

治療に期待することとして、「普通の子どものような暮らしができるようになってほしい」、「不自由なく生きていけるようになってほしい」というご意見を頂いた。

今後の不安について、「いつまで治療が続くのか」、「身体は本当に大きくなるのか。呼吸器ははずせるのか」、「どれくらい生きられるのか」というご意見を頂いた。

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。主要評価項目である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ため、間葉系幹細胞の呼吸症状への効果は肺組織への細胞置換ではなく、骨の石灰化および肺への trophic action が関与していると思われる。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、骨面積が低下傾向にあるため、長期間の効果をみていく必要がある。

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. 成長発達評価

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. インフォームドコンセント

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。骨髄移植は白血病や一部の先天性代謝疾患では確立した治療であるが、負担の大きな医療である認識が強い。また、臨床研究のため、治療が島根でしか行えない現状である。今後、この疾患でのより安全な骨髄移植方法の確立、後述している通り、根治療法の確立がこれらの問題をクリアにするとと思われた。

4. 間葉系幹細胞培養

1例目は5回、2例目は9回、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。

細胞の搬送は当初、陸路で行っていたが、実施期間の途中から空路で行うこと

になった。空路の場合は通常 X線検査を受けなければならないが、航空会社に申請し、国土交通省から特別に許可を得た上で X線検査の免除を受けることが可能となった。ただし搭乗毎に申請が必要で、許可が下りるまで約 10 日を要する。さらに搭乗便も指定されるため、次便に変更することさえ不可能であり、急な予定変更に対応出来ない。今後、医療界全体で細胞等の航空機搬送の枠組みが必要であると考えられる。

5. 骨形成能の研究

同種間葉系幹細胞移植により、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も残存していた。特に、症例 1 ではこれまで見られなかった大腿骨の骨折がみられ、皮質骨の機械特性が非常に不十分であることが示唆された。これらの結果にみられるように、同種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し、有用であると思われるも、今後さらなる長期にわたり、さらなる検証が必要となる。

また、移植した間葉系幹細胞はすべて *in vitro* では骨形成能を有していたが、患者に生着したドナー由来間葉系幹細胞が非常に少ないため、生体内での骨形成能や増殖能は明らかにできなかった。培養した間葉系幹細胞は *heterogenous* であり、その細胞特性も変化するため、骨へ

の遊走能および増殖能が質的にも量的にも低いため、臨床効果が不十分であった可能性が示唆された。

6. 基礎的研究

1) 疾患モデルマウスを用いた動物実験

ヘテロ接合体同士の交配で得られた個体は、同腹仔3匹で、予備的に加えた形態学的解析・血清学的解析結果については個体差の可能性が排除できない。

また、これまでに予備的に得たホモ接合体は全個体死産であり、親の育児放棄による哺乳障害もその原因の一つとして考えられる。

また、大腿骨から新鮮採取した骨髄細胞からのMSC分離は、ヒトやラットのMSCのような接着性の差異、さらに磁気ビーズによる血球系細胞の選別を利用しても困難であり、さらなる培養法の改善が求められる。

2) キメリズム解析

2症例ともに、骨髄移植後に造血細胞はドナータイプに置き換わったが、症例1はレシピエント優位のキメラとなっている。間葉系幹細胞のキメリズムに関して、骨髄から培養した間葉系幹細胞では、レシピエントタイプしか検出できないが、FCMにより骨髄液から間葉系幹細胞を単離して、そのキメリズム解析を行ったところ、ドナータイプを検出できたが、ドナータイプとレシピエントタイプの間葉系幹細胞の割合を同定するほどの検体

が得られなかった。臨床的には、骨の石灰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から、生着したドナータイプの間葉系幹細胞の効果があると思われる。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。今後、長期間ドナータイプの間葉系幹細胞が生着するか経時的に検討していく必要がある。

3) 病態の解明

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、直接的に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。今後、これらの遺伝子を詳細に検討して、この疾患の病態を解明していく予定である。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が遺伝子発現解析で明らかとなった。

② *TNSALP* 遺伝子変異解析

日本人のこの疾患に認められた遺伝子変異体を作成したところ、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。同様に、ドミナントネガティブ効果も 70% 以上の変異体でみとめられた。ALP 活性と石灰化能に関して、臨床の重症度と一致する変異体が多く認められたが、一部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 疾患特異的 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 遺伝子の変異しており、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。今後、iPS 細胞の長期的な維持、および樹立までの増殖能の保持を経時的に検討していき、

また、正常健康人から樹立した iPS 細胞の ALP をロックダウンすることによって、これらの機序を明らかにしていく必要がある。

4) 間葉系幹細胞の細胞特性

① 細胞剥離剤の検討

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。

② 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

骨分化や遊走能において、骨髄由来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 の発現量が高いことから、*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 MSC の培養条件で骨芽細胞へ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。*in vivo* でもロット間の差が大きいかどうかを検討することが重要であると思われた。

7. 外部評価委員会、当該臨床研究の発展に対する方策

当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、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くことで、当該臨床研究を改変することにより、科学的根拠に基づいた臨床研究を行うことができた。また、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、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と思われた。

