

201106014A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹谷 健

平成24（2012）年 3月

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 ----- 14
竹谷健
(資料) 研究計画書、厚生労働省発医政

2. インフォームドコンセントと外部評価委員会 ----- 39
山口清次
(資料) 研究協力依頼の説明書と同意書

3. 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究 ----- 58
弓場俊輔
(資料) 細胞培養工程

4. 骨形成能の研究 ----- 89
大串始

5. キメリズム解析および網羅的遺伝子解析 ----- 98
福田誠司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 108

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 110

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

研究代表者 竹谷 健（島根大学医学部附属病院輸血部・講師）

研究要旨

低ホスファターゼ症は、骨および歯の石灰化障害を来す疾患で、周産期および乳児期に発症した多くの症例は致命的な経過をとる。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、間葉系幹細胞を繰り返し投与する臨床研究を行った。これまで、2 症例に細胞治療を行い、呼吸症状の改善および骨の石灰化の改善が認められており、生命予後は改善している。しかし、ALP を含めた生化学検査は改善せず、正常人同等の骨の石灰化の改善までは到達していない。この疾患は致命的疾患で治療法が確立していないため、家族への十分な説明と同意を反復して行い、各専門分野からの指導を取り入れることで、当該臨床研究が適切に行うことができている。さらに、骨形成能、キメリズム解析、網羅的遺伝子発現、疾患モデルマウスの作製を行うことで、この治療の改善点、問題点が明らかとなり、より良い最治療法の確立に寄与している。この研究のこれまでの成果は、患者の救命、QOL の向上、および研究費以上の医療費ならびに社会福祉費の削減に貢献できるとが示唆された。今後、基礎的研究を継続し、この治療を受ける症例数を蓄積することで、この疾患に対する根治療法が明らかになると思われる。

I . 総括研究報告

研究分担者 所属機関名及び所属機関に
おける職名

山口清次 島根大学医学部小児科 教授

福田誠司 島根大学医学部小児科 准教
授

弓場俊輔 産業技術総合研究所・健康工
学研究部門 研究グループ長

大串始 産業技術総合研究所・健康工
学研究部門 招聘研究員

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う。

2. インフォームドコンセントと外部評価委員会

この臨床研究が確立した治療ではなく、致死的な疾患に対する治療であるため、インフォームドコンセントの対応によっては、患者および家族に過度の期待を与えたり、不必要な負担をかけることが予

想される。したがって、患者および家族が、この臨床研究を出来る限り正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、インフォームドコンセントを繰り返しかつ慎重に行った。また、それぞれの分野の専門家から当該臨床研究をより適切に行うことができるよう指導を受けるために、外部評価委員会を開催した。

3. 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究

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する。同時に、同疾患モデルマウスを用いた動物実験において、臨床研究で得られた有効性を検証する。

4. 骨形成能の研究

移植前の間葉系幹細胞の骨形成能と移植後における患者の骨形成を検討し、本研究の有用性を骨形成解析という側面から検討した。

5. キメリズム解析および網羅的遺伝子解析

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を明らかにするために網羅的遺伝子発現解析を行った。

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、抗がん剤の治療を行い、ALPが正常なドナーからの具体的な方法として、まず、提供者の骨髄を採取して、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）、生化学検査（ALP、カルシウム、リンなど）、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)、有害事象の検討を行う。

2. インフォームドコンセントと外部評価委員会

当該臨床研究の計画書ならびに説明書を用いて、3回説明を行い、また、医療従事者がいない状態でご家族同士の話し合いの場を設けた上で、同意を確認する。また、当該臨床研究を適切かつ順調に遂行するために、また、重篤な有害事象や予期せぬトラブルが生じた場合、ご助言を頂くために、それぞれの専門分野の第一人者に外部評価委員になって頂き、年度末に外部評価委員会を開催した。

