

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15715

研究課題名(和文) 真に臨床応用可能な細胞移植治療法の開発

研究課題名(英文) Development of clinically applicable cell transplantation therapies

研究代表者

小田 泰昭 (Oda, Yasuaki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70602473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低ホスファターゼ症は、ALPL遺伝子の変異により重度の骨形成不全を示す難治性骨疾患である。本研究では、低ホスファターゼ症モデルマウス(Alpl^{-/-}マウス)を用いて、分化・増殖能・遊走能が極めて高い、超高純度間葉系幹細胞(MSC)を用いた細胞移植治療の基盤技術開発を行った。放射線照射後のAlpl^{-/-}マウスに、同種同系マウスの骨髄細胞とヒト超高純度MSCを移植した。2か月後に、マウス大腿骨の凍結薄切片を作製し、骨を作り出す骨芽細胞の指標であるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を調べた。移植群でのみ、ヒト超高純度MSC由来のALP活性が検出された。また、生存率も大幅に向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、低ホスファターゼ症の治療薬は酵素製剤(製品名：ストレンジック)のみであるが、生涯にわたって投薬が必要であり、投薬を続けることで中和抗体(薬の効果を打ち消してしまう抗体ができること)が出現する懸念がある。

本研究成果は、ヒト超高純度MSC移植という、低ホスファターゼ症に対する新たな治療法の選択肢を提案すると共に、併用することでより相乗的な効果が期待される。ヒト高純度MSC移植のみで治療が可能になれば、根治療法となり得る可能性も秘めている。低ホスファターゼ症のみならず、他の骨系統疾患にも適応できると考えられるため、学術的にも社会的にも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hypophosphatasia is a rare bone disease that presents with severe osteogenesis imperfecta due to mutations in the ALPL gene. In this study, using with hypophosphatasia model mice (Alpl^{-/-} mice), we developed a basic technology for cell transplantation therapy using ultra-high-purity mesenchymal stem cells (MSC), which have extremely high differentiation, proliferation, and migration ability.

Mouse bone marrow cells and human ultra-high purity MSCs were transplanted into X-ray irradiated Alpl^{-/-} mice. Two month later, I prepared frozen slices of mouse femur to examine alkaline phosphatase (ALP) activity, which is an indicator of bone-producing osteoblasts. ALP activity derived from human ultra-high purity MSC was detected only in the transplanted group. And the survival rate has also improved significantly.

研究分野：再生医療

キーワード：低ホスファターゼ症 再生医療 間葉系幹細胞 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症は、組織非特異的アルカリフォスファターゼの変異により酵素活性が低下し、重度の患者では致死性の骨形成不全を呈する。酵素補充療法による治療が行われているが、酵素製剤に対する抗体が出現し、治療効果が低減する懸念がある。申請者らは、本疾患に対して、骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を用いた細胞移植治療を日本で初めて実施した。世界初となる全身骨の再生に成功し、救命効果も認められたが、正常な骨構造の回復には至っていない。原因として、移植した MSC が骨へ遊走・生着していないこと、増殖・分化能に限りがあることが考えられた。

そこで、本研究では低ホスファターゼ症に対して、①MSCを凌駕する増殖・分化能を有する超高純度 MSC 移植治療法の確立、②遺伝子改変血液細胞を用いた、全く新規の細胞移植治療法の開発を行う。いずれの移植法も、広範な疾患に対応する革新的な治療になり得ると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、重度の骨形成不全を呈する低ホスファターゼ症をモデルとして、『真に臨床応用可能な細胞移植治療法』を開発することを目的とする。具体的には、①分化・増殖能・遊走能が極めて高い超高純度 MSC を用いた細胞移植治療の基盤技術開発、②遺伝子改変血液細胞を用いた細胞移植治療技術の開発を行う。いずれも、低ホスファターゼ症のモデルマウスである、*Alpl*^{-/-} マウスを治療対象として基盤技術を確立する。

研究当初は上記の計画であったが、①の計画が予定以上に進捗したこと、他に参加していたプロジェクトとの兼ね合いで、臨床応用の計画に目途が立ったため、①のテーマにほぼ特化して研究を推進した。

