

骨髄由来表皮細胞は皮膚基底膜部に VII 型コラーゲンを供給し得ることが明らかとなった。

5.1.2. マウスモデルを用いた骨髄由来表皮細胞の骨髄内起源探索

1) 方法

表皮水疱症皮膚に骨髄由来角化細胞を供給している骨髄内細胞起源を探索するために、新生仔マウス皮膚を生理食塩水 1mL に 24 時間浸した溶液をシリコンチューブ（長さ：8mm、内径：3mm）に充填後、GFP 骨髄移植マウス背部皮下に移植し、表皮水疱症における水疱部と類似した溶液環境を作成した。移植 7 週間後にシリコンチューブを回収し、チューブ内溶液中に集積した GFP 陽性骨髄由来細胞の性質を検討した。

2) 結果

(1) 回収したシリコンチューブ内に多数の GFP 陽性骨髄由来細胞が存在することが明らかとなった（図 8）。また、チューブ内に集積した骨髄由来細胞 (tube-entrapped cells: TECs) をプラスチックシャーレ上で培養した結果、付着性増殖細胞は、殆どすべてが GFP 陽性骨髄由来細胞であることが確認された（図 8）。

(2) 移植チューブより回収した GFP 骨髄由来付着細胞の培養上清中に新生マウス皮膚抽出液を添加した結果、GFP 陽性/ケラチン 5 陽性細胞の表皮角化細胞への分化が確認された。すなわち、表皮角化細胞への分化能を有する骨髄由来表皮前駆細胞が皮膚抽出液を含むチューブ内に集積していることが確認された（図 9）。

