

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 再生医療実用化研究事業  
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名 : (日本語) 表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞移植再生医療の実用化研究  
(英語) Study for practical application of allogenic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for epidermolysis bullosa
- 研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学寄附講座 寄附講座教授  
玉井 克人
- 所属 役職 氏名 : (英語) KATSUTO TAMAI, Endowed Chair Professor, Department of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University
- 実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
- 開発課題名 : (日本語) 研究統括、臨床研究実施、薬効メカニズム解明研究実施  
(英語) Unification of the study, implementation of clinical study and pharmacological effectiveness test.
- 研究開発分担者
- 所属 役職 氏名 : (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学寄附講座 寄附講座教授  
玉井 克人  
(英語) KATSUTO TAMAI, Endowed Chair Professor, Department of Stem Cell f Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University
- 分担研究
- 開発課題名 : (日本語) 臨床研究指導  
(英語) Instruction of clinical study
- 研究開発分担者
- 所属 役職 氏名 : (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授 片山 一郎  
(英語) ICHIRO KATAYAMA, Professor and Chairman, Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Osaka University

#### 分担研究

開発課題名： (日本語) 薬効メカニズム解明研究実施  
(英語) implementation of pharmacological effectiveness test.

#### 研究開発分担者

所属 役職 氏名： (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授 金田 安史  
(英語) YASUFUMI KANEDA, Professor and Chairman, Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University

#### 分担研究

開発課題名： (日本語) 臨床研究実施  
(英語) Implementation of clinical study

#### 研究開発分担者

所属 役職 氏名： (日本語) 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 講師 江副 幸子  
(英語) SACHIKO EZOE, Associate Professor, Medical Center for Translational and Clinical Research, Osaka University Hospital

#### 分担研究

開発課題名： (日本語) 臨床研究プロトコール管理指導  
(英語) Instruction of managing the clinical study protocol

#### 研究開発分担者

所属 役職 氏名： (日本語) 近畿大学薬学総合研究所 顧問・客員教授 早川 堯夫  
(英語) TAKAO HAYAKAWA, Adviser/Visiting professor, Pharmaceutical research and technology institute, KINDAI UNIVERSITY

## II. 成果の概要 (活動総括概要)

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

研究代表者の玉井克人 (大阪大学大学院医学系研究科 再生誘導医学寄附講座教授) は、分担研究者の片山一朗教授 (大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科学講座)、金田安史教授 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学分野)、江副幸子講師 (大阪大学医学部附属病院 未来医療センター)、早川堯夫客員教授 (近畿大学薬学総合研究科) らのグループと共に、現在全く治療法の無い遺伝性皮膚難病である表皮水疱症に対して有効な治療法を開発することを目的として、平成 27~28 年度に「表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞移植再生医療の実用化研究」を進めた。表皮水疱症は、皮膚基底膜部の接着構造蛋白の遺伝的欠損ないし機能不全により、日常生活の軽微な外力で表皮剥離を繰り返し、全身熱傷様症状を来す。本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞が表皮水疱症皮膚の再生に寄与するという玉井らの基礎研究成果を背景として、6 週間以上持続する難治性皮膚潰瘍を有する 4 名の劣性栄養障害型表皮水疱症患者を対象として、健常家族由来骨髄間葉系幹細胞を培養・増殖後、難治性潰瘍周囲に 2 cm 間隔で 1ヶ所あたり 50 万個の間葉系幹細胞を皮下移植し、経時的に潰瘍面積および潰瘍周囲長を測定した。その結果、経過途中で間葉系幹細胞移植と因果関係のない合併

症で脱落した 1 例を除く 3 例において、著明な潰瘍面積縮小効果が得られ、3 例とも移植 1 年後の時点で 95%以上の潰瘍縮小率が確認された。また間葉系幹細胞移植部に異常は観察されなかった。移植 1 年後の評価が得られた患者 3 名の HLA は、いずれもドナーHLA と主要 3 遺伝子座の相同遺伝子のうち半分が一致 (haplo-identical) していた。皮膚基底膜の VII 型コラーゲン蛋白沈着は、3 例中 1 例でのみ、1 年後に増加傾向を示し、これと一致するように電顕写真において係留線維の形成が確認された。以上の結果は、骨髄間葉系幹細胞移植の潰瘍面積縮小効果が必ずしも移植細胞による皮膚基底膜成分の供給に依存していない可能性を示唆している。実際、同時に実施した治療効果発現機序解明研究において、骨髄由来間葉系幹細胞が皮膚基底膜 VII 型コラーゲン発現程度に依存しない皮膚病態マウスモデル (皮膚移植モデル、皮膚線維化モデル) において著明な抗炎症作用、瘢痕抑制作用を示すことが明らかになった。即ち、水疱・潰瘍形成後に著明な炎症反応が生じ、疼痛や搔痒により 2 次的に症状が悪化している表皮水疱症に共通した病態に対し、骨髄間葉系幹細胞移植は有効な治療となりうる可能性が示唆された。これらの臨床研究および基礎研究成果から、他家骨髄間葉系幹細胞移植治療は栄養障害型表皮水疱症、そしておそらく単純型及び接合部型表皮水疱症に対しても有効な治療法となる可能性がある。今後、大阪大学のみならず、国内すべての主要医療施設において表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植医療を実施可能にするためには、他家骨髄間葉系幹細胞凍結製剤 (企業製剤) の開発が必要である。

