

201306003B

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23～25年度

総合研究報告書

研究代表者 竹谷 健

平成 26 (2014) 年 3 月

I. 総合研究報告

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
研究代表者：竹谷健

II. 分担研究報告

1. 細胞治療 ----- 25
研究分担者：竹谷健
(資料) 症例経過

2. インフォームドコンセント、外部評価委員会・当該臨床研究の発展に対する方策、アンケート調査、成長発達評価 ----- 43
研究分担者：山口清次

3. 疾患モデルマウスの治療研究および間葉系幹細胞培養増殖 ----- 50
研究分担者：弓場俊輔
(資料) 細胞培養工程

4. 骨形成能の研究 ----- 79
研究分担者：大串始

5. キメリズム解析、病態解析、間葉系幹細胞の細胞特性、疾患特異的iPS細胞の樹立 ----- 86
研究分担者：福田誠司

III. 研究発表 ----- 95

1. 論文
2. 学会発表

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷 ----- 103

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

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

先天性骨系統疾患は確立した治療法がなく、致命的な経過をとるか、著しく日常生活が障害されることが多い。また、国内外で先天性骨系統疾患に対する正常な機械特性を有する骨を再生する包括的な根治療法は確立されておらず、正常骨を再生する細胞移植治療の確立は急務である。この疾患の病因として、骨芽細胞の起源である間葉系幹細胞からの骨化に至るまでの経路が障害されているため、骨化能が正常の同種間葉系幹細胞による骨再生医療は有望な細胞治療と考えられる。先天性骨系統疾患の1つである、低ホスファターゼ症は、骨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、我々は間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化して骨の石灰化が回復し救命することを目的として、致命的低ホスファターゼ症に対して、同種骨髄移植を行った後、同じドナーからの間葉系幹細胞を移植する臨床研究を行った。

1. 細胞治療

2例の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（5回、9回）した。骨の石灰化が回復して、呼吸状態は安定して、主目的である、3年生存を達成できた。しかし、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。骨髄移植の有害事象は、移植片対宿主病（GVHD）や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。症例2の治療抵抗性GVHDに対して間葉系幹細胞が有効であった。一方、間葉系幹細胞移植の有害事象は生じていない。よって、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植は、乳幼児でも安全に行うことができる、骨の石灰化を回復させることにより生命予後を改善できる治療法である。

2. 成長発達評価

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。

3. インフォームドコンセント

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。

4. 間葉系幹細胞の培養増殖

骨髄移植と同じドナー由来の骨髄を、セルプロセッシングセンターで培養増殖させ、品質を保証した間葉系幹細胞を作成することができた。また、骨髄および培養増殖させた間葉系幹細胞を空輸搬送して、細胞調整施設および医療機関に適切に輸送することができた。

5. 骨形成能の研究

この研究期間内に同種間葉系幹細胞移植を行った症例の経時的な長期間の画像解析（レントゲン像・CT像）を行ったところ、骨の石灰化は回復したが、長幹骨の脆弱性と変形が認められた。また、複数回に用いた間葉系幹細胞の *in vitro* での骨形成能を ALP 活性やカルセインの取り込みにより生化学的に検証したところ、培養増殖した間葉系幹細胞は全て骨分化能を有することが確認できた。

6. 基礎的研究

1) 疾患モデルマウスを用いた動物実験

疾患モデルマウス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。血清 ALP 値についても、ホモ接合体の検体は得られなかったが、ヘテロ接合体の ALP 値が野生型に比べ、有意に低かった。

2) キメリズム解析

ドナー由来造血細胞の生着を確認したとともに、ドナー由来間葉系幹細胞が頻度は少ないが生着していることを証明できた。

3) 病態の解明

間葉系幹細胞および骨芽細胞の遺伝子発現において、正常と患者で異なる遺伝子発現パターンを示す遺伝子群は、骨代謝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、中枢神経系や肺の形成に関わる遺伝子も変動していた。また、*TNSALP* 遺伝子変異解析では、疾患の重症度と ALP 活性が比例することが明らかとなった。さらに、患者の皮膚線維芽細胞に 5 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28) を導入して iPS 細胞を樹立することに成功した。

4) 間葉系幹細胞の細胞特性

間葉系幹細胞移植の効果を高めるために、骨髄および臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。臍帯由来間葉系幹細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞と比べて、ALP 発現、骨分化および遊走能には大きな差はなかったが、細胞接着に関する CD44 の発現は高かった。

7. 外部評価委員会、当該臨床研究の発展に対する方策

臨床研究に対する外部評価委員会を置くことで、現在のプロトコールを改善し適切にかつ科学的根拠に基づいた臨床研究を行うことができ、また、現在の問題点に対する方策を明らかにすることができた。現治療では根治療法になり得ない可能性が高いため、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。