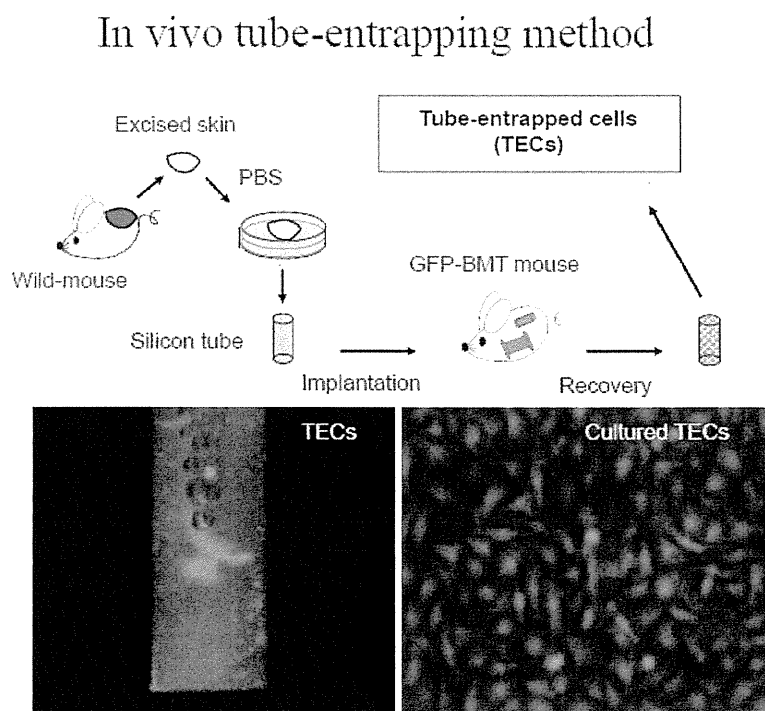


図 8：新生仔マウス皮膚抽出液含有チューブ内に集積する GFP 骨髄由来付着細胞

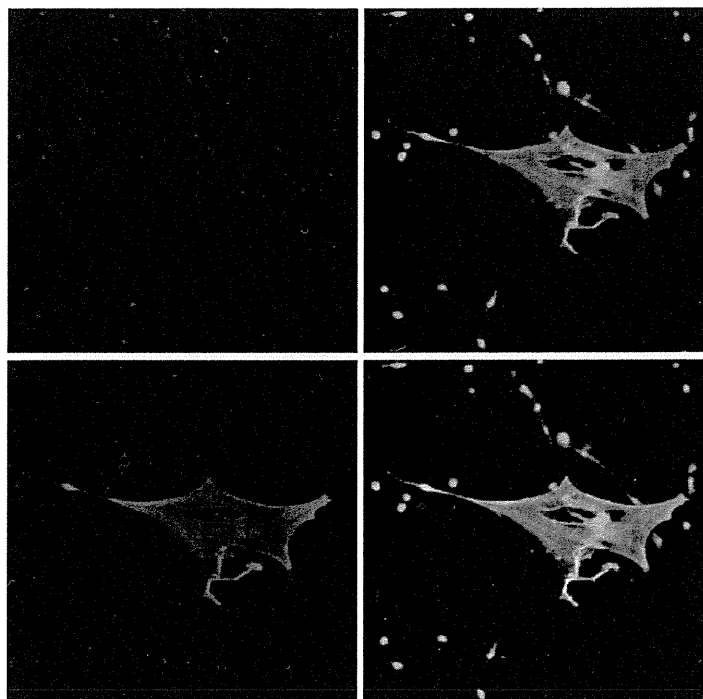


図9：TECs中に存在する骨髓由来培養表皮前駆細胞

(3) チューブ内に動員された細胞分画をフローサイトメトリーにより検討した結果、チューブ内細胞の約20%が間葉系幹細胞のマーカであるPDGFR α 陽性骨髓由来細胞である事が認められた(図10)。一方、骨髓内細胞(bone marrow cells: BMCs)ではPDGFR α 陽性細胞は0.1%未満であった(図10)。これらの結果から、チューブ内に遊走した骨髓由来表皮前駆細胞が骨髓間葉系幹細胞由来である可能性を仮定した。

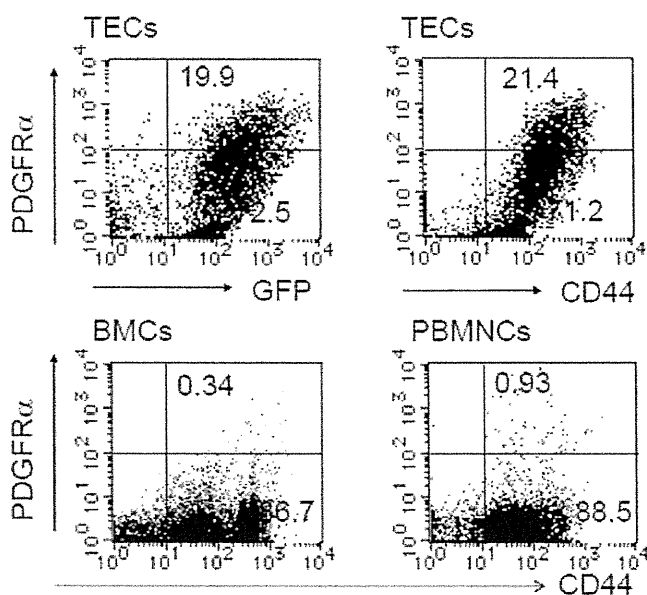


図10：TECsのフローサイトメトリー解析結果

(4) PDGFR α 陽性骨髄細胞が骨髄由来表皮細胞の起源であることを確認する目的で、PDGFR α 陽性/GFP 陽性骨髄細胞と PDGFR α 陰性/GFP 陰性骨髄細胞のキメラ骨髄細胞を移植した P+G+/P-G-骨髄移植マウスを作成し、その背部に表皮水疱症マウス皮膚を移植した。その結果、再生した表皮内に PDGFR α 陽性骨髄細胞由来である GFP 陽性表皮細胞が多数存在することが示され、骨髄由来表皮細胞は骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を起源とすることが明らかとなった (図 11)。

