

産業技術総合研究所の倫理委員会の承認を得た後、「ヒト幹細胞に用いる臨床研究に関する指針」において平成 22 年 6 月 21 日に厚生労働大臣の認可（資料 2）を得て行っている。

## C. 研究結果

### 症例 1

移植までの経過：胎児期より四肢短縮を指摘されていた。在胎週数 40 週 1 日、出生体重 正常経膈分娩で出生。多呼吸を認め、ALP の低値（7 IU/L）、ALP の基質である尿中 Phosphoethanoamine (PEA) の高値（5727.4 nmol/mgCr）、骨の石灰化不全、骨端部のくる病様変化、狭胸郭から、周産期型低ホスファターゼ症と診断した。生後 3 か月から、生後 3 ヶ月をすぎた頃から、急速に換気不全進行し、人工呼吸開始し、4 か月時に気管切開を行った。遺伝子検査では、*TNSALP* 遺伝子の 1559delT の homozygous mutation を認め、骨髄間葉系幹細胞の骨形成能の低下を認めたため、重症低ホスファターゼ症と診断した。

骨髄移植：1 歳 2 か月の時に、父（HLA2 座 (B, DR) ミスマッチ）から骨髄移植を行った（血液型同型、移植細胞数  $3.56 \times 10^8/\text{kg}$ ）。前処置は BU+CY+ATG で行い、浮腫を認めたが対症療法で軽快した。GVHD 予防として short term MTX および FK506 を使用した。骨髄は移植 17 日目に生着して、造血細胞は 100% ドナータイプであることを確認した。移植合併症として、急性 GVHD (skin; grade 1, Liver; grade 0, Gut; grade 0)、粘膜障害（気切口）、肝機能障害を認めたが、対症療法で軽快した。なお、移植後 8 か月で骨髄はキメラ状態となり、ドナー細胞が 10% 前後まで低下して、そのままの状態を維持している。

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（レントゲン、CT）では、長幹骨の骨端部から徐々に回復して、骨の石灰化の改善を認めているが、3 歳過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 の高値が持続しており、骨形成マーカーである骨型 ALP (BAP)、オステオカルシン (OC)、低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC)、インタクト 1 型プロコラーゲン N プロペプチド (intact P1NP)、骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリン (DPD)、I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx)、1 型コラーゲン-C-テロペプチド (1CTP)、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) を測定したところ、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ため、今後の慎重な経過観察が必要である。

### 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

移植までの経過：妊娠中羊水過多がみられたが、骨の異常は指摘されていなかった。在胎 41 週 2 日、出生体重 3,790g、正常経膈分娩で出生。出生後、徐々に呼吸状態が悪化して、気管内挿管後、人工呼吸を開始した。ALP が低値(9 IU/L)で、レントゲンで、胸郭低形成、骨幹端の不整を認めたため、周産期型低ホスファターゼ症と診断した。生後 5 日に痙攣がありピリドキシリン内服開始、以後痙攣は起きていない。生後 1 か月時に気管切開術を施行した。遺伝子型で、*TNSALP* 遺伝子の 1559delT の homozygous mutation を認め、骨髄間葉系幹細胞の骨形成能の低下を認めたため、重症低ホスファターゼ症と診断した。

骨髄移植：生後 7 か月の時に、母 (HLA1 座 (B) ミスマッチ) から骨髄移植を行った (血液型 major mismatch (ドナー B 型、レシピエント A 型)、移植細胞数 (CD34 細胞)  $8.83 \times 10^6/\text{kg}$ )。前処置は BU+CY+ATG を行ったが、ATG に伴う著明な浮腫を認めたため、ATG を減量した。GVHD 予防として short term MTX および FK506 を使用したが、FK506 による高血圧およびけいれんを発症したため、FK506 を中止して、シクロスポリン (CyA) に変更した。骨髄は移植 19 日目に生着して、造血細胞は 100% ドナータイプであることを確認し、現在までその状態を維持している。移植合併症として、急性 GVHD (skin grade2, Liver 0, Gut 4) を発症した。皮膚症状はステロイドで軽快した。しかし、消化器症状 (下痢、血便) はステロイドやその他の免疫抑制剤で改善しなかったが、2 回目の間葉系幹細胞を移植 (生後 8 か月) した後から、

劇的に改善して軽快した。また、移植 55 日目から、原因不明の腹水が貯留したが、腹水穿刺で軽快した。さらに、移植 3 か月ごろから、黄疸および肝機能障害が出現したが、FK506 の投与により治癒した (慢性 GVHD 疑い)。

間葉系幹細胞移植：これまで 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 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。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 (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。骨形成マーカーであるBAP、OC、ucOCおよびintactP1NP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。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。

### 3) 重篤な有害事象

骨髄移植の有害事象として、急性GVHD (skin; grade 2, Liver; grade 0, Gut; grade 4)および慢性GVHDを発症したが、間葉系幹細胞と免疫抑制剤により軽快した。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

## D. 考察

これまで2症例について、細胞治療を行った。主目的である3年生存率は、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、移植回数を増やすことで呼吸状態が安定すること、胸郭が樽状に改善していることから、間葉系幹細胞移植が呼吸障害の改善に寄与していることが示唆された。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ため、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。生化学検査に関して、症例2では改善しているが症例1では低値のままである。この理由として、ドナー由来骨髄の生着率に関して、症例1が10%であることに対して、症例2は100%現時点であることから、ドナー由来間葉系幹細胞の生着率も症例2の方が高い可能性があり、このことが生化学検査に反映していると推測される。なお、症例2に関して、骨形成マーカーが1歳8か月から約1年間低下して、その後再上昇していることがみられた。FK506は短期には骨分化を促進するが、長期間しよう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ことから、GVHDに対する免疫抑制剤であるFK506を長期間使用した影響が考えられる。