8. アンケート調査

当該臨床研究を受けた当事者のご家族にアンケート調査を行うことによって、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、この臨床研究の目標が3年生存率であるが、元気で健康な子ども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。

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 の向上だけでなく社会への貢献にもつながる。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高いため、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. 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
抗菌薬で軽快
3. 高血圧
免疫抑制剤の調整・降圧剤で改善
4. けいれん
高血圧の管理・免疫抑制剤の調整で消失
5. 急性および慢性 GVHD
免疫抑制剤の調整・間葉系幹細胞で治癒

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

(巻末に別記載)

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 23-25 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

致死的で治療法の確立していない骨系統疾患である、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する細胞治療を行った。主目的である 3 年生存率は到達できた。呼吸状態は安定し、身体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、骨の脆弱性は残存している。治療が必要な骨髄移植の有害事象（移植片対宿主病、甲状腺機能低下症など）を認めたが、後遺症を残さず軽快している。一方、間葉系幹細胞移植の有害事象は生じていない。したがって、当該治療は、年齢相当の成長発達および正常な骨構造の到達には至っていないが、骨の石灰化を回復させ、生命予後の改善に寄与することができ、乳幼児でも安全に行える治療法であることがわかった。今後、根治療法としての細胞医療の確立のために、遊走能、増殖能および免疫寛容に優れた間葉系幹細胞を樹立し、最適な同種間葉系幹細胞方法を確立する必要がある。

研究協力者

山口清次（島根大学医学部小児科・教授）
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劣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、呼吸障害などにより乳幼児期に死亡する。本疾患に対して国内外で酵素補充療法の治験が行われているが、確立した治療法がない。細胞治療に関して、この患者に、健康人の骨髄および骨、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。同種骨髄移植だけでは骨が形成されず、同種骨髄移植後の間葉系幹細胞はほとんどが患者由来であること、造血細胞は ALP を発現していないことから、骨髄移植だけではこの疾患は治癒できない。したがって、軟骨内骨化および膜性骨化の両方に骨化に必須の間葉系幹細胞を移植することが必要となってくる。この疾患の間葉系幹細胞は、ALP が低く骨形成能も著明に低下しているため、自己（患者）間葉系幹細胞を治療に使用できない。よって、骨化能が正常の同種間葉系幹細胞移植が不可欠である。間葉系幹細胞移植は、国内外で数多くの臨床研究が行われている。間葉系幹細胞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間葉系幹細胞が多用されている。それは細胞源（骨髄、臍帯、滑膜、脂肪、歯髄など）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。我々は同種間葉系幹細胞移植により骨を形成することをラットで明らかにしたが、免疫抑制剤が必要となる。また、これまでの多くの同種間葉系幹細胞移植の報告で、ドナー由来間葉系幹細胞は長期間生着できない。したがって、我々は、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、免疫細胞の主役を担っている血液細胞を骨髄移植で置き換えて拒絶反応を防ぐ状態にした後、同じドナーの骨髄から培養増殖した間葉系幹細胞を経静脈的に移植することにより生着した間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化して骨を再生させる治療を行った。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（生化学検査、画像評価、骨塩定量など）の改善度、有害事象の評価とした。（UMIN clinical trial ID: 000003828）

B. 研究方法

1. 対象患者

これまでの報告ならびに我々の疫学調査から、予後不良因子である、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、を有する患者とした。また、患者由来間葉系幹細胞の骨石灰化能が *in vitro* で低下していることも確認した。

TNSALP 遺伝子変異は、患者の末梢血から DNA を抽出して、全エクソンを直接シーケンスで同定した。同定された遺伝子変異の変異体を ALP 活性のない細胞株である Cos7 に導入して、*TNSALP* 遺伝子野性型を導入した細胞株と比較して、ALP 活性を測定した。骨石灰化能は、患者の骨髄から培養増殖した間葉系幹細胞を骨分化誘導した後、カルシウム親和性が高いカルセインの取り込みで評価した。

なお、除外症例として、1. 好中球 750/ μ L 以下、血小板 50,000/ μ L 以下、2. 血清 Cr 0.8mg/dL 異常、3. T.bil 1.8 mg/dL 以上、AST 160 IU/L 以上、4. 24 時間 CCr (体表面積補正) 70ml/min/1.73m² 以下、5. 治療が必要な心電図異常を認める、BNP 100pg/mL 以上、左室駆出率 50%以下、6. 活動性感染症がないこと、7. 平坦脳波でないこと、8. Performance status が保たれていないこと（表情がない、自動運動がない）とした。

2. 骨髄提供者の選定

健常人の骨髄および間葉系幹細胞を用いる。間葉系幹細胞は骨髄に存在するため、健常人の骨髄を採取する必要がある。患者の家族（2 親

等以内)の中でこの病気ではない人から、最も適切な間葉系幹細胞をもつ人を症状および血液検査 (ALP、肝機能、腎機能など)、*TNSALP* 遺伝子検査から選定する。また、骨髄移植を併用するため、患者および骨髄提供者の HLA 検査を行い、最適な提供者を決定する。

