

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の
開発に関する研究

平成16年度～平成18年度 総合研究報告書

平成19(2007)年3月

主任研究者 清水 宏

目 次

I	班員構成	1
II	総合研究報告	
	難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究	3
	主任研究者 清水 宏 (北海道大学)	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	15

I. 班員構成

I 班員構成

研究者名	研究実施場所	職名	主な研究分担
主任研究者 清水 宏	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	教授	研究の総括、症例の 集積、臨床表現の解 析など
分担研究者 澤村 大輔	弘前大学医学部皮膚科	教授	遺伝子解析、遺伝子 導入、動物実験など
古市 泰宏	(株) ジーンケア研究所	代表取締役研究所長	蛋白の精製、イムノ プロットなど
秋山 真志	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	助教授	免疫組織化学、電顕 検索、蛋白の解析な ど
阿部理一郎	北海道大学 北海道大学病院皮膚科	講師	骨髄移植、細胞の培 養、mRNAの解析、遺 伝子の構築など

II. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書
難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究
主任研究者 清水 宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 教授

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る。本研究は、早期に臨床応用可能な、リコンビナント VII 型コラーゲン蛋白を補充するという新しい発想に基づく治療法を実現し、さらに骨髄移植を行い、移植された骨髄幹細胞より分化した皮膚細胞から VII 型コラーゲンを供給させるという新しい観点から再生治療も検討し、難治性皮膚疾患である表皮水疱症の画期的治療法を確立する目的で行われた。その結果、VII 型コラーゲンの患者への投与から蛋白補充療法の有用性を確認した。さらに、表皮幹細胞と造血幹細胞の研究から、表皮水疱症への骨髄移植療法の可能性が示唆された。

分担研究者：

澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授
古市泰宏 (株)ジーンケア研究所
代表取締役研究所長
秋山真志 北海道大学大学院医学研究科
皮膚科学分野助教授
阿部理一郎 北海道大学北海道大学病院
皮膚科講師

13-15年に厚労省科学研究費の補助を受け、構造蛋白である VII 型コラーゲンを補充する治療の基礎的研究を行った。その結果、本蛋白を合成単離する方法を確立し、その合成 VII 型コラーゲンが皮膚の創傷治癒を促進することを明らかにしている。この過去3年の研究成果を基盤として、

- 1) 早期に臨床応用可能な、合成 VII 型コラーゲン蛋白を補充するという新しい発想に基づく治療法を実現し、
- 2) さらに骨髄移植を行い、移植された骨髄幹細胞より分化した皮膚細胞から VII 型コラーゲンを供給させるという新しい観点から再生治療も検討し、難治性皮膚疾患である表皮水疱症の画期的治療法を確立するという2大目標を建てた。本研究はその目標の達成に必要な研究を行った。

A. 研究目的

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り、厚生労働省の特定疾患対策研究事業の対象疾患とされている。近年の皮膚分子生物学の進歩により、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が、現在までに根本的な治療法はなく、画期的治療法の開発が急務である。

清水宏を代表する研究グループは、平成

B. 研究方法

1) 表皮水疱症患者の診断の確定と発症機構の解析

患者の臨床症状や家族歴を詳しく聴取した。皮膚生検を行い、電顕、各種基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検索を行った。さらに、患者本人、ならびに家族から genomic DNA を抽出し、PCR, direct sequencing 法などを用いて DNA 解析を施行した。

2) ヒトリコンビナント VII 型コラーゲンの臨床応用

VII 型コラーゲン遺伝子をヒト腎臓由来の 293 細胞に導入し、上清に分泌されたヒトリコンビナント VII 型コラーゲンをアフィニティクロマトグラフィーにて精製した。このリコンビナント VII 型コラーゲンの安全性はすでに動物実験で確認し、ラット皮膚に投与すると基底膜にそって沈着することを確認している。今回、16 歳男性の栄養障害型表皮水疱症患者で、12 歳時から有棘細胞癌が発生している患者の潰瘍部にヒトリコンビナント VII 型コラーゲンを局注した。1回 30 μ g で、総投与回数は 8 回とした。

3) XVII 型コラーゲンのノックアウトマウスの作成

マウス XVII 型コラーゲン遺伝子をマウスライブラリーからクローニングし、エクソン 2 にネオマイシン遺伝子を挿入し、常法に従いターゲティングベクターを作成した。ES 細胞にそのターゲティングベクターを導入し、相同組換をおこしたクローンを PCR にて選択した。その ES 細胞を胚盤胞にマイクロインジェクトし、偽妊娠マウスに着床させた。得られた、キメラマウスのなか

