

ankle joints and for treatment of
genetic disease. Siriraj Orthopaedic
Alumini Society. Bangkok, Thailand,
October 19, 2012

3. その他

なし

4) 竹谷健. 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.
第 11 回日本再生医療学会、横浜、2012
年 6 月 12-14 日

5) 竹谷健. 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.
第 88 回幹細胞研究会、広島市、2012 年 9
月 12 日

6) 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、横浜、2013 年 3 月 21-23 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

II. 分担研究報告

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）

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

致死的で治療法のない重症低ホスファターゼ症に対して、骨髄移植を行った後、間葉系幹細胞移植を繰り返し投与する細胞治療を行った。これまでの経過から、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 年生存率はクリアできると思われる。また、身体および精神の発育も遅れているが徐々に回復している。骨の石灰化に関して、間葉系幹細胞を移植する毎に骨の石灰化が画像上改善しており、さらに、生化学検査や病理検査でも石灰化が回復している。これらの臨床症状および骨の石灰化は、骨髄移植後 6 か月以降から明らかに改善した。治療が必要な骨髄移植の有害事象を認めたが、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。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、間葉系幹細胞の効果が限定的で十分ではないため、間葉系幹細胞の移植回数や移植方法について詳細に検討する必要があると思われた。有効性ならびに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。

研究協力者

	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）
金井理恵（島根大学医学部小児科・講師）	堀江昭好（島根大学医学部小児科・助教）
鬼形和道（島根大学医学部小児科・講師）	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）
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

①生後 6 か月以内に発症、②呼吸障害の合併、③ALP 活性の低い *TNSALP* 遺伝子変異、④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 (7 IU/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; grade 1, 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
で維持している。

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 (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。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)、I 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、intactP1NP および ucOC が上昇しているが、BAP や OC は低値のままである。骨吸収マーカーの変化はまだみられていない。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。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

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 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（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 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（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た。また、長幹骨の長さおよび太さも改善している。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が、骨形成マーカーである BAP、OC および ucOC が上昇している。intact P1NP の増加は明らかではない。また、骨吸収マーカーである DPD)、NTx および TRACP-5b は低下傾向であるが、1CTP の減少は明らかではない。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。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。

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、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。しかし、生化学検査は症例2では改善しているが症例1では低値のままである。このことに関して、ある薬剤が影響している可能性が示唆されるため、今後詳細に検討していく予定である。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る。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、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。骨髄移植有害事象に関して、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、HLAがミスマッチであ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。なお、間葉系幹細胞移植の有害事象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。

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、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。特に、間葉系幹細胞移植を繰り返すたびに、臨床症状は改善しているが、その効果が十分ではないことから、間葉系幹細胞の移植回数や移植方法について詳細に検討する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

総括報告書に記載した。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表

- 1) 田部有香、竹谷健、柴田直昭、山口清次.
周産期型低フォ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：3例
の経験．第57回日本未熟児新生児学会、
熊本市、2012年11月25-27日
- 2) 竹谷健. 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．第
10回日本胎児治療学会・第5回胎児骨系統
疾患フォーラム、仙台、2012年11月30
日-12月2日

