

201206005A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹谷 健

平成25（2013）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 ----- 19

竹谷健

(資料) 症例経過

2. インフォームドコンセントおよび外部評価委員会 ----- 40

山口清次

(資料) アンケート内容

3. 間葉系幹細胞培養 ----- 51

弓場俊輔

(資料) 細胞培養工程

4. 骨形成能の研究 ----- 79

大串始

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性 ----- 86

福田誠司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 121

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 123

I . 総括研究報告

平成 24 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、骨および歯の石灰化障害を来す疾患で、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、呼吸障害を含めた臨床症状の改善および骨の石灰化の回復を認めており、生命予後の改善に寄与している。さらに、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることも確認できた。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、間葉系幹細胞移植を乳幼児でも安全に行うことができた。しかし、正常人同等の骨の石灰化の改善までは到達していないこと、ALP を含めた生化学検査が十分に上昇していないことなどの問題点も明らかとなった。この疾患は致死性疾患で治療法が確立していないため、家族への十分な説明と同意を反復して行い、各専門分野からの指導を取り入れることで、当該臨床研究が適切に行うことができている。さらに、骨形成能、キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性の向上実験を行うことで、より良い治療法の確立に寄与している。この研究のこれまでの成果は、患者の救命、QOL の向上、および研究費以上の医療費ならびに社会福

祉費の削減に貢献できることが示唆された。今後、基礎的研究を継続し、この治療を受ける症例数を蓄積することで、この疾患に対する根治療法が明らかになると思われる。

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

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

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。

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

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。

2. インフォームドコンセント、外部評価委員会、アンケート調査

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行うことができるよう指導を受けるために、外部評価委員会を開催した。さらに、本治療を受けたあるいは受けている患者さんのご家族の病気の理解度、この臨床研究に望むこと、問題点などを明らかにするためにアンケート調査を行った。

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。

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、患者の生検骨組織よりドナー細胞の生着ならびに骨分化を組織的に検索した。

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性

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、外部評価委員会、アンケート調査

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、年度末に外部評価委員会を開催した。さらに、これまで臨床研究に参加して頂いた患者さんのご家族にアンケート調査を無記名で行った。

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。

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。ドナー同種間葉系幹細胞の患者骨内への生着と引きつづきの骨分化は、島根大学から搬送された骨生検資料を用いて、以下の方法により *in situ* hybridization をおこなった。

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性

移植後に患者から造血細胞および間葉系幹細胞を単離して、それぞれの細胞の由来（ドナー由来、レシピエント由来）を検討するために、個人識別マーカである *short tandem repeat* を増幅させ、シーケンス解析で塩基配列を決定した。また、*TNSALP* 遺伝子変異を解析して、ドナー由来細胞の検出を行った。

次に、患者および骨髄提供者（保因者）、正常健康人の間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現を解析して、遺伝子発現パターンの違いから、本疾患の病態を検討した。また、*TNSALP* 遺伝子ベクターを作成後、日本人に低ホスファターゼ症の患者に同定された *TNSALP* 遺伝子変異体を構築し、ALP活性、ドミナントネガティブ効果および石灰化能（カルセインの取り込みによる評価）を検討した。

さらに、間葉系幹細胞の遊走能を高めるために、培養した細胞を剥離する剥離液の検討を行った。

(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および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および産総研の倫理委員会の承認を得た後、行っている。

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; 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、3 歳 6 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 ヶ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。身長、体重および四肢の長さは徐々に上昇しており、座位も可能となり、歩行器による歩行訓練を開始している。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）は徐々に改善している。

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。また、長幹骨の長さも伸びている。陳旧性の骨折線が認められるが、その周囲は明らかに石灰化している。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続している。また、骨形成マーカーや骨吸収マーカーの明らかな変化はみられていない。DXA法による骨塩定量と筋肉量の測定では、どちらも上昇傾向がみられた。特に前者は正常な3歳の値と比べて、60%回復していた。乳歯および腸骨の病理学的検査では、脱落した乳歯はほとんど石灰化していなかったが、腸骨において非脱灰標本で石灰化の改善が認