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。

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

浮腫が2例ともに認めている。また、どちらの症例もGVHDを発症し、特に症例2では免疫抑制剤が十分に使用できなかったことにより重症の消化管GVHDを発症したが、間葉系幹細胞移植により劇的に軽快した。間葉系幹細胞のGVHDへの効果は成人ではその有効性が示されているが、小児でも効果があることが示された。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現時点では認めていないため、乳児にも安全に行えることが明らかとなった。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（カルバマゼピン）でコントロール良好である。骨髄移植や間葉系幹細胞移植との関連は、これまでの報告と経過から関係ないと思われ、原病の合併症であるてんかんを発症していることが考えられる。しかし、原病によるてんかんであればビタミン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が一定の効果を認めることが示唆された。しかし、これまでの臨床研究で問題点も明らかとなった。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。

## F. 健康危険情報

てんかん

## 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(3):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 Dis Child.* 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症患者 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

# 症例1 : 01 Male

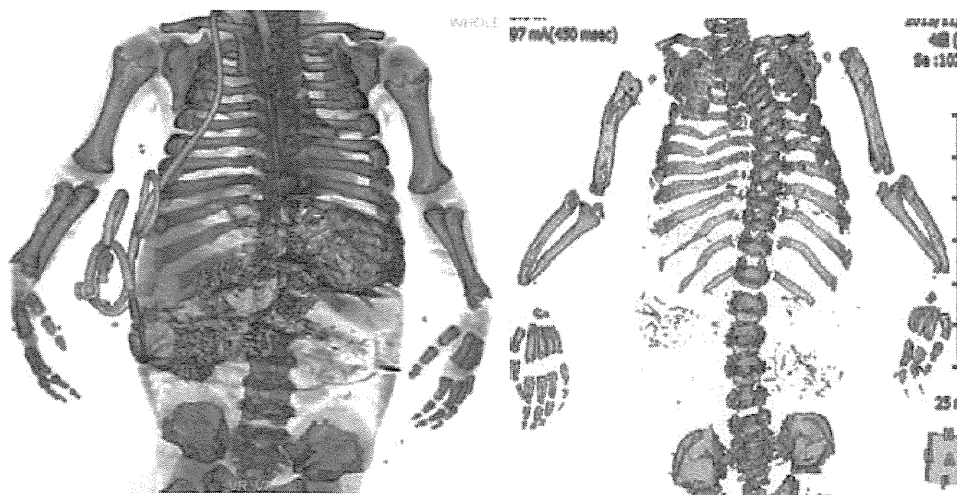
<b>骨髄移植</b>	
年齢	1歳2か月
ドナー	父（保因者）
血液型	A→A
HLA	HLA 2 locus (B, DR) mismatch
移植細胞数	$3.56 \times 10^8 / \text{Kg}$
<b>間葉系幹細胞移植</b>	
移植回数	5回
移植時期	1歳2か月～3歳6か月
移植細胞数	平均 $1.4 \times 10^6 / \text{kg}$

1

## 骨CT

1歳2か月（移植前）

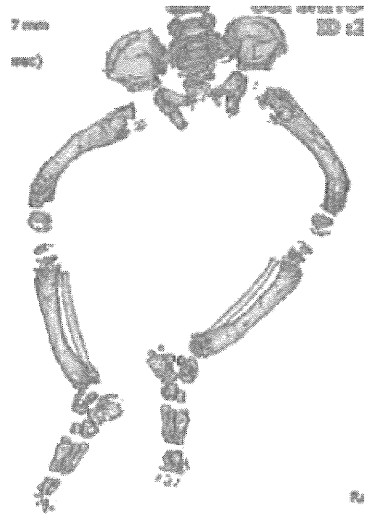
4歳6か月（移植後）



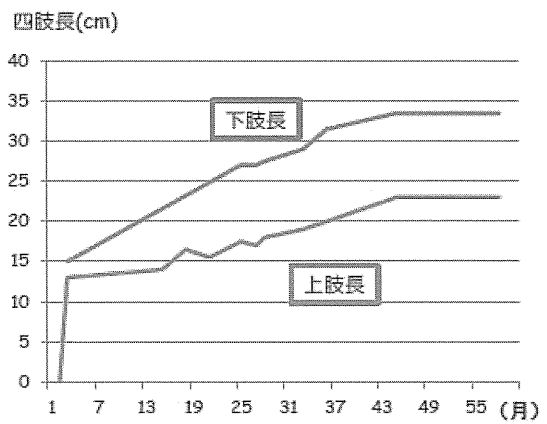
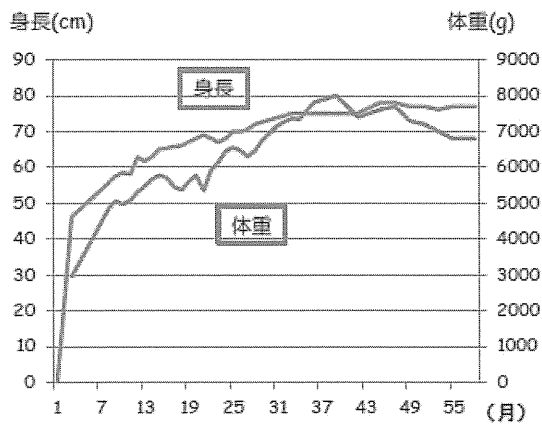
# 骨CT

