

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 21 年 8 月 27 日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	島根県出雲市塩冶町 89-1
	名称	島根大学医学部附属病院
	研究機関の長 役職名・氏名	病院長 小林 祥泰

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
重症低ホスファターゼ症に対する 可及的早期に行う 同種間葉系幹細胞移植	島根大学医学部附属病院輸血部・講師 竹谷 健

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	重症低ホスファターゼ症に対する可及的早期に行う同種間葉系幹細胞移植
申請年月日	平成21年8月27日
実施施設及び研究責任者	実施施設：島根大学医学部附属病院 研究責任者：竹谷 健
対象疾患	重症低ホスファターゼ症
ヒト幹細胞の種類	同種骨髄由来間葉系幹細胞
実施期間及び対象症例数	登録期間 意見発出日から平成25年3月31日まで 10症例
治療研究の概要	本研究は、アルカリホスファターゼ欠損により骨を作ることが障害される低ホスファターゼ症の中で、致命的な経過をとる乳幼児の患者に対して、同種骨髄間葉系幹細胞を移植するものである。ドナーは、患者の家族（2親等以内）の中でこの病気ではない人から選定する。間葉系幹細胞は、HLAクラス1の発現がないため拒絶反応が起きにくい。造血幹細胞移植および臓器移植に準じて、免疫抑制剤を6か月間使用する。
その他（外国での状況等）	この疾患の重症型は、現在の段階では、呼吸障害に対する人工呼吸管理、痙攣に対する抗けいれん薬などの対症療法が行われる。これまで、同施設の経験症例を含めて3人の患者が骨髄移植、骨移植および骨芽細胞・間葉系幹細胞移植を施行され救命された。なお、2008年からアメリカで骨へ移行しやすく改良されたリコンビナントALP製剤の治験が始まっている。
新規性について	本研究では重症低ホスファターゼ症の患者を救命するために、同種間葉系幹細胞のみを用いた比較的low侵襲な移植をすることに新規性が認められる。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	重症低ホスファターゼ症に対する可及的早期に行う同種間葉系幹細胞移植
研究機関	
名称	島根大学医学部附属病院
所在地	〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1
電話番号	0853-23-2111
FAX番号	0853-20-2215
研究機関の長	
役職	島根大学医学部附属病院 病院長
氏名	小林 祥泰 印
研究責任者	
所属	島根大学医学部附属病院 輸血部
役職	講師
氏名	竹谷 健 印
連絡先 Tel/Fax	Tel: 0853-20-2219 /Fax: 0853-20-2215
E-mail	ttaketani@med.shimane-u.ac.jp
最終学歴	平成8年3月 島根医科大学医学部医学科 卒業
専攻科目	小児科学、血液学、腫瘍学、分子生物学
その他の研究者	別紙1参照
共同研究機関(該当する場合のみ記載してください)	
名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループ
所在地	〒661-0974 兵庫県尼崎市若王寺3-11-46
電話番号	06-6494-7807
FAX番号	06-6494-7861
共同研究機関の長(該当する場合のみ記載してください)	
役職	独立行政法人産業技術総合研究所理事長
氏名	野間口 有