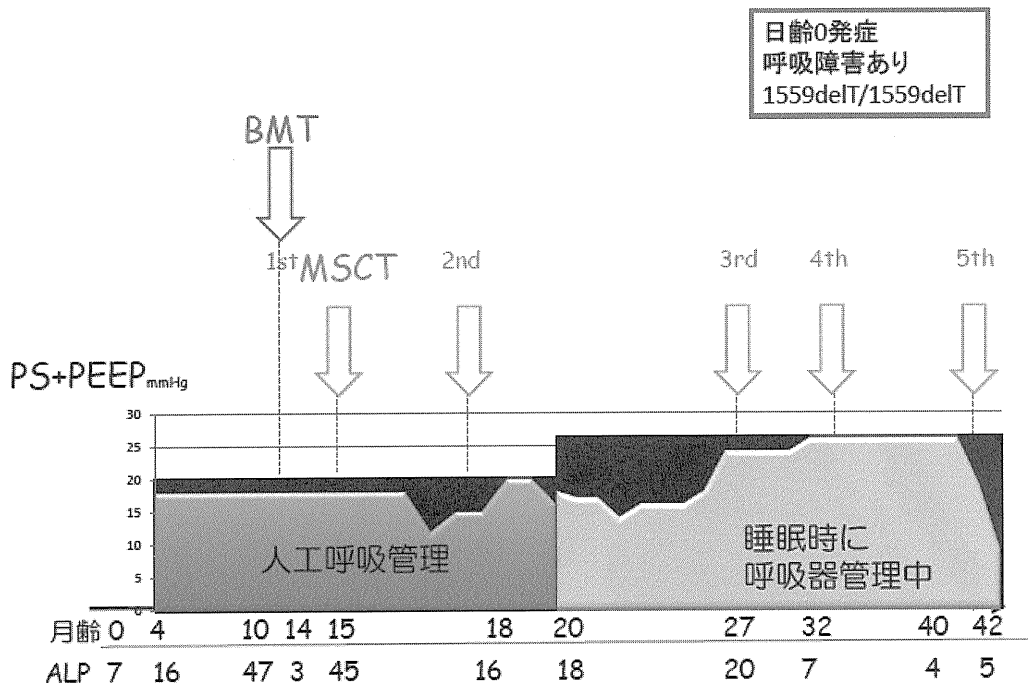
H. 知的財産権の出願・登録状況

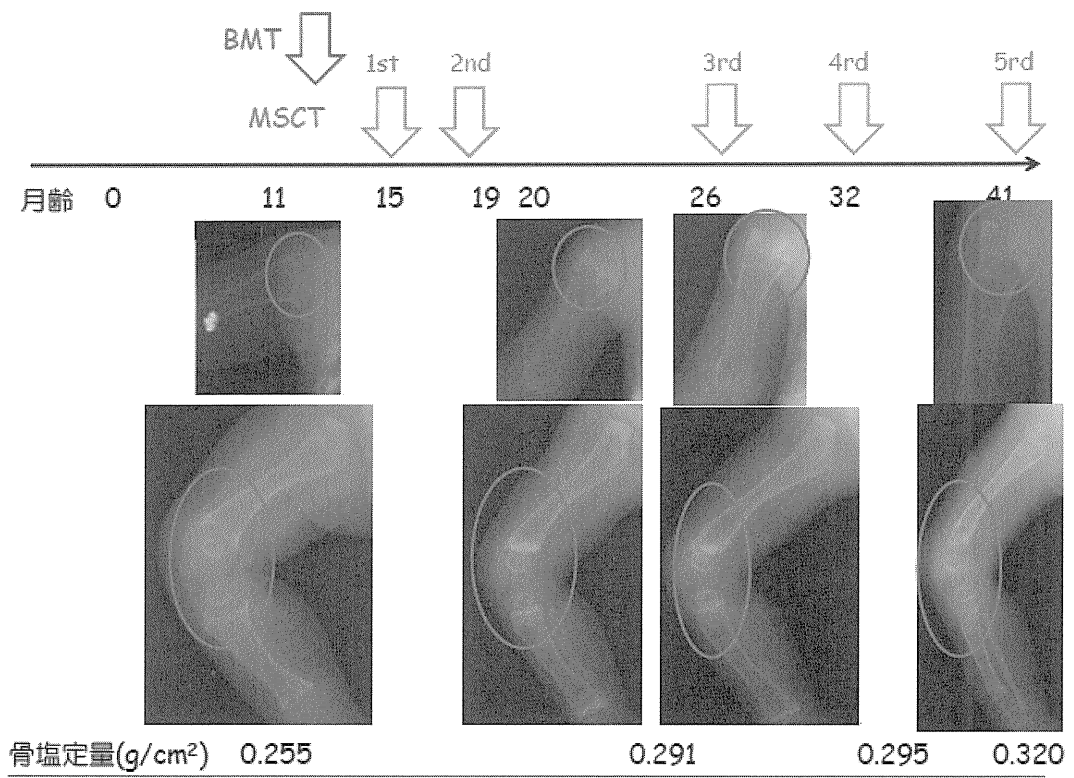
1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

