

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 22年 12月 22日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15	
	名称	大阪大学医学部附属病院	06-6879-6551 (電話番号) 06-6879-6549 (FAX 番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	大阪大学医学部附属病院長	福澤 正洋



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
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	大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座教授 玉井克人

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	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
申請年月日	平成22年12月22日
実施施設及び 研究責任者	実施施設：大阪大学医学部附属病院 玉井 克人
対象疾患	表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）
ヒト幹細胞の種類	非自己骨髄由来間葉系幹細胞
実施期間、対象症例数	登録期間（試験開始から2年間）、6症例
治療研究の概要	重篤な遺伝性皮膚難病である表皮水疱症（接合部型および栄養障害型）の患者に対して、家族ドナー由来骨髄間葉系幹細胞局所移植術を施行する。家族内ドナーから骨髄血を採取し細胞培養センターで骨髄間葉系幹細胞を培養し、皮膚潰瘍の周囲皮膚に2cm間隔で250 μ 1つつ皮下に移植する。潰瘍面積縮小程度を測定して潰瘍縮小効果を判定する。
その他（外国での状況等）	研究責任者らは、表皮水疱症モデルマウスに皮下移植した骨髄間葉系幹細胞が皮膚に生着し、皮膚基底膜領域に欠損している接着分子を補充して病態を改善することを報告した。 チリの共同研究グループが、栄養障害型表皮水疱症の成人患者（2症例）に骨髄間葉系幹細胞移植術を行い、移植7日後には欠損していたVII型コラーゲンが皮膚基底膜部にみられ、難治性潰瘍部の上皮化の促進・治癒が認められ、治療効果が移植4カ月後まで持続した。
新規性について	表皮水疱症はこれまで対症療法のみが行われている。本研究は、他家の間葉系幹細胞を用いて、潰瘍の上皮化促進に加えて、欠損蛋白を補う治療法である。さらに間葉系幹細胞の抗炎症効果、瘢痕抑制効果を評価する。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	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
研究機関	
名称	大阪大学医学部附属病院
所在地	〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15
電話番号	06-6879-6551
FAX番号	06-6879-6549
研究機関の長	
役職	病院長
氏名	福澤 正洋
研究責任者	
所属	大阪大学大学院医学系研究科 再生誘導医学寄付講座
役職	教授
氏名	玉井 克人
連絡先 Tel/Fax	Tel:06 - 6879 - 3902 /Fax:06 - 6879 - 3909
E-mail	tamai@gts.med.osaka-u.ac.jp @
最終学歴	弘前大学大学院医学研究科
専攻科目	皮膚科学
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	
所在地	〒
電話番号	
FAX番号	
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	
氏名	

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の目的・意義	<p>表皮水疱症(接合部型および栄養障害型)患者に対する家族ドナー由来骨髄間葉系幹細胞局所移植術に基づく再生療法の安全性、有効性を評価し、将来の全身性骨髄間葉系幹細胞移植術開発につなげるための基礎情報を収集する。本研究の意義は、表皮水疱症(接合部型および栄養障害型)を対象とした骨髄由来間葉系幹細胞局所移植術の安全性を明らかにし、将来の骨髄由来間葉系幹細胞全身移植術開発のための礎を築くことにある。骨髄由来間葉系幹細胞移植医療の確立により最終的には表皮水疱症(接合部型および栄養障害型)の生活の質の向上に大きく寄与することが期待される。</p>
臨床研究の対象疾患	
名称	表皮水疱症(接合部型および栄養障害型)
選定理由	<p>接合部型および栄養障害型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、生下時より日常生活の極めて軽微な外力で全身皮膚に水疱、びらん、潰瘍が生じる遺伝性水疱性皮膚難病である。本疾患は根治的治療法が全く無く、新規治療法を開発することは医療における喫緊の課題であると考え、対象疾患として設定した。</p> <p>単純型は加齢と共に症状が軽快する症例が多いため、骨髄間葉系幹細胞移植の安全性評価を主目的とする今回の臨床研究からは除外した。</p>
被験者等の選定基準	<p>適格基準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 表皮水疱症(接合部型又は栄養障害型)と診断された患者 2) 20歳以上60歳未満の患者 3) 6週間以上持続する難治性潰瘍を有する患者 4) ドナーの適格基準に合致し、同意の得られている異性の親、又は異性の兄弟姉妹がいる患者 5) 患者本人の文書による同意が得られている患者 <p>除外基準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 重度の精神疾患を有する患者 2) アルコール中毒症を有する患者 3) 意識障害を有する患者 4) 皮膚以外の悪性腫瘍を有する患者(過去5年以内に既往がある患者を含む) 5) 妊娠又は妊娠している可能性のある患者 6) 糖尿病を合併している患者 7) その他、研究責任者が移植に適さないと判断した患者 <p>ドナーの適格基準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 20歳以上65歳未満である者 2) 被験者と性の異なる親、又は性の異なる兄弟姉妹である者 3) ドナー本人の文書による同意が得られている者 <p>ドナーの除外基準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 血液疾患、または出血傾向を有する者 2) 慢性難治性の感染症を有する者 3) 登録前6カ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有する者 4) 悪性腫瘍を有する者(過去5年以内に既往がある者を含む) 5) 感染症(梅毒、HIV、HBV、HCV、HTLV、パルボウイルスB19のいずれか)を有する者 6) 伝達性海綿状脳症及びその疑いのある者 7) その他、研究責任者が移植に適さないと判断した者
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	間葉系幹細胞
由来	自己・ <u>非自己</u> ・株化細胞 <u>生体由来</u> ・死体由来