められ、骨梁に沿った骨芽細胞と思われる細胞の一部がALP染色で濃く染まっていた。

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（skin grade2, 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した後から、劇的に改善した。

間葉系幹細胞移植：これまで7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）行った。平均移植細胞数 $1.8 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主目的：現在、2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た。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。身長、体重および四肢の長さは徐々に上昇しており、頸定および座位が可能となり、食事は経口摂取である。知能は遅れているが少しずつ伸びており、難聴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

石灰化が回復した。また、長幹骨の長さおよび太さも改善している。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続しているが、骨形成マーカーであるBAP、OCおよびucOCが上昇している。また、骨吸収マーカーであるDPD)、NTxおよびTRACP-5bは低下傾向である。骨塩定量と筋肉量はどちらも上昇傾向がみられた。特に筋肉量と骨面積の回復が著しい。腸骨の病理学的検査では、非脱灰標本で石灰化の改善が認められ、軟骨内骨化の間葉系幹細胞の一部がALP染色で濃く染まっているが、骨化した部分の細胞はほとんど染まっていない。

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。

2. インフォームドコンセント、外部評価委員会、アンケート調査

1) インフォームドコンセント

これまで、10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、4例、4例である。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7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、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であった。

2) 外部評価委員会

①胎児治療への取り組み

出生時には病態が完成しており、治療を早期に行った方が良いので胎児治療も念頭におく必要があるが、胎児の免疫原性、大動物のモデルを作成する必要性な

どから、今後の検討課題ではあるが本事業中に取り組むには課題が多いと思われる。

②骨髄移植のみの治療効果

骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄移植だけでの治療効果と判定することもできるが、骨髄移植だけでは間葉系幹細胞が患者由来のままであることから、間葉系幹細胞移植は必須と思われる。

③間葉系幹細胞移植について

・間葉系幹細胞の投与方法、特に、骨髄内投与について、

間葉系幹細胞を静脈内投与した場合、骨への遊走能が悪いため、複数回移植することで骨髄へhomingする細胞数を増やすことを行っているが、骨髄への直接投与も検討する必要がある。しかし、病初期は骨が脆弱なため手技的に骨髄への細胞投与は困難であり、静脈内投与で骨の石灰化を改善した後、骨髄内への直接投与が望ましいと思われた。

・ドナー細胞の長期間生着の評価

同種間葉系幹細胞の生存期間は最大6ヶ月で、通常1~2ヶ月で消失するため、同じドナーからの骨髄移植を併用することによりドナー細胞が長期間生存することを期待できる。今後、定期的にキメリズム解析を行い、ドナー細胞の生存を確認することとした。

・間葉系幹細胞移植の有害事象

これまでは認めていないが、移植回数を増やすことで明らかになる可能性があるため、今後も注意深く follow していくこととした。

④疾患に関して

骨だけではなく中枢神経や肺にも ALP が発現していること、骨以外の ALP の発現部位に一致して症状を認める患者が多いことから、ALP 活性が低いことにより直接的あるいは間接的に呼吸や中枢神経の障害をもたらしていると思われる。したがって、患者由来の iPS 細胞を樹立し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こととした。また、筋骨関連という考えがあるが、逆に骨が石灰化して二次的に筋肉が増強する以外に、骨が産生する何らかの因子が筋肉の発達を促している可能性について、骨が筋肉の発達を促進する因子があるのか、骨芽細胞と筋細胞を同時に培養して検討することとした。

⑤ドナーの負担

現在の臨床研究では、間葉系幹細胞を移植するごとにドナーから骨髄を採取することになっているため、ドナーの負担が大きい。そのため、凍結した間葉系幹細胞の機能について、十分にエビデンスを積み重ねているため、今後の臨床研究に導入していくこととした。