症例1 : 01 Male

骨髓移植	
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（有核細胞数）	$3.56 \times 10^8 / \text{Kg}$
間葉系幹細胞移植	
移植回数	5回
移植時期	1歳2か月、1歳6か月、2歳3か月、 2歳8か月、3歳6か月
移植細胞数	平均 $1.4 \times 10^6 / \text{kg}$

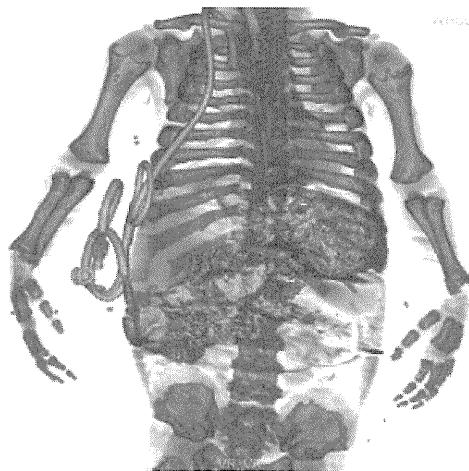
1



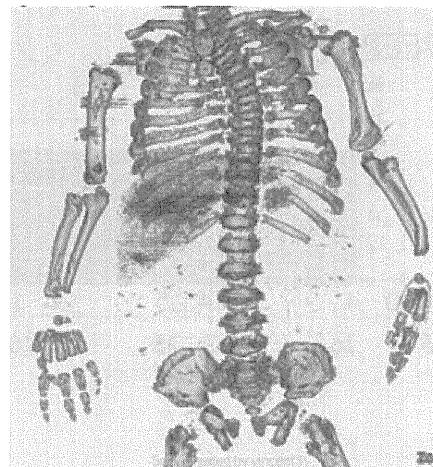


骨CT

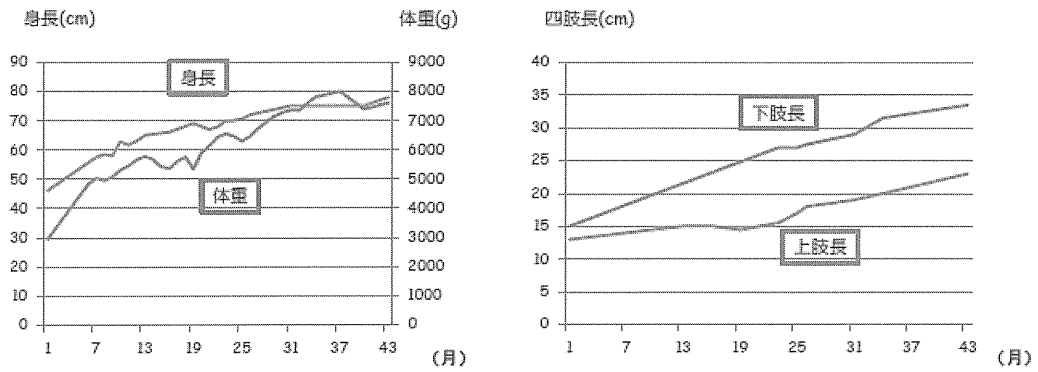
1歳2か月（移植前）



3歳6か月（移植後）

