

200834062A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

表皮水疱症状の根治的治療法確立に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 玉井 克人

平成 21 (2009) 年 4 月

# 目 次

---

## I. 総括研究報告

表皮水疱症の根治的治療法確立に関する研究

玉井 克人 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. 骨髄間葉系幹細胞移植に関わる免疫学的解析のための基礎研究

金倉 謙 ..... 7

2. 骨髄間葉系幹細胞移植実施計画書の作成

江副 幸子 ..... 11

3. 表皮水疱症における皮膚有棘細胞癌発生病態の解析

片山 一朗 ..... 31

4. 脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離培養法に関する研究

橋本 公二 ..... 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 41

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ..... 45

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）  
総括研究報告書

表皮水疱症の根治的治療法開発に関する研究

研究代表者 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 准教授

研究要旨

本研究班は、治療法の全くない遺伝性皮膚難病である表皮水疱症に対する根治的治療法開発のための基礎的、臨床的研究をすすめることを目的として組織された。平成 20 年度は、骨髄細胞の皮膚構成細胞への分化能を検討し、骨髄間葉系幹細胞移植による治療の妥当性を検証すると共に、間葉系幹細胞移植実施計画書の作成を進めた。また、移植骨髄細胞に対する免疫応答と、栄養障害型表皮水疱症皮膚における発癌リスクについて、それぞれ基礎的及び臨床的検討を行った。

研究分担者

金倉 譲	大阪大学医学系研究科血液腫瘍内科	教授
江副 幸子	大阪大学医学部附属病院未来医療センター	特任助教
片山 一朗	大阪大学医学系研究科皮膚科学	教授
橋本 公二	愛媛大学皮膚科学	教授
中神 啓徳	大阪大学医学系研究科遺伝子治療学	助教

A. 研究目的

表皮水疱症治療法としての骨髄間葉系幹細胞移植の妥当性を検証しつつ、先天性表皮水疱症の根治的治療法を確立することを目的として、研究班を組織した。平成 20 年度は骨髄由来間葉系細胞の皮膚構成細胞への分化能、および表皮水疱症マウスモデルへの移植による治療効果の検討（玉井、中神）、骨髄間葉系幹細胞移植実施に関する必要事項検討と計画書作成（玉井、江副）を進めた。さらに、間葉系幹細胞移植の有効

性、安全性を高めるために必要な基礎的研究を進めた（橋本、金倉、片山）。

B. 研究方法

玉井、中神は、骨髄由来間葉系細胞の皮膚構成細胞への分化能を明らかにする目的で、GFP 遺伝子トランスジェニックマウス (C57B16 バックグラウンド) より骨髄を採取し、野生型同系妊娠マウス子宮壁（羊膜）上の卵黄囊静脈から胎生 14 日目の胎仔循環にマイクロニードルを用い  $5 \times 10^6$  個の骨髄

細胞を移植した (embryonic bone marrow transplantation : E-BMT)。E-BMT マウスの出生 12 週後に皮膚を生検し、GFP 陽性骨髄由来細胞による皮膚内細胞系譜を検討した。また、皮膚内 GFP 陽性細胞を含む皮膚細胞を培養し、免疫染色および RT-PCR により GFP 陽性細胞における発現蛋白を検討した。次いで、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスに E-BMT を施行し、骨髄細胞移植による表皮水疱症の病態改善効果を検討した。

出生直後より皮膚に水疱を形成し、数日以内に致死となる VII 型コラーゲンノックアウトマウスに GFP 骨髄細胞を E-BMT し、皮膚病態および生存率に与える影響を検討した。

玉井、江副は、骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症治療臨床試験開始に向けて、その実施に必要な臨床試験項目、技術的課題、倫理的課題を検討した。さらに、それらの検討を基にして、実施計画書 (案) を作成した。

橋本は、骨髄細胞の採取・利用が困難な場合を想定し、骨髄以外の組織由来間葉系幹細胞を利用した治療法開発のための基礎的研究を進めた。今年度は、特に脂肪由来間葉系幹細胞の分離培養法を検討した。

片山は、重症栄養障害型表皮水疱症でも重篤な合併症である皮膚有棘細胞癌について、臨床症例における情報を基に病態を研究した。

金倉は、他家間葉系幹細胞移植後の免疫応答制御のための基礎研究を進めた。特に今年度は、臍帯血由来造血幹細胞から B リンパ球への分化過程における間葉系幹細胞との相互作用を検討した。

## C. 研究結果

玉井、中神は、E-BMT マウス皮膚において、出生 12 週後の皮膚真皮内に多数の GFP 陽性細胞が存在すること、これら GFP 陽性細胞は、蛋白染色および遺伝子発現レベルで、線維芽細胞としての性質を持つことを明らかにした。即ち、E-BMT により移植骨髄細胞は皮膚に線維芽細胞を供給し得ることが明らかとなった。

栄養障害型表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲンノックアウトマウスに E-BMT を施行した結果、平均生存率が約 3 週間延長し、水疱形成が抑制され、基底膜部位に、VII 型コラーゲンが供給されることが確認された。

さらに、これら線維芽細胞を供給し得る骨髄内細胞分画を検討した結果、PDGFR $\alpha$  陽性、CD44 陽性間葉系細胞分画中に含まれる可能性を見いだした。

