

図7 人工足関節上での再生培養骨形成

患者骨髄(a)をシャーレ上で培養することにより、繊維芽細胞様の細胞(MSC)がシャーレにへばりつくように増殖する(b)。この細胞が間葉系幹細胞(MSC)であることは、細胞表面抗原の解析で確認される(c)。この細胞(MSC)を骨分化条件でさらにシャーレ上に播種して培養すると石灰化((d)の黒色部分)が見られる。再生治療においては、MSCをシャーレに播種するのではなく、アルミナセラミック(e)の上に播種する。そして、さらに培養を行い再生培養骨をセラミック上で形成した後に患者に移植される(f)。文献3)の図より許可を得て転載

る疾患においては、アルミナセラミックなどの材料を用いる。特に、本法によるアルミナセラミック上での培養骨形成は移植後においてホスト側の既存骨組織と強固な結合を示し<sup>10)</sup>、関節症疾患患者に対する人工関節の緩みの問題の1つの解決策として臨床応用されている<sup>3)</sup>(図7)。最近、筆者らは整形外科領域で多く用いられている金属材料でもMSCによる培養骨が効率良く形成され、生体内における骨欠損部位への移植により既存骨組織の強固に結合を示す基礎研究結果を報告した<sup>11)</sup>。これらの材料はアルミナセラミックより多くの患者に用いられ、今後の臨床応用への展開が期待できる。また、これら金属やセラミックのみならずポリマー上でも培養骨は形成可能であり、骨疾患によってはこれらのポリマーを用いる骨再生も考えられる<sup>12)13)</sup>。

### 3.3 生体材料を用いない骨再生治療

上記に述べたように、種々生体材料を用いる方法に比し、材料を全く使用しない骨再生治療も考えられる。例えば、MSCそのものを直接患者に移植する方法である。筆者らは骨代謝疾患の患者(低フォスファターゼ症)に、父親あるいは母親の骨髄からMSCを増殖し、この培養増殖

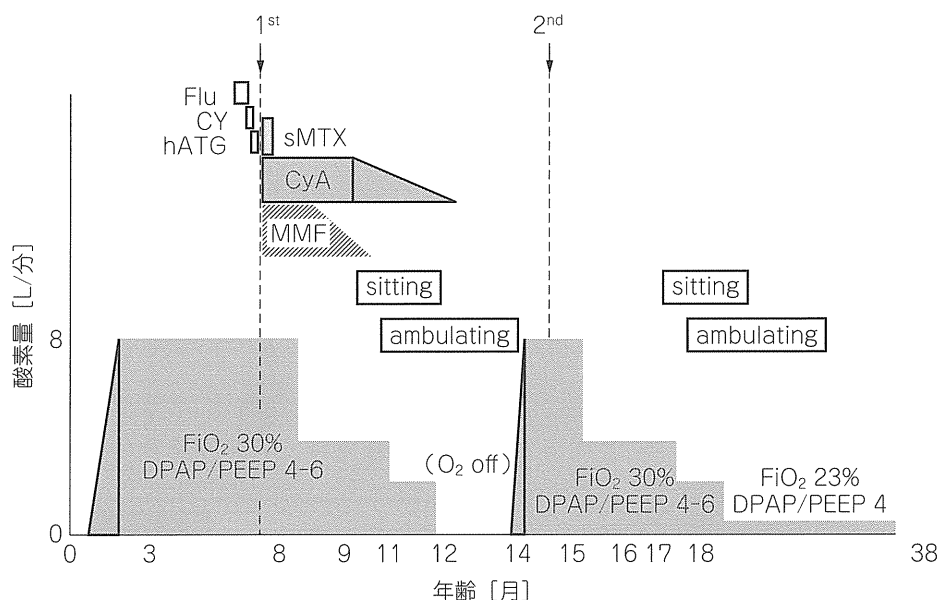


図8 低フォスファターゼ症に対する同種間葉系幹細胞（MSC）移植

患者は生後まもなく呼吸不全を起こし、インファントフローシステム（n-DPAP）を装着した。骨髄移植と種々免疫抑制剤投与の後に第一回（1<sup>st</sup>）の同種 MSC 移植を行い、呼吸不全は改善された。その後生後 14ヵ月で再度呼吸不全に陥り、2 回目（2<sup>nd</sup>）の MSC 移植を行い、呼吸不全が改善して座位（sitting）や移動（ambulating）も可能となる。文献 14）の図より許可を得て転載

された MSC を直接患者の体内へ経静脈的に投与する骨再生治療を行っている<sup>14)</sup>。この方法は培養増殖された MSC そのものを用いる方法である（図 8）。

また、上述のように、MSC を種々の因子の存在の下に培養することにより、MSC は骨芽細胞へ分化して骨形成を営む（再生培養骨構築）。この骨形成において大事なポイントは、MSC から分化して生じた骨芽細胞により細胞外基質（骨基質）が産生されることである。また、この骨芽細胞は骨細胞へさらに分化して骨基質内へ埋入される。すなわち、*in vitro* の骨形成（再生培養骨）はその表面に骨芽細胞が存在し、その内部に骨細胞を含む骨基質が存在する三次元構造を有することである<sup>15)</sup>。また、重要な点として、その骨基質は生体の骨組織の成分である低結晶性の炭酸含有ハイドロキシアパタイトで構成される<sup>6)</sup>。すなわち、*in vitro* で生じる再生培養骨は生体の骨組織に匹敵するものである。さて、この再生培養骨組織の高さ（培養皿からの高さ）はせいぜい数百  $\mu\text{m}$  であり、volume のある骨組織の形成は培養皿の上では困難である。しかし、培養皿の全面に形成することが可能で、薄い膜状の骨形成となる。この、膜状の骨（骨芽細胞シート）は容易に回収することが可能で、筆者らは回収された骨を生体内へ移植することにより、さらなる新生骨を誘導して、骨欠損が治癒することも報告している<sup>16)17)</sup>（図 9, 10）。この方法は動物モデルでの段階であるが、特殊な培養皿や細胞担体を用いずに骨再生を行うという期待される方法である。以上のように、MSC を用いての骨再生は生体材料（細胞担体）を用いる方法と材料を用いない方法の 2 つに分類されるが、どちらの方法を用いるかは対象とする疾患で決められる。

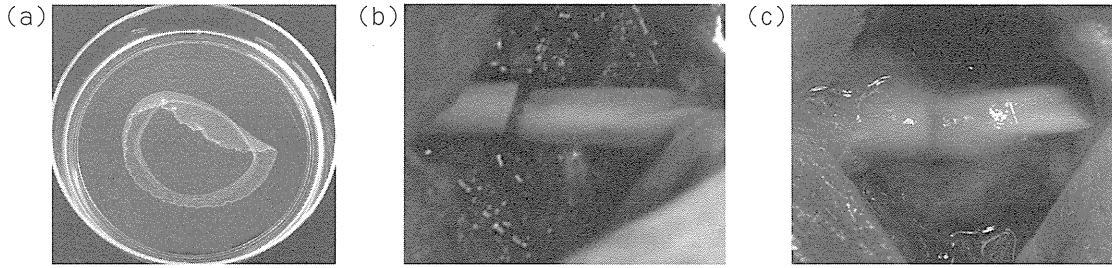


図 9 骨芽細胞シートの外観とラット大腿骨の骨欠損への移植

(a)骨芽細胞シートの外観。MSC をデキサメサゾンとアスコルビン酸添加培地で培養後スクレーパーを用いて細胞シートとして採取できる。(b)ラット偽関節モデル。骨膜と骨髄搔把を行うことで小動物（ラット）でも大腿骨偽関節が作製できる。(c)骨芽細胞シート移植。骨芽細胞シートは細胞担体（スキャホールド）なしで移植が可能であり、複雑な形状の骨切り部へも適合させることが容易である。文献 17) の図より許可を得て転載

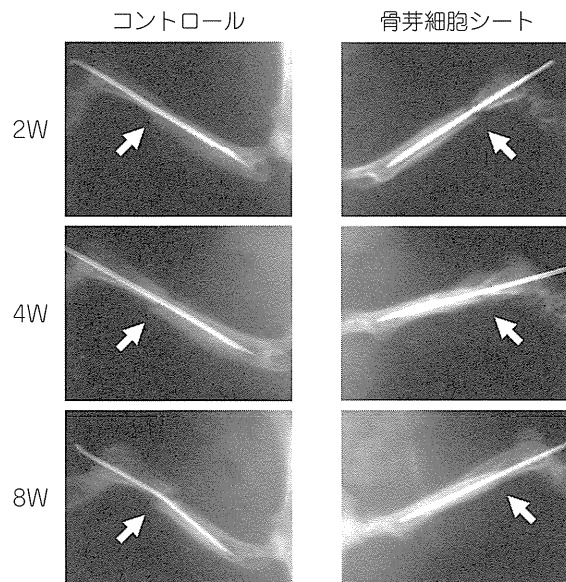


図 10 ラット大腿骨偽関節モデルにおける骨芽細胞シート移植後のレントゲン像

コントロール群では骨癒合が起こらず 8 週後には偽関節となったが、骨芽細胞シート移植群では 4 週で仮骨形成が見られ、8 週で骨癒合が得られた。文献 17) の図より許可を得て転載

#### 4 MSC の細胞ソースと MSC の問題点

以上、筆者らが行っている MSC を用いての骨再生の方法論について述べてきた。用いた MSC はすべて骨髄由来である。しかし、近年 MSC が骨髄のみならず種々の組織に存在することが報告されている。特に、脂肪には MSC が多く含まれ、美容目的で採取された脂肪が破棄されていることに注目されて、近年脂肪由来 MSC の臨床応用が考えられている。この点において、骨再生にとって MSC が骨髄由来か脂肪由来のどちらが優位であるかの検証が必要である。これについては議論のあるところで、種々の結果が報告されている。しかし、これらの報告の多くは