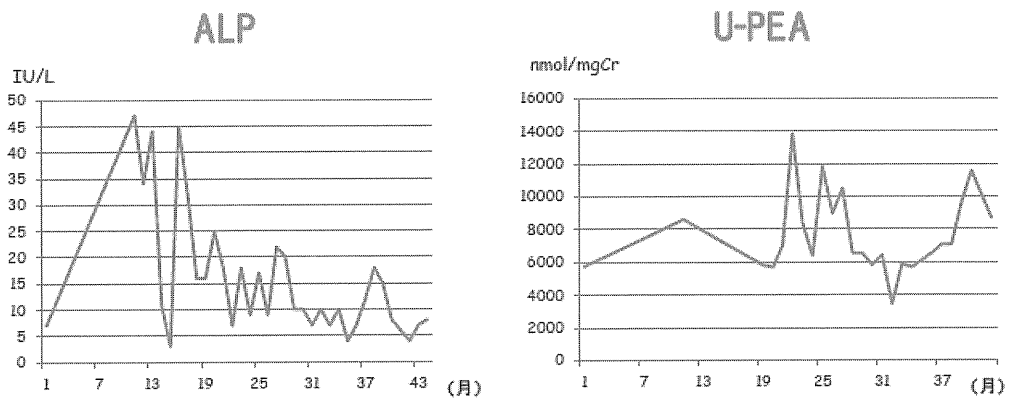


身長・体重・上肢長・下肢長

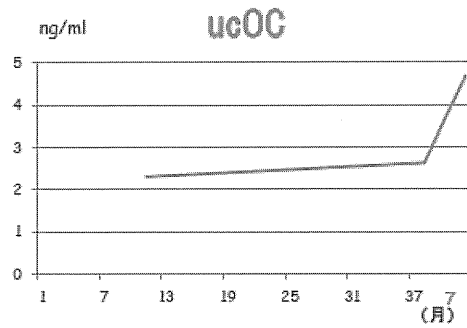
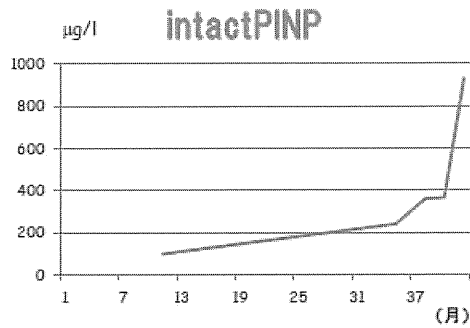
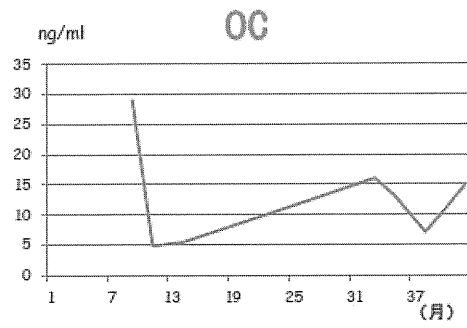
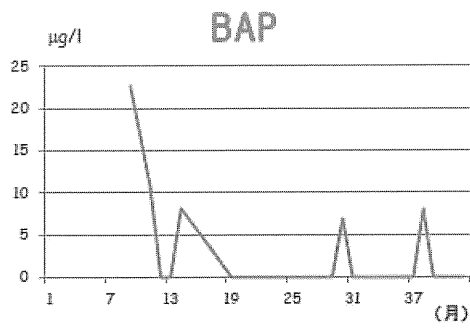


5

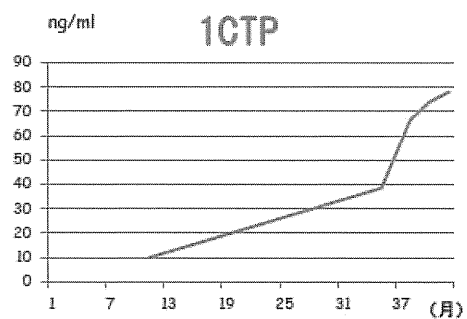
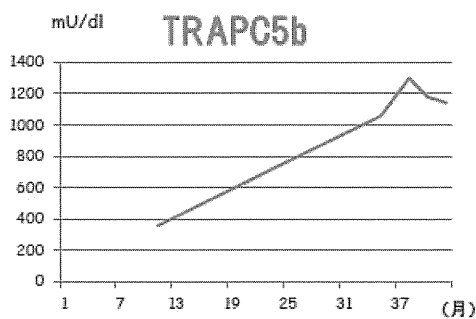
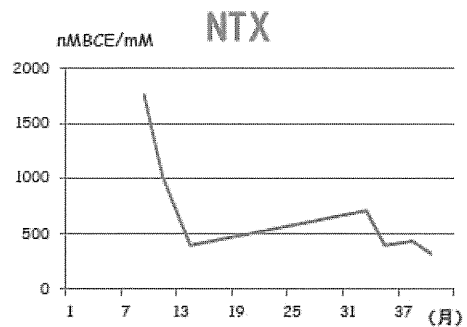
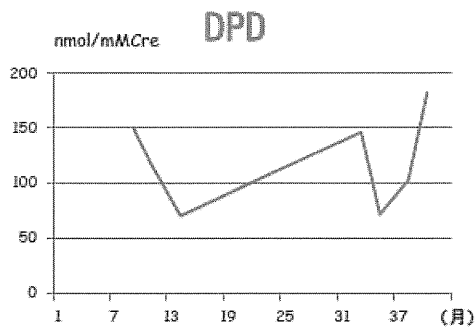
ALP・U-PEA



