

軟骨無（低）形成症の下肢骨延長術における細胞治療の試み

研究分担者 鬼頭 浩史 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科 講師

研究要旨 下肢骨延長術において延長部位の仮骨形成を促進させ、治療期間を短縮させることを目的として、培養骨髄細胞と多血小板血漿の移植を併用した細胞治療を開発した。細胞移植を併用した15例38骨と、移植を併用しない9例32骨の治療成績を比較した。Healing Index は移植群で平均30.7日/cm、コントロール群で36.2日/cmであり、細胞移植により有意に治療期間が短縮した。また、追加治療を要した合併症は移植群で0.08回/骨、コントロール群で0.22回/骨であり、細胞移植により合併症が減少した。細胞移植の骨形成促進効果は、下腿骨延長よりも大腿骨延長において顕著であった。

A. 研究目的

軟骨無形成症および軟骨低形成症の低身長に対する治療として、下肢骨延長術は広く行われているが、大量の延長を希望されるため治療期間が長期化し、それに伴い合併症が多くなるのが難点とされている¹。延長部位の骨形成を促進させ、治療期間を短縮させることができれば合併症の減少につながり、安定した治療成績が期待できる。我々は細胞、増殖因子、scaffold（足場）を組み合わせた組織工学的手法を用いて、延長部位の骨形成を促進させる新しい治療法を開発した²。

骨髄にはさまざまな間葉系組織に分化し得る未分化間葉系幹細胞が存在し、これらをデキサメサゾン含有の培養液で培養することにより骨芽細胞への分化誘導が可能である³。また、骨髄は採取による正常組織の損傷が少なく、ドナー組織として優れている。我々はラットの骨延長モデルを用い、コラーゲンゲルに包埋した培養骨髄細胞を延長部位に移植することにより骨形成を促進させることに成功した⁴。ヒトにも応用可能な技術であると考え、移植細胞には骨髄細胞を選択した。

多血小板血漿（platelet rich plasma : PRP）は血小板由来の細胞増殖因子に富み、また、トロンピンとカルシウムと混合することによりゲル化することから、scaffoldとしても有用である⁵。さらに、自家組織のため感染や免疫反応の危険性は少ない。そこで、培養骨髄細胞とPRPを延長部位

に注入することにより骨形成を促進させ、骨延長術における治療期間の短縮を目的とした細胞治療を試みた。

B. 研究方法

下肢骨延長手術時に約40mlの骨髄液を腸骨より採取し、遠心後、中間層の単核細胞を分離した。抗生剤、10%患者血清、100nM デキサメサゾン、10mMβグリセロリン酸、0.2mM アスコルビン酸を添加した培養液で付着性細胞を初期培養し、コンフルエントに達した細胞は5000個/cm²の濃度で継代した。約3週間培養し3代継代した細胞を移植に用いた。移植前に培養液中の細菌、真菌、エンドトキシン、マイコプラズマの検査を行い、コンタミネーションのないことを確認した。骨芽細胞への分化の指標として、継代毎に培養液中の骨型アルカリフォスファターゼ（bone specific alkaline phosphatase : BAP）の濃度を測定した。なお、培養工程はすべて専用の細胞調整室（cell processing center : CPC）で行った（図1）。

移植前48時間以内に採取した静脈血200mlを200g、15分間遠心分離して二層に分離した。血漿の含まれる上層の半透明層を吸い上げ、再び560g、15分間遠心して上層に血小板の少ない血漿（platelet poor plasma : PPP）、下層に血小板の沈殿を含むPRPを得た。最終的にはPPPを除去し、10mlとなるように量を調整した。精製した

PRPは移植までの間、室温でゆっくりと振動させながら保存した。

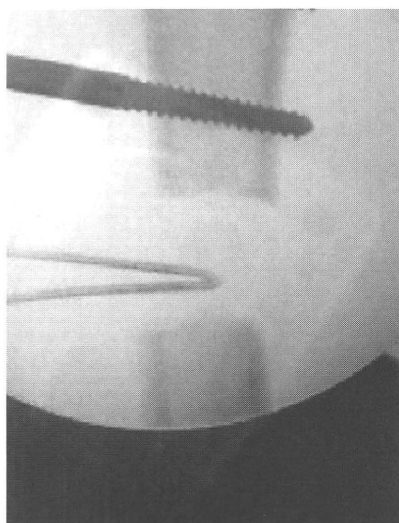
手術室で培養骨髄細胞とPRP、5000単位のリトロンビン末と2 mEq グルコン酸カルシウムをそれぞれ別のシリンジにて混合した。イメージ透視下に2本の18G スパイナル針を先が対面するように延長部位に刺入し、培養骨髄細胞とPRPの混合液5 ml、トロンビンとカルシウムの混合液2 mlを同時に注入し、体内でのゲル化を図った(図2)。両側に対し同様の移植を施行した。

15例(軟骨無形成症12例、軟骨低形成症3例)38骨(大腿骨18骨、下腿骨20骨)に対し、細胞移植を併用した下肢骨延長術を施行した。当院で細胞移植を併用せずに治療した9例(軟骨無形成症7例、軟骨低形成症2例)32骨(大腿骨14骨、下腿骨18骨)をコントロールとして、手術時年齢、延長量、延長率、Healing Index、合併症を検討した。合併症は手術など追加治療を要したものと定

図1：CPCでの培養風景。作業者と観察者の2名で必ず入室する。



図2：注射による細胞移植

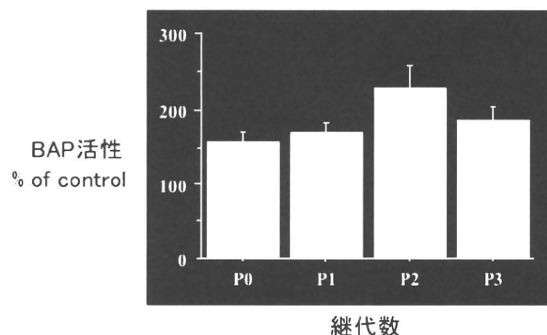


義し、抗生剤投与により軽快するようなピン刺入部感染は含めなかった。両群における各パラメーターをMann-Whitney U testあるいはPearsonの χ^2 検定を用いて統計学的に比較し、P値0.05未満をもって有意差ありと判定した。

C. 研究結果

全例、目的の延長量を獲得し、細胞移植に伴うと思われる合併症は認めなかった。3週間培養した結果、平均 3.2×10^7 個のP3の培養骨髄細胞を移植した。BAP活性はP2でピークを示したが、P3の細胞でも十分に保たれていた(図3)。

図3：培養骨髄細胞のBAP活性



移植群とコントロール群における各パラメーターの比較を表1に示す。手術時年齢、延長量、延長率に両群間で差は認めなかった。Healing Indexは移植群で平均30.7日/cm、コントロール群で36.2日/cmであり、移植群で有意に小さかった(図4)。合併症は移植群の3骨、コントロール群の7骨で認め、コントロール群でやや多い傾向にあったが、有意差は認めなかった。移植群では