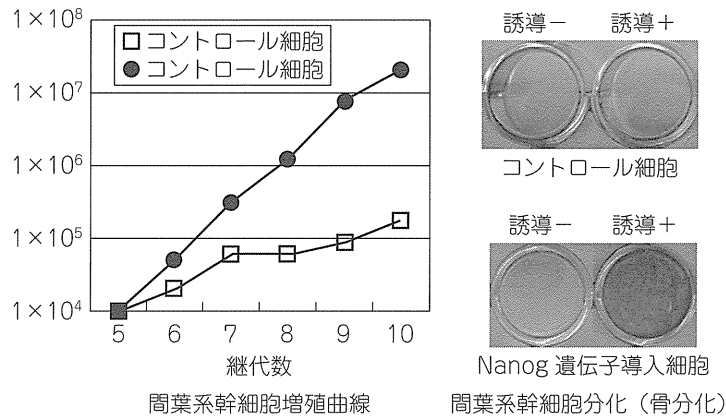


図 11 ヒト間葉系幹細胞 (MSC) への Nanog 遺伝子導入

Nanog 遺伝子非導入 (通常の MSC) は継代を経るに従い、増殖能が落ちる (左図)。しかし、遺伝子導入 MSC は増殖能を維持しつつ、骨分化誘導培地 (誘導+) において、骨分化能も維持する。左図は増殖曲線で右図は培養による骨分化能をアリザリンレッド染色 (赤色) で示す。文献 19) の図より許可を得て転載

MSC の由来、すなわち細胞ソースとしての脂肪あるいは骨髄が同一のドナー由来でなかったり、脂肪と骨髄 MSC の培養の継代数が異なっているものであった (継代回数が増えると骨分化能は低下する)。そこで、筆者らはラットのモデルを用いて、脂肪ならびに骨髄を同一のドナーより採取し、それらの組織から MSC を増殖して *in vitro* ならびに *in vivo* での生体内移植による骨形成を比較した。用いた MSC の培養において継代数を揃えた。結果として、骨形成は明らかに骨髄由来 MSC が脂肪由来 MSC より高いものであり、骨再生を念頭においた場合は脂肪でなく骨髄 MSC を使用するのが有利であると考えられる<sup>18)</sup>。また、この実験において継代数を揃えたが、これは MSC が培養をくり返す (継代を増やす) ことにより増殖能と分化能が低下するためである。この MSC の能力低下に関して、筆者らは基礎研究として ES 細胞に多く発現している Nanog あるいは Sox2 遺伝子を MSC に導入することにより、この増殖・分化能の低下を回復できることを報告している<sup>19)</sup> (図 11)。また、種々細胞に Oct4, Sox3, Klf4 の 3 遺伝子を同時に導入することにより人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作る事が可能であるが、筆者らは MSC が iPS 細胞創製のための細胞ソースとしても有用な細胞であることも報告している<sup>20,21)</sup>。

なお、前項において、筆者らは MSC がスキャホールドを用いずに骨再生に使用できることを記述した。特に、骨代謝疾患患者への MSC の投与は経静脈的に全身投与である。また、患者は骨形成に必須のアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase ; ALP) 遺伝子の異常により骨形成の不全が生じている。すなわち、筆者らが通常行っている骨再生治療は患者自身の細胞 (自己細胞) を用いての再生治療であるが、この骨代謝疾患においては、ALP 遺伝子の異常があるので患者自身の細胞を用いることはできない。そのため、父親あるいは母親といった同種の MSC を用いて移植された。他の細胞と異なり、MSC は免疫抑制作用を有して移植免疫を回避できるとの報告もある。しかし、筆者らの以前の研究において、たとえ遺伝背景の近い MSC すなわち、免疫バリアーの低い同種 MSC を用いても、生体内への移植により骨形成を示すには、

免疫抑制剤の投与を必要とすることを報告している<sup>23)</sup>。すなわち、MSCを用いても移植免疫を単純に回避できないことを示している。実際、筆者らの同種MSCを用いての骨再生においては骨髄移植を初回に行い、それに伴い免疫抑制剤を患者に投与している<sup>14)</sup>。最近のさらなる同種MSCを用いての臨床経験により、同種MSCの生着ならびに骨分化が向上する症例を経験しているが、確証するにはさらに臨床経験を積み重ねる必要がある。

## 5 将来展望

筆者らは骨再生の臨床において、骨髄から増殖されたMSCを患者に移植している。他の組織からのMSCを用いる可能性もあるが、脂肪由来のMSCの比較研究より、現段階では我々は骨髄由来MSCが骨再生に非常に有用であると考えている。また、ほとんどの症例は患者自身の骨髄細胞からMSCを培養増殖して用いている。しかし、骨再生を多くの患者に用いるにはストック保存された細胞、特に患者自身でない同種の保存細胞を用いることが期待される。この点において、筆者らはMSCが長期にわたり、増殖ならびに骨分化能を維持したまま冷凍保存(-80℃)できうることを報告している<sup>23)</sup>。ただ、単純な移植による同種のMSCが患者体内で生着するのは期待できないが、患者に対しての種々の処置を施すことにより、同種のMSCの臨床応用の範囲も広がることを期待できる。

MSCの問題点の1つとして、移植に必要な細胞数を得るためには継代という培養ステップを必要とするが、その継代数が増えることにより増殖・分化能が低下する問題がある。これの解決法として、種々の方法が考えられる。例えば、我々が報告しているようにNanogといった単一の遺伝子を導入することも考えられるが<sup>19)</sup>、さらなる増殖・分化能の高い細胞を創製するにはiPS細胞を視野に入れる必要がある。すなわち、iPS細胞は多分化能を維持したまま、長期にわたり継代可能な高い増殖能を有する幹細胞である。また、iPS細胞はMSCから作製可能であることを筆者らは報告しているが<sup>20,21)</sup>、その逆のプロセス、すなわちiPS細胞から間葉系幹細胞も誘導可能であり、iPS細胞由来のMSCを用いての骨再生治療も将来実現可能と思われる。また、移植免疫の回避できうる同種のMSCがiPS細胞から得られるなら、同じ細胞(MSC)を用いて多数の種々の骨疾患の再生に用いることが可能となり、その応用範囲は飛躍的に広がる。この点において、遺伝子マッチングされたiPS細胞がバンキングされる構想も出ている。

このように、患者に対して移植免疫を回避できうる同種のiPS細胞由来MSCを用いての再生治療も将来可能になるかと思われる。この将来のiPS細胞利用の骨再生医療を考える場合、現在のMSCを用いての臨床応用の研究成果により、MSC移植の安全性と有用性を確認することが非常に重要である。なお、iPS細胞そのものは造腫瘍性(テラトーマ発生)を有するので、このiPS細胞由来の細胞(例えばMSC)を利用する再生医療においては、残余する未分化のiPS細胞を除外する必要がある。現在、iPS細胞ならびにその周辺技術が進歩しつつあり、この造腫瘍性の問題も解決できうらと思われる。近い将来、iPS細胞由来のMSCが多くの疾患患者に応用できうる時代が到達することを期待して本項を終える。

〈謝辞〉

独立行政法人産業技術総合研究所健康工学研究部門組織再生工学研究グループの皆様のご協力により本稿でのべている患者細胞からの間葉系幹細胞の培養が行われた。また、多くの臨床応用は奈良県立医大附属病院で行われ、同医大整形外科、健康政策医学、口腔外科の皆様に深謝する。同種の間葉系幹細胞を用いての治療は島根大学医学部附属病院で行われ、同医学部小児科、輸血部、整形外科の皆様にも深謝する。

文 献

- 1) A. Friedenstein et al. : *Exper Hematol*, **6**, 440-444 (1978).
- 2) H. Ohgushi et al. : *J Orthop Res*, **7** (4), 568-578 (1989).
- 3) H. Ohgushi et al. : *Biomaterials*, **26**, 4654-4661 (2005).
- 4) M. Okumura et al. : *Biomaterials*, **12** (4), 411-416 (1991).
- 5) H. Ohgushi and A. I. Caplan : *J Biomed Mater Res*, **48** (6), 913-927 (1999).
- 6) H. Ohgushi et al. : *J Biomed Mater Res*, **32** (3), 333-340 (1996).
- 7) A. Matsushima : *Artif Organs*, **33** (6), 474-481 (2009).
- 8) T. Morishita et al. : *Artif Organs*, **30**, 115-118 (2006).
- 9) K. Kawate et al. : *Artif Organs*, **30** (12), 960-962 (2006).
- 10) Y. Tohma et al. : *J Orthop Res*, **24** (4), 595-603 (2006).
- 11) M. Ogawa et al. : *Int J Mol Sci*, **13** (5), 5528-5541 (2012).
- 12) N. Mizuta et al. : *J Tissue Eng Regen Med*, **7** (1), 51-60 (2013).
- 13) T. Matsumoto et al. : *Tissue Eng Part A*, **17** (1-2), 171-180 (2011).
- 14) M. Tadokoro et al. : *J Pediatr*, **154**, 924-930 (2009).
- 15) T. Kihara et al. : *Biochem Biophys Res Commun*, **316** (3), 943-948 (2004).
- 16) M. Akahane et al. : *J Tissue Eng Regen Med*, **2** (4), 196-201 (2008).
- 17) A. Nakamura et al. : *Bone*, **46** (2), 418-424 (2010).
- 18) O. Hayashi et al. : *Calcif Tissue Int*, **82** (3), 238-247 (2008).
- 19) M. J. Go et al. : *Exp Cell Res*, **314** (5), 1147-1154 (2008).
- 20) Y. Oda et al. : *J Biol Chem*, **285**, 29270-29278 (2010).
- 21) H. Ohnishi et al. : *J Tissue Eng Regen Med*, **6** (4), 261-271 (2012).
- 22) N. Kotobuki et al. : *Cell Transplant*, **17**, 705-712 (2008).
- 23) N. Kotobuki et al. : *Tissue Eng*, **11** (5-6), 663-673 (2005).

