

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

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 報告書 目次

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

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**

先天性骨系統疾患は確立した治療法がなく、致死的な経過をとるか、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死的な経過をとる。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 の改善につながる事が明らかとなった。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目

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、 $\mu$ 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、シークエ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)、肝機能障害を認めしたが、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

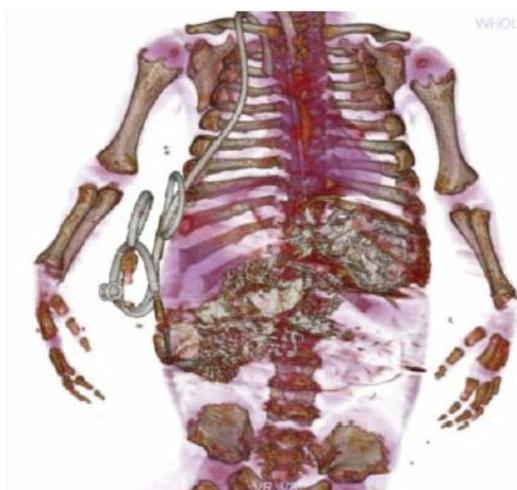
気管攣縮が消失して、呼吸状態の明らかな改善を認め、2回目の移植後5か月頃からは日中は呼吸器を離脱でき、睡眠時に補助呼吸を行っている。胸郭もベル状から樽状に改善している。3歳6か月ごろから、息をとめる動作が出現し、脳波からてんかんと診断した。抗けいれん薬で発作は消失し、脳波上もてんかん波は改善している。身長、体重および四肢の長さは3歳までは徐々に上昇していたが、3歳以降は横ばいである。知能は、原病による気管攣縮に伴う低酸素性脳症後遺症を合併しているが、視力や聴力（補聴器装着中）は徐々に改善しており、人見知りが激しく、好き嫌いがはっきりするようになった。

## 2) 骨の石灰化

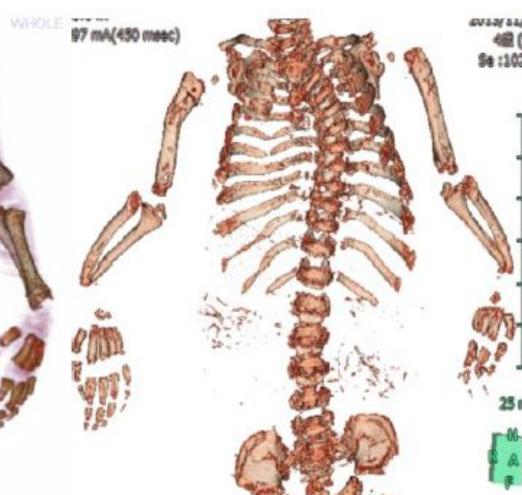
画像検査では、長幹骨の骨端部から徐々に回復して、骨の石灰化の改善を認めているが、3歳すぎてから石灰化が停滞している。また、長幹骨の長さも伸びなくなっている。生化学検査では、ALPの低値、尿中PEAの高値が持続している。骨形成マーカーは3歳以降低値を維持している。骨吸収マーカーのNTXと1CTPは低下してきた。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、骨塩定量は少しずつ上昇しているが、筋肉量は3歳以降横ばいである。しかし、4歳になって、骨面積が低下している。

## 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）



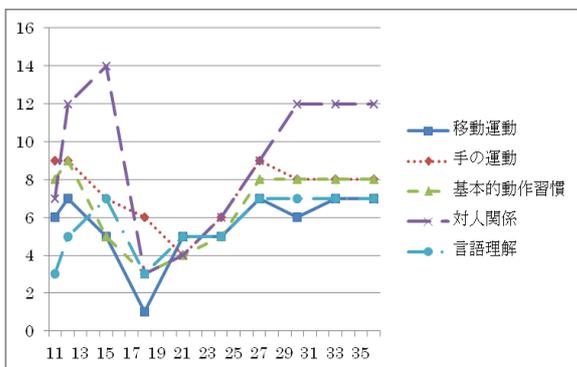
画像検査では、長幹骨および扁平骨ともに骨の石灰化が徐々に改善しており、特に頭蓋骨は骨の石灰化を全く認めなかったが、移植後に大泉門だけ残してすべて石灰化が回復していたが、2歳以降石灰化が低下している部分が見られている。生化学検査では、ALPは1歳8か月ごろから低下していたが、2歳6か月頃から再上昇してきている。尿中PEAは1歳頃をピークに徐々に低下しており、現在はピーク時の25%まで下がった。骨形成マーカーは2歳からの半年間低下したが、それ以降再上昇している。また、骨吸収マーカーは一定の変化が見られない。DXA法による骨塩定量と筋肉量を測定したところ、どちらも上昇傾向が見られたが、骨面積は2歳以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

### 3) 重篤な有害事象

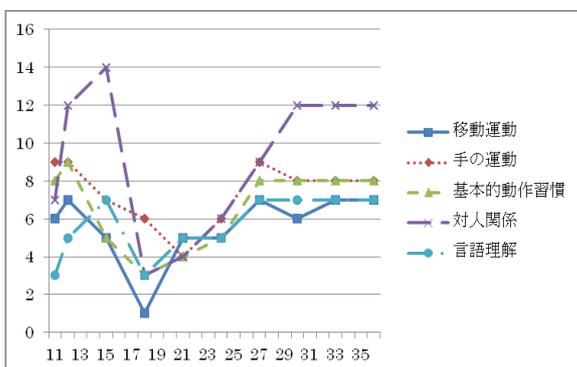
骨髄移植の有害事象として、急性GVHD (skin; grade 2, Liver; grade 0, Gut; grade 4)および慢性GVHD (Liver; grade 2)を発症したが、間葉系幹細胞と免疫抑制剤により軽快した。間葉系幹細胞移植の有害事象は認めていない。

### 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  $1 \times 10^6$  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 月 日	世例 1		世例 2	
	移植時期	月 日	移植時期	氏名
10 7 14	①			
10 8 15				
10 9 16				
10 10 17				
10 11 18	②			
11 12 19				
11 1 20				
11 2 21				
11 3 22				
11 4 23				
11 5 24				
11 6 25				
11 7 26				
11 8 27	③			
11 9 28				
11 10 29				
11 11 30				
11 12 31	④			
12 1 32				
12 2 33				
12 3 34				
12 4 35				
12 5 36				
12 6 37				
12 7 38				
12 8 39				
12 9 40	⑤			
12 10 41				
12 11 42				
13 12 43				
13 2 44				
13 3 45				
13 4 46				
13 5 47				
13 6 48				
13 7 49				
13 8 50				
13 9 51				
13 10 52				
13 11 53				
13 12 54				
14 1 55				
14 2 56				
14 3 57				
14 4 58				
14 5 59				
14 6 60				
14 7 61				
14 8 62				
14 9 63				
14 10 64				
14 11 65				
14 12 66				
15 1 67				
15 2 68				
15 3 69				
15 4 70				
15 5 71				
15 6 72				
15 7 73				
15 8 74				
15 9 75				
15 10 76				
15 11 77				
15 12 78				
16 1 79				
16 2 80				
16 3 81				
16 4 82				
16 5 83				
16 6 84				
16 7 85				
16 8 86				
16 9 87				
16 10 88				
16 11 89				
16 12 90				
17 1 91				
17 2 92				
17 3 93				
17 4 94				
17 5 95				
17 6 96				
17 7 97				
17 8 98				
17 9 99				
17 10 100				

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。

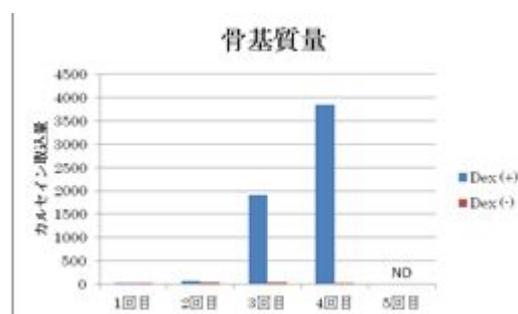
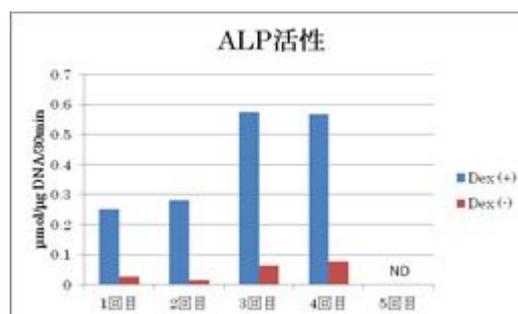
## 5. 骨形成能の研究

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。

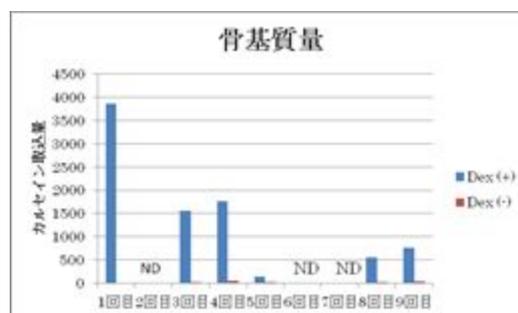
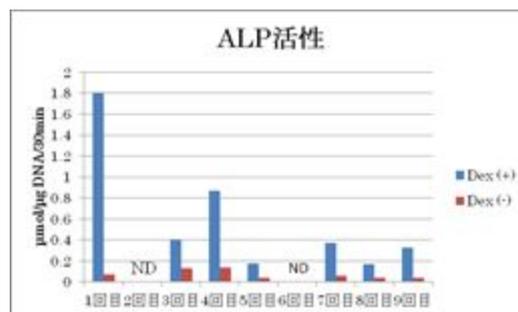
症例 2: 症例 1 にみられるような移植前のあきらかなキャッピングはみられなかったが、非石灰化骨端線が幅広く存在していた。この非石灰化骨端線は移植後に改善し、長期でも改善していた。しかし、症例 1 と同様に骨皮質の石灰化は不十分で脆弱性が示唆された。

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みである。

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みである。

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

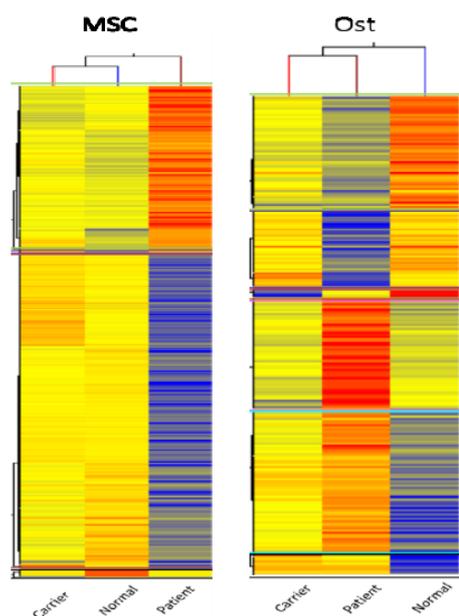
#### 網羅的遺伝子解析

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、肺や脳の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が変動していた。

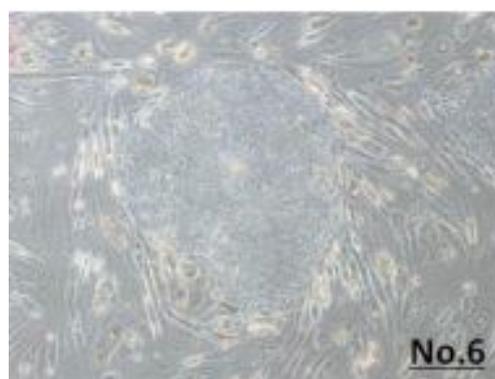


TNSALP 遺伝子変異解析

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。

#### 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

##### 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。

##### 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

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。

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。

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。

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

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。骨髄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。

#### 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。

#### 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ればよかった」、「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ればよかった」といった意見が頂いた。

治療を受けて良かった点として、「呼吸が楽になった」、「笑顔が見れる。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、「骨髄移植の合併症（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。

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こらないこと、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ー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、現在のプロトコー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と、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

#### 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。

## 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。

## 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

### 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。

### 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る。

## 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の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・間葉系幹細胞で治療

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

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）を認めしたが、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

島根大学医学部附属病院小児センタースタッフ一同

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）

#### 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、生後 6 か月以内に発症、呼吸障害の合併、ALP 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  $750/\mu\text{L}$  以下、血小板  $50,000/\mu\text{L}$  以下、2. 血清 Cr  $0.8\text{mg/dL}$  異常、3. T.bil  $1.8\text{mg/dL}$  以上、AST  $160\text{IU/L}$  以上、4. 24 時間 CCr(体表面積補正)  $70\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$  以下、5. 治療が必要な心電図異常を認める、BNP  $100\text{pg/mL}$  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/m<sup>2</sup>/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 ( $\alpha$ -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%CO<sub>2</sub>, 37 ) 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 10<sup>6</sup> 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 10<sup>6</sup> 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し行う必要がある。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)、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 grade1, 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 が低値のままで、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、人見知りや激しく、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一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。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、脳波からてんかんと診断し、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、遠域寺式発達評価では、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

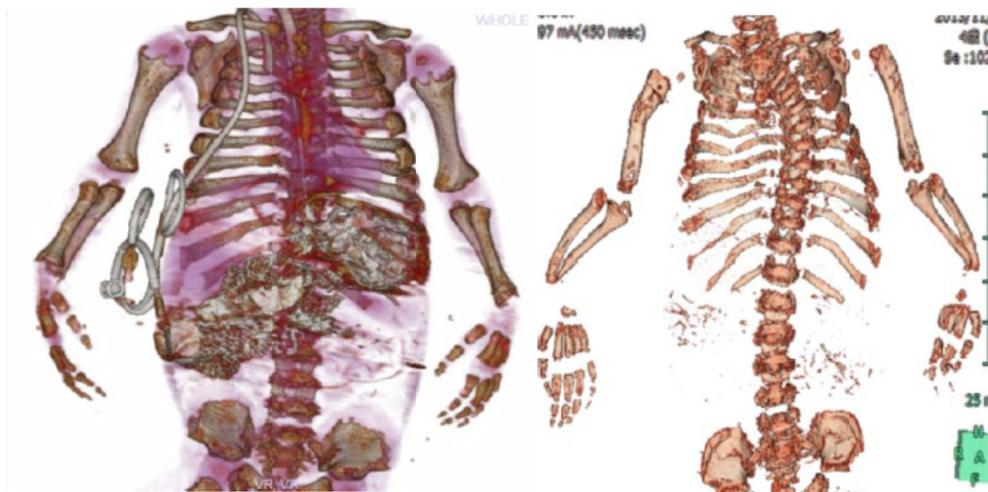
<b>骨髄移植</b>	
年齢	1歳2か月
ドナー	父（保因者）
血液型	A→A
HLA	HLA 2 locus (B, DR) mismatch
移植細胞数	$3.56 \times 10^8$ /Kg
<b>間葉系幹細胞移植</b>	
移植回数	5回
移植時期	1歳2か月～3歳6か月
移植細胞数	平均 $1.4 \times 10^6$ /kg