8. アンケート調査

臨床研究に参加して頂いた家族にアンケート調査を行うことで、患者の目線からこの臨床研究を評価されることによって、真の意味で目指すべき当該臨床研究の目標が明らかとなった。

まとめ

本研究によって、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植が安全に行うことができ、骨形成に寄与し、生命予後だけでなく患者およびその家族の QOL・ADL の改善につながることを明らかとなった。しかし、正常の骨構造には到達していないため、今後、根治療法に向けた更なる translational research が必要である。

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、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。そこで、我々は間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化して骨の石灰化が回復し救命することを

的として、致死的低ホスファターゼ症に対して、同種骨髄移植を行った後、同じドナーからの間葉系幹細胞を移植する臨床研究を行うこととした。

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った。

2. 成長発達評価

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、患者および家族の最も期待することである。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。

3. インフォームドコンセント

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。

4. 間葉系幹細胞培養増殖

本臨床研究に不可欠な同種 MSC をセルプロセッシングセンターで培養し、品質を保証した細胞を調整した。

5. 骨形成能の研究

間葉系幹細胞移植前にみられる骨格の脆弱性の改善とドナー間葉系幹細胞が生着して骨へ分化しているか明らかにするために、移植前と移植後における患者の画像解析を行うとともに、ドナー間葉系幹細胞の骨分化能を検証した。

6. 基礎的研究

1) 疾患モデルマウスを用いた動物実験

本計画では骨形成障害を改善するために、同種 MSC を患者に移植して骨形成能を付与することにある。そこで、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した。

2) キメリズム解析

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、ドナー由来間葉系幹細胞のキメリズム解析を行った。

3) 病態の解明

これまでの研究・報告では、この疾患で石灰化障害を来す原因が明らかでは

ないこと、骨髄移植では石灰化は改善しないこと、間葉系幹細胞移植により骨の石灰化は改善するが、臨床効果が不十分であることがわかった。また、この疾患は骨以外に中枢神経系や肺などにも合併症を引き起こす。したがって、この疾患の病態を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析および疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。

4) 間葉系幹細胞の細胞特性

培養した間葉系幹細胞は静脈内投与した場合、骨への遊走能が悪く、ほとんど肺でトラップされる。また、現在の患者のドナーは *TNSALP* 遺伝子異常を有する保因者であるため、*TNSALP* 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。したがって、上記条件を満たすドナーを得やすい、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ため、臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性を骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討した。

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、外部評価委員会を開催した。さらに、外部評価委員会からの指摘を受けて、当該臨床研究の発展させる方策を検討した。

8. アンケート調査

臨床研究を行っていく過程で、治療を受けた患者さんおよびご家族が抱く、病気の理解、治療への期待度と問題点を共有することにより、さらなる臨床研究の発展が望まれる。したがって、本治療を受けたあるいは受けている患者さんのご家族の病気の理解度、この臨床研究に望むこと、問題点などを明らかにするためにアンケート調査を行った。

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、ALPが正常なドナーから骨髄を提供していただき、まず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、主要評価項目は3年生存率、副次的評価項目は、臨床症状（呼吸状態、身体計測など）、骨の石灰化（生化学検査{ALP、骨型ALP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}、組織学的検査）および有害事象とした。

2. 成長発達評価

患者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。

3. インフォームドコンセント

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、同意を確認することとした。

4. 間葉系幹細胞培養

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。

5. 骨形成能の研究

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および CT により検討をおこなった。また、ドナー同種間葉系幹細胞の骨分化の評価を、島根大学から搬送された骨髄から培養増殖された間葉系幹細胞を用いて ALP 活性およびカルセインの取り込みにより行った。

6. 基礎的研究

1) 疾患モデルマウスを用いた動物実験

低ホスファターゼ症の原因遺伝子である *TNSALP* 遺伝子変異を導入したマウス (*TNALP* KO マウス) について、凍結受精卵から個体復元を行い、当該遺伝子についてヘテロ接合体の個体 (9 週齢) を入手した。この個体と野生型 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、血清 ALP の測定、軟 X 線写真撮影、 μ CT、下肢全体の DXA (骨密度) 測定を行った。

2) キメリズム解析

移植前後に患者から造血細胞および骨髄からフローサイトメトリー (FCM) で単離した間葉系幹細胞の由来 (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、ALP 遺伝子変異の有無を調べた。

3) 病態の解明

Microarray 法を用いて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の網羅的遺伝子発現を解析した。また、*TNSALP* 遺伝子変異体を作成して、ALP 活性、ドミナントネガティブ効果、骨の石灰化能を検討した。さらに、患者線維芽細胞に 5 つの遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog*, *Lin28*) を導入して iPS 細胞の樹立を試みた。