表1：移植群、コントロール群における治療成績の比較

	移植群	コントロール群	P値
手術時年齢(歳)	16.3±3.01	17.1±4.06	0.7577
延長量(cm)	9.12±1.35	8.84±1.28	0.7436
延長率(%)	41.9±12.5	39.8±9.82	0.7412
Healing Index(日/cm)	30.7±8.94	36.2±10.4	0.019*
合併症(回/骨)	0.08	0.22	0.0959

表2：延長部位におけるHealing Indexの比較

	移植群	コントロール群
大腿骨	27.5±8.13	38.4±11.5
下腿骨	33.6±8.82	34.5±9.53
P値	0.014*	0.5183

図4：コントロール群と移植群の Healing Index の比較

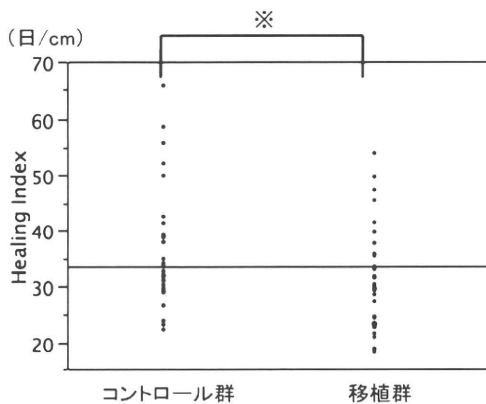


図5：コントロール群における大腿骨・下腿骨の Healing Index の比較

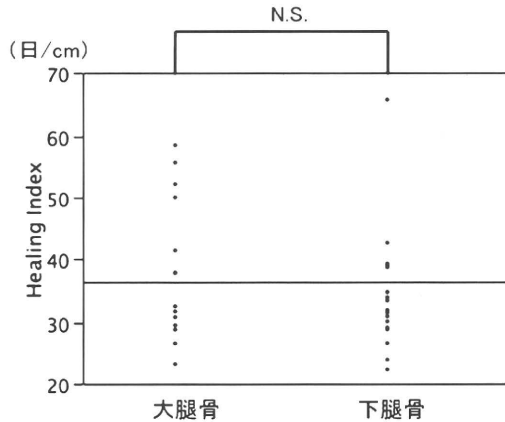
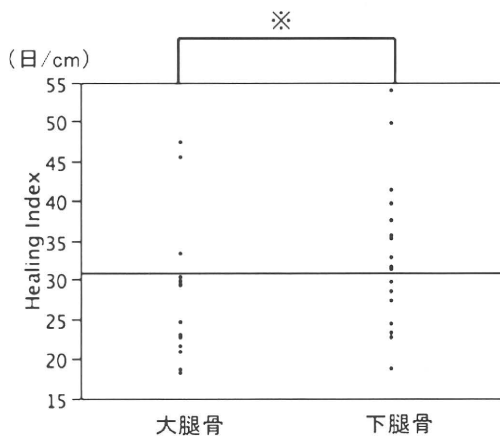


図6：移植群における大腿骨・下腿骨の Healing Index の比較



大腿骨骨折、脛骨骨折がそれぞれ1骨ずつあり、いずれも保存的に加療した。大腿骨延長の1骨で仮骨の早期癒合を認め、経皮的骨切り術を追加した。コントロール群では大腿骨骨折を1骨、脛骨骨折を2骨に認めた。また、関節拘縮残存のため膝分離術、アキレス腱延長術をそれぞれ1肢、3肢に施行した。

延長肢別に成績を比較すると、コントロール群では大腿骨、下腿骨で Healing Index に差を認めなかった(図5)。一方、移植群では大腿骨での Healing Index は平均27.5日/cmであったのに対し、下腿骨では33.6日/cmであり、大腿骨延長において有意に治療期間が短縮した(表2、図6)。

D. 考察

骨延長術は骨だけでなく筋肉、腱、神経、血管などの軟部組織も同時に新生させる複合組織形成術である。延長速度は軟部組織の影響を十分に考慮することが重要で、下肢骨延長術では一般的に1日1mmが原則とされている。細胞移植により骨形成が促進された場合、延長速度の調整が必須となる。延長速度を早めることにより末梢神経障害によるしびれ感や、筋・腱の伸長不全による関節拘縮が生じる可能性があるため、仮骨の早期癒合が危惧された場合にのみ、軟部組織の緊張を注意深く観察しながら短期間延長速度を1日1.5mmとした。その結果、本研究では関節拘縮が残存して追加治療を要したものはなかった。しかし、大腿骨延長の1骨で仮骨の早期癒合を呈した。

骨延長術における治療成績の評価として Healing Index が用いられることが多い。Healing Index は患者の年齢、延長量、延長部位、延長器の種類、抜釘時期の決定などの影響を少なからず受ける。細胞移植の有用性を評価するために、本研究では同一施設で同様の延長器、手術手技を用いて施行した症例との治療成績を比較した。両群間で手術時年齢、延長量および延長率に差がなかったものの、Healing Index は細胞移植群で有意に減少したため、移植による骨形成促進効果を認めたものと判断できる^{6,7}。細胞移植の骨形成促進効果は、大腿骨延長でより顕著であった。大腿骨延長では、ほとんどの症例で元の骨より太い紡錘形の豊富な仮骨が形成されたのに対し(図7)、下腿骨延長における仮骨は後方優位で、前内側の骨形成が不良となる例が多かった(図8)。これは移植部位の環境、すなわち軟部組織の量および血流が本法に影響を与える因子であると考えられる⁸。すなわち、移植された細胞が直接、骨形成に関わるというよりは、移植部位に存在する細胞に paracrine 的な効果を及ぼすことにより骨形成を促

図7：19歳、軟骨無形成症。
A：細胞移植後2週 B：延長終了時

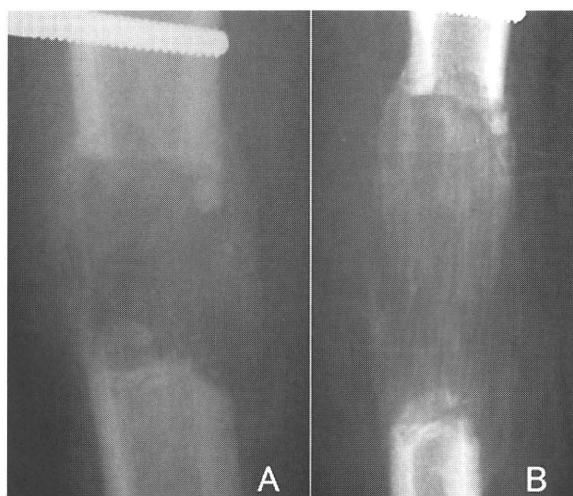


図8：18歳、軟骨低形成症、Consolidation期。
A：正面像 B：側面像



進していることが示唆される。

本法の利点としては次のようなことが挙げられる。まず、骨髓細胞は採取が容易で、採取による正常組織への影響が少ないため、骨再生のドナーに適している。また、培養下で比較的容易に骨芽細胞へ分化、増殖させることが可能である。次に骨髓細胞、PRPともに自家組織であるため、感染や免疫反応の危険性が少なく安全性が高い。さらに、注射による移植であるため極めて侵襲が少ない。本法は骨形成を促進する新しい低侵襲治療法として、従来の同種骨あるいは自家骨移植の代用になり得る可能性を秘めている。