1

## 骨CT

1歳2か月（移植前）

4歳6か月（移植後）



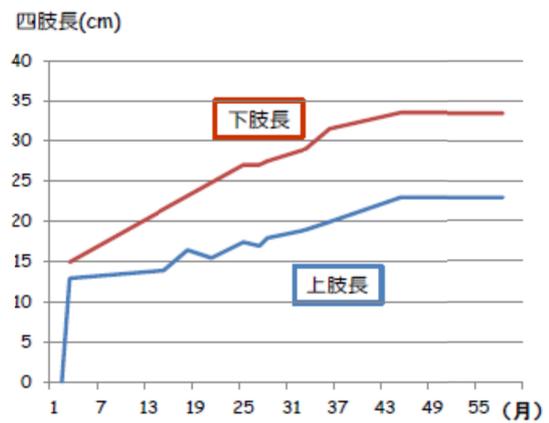
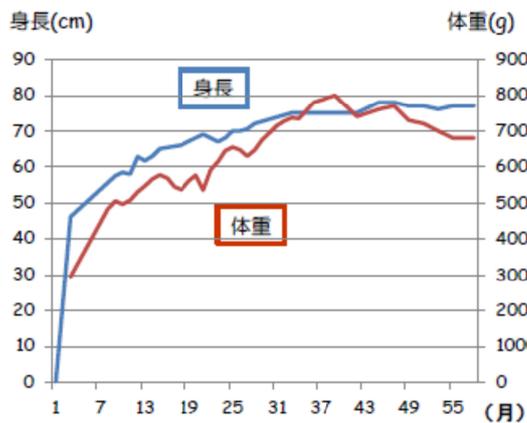
# 骨CT

1歳2か月（移植前）

4歳6か月（移植後）

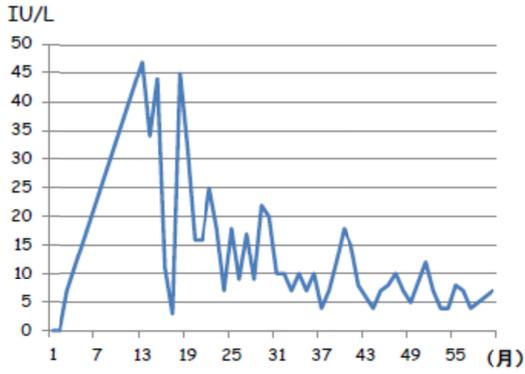


身長・体重・上肢長・下肢長

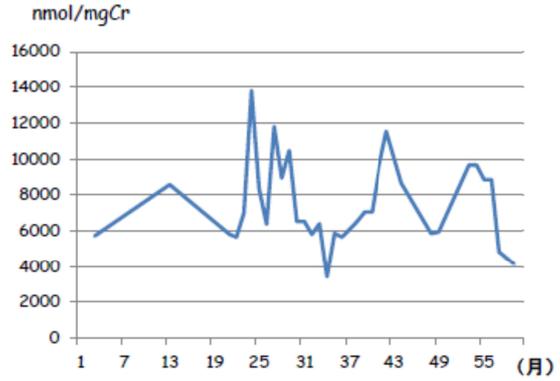


# ALP・U-PEA

## ALP

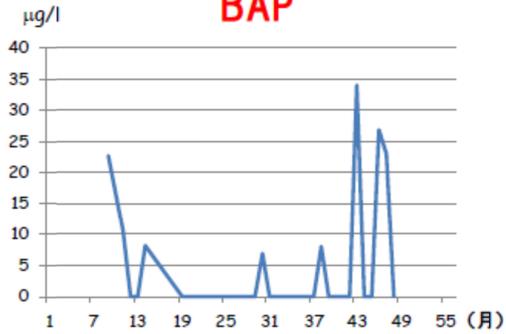


## U-PEA

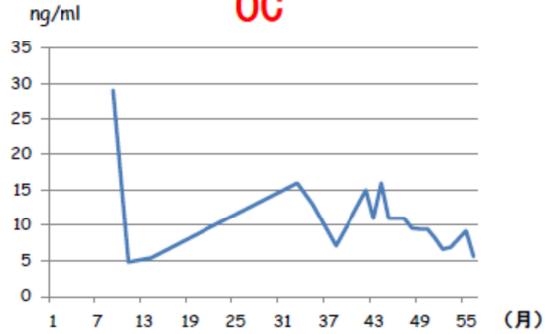


# 骨形成マーカー

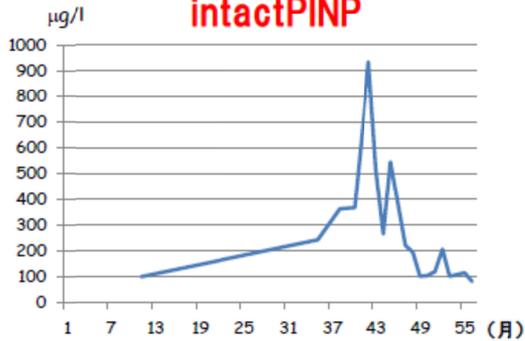
## BAP



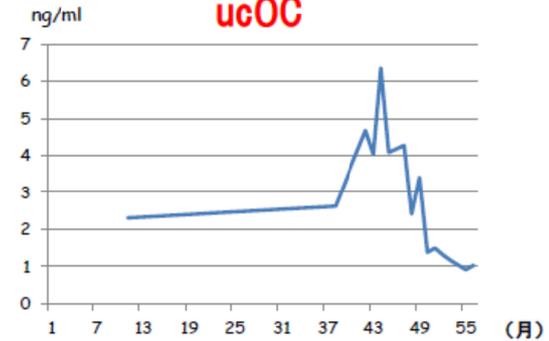
## OC



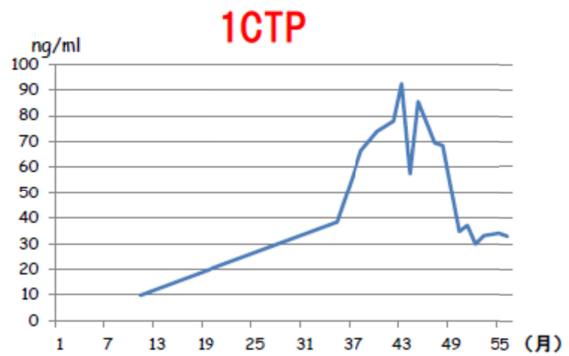
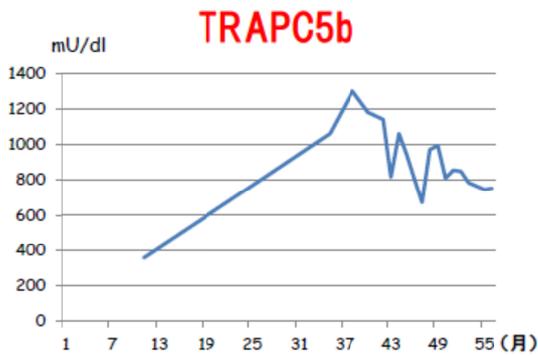
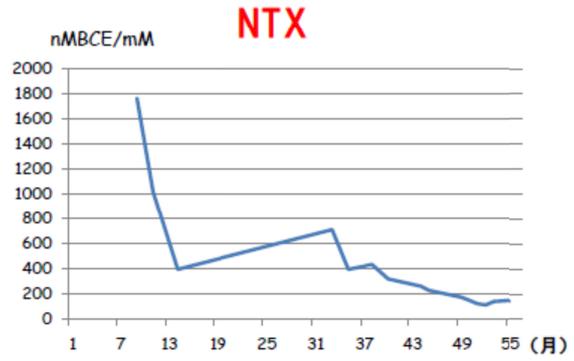
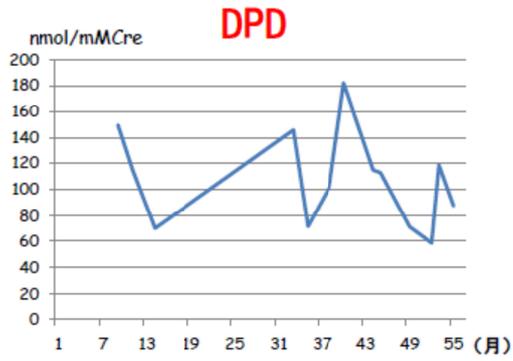
## intactPINP



## ucOC

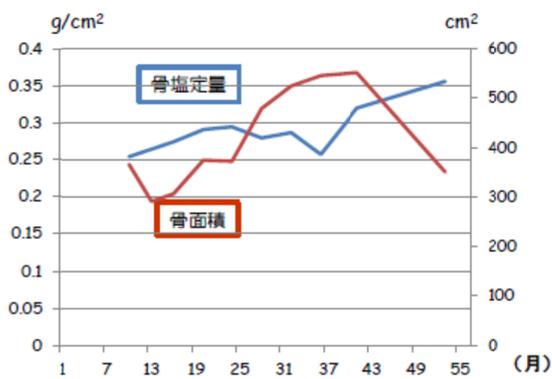


## 骨吸収マーカー

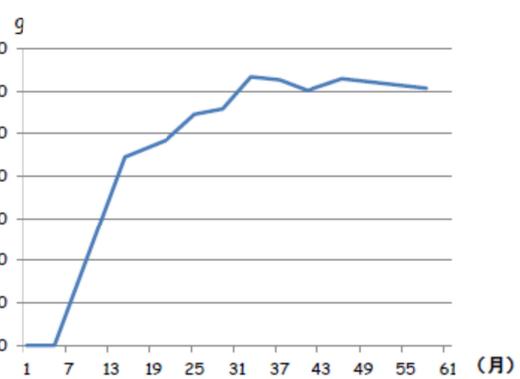


## 骨塩定量・筋肉量

**骨塩定量・骨面積**



**筋肉量**

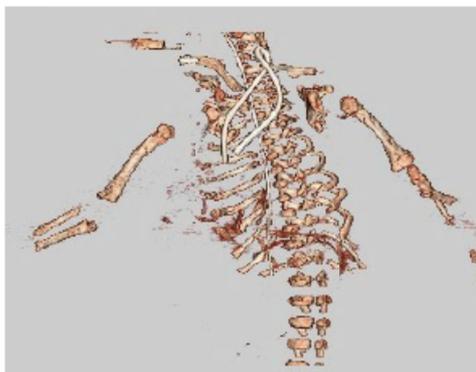


## 症例2：05 Male

<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 移植時期 移植細胞数 ( $10^6 / \text{kg}$ )	9回 7か月～2歳9か月 平均 $1.8 \times 10^6 / \text{kg}$