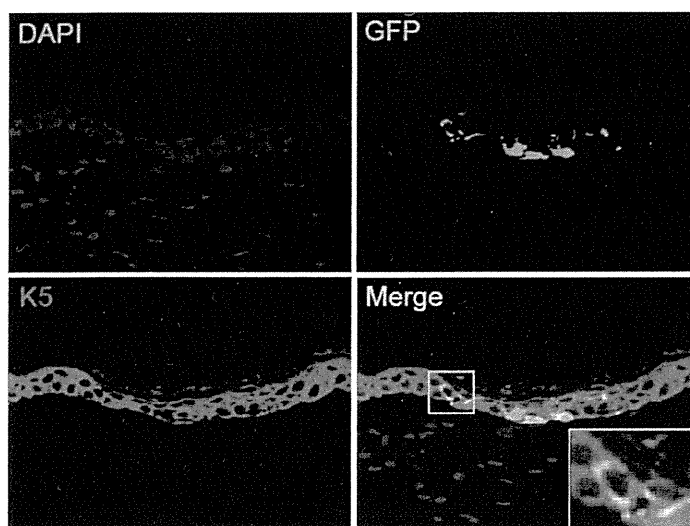


図 11 : 表皮水疱症マウス再生表皮内の PDGFR α 陽性/GFP 陽性骨髄細胞由来表皮細胞の同定

3) 結論

以上の結果から、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞が骨髄由来表皮細胞の起源であることが明らかとなった。

5.1.3. マウスを用いた骨髄内 PDGFR α 陽性細胞の性質検討

1) 方法

PDGFR α 遺伝子のプロモーター下流にヒストン H2B 遺伝子と GFP 遺伝子の融合遺伝子 (H2B-GFP) をノックインした PDGFR α -H2BGFP マウスから骨髄細胞を採取し、核内 GFP 陽性細胞の性質について、フローサイトメトリーにより解析した。また、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を培養し、間葉系細胞および表皮細胞への分化能を検討した。

2) 結果

(1) 骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は、血球系分化マーカーである Lineage および未分化造血幹細胞マーカーである c-kit がいずれも陰性であることが明らかとなり、造血系細胞では無いことが示された (図 12)。

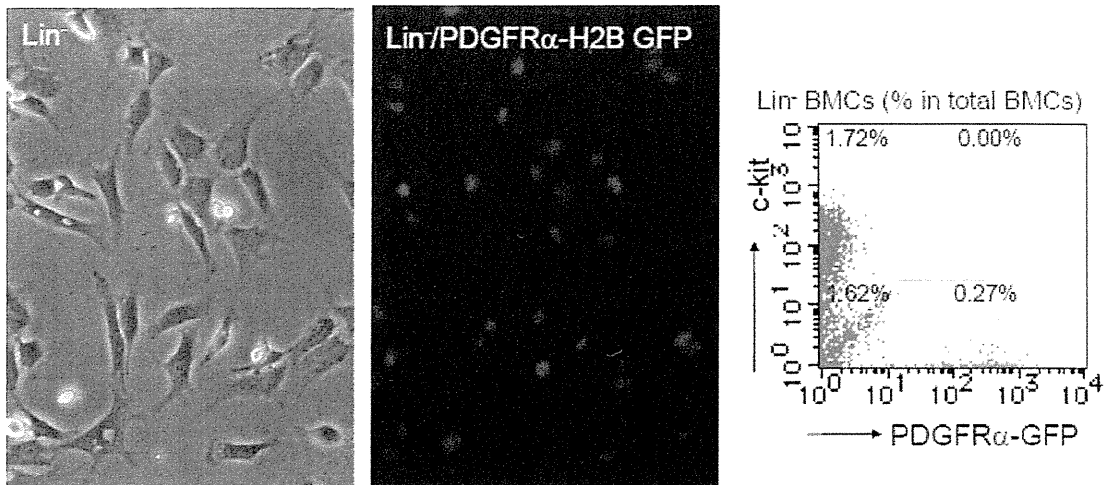


図 12 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来骨髄細胞の培養およびフローサイトメトリー解析

(2) 骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺陽性細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなり、間葉系幹細胞としての性質を有することが示された (図 13)。さらに、表皮細胞分化誘導培地で培養を行った結果、ケラチン 5 陽性細胞の出現を確認し、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は間葉系のみならず外胚葉由来である表皮角化細胞へと分化し得る、多能性幹細胞であることが示唆された (図 14)。

