

しかし、何らかのアレルギー反応を惹起することは予想され、感染症の危険性も否定できない。予期されない有害事象の可能性も考え、本研究の主要評価項目を安全性の評価とした。

有効性に関する評価項目

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

副次評価項目の適切性

- 1) 表皮水疱症では多くの場合、水疱形成部分の表皮が剥離し、潰瘍を形成する。正常基底膜細胞が生着し、正常の皮膚形成が回復するとその部分の潰瘍が消失する。また、潰瘍の形成は疼痛、感染の原因となり、本疾患の患者にとって最も深刻な症状である。従って潰瘍面積縮小程度は治療効果の最も良い指標となる。
- 2) 患部において真皮と基底膜の接着が回復しているかを確認するためには皮膚生検による組織学的検索が必要である。
- 3) 本疾患の原因である7型コラーゲンの産生がどの程度回復しているかを確認するためには遺伝子検索を行う必要がある。
- 4) 異性間移植において移植されたドナー細胞がどれだけ生着しているかを性染色体の発現により検索することで本治療法の有効性の評価、および必要細胞数の決定に反映させたい。
- 5) 骨髄間葉系幹細胞にHLAの発現は少ないと言われているが、真皮細胞、基底膜細胞に分化する過程でHLAの発現が増強すると考えられ、それによる拒絶が予想される。本研究においてはHLAの不一致による拒絶の程度を検討し、治療開発に反映させたいと考える。
- 6) 本治療法において潰瘍面積と必要細胞数の相関を求め、治療開発に反映させたいと考える。
- 7) 細胞数と有害事象との相関は少ないと予想されるが、その点を確認したい。
- 8) 設定培養条件における骨髄間葉系幹細胞の増殖状況などから必要細胞数を得られるかといった問題を始とし、一次登録症例のうち二次登録、移植術を完遂できる被験者がどれだけいるかについても検討する。

7. 観察・検査項目とスケジュール

観察・検査スケジュール

7.1.2. 被験者の観察・検査スケジュール

観察・検査・評価日	一次登録前	二次登録前	移植直後	プロトコル治療後		
				1週	4週	1年後

実施許容期間	3週以内	3週以内	±3日	±10日	±2週	
臨床症状の観察	○	○	○	○	○	○
血液検査・尿検査	○	○	○	○	○	○
胸部 X線検査	○	○	○			○
十二誘導心電図	○	○	○			○
皮膚生検	○				○	○

7.1.2.ドナーの観察・検査・評価スケジュール

観察・検査・評価日	一次登録前	骨髄採取直後	骨髄採取一週後
実施許容期間	3週以内	+1日	±3日
臨床症状の観察	○	○	○
血液検査・	○	○	○

7.2. 観察・検査項目

7.2.1. 被験者の観察・検査項目

1)臨床症状の観察

(1) 検査時期

一次登録前、二次登録前、移植直後、移植後1週後、4週後、12週後、1年後

(2)方法および注意点

平成状態で観察する。

(3)観察項目

① バイタルサイン

a)血圧（収縮期、拡張期）

b)脈拍

c)体重

d)体温

②身体所見

- a) 胸部聴診（呼吸音、心音）、
- b) 腹部触診、

③移植対象患部の観察

- a) 潰瘍面積：移植部位の辺縁から 5cm（ルーラーを用いて）90 度の位置にカメラ（Sony Cyber-shot 5.1 Megapixel Digital Camera）を用いて移植部を撮影する。写真は Adobe Acrobat Reader Professional Software)を用い、面積、外周を計測する。
- b) 潰瘍の性状（出血の有無、か皮の形成など）
- c) 潰瘍の進達度（目視による）

2) 血液検査・尿検査

(1) 検査時期

一次登録前、二次登録前、移植直後、移植後 1 週後、4 週後、12 週後、1 年後

(2) 方法および注意点

原則として大阪大学歯学部附属病院臨床検査部にて測定をおこなう。

(3) 検査項目

a) 血液学的検査

赤血球、ヘモグロビン値、白血球数、血小板数、白血球分画

b) 遺伝学的検査

HLA 検索（A,B,DR ローカス）（一次登録前のみ）

c) 生化学的検査

血清電解質（Na,K,Cl）、BUN、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、抱合型ビリルビン、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、CRP、

d) 尿検査

尿蛋白、尿糖（定性）、潜血、ケトン、PH、沈査

3) 十二誘導心電図

(1) 検査時期

一次登録前、二次登録前、移植直後

(2) 方法および注意点

平静状態で、ベッド上に仰臥位の状態で、検査技師、または担当医が、十二誘導心電図を計測する。

(3) 評価

重篤な心疾患の有無を評価する。

4) 胸部 X 線検査

(1) 検査時期

一次登録前、二次登録前、移植直後

(2) 方法および注意点

検査技師が胸部 X 線正面画像を撮影する。立位で撮影することを原則とするが、被験者の状態によって立位が困難な場合は、仰臥位での撮影も可とする。

(3) 検査項目

肺野異常陰影の有無

5) 移植対象患部皮膚生検による組織学的検索

(1) 検査時期

一次登録前、4 週後、48 週後。

(2) 方法および注意点

移植後の生検においては局所麻酔下に移植部位右辺縁中央から内側 \quad cm の位置、 \times cm、真皮に到達するよう生検を行う。生検片は4片に分割し、一部はブロックのまま凍結保存とする。残りは以下の項目に私用する。