1歳2か月（移植前）

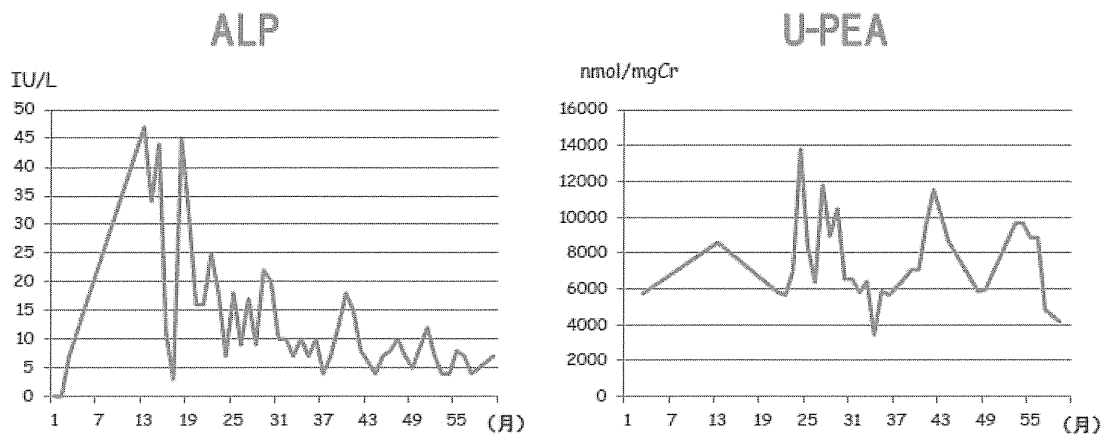
4歳6か月（移植後）



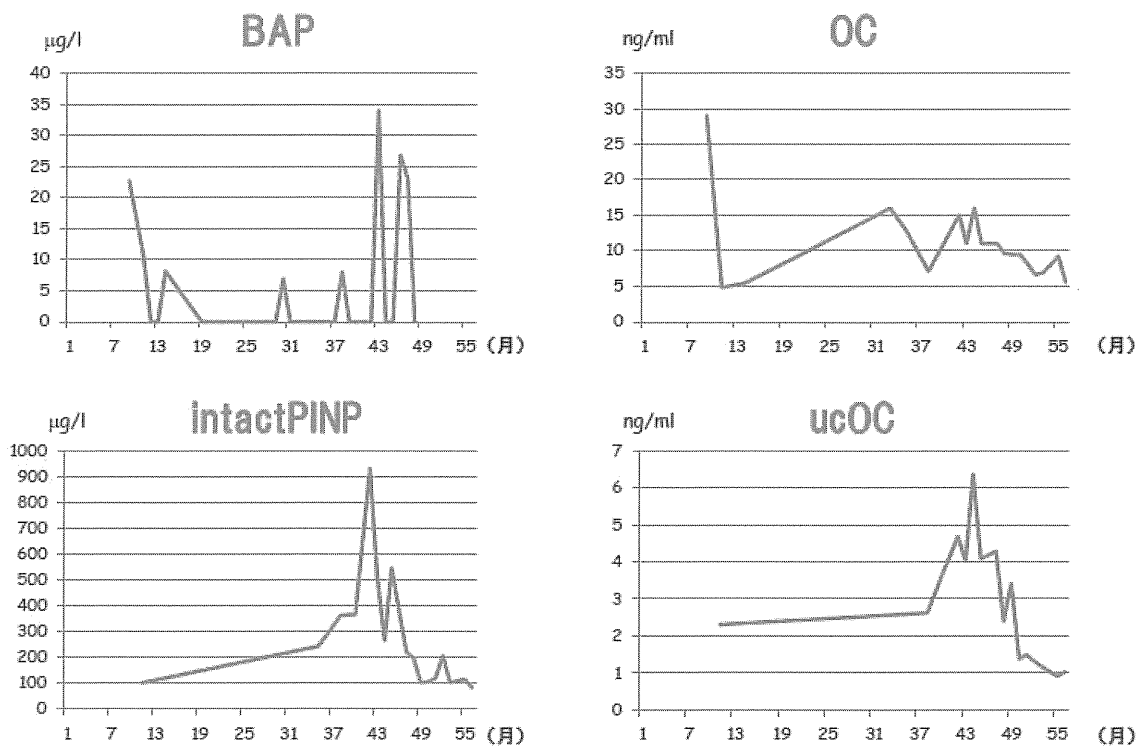
## 身長・体重・上肢長・下肢長



# ALP・U-PEA

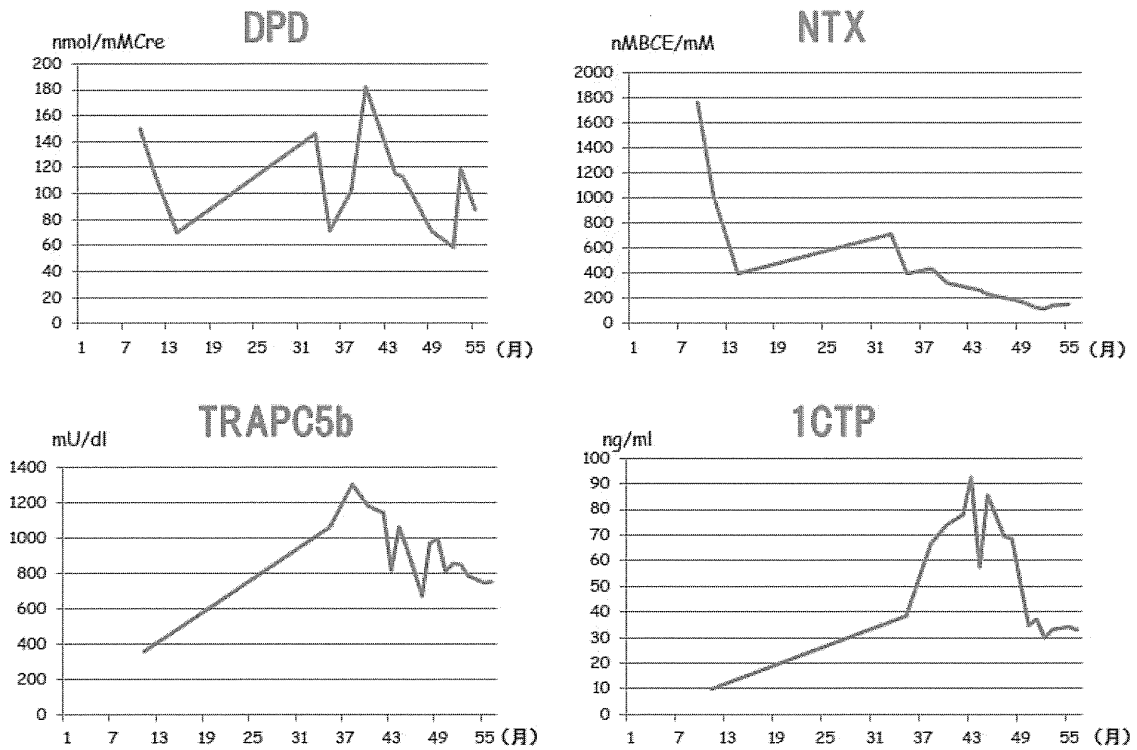


# 骨形成マーカー

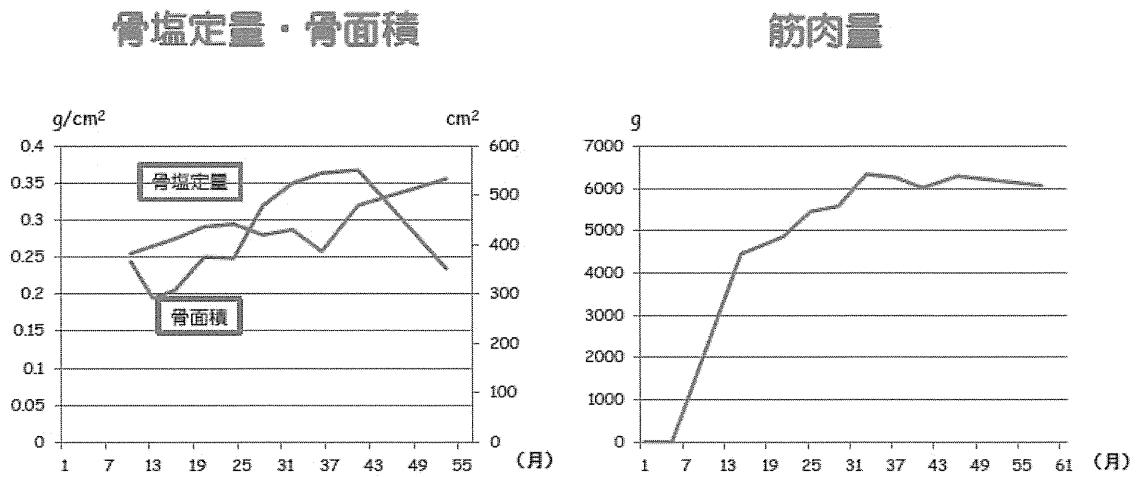




## 骨吸収マーカー



## 骨塩定量・筋肉量

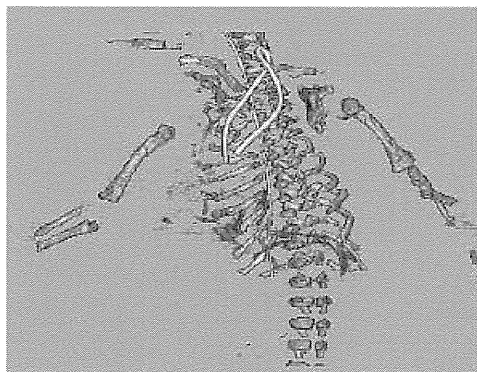