玉井、江副は、上述した研究内容を踏まえて、骨髄間葉系幹細胞移植臨床試験実施計画書案を作成した。

橋本は、より安全かつ効率的に間葉系幹細胞を採取する方法論確立を目指して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の採取・培養法を検討し、ヒト脂肪組織から 10 代以上の継代培養が可能な間葉系細胞の分離・培養法を確立した。

片山は、皮膚有棘細胞癌を合併した重症栄養障害型表皮水疱症症例において、癌組織が産生する細胞増殖因子の探索を進め、癌組織で G-CSF および PTH-rP が極めて強く発現していることを明らかにした。

金倉は、臍帯血由来 CD34 陽性細胞から B リンパ球への分化過程に対し、間葉系幹細

胞が分化誘導作用を持つ因子を供給していることを明らかにした。

#### D. 考察

今年度の研究により、骨髄内に、皮膚に線維芽細胞を供給可能な間葉系細胞分画が存在すること、それらの分画は、骨髄内 PDGFR $\alpha$  陽性 CD44 陽性細胞分画に含まれる可能性が示された。これらの骨髄由来細胞は正常皮膚で線維芽細胞として機能するだけでなく、遺伝性皮膚疾患である栄養障害型表皮水疱症のモデルマウスである VII 型コラーゲンノックアウトマウスに対し、欠損していた VII 型コラーゲンを供給し得ることが明らかとなった。即ち、骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症治療の可能性が示された。これらの研究成果は、臨床試験実施計画書案の内容に反映された。本研究期間内の臨床試験実施に向けて、さらなる基礎的検討を重ねる予定である。

また、肪細胞由来間葉系幹細胞の分離・培養法が確立されたため、骨髄由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞の異同、および表皮水疱症治療における有効性・安全性の比較検討が可能になった。将来的には、骨髄間葉系幹細胞採取が困難な場合に、代換え方法として脂肪由来間葉系幹細胞を利用することが可能になるかもしれない。

他家骨髄間葉系幹細胞移植の際に生じる免疫応答制御は、治療の有効性・安全性を保証する上で極めて重要であることは言うまでもない。間葉系幹細胞と造血系細胞の相互作用を明らかにすることで、有効な免疫制御法選択が可能になると期待される。

重症栄養障害型表皮水疱症では青年期か

ら壮年期にかけて、皮膚有棘細胞癌を高率に合併する。皮膚有棘細胞癌から産生される G-CSF や PTH-rP が腫瘍の増殖や転移などの病態にどのような意味を持つかは不明であるが、腫瘍マーカーとしての有用性が明らかとなれば、骨髄間葉系幹細胞移植適応判定の際の重要な指標となるかもしれない。

今後、これらの研究成果を現在作成中の臨床試験実施計画書作成により良く反映し、患者および骨髄細胞ドナーに対するより有効かつ安全な臨床試験を進める予定である。

#### E. 結論

骨髄間葉系幹細胞移植が皮膚に線維芽細胞を供給し、表皮水疱症治療効果を発揮し得ることが示されるとともに、臨床試験実施のために必要な基礎的研究情報を蓄積した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### a) 論文発表

1. Otsuru S, **Tamai K**, Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 2008, 26:223-34.
2. Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, **Tamai K**, Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Cold shock domain protein A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum

- response element. *Oncogene*. 2008, 27:1821-33.
3. Saga K, **Tamai K**, Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. *J Biotech*. 2008 Feb 1;133(3):386-94.
  4. Nakajima K, **Tamai K**, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a Splice Variant Induced by High Calcium Concentration and Specifically Expressed in Normal Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008 128: 1336-9.
  5. Yamamoto C, **Tamai K**, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D. Vitamin D(3) inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. *J Dermatol Sci*. 2008 50: 155-8.
  6. Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, Tabata Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Tatsu Y, Yumoto N, **Tamai K**, Tomono K, Kaneda Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med*. 2008, Apr 9. [Epub ahead of print]
  7. Aizu T, **Tamai K**, Nakano H, Rokunohe D, Toyomaki Y, Uitto J, Sawamura D. Calcineurin/NFAT-dependent regulation of 230-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2008, 51: 45-51.
  8. Chino T, **Tamai K**, Yamazaki T, Otsuru S, Kikuchi Y, Nimura K, Endo M, Nagai M, Uitto J, Kitajima Y, Kaneda Y. Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. *Am J Pathol*. 2008, 173:803-14.
  9. Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, **Tamai K**, Sawamura D. Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol*. 2008, 35:336-40.
- b) 学会発表
1. シンポジウム：骨髄由来ケラチノサイトによる皮膚再生、第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋
  2. 教育講演：創傷治療のニューウエーブ、第107回日本皮膚科学会総会 2008年4月20日、京都
  3. Symposium: Development of NF-kB decoy ointment and clinical trial for atopic dermatitis, International Symposium of Atopic Dermatitis, May 12<sup>th</sup>, 2008, Kyoto
  4. 基調講演：遺伝性皮膚疾患の根治的治療法開発、第23回角化症研究会、2008年8月2日、東京
  5. Workshop for molecular and cellular therapy for EB, Bone marrow transplants: from mouse to human, bone marrow can be an essential source of mesenchymal and epithelial

progenitor cells in EB skin, October 3<sup>rd</sup>,  
2008, Madrid

6. Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino, Yasushi Kikuchi, Ichiro Katayama, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda. Bone marrow replenishes de novo keratinocytes in the regenerating hair follicles via circulating blood. Concurrent Minisymposium, Epidermal Structure and Function, International Investigative Dermatology Meeting 2008. May 14-17, Kyoto
7. 玉井克人、梅垣知子、馬淵恵理子、片山 一朗、金田安史、棘融解性水疱を生じた非ヘルリッツ接合部型表皮水疱症の一例、第30回水疱症研究会、2008.10.26、東京
8. 玉井克人、山崎尊彦、知野剛直、金田安史 骨髄幹細胞動員因子を利用した新しい皮膚再生誘導医療の開発 第15回分子皮膚科学フォーラム 2008.11.14-15、京都