3. 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究

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。低ホスファターゼ症の原因遺伝子である組織非特異的ALP遺伝子に変異を導入したマウス(TNALP KOマウス)と野生型BL6との交配を開始し、ヘテロ接合体個体の繁殖を行った。また、繁殖で得た個体について、解析手法の確認として、血清ALP、軟X線写真撮影、 μ CT、下肢全体のDXA(骨密度)を行った。

4. 骨形成能の研究

MSCの移植前の骨形成能の検討においては、培養条件下に増殖されたMSCを骨分化因子を含んでいる培地、もしくはコントロールとして分化因子を含まない培地で培養し、顕微鏡観察、ALP活性ならびにミネラル量(カルセインの蛍光強度)を測定した。

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により検討をおこなった。

5. キメリズム解析および網羅的遺伝子解析

移植後に患者から造血細胞および培養した間葉系幹細胞を単離して、それぞれの細胞の由来（ドナー由来、レシピエント由来）を検討するために、個人識別マーカーである short tandem repeat を増幅させ、シーケンス解析で塩基配列を決定した。また、患者および骨髄提供者（保因者）、正常健康人の間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現を解析して、遺伝子発現パターンの違いから、本疾患の病態を検討した。

（倫理面への配慮）

当該研究は、島根大学医の倫理委員会および産総研の倫理委員会の承認を得た後、「ヒト幹細胞に用いる臨床研究に関する指針」において平成 22 年 6 月 21

日に厚生労働大臣の認可を得て行っている。また、本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針に従い、島根大学医の倫理委員会および産総研の倫理委員会の承認を得た後、行っている。

C. 研究結果

1. 細胞治療

これまでの 2 症例について、細胞治療を行った。

症例 1：1 歳 2 か月の時に、父から骨髄移植を行った。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 grade1, Liver 0, Gut 0)、粘膜障害、肝機能障害を認めたが、対処療法で軽快した。骨髄移植後 1 か月半および 3 か月の時、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、低酸素性脳症を発症した。2回目の気管れん縮の後から、追視障害や視覚障害がみられている。また、甲状腺機能が低下したが、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4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、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。2歳8か月現在、身長、体重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。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。しかし、骨の石灰化に関して、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。骨塩定量は正常よりも低いが、少しずつ回復し、筋肉量も徐々に増加している。

症例2：生後7か月の時に、母から骨髄移植を行った。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た。骨髄移植の移植合併症として、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移植した後から、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。呼吸状態が改善せず、ALPも低値のまま骨の石灰化も回復しないため、間葉系幹細胞を生後9か月および1歳に追加投与した。この症例も2回目の間葉系幹細胞移植以降は、気管れん縮が消失した。呼吸状態に関して、人工呼吸を必要としているが、少しずつ条件を下げる事ができている。1歳現在、

身長、体重は変化なく、顎定がすこしみられる程度で、経管栄養を続けている。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、生化学的改善も認めていない。骨の石灰化に関して、移植前の骨の石灰化障害が軽度回復しており、胸郭が拡大し、長幹骨が太くなっている。

2. インフォームドコンセントと外部評価委員会

これまで、8 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、3 例、3 例である。臨床研究を開始している 2 例については、骨髄移植を 1 回、間葉系幹細胞移植を 4 回行っている。そのたびに、臨床研究の説明を行い、同意を得た後、治療を行っている。なお、説明の際、ご家族からの質問が多かった内容として、骨髄移植の危険性、どこまで改善するのか、間葉系幹細胞移植を行う回数であった。

外部評価委員会により、以下のような意見を頂き、対応を検討した。

1) 臨床研究の目的および評価が不明瞭

本臨床研究の主目的として、低酸素性脳障害を合併せずに 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。

2) 症状が改善している客観的データがない

キメリズム解析の方法の再検討や骨や歯の石灰化の評価を行うこととした。また、筋肉量の増加および肺機能の改善がみられることから、筋生検および肺生検による評価を行うか検討することとした。