で、germline transmission をおこしているものを選択し、交雑を繰り返した。得られた F1 ヘテロ接合体をさらに交雑することにより、ホモ接合体 (XVII 型コラーゲンのノックアウトマウス) を得た。

4) 同種培養真皮の臨床応用

北里大学人工皮膚研究開発センターの黒柳能光教授から同種培養真皮の供与をうけた。培養真皮は正常のヒト線維芽細胞から作成され、凍結状態で輸送された。それらは、使用直前に培養液で常温に戻して使用した。対象患者の 1 例目は、51 歳の栄養障害型表皮水疱症の女性で、全身に潰瘍が多発し、有棘細胞癌も併発している。遺伝子変異は、G1815R / 5818delC であった。第 2 例目は 39 歳の栄養障害型表皮水疱症の女性で、やはり全身に難治性の潰瘍が多発し、遺伝子変異は R1978X / G2677S であった。患者 2 例の難治性潰瘍面に、週 1 から 2 回培養真皮を貼付し、潰瘍の縮小を観察した。

5) 線維芽細胞からの VII 型コラーゲン供給

我々は VII 型コラーゲン遺伝子をレトロウイルス法にて、正常表皮細胞へ導入する方法を確立している。そこで、今回 VII 型コラーゲンの発現が全くない重症型表皮水疱症患者から、表皮細胞と線維芽細胞を分離培養した。次にレトロウイルス法にて、表皮細胞に VII 型コラーゲンを遺伝子を導入し、無処理の線維芽細胞と 3 次元培養を行い人工皮膚を構築した。さらに、その患者線維芽細胞に VII 型コラーゲン遺伝子を導入し、無処置の表皮細胞と 3 次元培養を行い人工皮膚を構築した。それぞれの人工皮膚を無免疫ラットの潰瘍部に移植し、経時的に皮膚を採取して VII 型コラーゲンの基底膜への沈着を検討した。対照は、遺伝

子を導入していない、表皮細胞と線維芽細胞で人工皮膚を作成した。尚、遺伝子導入表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞の VII 型コラーゲン発現量はほぼ一致していた。

6) 毛包幹細胞

毛包上皮の幹細胞は、皮膚疾患の場合だけでなく、全身性の疾患に対しても、その遺伝子治療の標的として理想的である。我々は、毛包の上皮細胞の幹細胞を生体から取り出し、選択的に幹細胞に遺伝子を導入し、その導入遺伝子を有する幹細胞から、毛包を再構成することを試みた。ラット髭毛包のバルジ部位より、毛包上皮の幹細胞と考えられる細胞を採取し、遺伝子発現パターンを検討した。また、得られたラット毛包上皮幹細胞に対して、GFP、あるいは、LacZ の reporter gene をコードするレトロウイルスベクターを遺伝子導入した。それらを、SCID マウスの背部に移植し、導入遺伝子の発現状況を検討した。

7) 骨髄細胞

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、なお確定は得られていない。そこで、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、検討を行っている。

皮膚再生の現象の場である、創傷治癒過程の皮膚における細胞遊走因子のスクリーニングを行い、候補となる遊走因子を数種同定した。同定したそれぞれの遊走因子において、骨髄幹細胞への遊走惹起能を *in vitro* で検討した。さらに皮膚創傷部位への骨髄由来表皮細胞遊走への、それぞれの

遊走因子の影響を検討した。また、骨髄由来表皮細胞増加の、皮膚再生過程に対する寄与を解析するため、上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することによる、創傷治癒への影響を検討した。

倫理面への配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解（インフォームドコンセント）に係わる状況を鑑み、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行した。また、動物を使用する実験を行う場合、動物に対する動物愛護上の配慮から、北海道大学で定める動物実験規則に従った。遺伝子解析、同種培養真皮とヒトリコンビナント VII 型コラーゲンによる治療の試みに関しては、すでに北海道大学医学部倫理委員会の承認を得ている。また新たに遺伝子治療を行う場合は、北海道大学医学部倫理委員会や厚生労働省の認可を受ける予定であった。以上のようにシステムをすでに構築し、人権、利益の保護に関しては万全の体制が整っていた。

C. 研究結果

1) 表皮水疱症患者の診断の確定と発症機構の解析

対象とした患者 20 例の内訳は、優性栄養障害型 4 例、非 Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型 10 例、Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型 6 例であった。その結果、16 の新規変異を含む 30 の変異を同定した。優性型では、G2034R (6100G>A), G2037E (6110G>A), G2064E (6191G>A), 8069del17insGA : 非 Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、

