

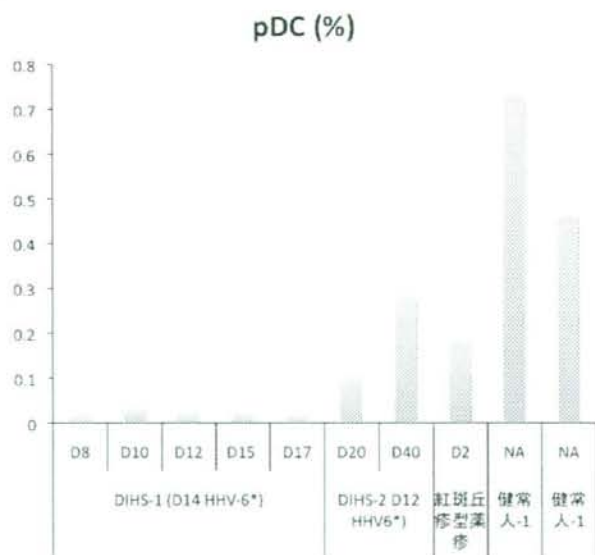
図1：DIHSにおけるHHV-6再活性化機序における仮説

DIHS発症におけるpDCの関与に関する仮説



図2：DIHSにおける血中pDCの頻度

DIHS (2例)、紅斑丘疹型薬疹 (1例)、健常人2例の末梢血単核球分画におけるpDCの頻度をフローサイトメーターにて測定した。DIHS症例1では、DIHSにおける初発疹後8, 10, 12, 15, 17日目、DIHS症例2では初発疹後20, 40日後のサンプルを回収した。各症例におけるHHV-6の活性化は初発疹後14, 12日後であった。



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中毒性表皮壊死症(TEN)のモデルマウスの作製

研究分担者 小豆澤 宏明

大阪大学大学院医学系研究科

内科系臨床医学専攻情報統合医学皮膚学 助教

研究要旨 薬疹で表皮傷害性の $CD8^+$ T 細胞が活性化する機序はわかっていない。ここでは TEN の病態に酷似する皮膚症状を発症する動物モデルを用いて、その病態機序の解明を試みた。皮膚所属リンパ節において抗原提示をする細胞を検討した。表皮傷害性をもつ $CD8^+$ T 細胞が活性化されるのに、皮膚から遊走している樹状細胞が表皮細胞の自己抗原を提示することで活性化できることが明らかとなった。これは薬疹のように炎症がもともとない状態でリンパ球が樹状細胞によって提示された薬剤によって TEN のような表皮障害を引き起こす細胞傷害性を獲得しうることを示し、それを抑制する制御性 T 細胞がどのように働いているのかを検討する上で大変興味深い結果であった。

共同研究者

Manfred B. Lutz, Associate Professor,
Institute for Virology and
Immunobiology
University of Wuerzburg, Germany

A. 研究目的

中毒性表皮壊死症(TEN)は発症が稀であるため臨床での病態研究が難しく、確実な治療法は確立されていない。遅延型過敏反応が関与する薬疹では、T細胞により表皮障害が引き起こされると考えられているがその活性化の機序はわかっていない。我々は表皮にモデル自己抗原を発現するマウスに抗原特異的な $CD8^+$ T細胞を移入することでTENを発症する動物モデルを確立しており、薬剤によりT細胞が活

性化される際に、表皮細胞が発現する自己抗原が関与しているために表皮への傷害性を獲得するのではないかと考えている(図1)。この研究では表皮ケラチノサイトに発現する自己抗原がいかにして抗原提示されるかを明らかにし、薬疹の発症機序への関わりを検討する。さらに $CD8^+$ T細胞の活性化と表皮障害が制御性T細胞によって、いかにして調節されているかを検討する。

B. 研究方法

表皮にモデル自己抗原を発現するトランスジェニックマウスとしてケラチン5プロモーター下にニワトリ卵白アルブミン(OVA)を発現するK5-mOVAを用いた(Azukizawa H. et al. Eur J Immunol. 2003)。表皮傷害性