4) 間葉系幹細胞の細胞特性

間葉系幹細胞の遊走能を高めるために、培養した細胞を剥離する剥離液の検討を行った。また、臍帯由来間葉系幹細胞の ALP 活性、骨石灰化能および遊走能を検討した。

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、また、重篤な有害事象や予期せぬトラブルが生じた場合、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、外部評価委員会を開催した。また、そこでの指摘から当該臨床研究の発展のための方策を検討した。

8. アンケート調査

本治療を受けたあるいは受けている患者さんのご家族の病気の理解度、この臨床研究に望むこと、問題点などを明らかにするためにアンケート調査を行った。

(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(平成 16 年 12 月 28 日)に従い、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、行っている。書面によるインフォームド・コンセントを取得後に検体を採取して、使用している。提供された臍帯は、(1)再生医療、(2)血液疾患、(3)患者数の少ない難治性疾患の治療方法の開発や創薬を目指した研究、ならびに臍帯の保存技術の開発、バンキングを目指した研究等、医学の発展を目指した研究に使用する事を、臍帯を提供して頂く妊婦に説明し、同意を得ている。また、患者由来 iPS 細胞も病態解明、治

療法の開発のための使用することを患者の親権者に説明して同意を得ている。

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

骨髄移植：1 歳 2 か月の時に、父 (HLA2 座ミスマッチ) から骨髄移植を行った。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。移植合併症として、急性 GVHD (skin; grade1, 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 $1.4 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主要評価項目：現在、4 歳 9 か月で生存中である。

副次的評価項目：

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

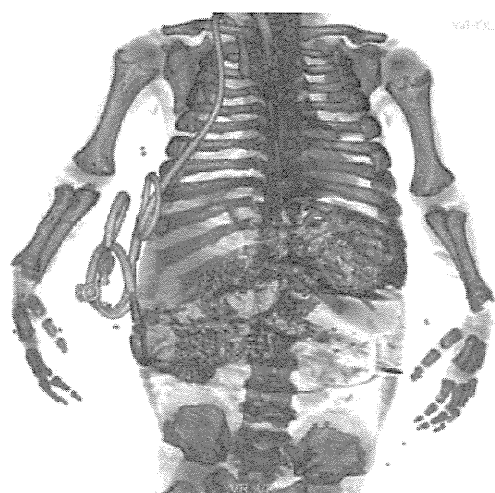
気管攣縮が消失して、呼吸状態の明らかな改善を認め、2回目の移植後5か月頃からは日中は呼吸器を離脱でき、睡眠時に補助呼吸を行っている。胸郭もベル状から樽状に改善している。3歳6か月ごろから、息をとめる動作が出現し、脳波からてんかんと診断した。抗けいれん薬で発作は消失し、脳波上もてんかん波は改善している。身長、体重および四肢の長さは3歳までは徐々に上昇していたが、3歳以降は横ばいである。知能は、原病による気管攣縮に伴う低酸素性脳症後遺症を合併しているが、視力や聴力（補聴器装着中）は徐々に改善しており、人見知りが激しく、好き嫌いがはっきりするようになった。

2) 骨の石灰化

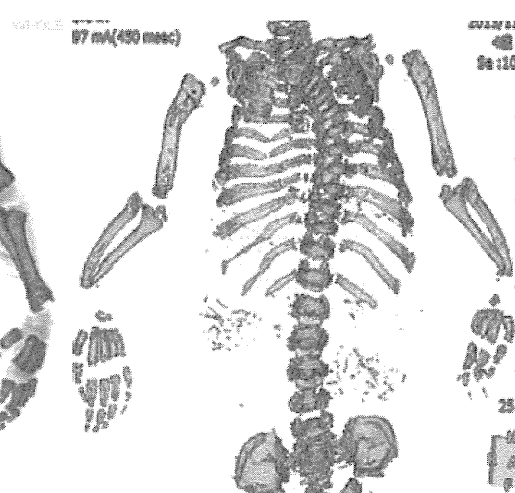
画像検査では、長幹骨の骨端部から徐々に回復して、骨の石灰化の改善を認めているが、3歳すぎteから石灰化が停滞している。また、長幹骨の長さも伸びなくなっている。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続している。骨形成マーカーは3歳以降低値を維持している。骨吸収マーカーのNTXと1CTPは低下してきた。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、骨塩定量は少しずつ上昇しているが、筋肉量は3歳以降横ばいである。しかし、4歳になって、骨面積が低下している。

骨CT

1歳2か月（移植前）



4歳6か月（移植後）



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

骨髄移植：生後 7 か月の時に、母 (HLA1 座ミスマッチ) から骨髄移植を行った。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、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 (皮膚、消化管) を発症した。皮膚症状はステロイドで軽快したが、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した後から、劇的に改善した。その後、慢性 GVHD (黄疸、肝機能障害) を来たしたが、間葉系幹細胞移植と免疫抑制剤により治癒した。