G1595R(4783G>A), G1815R(5443G>A), R1957Q(5870G>A), G2366C(7096G>T), C2875F(8627G>T), R236X(706C>T), R1340X(4018C>T), R1978X(5932C>T), Q2827X(8479C>T), E2857X(8569G>T), 5818delC, 5604+2G>C, 6573+1G>C, 8109+2T>A, 8358+1G>T: Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、R137X(409C>T), Q641X(1921C>T), R1683X(5047C>T), R2261X(6781C>T), 434insGCAT, 1474del8 and 5818delC, 6081insC: を認めた。

今回の優性型の変異では、4 グリシン置換は既知の報告であったが、8069del17insGA は新規の変異であった。17 塩基の欠失であるが、2 塩基 GA の挿入があるため、open reading frame が止まることがない。逆に蛋白が作られてしまうため、dominant-negative 効果が出て、優性形になると考えられた。今回の検索では、15 の劣性型の新規変異を同定したが、日本人でも VII 型コラーゲンの変異は家系特異であることが予想された。日本人特有の変異として、5818delC, 6573+1G>C, E2857X の 3 変異が報告されているが、今回の検索でも 5818delC は 4 家系に、6573+1G>C は 2 家系に認めたが、E2857X は一家系のみであった。さらに、Q2827X を 2 家系に認め、この変異も日本人に多い変異であることが推測された。

2) ヒトリコンビナント VII 型コラーゲンの臨床応用

16 歳男性、栄養障害型表皮水疱症患者の腰部にある難治性の潰瘍にヒトリコンビナント VII 型コラーゲンを 8 回局注した。特に、局所や全身の副作用は認めなかった。その結果、投与部位で潰瘍の縮小が認めら

れた。処置部の生検を行い、ヒト VII 型コラーゲンに対する抗体で VII 型コラーゲンの発現を検討したが、局注部で明らかな VII 型コラーゲンの増加は確認できなかった。

潰瘍縮小効果が認められたのは、局注した VII 型コラーゲンの作用と考えられたが、蛍光抗体で明らかな蛋白の増加がなかったのは、やはり、VII 型コラーゲンが基底膜に十分供給されていなかったと考えられた。今後、VII 型コラーゲンの量を増やしたり、局注した VII 型コラーゲンが皮膚に長く留まる工夫がさらに必要と考えた。また、今回の患者では異常ながら VII 型コラーゲンの発現が基底膜に認められるので、VII 型コラーゲンの発現がまったくない症例でも検討することが必要と思われた。

3) XVII 型コラーゲンのノックアウトマウスの作成

新生児 XVII 型コラーゲン KO マウス皮膚は外的刺激によって容易に剥離可能であり、手足には水疱形成を認めた。組織学的に水疱は表皮下に生じ、COL17 の発現は消失していた。KO マウスは生後 2~4 週以内に死亡したが、6 ヶ月以上成長するものもあった。これらの成長した KO マウスでは、肛囲のびらん、潰瘍化や指先の爪甲脱落を伴う瘢痕化、脱毛や白髪など多くの特徴的な所見を多く呈していた。

これまで多くの表皮水疱症モデルマウスが作製されてきたが、XVII 型コラーゲン KO マウス作製に成功した報告はなく本研究が初めてである。表皮水疱症モデルマウスの多くはヒトの臨床形に比較し重症化する傾向があり、大人になるまで成長するものは殆ど無い。XVII 型コラーゲン KO マウスもその多くが生後間もなく死亡するが、3 ヶ

月以上生存する個体も存在し必ずしも致死
的ではなかった。

表皮水疱症患者の治療法として遺伝子治
療や欠損タンパク補充療法など種々の方法
が施行されているが、未だ疾患モデル動物
の治療に成功した報告はない。この理由と
して、表皮水疱症の治療自体が困難である
以外に適切なモデル動物が存在しなかった
ことが挙げられる。XVII 型コラーゲン KO
マウスの一部は長期生存可能なため、種々
の治療実験の対象として今後大いに期待で
きる。

4) 同種培養真皮の臨床応用

1 例目、2 例目とも下肢にある難治性の
潰瘍に対して、同種培養真皮療法を行った。
その結果、両者とも著明に潰瘍の縮小が認
められ、本症に対して有用であることが示
された。潰瘍治癒部を生検し、VII 型コラ
ーゲンの発現を確認したが、明確な VII 型
コラーゲンの発現の上昇は確認できなかった。