骨形成マーカー

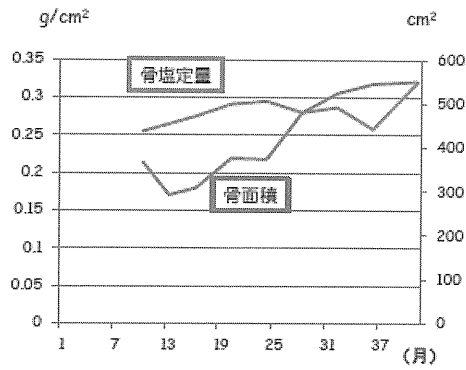


骨吸収マーカー

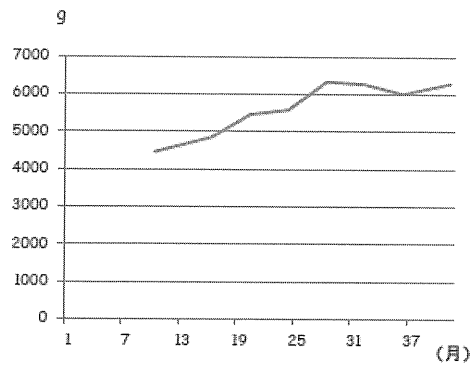


骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



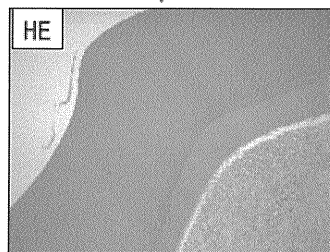
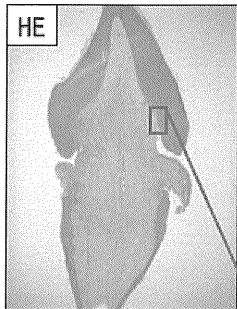
筋肉量



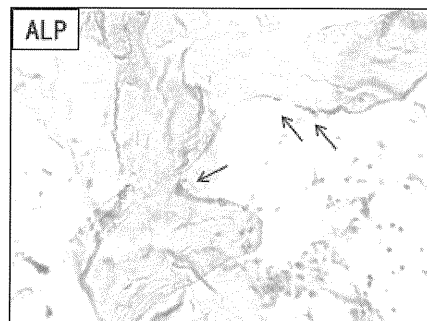
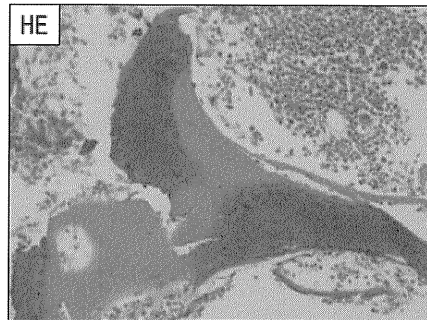
9

病理

乳歯

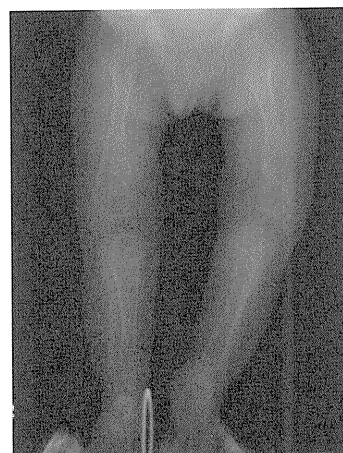
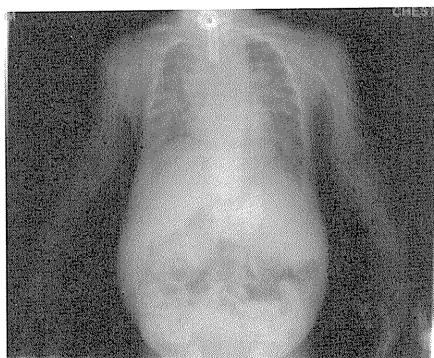


