研究の説明を行い、同意を得た後、治療を行っている。なお、説明の際、ご家族からの質問が多かった内容として、治療の効果のゴールおよび間葉系幹細胞移植を行う回数であった。

2) 当該臨床研究の発展に対する方策

最適な間葉系幹細胞移植方法の検討

骨髄移植を受けた患者の間葉系幹細胞は患者由来のままであることが報告されている。また、免疫抑制剤なしにはドナー由来間葉系幹細胞が生着することが困難であることも明らかとなっている。さらに、我々は免疫抑制剤なしに同種間葉系幹細胞が生着しないことをラットの実験で明らかにした。骨髄移植併用による同種間葉系幹細胞の生着効果を検討する。

また、ALP遺伝子変異を認めずかつ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を臨床的にも倫理的にも得やすい、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。

さらに、間葉系幹細胞を静脈内投与した場合、そのほとんどが肺の毛細血管でトラップされることが報告されている。したがって、間葉系幹細胞のhomingを高めるために、骨髄内の直接投与(髄腔内投与)する方法での検討も必要である。

間葉系幹細胞の生着率向上の必要性

我々が用いている間葉系幹細胞はドナー由来の骨髄から培養・増殖させた間葉系幹細胞である。培養した間葉系幹細胞はヘテロな集団であるため、すなわち、未分化な状態を維持しているものからある程度分化したものでさまざまである。したがって、間葉系幹細胞の遊走能、増

殖能および免疫寛容効果を高めるために、未分化能を維持して、かつ、骨への遊走能が高くかつ、増殖能に優れた間葉系幹細胞の単離培養方法の確立を目指す。

また、遺伝子改変した患者由来間葉系幹細胞あるいは疾患特異的 iPS 細胞を遺伝子改変して誘導した間葉系幹細胞を用いて、自家遺伝子改変間葉系幹細胞移植の効果も検討する。

ALP の機能解析

骨の石灰化に関して、患者由来間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いて、drug library screening を行い、骨の石灰化が改善する small molecule を同定することとした。また、樹立した患者由来 iPS 細胞を用いて、骨以外の組織に分化させて、それぞれの機能をみることで明らかにする。

3) 成長発達評価

遠城寺・乳幼児分析的発達検査法を用いて、移動運動、手の運動、基本的動作習慣、対人関係、言語理解を3か月ごとに評価した。発語の評価は気管切開を行っているため未評価とした。2 症例ともに、年齢を重ねるごとに発達しているが、年齢相当の発達には到達していない。

3 . 間葉系幹細胞培養

今回は、症例 2 に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った。30mL の骨髄を 3 週間かけて培養し、体重(kg)あたり 1×10^6 細胞以上、細胞生存率 80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の安全性試験結果はすべて異常なかった。また培養した間葉系幹細胞は、骨分化能を有していることが確認できた。また、骨髄および間葉系幹細胞の搬送(島根大学↔産総研)もスムーズかつ安全に行えた。

4 . 骨形成能の研究

症例1は移植による骨形成の促進、特に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、皮質骨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。症例2では移植前には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。この非石灰化骨端線は移植後長期でも改善していた。ただし、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。

両症例に対する複数回の間葉系幹細胞移植により、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。

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ところ、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。

5. 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

1) 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

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。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、臍帯由来間葉系幹細胞のロット間の差が認められた。

2) 患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

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可能を維持することが困難であった。

D. 考察

1. 細胞治療

これまで2症例について、細胞治療を行った。主目的である3年生存率は、2症例ともに達成できた。臨床症状について、呼吸機能の改善は、間葉系幹細胞移植以降は原病の合併症である気管れん縮が起こらないこと、移植により呼吸状態が安定することから、間葉系幹細胞移植が呼吸障害の改善に寄与していることが示唆された。しかし、呼吸器からの離脱ができていないこと、気管れん縮が再燃していることから、永続的な効果を得るには至っていない可能性がある。身体発育に関して、間葉系幹細胞移植の回数に関係なく、2歳過ぎてから身長と体重の伸びが停滞していることから、原疾患の症状をこの治療で完全にコントロールすることは困難であるかもしれない。中枢神経合併症である、精神発達遅滞や難聴などは徐々に改善はしているが、年齢相当までは回復していないため、今後注意深い観察が必要である。

骨の石灰化に関して、どちらの症例も間葉系幹細胞移植により骨の石灰化が改善していたが、移植前の骨の状態によりその改善度が影響する可能性が示唆された。また、どちらの症例ともに骨密度や筋肉量は保たれているが、正常な骨構造に達しておらず、骨面積が低下しているため、今後、慎重な経過観察が必要である。

永続的な効果が得られるかに関して、間葉系幹細胞を最後に移植してから、症例1は1年以上、症例2は4か月経過している。間葉系幹細胞がいつまで生着するか不明のため、今後の推移を慎重に評価する必要がある。また、現時点で臨床症状ならびに骨の石灰化は、正常な子供と同程度まで改善がみられていないことから、我々の治療プロトコールではその効果が限定的で十分ではないと思われた。

有害事象に関して、骨髄移植の合併症は予想範囲内であったが、免疫抑制剤抵抗性GVHDは間葉系幹細胞が有効であった。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていないため、乳幼児にも安全に行えることが明らかとなった。しかし、どちらの症例においても甲状腺機能低下症およびてんかんを発症した。これが疾患特異的有害事象なのか、現在のプロトコールの有害事象なのか、慎重に判断する必要がある。

2. インフォームドコンセント、当該臨床研究の発展に対する方策、成長発達評価

我々が複数回説明するだけでなく、臨床研究を行っている家族との話し合いの場を設けることにより、臨床研究に参加するかどうかを適切に判断する時の一助になっていると思われた。

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、過去2年間、外部評価委員会を

開催して、各専門分野の先生方からご助言を頂いた。これまでの臨床研究の成果と問題点から、臨床研究の目的は果たしているが、根治療法にはなり得ない可能性が高いことが明らかとなった。したがって、細胞治療による根治療法を確立するために、現在の患者さんの長期follow upとともに、最適な間葉系幹細胞移植方法の確立、間葉系幹細胞の細胞特性の向上、特に、骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果に優れた間葉系幹細胞の分離培養方法の確立を行う必要がある。

運動精神発達は年齢相当ではないが少しずつ伸びていることが明らかとなった。年齢に見合った発達が得られない原因として、現在の臨床研究での問題点である、正常の骨構造に到達できていないことが考えられる。また、骨以外の障害、特に中枢神経系障害への効果が不十分であることが推測される。

3. 間葉系幹細胞培養

計1回、移植用MSCの培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。培養した間葉系幹細胞の移植後1ヶ月前後から、それまでに見られた気管軟化症の症状は改善して、現在ではほとんど消失している。このことから、移植細胞が臨床症状の改善に寄与している可能性が示された。

細胞の搬送は陸路または空路で行っている。天候や交通事情により変更を余儀なくされることが予想されるため、安全

かつ適切な搬送体制の構築を行っていく必要がある。

4. 骨形成能の研究

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。したがって、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す、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する。

5. 由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

1) 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

臍帯由来間葉系幹細胞は、骨分化や遊走能において、骨髄由来間葉系幹細胞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、骨髄由来間葉系幹細胞の培養条件で骨芽細胞へ十分に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。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る。

2) 患者由来線維芽細胞からの 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 遺伝子に変異しており、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。

E. 結論

致死的で治療法のない重症低ホスファターゼ症に関して、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植が骨の石灰化を改善することにより生命予後を改善できることが示唆された。また、この治療により生じた有害事象も対応可能なものであった。しかし、正常な骨構造に到達していない

ため、根治療法の確立のために、この疾患の病態解明だけでなく、最適な間葉系幹細胞移植方法の確立、間葉系幹細胞の細胞特性（遊走能、増殖能、免疫寛容効果）の向上を行う必要がある。根治療法が確立した場合、生命予後の改善に寄与し、患者およびその家族の QOL・ADL の向上にもつながる。さらに、治療がない類似疾患や、酵素補充療法しか治療がない他の代謝疾患に対する治療へも応用できる可能性があるため、医療費や社会福祉費の負担軽減にもつながると思われる。

F. 健康危険情報

1. 細胞治療

- 1) 甲状腺機能低下症
甲状腺ホルモン内服で改善
- 2) 気管支炎、肺炎、蜂窩織炎
抗菌薬投与により軽快
- 3) 高血圧
免疫抑制剤の変更・調整および降圧剤の投与により改善
- 4) けいれん
高血圧の管理および免疫抑制剤の調整により消失
- 5) 急性 GVHD

免疫抑制剤の調整、および間葉系幹細胞の投与により軽快

6) てんかん

抗てんかん薬でコントロール良好

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療 弓場 俊輔、**竹谷健**
血液フロンティア特集「間葉系幹細胞を用いた細胞治療」医薬ジャーナル 23:53-59, 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.* 2013 Nov 25. doi: 10.1136/archdischild-2013-305037.

2. 学会発表

- 1) 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（会長 高戸毅）、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
 - 2) **竹谷健**、弓場俊輔、大串始．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（会長 高戸毅）、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
 - 3) **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（主催 島根県保険医協会/出雲支部）、出雲市、2013 年 7 月 2 日
 - 4) 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
 - 5) **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
 - 6) **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
 - 7) **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（会長 岡本真一郎）、沖縄、2014 年 3 月 7-9 日
- 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

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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

-細胞治療-

研究分担者 竹谷健（島根大学医学部附属病院輸血部・講師）

研究要旨

致死的で治療のない重症低ホスファターゼ症 2 例に対して、骨髄移植を行った後、間葉系幹細胞移植を繰り返し投与（5 回、9 回）する細胞治療を行った。生命予後に寄与している呼吸機能が改善したことから、主目的である 3 年生存率は到達できた。また、身体および精神の発育および骨の石灰化も徐々に回復するが、発達の伸びが停滞しており、正常の骨構造に到達しておらず、一部骨の石灰化が低下する部位もみられた。治療が必要な骨髄移植の有害事象（甲状腺機能低下症）を認めたが、後遺症を残さず軽快している。なお、間葉系幹細胞移植の有害事象は生じていないが、2 例ともにてんかんを発症した。現時点で正常な子供と同程度まで改善がみられていないことから、当該臨床研究の間葉系幹細胞移植の効果は限定的で十分ではないと思われた。最大の課題は移植後の生着細胞が十分でなく、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。この原因を明らかにして、根治療法としての細胞医療の確立に取り組む必要がある。

研究協力者

金井理恵（島根大学医学部小児科・講師）
鬼形和道（島根大学医学部小児科・講師）
小林弘典（島根大学医学部小児科・助教）
虫本雄一（島根大学医学部小児科・助教）
堀江昭好（島根大学医学部小児科・助教）
南憲明（島根大学医学部小児科・助教）
美根潤（島根大学医学部小児科・助教）
柴田直昭（島根大学医学部小児科・助教）
三原綾（島根大学医学部小児科・医員）
小山千草（島根大学医学部小児科・医員）
田部有香（島根大学医学部小児科・医員）
山本慧（島根大学医学部小児科・医員）

島根大学医学部附属病院小児センタースタッフ一同

A. 研究目的

低ホスファターゼ症は *TNSALP* 遺伝子変異によって ALP 活性が低下して、正常な骨形成が障害される常染色体優性遺伝性疾患である。特に、生後 6 か月以内に発症した場合、重篤な骨形成障害により、乳幼児期に死亡する。これまで、本疾患に対しては有効な治療法がなかった。しかし、この患者に、健常人の骨髄および骨、骨をつくる骨芽細胞や骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を移植することによりその提供者の細胞が患者の骨に到達して骨を作り、患者が

救命されたことが報告されている。このことから、我々は 2004 年に当該疾患の患者に骨髄、間葉系幹細胞ならびに産業技術総合研究所（産総研）が独自に開発した培養骨の移植を行い、救命することができた経験を持つ。したがって、根治療法のない重症低ホスファターゼ症の患者を救うことを目的として、骨髄移植と間葉系幹細胞移植を行う臨床研究を行った。

本臨床研究の主目的として、3 年間生存することとした。また、副目的として、臨床症状の改善度（呼吸機能、発育・発達、身長体重、四肢の長さなど）、骨の石灰化（血液検査、レントゲン、骨塩定量など）の改善度、有害事象の評価とした。

B. 研究方法

1. 重症低ホスファターゼ症の対象患者

生後 6 か月以内に発症、呼吸障害の合併、ALP 活性の低い *TNSALP* 遺伝子変異、間葉系幹細胞の骨形成能の低下、の 4 つを満たす患者

2. 骨髄提供者の選定

TNSALP 遺伝子、HLA 検査などから、患者の家族の中から最適な骨髄提供者を選ぶ。

3. 骨髄提供者からの骨髄採取

最適な骨髄提供者に骨髄採取の説明を行い同意が得られた後、骨髄を採取する。

4. 骨髄移植

1) 移植時期

重症低ホスファターゼ症の診断が確定した後、生後 6 か月以降に移植を行う。

2) 骨髄移植の前処置

ブスルファン(BU)、シクロフォスファミド(CY)、抗胸腺グロブリン(ATG)の 3 剤を用いる。

3) GVHD 予防

メソトレキセート(MTX)とタクロリムス(FK506)を用いる。

4) その他

骨髄移植を行うに当たり、抗がん剤の副作用対策や感染対策、輸血、栄養管理などは通常の骨髄移植に準じて行う。

5. 間葉系幹細胞の培養増殖

島根大学で採取された骨髄は産総研に搬送され、牛胎児血清を含んでいる液体培地を用いて培養する。牛血清は狂牛病との関連が危惧されているが、牛海綿状脳症の発生していない地域（ニュージーランドあるいはオーストラリア）の牛の血清を使用すること、放射線照射などによる最大限の滅菌処理を行うことなどで可能な限りの対処を行う。

6. 間葉系幹細胞移植

1) 移植時期

骨髄移植 14～21 日後

2) 患者への間葉系幹細胞の投与

間葉系幹細胞（移植必要細胞数：患者体重当たり 10^6 個/kg）は生理食塩水に懸濁後、経静脈的に 1 時間かけて投与する。

7. 再移植の基準と方法

これまでの報告また我々の経験から、間葉系幹細胞を単回移植しただけでは正常な骨形成を回復させることができないことが想定され、間葉系幹細胞移植を繰り返し行う必要がある。そのため、移植後に、症状が悪化したり改善がみられない場合、間葉系幹細胞のみを再移植する。

（倫理面への配慮）

当該研究は、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、「ヒト幹細胞に用いる臨床研究に関する指針」において平成22年6月21日に厚生労働大臣の認可（資料2）を得て行っている。

C. 研究結果

症例1

移植までの経過：胎児期より四肢短縮を指摘されていた。在胎週数40週1日、出生体重正常経膈分娩で出生。多呼吸を認め、ALPの低値（7IU/L）ALPの基質である尿中 Phosphoethanoamine (PEA)の高値（5727.4 nmol/mgCr）、骨の石灰化不全、骨端部のくる病様変化、狭胸郭から、周産期型低ホスファターゼ症と診断した。生後3か月から、生後3ヶ月をすぎた頃から、急速に換気不全進行し、人工呼吸開始し、4か月時に気管切開を行った。遺伝子検査では、*TNSALP* 遺伝子の1559delTのhomozygous mutationを認め、骨髄間葉系幹細胞の骨形成能の低下を認めたため、重症低ホスファターゼ症と診断した。

骨髄移植：1歳2か月の時に、父（HLA2座（B, DR）ミスマッチ）から骨髄移植を行った（血液型同型、移植細胞数 $3.56 \times 10^8/\text{kg}$ ）。前処置はBU+CY+ATGで行い、浮腫を認めたが対症療法で軽快した。GVHD予防としてshort term MTX およびFK506を使用した。骨髄は移植17日目に生着して、造血細胞は100%ドナータイプであることを確認した。移植合併症として、急性GVHD（skin; grade1, Liver; grade 0, Gut; grade 0）、粘膜障害（気切口）、肝機能障害を認めたが、対症療法で軽快した。なお、移植後8か月で骨髄はキメラ状態となり、ドナー細胞が10%前後まで低下して、そのままの状態を維持している。

間葉系幹細胞移植：これまで5回（1歳2か月、1歳6か月、2歳3か月、2歳8か月、3歳6か月）行った。平均移植細胞数 $1.4 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主目的：現在、4歳9か月で生存中である。

副目的：

1) 臨床症状

呼吸機能に関して、間葉系幹細胞移植を2回行った後から原病の合併症である気管攣縮が消失して、呼吸状態の明らかな改善を認め、2回目の移植後5か月頃からは日中は呼吸器を離脱でき、睡眠時に補助呼吸を行っている。胸郭もベル状から樽状に改善している。3歳6か月ごろから、息をとめる動作が出現して、脳波からてんかんと診断し、抗けいれん薬で発作は消失して、脳波上もてんかん波は改善している。身長、体重および四肢の長さは3歳までは徐々に上昇していたが、3歳以降は横ばいである。知能は、原病による気管攣縮に伴う低酸素性脳症後遺症を合併しているが、視力や聴力（補聴器装着中）は徐々に改善しており、人見知りが激しく、好き嫌いがはっきりするようになった。