# 再生医療技術の実用化における環境整備 — 間葉系幹細胞を用いた再生医療の経験をふまえて —



医療法人大隈病院 整形外科  
(独) 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 **大串 始**

## 1) はじめに

再生医療とは、損傷を受けた組織・臓器に対して、細胞を利用し、これらの損傷を修復（再生）する医療である。また、用いる細胞は試験管やシャーレ上で増殖・加工されるというプロセスすなわち組織工学技術を利用することが多い。この技術により、細胞を増殖する（増やす）のみならず、損傷を受けた組織・臓器の修復に適した細胞へ加工（細胞分化）することが可能であり、臓器・組織移植で問題となる提供者（ドナー）の不足を克服できる技術ととらえられる。また、現在広くおこなわれている再生医療は患者自身の少量の細胞を増殖・加工して用いることが多く、自身の細胞を用いる為、臓器・組織移植に伴う拒絶反応や患者が持っていないドナー由来の感染症を引き起こす問題も回避できる。現在、我が国ではやけど（熱傷）に対する皮膚再生製品や膝の軟骨損傷に対しての軟骨再生製品が上市されている。また、研究開発段階であるが、実際の患者に対して心筋、神経、血管、角膜、骨の再生なども行われている。

## 2) 再生医療に用いられる細胞

我々の体は組織・臓器から成り立っている。また、これらの組織・臓器にはそれぞれ特有の細胞がある。例えば、心臓には心筋細胞があり、神経には神経細胞、軟骨には軟骨細胞がある。これらの細胞はそれぞれの組織・臓器において、その機能を発揮するための役割を担っている分化した細胞である（図1）。その為、例えば軟骨障害においては、正常の軟骨組織の一部から軟骨細胞を増殖して軟骨の再生に用いられる。また、これらの分化細胞になりうる未分化な細胞が

あり、これを幹細胞と呼ぶ。この幹細胞を簡単に定義すると、一個の細胞がそのまま2つ、さらに4つと分裂増加する自己増殖能を有し、さらに種々の細胞へ分化する能力（多分化能）を持った未分化細胞である（図2）。

### 再生医療に用いられる細胞 組織由来分化細胞

- ・ 心筋細胞
  - ・ 神経細胞
  - ・ 軟骨細胞など
- } 我々の体に存在する。

### 幹細胞(未分化細胞)

- ・ 胚性幹細胞 (ES細胞)
  - ・ iPS細胞
  - ・ 体性幹細胞
- 造血幹細胞  
間葉系幹細胞
- } 倫理的問題  
我々の体には存在しない。  
} 我々の体に存在する。

図1 再生医療に用いられる細胞

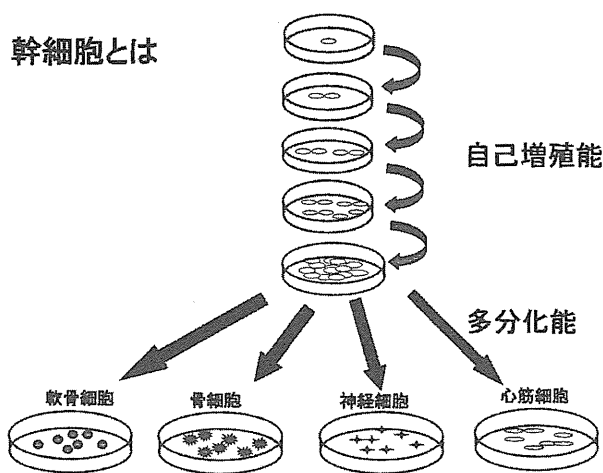


図2 幹細胞とは自己増殖能と多分化能を有する細胞である

動物の発生段階には幹細胞があり、胚性幹細胞 (embryonic stem cell :ES細胞)と呼ばれる。この細胞は優れた自己増殖能を持ち、体のあらゆる組織・臓器の細胞へなりうる能力を持った細胞である。1998年にヒトのES細胞が培養増殖できることが報告されて再生医療への応用が期待されている<sup>1)</sup>。実際、米国では少数の患者に治療目的でES細胞から分化された細胞を用いて脊髄損傷等の患者に移植された<sup>2)</sup>。しかし、ES細胞は胎児になりうる細胞由来であり、倫理的問題がある。さらに、使用されうるES細胞は患者にとっては他人の細胞であり、この細胞を用いての移植は拒絶されうる。このような状況の中、数種類の遺伝子を皮膚の細胞等に導入することにより、ES細胞に匹敵しうる幹細胞を創製する発表があった。すなわち京都大学の山中伸弥教授による人工多能性幹細胞「iPS細胞」の誕生である<sup>3)</sup>。患者自身の種々の細胞からiPS細胞を作製できるので、ES細胞にみられる倫理問題や拒絶反応の問題も解決できる。

しかし、これらES細胞やiPS細胞をそのまま体内に移植すると、移植された細胞がテラトーマという腫瘍をつくる可能性があり、iPS細胞を臨床に用いるにはまだまだ解決しなければならない問題点がある。この点に関して、我々の体内にもすでに幹細胞が存在することが知られ、体性幹細胞と呼ばれる (図1)。骨の中の柔らかい組織である骨髓や脂肪には間葉系幹細胞という体性幹細胞が存在する。ES細胞やiPS細胞に比較すると、増殖や分化能力は限定的であるがこの幹細胞は骨や軟骨を含む種々の分化細胞に分化可能である<sup>4, 5)</sup>。骨髓は注射針 (骨髓針) により容易に採取可能で患者にとって侵襲が少なく、少量の骨髓から間葉系幹細胞は培養により増殖することが出来る。

また、この幹細胞は移植しても上述のようにテラトーマという腫瘍は生じない。実際、我々は種々の大学病院等との共同研究で骨髓から間葉系幹細胞を増殖して100例近くの患者に移植しているが、重篤な感染や腫瘍発生の報告は受けていない<sup>6, 7)</sup>。すなわち、この間葉系幹細胞を用いて種々の疾患への再生治療が可能である。

### 3) 再生医療の実際

現在、皮膚、軟骨、骨、心臓、血管、角膜等の再生治療が行われているが、全てを論じるのは紙面の関係上不可能であり、我々がやっている上記の間葉

系幹細胞を用いての臨床応用 (骨/軟骨再生) について述べる。病院で採取された約10~20mlの患者骨髓が我々の施設のヒト細胞培養施設に運ばれ、培養皿に接着される間葉系幹細胞が増殖される。疾患によっては、この間葉系幹細胞そのものが移植されるが、通常は増殖された幹細胞を種々基材 (バイオマテリアル) の上に播種され、さらなる骨分化を経て培養骨とよばれる骨組織を形成して移植される<sup>4)</sup>。これらの培養過程において、細胞を培養する培地に細菌あるいは真菌等が混入すると、感染が生じることとなる。それを防ぐためには、無菌性を担保する無菌加工区域 (Aseptic Processing Area (いわゆるクリーンルーム)) が必要となる。このクリーンルームは製薬業に無菌製剤製造にも使用されているが、再生医療においては、これらと同等あるいはそれ以上のクリーン度を必要とする。また、種々の清浄度を計測する検査も必要である。この検査にはクリーンルーム内の微細粒子 (パーティクル) の計測等が含まれるが、培養中の細胞培地そのものに細菌や真菌のコンタミネーションが無いことを確認する生物学的な検査も必須である。

骨組織再生には間葉系幹細胞あるいはその幹細胞より作製される培養骨を患者に移植することにより行われるが、細胞を播種する基材として主にセラミック等のハードな素材を使用してきた。これは、骨組織が体を支えるという機能を発揮するために強度を有するセラミックの機械特性を必要とするからである。この点において、間葉系幹細胞は軟骨細胞にも分化可能であり、軟骨再生にも使用できる<sup>8)</sup>。

しかし、セラミックスはその機械強度が強いため、例えば軟らかい粘弾性をもつ軟骨組織再生のための幹細胞の基材としては用いることはできない。そのため、他の基材例えばポリマーを使用することが考えられ、実際軟骨再生に下記に記載のように種々のポリマーが使用されている。

関節軟骨は自己修復能力に乏しい組織であって、一旦損傷されると治癒されにくいので再生医療の対象となる軟骨障害の患者数は多い。軟骨再生に用いられる細胞として、我々は間葉系幹細胞が用いて患者に移植しているが<sup>8)</sup>、組織由来の分化細胞である軟骨細胞そのものも用いられる<sup>9)</sup>。例えば、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングより製造販売されている培養軟骨 (ジャック<sup>®</sup>) は生体高分子であるコラーゲンを細胞培養の基材として使用してい