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の目的・意義	<p>低ホスファターゼ症とは、骨を作るのに必要なアルカリホスファターゼ (ALP) という酵素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の病気である。この病気の重症の患者は、全身の骨が徐々に菲薄化して骨折しやすくなり、特に呼吸筋を支える肋骨などが骨折するために呼吸不全で乳幼児期に死亡する。この病気に対しては、これまで有効な治療法がなかった。しかし、近年、致死型の低ホスファターゼ症の患者に、健康人(提供者)の骨髄および骨、骨をつくる骨芽細胞や骨芽細胞のもと(起源)の細胞であ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(生着)して骨を作り、患者が救命されていることが報告されている。このことから、我々は2004年に同じ疾患の患者に骨髄移植、骨移植、間葉系幹細胞移植を行い、救命することができた。なお、その症例では複数回の移植をおこなったが、間葉系幹細胞のみの移植時にも呼吸改善がみられた。したがって、臨床研究の目的は、根治療法のない重症低ホスファターゼ症の患者を救命するために、骨髄や骨移植を伴わない同種間葉系幹細胞のみの移植という低侵襲の移植治療研究を行なう。</p>
臨床研究の対象疾患	
名称	重症低ホスファターゼ症
選定理由	この疾患の重症型は、現在の段階では、細胞治療でしか救命できた患者がないため。現在は対症療法のみで、具体的には、呼吸障害に対する人工呼吸管理、痙攣に対する抗けいれん薬などである。2008年から、アメリカで骨へ移行しやすく改良されたリコンビナントALP製剤の治験が始まっており、ある程度の効果が出ている。
被験者等の選定基準	<p>被験者は以下の4つすべてを満たすこと</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 生後6か月以内の発症 2. 呼吸障害を合併 3. ALP活性の低いALP遺伝子変異を有している 4. 骨髄間葉系幹細胞の骨形成能低下
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨髄由来間葉系幹細胞
由来	自己(非自己)・株化細胞 (生体由来)・死体由来
採取、調製、移植又は投与の方法	<p>骨髄提供者からの腸骨から9～15mLの骨髄を骨髄針を用いて採取し、ヘパリンを添加したPBS(Phosphate buffered saline)を含む滅菌試験管に加える。採取には無菌での操作が必要であるため、手術室あるいは無菌室で担当医師が行う。採取された骨髄は産業技術総合研究所内セルプロセッシングセンターに搬送され培養操作を行う。産業技術総合研究所における作業においては培養担当医師がその責任を負う。製造指示記録書に培養を担当した医師名およびスタッフ名を記載する。培養は20 μg/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(α-MEM: GIBCO カタログ番号12571)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%CO₂、37°C)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。その後、細胞を剥離しPBSで懸濁し細胞数および生存率を測定を行なう。細胞生存率が80%以上あり移植必要細胞数(体重あたり10⁶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す。移植用の間葉系幹細胞は、クーラーボックスを使用して島根大学付属病院に搬送される。搬送された間葉系幹細胞は島根大学付属病院手術室で、注射器により経静脈的に全身投与される。また、移植免疫を回避し間葉系幹細胞の機能を長期間維持するために、免疫抑制剤投与をおこなう。呼吸状態の悪化、骨折、体重増加不良など症状の悪化がみられた場合に、同じ方法で再移植を複数回行うことがある。なお、骨髄および移植細胞の輸送は、島根大学⇄出雲空港 30分(車)、出雲空港⇄大阪空港 50分(飛行機)、大阪空港⇄産総研 30分(車)で行う。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