### 骨CT

6か月（移植前）



2歳（移植後）



# 骨CT

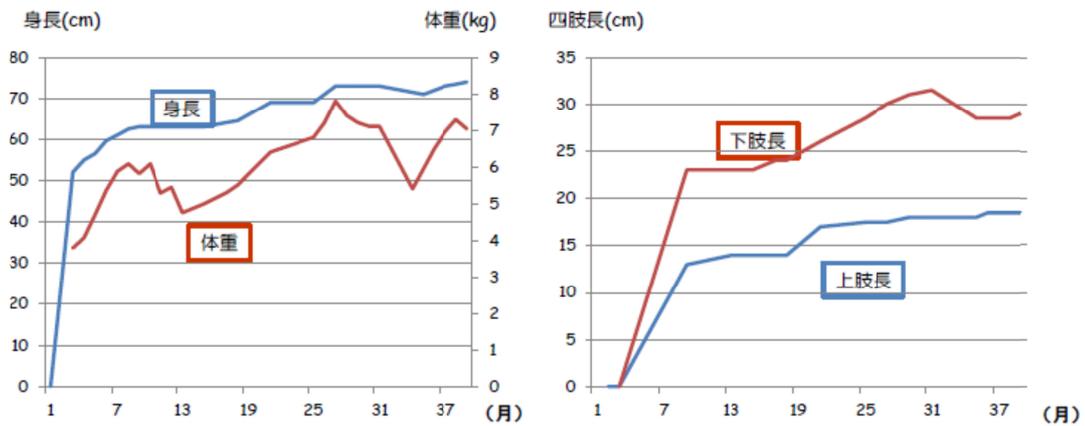
6か月（移植前）



2歳（移植後）

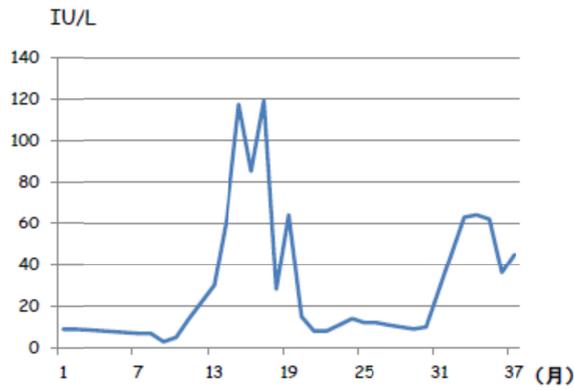


## 身長・体重・上肢長・下肢長

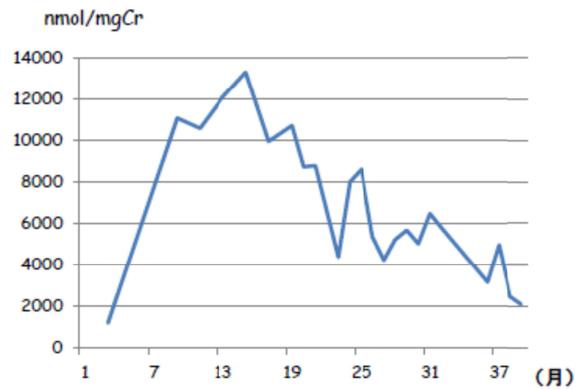


# ALP・U-PEA

## ALP

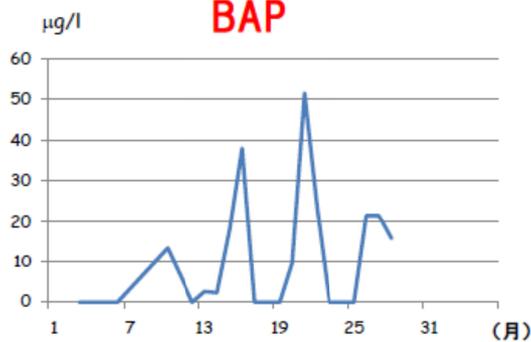


## U-PEA

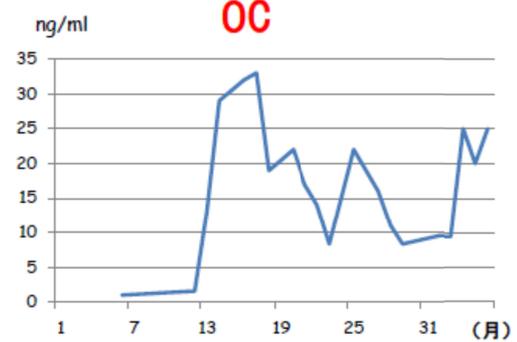


# 骨形成マーカー

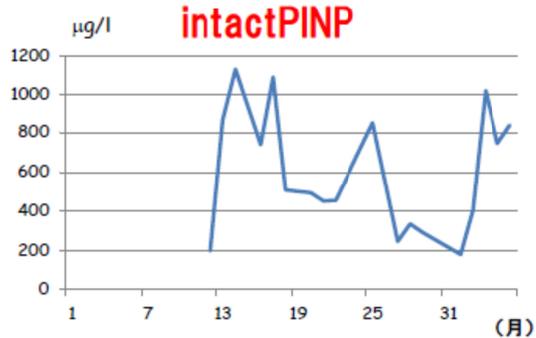
## BAP



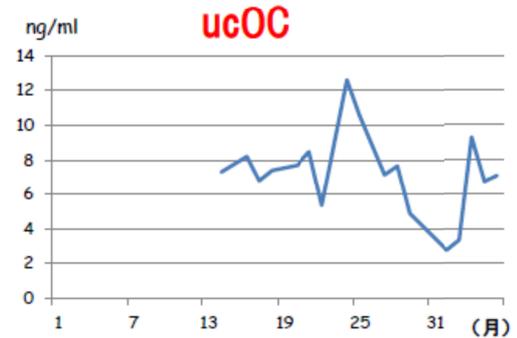
## OC



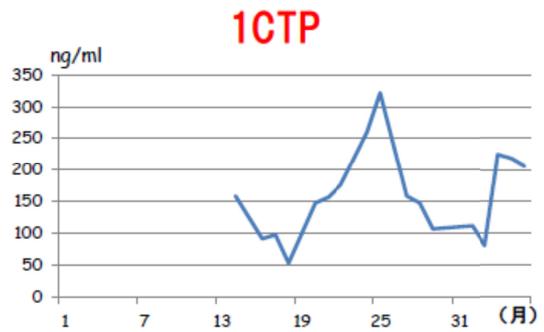
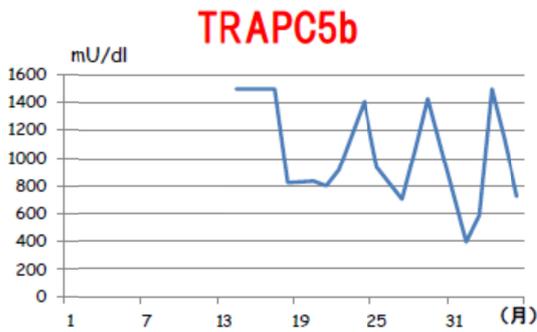
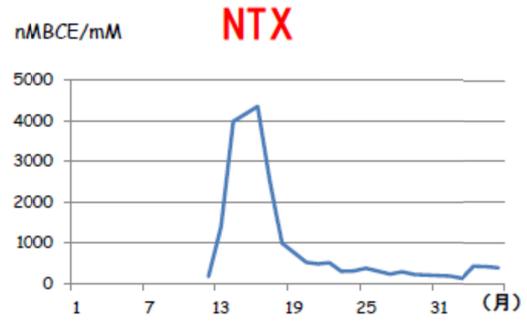
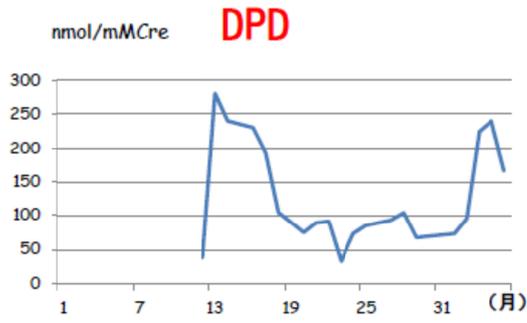
## intactPINP



## ucOC

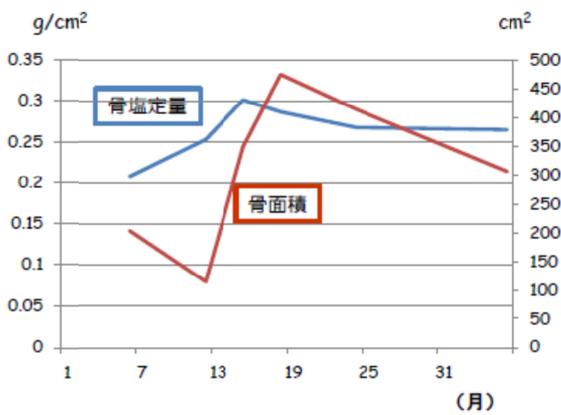


# 骨吸収マーカー

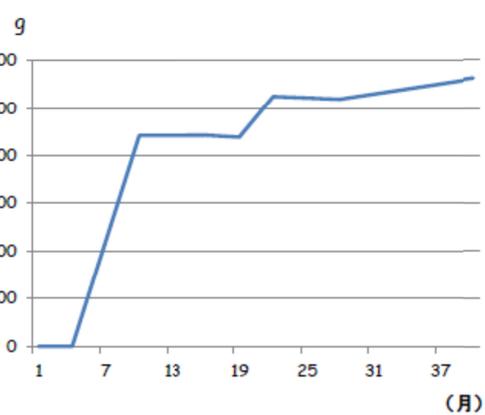


# 骨塩定量・筋肉量

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 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

-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

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を行うことで、現在のプロトコルを改善し適切にかつ科学的根拠に基づいた臨床研究が行うことができ、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。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。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

大藺恵一（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、外部評価委員会を開催した。また、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。

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。

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、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。

## 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. 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、大園恵一先生（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。各先生方だけでなく、先生方の施設あるいは研究班、医療チームの先生方、スタッフも参加していただき、それぞれの専門的な観点からご教示頂き、当該臨床研究を改善した。また、外部評価委員会から頂いたご指導・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. アンケート調査

これまで臨床研究に参加して頂いた2名の患者さんのご家族（述べ5名）にアンケート調査を無記名で行った。具体的な質問項

目として、低ホスファターゼ症の印象、臨床研究を受けた理由、臨床研究の利点と問題点、この治療を継続する不安などである。

## 4. 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（それぞれ5回、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、間葉系幹細胞移植を行う回数、ドナーの負担、臨床研究が終了した後の治療の予定であった。

### 2. 外部評価委員会・当該臨床研究の発展に対する方策

#### 1) 外部評価委員会からの指摘による当該臨床研究の改善点

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により突っ込んだご意見が頂けた。

#### 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。

#### 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。

#### 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

#### 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。

#### 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させ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、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。

#### ドナーの負担軽減の取り組み

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髄を採取するため、ドナーの負担が大きい。これを改善するために、骨髄を培養増殖した間葉系幹細胞を凍結して、適切な時期に適切な量を投与することを検討する必要がある。しかし、骨髄からの間葉系幹細胞を継代することに、未熟性や増殖性が低下して、また、形質転換が起こることから、stemness を維持した間葉系幹細胞の培養方法を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. 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」、「笑顔が見れる。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、「骨髄移植の合併症( 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。

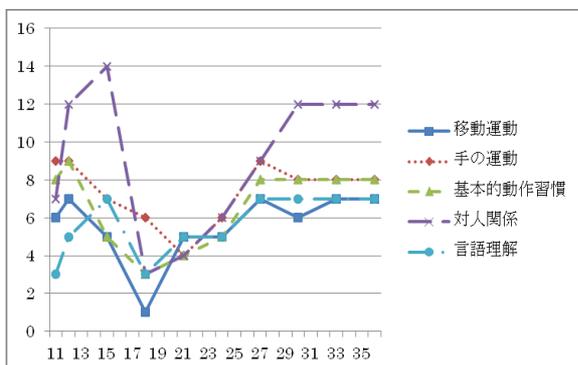
治療に期待することとして、「普通の子どものような暮らしができるようになってほしい」 「不自由なく生きていけるようになってほしい」というご意見を頂いた。

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。

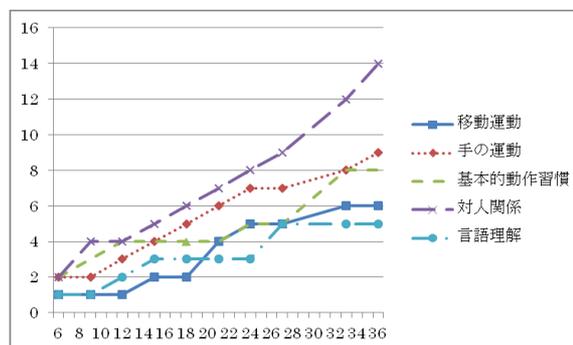
#### 4. 成長発達評価

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

インフォームドコンセントにより、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。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、さらに根治療法になり得るかわからないことが、治療を受けることへの障害になっていると思われる。

##### 2. 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。

### 3. 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と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。

### 4. 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た。

### 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、患者さんおよび家族に則した、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、現在のプロトコルを改善し適切にかつ科学的根拠に基づいた臨床研究が行うことができ、また、現在の問題点に対する方策が明らかになることができた。

アンケート調査をすることで、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。

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た。

### F. 健康危険情報

なし

### 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

## 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

### 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

研究分担者 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)

#### 研究要旨

疾患モデルマウスを用いた動物実験を試みるとともに、同種間葉系幹細胞(MSC)の増殖をセルプロセッシングセンターにて行い、品質を保証した細胞を低ホスファターゼ症患者に対する移植用として供給した。

#### A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。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、分担研究者、弓場は、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とともに、同種MSCをセルプロセッシングセンターにて培養し、品質を保証した細胞を代表研究者に供給することで臨床研究を遂行する。

#### B. 研究方法

#### 1. 疾患モデルマウス

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)について、米国ジャクソン研究所に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(図1)。

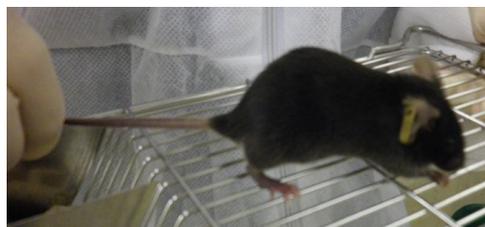


図1. TNALP KOマウス(ヘテロ接合体)

分担者研究機関の動物施設にて、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、解析手法の確認として、軟 X 線写真撮影、 $\mu$ CT、下肢全体の DXA (骨密度) 測定を株式会社クレハ分析センターに、血清 ALP の測定をオリエンタル酵母株式会社に依頼した。さらに、患者同様、新生仔は、未処置では致死性であるため、ピリドキサル (ビタミン B6) 投与の細胞移植前の生存維持にかかる処置についても実験手技を確立した。一方、移植するマウス MSC は、定法に従って 8 週齢マウス大腿骨内腔より採取し、培養を行うとともに、対照として市販のマウス MSC (DS ファーマ社製 C57BL/6 由来 [passage 6]) も入手して培養した (図 2)。

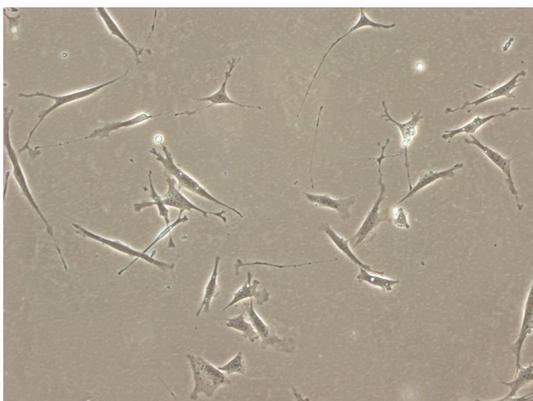


図2. 市販MSC (C57BL/6由来)

## 2. 間葉系幹細胞培養 (詳細は、資料 1)

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 MSC の培養を行った。搬送中は 10 ~ 30 を保つようにした。培養は 20 $\mu$ g/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 ( $\alpha$ -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%CO<sub>2</sub>、37 ) 内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増殖した MSC を、プロテアーゼを用いて培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養 (2 次培養) した。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 (4 次培養) までとした。移植当日に MSC を剥離し、10mL の 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、まず骨髄採取に先立ちドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験で確認した。

### (倫理面への配慮)

移植・骨髄採取のたびに島根大にて患者・ドナーへの説明を行い、同意を得た上で行った。

## C. 研究結果

### 1. 疾患モデルマウス

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

ついでに形態学的解析では、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(CD45+, TER119+)が混入(図3)し、磁気ビーズによる分離(図4)も試みたが、残存血球系細胞も増殖した。

