

のもある。例えば、VII型コラーゲンの片方のアリルに早期終止コドンがあり、そのアリルから全くVII型コラーゲンが産生されなくても、病気は発症しない。従って、優性型のグリシン置換はドミナント-ネガティブに他方のアリルからの正常のVII型コラーゲンの機能を障害していることになる。

VII型コラーゲンのコラーゲン領域には、コラーゲンの gly-X-Y の繰り返しがとぎれるところが多い。そこで、優性型の変異を持つVII型コラーゲンと正常のVII型コラーゲンが2つあることが問題で、変異を持つ物のみであれば疾患を生じない可能性もあると考えた。そこで、変異のみ、変異/正常、正常のみ、の遺伝子を表皮細胞に導入してVII型コラーゲンの分布や量を検討した。G2034Rでは、形態学的に異常を検出出来なかったが、この変異があるとVII型コラーゲンが表皮細胞に蓄積するようになる。G2037Eでは、表皮細胞への貯留を培養細胞でも認めた。さらに、さらに、細胞への貯留をスコア化して貯留度を比較すると、変異のみの方が、変異/正常のものと比較して有意に貯留度が高かった。この結果は、優性栄養障害型がドミナントネガティブ効果に加え、変異VII型コラーゲンの構造異常による影響もあること

が示唆された。

E 結論

VII型コラーゲン遺伝子における優性栄養障害型変異はドミナントネガティブ効果に加え、変異VII型コラーゲンの構造異常による影響もあることが示唆された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

研究発表や論文投稿に関して準備中である。

H 知的財産の出願・登録状況

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)

分担研究者

造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究

分担研究者 阿部理一郎

北海道大学・北海道大学病院皮膚科 助手

研究要旨

これまで再生医学領域の研究により、種々の体細胞成分が骨髄幹細胞から分化可能であることが明らかとなった。骨髄由来幹細胞が表皮細胞に分化しうることも予想されている。よって、皮膚基底膜構造タンパク欠損疾患である表皮水疱症に対して、同種骨髄移植によりドナー骨髄由来表皮細胞を分化させ、欠損構造タンパクを産生させることで根治させることを目的として検討を行った。本年度の研究で、実際に骨髄由来表皮細胞の存在を確認した。また培養系において、末梢血細胞から表皮細胞に分化しうることを明らかにした。

A 目的

これまで再生医学領域の研究により、種々の体細胞成分が骨髄幹細胞から分化可能であることが明らかとなった。骨髄幹細胞から表皮細胞への分化の可能性も示唆されているが、なお確定はえられていない。一方先天性酵素欠損症（Hunter 症候群など）は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用であることが証明されている。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究はなされておらず、定説もない。そこで、国の稀少難治性疾患に指定されている皮膚基底膜構造タンパク欠損疾患（基底膜構造タンパク欠損により、微細な外力でびらん、潰瘍をきたす重症難知性疾患）である表皮水疱症に対して、同種骨髄移植により構造タンパク欠損症を根治させることを目的として、検討を行った。

B 研究方法

①骨髄幹細胞から表皮細胞への分化：

表皮構造タンパク欠損マウス（VII型コラーゲンノックアウト

マウス) に正常マウスから骨髄移植を行うことで、ドナー骨髄由来の表皮細胞が出現するかを確認する。具体的には、骨髄移植されたマウス皮膚を経時的に採取し、ドナー骨髄からの表皮細胞が認められるか、ドナー抗原を用いて確認を行う。現在までの検討で、骨髄移植されたマウス皮膚に、ドナー由来の表皮細胞が存在することを確認した。あわせて、骨髄由来表皮細胞の遊走に付いても検討を行い、ある種のケモカインが強力な遊走因子であることを見出した。

②骨髄由来表皮幹細胞の検討：

ヒト末梢血細胞を用いて、*in vitro* において、様々な培養条件(添加物、共培養など)を行い、末梢血中に表皮細胞へ分化する細胞が存在するか検討した。

C 研究結果

①骨髄幹細胞から表皮細胞への分化：

現在までの検討で、骨髄移植されたマウス皮膚に、ドナー由来の表皮細胞が存在することを確認した。あわせて、骨髄由来表皮細胞の遊走に付いても検討を行い、ある種のケモカインが強力な