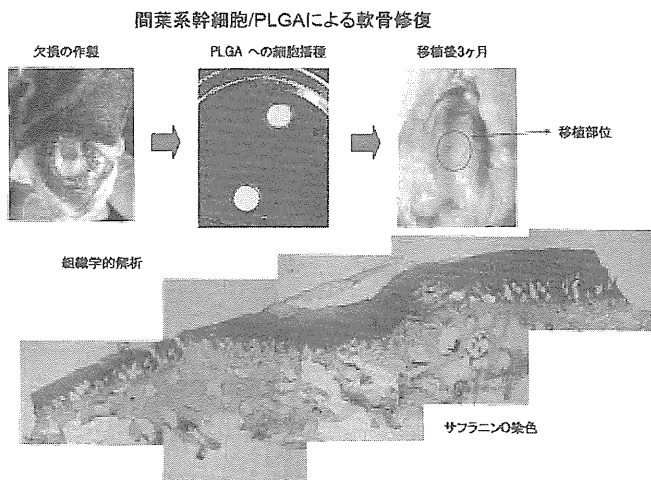


図3 軟骨欠損に対する間葉系幹細胞の移植 文献11より出版社の許可を得て転載

る<sup>10)</sup>。コラーゲンは生体由来であるが、合成高分子を用いての軟骨再生も可能である。例えば、我々は上述した手法で間葉系細胞の培養を行い、増殖された間葉系幹細胞をポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体からなるポリマー<sup>11)</sup>に播種してウサギ軟骨欠損部へ移植した。基材内の間葉系幹細胞は未分化なままであるが、移植部位（生体内）で軟骨組織へと分化可能であった。使用したポリマーは播種された間葉系幹細胞を保持することが容易な気孔構造を有し、再生された組織は正常の軟骨組織の3次元構造を有していた（図3）。

軟骨再生では、細胞の基材としてポリマーを使用するが、上記に述べたように、通常骨再生においては間葉系幹細胞をセラミック上で播種して再生培養骨を形成している。しかし、この再生培養骨は種々のポリマー上でも形成可能である。例えば、Poly lactic acid (PLA) polymerの上で、骨髄間葉系幹細胞を行い、このポリマー上でも間葉系幹細胞の骨芽細胞への細胞分化が可能である<sup>12)</sup>。さらに、合成アミノ酸ポリマー等でも培養骨は作製可能である<sup>13)</sup>。これらの結果より、荷重のかからない（強度をあまり必要としない）部位、例えば顔面骨や頭蓋骨などでの骨再生に使用することも考えられる。

#### 4) 再生医療における環境整備

さて、再生医療においては、細胞を増殖あるいは加工するという操作が必要となり、その為にはクリーンルームを必要とする。このクリーンルームでの作業は煩雑であり、作業にかかわる人件費を含め、設備や空調ならびに清浄度維持のために多大な費用を

必要とする。さらに、疾病の治療を目的とする再生医療の臨床研究を行う場合には、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成22年厚生労働省告示第380号）にそって行わなければならない。この指針では、培養を行う施設は再生治療を行う病院施設内に設置されるか、病院外で培養を行うには、培養する施設が細胞調製機関として種々の基準を満たす必要があるとともに、医師自らが細胞調整機関に向く必要がある。すなわち、臨床研究では外部機関に培養を委託するのは困難であり、多くの経験や設備を有する企業の培養施設に患者細胞の培養を委託することは出来ない。しかし、実際の治療を行う医師にその培養を自らが行うのは非効率的であり、この事が再生医療の普及を妨げている要因のひとつとも考えられる。

このような状況のもと、2013年4月には再生医療促進法が成立した。これは再生医療の促進のために国を挙げてその環境づくりを行うというものである。

しかし、具体的な事項には言及されず、いわゆる総論的な法律である。現在、さらに踏み込んだ再生医療関連法案が議論されている。その中の再生医療等の安全性の確保等に関する法律案では、再生医療等の安全性の確保等を図るため、再生医療等の提供機関及び細胞培養加工施設についての基準を新たに設けるとなっている。その上で細胞培養加工について、医療機関から企業への外部委託を可能にする法律である。すなわち、例え臨床研究であっても、医師自らが培養を行う必要はなく、基準を満たす企業の培養施設で細胞培養が行えることとなる。また、もうひとつの関連法案である薬事法改正法案では、早期の承認体制制度も認めるという画期的な法案である。これらの両法案は5月24日に国会に提出され、年内には成立されると思われる。

#### 5) 私見

現在、日本における再生医療製品は上述の株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングの皮膚再生製品（ジェイス）と軟骨再生製品（ジャック）の2製品のみである<sup>10)</sup>。ジェイスは2007年に製品としての製造承認を得たが、承認まで7年を要したとされている。さらに、同様に皮膚再生製品を目指していたビーシーエスが2008年に、角膜再生を目指していたアルプラストも2009年に倒産した。これらのベンチャーは再生医療に正面から取り組むとともに、

基礎研究もしっかり行なっていた。あくまでも想定であるが、承認までの期間がその当時に短縮可能であれば、これらの両企業も生き残っていたのではと思われる。実際、韓国では多くの再生医療製品（18製品）が承認されているが<sup>14)</sup>、その背景には早期の承認制度が企業の後押しをしていると思われる。

しかし、日本政府も本格的に再生医療の普及を図る本腰をいれてきている。特に、臨床研究における外部の企業への培養委託や早期の承認制度体制案が国会で取り上げられていることは、再生医療を待ちのぞんでいる多くの患者にとって朗報となり、その医療を支える企業の活動も活発になると思われる。

今後の再生医療技術のみならず、それを取り巻く環境の整備のさらなる充実を期待して本稿を終える。

#### 参考文献

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
2. <http://www.geron.com/grnopc1>
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10
4. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(6):913-27
5. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*. 2004 Jan;28(1):33-9
6. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, Takakura Y. Tissue engineered ceramic artificial joint—ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(22):4654-61
7. 大串始, 服部耕治, 牛田多加志 他. 臨床研究の活性化と再生医療産業化の促進 —骨・関節領域（整形外科, 歯科・口腔外科）の実施者からの提言—日本再生医療学会雑誌2010; Vol.9 No.3 (116)
8. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Feb;5(2):146-50
9. Tohyama H, Yasuda K, Minami A, Majima T, Iwasaki N, Muneta T, Sekiya I, Yagishita K, Takahashi S, Kurokouchi K, Uchio Y, Iwasa J, Deie M, Adachi N, Sugawara K, Ochi M. Atelocollagen-associated autologous chondrocyte implantation for the repair of chondral defects of the knee: a prospective multicenter clinical trial in Japan *J Orthop Sci*. 2009 Sep;14(5):579-88
10. <http://www.jpte.co.jp/business/regenerative/index.html>
11. Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T, Takakura Y, Ohgushi H, Fukuchi T, Sato M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*. 2005 Jul;26(20):4273-9.
12. Tanaka T, Hirose M, Kotobuki N, Tadokoro M, Ohgushi H, Fukuchi T, Sato J, Seto K. Bone augmentation by bone marrow mesenchymal stem cells cultured in three-dimensional biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Nov;91(2):428-35.
13. Hamada K, Hirose M, Yamashita T, Ohgushi H. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jan;84(1):128-36
14. 平成24年度中小企業支援調査（再生医療の産業化に資する諸外国の制度比較に関する調査）報告書委託元 経済産業省：委託先 株式会社三菱化学テクノロジーサーチ

#### 謝辞

再生医療における患者細胞の培養は産業技術総合研究所、健康工学研究部門、組織再生工学研究グループの皆様のご協力により行なわれた。多くの臨床応用は奈良県立医大附属病院で行なわれ、同医大整形外科の皆様に深謝する。また、本稿でのべている細胞支持対のPLGAは株式会社ジーシーと株式会社カネカの共同開発である。

## 5. 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\*\*  
Yuba Shunsuke Taketani Takeshi

\*独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 組織・再生工学研究グループ 研究グループ長  
\*\* 島根大学医学部附属病院 輸血部 講師

**Summary** 先天性骨系統疾患に対する確立した治療法はない。そこで、我々は低フォスファターゼ症で致死的な周産期型を対象に、骨髄由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) 移植を行う「ヒト幹細胞臨床研究」に取り組んだ。今回、親をドナーとする骨髄移植を行った後、同じドナーからの MSC を複数回移植した。骨髄採取と細胞移植は島根大学、移植細胞の MSC 培養は産業技術総合研究所が担当した。厳格な品質管理の下で培養された MSC を移植した結果、骨が全く消失していた部位の骨石灰化も回復、生命予後を左右する呼吸障害も改善した。

### はじめに

先天性骨系統疾患は 450 種類以上も存在するが、それぞれは非常に稀な疾患であり、多くは骨・軟骨形成や骨代謝に関わる遺伝子異常により発症する。疾患によっては骨だけでなく、免疫系や中枢神経系などにも障害を引き起こす場合もある。根治療法が存在する疾患はほとんどなく、疾患によっては酵素補充療法や造血幹細胞移植を含む骨髄移植 (Bone marrow transplantation : BMT) が行われているが、その効果は限定的である。そこで、我々は間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) に注目した。MSC は多分化能を備えており、特に骨芽細胞や軟骨細胞に分化することから、これまで国内外で骨・軟骨再生治

療に自己 MSC が多用されている。それは MSC に関して、細胞源の採取が比較的容易で、その技術も確立していることと培養操作も容易であること、そして何よりも、多用されているにもかかわらず移植後の腫瘍発生が国内外で報告されていない安全な幹細胞であることが大きな理由である。実際、独立行政法人産業技術総合研究所 (以下、産総研と記述) でもこれまで自己 MSC を用いて、足関節症に代表される整形外科疾患の他、本稿で取り上げる先天性骨系統疾患や心疾患など約 100 症例もの臨床研究を行い、腫瘍発生も含め有害事象は全く生じていない。一方、先天性骨系統疾患の MSC は骨形成能の障害が想定されているため、骨再生治療を目的とした細胞治療に自己 MSC を用いるのは困難と思われる。したがって、

MSC (Mesenchymal Stem Cells ; 間葉系幹細胞) BMT (Bone marrow transplantation ; 骨髄移植)