の CD8⁺T 細胞のモデルとして OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスである OT-I を用いた。樹状細胞の精製には Cell sorter として MoFlow あるいは FACS Vantage を用いた。マウスのリンパ節を採取し、Collagenase type III と DNase I あるいは Collagenase type D を用いた。一部の実験では CD11c Macsbeads を用いて樹状細胞を濃縮した。リンパ節細胞を CD11c および CD40 に対する蛍光標識抗体で染色し、DAPI あるいは 7AAD で死細胞を染色した。死細胞を除外した CD40^{hi} の樹状細胞分画を皮膚からの遊走した樹状細胞、CD40^{int} の樹状細胞分画をそれ以外の樹状細胞として Cell sorter で精製した。精製した樹状細胞は、磁気ビーズで精製し CFSE で標した OT-I マウスの CD8⁺T 細胞と混ぜて 3 日間培養した。(図 2)

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

1. 精製した樹状細胞の純度は 93% 以上であった。
2. 野生型マウスから精製した樹状細胞と培養した OT-I 細胞は活性化や分裂がほとんどみられなかったが、K5-mOVA の皮膚所属リンパ節から精製した CD40^{hi} 樹状細胞では活性化、細胞分裂がみられた。CD40^{int} の樹状細胞分画では活性化・分裂がみられなかったことから、皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走している樹状細胞が表皮自己抗原をつねに抗原提示していることが明らかになった。

D. 考察

薬疹でもともと炎症のない状態で

原因薬剤が T 細胞の活性化を引き起こすと考えられるが、実際に炎症のない状態の樹状細胞によって表皮傷害性の CD8⁺T 細胞が活性化されているのはこれまで明らかではなかった。今回我々は皮膚から皮膚所属リンパ節へ炎症がない状態で常に遊走している樹状細胞が MHC class I 上に提示することによって CD8⁺T 細胞が直接活性化しうることを明らかにした。これは薬疹において表皮障害をおこす CD8⁺T 細胞が皮膚所属リンパ節にいる遊走性の樹状細胞によって活性化した結果皮膚を傷害しうることを示している。これまでの研究で表皮傷害性の CD8⁺T 細胞が皮膚を傷害することで TEN の病態に酷似した全層表皮壊死を伴った皮膚障害を誘導でき、表皮障害は CD4⁺CD25⁺regulatory T cell が樹状細胞を介してその免疫反応を抑制していることが明らかとなっていたが (Azukizawa H. et al. Eur J Immunol. 2005)、今回確立し得た In vitro の実験系を用いてさらに詳細な抑制機序を検討する予定である (図 3)。

E. 結論

薬疹がおこるメカニズムとして T 細胞の関与が臨床研究から明らかとなっているが、薬剤によって T 細胞が活性化し、皮膚障害性を獲得する機序は未だ明らかではない。今回の結果は皮膚所属リンパ節の遊走性の樹状細胞が関与しうることを示し、薬疹の発症機序を考える上で貴重な情報をもたらすと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.小豆澤宏明【ステイブンス・ジョンソン症候群と向き合う】 SJS研究最前線 Stevens-Johnson症候群の動物モデルVisual Dermatology 7巻7号 Page770-771(2008.06)

2.小豆澤宏明【薬疹の新しい展開】薬疹と制御性T細胞炎症と免疫(0918-8371)16 巻 4 号 Page419-423(2008.06)

3.小豆澤宏明、皮膚疾患の新しいマウスモデル-重症薬疹、最新皮膚科学大系2008-2009 66-73ページ中山書店.

2. 学会発表

1. Hiroaki Azukizawa, Nobuo Kanazawa, Manfred B. Lutz
Langerhans cells induce de novo regulatory T cells by presenting epidermal self-antigen. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto

2. Hiroaki Azukizawa, Nobuo Kanazawa, Manfred B. Lutz
Langerin+ dendritic cells induce de novo regulatory T cells by presenting epidermal self-antigen The 10th International Symposium on Dendritic Cells

3.小豆澤 宏明 薬疹2008中毒性表皮壊死症(TEN)の発症機序 日本皮膚アレルギー学会 大阪

4. Hiroaki Azukizawa, Nobuo Kanazawa, Manfred B. Lutz
Langerin+ dendritic cells induce de novo regulatory T cells by presenting epidermal self-antigen 日本免疫学会

京都

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

I. 引用論文

1. Azukizawa H, Kosaka H, Sano S, Heath WR, Takahashi I, Gao XH, Sumikawa Y, Okabe M, Yoshikawa K, Itami S. Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. Eur J Immunol. 2003 Jul;33(7):1879-88.