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

採取、調製、移植又は投与の方法	<p>1) ドナーからの血清の採取・・・ドナー骨髄細胞培養に用いるために予めドナー血液400mL採取し、血清分離した後凍結保存する。</p> <p>2) ドナーからの骨髄液採取・・・ドナー骨髄液を局所麻酔にて腸骨より約20mL採取する。</p> <p>3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養・・・未来医療センターセルプロセッシングアイソレーター (CPI) において調製、培養を行う。ドナー血清含 α MEM 中培養液中で付着細胞を2～3回の継代にて必要細胞数に達するまで培養する。</p> <p>4) 骨髄間葉系幹細胞の試験移植・・・移植当日に骨髄間葉系幹細胞約100個分を生理食塩水100 μ Lに懸濁し、被験者の前腕非潰瘍部の皮下に試験移植する。</p> <p>5) 潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植・・・難治性皮膚潰瘍を1カ所選択し、潰瘍部の周囲に、2cm間隔で、1箇所につき0.5 \times 10⁶個/250 μ Lの培養骨髄間葉系幹細胞を皮下移植する。</p>
調製(加工)行程	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無
非自己由来材料使用	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無 動物種(ヒト)
複数機関での実施	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無
他の医療機関への授与・販売	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無
安全性についての評価	<p>ドナー血清採取からドナー研究期間終了までの有害事象及び被験者移植後から研究終了までの被験者におきた有害事象の種類とその頻度、重症度、重篤度、発現期間などを評価する。</p> <p>ドナーは、臨床症状の有無、及び血液検査にて評価する。</p> <p>被験者は、臨床症状の有無、血液検査、心電図、胸部X線にて評価する。</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>研究責任者らの表皮水疱症モデルマウスを用いた試験で、移植された骨髄間葉系幹細胞が剥離表皮部に遊走し、皮膚構成細胞に分化して皮膚基底膜領域に欠損している接着分子(VII型コラーゲン)を補充することが確認された。また、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスに皮下移植した骨髄間葉系幹細胞が皮膚に生着し、基底膜部にVII型コラーゲンを供給して病態を改善することが確認された。これらの試験から、骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症皮膚へと移植することにより治療効果が得られることが示唆された。</p> <p>上述の研究責任者および共同研究者の非臨床試験の結果をもとに、チリの共同研究グループにより栄養障害型表皮水疱症の成人患者(2症例)に骨髄間葉系幹細胞移植術が行われた。移植7日後に欠損していたVII型コラーゲンが皮膚基底膜部にみられたこと、難治性潰瘍部の上皮化の促進・治癒が認められたこと、治療効果は間葉系幹細胞移植4カ月後までは持続したことが確認されている。また、治療期間に重篤な有害事象はみられなかった。</p> <p>一方、骨髄間葉系幹細胞は表皮細胞への分化能を持つことが知られている。そのため、表皮水疱症の潰瘍部に移植するドナー由来骨髄間葉系幹細胞が表皮細胞へと分化し、XVII型コラーゲンを産生することによって、接合部型表皮水疱症に対しても治療効果が期待される。よって、接合部型表皮水疱症の患者で本臨床研究への参加を希望する患者がいる場合には、その患者を対象とすることは妥当と考えられる。</p> <p>以上の非臨床及び臨床知見より、表皮水疱症(接合部型および栄養障害型)に対する骨髄間葉系幹細胞移植は安全かつ有効に実施できるものと判断し、その安全性と有効性を検討するために本臨床研究を立案した。</p>
臨床研究の実施計画	<p>I. デザインの型 安全性評価のための臨床研究</p> <p>II. 目標登録患者数・患者登録期間 1) 目標症例数: 6例 2) 患者登録期間: 病院長による実施許可日から2年間</p> <p>III. 治療の定義 本研究における治療とは、「1) 骨髄間葉系幹細胞の試験移植」から「2) 潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植」完了までとする。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