## 症例2 : 05 Male

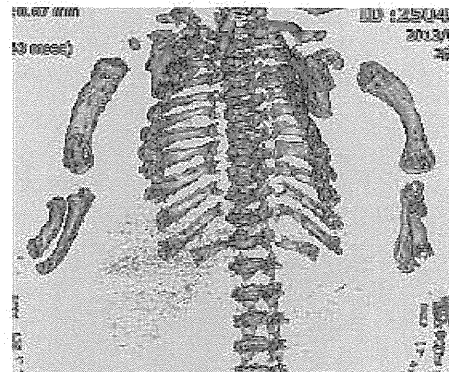
<b>骨髄移植</b>	
年齢	7か月
ドナー	母 (保因者)
血液型	A→B
HLA	HLA 1 locus (B) mismatch
移植細胞数	CD34 $8.83 \times 10^6 / \text{Kg}$
<b>間葉系幹細胞移植</b>	
移植回数	9回
移植時期	7か月～2歳9か月
移植細胞数 ( $10^6 / \text{kg}$ )	平均 $1.8 \times 10^6 / \text{kg}$

### 骨CT

6か月 (移植前)

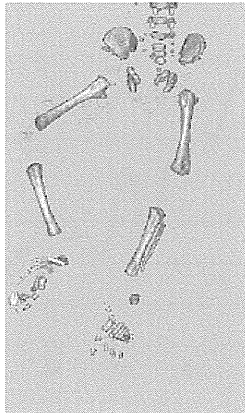


2歳 (移植後)