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (4月30日出願)
  - 1) 特許出願番号：特願 2008-119324  
「損傷組織の機能的再生促進医薬」
  - 2) 特許出願番号：特願 2008-119348  
「末梢循環への骨髄由来多能性幹細胞動員薬」
  - 3) 特許出願番号：特願 2008-119355  
「生体内機能的細胞の高効率採取法」
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

骨髄間葉系幹細胞移植に関わる免疫学的解析のための基礎研究

研究分担者 金倉 譲 大阪大学医学系研究科血液腫瘍内科 教授

研究要旨

分担者は、骨髄間葉系幹細胞の皮膚基底膜領域への着生時における免疫応答の研究のために、ヒトB細胞を体外増幅する手法の確立を行った。ヒト間葉系幹細胞との共培養、SCFとFlt3L存在下で2000個のヒト臍帯血CD34陽性細胞から $1.5 \times 10^5$ 個のCD10陽性Bリンパ球前駆細胞を得ることができ、さらにIgM陽性幼若Bリンパ球に分化することが確認された。さらにこのBリンパ球の体外増幅は、activin A, TGF- $\beta$ により抑制されることが示された。

A. 研究目的

ヒト間葉系幹細胞と免疫系との関係を解明することを目的に研究を進めた。今年度は、特に造血幹細胞からBリンパ球への分化および増殖に対する間葉系幹細胞共存効果を検討した。

B. 研究方法

同意書の取得されている妊婦から臍帯血の供与を受け、CD34陽性細胞をマグネットビーズを用いて選別した。

マウス間質細胞株MS-5、ヒト間葉系幹細胞株 MSC、ヒト内皮細胞株HUVEC上をフィーダーとし、stem cell factor (SCF)、Flt3L存在下でIL-7+/+で培養した。

4日間の培養の後にCD10の発現をFACS Caliverを用いて検討した。

同様の培養系においていくつかの低分子化合物、抗体などを添加し、Bリンパ球の増幅に及ぼす影響を検討した。なお、臍帯血の

供与については医学部医学倫理委員会の承認を得た。倫理委員会において承認された患者説明書により臨床研究についての説明を十分行った上で、書面による同意を得た。臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示第459号)を遵守し、検体提供者の安全を最優先にし、個人情報漏出のないよう、厳重に取り扱うこととした。

C. 研究結果

臍帯血CD34陽性細胞2000個からCD19陽性B細胞は、サイトカイン非存在下においてMS-5との共培養では4週の後約2000個にとどまり、HUVECとの共培養では殆ど出現しなかったのに対し、 $1.5 \times 10^4$ と有意な増加を示した。次にhMSC上の培養において有効に増幅するサイトカインの解析を行ったところ、IL-7添加よりも非添加の場合のほうがより多くのCD10陽性Bリンパ球を得ることができ、hMSC上、SCF、Flt3L添加に



より2000個のCD34陽性細胞から1-5×10E5個のCD10陽性Bリンパ球を得ることができた。また、この条件においてactivin A, TGF-βの阻害剤及び中和抗体添加によりBリンパ球の増幅が増強された。

#### D. 考察

ヒトのBリンパ球の有効な培養システムを確立した。マウスではMSCとの共培養が無くてもBリンパ球を誘導することができたが、ヒトの場合MSCが必要であることが示された。ヒト間葉系幹細胞はBリンパ球の誘導などを介して局所の免疫系を制御していると考えられる。

#### E. 結論

ヒトBリンパ球とヒト間葉系幹細胞との相互作用を明らかにする実験系を確立した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: Report of a case. Miyagawa S, Matsumiya G, Funatsu T, Yoshitatsu M, Sekiya N, Fukui S, Hoashi T, Hori M, Yoshikawa H, **Kanakura Y**, Ishikawa J, Aozasa K, Kawaguchi N, Matsuura N, Myoui A, Matsuyama A, Ezoe S, Iida H, Matsuda H, Sawa Y. Surg Today. 39:133-136. 2009

2. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells.

Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Tokunaga M, Yasumi M, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, **Kanakura Y**.

J Biol Chem. 2009 Epub ahead of print

3. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice.

Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, **Kanakura Y**.

Blood. 2008, Epub ahead of print,

4. 18F-FDG-PET in patients with malignant lymphoma having long-term follow-up: staging and restaging, and evaluation of treatment response and recurrence.

Isohashi K, Tatsumi M, Higuchi I, Inoue A, Nakajo K, Ishikawa J, Shimosegawa E, **Kanakura Y**, Nakamura H, Hatazawa J.

Ann Nucl Med. 22, 795-802. 2008

5. Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis.

Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Satoh Y, Kincade PW, **Kanakura Y**.