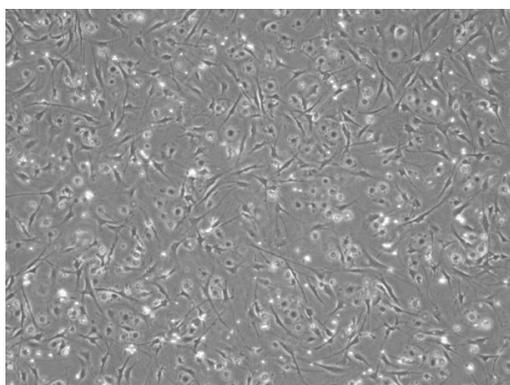


図3. 磁気ビーズ分離前のMSC培養

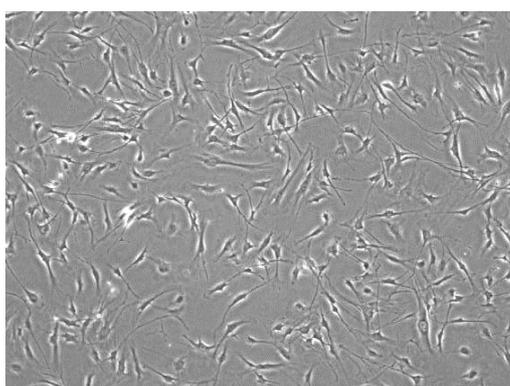


図4. 磁気ビーズ分離直後のMSC培養

## 2. 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を行った(図5)。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 $1 \times 10^6$ 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。

症例	1		2	
	移植時期	年齢	移植時期	年齢
	14	7		7
	15	8		8
	16	9		9
	17	10		10
	18	11		11
	19	12		12
	20	1		1
	21	2		2
	22	3		3
	23	4		4
	24	5		5
	25	6		6
	26	7		7
	27	8		8
	28	9		9
	29	10		10
	30	11		11
	31	12		12
	32	1		1
	33	2		2
	34	3		3
	35	4		4
	36	5		5
	37	6		6
	38	7		7
	39	8		8
	40	9		9
	41	10		10
	42	11		11
	43	12		12
	44	1		1
	45	2		2
	46	3		3
		4		4
		5		5
		6		6
		7		7
		8		8
		9		9
		10		10
		11		11

図5. CPCスケジュール

## D. 考察

### 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. 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。

## E. 結論

疾患モデルマウスである、TNALP KO マウスのホモ接合体個体は生直後からその維持は困難を極め、治療モデル確立に至らなかった。移植用マウス MSC についても、ラットで可能な通常分離方法では血球系細胞の分離が難しく、分離方法のさらなる改善が求められる。

本研究計画実施期間全体で、安全性が担保された移植用間葉系幹細胞を計 11 回、島根大学へ供出できた。しかしながら、ヒト幹細胞臨床研究の計画どおりドナーより毎回新鮮骨髄を採取し培養した回数は頻回に及んだ。そのため、原料である骨髄細胞数、その後の細胞増殖率等が毎回同一ではなく、品質の管理は決して簡単なことではなかった。何よりも採取にかかるドナーの負担が大きいことから、今後は凍結細胞の利用をぜひとも考慮すべきである。

## F. 健康危険情報

なし

## 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

## 資料 1

### < 骨髄提供者の細胞培養 >

#### **: 依頼受付工程**

1. 島根大学附属病院は骨髄提供者名を患者医療機関IDに変換し、産業技術総合研究所に培養を依頼する。
2. 産業技術総合研究所は、患者および骨髄提供者がインフォームドコンセントを受け、研究に同意している事を確認する。また、感染症検査の結果が陰性であること等を確認し、島根大学附属病院に受け入れの可否を連絡する。
3. 産業技術総合研究所では患者医療機関IDを更に症例IDに置き換え、当研究所内での作業には症例IDを用いる。

#### **: 運搬容器発送工程**

1. 産業技術総合研究所は搬送専用のクーラーボックスを準備し島根大学附属病院に送る。
2. 清拭した搬送専用クーラーボックスに患者医療機関IDを記入し、以下の物品を入れておく。

- ・ 温度記録計
- ・ 50mLチューブで二重包装されたアシストチューブ入りヘパリン/PBS溶液
- ・ チューブラック
- ・ ヘパリンナトリウム注射液
- ・ 保冷剤

保冷剤は島根大学附属病院で骨髄採取当日まで凍結しておく。

#### **: 骨髄採取工程**

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスを、島根大学附属病院の手術室や無菌室等の骨髓採取場所へ持ち込む。
2. 骨髓提供者の自家骨髓を所定のチューブに採取する。担当医師が必要に応じて、骨髓採取時にヘパリンナトリウム注射液を用いる。
3. あらかじめ凍結しておいた保冷剤を搬送専用のクーラーボックスに入れ、担当医師は産業技術総合研究所まで骨髓を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10 以上30 未満で保たれるようにし、骨髓採取から12時間以内に産業技術総合研究所CPCに搬入するようにする。

### **:受入工程**

1. 産業技術総合研究所の居室において、グループ長もしくは管理責任者が骨髓の状態等の確認をする。
2. 産業技術総合研究所まで骨髓を搬送した担当医師は、骨髓採取時間や骨髓に関する報告を行う。
3. 製造管理責任者は骨髓採取から12時間以内にCPCへ搬入できることを確認する。同様に温度記録計より搬送中、骨髓が10 以上30 未満に保たれていたことも確認する。

以降は産業技術総合研究所CPC細胞調製室での作業

産業技術総合研究所CPC細胞調製室へは、決められた手順に従い入室する。

CPC細胞調製室に持ち込む試薬、消耗品についての情報、各工程の作業記録は製造指示図記録書に記録する。

### **:FBS(牛胎児血清)培地調製工程**

FBS培地の調製

1. 分注し凍結保存されているFBSを骨髓採取日の前日にサプライ室薬品保冷库(冷凍)から必要本数取り出し細胞調製室薬品保冷库(冷蔵)に移し解凍する。
2. 硫酸ゲンタマイシン(40mg/mL)1mLをPBS7mLで希釈し5mg/mLの濃度に調製する。
3. -MEM 500mLに解凍したFBS 88mLと希釈したゲンタマイシン2.4mLを添加する。
4. ボトルトップフィルター 150mL 0.22μmで吸引濾過する。

5. 同様の手順で必要量を調製する。
6. 調製後のFBS培地を一部採取して持ち出し、無菌試験Aおよびエンドトキシン試験を行う。

培養に用いる FBS は牛海綿状脳症の発生していない地域原産で放射線照射処理されたものを使用する。

### **:細胞培養工程(1次培養)**

#### (1) 骨髄の播種

1. 骨髄を採取したアシストチューブは4 にて900rpm、10分間、遠心分離を行う。ただし、分離が悪ければ追加で遠心分離する。
2. 遠心分離後の骨髄は、下層から赤血球層、有核細胞層(buffy coat)、血漿の3層に分離されるので確認する。
3. 注意深く血漿を吸引除去する。
4. 新しい50mLチューブに残った赤血球層と有核細胞層をプールする。
5. 骨髄を搬送してきたアシストチューブにPBSを添加して、無菌試験Aを行う。
6. 75cm<sup>2</sup>フラスコ当たりの分注量(骨髄+培地)が15mLとなるように、FBS培地をプールした赤血球層と有核細胞層に追加する。
7. フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
8. フラスコに骨髄を播種する。
9. 37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。

#### (2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 目視にて培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べる。
2. 培養上清を吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含め

た培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

### (3) 間葉系幹細胞の回収

1. TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素) をサプライ室薬品保冷庫 (冷蔵) から必要本数持ちこむ。
2.  $\times 40$ 、 $\times 100$ の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. フラスコの培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectを75cm<sup>2</sup>フラスコに2mL添加し、インキュベーター内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 回収した細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
11. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。
12. 回収した細胞浮遊液は4にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、培養上清を吸引除去する。
13.  $5 \times 10^5$  cells/mLにResuspensionする。
14. 継代に必要な細胞浮遊液 ( $5 \times 10^5$  cells/75cm<sup>2</sup>) を50mLチューブにとる。

### **:細胞培養工程(2次培養)**

#### (1) 間葉系幹細胞のフラスコへの播種

1. 播種する75cm<sup>2</sup>フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
2. 培養スケジュールと培養培地残量より10~13mLの範囲でフラスコあたりの培地量を決定する。
3. 継代用細胞浮遊液の入った50mLチューブにFBS培地を加える。

4. フラスコに細胞浮遊液を播種する。
5. 37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。
6. マイコプラズマ否定試験用として細胞浮遊液2000 μL ( $1 \times 10^6$  cells) にFBS培地を加え、6 well plateの2 wellへ播種し、それもインキュベータで培養する。
7. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数持ち込み、余剰細胞は凍結保存する。

必要細胞数が多い場合は、75cm<sup>2</sup>フラスコでは本数が多くなるので、225cm<sup>2</sup>フラスコの使用を製造管理責任者は検討する。その場合、培地量および播種する細胞数は面積に合わせて調整する。

#### (2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 培養上清を吸引除去する。
2. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
3. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
4. マイコプラズマ否定試験用プレートも2mL/well で培地交換を行う。
5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含めた培養スケジュールを再検討する。

上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。

225cm<sup>2</sup>フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

#### (3) 搬出前、最終培地交換

1. 培養上清の一部をチューブに採取して持ち出し、無菌試験Bを行う。
2. 残りの培養上清は吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量に不足が見られる場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する
5. マイコプラズマ否定試験用プレートを持ち出し、マイコプラズマ否定試験を行う。

225cm<sup>2</sup>フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

(4) 間葉系幹細胞の回収

1. サプライ室薬品保冷庫(冷蔵)のTrypLE Selectを必要本数持ち込む。
2. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. 培養上清の一部をチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectをフラスコに2mL(225cm<sup>2</sup>フラスコの場合は5mL)添加し、インキュベータ内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。
11. 沈殿した全細胞を50mLのPBSに懸濁する。
12. 4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄1回目)
13. 沈殿した細胞を50mLのPBSに懸濁する。
14. 細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
15. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。移植に必要な量(患者体重(kg)×10<sup>6</sup>個以上)の細胞が確保できているか、生存率が80%以上であるか確認する。
16. 細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄2回目)
17.  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mLになるようにPBSを用いて細胞浮遊液を調製する。
18. 参考品等に必要な量の細胞浮遊液を別のチューブにとる。
19. 残りの移植用細胞浮遊液は4 にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄3回目)
20. 新しいPBSを開封し、移植用間葉系幹細胞を10mLのPBSに懸濁する。
21. 清潔下、安全キャビネット内に滅菌シートを広げ、シート上に新しい50mLチューブとアシストチューブを取り出す。
22. アシストチューブを差し出し、別の作業者に移植用細胞浮遊液を入れてもらう。このとき、

元のチューブに残った細胞浮遊液は無菌試験A、エンドトキシン試験に出す。

23. 移植用間葉系幹細胞が入ったアシストチューブを50mLチューブに入れ二重包装にする。
24. 50mLチューブに症例IDと細胞数を記載し、チューブ立てに立てて細胞調製室外に搬出する。
25. 製造責任者は細胞保存室にてチューブに記載してある症例IDを患者医療機関IDに変換する。
26. 搬送専用クーラーボックス内へ温度記録計とともに梱包する。
27. 搬送専用クーラーボックスにも患者医療機関IDを記入して、居室へ運ぶ。
28. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数細胞調製室へ持ち込み、18.で取り分けておいた細胞は凍結保存する。
29. 未使用のFBS培養培地と移植用間葉系幹細胞を懸濁させたPBSはクライオチューブに採取し参考品として保管する。

細胞数が必要量に満たない場合、 :細胞培養工程(2次培養)(1)から繰り返す。ただし、移植用間葉系幹細胞は、安全性を考慮して培養日数は1ヵ月以内で継代回数3回までとする。

### **:受渡工程**

1. 居室にて管理責任者または品質管理責任者が安全性試験の結果等を担当医師に説明し、担当医師は調製した細胞の品質と安全性を判断する。
2. 担当医師は搬送専用クーラーボックスの中身を確認し、島根大学附属病院まで間葉系幹細胞を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、移植はCPCを出てから12時間以内に完了するようにする。

### **:細胞移植工程**

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスのまま、島根大学附属病院の病室に細胞浮遊液を持ち込む。この時、担当医師は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10℃以上30℃未満に保たれていた事を確認する。

2. 50mLチューブから細胞浮遊液が入っているアシストチューブを取り出し、沈殿している細胞を攪拌し注射器で吸引する。
3. 経静脈的に間葉系幹細胞を投与する。
4. 担当医師は産業技術総合研究所に、温度記録計の入った搬送専用クーラーボックスを返却する。製造管理責任者は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10 以上30 未満に保たれていた事を確認する。

## <間葉系幹細胞の安全性試験>

各試験で使用する試薬についての情報、作業の記録は、オリジナルデータを含め所定の記録様式を用い、文書として保管する。

### エンドトキシン試験

エンドトキシン試験は住化分析センターに委託する。（日本薬局方（ゲル化法）に準拠）

#### （１）委託

1. 培養担当者から試験サンプルを受け取る。委託する検体は、サンプリングした試験サンプルから安全キャビネット内で無菌的に必要量（2.5mL以上）を分取し、委託検体名を記載したアシストチューブに移したものとする。
2. 検体を委託する。
3. 報告書を受領する際は以下の内容を確認する。
  - ・ 分析・試験項目
  - ・ 検体名
  - ・ エンドトキシン濃度
  - ・ 委託先責任者、担当者印
4. 試験結果の受け入れ承認は品質管理責任者が行う。

#### （２）判定

承認された報告書のエンドトキシン濃度により、判定を行う。

- ・ エンドトキシン濃度が $<0.5$  EU/mLの時、陰性と判定する。（試験終了）

（\*日本薬局方における「生理食塩水」のエンドトキシン濃度は $<0.5$  EU/mL）

- ・  $0.5$  EU/mLを超える場合は陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
- ・ 判定不能（試験無効など）の場合も、要再試験と判断する。

### (3) 再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 手順(1)に従い委託先に再試験の依頼を行う。委託検体名は再試験であることが明確なものにする。
3. 手順(2)に従い、試験結果の判定を行う。
  - ・ 再試験で陰性判定の場合は、当該間葉系幹細胞を陰性と判断する。
  - ・ 再試験でも陽性が疑われる場合は、ただちに状況を品質管理責任者に報告する。