3) 細胞治療の改善する方法が必要

骨への直接的な間葉系幹細胞あるいは骨芽細胞の投与、骨髄移植をせずに間葉系幹細胞のみの投与、胎児への細胞治療

についての可能性について、動物実験を含めて、検討することとした。

4) 間葉系幹細胞の再投与の基準が不明確

間葉系幹細胞を最初の3回は、可及的速やかに行うこととした。その後は、2～4カ月で臨床的および骨の石灰化の評価（上述した副目的）が改善しない場合、間葉系幹細胞を再投与することとした。

5) 同胞がドナーになった時の対応

未成年である同胞がドナーとなった場合、未成年の人権保護に十分に留意して、ご両親に説明する。両親に説明して同意を得るだけでなく、可能な限り未成年者本人にも十分に説明する。この場合、年齢に応じて本人に理解できるように説明を試み、可能な限り本人の承諾を得ることに努力する。さらに、未成年者が骨髄提供者になる場合、島根大学医の倫理委員会で骨髄提供者としての妥当性を審査して、また、ソーシャルワーカーあるいはコーディネーターから家族および未成年である提供者に説明を行った後に、

未成年が提供者として適切かどうか決定する。

3. 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究

2例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った。15～25mLの骨髄を2～3週間かけて培養し、何れの場合も体重(kg)あたり 1×10^6 細胞以上、細胞生存率80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の安全性試験結果はすべて異常なかった。また培養した間葉系幹細胞は、骨分化能を有していることが確認できた。

ヘテロ接合体と野生型の交配を行い、ヘテロ接合体が得られた。また、試験的にヘテロ接合体同士の交配から、疾患モデルになりうるホモ接合体も死産ながら得られた。これら個体の骨形成についての形態学的解析では、ホモ接合体のみならず、ヘテロ接合体にも異常が疑われた。

移植用のマウス MSC については、培養直後から血球系細胞が混入し、残存血球系細胞も増殖した。

4. 骨形成能の研究

患者MSCを骨分化因子を添加して培養するも、石灰化は見られなかった。移植に用いられる同種MSCは骨分化因子を添加しないと石灰化はみられなかったが、添加することにより同種MSCは骨芽細胞へ分化して褐色の石灰化物の沈着を示した。骨分化因子を添加あるいは非添加でALP活性ならびにミネラルの沈着量の定量をおこなったところ、同種MSCでは骨分化因子の存在のもとに高いALP活性とミネラルの沈着をおこした。しかし、患者MSCのALP活性とミネラル量は非常に低値のままであった。骨レントゲンによる評価では、移植後に関節近くの骨端線に移植前にみられなかった石灰化がみられ、移植による骨形成の促進が示唆された。

5. キメリズム解析および網羅的遺伝子解析

キメリズム解析では、2症例ともに間葉系幹細胞は、レシピエント由来のままである。造血細胞は、症例1は、骨髄移植1か月後の造血細胞は、100%ドナータイプであったが、移植8か月頃から、10~20%台にまでドナー細胞が低下した。その後、現在までこの比率を維持している。症例2は、100%ドナータイプを維持している。

網羅的遺伝子発現に関して、間葉系幹細胞は正常健康人、保因者が同じような発現を示したのに対して、骨芽細胞は正常健康人と保因者が大きく異なる発現パターンを示した。患者では、間葉系幹細胞および骨芽細胞ともに、健康人および保因者と比較して違った発現パターンを示した。

D. 考察

1. 細胞治療

効果に関して、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

回数を増やすことで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。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、生化学検査はこれまでの症例で改善がみられず、臨床症状の改善も十分ではない。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。どちらの症例も GVHD を発症し、間葉系幹細胞移植により軽快したことから、間葉系幹細胞の GVHD への効果が明らかとなった。

2. インフォームドコンセントと外部評価委員会

インフォームドコンセントを行った。我々が説明を行うに当たって、特に、目的、効果、危険性について、複数回説明することにより、また、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、外部評価委員会を開催して、各専門分野の先生方から適切なお助言を頂いた結果、来年度の臨床研究が、今年度よりも科学的根拠に基づいた臨床研究を行うことができ、今後の細胞治療の向上に関わる基礎研究を遂行できると思われた。