J Immunol. 181(9):6061-6072. 2008

6. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells.

Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, **Kanakura Y**.

J Biol Chem. 283:30045-30056. 2008

7. Diffuse large B-cell lymphoma showing an interfollicular pattern of proliferation: a

study of the Osaka Lymphoma Study Group.  
Yamauchi A, Ikeda J, Nakamichi I, Kohara M, Fukuhara S, Hino M, **Kanakura Y**,  
Ogawa H, Sugiyama H, Kanamaru A,  
Aozasa K; Osaka Lymphoma Study Group.  
Histopathology. 52:731-737. 2008

8. Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/beta2-glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus.

Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Suehisa E, Takano T, Hidaka Y, **Kanakura Y**.  
Rheumatology (Oxford). 45:684-689. 2008

9. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment.

Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, Ezoe S, Saitoh N, Tanigawa R, Kincade PW, **Kanakura Y**.  
Exp Hematol. ;36:587-957. 2008

## 2. 学会発表

1. International Society of Hematology  
World Congress XXXII  
NAD-Dependent Histone Deacetylase, SIRT1, Plays Essential Roles in The Maintenance of Hematopoietic Stem Cells.  
Ezoe Sschiko, Mtsumura Itaru, Kanakura Yuzuru  
2008, 10, 19-23, Bangkok, Thailand, Saengsuree Jootar
2. The American Society of Hematology 44th Annual meeting  
NAD-Dependent Histone Deacetylase, SIRT1, Plays Essential Roles in The Maintenance of Hematopoietic Stem Cells.

Sachiko Ezoe, Itaru Matsumura, Yuzuru Kanakura  
2008,12,6-9,SanFrancisco, USA,

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得 : なし  
実用新案登録 : なし  
その他 : なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

骨髄間葉系幹細胞移植実施計画書の作成

研究分担者 江副 幸子 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 特任講師

**研究要旨**

分担者は、本研究の実施に向けて実施計画書の作成を行った。実施計画書は大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおいて定められた形式を採用した。実施計画書作成に当たり、臨床研究のプロトコルの詳細について検討した。プロトコル作成に当たり、製品「骨髄間葉系幹細胞」は GMP に準拠して作成されること、臨床研究は「ヒト幹細胞をもちいる臨床研究の指針」に準拠して行われることに留意して作成した。

**共同研究者**

玉井 克人	大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学
中神 啓徳	大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学

**C. 研究結果**

実施計画書作成に際しては、「ヘルシンキ宣言」および「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年厚生労働省告示第425号）」を遵守することを明記し、ドナーおよび被験者の安全と人権の確保について明記した。

また、適格基準としては本人の同意がとれるように20歳以上に設定し、ドナー及び被験者の安全性の確保のため、感染症・悪性腫瘍などに関する規定を設けた。

また、評価項目については、正常ドナーからの骨髄間葉系幹細胞を国内で初めて表皮水疱症の患者皮膚に移植する臨床研究であることから主要評価項目を安全性の評価とした。副次的評価項目には効果判定のための項目として、疾患の治癒への直接の効果を判定するために潰瘍縮小面積比率を設定するほか、移植細胞の生着および欠損蛋白の発現の免疫組織学的な検証を挙げた。

**A. 研究目的**

「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」の実施計画書の作成

**B. 研究方法**

大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおいて本研究の臨床研究を実施するために、本臨床研究実施のための実施計画書を作成した。未来医療センターにおいて開発されている実施計画書の様式を採用し、本研究の倫理的実施、安全性の確立、および統計処理について検討下。また、採取・培養・移植・評価それぞれの過程においてプロトコルを検討し、作成した。

別紙 「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究の実施計画書」参照

#### D. 考察

表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞皮下移植術は既にチリで行われているが、少数例の研究であり、また、本邦で多い栄養障害型表皮水疱症に対する安全性有効性はいまだ確立されていない。本研究を安全に、倫理的に遂行するために、十分な製造環境の整備と実施体制の整備が必要であると考え、製品の安全性と清浄度の保持のために大阪大学未来医療センター内CPCにおいてGMPに準拠した製造を行うこととした。また、倫理性においては十分なインフォームドコンセントと個人情報漏出の防止のため、十分な体制を確立し、完成された実施計画書は大阪大学医学部附属病院 ヒト幹細胞輸法研究審査委員会において審議を受けるものとする。

#### E. 結論

「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」の実施計画書を作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: Report of a case. Miyagawa S, Matsumiya G, Funatsu T, Yoshitatsu M, Sekiya N, Fukui S, Hoashi T,

Hori M, Yoshikawa H, Kanakura Y, Ishikawa J, Aozasa K, Kawaguchi N, Matsuura N, Myoui A, Matsuyama A, **Ezoe S**, Iida H, Matsuda H, Sawa Y. Surg Today. 39:133-136. 2009

2. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells.

Fukushima K, Matsumura I, **Ezoe S**, Tokunaga M, Yasumi M, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, Kanakura Y.

J Biol Chem. 2009 Epub ahead of print

3. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells.

Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, **Ezoe S**, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y.

J Biol Chem. 283:30045-30056. 2008

4. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment.

Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, **Ezoe S**, Saitoh N, Tanigawa R, Kincade PW, Kanakura Y. Exp Hematol. ;36:587-957. 2008

#### 2. 学会発表

1. International Society of Hematology World Congress XXXII NAD-Dependent Histone Deacetylase, SIRT1, Plays Essential Roles in The Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. Ezoe Sschiko, Mtsumura Itaru, Kanakura Yuzuru 2008, 10, 19-23, Bangkok, Thailand, Saengsuee Jootar

2. The American Society of Hematology 44th  
Annual meeting  
NAD-Dependent Histone Deacetylase,  
SIRT1, Plays Essential Roles in The  
Maintenance of Hematopoietic Stem Cells.  
Sachiko Ezoe, Itaru Matsumura, Yuzuru  
Kanakura  
2008,12,6-9, San Francisco, USA,

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

## 別紙：表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究実施計画書（案）

### 1. 研究目的

重症表皮水疱症病患者を対象として、親族ドナー由来骨髄間葉系幹細胞移植術に基づく再生療法の安全性、効果及び実施可能性を評価することを目的とする。

#### 主要目的

本研究における安全性の評価を行う。

##### 1.1.1. 主要評価項目

有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間

#### 副次目的

本研究における有効性、忍容性と実施可能性の評価を行う。

#### 副次評価項目

- 1) 潰瘍面積縮小程度
- 2) 組織学的水疱形成程度
- 3) 投与細胞の組織学的生着状況
- 4) 欠損基底膜分子の発現程度
- 5) ドナー・レシピエントHLA一致locusと生着状況の相関
- 6) 移植細胞数と生着状況の相関
- 7) 移植細胞数と有害事象出現との相関
- 8) 骨髄由来間葉系幹細胞移植術の完遂の可否

### 2. 経緯

#### 対象疾患

表皮水疱症

#### 概念・定義・病因・病態・併存疾患及び合併症

表皮水疱症は厚生労働省特定疾患調査研究分野の範疇に含まれる難治性疾患の一つで、皮膚基底膜領域の接着分子遺伝子の先天性異常により、生下時より日常生活の軽微な外力で全身皮膚に水疱・潰瘍が生じる遺伝性水疱生皮膚難病である。

表皮水疱症は、水疱形成部位によって、単純型（表皮内水疱）、接合部型（表皮・基底膜間水疱）、栄養障害型（基底膜下水疱）の三病型に分類される。単純型は表皮細胞の細胞骨格を形成しているケラチン5および14の遺伝子異常、あるいはケラチン蛋白を細胞膜底面に結合しているプレクチン蛋白の遺伝子異常により発症し、前者は優性遺伝形式、後者は劣性遺伝形式をとる。ケラチン遺伝子異常の場合は手掌、足底に著明な角化を伴い、プレクチン遺伝子異常では経過中に筋ジストロフィーを発症する。接合部型は、表皮細胞と基底膜間の接着分子であるXVII型コラーゲン、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン、ラミニン332の遺伝子異常により発症し、いずれも劣性遺伝形式をとる。XVII型コラーゲン遺伝子異常では、頭頂部脱毛、歯のエナメル質形成不全を合併し、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの遺伝子異常では胃の幽門閉鎖を合併する。ラミニン332異常では、皮膚以外の基底膜にも異常を来し、殆どの症例が生後数ヶ月以内に死亡する。栄養障害型は、基底膜と真皮間を接着するVII型コラーゲン遺伝子異常により発症し、遺伝子異常の種類により優性遺伝形式、劣性遺伝形式のいずれかの遺伝形式をとる。コラーゲン分子内のグリシンを他のアミノ酸に置換する、いわゆるグリシン置換型変異の場合は優性型を発症し、その他のアミノ酸置換変異や蛋白合成が途中で停止する、いわゆる早期停止コドン型変異は劣性型となる。優性型、劣性型いずれの病型も、潰瘍治癒後の著明な瘢痕形成と、爪の変形を来すことを特徴とする。劣性型は優性型に比較して重症となる傾向を示し、手指の瘢痕性癒着、食道狭窄、皮膚有棘細胞癌を高率に合併する。

## 疫学

本邦における症例数は、厚生労働省稀少難治性皮膚疾患調査研究班による疫学統計では約700名と推定されている。

## 標準治療と予後

いずれの病型も、生涯にわたり重症熱傷と同様の皮膚科潰瘍が続く、極めて重篤かつ悲惨な遺伝性皮膚疾患である。しかし、現在の医療現場では表皮水疱症に対する根治的治療法は全くなく、軟膏外用による潰瘍面の保護と感染予防といった、熱傷に準じた対症療法のみが行われているのが現状である。本症に対する根治的治療法開発のための臨床研究は、難病に苦しむ患者さんを救うために、喫緊の課題である。