腸骨



3歳6か月現在

呼吸器：夜間のみ装着
 歩行器での歩行訓練中
 身長 78cm、体重 7.8kg
 骨塩定量 0.32 g/cm²



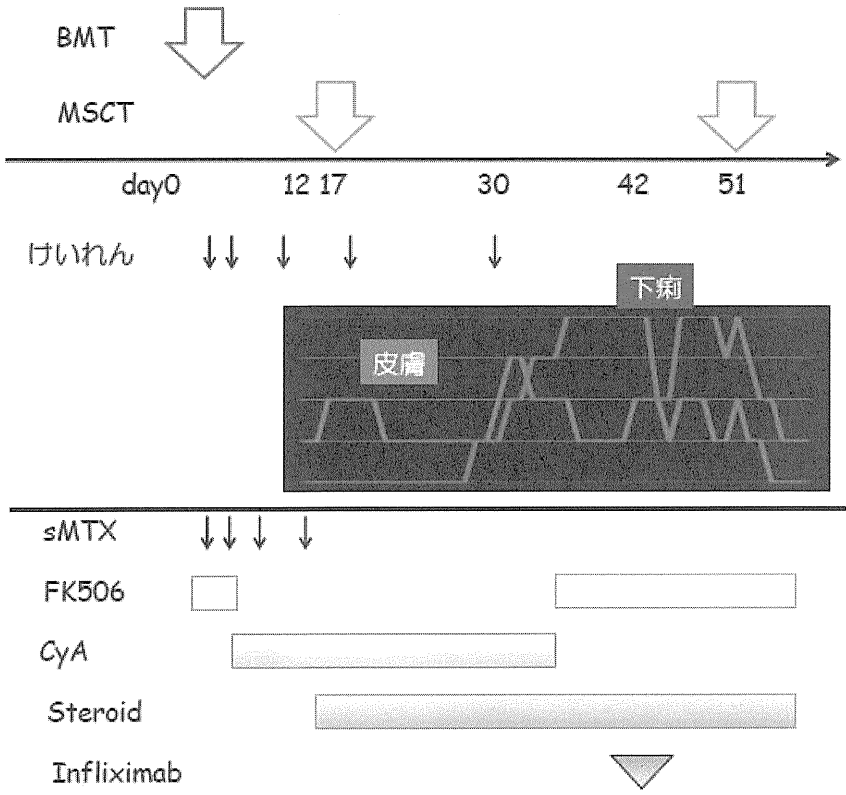
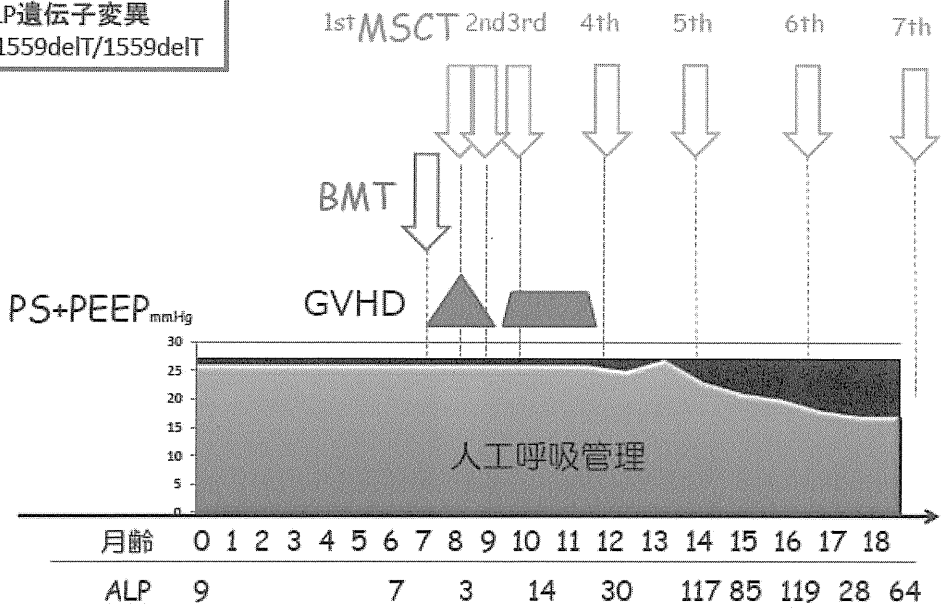
11