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 $1.8 \times 10^6/\text{kg}$ 。

主要評価項目：現在、3 歳 0 か月で生存中である。

副次的評価項目：

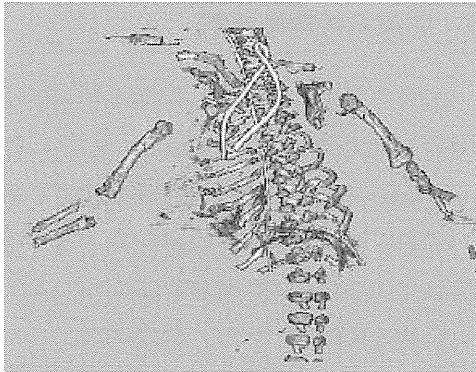
1) 臨床症状

呼吸状態に関して、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 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が、気管れん縮が再燃したため、2 歳 9 か月に 9 回目の間葉系幹細胞移植を行い、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。

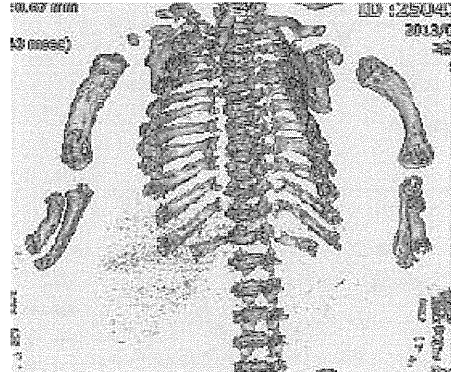
2) 骨の石灰化

骨CT

6か月（移植前）



2歳（移植後）



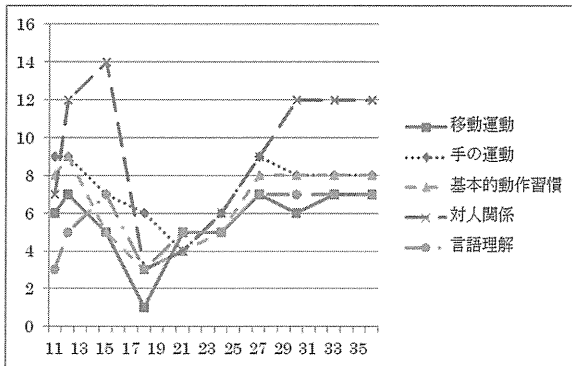
画像検査では、長幹骨および扁平骨ともに骨の石灰化が徐々に改善しており、特に頭蓋骨は骨の石灰化を全く認めなかったが、移植後に大泉門だけ残してすべて石灰化が回復していたが、2歳以降石灰化が低下している部分が見られている。生化学検査では、ALPは1歳8か月ごろから低下していたが、2歳6か月頃から、再上昇してきている。尿中PEAは1歳頃をピークに徐々に低下しており、現在はピーク時の25%まで下がった。骨形成マーカーは2歳からの半年間低下したが、それ以降再上昇している。また、骨吸収マーカーは一定の変化が見られない。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、どちらも上昇傾向が見られたが、骨面積は2歳以降低下している。

3) 重篤な有害事象

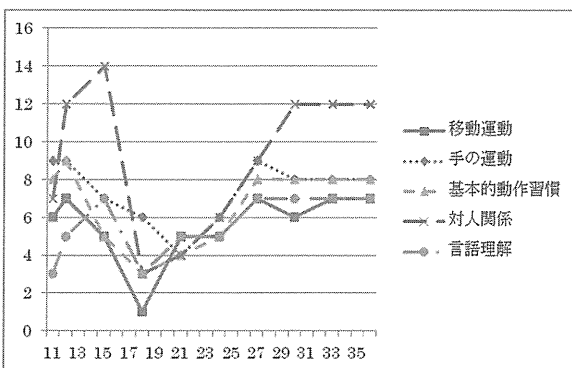
骨髄移植の有害事象として、急性GVHD (skin; grade 2, Liver; grade 0, Gut; grade 4) および慢性GVHD (Liver; grade 2) を発症したが、間葉系幹細胞と免疫抑制剤により軽快した。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

2. 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。2症例ともに、年齢を重ねるごとに発達しているが、年齢相当の発達には到達していない。



症例 1



症例 2

3. 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

および臨床研究が終了後に治療が必要な場合の対応であった。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。