Lin⁻/PDGFR α ⁺ bone marrow cells

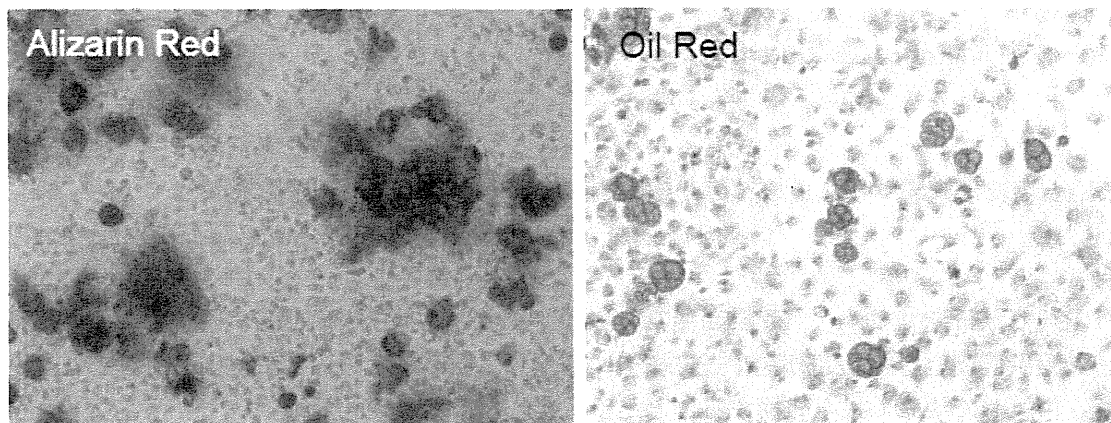


図 13 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄細胞の間葉系細胞への多分化能。
(左 : alizarin red 陽性骨芽細胞、右 : oil red 陽性脂肪細胞)、

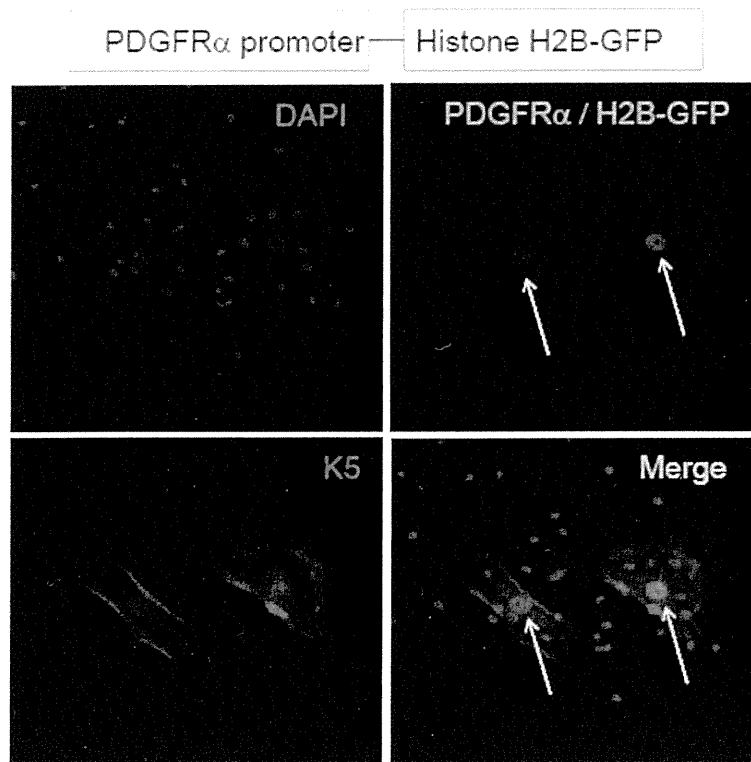


図 13 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄細胞の表皮細胞分化能

3) 結論

以上の結果から、骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄間葉系幹細胞が表皮細胞の起源であることが明らかとなった。

5.1.4 表皮水疱症マウス皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果検討

(Alexeev V and Uitto J *et al.* Cytotherapy 2011;13:30-45)

上述した研究結果から、骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症皮膚に移植することにより、移植間葉系幹細胞が線維芽細胞や表皮細胞に分化し、皮膚基底膜領域に欠損している接着分子を供給して治療効果を発揮することが予想された。我々の共同研究者で、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を開発して我々に提供してくれた米国フィラデルフィア、ジェファーソン医科大学皮膚科主任教授の Jouni Uitto 博士は、我々の研究成果を基にして、VII 型コラーゲンノックアウトマウス背部にマウス間葉系幹細胞 (5×10^5 個) を皮下移植し、その治療効果を検討した。その結果、移植した間葉系幹細胞は皮膚に生着し、基底膜部位に欠損していた VII 型コラーゲンを供給し、皮膚の病態を著明に改善することを明らかにした (図 14)。