2) 骨の石灰化

画像検査（レントゲン、CT）では、長幹骨の骨端部から徐々に回復して、骨の石灰化の改善を認めているが、3歳過ぎてから石灰化が停滞している。また、長幹骨の長さも伸びなくなっている。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続しており、骨形成マーカーである骨型ALP（BAP）、オステオカルシン（OC）、低カルボキシル化オステオカルシン（ucOC）、インタクト1型プロコラーゲンNプロペプチド（intact P1NP）、骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリン（DPD）、1型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）、1型コラーゲン-C-テロペプチド（1CTP）、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRACP-5b）を測定したところ、骨形成マーカーは3歳以降低値を持続している。骨吸収マーカーのNTxと1CTPは低下してきた。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、骨塩定量は少しずつ上昇しているが、筋肉量は3歳以降横ばいである。しかし、4歳になって、骨面積が低下しているため、今後の慎重な経過観察が必要である。

3) 重篤な有害事象

骨髄移植の有害事象として、甲状腺機能低下症を合併しているが、甲状腺薬内服でコントロールが良好である。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

症例 2

移植までの経過：妊娠中羊水過多がみられたが、骨の異常は指摘されていなかった。在胎 41 週 2 日、出生体重 3,790g、正常経膈分娩で出生。出生後、徐々に呼吸状態が悪化して、気管内挿管後、人工呼吸を開始した。ALP が低値(9 IU/L)で、レントゲンで、胸郭低形成、骨幹端の不整を認めたため、周産期型低ホスファターゼ症と診断した。生後 5 日に痙攣がありピリドキシン内服開始、以後痙攣は起きていない。生後 1 か月時に気管切開術を施行した。遺伝子型で、*TNSALP* 遺伝子の 1559delT の homozygous mutation を認め、骨髄間葉系幹細胞の骨形成能の低下を認めたため、重症低ホスファターゼ症と診断した。

骨髄移植：生後 7 か月の時に、母 (HLA1 座 (B)ミスマッチ) から骨髄移植を行った (血液型 major mismatch (ドナー B 型、レシピエント A 型)、移植細胞数 (CD34 細胞) $8.83 \times 10^6/\text{kg}$)。前処置は BU+CY+ATG を行ったが、ATG に伴う著明な浮腫を認めたため、ATG を減量した。GVHD 予防として short term MTX および FK506 を使用したが、FK506 による高血圧およびけいれんを発症したため、FK506 を中止して、シクロスポリン (CyA) に変更した。骨髄は移植 19 日目に生着して、造血細胞は 100% ドナータイプであることを確認し、現在までその状態を維持している。移植合併症として、急性 GVHD (skin grade 2, Liver 0, Gut 4) を発症した。皮膚症状はステロイドで軽快した。しかし、消化器症状 (下痢、血便) はステロイドやその他の免疫抑制剤で改善しなかったが、2 回目の間葉系幹細胞を移植 (生後 8 か月) した後から、

劇的に改善して軽快した。また、移植 55 日目から、原因不明の腹水が貯留したが、腹水穿刺で軽快した。さらに、移植 3 か月ごろから、黄疸および肝機能障害が出現したが、FK506 の投与により治癒した (慢性 GVHD 疑い)。

間葉系幹細胞移植：これまで 9 回 (7 か月、8 か月、10 か月、1 歳、1 歳 2 か月、1 歳 5 か月、1 歳 9 か月、2 歳、2 歳 9 か月) 行った。平均移植細胞数 $1.8 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主目的：現在、3 歳 0 か月で生存中である。

副目的：

1) 臨床症状

4 回目の間葉系幹細胞移植以降は、気管れん縮が消失し、胸郭もベル状から樽状に改善しているが、人工呼吸管理中である。しかし、1 歳 9 か月から、息をとめる動作が頻発して、脳波からてんかんを診断して、抗けいれん薬内服後、症状が消失した。1 歳 11 か月の時に、てんかん発作および気管支喘息発作が重なり、気管れん縮が再増悪したため、2 歳 0 か月の時に 8 回目の間葉系幹細胞移植を行い、移植後 1 か月ごろから気管れん縮は消失した。2 歳 3 か月の時に、在宅に向けて、近医に転院したが、2 歳 5 か月に、重症肺炎および敗血症を発症し、抗菌薬の投与などで治癒した。しかし、重症の感染症であったため、低栄養から起因する体重減少も伴い、このころから、気管攣縮が再燃したため、2 歳 7 か月に再度入院となった。2 歳 9 か月に 9 回目の間葉系細胞移植を行った後から、体重は元に戻り、気管攣縮も移植後 2 か月からは認められなくなった。身長、体重および四肢の長さは徐々に上昇していたが、2 歳以降その上昇スピードが停滞している。頸定および座位が可能となり、食事は経口摂取であったが、現在は経管栄養を併用している。知能は遅れているが少しずつ伸びており、難聴 (補聴器装着中) も徐々に改善している。

2) 骨の石灰化

画像検査 (レントゲン、CT) では、長幹骨お

よび扁平骨ともに骨の石灰化が徐々に改善しており、特に頭蓋骨は骨の石灰化を全く認めなかったが、移植後に大泉門だけ残してすべて石灰化が回復していたが、2歳以降石灰化が低下している部分がみられている。生化学検査では、ALPは1歳8か月ごろから低下していたが、2歳6か月頃から、再上昇してきている。尿中PEAは1歳頃をピークに徐々に低下しており、現在はピーク時の25%まで下がった。骨形成マーカーであるBAP、OC、ucOCおよびintactP1NPは2歳からの半年間低下したが、それ以降再上昇している。また、骨吸収マーカーであるNTxは低値を持続しているが、DPD、TRACP-5bおよび1CTPは一定の変化がみられない。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、どちらも上昇傾向がみられた。しかし、2歳以降、骨面積が低下しているため、今後の慎重な経過観察が必要である。

3) 重篤な有害事象

骨髄移植の有害事象として、急性GVHD (skin; grade 2, Liver; grade 0, Gut; grade 4)および慢性GVHDを発症したが、間葉系幹細胞と免疫抑制剤により軽快した。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

D. 考察

これまで2症例について、細胞治療を行った。主目的である3年生存率は、2症例ともに達成できた。臨床症状について、呼吸機能の改善は、間葉系幹細胞移植以降は原病の合併症である気管れん縮が起こらないこと、移植回数を増やすことで呼吸状態が安定すること、胸郭が樽状に改善していることから、間葉系幹細胞移植が呼吸障害の改善に寄与していることが示唆された。しかし、呼吸器からの離脱ができていないこと、症例2ではてんかんや気管支喘息に伴い気管れん縮が再燃しているため、永続的な効果を得るには至っていない可能性がある。身体発育に関して、間葉系幹細胞移植の回数に関係

なく、2歳過ぎてから身長と体重の伸びが停滞していることから、原疾患の症状をこの治療で完全にコントロールすることは困難であるかもしれない。中枢神経合併症である、精神発達遅滞や難聴などは徐々に改善はしているが、年齢相当までは回復していないため、今後注意深い観察が必要である。骨の石灰化に関して、どちらの症例も間葉系幹細胞移植により骨の石灰化が改善していたが、移植前の骨の状態によりその改善度が影響する可能性が示唆された。また、どちらの症例ともに骨密度や筋肉量は保たれているが、正常な骨構造に達しておらず、骨面積が低下しているため、今後、慎重な経過観察が必要である。生化学検査に関して、症例2では改善しているが症例1では低値のままである。この理由として、ドナー由来骨髄の生着率に関して、症例1が10%であることに対して、症例2は100%現時点であることから、ドナー由来間葉系幹細胞の生着率も症例2の方が高い可能性があり、このことが生化学検査に反映していると推測される。なお、症例2に関して、骨形成マーカーが1歳8か月から約1年間低下して、その後再上昇していることがみられた。FK506は短期には骨分化を促進するが、長期間しようすると骨形成が低下することがヒトでもマウスでも報告されていることから、GVHDに対する免疫抑制剤であるFK506を長期間使用した影響が考えられる。

永続的な効果が得られるかに関して、間葉系幹細胞を最後に移植してから、症例1は1年以上、症例2は4か月経過している。間葉系幹細胞がいつまで生着するか不明のため、今後の推移を慎重に評価する必要がある。また、現時点で臨床症状ならびに骨の石灰化は、正常な子供と同程度まで改善がみられていないことから、我々の治療プロトコルではその効果が限定的で十分ではないと思われた。

骨髄移植の有害事象に関して、感染症はコントロール可能であったが、前処置の薬剤による

浮腫が2例ともに認めている。また、どちらの症例もGVHDを発症し、特に症例2では免疫抑制剤が十分に使用できなかったことにより重症の消化管GVHDを発症したが、間葉系幹細胞移植により劇的に軽快した。間葉系幹細胞のGVHDへの効果は成人ではその有効性が示されているが、小児でも効果があることが示された。また、2例とも、骨髄移植後甲状腺機能低下症を発症したが、甲状腺ホルモンを内服することで症状は認めていない。間葉系幹細胞移植の有害事象に関して現時点では認めていないため、乳児にも安全に行えることが明らかとなった。なお、2例ともに、息をとめるてんかん発作を発症したが、抗てんかん薬（カルバマゼピン）でコントロール良好である。骨髄移植や間葉系幹細胞移植との関連は、これまでの報告と経過から関係ないと思われ、原病の合併症であるてんかんを発症していることが考えられる。しかし、原病によるてんかんであればビタミンB6依存性であることが多いため、症例を蓄積することでてんかんの原因が明らかになると思われる。

E. 結論

致死的で治療法のない重症低ホスファターゼ症に関して、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植が一定の効果を認めることが示唆された。しかし、これまでの臨床研究で問題点も明らかとなった。最大の課題は移植後の生着細胞が十分でなく、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。この原因を明らかにして、根治療法としての細胞医療の確立に取り組む必要がある。

F. 健康危険情報

てんかん

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) 間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療 弓場 俊輔、**竹谷健** 血液フロンティア特集「間葉系幹細胞を用いた細胞治療」医薬ジャーナル 23:53-59, 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(3):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.* 2013 Nov 25. doi: 10.1136/archdischild-2013-305037.
2. 学会発表
- 1) 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(会長 高戸毅) 横浜、2013年3月21-23日
 - 2) **竹谷健**、弓場俊輔、大串始．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(会長 高戸毅) 横浜、2013年3月21-23日
 - 3) **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(主催 島根県保険医協会/出雲支部) 出雲市、2013年7月2日
 - 4) 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
 - 5) **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

6) **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

7) **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(会長 岡本真一郎) 沖縄、2014年3月7-9日

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

症例1：01 Male

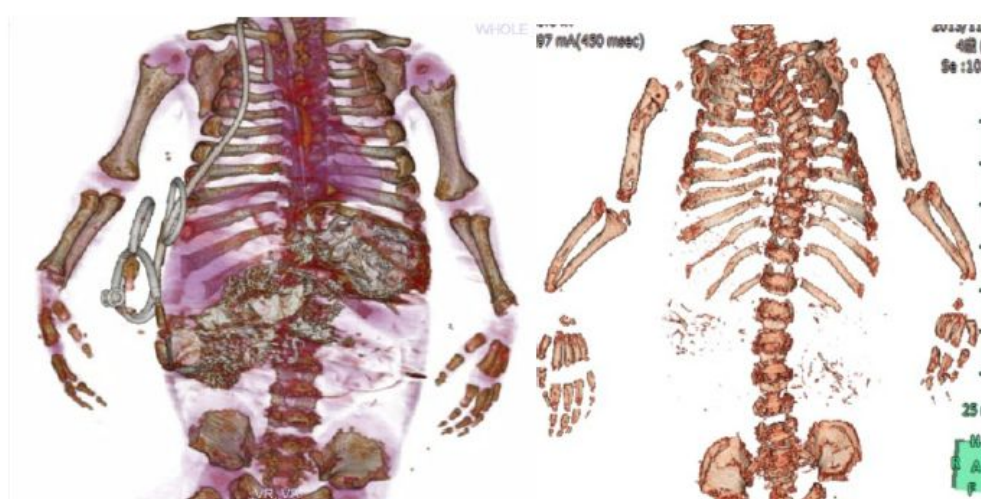
骨髄移植	
年齢	1歳2か月
ドナー	父（保因者）
血液型	A→A
HLA	HLA 2 locus (B, DR) mismatch
移植細胞数	$3.56 \times 10^8 / \text{Kg}$
間葉系幹細胞移植	
移植回数	5回
移植時期	1歳2か月～3歳6か月
移植細胞数	平均 $1.4 \times 10^6 / \text{kg}$

1

骨CT

1歳2か月（移植前）

4歳6か月（移植後）



骨CT

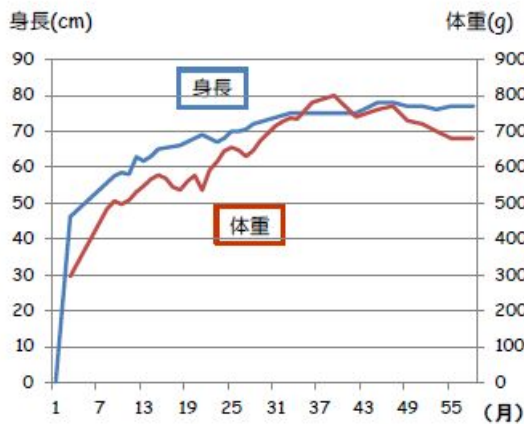
1歳2か月（移植前）



4歳6か月（移植後）

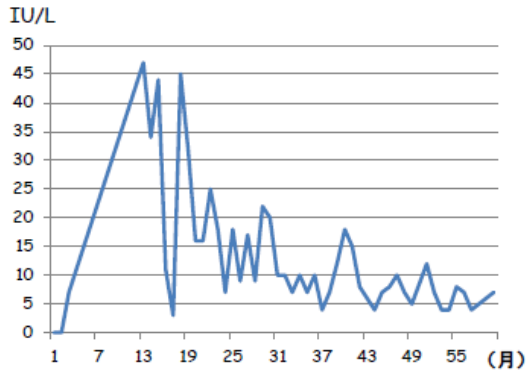


身長・体重・上肢長・下肢長

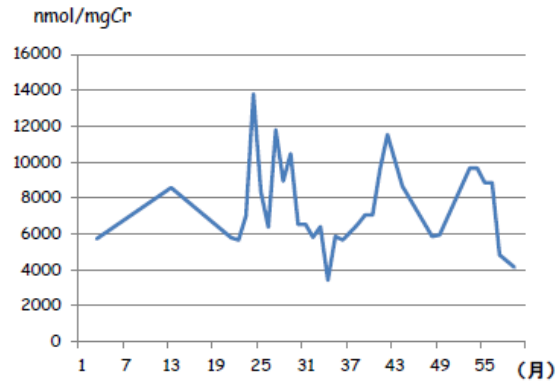


ALP・U-PEA

ALP

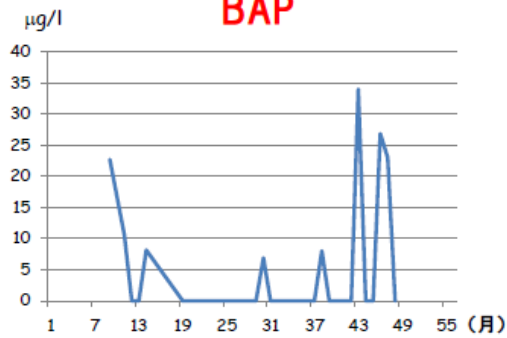


U-PEA

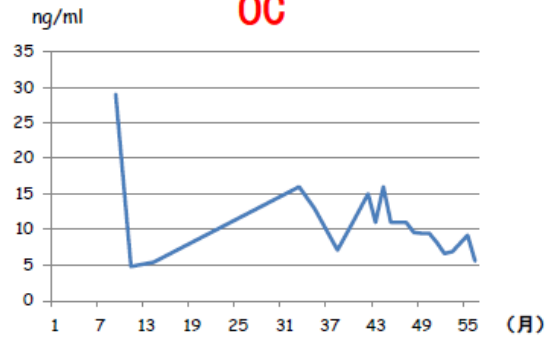


骨形成マーカー

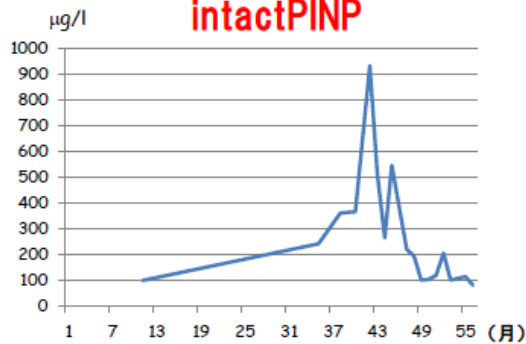
BAP



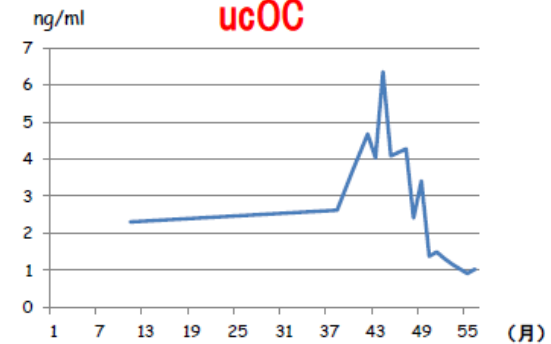
OC



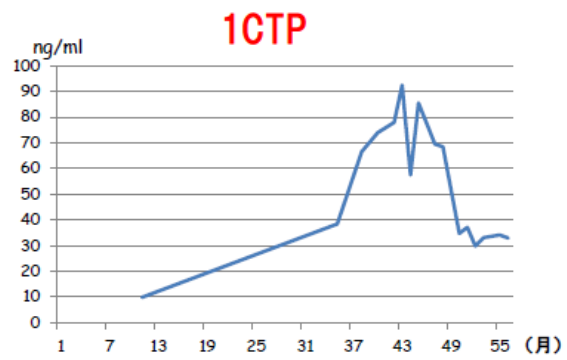
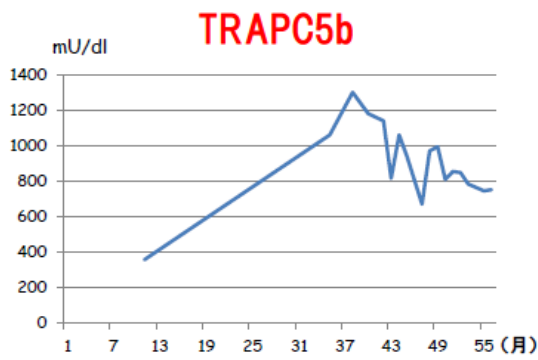
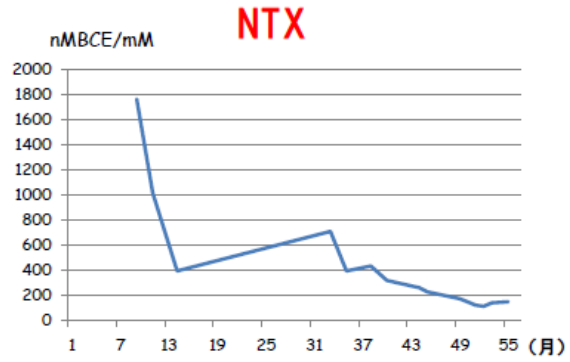
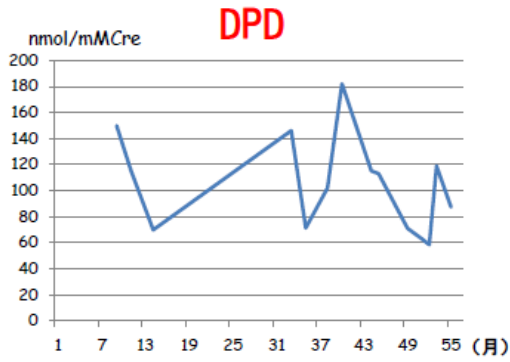
intactPINP