骨髄提供者の選定基準は、以下のとおりである。1. 患者のご家族 (血縁関係のある 2 親等以内) である、2. 症状および骨レントゲン、骨密度などから、骨形成が正常に行われている、3. 血清 ALP が正常である *TNSALP* 遺伝子が正常である、または、*TNSALP* 遺伝子異常 (保因者) であっても血清 ALP が正常である、5. HLA が一致している、または、一致していなくても骨髄の生着や重篤な移植後合併症が起きる可能性が低い、6. 感染症マイナス (HIV (ヒト免疫不全ウイルス)、HBV (B 型肝炎)、HCV (C 型肝炎)、HTLV1 (成人 T 細胞白血病ウイルス) 検査結果陰性) である。骨髄提供者の優先順位は、両親が *TNSALP* 遺伝子異常を認めてもその表現型が正常であり、患者との HLA 不一致の程度が骨髄移植に耐えうる場合、両親のどちらかをドナーとする。しかし、両親のどちらも、*TNSALP* 遺伝子異常を有し、かつ表現型が正常でない場合 (症状がある場合)、HLA 不一致の程度が高く骨髄移植の合併症である GVHD や拒絶反応などの重篤な有害事象を発生する可能性が高い場合にのみ、未成年である同胞をドナーとする。

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、骨髄移植および骨髄から培養する間葉系幹細胞に必要な量 (それぞれ、患者体重当たり 10-15ml/kg、20-30ml) 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。具体的な投与方法は、BU (0.9-1mg/kg/dose×4 回/day、4 日間)、シクロフォスファミド (50mg/kg/dose、4 日間)、抗胸腺グロブリン (1.25mg/kg/dose、4 日間) とした。

3) 移植片対宿主病 (GVHD) の予防

短期間メソトレキセート (short term MTX、10-15mg/m²/dose、4 日間) およびタクロリムス (FK506、0.02~0.04 mg/kg/day、トラフ 5-10 ng/mL を保つ) を使用した。FK506 は、骨髄移植に準じて、漸減中止とした。

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。具体的な培養方法として、間葉系幹細胞移植用に採取された骨髄 (20-30mL) をヘパリン添加した PBS

(Phosphate buffered saline) を含む滅菌試験管に加える。採取された骨髄は、温度管理 (10~30 度) されたクーラーボックスに入れて空路で産総研内セルプロセッシングセンターに搬

送して培養操作を行う。培養は 20mg/mL 硫酸ゲンタマイシンと 15%牛胎児血清を含んでいる液体培地 (α -MEM) 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 (5%CO₂, 37°C) 内で行う。培養容器底面に間葉系幹細胞が接着し細胞が増殖する。移植に必要な細胞数を得るために、培養細胞をプロテアーゼ (トリプシンに代わる動物由来成分不含の細胞解離剤: GIBCO recombinant Protease) を用いて培養容器より剥がし、あらたな培養容器で継代培養 (2 次培養) する。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) までとする。培養期間は、14-21 日間である。その後、細胞を剥離し PBS で懸濁し細胞数および生存率の測定を行なう。細胞生存率が 80%以上あり移植必要細胞数 (体重あたり 10⁶ 個/kg 以上を目標とする) が確保できていれば、細胞を新たな PBS で懸濁し滅菌試験管に移し、同日に上記のクーラーボックスを使用して島根大学附属病院に空路で搬送する。

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: 患者体重あたり 10⁶ 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す必要がある。また、間葉系幹細胞は、同種骨髄移植後の合併症である、生着不全や GVHD への効果も指摘されている。特に、本疾患の生命予後が呼吸障害に依存しており、間葉系幹細胞移植後の呼吸

障害の改善が 1 か月前後でみられることから、骨髄移植および間葉系幹細胞移植を行った後に 2-3 か月で呼吸状態が改善しない場合、また、GVHD などの臨床症状の悪化がみられたり、骨の石灰化の悪化がみられた場合に、間葉系幹細胞のみを再投与することとした。この時使用する間葉系幹細胞は、同じドナーから再び同意を得た後、骨髄を採取して、上述と同様に培養増殖された間葉系幹細胞を使用する。

8. 移植後の評価

臨床症状として、バイタルサイン、呼吸状態および身体計測を評価した。また、乳幼児の成長発達評価として、遠城寺式発達指数を用いた。客観的評価として、ALP、Ca、P などの一般的な血液・尿検査に加えて、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。また、ALP の基質である、尿中 Phosphoethanoamine (PEA) も測定した。画像検査として、レントゲンおよび CT による骨の評価に加えて、DXA 法により、骨密度、骨面積および筋肉量を測定した。

(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 2,942g、正常経膈分娩で出生した。多呼吸を認め、ALP の低値 (7 IU/L)、ALP の基質である尿中 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。出生後から呼吸障害を認めたが、生後 3 か月に急速に換気不全が進行したため人工呼吸管理を開始し、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 を認めた。この変異体の ALP 活性はほとんどなく、患者由来間葉系幹細胞の骨形成能の低下を認めた。