E. 結論

15例(38骨)の軟骨無(低)形成症症例に対し、

培養骨髓細胞と多血小板血漿の移植を併用した下肢骨延長術を施行した。移植に伴う合併症は認めなかった。細胞移植群では Healing Index がコントロール群と比較して有意に減少し、治療期間が短縮した。また、細胞移植による骨形成促進効果は下腿骨延長よりも大腿骨延長で顕著であった。有意差こそ認めなかったものの、追加治療を要する合併症の発生頻度は、細胞移植群で少ない傾向にあった。本法は安全性が高く、低侵襲な骨形成促進治療法である。

F. 文献

1. Simpson AH, Kenwright J. Fracture after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 82-B : 659-665, 2002
2. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of marrow derived mesenchymal stem cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis. - A preliminary result of three cases. *Bone* 35 : 892-898, 2004
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
4. Takamine Y, Tsuchiya H, Kitakoji T, et al. Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel. *ClinOrthop* 399 : 240-246, 2002
5. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma; Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod* 85 : 638-646, 1998
6. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 40 : 522-528, 2007

7. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma. *J PediatrOrthop* 27 : 629–634, 2007
8. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, et al. Differential effects of culture expanded bone marrow cells transplantation on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J PediatrOrthop* 29 : 643–649, 2009

G. 研究発表

1. Kitoh H, Kaneko H, Ishiguro N. Limb lengthening and correction of deformities treated with culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in skeletal dysplasias. 56th annual meeting of Orthopaedic Research Society. 2010.3.6–9 (New Orleans)
2. 鬼頭浩史. 培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第28回つくしの会全国集会. 2010.4.18 (東京)
3. 鬼頭浩史、金子浩史、石黒直樹. 骨系統疾患に対する培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第83回日本整形外科学会. 2010.5.26–30 (東京)
4. 鬼頭浩史. 骨疾患の再生医療の現状と将来. 第3回胎児骨系統疾患フォーラム. 2010.12.12 (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

X線で観察される骨形態の特徴と年齢的变化について

分担研究者 奥 住 成 晴 神奈川県立こども医療センター 肢体不自由児施設長

研究要旨 神奈川県立こども医療センターを受診し、一定期間観察された軟骨無形成症のうち、遺伝子診断で特有の遺伝子変異が判明している症例9例を対象とした。これらの症例について定期的に撮影されたX線像について、下肢、骨盤、脊椎を含む、全身の主要な骨格ごとに骨形態の計測を行い、経年的な変化を追跡した。下肢の連続的な計測によって、大腿骨や脛骨の年間の伸びが算出できた。脊椎では、椎弓根間距離の経年的な変化が把握できた。他の部位についても、これまで一般に言われてきた特徴的所見について再度検証する基礎資料になると考える。

A. 研究目的

軟骨無形成症の診断において、遺伝子診断が比較的容易に行えるようになった現在でも、X線診断は依然として重要な位置を占める。将来起こりうる症状の予測や類縁疾患との鑑別などの点で、より詳細なX線所見、とくに経年的な変化を把握しておくことは重要な意義がある。

そこで今回は、遺伝子診断で確定している症例について、X線所見を経年的に追跡し、より詳細な特徴を検討することを目的とした。

B. 研究方法

i) 下肢の長管骨の長さ

下肢の初回X線撮影月齢（年齢）は生後3～4カ月が3例、10～11か月2例、1歳4か月1例、他の例の初回はすべて5歳以上であった。

両下肢正面像から大腿骨、脛骨、腓骨の長さを計測した。二次骨格が出現していない若年例ではそれぞれの上下縁について、次のような点に留意して計測した。

- ①大腿骨近位について：大腿骨近位骨幹端から股関節臼蓋までを3等分し、上中1/3境界を大腿骨上縁と想定した（図1）。
- ②大腿骨遠位と脛骨近位について：大腿骨骨幹端と脛骨骨幹端の中点をもって両骨の上

下縁とした。

- ③脛骨遠位について：脛骨骨幹端と距骨滑車中央の中点をもって脛骨の下縁とした（図1-c）。

- ④腓骨長について：3～4歳未満では上下骨端の二次骨核が未出現で、計測誤差が大きいため、4歳以上について計測した。脛骨：腓骨の比の計測では、二次骨核の上下端の長さによって算出した。

ii) 骨盤および小骨盤腔の形態について

両股関節正面像または両下肢正面像を用いて計測した。平成21年度、本研究報告書の「軟骨無形成症の臨床診断基準の作成」での方法と同様に、骨盤の横径は左右腸骨の最大水平距離とし、縦径は腸骨上縁から坐骨の下縁までの垂直距離とした。

小骨盤腔の横径は両大坐骨切痕先端間の距離、縦径はこの先端を結ぶ直線から恥骨結合上縁までの垂直距離とした。

iii) 手指の骨格形態について

左右いずれかの手X線正面像で、中手骨および基節から末節骨までの長さを計測した。

また、三尖手（三叉手）に関連して指骨の形態異常について検討した。

iv) 脊椎の形態と脊柱管径について

全脊椎正面像から、第1腰椎と第4腰椎の椎弓根間距離を計測した。

側面像で胸腰椎移行部の楔状化、亀背 (Cobb 角 20° 以上)、椎体後方の陥凹 (scalloping: 椎体後縁の前方への陥凹) についても検討した。

v) その他の部位

○頭骨の形態 頭骨の横径、前後径について検討した。

○上肢の形態、下肢と同様に、上腕骨、橈骨、尺骨の長さについて検討した。

C. 研究結果

各部位別の形態について、主に年齢的变化を中心に述べる。

1) 下肢の長管骨の長さ

i) 生後3～4カ月での初回X線撮影のある3例の大腿骨長はそれぞれ90、92、82mmであった。大腿骨の年間成長率は症例によって、また年齢によって変動が大であったが概ね11～15mmであった。年間成長率の最大例 (調査時12歳の女子) では、生後10カ月から3歳にかけて年平均27mmの伸びであった。

生後3～4カ月での初回X線撮影のある3例の脛骨長は、それぞれ72、71、63mmであった。脛骨の年間成長率は全例全期間で概ね9～13mmであった。

今回の症例における大腿骨に対する脛骨の長さ比は80～85%であったが、1例では11歳時に73%であり、下腿の内反変形を呈した。

脛骨に対する腓骨の長さ比、すなわち (腓骨/脛骨) * 100 (%) は、4歳頃のほぼ100%から漸増し、思春期まで追跡できた6例では最終X線で103%から118% (平均111%) であった。118%の例は下腿の内反が著明であった。

ii) 骨盤の形態について

骨盤は年齢とともに縦成長が横成長を上回り、年齢とともに縦長になる。(横径/縦径) * 100 (%) は、1例では生後3カ月に160%であったが漸次減少し、最終12歳で138%であった。他の例でも概ね135～150%であった。