4. 間葉系幹細胞培養

2 例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養 (延べ 14 回) を行った。15 ~ 35mL の骨髄を 2 ~ 3 週間かけて培養し、いずれの場合も体重(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

| 年齢 年 月 | 症例 | | 移植回数 |
|-----------|------|------|------|
| | 症例 1 | 症例 2 | |
| 7 0 | | | |
| 8 1 | | | |
| 9 2 | | | |
| 10 3 | | | |
| 11 4 | | | |
| 12 5 | | | |
| 13 6 | | | |
| 14 7 | | | |
| 15 8 | | | |
| 16 9 | | | |
| 17 10 | | | |
| 18 11 | | | |
| 19 12 | | | |
| 20 1 | | | |
| 21 2 | | | |
| 22 3 | | | |
| 23 4 | | | |
| 24 5 | | | |
| 25 6 | | | |
| 26 7 | | | |
| 27 8 | | | |
| 28 9 | | | |
| 29 10 | | | |
| 30 11 | | | |
| 31 12 | | | |
| 32 1 | | | |
| 33 2 | | | |
| 34 3 | | | |
| 35 4 | | | |
| 36 5 | | | |
| 37 6 | | | |
| 38 7 | | | |
| 39 8 | | | |
| 40 9 | | | |
| 41 10 | | | |
| 42 11 | | | |
| 43 12 | | | |
| 44 1 | | | |
| 45 2 | | | |
| 46 3 | | | |
| 47 4 | | | |
| 48 5 | | | |
| 49 6 | | | |
| 50 7 | | | |
| 51 8 | | | |
| 52 9 | | | |
| 53 10 | | | |
| 54 11 | | | |
| 55 12 | | | |
| 56 1 | | | |
| 57 2 | | | |
| 58 3 | | | |
| 59 4 | | | |
| 60 5 | | | |
| 61 6 | | | |
| 62 7 | | | |
| 63 8 | | | |
| 64 9 | | | |
| 65 10 | | | |
| 66 11 | | | |
| 67 12 | | | |
| 68 1 | | | |
| 69 2 | | | |
| 70 3 | | | |
| 71 4 | | | |
| 72 5 | | | |
| 73 6 | | | |
| 74 7 | | | |
| 75 8 | | | |
| 76 9 | | | |
| 77 10 | | | |
| 78 11 | | | |
| 79 12 | | | |
| 80 1 | | | |
| 81 2 | | | |
| 82 3 | | | |
| 83 4 | | | |
| 84 5 | | | |
| 85 6 | | | |
| 86 7 | | | |
| 87 8 | | | |
| 88 9 | | | |
| 89 10 | | | |
| 90 11 | | | |
| 91 12 | | | |
| 92 1 | | | |
| 93 2 | | | |
| 94 3 | | | |
| 95 4 | | | |
| 96 5 | | | |
| 97 6 | | | |
| 98 7 | | | |
| 99 8 | | | |
| 100 9 | | | |
| 101 10 | | | |
| 102 11 | | | |
| 103 12 | | | |
| 104 1 | | | |
| 105 2 | | | |
| 106 3 | | | |
| 107 4 | | | |
| 108 5 | | | |
| 109 6 | | | |
| 110 7 | | | |
| 111 8 | | | |
| 112 9 | | | |
| 113 10 | | | |
| 114 11 | | | |
| 115 12 | | | |
| 116 1 | | | |
| 117 2 | | | |
| 118 3 | | | |
| 119 4 | | | |
| 120 5 | | | |
| 121 6 | | | |
| 122 7 | | | |
| 123 8 | | | |
| 124 9 | | | |
| 125 10 | | | |
| 126 11 | | | |
| 127 12 | | | |
| 128 1 | | | |
| 129 2 | | | |
| 130 3 | | | |
| 131 4 | | | |
| 132 5 | | | |
| 133 6 | | | |
| 134 7 | | | |
| 135 8 | | | |
| 136 9 | | | |
| 137 10 | | | |
| 138 11 | | | |
| 139 12 | | | |
| 140 1 | | | |
| 141 2 | | | |
| 142 3 | | | |
| 143 4 | | | |
| 144 5 | | | |
| 145 6 | | | |
| 146 7 | | | |
| 147 8 | | | |
| 148 9 | | | |
| 149 10 | | | |
| 150 11 | | | |
| 151 12 | | | |
| 152 1 | | | |
| 153 2 | | | |
| 154 3 | | | |
| 155 4 | | | |
| 156 5 | | | |
| 157 6 | | | |
| 158 7 | | | |
| 159 8 | | | |
| 160 9 | | | |
| 161 10 | | | |
| 162 11 | | | |
| 163 12 | | | |
| 164 1 | | | |
| 165 2 | | | |
| 166 3 | | | |
| 167 4 | | | |
| 168 5 | | | |
| 169 6 | | | |
| 170 7 | | | |
| 171 8 | | | |
| 172 9 | | | |
| 173 10 | | | |
| 174 11 | | | |
| 175 12 | | | |
| 176 1 | | | |
| 177 2 | | | |
| 178 3 | | | |
| 179 4 | | | |
| 180 5 | | | |
| 181 6 | | | |
| 182 7 | | | |
| 183 8 | | | |
| 184 9 | | | |
| 185 10 | | | |
| 186 11 | | | |
| 187 12 | | | |
| 188 1 | | | |
| 189 2 | | | |
| 190 3 | | | |
| 191 4 | | | |
| 192 5 | | | |
| 193 6 | | | |
| 194 7 | | | |
| 195 8 | | | |
| 196 9 | | | |
| 197 10 | | | |
| 198 11 | | | |
| 199 12 | | | |
| 200 1 | | | |
| 201 2 | | | |
| 202 3 | | | |
| 203 4 | | | |
| 204 5 | | | |
| 205 6 | | | |
| 206 7 | | | |
| 207 8 | | | |
| 208 9 | | | |
| 209 10 | | | |
| 210 11 | | | |
| 211 12 | | | |
| 212 1 | | | |
| 213 2 | | | |
| 214 3 | | | |
| 215 4 | | | |
| 216 5 | | | |
| 217 6 | | | |
| 218 7 | | | |
| 219 8 | | | |
| 220 9 | | | |
| 221 10 | | | |
| 222 11 | | | |
| 223 12 | | | |
| 224 1 | | | |
| 225 2 | | | |
| 226 3 | | | |
| 227 4 | | | |
| 228 5 | | | |
| 229 6 | | | |
| 230 7 | | | |
| 231 8 | | | |
| 232 9 | | | |
| 233 10 | | | |
| 234 11 | | | |
| 235 12 | | | |

