

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

大園恵一(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ことに説明を行い、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、大藺恵一先生（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。

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、骨髓内の直接投与(髄腔内投与)する方法での検討も必要である。

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ことにドナーから骨髓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髓から培養・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髓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方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。

ALP の機能解析

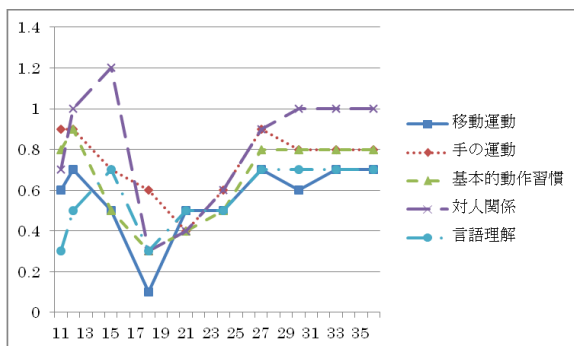
同じ遺伝子変異を有する重症の患者でも骨の石灰化の程度が異なるため、また、骨の石灰化以外の他の症状(特に、肺と中枢神経系) を認めることが明らかとなったため、ALP の機能解析を行うよう指摘を受けた。

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關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。

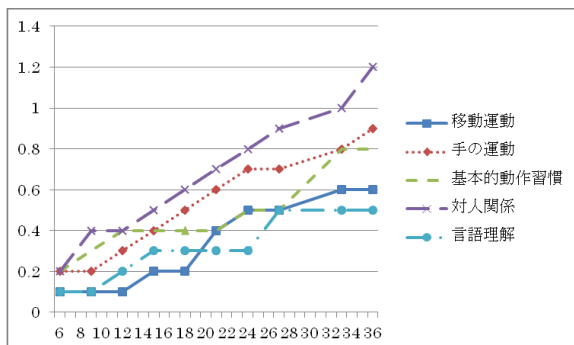
3. 成長発達評価

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、移植前を状態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