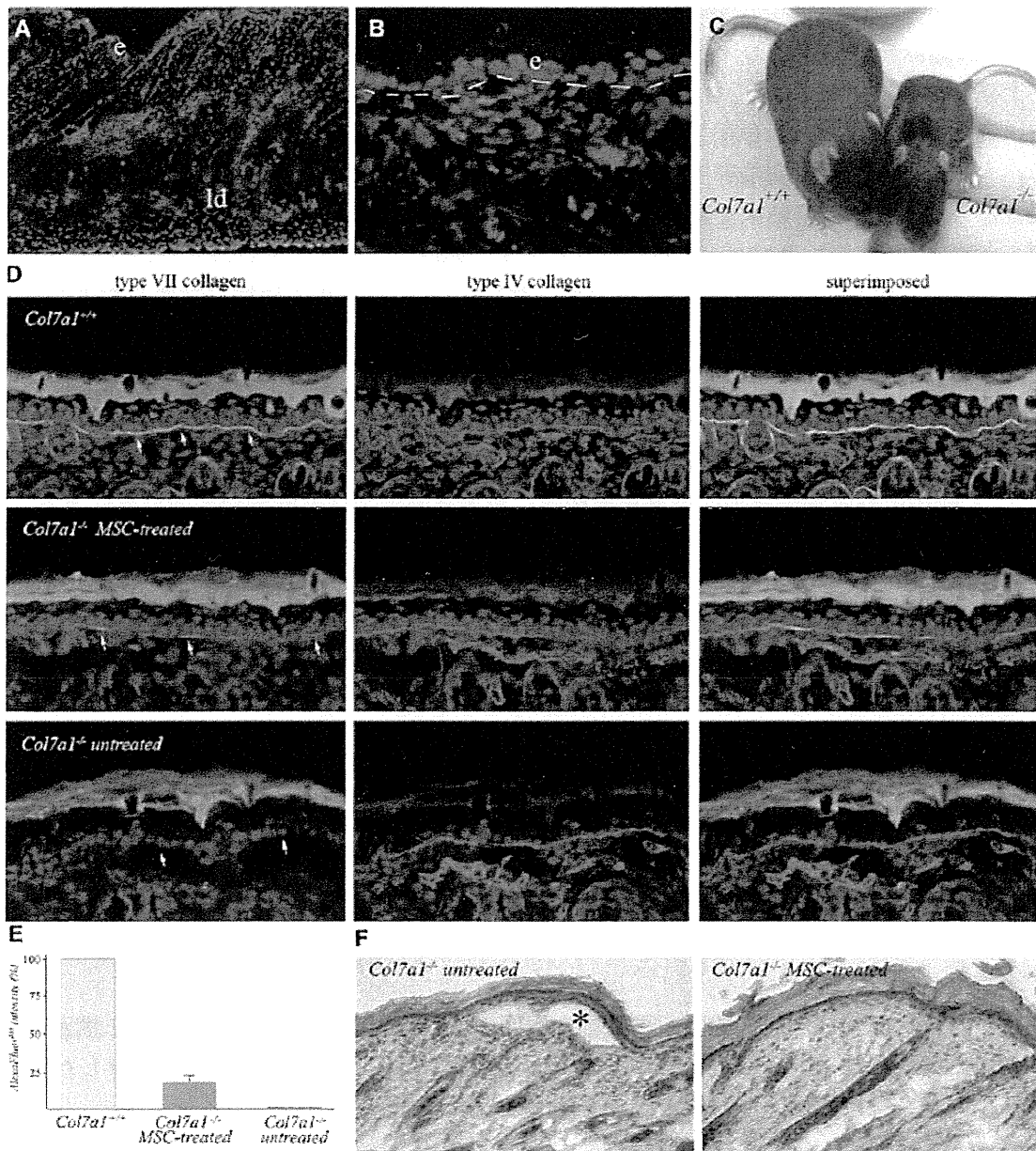


図 14：栄養障害型表皮水疱症モデルマウス皮膚への間葉系幹細胞移植治療効果

A、B：皮下移植した間葉系幹細胞（赤色蛍光）の生着、C：移植後のマウス（左；野生型、右；VII型コラーゲンノックアウトマウス）、D：間葉系幹細胞移植治療効果（上段；野生型マウス皮膚、中段；間葉系幹細胞移植後のVII型コラーゲンノックアウトマウス、下段；未治療のVII型コラーゲンノックアウトマウス、左列；VII型コラーゲン、中列；IV型コラーゲン、右列；Merge）、E：基底膜部のVII型コラーゲン発現量定量（左；野生型100%、中；骨髄間葉系幹細胞移植後VII型コラーゲンノックアウトマウス20%、右；未治療VII型コラーゲンノックアウトマウス0%）、F：骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症マウス皮膚水疱形成抑制（左；移植前、右；移植後、*水疱）

5.1.5 非臨床試験のまとめ

上述した基礎研究により、骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺/c-kit⁻ 細胞は造血幹細胞とは独立して骨髄内に間葉系幹細胞として存在し、表皮水疱症における皮膚損傷に応答して骨髄内から流血中へと動員され、表皮剥離部で角化細胞へと分化して表皮再生に寄与していることが明らかとなった。これらの結果を基に骨髄間葉系幹細胞（ 5×10^5 個）を栄養障害型表皮水疱症モデルマウス（VII 型コラーゲン欠損マウス）皮下に移植した結果、移植間葉系幹細胞が皮膚構成細胞に分化して基底膜部に VII 型コラーゲンを供給し、表皮水疱症の病態を改善することが明らかとなった。

5.2. 臨床成績