IV. 治療の方法

- 1) 被験者は移植当日までに入院し、2～3日間の入院にて治療を行う。
- 2) 骨髄間葉系幹細胞の試験移植
- 3) 潰瘍部皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植

V. 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、ポララミン5mgの点滴静脈注射を行う。

潰瘍部への局所治療は、創部の状況に応じて適宜必要な外用剤を選択する。創傷被覆材の使用についても、外用剤と同様に必要に応じて適宜選択して施行する。

そう痒、疼痛など皮膚潰瘍に併発する症状に対しては、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、鎮痛剤の全身投与を行う。

VI. 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。

臨床研究対象部位かどうかに関わらず、皮膚潰瘍部に明らかな感染症が併発した際には、外用を抗生剤含有軟膏に切り替えると共に、必要に応じて全身性に抗生剤を投与する。

VII. 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、抗アレルギー剤の投与など適切な治療を行う。

VIII. 主要評価項目

本研究における被験者及びドナーの有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間とする。

IX. 副次評価項目

1) 移植潰瘍部位の評価

- ①潰瘍面積縮小程度(写真判定)
- ②潰瘍の性状
- ③潰瘍部位細菌検査:潰瘍部位の細菌・真菌培養を行い、感染状況を評価する。

2) 移植潰瘍部皮膚生検による組織学的検討

- ①水疱形成程度の組織学的検討(HE染色)
- ②移植骨髄間葉系幹細胞の組織学的生着状況(FISH性染色体検査)
- ③VII型コラーゲン又はXVII型コラーゲン産生の有無(免疫蛍光染色、電顕的観察、RT-PCR)

X. 登録患者の研究参加期間

- 1) 治療前観察期間(登録日から骨髄間葉系幹細胞移植前まで):8週以内
- 2) 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

XI. 臨床研究登録期間・臨床研究実施期間

臨床研究登録期間は、病院長の実施許可が通知された日から2年とする。

臨床研究実施期間は、病院長の実施許可が通知された日から全ての登録症例の臨床研究が終了又は中止する時点までの期間とし、臨床研究実施期間の目標は4年とする。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 ①無
補償が有る場合、その内容	本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、保険診療により検査及び治療を行うことになり、別途、補償制度はない。
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	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又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及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。
その他	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。
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>本臨床研究における治療などにかかる費用は大阪大学医学部附属病院が負担する。 また、本臨床研究にかかる費用の一部は、厚生労働科学研究費から賄われる。 本臨床研究に関しては特定の企業などの資金提供を受けていないため、利益相反に係わる事項は生じない。</p> <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>表皮水疱症に対する治療法はこれまで対症療法のみである。本研究は、他家の間葉系幹細胞を用いて、潰瘍の上皮化促進に加えて、欠損蛋白を補う治療法である。さらに間葉系幹細胞のもつ抗炎症効果、瘢痕抑制効果をも期待できる。上記の点から本研究はこれまでになく、画期的治療法といえる。</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: 製品芳醇書))
- その他(資料内容: ヒト幹細胞臨床研究審査委員会手順書及び審査委員会名簿))

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

その他(資料内容:参考文献)

1. Chino T., et al. 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 Sep;173(3):803-14. Epub 2008 Aug 7.
2. Alexeev V., et al. Gene expression signature of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the cutaneous environment and therapeutic implications for blistering skin disorder. *Cytotherapy.* 2011
3. Conget P., et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy* 2010;12:429-431
4. Wo Y., et al. Concise Review: Bone marrow-derived stem cell/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells* 2010 May;28(5):905-915
5. Sivamani RK. et al. Keratinocyte proximity and contact can play a significant role in determining mesenchymal stem cell fate in human tissue. *FASEB J.* online September 2010.
6. Wagner JE, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med* 2010;363:629-39.
7. English K., et al. Mesenchymal stromal cells: Facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell*, 2010; 7: 431-442

その他(資料内容:ヒト幹細胞臨床研究審査委員会資料)

)