品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

### (4) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

## **無菌試験(細菌・真菌検査)**

間葉系幹細胞の工程内試験及び調製試液の無菌試験の際は「無菌試験A」を、間葉系幹細胞の最終試験の際は「無菌試験B」を実施する。

無菌試験を行う際は、専用白衣(青色)を着用する。ディスポーザブルのゴム手袋を装着し、クリーンベンチ内に入る部位(手、腕)のエタノール消毒を行って検体を取り扱う。

## 無菌試験A

BacT/ALERT 3D微生物培養システムを利用する。

BacT/ALERT機器にサンプルを播種した専用培養ボトルを設置し、培養および判定は機器に負う。

使用する専用ボトルの有効期限を確認し、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。

### ( 1 ) BacT/ALERT専用培養ボトルへの検体サンプル播種

1. 培養担当者または試薬の調製者より受け取ったサンプルは試験開始まで室温で保管する。受け取り後は5時間以内に無菌試験を実施すること。
2. 安全キャビネット内にサンプル及び以下のものを準備する。すべて70%エタノールで清拭し、消毒してからキャビネット内に入れること。
  - ・ 5 mLシリンジ
  - ・ 21 G注射針
  - ・ サインペン
  - ・ BacT/ALERT FA培養ボトル(好気性菌用)サンプル1本につき1つずつ用意する。
3. ボトルに症例IDから年齢性別を除いたもの(以下、検体ID)、サンプル名、試験日を記入する。
4. ボトルから緑のキャップを取り去りゴム部分を70%エタノールで十分に清拭する。
5. シリンジに針を取り付け、サンプルを2 mL 吸引する。
6. ボトルのゴム部分に針を立てる。(陰圧によりサンプルが自動的に注入される。)
7. シリンジを引き抜き、注入部のゴムを70%エタノールで清拭する。
8. 使用したシリンジ・注射針等の鋭利な感染性廃棄物は安全キャビネット内に備え付けの専用箱に一時保管し、全ての作業終了後にプラスチック製の医療系廃棄物入れに捨てる。(安全のため、リキャップはせずにそのまま廃棄すること)
9. サンプルの残りはフタをしてパラフィルムで封をし、冷蔵庫で保存する。
10. ボトルはBacT/ALERT機器に設置し、培養を行う。

## ( 2 ) BacT/ALERT機器への設置、培養

ボトルの機器への設置、取り出しは必ず1本ずつ行うこと。

( 複数本同時に扱う場合は前のボトルの処理が終わってから次のボトルを取り扱う。 )

1. BacT/ALERTメイン画面からボトル設置ボタンを押し、設置モードへ切替える。
2. ボトルID入力: バーコードを読み取らせる、またはキーボードにて直接入力する。
3. 検体受付番号入力: ボトル名を登録する。ボトル名は[検体ID\_サンプル名\_試験日] ( 15文字まで ) とする。
4. ラックを引き出し、緑のランプが点灯しているセルにボトルを設置する。
5. 各ボトルについて2~4を繰り返す。
6. 全てのボトルを設置し終わったらラックを閉じる。
7. 最後にチェックボタンを押し、設置モードを終了する。
8. 7日間、35 ℃ で培養する。

## ( 3 ) ボトルグラフの表示と印刷

培養期間中いつでもボトルグラフの確認が出来る。

1. メイン画面中央のラック状況確認コマンドからボトルの設置位置を確認する。
2. メイン画面から画面右下の右矢印ボタンで、セットアップ画面に移動する。
3. パスワードを入力する。
4. ボトル編集ボタンを選択する。
5. 表示したいボトルのセル位置を指定する。
6. 画面右下のグラフボタンでボトルグラフを表示させる。
7. 画面右下の印刷ボタンを押し、結果をプリントアウトする。

## ( 4 ) 判定

試験後、使用した機器に間違いはないか、校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。

<1次判定>

培養3日目に1次判定を行う。BacT/ALERT の画面に陽性判定表示が出ていないかを確認する。手順（3）に従いボトルグラフを表示し目視によるCO<sub>2</sub>量変動の確認を行う。

- ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定し、培養を続行する。
- ・ グラフの上昇が認められる場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。

#### <最終判定>

1. 陰性のまま培養7日間が過ぎたボトルは、メイン画面に判定結果が表示される。（陰性の場合には陰性ボトルのボタンが青色に点灯し、陽性の場合には画面全体が黄色になり、陽性ボトルのボタンが点灯する。）
2. 機器の判定を参考に、以下の判定を行う。
  - ・ 機器の判定が陰性の場合、最終判定を陰性と判断する。（試験終了）
  - ・ 機器の判定が陽性の場合、要再試験と判断する。

#### （5）再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
3. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）、（2）と同様に無菌試験を行う。ただし再試験では1サンプルにつきボトル2本に播種する(n=2)。
4. 手順（4）～（6）に従い判定と処理を行う。
  - ・ 再試験で2本とも陰性判定の場合、最終判定を陰性とする。（試験終了）
  - ・ 再試験でいずれか1本または2本とも陽性判定の場合、ただちに品質管理責任者に状況を報告する。品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

#### ( 6 ) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

### **無菌試験B**

BacT/ALERT 3D微生物培養システム及び寒天平板表面塗抹法を併用する。

使用する培地の有効期限を確認し、有効なものを用いること。

( BacT/ALERT 専用ボトルの場合、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。平板培地は試験実施日が、使用期限内のものを用いる )

平板培地は1回の試験につき未開封の培地各1包 ( 10枚 ) を使用する。

#### ( 1 ) BacT/ALERT 専用培養ボトルへのサンプル播種

最終培地交換前サンプル( -1)および交換後サンプル( -2)を無菌試験A 手順 ( 1 ) と同様に培養ボトルに播種する。

( ただし1検体につきボトル3本に播種し(n=3)、ボトル名は -1a, -1b, -1c, -2a, -2b, -2cとする )

#### ( 2 ) BacT/ALERT機器への設置、培養

無菌試験A 手順 ( 2 ) に従いボトルを機器に設置する。

( 設置した翌日に培養中のボトルから培養液を一部採取し、平板培地に播種する )

### (3) 培養中のボトルの取り出し、平板培地播種

使用する平板培地は当日まで冷蔵庫に保管し、使用時に室温に戻す。(結露を解消するため、試験実施1時間程度前に包装を外して安全キャビネット内で静置する)

1サンプルにつき各培地3枚ずつ(n=3)、計6枚を使用する。

1. 安全キャビネット内に以下のものを準備する。
  - ・ 20 mLシリンジ
  - ・ 21 G注射針
  - ・ サインペン又はシール
  - ・ 15 mLチューブ
  - ・ トリプケースソイ寒天培地 6枚
  - ・ サブロー寒天培地 6枚
2. シャーレのフタにボトル名、日付、培地の種類を記載する。
3. 無菌試験A 手順(3)に従い、前日にBacT/ALERT機器に設置したボトルの培養状況を確認する。
4. -1の3本の内、取り出すボトルを1本選び(例: -1 c)、セル位置の確認をする。ラックを引き出し、選んだボトルを1本引き抜く。
5. ラックを閉める。
6. 取り出したボトルの周囲をエタノールでよく清拭した後、安全キャビネット内に入れる。
7. ボトルをよく振り、口のゴム部分をエタノールで清拭する。
8. 注射針を装着したシリンジで、ボトル内溶液を約9 mL引き抜く。(かなり力が必要)
9. 内容液を15 mLチューブに回収する。チューブにはサンプル名を明記する。
10. 取り出したボトルはゴム部分を清拭し、BacT/ALERT機器の元のセルに戻す。他のボトルと共に残り6日間培養し、機器による判定を行う。
11. -2ボトルについても同様に(3)3)~11)を繰り返す。
12. 回収した内容液は大きな浮遊物(活性炭など)を除くため、遠心する。(500×g、3分間)。チューブをクリーンベンチ内へ持ち込む際には、エタノールで清拭する。
13. 平板培地への播種作業前に、作業用ゴム手袋を滅菌手袋に交換する。
14. 内容液の上清を5 mLピペットを用いて3 mL吸引し、重ねた平板培地3枚に1

mL / plate滴下し、シャーレのフタを閉めてすぐに傾け、内容液を広げる。作業中の汚染を防ぐため、一度に播種する平板培地は 3 枚までとする。

15. 同様の操作を繰り返し1サンプルあたり 6 枚、合計 12 枚すべての培地に播種する。
16. 培地はフタをしたまましばらく安全キャビネット内に静置し、内容液を培地に染み込ませる。(すぐにインキュベータに入れる場合は、結露がない事を確認する)
17. 培地表面が乾燥した事を確認し、裏返して(フタが下になるようにして)重ね、インキュベータで7日間培養する。

・トリプケースソイ寒天培地 30

・サブロー寒天培地 25

#### ( 4 ) 最終試験の判定(搬出日)

##### 4 - 1 .搬出前判定

平板培地播種後2日目か3日目が搬出日になるので、搬出日の朝に判定を行う。

1. 平板培地は蓋をしたまま観察する。
  - ・ すべての培地にコロニーが認められない時、陰性と判定する。
  - ・ 平板培地はいずれかの培地にコロニーが1つ以上認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
2. 培養ボトルは平板培地播種に用いなかった2本について判定を行う。無菌試験A ( 4 ) に従い、ボトルグラフの目視による確認を行う。
  - ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定する。
  - ・ グラフの上昇が認められた場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
3. 平板培地の結果と培養ボトルの結果を合わせて搬出前判定を行う。
  - ・ すべて陰性の判定が出たとき、当該間葉系幹細胞を陰性と判定する。
  - ・ いずれか 1 つ以上で陽性が疑われるものがある場合は、品質管理責任者は各責任者に報告し、対応を協議する。

#### 4 - 2 .最終試験（搬出前）の陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### 4 - 3 .搬出準備

1. 品質管理責任者の指示を得て、BacT/ALERTのボトルグラフをプリントアウトする（培養ボトルはそのまま培養を続行する）。平板培地はTriplicateの内、1セット（4枚）をインキュベータから取り出す。残りの培地については最終判定日までそのまま培養を続行する。
2. 取り出した培地とプリントしたボトルグラフを担当医師に見せ、結果を説明する。

#### 4 - 4 .最終試験の再試験および再判定

品質管理責任者から指示があった場合、再試験を行う。

再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。

1. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順（1）～（3）に従いボトルへの播種および平板培地播種を行う。
2. 手順4 - 1に従い最終判定を行う。
  - ・ 再試験ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を陰性と判断する（試験終了）。
  - ・ 再試験でもどれか1つ以上陽性が疑われるものがある場合は、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### （5）陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

#### (6) 引渡し後の最終試験判定

製品引渡し後も培養を続けていた平板培地および培養ボトルについて、平板培地の培養7日目に最終判定を行うこととする（培養ボトルは培養8日目にあたる）。

手順（4）と同様に、判定と処理を行う。

- ・ 引渡し後の判定ですべて陰性の判定が出た場合は、最終試験を適合とする。
- ・ 引渡し後の判定でどれか1つ以上で陽性が疑われる場合、搬出前判定と同様に関係者で協議を行う。

#### (7) 平板培地の写真撮影

1. BacT/ALERT のボトルグラフをプリントアウトする。平板培地（8枚）はインキュベータから取り出して、写真撮影を行う。
2. 培養7日目に判定を行った後の平板培地をデスクに並べる。
3. シャーレのフタを取りデジタルカメラで上から撮影する。

### **マイコプラズマ否定試験**

市販の“Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR”（minerva biolabs, 一段 PCR 法）を用いる。

使用する市販の試薬、キットは、全てロット番号と使用期限を確認する。作業はすべてゴム手袋を着用して行う。

## ( 1 ) DNA回収

細胞溶解および DNA 抽出には PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation Kit (QIAGEN)を用いる。

1. 培養担当者より検体細胞培養プレート (6 well) を受け取る。
2. プレートから上清を除去し、Cell Lysis solution 300  $\mu$ l ずつ 2 well に添加する。
3. セルスクレーパーで細胞を掻きとり、ピペティングによりしっかりと懸濁する。1.5 ml チューブ 2 本に分けて回収し( 1 well 分/tube )、1 本を DNA 抽出用として以下に用いる。残りの 1 本は再試験に備えるため、試験結果の確認および判定が終わるまで冷蔵庫で保管する。
4. RNase A solution 1.5  $\mu$ l を添加し、よく混合した後、37  $^{\circ}$ C、30 min インキュベートする。
5. 室温に戻した後、Protein PPT Solution 100  $\mu$ l を添加する。
6. 白濁するまで激しく vortex する。
7. 15,000 rpm、3 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。
8. 2-propanol 300  $\mu$ l を加え、ゆっくりと約 50 回転倒混和する。DNA が見えてくることを確認する。
9. 15,000 rpm、3 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
10. ペレットを確認しながら上清を除去し、70%エタノール 300  $\mu$ l を添加する。
11. 15,000 rpm、1 min、4  $^{\circ}$ C にて遠心を行う。
12. 上清を全て除去する。
13. ペレットを乾燥させる。
14. 注射用水 15 - 30  $\mu$ l に溶解し、DNA サンプルとする。溶解する注射水の量は、ペレットの大きさで判断する。  
以下に使用する水は全て同一ロットの注射用水とする。

## ( 2 ) DNA 定量

1. 測定の 30 分前に吸光光度計のスイッチを入れる。
2. 吸光値測定用サンプル (DNA サンプル 10 倍希釈液) を用意する。(DNA サンプル 2  $\mu$ l + 注射用水 18  $\mu$ l)
3. パソコンを立ち上げ Genespec<sup>+</sup> (DNA)を起動させ、プリンタの電源を入れる。
4. 測定条件を入力する。
5. [編集]→

[測定条件編集] ・波長範囲：上限 300 nm、下限 220 nm

・光路長: 5mm

・積算回数：32

[核酸条件編集] ・計算モード：dsDNA

・希釈率：10

6. 10 µl 測定用セルを注射用水で洗う。
7. セルに注射用水 10 µl を入れてベースラインを測定する。
8. ベースラインが決定したら測定用 サンプルを 10 µl 入れて測定する。
9. 複数のサンプルを測定するときはサンプルごとにシートを替える。
10. シートにサンプル名(検体 ID、培養時期)、コメント(試験担当者名)を入力する。
11. [保存]→[一括ファイル保存]で全てのシートを 1 つのファイルとして保存する。
12. 波形をプリントアウトし、記録用紙の所定の欄に貼り付ける。
13. Genespec を終了し、吸光光度計の電源を切る。
14. 測定用サンプルを捨て、使用したセルは MQ 水で洗浄して所定の位置に戻す。