2. Azukizawa H, Sano S, Kosaka H, Sumikawa Y, Itami S. Prevention of toxic epidermal necrolysis by regulatory T cells. Eur J Immunol. 2005 Jun;35(6):1722-30.

図 1

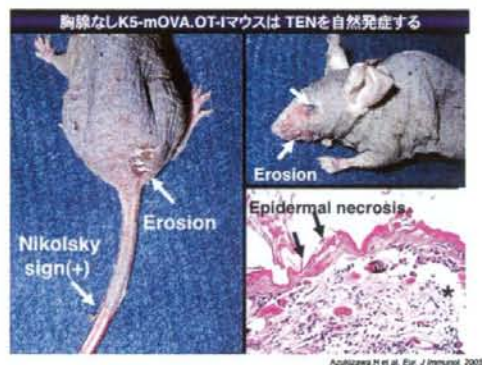


図 2

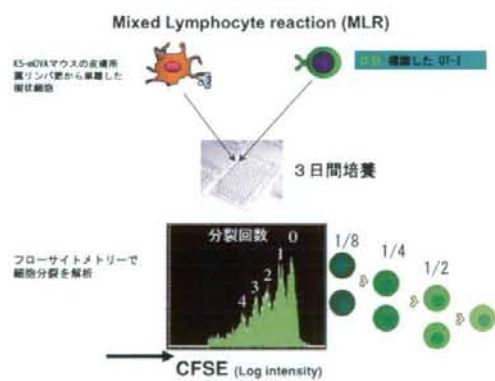
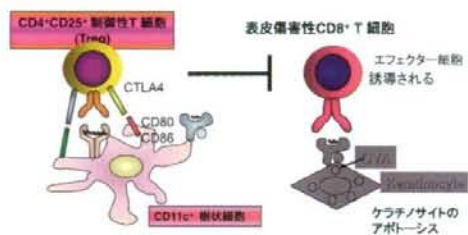


図 3

TENにおけるTregの役割



- Treg のみでは 寛容を誘導できない
- 樹状細胞の存在下でTregは免疫寛容を誘導する
- 生体内でTregがなくなると免疫寛容が誘導されていたCD8⁺T細胞はエフェクターとなり、ケラチノサイトのアポトーシスを誘導する

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
分担研究報告書

骨髄細胞を用いた皮膚再生医療法開発

研究分担者 玉井克人

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 准教授

研究要旨 我々は、皮膚再生に寄与する骨髄由来細胞の同定と、再生医療への応用を目指して研究を進めている。平成 20 年度は、マウス胎生循環に移植した骨髄細胞が胎仔マウス皮膚に皮膚線維芽細胞を供給し得ることを明らかにした。

共同研究者

知野剛直、金田安史

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子
治療学

白方裕司、橋本公二

愛媛大学大学院医学系研究科皮膚科

A. 研究目的

難治性皮膚科潰瘍に対する骨髄細胞を用いた再生医療法開発を目的として、骨髄細胞が皮膚構成細胞を提供し得る可能性を、マウス胎生循環骨髄移植法を利用して検討した。

B. 研究方法

GFP 遺伝子トランスジェニックマウス(C57Bl6 バックグラウンド)より骨髄を採取し、野生型同系妊娠マウス子宮壁(羊膜)上の卵黄囊静脈から胎生 14 日目の胎仔循環にマイクロニードルを用い 5×10^6 個の骨髄細胞を移植した(embryonic bone marrow transplantation: E-BMT)。E-BMT マウスの出生 12 週後に皮膚を生検し、GFP 陽性骨髄由来細胞の存在を確認した。さらに、免疫組織学的検討により、皮膚内 GFP 陽性骨髄由来細胞の