(3)検査項目

a)組織学的水疱形成の有無：一部を \quad 固定し、 $7\mu\text{m}$ の薄片とし、スライドグラスに固定した後サンプルをヘマトキシリン染色液に10秒間浸し、乾燥させ、光学顕微鏡で観察する。真皮・基底膜剥離部位の長さの計測

b)移植骨髄間葉系幹細胞の組織学的生着状況：XY/XX染色体の区別によりFISH法を用いてキメリズムを検索する。Q-BIOgeneのtissue pre-treatment kitを用いる。XY染色体 centromeric region に対する α -satellite probeを用いる。スライドにprobeをマウントし、 73°C で熱変性した後、 37°C で16時間 hybridize する。洗浄後スライドは更にDAPIで染色し、ニコン蛍光顕微鏡でスキャンし、XY/XXをカウントする。

c)欠損基底膜分子の発現程度(RT-PCR)：移植片からRNAを抽出し、RT-PCRによりcollagen VIIの発現をreal-time PCRをにより定量する。

7.2.2. ドナーの観察・検査項目

1)臨床症状の観察

(1)検査時期

一次登録前、骨髄採取直後

(2)方法および注意点

平成状態で行う。

(3)観察項目

①バイタルサイン

a) 血圧 (収縮期、拡張期)

b) 脈拍

c) 体重

d) 体温

②身体所見

a) 胸部聴診

b) 腹部触診

3)血液検査

(1)検査時期

一次登録前、骨髄採取終了直後、骨髄採取2週後

(2)方法および留意点

原則として大阪大学医学部附属病院臨床検査部において検査を行う。

(3)検査項目

a)血液学的検査

赤血球、ヘモグロビン、白血球数、血小板数、白血球分画

b)遺伝学的検査

HLA 検索 (A,B,DR ローカス) (一次登録前のみ)

c)生化学的検査

血清電解質 (Na, K, Cl)、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、CRP

8. 被験者の安全性の確保

基本的事項

「ヒト幹細胞指針」の規定に基づき以下の条項を定める。

1) 採取段階における安全対策

(1) ドナーの安全

- ① 採取術前のドナーの全身状態を把握し、採取術による危険性を最小限にするよう努力する。危険と考えられる場合は採取術を中止又は延期するなどドナーの安全性を最優先とする。
- ② 採取後のドナーの状態を十分観察し、有害事象の有無について把握する。有害事象が生じた場合は、速やかに対処する。

(2) 被験者の安全

「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成12年12月26日付け医薬発第1314号厚生省医薬安全局長通知）に基づき、以下の条項を定める。

- ① ドナースクリーニングにより細胞提供者としての適格性を確認する。
- ② 骨髄細胞の採取に当たっては、採取の過程における微生物等の汚染を防ぐために必要な措置を講じる。
- ③ 搬送容器については清浄度の保証があるもの、外部から微生物侵入の危険性のないものを選択する。

2) 培養段階における安全対策

- (1) ヒト幹細胞を扱う作業区域及び器材については無菌状態を確保し、定期的な保守、点検等により、その清浄度を保つように努めるとともに、その記録を作成し保存する。
- (2) 取違え又は細菌、真菌、ウイルス等の伝播の危険性を避けるため、複数の提供者からのヒト幹細胞細胞を同時に同一区域内で扱わない。
- (3) 細菌、真菌、ウイルス等による汚染の危険性を排除する。
 - ① 提供者のスクリーニング記録の確認
 - ② 調製工程における汚染防止
 - ③ 調製の各段階での試験及び検査
 - ④ 妥当性の確認された方法による不活化及び除去の導入

3) 移植段階における安全対策

- (1) 提供者のスクリーニング、最終調製物の試験及び検査の結果、調製番号、ロット番号その他の情報を管理する。
- (2) 被験者について、将来新たに病原体等に感染した場合に、その原因が当該臨床研究に起因するかどうかを明らかにするため、最終調製物を適切な期間保存するとともに、当該被験者に骨髄間葉系幹細胞を移植する前後の記録を、総括報告書を提出した日から少なくとも10年間保存するものとする。
- (3) 被験者に病原体感染等の有害事象が起きた場合に当該情報を把握できるよう、また、最終調製物に問題が生じた場合に被験者の健康状態等が把握できるよう、適切な措置をとるものとする。また、この措置を実施するため、被験者から必要な情報の提供や保存について協力を受けられるよう、研究者等に対してあらかじめ指示しておくものとする。