ucOC

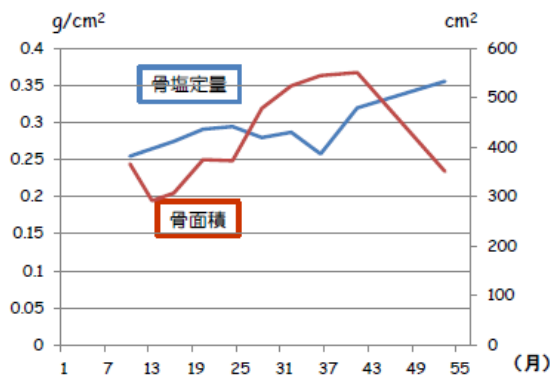


骨吸収マーカー

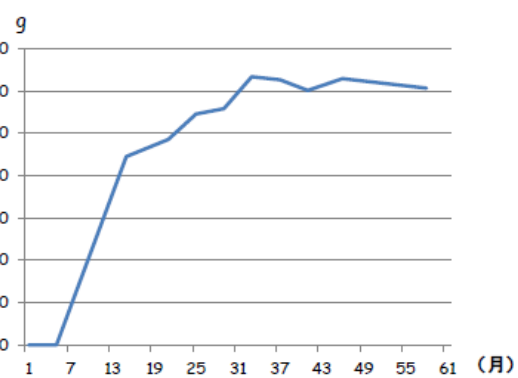


骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



筋肉量

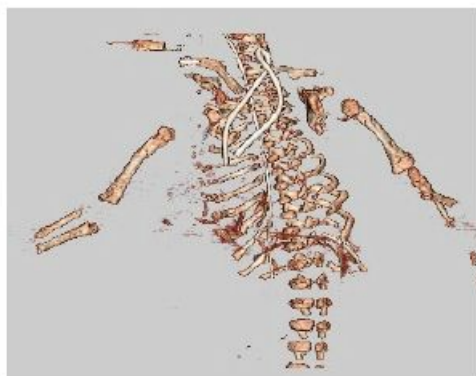


症例2：05 Male

骨髄移植	
年齢	7か月
ドナー	母（保因者）
血液型	A→B
HLA	HLA 1 locus (B) mismatch
移植細胞数	CD34 $8.83 \times 10^6 / \text{Kg}$
間葉系幹細胞移植	
移植回数 移植時期 移植細胞数 ($10^6 / \text{kg}$)	9回 7か月～2歳9か月 平均 $1.8 \times 10^6 / \text{kg}$

骨CT

6か月（移植前）



2歳（移植後）



骨CT

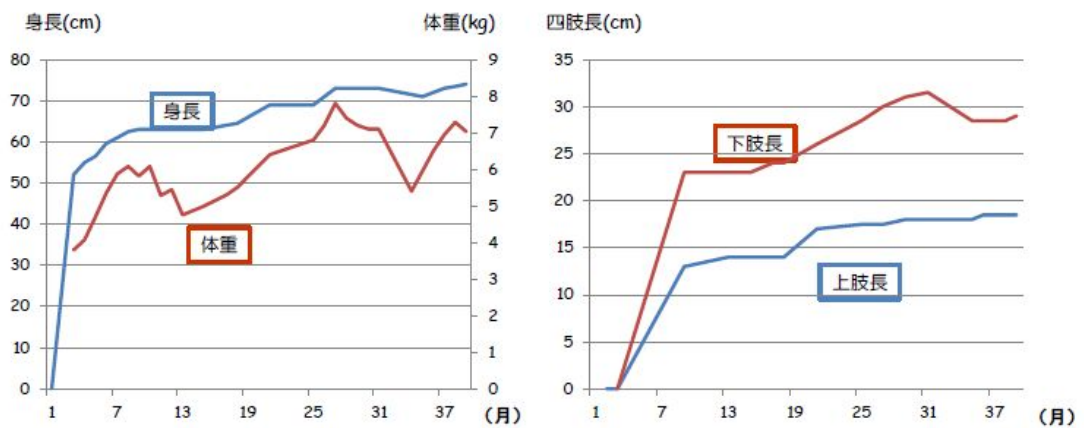
6か月（移植前）



2歳（移植後）

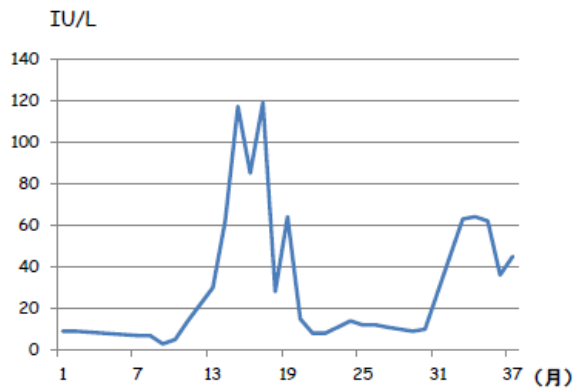


身長・体重・上肢長・下肢長

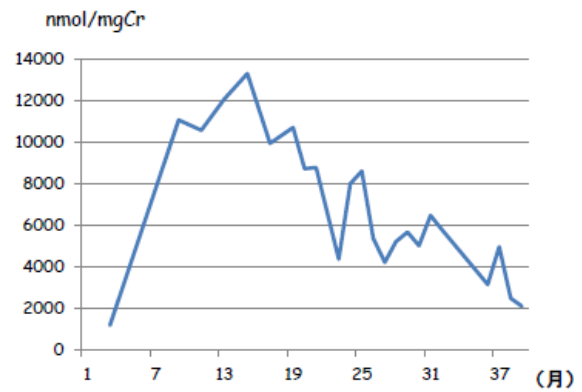


ALP・U-PEA

ALP

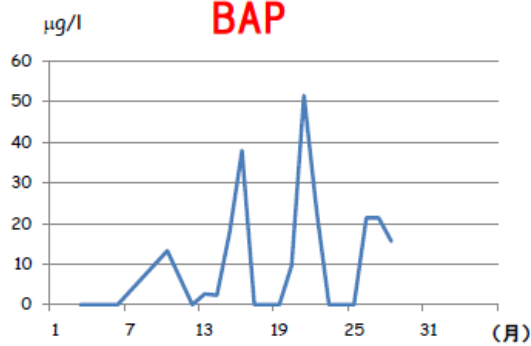


U-PEA

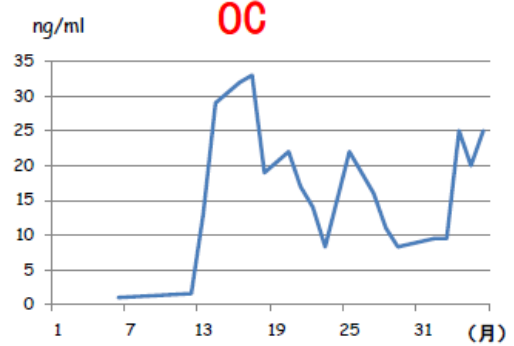


骨形成マーカー

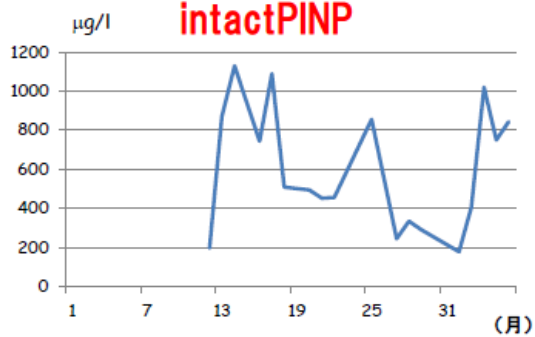
BAP



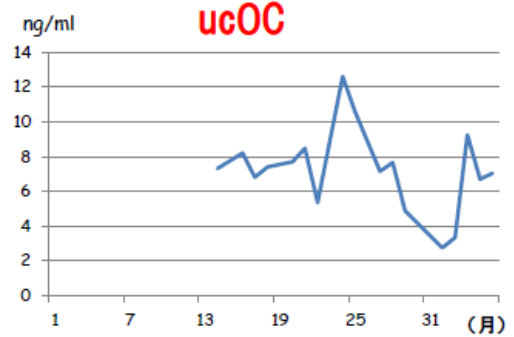
OC



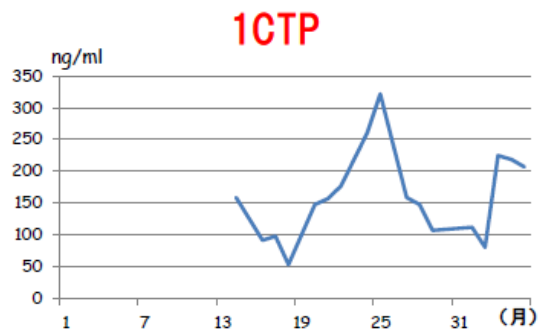
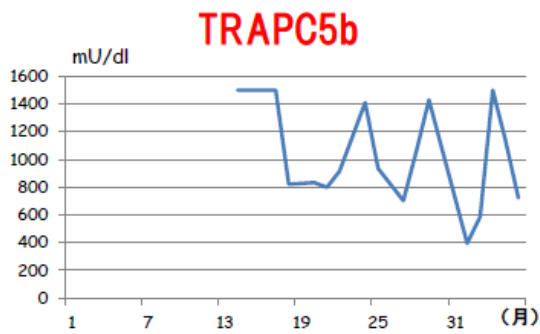
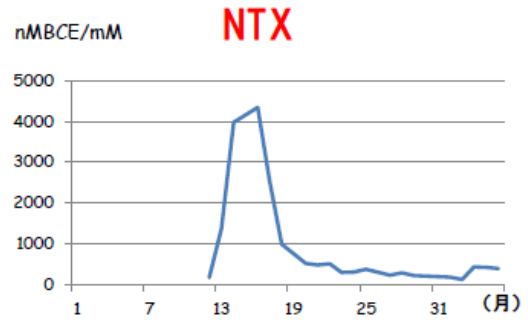
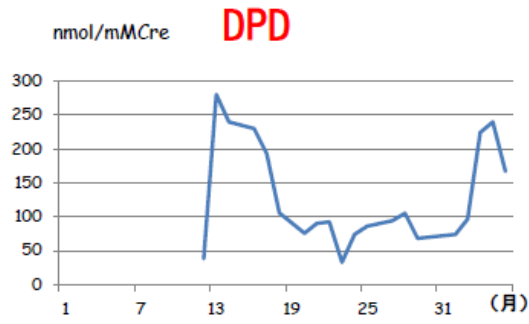
intactPINP



ucOC

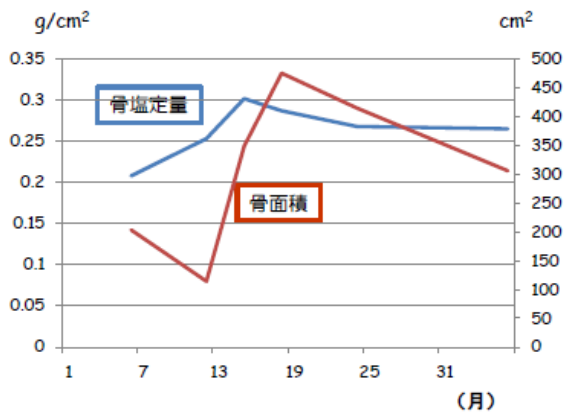


骨吸収マーカー

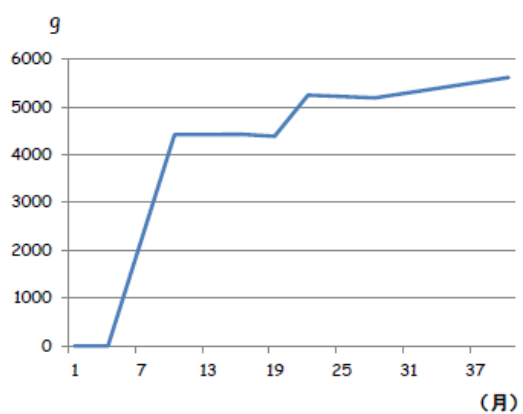


骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



筋肉量



2症例のまとめ

		症例 1	症例 2
移植回数	BM	1	1
	MSC	5	9
ドナーの生着	骨髄	10%	100%
	MSC	+(3歳5か月)	+(1歳9か月)
Primary endpoint			
3年生存率		clear	
Secondary endpoints			
臨床症状	呼吸機能	改善	
	発育発達	歩行訓練	頸定、寝返り
	難聴	回復	
骨の石灰化の評価	画像検査	改善	
	骨型ALP	変化なし	上昇
	病理所見	石灰化の回復	
重篤な合併症	BMT	甲状腺機能低下症	
	MSCT	なし	

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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
-インフォームドコンセント、当該臨床研究の発展に対する方策、成長発達評価
研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科・教授）**

研究要旨

当該臨床研究を正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、複数回説明し、かつ、同じ病気の疾患を持つご家族との話し合いの場を設けることにより、ご家族が臨床研究への参加を適切に判断できていると思われた。しかし、移植医療への説明不足と遠方での治療が臨床研究への参加を躊躇する原因となっていた。また、臨床研究に対する外部評価委員会の評価から、臨床研究の目的は果たしているが、根治療法にはなり得ない可能性が高いことが明らかとなった。したがって、細胞治療による根治療法を確立するために、間葉系幹細胞の細胞特性を向上させた（骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果に優れた）間葉系幹細胞の分離培養方法の確立および最適な間葉系幹細胞移植方法（骨髄移植、髄腔内投与、臍帯血移植および臍帯由来間葉系幹細胞移植など）の樹立を行う必要がある。さらに、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に成長発達を評価した結果、運動精神発達は細胞治療により年齢相当ではないが徐々に伸びていることが明らかとなった。

研究協力者

大園恵一(大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学小児科学・教授)

加藤俊一(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授)

杉本利嗣(島根大学医学部内科第一・教授)

鈴宮淳司(島根大学医学部附属病院腫瘍センター・教授)

服部耕治(甲南女子大学看護リハビリテーション学部理学療法学科・教授)

室月淳(宮城県立こども病院産科・部長)

矢田昭子(島根大学医学部看護学科臨床看護学講座小児看護学・准教授)

竹谷健(島根大学医学部附属病院輸血部・講師)

蓼沼拓(島根大学医学部附属病院リハビリテーション部)

鳥屋尾ゆう子(島根大学医学部附属病院リハビリテーション部)

A. 研究目的

致死的で治療のない先天性疾患は、そ

それぞれの疾患単位では頻度は少ないが、その病気を持った患者およびその家族だけでなく、医療従事者の医療的、経済的および心理的な負担は計り知れない。重症低ホスファターゼ症も、現時点では確立した治療法がなく、致死的な経過をとる疾患である。この病気に対して、我々は当該臨床研究を行っている。この臨床研究も確立した治療ではないが、インフォームドコンセントの対応によっては、患者および家族に過度の期待を与えたり、不必要な負担をかけることが予想される。したがって、患者および家族が、この臨床研究を出来る限り正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、下記の方法でインフォームドコンセントを行った。

当該臨床研究は、確立した治療ではないため、小児医療、整形外科医療、移植医療、骨代謝、再生医療、周産期医療、致死性疾患に対する臨床研究および倫理的配慮などの多岐にわたる分野において、それぞれの専門性が求められる。当該臨床研究を進めるにあたり、それぞれの担当者を配置して体制を整えている。しかし、各専門に対する知識および対応に関しては、我々の体制だけでは十分とは言えない。したがって、それぞれの分野の専門家から当該臨床研究をより適切に行うことができるよう指導を受けるために過去 2 年間に開催した外部評価委員会からの指摘事項をもとに、当該臨床研究の発展させる方策を検討した。