本疾患の治療として採取する MSC は、自己ではなく同種のものであり望ましいと考えられる。

## 1. 疾患治療に向けて

我々が現在取り組んでいる臨床研究の対象は、この先天性骨系統疾患のうち、低フォスファターゼ症 (Hypophosphatasia : HPP) である。この疾患は、骨の石灰化に関わる酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP) が、それをコードする *ALPL (TNSALP)* 遺伝子変異によってその活性が低下して、正常な骨の石灰化が障害される疾患で、多くは常染色体劣性遺伝形式をとる。発症時期と症状によって、胎児期に発症する周産期型、生後半年以内に発症する乳児型、乳歯の早期脱落を特徴とする小児型の他、成人型、症状が骨には無く歯に局限する歯限局型の計5種類の病型に分類される。このうち、周産期型は10万出生に1人の頻度と言われている稀な疾患であるが、日本で最も頻度が高い病型で、かつ最も重症である。症状として全身骨の低石灰化・長管骨の変形・骨幹端不整などが顕著で、徐々に骨の石灰化が消失して呼吸不全などで致死的な経過をとる<sup>1)</sup>。現在、Alexion Pharmaceuticals 社(米国)によって周産期型・乳児型を対象とした酵素補充療法の治験が始まっているが、現在のところ本疾患に対しては確立した治療法はない<sup>2)</sup>。細胞治療としては、これまで乳児型の患者に、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 MSC 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<sup>3, 4)</sup>。このことから、我々、島根大学医学部附属病院(以下、島根大と記述)と産総研は、2004年に骨髄 (Bone marrow : BM)、

MSC ならびに産総研が独自に開発した培養骨の移植を行い、周産期型の患者を救命することに世界で初めて成功した<sup>5)</sup>。そこで、根治療法のない HPP の中でも生後6カ月以内に発症し、呼吸障害を伴うとりわけ重症の患者を救うために、全身骨の石灰化再生を目的として、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 (以下、ヒト幹指針と記述)」に従った臨床研究として同省に申請、省内の厚生科学審議会に諮問後、2010年に「ヒト幹細胞臨床研究(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)」として許可された(図1)。BMTと同種間葉系幹細胞移植 (Mesenchymal stem cell transplantation : MSCT) を併用する理由として、① HPP の MSC は ALP 活性が低く、骨形成能も著明に低下しているために自己(患者) MSC を治療に使用できず<sup>6)</sup>、骨形成能が正常な同種 MSC を使用、② 同種 BMT 後の患者 MSC は患者由来のままである<sup>7)</sup>、③ 造血幹細胞移植を含む同種 BMT では骨は形成されない、④ 同種 MSCT による骨形成には免疫抑制剤が必要である<sup>8)</sup>、⑤ BMT を先行することにより同じドナーの MSC が拒絶されることを防ぐなどが挙げられる。

## 2. 治療の実際

さて、実際に行った一連の治療について詳述する。

BMT の具体的な治療として、前処置にはブスルファン、シクロホスファミド、抗胸腺グロブリンの3剤を用い、移植片対宿主病 (Graft versus host disease : GVHD) 予防にはメトトレキサート (MTX) とタクロリムス (FK506) の2剤を使用した。MSCT 用として、BMT の時に採取された BM

HPP (Hypophosphatasia ; 低フォスファターゼ症) ALP (アルカリフォスファターゼ) BM (Bone marrow ; 骨髄)  
MSCT (Mesenchymal stem cell transplantation ; 同種間葉系幹細胞移植)  
GVHD (Graft versus host disease ; 移植片対宿主病) MTX (メトトレキサート) FK506 (タクロリムス)

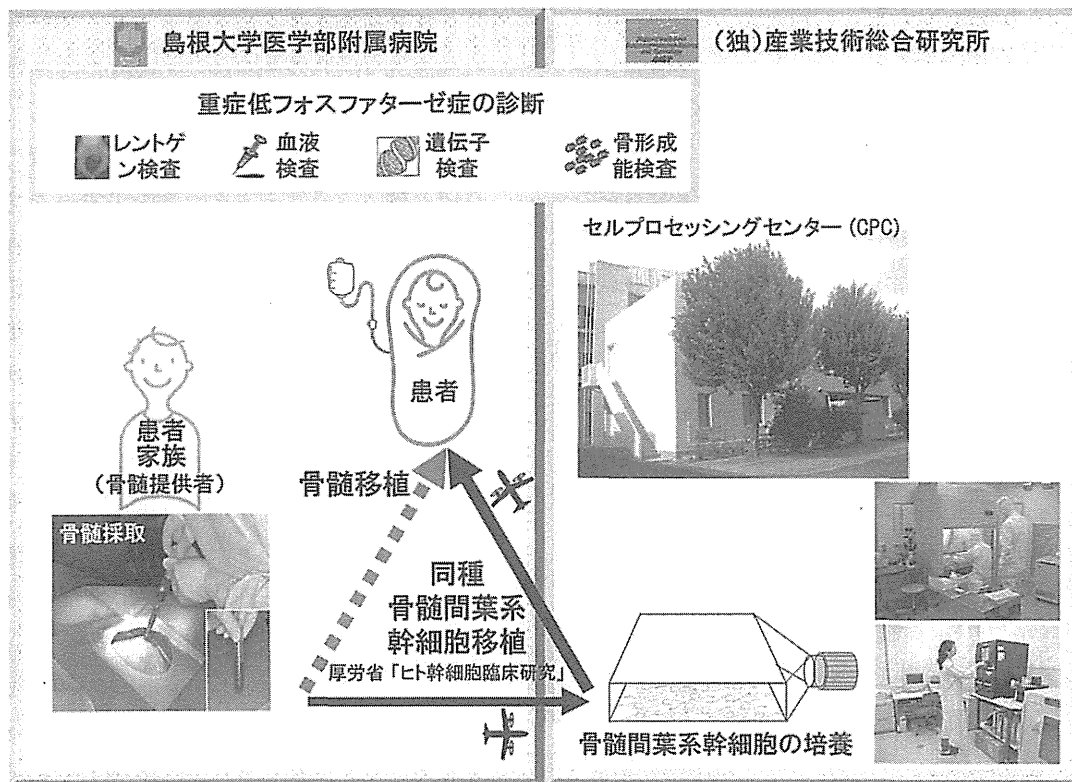


図1 重症低フォスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植治療の概要

重症低フォスファターゼ症の診断後、家族内で最適な骨髄提供者を決定する。前処置を行った後、骨髄移植を行う。骨髄移植に使用した骨髄の一部を用いて、セルプロセッシングセンターで間葉系幹細胞を培養増殖して患者に経静脈的に投与する。移植治療は島根大学で行い、間葉系幹細胞の培養増殖は産業技術総合研究所で行うため、骨髄および間葉系幹細胞は空輸している。(筆者作成)

の一部を産総研の細胞製造施設 (Cell Processing Center : CPC) へ搬送した。このとき、滅菌処理ができない BM (MSC も同様) は滅菌チューブによって二重梱包し、保冷剤を入れた運搬用クーラーボックス (症例の取り違え防止策として、BM あるいは MSC の搬送には単一症例ごとにそれぞれ 1 個の運搬用クーラーボックスをあてる) を用いた。島根大から産総研への BM の搬送および産総研から島根大への MSC の搬送中は、細胞の安全性および有効性に問題のないことを事前に確認した適温 (10 ~ 30 °C) を保つようにした。また、当初これらの搬送は、鉄道による陸路搬送

を余儀なくされた。それは、空輸の場合、細胞を航空機内へ手荷物として持ち込む際、X線検査を免れることが不可能で、細胞への影響を危惧したからであった。搬送する内容物全ての詳細情報を航空会社へ事前に提供することで、最近になってようやくこのX線検査の免除について国土交通省の許可を得ることができた。こうして、空輸によって搬送時間の大幅な短縮化が可能となった。

このように、BM に含まれる幹細胞、すなわち MSC を採取する機関、そして MSC を移植する機関はともに島根大であるが、前述の「ヒト幹指針」で実際に移植用細胞を培養すると定められた「調

CPC (Cell Processing Center ; 細胞製造施設)

整機関」は産総研である。産総研では10年程前に国内研究機関としてはいち早くCPCを設置した。この調整機関では、ヒト幹細胞の無菌的な調整および保存に必要な衛生上の管理がなされ、調整に関する十分な知識および技術を有する研究者を有していることがその要件として求められる。産総研CPCでも、一定陽圧の室圧を保ちながらフィルターを通した清浄な空気を流入させたグレードDからA(クラス100,000から100以下。クラスは米国Fed-Std-209E規格で1立方フィート中の基本粒子径 $0.5\mu\text{m}$ 以上の粒子数)までのバイオクリーンルームを設置、作業従事者の動線も一方向にした作業空間を作っている。作業従事者は定期的な教育訓練に参加し、細胞製造に関わる製造管理部門、無菌試験に代表される品質検査に関わる品質管理部門をそれぞれ担当している。これら施設の維持、製造および品質管理、バリデーション業務の詳細について、標準作業手順書(Standard operating procedure: SOP)を作成、これまでの100症例程の豊富な実務経験を活かして、改訂を重ねながらより精緻なものにしてきた。作業従事者は高いスキルを身に付けているが、さらにこのSOPに従って毎回一定の作業を行うことで、作業ミスの防止・作業結果の再現性を高めることに役立ててきた。この産総研CPCにおいて、島根大から搬送されたBMからMSCの培養を行った。培養は15%牛胎児血清を含んでいる液体培地に採取した骨髓を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器(5%CO<sub>2</sub>, 37℃)内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増殖したMSCをプロテアーゼによって培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養(2次培養)した。こうして2~3週間かけて培養し、移植当日にMSCを剥離し、PBSに浮遊させた状態で島根大へ搬送した。ま

た、移植細胞の安全性検査として、まず骨髓採取に先立ちドナーのウイルス試験を行った。CPCでは、細胞培養に先立つ培養前検査として、培地に添加する薬剤や血清は各種微生物検査で陰性のものを購入するとともに、それらを含有する培地とBMを検体、培養工程内検査として工程ごとの検体、そして出荷検査(最終検査)用に最終培地交換時の検体として各検査を実施した。検査項目は、無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査で、一部外部委託の検査もあるが、いずれの症例においても全て異常のないことを確認した。また、各工程で細胞の一部を凍結保存し、再検査・確認試験にも備えた。培養したMSCについては、同時に骨分化能を有していることも確認した。