有害事象発現時の対応

- 1) 有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、研究被験者の安全の確保に留意し、専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。研究被験者の試験参加中およびその後を通じて、临床上問題となる試験に関連した重篤な有害事象に対して十分な医療措置を講じる。
- 2) 研究責任医師は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を行う。

- 3) 重篤な有害事象が認められた場合は大阪大学医学部附属病院 ヒト幹細胞を用いる臨床研究「重篤な有害事象発現時の対応に関する手順書」(以下「重篤な有害事象手順書」と記す。)に従い病院長に報告し、当該臨床研究との因果関係や臨床研究継続の可否などの審議を受け、必要と認めた場合は臨床研究を中止する。さらに、「重篤な有害事象手順書」に従い、研究との因果関係が認められ厚生労働大臣への報告の必要があると認められた場合、病院長は厚生労働大臣に報告する。研究期間のみならず研究終了後の追跡調査において「重大な出来事」が明らかになった場合も厚生労働大臣への報告を行う。

予想される副作用

- 1) ドナーの予想される副作用
 - (1) 骨髄炎(骨髄感染症)
 - (2) 血腫
 - (3) 血球減少
 - (4) 敗血症
 - (5) 穿刺針の遺留

- 2) 被験者の予想される副作用
 - (1) 感染症
 - (2) アナフィラキシーショック
 - (3) 皮疹
 - (4) 発熱
 - (5) 血球減少

9. 被験者毎の研究中止の基準及び手順

基準

研究責任医師又は研究分担医師は、以下の場合には、当該被験者の研究を中止・中断する。

- 1) ドナー骨髄細胞から幹細胞の2回目の採取に際し、採取細胞が基準を満たさなかった場合当該被験者の研究を中止する。
- 2) ドナー骨髄細胞からの2回の培養後、2回とも培養細胞の基準を満たさなかった場合当該被験者の研究を中止する。
- 3) 上記1)、2)の他、研究実施計画書を遵守したプロトコル治療が不可能となった場合当該被験者の研究を中止する。
- 4) 被験者またはドナーより同意撤回の申し出があった場合、当該被験者の研究を中止する。
- 5) 有害事象の発現を認め、研究責任医師が当該被験者についての研究の継続が困難と判断した場合、当該被験者の研究を中止する。
- 6) プロトコル治療開始後、被験者が適格基準を満たしていなかったことが判明した場合、当該被験者の研究を中止する。
- 7) 「11.2.1 研究全体の中止の基準」により本臨床研究全体が中止または中断された場合、実施中の被験者の臨床研究は可能な時点で中止または中断する。
- 8) その他、研究責任医師又は研究分担医師が、研究の中止を適切と判断した場合、当該被験者の研究を中止する。
- 9) 被験者の体調の変化などにより一次的に臨床研究の継続が不可能であると判断した場合、被験者の臨床研究を中断し、回復を待って、可能であれば再開する。

手順

研究責任医師が当該被験者の臨床研究の継続が可能かどうかを判断し、不可能な場合は

中止の手続きを行う。

- 1) 研究責任医師又は研究分担医師は、研究を中止する旨を当該被験者のドナー及び当該被験者に速やかに説明し、適切な医療の提供その他必要な措置を講じる。
- 2) 症例報告書に中止の理由及び中止年月日を記載する。

10. 研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更

研究実施計画書の遵守

被験者の緊急の危険を回避するためのものである等医療上やむを得ない場合、又は臨床研究の事務的事項（例えば、電話番号の変更）に関する変更を除き、実施計画書を遵守して本臨床研究を実施しなければならない。

研究実施計画書からの逸脱又は変更

責任者又は分担者は、被験者の緊急の危険を回避するためのものである等医療上やむを得ない場合、又は臨床研究の事務的事項（例えば、電話番号の変更）に関する変更を除き、ヒト幹細胞審査委員会の事前の審査に基づく文書による承認を得ることなく、実施計画書からの逸脱又は変更を行ってはならない。