3) アンケート調査

①臨床研究に参加された理由

この治療を受けることによって後々同じ疾患の親や子ども達に少しでも希望がもてるよう、治療法が確立できればと思

った。命を失うことはありえないと思ったから。

②治療を受けて良かった点

症状が良くなり、笑顔が見れ、家に帰ることができた。通常の子どもを育てるよりも一つ一つの事が感動に満ちあふれている。

③治療を受けて悪かった点

骨髄移植の合併症、原病の合併症、薬の副作用がなかった。長期の入院で付き添いをするため家族全員が我慢を強いられる。自宅から遠い。

④今後の治療

期待することは、普通の子どもに不自由なくような暮らしができるようになってほしい。不安なことは、いつまで治療が続き、普通の子どものようになれるのか。

3. 間葉系幹細胞培養

2例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った。15～25mLの骨髄を2～3週間かけて培養し、何れの場合も体重(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。症例2では移植前には非石灰化骨端線の拡張がみられたが、移植後には改善した。症例1,2のCTの解析もレントゲンの解析結果を確認するものであった。また、予備実験であるが、症例2の骨生検

中の骨細胞様細胞にドナー由来のシグナルと思われる輝度を検出し、ドナー細胞の生着と引きつづきの骨分化が示唆された。

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性

1) キメリズム解析

2 症例ともに骨髄からフローサイトメトリーで単離した間葉系幹細胞はドナー由来の細胞が存在していた。しかし、その割合は単離した細胞数が少ないため明らかにすることはできなかった。症例 1 の造血細胞は骨髄移植 1 か月後 100% ドナータイプであったが、移植 8 か月頃から、10~20%台にまでドナー細胞が低下した。その後、現在までこの比率を維持している。症例 2 は、100%ドナータイプを維持している。

2) 病態解析

①網羅的遺伝子発現

間葉系幹細胞および骨芽細胞について、骨代謝に関わる遺伝子の変動しているだけでなく、炎症や細胞内伝達、さらには肺や中枢神経の形成に関わる遺伝子も変動していたことが明らかになった。

②変異体解析

19 個の *TNSALP* 遺伝子変異体の機能解析では、ALP 活性、ドミナントネガティブ効果ならびに石灰化が低下している変異体がほとんどであったが、一部活性が低下していないものもあった。

③間葉系幹細胞の細胞特性

間葉系幹細胞の細胞特性を向上させるために、剥離液の検討を行った。トリプシンに比べて、試薬 A で細胞を剥離した場合、細胞表面の突起が多く認められ、細胞の遊走能が改善した。

D. 考察

1. 細胞治療

		症例 1	症例 2
移植回数	BM	1	1
	MSC	5	7
ドナーの生着	骨髄	100%	100%
	MSC	+(3歳5か月)	+(1歳9か月)
Primary endpoint			
3年生存率		clear	2歳まで生存
Secondary endpoints			
臨床症状	呼吸機能	改善 (呼吸器離脱可)	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	石灰化の改善およびALP陽性細胞を認める	
重篤な有害事象	BMT	甲状腺機能低下症	GVHD
	MSCT	なし	なし

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、クリアできると思われる。臨床症状について、呼吸機能の改善は、4回目の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。身体発育も伸びており、呼吸機能と合わせて、骨髄移植後6か月前後から、明らかに改善する傾向がみられた。しかし、精神発達遅滞や難聴などの中枢神経合併症が認めら

れる。徐々に改善はしているが、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を移植する毎に骨の石灰化が改善しているが、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。さらに、骨の石灰化だけでなく筋肉量も改善しており、骨の石灰化に伴って二次的に回復していると思われた。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、現時点では間葉系幹細胞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。

2. インフォームドコンセント、外部評価委員会、アンケート調査

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。

外部評価委員会を行うことによって、昨年度ご指摘を受けた点を改善したことにより、今年度は昨年度よりもより科学的根拠に基づいた臨床研究を行うことができ、さらに今後につながる基礎研究を遂行することができた。今回のご助言ですぐに実施可能な点や、基礎的実験が必要な課題が明確となったため、各専門家による外部評価委員会の意義が極めて高いと思われた。