同種培養真皮では生きた正常線維芽細胞
が含まれるため、VII 型コラーゲンの発現
があり、正常の VII 型コラーゲンがない栄
養障害型の 2 例に効果があったと考えられ
た。しかし、投与を行った 2 例は、VII 型
コラーゲンの変異が終止コドンとミスセン
ス変異の組み合わせのため、VII 型コラ
ーゲン発現がある程度認められる。本来 VII
型コラーゲンの正常皮膚においての VII 型
コラーゲン発現は非常に低いため、培養真
皮からの VII 型コラーゲンの供給も少なく、
治療効果はあったが、蛍光抗体で確認で
きるほど十分な供給はなかったと考えられた。

今後、遺伝子導入によって VII 型コラ
ーゲンの強発現した培養真皮の検討が必要と

考えた。

5) 線維芽細胞からの VII 型コラーゲン供 給

作成した人工皮膚を無免疫動物に移植し、
構築された皮膚を生検し、VII 型コラーゲ
ンの発現を蛍光抗体にて検討した所、3 週、
6 週、9 週いずれの週においても、無処置
表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞を組み合
わせた人工皮膚移植による皮膚が最も基底
膜に強く VII 型コラーゲンが強く沈着して
いることが認められた。さらに、基底膜に
沈着した VII 型コラーゲンを蛍光光度にて
数値化すると、有意に無処置表皮細胞と遺
伝子導入線維芽細胞の人工皮膚移植におい
て、VII 型コラーゲンの発現が高いことが
確認された。

6) 毛包幹細胞

培養ラットバルジ由来毛包上皮の幹細胞
からの mRNA を検討した所、procollagen
type II, alpha I, insulin-like growth
factor-binding protein, fibroblast growth
factor, matrix metalloproteinase 3 等の
遺伝子の発現が上昇していた。遺伝子を導
入された毛包上皮幹細胞から、移植後、3
週間で、毛包付属器の再構成が観察された。
再構成毛包は、ほぼ、正常な形態を有し、
それらの上皮成分には、導入された
reporter gene の発現が確認された。その
後、経時的に、reporter gene の発現を観
察した結果、再生毛包上皮には、移植後、
6 ヶ月後にも、導入遺伝子の発現が確認さ
れた。

本研究の結果から、毛包上皮の幹細胞か
ら再構成された皮膚においては、毛包付属
器のみならず、毛包周囲の毛包間表皮にも
導入遺伝子の発現が見られた。また、導入

された遺伝子について、細胞移植後半年以上経過しても、その発現が認められた。このように長期に渡り、導入遺伝子の発現が見られた理由は、本研究での方法で、高率に幹細胞に遺伝子が導入されていたためと考えられる。今後、バルジ部の毛包上皮細胞を採取後、幹細胞マーカーを用いて、FACSを行い、さらに、採取細胞中の幹細胞の密度を高くすれば、幹細胞への遺伝子導入効率を上げることができると考えられた。

7) 骨髄細胞

骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子の同定に関しては、現在までの検討で、皮膚創傷部位に特異的に発現し、かつ骨髄幹細胞の遊走を特異的に誘導する、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。この同定因子は生体内においても骨髄由来表皮細胞の数を増加させた。骨髄由来表皮細胞増加の創傷治癒への影響については、上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することにより、創傷治癒が有意に促進した。

今回の研究で、骨髄由来表皮細胞の割合を増加させるために、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。さらに実際に、この因子が、生体内における骨髄由来表皮細胞の割合を増加させることも明らかにした。加えて、骨髄由来表皮細胞増加の創傷治癒への影響も検討し、創傷治癒を促進させることを明らかにした。

今後は現在までの成果を、臨床応用に近づけるべく、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) への正常マウスから骨髄移植療法を行う予定である。

D. 考察

今回の研究で、ヒトリコンビナント VII 型コラーゲン産生細胞の大量培養に成功し、はじめて VII 型コラーゲンを大量に得ることができた。さらに、北大医学部の倫理委員会の認可を得て、劣性栄養障害型表皮水疱症の 1 例に、臨床応用を行った。結果は、潰瘍の縮小が認められ良好であった。現在、さらに、3 例の追加症例に関して、倫理委員会の認可を得ているので、近日、VII 型コラーゲンを投与予定であり、臨床応用の目標を達成した。

近年、骨髄細胞は色々な細胞に分化可能であることが分かって来たが、今回の研究でも、骨髄細胞が表皮細胞に分化することが確かめられた。また、皮膚創傷部位に特異的に発現し、かつ骨髄幹細胞の遊走を特異的に誘導する、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。さらに、その因子が創傷治癒を促進することを確かめた。いまだ、骨髄由来細胞の回収細胞量がすくない所が問題点であるが、VII 型コラーゲンを含む皮膚蛋白の発現を検討中で、目標を概ね達成した。