3. 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究

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。現在行っているプロトコールで問題ないと思われる。また、培養した間葉系幹細胞が骨分化能を有していることから、患者の骨再生に寄与し得る可能性が示された。

疾患モデルマウスについて、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、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。

4. 骨形成能の研究

骨形成の検討方法の確認ならびにその有用性が実証でき、用いる同種MSCの骨形成能の評価ができた。

5. キメリズム解析および網羅的遺伝子解析

キメリズム解析に関して、造血細胞の由来に関わらず、間葉系幹細胞はレシピエント由来であった。しかし、臨床的には、骨化の改善が認められているあるいは石灰化障害の進行を食い止めることができていることから、間葉系幹細胞移植の効果があると思われる。

網羅的遺伝子発現に関して、臨床的正常な保因者が、骨芽細胞の遺伝子発現では正常人と大きく異なっていたことから、骨髄提供者の選定に一石を投じた結果と

なった。詳細な検討を行うことで、石灰化の機序を明らかにしていく必要である。

E. 結論

致死的で治療法のない重症低ホスファターゼ症に関して、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植がある程度の効果を認めることが示唆された。しかし、その有効性、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る。この効果を客観的に証明するために、キメリズム解析、遺伝子発現、骨形成能を継続して評価していく。この治療が実用段階で成功した場合、生命予後の改善に寄与し、患者およびその家族のQOL・ADLの向上にもつながる。さらに、治療法がない類似疾患や、酵素補充療法しか治療がない他の代謝疾患に対する治療へも応用できる可能性があるため、医療費や社会福祉費の負担軽減にもつながると思われる。

F. 健康危険情報

1. 細胞治療

1) 甲状腺機能低下症

甲状腺ホルモン内服で改善

2) 気管支炎、肺炎、蜂窩織炎

抗菌薬投与により軽快

3) 高血圧

免疫抑制剤の変更・調整および降圧剤の投与により改善

4) けいれん

高血圧の管理および免疫抑制剤の調整により消失

5) 急性 GVHD

免疫抑制剤の調整、および間葉系幹細胞の投与により軽快

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 竹谷健、鬼形和道、小林弘典、虫本雄一、山口清次. 日本における低ホスファターゼ症の臨床像. ホルモンと臨床、58:1091-1095, 2010

2. 学会発表

1) 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 29 回日本骨代謝学会.

2) 竹谷健、金井理恵、小山千草、安部真理子、斎藤敦郎、鬼形和道、福田誠司、山口清次、三原綾、勝部好裕、大西弘恵、小田泰昭、田所美香、服部耕治、弓場俊輔、大串始. 低ホスファターゼ症に対する骨髄移植を併用した間葉系幹細胞移植治療の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会.

3) 竹谷健. 新しい細胞治療の取り組み. 骨髄バンク設立 20 周年記念講演会 in しまね.

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 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、呼吸機能の改善は、2 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。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、生化学検査の改善がみられず、臨床症状の改善が十分ではないことから、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ため、間葉系幹細胞の移植回数について詳細に検討する必要があると思われた。なお、骨髄移植の有害事象に関しては、前処置の副作用および感染症は想定内でコントロール可能であったが、重度の GVHD を認めた症例も存在した。しかし、この治療として間葉系幹細胞が効果を示すことから、骨髄移植後に、間葉系幹細胞移植を早期に繰り返し投与することが必要であると思われた。

研究協力者

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）

金井理恵（島根大学医学部小児科・講師）

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）

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。

B. 研究方法（詳細は資料 1 研究計画書）

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 ALP 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

ALP 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）は経静脈的に投与する。

7. 移植後の評価

・臨床症状：呼吸状態、身体計測など

・検査：ALP、カルシウム、リンなど

・画像：全身骨レントゲン、胸部レントゲン、骨塩定量など

・有害事象

8. 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