さらに、当該臨床研究を行うことによって救命し骨の石灰化を改善することはできたが、その後の成長発達が健康な子どもたちと同じように進んでいくことが根治療法である。したがって、当該臨床研究を行った患者さんの成長発達の評価を行った。

B . 研究方法

1 . 臨床研究のインフォームドコンセント

まず、本疾患であることが判明し、当該臨床研究について参加の意思がある、あるいは内容を聞きたい旨の連絡があった場合、ホームページ

(<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pediatrics/2-2/2-2.html>) からダウンロードして頂いた当該臨床研究の計画書ならびに患者説明書を、ご両親および担当の医療従事者に内容を確認頂く。内容を確認後、詳細な当該臨床研究の説明を希望された場合、患者さんの入院しておられる医療機関に出向いて、ご家族および医療従事者に直接説明をさせて頂く。その際、患者さんへの治療の説明だけでなく、この時点では不明であるが骨髄提供者に対する説明も行う。この説明の後、ご家族から参加の意思がある場合、患者さんが治療開始基準を満たしており、入院中の医療機関から島根大学医学部附属病院まで移動することが可能なことを確認した後、ご家族に島根大学医学部附属病院までお越し頂き、当該臨床研究について説明させて頂く。さらに、この治療を受けている、あるいは受けた患者さんおよびご家族の同意が得られた場合、医療従事者がいない状態でご家族同士の話し合いの場を設ける。これらの段階を踏んだ上で、当該臨床研究への参加の同意を確認した。また、実際に骨髄移植を行う前に、再度説明して同意を確認した。なお、同意が得られ治療を開始した後、間葉系幹細胞を移植することに説明を行い、同意を得ることとした。

2 . 当該臨床研究の発展に対する方策

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、また、重篤な有害事象や予期せぬトラブルが生じた場合ご助言を頂くために、それぞれの専門分野の第一人者に外部評価委員になって頂き、過去 2 年間外部評価委員会を開催し、これまでの臨床研究の遂行状

況を説明して、ご助言、ご指摘を頂いた。外部評価委員（専門分野）として、大藺恵一先生（小児医療、低ホスファターゼ症および骨代謝）、加藤俊一先生（小児医療および移植医療）、杉本利嗣先生（骨代謝）、鈴宮淳司先生（移植医療および臨床研究）、服部耕治先生（再生医療および整形外科医療）、室月淳先生（周産期医療）、矢田昭子先生（小児致死性疾患に対する倫理）、計7名の先生方に就任して頂いた。今年度は過去2年間のその分野の専門的な先生方から頂いたご指導・ご助言を、当該臨床研究の発展に活かすための方策を検討した。

3. 成長発達評価

これまで臨床研究に参加して頂いた2名の患者さんの身体発育および精神発達に関して、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に評価した。

（倫理面への配慮）

当該臨床研究は、臨床研究に関する倫理指針に従い、島根大学医の倫理委員会の承認を得た後行っている。

C. 研究結果

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

これまで延べ12例の患者さんのご家族へインフォームドコンセントを行った。現時点で、臨床研究に参加、不参加、検討中がそれぞれ、2例、8例、2例である。不参加あるいは検討中の10例中8例が治療開始基準を満たさなかったり、経過中に死亡した。臨床研究を開始している2例については、骨髄移植を1回、間葉系幹細胞移植を複数回（5回および9回）行っている。そのたびに臨床研究の説明を行い、同意を得た後、治療を行っている。なお、説明の際、ご家族からの質問が多かった内容として、治療の効果の

ゴールおよび間葉系幹細胞移植を行う回数であった。

2. 当該臨床研究の発展に対する方策

過去2年間に外部評価委員会で指摘された点および現在の臨床研究の成果から、今後、根治療法を目指す上での課題とそれに対する方策を検討した。

最適な間葉系幹細胞移植方法の検討

骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄移植だけでも治療効果が得られる可能性が指摘された。また、ドナーの負担が大きい。さらに、現在のドナーはすべて保因者であるため、ALP活性が低い。保因者は正常の骨構造を有しているが、in vitroでは骨の石灰化能は正常健康人よりも低い。以上のことが、根治療法となり得ない問題点として挙げられる。

骨髄移植を受けた患者の間葉系幹細胞は患者由来のままであることが報告されている。また、免疫抑制剤なしにはドナー由来間葉系幹細胞が生着することが困難であることも明らかとなっている。しかし、数%はドナー由来間葉系幹細胞が骨髄内に生着することも明らかになっている。さらに、我々は免疫抑制剤なしに同種間葉系幹細胞が生着しないことをラットの実験で明らかにした（Kotobuki, et al. 2008）。したがって、同種ラット骨髄を経静脈的に全身移植した後、異系ラット間葉系幹細胞を移植して、骨髄移植による効果を検討することとした。

また、ALP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ため、上記条件を満たすドナーを臨床的にも倫理的にも得やすい、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こととした。

さらに、間葉系幹細胞を静脈内投与した場合、そのほとんどが肺の毛細血管でトラップされることが報告されている。したがって、間葉系幹細胞の homing を高めるために、骨髓内の直接投与(髄腔内投与)する方法での検討も必要である。

間葉系幹細胞の生着率向上の必要性

間葉系幹細胞の骨への遊走が悪いこと、正常の骨構造に到達していないことから、また、現在の臨床研究では、間葉系幹細胞を移植することにドナーから骨髓を採取することになっているため、間葉系幹細胞移植の生着率を向上する必要性を指摘された。

我々が用いている間葉系幹細胞はドナー由来の骨髓から培養・増殖させた間葉系幹細胞である。培養した間葉系幹細胞はヘテロな集団であるため、すなわち、未分化な状態を維持しているものからある程度分化したのまでさまざまである。また、現在は、間葉系幹細胞移植のたびにドナーから骨髓採取を行っているため、ドナーの負担も大きい。したがって、間葉系幹細胞の遊走能、増殖能および免疫寛容効果を高めることが必須である。

生体内の間葉系幹細胞は損傷した組織や、炎症部位、がん局所に遊走し、組織修復、抗炎症作用、がん免疫などに関わっていることが証明されている。また、培養することで新鮮な間葉系幹細胞の細胞特性が失われることが報告されている。したがって、未分化能を維持して、かつ、骨への遊走能が高くかつ、増殖能に優れた間葉系幹細胞の単離培養方法の確立を目指すこととした。

また、我々は正常な ALP 遺伝子を導入した患者の間葉系幹細胞をラットに移植して、

骨が再生することを明らかにしている (Katsube Y, et al. Gene Ther, 2010)。また、この疾患の iPS 細胞の樹立にも成功している。さらに、疾患モデルマウスにおいて、遺伝子改変した造血幹細胞移植の効果が示されている。したがって、遺伝子改変した患者由来間葉系幹細胞あるいは疾患特異的 iPS 細胞を遺伝子改変して誘導した間葉系幹細胞を用いて、自家遺伝子改変間葉系幹細胞移植の効果も検討することとした。

ALP の機能解析

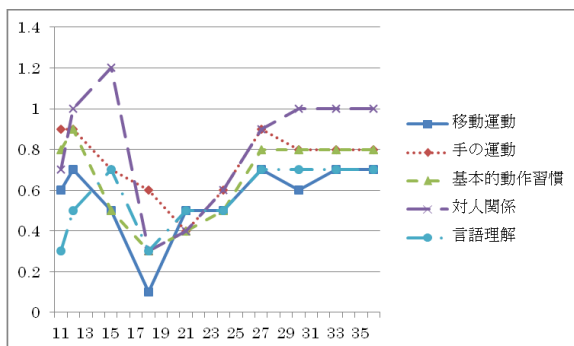
同じ遺伝子変異を有する重症の患者でも骨の石灰化の程度が異なるため、また、骨の石灰化以外の他の症状(特に、肺と中枢神経系)を認めることが明らかとなったため、ALP の機能解析を行うよう指摘を受けた。

骨の石灰化に関して、患者由来間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いて、健康人のそれらと遺伝子発現を比較したところ、骨分化や骨の石灰化に關与する遺伝子発現の差異がみられた。それらを参考にして、drug library screening を行って、骨の石灰化が改善する small molecule を同定することとした。また、患者由来の iPS 細胞を樹立することに成功したため、骨以外の組織に分化させて、それぞれの機能をみることで明らかにすることとした。

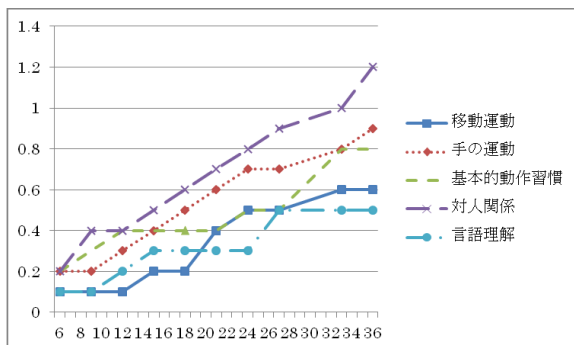
3. 成長発達評価

遠城寺・乳幼児分析的発達検査法を用いて、移動運動、手の運動、基本的動作習慣、対人関係、言語理解を 3 か月ごとに評価した。発語の評価は気管切開を行っているため未評価とした。

症例 1



症例 2



症例 1 は、原病による気管れん縮による低酸素性脳症が起こった 1 歳 6 か月にすべての評価項目で低下しているが、その後徐々に回復している。症例 2 は、移植前を状態から年齢を重ねるごとに徐々に発達指数は伸びているが、年齢相当までは到達していない。

D. 考察

1. 臨床研究のインフォームドコンセント

これまで 12 例に説明して、インフォームドコンセントを行った。我々が説明を行うに当たって、特に目的、効果、危険性について複数回説明することにより、また、臨床研究を行っている家族との話し合いの場を設けることにより、臨床研究に参加するかどうかを適切に判断する時の一助になっていると思われる。しかし、骨髄移植の危険性、どこまで改善するのか、間葉系幹細胞移植を行う回数についての質問について、今後の臨床研究のデータも加味して、説明していく予定である。さらに、新規の症例への説明について、島根でしか治療を受けることができない

こと、家族の、骨髄移植および間葉系幹細胞移植が負担の強い治療であるイメージが強いこと、治療期間が明らかでないことが、治療を受けることへの障害になっていると思われる。

2. 当該臨床研究の発展に対する方策

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、過去 2 年間、外部評価委員会を開催して、各専門分野の先生方からご助言を頂いた。これまでの臨床研究の成果と問題点から、臨床研究の目的は果たしているが、根治療法にはなり得ない可能性が高いことが明らかとなった。したがって、細胞治療による根治療法を確立するために、現在の患者さんの長期 follow up とともに、最適な間葉系幹細胞移植方法の確立、間葉系幹細胞の細胞特性の向上、特に、骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果に優れた間葉系幹細胞の分離培養方法の確立を行う必要がある。

3. 成長発達評価

2 症例ともに、運動精神発達は年齢相当ではないが少しずつ伸びていることが明らかとなった。年齢に見合った発達が得られない原因として、現在の臨床研究での問題点である、正常の骨構造に到達できていないことが考えられる。また、骨以外の障害、特に中枢神経系障害への効果が不十分であることが推測される。しかし、重症低ホスファターゼ症の自然歴から考慮すると、運動精神発達が見られることは細胞治療効果であると思われる。

E. 結論

致死的で治療法のない先天性疾患の治療研究を行う際のインフォームドコンセントの対応について、今後も症例数を重ねてことで家族により則した、適切な判断ができる説

明を行うことができることが示唆された。

臨床研究が始まった後に外部評価委員会を行うことで、現行の治療の問題点とそれに対する方策が明らかとなったため、根治療法の確立に非常に有用であった。

細胞治療の効果が運動精神発達面でも認められたが、正常なこどもの発達には到達できなかった。今後、この面からも、患者および家族が心から満足して幸せを感じることができる治療の確立が重要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) 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.* 2013 Jun;55(3):e52-5.

2) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, **Yamaguchi S.** Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 2013 Nov 25. doi: 10.1136/archdischild-2013-305037.

2. 学会発表：

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

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

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

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 間葉系幹細胞培養増殖

研究分担者 弓場俊輔(産業技術総合研究所健康工学研究部門研究グループ長)

研究要旨

同種間葉系幹細胞(MSC)の培養増殖をセルプロセッシングセンターにて行い、品質を保証した細胞を低ホスファターゼ症患者に対する移植用として供給した。

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MSCを患者に移植して骨形成能を付与することにある。そこで、分担研究者、弓場は同種MSCをセルプロセッシングセンターにて培養し、品質を保証した細胞を代表研究者に供給することで臨床研究を遂行する。

B. 研究方法（詳細は、資料1）

島根大学で採取された骨髄を産総研に搬送し、セルプロセッシングセンターで骨髄由来MSCの培養を行った。搬送中は10～30℃を保つようにした。培養は20µg/mL硫酸ゲンタマイシンと15%牛胎

児血清を含んでいる液体培地(α -MEM)に採取した骨髄を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器(5%CO₂、37℃)内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増殖したMSCを、プロテアーゼを用いて培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養(2次培養)した。培養期間および継代回数は安全性を考え、1ヶ月以内で継代回数3回(4次培養)までとした。移植当日にMSCを剥離し、10mLのPBSに浮遊させた状態で島根大学へ搬送した。また移植細胞の安全性は、まず骨髄採取に先立ちドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験で確認した。

（倫理面への配慮）

移植・骨髄採取のたびに島根大にて患者・ドナーへの説明を行い、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

本研究で対象となった1例目の患者では人工呼吸管理が夜間のみとなったことで退院しているのに対して、2例目の患者は、これまで2011年10月の初回移植から計8回の間葉系幹細胞移植を実施、全身の骨形成障害が改善されているにもかかわらず、呼吸障害の改善は不十分である。そのために常時人工呼吸管理が必要となっている。今回、その過程で生じた気管軟化症の改善、ひいては呼吸障害の改善を目的に2例目の患者に対するMSC用の細胞培養を行った(症例2:1回 [H26年1月末現在])。(図1)30mLの骨髄を3週間かけて培養し、体重(kg)あたり 1×10^6 細胞以上、細胞生存率80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験等の安全性試験結果はすべて異常なかった。骨髄およびMSCの搬送も規定の温度を保って搬送でき、問題は起こらなかった。なお、搬送はすべて航空機を利用して行った。また培養したMSCは、骨分化能を有していることが確認できた。

2013年		CPC業務	その他の業務
10月16日	水		FBS融解
10月17日	木		
10月18日	金		FBS等各種試薬分注 無菌、手指
10月19日	土		
10月20日	日		
10月21日	月		
10月22日	火		
10月23日	水		
10月24日	木		
10月25日	金		
10月26日	土		停電
10月27日	日		
10月28日	月		定期清掃
10月29日	火	インキュベータセットアップ、FBS融解	環境検査
10月30日	水	搬入前検査、FBS培地調製 無菌、エンドキ	ペパロン発送
10月31日	木		
11月1日	金		
11月2日	土		
11月3日	日		
11月4日	月		
11月5日	火		
11月6日	水		
11月7日	木		
11月8日	金	1902MS 骨髄採集 無菌	
11月9日	土		
11月10日	日		
11月11日	月	MC	
11月12日	火		
11月13日	水	MC	
11月14日	木		
11月15日	金	MC	
11月16日	土		
11月17日	日		
11月18日	月	passage 無菌、FACS	1302MS:骨化評価(12well)F1
11月19日	火		
11月20日	水	MC	
11月21日	木		
11月22日	金	passage 無菌、FACS	1302MS:骨化評価(12well)F2
11月23日	土		
11月24日	日		
11月25日	月	最終MC 無菌、マイコ	
11月26日	火	プレート凍結	
11月27日	水		
11月28日	木	移植 無菌、エンドキ、FACS、手指	130BMS:骨化評価(12well)F3
11月29日	金	インキュベータクリーンアップ	
11月30日	土		
12月1日	日		
12月2日	月		
12月3日	火		
12月4日	水		
12月5日	木		
12月6日	金		
12月7日	土		
12月8日	日		
12月9日	月		
12月10日	火		
12月11日	水		
12月12日	木		
12月13日	金		
12月14日	土		
12月15日	日		

図1. 平成25年度培養スケジュール

D. 考察

計1回、移植用MSCの培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。培養した間葉系幹細胞の移植後1ヶ月前後から、それまでに見られた気管軟化症の症状は改善して、現在ではほとんど消失している。このことから、移植細胞が臨床症状の改善に寄与している可能性が示された。

E. 結論

安全性が担保された移植用 MSC を計 1 回、島根大学へ供出できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1. 間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療 **弓場俊輔**、竹谷健 血液フロンティア特集「間葉系幹細胞を用いた細胞治療」医薬ジャーナル23(4):53-59 (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.* 2013 Jun;55(3):e52-5.

3. Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, **Yuba S**, Miyake J. Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(3):380-5.