細胞系譜を検討した。また、皮膚内 GFP 陽性細胞を含む皮膚細胞を培養し、免疫染色および RT-PCR により GFP 陽性細胞における発現蛋白を検討した。

出生直後より皮膚に水疱を形成し、数日以内に致死となる VII 型コラーゲンノックアウトマウスに GFP 骨髄細胞を E-BMT し、皮膚病態および生存率に与える影響を検討した。

C. 研究結果

E-BMT マウス皮膚において、出生 12 週後の皮膚真皮内に多数の GFP 陽性細胞が存在することが確認された。これら GFP 陽性細胞は、免疫染色により vimentin、fibronectin、type I collagen といった線維芽細胞マーカー蛋白を発現することが確認された。また、E-BMT マウス皮膚を培養した結果、GFP 陽性線維芽細胞様細胞が GFP 陰性線維芽細胞と同様に培養された。これら GFP 陽性細胞を FACS (fluorescence-activating cell sorter) により分離・培養した後、RT-PCRにより上述した線維芽細胞マーカー蛋白の発現を確認した。即ち、E-BMT により骨髄細胞は皮膚線維芽

細胞を供給し得ることが明らかとなった。

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に E-BMT を施行した結果、平均生存率が約 3 週間延長した。これらのマウスから皮膚を生検し、GFP 陽性細胞の存在を検討した結果、真皮、特に毛包周囲に多数の GFP 陽性・vimentin 陽性の線維芽細胞様細胞が観察された。さらに、これら GFP 陽性細胞近傍の基底膜部位に、VII 型コラーゲンの発現が確認された。

D. 考察

本研究により、骨髄内に、胎生期皮膚に線維芽細胞を供給可能な細胞分画が存在することが明らかとなった。これらの細胞は正常皮膚で線維芽細胞として機能するだけでなく、遺伝性皮膚疾患である栄養障害型表皮水疱症の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に対し、欠損していた VII 型コラーゲンを供給し得ることが明らかとなった。即ち、胎生期骨髄細胞移植は遺伝性難治性水疱生皮膚疾患である表皮水疱症の有効な治療法と成り得る可能性が示された。

今後、骨髄内のどの細胞分画が皮膚に線維芽細胞を供給し得るのか、その詳細を解明し、それら細胞を選択的に採取して胎生循環へと移植することにより、治療効果のさらなる向上が期待される。

E 結論

骨髄細胞が胎生期皮膚に線維芽細胞を供給可能なことが示された。今後骨髄由来皮膚構成細胞をより詳細に解明することにより、遺伝性皮膚疾患

をはじめとする皮膚難病に対し、これまでに無い新しい再生医療の開発が可能になると期待する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成 20 年度)

論文発表

1. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 2008, 26:223-34.
2. Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Cold shock domain protein A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum response element. *Oncogene*. 2008, 27:1821-33.
3. Saga K, Tamai K, Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. *J Biotech.* 2008 Feb 1;133(3):386-94.
4. Nakajima K, Tamai K, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a Splice Variant Induced by High Calcium Concentration and Specifically Expressed in Normal Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008 128: 1336-9.
5. Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura

- D. Vitamin D(3) inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. *J Dermatol Sci*. 2008 50: 155-8.
6. Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, Tabata Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Tatsu Y, Yumoto N, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med*. 2008, Apr 9. [Epub ahead of print]
7. Aizu T, Tamai K, Nakano H, Rokunohe D, Toyomaki Y, Uitto J, Sawamura D. Calcineurin/NFAT-dependent regulation of 230-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2008, 51: 45-51.
8. Chino T, Tamai K, Yamazaki T, Otsuru S, Kikuchi Y, Nimura K, Endo M, Nagai M, Uitto J, Kitajima Y, Kaneda Y. 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, 173:803-14.
9. Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, Tamai K, Sawamura D. Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol*. 2008, 35:336-40.
2. 学会発表
1. シンポジウム:骨髄由来ケラチノサイトによる皮膚再生、第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋
2. 教育講演:創傷治療のニューウェーブ、第107回日本皮膚科学会総会2008年4月20日、京都
3. Symposium: Development of NF-kB decoy ointment and clinical trial for atopic dermatitis, International Symposium of Atopic Dermatitis, May 12th, 2008, Kyoto
4. 基調講演:遺伝性皮膚疾患の根治的治療法開発、第23回角化症研究会、2008年8月2日、東京
5. Workshop for molecular and cellular therapy for EB, Bone marrow transplants: from mouse to human, bone marrow can be an essential source of mesenchymal and epithelial progenitor cells in EB skin, October 3rd, 2008, Madrid
6. Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino, Yasushi Kikuchi, Ichiro Katayama, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda. Bone marrow replenishes de novo keratinocytes in the regenerating hair follicles via circulating blood. Concurrent Minisymposium, Epidermal Structure and Function, International Investigative Dermatology Meeting 2008. May 14-17, Kyoto
7. 玉井克人、梅垣知子、馬淵恵理子、片山一朗、金田安史、棘融解性水疱を生じた非ヘルリッツ接合部型表

皮水疱症の一例、第 30 回水疱症研究会、2008. 10. 26, 東京

8. 玉井克人、山崎尊彦、知野剛直、金田安史 骨髓幹細胞動員因子を利用した新しい皮膚再生誘導医療の開発 第 15 回分子皮膚科学フォーラム 2008.11.14-15, 京都

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（4月30日出願）

- 1) 特許出願番号：特願 2008-119324 「損傷組織の機能的再生促進医薬」
- 2) 特許出願番号：特願 2008-119348 「末梢循環への骨髓由来多能性幹細胞動員薬」
- 3) 特許出願番号：特願 2008-119355 「生体内機能的細胞の高効率採取法」

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

皮膚付属器を有する培養皮膚の作製

研究分担者 岸本治郎

株資生堂新成長領域研究開発センター 皮膚科学研究グループリーダー

研究要旨 これまで上皮と真皮の相互作用に着眼点をおいた、細胞移植による毛包を始めとする皮膚付属器官の再生を目指した基礎研究を進めてきた。本年度は、結合織性毛根鞘細胞に関する基礎的な組織解析と、培養法確立を目指し研究を実施した。結果、ヒト毛乳頭細胞の培養に使用している線維芽細胞培養用低血清培地を用いることで、効率よく結合織性毛根鞘細胞の培養が可能になった。結合織性毛根鞘細胞は毛乳頭細胞の供給源の可能性があるので、ヒト結合織性毛根鞘細胞の培養法の確立は、効率的な毛髪再生技術の開発に寄与すると期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、術後のQOL向上を目指して、毛髪を始めとする皮膚付属器官を有する自己培養皮膚作製技術を確立することである。これまでに、マウス毛乳頭細胞とヒト上皮細胞をヌードマウス背部皮膚に細胞移植することで不完全ながらヒト様の形態と毛包特異的な分子マーカーを発現するキメラ毛包の再生を報告してきた。また、ヒト毛乳頭細胞の培養には、愛媛大より供給を受けた線維芽細胞培養用低血清培地が適していることを明らかにした。毛包には、間葉系細胞として毛乳頭細胞の他に、毛包の周囲に結合織性毛根鞘細胞が存在する。結合織性毛根鞘細胞と毛乳頭は密接に関連しており、また毛包誘導に関連するとの報告がなされている。本年度は、結合織性毛根鞘細胞の培養法の確立と解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. ヒト結合織性毛根鞘の単離
HAB研究機構より倫理委員会の承認を得て供給された頭皮組織から、Tobinらの方法に準じて、毛包を単離し、次いで結合織性毛根鞘組織を実体顕微鏡下で単離した。
2. ヒト結合織性毛根鞘細胞の培養
単離した結合織性毛根鞘を0.35%のコラゲナーゼ（和光純薬）に入れ、37℃で40分間処理して細胞を解離させた。次いで、MHDFⅢ培地中(基礎培地+10%FBS, 抗生物質, 最終濃度 human EGF 10ng/ml, basic FGF 2ng/ml)、35mm コラーゲンコートディッシュ（AGC テクノグラス）上において、1週間の静置培養を行った。また、トリプシン処理の後、同培地を用いて継代培養を行った。
3. ヒト結合織性毛根鞘細胞の解析
HAB研究機構より供給された