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。骨髄移植 16 日目に、1 回目の間葉系幹細胞移植を行った。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。骨髄移植の移植合併症として、急性 GVHD (skin grade 1, Liver 0, Gut 0)、粘膜障害 (気切口)、肝機能障害を認めたが、対処療法で軽快した。FK506 は移植後 2 か月で中止した。骨髄移植後 1 歳 4 か月および 1 歳 5 月の時、原病による気管れん縮を起こし、徐脈を伴うチアノーゼを繰り返したため、2 回目の気管れん縮の後から、追視障害や視覚障害などの低酸素性脳障害による後遺症がみられた。頭部 MRI で、高信号であった尾状核、被殻が萎縮して高信号域が消失したため、同部位が低酸素により障害されていると思われる。また、骨髄移植後 4 か月に甲状腺機能低下症を発症したため、甲状腺ホルモン (チラーゼン) 内服で甲状腺機能が回復している。1 歳 6 か月に、2 回目の間葉系幹細胞移植を行った。その後、気管れん縮は認めず、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し、夜間のみ補助呼吸を行っている。しかし、この頃から、ドナー由来造血細胞の割合が 10-20% に低下し、ALP が低値のまま、骨の石灰化も不十分のため、2 歳 3 か月および 2 歳 8 か月に、3 回目および 4 回目の間葉系幹細胞移植を行った。3 歳で、座位も可能となり、歩行器による歩行訓練を開始した。状態の安定を確認して、3 歳より自宅で生活している。3 歳 6 か月の時に、骨の石灰化の更なる改善と慢性 GVHD による肝機能障害に対して、5 回目の間葉系幹細胞移植および FK506 を 1 年間投与した。同時期より、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。現在、4 歳 6 か月で、呼吸状態は安定しており、自宅で生活している。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。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。

しかし、ALP の低値、骨型 ALP の低値および尿中 PEA の高値は持続しており、生化学的改善は認めていない。

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、骨の石灰化の改善が全身の骨で認めていたが、3 歳すぎてから石灰化が停滞している。また、3 歳頃まで伸長していた長幹骨の長さも変化がなくなってきた。生化学検査では、ALP の低値は 5 回目の間葉系幹細胞移植後 ALP が 1 年間上昇し始めたがその後低下している。一方、ALP の基質である尿中 PEA は高値であるが、5 回目の間葉系幹細胞移植後低下傾向にある。骨形成マーカーは ALP の推移に一致した変動を示した。一方、NTX 以外の骨吸収マーカーも骨形成マーカー

の動きに比例して、5回目の間葉系幹細胞移植後一旦上昇したが再度低下傾向にある。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ため、今後の慎重な経過観察が必要である。

重篤な有害事象に関して、骨髄移植による有害事象として、急性GVHDを発症したが、免疫抑制剤により軽快した。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、人工呼吸管理を開始した。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。遺伝子検査で症例1と同様の*TNSALP*遺伝子の1559delTのhomozygous mutationを認めた。また、生後6か月頃からこの疾患の合併症である気管れん縮が断続的に起こっていた。

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。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。骨髄移植後17日目に、1回目の間葉系幹細胞移植を行った。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、重度の消化器症状(下痢、血便)はステロイドやFK506、CyA、infiximabなどの免疫抑制剤で改善しなかった。また、GVHDの1つの症状と考えられる腹水の貯留が出現したが、生後8か月(骨髄移植後51日目)時に2回目の間葉系幹細胞移植を行ったところ、移植後1週間頃から劇的に症状が改善した。なお、これ以降、気管れん縮は認めなくなった。骨髄移植後3か月ごろから、慢性GVHDである、黄疸および肝機能障害が出現したが、FK506により治癒した。なお、FK506は2歳まで投与した。

この間、呼吸状態が改善せず、骨の石灰化も回復しないため、間葉系幹細胞を10か月から1歳5か月まで計4回追加投与した。1歳6か月ごろから、呼吸状態が安定してきたが、しかし、酸素化が安定しなかったため、1歳9か月の時に、7回目の間葉系幹細胞移植を行った。このころから、息をとめる動作が頻発して、脳波からてんかんを診断し、抗けいれん薬により、症状が消失したが、1歳11か月の時に、てんかん発作の再燃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3か月の時に、在宅に向けて、近医に転院したが、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。しかし、重症の感染症であったため、低栄養から起因する体重減少も伴い、このころから、気管攣縮が再燃したため、2歳7か月に再度入院となった。2歳9か月に9回目の間葉系細胞移植を行った後から、体重は元に戻り、気管攣縮も移植後2か月から

は認められなくなった。3歳0か月現在、人工呼吸器が必要な状態であるが、呼吸状態は安定している。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。

ALPは11か月頃から上昇し始めたが、1歳8か月ごろから低下した。しかし、2歳6か月頃から、再上昇してきている。尿中PEAは1歳ごろをピークに低下傾向にあり、現在はピーク時の25%まで下がった。

骨の石灰化に関して、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ていたが、2歳以降石灰化が低下している部分が見られている。骨形成マーカーであるBAP、OC、ucOCおよびintact P1NPはALPの推移と比例していることが明らかとなった。骨吸収マーカーであるNTxは低値を持続しているが、DPD、TRACP-5bおよび1CTPは一定の変化が見られない。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見られた。しかし、2歳以降、骨面積が低下しているため、今後の慎重な経過観察が必要である。

重篤な有害事象に関して、骨髄移植による有害事象として、急性GVHD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。また、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。間葉系幹細胞移植による有害事象は認めていない。

D. 考察

細胞治療による治療効果のメカニズムは、1.