症例2：05 Male

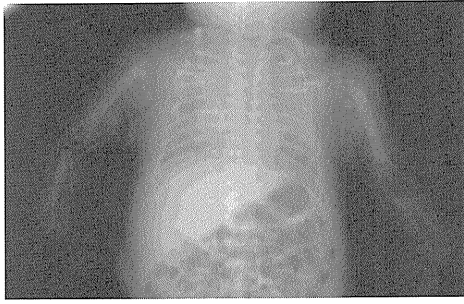
骨髄移植	
年齢	7か月
ドナー	母（保因者）
血液型	A→B
HLA	HLA 1 locus (B) mismatch
移植細胞数	CD34 8.83×10 ⁶ /Kg
間葉系幹細胞移植	
移植回数	7回
移植時期	7か月、8か月、10か月、1歳、1歳2か月、 1歳5か月、1歳9か月
移植細胞数（10 ⁶ /kg）	平均 1.8×10 ⁶ /kg

12

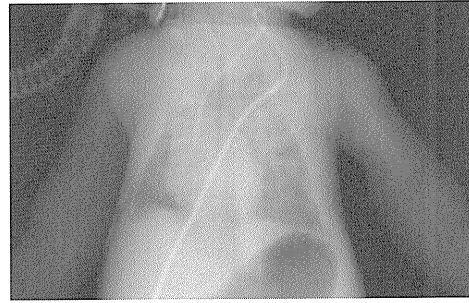
日齢0発症
呼吸障害あり
ALP遺伝子変異
1559delT/1559delT



1か月



6か月



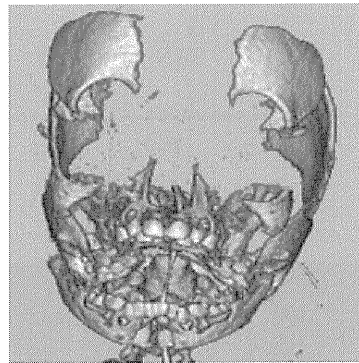
1歳



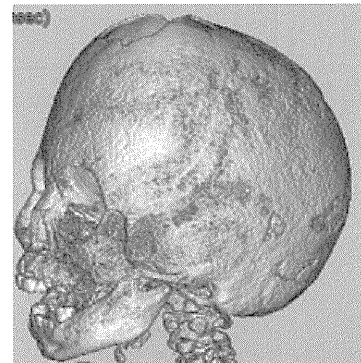
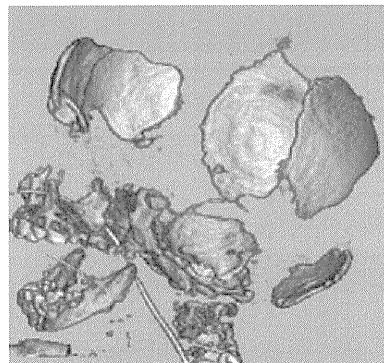
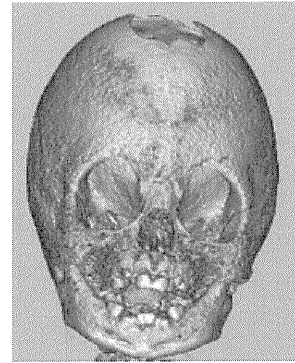
1歳6か月