産総研から搬送されたMSCは数時間後に島根大にて患者に移植した。MSCTは患者体重(kg)あたり $1 \times 10^6$ 細胞以上、細胞生存率80%以上のMSCを経静脈的に約1時間かけて投与した。なお、これまでの報告および我々の経験から、単回のMSCTだけでは骨形成を十分に回復させることができなかったことから、MSCTを繰り返している。特に後述の薬剤抵抗性のGVHDのように症状が悪化したり改善が見られなかったりした場合、短期間のうちにMSCTを繰り返した。

### 3. 治療の効果

これまでの臨床研究の結果を示す。対象患者の条件として、①生後6カ月以内の発症、②呼吸障害を合併している、③ALP活性の低いALPL遺伝子変異を有している、④*In vitro*で患者のMSCの骨形成能が低下しているという4条件を満たすこととした。これは、これまでの疫学調査から周産期に発症する患者の中に、徐々に自然回復する症

SOP (Standard operating procedure ; 標準作業手順書)

例が存在することが明らかとなったためである。ドナーの選択として、一般的な骨髄提供者の条件以外に、ALP 活性が正常であること、症状や検査(骨レントゲン・骨密度など)から骨形成が正常であることとした。また、MSCT を複数回行う度に BM を採取して MSC を培養する必要があることなどから、現実にはドナーとして両親のいずれかを選択せざるを得なかった。そこで、BM ドナーとして重要な条件である HLA に関しては、HLA の一致度は規定しないこととした。実際、全ての患者に対して、HLA 不一致ドナーである親からの BMT を行った。一方、MSCT は、BMT と同じドナーから複数回(症例ごとに異なるがこれまでに 5~7 回)行った。行った移植時期は乳児期であったが、前処置および移植後早期に重篤な有害事象は認めなかった。BM の生着は 3 週間前後で認められ、血球の回復も順調であった。骨の石灰化は、移植後 6 カ月ごろから徐々に改善し、骨が全く消失していた部位の石灰化も認められているまでに回復している(図 2)。生命予後を左右する呼吸障害に関して、移植後 1~2 カ月で呼吸機能が改善して、1 例は呼吸器からの短時間の離脱も可能となっている。骨の石灰化の改善に伴い筋肉量も増えて、発育発達も伸びている。キメリズム解析でドナー由来 MSC が骨髄および骨で生存していることから、この臨床的効果が MSC に起因すると思われた。また、この疾患に合併する難聴や精神発達障害などの中枢神経障害も改善を認めているが、MSC の中枢神経系への関与は明らかではない。なお、ドナー由来 MSC は有害事象なく投与できており腫瘍化も認めず、同種 MSC は乳児において安全に行える治療であると思われた。このように、本疾患に対して限定的な効果しか示さなかった BMT や酵素補充療法といった従来治療法に比べ、当初の予想をはるかに上回る効果を MSCT が示したことは特筆すべきである。さらに、1 例では重症 GVHD (grade 4: 皮膚 3,

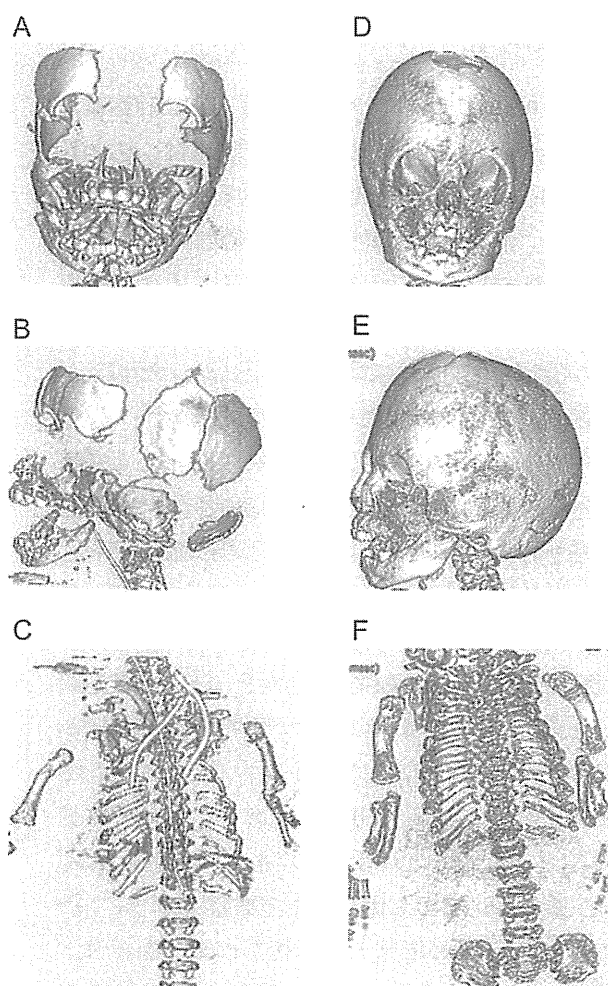


図2 骨髄と間葉系幹細胞の移植により骨の石灰化が改善する(骨 CT)

A, B, C: 移植前(生後6カ月)。D, E, F: 骨髄移植後1年+間葉系幹細胞移植5回(生後1歳6カ月)。A, D: 頭蓋骨(正面)。B, E: 頭蓋骨(側面)。C, F: 上半身。  
(筆者提供)

肝臓 1, 腸管 4) を発症し、MTX・FK506 に加え、ステロイド・シクロスポリン・インフリキシマブも投与して全く改善されなかったが、MSC を投与したところ 1 週間で症状が改善し、その後再燃なく軽快した。GVHD に対する MSC の効果はこの号でも報告されているが、小児に対しても有効な治療法となり得ると思われる。

## おわりに

今後の課題として、今回用いる MSC は移植ごとにドナー骨髄を採取して分離増殖するものとして「ヒト幹細胞臨床研究」の申請を行った。しかしながら、ドナーには毎回採取で侵襲を加えることや、骨髄採取量などの条件が異なることで、細胞培養期間が異なる点で MSC 搬出、すなわち移植日の設定も困難となる問題が浮上した。今後は、初回培養で生じた余剰 MSC を凍結保存し、以後継続する移植には解凍した細胞を用いることが望まれる。実際、産総研では他の臨床用細胞の凍結に用いられている凍結保護剤で MSC を凍結保存し、解凍後の安定性（増殖・分化能）も確認している。また、ドナーの選択も今後の課題である。MSC 自体、元々免疫原性が低いどころか、前述の GVHD 治療に利用されるほど免疫抑制作用があるので、移植後短期間では生存することが期待できる。しかし、長期生着については、我々は FK506 を投与しない限り、異系ラット由来 MSC は生着しないことも動物実験で確認している<sup>8)</sup>ので、HLA 一致のドナーも考慮すべきであろう。我々のように、同じドナーの BM からその都度 MSC を培養する方法では、骨髄バンクならびに臍帯血バンクからの HLA 一致 BM あるいは臍帯血を使用することはできない。そのために、ドナーとなった親も HLA が完全に一致したことはなかった。しかし、HLA を一致させた方が BMT および MSCT の成績が良いのは明らかである。HLA が適合した健常者のドナーを選択できれば、BMT をより安全に行うことができ、MSC の生着率が上がり、ひいては骨の石灰化の改善に寄与するものと思われるからである。そのためにも、前述の凍結 MSC が頻回移植の必要性に対応できることも考え合わせると、最近 iPS 細胞の応用としてにわかに注目されるようになった臨床用細胞バンクを MSC についても整備することが、MSCT

の可能性を拓げるものと思われる。さらに、その細胞バンク整備のための細胞源にも新たな展開が考えられる。この臨床用細胞バンクとして既に整備されているのが、前述の臍帯血バンクである。臍帯血は骨髄に較べて少ないものの造血幹細胞を含むので、これまで盛んに採取されてバンク化されてきたが、臍帯血採取後、破棄されていた臍帯の臍帯動静脈周囲には MSC が豊富に存在することが知られている<sup>9)</sup>。皮膚再生が対象ではあるが、CellResearch Corporation (シンガポール) も治験を進めているように、新たな細胞源として期待される。こうした医療廃棄物となる組織は、ドナーに細胞源採取を目的に新たに侵襲を加える必要がない点で注目に値する。ここで改めて触れておきたいのは、我々の臨床研究が BMT と MSCT を併用していることである。MSCT の効果は、初回の BMT に依存している可能性も考えられる。すなわち、元々ドナー BM 中に存在していた MSC は、BMT によってもたらされるレシピエントの BM はもちろん、他の異所環境においても生着が促されていることが大いに考えられる。このことから、臍帯血と MSC が同じレシピエントから同時に採取できる臍帯は、移植細胞が少なくても済む小児であれば、我々の臨床研究と同様、臍帯血移植と MSCT の併用という新たな治療戦略を想起させる。対して、HPP には酵素補充療法の治験も進行している。先天性の代謝性疾患の多くは稀少疾患であり、HPP のようにオーファンドラッグ（稀少疾病用医薬品）が存在することは、患者にとって確かに福音である。ところが、継続的な投薬が必要であることに加え、その開発製造費と患者数を反映して薬価は高く、公費助成はあるものの、患者の経済的負担は甚大である。

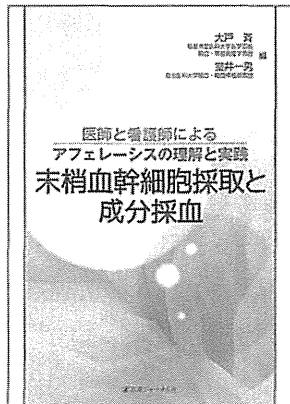
骨髄および骨に生着しているドナー MSC が十分ではないこと、そして骨石灰化の程度が健常児のレベルに至っていないなど、根治に向けた課題はまだ残されている。しかしながら、本研究のさ