調製(加工)行程	(有)・無
非自己由来材料使用	(有)・無 動物種(ウシ:血清・ブタ:ヘパリン)
複数機関での実施	(有)・無
他の医療機関への授与・販売	有(無)
安全性についての評価	<p>各培養段階において、安全性検査を実施する。培養のための骨髓採取に用いる容器・その他の機材は全て滅菌されたものを使用し、無菌操作を心がける。骨髓は滅菌処理が出来ないため、滅菌チューブを二重梱包し、産業技術総合研究所内セルプロセッシングセンターに搬送する。搬送にあたっては、保冷剤を入れた運搬用クーラーボックスを用いる。1つのクーラーボックスで、複数の症例の骨髓を運搬することはない。運搬中、ボックス内は、ほぼ一定の温度(10~30℃)に保たれていることを確認する。また、本方法にて搬送した骨髓の安全性および有効性を確認している。培養に用いる牛胎児血清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。調整した液体培地は、0.22umフィルターによりフィルター滅菌を行った後、細菌・真菌検査、エンドキシン検査を行う。骨髓は培養開始時に細菌・真菌検査を行い、搬送時の汚染を否定する。培養過程において培養操作時の汚染を否定するため、細菌・真菌検査を行う。さらに最終培地交換時に培養上清より、細菌・真菌検査、マイコプラズマ検査を行い、汚染の最終確認を行う。移植手術予定日にはこれらの検査結果を踏まえて、主治医がその使用の可否を判断する。マイコプラズマ試験はPCR法を用いるため、サンプリング後約1日で結果が得られる。エンドキシン試験は、培養開始時に作製する調製培地について行っており、培養終了時までには結果が得られる。両試験で汚染が確認された場合は、細胞培養を中止する。</p> <p>現在までに産業技術総合研究所は、大学病院または国立研究機関と共同で80症例以上の自己骨髓由来間葉系細胞培養及び移植を行っているが、すべての症例で細菌・真菌検査の最終判定は陰性であり、術後感染症等の問題は発生していない。また、骨髓の搬送方法は全ての症例で本法と同様の手法を用いており、安全性と有効性が確認されている。動物由来成分を含有する試薬は骨髓採取に用いるヘパリン(ブタ)と液体培地の牛胎児血清だけである。ヘパリンは日本薬局方のもので採用し安全性を確保する。牛胎児血清は牛海綿状脳症との関連が危惧されているが、これまで牛胎児血清を含んでいる液体培地で培養された間葉系幹細胞を投与された患者はすべて、牛海綿状脳症の発症は報告されていない。また、牛海綿状脳症の発生していない地域の血清で、放射線処理済みのものを使用することなど、可能な限りの対処を行う。細胞剥離剤は動物由来成分を含まない、トリプシン様酵素(TrypLE Select: GIBCO カタログ番号12563)を採用する。液体培地に添加する抗菌剤である硫酸ゲンタマイシンは日本薬局方のもので採用する。また移植細胞は、剥離後PBSで複数回洗浄されるため、薬剤の残留は低減する。移植細胞の搬送にはクーラーボックスを使用し一定の温度(10~30℃)に保たれ、12時間以内に島根大学付属病院手術場に搬入移植する。使用した細胞、液体培地は、その一部を後証品として冷凍保存する。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>1. これまで細胞治療を行われた3例は全例骨髄移植が行われている。これは、間葉系幹細胞が拒絶されないために、免疫細胞も間葉系幹細胞の提供者と同一とする必要があると考えられていたからである。しかし、3例中2例は骨髄移植を行ったが提供者の骨髄が生着せず拒絶された。すなわち、骨髄は患者由来のまま免疫細胞は変わらなかった。しかし、提供者の骨髄が拒絶された2名の患者はどちらも、骨を産生する細胞は提供者の細胞が少数であるが長期間存在していた。このことは、間葉系幹細胞が患者の体内で拒絶されずに、骨を産生する細胞に分化して、生存していることを証明している。</p> <p>2. ラットの実験において、同種間葉系幹細胞移植は免疫抑制剤を用いることで間葉系幹細胞移植は生存して、骨を形成することが明らかとなっている。</p> <p>3. 我々が経験した患者は2回細胞治療を行った。1回目は骨髄移植を併用したが、骨髄は拒絶された。2回目は、間葉系幹細胞移植のみを投与したが呼吸状態が改善した。</p> <p>4. 骨髄移植を併用する場合、患者に抗がん剤を投与して患者の骨髄を破壊する必要がある。その抗がん剤による副作用は、可逆的なものが多いが、後遺症を残したり、場合によっては、致死的な合併症を起こすことがある。しかし、間葉系幹細胞移植は、ラットにおいて抗がん剤を使用しなくても、同種間葉系幹細胞が生着して、骨を産生する。</p> <p>5. 間葉系幹細胞移植は海外では造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD)、クローン病、1型糖尿病、心血管障害、骨形成不全、先天性代謝疾患などの疾患に臨床応用されている。有効性は各疾患でばらつきがあるが、間葉系幹細胞を投与することの副作用はほとんどなく、安全に行われている。</p> <p>6. 研究分担者である産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門は、骨髄から間葉系幹細胞を培養増殖する経験を有している。約80例のさまざまな疾患を有した患者に対して、培養した間葉系幹細胞を移植している。</p> <p>7. 島根大学小児科はこれまで数多くの造血幹細胞移植を行っている。その際、移植後に使用する免疫抑制剤の使用経験は十分あり、その管理も合併症なく、安全に行われている。</p>
臨床研究の実施計画	別紙参照