小骨盤腔の横径に対する縦径はばらつきが大で、症例によって37～46%で、年齢による増減に一定の傾向は見られなかった。

その他の所見として、股関節臼蓋の形状を観察した。水平臼蓋は全例陽性であるが、2例では発育とともに外方が高まる傾向を示した。

iii) 手指の形態

生後3～4カ月で手指の計測可能な3例の中手骨の長さは15、18、16mm、基節骨の長さは、13、16、15mmであった。

三尖手の有無は臨床的に9例中5例で“有”であったが、これらのX線で指骨を検討したところ、6歳以上の手X線がある2例ではいずれも、基節骨の遠位関節面が橈屈変形していた。(図2)

iv) 脊椎の形態

脊柱管横径 (椎弓根間距離) は、生後間もなくでは当然小さく、L1レベルで11～12mmで、発育とともに増大したが、その程度は個人差が大きかった。

L1レベルの増大に比してL5レベルの増大は遅く、L5/L1比は全例で年齢とともに減少した。年長まで追跡できた症例のL5レベルは、12歳で13mmの例から、9歳15mm (脊柱管狭窄症状発現例)、9.5歳16mm、10歳23mmなどであった。

胸腰椎移行部の亀背は全例に存在したが、程度は症例によって異なり、ほとんどの例で年齢とともに減少した。椎体の楔状化も同様の傾向であった。scalloping は全例に存在したが症例によって程度は異なっていた。1例ではこれらの変化が軽度で、9歳時に亀背、楔状化、scalloping のいずれも軽度であった。

v) その他の部位

頭骨の形態、上肢の形態についても検討したが、いずれも撮影回数が少なく、年齢的な推移は追えなかった。

D. 考察

1) 計測方法と問題点について

小児では管骨の長さの計測は容易ではな

い。下肢の長管骨の中で腓骨は上下端が関節を形成していないため、長さ計測が難しく誤差が大となる。4歳以上になって特に遠位の骨化核が出現するまでは正確な計測はできないと考える。

小骨盤腔は前後の広がりを持つ空間であるから、その縦径はX線撮影による誤差が大きいのは当然である。X線撮影時の中心をどこに置くかで著明に変化する。今回の計測に用いたX線フィルムとして、下肢全長Xpと股関節Xpの2種を用いたが、データに大きなばらつきが生じた。今後、時間的変化を追う場合は、いずれか一方に統一すべきと考える。

頭骨の形態も重要であり、計測を行ったが、水頭症発生例を除くとデータが少ないため、結果として記載できなかった。水頭症発生例については短期間に頭部の形態が変化するので、本症自体の診断には適切ではないと考える。計測法については、前方の点を①前額部の最大径、②鼻根部、の2点とすると、この①と②の差が鞍鼻(saddle nose)や前額突出(frontal bossing)を表わす指標となる可能性がある。この場合、後方の点を人字縫合の後上縁とするのが構造上適切のように思われる。

2) 今回の結果について

症例数は少ないが、遺伝子異常が判明している例に限ったこと、部位によっては成長に伴う変化が追跡できた点で意義があると考ええる。

大腿骨長の年間伸び率は、11~15mm、脛骨では9~13mmであった。大腿骨の伸びに対して脛骨の伸びが最も小さかった例は、脛骨の内反の強い例で、現在、創外固定器による変形矯正と骨延長を行っている。

手指の形態のうち、三叉手(三尖手)については、古くから成書に記載されてきたものの、詳細、とくに骨形態についての記載は皆無と言ってよい^{1),2),3)}。軟骨部分が多い幼児期にはわかりにくい、今回、6歳以上の手X線がある2例ではいずれも、基節骨の遠位関節面の撓屈変形が見られた。このような骨格異常が原因なのか、あるいは軟部組織異常に起因した関節位置異常の結果なのか?この解決のためには、MRIによる軟骨形態を把握によって可能となる。

今回の症例で発育期に脊柱管狭窄症状を発症した例は1例で、この例のL5脊柱管横径は9歳で15mmであった。この例よりもさらに小さい13mm例は未だ症状はないが、要注意例として経過観察されている。

E. 結論

軟骨無形成症は、外観的にもかなり特徴的で、見慣れている医師にとっては一見して診断できる例が多い。しかし、中には診断に迷う例もあり、従来よりも一歩進んだガイドラインの存在が望ましいが、こうした診断基準の中でX線検査は依然として重要な位置を占める。

従来言われてきたX線所見を再検証し、年齢的变化も加味することによって、より正確で分かりやすいガイドラインを作成できると考える。

【参考文献】

- 1) Fairbank's Atlas of General Affections of the Skeleton - 2nd ed. Churchill Livingstone.
- 2) Tachdjian's Pediatric Orthopaedics. - 3rd ed. W.B. Saunders Company.
- 3) 西村玄 著:「骨系統疾患X線アトラス」(医学書院)