5.2.1. 2 例の劣性栄養障害型表皮水疱症患者に対する同種間葉系幹細胞皮内投与による VII 型コラーゲンの補充と慢性潰瘍の再上皮化

(Conget P, Rodriguez F, *et al.* Cytotherapy 2010;12:429-431)

VII 型コラーゲンが完全欠損した劣性栄養障害型表皮水疱症患者に培養他家骨髄細胞由来間葉系幹細胞を移植し、治療効果が得られることを確認した。

詳細を以下に示す。

1) 対象患者

1 例目：25 歳の女性

2 例目：13 歳の男性

2) 方法

背部の健常部皮膚と四肢の慢性創傷周囲の潰瘍部皮膚に対し、 0.5×10^6 個の間葉系幹細胞（治療部）とコントロールとして賦形剤（コントロール部）を皮内投与した。

間葉系幹細胞は、非血縁者の成人健常人女性の骨髄から採取した。

3) 結果

1 例目での移植 1 週後のコントロール部では水疱の形成が認められた。免疫組織化学検査による VII 型コラーゲンの発現はほとんどなく、ケラチン生成細胞と線維芽細胞の細胞質が染色されていた。一方、治療部では連続した真皮-表皮結合が認められ、免疫組織学検査によって基底膜部位が認められた。

治療部において移植 1 週間後から創傷の再上皮化が認められ、12 週間後にはほぼ治癒した。再生された表皮は真皮と強固に結合し、痒みや機械的応力による水疱形成を起さず、移植 4 カ月後まで治療効果が持続していた。一方、コントロール部では創傷の治癒は認められなかった。

本試験を通じて、急性の有害事象はみられなかった。

2 例目においても、1 例目と同様の結果が得られた。



4) 考察

同種間葉系幹細胞を皮内投与することにより、真皮-上皮結合部の VII 型コラーゲンの補充、水疱形成の防止、創傷治癒の改善が認められた。また、この治療による急性の有害事象は認められず、安全に行えるものと考えられる。