遊走因子であることを見出した。

②骨髄由来表皮幹細胞の検討：

末梢血細胞と表皮細胞との共培養で、末梢血細胞の一部は表皮細胞のマーカー（keratin 10 など）を発現することを確認した。加えて、骨髄造血幹細胞のみを用いた同様の検討で、非常に高い割合で表皮細胞に分化することを確認した。

D 考察

本年度の研究で、実際に骨髄由来表皮細胞の存在を確認した。また培養系において、末梢血細胞から表皮細胞に分化しうることを明らかにした。今後は骨髄由来表皮細胞の分化を促進させる条件の検索を行う。現在、表皮細胞への分化能をもつ骨髄由来細胞を表皮へ遊走させるケモカインに重点をおき検討している。上記の効果を持つケモカインを同定できれば、より臨床応用に近づくと考える。

E 結論

今回の研究では、骨髄由来表皮細胞の存在を確認した。また培養系においても、特定の条件で末梢血細胞は表皮細胞に分化しうることを明らかにした。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

特になし。

H 知的財産の出願・登録状況

出願番号：JP2004/369272、「骨髄幹細胞移植治療用医薬」

発明者：清水 宏、阿部理一郎、猪熊大輔

出願人：北海道大学

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

表皮および毛包上皮の幹細胞部位（バルジ）における表皮水疱症関連蛋白の発現とギャップ結合に関する研究

分担研究者 秋山真志

北海道大学・北海道大学病院皮膚科 講師

研究要旨

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称であり、表皮真皮境界部に存在する種々の蛋白の遺伝子異常で発症する。今回の研究では、それらの病因遺伝子についての遺伝子治療を視野にいれ、遺伝子の導入対象としての表皮、および、毛包の幹細胞の属性について検討した。その結果、表皮細胞、および、毛包上皮細胞を供給する幹細胞である毛包のバルジ細胞は、ヒト胎生期の発生過程などを通じて、基底膜蛋白、hemidesmosome 蛋白の発現を恒常的に維持していること、また、

バルジ幹細胞は、ギャップ結合を介した細胞間情報伝達を行なっていることが、確認された。これらの情報は、表皮水疱症の遺伝子治療の標的として毛包バルジ幹細胞を利用する際に有用な知見である。

A 目的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、ケラチン 5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$ インテグリン、ラミニン 5、VII 型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。しかしながら、現在までに根本的な治療法はなく、患者の細胞に原因となる遺伝子を導入する遺伝子治療が根本的な治療法として期待されている。悪性腫瘍等に対する遺伝子治療と異なり、表皮水疱症のような遺伝性疾患に対する遺伝子治療においては、一回の遺伝子治療で、ある程度の持続的効果を得るためには、組織幹細胞に遺伝子を導入する必要がある。すなわち、表皮水疱症の遺伝子治療においては、表皮細胞を

供給する幹細胞である毛包のバルジ細胞をターゲットとして遺伝子治療を行なう必要があるわけである。

そこで、今回の研究では、1) 毛包のバルジ幹細胞にたいする微小環境(niche)には、基底膜蛋白、および、hemidesmosome 蛋白の発現が必要であるのかを検討した。また、2) 毛包のバルジ幹細胞の性質の維持には、ギャップ結合を介した細胞間情報伝達が働いているのかも検討した。

B 研究方法

ヒト皮膚発生過程での毛包のバルジにおける hemidesmosome および基底膜蛋白の発現の検討ヒト胎児皮膚を経時的に採取し、毛包のバルジが顕著である発生過程の毛包における hemidesmosome および基底膜蛋白の発現を蛍光抗体法、免疫組織化学染色にて観察し、各発生段階での経時変化を検討した。

ヒト皮膚発生過程での毛包のバルジにおけるギャップ結合構成蛋白の発現とギャップ結合形成の検討

ヒト皮膚の表皮細胞等のギャップ結合の重要構成蛋白であるコネキシン 26、コネキシン 43 の発現を、免疫蛍光抗体法を用い

て、経時的に採取したヒト胎児皮膚を対象として観察した。さらに、超微形態学的にギャップ結合の形成を観察し、その形成頻度も評価した。この際、特に、発生過程の毛包の著明なバルジ幹細胞を重点的に検討した。