臨床研究の概要をできるだけ平易な用語を用いて記載した要旨

研究課題名：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

研究の概要：表皮水疱症は、遺伝子の異常によって皮膚の基底膜タンパクが先天的に欠損する結果、生直後から一生涯、日常生活の軽微な外力で皮膚が剥離して「全身やけど」と同じ皮膚症状を来す、極めて重篤な遺伝性皮膚難病です（下図参照）。



表皮水疱症の臨床像（左；出生直後、中；成人）と剥離皮膚の組織像（右）

本研究は、これまで全く治療法の無かった表皮水疱症に苦しむ患者さんの皮膚潰瘍に、健常人（家族）由来骨髄間葉系幹細胞を移植して、移植部皮膚内で線維芽細胞や表皮細胞へと分化した骨髄由来正常皮膚細胞によって剥離した皮膚の再生を誘導し、さらに再生した骨髄由来皮膚細胞が正常な皮膚基底膜タンパクを産生することで、皮膚の再剥離を抑制して力強い治療効果を得るといふ、これまで不可能であった表皮水疱症の治療を可能することを目的とします。

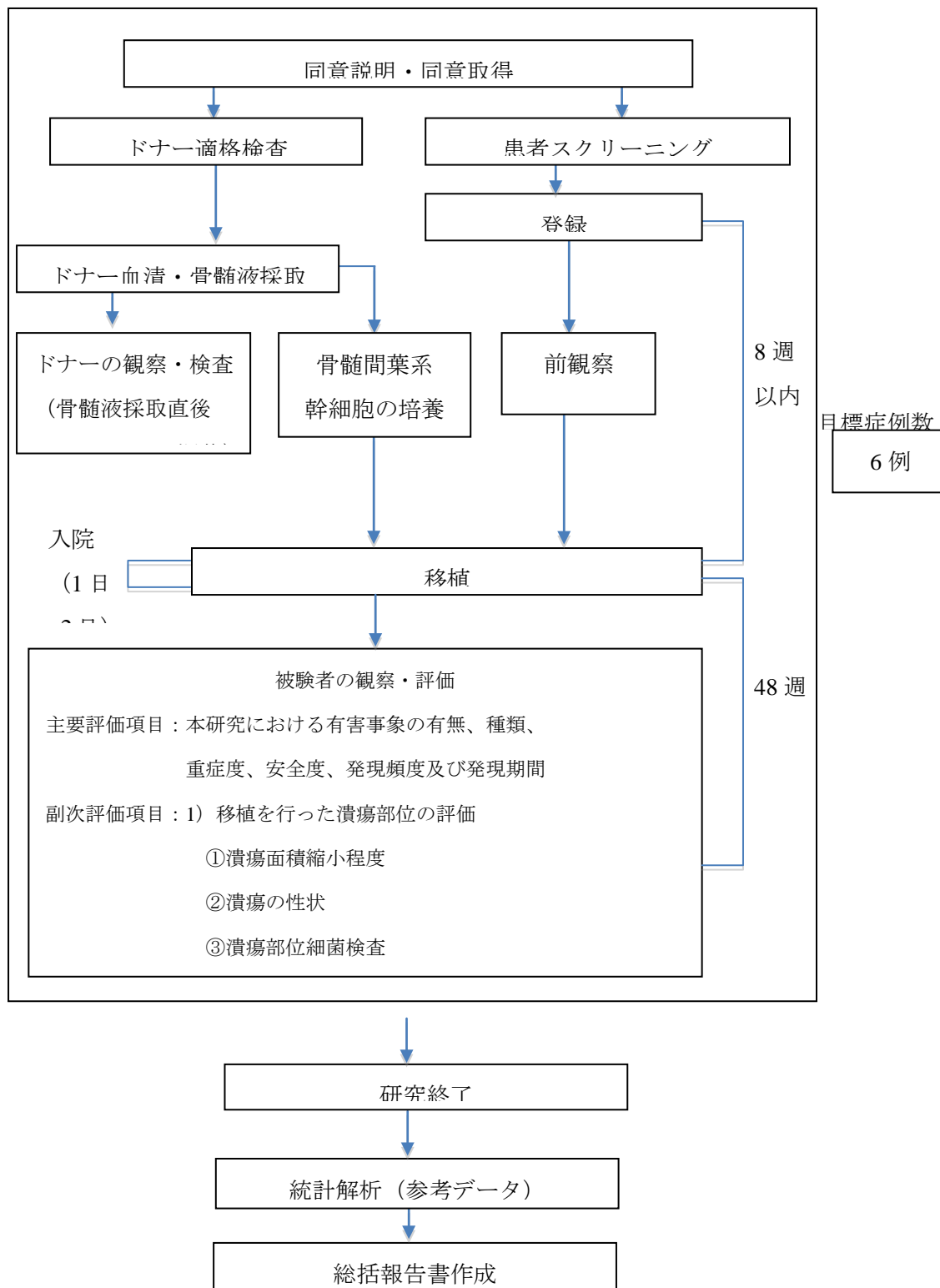
研究の背景：これまで申請者は、厚生労働省稀少難治性皮膚疾患調査研究班のメンバーとして、平成8年から現在まで、表皮水疱症の病態研究、遺伝子診断技術開発研究、遺伝子治療研究、再生医療研究を担当してきました。その過程で申請者は、表皮水疱症の剥がれた表皮が SOS シグナルを血液中に放出し、骨髄から末梢血液を介して間葉系幹細胞を皮膚に誘導すること、皮膚に集まった骨髄由来間葉系幹細胞は皮膚の線維芽細胞や表皮細胞へと分化して剥がれた皮膚の再生に寄与していることを見出しました。また、表皮水疱症モデルマウスに骨髄細胞を移植した結果、移植骨髄細胞によって皮膚基底膜部に欠損していたVII型コラーゲンが供給されて治療効果が得られることを明らかにしました。これらの研究成果を基にして、平成20年から3年間（本年度が最終年度）厚生労働省難治性疾患克服研究事業として「表皮水疱症に対する根治的治療法開発」研究