## 対象疾患の設定根拠

本研究責任者は、現在厚生労働省特定疾患対策事業・表皮水疱症の根治的治療法確立に関する研究班において、研究代表者として骨髄間葉系幹細胞移植による治療法の開発を進めている。また、厚生省特定疾患基盤研究部門分子病態班難病特別研究員（平成8年度）、厚生労働省特定疾患対策事業・稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班班員（平成9年度～平成13年度）、研究協力者（平成14年度～現在に至る）、厚生労働省特定疾患対策事業・難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究班班員（平成13年度～平成17年度）、厚生労働省難治性疾患克服研究事業・重症多形滲出性紅斑に関する調査研究班班員（平成19年度～現在に至る）として、表皮水疱症の病態解明、治療法開発を目指して研究を進めてきた。これらの研究過程において、申請者は栄養障害型表皮水疱症のDNA診断技術を確立し、この技術としては初めて高度先進医療として認可された。さらにこの開発技術を基にして本邦栄養障害型表皮水疱症患者における遺伝子変異と臨床症状の関係解明・データベース構築を進めた。さらに、表皮水疱症モデルマウスを用いて、骨髄間葉系幹細胞が皮膚構成細胞に分化し、皮膚基底膜領域に欠損していた接着分子（VII型コラーゲン）を供給し得ることを世界で初めて確認して報告した（American Journal of Pathology, 2008）。またマウス皮膚潰瘍部に直接移植した間葉系幹細胞が、潰瘍治療後も長期間移植部皮膚に生着して機能していることを確認している。当該知見を基盤として、南米チリの共同研究グループが、他家骨髄由来間葉系幹細胞を培養した後、重症栄養障害型表皮水疱症成人患者の難治性潰瘍部に移植する臨床試験を開始し、移植後7日目に、完全欠損していたVII型コラーゲンが皮膚基底膜部に供給され、難治性潰瘍の上皮化が促進されたこと、治療効果は間葉系幹細胞移植後200日後も持続していることを確認している（私信）。

以上の申請者および共同研究者の研究成果を基にして、今回本研究申請者らは本邦表皮水疱症患者を対象とした治療法開発は医療人としての急務の課題と考え、骨髄間葉系幹細胞による再生的治療法を実施し、その安全性、効果及び実施可能性を評価することを計画した。

## 試験物

### 概要

「骨髄間葉系幹細胞」

規格：細胞総数： $1 \times 10^7$ 以上

純度：CD105+, CD34- 細胞として50%以上

viability：トリパンプルー陰性細胞 50%以上

### 2.2.2.これまでの前臨床試験、臨床試験及び臨床研究の結果の要約

本研究責任者らは、表皮水疱症モデルマウスを用いて、骨髄間葉系幹細胞が皮膚構成細胞に分化し、皮膚基底膜領域に欠損していた接着分子を供給し得ることを確認した。またマウス皮膚潰瘍部に直接移植した間葉系幹細胞が、潰瘍治療後も長期間移植部皮膚に生着していることを確認している。当該知見を基盤として、南米チリの共同

研究グループが、骨髄間葉系幹細胞を用いて栄養障害型表皮水疱症の成人患者に治療を開始し、移植後 7 日目で欠損していたⅦ型コラーゲンが皮膚基底膜部に存在していること、難治性潰瘍部の上皮化が促進されたこと、治療効果は間葉系幹細胞移植後 200 日後も持続していることを確認している。一方、わが国では表皮水疱症に対する間葉系幹細胞移植実施例は無い。

#### **治療計画の概要**

- 1) 被験者の血清の採取
- 2) ドナーからの骨髄細胞の採取
- 3) ドナー骨髄細胞から骨髄間葉系幹細胞の培養
- 4) 骨髄間葉系幹細胞移植術

#### **研究デザインの概要**

- 1) 試験の相：第 1 相
- 2) デザインの型：単群
- 3) 対照：無
- 4) ランダム化：無
- 5) 遮蔽化：無

#### **登録患者の予想される利益と不利益**

##### **予想される利益**

本研究に参加することにより報酬などの利益を受けることは一切無い。また、本研究により生じる知的財産権は研究者に帰属するものとし、それにより被験者が利益を受けることはない。

##### **予想される不利益**

本研究における治療にかかる費用は校費によって行われ、被験者による負担は生じない。なお、通常の診療にかかる費用は保険診療にてまかなわれる。また、本研究における治療が原因での有害事象が生じた場合、明かな補償制度は無いが、病院の規則に応じて対処する。個人情報については一切漏洩が無いよう万全の体制を整える。

##### **本試験の意義**

本研究の意義は、重症表皮水疱症患者を対象とした骨髄由来間葉系幹細胞移植術の安全性を明らかにし、新たな再生医療の確立の礎を築くことにある。この治療法の確立により最終的には重症表皮水疱症患者の生活の質の向上に大きく寄与することが期待される。

### **3. 対象疾患と適格基準**

#### **対象疾患**

重症栄養障害型表皮水疱症

#### **被験者一次登録時の適格基準**

##### **選択基準**

- 1) 栄養障害型表皮水疱症である。
- 2) 年齢 20 歳以上 60 歳未満。
- 3) 20cm×20cm 未満の難治性潰瘍を有する。
- 4) ドナーの適格基準に合致し、同意の得られている親または兄弟がいる。
- 5) 被験者本人の署名による同意が得られている。

##### **選択基準の設定根拠**

##### **除外基準**

- 1) 精神疾患を有する患者
- 2) アルコール中毒患者



- 3) 重篤な意識障害を有する患者
- 4) 悪性腫瘍（過去5年以内に既往がある患者を含む。）
- 6) 妊娠又は妊娠している可能性のある患者
- 7) 糖尿病を合併している患者
- 8) その他臨床研究責任者が移植に適さないと判断した患者