細胞置換（Cellular Replacement）：ホストの組織・臓器に移植細胞が組み込まれ、機能不全に陥った細胞を置換することにより機能回復を行う、2. 栄養効果（trophic action）：移植細胞が産生する栄養因子、サイトカイン、細胞外基質の作用により、ホストの細胞への保護効果あるいは組織の修復能力が高められて機能修復が行われる、の2つに大別される。低ホスファターゼ症に対する同種間葉系幹細胞移植による骨石灰化は前者に該当する。一方、MSCによる急性GVHD治療は、間葉系幹細胞が抗炎症・免疫抑制性サイトカインを放出する性質を利用したもので、後者に該当する。細胞置換を期待した治療では、多くの場合、試験管内で作製された骨・軟骨を患部へ移植する局所投与がとられてきたが、本疾患を含めた全身症状を示す骨系統疾患に対しては局所投与では不十分なため、経静脈的全身投与が必要となる。全身への同種間葉系幹細胞移植は一過性の効果を求めるGVHDでは多数試みられているが、移植細胞の長期生着が要求される再生医療としては我々の試みだけである。

今回の我々の細胞治療において、主目的である3年生存率は2症例ともに達成でき、骨の石灰化も回復した。臨床症状について、呼吸機能の改善は、呼吸筋を支える肋骨などの石灰化の回復に伴い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。しかし、呼吸器からの離脱ができていないこと、症例2ではてんかんや気管支喘息に伴い気管れん縮が再燃していること、酸素が必要であることから、永続的な効果を得るには至っていない。これは、呼吸筋を支える肋骨や気管軟骨の脆弱性が正常化していないことが考えられる。また、呼吸障害を合併するこの患者は酸素が必要としているため、肺組織の酸素化機能にも障害をされていることが考えられる。中胚葉である間葉系幹細胞が内胚葉である肺組織に置換することも

動物実験では報告されているが、我々の結果からは、ヒトでは同種間葉系幹細胞の肺組織への置換は非常に低いと思われる。

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。また、この疾患の中樞神経合併症である、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。さらに、遠城寺式発達評価では、3歳現在どちらの症例も、1歳前後の発達レベルである。これらのことから、この細胞治療で症状の悪化を防ぐことはできるが、こどもの正常の成長発達を促すことは難しいと思われた。

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、症例ごとに骨の石灰化の改善度が異なることは、移植前の骨の状態の違いや、移植する間葉系幹細胞の生着能や骨分化能の違いが影響していることが推測される。なお、移植した間葉系幹細胞の *in vitro* での骨形成能 (ALP 活性およびカルセインの取り込み) は、variation が認められるものの、測定した全てがみられた。興味深いことに、骨の石灰化の回復とともに、筋肉量の増加がみられた。筋肉が発達することにより骨が増強される筋骨関連という考えがあるが、骨の石灰化により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が示唆された。しかし、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いない。この理由として、骨へ遊走生着する間葉系幹細胞が少ないこと、生着した間葉系幹細胞の増殖能が低いこと、および移植した同種間葉系幹細胞が移植同種免疫により拒絶されることなどにあると考えられる。今後、正常骨を再生する細胞移植治療の確立のために、遊走能、増殖能および免疫寛容に優れた間葉系幹細胞を樹立し、最適な同種間葉系幹細胞方法を確立する必要がある。また、今回の間葉系幹細胞のドナーが

保因者であることも骨の石灰化が正常に達しない要因と考えられるため、ALP が正常かつ HLA が一致したドナーを選択する方法として、臍帯血移植と同一ドナーの臍帯由来間葉系幹細胞移植も念頭に置く必要がある。さらに、我々は、正常な *TNSALP* 遺伝子を導入した患者由来間葉系幹細胞をヌードラットに移植したところ、骨を形成することを証明した。また、骨への取り込みを高めた ALP を遺伝子導入した造血幹細胞を疾患モデルマウスに移植して症状が改善している。これらのことから、同種だけでなく自家細胞を利用した遺伝子改変細胞治療も検討していく必要がある。

生化学検査に関して、ALP と骨形成マーカーは特徴的な推移を示した。症例 1 は骨髄移植および間葉系幹細胞移植後低値のままであったが、5 回目の間葉系幹細胞移植後から 1 年間上昇した。症例 2 は骨髄移植後 4 か月ごろから上昇し始めたが、1 歳 8 か月ごろから低下した。その後、2 歳 6 か月頃から再上昇している。この推移に関して、FK506 の関連を考えている。症例 1 は FK506 を骨髄移植後 2 か月しか投与せず、5 回目の間葉系幹細胞前から慢性 GVHD の治療として FK506 を 1 年間投与した。症例 2 は骨髄移植後 2 歳までの 1 年 7 か月間使用した。FK506 の投与が短期間の場合骨分化を促進するが、長期間投与すると骨形成が低下することがヒトでもマウスでも報告されている。以上より、FK506 は間葉系幹細胞の骨分化には必要であるが、その投与期間は慎重に判断する必要があると思われた。