また、変更の際には変更することの倫理的、科学的、及び医学的妥当性について十分検討する。

また、逸脱・変更の際には「ヒト幹細胞臨床研究の規程」第5条、第19条に従う。

研究実施計画書及び症例報告書の改訂

11. 研究の終了又は中止及び中断

研究の終了

基準

目標症例の登録が予定期間内に終了した場合、登録症例の最終研究期間終了日を研究の終了とする。

手順

「ヒト幹細胞臨床研究の規程」第10条に従う。

研究全体の中断・中止の基準及び手順

基準

試験責任医師は、以下の場合に、試験全体を中止又は中断する。

- 1) 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究規程」第4条に基づき病院長が大阪大学医学部附属病院ヒト幹細胞審査委員会の答申を受け、臨床研究を継続すべきでないことと決定し、臨床研究責任医師に通知した場合、本臨床研究を中止する。
- 2) 重篤な有害事象等の重大な事態が発生した場合、本臨床研究を中断し、「11.2.2.手順」に従う。
- 3) 新たな被験者の安全または本臨床研究の実施に悪影響を及ぼす可能性のある重大な情報を入手した場合、本臨床研究を中断し、「11.2.2.手順」に従う。
- 4) その他の理由により研究責任者が本臨床研究を中止又すべきである、または継続が不可能であると判断した場合、本臨床研究を中止する。

手順

11.2.1.項の2)、3)による中断の場合は、病院長に報告するとともに、実施中の被験者の臨床研究を可能な時点で中断し、必要に応じて適切な処置および原因究明を行う。また、新たな被験者のエントリーを中断する。

なお、病院長がヒト幹細胞臨床研究審査委員会の答申を受け、継続可能であるとの決定を下した場合は再開することができるが、継続すべきでないとの決定を下した場

合には、本臨床研究を中止する。

中止の場合は、病院長に中止の報告を行い、病院長はさらにヒト幹細胞臨床研究審査委員会に報告するとともに、臨床研究総括報告書についてヒト幹細胞臨床研究審査委員会の意見を求める。

12. 同意取得

同意説明文書及び同意書の作成

同意説明文書は既に作成されている。(添付文書1「患者さんへ」参照)

また、同意書および同意撤回書の様式も作成されている。(添付文書2参照)

同意説明文書及び同意書の改訂

同意説明文書及び同意書が改訂された場合は既に臨床研究に参加している被験者においても改訂された同意説明文書により再び説明を行い、再同意を文書により取得する。

同意説明及び同意取得の時期及び方法

スクリーニングを行う前に外来において同意説明を行い、被験者本人による同意を得る。

研究責任医師または研究分担医師は、本研究への参加候補となる患者本人に対して、同意説明文書(添付文書1「患者さんへ」参照)を提供し、口頭で十分な説明を行った後、本研究への参加の同意を文書で取得する。(「ヒト幹細胞臨床研究インフォームド・コンセントに関する手順」を参照)。なお、本研究においては、単独で同意を取得できない者は被験者とししない。

13. 登録

14. 症例報告書

症例報告書の作成の手順

症例報告書の記載内容の変更又は修正の手順

症例報告書の提出の手順

15. 統計学的考察

目標登録患者数の設定根拠

解析対象集団の定義

安全性に関する解析対象集団

有効性に関する解析対象集団

解析項目・方法

統計解析計画書の作成

16. 規範、法令、基準、指針等の遵守

17. 研究の品質管理及び品質保証

品質管理

- 1) 製造においては多点環境モニタリングシステム、工程管理システムの管理の下に製造が行われる。
- 2) 骨髄間葉系幹細胞の培養過程は大阪大学未来医療センターCPC内で行われるが、その間、未来医療センターにおける臨床研究の手順書に従い、製造工程、製造環境が全て手順書を遵守して行われることを保証する。
- 3) 出荷時には「出荷判定の手順書」に従い、品質管理者が以下の項目を確認し、出荷判定を行う。

(1) 製造指図報告の記録書・指図書に空欄がないことを確認する。

- (2) 記録されている情報が、標準書および手順書と合致していることを確認する。
また、合致しないところを指摘し、その矛盾が臨床的に及ぼす影響を判定し、標準外手順管理連絡書に記載する。
- (3) 同意書があることを再確認する。
- (4) 規格試験に合致していることを確認する。
- (5) 品質証明書(感染症検査適性証明書)(MTR-CS-R03)があることを確認する。
- (6) ラベルの確認を行う。

品質保証

品質管理責任者は規格試験の結果及び感染症検査の結果の報告を受け、品質保証書に記載し、品質管理者に報告する。品質管理者はこの報告をもとに出荷判定を行う。

18. 研究の倫理的実施

ヒト幹細胞臨床研究審査委員会

本研究の実施に関しては大阪大学医学部附属病院ヒト幹細胞臨床研究審査委員会の承認を得て実施される。(「ヒト幹細胞臨床研究審査委員会規程」参照)

研究の進捗報告

本研究の実施期間中定期的に、また終了時には進捗状況を上記大阪大学医学部附属病院ヒト幹細胞臨床研究審査委員会に報告する。(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究の規程」参照)