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

採血及び血清分離に関する手順書
MTR-S1102-01-00

制定：2013年06月17日

承認	確認	作成
		

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

文書番号 MTR-S1102-01	採血及び血清分離に関する手順書	改訂番号	00
		2 頁の内 1 頁	

1. 目的
輸血部において採血・血清分離が無菌的に支障なく行われるために手順書を作成する。
2. 適応範囲
輸血部内にてドナーの採血・血清分離を行う全ての工程に適応する。
3. 責任体制
本手順書は製造管理責任者が作成し、臨床研究管理責任者が承認する。
臨床研究管理責任者が輸血部内での採血・血清分離に関する責任と権限を有する。
4. 遵守事項
表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞製品標準書
5. 手順
 - 5-1 採血・血清分離は下記に示す手順に従って輸血部にて行う。
 - 5-1-1 テルモ血液分離バッグ MAP 液 400 mL 採血用（テルモ株式会社, BB-TO40CJ）と AVF セット（ニプロ AVF ニードルセット GA 18G）を無菌接合装置（ウエハー TSCD テルモ）で接合する。
 - 5-1-2 テルモ血液分離バッグに 400 mL の血液を採取し、針をチューブシーラーでシールして廃棄する。
 - 5-1-3 穿刺部位をイソジン S 消毒液（明治製菓株式会社）にて消毒する。
 - 5-1-4 採取した血液分離バッグにラベルを貼付する。
ラベル記載事項：製品名、被験者識別 ID、作製日。
 - 5-1-5 チューブ内の血液をローラーベンチでしごき、根元を金具で閉じる。（チューブ内は空にしておく）。
 - 5-1-6 分離バッグをビニール袋に入れる。
 - 5-1-7 37℃ 2 時間恒温槽でインキュベートする。
 - 5-1-8 新しい分離バッグのチューブとインキュベート後の分離バッグのチューブを無菌接合装置で接合する。
 - 5-1-9 血液バッグを遠心機にて 2500 rpm、室温、10 min brake 0 として遠心する。必要であればチューブ付近に残った血液凝固塊を徒手的にバッグ内へ移動させ、さらに遠心機にて 2500 rpm、室温、10 min 遠心する。
 - 5-1-10 凝血塊が混入しないように上清を移動させる。
 - 5-1-11 チューブ内の血清をローラーベンチでしごき、根元を金具で閉じる。
 - 5-1-12 凝血塊の入った分離バッグはチューブシーラーでシールし廃棄する。
 - 5-1-13 血清の入った分離バッグのチューブと新しい分離バッグのチューブとを無菌接合装置で接合する。
 - 5-1-14 さらに遠心機にて 2500 rpm、室温、10 min 遠心する。
 - 5-1-15 遠心後の分離バッグを分離スタンドに立てて上清を分離する。
 - 5-1-16 上清を別の分離バッグに流し込み、分離終了後は上清の入った分離バッグをチューブシーラーでシールして中部を切断分離する。
 - 5-1-17 血清は専用ビニール袋に入れてラベルを貼付する。

文書番号 MTR-S1102-01	採血及び血清分離に関する手順書	改訂番号	00
		2 頁の内 2 頁	

5-2 血清の搬送に関する手順

- 5-2-1 血清搬送担当者は、ラベルを確認し、ドナーの臨床研究参加の同意書と症例登録票のコピーを添付の上、未来医療センターCPI 調製室へ搬送する。
- 5-2-2 血清は、保冷剤入りのクーラーボックスに入れて搬送する。
- 5-2-3 血清の採取から搬送終了までの時間は6時間以内とする。
- 5-2-4 フリーザ付薬用保冷库（機器番号：RF1-5）（5℃±3℃）内で保存し、その日の内に調製する。その日の内に使用しない場合は-20℃±5℃で保存する。保存期限：3ヶ月

6. 関連文書

- ・ 表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S1102】
- ・ 原材料の選定・入手・管理に関する手順書【MTR-AS-04】



7. 記録とその様式

- ・ 臨床研究参加の同意書
- ・ 症例登録票
- ・ マスターラベル管理記録書【MTR-AS-08-R01】
- ・ 血清採取記録用紙

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

骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書
MTR-S1102-02-00

制定：2013年06月17日

承認	確認	作成
		

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

文書番号 MTR-S1102-02	骨髓細胞培養培地の調製に 関する手順書	改訂番号	00
		1 頁の内 1 頁	

1. 目的

骨髓細胞培養に用いる骨髓細胞培養培地の調製に関する手順を記す。

2. 適応範囲

大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPI調製室にて骨髓細胞培養培地の調製を行う全ての工程に適応する。