らなる進展によってこうした課題が解決されて、  
酵素補充療法しか治療法が存在しない疾患に対し  
て、MSCT が医療経済的にも優れ、持続効果が期  
待できる治療として、さらに HPP 以外の代謝性  
疾患への汎用的治療としても適応拡大ができれば  
と願っている。

文 献

- 1) 竹谷 健, 鬼形和道, 山口清次: 低ホスファターゼ症. 小児科 50 (sppul) : 1169-1176, 2009.
- 2) Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, et al : Enzyme-Replacement Therapy in Life-Threatening Hypophosphatasia. N Engl J Med 366 : 904-913, 2012.
- 3) Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, et al : Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. J Bone Miner Res 18 : 624-636, 2003.
- 4) Cahill RA, Wenkert D, Perlman SA, et al : Infantile hypophosphatasia : transplantation therapy trial using bone fragments and cultured osteoblasts. J Clin Endocrinol Metab 92 : 2923-2930, 2007.
- 5) Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, et al : New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. J Pediatr 154 : 924-930, 2009.
- 6) Katsube Y, Kotobuki N, Tadokoro M, et al : Restoration of cellular function of mesenchymal stem cells from a hypophosphatasia patient. Gene Ther 17 : 494-502, 2010.
- 7) Bartsch K, Al-Ali H, Reinhardt A, et al : Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. Transplantation 87 : 217-221, 2009.
- 8) Kotobuki N, Katsube Y, Katou Y, et al : *In vivo* survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). Cell Transplant 17 : 705-712, 2008.
- 9) Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, et al : Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells : A source of mesenchymal progenitors. Stem Cells 23 : 220-229, 2005.




## 末梢血幹細胞採取と成分採血

### — 医師と看護師による アフェレーシスの理解と実践 —

福島県立医科大学医学部長, 輸血・移植免疫学教授 **大戸 齊** 編  
自治医科大学輸血・細胞移植部教授 **室井一男**

B5判 148頁 定価 3,990円 (価格 3,800円+税5%) 送料実費  
ISBN978-4-7532-2496-8 C3047


**株式会社 医薬ジャーナル社** 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 ( 振替番号 )  
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (00910-1-33353)

<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。



## Patient Report

## Therapy-related Ph+ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia

Takeshi Taketani,<sup>1,2</sup> Rie Kanai,<sup>2</sup> Mariko Abe,<sup>2</sup> Seiji Mishima,<sup>1</sup> Mika Tadokoro,<sup>3</sup> Yoshihiro Katsube,<sup>3</sup> Shunsuke Yuba,<sup>3</sup> Hajime Ogushi,<sup>3</sup> Seiji Fukuda<sup>2</sup> and Seiji Yamaguchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Blood Transfusion, Shimane University Hospital, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine, Shimane and <sup>3</sup>Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Hyogo, Japan

**Abstract** Bone marrow (BM) transplantation (BMT) is one of the treatment strategies for congenital metabolic disease, but leukemia secondary to intensive cytoreductive treatment is a major concern. Besides BM cells, mesenchymal stem cells (MSC) are also used for transplantation. An 8-month-old girl with hypophosphatasia underwent transplantation of haploidentical BM cells followed by two transplants of MSC obtained from her father to facilitate osteogenesis. Fludarabine(Flu)/cyclophosphamide (CPA)/anti-thymocyte globulin were used for myeloablative conditioning, but the patient developed therapy-related leukemia harboring t(9;22)(q34;q11.2); minor *BCR-ABL* (t-leukemia with Ph) at the age of 32 months. At the age of 40 months she underwent a second BM and third MSC transplant from the same donor. Thereafter, she achieved complete histological and molecular remission. The present case suggests that the combination of cytotoxic agents (Flu/CPA) and MSC led to t-leukemia with Ph as a consequence of chromosome instability and suppression of host anti-tumor immunity.

**Key words** bone marrow transplantation, hypophosphatasia, mesenchymal stem cell transplantation, t(9;22)(q34;q11.2), therapy-related leukemia.

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is one of the treatment strategies for congenital metabolic disease, but myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia (MDS/AML) secondary to intensive cytoreductive treatment is a major concern. In contrast, acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myeloid leukemia (CML), and mixed phenotype acute leukemia (MPAL) associated with HSCT are seldom reported.<sup>1</sup> Cytotoxic agents implicated in therapy-related hematologic neoplasms are alkylating agents, DNA topoisomerase II inhibitors, ionizing radiation therapy, and other drugs such as anti-metabolites and anti-tubulin agents.<sup>2</sup> Monosomy or deletions of the long arms of chromosome 5 and 7 and the rearrangement of the mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene located on chromosome 11q23 are frequently detected in therapy-related hematological malignancies.<sup>1</sup> Translocation of (9;22)(q34;q11), however, is rare.<sup>1</sup> Besides hematopoietic stem cells (HSC), mesenchymal stem cells (MSC) that normally reside in bone marrow (BM) and other tissues are also used for transplantation. MSC differentiate into various mesenchymal lineages and several mesoderm lineages.<sup>3,4</sup> Their regenerative ability makes MSC an ideal source for transplantation in patients with osteogenesis imperfecta, inborn

errors of metabolism and ischemic heart disease.<sup>3,4</sup> Furthermore, MSC help maintain hematopoietic stem cells, facilitate hematopoietic recovery and reduce graft versus host disease (GVHD) by modulating immune function of T cells, B cells, NK cells, monocyte, and dendritic cells.<sup>3,4</sup> Herein we describe a girl with therapy-related leukemia harboring t(9;22)(q34;q11.2) (t-leukemia with Ph) that had developed following transplantation of HSC and MSC for the treatment of lethal congenital hypophosphatasia (HPP).

**Case report**

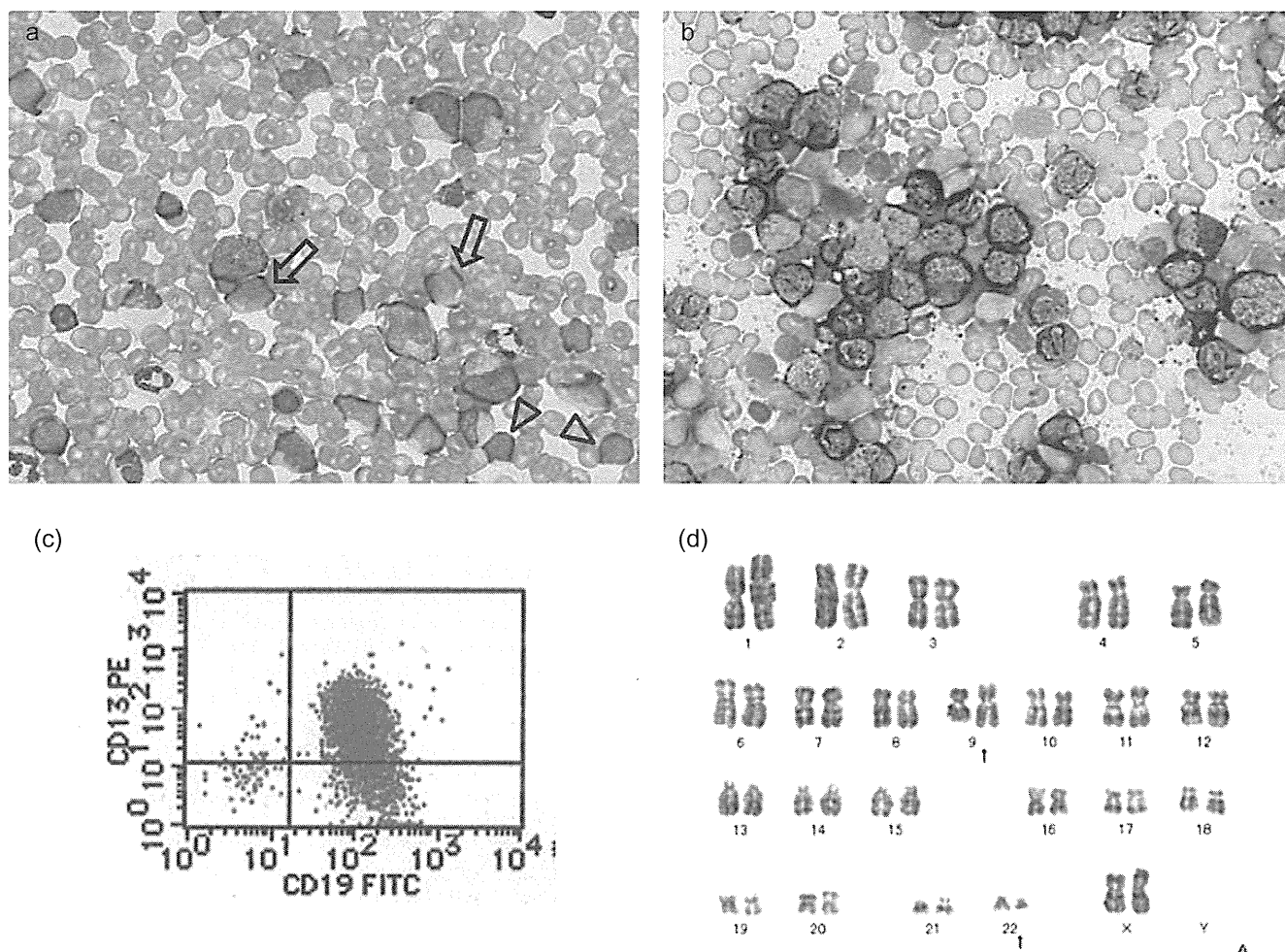
A female infant suffering from severe respiratory distress was diagnosed with perinatal HPP based on low serum alkaline phosphatase and hypomineralization of bones soon after birth. At 8 months old, she underwent sequential transplantation of haploidentical BM cells and MSC obtained from her father to facilitate osteogenesis, given that perinatal HPP manifesting respiratory disturbance is lethal.<sup>5</sup> Fludarabine (Flu; 30 mg/m<sup>2</sup> per dose × 5 days)/cyclophosphamide (CPA; 50 mg/kg per dose × 2 days)/anti-thymocyte globulin (30 mg/kg per dose × 3 days) were used for non-myeloablative conditioning. Short-term methotrexate (sMTX)/cyclosporin A/mycophenolate mofetil was given for GVHD prophylaxis. Although donor-derived bone marrow did not engraft, her respiration improved.<sup>5</sup> GVHD was not observed. MSC from the same donor were re-infused for recurrence of respiratory failure at the age of 15 months.<sup>5</sup> Although the patient had no respiratory complications following the second MSC