被験者の人権及び個人情報の保護に関する事項

1) 被験者の人権

2) 個人情報の保護

被験者の同意取得後はデータ管理、製造管理など、症例の取り扱いにおいては全て連結可能匿名化された被験者識別コードまたは登録番号により管理され、匿名化コードと氏名の対照表および氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。また、公表に際しては被験者の名前が直接公表されることがない等、被験者の個人情報の保護については十分に配慮する。

19. 記録等の保存

研究実施医療機関

研究責任医師

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学講座 准教授

研究実施医療機関の長

大阪大学医学部附属病院病院長

審査委員会の設置者

大阪大学医学部附属病院病院長

大阪大学医学部附属病院未来医療センター

20. 研究費用並びに健康被害の補償

研究の資金源及び利益相反

研究に関する費用負担

健康被害の補償等

この臨床研究に起因する有害事象が発生した場合、研究者は医学上最善の処置を取る事により被験者の回復に努める。この際には、日常の治療の場合と同様に、被験者の主治医の属する医療機関において検査および治療を行うことになり、別途、補償制度はない。また、障害、死亡などの重篤な有害事象に対する特別な補償制度はないが、病院の規則に則り誠実に対処する。

21. 研究成果の帰属及び研究結果の公表に関するとり決め

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する。

本臨床研究結果は、総括報告書としてまとめることとする。また必要に応じて論文または学会発表として公表する。本臨床研究に関し、研究終了前に公表する場合はヒト幹細胞臨床研究審査委員会に、その公表先と内容を申請し、承認を受けなければならない。

公表に際しては被験者の名前が直接公表されないことがない等、被験者の個人情報の保護については十分に配慮する。

22. 研究実施体制

23. 文献

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
分担研究報告書

表皮水疱症における皮膚有棘細胞癌発生病態の解析

研究分担者 片山 一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨

表皮水疱症の根治的治療法開発を進めるにあたり、重症栄養障害型表皮水疱症で高率に合併する皮膚有棘細胞癌の制御は極めて重要な課題である。分担者は、20歳男性の重症栄養障害型表皮水疱症患者に合併した皮膚有棘細胞癌がG-CSFおよびPTH-rPを異常産生していることを見いだした。これらの情報は腫瘍の増殖・転移の病態理解、さらには腫瘍マーカーとして早期診断を進める上で、重要な知見であると思われる。

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
梅垣 知子 大阪大学大学院医学系研究科
皮膚科学

A. 研究目的

表皮水疱症は全身の皮膚に水疱を生じる遺伝性疾患で、特に劣性栄養障害型先天性表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa: RDEB) はVII型コラーゲンの遺伝子異常によって生じる。また RDEB は生下時から水疱、びらん後に癒痕治療を繰り返すため比較的若年から皮膚の有棘細胞癌が発症し、生命予後に関わることが知られている。今回我々は、表皮水疱症に合併する有棘細胞癌の発症病理を理解し、治療法開発の一助とすることを目的として、若年 RDEB 患者に生じた granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) および parathyroid hormone-related protein (PTH-rP) 産生有棘細胞癌(SCC)症例

より得られた知見をまとめ、病態について考察する。

B. 研究方法

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、その治療経過を通して腫瘍細胞増殖機序に関わる病態を検討・考察した。

C. 研究結果

有棘細胞癌を合併した栄養障害型表皮水疱症症例の症状・治療経過は以下の通りである。

症例: 20歳男性。
家族歴なし。

現病歴: 18歳から拡張型心筋症と二次性の呼吸不全、腎不全あり、当院小児科入院となっていた。患者は生下時より機械刺激により全身の皮膚に水疱びらんを生じており、電子顕

微鏡検査による VII 型コラーゲンの遺伝子異常を認め、RDEB の診断を得ていた。外力が加わる部位を中心として全身に水疱新生とびらん潰瘍を認め、癒痕治癒し、手足の皮膚は癒着し融合していた。また食道の狭窄も認めており、経口摂取も困難になっていた。約 6 ヶ月前から右足に手掌大の皮膚潰瘍を認め、外用剤などで加療するも難治であった。その後急速に拡大しながら潰瘍表面が疣状に隆起するようになってきた。また同時期より血中のカルシウム値、CRP 値および白血球数の著明な上昇を認めた。

皮膚病理所見:皮膚生検を施行したところ、表皮から連続して異型性のある有棘細胞様の腫瘍細胞が増殖し、一部に癌真珠の形成を認め、高分化型の SCC と診断した。また免疫染色にて腫瘍細胞に G-CSF、PTH-rP 陽性を認めた。

検査成績:白血球数:39440/mm³、好中球 92%、ヘモグロビン:9.4 g/dl、カルシウム:10.4 mg/dl、CRP:15.6 mg/dl、SCC:76 ng/ml (0-2)、血清中 PTH-rP:5.5 pmol/l (<1.1) G-CSF:402 pg/ml