移植した間葉系幹細胞の生着に関して、我々は、間葉系幹細胞を腸骨から採取した骨髄から単離して調べたところ、ドナー由来が生着していることを明らかにした。しかし、骨髄移植の骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄中と培養増殖した間葉系幹細胞の両方あるいはどちらかが生着しているかを明らかにすることはできなかった。また、最後に移植して

から、症例 1 は 1 年以上、症例 2 は 4 か月経過しているが、ドナー由来間葉系幹細胞が長期間生着し機能するかは不明のため、今後の推移を慎重に評価する必要がある。

骨髄移植の有害事象に関して、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を 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により重症の急性消化管 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 への効果はさまざまな報告があるが、我々の症例では効果的であった。また、2 例とも、骨髄移植後甲状腺機能低下症を発症したが、甲状腺ホルモンを内服することで症状は認めていない。間葉系幹細胞移植の有害事象に関して、複数回の間葉系幹細胞の経静脈投与による有害事象は、投与早期にも投与後長期間が経過しても認めなかったため、間葉系幹細胞の静注は乳児にも安全に行えることが明らかとなった。なお、2 例ともに、息をとめるてんかん発作を発症したが、抗てんかん薬（カルマバゼピン）でコントロール良好である。これまでの文献で同様のてんかんの有害事象の報告がないことから、骨髄移植や間葉系幹細胞移植とてんかんの関連はないと考えている。なお、原病の合併症に、てんかんがある。しかし、原病によるてんかんはビタミン B6 依存性であることが多いため、症例を蓄積することでてんかんの原因が明らかになると思われる。

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は、正常な成長発達および正常な骨構造を示すことはできないが、骨の石灰化を回復して、救命することができた。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。

F. 健康危険情報

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
抗菌薬で軽快
3. 高血圧
免疫抑制剤の調整・降圧剤で改善
4. けいれん
高血圧の管理・免疫抑制剤の調整で消失
5. 急性および慢性 GVHD
免疫抑制剤の調整・間葉系幹細胞で治癒
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

(巻末に別記載)

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

骨髄移植	
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	$3.56 \times 10^8 / \text{Kg}$
間葉系幹細胞移植	

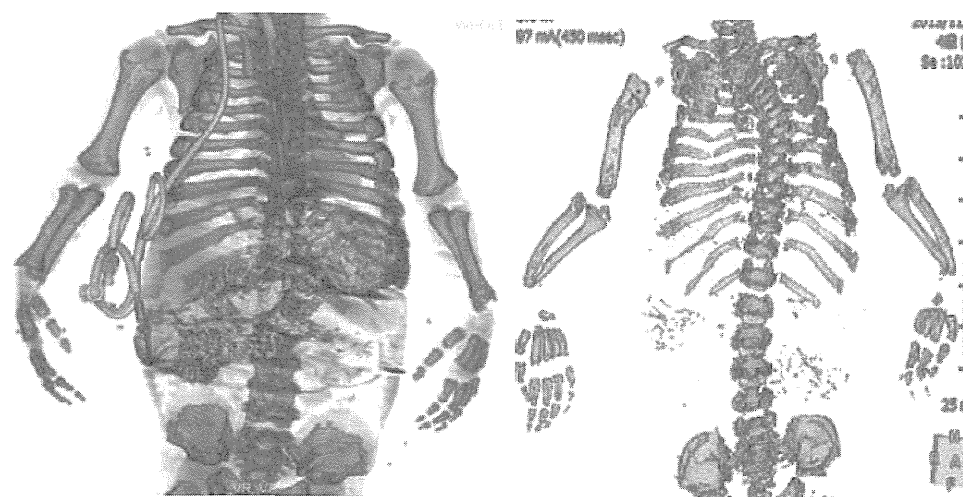
移植回数	5回
移植時期	1歳2か月～3歳6か月
移植細胞数	平均 $1.4 \times 10^6 / \text{kg}$