2. 学会発表：

1. 「先天性骨代謝疾患に対する間葉系幹細胞治療」BioJapan2013（パシフィコ横浜）2013.10.9-11

2. 「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（産業技術総合研究所つくばセンター）2013.10.31-11.1

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

資料 1

< 骨髄提供者の細胞培養 >

: 依頼受付工程

1. 島根大学附属病院は骨髄提供者名を患者医療機関IDに変換し、産業技術総合研究所に培養を依頼する。
2. 産業技術総合研究所は、患者および骨髄提供者がインフォームドコンセントを受け、研究に同意している事を確認する。また、感染症検査の結果が陰性であること等を確認し、島根大学附属病院に受け入れの可否を連絡する。
3. 産業技術総合研究所では患者医療機関IDを更に症例IDに置き換え、当研究所内での作業には症例IDを用いる。

: 運搬容器発送工程

1. 産業技術総合研究所は搬送専用のクーラーボックスを準備し島根大学附属病院に送る。
2. 清拭した搬送専用クーラーボックスに患者医療機関IDを記入し、以下の物品を入れておく。

- ・ 温度記録計
- ・ 50mLチューブで二重包装されたアシストチューブ入りヘパリン/PBS溶液
- ・ チューブラック
- ・ ヘパリンナトリウム注射液
- ・ 保冷剤

保冷剤は島根大学附属病院で骨髄採取当日まで凍結しておく。

: 骨髄採取工程

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスを、島根大学附属病院の手術室や無菌室等の骨髓採取場所へ持ち込む。
2. 骨髓提供者の自家骨髓を所定のチューブに採取する。担当医師が必要に応じて、骨髓採取時にヘパリンナトリウム注射液を用いる。
3. あらかじめ凍結しておいた保冷剤を搬送専用のクーラーボックスに入れ、担当医師は産業技術総合研究所まで骨髓を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10 以上30 未満で保たれるようにし、骨髓採取から12時間以内に産業技術総合研究所CPCに搬入するようにする。

:受入工程

1. 産業技術総合研究所の居室において、グループ長もしくは管理責任者が骨髓の状態等の確認をする。
2. 産業技術総合研究所まで骨髓を搬送した担当医師は、骨髓採取時間や骨髓に関する報告を行う。
3. 製造管理責任者は骨髓採取から12時間以内にCPCへ搬入できることを確認する。同様に温度記録計より搬送中、骨髓が10 以上30 未満に保たれていたことも確認する。

以降は産業技術総合研究所CPC細胞調製室での作業

産業技術総合研究所CPC細胞調製室へは、決められた手順に従い入室する。

CPC細胞調製室に持ち込む試薬、消耗品についての情報、各工程の作業記録は製造指示図記録書に記録する。

:FBS(牛胎児血清)培地調製工程

FBS培地の調製

1. 分注し凍結保存されているFBSを骨髓採取日の前日にサプライ室薬品保冷库(冷凍)から必要本数取り出し細胞調製室薬品保冷库(冷蔵)に移し解凍する。
2. 硫酸ゲンタマイシン(40mg/mL)1mLをPBS7mLで希釈し5mg/mLの濃度に調製する。
3. -MEM 500mLに解凍したFBS 88mLと希釈したゲンタマイシン2.4mLを添加する。
4. ボトルトップフィルター 150mL 0.22μmで吸引濾過する。

5. 同様の手順で必要量を調製する。
6. 調製後のFBS培地を一部採取して持ち出し、無菌試験Aおよびエンドトキシン試験を行う。

培養に用いる FBS は牛海綿状脳症の発生していない地域原産で放射線照射処理されたものを使用する。

:細胞培養工程(1次培養)

(1) 骨髄の播種

1. 骨髄を採取したアシストチューブは4 にて900rpm、10分間、遠心分離を行う。ただし、分離が悪ければ追加で遠心分離する。
2. 遠心分離後の骨髄は、下層から赤血球層、有核細胞層(buffy coat)、血漿の3層に分離されるので確認する。
3. 注意深く血漿を吸引除去する。
4. 新しい50mLチューブに残った赤血球層と有核細胞層をプールする。
5. 骨髄を搬送してきたアシストチューブにPBSを添加して、無菌試験Aを行う。
6. 75cm²フラスコ当たりの分注量(骨髄+培地)が15mLとなるように、FBS培地をプールした赤血球層と有核細胞層に追加する。
7. フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
8. フラスコに骨髄を播種する。
9. 37℃、CO₂濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。

(2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 目視にて培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べる。
2. 培養上清を吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含め

た培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

(3) 間葉系幹細胞の回収

1. TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素) をサプライ室薬品保冷庫 (冷蔵) から必要本数持ちこむ。
2. $\times 40$ 、 $\times 100$ の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. フラスコの培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectを75cm²フラスコに2mL添加し、インキュベーター内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 回収した細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
11. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。
12. 回収した細胞浮遊液は4にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、培養上清を吸引除去する。
13. 5×10^5 cells/mLにResuspensionする。
14. 継代に必要な細胞浮遊液 (5×10^5 cells/75cm²) を50mLチューブにとる。

:細胞培養工程(2次培養)

(1) 間葉系幹細胞のフラスコへの播種

1. 播種する75cm²フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
2. 培養スケジュールと培養培地残量より10~13mLの範囲でフラスコあたりの培地量を決定する。
3. 継代用細胞浮遊液の入った50mLチューブにFBS培地を加える。

4. フラスコに細胞浮遊液を播種する。
5. 37℃、CO₂濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。
6. マイコプラズマ否定試験用として細胞浮遊液2000 μL (1×10^6 cells) にFBS培地を加え、6 well plateの2 wellへ播種し、それもインキュベータで培養する。
7. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数持ち込み、余剰細胞は凍結保存する。

必要細胞数が多い場合は、75cm²フラスコでは本数が多くなるので、225cm²フラスコの使用を製造管理責任者は検討する。その場合、培地量および播種する細胞数は面積に合わせて調整する。

(2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 培養上清を吸引除去する。
2. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
3. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
4. マイコプラズマ否定試験用プレートも2mL/well で培地交換を行う。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含めた培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

225cm²フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

(3) 搬出前、最終培地交換

1. 培養上清の一部をチューブに採取して持ち出し、無菌試験Bを行う。
2. 残りの培養上清は吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量に不足が見られる場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する
5. マイコプラズマ否定試験用プレートを持ち出し、マイコプラズマ否定試験を行う。

225cm²フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

(4) 間葉系幹細胞の回収

1. サプライ室薬品保冷庫(冷蔵)のTrypLE Selectを必要本数持ち込む。
2. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. 培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectをフラスコに2mL(225cm²フラスコの場合は5mL)添加し、インキュベータ内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。
11. 沈殿した全細胞を50mLのPBSに懸濁する。
12. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄1回目)
13. 沈殿した細胞を50mLのPBSに懸濁する。
14. 細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
15. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。移植に必要な量(患者体重(kg)×10⁶個以上)の細胞が確保できているか、生存率が80%以上であるか確認する。
16. 細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄2回目)
17. $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cells/mLになるようにPBSを用いて細胞浮遊液を調製する。
18. 参考品等に必要な量の細胞浮遊液を別のチューブにとる。
19. 残りの移植用細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄3回目)
20. 新しいPBSを開封し、移植用間葉系幹細胞を10mLのPBSに懸濁する。
21. 清潔下、安全キャビネット内に滅菌シートを広げ、シート上に新しい50mLチューブとアシストチューブを取り出す。
22. アシストチューブを差し出し、別の作業者に移植用細胞浮遊液を入れてもらう。このとき、

元のチューブに残った細胞浮遊液は無菌試験A、エンドトキシン試験に出す。

23. 移植用間葉系幹細胞が入ったアシストチューブを50mLチューブに入れ二重包装にする。
24. 50mLチューブに症例IDと細胞数を記載し、チューブ立てに立てて細胞調製室外に搬出する。
25. 製造責任者は細胞保存室にてチューブに記載してある症例IDを患者医療機関IDに変換する。
26. 搬送専用クーラーボックス内へ温度記録計とともに梱包する。
27. 搬送専用クーラーボックスにも患者医療機関IDを記入して、居室へ運ぶ。
28. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数細胞調製室へ持ち込み、18.で取り分けておいた細胞は凍結保存する。
29. 未使用のFBS培養培地と移植用間葉系幹細胞を懸濁させたPBSはクライオチューブに採取し参考品として保管する。

細胞数が必要量に満たない場合、 :細胞培養工程(2次培養)(1)から繰り返す。ただし、移植用間葉系幹細胞は、安全性を考慮して培養日数は1ヵ月以内で継代回数3回までとする。

:受渡工程

1. 居室にて管理責任者または品質管理責任者が安全性試験の結果等を担当医師に説明し、担当医師は調製した細胞の品質と安全性を判断する。
2. 担当医師は搬送専用クーラーボックスの中身を確認し、島根大学附属病院まで間葉系幹細胞を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、移植はCPCを出てから12時間以内に完了するようにする。

:細胞移植工程

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスのまま、島根大学附属病院の病室に細胞浮遊液を持ち込む。この時、担当医師は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10℃以上30℃未満に保たれていた事を確認する。

2. 50mLチューブから細胞浮遊液が入っているアシストチューブを取り出し、沈殿している細胞を攪拌し注射器で吸引する。
3. 経静脈的に間葉系幹細胞を投与する。
4. 担当医師は産業技術総合研究所に、温度記録計の入った搬送専用クーラーボックスを返却する。製造管理責任者は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10 以上30 未満に保たれていた事を確認する。

<間葉系幹細胞の安全性試験>

各試験で使用する試薬についての情報、作業の記録は、オリジナルデータを含め所定の記録様式を用い、文書として保管する。

エンドトキシン試験

エンドトキシン試験は住化分析センターに委託する。（日本薬局方（ゲル化法）に準拠）

（１）委託

1. 培養担当者から試験サンプルを受け取る。委託する検体は、サンプリングした試験サンプルから安全キャビネット内で無菌的に必要量（2.5mL以上）を分取し、委託検体名を記載したアシストチューブに移したものとする。
2. 検体を委託する。
3. 報告書を受領する際は以下の内容を確認する。
 - ・ 分析・試験項目
 - ・ 検体名
 - ・ エンドトキシン濃度
 - ・ 委託先責任者、担当者印
4. 試験結果の受け入れ承認は品質管理責任者が行う。

（２）判定

承認された報告書のエンドトキシン濃度により、判定を行う。

- ・ エンドトキシン濃度が <0.5 EU/mLの時、陰性と判定する。（試験終了）

（*日本薬局方における「生理食塩水」のエンドトキシン濃度は <0.5 EU/mL）

- ・ 0.5 EU/mLを超える場合は陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
- ・ 判定不能（試験無効など）の場合も、要再試験と判断する。

(3) 再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 手順(1)に従い委託先に再試験の依頼を行う。委託検体名は再試験であることが明確なものにする。
3. 手順(2)に従い、試験結果の判定を行う。
 - ・ 再試験で陰性判定の場合は、当該間葉系幹細胞を陰性と判断する。
 - ・ 再試験でも陽性が疑われる場合は、ただちに状況を品質管理責任者に報告する。

品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

(4) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

無菌試験(細菌・真菌検査)

間葉系幹細胞の工程内試験及び調製試液の無菌試験の際は「無菌試験A」を、間葉系幹細胞の最終試験の際は「無菌試験B」を実施する。

無菌試験を行う際は、専用白衣(青色)を着用する。ディスポーザブルのゴム手袋を装着し、クリーンベンチ内に入る部位(手、腕)のエタノール消毒を行って検体を取り扱う。

無菌試験A

BacT/ALERT 3D微生物培養システムを利用する。

BacT/ALERT機器にサンプルを播種した専用培養ボトルを設置し、培養および判定は機器に負う。

使用する専用ボトルの有効期限を確認し、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。

(1) BacT/ALERT専用培養ボトルへの検体サンプル播種

1. 培養担当者または試薬の調製者より受け取ったサンプルは試験開始まで室温で保管する。受け取り後は5時間以内に無菌試験を実施すること。
2. 安全キャビネット内にサンプル及び以下のものを準備する。すべて70%エタノールで清拭し、消毒してからキャビネット内に入れること。
 - ・ 5 mLシリンジ
 - ・ 21 G注射針
 - ・ サインペン
 - ・ BacT/ALERT FA培養ボトル(好気性菌用)サンプル1本につき1つずつ用意する。
3. ボトルに症例IDから年齢性別を除いたもの(以下、検体ID)、サンプル名、試験日を記入する。
4. ボトルから緑のキャップを取り去りゴム部分を70%エタノールで十分に清拭する。
5. シリンジに針を取り付け、サンプルを2 mL 吸引する。
6. ボトルのゴム部分に針を立てる。(陰圧によりサンプルが自動的に注入される。)
7. シリンジを引き抜き、注入部のゴムを70%エタノールで清拭する。
8. 使用したシリンジ・注射針等の鋭利な感染性廃棄物は安全キャビネット内に備え付けの専用箱に一時保管し、全ての作業終了後にプラスチック製の医療系廃棄物入れに捨てる。(安全のため、リキャップはせずにそのまま廃棄すること)
9. サンプルの残りはフタをしてパラフィルムで封をし、冷蔵庫で保存する。
10. ボトルはBacT/ALERT機器に設置し、培養を行う。

(2) BacT/ALERT機器への設置、培養

ボトルの機器への設置、取り出しは必ず1本ずつ行うこと。

(複数本同時に扱う場合は前のボトルの処理が終わってから次のボトルを取り扱う。)

1. BacT/ALERTメイン画面からボトル設置ボタンを押し、設置モードへ切替える。
2. ボトルID入力: バーコードを読み取らせる、またはキーボードにて直接入力する。
3. 検体受付番号入力: ボトル名を登録する。ボトル名は[検体ID_サンプル名_試験日]
(15文字まで) とする。
4. ラックを引き出し、緑のランプが点灯しているセルにボトルを設置する。
5. 各ボトルについて2~4を繰り返す。
6. 全てのボトルを設置し終わったらラックを閉じる。
7. 最後にチェックボタンを押し、設置モードを終了する。
8. 7日間、35 ℃ で培養する。

(3) ボトルグラフの表示と印刷

培養期間中いつでもボトルグラフの確認が出来る。

1. メイン画面中央のラック状況確認コマンドからボトルの設置位置を確認する。
2. メイン画面から画面右下の右矢印ボタンで、セットアップ画面に移動する。
3. パスワードを入力する。
4. ボトル編集ボタンを選択する。
5. 表示したいボトルのセル位置を指定する。
6. 画面右下のグラフボタンでボトルグラフを表示させる。
7. 画面右下の印刷ボタンを押し、結果をプリントアウトする。

(4) 判定

試験後、使用した機器に間違いはないか、校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。

<1次判定>

培養3日目に1次判定を行う。BacT/ALERT の画面に陽性判定表示が出ていないかを確認する。手順（3）に従いボトルグラフを表示し目視によるCO₂量変動の確認を行う。

- ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定し、培養を続行する。
- ・ グラフの上昇が認められる場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。

<最終判定>

1. 陰性のまま培養7日間が過ぎたボトルは、メイン画面に判定結果が表示される。（陰性の場合には陰性ボトルのボタンが青色に点灯し、陽性の場合には画面全体が黄色になり、陽性ボトルのボタンが点灯する。）
2. 機器の判定を参考に、以下の判定を行う。
 - ・ 機器の判定が陰性の場合、最終判定を陰性と判断する。（試験終了）
 - ・ 機器の判定が陽性の場合、要再試験と判断する。

（5）再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
3. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）、（2）と同様に無菌試験を行う。ただし再試験では1サンプルにつきボトル2本に播種する(n=2)。
4. 手順（4）～（6）に従い判定と処理を行う。
 - ・ 再試験で2本とも陰性判定の場合、最終判定を陰性とする。（試験終了）
 - ・ 再試験でいずれか1本または2本とも陽性判定の場合、ただちに品質管理責任者に状況を報告する。品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

(6) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

無菌試験B

BacT/ALERT 3D微生物培養システム及び寒天平板表面塗抹法を併用する。

使用する培地の有効期限を確認し、有効なものを用いること。

(BacT/ALERT 専用ボトルの場合、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。平板培地は試験実施日が、使用期限内のものを用いる)

平板培地は1回の試験につき未開封の培地各1包 (10枚) を使用する。

(1) BacT/ALERT 専用培養ボトルへのサンプル播種

最終培地交換前サンプル(-1)および交換後サンプル(-2)を無菌試験A 手順 (1) と同様に培養ボトルに播種する。

(ただし1検体につきボトル3本に播種し(n=3)、ボトル名は -1a, -1b, -1c, -2a, -2b, -2cとする)

(2) BacT/ALERT機器への設置、培養

無菌試験A 手順 (2) に従いボトルを機器に設置する。

(設置した翌日に培養中のボトルから培養液を一部採取し、平板培地に播種する)

(3) 培養中のボトルの取り出し、平板培地播種

使用する平板培地は当日まで冷蔵庫に保管し、使用時に室温に戻す。(結露を解消するため、試験実施1時間程度前に包装を外して安全キャビネット内で静置する)