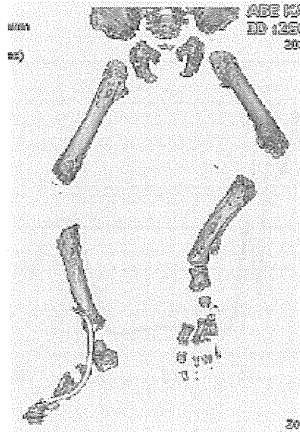


# 骨CT

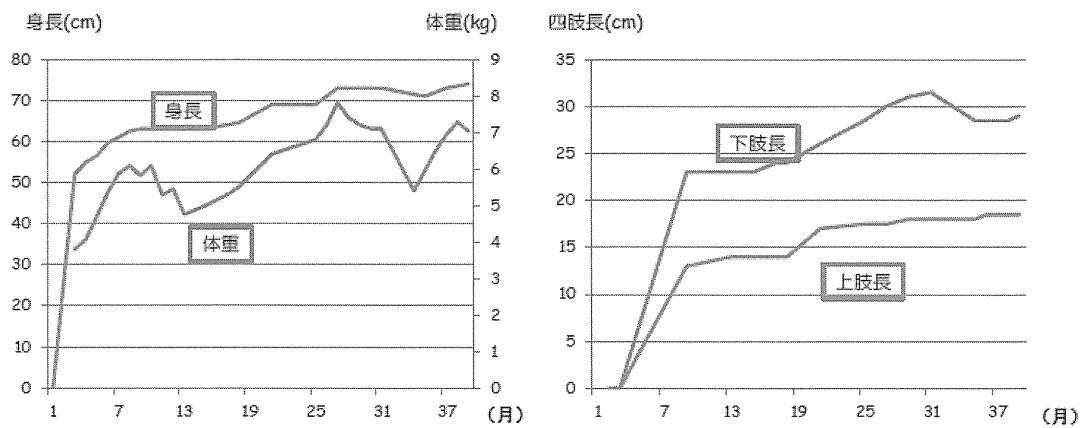
6か月（移植前）



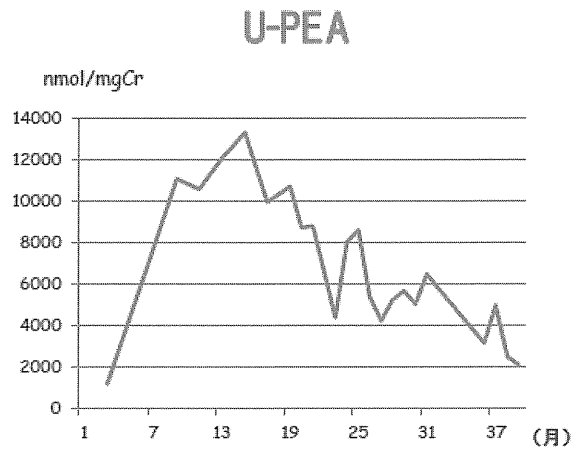
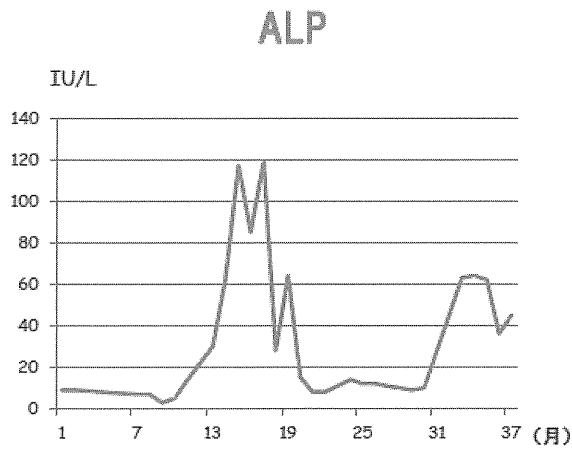
2歳（移植後）



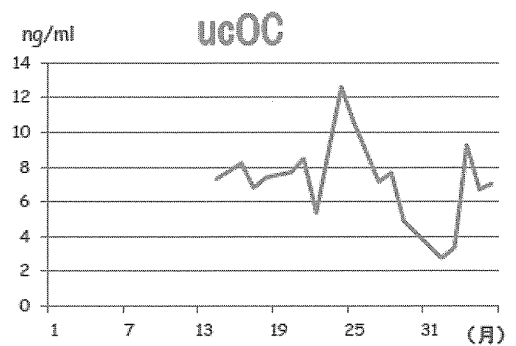
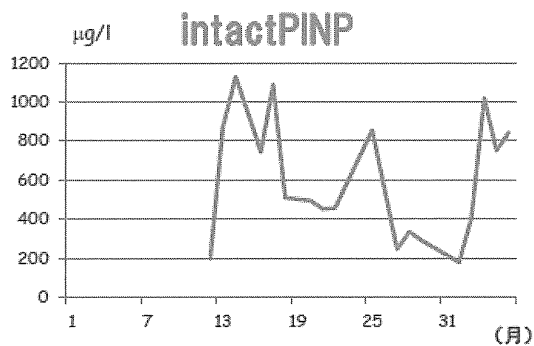
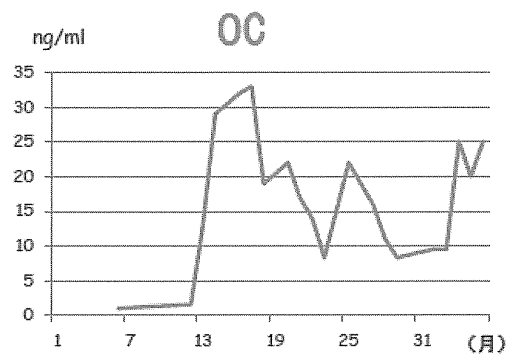
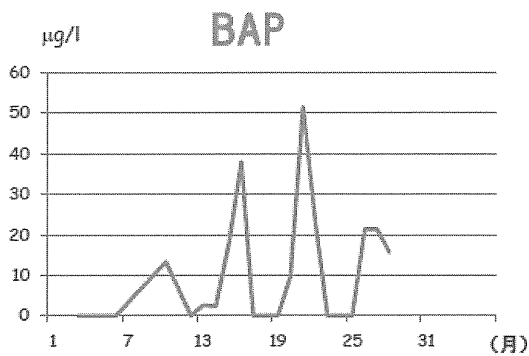
## 身長・体重・上肢長・下肢長