### ( 3 ) 上清サンプルの準備

1. 冷蔵庫から最終検査用培養上清を取り出す。
2. 安全キャビネット内で、少量を クライオチューブに分注する。
3. 実験台で 0.2 ml チューブに 50 µl を分注する。
4. PCR 機で 95 °C、5 min 加熱し、5 秒間スピンドウンする。
5. Sample A として以下に用いる。

### ( 4 ) PCR

PCR には以下のキットを用いる。

- ・ Venor GeM Mycoplasma detection kit for conventional PCR (minerva biolabs)
- ・ Ampdirect Plus (島津製作所)
- ・ Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)

1. DNA 定量で得られたデータに基づき、DNA サンプルを 100 ng/µl になるように注射用水で希釈し、Sample B として以下に用いる。
2. 冷凍保存の Venor GeM PCR キットのケースから、Ampdirect Plus (Buffer)、PCR grade water、Primer/Nucleotide Mix 及び Internal control DNA を取り出し、解凍する。
3. 8 連チューブを用意し、検体 ID と日付を記入する。
4. 下表に従い 1.5 ml チューブに (必要サンプル数 + 1) サンプル分の PCR Mixture

を調整する。

	1 サンプル分	6 サンプルで 試験を行う場合
Ampdirect Plus	12.5 µl	87.5 µl
PCR grade water	4.87 µl	34 µl
Primer/Nucleotide Mix	2.5 µl	17.5 µl
Nova Taq *	0.13 µl	1 µl
合計	20 µl	140 µl

\* Nova Taq (酵素)は混合直前まで冷凍庫で保管し、使用後は直ちに冷凍庫に戻す。

5. よく混合した後、8 連チューブに 20 µl ずつ添加する。
6. 下記の表にしたがって Sample , Internal control DNA , Extra H<sub>2</sub>O (注射用水)を加える。
7. \*添加時、内容液がチューブ外面に付着しないように注意する。交差汚染を防ぐため、残りのサンプル、試薬類は確実にキャップをして片付ける。マイコプラズマ DNA はコントロールとして使用しない。

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Sample name	Negative control	Positive control	Sample A (培養上清)	3 + Internal control	Sample B (細胞 DNA)	5 + Internal control
PCR mixture	20	20	20	20	20	20
Sample	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Internal Control DNA	-	2.5	-	2.5	-	2.5
Extra H <sub>2</sub> O	5	-	2.5	-	2.5	-
Total	25	25	25	25	25	25

8. キャップを確実に閉めて混合し、スピンドウンする。
9. 以下の条件で PCR を行う。

### Thermal Profile

1 cycle	95 for 10 min
39 cycles	94 for 30 sec
	55 for 30 sec
	72 for 30 sec
cool down	15 for

\* 最終の保持温度は PCR 機の結露を防ぐため 15 とする。

10. PCR が終了したら、PCR 産物は電気泳動を行うまで冷蔵庫で保存する。

#### ( 5 ) 電気泳動

1. 以下の通り、サンプルを 2% agarose gel にロードし 100 V、1×TAE で 30 分程度泳動する。

Lane M . 100 bp Ladder Marker

Lane 1. Negative control

Lane 2. Positive control

Lane 3. Sample A

Lane 4. Sample A + Internal control

Lane 5. Sample B

Lane 6. Sample B + Internal control

2. EtBr で染色して UV 照射下で写真を撮る。

#### ( 6 ) 結果の確認

1. 電気泳動写真を見て、以下の試験成立基準を確認する。これら全てが満たされていない場合は試験が成立していないと判断し、PCR をやり直す。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

・ Lane 1 にバンドが認められない

・ Lane 2 に 1 本 ( 191 bp 付近 ) のバンドが認められる。

・ Lane 4, 6 に 1 本 ( 191 bp 付近 ) のバンドが認められる。

(lane 3, 5 で標的のバンド (265-278 bp) が認められた時は、この基準を満たさなくてよい)

\* 191 bp . . . Internal control DNA 増幅産物サイズ

Lane2, 4, 6 にバンドが認められない場合は、サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性があるため、当該サンプルを希釈して PCR をやり直す。培養上清サンプルは 5 倍に希釈し、加熱処理を行う。

再測定の前には試薬の有効期限、操作手順及び試験機器の点検・校正状況の再確認を行う。PCR をやり直しても基準を満たさない場合は試験不成立として、品質管理責任者に状況を報告する。

#### ( 7 ) 判定

手順 ( 6 ) で基準を満たしたサンプルについて、以下の判定を行う。

試験に使用した機器に間違いはないか、点検・校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。いずれの場合も、非特異的増幅、プライマーダイマーによるバンドは無視する。

- ・ Lane 3, 5 のいずれにもバンドが認められない場合、陰性と判断する。
- ・ Lane 3, 5 のいずれかで 265 – 278 bp 間にバンドが認められる場合、陽性と判断する。

#### ( 8 ) 再試験および再判定

##### **再試験 A**

陽性または擬陽性の判定が出た場合は、品質管理責任者の指示を受け、以下の手順で再試験 A-1 および A-2 を行う。

#### 8 - 1.再試験 A-1 および A-2

1. 本試験で用いた DNA サンプルおよび上清サンプルを希釈し直した上で、手順（４）に従い PCR を行う（A-1）。
2. 手順（３）で保管しておいた細胞懸濁液を用いて再度サンプルを調製し、手順（４）に従い PCR を行う（A-2）。
3. 手順（６）、（７）に従い、A-1 および A-2 の判定を行う。
  - ・どちらも陰性の場合、最終判定を陰性とする。
  - ・どちらか、または両方で陽性の場合、状況を品質管理責任者に報告する。

#### 再試験 B

再試験 A でも陽性または擬陽性の判定が出た場合は凍結保存細胞を融解し、以下の手順で再試験 B-1 および B-2 を行う。

#### 8 - 2.参考品からのサンプリング

1. 凍結保存しておいた細胞の参考品を 1 本（ $5 \times 10^5$  cells/ml, 500  $\mu$ l）融解する。
2. 融解した細胞懸濁液のうち、200  $\mu$ l は培地で洗浄した後、6 well plate の 1 well に播種し、培養を行い、再試験 B-2（手順 8 - 4）に用いる。
3. 残りの 300  $\mu$ l の細胞懸濁液を用いて再試験 B-1（手順 8 - 3）を行う。

#### 8 - 3.再試験 B-1

- 1 手順 8 - 2 で採取した細胞懸濁液 300  $\mu$ l から DNA を抽出、精製して、手順（４）に従い PCR を行う。
- 2 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
- 3 手順（６）、（７）に従い判定を行う。
  - ・ 陰性場合は手順 8 - 4 に進んで再試験を続行する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管

理責任者に報告する。

#### 8 - 4 .再試験 B-2

再試験 B-2 には手順 8 - 2 で培養を開始した参考品の細胞および再サンプリングした間葉系幹細胞の培養上清の計 2 サンプルを用いて試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に上清の再サンプリングを依頼する。
2. 2 回の培地交換を経た参考品の培養細胞を用いて、5-1 からの方法に従い DNA サンプルを作製する。
3. 手順(4)に従い PCR を行う。再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼動状況のチェックを行う。
4. 手順(6)、(7)に従い判定を行う。
  - ・ 陰性の場合、最終判定を陰性とする。ただし、再試験 B による判定であることを品質管理責任者に報告する。
  - ・ 陽性反応が認められた場合は当該間葉系幹細胞を不適合品とし、状況を品質管理責任者に報告する。

#### (9) .陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

## 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 骨形成能の研究

研究分担者 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）

### 研究要旨

この研究期間内に同種間葉系幹細胞の移植をおこなった2症例の長期でのレントゲン像ならびにCT像の解析をおこなった。症例1では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。また、移植前にみられた頭蓋骨の形成不全も改善し、この良好な石灰化も移植後持続していた。しかし、長管骨脆弱性は残存していた。症例2では移植前にみられた非石灰化骨端線の拡張は改善し、さらに長管骨の変形も生じなかった。しかし、症例1と同様、骨の脆弱性は残存していた。また、これらの症例には複数回の移植をおこなったが、この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。これらの検証により、複数回用い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。以上より、本疾患患者に対する同種幹細胞移植の有用性が確認されるも、骨の脆弱性の問題を解決すべく、さらなる研究が必要である。

### A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要なALPが生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種の間葉系幹細胞を患者に移植して骨形成能を付与することにある。しかし、その検証には間葉系幹細胞移植前にみられる骨成長不全の改善と、移植に用いる間葉系幹細胞

が骨分化能を有することが必須である。以上の点をふまえて、分担研究者大串は、継時的な移植後における患者の画像解析（レントゲン撮影とCT撮影）をおこなうとともに、これまでに複数回用いたドナー間葉系幹細胞の骨分化能を検証した。すなわち、本研究の有用性を骨形成解析という側面から検討することを目的とした。

## B. 研究方法

骨成長の画像解析においては島根大学で通常のレントゲン撮影とCT撮影をおこなった。ドナー同種間葉系幹細胞の骨分化は、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 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いて以下の方法によりおこなった。

### 骨分化能解析

・ MSCを基礎培地に浮遊し $2 \times 10^4$  cell/s/1.5mL /wellで12well plateに播種する。

(この時の濃度は5000cells/cm<sup>2</sup>となる)

・ 播種翌日(又は細胞接着後)、6 wellを基礎培地に添加因子3種をそれぞれ100分の1ずつ加えた誘導培地(Dex(+))に交換する。(コントロールとして残りの6 wellはβ-GPのみ加えた培地(Dex(-))に交換する。)

・ Dex(+), Dex(-)各6 wellのうち、5 wellにCalceinを100分の1加える。

・ 添加因子を加えた培地で週2-3回培地交換をおこない、2週間培養する。

・ イメージアナライザー(タイフーン)で蛍光強度を測定し、石灰化基質の定量を行う。

・ DNA bufferを0.5mLずつ各wellへ添加し、細胞を回収する。

・ 回収した細胞を超音波破碎する。

・ DNA量を定量する。

・ ALP活性を測定する。

・ DNA 1μgあたりのALP活性を計算す

る。

基礎培地：15%FBS/αMEM(抗生物質+)

添加因子

・ β-GP：β-Glycerophosphate disodium salt (CALBIOCHEM: 35675)

作成法 β-GPを精製水に1Mとなるように溶解 ろ過滅菌

・ Vit.C：L-アスコルビン酸リポ酸エステルマグネシウム水和物 (Wako: 013-12061)

作成法 Vit.C をPBSに2.05mg/mLとなるように溶解 ろ過滅菌

・ Dex：Dexamethasone (SIGMA: D-8893)

作成法 1mg入りの瓶に1mLのエタノールを添加 24mLのPBSを添加

PBSでさらに10倍希釈 ろ過滅菌

・ Calcein (3,3'-Bis[N,N-bis(carboxyethyl)-aminomethyl]fluorecein)：(Dojin:344-00431)

作成法 CalceinをPBSに0.1mg/mLとなるように溶解 ろ過滅菌

・ DNA Buffer：100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA[pH 7.4]溶液

### (倫理面への配慮)

患者のレントゲン撮影やCT撮影に関しては、本計画提案時の研究計画ならびに患者(家族)への説明文章にかかっている。さらに、骨形成能の解析についても、本計画提案時の研究計画ならびに患者(家族)への説明文章にかかっている。以上より倫理面での問題は無い。

### C . 研究結果

症例 1 の移植前のレントゲンの像を図 1 に示す。これに見られるように長管骨の両端には骨形成不全の像がみられる。これはビタミン D の不足によって生じる、くる病の変化と類似であり、膝関節での脛骨の下端と大腿骨の上端に凹状のレントゲン透過像(キャッピング)として見られる。



図 1. 症例 1 の移植前のレントゲン

このキャッピングは間葉系幹細胞移植後に消失し、骨端部での骨形成不全は改善された。このキャッピングが再度あらわれることは無く、症例 1 の患者の 4 才 6 ヶ月の時点でのレントゲン像(図 2)でも、この消失は長期にわたり確認できた。しかし、大腿骨や下腿骨全体に骨の脆弱性がみられ、さらに右大腿骨の中央にこれまでに生じなかった骨折がみられた。



図 2. 症例 1 の 4 才 6 ヶ月でのレントゲン像

症例 1 の移植前の CT 像を図 3 に示す。この像に見られるように、レントゲンでみられた骨端部の骨形成不全が CT 像でもみられる。また、この CT では頭蓋骨の顕著な骨形成不全がみられ、頭蓋骨に著名な骨透過像が見られる。これらの骨形成不全は移植により改善される。図 4 に見られるように、移植後 1 年で、頭蓋骨はほぼ正常の骨にまで回復している。また、骨端部の骨形成も改善した。これらの骨形成の改善は引きつづき確認でき、患者の 4 才 6 ヶ月の時点での CT 像(図 5)においても見られる。しかし、骨強度の改善は不完全であり、レントゲン(図 2)にみられる右大腿骨の骨折が確認できる。また、全体に大腿骨が湾曲しているのも見られる。



図 3. 症例 1 の移植前の CT 像



図 4 症例 1 の移植後 1 年の CT



図 5. 症例 1 の 4 才 6 ヶ月での CT 像

以上より、症例 1 では移植による骨形成の促進、特に頭蓋骨や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 においては、症例 1 のレントゲン像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（図 6）。この非石灰化骨端線は移植後に改善し、長期（2 才の時点）でも改善していた（図 7）。CT の画像でも同様の所見を得た（図 8）。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。



図 6 症例 2 の 1 歳のレントゲン像



図 7. 症例 2 の 2 才でのレントゲン像

これまでに、両症例に対して複数回の間葉系幹細胞の移植をおこなってきた。レントゲン像や CT では、移植間葉系幹細胞が患者の骨に生着して新たな骨形成を生じていることを示唆され、この同種の幹細胞移植が有効であると思われた。