In this study, Katsuto Tamai (principal investigator, Endowed Chair Professor, Department of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University), together with Ichiro Katayama (co-investigator, Professor and Chairman, Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Osaka University), Yasufumi Kaneda (co-investigator, Professor and Chairman, Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University), Sachiko Ezoe (co-investigator, Associate Professor, Medical Center for Translational and Clinical Research, Osaka University Hospital), Takao Hayakawa (co-investigator, Adviser/Visiting professor, Pharmaceutical research and technology institute, KINDAI UNIVERSITY), have investigated “clinical study of healthy family donor-derived bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for epidermolysis bullosa patients” from 2014 to 2016 academic years to develop effective therapeutics for epidermolysis bullosa (EB), an intractable genetic blistering skin disease. Among EB forms, recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is one of the most severe EB subtype caused by genetic dysfunction of type VII collagen (Col7), which anchor cutaneous basement membrane to the underlying dermis. Previously, we demonstrated that transplanted bone marrow-derived MSCs accumulated into the RDEB skin and provide Col7 at the cutaneous basement membrane zone, resulting in regeneration of the RDEB skin. Under these backgrounds, we planned clinical trial of allogeneic MSC transplantation in four adult RDEB patients with chronic intractable ulcers continuing more than years. Practically, 0.5 million of MSCs cultured from sex-mismatched healthy family donor bone marrow were subcutaneously inoculated at every 2cm distance around the chronic ulcer, and evaluated the ulcer area, expression of Col7 mRNA/ protein, formation of anchoring fibrils, and engraftment of the transplanted MSCs before and one year after the transplantation. Three out of four RDEB

cases showed almost complete healing of the intractable ulcers after one year. Among the three patients, one patient clearly demonstrated increase of Col7 protein and anchoring fibrils at the basement membrane, and the other two patients showed less but some engraftment of the allogeneic MSCs even after 1 year. The transplanted allogeneic MSCs were haplo-identical to the all RDEB recipients. These data clearly demonstrated that subcutaneous transplantation of allogeneic MSCs would be a therapeutic option for years-lasting intractable ulcers in severe generalized RDEB patients. Further clinical study would be expected to develop allogeneic MSC products for patients suffering from RDEB, and possibly other form of EB with intractable skin ulcer.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 7 件、国際誌 45 件)

玉井 克人

1. Takahashi K, Endo M, Miyoshi T, Tsuritani M, Shimazu Y, Hosoda H, Saga K, Tamai K, Flake AW, Yoshimatsu J, Kimura T. Immune tolerance induction using fetal directed placental injection in rodent models: a murine model. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0123712.
2. Aikawa E, Fujita R, Kikuchi Y, Kaneda Y, Tamai K. Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by inducing an accumulation of PDGFR $\alpha$ (+) mesenchymal cells from bone marrow. Sci Rep. 2015 Jun 5;5:11008.
3. Fujita K, Kuge K, Ozawa N, Sahara S, Zaiki K, Nakaoji K, Hamada K, Takenaka Y, Tanahashi T, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A. Cinnamtannin B-1 Promotes Migration of Mesenchymal Stem Cells and Accelerates Wound Healing in Mice. PLoS One. 2015 Dec 11;10(12):e0144166.
4. Aikawa E, Fujita R, Asai M, Kaneda Y, and Tamai K. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signaling impairs the maintenance of bone marrow mesenchymal stromal cells in diabetic model mice. Stem Cells and Development, 2016 Nov 15;25(22):1721-1732.

片山 一朗

1. Terao M, Yang L, Matsumura S, Yutani M, Murota H, Katayama I. A vitamin D analog inhibits Th2 cytokine- and TGF $\beta$ -induced periostin production in fibroblasts: a potential role for vitamin D in skin sclerosis. Dermatoendocrinol. 2015 Apr 2;7(1): e1010983.
2. Matsumura S, Terao M, Murota H, Katayama I. Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. J Dermatol Sci. 2015 Jun ;78(3):215-23.
3. Hanafusa T, Kato K, Azukizawa H, Miyazaki J, Takeda J, Katayama I. B-1 B cell progenitors

- transiently and partially express keratin 5 during differentiation in bone marrow. *J Dermatol Sci.* 2016 Mar ;81(3):173-81.
- Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H, Ishii M. Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. *Mol Cell Biol.* 2016 June ;36(11):1610-20.
  - Terao M, Katayama I. Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016 June; 84(1):11-6.