アンケート調査では、治療を受けた側からこの治療についての評価を頂いた。一定の評価をいただいたが、この臨床研究の主目的が3年生存率であるが、元気で健康な子どもの状態まで改善したい思いが強いことが改めてわかった。したがって臨床研究が終了しても、継続的に真摯

に follow up していく体制を構築する必要があると思われた。

3. 間葉系幹細胞培養

複数回の移植用間葉系幹細胞の培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。培養した間葉系幹細胞は骨分化能を有しており、患者の骨の石灰化が改善していることから、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。ただし、皮質骨の菲薄化、すなわち骨の脆弱性が持続

しているレントゲン像がみられ、これについては今後の検討を必要とする。なお、予備実験において、患者骨組織内にドナー由来と思われるシグナルが検出できたが、この結果においてはさらなる検証を必要とする。

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性

1) キメリズム解析

2症例ともにドナータイプの間葉系幹細胞が生着したことが確認できたことは、臨床的には、骨化の改善が認められているあるいは石灰化障害の進行を食い止めることができていることに反映していると思われた。また、症例1は、造血細胞がレシピエント優位な状況にも関わらず骨の石灰化が改善していることから、間葉系幹細胞と造血細胞の免疫寛容が生体内で起こっている可能性が示唆された要がある。

2) 病態解析

①網羅的遺伝子解析

間葉系幹細胞と骨芽細胞に関して、ALP活性が低下することにより代償的に骨に関わる遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。しかし、ALP活性が低下することで、直接的あるいは間接的に骨化に関わる遺伝子発現が低下していることから、ALPに関わる骨化（骨の石灰化）の機序が明らかにすることができると思われる。また、特に間葉系幹細胞において、骨に関わる遺伝子だけでなく、細胞内伝達、炎症、細胞接着に関わる遺伝子の変動していた。さらに、この疾患に合併する肺や中枢神経に関与する遺伝子も変動していた。したがって、この疾患が、骨だけでなくさまざまな症状に寄与することと予測されるため、この疾患からiPS細胞を作成して、それぞれの組織に分化させて、詳細に検討していく予定である。

②*TNSALP*遺伝子変異解析

ALP 活性および石灰化能が 70%以上の変異体で低下していたが、これは臨床の重症度と一致する結果であった。しかし、一部の変異体は臨床像と合わずに ALP 活性が高い変異体もみられたこと、ドミナントネガティブ効果を認めた変異体を有する保因者が臨床的に正常であること、同じ *TNSALP* 遺伝子変異体を有する患者でも骨の石灰化の程度に開きがあることから、ALP 以外に骨の石灰化に関わる因子が存在する可能性が示唆された。

3) 間葉系幹細胞の細胞特性

間葉系幹細胞の細胞特性を向上させるために、細胞剥離液を検討したところ、トリプシンよりは遊走能が維持できる剥離液を同定できた。しかし、生体内で骨への homing が高くなるかは明らかでない。さらに、他の因子の検討も重ねて、高い遊走能を有する培養間葉系幹細胞を樹立できるよう検討していく必要がある。

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ある程度の効果を認めることが示唆された。しかし、その有効性および有害事象を明らかにするために、今後、症例数を重ねていくことが必要であると思われた。この効果を客観的に証明するために、臨床症状および骨の石灰化の評価、キメリズム解析を継続して評価していく。この治療が実用段階で成功した場合、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、治療法がない類似疾患や、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

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 竹谷健. 低フォスファターゼ症. 先天性代謝異常ハンドブック. 東京: 中山書店; 2013, p412-413.

2. 学会発表

1) Taketani T, Onigata K, Kanai R, Kobayashi H, Mushimoto Y, Mihara A, Oyama C, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinicogenetical Characteristics of Japanese patients with Hypophosphatasia. the 6th International Alkaline Phosphatase Symposium, Huningue, France, May 16-19, 2012

2) 1. Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, Taketani T. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering : Transplantation of Allogeneic MSCs for Treatment of Hypophosphatasia Patients. Term Stem 2012, Guimaraes, Portugal, October 9-12, 2012

3) Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, T. Taketani. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering : - Tissue engineering approaches for total