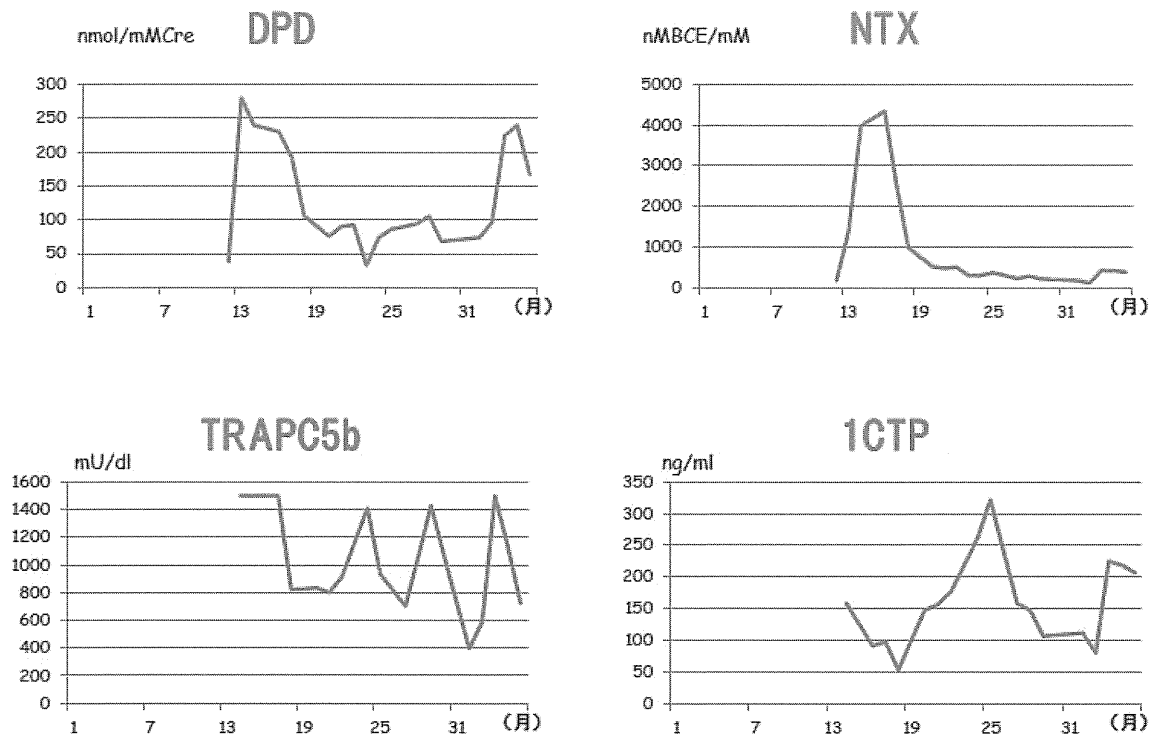
# ALP・U-PEA



# 骨形成マーカー

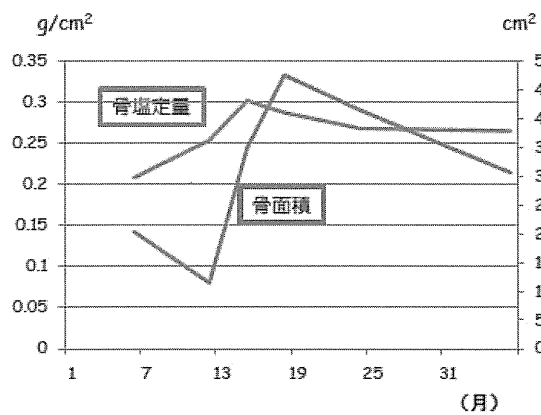


# 骨吸収マーカー

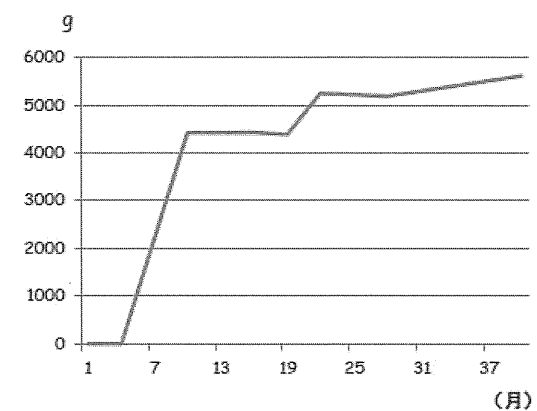


# 骨塩定量・筋肉量

骨塩定量・骨面積



筋肉量



## 2症例のまとめ

		症例 1	症例 2
移植回数	BM	1	1
	MSC	5	9
ドナーの生着	骨髄	10%	100%
	MSC	+(3歳5か月)	+(1歳9か月)
<b>Primary endpoint</b>			
3年生存率		clear	
<b>Secondary endpoints</b>			
臨床症状	呼吸機能	改善	
	発育発達	歩行訓練	頸定、寝返り
	難聴	回復	
骨の石灰化の評価	画像検査	改善	
	骨型ALP	変化なし	上昇
	病理所見	石灰化の回復	
重篤な合併症	BMT	甲状腺機能低下症	
	MSCT	なし	