上記した成果に加え、今回、XVII 型コラーゲン KO マウスの作成により、重症型表皮水疱症の治療実験に使用可能な、非致死性の重症型表皮水疱症のモデル動物作成に成功した (Nishie W and Sawamura D, Co-first, Nat Med, in press)。いままでのモデルは生後すぐに死亡していたため、このモデルは今後の治療実験に、有力な武器となると考えられる。さらに、遺伝子を導入した場合、表皮細胞より真皮にある線維芽細胞の方が効率よく基底膜に欠損蛋白をより供給できること (Goto et al, J Invest Dermatol,

2005)、同種培養真皮移植が表皮水疱症の潰瘍縮小にある程度効果があること (Natsuga et al. 論文投稿中) が明らかになった。

今回の研究でヒト VII 型コラーゲンの蛋白補充療法が臨床的に有用であることが示された学術的意義は計り知れない。また、骨髄由来表皮細胞を遊走させる因子を同定した点も評価される。その他、治療実験に使用可能な、非致死性重症型表皮水疱症のモデルマウスを確立した点も学術的意義が大きい。また、本研究による成果は世界で唯一のものであり、表皮水疱症を研究する世界の研究者にとって重要であるのはいうまでもない。表皮水疱症患者は、地域特性がなく、全世界に万遍なく分布するので、本研究の国際的意義も高い。さらに、本研究により、表皮水疱症の新しい治療法が将来確立されれば、本症患者や家族が苦しみから救われ QOL が著しく改善されるため、国民の健康・医療・福祉の向上等の面から必要な研究と言える。また、蛋白補充、遺伝子治療、再生治療といった新しい視点から発展させる療法であり、医学の発展や進歩へも多大な貢献となると確信する。そのため、社会的意義も計り知れない。

E. 結論

本研究は、重症型表皮水疱症に対するヒト VII 型コラーゲンの蛋白補充療法の臨床的有用性と骨髄細胞細胞を用いる再生医療の可能性を示すことができた。今後、この治療をさらに発展させることが必要であると思われた。さらに、1) 重症型表皮水疱症のモデル動物の作成に成功し、2) 表皮細胞より線維芽細胞の方がより基底膜に欠損蛋白効率よく供給できること、3) 同種

培養真皮が表皮水疱症の潰瘍縮小にある程度効果があること、を示した。このことから、培養が簡単で長期培養可能な線維芽細胞を標的細胞として、欠損する遺伝子を線維芽細胞に導入し、それらの蛋白を強発現する線維芽細胞を患者に投与する細胞治療を開発が、新しい研究として、今後不可欠であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表にまとめた。