Correspondence: Takeshi Taketani, MD, PhD, Division of Blood Transfusion, Shimane University Hospital, 89-1, Enya, Izumo, Shimane 693-8501, Japan. Email: ttaketani@med.shimane-u.ac.jp

Received 13 July 2012; revised 9 October 2012; accepted 31 October 2012.

transplant (MSCT), she was found to have hepatosplenomegaly at 32 months of age, 24 months after initial transplantation. Peripheral blood (PB) examination showed an elevation of white blood cells (WBC) up to 48 990/uL with 40% blasts, 5.5% myelocytes, 2.5% metamyelocytes, 3.5% bands, 31% segments, 1% eosinophils, 7.5% monocytes and 9.5% lymphocytes. Hemoglobin and platelets were 14.6 g/dL and 163 000/uL, respectively. Marrow nuclear cell count was 156 000/ $\mu$ L with 23.4% lymphoblasts and myeloblasts, which were positive for myeloperoxidase (Fig. 1a,b). On flow cytometry, the blasts were positive for CD10, CD13, CD19, CD33, CD34, HLA-DR, TdT, cyMPO, cyCD22, and cyCD79a antigens. The data indicate that the leukemic clones expressed both myeloid and B lineage antigen and that these cells were biphenotypic, not biclonal (Fig. 1c). On G-banding chromosomal analysis, four out of 20 BM cells were 46 XX, t(9;22)(q34; q11) (Fig. 1d). No additional chromosomal abnormalities were detected. A minor *BCR-ABL* fusion gene, but

not the major *BCR-ABL* fusion gene, was detected on quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). MPAL does not involve myeloid differentiation. The patient presented with differentiated myeloid cells as well as leukemic blasts. Three weeks before onset, PB cells, including the leukocyte number and differential count, were normal and the minor *BCR-ABL* fusion was not detected on RT-PCR, resulting in no appearance of CML chronic and accelerated phase. The present patient, therefore, was diagnosed with undifferentiated leukemia. Daily imatinib at 230 mg/m<sup>2</sup> normalized the WBC count and eliminated the blasts in the PB. The blasts re-emerged, however, 3 months after imatinib treatment despite increasing of the dose (300 mg/m<sup>2</sup> per day). Neither mutations within *BCR-ABL* kinase domain nor *BCR-ABL* gene amplifications were found at this time. Irrespective of multiple chemotherapeutic drugs in addition to imatinib (prednisolone, vincristine, CPA, daunorubicin, L-asparaginase, cytarabine, and etoposide), the blasts never



**Fig. 1** Bone marrow examination. (a) Myeloid (arrows) and lymphoid (arrowheads) blasts exist simultaneously (May–Giemsa staining). (b) Myeloperoxidase staining. (c) Flow cytometry: marrow blasts expressing both CD19 (lymphoid antigen) and CD13 (myeloid antigen). (d). G-banding chromosome analysis.

disappeared. At the age of 40 months (32 months after the first BM transplant [BMT]), the patient underwent a second BMT from the same donor. VP16 (60 mg/kg/dose  $\times$  1 day)/CPA (60 mg/kg/dose  $\times$  2 days)/total body irradiation (13.4 Gy), and sMTX/tacrolimus (FK506) were given for myeloablative conditioning and prophylaxis of GVHD, respectively. A third MSCT was also performed to prevent severe GVHD because of HLA haploidentical BMT. Donor-derived marrow cells were engrafted 17 days after the second BMT. *BCR-ABL* fusion gene disappeared 1 month after the second BMT. Grade 1 acute GVHD was detected only in the skin but chronic GVHD was not observed. Although the patient maintained complete histological and molecular remission thereafter, she suddenly died due to unknown reasons at the age of 65 months.

## Discussion

The present patient had t-leukemia with Ph. The frequency of therapy-related MDS/AML, ALL, MPAL, and CML with Ph, resulting from cytoreductive treatment is rare in adult and pediatric cases.<sup>1,6,7</sup> Previous reports indicate that therapy-related MDS/acute leukemia with Ph is predominant in female subjects and adults (the median age at diagnosis of therapy-related disease is 48 years; range, 25–69 years). The median interval from initial therapy to development of therapy-related diseases is 110 months and the median survival is 5 months,<sup>6</sup> indicating long latency and poor outcome. Exposure to dose-dependent ionizing radiation is reported as one of the mechanisms responsible for therapy-related CML with Ph.<sup>1,7</sup> Ph+ AML/ALL/CML is reported to be associated with DNA topoisomerase II inhibitors, but not the alkylating agents.<sup>1,7,8</sup> Treatment with radioactive <sup>131</sup>iodine, 5-fluorouracil, 5'-deoxy-5-fluorouridine or tegafur for some solid tumors is also reported to be associated with subsequent emergence of CML.<sup>7,9</sup> There is also increasing recognition of CML in patients with non-malignant diseases treated with long-term immunosuppressive drugs and intensive treatment for organ transplantation.<sup>7</sup> Both alkylating agent (CPA) and antimetabolites (Flu) were given in the present case but neither DNA topoisomerase II inhibitors nor irradiation were used. Immunosuppressant drugs were used for <2 months in the present case and the known evidence indicates that CPA was also unlikely to contribute to the onset of Ph+ leukemia, suggesting that the combination of the two cytotoxic agents, CPA and Flu, may be implicated in the present case of Ph+ leukemia. A number of clinical trials of transplantation of HSC plus MSC have been performed in order to prevent graft failure and/or GVHD.<sup>3,4</sup> Although the risk of recurrence of hematological malignancies is a matter of concern because of the immunosuppressive function of MSC, the frequency of recurrence of leukemia in the patients who received HSCT plus MSCT was similar to those treated with HSCT alone.<sup>4</sup> The MSC is considered to be one of the components of the leukemia stem cell niche in addition to normal HSC.<sup>3,4</sup> Soluble factors secreted from MSC and cell–cell interactions regulated by MSC can aggravate the tumor microenvironment.<sup>2</sup> The cellular components of the tumor stroma, such as blood vessels, connective tissue, and inflammatory cells, proliferate and survive in the presence of a variety of chemokines, cytokines and adhe-

sion molecules derived from MSC.<sup>3,4,10</sup> Moreover, chemokines secreted by MSC can recruit tumor-associated macrophages and correlate with the progression of cancer cells by favoring tumor angiogenesis, proliferation, and metastasis.<sup>3,4,10</sup> MSC inhibit the function of cytotoxic T cells<sup>10</sup> and the proliferation of NK cells as well as dendritic cells,<sup>10</sup> suggesting that host anti-tumor immunity can be compromised by MSC.<sup>10</sup> These findings suggest that transplanted MSC likely supported tumor growth in the present case by inhibiting host anti-tumor immunity. Although a lack of phosphatase in general can increase phosphorylation, which likely affects intracellular signaling associated with cell proliferation, none of the patients with HPP reported so far developed any hematological malignancies. This may be attributed to lack of expression of alkaline phosphatase in primitive hematopoietic cells. Alternatively, the substrates for alkaline phosphatase may not be involved in cell proliferation, although this remains to be explored. These findings strongly suggest that deficiency of alkaline phosphatase itself was not the primary mechanism responsible for t-leukemia with Ph in the present patient. The present case instead suggests that a combination of cytotoxic drugs and MSC used for the treatment of HPP lead to t-leukemia with Ph as a consequence of chromosome instability and suppression of host anti-tumor immunity.

## Acknowledgments

Supported by the project for realization of regenerative medicine, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and Research on Regenerative Medicine for Clinical Application, Ministry of Health, Labour and Welfare. We thank Midori Furui, Mayumi Nagase, Mayumi Naito, and Rie Eda for support in molecular analyses.

## References

- 1 Czader M, Orazi A. Therapy-related myeloid neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; **132**: 410–25.
- 2 Vardiman JW, Matutes E, Arber DA *et al.* *Therapy-Related Myeloid Neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008; 127–9.
- 3 Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: Current status and future perspectives. *J. Cell. Physiol.* 2009; **218**: 9–12.
- 4 Sato K, Ozaki K, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: Basic aspects and clinical outcomes. *J. Clin. Exp. Hematol.* 2010; **50**: 79–89.
- 5 Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H. New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. *J. Pediatr.* 2009; **154**: 924–30.
- 6 Block AW, Carroll AJ, Hagemeyer A *et al.* Rare recurring balanced chromosome abnormalities in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: Report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **33**: 401–12.
- 7 Waller CF, Fetscher S, Lange W. Treatment-related chronic myelogenous leukemia. *Ann. Hematol.* 1999; **78**: 341–54.
- 8 Pedersen-Bjergaard J, Brøndum-Nielsen K, Karle H, Johansson B. Chemotherapy-related – late occurring – Philadelphia chromosome