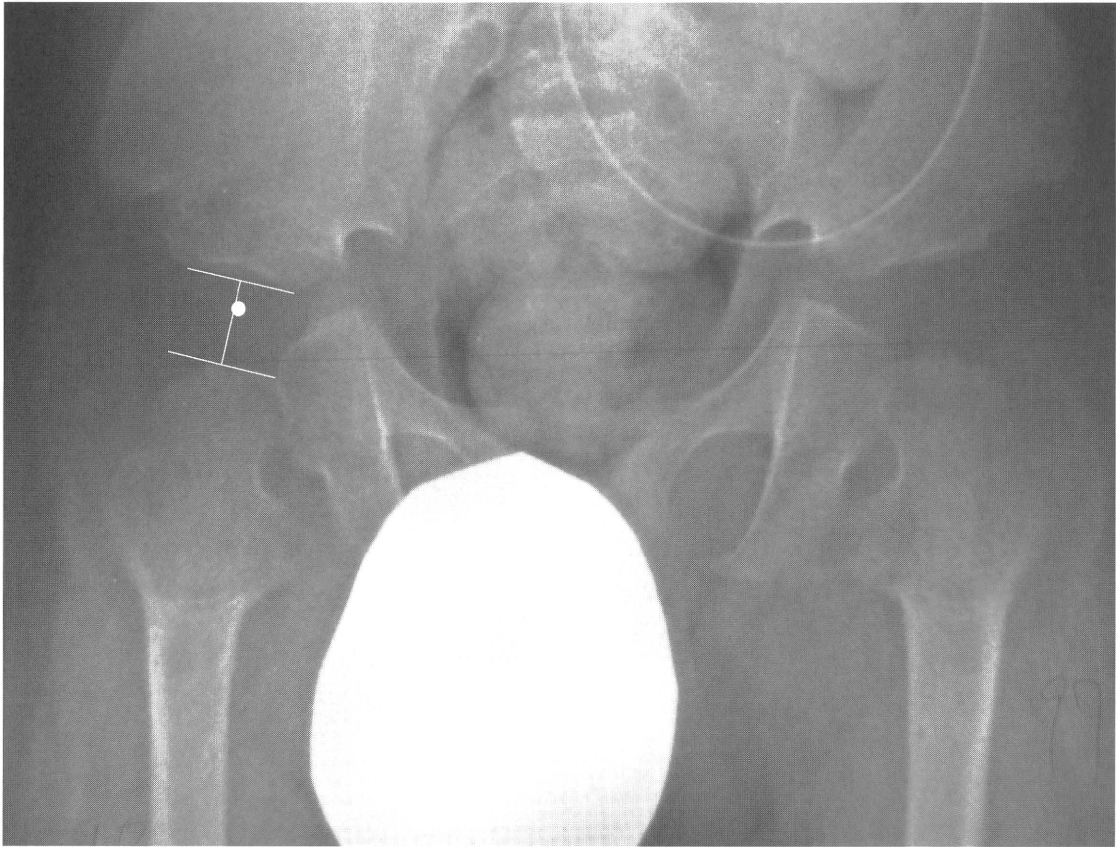


図1. 大腿骨長の計測のための近位端の設定
 白蓋と大腿骨骨幹端間の上中1/3境界点を大腿骨近位端と設定した。



図2. 三尖手における骨形態
 示指基節骨の遠位関節面が母指側に傾斜している（矢印）。

軟骨無形成症に対する単支柱型創外固定器による 下肢延長の治療について

研究分担者 高 村 和 幸 福岡市立こども病院・感染症センター 整形外科科長

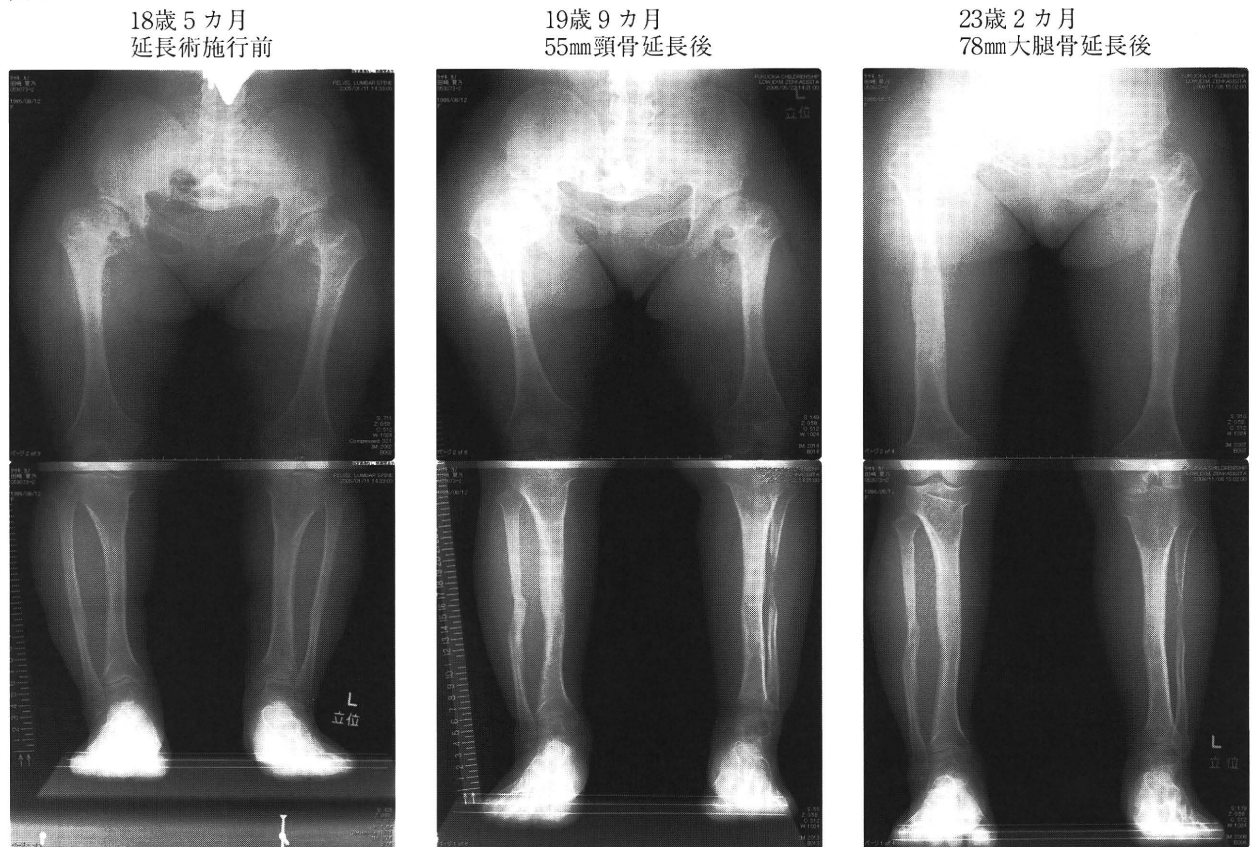
研究要旨 軟骨無形成症に対する単支柱型仮骨延長器の治療を検討した。単支柱型創外固定器はあまりかさ張らない為装着や管理が比較的容易であるが延長後の変形を生じていた。その対策として変形を考慮した screw 刺入や延長終了直前の特殊なクランプを用いることにより変形の予防や矯正が可能になってきた。

A. 研究目的

軟骨無形成症は四肢短縮型の骨系統疾患であり特有の顔貌、四肢短縮、O脚変形、腰椎の前弯の増強などを呈する。約2万出生に1人の発生頻度でありFGFR3遺伝子の変異により線繊維芽細胞増殖因子が抑制され成長障害が発生すると考えられている¹⁾。四肢短縮症の治療としては成長ホルモンによる治療も行われてきているが、O脚の悪

化や水頭症、脊柱管狭窄症などの合併症をきたすことがあるので注意が必要とされている²⁾。低身長を改善するために、いくつかの種類の創外固定器を使用した下肢延長が行われている（図1）。我々は単支柱型創外固定器を用いて脛骨、大腿骨の延長を行った軟骨無形成症の症例を分析し、有用性、合併症などを考察し今後の治療の改善点を検討する。

図1



B. 研究方法

対象は当院および佐賀整肢学園にて Orthofix 社製単支柱型創外固定器を用いて治療を行った軟骨無形成症の症例とした。症例は13名で男児5名、女児8名、そのうち6名が成長ホルモンを投与されていた。脛骨は13症例全例に延長を行い手術時年齢は9歳5カ月から18歳6カ月、平均13歳であった。大腿骨延長は10症例に対して行い手術時年齢は11歳3カ月から19歳9カ月、平均15歳9カ月であった。Waiting periodは10日間、1日0.75～0.1mmの速度で延長を行い、延長速度は仮骨の形成度合いや軟部組織の緊張を考慮して調整した。延長距離、延長期間、創外固定器装着期間、healing index、合併症を調査した。

C. 研究結果

脛骨13例26脚では延長距離は55.0mmから96.5mm、平均75.0mmで延長期間は69日から210日、平均106日、創外固定器装着期間は213日から586日、平均382日、Healing Indexは26.0day/cmから82.0day/cm、平均50.8day/cmであった。

大腿骨延長を行った10症例20脚では延長距離は32.0mmから104.0mm、平均72.0mmで延長期間49日から149日、平均90日、創外固定器装着期間は193日から427日、平均352日、Healing Indexは23.8day/cmから76.3day/cm、平均51.0day/cmであった。大腿骨延長の4症例では延長が終了し現在固定器を装着中であり、創外固定器装着期間とhealing indexの結果には含まれていない。