**除外基準の設定根拠**

**ドナーの適格基準**

**選択基準**

- 1) 年齢 20 歳以上 65 歳未満である。
- 2) 被験者と性の異なる親又は兄弟である。
- 3) 本人の署名による同意が得られている。

**選択基準の設定根拠**

**除外基準**

- 1) 血液疾患、または出血傾向を有する。
- 2) 慢性難治性の感染症を有する。
- 3) 登録前 6 ヶ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有している。
- 4) 悪性腫瘍（過去5年以内に既往がある患者を含む。）。
- 6) 感染症（梅毒, HIV, HBV, HCV, HTLV, パルボウィルス B19 いずれかの感染者）。
- 6) 伝達性海綿状脳症及びその疑いのある者。
- 7) その他臨床研究責任者が移植に適さないと判断した者。

**除外基準の設定根拠**

**被験者二次登録時の適格基準**

**選択基準**

- 1) 一次登録が完了している。
- 2) ドナー由来骨髄間葉系細胞が作製されている。

**選択基準の設定根拠**

**除外基準**

- 1) 被験者が、骨髄間葉系幹細胞作製完了後の本研究への参加の同意を撤回している。
- 2) ドナーが作成された間葉系幹細胞の投与の承諾を撤回している。
- 3) その他、研究責任医師の判断により、本研究への参加継続が不適当と考えられる。

**除外基準の設定根拠**

- 1) 2) 研究参加への自由意思の原則

**4. 試験物**

**試験物名**

骨髄間葉系幹細胞

**成分・構造・特性・製造方法等**

**4.1.1. 規格**

細胞総数： $1 \times 10^6$ 以上

純度：CD105+, CD34- 細胞として 50%以上

viability：トリパンブルー陰性細胞として 50%以上

**4.1.2. 製造方法：**

- 1) 家族ドナーからの骨髄細胞の採取
- 2) CPC における骨髄間葉系幹細胞の培養（サイトカインなどは不使用、被験者血清の使用）
- 3) 骨髄間葉系幹細胞移植術（被験者患部皮下への移植）

### 試験物の安全性についての評価・情報

HLA 一致親族からの骨髄移植は白血病などにたいし、既に確立された治療法である。また、通常の骨髄移植においては前処置による骨髄抑制や、全身投与であるための GVH の発症など危険性が伴うが、本研究においては患部皮下への少量投与であり、それらの危険性はないと考える。なお、本省令は HLA 一致ドナーに限定していないが、移植片中に T リンパ球が存在することは考えにくい。GVHD の発症は考慮に入れる必要がない。HLA の不一致は生着の確率には関わると考えられるが、安全性に大きく関与しないと考えられる。

骨髄由来間葉系幹細胞については遺伝子導入や、サイトカインの使用により発癌性の可能性が増すことが否定しきれないが、本研究においては遺伝子導入、サイトカインによる増幅などを行わず、発癌の可能性はきわめて低いと考える。さらに近年、骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床研究においてはウシ血清やコラゲナーゼなどによるプリオン汚染の可能性が問題となっているが、本研究においては骨髄間葉系幹細胞の培養過程で動物由来の製剤を用いず、被験者の血清を用いることから、微生物などによる汚染に関しても比較的安全であると考えられる。

### 製品

剥離した樹状細胞を1mlの生理食塩水に懸濁し、インシュリン用注射器に充填、専用ビニール袋に梱包し、出荷判定を受けたものを製品とする。

### 交付・搬送

臨床研究実施者が、上記製品を出荷判定書とともに搬送用クーラーボックスにいれ、未来医療センター治療区内手術室に搬送する。

### 管理・保管

製品は搬送後速やかに使用する。手術室においては臨床研究実施者自らの監視下にて管理・保管する。

## 5. 研究実施計画

### デザインの型

- 1) 試験の相：第1相
- 2) デザインの型：単群
- 3) 対照：無
- 4) ランダム化：無
- 5) 遮蔽化：無

### デザインの設定根拠

#### 目標登録患者数・患者登録期間

- 1) 目標症例数：12例とする。
- 2) 患者登録期間：臨床研究開始（病院長の許可）後、2年間とする。

#### 目標登録患者数の集積可能性

#### 治療計画

#### 治療の定義

本研究における治療とは、以下の 5.5.2.の方法に示す「(1)被験者の血清の採取」から「(4)骨髄間葉系幹細胞移植術」完了までとする。

#### 方法

- 1) 被験者の血清の採取
  - (1) 被験者の静脈より採血バッグにて約400mlの末梢血を採取する。

- (2) 採血バッグごと遠心することにより血清を分離する。
- (3) 血清は別の採血バッグに回収する。
- (4) ラベルを貼付する。
- (5) 血清を非動化 (56度30分) する
- 2) ドナーからの骨髓細胞採取
  - (1) 未来医療センター処置室においてドナー腸骨より局所麻酔下に骨髓穿刺針を用いて骨髓穿刺を行う。
  - (2) 1回の吸引あたり約5mlの骨髓液を吸引し、ヘパリン入りの採血バッグに回収する。合計約20mlの骨髓液を回収する。
  - (3) 採血バッグにラベルを貼付し、専用輸送容器に入れて1)の被験者血清とともに未来医療センターCPCに搬入する。
- 3) ドナー骨髓細胞から骨髓間葉系幹細胞の培養
 