H. 知的財産の出願・登録状況

特許の名称：骨髄幹細胞移植治療用医薬

出願番号：JP2004/369272

発明者：清水 宏、阿部理一郎、猪熊大輔

出願人：北海道大学

出願日：平成16年12月21日

特許の名称：骨髄幹細胞移植治療用医薬

出願番号：PCT/JP2005/020697

発明者：清水 宏、阿部理一郎、猪熊大輔

出願人：北海道大学

出願日：平成17年11月11日

特許の名称：皮膚再生用の細胞シートを
製するための構造体およびそ
の利用

出願番号：特願 2005-188948

発明者：ジェイムズ ロバート マクミラ
ン、田中 賢、山本貞明、清水 宏、
下村政嗣

出願人：北海道大学

出願日：平成17年6月28日

特許の名称：180kD 類天疱瘡抗原欠損ノックアウトマウス

出願番号：特願 2005-325275

発明者：澤村大輔、清水 宏

出願人：北海道大学

出願日：平成17年8月30日

特許の名称：角化異常症の診断支援方法

出願番号：特願 2006-019199

発明者：中川裕章、秋山真志、清水 宏、
西村紳一郎、近藤裕郷

出願人：北海道大学、塩野義製薬株式会社

出願日：平成18年1月27日

別添資料

厚生労働省難治性疾患研究事後評価（ヒアリング）発表スライド

スライド1 難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究

平成16年～18年度厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
H16-難治-一般-005

難治性重症型表皮水疱症の 画期的治療法の開発に関する研究

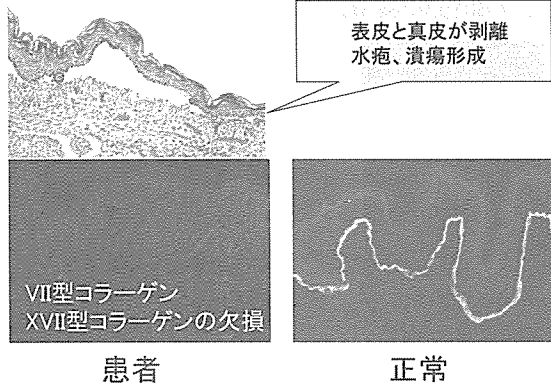
主任研究者 清水 宏
北海道大学医学研究科
皮膚科学分野

スライド2 難治性重症型表皮水疱症の臨床

難治性重症型 表皮水疱症



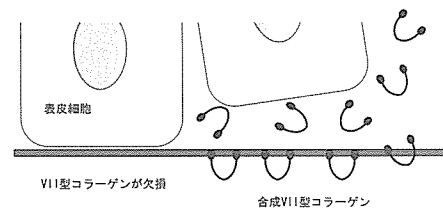
スライド3 難治性重症型表皮水疱症の発症機構
表皮水疱症の発症機構



スライド4 VII型コラーゲンの蛋白補充療法

1) 蛋白補充療法

皮膚基底膜の構造蛋白である
合成VII型コラーゲンを補充するという
新しい発想に基づく治療法の臨床応用



スライド5 合成VII型コラーゲンの精製方法

1) 蛋白補充療法

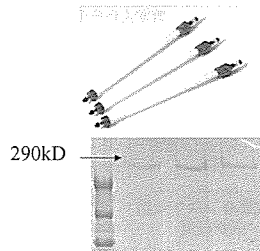
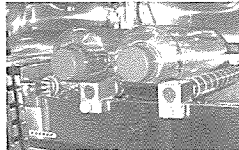
合成VII型コラーゲン
大量精製法の確立