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続	<p>担当医は患者本人と親権者(法定代理人)への添付の説明文に沿って内容を説明する。ただし、今回の患者は幼少のため理解できないため、親権者(法定代理人)に対する説明となる。さらに、今回は骨髄提供者または提供者の親権者(法定代理人)に対する説明も要する。</p> <p>説明を行った後に、内容の理解を確認した上で、添付書類の同意書を用いて、説明医師と、説明を受けた親権者および骨髄提供者または提供者の親権者(法定代理人)が日付を記載し、署名する。同意文書は2部複写し、1部は親権者および骨髄提供者または提供者の親権者(法定代理人)に手渡し、1部は研究責任者が保管する。原本はカルテに保管する。</p>
説明事項	<p>1)被験者用</p> <p>①臨床研究の目的、意義及び方法 ②予期される効果及び危険性とその対処方法 ③費用負担とその補償 ④他の治療法の有無及びその方法 ⑤研究への協力に同意した後であっても、自らの自由意思でいつでも同意を撤回でき、また、そのことによって不利益を受けないこと。 ⑥個人情報の保護の方法及び、研究成果が匿名化の上公表されること。 ⑦知的財産権に関して ⑧問い合わせ・苦情の受付先</p> <p>2)骨髄提供者用</p> <p>①対象疾患に対する説明 ②臨床研究の目的 ③骨髄採取方法 ④予期される効果 ⑤危険性とその対処方法 ⑥他の治療法の有無及びその方法 ⑦個人情報の保護の方法及び、研究成果が匿名化の上公表されること。 ⑧知的財産権に関して ⑨問い合わせ・苦情の受付先</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合	
研究が必要不可欠である理由	本臨床研究の対象疾患は致死的な重症低ホスファターゼ症であり、先天性疾患であることから被験者は全て乳幼児である。
代諾者の選定方針	被験者の親権者または養育責任者
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	<p>1. 間葉系幹細胞を投与することで起こる副作用は、アレルギー反応が挙げられる。それに対しては、抗ヒスタミン剤およびステロイドを前投与して、予防する。</p> <p>2. 今回使用する免疫抑制剤であるタクロリムス(プロGRAF®)の副作用は、腎障害、高血糖、中枢神経障害(頭痛、けいれんなど)、心不全、高血圧、低マグネシウム血症、高カリウム血症、高コレステロール血症、腹部膨満、下痢、多毛、手指の振戦、感染症などが挙げられる。これらの副作用は、血中濃度に比例するものが多いことから、血中濃度測定を定期的に行い、至適濃度内に管理する。また、症状を観察し、定期的な検査を行うことで、もし副作用が生じた場合、早期に副作用を発見し、対処する。感染症に関しては、抗菌薬内服などで予防に努める。</p>
臨床研究終了後の追跡調査の方法	臨床研究が終了後も、救命された場合、骨の発達を観察する必要があるため、成人になるまで、経過観察する。
臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 <input type="radio"/> 無 <input checked="" type="radio"/>
補償が有る場合、その内容	
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	研究責任者の責任のもと、氏名、生年月日、住所などの個人を特定できる情報を取り除き、代わりに新たな登録番号をつけ、個人を特定できなくする。
その他	研究結果の公表に際しては、個人情報保護法に則り、個人情報の保護に十分配慮する。公表される個人に関する情報としては年齢、疾患名、性別のみである。
その他必要な事項 (細則を確認してください)	<p>①当該研究に係る研究資金の調達方法</p> <p>骨髄穿刺及び細胞培養にかかる費用は、すべて島根大学と産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループが負担をする。骨髄穿刺等の島根大学でかかる費用は、文部科学省・委託研究「平成20年度再生医療実現化プロジェクト」の1つである「重度先天性骨代謝疾患に対する遺伝子改変間葉系幹細胞移植治療法の開発」の研究費より、細胞培養に掛かる費用は産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループの運営交付金より資金を調達する。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>②既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項</p> <p>これまで、我々が経験した患者さんを含めて、3人の患者さんが骨髄移植、骨移植および骨芽細胞・間葉系幹細胞移植を施行して救命された。本疾患に対してこれらの治療を行った報告は3例しかないが、これらの治療以外で救命された例はない。現在のところ、他の方法では治療では期待できない。2004年の我々の経験では間葉系幹細胞のみの移植時にも呼吸改善がみられた。そこで、本計画では重症低ホスファターゼ症の患者を救命するために、同種間葉系幹細胞を用いた低侵襲の移植治療研究を行う。以上より、間葉系幹細胞のみの移植することに新規性が認められる。</p>
--	---

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類(添付した書類にチェックを入れること)

- 研究者の略歴及び研究業績
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式
- その他(資料内容:ポンチ絵)
- その他(資料内容:低ホスファターゼ症の概略)
- その他(資料内容:遺伝子解析・培養・試験の手順)
- その他(資料内容:ラットの同種骨髄間葉系幹細胞移植での細胞の生存および骨形成能を調査した論文)
- その他(資料内容:倫理委員会関連書類)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)
- その他(資料内容:)

重症低ホスファターゼ症に対する可及的早期に行う同種間葉系幹細胞移植