3. 研究の方法

研究方法の概略を図1に示した。



図1. 研究方法の概略図

(3-1) レシピエントマウスへのストレンジック投与

本研究で用いた低ホスファターゼ症モデルマウス (*Alpl* ノックアウトマウス) は、アメリカの Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute の José Luis Millán 教授から分与して頂いた。

Alpl^{+/-} マウス同士を交配して得られた、day0~day5 の仔マウス尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR にて遺伝型の判定を行った。出生後、*Alpl*^{-/-} マウスには週 2, 3 回の頻度で 8 mg/kg の

ストレンジックを継続的に皮下投与した。細胞移植後も、同様の方法でストレンジック投与を継続投与した。

(3-2) レシピエントマウスへのヒト超高純度 MSC 投与

ヒト超高純度 MSC 移植の前日に、ドナーである野生型マウス (B6 メス) と、レシピエントである *Alpl*^{-/-} マウスに免疫抑制剤 (0.5mg/1mL グラセプター) を体重 10g あたり 0.1mL 投与した。移植当日、*Alpl*^{-/-} マウスに 8Gy の放射線を照射し、直後に B6 マウス由来骨髄細胞とヒト超高純度 MSC を懸濁して、マウスの尾静脈から投与した。比較対象となる *Alpl*^{-/-} マウスには、同数の B6 マウス由来骨髄細胞のみを投与した。

(3-3) 組織学的検討

移植 2 か月後のマウスの大腿骨を採取し、直ちに PFA で一晩、4°C で固定した。翌日に PBS に置換して数回 wash し、川本法の手技に従って組織の凍結ブロックを作製し-80°C で保存した。組織凍結ブロックは、クライオスタット (Leica 3050) を用いて 10 μm の厚さに薄切し、Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (86R, sigma) の protocol に従って ALP 染色を実施した。

(3-4) レシピエントマウス生存曲線解析

カプランマイヤー生存曲線は、統計解析ソフト EZR を用いて解析した。解析方法は、自治医科大学附属さいたま医療センター血液科のホームページ (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) に掲載された各種マニュアルを参照した。

4. 研究成果

(4-1) ヒト超高純度 MSC 移植 2 か月後の骨髄内 ALP 活性の検討

ALP 活性の陽性コントロールであるマウス (*Alpl*^{+/-}, 図 2 左) では、通常骨芽細胞が多く局在する大腿骨骨頭部海綿骨 (成長板付近) および皮質骨表面に ALP 活性 (青矢印、薄紫部分) が検出された (図 2 左)。一方、陰性コントロールである骨髄細胞のみを移植した *Alpl*^{-/-} マウス的大腿骨では、ALP 活性は全く検出されなかった (*Alpl*^{-/-}, 図 2 中)。