VII型コラーゲン遺伝子導入細胞
回転培養システム

培養液をアフィニティークロマト
ゲルろ過処理

VII型コラーゲンの精製

2リットルボトル

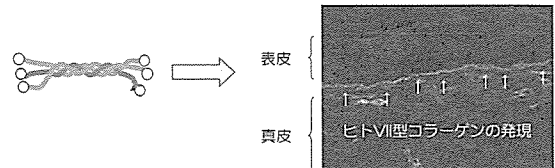


スライド6 合成VII型コラーゲンの動物への投与

ラットにVII型コラーゲンタンパクを注射



正常ラットの皮膚にヒトVII型コラーゲン蛋白を導入



スライド7 合成VII型コラーゲンの臨床応用

臨床応用：VII型コラーゲンタンパクを注射

劣性栄養障害型表皮水疱症の潰瘍にヒトVII型コラーゲン蛋白を導入

表皮
真皮

ヒトVII型コラーゲンの発現

スライド8 合成VII型コラーゲン補充療法の申請

臨床応用へ

臨床治験

重症型表皮水疱症に対する
ヒトリコンビナントVII型コラーゲンの投与

北海道大学医学部
倫理委員会の承認

スライド9 蛋白補充療法の実際

VII型コラーゲン蛋白補充療法の実際

16歳男子。

有棘細胞癌が多発している栄養障害型患者の潰瘍部にリコンビナントVII型コラーゲンを投与

スライド10 蛋白補充療法の効果

リコンビナントVII型コラーゲン投与部位の変化

○ VII型コラーゲン投与部

○ 生理食塩水投与部

投与部の潰瘍の縮小が認められた。

スライド11 蛋白補充療法の追加症例

蛋白補充療法の追加症例

さらに症状が重篤な3例投与予定

4歳, 男児

1. 4歳, 男児
2. 7歳, 女児
3. 2歳, 女児

すでに北大医学部倫理委員会承認済み

スライド12 骨髄細胞からのVII型コラーゲンの分泌

2) 骨髄幹細胞移植療法

移植骨髄幹細胞より表皮細胞を分化させその細胞からVII型コラーゲンを供給する

表皮
真皮

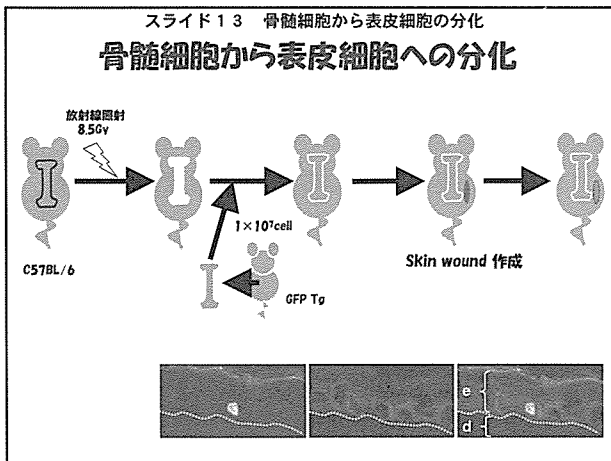
健康人からの骨髄移植

健康人ドナー由来骨髄幹細胞

表皮細胞に分化

欠損タンパクを産生

基底膜タンパク欠損患者皮膚

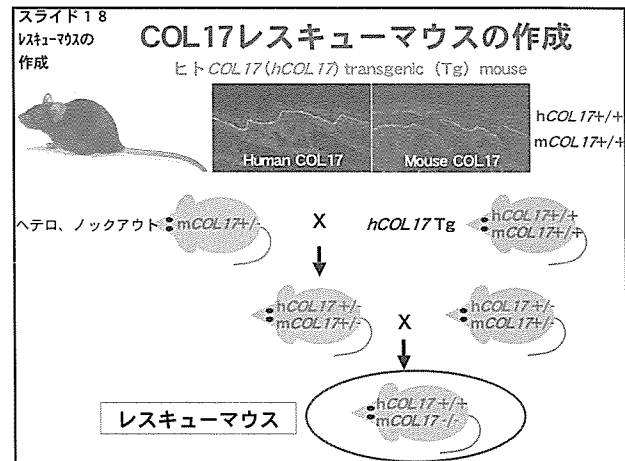
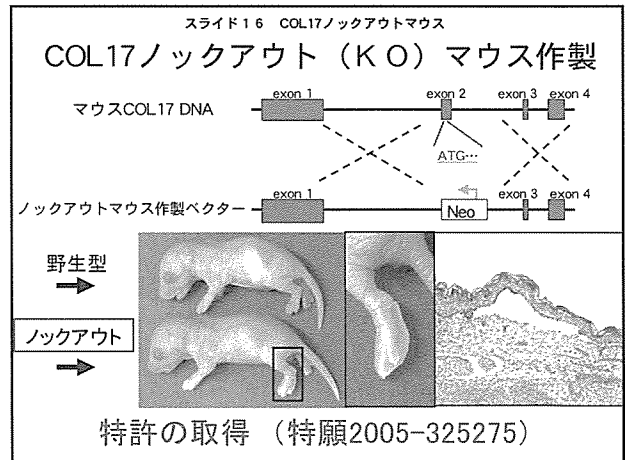
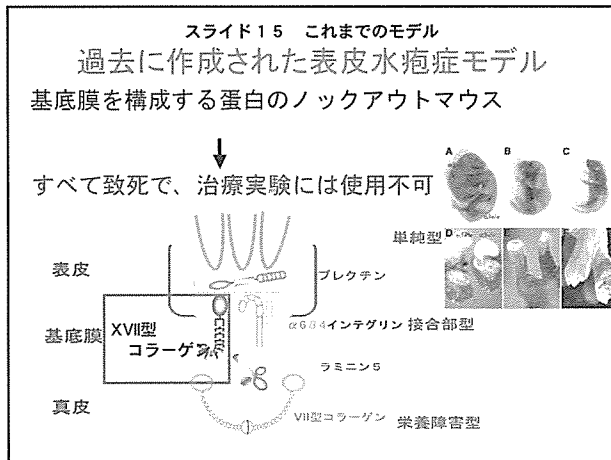


スライド14 表皮水疱症モデルの作成

3) 表皮水疱症モデルマウスの作成

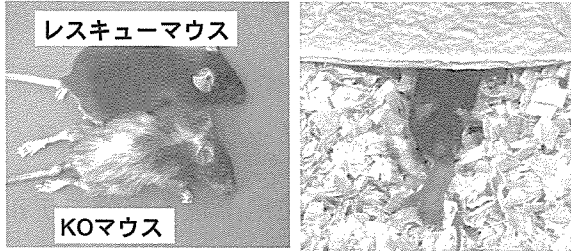
XVII型コラーゲン ノックアウトマウス
世界初の治療実験に使用出来る動物モデル

Nature Medicine, in press
2007年4月にE-publication 予定



レスキューマウスプロジェクト

スライド19
表皮水疱症モデル
の治癒実験



レスキューファミリー

ヒトXVII型コラーゲン蛋白により、
表皮水疱症モデルマウスを治療することができる

Nishie, Sawamura (Co-first) et al, Nat Med, in press.