1サンプルにつき各培地3枚ずつ(n=3)、計6枚を使用する。

1. 安全キャビネット内に以下のものを準備する。
 - ・ 20 mLシリンジ
 - ・ 21 G注射針
 - ・ サインペン又はシール
 - ・ 15 mLチューブ
 - ・ トリプケースソイ寒天培地 6枚
 - ・ サブロー寒天培地 6枚
2. シャーレのフタにボトル名、日付、培地の種類を記載する。
3. 無菌試験A 手順(3)に従い、前日にBacT/ALERT機器に設置したボトルの培養状況を確認する。
4. -1の3本の内、取り出すボトルを1本選び(例: -1 c)、セル位置の確認をする。ラックを引き出し、選んだボトルを1本引き抜く。
5. ラックを閉める。
6. 取り出したボトルの周囲をエタノールでよく清拭した後、安全キャビネット内に入れる。
7. ボトルをよく振り、口のゴム部分をエタノールで清拭する。
8. 注射針を装着したシリンジで、ボトル内溶液を約9 mL引き抜く。(かなり力が必要)
9. 内容液を15 mLチューブに回収する。チューブにはサンプル名を明記する。
10. 取り出したボトルはゴム部分を清拭し、BacT/ALERT機器の元のセルに戻す。他のボトルと共に残り6日間培養し、機器による判定を行う。
11. -2ボトルについても同様に(3)3)~11)を繰り返す。
12. 回収した内容液は大きな浮遊物(活性炭など)を除くため、遠心する。(500×g、3分間)。チューブをクリーンベンチ内へ持ち込む際には、エタノールで清拭する。
13. 平板培地への播種作業前に、作業用ゴム手袋を滅菌手袋に交換する。
14. 内容液の上清を5 mLピペットを用いて3 mL吸引し、重ねた平板培地3枚に1

mL / plate滴下し、シャーレのフタを閉めてすぐに傾け、内容液を広げる。作業中の汚染を防ぐため、一度に播種する平板培地は 3 枚までとする。

15. 同様の操作を繰り返し1サンプルあたり 6 枚、合計 12 枚すべての培地に播種する。
16. 培地はフタをしたまましばらく安全キャビネット内に静置し、内容液を培地に染み込ませる。(すぐにインキュベータに入れる場合は、結露がない事を確認する)
17. 培地表面が乾燥した事を確認し、裏返して(フタが下になるようにして)重ね、インキュベータで7日間培養する。

・トリプケースソイ寒天培地 30

・サブロー寒天培地 25

(4) 最終試験の判定(搬出日)

4 - 1 .搬出前判定

平板培地播種後2日目か3日目が搬出日になるので、搬出日の朝に判定を行う。

1. 平板培地は蓋をしたまま観察する。
 - ・ すべての培地にコロニーが認められない時、陰性と判定する。
 - ・ 平板培地はいずれかの培地にコロニーが1つ以上認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
2. 培養ボトルは平板培地播種に用いなかった2本について判定を行う。無菌試験A (4) に従い、ボトルグラフの目視による確認を行う。
 - ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定する。
 - ・ グラフの上昇が認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
3. 平板培地の結果と培養ボトルの結果を合わせて搬出前判定を行う。
 - ・ すべて陰性の判定が出たとき、当該間葉系幹細胞を陰性と判定する。
 - ・ いずれか 1 つ以上で陽性が疑われるものがある場合は、品質管理責任者は各責任者に報告し、対応を協議する。

4 - 2 .最終試験（搬出前）の陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

4 - 3 .搬出準備

1. 品質管理責任者の指示を得て、BacT/ALERTのボトルグラフをプリントアウトする（培養ボトルはそのまま培養を続行する）。平板培地はTriplicateの内、1セット（4枚）をインキュベータから取り出す。残りの培地については最終判定日までそのまま培養を続行する。
2. 取り出した培地とプリントしたボトルグラフを担当医師に見せ、結果を説明する。

4 - 4 .最終試験の再試験および再判定

品質管理責任者から指示があった場合、再試験を行う。

再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。

1. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）～（3）に従いボトルへの播種および平板培地播種を行う。
2. 手順4 - 1に従い最終判定を行う。
 - ・ 再試験ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を陰性と判断する（試験終了）。
 - ・ 再試験でもどれか1つ以上陽性が疑われるものがある場合は、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

（5）陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

(6) 引渡し後の最終試験判定

製品引渡し後も培養を続けていた平板培地および培養ボトルについて、平板培地の培養7日目に最終判定を行うこととする（培養ボトルは培養8日目にあたる）。

手順(4)と同様に、判定と処理を行う。

- ・ 引渡し後の判定ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を適合とする。
- ・ 引渡し後の判定でどれか1つ以上で陽性が疑われる場合、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

(7) 平板培地の写真撮影

1. BacT/ALERT のボトルグラフをプリントアウトする。平板培地（8枚）はインキュベータから取り出して、写真撮影を行う。
2. 培養7日目に判定を行った後の平板培地をデスクに並べる。
3. シャーレのフタを取りデジタルカメラで上から撮影する。

マイコプラズマ否定試験

市販 の“Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR”（minerva biolabs, 一段 PCR 法）を用いる。

使用する市販の試薬、キットは、全てロット番号と使用期限を確認する。作業はすべてゴム手袋を着用して行う。

(1) DNA回収

細胞溶解および DNA 抽出には PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation Kit (QIAGEN)を用いる。

1. 培養担当者より検体細胞培養プレート (6 well) を受け取る。
2. プレートから上清を除去し、Cell Lysis solution 300 μ l ずつ 2 well に添加する。
3. セルスクレーパーで細胞を掻きとり、ピペティングによりしっかりと懸濁する。1.5 ml チューブ 2 本に分けて回収し(1 well 分/tube)、1 本を DNA 抽出用として以下に用いる。残りの 1 本は再試験に備えるため、試験結果の確認および判定が終わるまで冷蔵庫で保管する。
4. RNase A solution 1.5 μ l を添加し、よく混合した後、37 $^{\circ}$ C、30 min インキュベートする。
5. 室温に戻した後、Protein PPT Solution 100 μ l を添加する。
6. 白濁するまで激しく vortex する。
7. 15,000 rpm、3 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
8. 2-propanol 300 μ l を加え、ゆっくりと約 50 回転倒混和する。DNA が見えてくることを確認する。
9. 15,000 rpm、3 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
10. ペレットを確認しながら上清を除去し、70%エタノール 300 μ l を添加する。
11. 15,000 rpm、1 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
12. 上清を全て除去する。
13. ペレットを乾燥させる。
14. 注射用水 15 - 30 μ l に溶解し、DNA サンプルとする。溶解する注射水の量は、ペレットの大きさで判断する。
以下に使用する水は全て同一ロットの注射用水とする。

(2) DNA 定量

1. 測定の 30 分前に吸光光度計のスイッチを入れる。
2. 吸光値測定用サンプル (DNA サンプル 10 倍希釈液) を用意する。(DNA サンプル 2 μ l + 注射用水 18 μ l)
3. パソコンを立ち上げ Genespec⁺ (DNA)を起動させ、プリンタの電源を入れる。
4. 測定条件を入力する。
5. [編集]→

[測定条件編集] ・波長範囲：上限 300 nm、下限 220 nm

・光路長: 5mm

・積算回数：32

[核酸条件編集] ・計算モード：dsDNA

・希釈率：10

6. 10 µl 測定用セルを注射用水で洗う。
7. セルに注射用水 10 µl を入れてベースラインを測定する。
8. ベースラインが決定したら測定用 サンプルを 10 µl 入れて測定する。
9. 複数のサンプルを測定するときはサンプルごとにシートを替える。
10. シートにサンプル名(検体 ID、培養時期)、コメント(試験担当者名)を入力する。
11. [保存]→[一括ファイル保存]で全てのシートを 1 つのファイルとして保存する。
12. 波形をプリントアウトし、記録用紙の所定の欄に貼り付ける。
13. Genespec を終了し、吸光光度計の電源を切る。
14. 測定用サンプルを捨て、使用したセルは MQ 水で洗浄して所定の位置に戻す。

(3) 上清サンプルの準備

1. 冷蔵庫から最終検査用培養上清を取り出す。
2. 安全キャビネット内で、少量を クライオチューブに分注する。
3. 実験台で 0.2 ml チューブに 50 µl を分注する。
4. PCR 機で 95 °C、5 min 加熱し、5 秒間スピンドウンする。
5. Sample A として以下に用いる。

(4) PCR

PCR には以下のキットを用いる。

- ・ Venor GeM Mycoplasma detection kit for conventional PCR (minerva biolabs)
- ・ Ampdirect Plus (島津製作所)
- ・ Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)

1. DNA 定量で得られたデータに基づき、DNA サンプルを 100 ng/µl になるように注射用水で希釈し、Sample B として以下に用いる。
2. 冷凍保存の Venor GeM PCR キットのケースから、Ampdirect Plus (Buffer)、PCR grade water、Primer/Nucleotide Mix 及び Internal control DNA を取り出し、解凍する。
3. 8 連チューブを用意し、検体 ID と日付を記入する。
4. 下表に従い 1.5 ml チューブに (必要サンプル数 + 1) サンプル分の PCR Mixture

を調整する。

	1 サンプル分	6 サンプルで 試験を行う場合
Ampdirect Plus	12.5 µl	87.5 µl
PCR grade water	4.87 µl	34 µl
Primer/Nucleotide Mix	2.5 µl	17.5 µl
Nova Taq *	0.13 µl	1 µl
合計	20 µl	140 µl

* Nova Taq (酵素)は混合直前まで冷凍庫で保管し、使用後は直ちに冷凍庫に戻す。

5. よく混合した後、8 連チューブに 20 µl ずつ添加する。
6. 下記の表にしたがって Sample , Internal control DNA , Extra H₂O (注射用水)を加える。
7. *添加時、内容液がチューブ外面に付着しないように注意する。交差汚染を防ぐため、残りのサンプル、試薬類は確実にキャップをして片付ける。マイコプラズマ DNA はコントロールとして使用しない。

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Sample name	Negative control	Positive control	Sample A (培養上清)	3 + Internal control	Sample B (細胞 DNA)	5 + Internal control
PCR mixture	20	20	20	20	20	20
Sample	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Internal Control DNA	-	2.5	-	2.5	-	2.5
Extra H ₂ O	5	-	2.5	-	2.5	-
Total	25	25	25	25	25	25

8. キャップを確実に閉めて混合し、スピンドウンする。
9. 以下の条件で PCR を行う。

Thermal Profile

1 cycle	95 for 10 min
39 cycles	94 for 30 sec
	55 for 30 sec
	72 for 30 sec
cool down	15 for

* 最終の保持温度は PCR 機の結露を防ぐため 15 とする。

10. PCR が終了したら、PCR 産物は電気泳動を行うまで冷蔵庫で保存する。

(5) 電気泳動

1. 以下の通り、サンプルを 2% agarose gel にロードし 100 V、1×TAE で 30 分程度泳動する。

Lane M . 100 bp Ladder Marker

Lane 1. Negative control

Lane 2. Positive control

Lane 3. Sample A

Lane 4. Sample A + Internal control

Lane 5. Sample B

Lane 6. Sample B + Internal control

2. EtBr で染色して UV 照射下で写真を撮る。

(6) 結果の確認

1. 電気泳動写真を見て、以下の試験成立基準を確認する。これら全てが満たされていない場合は試験が成立していないと判断し、PCR をやり直す。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

・ Lane 1 にバンドが認められない

・ Lane 2 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。

・ Lane 4, 6 に 1 本 (191 bp 付近) のバンドが認められる。

(lane 3, 5 で標的のバンド (265-278 bp) が認められた時は、この基準を満たさなくてよい)

* 191 bp・・・Internal control DNA 増幅産物サイズ

Lane2, 4, 6 にバンドが認められない場合は、サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性があるので、当該サンプルを希釈して PCR をやり直す。培養上清サンプルは 5 倍に希釈し、加熱処理を行う。

再測定の前には試薬の有効期限、操作手順及び試験機器の点検・校正状況の再確認を行う。PCR をやり直しても基準を満たさない場合は試験不成立として、品質管理責任者に状況を報告する。

(7) 判定

手順 (6) で基準を満たしたサンプルについて、以下の判定を行う。

試験に使用した機器に間違いはないか、点検・校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- ・ Lane 3, 5 のいずれにもバンドが認められない場合、陰性と判断する。
- ・ Lane 3, 5 のいずれかで 265 – 278 bp 間にバンドが認められる場合、陽性と判断する。

(8) 再試験および再判定

再試験 A

陽性または擬陽性の判定が出た場合は、品質管理責任者の指示を受け、以下の手順で再試験 A-1 および A-2 を行う。

8 - 1.再試験 A-1 および A-2

1. 本試験で用いた DNA サンプルおよび上清サンプルを希釈し直した上で、手順（４）に従い PCR を行う（A-1）。
2. 手順（３）で保管しておいた細胞懸濁液を用いて再度サンプルを調製し、手順（４）に従い PCR を行う（A-2）。
3. 手順（６）、（７）に従い、A-1 および A-2 の判定を行う。
 - ・どちらも陰性の場合、最終判定を陰性とする。
 - ・どちらか、または両方で陽性の場合、状況を品質管理責任者に報告する。

再試験 B

再試験 A でも陽性または擬陽性の判定が出た場合は凍結保存細胞を融解し、以下の手順で再試験 B-1 および B-2 を行う。

8 - 2.参考品からのサンプリング

1. 凍結保存しておいた細胞の参考品を 1 本（ 5×10^5 cells/ml, 500 μ l）融解する。
2. 融解した細胞懸濁液のうち、200 μ l は培地で洗浄した後、6 well plate の 1 well に播種し、培養を行い、再試験 B-2（手順 8 - 4）に用いる。
3. 残りの 300 μ l の細胞懸濁液を用いて再試験 B-1（手順 8 - 3）を行う。

8 - 3.再試験 B-1

- 1 手順 8 - 2 で採取した細胞懸濁液 300 μ l から DNA を抽出、精製して、手順（４）に従い PCR を行う。
- 2 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
- 3 手順（６）、（７）に従い判定を行う。
 - ・ 陰性の場合は手順 8 - 4 に進んで再試験を続行する。
 - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管

理責任者に報告する。

8 - 4 .再試験 B-2

再試験 B-2 には手順 8 - 2 で培養を開始した参考品の細胞および再サンプリングした間葉系幹細胞の培養上清の計 2 サンプルを用いて試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に上清の再サンプリングを依頼する。
2. 2 回の培地交換を経た参考品の培養細胞を用いて、5-1 からの方法に従い DNA サンプルを作製する。
3. 手順（4）に従い PCR を行う。再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
4. 手順（6）、（7）に従い判定を行う。
 - ・ 陰性の場合、最終判定を陰性とする。ただし、再試験 B による判定であることを品質管理責任者に報告する。
 - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

（9）.陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

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
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

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再度みられず、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、頭蓋骨の良好な石灰化は持続していた。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、今回長期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する。

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 2×10^4 cells/1.5mL/wellで12well plateに播種する。

(この時の濃度は5000cells/cm²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-アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム塩n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, 10 mM 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の患者の4才6ヶ月の時点でのレントゲン像(図1)を示す。移植前には膝関節部分においてくる病様の変化(キャッピング変化)が見られたが、これは消失したままであった。なお、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1. 症例1の4才6ヶ月でのレントゲン像

症例1の患者の4才6ヶ月の時点でのCT像(図2)においても、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。なお、頭蓋骨の骨形成は非常に良好である。以上より移植による骨形成の促進、特に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、皮質骨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。



図2. 症例1の4才6ヶ月でのCT像

症例2においては、レントゲンにおいて移植前には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。この非石灰化骨端線は移植後長期(2才の時点)でも改善していた(図3)。CTの画像でも同様の所見を得た(図4)。ただし、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 3. 症例 2 の 2 才でのレントゲン像

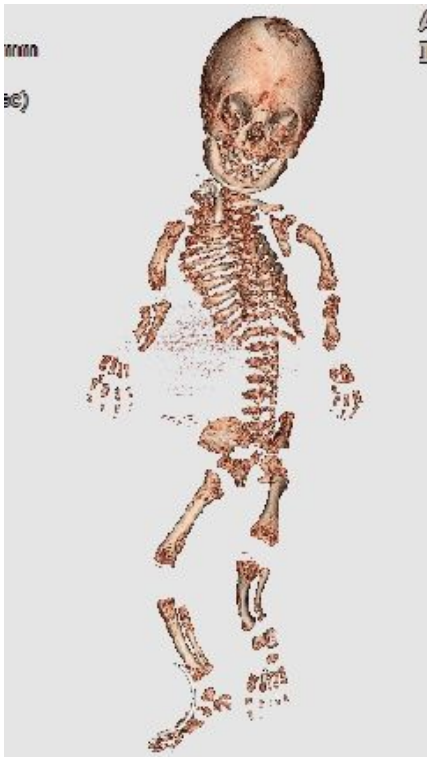


図 4. 症例 2 の 2 才での CT 像

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。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行った。

図 5, 6 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。

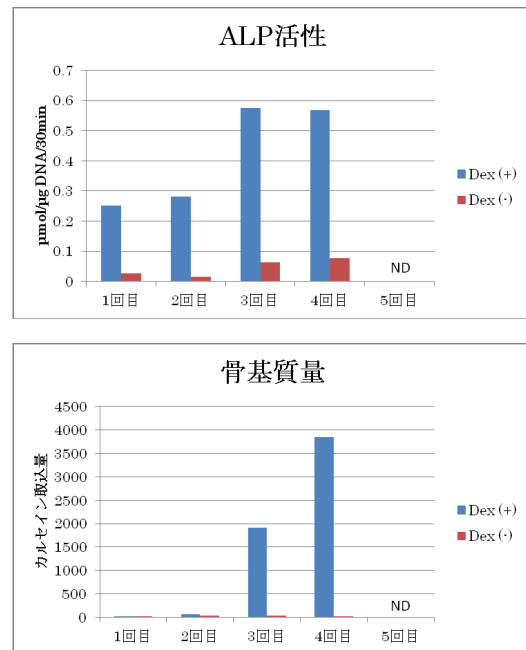


図 5. 症例 1 の骨形成比較

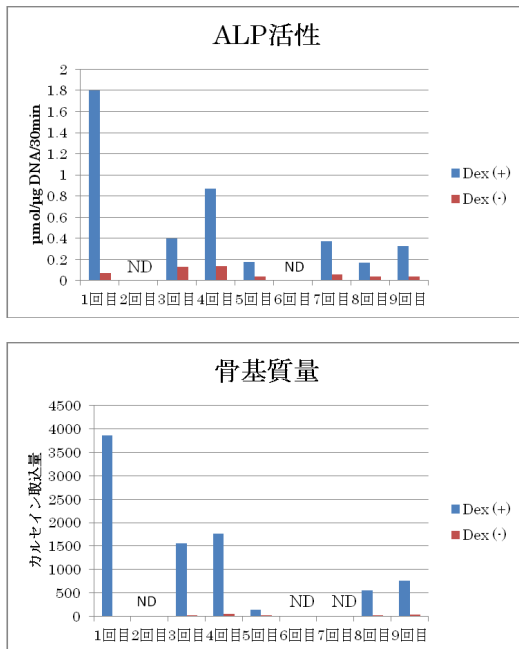


図 6. 症例 2 の骨形成比較

D. 考察

今年度ならびにこれまでの研究において、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す、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する。