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。さらに、骨髄および間葉系幹細胞の搬送（島根大学↔産総研）もスムーズかつ安全に行えた。

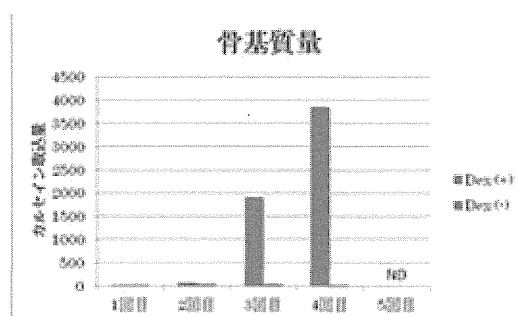
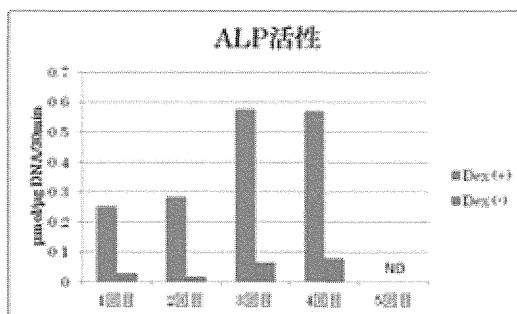
5. 骨形成能の研究

症例 1: 移植前にみられた骨端線のキャッピング変化が移植後長期にわたり消失することを確認し、同部位での石灰化が継続して存在することを確認した。しかし、長管骨脆弱性は残存していた。したがって、移植による骨形成の促進、特に関節近傍の骨端部分における骨形成促進が示唆されるも、長管骨の皮質骨部の十分な石灰化の確認は困難であり、菲薄化の改善は不十分であった。特に大腿骨では脆弱性がみられ、結果として骨折を生じたと思われる。

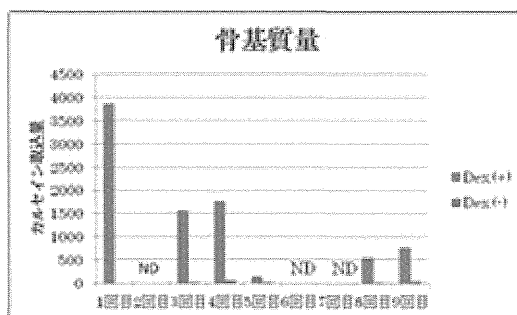
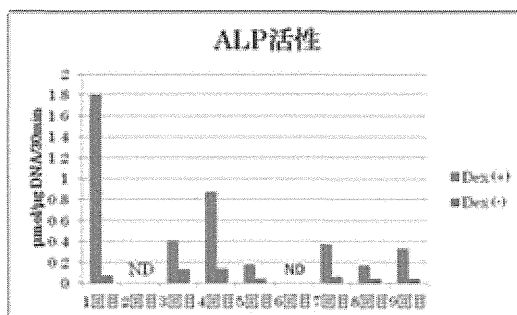
症例 2: 症例 1 にみられるような移植前のあきらかなキャッピングはみられなかったが、非石灰化骨端線が幅広く存在していた。この非石灰化骨端線は移植後に改善し、長期でも改善していた。しかし、症例 1 と同様に骨皮質の石灰化は不十分で脆弱性が示唆された。