をすすめ、本申請研究の内容である表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植治療の妥当性に関する基礎研究を進展させました。さらに、ヒト幹細胞臨床研究申請に必要な実施計画書、症例報告書、患者同意説明文書、製品標準書、手順書などを完成させて、大阪大学附属病院における臨床研究実施可能な体制を整えました。一方、南米チリの研究グループは、申請者が国際表皮水疱症会議で提供した基礎研究情報を基にして、チリの表皮水疱症に苦しむ二人の患者さんに健常人由来由来骨髄間葉系幹細胞皮膚移植を実施し、その安全性と有効性を本年（2010年）報告しています。

研究の内容：本申請研究の内容を以下に簡潔にまとめます。

- 1) 20歳以上 60歳未満の表皮水疱症に罹患している患者さん 6例を対象とします。
- 2) 治療部位は、6週間以上持続する難治性皮膚潰瘍です。
- 3) 骨髄間葉系幹細胞のドナーは同意の得られた異性の親または兄弟姉妹です。
- 4) 重度の精神疾患を有する人、アルコール中毒症を有する人、意識障害を有する人、皮膚以外の悪性腫瘍を有する（又は過去5年以内に罹患した既往のある）人、妊娠又は妊娠している可能性のある人、糖尿病を合併している人、その他研究責任者が移植に適さないと判断した人は参加できません（除外基準）。
- 5) 上記1)～3)の条件を満たし、4)の除外基準に該当しない表皮水疱症の患者さんで、かつこの研究への参加を希望する方に同意説明文書を提供し、口頭で十分な説明を行ったあと、文章で同意を得た方をエントリーします。
- 6) ドナーから局所麻酔下で約20mlの骨髄血を未来医療センター外来で採血し、未来医療センター内細胞培養センター（Cell Processing Center、CPC）で骨髄間葉系幹細胞を培養により増やします。
- 7) 培養により増やした家族内ドナー由来骨髄間葉系幹細胞を 0.5×10^6 個/250 μ l となるように生理食塩水で浮遊細胞液を作成し、大阪大学附属病院皮膚科に入院した表皮水疱症に罹患している患者さんの難治性皮膚潰瘍の周囲皮膚に、2cm 間隔で1箇所あたり 250 μ l (0.5×10^6 個) ずつ皮下移植します。もし潰瘍周囲の長さが20cm であれば、2cm 間隔で計10箇所に移植することになります。
- 8) 移植後、経時的に外来で診察し、移植部皮膚や全身における異常出現の有無を詳細に検査して、健常人由来骨髄間葉系幹細胞移植の安全性を確認します。同時に、骨髄間葉系幹細胞移植部の潰瘍面積縮小程度を測定して潰瘍縮小効果を判定します。また、移植前と潰瘍閉鎖後に移植部皮膚を生検し、性染色体の違いを利用して移植した骨髄間葉系幹細胞の存在を確認します。また、皮膚基底膜部の水疱形成状況や、移植骨髄間葉系幹細胞由来の皮膚細胞による欠損基底膜タンパクの供給程度を確認します。

臨床研究の流れ図



手術当日

手術より約3週間前