E. 結論

今回のレントゲンとCT像、ならびに

これまでの画像による比較で、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。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

1. 論文発表

1. 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.* 2012 Dec 18. doi: 10.1002/term.1674. [Epub ahead of print]
2. 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. 2013
Dec;101(12):3571-9
3. 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. 2013 Sep 6;438(4):753-9
 4. 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. 2013 Jan;7(1):51-60
 5. **Ohgushi H**. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. Expert Opin Biol Ther. 2014 Feb;14(2):197-208.
 6. 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 (pp1-52),2013 社団法人日本整形外科学会
 7. **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」pp217-226 株式会社 エヌ-ティーエヌ 2013年10月14日発行
 8. **大串始**
再生医療技術の実用化における環境整備 Web Journal No.143,pp7-10, 2013 アクトライム発行
 2. 学会発表(2013年)
 1. 奈良県立医科大学特別講演 (1/10 奈良県立医大、橿原市)「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」**大串始**
 2. 第25回バイオエンジニアリング講演会、特別講演「再生医療技術と工学技術の融合」(1/9 産業技術総合研究所 つくばセンター) **大串始**
 3. 近畿大学医学会学術講演、「間葉系幹細胞を用いた再生医療の実」(1/30 招待講演 大阪府狭山市近畿大学医学部) **大串始**
 4. 第12回日本再生医療学会 (3/21、横浜パシフィコ横浜) パネルディスカッション「幹細胞療法の可能性」における“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”竹谷 健、弓場俊輔、
大串始
5. 第 12 回日本再生医療学会 (3/21、
横浜パシフィコ横浜)一般口演、
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、
上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、
大串始、桐田忠昭
 6. 第 12 回日本再生医療学会 (3/23、
横浜パシフィコ横浜)一般口演、
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、
前田雅彦、**大串始**、桐田忠昭
 7. 第 12 回日本再生医療学会
(3/21-23、横浜パシフィコ横浜)
ポスターセッション、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、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
 8. 第 12 回日本再生医療学会
(3/21-23、横浜パシフィコ横浜)
ポスターセッション、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、田所美香、笹
尾真理、越田一郎、大門誠、廣瀬
志弘、小久保謙、**大串始**、紀ノ岡
正博、弓場俊輔
 9. 第 12 回日本再生医療学会
(3/21-23、横浜パシフィコ横浜)
ポスターセッション、低フォスフ
ァターゼ症患者 iPS 細胞の樹立、
小田泰昭、田所美香、勝部好裕、
大串始、竹谷健、弓場俊輔
 10. 第 86 回日本整形外科学会総会
(5/23 - 26 広島リーガロイヤルホ
テル、広島)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、**大串始**、
弓場俊輔、竹谷健
 11. 第 86 回日本整形外科学会総会
(5/24 広島リーガロイヤルホテル、
広島) 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 川手 健二、矢島弘
嗣、**大串始**、田中康仁、高倉義典
 12. 奈良県立医大特別講演(生化学教室
主催)(6/13 奈良県立医大、橿原市)
「再生医療とは?体性幹細胞~iPS
細胞」 **大串始**
 13. 第 22 回泉大津市医師会病診連携懇
話会 (10/19 招待講演 ホテルレ
イクアルスターアルザ泉大津、泉大
津市) 「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」
大串始
 14. 第 28 回整形外科基礎学術集会
(10/17 幕張メッセ 千葉 ポス
ター) 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)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**

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

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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

由来別間葉系幹細胞の細胞特性、患者由来線維芽細胞からの 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

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間葉系幹細胞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。この理由として、間葉系幹細胞の遊走能や生着能が低いことが挙げられる。この課題を克服するために、臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。また、この疾患の病態を解明するために、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試みた。臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性に関して、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。また、疾患特異的 iPS 細胞に関して、患者の皮膚繊維芽細胞に 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可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。これらの結果から、ALP が正常かつ HLA が一致したドナーからの臍帯血移植後に同一ドナーからの臍帯由来間葉系幹細胞を骨髄内に移植する治療の有効性を検討する必要がある。また、疾患特異的 iPS 細胞から骨だけでなく中枢神経や肺などに分化させて、病態の解明を行うことが重要である。

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、臨床的には不十分であることがわかっている。臨床効果が不十分な理由の1つとして、ALP 遺伝子異常を有する保因者をドナーとしていることが挙げられる。ALP 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ため、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必要がある。したがって、臍帯由来間葉系幹細胞 (uMSC) の細胞特性を検討した。また、この疾患の病態解明を行うために、患者から疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

(1) ALP 染色

uMSC (1×10^4 個) を 24 ウェルにまき、 37°C 、5% CO_2 濃度下で 24 時間培養後、培養上清を取り除き、 $1 \times \text{PBS}$ で 1 度洗浄した。固定液を各ウェルに $250\mu\text{L}$ 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 $250\mu\text{L}/\text{well}$ 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、顕微鏡下で観察した。

(2) Flow cytometry による CD44 と 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) および CD44 抗体(Beckman coulter) をそれぞれ 5 μ L 添加し、15 分間氷上で静置し、洗浄後、BD FACS Calibur で ALP および CD44 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) ALP 活性

同様に培養後、超音波粉碎器を用いて細胞抽出液を作り、ラボアッセイ™ ALP kit (WAKO)を用いて ALP 基質を染色し、蛍光プレートリーダーで 405nm で測定した。

(4) 骨分化能

α -MEM に 15%FBS, 2mL penicillin/streptomycin (10,000 units/mL penicillin, 10,000 μ g/mL streptomycin, in 0.85% NaCl, nacalaitesque, Kyoto), 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 1 μ M retinoic acid (RA), 10nM cyclosporin A (CyA), 10nM tacrolimus (FK506), 10nM calcitriol (Vitamin D3), 0.5mM sodium butyrate (SB) and LiCl, 0.5mM LiCl, 0.5mM SB, 100ng/mL BMP-2 をそれぞれ加えた培地で、37、5%CO₂ 下で 21 日間培養して骨分化能

を検討した。その間に培地は 3 日置きに交換した。

培養後、超音波粉碎器を用いて細胞液を作り、ラボアッセイ™ ALP kit (WAKO)を用いて ALP 基質を染色し、蛍光プレートリーダーで 405nm で測定した。

また、アリザリンレッド染色で骨分化を確認し、カルシウムテストワコー (WAKO) を用いて骨基質(calcein)を蛍光プレートリーダーで 610nm で測定した。

(5) 遊走能の検討

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、骨髄由来間葉系幹細胞の遊走能との差を検討する為に、uMSC を用いて検討を行った。24-well プレートに 1×10^5 cells/mL の細胞を 3 日間培養した uMSC を boyden chamber assay で migration を評価した。

2. 患者由来皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

(1) iPS 細胞誘導用組換えレトロウイルスベクターの調整

TransIT-293 トランスフェクション試薬を用いて、G3T-hi 細胞に

Human iPS Cell Generation

All-in-One Vector (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 の 5 つの遺伝子を組み込んだベクター、TaKaRa), pGP Vector (TaKaRa), pE-Ampho Vector (TaKaRa) を共導入し、組換えレトロウイルスベクターを調整した。

コラーゲンコート 60mm シャーレに 2×10^6 cells/dish で G3T-hi 細胞を播種、24 時間培養した後、TransIT-293 トランスフェクション試薬を用いて遺伝子導入を行った。シャーレ 1 枚当たり、Human iPS Cell Generation All-in-One Vector (2 μ g), pGP Vector (gag-pol 遺伝子発現ベクター, 2 μ g)、および pE-Ampho Vector (Amphotropic envelope 遺伝子発現ベクター, 1 μ g) を共導入した。導入方法は試薬付属のマニュアルに従った。DNA トランスフェクションから 24 時間後、新たな培地に交換し、さらに 24 時間の培養を行った。トランスフェクションから 48 時間後、各シャーレより培養上清を回収、0.8 μ m および 0.2 μ m フィルターで濾過したものをレトロウイルス溶液とし、1mL/vial で分注後、-80 で保存した。

(2) 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数の算出

(1) で調整した組換えレトロウイルスベクター溶液の RNA ゲノムコピー数を Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR, TaKaRa) を用いて算出した。

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて DNase I 処理(反応条件は表 1 を参照) を施したウイルス液を ONE Step リアルタイム RT-PCR 反応に供した。One step リアルタイム RT-PCR 反応は、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR kit (perfect Real Time, TaKaRa) のプロトコルに従い、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いて行った(表 1)。Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) に含まれる RNA Control Template を用いて、二次微分曲線(2nd Derivative) から算出した Ct 値と RNA コピー数の挿管を示す検量線を作成し、被検サンプルの RNA コピー数、RNA Control Template の測定データ、被検サンプルの RNA コピー数を算出した。

(3) 標的細胞の培養とマイコプラズマ検出試験

患者由来ヒト皮膚線維芽細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地(GIBCO) を用いて培養した。拡大培養後、必要数の細胞を iPS 細胞誘導試験に供し、 5×10^5 cells の細胞ペレットを同一性確認試験用に凍結保存した。また MycoAlert Mycoplasma detection Kit (TaKaRa) を用いたマイコプラズマ検出試験を実施した。検体には拡大培養中の培養上清を使用した。

(4) iPS 細胞誘導因子の遺伝子導入

RetroNectin(TaKaRa)を用いてレトロウイルスベクターを患者由来皮膚線維芽細胞に感染させ、iPS 細胞誘導因子群の遺伝子を導入した。20 µg/mL に調整した RetroNectin 溶液をノントリート 6well プレートに 2mL/well 添加、4 日に一晩静置する事で RetroNectin 固定化プレートを作製した。

RetroNectin 溶液を除去後、(1)で作製したレトロウイルスベクター溶液を、DMEM 培地を用いて 30 倍に希釈し、RetroNectin 固定化プレートに添加した。32 °C、2,000 × g の条件でプレートを 2 時間遠心し、溶液中のレトロウイルスを RetroNectin 固定化プレートに吸着させた。ウイルス溶液の除去と 1.5% HSA/PBS での洗浄の後、 1×10^5 cells/well の細胞数で患者由来線維芽細胞をプレートに播種し、遺伝子導入を行った。播種約 24 時間後の細胞を回収、同様の操作で作製した RetroNectin 固定化・レトロウイルス吸着プレートに播き直すことで、さらに再び遺伝子導入を行った。

(5) iPS 細胞誘導

iPS 細胞誘導因子の遺伝子を導入したヒト皮膚線維芽細胞を、STO 細胞(ATCC)上に播種し、霊長類 ES 細胞培地(ReproCELL)を用いて培養する事で、iPS 細胞の誘導培養を行った。細胞培養用 100mm シャーレに 0.1%ゼラチン溶

液を添加、室温で 30 分間静置する事で、ゼラチンの固定化を行った。ゼラチン固定化シャーレにマイトマイシン C 処理(最終濃度 12µg/mL, 協和発酵工業)で培養上清に添加後、2 時間 15 分以上培養を施した STO 細胞を

1.5×10^6 cells/dish で播種し、一晩培養する事でフィーダー細胞を準備した。

(4)の遺伝子導入 6 日後の細胞を回収し、 1×10^5 cells/dish で STO 細胞上に播種した。培養 24 時間後に上清を霊長類 ES 細胞用培地に交換、以降 2 日ごとに培地を交換し、遺伝子導入 35 日後まで培養を継続する事で iPS 細胞誘導を行った。

(6) iPS 細胞のクローン化

iPS 細胞コロニーをピックアップし、ES 細胞様の外観を示したクローンの拡大培養を試みた。(5)の誘導培養を実施したシャーレから実体顕微鏡での観察下、単一の iPS 細胞コロニーをピペットマンやシリンジを用いて分取し、数回のピペッティングによる細分化後、ゼラチン固定か 24well プレートにあらかじめ用意したフィーダー細胞上に播種した。以降約 24 時間ごとに、ES 細胞培養用培地を用いて培養上清を交換し、7~10 日ごとに継代を実施する事で拡大培養を行った。その過程で ES 細胞様の形態を示す 6 クロニーを選別した。iPS 細胞の継代方法は、上清の除去と PBS 洗浄の後、霊長類 ES 細胞培養用培地を添加、先に剥離するフィーダー

細胞を除去し、ES 細胞培養用培地添加後、残った iPS 細胞をセルスクレーパーで剥がした、iPS 細胞懸濁液を回収し、ピペティングによる細分化後、6 well プレートに用意した新たなフィーダー細胞上に播種し直した。しかし、これらの iPS 細胞株は、一般的な iPS 細胞と比較して増殖速度が著しく低かったため、継代の際に細胞死を抑制する Rho 結合キナーゼ ROCK の阻害剤 Y27632(WAKO)の使用を試みた。継代の前に培養上清を 10 μ M の ROCK 阻害剤 Y-27632 を含む iPS 細胞培養用培地に交換、1 時間以上培養した後、上記の方法で継代を行った。iPS 細胞コロニーのピックアップから数えて 81 日間の培養を行った。

(7) ALP 染色

(6)で選別した iPS 細胞クローン 3 株 (No.2、No.4、No.6)について、TRACP&ALP double stain kit(TaKaRa)を用いた ALP 染色を行った。

(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。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、治療法の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. 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

(1) uMSC の ALP 活性および 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 1A)。また、CD44 の発現は H-HOS よりも発現レベルが高かった(図 1B)。ALP 免疫染色でも uMSC は呈色が得られた(図 2)。

(2) uMSC の骨分化能および骨分化後の ALP 活性

基礎培地において、uMSC が骨芽細胞に分化したところ、石灰化能および ALP 活性を認めた(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 (図 3B, 図 4)。しかし、uMSC のロット間の差が認められた。(図 3B, 図 4)。

(3) 遊走能

Boyden chamber assay において、uMSC と骨髄由来 MSC は、同じ割合で遊走能が認められた (図 5)。

2 . 患者由来 iPS 細胞の樹立

One step リアルタイム RT-PCR 解析結果より、取得したレトロウイルスベクター溶液は 2.55×10 copies/mL の RNA Titer を示し、感染試験に適するウイルス溶液が取得できたことを確認した(表 1)。また、マイコプラズマ陰性も確認した。

患者由来皮膚繊維芽細胞からの iPS 細胞様コロニーを計 21 個ピックアップし、拡大培養を試みたところ、6 クローンが iPS 細胞様コロニーの外観を示した(図 6)。しかし、クローン No.1 と No.5 については継代を重ねるごとに増殖速度が低下し、増殖が停止した。クローン No.2、No.3、No.4 については未分化能が維持できず、ES 細胞様の外観のコロニーが消失し、分化したと思われる細胞のみとなった。クローン No.6 については一定の増殖速度を示し、ES 細胞様の外観を示すコロニーが生育し続けた。しかし、iPS 細胞様の外観を示し

ているにも関わらず、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。

ALP 染色において、全てのクローンについて呈色反応が確認できず陰性を確認した(図 7)。

D. 考察

1 . 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

uMSC は、骨分化や遊走能において、骨髄由来 MSC 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 が H-HOS 細胞よりも発現量が多いことから、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、uMSC 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る。

2. 患者由来 iPS 細胞の樹立

今回患者由来の皮膚繊維芽細胞から 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 遺伝子に変異しており、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。

E. 結論

今回の検討では、uMSC が骨髄由来 MSC よりも接着能が高いが、遊走能や骨分化は変わらない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 uMSC を骨髄内に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。また、疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功したことで、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) 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.* 2013 Jun;55(3):e52-5.
- 2) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, **Fukuda S**, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 2013 Nov 25. doi:10.1136/archdischild-2013-305037.