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

- 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 -

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科・教授）

### 研究要旨

当該臨床研究を正確に理解して頂いた上で同意してもらうために、複数回説明し、かつ、同じ病気の疾患を持つご家族との話し合いの場を設けることにより、ご家族が臨床研究への参加を適切に判断できていると思われた。しかし、移植医療への説明不足と遠方での治療が臨床研究への参加を躊躇する原因となっていた。また、臨床研究に対する外部評価委員会の評価から、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、間葉系幹細胞の細胞特性を向上させた（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および最適な間葉系幹細胞移植方法（骨髄移植、髄腔内投与、臍帯血移植および臍帯由来間葉系幹細胞移植など）の樹立を行う必要がある。さらに、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表を用いて経時的に成長発達を評価した結果、運動精神発達は細胞治療により年齢相当ではないが徐々に伸びていることが明らかとなった。

### 研究協力者

大藪恵一（大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学小児科学・教授）

加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授）

杉本利嗣（島根大学医学部内科第一・教授）

鈴宮淳司（島根大学医学部附属病院腫瘍センター・教授）

服部耕治（甲南女子大学看護リハビリテーション学部理学療法学科・教授）

室月淳（宮城県立こども病院産科・部長）

矢田昭子（島根大学医学部看護学科臨床看護学講座小児看護学・准教授）

竹谷健（島根大学医学部附属病院輸血部・講師）

蓼沼拓（島根大学医学部附属病院リハビリテーション部）

鳥屋尾ゆう子（島根大学医学部附属病院リハビリテーション部）

### A. 研究目的

致死的で治療のない先天性疾患は、そ

それぞれの疾患単位では頻度は少ないが、その病気を持った患者およびその家族だけでなく、医療従事者の医療的、経済的および心理的な負担は計り知れない。重症低ホスファターゼ症も、現時点では確立した治療法がなく、致死的な経過をとる疾患である。この病気に対して、我々は当該臨床研究を行っている。この臨床研究も確立した治療ではないが、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、下記の方法でインフォームドコンセントを行った。

当該臨床研究は、確立した治療ではないため、小児医療、整形外科医療、移植医療、骨代謝、再生医療、周産期医療、致死性疾患に対する臨床研究および倫理的配慮などの多岐にわたる分野において、それぞれの専門性が求められる。当該臨床研究を進めるにあたり、それぞれの担当者を配置して体制を整えている。しかし、各専門に対する知識および対応に関しては、我々の体制だけでは十分とは言えない。したがって、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過去 2 年間に開催した外部評価委員会からの指摘事項をもとに、当該臨床研究の発展させる方策を検討した。

さらに、当該臨床研究を行うことによって救命し骨の石灰化を改善することはできたが、その後の成長発達が健康な子どもたちと同じように進んでいくことが根治療法である。したがって、当該臨床研究を行った患者さんの成長発達の評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 臨床研究のインフォームドコンセント

まず、本疾患であることが判明し、当該臨床研究について参加の意思がある、あるいは内容を聞きたい旨の連絡があった場合、ホームページ

(<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pediatrics/2-2/2-2.html>) からダウンロードして頂いた当該臨床研究の計画書ならびに患者説明書を、ご両親および担当の医療従事者に内容を確認頂く。内容を確認後、詳細な当該臨床研究の説明を希望された場合、患者さんの入院しておられる医療機関に出向いて、ご家族および医療従事者に直接説明をさせて頂く。その際、患者さんへの治療の説明だけでなく、この時点では不明であるが骨髄提供者に対する説明も行う。この説明の後、ご家族から参加の意思がある場合、患者さんが治療開始基準を満たしており、入院中の医療機関から島根大学医学部附属病院まで移動することが可能なことを確認した後、ご家族に島根大学医学部附属病院までお越し頂き、当該臨床研究について説明させて頂く。さらに、この治療を受けている、あるいは受けた患者さんおよびご家族の同意が得られた場合、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る。これらの段階を踏んだ上で、当該臨床研究への参加の同意を確認した。また、実際に骨髄移植を行う前に、再度説明して同意を確認した。なお、同意が得られ治療を開始した後、間葉系幹細胞を移植するごとに説明を行い、同意を得ることとした。

### 2. 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、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 年間外部評価委員会を開催し、これまでの臨床研究の遂行状



況を説明して、ご助言、ご指摘を頂いた。外部評価委員（専門分野）として、大菌恵一先生（小児医療、低ホスファターゼ症および骨代謝）、加藤俊一先生（小児医療および移植医療）、杉本利嗣先生（骨代謝）、鈴宮淳司先生（移植医療および臨床研究）、服部耕治先生（再生医療および整形外科医療）、室月淳先生（周産期医療）、矢田昭子先生（小児致死性疾患に対する倫理）、計7名の先生方に就任して頂いた。今年度は過去2年間のその分野の専門的な先生方から頂いたご指導・ご助言を、当該臨床研究の発展に活かすための方策を検討した。

### 3. 成長発達評価

これまで臨床研究に参加して頂いた2名の患者さん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。

#### （倫理面への配慮）

当該臨床研究は、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の承認を得た後行っている。

## C. 研究結果

### 1. 臨床研究の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

過去2年間に外部評価委員会で指摘された点および現在の臨床研究の成果から、今後、根治療法を目指す上での課題とそれに対する方策を検討した。

#### ①最適な間葉系幹細胞移植方法の検討

骨髄の中にも間葉系幹細胞が存在するため、骨髄移植だけでも治療効果が得られる可能性が指摘された。また、ドナーの負担が大きい。さらに、現在のドナーはすべて保因者であるため、ALP活性が低い。保因者は正常の骨構造を有しているが、*in vitro*では骨の石灰化能は正常健康人よりも低い。以上のことが、根治療法となり得ない問題点として挙げられる。