3. 責任体制

本手順書は製造管理責任者が作成し、臨床研究管理責任者が承認する。

製造管理責任者が大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPCにおける骨髓細胞培養培地の調製に関する責任と権限を有する。

4. 遵守事項

表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書

5. 手順

5-1 骨髓細胞培養培地（以下、培養液）の調製は下記に記す手順に従って行う。

5-1-1 CPI（機器番号：CPI-1、2）内の清浄度を確認し、未除染の場合は、過酸化水素を用いてCPI内の除染を行う。

5-1-2 ドナー由来血清（融解済み）、 α Minimum Essential Medium (1x), liquid (Invitrogen Corp., 12571-063)（以下、 α -MEM）、Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (Sigma-Aldrich Corp., A5955-20) の入った容器をそれぞれ消毒用エタノール（以下、日本薬局方グレードを用いる）にて消毒後、パスボックス経由でCPI内に搬入する。

5-1-3 ピペット・エイドを用いて、 α -MEM500mLにドナー由来血清（融解済み）88 mL及びAntibiotic Antimycotic Solution 5 mLを加え、十分に混合する。

5-1-4 項目 5-1-3 で調製した混合液を、Filter System (500 mL, 0.22 μ m) (Corning Incorporated, 430769) の上部に全量加え、コネクションチューブを接続し濾過滅菌を行う。

5-1-5 濾過滅菌後のフィルター下部容器に培養液、被験者識別 ID、調製日時及び使用期限を表記したラベルを貼り、フリーザ付薬用保冷庫（機器番号：RF1-5）にて5°C \pm 3°Cで保存する。使用期限は調製後2ヶ月とする。



6. 関連文書

- ・表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S1102】
- ・骨髓間葉系幹細胞の培養に関する手順書【MTR-S1102-05】
- ・CPIの使用に関する手順書【MTR-AS-15】

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

骨髄液の採取に関する手順書
MTR-S1102-03-00

制定：2013年06月17日

承認	確認	作成
		

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

文書番号 MTR-S1102-03	骨髓液の採取に関する手順書	改訂番号	00
		1頁の内1頁	

1. 目的

手術室における骨髓液採取を無菌的に支障なく行うための手順を定める。

2. 適応範囲

本臨床研究に用いる骨髓由来間葉系幹細胞を得るための、骨髓液の採取を行う全ての人に適応する。

3. 責任体制

本手順書は製造管理責任者が作成し、臨床研究管理責任者が承認する。
臨床管理責任者が手術室内での骨髓採取に関する責任と権限を有する。

4. 遵守事項

表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書

5. 手順

5-1 ドナー骨髓液は、下記に記す手順に従ってドナー腸骨から採取する。

5-1-1 手術室内にてドナーに対して穿刺部位の局所麻酔を行う。

5-1-2 穿刺部位をイソジン消毒液（明治製菓株式会社）にて消毒する。

5-1-3 ヘパリン Na ロック 100 シリンジ製剤（三菱ウェルファーマ株式会社）を約 0.3 mL～1 mL 注射器に入れる。

5-1-4 骨髓穿刺針及び注射器にて腸骨から骨髓液を採取する。採取は1回の吸引あたり約 2～5mL の骨髓液を吸引し、注射器から滅菌チューブに骨髓液を移す。骨髓液は、ヘパリン Na ロック 100 シリンジ製剤との混合物として合計約 20 mL 採取する。

5-1-5 骨髓液を採取した滅菌チューブを清潔操作にてジッパー付き滅菌ビニール袋にいれ、袋にラベルを貼る。（記載事項：製品名、被験者識別 ID、バッチ No.、作成日／保存期限）

5-1-6 骨髓液入のチューブをビニール袋のままクーラーボックス（室温）に入れて、未来医療センターCPI調製室内CPIに搬送後、当日中に播種する。

6. 関連文書



- ・表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S1102】
- ・骨髓間葉系幹細胞の培養に関する手順書【MTR-S1102-05】
- ・ドナー選定に関する手順書【MTR-QS-14】
- ・原材料の選定・入手・管理に関する手順書【MTR-AS-04】

7. 記録と様式

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

骨髄液の搬送に関する手順書
MTR-S1102-04-00

制定：2013年06月17日

承認	確認	作成
		

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