2 . 学会発表 :

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

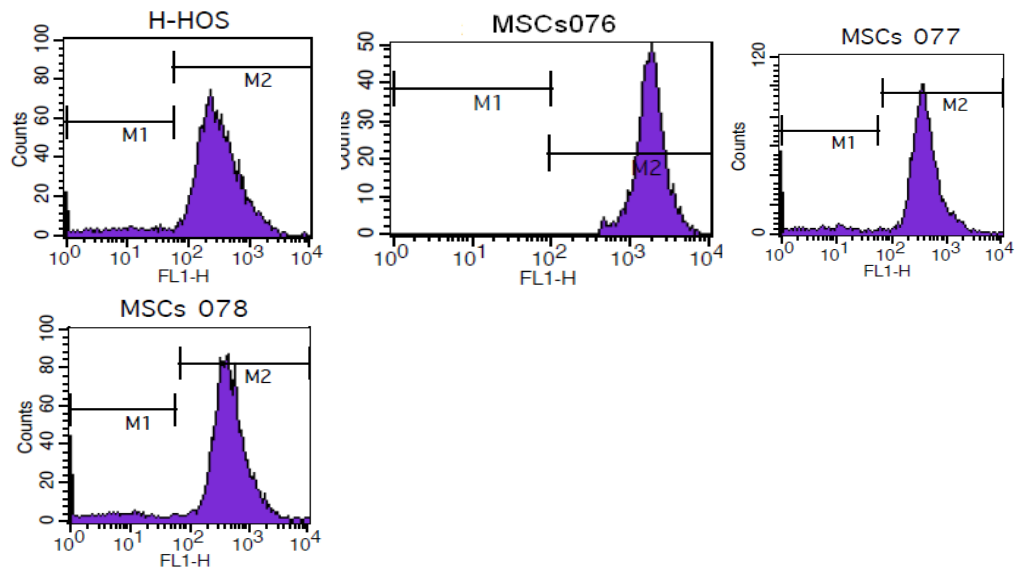
2) Taketani T, Hattori M, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H, Abe M, Hirade T, **Fukuda S**, Yamaguchi S. The functional analysis of TNSALP mutants in Hypophosphatasia with Japanese patients . 10th ALPS meeting(president Hieo Orimo), Tokyo, July 27, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

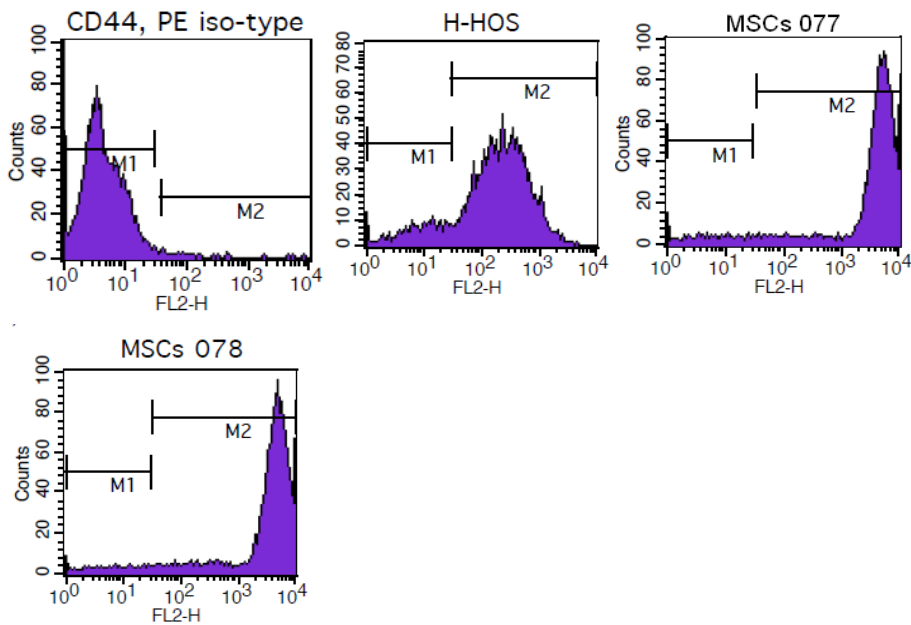
- 1 . 特許所得 : なし
- 2 . 実用新案登録 : なし
- 3 . その他 : なし

図 1. 臍帯由来間葉系幹細胞の発現解析

A. ALP の発現



B. CD44 の発現



M1:死細胞または未発現領域 M2:抗体発現領域

図 2. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 免疫染色

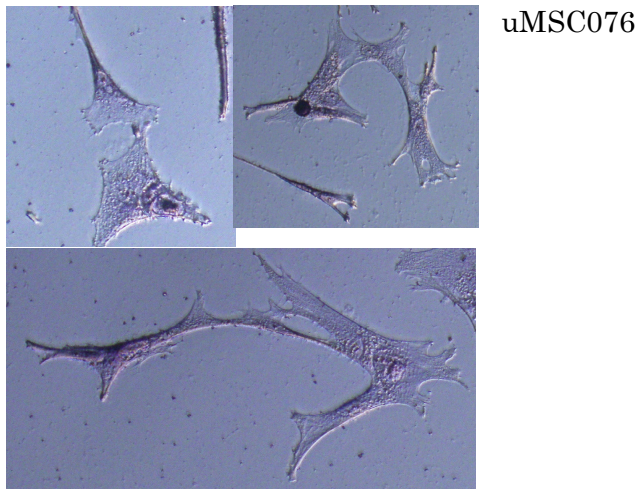
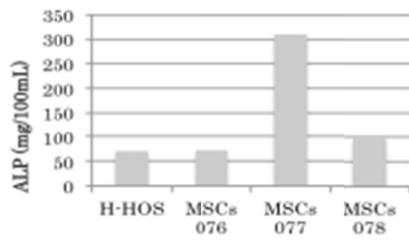


図 3. 臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 活性

A. ロット別



B. 骨分化誘導後の ALP 活性測定

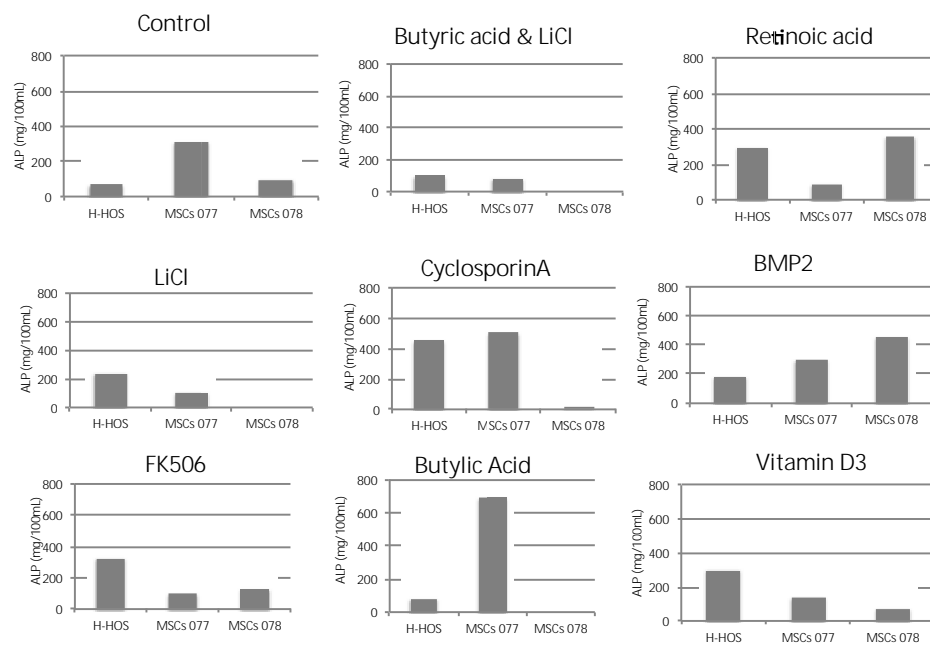


図 4. 臍帯由来間葉系幹細胞の骨分化誘導のカルセリンによる石灰化

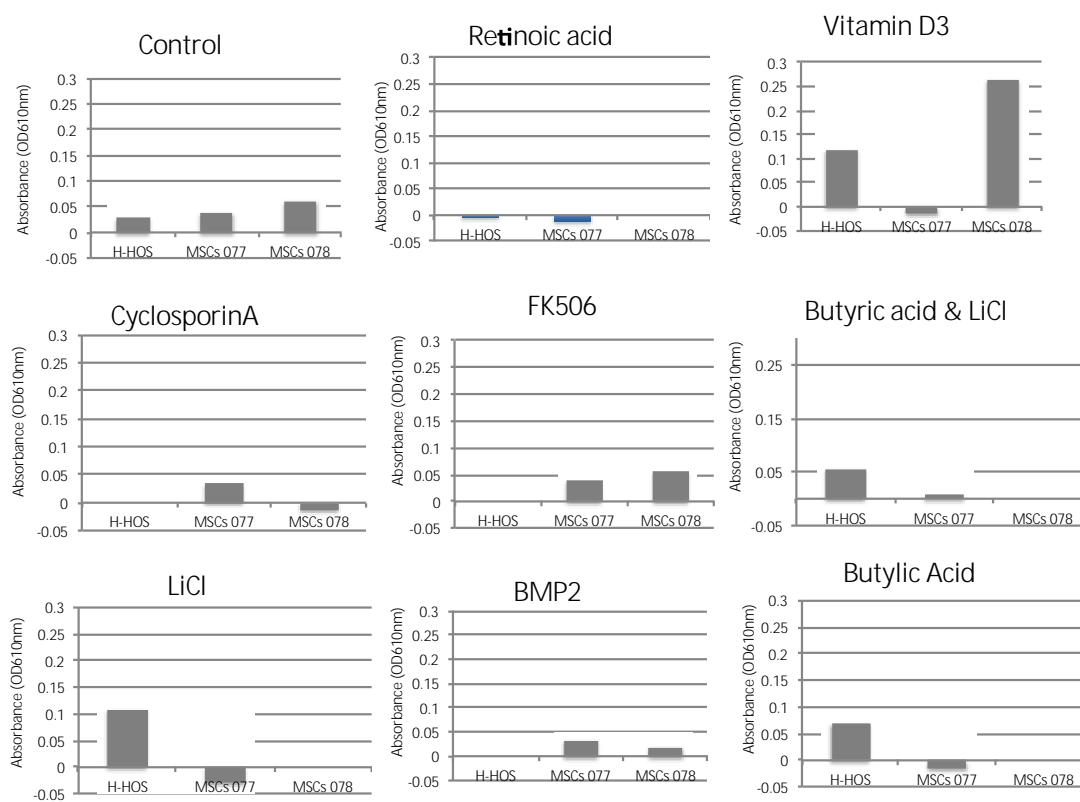
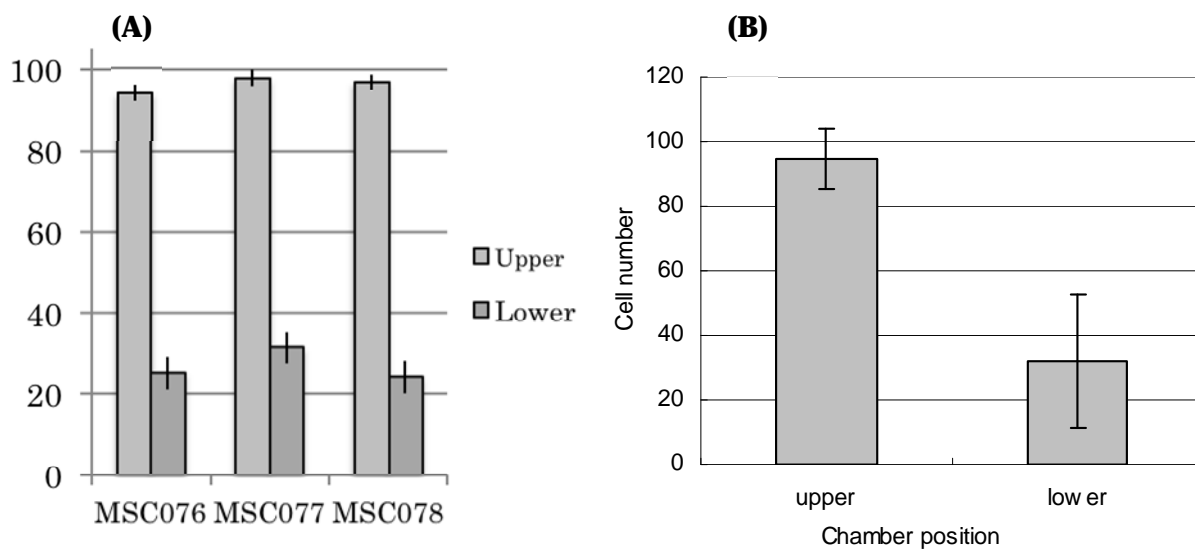


図 5. 遊走能



(A)uMSC のロット別遊走能の比較。ボイデンチャンバーを用いて Upper chamber position および Lower chamber position の細胞数をカウントした。

(B)骨髄由来 MSC の遊走能の比較。uMSC 同様、各 chamber position でセルカウントした。細胞数は百分率で示し、 1×10^5 cells/mL でセットした細胞を 100 とした。

図 6. 選別した iPS 細胞クローンの顕微鏡写真(40 倍)

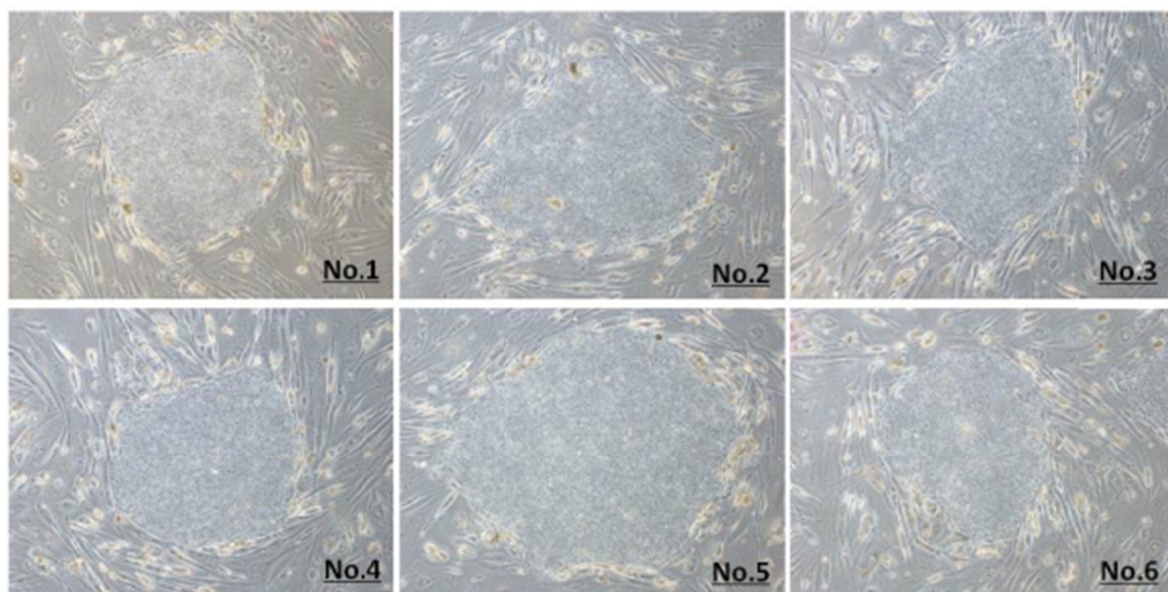
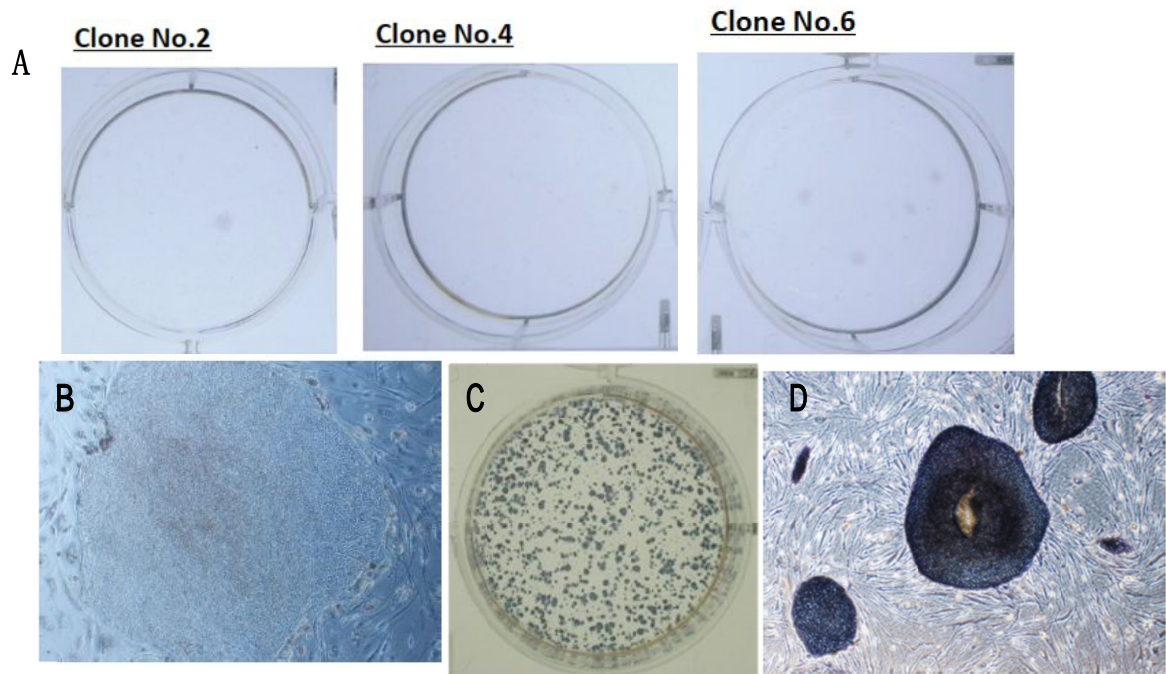


図 7. アルカリホスファターゼ染色



A: アルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

B: アルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(クローン No.6, 40 倍)

C: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の 6well プレート写真

D: 一般的な iPS 細胞株のアルカリホスファターゼ染色後の iPS 細胞コロニーの光学顕微鏡写真(40 倍)

表 1 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数

Sample name	Ct 値	RNA copy No. (copies/mL)	RNA copy No.平均 (copies/mL)
All-in-One Vector	17.52	2.43×10^{10}	2.55×10^{10}
	17.38	2.67×10^{10}	
Non template control	34.91	検出限界以下	-
	35.43	検出限界以下	

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
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
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/archdiscchild-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
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
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	3571-3579	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