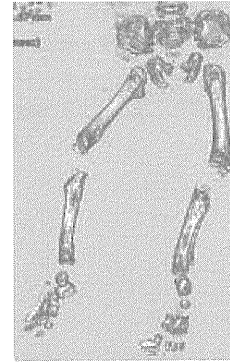
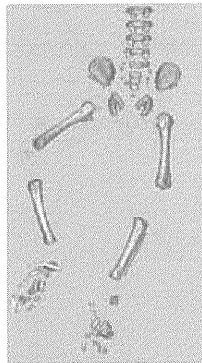
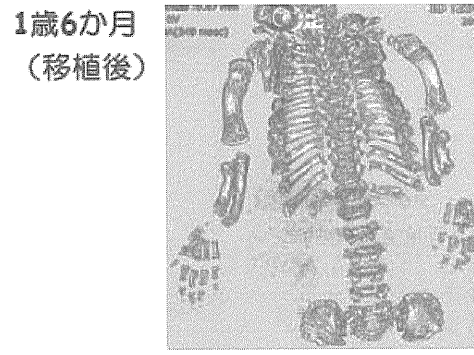
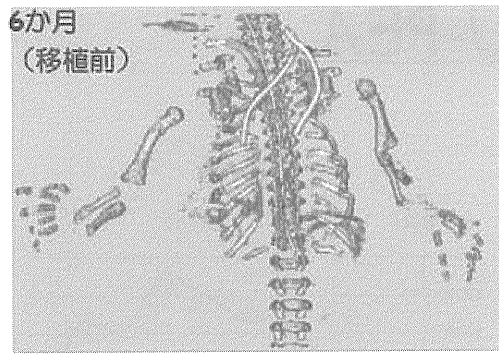


6か月
(移植前)

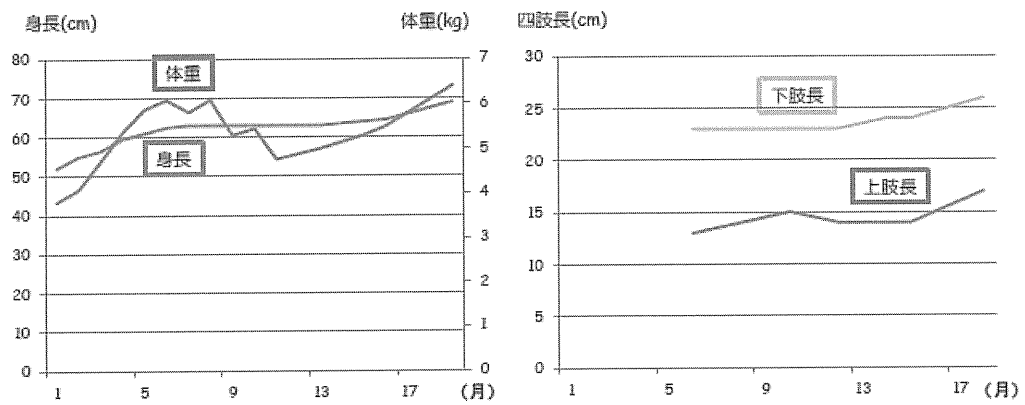


1歳6か月
(移植後)

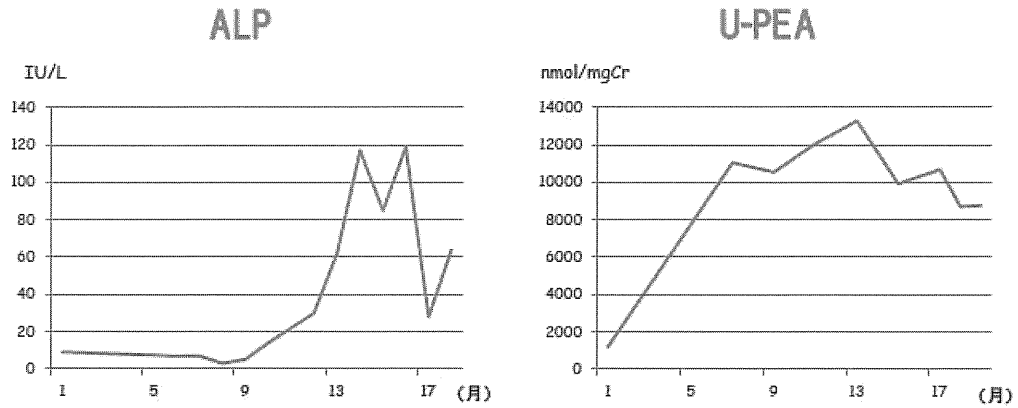




身長・体重・上肢長・下肢長



ALP・U-PEA



19

骨形成マーカー