C 研究結果

1) Hemidesmosome、基底膜蛋白の発現 (論文1)

ヒト胎生期、発達過程にある毛包において、バルジ幹細胞部位では常に、基底膜領域に hemidesmosome 蛋白の発現が維持されていた。

2) ギャップ結合構成蛋白の発現とギャップ結合形成 (論文2)

ギャップ結合の構成蛋白であるコネキシン 26、コネキシン 43 の発現は、ヒト胎児の発生過程での毛包において、発生早期から認められ、コネキシン 43 の発現はバルジ幹細胞にも見られた。また、コネキシン 43 を発現している幹細胞は、超微形態的に明らかなギャップ結合の形成を示した。

D 考察

1) 表皮の幹細胞の性質の維持における Hemidesmosome、基底膜蛋白の役割

今回の研究の結果から、hemidesmosome を介した幹細胞と細胞外基質の相互作用が表皮の幹細胞であるバルジ幹細胞の性質の維持に重要な役割を果たしていることが推察された。今後の表皮水疱症の遺伝子治療においては、この hemidesmosome を介した幹細胞と細胞外基質の相互作用を健全に保った状態での治療が必要と考えられる。

2) ギャップ結合を介した情報伝達が表皮幹細胞において果たす機能

従来、表皮の幹細胞は個別に存在し、ギャップ結合を介した細胞相互の情報伝達を行なわないと考えられてきた。しかし、今回の研究結果から、表皮の幹細胞もギャップ結合を介した情報伝達を行っており、それが、幹細胞プールとしてのバルジの維持に働いている可能性が示唆された。このギャップ結合を介した情報伝達、物質伝達の存在が、遺伝子治療においてどのような意味を持

つのか、今後の検討が必要である。

E 結論

今回の研究では、表皮水疱症の遺伝子治療のターゲットである毛包のバルジ幹細胞の幹細胞としての形質の維持のためには、hemidesmosome 蛋白の発現が重要であることが示された。また、幹細胞間のギャップ結合による情報伝達も、幹細胞としての性質の維持に働いている可能生が示された。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

論文 1) Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H. Remodeling of desmosomal and hemidesmosomal adhesion systems during human hair follicle development. J Dermatol Sci, 35, 154-157, 2004.

論文 2) Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, McMillan JR, Eady RAJ,

Shimizu H. Gap junction development in human fetal hair follicle and bulge region. Br J Dermatol, 150, 429-434, 2004.

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
<u>Abe R,</u> <u>Shimizu T,</u> Sugawara H, Watanabe H, Nakamura H, Choei H, Sasaki N, Yamagishi S, Takeuchi M, <u>Shimizu H</u>	Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions.	J Invest Dermatol	122	461-467	2004
<u>Abe R,</u> <u>Shimizu T,</u> Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y, Watanabe H, Sugawara H, Nakamura H, Takeuchi M, Imaizumi T, <u>Shimizu H</u>	Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo.	Am J Pathol	164	1225-1232	2004
<u>Akiyama M,</u> <u>Sawamura D,</u> <u>Shimizu H,</u> Matsuo I	Remodeling of desmosomal and hemidesmosomal adhesion systems during human hair follicle development.	J Dermatol Sci	35	154-157	2004
Arita K, <u>Akiyama M,</u> Tsuji Y, McMillan JR, Eady RAJ, <u>Shimizu H</u>	Gap junction development in the human fetal hair follicle and bulge region.	Br J Dermatol	150	429-434	2004