同じドナーから複数回移植しているが、これらの移植ごとにおける骨分化能の比較が重要と思われ、これまでに移植された幹細胞の移植毎の骨形成の比較を ALP 活性とカルセインの取り込みにより行った。variation がみられるも、測定した全

てで dexamethasone による ALP 活性と骨基質産生の誘導がみられた。



症例 1 の骨形成比較



症例 2 の骨形成比較

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♂ 5匹と野生型♀ 10匹の交配を行い、既報通り、メンデルの法則に従って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。血清 ALP 値についても、ホモ接合体の検体は得られなかったが、ヘテロ接合体の ALP 値が野生型に比べ、有意に低かった。

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、磁気ビーズによる分離も試みたが、残存血球系細胞も増殖した。

2) キメリズム解析

症例 1 に関して、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。骨髄から採取して培養した間葉系幹細胞は、100%レシピエント由来のままである。

症例 2 に関して、骨髄移植 1 か月後から現在まで、100%ドナータイプを維持している。骨髄から採取して培養した間葉系幹細胞は、100%レシピエント由来のままである。

2 症例ともに、骨髄中のドナー由来間葉系幹細胞が少ないことが予想されたため、

骨髄から FCM で単離した間葉系幹細胞のキメリズム解析を行った。単離した間葉系幹細胞数が少なかったため、short tandem repeat の増幅が困難であった。したがって、*TNSALP* 遺伝子変異を調べたところ、正常な *TNSALP* 遺伝子を検出することができたため、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることが明らかとなった。

3) 病態の解明

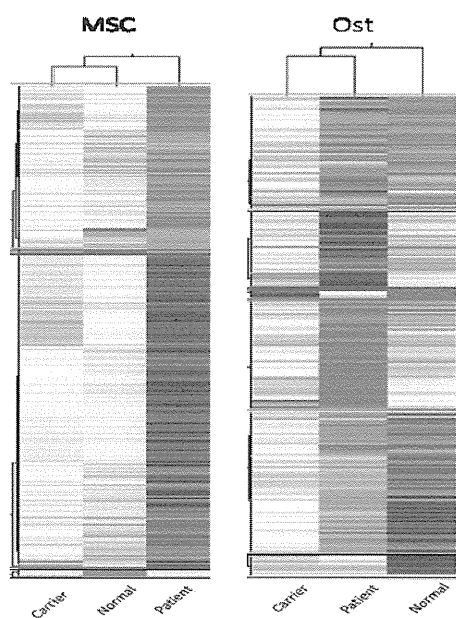
① 網羅的遺伝子解析

間葉系幹細胞に関して、正常健康人と骨髄提供者（保因者）の遺伝子発現に大きな差は認めなかったが、骨芽細胞においては、正常健康人と骨髄提供者（保因者）の遺伝子発現に大きな開きがあった。移植細胞は間葉系幹細胞であるが、その細胞が骨芽細胞に分化して石灰化に貢献することを想定している。保因者であっても臨床的に骨の石灰化は問題ないことから、個々の遺伝子において、詳細な検討を行った。

階層クラスタリング解析において、間葉系幹細胞は正常人と保因者が同じ遺伝子発現パターンを示していたため、患者と正常人の比較を行った。変動倍率 3 で解析した結果、骨に関わる遺伝子だけでなく、炎症、細胞内シグナル、細胞接着に関わる遺伝子も変動していた。さらに、肺や脳形成に関わる遺伝子も変動していた。

骨芽細胞は、階層クラスタリング解析において、正常人、保因者、患者でそれぞれの遺伝子発現パターンを示していたが、

正常人と保因者が臨床的には正常であることから、正常人と保因者をまとめて、患者との比較を行った。変動倍率 3 で解析した結果、間葉系幹細胞同様に、骨に関わる遺伝子だけでなく、炎症や細胞接着に関わる遺伝子に変動していた。