CPCバイオハザード対策用キャビネット内で無菌的に処理する。

  - (1) 培養用基本培地の調整： $\alpha$ MEM 500mlに抗生剤 (penicillin/streptomycin) と被験者血清88mlを混和する。
  - (2) ドナー骨髓細胞をPBSで3回洗浄し、30mlの基本培地に浮遊させ、フラスコ (75cm<sup>2</sup> Flask Vent Cap) 2本に播種する。
  - (3) 培養開始24時間後に上清及び浮遊細胞を吸引除去し、2回の洗浄の後新たに1mlの基本培地を加える。
  - (4) 4日を超えない範囲で2~3回/週の間隔で(3)と同様の方法で培地交換を行う。
  - (5) confluentになった場合はトリプシン添加により細胞を剥離し、(2)と同様の方法により継代を行う。その際、フラスコ1本あたりの細胞数が1個を超えないようにフラスコの数を調整する。
  - (6) 2回の継代の後に細胞数を計測し、以下であればもう一度継代を繰り返す。なお、培養期間は20日±10日間とする。
- 4) 骨髓間葉系幹細胞移植術
  - (1) 移植の前日、細胞上清を吸引し、その一部を [ml] 感染症検査のために品質検査部に提出する。トリプシンにより細胞を剥離し、1/10量を用いて細胞数、純度、viabilityの検査を行い、基準を満たすことを確認する。この際、規格に満たない場合は培養細胞を凍結保存し、再度ドナーの骨髓細胞採取を行い、同様の工程を経て骨髓間葉系幹細胞の培養を行う。
  - (2) 同じく、移植の前日に骨髓間葉系幹細胞100個分を生理食塩水100 $\mu$ lに懸濁し、被験者の前腕健常部の皮下に試験投与する。翌日までに重篤なアレルギー症状を生じた場合は本試験を中止する。
  - (3) 移植当日、トリプシンにより骨髓間葉系幹細胞を剥離し、PBSにより2回の洗浄を行い、細胞数を再度計測し、1mlの0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁する。
  - (4) インスリン用注射器に吸引し、ジッパー付きのビニール袋に梱包し、ラベルを貼付する。
  - (4) 未来医療センター内処置室に搬送し、移植を行う。移植対象患部全周の皮下に数カ所にかけて投与する。

#### 併用治療

移植前処置として、移植1時間前よりソルコーテフ100mg、ボララミン mgの点滴静脈注射を行う。

#### 支持治療

移植直後に重篤なアレルギー症状や発熱を生じた場合には、ソルコーテフの静脈注射など適切な治療を行う。

#### 後治療

移植後の患部などに皮疹などアレルギー反応を生じた場合は、副腎皮質ステロイド製剤の塗布や抗アレルギー剤の内服など適切な治療を行う。

#### 治療計画の設定根拠

- 1) 骨髄間葉系幹細胞はこれまでの経験より骨髄1mlから約20日間の培養において10個の骨髄間葉系幹細胞が得られることがわかっている。本研究において目標細胞数が10個であることから骨髄採取量は10mlが適当であると考えられる。
- 2) 骨髄間葉系幹細胞は3代の継代以後は増殖能力が減衰することが知られている。そのため、培養は3代継代までとした。
- 3) 移植細胞の生着率は不明であるが、これまでのマウスの実験からは。よって約10cm×10cmの皮膚患部に行き渡らせるためには10<sup>6</sup>個の骨髄間葉系幹細胞が必要であると考え、細胞数、純度、生存率を設定した。なお、起こりうる有害事象は細胞数に影響されないと考え、上限は設定しない。
- 4) 同種ドナーの細胞が皮下に投与されることにより重篤なアレルギー反応が起こる可能性は少ないと考えられるが、被験者の安全を考え、前日の少量投与を試行することとした。

#### 主要評価項目及び副次評価項目

主要評価項目：有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間

副次評価項目：

- 1) 潰瘍面積縮小程度
- 2) 組織学的水疱形成程度
- 3) 投与細胞の組織学的生着状況
- 4) 欠損基底膜分子の発現程度
- 5) ドナー・被験者のHLA一致locusと生着状況の相関
- 6) 移植細胞数と生着状況の相関
- 7) 移植細胞数と有害事象出現との相関
- 8) 骨髄由来間葉系幹細胞移植術の完遂の可否

#### 登録患者の研究参加期間

- 1) 治療前観察期間（登録日から被験者の血清の採取まで）：3週以内
- 2) 治療期間（被験者の血清の採取から骨髄間葉系幹細胞移植術まで）：20日±10日
- 3) 治療後観察期間（骨髄間葉系幹細胞移植術終了から最終検査終了まで）：48週

#### 研究実施期間

### 6. 主要評価項目及び副次評価項目の定義

#### 安全性に関する評価項目

##### 主要評価項目

有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間

##### 主要評価項目の適切性

本研究は、同種骨髄由来間葉系幹細胞を体外で培養、増幅した後にレシピエントの皮下に移植する本邦発の臨床研究である。HLA一致・部分不一致親族からの骨髄移植は白血病などにたいし、既に確立された治療法である。さらに、通常骨髄移植においては前処置による骨髄抑制や、全身投与であるためのGVHDの発症など危険性が伴うが、本研究においては患部皮下への少量投与であり、それらの危険性はないと考える。なお、本研究ではHLA一致ドナーに限定していないが、移植片中にTリンパ球が存在することは考えにくいため、GVHDの発症は考慮に入れる必要がない。HLAの不一致は生着の確率には関わりと考慮されるが、安全性に大きく関与しないと考えられる。