治療経過:CTおよびガリウムシンチグラフィー施行し、全身に明らかな転移を認めなかったため、右膝下で下腿切断術施行。組織学的に手術断端は腫瘍細胞を認めなかった。腫瘍切除後より速やかに白血球、CRP、血清カルシウム値の低下を認めた。1 ヶ月後、切除断端に

腫瘍の局所再発あり、また肺に多発する転移病巣を確認した。積極的な加療は施行せず、経過観察したところ、再び白血球、CRP、血清カルシウム値の著明な上昇を認めた。術後約 5 ヶ月に全身状態の悪化により永眠された。

D. 考察

表皮角化細胞は様々なサイトカインやホルモンを分泌することが知られているが、正常表皮角化細胞では G-CSF、PTH-rP の産生は低値である。今回 SCC がこれらのサイトカインを産生したメカニズムはまだ不明であるが、高分化型であったことでサイトカイン産生能が維持され、活性化していたと考える。これらのサイトカインが腫瘍細胞の増殖や転移に対してどのような役割を持つかを明らかにするためには、今後のさらなる検討が必要である。しかし、皮膚表面に多数の潰瘍や癒痕を持つ表皮水疱症患者では、皮膚有棘細胞癌の早期発見が困難であることも少なくない。これらサイトカインやホルモンの腫瘍マーカーとしての意義が明らかとなれば、骨髄間葉系幹細胞移植の際に、極めて有用な適応判断の指標となり得るかもしれない。今後の情報蓄積が必要である。

E. 結論

表皮水疱症の根治的治療を可能にするためには、生命予後に関わる合併症である皮膚有棘細胞癌の発症・進展病理を理解し、治療法開発・選択の際の情報や判断材料とすることが重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Murota H et al. Emedastine difumarate inhibits histamine-induced collagen synthesis in dermal fibroblasts. J Investig Allergol Clin Immunol 2008 18(4):245-252.

2)Murota H et al. New aspect of anti-inflammatory action of lipo-prostaglandinE1 in the management of collagen diseases-related skin ulcer. Rheumatol Int 2008 28(11):1127-1135.

3)Kijima A et al. Does drug-induced hypersensitivity syndrome elicit bullous pemphigoid? Allergol Int 2008 57(2):181-182.

4)Hanafusa T et al. Establishment of suction blister roof grafting by injection of local anesthesia beneath the epidermis: less painful and more rapid formation of blisters. J Dermatol Sci. 2008 50(3):243-247.

2. 学会発表

1)Katayama I. Clinical approach and therapeutic perspective of the scleroderma. The Chinese association for dermatology and venereology of the integration of traditional Chinese medicine with western medicine Annual Meeting, 2008.11.2 上海.

2)Umegaki N et al. A case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa complicated

with dilated cardiomyopathy and fast-growing squamous cell carcinoma producing PTH-rP and G-CSF. 2008.11.2 杭州

3)片山一朗 考え方と治療の実際 アトピー性皮膚炎 第16回小児臨床薬師・アレルギー免疫研究会 2008.1.26 福岡

4)片山一朗 膠原病診療のピットフォール 第3回湯島皮膚アレルギー研究会 2008.4.12 東京

5)片山一朗 アレルギー疾患の寛解から治癒をめざす治療戦略 アトピー性皮膚炎 第20回日本アレルギー学会春季学術大会 2008.6.13 東京

6)片山一朗 皮膚のリモデリングとその制御 第1回上野の山サマーカンファレンス 2008.8.9 東京

7)片山一朗 皮膚科における膠原病診療のピットフォール「シェーグレン症候群を中心に」第37回大阪皮膚科医会 2008.9.27 大阪

8)片山一朗 アトピー性皮膚炎とリモデリング 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11.27 東京

9)片山一朗 化学物質等の環境因子とアレルギーに関する研究の最前線について 平成20年度化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム 2008.12.15 東京

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

脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離培養法に関する研究

研究分担者 橋本 公二 愛媛大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学 教授

研究要旨

表皮水疱症の根治的治療法を確立する目的で脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離培養法を開発した。ヒト脂肪組織を酵素処理にて分散し、遠心操作にて沈降する細胞分画を得た。10%FCSを含むDMEM培地にて組織培養用シャーレに播種したところ、シャーレに付着・増殖する線維芽細胞用の細胞を得ることができた。この細胞は10回以上継代培養が可能であり、増殖能力も維持されていた。この脂肪組織由来線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞としての性質を有しているかの検討が今後必要である。