スライド20 新規研究班の構想

新しい研究班 平成19年度より

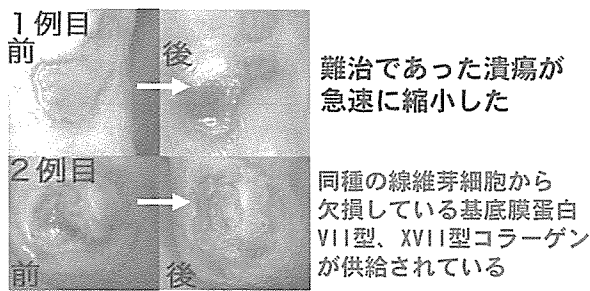
重症型表皮水疱症の根治的細胞療法の開発

班長：澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授
(平成19年2月1日付け)
元 北海道大学医学研究科皮膚科 助教授

Nishie, Sawamura (Co-first) et al,
Nat Med, in press.

スライド21 同種培養真皮の効果

同種培養真皮の表皮水疱症に対する効果

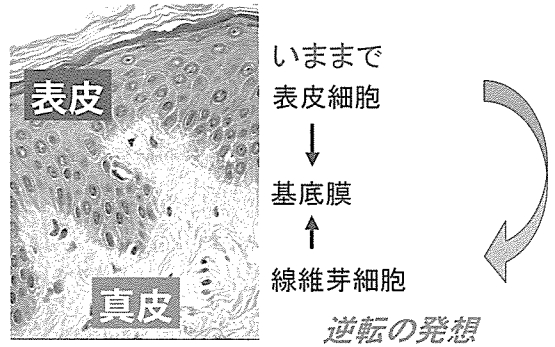


難治であった潰瘍が
急速に縮小した

同種の線維芽細胞から
欠損している基底膜蛋白
VII型、XVII型コラーゲン
が供給されている

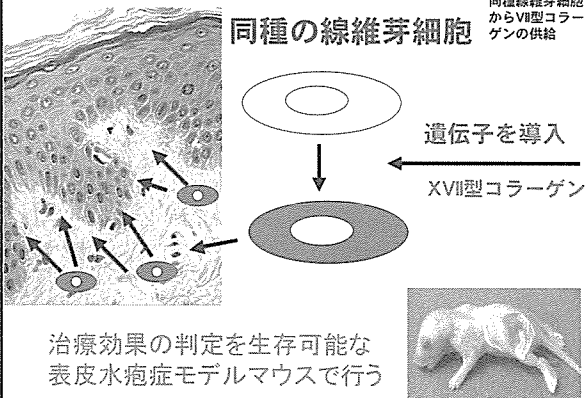
表皮水疱症の標的細胞

スライド22
線維芽細胞を標的に



今後の展望：新しい治療戦略

スライド23
同種線維芽細胞
からVII型コラー
ゲンの供給



治療効果の判定を生存可能な
表皮水疱症モデルマウスで行う



スライド24 新規治療法の有用性

新しい研究班 平成19年度より

重症型表皮水疱症の根治的細胞療法の開発

- 線維芽細胞の培養は簡単
- 遺伝子導入細胞が同種であるため生着がなく安全
- 同種細胞であるため全ての患者に使用可能
- 非常に安価

班長：澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授
(平成19年2月1日付け)
元 北海道大学医学研究科皮膚科 助教授

Nishie, Sawamura (Co-first) et al,
Nat Med, in press.

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

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> , Shimizu T, 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> , Shimizu T, 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
Aoyagi S, Sato-Matsumura KC, <u>Akiyama M</u> , Tanimura S, Shibaki H, <u>Shimizu H</u>	Spitz naevus of the glans penis: an unusual location.	Acta Derm Venereol	84	324-325	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
Fujita Y, Shimizu T, <u>Shimizu H</u>	A case of interstitial granulomatous drug reaction due to sennoside.	Br J Dermatol	150	1035-1037	2004
Goto M, Sato-Matsumura KC, <u>Sawamura D</u> , Yokota K, Nakamura H, <u>Shimizu H</u>	Tyrosinase gene analysis in Japanese patients with oculocutaneous albinism.	J Dermatol Sci	35	215-220	2004
Hata H, <u>Sawamura D</u> , Shibaki A, <u>Shimizu H</u>	Facial erythema alone as a manifestation of chronic graft-versus-host disease.	Acta Derm Venereol	84	239-240	2004
Hayashi H, Shimizu T, Nakamura H, <u>Shimizu H</u>	Linear verrucous haemangioma on the abdomen.	Acta Derm Venereol	84	79-80	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
Iwao F, Sato-Matsumura KC, <u>Sawamura D</u> , <u>Shimizu H</u>	Elephantiasis nostras verrucosa successfully treated by surgical debridement.	Dermatol Surg	30	939-941	2004
Komiyama T, Zhang Q-Z, Miyamoto M, Selvakumar D, <u>Furuichi Y</u>	Monoclonal antibodies and sandwich ELISA for quantitation of HM-1 killer toxin.	Biol Pharm Bull	27	691-693	2004