Goto M, Sato-Matsumura KC, <u>Sawamura D</u> , Yokota K, Nakamura H, Shimizu H	Tyrosinase gene analysis in Japanese patients with oculocutaneous albinism.	J Dermatol Sci	35	215-220	2004
Inagaki K, Suzuki T, <u>Shimizu H</u> , Ishii N, Umezawa Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y	Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan.	Am J Hum Genet	74	466-471	2004
Murata T, Masunaga T, Ishiko A, <u>Shimizu H</u> , Nshikawa T	Differences in recurrent COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa: ethnic-specific and worldwide recurrent mutations.	Arch Dermatol Res	295	442-447	2004
Nakamura H, <u>Sawamura D</u> , Goto M, Sato-Matsumura KC, LaDuca J, Lee JY, Masunaga T, <u>Shimizu H</u>	The G2028R glycine substitution mutation in COL7A1 leads to marked inter-familial clinical heterogeneity in dominant dystrophic epidermolysis bullosa.	J Dermatol Sci	34	195-200	2004
Onozuka T, <u>Sawamura D</u> , Yokota K, <u>Shimizu H</u>	Mutational analysis of the ATP2A2 gene in two Darier disease families with intrafamilial variability.	Br J Dermatol	150	652-657	2004
<u>Sawamura D</u> , Ina S, Goto M, <u>Akiyama M</u> , <u>Shimizu H</u>	In vivo transfer of TGF- α and beta genes to keratinocytes.	J Dermatol Sci	34	234-236	2004

<u>Shimizu T</u> , Niizeki H, Takeuchi O, Yamasaki Y, Inamoto N, Nishikawa T, <u>Abe R</u> , <u>Shimizu H</u> , Hashiguchi K, Nishihira J	Induction of migration inhibitory factor (MIF) precedes at the onset of acute tonsillitis.	Mediat Inflamm	13	293-295	2004
<u>Shimizu T</u> , Nishihira J, Watanabe H, <u>Abe R</u> , Honda A, Ishibashi T, <u>Shimizu H</u>	Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells.	J Biol Chem	279	13729-13737	2004
<u>Shimizu T</u> , Nishihira J, Watanabe H, <u>Abe R</u> , Ishibashi T, <u>Shimizu H</u>	Cetirizine, an H1-receptor antagonist, suppresses the expression of macrophage migration inhibitory factor: Its potential anti-inflammatory action.	Clin Exp Allergy	34	103-109	2004
Tsuchida S, Bonkobara M, McMillan JR, <u>Akiyama M</u> , Yudate T, Aragane Y, Tezuka T, <u>Shimizu H</u> , Cruz PD, Jr., Ariizumi K	Characterization of Kdap, a protein secreted by keratinocytes.	J Invest Dermatol	122	1225-1234	2004
Watanabe H, <u>Shimizu T</u> , Nishihira J, <u>Abe R</u> , Nakayama T, Taniguchi M, Sabe H, Ishibashi T, <u>Shimizu H</u>	Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts.	J Biol Chem	279	1676-1683	2004

Shibaki A, Akiyama M, <u>Shimizu H</u>	Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in a Japanese family of Sjogren-Larsson syndrome.	J Invest Dermatol	123	1197-1199	2004
Tsuchida S, Bonkobara M, McMillan JR, Akiyama M, Yudate T, Aragane Y, Tezuka T, <u>Shimizu H</u> , Cruz PD, Jr., Ariizumi K	Characterization of Kdap, a protein secreted by keratinocytes.	J Invest Dermatol	122	1225-1234	2004
Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Nakamura H, Takizawa Y, <u>Sawamura D</u> , Matsunaga K, Suzumori K, <u>Shimizu H</u>	DNA-based prenatal exclusion of bullous congenital ichthyosiform erythroderma at the early stage, 10 to 11 weeks' of pregnancy, in two consequent siblings.	J Am Acad Dermatol	51	1008-1011	2004

Yamagishi S, <u>Abe R</u> , Inagaki Y, Nakamura K, Sugawara H, Inokuma D, Nakamura H, Shimizu T, Takeuchi M, Yoshimura A, Bucala R, <u>Shimizu H</u> , Imaizumi T	Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling.	Am J Pathol	165	1865-1874	2004
Kawasaki H, <u>Sawamura D</u> , Nakazawa H, Hattori N, Goto M, Sato-Matsumura KC, Akiyama M, <u>Shimizu H</u>	Detection of 1733insC mutations in an Asian family with Birt-Hogg-Dubé syndrome.	Br J Dermatol	152	142-145	2005
Nakamura H, <u>Sawamura D</u> , Goto M, McMillan JR, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, <u>Shimizu H</u>	Epidermolysis Bullosa Simplex Associated with Pyloric Atresia Is a Novel Clinical Subtype Caused by Mutations in the Plectin Gene (PLEC1).	J Mol Diagn	7	28-35	2005