共同研究者

白方 裕司 愛媛大学大学院医学系研究科
感覚皮膚医学

A. 研究目的

表皮水疱症は細胞骨格ならびに基底膜の蛋白をコードする遺伝子異常により発症する疾患で、根治的治療は遺伝子治療である。遺伝子治療が実際に行うことができるまでには相当のハードルがあり、現実に直面する患者の症状を改善するにはなんらかの治療法の開発が必要である。現時点では最も有効であると思われる治療法は再生医療である。これまでの研究成果においては自己ないしは同種培養皮膚を用いた治療法が最も有効であるが、培養皮膚作製には高度な技術が必要であり一般化していないのが現状である。最新の基礎的研究成果によると骨髄由来間葉系幹細胞が表皮水疱症の治療に有用であるとされている。そこで、本研究では骨髄以外の組織から間葉系幹細胞を分離培養することを目的とした。

B. 研究方法

骨髄以外の組織として比較的容易に手に入る組織であり、容量が十分得られるという観点から脂肪組織に着目した。手術時に得られた余剰脂肪組織をPBSにて十分洗浄し、ハサミにて細切後、37℃にてトリプシン処理を行った。遠心操作を行い沈降してきた細胞を回収し、10%FCS/DMEMにて懸濁し、組織培養用シャーレに播種した。培養液を2日に1回交換し5%CO₂、37℃にて培養した。

C. 研究結果

培養開始翌日にはシャーレ底面に付着する細胞が観察された。この細胞集団は徐々に増殖し、7-14日でコロニーは大きくなり、シャーレ全面を占めるほど増殖した。細胞の形態は紡錘形の細胞で、線維芽細胞に似た形態を示していたが、突起がやや太く、短い印象であった。コンフルエントになった時点で、継代操作を行った。線維芽細胞の継代と同様の操作で、PBSにて洗浄後0.125%トリプシン・0.1%EDTA溶液にて処理すると約5分以内に細胞は丸くなり、底

面から浮いた状態となった。1:3の割合で継代操作を行い、適宜保存した。継代は10代までは可能であった。細胞の形態は10代継代した細胞でも初代培養とほぼ変わらない形態を呈していた。

D. 考察

表皮水疱症の再生医療として、培養皮膚を用いた治療の有効性が報告されている。自己もしくは他人から皮膚構成細胞である線維芽細胞や角化細胞を培養し、大量に増殖させ人工皮膚を作製し難治性潰瘍面へ移植することで創傷治癒を促進させるものであり、現時点では表皮水疱症に対する最も有効な治療法であろう。培養皮膚とは全く異なる治療法として骨髄細胞を用いた皮膚再生が報告されている。すなわち骨髄穿刺した細胞を難治性皮膚潰瘍の周囲に局所注入することにより創の上皮化を促進させる治療法である。この場合には体外での培養操作がないため一度に治療できる範囲が限られている。骨髄細胞による潰瘍治療は、おそらくは骨髄に含まれる間葉系幹細胞による創の上皮化促進であると考えられている。さらに骨髄から間葉系幹細胞を分離増殖させ、広範囲の皮膚潰瘍を治療することができるとの報告があり、実際に表皮水疱症への治療の可能性が検討されている。間葉系幹細胞を用いた治療を推進する場合に、骨髄以外の組織から大量に分離培養できれば治療効果が増すことが期待できる。本研究においては比較的大量にかつ容易に手に入

れることが可能な脂肪組織に着目し、脂肪組織から付着系の細胞を分離培養できることを明らかにした。この線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞の性質を有していれば表皮水疱症の新たな治療法として有効であることが期待できる。今後は脂肪組織由来線維芽細胞様細胞が果たして間葉系幹細胞であるかについて、多分化能と高増殖能についての検討をする必要がある。

E. 結論

脂肪組織から付着系線維芽細胞様細胞の分離・培養法を確立した。この細胞が間葉系幹細胞の性質を有しているかの検討が今後の課題である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhu P, Hata R, Cao F, Gu F, Hanakawa Y, Hashimoto K, Sakanaka M: Ramified microglial cells promote astrogliogenesis and maintenance of neural stem cells through activation of Stat3 function. *FASEB J.* 22:3866-77, 2008

Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 159:981-4, 2008

- Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. *J Cell Physiol.* 214:465-73, 2008
- Isokame M, Hieda M, Hirakawa S, Shudou M, Nakashiro K, Hashimoto K, Hamakawa H, Higashiyama S: Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci* 121:3608-18, 2008
- Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci* 50:53-60, 2008
- Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K.: The NF-kB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 20:901-9, 2008
- Watanabe H, Daibata M, Tohyama M, Batchelor J, Hashimoto K, Iijima M: Chromosomal integration of human herpesvirus 6 DNA in anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 158: 640-642, 2008.
2. 学会発表
- Hashimoto K, Amagai M, Ikeda S: A double-blind clinical trial of IVIG for pemphigus in Japan. Post IID 2008 Satellite International Meeting on Autoimmune Bullous Diseases, May 17-19, Ootsu.
- Tokumaru S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Yang L, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for lymphatic endothelial cell migration induced by VEGF-A. *International Investigative Dermatology*, May 14-17, Kyoto, 2008.
- Yang L, Shirakata Y, Hirakawa S, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Myofibroblasts differentiation is modulated by epithelial-mesenchymal in human living skin equivalents. *International Investigative Dermatology*, May 14-17, Kyoto, 2008.
- Hirakawa S, Watanabe S, Tanemura A, Detmar M, Hashimoto K: Activation of

tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Tohyama M, Hanakawa Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: Augmentation of IL-22 receptor expression and IL-20 subfamily production plays a critical role in psoriasis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Sayama K, Yamamoto M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Akira S, Hashimoto K: Conditional ablation of Ubc 13, a mediator of innate immunity, in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased proliferation, and apoptosis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Shirakata Y, Yang L, Hanakawa Y, Tokumaru S, Hirakawa S, Tohyama M, Dai X, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K: Keratinocyte-specific SOCS3 knockout mice show clinical phenotypes similar to human psoriasis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Kishimoto J, Shirakata Y, Fuziwara S,

Soma T, Hashimoto K: Hair-inducing ability of cultured human dermal papilla cells. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Hirakawa S, Matsuo K, Hashimoto K: Lymph node lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor and lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 28-30, Nagoya, 2008. Selected for international session.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial- mesenchymal transition. UICC World Cancer Congress. Geneva, Switzerland August 27-31, 2008.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial- mesenchymal transition. 5th International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Tanemura A,

Matsuo K, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial –mesenchymal transition. Gordon Research Conference, Molecular Mechanisms in Lymphatic Function and Disease. Ventura, March 2-7, U. S. A., 2008.

Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K: Successful treatment of giant congenital melanocytic nevus with new skin equivalent using amnion membrane. The 17th congress of the European Academy of Dermatology Venereology, Sep 17-20, Paris, 2008.

Hashimoto K, Tohyama M: Drug-induced hypersensitivity syndrome. International symposium on solvent-induced, severe hypersensitivity reactions and human herpesvirus 6 reactivation, Nagoya, Nov. 29-30, 2008.

Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Dai X, Hirakawa S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Human amnion improves the development of basement membrane and

epidermogenesis in a living skin equivalent. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Dai X, Hirakawa S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Human amnion improves the development of basement membrane and epidermogenesis in a living skin equivalent. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K: The NFκB, p38, and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

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

◆研究成果の刊行に関する一覧

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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	26	223-34	2008
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	27	1821-33	2008
Saga K, Tamai K , Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y	Functional modification of Sendai virus by siRNA.	J Biotech	Feb 1;133(3)	386-94	2008
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	128	1336-9	2008
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	50	155-8	2008
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	Epub ahead of print		
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	51	45-51	2008
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	173	803-14	2008
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	35	336-40	2008

Shigeru Miyagawa, Goro Matsumiya, Toshihiro Funatsu, Masao Yoshitatsu, Naozumi Sekiya, Shinya Fukui, Takaya Hoashi, Masatsugu Hori, Hideki Yoshikawa, Yuzuru Kanakura , Jun Ishikawa, Katsuyuki Aozasa, Naomasa Kawaguchi, Nariaki Matsuura, Akira Myoui, Akifumi Matsuyama, Sachiko Ezo , Hidehiro Iida, Hikaru Matsuda, Yoshiaki Sawa.	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.	Surg Today.	39	133-136	2009
Kentaro Fukushima, Itaru Matsumura, Sachiko Ezo , Masahiro Tokunaga, Masato Yasumi, Yusuke Satoh, Hirohiko Shibayama, Hiroyuki Tanaka, Atsushi Iwama, Yuzuru Kanakura .	FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells.	J Biol Chem.	Epub ahead of print		2009
Takafumi Yokota, Kenji Oritani, Stefan Butz, Koichi Kokame, Paul W Kincade, Toshiyuki Miyata, Dietmar Vestweber, Yuzuru Kanakura .	The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice.	Blood.	Epub ahead of print		2008
Kayako Isohashi, Mitsuaki Tatsumi, Ichiro Higuchi, Atsuo Inoue, Kazuya Nakajo, Jun Ishikawa, Eku Shimosegawa, Yuzuru Kanakura , Hironobu Nakamura, Jun Hatazawa.	¹⁸ F-FDG-PET in patients with malignant lymphoma having long-term follow-up: staging and restaging, and evaluation of treatment response and recurrence.	Ann Nucl Med.	22	795-802	2008
Yusuke Satoh, Itaru Matsumura, Hirokazu Tanaka, Sachiko Ezo , Kentaro Fukushima, Masahiro Tokunaga, Masato Yasumi, Hirohiko Shibayama, Masao Mizuki, Takumi Era, Tsukasa Okuda, Yuzuru Kanakura .	AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells.	J Biol Chem.	283	30045-30056	2008