1

骨CT

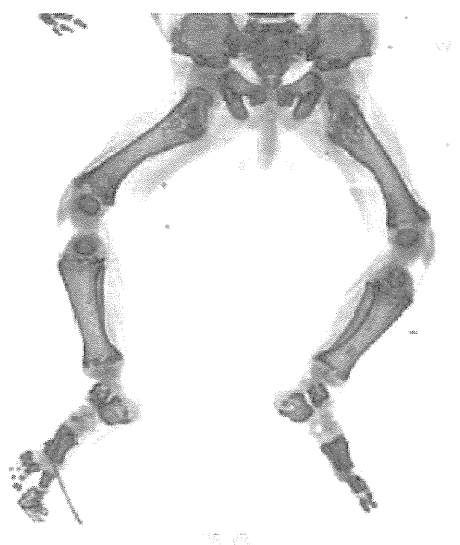
1歳2か月（移植前）

4歳6か月（移植後）

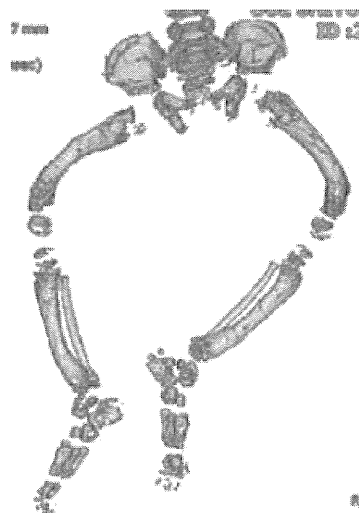


骨CT

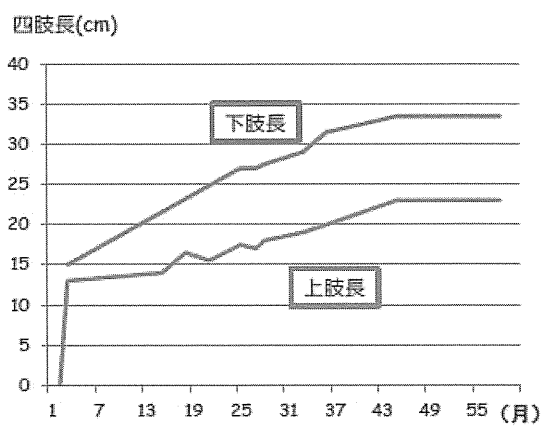
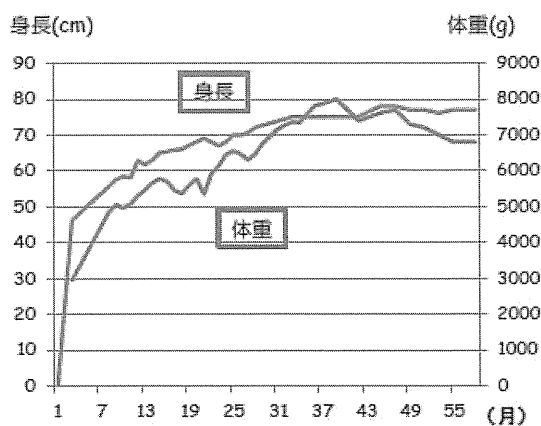
1歳2か月（移植前）



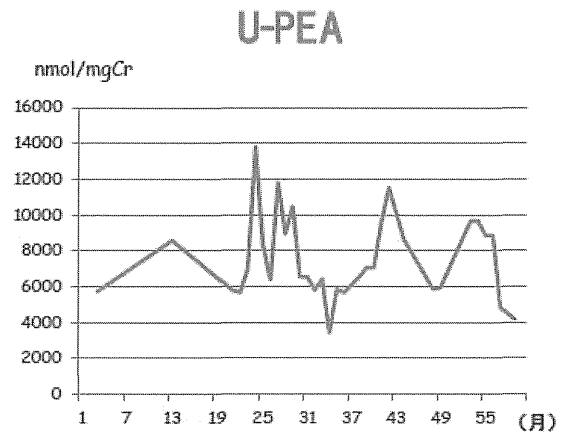
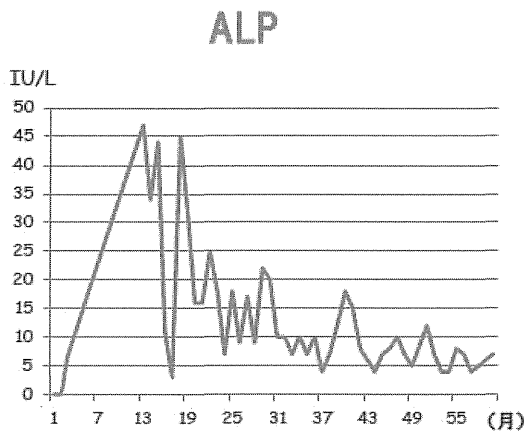
4歳6か月（移植後）