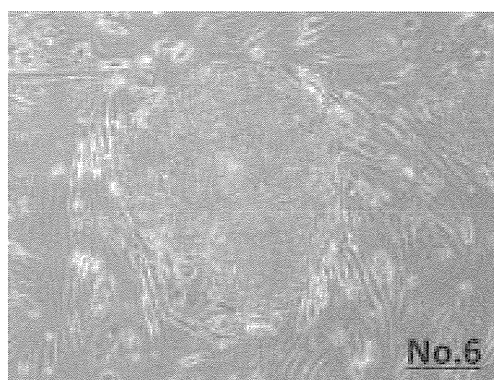


② *TNSALP* 遺伝子変異解析

19 個の *TNSALP* 遺伝子変異体を作成して、ALP 活性を行った。*TNSALP* 遺伝子野生型に比べて、19 個中 15 個の変異体は ALP 活性が低く、4 個は ALP 活性が高かった。また、ALP を高発現している H-HOS 細胞株に変異体を導入したところ、ドミナントネガティブ効果が 19 個中 14 個の変異体で認められた。さらに、変異体の石灰化能を、ALP を低発現している L-HOS 細胞株に導入したところ、19 個中 14 個の変異体で石灰化能が低下していた。

③ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

5 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28) を患者由来皮膚線維芽細胞に導入した結果、iPS 細胞様コロニーを計 21 個ピックアップし、拡大培養を試みたところ、6 クローンが iPS 細胞様コロニーの外観を示したが、クローン No.6 のみ一定の増殖速度を示し、ES 細胞様の外観を示すコロニーが生育し続けた。しかし、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。なお、ALP 染色において、呈色反応が確認できず陰性を確認した。



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、剥離液の検討を行った。トリプシンに比べて、試薬 A で細胞を剥離した場合、細胞の遊走能が改善した。

② 臍帯由来間葉系幹細胞の細胞特性

ALP 発現は骨髄由来間葉系幹細胞と同程度であった。しかし、CD44 の発現は骨髄由来よりも発現レベルが高かった。

骨分化能に関して、基礎培地で臍帯由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞のように骨芽細胞に分化し、石灰化能およびALP活性を認めた。しかし、ロット間の差が認められた。

また、臍帯由来と骨髄由来の間葉系幹細胞の遊走能の違いはみられなかった。

7. 外部評価委員会、当該臨床研究の発展に対する方策

1) 外部評価委員会

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、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。副目的である、骨の石灰化の評価の生化学的評価に関して、ALP、骨型ALPだけでなく、骨形成マーカー（オステオカルシン、PINPなど）、骨吸収マーカー（NTX、デオキシピリノジンなど）を測定することとした。目的および評価方法を具体的に明示したことは一定の評価を受け、外部評価委員の先生方からこの臨床研究の改善点からの結果に関して詳細なご意見が頂けた。

② 症状が改善している客観的データがない

キメリズム解析を造血細胞だけでなく間葉系幹細胞についても行うこととした。また、骨の石灰化の評価を経時的に多く

の方法（レントゲン、CT、骨塩定量、病理標本）で行った。さらに、ドナーの細胞の生着の評価として、骨生検のALP染色を追加すること、異性間FISHなどでドナー細胞を検出することなどを検討した。その結果、臨床症状だけでなく石灰化の改善が明らかとなっただけでなく、ドナーの細胞が生着していることが証明できたことから、ドナー由来細胞が石灰化の改善に寄与していることが明らかとなった。

③ 間葉系幹細胞の再投与の基準が不明確

2～4か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ところ、再投与がより客観的に行うことができるようになった。

④ 同胞がドナーになった時の対応

臨床研究実施計画書に同胞がドナーになった時に対応を明示した。

2) 当該臨床研究の発展に対する方策

① 最適な間葉系幹細胞移植方法の検討

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。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。骨髓移植併用による同種間葉系幹細胞の生着効果を検討する。

また、ALP 遺伝子変異を認めずかつ 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。

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。

② 間葉系幹細胞の生着率向上の必要性

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、ある程度分化したものまでさまざまである。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ために、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。

また、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。

③ ALP の機能解析

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、drug library screening を行い、骨の石灰化が改善する small molecule を同定することとした。また、樹立した患者由来 iPS 細胞を用いて、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。

8. アンケート調査

臨床研究に参加された理由として、「少しでも先があるならと思い決意した」、「この治療を受けることによって後々同じ疾患の親や子ども達に少しでも希望がもてるよう、治療法が確立できればと思った」、「命を失うことはありえず、可能性として生きることができるとはこれしかないと思ったから」であった。

治療を受けて良かった点として、「呼吸が楽になった」、「笑顔が見える。家に帰ることができた」、「移植をする度に目に見えて手足が伸び肋骨が大きくなり健康な子どもに近づいている」、「通常の子どもを育てるよりも一つ一つの事が感動に満ちあふれている」というご意見を頂いた。

治療を受けて悪かった点として、「骨髓移植の合併症（GVHDなど）、原病の合併症（けいれん、気道閉塞など）、薬の副作用がつかった」、「脳症を回避できなかった」、「長期の入院で付き添いをするため家族全員が我慢を強いられる」、「自宅から遠い」というご意見を頂いた。