

201306003A

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

I . 総括研究報告

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

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。

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、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。

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、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。

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

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。

(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; 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回目の間葉系幹細胞移植を行い、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

①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。

②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までさまざまである。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。

③ALP 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。

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

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 DisChild.* 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

II. 分担研究報告

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

致死的で治療法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

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