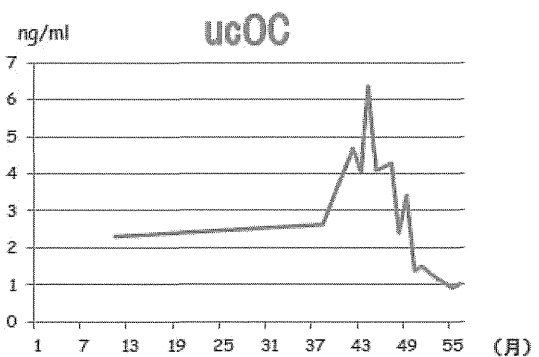
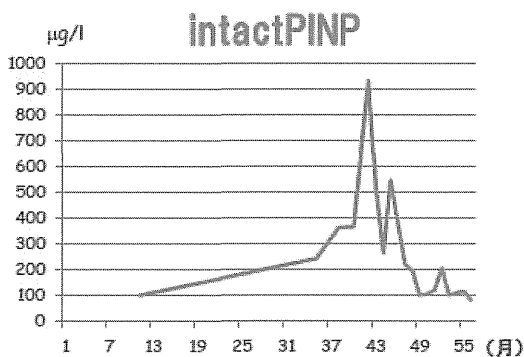
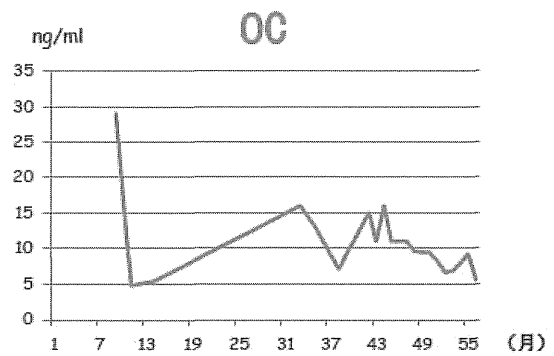
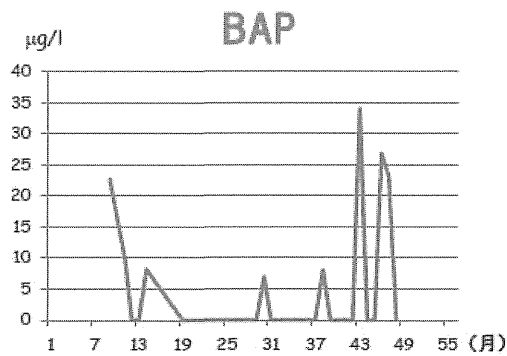
身長・体重・上肢長・下肢長



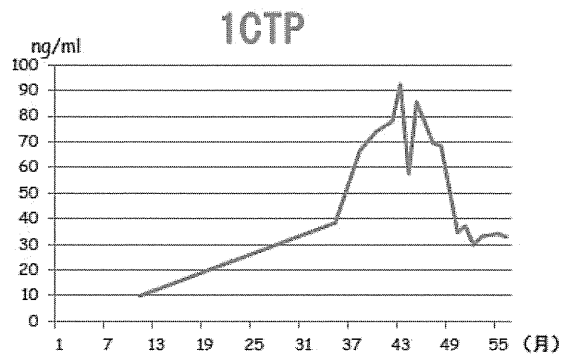
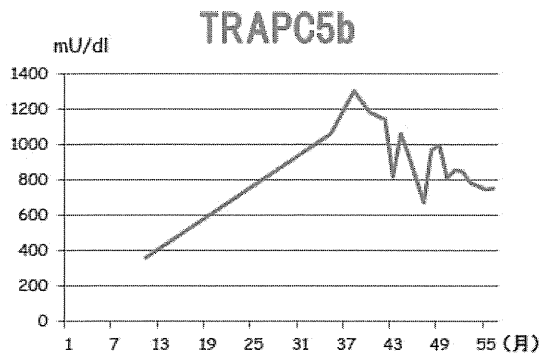
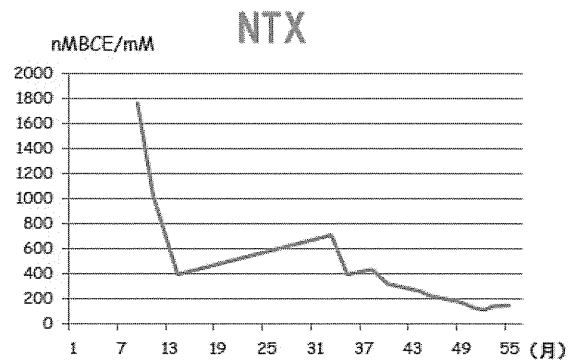
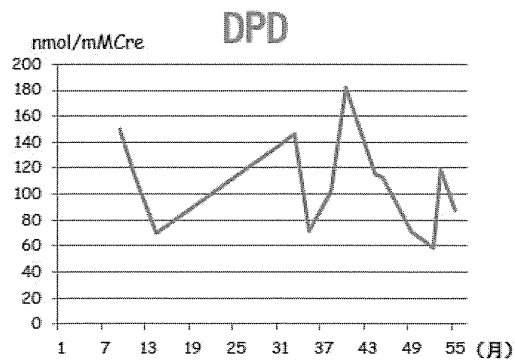
ALP・U-PEA



骨形成マーカー

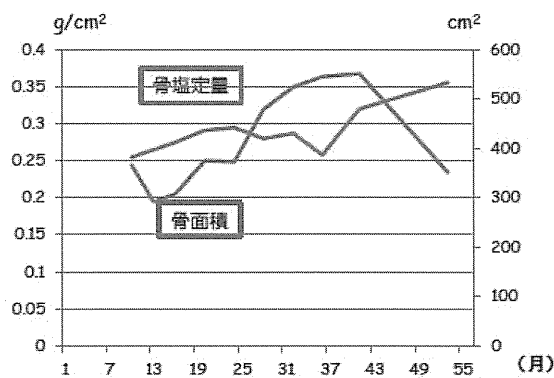


骨吸収マーカー



骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



筋肉量