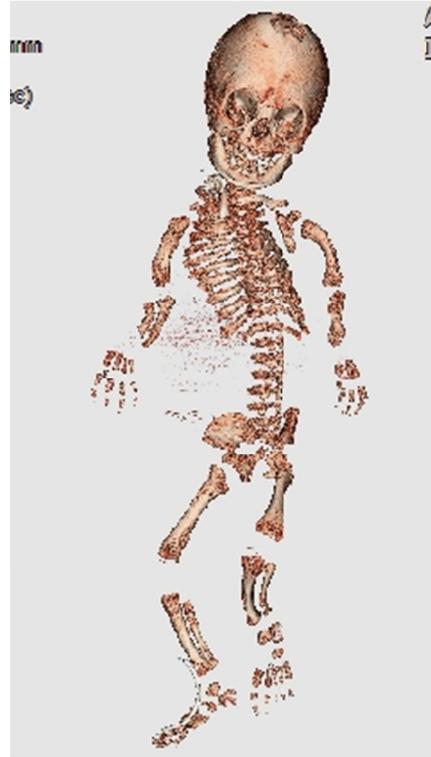


図 8. 症例 2 の 2 才での CT 像

しかし、骨の脆弱性は残存し、移植された幹細胞の骨分化能に関する検証が必要である。特に、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、今回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おこなった。

図 9,10 のように、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。これにより、ドナー骨髄から得られた間葉系幹細胞の骨分化能が確認された。

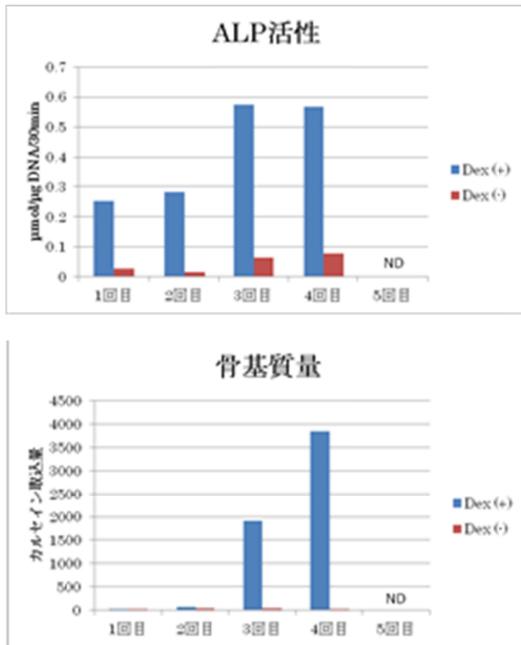


図 9. 症例 1 の骨形成比較

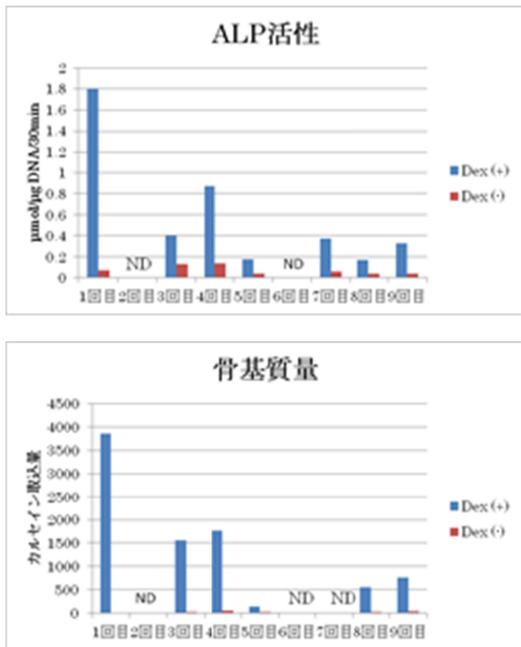


図 10. 症例 2 の骨形成比較

#### D. 考察

この研究において、ドナー間葉系幹細胞の移植により、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、同種の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、今後長期にわたり、さらなる検証を必要となる。

#### E. 結論

この研究期間におけるレントゲンと CT 像の継時的な画像比較で、間葉系幹細胞の移植後長期にわたって骨端部分の骨構築が改善されたことが確認できた。また、移植された間葉系幹細胞が骨形成分化能を有していたことも確認できた。しかし、四肢の皮質骨の脆弱性は残存し、特に症例 1 においては大腿骨骨幹部の骨折がみられた。以上を踏まえると、同種間葉系幹細胞を用いての本疾患治療の有用性が示されるも、さらなる症例において同種間葉系幹細胞の移植研究を引きつづき行うことが重要である。また、今後の研究においては、移植細胞数を増やすなどの計画の変更も視野にいれるべきかと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

## 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

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**

**-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-**

**研究分担者 福田 誠司（島根大学医学部小児科 准教授）**

**研究要旨**

低ホスファターゼ症は、骨の石灰化障害を来す疾患である。今回の臨床研究では骨髄移植を行い、その後骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を複数回移植して、骨の石灰化を回復させる骨再生医療である。間葉系幹細胞の効果を明らかにするために、移植後の造血および間葉系幹細胞のキメリズム解析を行った。また、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、*TNSALP* 遺伝子変異解析および疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。さらに、間葉系幹細胞の細胞特性を検討した。キメリズム解析において、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。生着率が低い理由として、間葉系幹細胞の遊走能や生着能が低いことが考えられた。また、この病態に関して、間葉系幹細胞および骨芽細胞の遺伝子発現について、健康人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。*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。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。しかし、細胞増殖能が低く未分化能を維持することが困難であったため、未分化マーカーである ALP（この疾患では遺伝的に欠損している）がこれらの機能に関与している可能性が示唆された。さらに、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。このことは、移植後に生着する間葉系幹細胞が少ないことを回復させる可能性が示唆された。

## 研究協力者

服部美保 (島根大学医学部附属病院輸血部)

江田理恵 (島根大学医学部附属病院輸血部)

永瀬真弓 (島根大学医学部附属病院輸血部)

内藤真佑美 (島根大学医学部附属病院輸血部)

竹谷健(島根大学医学部附属病院輸血部)

安部真理子 (島根大学医学部小児科)

平出智裕 (島根大学医学部小児科)

勝部好裕 (産業技術総合研究所)

### A. 研究目的

低ホスファターゼ症は、骨および歯の石灰化障害を来す常染色体劣性遺伝疾患である。本研究では、石灰化を改善するために、骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植を行っている。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。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、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。また、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。さらに、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。

### B. 研究方法

#### 1. 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。

#### 2. 病態解明

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。

### 3. 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。したがって、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。

#### (倫理面への配慮)

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年度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。また、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. 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(図1)。

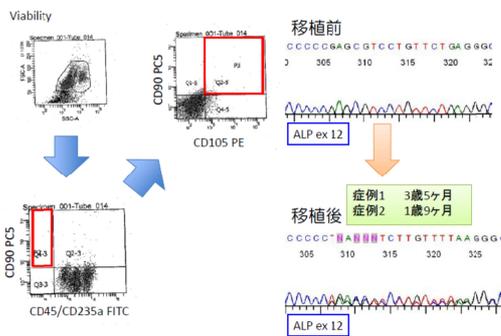


図 1. 間葉系幹細胞のキメリズム解析

## 2. 病態解明

### 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（図 2）。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（図 2）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、肺や脳の形成に関わる遺伝子も変動していた。

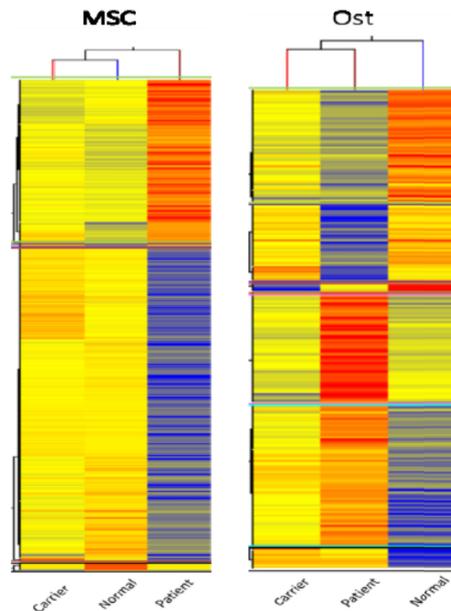


図 2. クラスタ解析ヒートマップ図

骨芽細胞は、階層クラスタリング解析（図 2）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も変動していた。

### 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（図 3）。*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（図 4）。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 ( 図 5 )

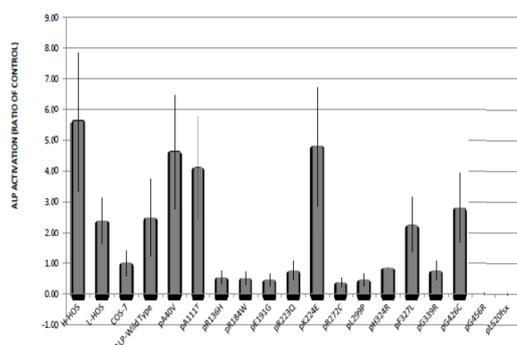


図 3. TNSALP 変異体の ALP 活性

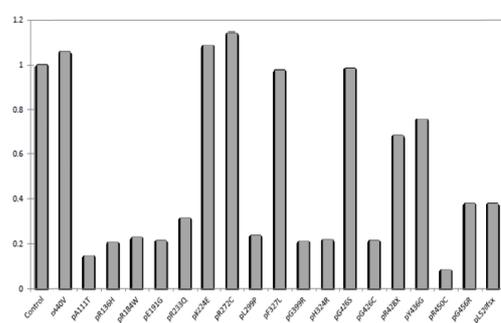


図 4. TNSALP 変異体の dominant negative 効果

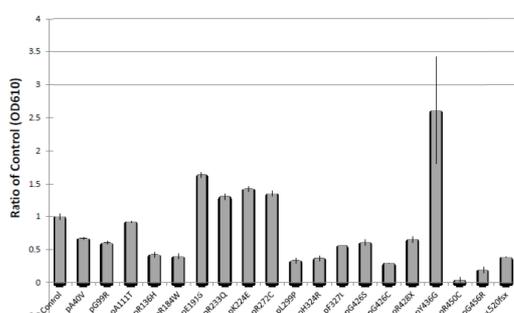


図 5. TNSALP 変異体の石灰化能

### 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 ( 図 6 )。しかし、iPS 細

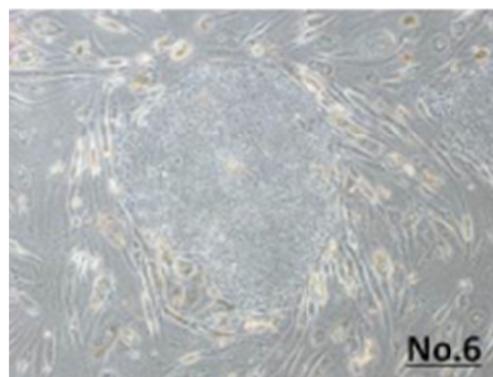


図 6. iPS 細胞クローンの顕微鏡写真(40 倍) 胞様の外観を示しているにも関わらず、通例 5~7 日ごとに 3~6 倍に増殖する iPS 細胞が、7~9 日で約 1.5 倍程度の増殖しか認められなかった。なお、ALP 染色において、呈色反応が確認できず陰性を確認した ( 図 7 )。



図 7. iPS 細胞の ALP 染色(40 倍)

### 3. 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

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 (図 8)。

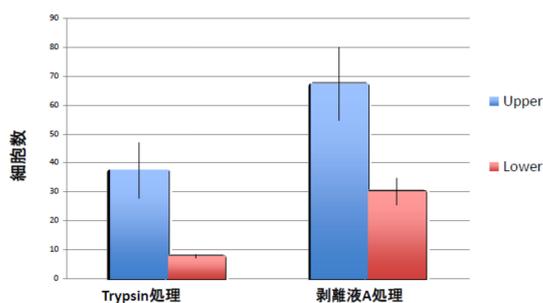


図 8.細胞剥離液の違いによる遊走能の変化

## 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 (図 9)。しかし、ロット間の差が認められた。(図 9)。

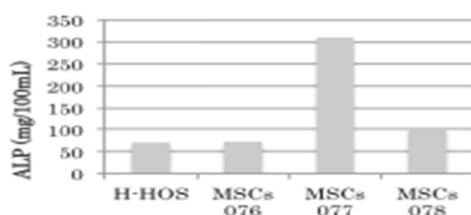


図 9. 骨分化後の ALP 活性

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。

## D. 考察

### 1. 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、そのキメリズムを解析行ったら、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。

### 2. 病態解明

#### 1) 網羅的遺伝子発現

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遺伝子が発現しており、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をノ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。

## 3. 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

る、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。

## E. 結論

今回の検討では、ドナー由来の間葉系幹細胞が生着していることを証明できた。臨床的には改善していることのエビデンスとなりうるが、長期間生着するか、検討する必要がある。病態解析では、ALP 変異体の機能を明らかにすることができただけでなく網羅的遺

伝子解析で骨だけでなくそれ以外の症状を引き起こす機序が明らかとなった。疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功したことで、今後、本疾患の障害部位である骨、中枢神経、肺などの細胞に分化させて、それぞれの機能解析を行い、病態解明を進めていくことが重要であると思われた。疾患特異的 iPS 細胞を樹立して、それぞれの組織について検証を行う必要がある。臍帯由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の細胞特性（ALP 活性、骨分化能、遊走能）に大きな違いは認められなかった。また、培養した間葉系幹細胞は剥離液を変えた程度では細胞特性も大きな違いはでない。この疾患の根治療法を目指すためにも、骨への遊走能、増殖能、免疫寛容効果の優れた間葉系幹細胞の樹立が不可欠であると思われた。