→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。しかし、数%はドナー由来間葉系幹細胞が骨髄内に生着することも明らかになっている。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（Kotobuki, et al. 2008）。したがって、同種ラット骨髄を経静脈的に全身移植した後、異系ラット間葉系幹細胞を移植して、骨髄移植による効果を検討することとした。

また、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こととした。

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

間葉系幹細胞の骨への遊走が悪いこと、正常の骨構造に到達していないことから、また、現在の臨床研究では、間葉系幹細胞を移植するごとにドナーから骨髄を採取することになっているため、間葉系幹細胞移植の生着率を向上する必要性を指摘された。

→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。また、現在は、間葉系幹細胞移植のたびにドナーから骨髄採取を行っているため、ドナーの負担も大きい。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ことが必須である。

生体内の間葉系幹細胞は損傷した組織や、炎症部位、がん局所に遊走し、組織修復、抗炎症作用、がん免疫などに関わっていることが証明されている。また、培養することで新鮮な間葉系幹細胞の細胞特性が失われることが報告されている。したがって、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法の確立を目指すこととした。

また、我々は正常な ALP 遺伝子を導入した患者の間葉系幹細胞をラットに移植して、

骨が再生することを明らかにしている (Katsube Y, et al. Gene Ther, 2010)。また、この疾患の iPS 細胞の樹立にも成功している。さらに、疾患モデルマウスにおいて、遺伝子改変した造血幹細胞移植の効果が示されている。したがって、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こととした。

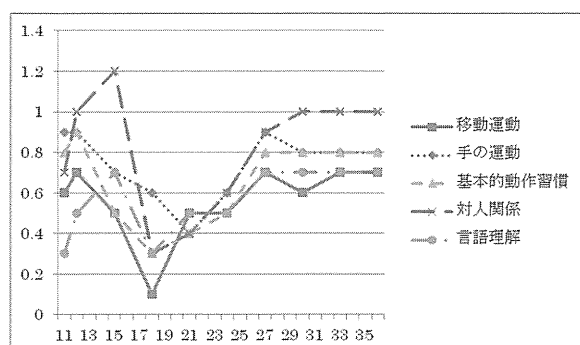
#### ③ALP の機能解析

同じ遺伝子変異を有する重症の患者でも骨の石灰化の程度が異なるため、また、骨の石灰化以外の他の症状（特に、肺と中枢神経系）を認めることが明らかとなったため、ALP の機能解析を行うよう指摘を受けた。→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、健康人のそれらと遺伝子発現を比較したところ、骨分化や骨の石灰化に関与する遺伝子発現の差異がみられた。それらを参考にして、drug library screening を行って、骨の石灰化が改善する small molecule を同定することとした。また、患者由来の iPS 細胞を樹立することに成功したため、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こととした。

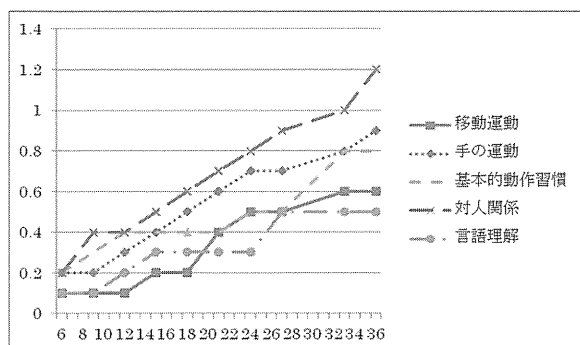
### 3. 成長発達評価

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。

#### 症例 1



症例 2



症例 1 は、原病による気管れん縮による低酸素性脳症が起こった 1 歳 6 か月にすべての評価項目で低下しているが、その後徐々に回復している。症例 2 は、移植前から年齢を重ねるごとに徐々に発達指数は伸びているが、年齢相当までは到達していない。

## D. 考察

### 1. 臨床研究のインフォームドコンセント

これまで 12 例に説明して、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る。しかし、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についての質問について、今後の臨床研究のデータも加味して、説明していく予定である。さらに、新規の症例への説明について、島根でしか治療を受けることができない

こと、家族の、骨髄移植および間葉系幹細胞移植が負担の強い治療であるイメージが強いこと、治療期間が明らかでないことが、治療を受けることへの障害になっていると思われる。

### 2. 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、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。

### 3. 成長発達評価

2 症例ともに、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。しかし、重症低ホスファターゼ症の自然歴から考慮すると、運動精神発達が見られることは細胞治療効果であると思われる。

## E. 結論

致死的で治療法のない先天性疾患の治療研究を行う際のインフォームドコンセントの対応について、今後も症例数を重ねてことで家族により則した、適切な判断ができる説

明を行うことができることが示唆された。

臨床研究が始まった後に外部評価委員会を行うことで、現行の治療の問題点とそれに対する方策が明らかとなったため、根治療法の確立に非常に有用であった。

細胞治療の効果が運動精神発達面でも認められたが、正常なこどもの発達には到達できなかった。今後、この面からも、患者および家族が心から満足して幸せを感じることができる治療の確立が重要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表：

1) 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.* 2013 Jun;55(3):e52-5.

2) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child.* 2013 Nov 25. doi: 10.1136/archdischild-2013-305037.

##### 2. 学会発表：

1) 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

2) 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

#### 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