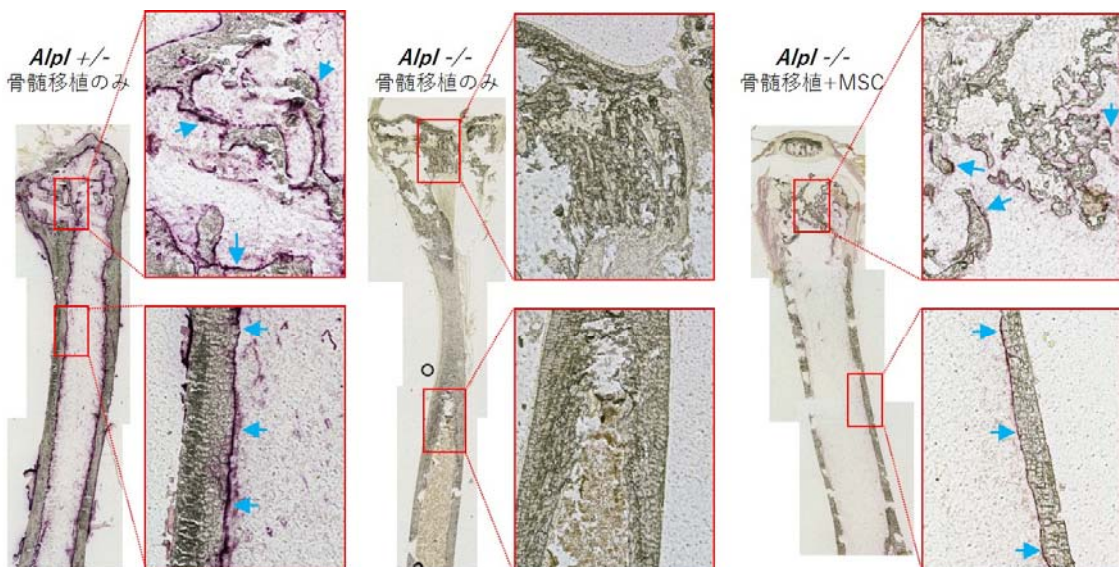


図2. ヒト高純度MSC移植後のマウス大腿骨凍結切片のALP染色像

これに対し、骨髄細胞とヒト超高純度 MSC を移植した *Alpl*^{-/-} マウスの大腿骨では、骨頭部海綿骨および皮質骨表面の一部に ALP 活性が検出された (*Alpl*^{-/-}, 図 2 右)。

骨髄細胞のみを移植した群では ALP 活性が全く検出されなかったこと、骨髄細胞およびヒト高純度 MSC を同時移植した細胞でのみ ALP 活性が示されたことから、移植したヒト高純度 MSC がマウス体内で生着後、骨芽細胞へと分化し、ALP を産生したことが示唆された。

(4-2) ヒト超高純度 MSC 移植の有無による生存率の比較

非移植群 (移植なし, n=67, ストレンジック投与、図中: 黒線) と移植群 (移植あり, n=9, 骨髄細胞+ヒト高純度 MSC+ストレンジック投与、図中: 赤線) の生存曲線を、 Kaplan-Meier 法を用いて log-rank 検定で評価した。ヒト高純度 MSC 移植により *Alpl*^{-/-} マウスの生存率が有意に改善した (図 3, p=0.00045)。

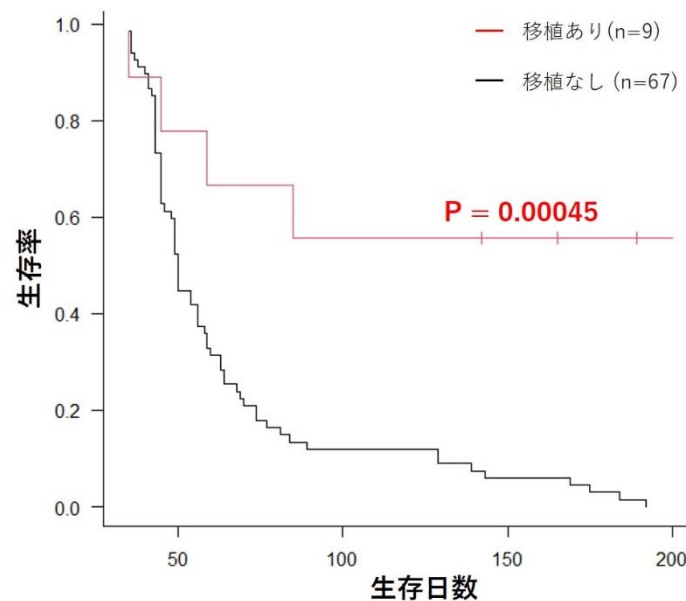


図3. ヒト超高純度MSC移植の有無による低ホスファターゼ症モデルマウスの生存率比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小田 泰昭, 陶山 隆史, 宮内 裕美, 松崎 有未, 竹谷 健
2. 発表標題 ヒト骨髄由来超高純度幹細胞“REC”を用いた低ホスファターゼ症への臨床応用に向けて
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 竹谷健, 小山千草, 小田泰昭	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 不明
3. 書名 血液内科	

1. 著者名 Taketani T., Oyama C., Oda Y., Murphy L.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 349
3. 書名 Human Pathobiochemistry	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨疾患治療用医薬組成物	発明者 竹谷 健、小田 泰昭、伊谷 有未、陶山 隆史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 24794	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------