## F. 健康危険情報

なし

## 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

## 論文

### 平成 23 年度

1. Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, Kubo Y, Hattori K, Saito S, Horimoto K, Yuba S, Ohgushi H. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 285: 29270-29278, 2010
2. Kihara T, Haghparast SM, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J. Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 1-6, 2011
3. Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, Ohgushi H, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. *J Tissue Eng Regen Med* 10: 798-805, 2011
4. Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H. Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* (doi:10.1002/term.427), 2011
5. Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. *Hum Cell* 24: 2-8, 2011
6. Oliveira JM, Sousa RA, Malafaya PB, Silva SS, Kotobuki N, Hirose M, Ohgushi H, Mano JF, Reis RL. In vivo study of dendronlike nanoparticles for stem cells "tune-up": from nano to tissues. *Nanomedicine* 7: 914-924, 2011
7. Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahane M, Tanaka Y. Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone. *J Tissue Eng Regen Med* (doi: 10.1002/term.401), 2011
8. Hagiwara Y, Hattori K, Aoki T, Ohgushi H, Ito H. Autofluorescence assessment of extracellular matrices of a cartilage-like tissue construct using a fluorescent image analyser. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 163-168, 2011
9. Matsumoto T, Hattori K, Matsushima A, Tadokoro M, Yagyuu T, Kodama M, Sato J, Ohgushi H. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells on expanded polytetrafluoroethylene

coated with both a poly-amino-acid urethane copolymer and collagen. *Tissue Eng Part A* 17: 171-180, 2011

10. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 146-150, 2011

#### 平成 24 年度

11. Shimizu Y, Kihara T, Haghparast SM, Yuba S, Miyake J. Simple display system of mechanical properties of cells and their dispersion. *PLoS One* 7: e34305, 2012
12. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori K, Yuba S. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 6(4): 261-271, 2012
13. Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y,

Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H(CA). Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 6(4): 253-260, 2012

14. Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahane M, Tanaka Y. Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone. *J Tissue Eng Regen Med* 6(2): 96-102, 2012
15. Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product *J Tissue Eng Regen Med* 6(7): 550-558, 2012
16. Ogawa M, Tohma Y, Ohgushi H(CA), Takakura Y, Tanaka Y. Early Fixation of Cobalt-Chromium Based Alloy Surgical Implants to Bone Using a Tissue-engineering Approach. *Int J Mol Sci* 13(5): 5528-5541, 2012

17. Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Ohgushi H. Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* (doi: 10.1002/term.1674), 2012
- 平成 25 年度
18. Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J. Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells. *J Biosci Bioeng* 116(3): 380-385, 2013
19. 弓場俊輔, 竹谷健. 間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療. *血液フロンティア* 23: 487-493, 2013
20. Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ohgushi H, Fukuda S, Yamaguchi S. Therapy-related Ph+ Leukemia after both BMT and MSCT for Hypophosphatasia. *Pediatr Int* 55: e52-55, 2013
21. Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child* (doi:10.1136/archdischild-2013-305037), 2013
22. Teraoka K, Kato T, Hattori K, Ohgushi H. Evaluation of the capacity of mosaic-like porous ceramics with designed pores to support osteoconduction. *J Biomed Mater Res A* 101(12): 3571-3579, 2013
23. Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 438(4): 753-759, 2013
24. Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y. Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 7(1): 51-60, 2013
25. Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 14(2): 197-208, 2014
26. 松末吉隆, 勝呂徹, 大串始, 佐藤正人, 中村憲正, 松田秀一, 和田佑一. 自家培養軟骨. 使用要件等基準策定

ワーキンググループ報告書，社団法人日本整形外科学会，pp1-52, 2013

## 学会発表

### 平成 23 年度

1. 大串 始．整形外科における再生医療（骨・関節疾患 - 重度先天性骨代謝疾患治療）．第 13 回なにわ整形外科研究会，大阪，2011 年 1 月 29 日
2. 大串 始．バイオマテリアル上での幹細胞の増殖と分化．大阪市立大学重点研究「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第一回シンポジウム，大阪，2011 年 2 月 14 日
3. 大串 始．骨・関節の再生テクノロジー（体性幹細胞を用いての臨床から iPS 細胞まで）．第 17 回青森県骨軟骨シンポジウム，青森，2011 年 3 月 4 日
4. 竹谷健．低ホスファターゼ症に対する同種骨髄移植併用間葉系幹細胞移植 第 59 回日本輸血・細胞治療学会，東京，2011 年 4 月 14-16 日
5. 廣田篤史，奈良昇之助，竹田知洋，久枝義也，天方秀輔，櫻井裕子，中尾厚，川上義，竹谷健．低フォスファターゼ症に対する間葉系幹細胞移植．第 21 回城南新生児・未熟児研究会，東京，2011 年 5 月
6. 小山千草，竹谷健，三原綾，高野勉，美根潤，山口清次．骨髄移植と間葉系幹細胞移植を併用して治療した周産期型低ホスファターゼ症の 2 例．第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会，札幌，2011 年 7 月 10-12 日
7. 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 回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2011 年 7 月 28-30 日
8. 大串 始．骨再生医療の現況と展望．第 29 回骨代謝学会学術集会，大阪，2011 年 7 月 28-30 日
9. 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・がん学会学術集会，前橋，2011 年 11 月 25-27 日
10. 大串 始．幹細胞を用いた骨再生医療．骨粗鬆症財団主催 第 57 回教育ゼミナール講演，東京，2011 年 12 月 2 日
11. 大串 始．骨・関節領域における再生医療の現況．技術情報協会主催「実用化に向けた骨・関節領域における再生医療の現況と展望」研修会（招待講演），東京，2011 年 12 月 21 日
12. 大串 始．間葉系幹細胞を用いた再生医療の動向．産業技術総合研究所インテレクチャルカフェ「再生医療用細胞製造システムの将来と事業展望」（シンポジスト），尼崎，2012 年 2 月 15 日
13. 大串 始．関節疾患再生医療の現況．技術情報協会主催「関節疾患治療薬の開発とメディカルニーズ」（招待講演），東京，2012 年 3 月 28 日

### 平成 24 年度

14. Taketani T, Onigata K, Kanai R, Kobayashi H, Mushimoto Y, Mihara A, Oyama C, Fukuda S, Yamaguchi S . Clinicogenetical Characteristics of Japanese patients with Hypophosphatasia . the 6th International Alkaline Phosphatase Symposium, Huningue, France, May 16-19, 2012
15. 竹谷健 . 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11回日本再生医療学会 横浜 , 2012年6月12-14日
16. 大串 始 . (シンポジウム) アログラフトは再生医療の起爆剤になるか : 再生医療におけるアログラフト . 第11回日本再生医療学会 , 横浜 , 2012年6月12-14日
17. 竹谷健 . 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88回幹細胞研究会 , 広島市 , 2012年9月12日
18. Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, Taketani T. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering: Transplantation of Allogeneic MSCs for Treatment of Hypophosphatasia Patients. (Invited speaker), Term Stem 2012, Guimaraes, Portugal, October 9-12, 2012
19. Ohgushi H, Katsube Y, Tadokoro M, Oda Y, Yuba S, Taketani T. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Bone Tissue Engineering: -Tissue engineering approaches for total ankle joints and for treatment of genetic disease-. (Invited speaker) Siriraj Orthopaedic Alumini Society. Bangkok, Thailand, October 19, 2012
20. 大串 始 , 勝部好裕 , 田所美香 , 弓場俊輔 , 竹谷 健 . 骨形成研究の種々アプローチとその臨床応用 . 第27回日本整形外科基礎学術集会 骨形成シンポジウム (シンポジスト) , 名古屋 , 2012年10月25日
21. 田部有香 , 竹谷健 , 柴田直昭 , 山口清次 . 周産期型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 : 3例の経験 . 第57回日本未熟児新生児学会 , 熊本 , 2012年11月25-27日
22. 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10回日本胎児治療学会 . 第5回胎児骨系統疾患フォーラム , 仙台 , 2012年11月30日-12月2日
23. 大串 始 . 再生医療技術と工学技術の融合 . 第25回バイオエンジニアリング講演会 (特別講演) , つくば , 2013年1月9日
24. 大串始 . 研究・臨床における常識と非常識 : 私の再生医療経験からみた方法論について . 奈良県立医科大学特別講演 , 橿原 , 2013年1月10日
25. 大串始 . 間葉系幹細胞を用いた再生医療の実 . 近畿大学医学会学術講演

- (招待講演), 大阪狭山, 2013年1月30日
26. 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疾患患者 iPS 細胞樹立. 第12回再生医療学会, 横浜, 2013年3月21-23日
27. 竹谷健, 弓場俊輔, 大串始. (パネルディスカッション) 幹細胞療法の可能性: 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, 横浜, 2013年3月21-23日
28. 上山善弘, 柳生貴裕, 前田雅彦, 大串始, 桐田忠昭. 再生培養骨評価のためのラット“先天性骨癒合不全”モデル開発. 第12回日本再生医療学会, 横浜, 2013年3月21-23日
29. 前田雅彦, 大串始, 桐田忠昭. 骨再生のための培養骨移植における骨芽細胞分化度の違いによる骨形成能への影響についての検討. 第12回再生医療学会, 横浜, 2013年3月21-23日
30. 石嶺久子, 山川哲生, 笹尾真理, 田所美香, 上大介, 徳原真, 梅澤明弘, 大串始, 浅島誠, 栗崎晃. ヒト間葉系幹細胞で高心筋分化能を示す新規細胞表面マーカー. 第12回日本再生医療学会, 横浜, 2013年3月21-23日
31. 田所美香, 笹尾真理, 越田一郎, 大門誠, 廣瀬志弘, 小久保謙, 大串始, 紀ノ岡正博, 弓場俊輔. 間葉系幹細胞に対する培養環境中の過酸化水素の影響について. 第12回日本再生医療学会, 横浜, 2013年3月21-23日
- 平成25年度
32. 大串始, 弓場俊輔, 竹谷健. (シンポジウム) 運動器再生医療研究の最先端: 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総会, 広島, 2013年5月23日
33. 川手 健二, 矢島弘嗣, 大串始, 田中康仁, 高倉義典. 遊離血管柄付き腓骨と培養骨髄間葉系幹細胞搭載 TCP 顆粒を移植したステロイド性大腿骨頭壊死症例の成績. 第86回日本整形外科学会総会, 広島, 2013年5月23日
34. 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, 広島, 2013年5月23-26日
35. 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, Kobe, May 28-Jun 1, 2013
36. 大串始．再生医療とは？体性幹細胞～iPS細胞．奈良県立医科大学特別講演（生化学教室主催），橿原，2013年6月13日
  37. 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，出雲，2013年7月2日
  38. 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, Tokyo, July 27, 2013
  39. 弓場俊輔．先天性骨代謝疾患に対する間葉系幹細胞治療．BioJapan2013，横浜，2013年10月9-11日
  40. 谷掛洋平，藤間保晶，土肥祥子，岩田栄一郎，赤羽学，川手健二，田中康仁，大串始．Fibronectin をコートした b-TCP の骨形成能（bTCP の気孔率の影響について）．第28回整形外科基礎学術集会，千葉，2013年10月17日
  41. 大串始．再生医療の経験から得た研究・臨床における常識と非常識．第22回泉大津市医師会病診連携懇話会（招待講演），泉大津市，2013年10月19日
  42. 弓場俊輔．先天性骨代謝疾患に対する間葉系幹細胞治療．産総研オープンラボ，2013年10月31日-11月1日
  43. 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，沖縄，2014年3月7-9日

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

発表者氏名		書籍名	出版会社	ページ	出版年
竹谷健	低フォスファターゼ症	先天性代謝異常ハンドブック	中山書店	412-413	2013
大串始、赤羽学	間葉系幹細胞を用いた種々骨再生	骨形成最前線	エヌ-ティーエヌ	217-226	2013
大串始	再生医療技術の実用化における環境整備	Web Journal	アクトライム	7-10	2013

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
竹谷健、鬼形和道、小林弘典、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	2011
Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, Ohgushi H, Numabe Y	Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament	J Tissue Eng Regen Med	10	798-805	2011
Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T	Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product	J Tissue Eng Regen Med		doi: 10.1002/term.460	2011
Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T	Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines	Hum Cell	24	2-8	2011
Oliveira JM, Sousa RA, Malafaya PB, Silva SS, Kotobuki N, Hirose M, Ohgushi H, Mano JF, Reis RL	In vivo study of dendronlike nanoparticles for stem cells "tune-up": from nano to tissues	Nanomedicine	7	914-924	2011

Matsumoto T, Hattori K, Matsushima A, Tadokoro M, Yagyuu T, Kodama M, Sato J, Ohgushi H	Osteogenic potential of mesenchymal stem cells on expanded polytetrafluoroethylene coated with both a poly-amino-acid urethane copolymer and collagen	Tissue Eng Part A	17	171-180	2011
Ohnishi H, Yuba S, Ohgushi H	Forced Expression of Transcription Factors in Human Mesenchymal Cells to Promote Proliferation and Osteogenic Differentiation.	Bioceramics Development and Applications	1	doi:10.4303/bda/D110166	2011
Kihara T, Haghparast SM, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J	Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap	Biochem Biophys Res Commun	409	1-6	2011
大串 始、有馬靖佳、竹谷健	間葉系幹細胞研究（臨床研究からみた同種間葉系幹細胞移植）	日本臨床	69	2121-2127	2011
Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori H, Yuba S	A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	JTissue Eng Regen Med	6	261-267	2012
Shimizu Y, Kihara T, Haghparast SM, Yuba S, Miyake J	Simple display system of mechanical properties of cells and their dispersion	PLoS One	7	e34305	2012
Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H	Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and $\beta$ -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells	J Tissue Eng Regen Med	6	253-260	2012
Ogawa M, Tohma Y, Ohgushi H, Takakura Y, Tanaka Y.	Early Fixation of Cobalt-Chromium Based Alloy Surgical Implants to Bone Using a Tissue-engineering Approach	Inn J Mol Sci	13	5528-5541	2012
弓場俊輔、竹谷健	間葉系幹細胞を用いた先天性骨代謝疾患の治療	血液フロンティア	23	487-493	2013
Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ohgushi H, Fukuda S, Yamaguchi S	Therapy-related Ph <sup>+</sup> leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia	Pediatr Int	55	e52-55	2013
Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S	Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients	Arch Dis Child		doi: 10.1136/archdisc hild-2013-305037	2013

Haghparast SM, Kihara T, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J.	Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells	J Biosci Bioeng	116	380-385	2013
Teraoka K, Kato T, Hattori K, Ohgushi H	Evaluation of the capacity of mosaic-like porous ceramics with designed pores to support osteoconduction	J Biomed Mater Res A	101	3571-3579	2013
Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A	N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation	Biochem Biophys Res Commun.	438	753-759	2013
Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y	Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model	J Tissue Eng Regen Med.	7	51-60	2013
Ohgushi H	Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering	Expert Opin Biol Ther.	14	197-208	2014