脛骨延長では13例中6例に延長終了時期直前にスイベリングクランプを使用して一期的矯正を行いalignmentを矯正した。

表層感染は全ての症例で発生し内服の抗生物質と刺入部の処置にて対応したが、脛骨延長の1例と大腿骨延長の1例に深部感染が発症し抗生物質の点滴による投与を行った。脛骨延長開始後全症例で尖足を呈したが、抜釘時には改善していた。その他の脛骨延長による合併症は2例で腓骨の早期骨癒合、1例でアレルギー性皮膚炎が発症し、大腿骨延長による合併症はピン刺入部の肥厚性癬痕、膝蓋骨脱臼、重度の腰痛が1例ずつ発症した。

D. 考察

軟骨無形成症は著明な四肢の短縮を呈する為下肢長を仮骨延長により増加させることにより身長を伸ばし、ADLを改善させる。延長器の種類としてはOrthofix社製などの単支柱型創外固定器が多く用いられていたが、Ilizarov創外固定器³⁾やTaylor Spatial Frameなどのリング状創外固定器⁴⁾の使用例の報告が多くなってきている。我々は手技が簡便で、創外固定器がかさ張らず装着期間の歩行の支障が少ないという観点から単支柱型創外固定器を使用している。今回我々は脛骨で75.0mm、大腿骨で72.0mmの延長を行った。延長量としては他の報告とほぼ同様であり⁵⁾⁶⁾、healing indexは大きくなっていった。healing indexの増加の原因としては我々は骨切りをbone sawで行っており、Yasuiら⁷⁾が提唱している複数のドリル穴を開け鑿にてつなげるという方法を使用することで改善の可能性があるのではないかと考えられた。さらに培養骨髄細胞移植などによる骨形成の促進も有用と考えられる⁸⁾。またもう一つの理由とし再骨折をきたさないよう十分な骨成熟が得られたことを確認して抜釘しており、もう少し抜釘の時期を早めることも可能ではないかと考えられた。

また軟骨無形成症は様々な程度のO脚変形をきたす為、下肢の長軸方向の延長のみではなく、下肢軸の矯正も必要とされる場合が多い。我々は矯正が必要と考えられる症例に対しては脛骨、大腿骨に対し骨切り時に一期的に矯正を行い必要であれば延長終了時期直前で再度矯正を行っている。実際脛骨では13例中6例に延長終了時期直前でスイベリングクランプを用いてalignmentの矯正を行った。リング式創外固定器では変形の矯正が比較的容易に可能であるが、単支柱型の創外固定器な場合、矯正にできる方向に限界があるため、最も重要な前額面での矯正を行えるようにscrewを刺入する必要がある。脛骨延長では外反、大腿骨延長では内反する傾向があるため⁹⁾延長量の多い軟骨無形成症では程度が大きく出やすいためその影響もある程度見込んで矯正する。また脛骨を先に伸ばし、その後大腿骨を伸ばすため最終延長時の形態を考慮してそれぞれの延長を行う。脛骨延長時には脛骨のみでO脚を改善するのではなく脛骨の膝関節面と足関節面が平行であ

る必要があり、最終的に荷重軸が膝関節中央を通り、膝関節の前額面の傾きが正常になるように大腿骨を延長する。

創外固定器による治療の弱点としては感染を起こしやすいという点があげられる。Screw 刺入部の表層感染は全ての症例に起り、創処置と経口抗生物質の投与を行っているが、脛骨延長と大腿骨延長に1例ずつでは経口での改善が芳しくなかったため静脈内投与を行った。骨髄炎を呈することはなく感染による抜釘は行っていない。Screw 刺入部をこまめに観察することで早期の感染徴候を把握し対策をとることが最も重要であると考えられた。

脛骨延長では延長開始後相対的アキレス腱の短縮による尖足が全ての症例で起ってきたが、リハビリにより抜釘時には尖足は改善した。症例によっては装具治療や十分なリハビリが必要な場合があり個々の症例に注意を払い診療する必要がある。

大腿骨延長を行う場合外反位に矯正すると大腿四頭筋が膝蓋骨を外側に牽引する方向に働き、大腿骨外顆の関節面の低形成があると膝蓋骨脱臼をきたす場合がある。対象中1例に膝蓋骨脱臼をきたし、大腿骨延長中は膝蓋骨の位置を注意深く観察する必要がある。

E. 結論

単支柱型創外固定器による仮骨延長は延長器がかさ張らず装着中のADL障害が少なく、また延長方法も簡便で管理しやすいが、延長期間に生じる脛骨外反、大腿骨内反に対する処置が修正しにくい。変形を考慮してscrewを刺入し、変形が出現してきた場合は必要であればスライディングクランプを使用して変形の矯正を行うことで対応可能であり、それぞれの単支柱型創外固定器の矯正クランプを使用することで対応できるのではないかと考えられる。

F. 文献

1. 安井夏生. 軟骨無形成症最新整形外科学体系骨系統疾患、代謝性骨疾患. 98-104, 2007
2. 清野佳紀. 軟骨無形成症—update—. 小児科

臨床. 63: 1113-1116, 2010.

3. 川端秀彦. 軟骨無形成症の下肢変形に対する手術療法. 新OS NOW26 下肢変形に対する手術療法 149-155, 2005.
4. 高橋光彦, 松井好人, 安井夏生. 脚延長術. 新しい創外固定 Tylor Spatial Frame 実用マニュアル 97-105, 2006.
5. Yasui N, Kawabata H, Kojimoto H, Ohno H, Matsuda S, Araki N, Shimomura Y, Ochi T. Lengthening of the Lower Limbs in Patient With Achondroplasia and Hypochondroplasia. Clin Orthop Rel Res 344: 298-306, 1997.
6. 柏木直也. 軟骨無形成症の四肢延長. 整形外科57: 353-360, 2006.
7. Yasui N, Nakase T, Kawabata H, Shibata T, Helland P, Ochi T. A technique of Percutaneous Multiple Drilling Osteotomy for Limb Lengthening and Deformity Correction. J Orthop Sci 5: 104-107, 2000.
8. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Distraction Osteogenesis of the Lower Extremity in Patients With Achondroplasia/Hypochondroplasia Treated With Transplantation of Culture-Expanded Bone Marrow Cells and Platelet-Rich Plasma. J Pediatr Orthop 27: 629-634, 2007.
9. 安井夏生. 骨系統疾患における脚延長術と変形矯正. 日整会誌83: 803-807, 2009.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

軟骨無形成症・軟骨低形成症の *FGFR3* 遺伝子全翻訳領域解析

研究分担者 長谷川 奉 延 慶應義塾大学医学部小児科

研究要旨 臨床的に軟骨無形成症（Achondroplasia 以下 ACH）および軟骨低形成症（Hypochondroplasia 以下 HCH）と診断された計30名で *FGFR3* 遺伝子解析を行った。HCH における既知変異 hot spot のみの解析では変異陽性率は60–70%と報告されていたが、*FGFR3* 遺伝子全翻訳領域を解析することにより、本邦 HCH の変異陽性率は88%であった。Hot spot のみの解析では不十分である。