金田 安史

- Aikawa E, Fujita R, Kikuchi Y, Kaneda Y, Tamai K. Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by inducing an accumulation of PDGFR $\alpha$  + mesenchymal cells from bone marrow. *Scientific Reports.* 2015 Jun 5;5:11008.

早川 堯夫

- Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama Y, Yamanaka S, Yamato M. A Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Autologous Human Somatic Stem Cells. *Regenerative Therapy*2. 2015. 57-69.
- Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama Y, Yamanaka S, Yamato M. A Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Allogenic Human Somatic Stem Cells. *Regenerative Therapy*2. 2015. 70-80.
- Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin J-H, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-More P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals.* 2015. 43 (5), 283-297.
- Hayakawa T. Overview: Core Technical Elements for Early Product Development, Evaluation, and Control of Human Cell-based Products. *Biologicals.* 2015. 43 (5), 410-415.
- 早川堯夫、佐藤陽治. わが国の再生医療実用化促進の規制整備と世界での位置づけ. *再生医療.* 2015. 4, 9-25.
- 早川堯夫. 適切な科学的規制による再生医療実用化促進. *再生医療.* 2015. 15, 75-89.
- 早川堯夫. 再生医療の産業化と課題. *腎と透析.* 2015. 79, 865-871.
- Hayakawa T, Harris I, Joung J, Kanai N, Kawamata S, Kellathur S, Koga J, Lin YC, Maruyama Y, McBlane J, Nishimura T, Renner M, Ridgway A, Salmikangas P, Sakamoto N, Sato D, Sato Y, Toda Y, Umezawa A, Werner M, Wicks S. Report of the International Regulatory Forum on Human Cell Therapy and Gene Therapy Products. *Biologicals.* 2016 Sep;44(5):467-79.

9. Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals*. 2016 Sep;43(5):283-97.
10. 早川堯夫, 適切な規制による再生医療実用化促進, *再生医療*, 2016, 15, 67-81
11. 早川堯夫, 再生医療等の産業化促進と課題. 再生医療等製品の開発と実用化展望, (株)シーエムシー出版 東京, 2016, 23-31

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

玉井 克人

1. Mesenchymal stem cell therapy for epidermolysis bullosa, 口頭, Tamai K, The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research, April 18th, 2015/4/18, 国内.
2. Mesenchymal stromal cell therapy for EB, 口頭, Tamai K, 23rd World Congress of Dermatology, 2015/6/9, 国外.
3. Role of HMGB1 in tissue injury: Lesson from epidermolysis bullosa, 口頭, Tamai K, European Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting, 2015/9/17-20, 国外.
4. 骨髄間葉系幹細胞と損傷組織のクロストーク, 口頭, 玉井克人, 第124回日本補綴歯科学会総会, 2015/5/21, 国内.
5. 皮膚の炎症と再生: 表皮水疱症皮膚再生過程における HMGB1 の役割, 口頭, 玉井克人, 第36回日本炎症・再生学会, 2015/7/22, 国内.
6. 他家骨髄由来間葉系細胞移植による表皮水疱症治療, 口頭, 玉井克人, 第15回日本再生医療学会総会, 2016/3/17, 国内.
7. 末梢循環性間葉系細胞による生体内損傷組織再生機序を促進する医薬開発, 口頭, 玉井克人, 第15回日本再生医療学会総会, 2016/3/19, 国内.
8. 骨髄由来間葉系幹細胞による体内再生誘導メカニズム, 口頭, 玉井克人, 第115回日本皮膚科学会総会, 2016/6/3, 国内.
9. 骨髄間葉系細胞集団の多様性と生体内機能, 口頭, 玉井克人, 第6回細胞再生医療研究会, 2016/7/30, 国内.
10. 表皮水疱症の再生医学 基礎から臨床へ, 口頭, 玉井克人, 第67回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 2016/10/22, 国内.
11. 表皮水疱症患者を対象とした他家骨髄間葉系幹細胞移植治療の開発, 口頭, 玉井克人, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
12. 骨髄間葉系幹細胞を標的とした再生医学の新しいストラテジー, 口頭, 玉井克人, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.