共同研究者

慶應義塾大学医学部小児科 高木 優樹

A. 研究目的

ACH は軟骨内骨化の異常のため、四肢短縮、骨幹端の拡大、扁平椎、顔面中央部の低形成、三叉手等を呈する先天性骨系統疾患である。HCH は ACH の軽症型であり、ACH 同様近位部優位な四肢短縮型低身長をきたす。ACH の表現型が比較的均一なのに対し、HCH の表現型は幅広く、ACH と鑑別困難な重症例から、身長の高い健常人との鑑別が困難な軽症例まで存在する。ACH、HCH 両者とも責任遺伝子は *FGFR3* 遺伝子であるが、両者では変異の hot spot が異なる。ACH では G380R が全症例の95%以上を占め、稀な変異として G375C も報告されている。一方 HCH において *FGFR3* 遺伝子変異陽性率は60–70%にすぎず、変異陽性者の中では N540K の頻度が高い。ただし過去の報告の多くは hot spot のみの解析である。よって HCH の変異陽性率が60–70%と低いのが不完全な解析しかなされていないためなのか、HCH が heterogeneous な疾患であり、その責任遺伝子が *FGFR3* 遺伝子以外に存在するためなのかは不明である。よって本研究の目的は ACH および HCH 患者において既知の hot spot のみでなく、全翻訳領域を解析することにより、1) 本邦における ACH および HCH の変異陽性率を算出すること、2) *FGFR3* 遺伝子変異陽性者の遺

伝子型表現型関連の有無を検討することである。

B. 研究方法

研究の対象は臨床症状および骨レントゲン所見から ACH と診断された14名、HCH と診断された16名である。解析方法は PCR 直接シーケンス法による解析である。まず ACH、HCH の既知の hot spot である Exon8, 11を解析し、変異が陰性であれば全翻訳領域を解析した。得られた結果より責任遺伝子変異の遺伝子型表現型関連の有無につき検討した。

（倫理面への配慮）

血液採取、遺伝子解析に関しては書面による同意を本人あるいは家族から得て行った。

C. 研究結果

1) 本邦における変異陽性率

ACH：臨床的に ACH と診断された14名の内、13名で G380R を、1名で R248C を同定した。以上から本邦における ACH の変異陽性率は100%（14/14）で、そのうち G380R が占める割合は93%であった。

HCH：臨床的に HCH と診断された16名の内、14名で変異を同定し、その内訳は N540K が7名、K650Q が3名、G380R が1名、新規変異である L324V、S344C、S351C がそれぞれ1名であった。以上から本邦における HCH の変異陽性率は、hotspot のみの解析で63%（10/

16)であったのに対し、全翻訳領域の解析では88% (14/16)であった。

2) 遺伝子型表現型関連

ACH:G380R 変異陽性の13名は臨床症状および骨レントゲン所見からにはACHと確定的であった。R248C 変異陽性者は四肢短縮の程度も軽く、鞍鼻を認めないが、三叉手を認めたためACHと臨床診断された乳児例であった。

HCH:既報変異が同定された14名中1名はACHのhot spot 変異であるG380Rを有していた。現在60歳の男性で成人身長は138.5cm Arm Span 126.0cm、軽度の前額部の突出を認めるのみで三叉手、鞍鼻を認めなかった。

D. 考察

1) 本邦におけるACHおよびHCHの変異陽性率

ACH:診断に迷わないACHの場合ほぼ全例でG380Rが検出される。非定型例では稀にG380R以外の変異が同定されるため、まずG380Rを解析し、変異が陰性であった場合は全翻訳領域を解析すべきである。

HCH:FGFR3 遺伝子の全翻訳領域解析による変異陽性率は88%で、従来のhot spotのみの解析による60-70%より明らかに向上する。Hot spotのみの解析では不十分である。

2) ACH・HCHの遺伝子型表現型関連の有無

G380R 変異陽性者の中でも、典型的なACHから重症なHCHと診断されるものまで臨床像には幅がある。HCH3名で新たな新規変異が同定されたが、陽性者はいずれも臨床的には典型的なHCHであり、本研究からは遺伝子型表現型関連の有無は見出せなかった。

E. 結論

臨床的に軟骨無形成症 (Achondroplasia 以下ACH) および軟骨低形成症 (Hypochondroplasia 以下HCH) と診断された計30名でFGFR3 遺伝子解析を行った。HCHにおける既知変異hot spotのみの解析では変異陽性率は60-70%と報告されていたが、FGFR3 遺伝子全翻訳領域を解析することにより、本邦HCHの変異陽性率は88%であ

った。Hot spotのみの解析では不十分である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

軟骨無形成症の病態解明

研究分担者 親 泊 政 一 徳島大学疾患ゲノム研究センター生体機能分野 教授

研究要旨 変異 FGFR 3 遺伝子がどのようなメカニズムで病気の発症に関わっているかは未だ不明な点が多い。タンパク合成の工場である小胞体がこのメカニズムに関与しているのではないかと仮説を立て、研究を行った。一部の変異型では小胞体ストレスが疾患の発症に関与することが強く示唆された。

研究協力者

徳島大学運動機能外科学 佐藤 亮祐

A. 研究目的

軟骨無形成症は FGFR 3 (fibroblast growth factor receptor 3) の異常により発症するが、FGFR 3 は成長軟骨において増殖軟骨細胞から前肥大軟骨細胞の細胞膜に発現し、主に JAK/STAT-1 経路と MAPK 経路の 2 つを介してシグナルを伝達し細胞の分化・増殖を抑制することが知られている。

FGFR 3 遺伝子の異常により低身長を来す疾患には重症度の低いものより軟骨低形成症 (HCH)、軟骨無形成症 (ACH)、発達遅延と黒色棘細胞症を伴う軟骨無形成症 (SADDAN)、致死性軟骨異形成症 (TD I、II) がある。

これらの疾患群は従来よりこの FGFR 3 からのシグナルが過剰 (constitutive active) になり成長軟骨の分化・増殖が抑制されるために、四肢長官骨の長軸方向の成長が障害され四肢短縮型の低身長になると考えられているが、FGFR 3 の活性と重症度が相関しない報告もあり、シグナル過剰以外の病因メカニズムの存在が予想される。本研究では未だわかっていない病態メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

重症度の低い軟骨低形成症 (HCH) からのもつ

とも重症度の高い致死性軟骨異形成症 (TD) までそれぞれの変異 FGFR 3 遺伝子を前軟骨細胞培養株 (ATDC 5) に導入し、FGFR 3 タンパクの発現パターンを immunoblot 法、細胞内での FGFR 3 の局在に違いがあるかを免疫染色、また変異型 FGFR 3 発現細胞が小胞体ストレスを起こしているかを定量的 RT-PCR を用いて、それぞれ野生型の FGFR 3 を導入した場合と比較検討した。

また本研究は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」を遵守し、遺伝子組み換え実験に必要な「遺伝子組換え実験計画」の承認を徳島大学から得てから、適切な拡散防止措置がとられた徳島大学疾患ゲノム研究センターにおいて実験した。

C. 研究結果

1. 変異 FGFR 3 遺伝子発現プラスミドの構築

軽症型の軟骨低形成症から重症型の致死性軟骨異形成症まででこれまでに報告されている変異 FGFR 3 (全 21 変異) 発現プラスミドを構築した (図 1)。

2. 変異型 FGFR 3 の発現と細胞内局在

前軟骨細胞培養株に変異 FGFR 3 遺伝子を導入し変異型 FGFR 3 タンパクの発現パターンを immunoblot 法でみると、野生型の FGFR 3 を強発現した場合は二重バンドのパターンを示したのに対して、K650M 変異、K650N、K650Q や