早川 堯夫

1. 科学と規制, 学んで40年, 口頭, 早川堯夫, PMDA 特別講演会, 2015/5/20, 国内.
2. 再生医療の実用化のための CMC の現状と課題, 今後, 口頭, 早川堯夫, (公財) ヒューマンサ

- イエンス振興財団規制動向調査班勉強会, 東京, 2015/7/10, 国内.
3. 再生医療の実用化のための適切な規制について, 口頭, 早川堯夫, シスメックス再生医療セミナー2016 (東京), 2016/9/1, 国内.
  4. Specifications / Potency: Test Procedures and Acceptance Criteria for Cell-based Products, 口頭, Hayakawa T, Uchida K, CMC Strategy Forum Japan 2016(Tokyo), Workshop Session, 2016/12/5, 国内.
  5. 「再生医療実用化加速のための幹細胞等由来製品評価に最低限必須・共通の技術要件・基準に関する研究」ならびに「ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究」, 口頭, 早川堯夫, 佐藤陽治, 2016年度AMED再生医療情報交換会, 2016/5/30, 国内.
  6. 「再生医療実用化加速のための幹細胞等由来製品評価に最低限必須・共通の技術要件・基準に関する研究」ならびに「ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究」, 口頭・ポスター, 早川堯夫, 佐藤陽治, 2016年度AMED再生医療情報交換会, 2016/5/30, 国内.
  7. ヒト脂肪を由来とした再生医療に資する細胞原材料の開発, 口頭, 森山博由, 早川堯夫, 甲南大学FIRST/FIBER産学連携サロン=Part 10=, 神戸医療産業都市クラスター交流会・第50回 甲南ニューフロンティアサロン (神戸), 2016/6/10, 国内.
  8. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions, 口頭・ポスター, H. Moriyama, M. Moriyama, T. Hayakawa, 14<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research 2016, Moscone West, San Francisco, CA USA, 2016/6/22, 国外.
  9. 生命科学研究カッティングエッジ ~皮膚組織とヒト生体間葉系幹細胞~, 口頭・ポスター, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 生命機能研究会. 同志社大学 (京都), 2016/8/6, 国内.
  10. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の糖代謝制御機構, 口頭, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 同志社大学リトリート (同志社大学リトリートセンター (滋賀)), 2016/8/21, 国内.
  11. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(hADSC)を用いたメラノサイトの作製, ポスター, 奥田真悠, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 同志社大学リトリート (同志社大学リトリートセンター (滋賀)), 2016/8/21, 国内.
  12. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(hADSC)を用いたメラノサイトの作製, ポスター, 奥田真悠, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 第66回日本薬学会近畿支部会 (大阪薬科大学 (大阪)), 2016/10/15, 国内.
  13. 低酸素状態下でのヒト脂肪由来間葉系幹細胞における Notch シグナルの役割, ポスター, 野沢一樹, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 第66回日本薬学会近畿支部会 (大阪薬科大学 (大阪)), 2016/10/15 国内.
  14. 低酸素状態下のヒト間葉系幹細胞維持機構における Notch シグナルの役割, 口頭, 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫, 第16回日本再生医療学会総会 (仙台国際センター (宮城)), 2017/3/6, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

玉井 克人

1. 難治性皮膚疾患治療薬開発: 表皮水疱症治療を目指して, 玉井克人, 第5回がん新薬開発合同シンポジウム, 2015/11/13, 国内.

2. 間葉系幹細胞を利用した再生医療の現状, 玉井克人, 京都リサーチパーク主催, 再生医療分野の産業化を目指した実用セミナー: 再生医療の全体像を見渡せるわかりやすい解説講座, 2015/11/24, 国内.
3. 生体内骨髄間葉系幹細胞を標的とした体内再生誘導医薬開発の現状と未来, 玉井克人, 第 8 回 関西ライフサイエンス リーディングサイエンティストセミナー, 2016/6/10, 国内.
4. 骨髄内間葉系幹細胞を標的とした再生誘導医薬開発, 玉井克人, 平成 28 年度第 1 回京都市ライフイノベーション創出支援センターシンポジウム「ライフイノベーションの原動力 ～進化する幹細胞技術と再生誘導法～」, 2016/11/2, 国内.
5. 難病の患者さんから学ぶ、生と死のはざまに必要な医療, 玉井克人, 八戸学院大学 平成 28 年度 地域医療セミナー, 2016/11/4, 国内.
6. 組織再生における骨髄間葉系幹細胞の役割, 玉井克人, 京都リサーチパーク主催 平成 28 年度 再生医療分野の産業化を目指した実用セミナー: 再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座, 2016/11/15, 国内.

早川 堯夫

1. ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究, 早川堯夫, 佐藤陽治, AMED 再生医療シンポジウム, 2016/1/25, 国内.
2. ヒト脂肪を由来とした再生医療に資する細胞原材料の開発, 森山博由, 早川堯夫, 甲南大学 FIRST/FIBER 産学連携サロン=Part 10= (神戸医療産業都市クラスター交流会・第 50 回 甲南ニューフロンティアサロン (神戸)), 2016/6/10, 国内.
3. 再生医療の実用化のための適切な規制について, 早川堯夫, シスメックス再生医療セミナー 2016 (東京), 2016/9/1, 国内.

(4) 特許出願