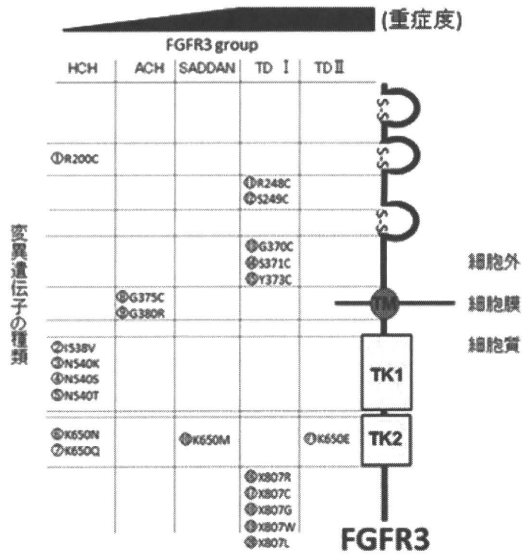


図1. 変異 FGFR 3 遺伝子と重症度

X807C 変異型 FGFR 3 では一重バンドのパターンを示した (図2)。この一重バンドパターンを示したこれらの変異型 FGFR 3 遺伝子を細胞内に導入し、変異型 FGFR 3 タンパクを発現させてその局在を免疫染色でみると、野生型の FGFR 3 の発現は細胞膜に一致して発現しているのに対し、変異型 FGFR 3 は細胞膜への局在は見られず小胞体内に局在していた。

3. 小胞体ストレス測定

定量的 RT-PCR で Bip (小胞体ストレスマーカー)、CHOP (細胞死のマーカー) の発現をみると K650M、K650N や X807C 変異型 FGFR 3 を導入した場合、野生型の FGFR 3 を導入した場合と比べて、Bip、CHOP ともに強く発現していた (図3)。

D. 考察

軟骨無形成症の発症メカニズムは成長軟骨における FGFR 3 遺伝子の変異による FGFR 3 からの

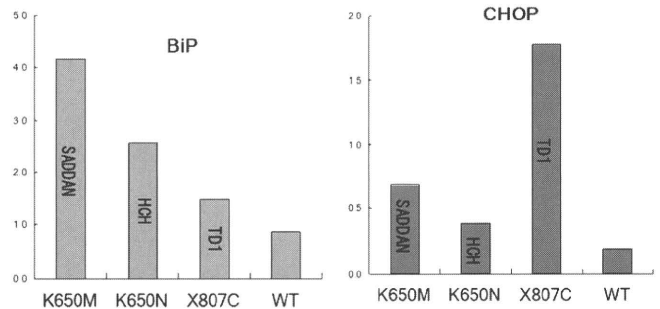


図3. BiP (小胞体ストレスマーカー) と CHOP (細胞死のマーカー) の発現上昇

シグナルの過剰によると言われている。しかし FGFR 3 からのシグナルの活性と重症度が一致しない症例もあり、シグナル過剰以外に発症メカニズムが存在することが予想される。動物実験レベルでは G380R 変異に対して CNP (C 型ナトリウム利尿ペプチド) を強発現することによる FGFR 3 のシグナルの抑制が一定の効果を示すことが報告されているが、本質的な治療は未だ開発されていない。

生体内のタンパク質は細胞内の小胞体という器官でつくられるが、近年、小胞体はタンパク合成の場だけでなく、タンパク質の翻訳抑制や分解、タンパクの折りたたみの促進、細胞死の誘導など生体機能の維持に重要な働きをしていることがわかり、小胞体機能の破綻 (小胞体ストレス) とさまざまな疾患の発症との関係が注目されている。細胞外基質を盛んに産生する成長軟骨細胞は発達した小胞体を持つことから、小胞体ストレス応答が軟骨細胞の機能発現に重要な働きをしていることが予想される。そのため、FGFR 3 変異による内的な要因、それに力学的負荷などの外的な要因が加わり小胞体の機能障害をきたしているのではないかと考えられる。

野生型 FGFR 3 を強発現させて immunoblot でみると、二重バンドパターンを示す。これは FGFR

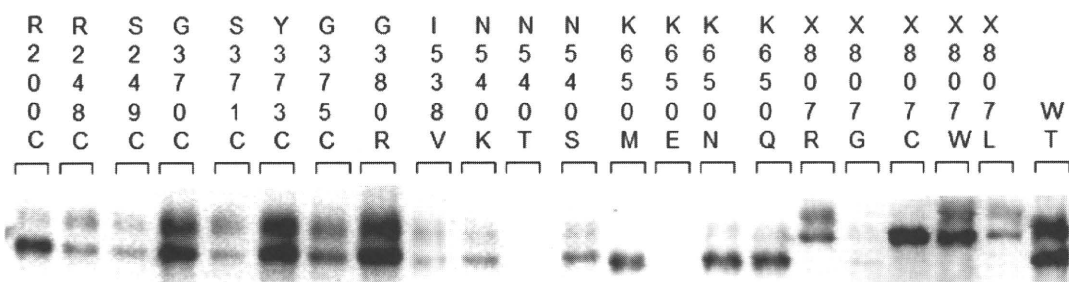


図2. 各変異型 FGFR 3 における発現パターン

3は小胞体で作られ、その後 Golgi 装置を介して細胞膜へ輸送されるが、その過程で糖鎖修飾を受けるため、その前後の状態を反映していると考えられるが、野生型の FGFR 3 のバンドと異なるパターンを示した変異型 FGFR 3 はこの一連の過程を経ていないことが予想される。さらに異なったバンドパターンを示した変異群を免疫染色で FGFR 3 の局在をみてみると、野生型 FGFR 3 が細胞膜に局在するのに対して、変異型 FGFR 3 が小胞体に局在しているのがわかった。さらに定量的 RT-PCR では小胞体ストレスマーカーである Bip 遺伝子と細胞死マーカーである CHOP 遺伝子の発現が野生型よりもこれらの変異型 FGFR 3 で強くなっていることから、FGFR 3 タンパクの変異の部位によってはその変異型 FGFR 3 が小胞体内に蓄積することによって、小胞体ストレスが起り、細胞死が誘導されることが強く示唆された。

FGFR 3 変異遺伝子による小胞体ストレスの関与が明らかになれば、小胞体ストレスを抑える化学シャペロンの投与など病態に即した全く新しい治療法の開発に繋がると考えられる。

E. 結論

FGFR 3 タンパクの変異の位置によっては疾患の発症メカニズムに変異型 FGFR 3 の小胞体内の蓄積による小胞体ストレスが関与することがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 小胞体ストレス応答シグナルによる代謝制御 第5回臨床ストレス応答学会 徳島 2010.11.20.
2. The ER stress response as a possible link between metabolism and circadian rhythm., The 3rd International Symposium on Protein Community ISPC-Nara 2010, 2010.9.14.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧

研究分担者：松 井 好 人

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
松 井 好 人	軟骨異形成症と遺伝子異常	CLINICAL CALCIUM	20 (8)	34-41	2010