頭皮組織の一部を、ホルマリン固定してパラフィンブロックを作製し、薄切後、組織染色に供した。ヒト結合織性毛根鞘細胞の染色は、 α 平滑筋型アクチン抗体 (Sigma 社) とニチレイ社のキットを用いて行った。

C. 研究結果

1. ヒト結合織性毛根鞘細胞の組織解析 ヒト頭皮組織を α 平滑筋型アクチン抗体で染色を行ったところ、結合織性毛根鞘において α 平滑筋型アクチンに陽性の細胞が多数確認された (図 1 A : 茶色)。一方、毛乳頭(DP)には中心部 (図 1 B : 矢印)を除き、 α 平滑筋型アクチン陽性の細胞は認められなかった。

2. ヒト結合織性毛根鞘細胞の培養 単離した結合織性毛根鞘より 0.35% のコラゲナーゼで細胞を解離させ、MHDF III 培地で約 1 週間の静置培養を行ったところ、線維芽細胞様の結合織性毛根細胞が効率良く得られることが分かった (図 2)。

D. 考察

細胞移植によるヒト毛包の再生には、毛包誘導能を維持したヒト毛乳頭細胞の数を確保することが必須条件であると考えられることから、活性を維持したヒト毛乳頭細胞の培養技術の開発に取り組み、MHDF III 培地が有効であることを報告してきた。一方で、マウスを用いた研究から、結合織性毛根鞘細胞が毛乳頭細胞の供給源である可能性が指摘されるようになってきている。今回、 α 平滑筋型アクチン抗体を用いた組織染色により、ヒト毛包での結合織性毛根鞘細胞の分布を

明らかにし、またヒト結合織性毛根鞘細胞の培養法を確立することが出来た。今後、ヒト培養毛乳頭細胞にヒト結合織性毛根鞘細胞を加えることで、毛包誘導の効率が上昇するか検討する必要があると考えられる。

E. 結論 ヒト結合織性毛根鞘細胞の培養法を確立できたことは、結合織性毛根鞘細胞が毛乳頭細胞の供給源である点から考えると、毛髪再生研究を進める上で、非常に意義深いと考えられ、効率的な毛髪再生に寄与する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 20 年度)

講演・シンポジスト

Kishimoto J: Attempt of human hair follicle regeneration in vivo and in vitro. Hair Research Symposium, International Investigative Dermatology 2008, May 13, Kyoto, Japan

学会発表

1. Kishimoto J, Shirakata Y, Fuziwara S, Soma T, Hashimoto K: Hair-inducing ability of cultured human dermal papilla cells. International Investigative Dermatology 2008, May 14, Kyoto, Japan
2. Soma T, Fuziwara S, Ishimatsu-Tsuji Y, Yoshida Y, Kishimoto J: Generation and characterization of three-dimensional human hair follicle model using hanging drop

culture system. International
Investigative Dermatology 2008,
May 14, Kyoto, Japan

- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：なし

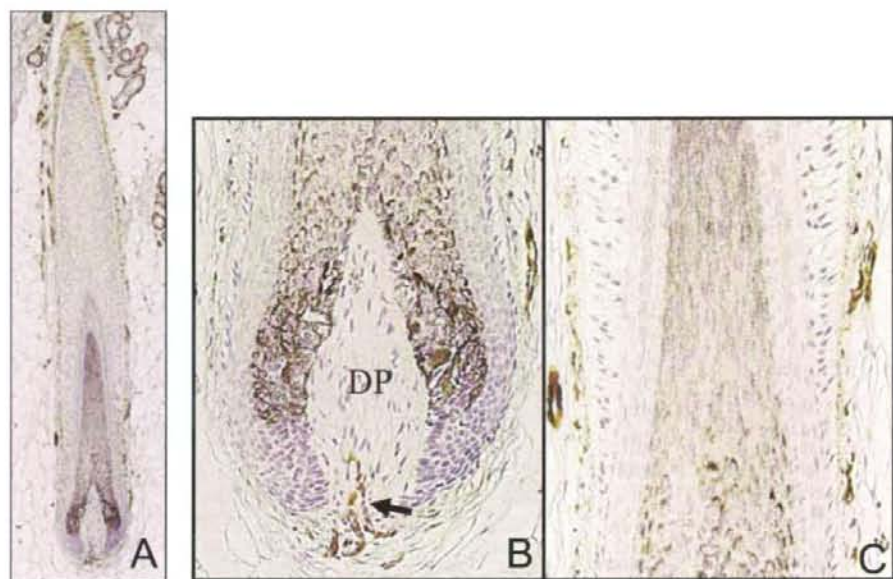


図1: ヒト毛包組織の α 平滑筋型アクチンの免疫染色

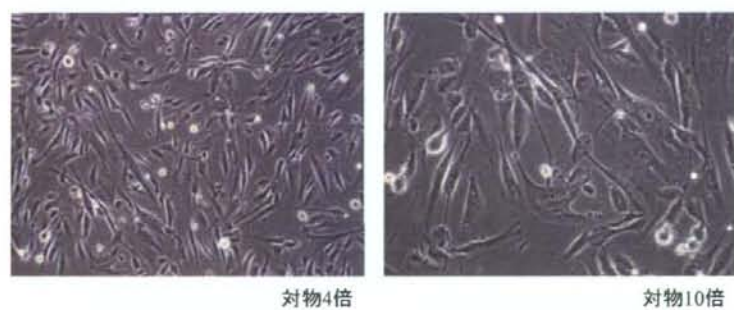


図2: 単離・培養したヒト結合織性毛根鞘細胞

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

三次元培養皮膚真皮成分の改善に関する研究

研究分担者 白方裕司

愛媛大学大学院医学系研究科 附属再生医療研究センター 講師

研究要旨 三次元培養皮膚作製には角化細胞と線維芽細胞の培養が必要である。形態的に優れた三次元培養皮膚の作製には真皮成分がしっかり形成されていることが必要である。従来の三次元培養皮膚では重層化開始後真皮成分の退縮が目立ち、2週後には真皮の菲薄化が認められた。そこで真皮成分の退縮を防止することを目的とし、培養法の改善を行ったところ、bFGF添加により真皮成分が厚い状態で長期間維持できることが明らかとなった。

A. 研究目的

難治性・再発性皮膚潰瘍に対する培養皮膚の有効性が示されてきている。培養皮膚移植は再生医療の戦陣をきって1980年代に開発されたが、未だ正常皮膚のレベルには達していない。それは培養皮膚の質の向上が追いついていないせいでもある。Basic fibroblast growth factor (bFGF) はFGF2とも呼ばれ、22種類からなるファミリーの一つであり、細胞の増殖、遊走、分化、生存に影響を及ぼすことが知られている。FGFはその名のごとく線維芽細胞に対して増殖的に作用し、コラーゲンの産生等を促すことが明かとなっている。遺伝子組み換えヒト型bFGFは臨床応用されている薬剤であり、培養皮膚の構成細胞である線維芽細胞に対しても影響を与える物質であることから、三次元培養皮膚作製時に併用することで品質の改善が期待される。今回我々は三次元培養皮膚作製時にbFGFを添加し、培養皮膚の真皮成分に関して組織学的検討を

行った。

B. 研究方法

手術時の余剰正常ヒト皮膚から線維芽細胞をoutgrowth法にて分離培養した。デイスパーゼで剥離した真皮を1-2mm角に細切り、I型コラーゲンコートシャーレに密着させた後、10% fetal calf serum (FCS) 添加ダルベッコ変法MEM (DMEM) 培地を真皮片が少し浸る程度添加した。真皮片の周囲から線維芽細胞が増殖・遊走し、コロニーが大きくなった時点で継代操作を行い、5代継代した細胞を使用した。三次元培養皮膚の作製：I型コラーゲン溶液6容量に対して0.1N NaOH：1容量、8倍濃度DMEM：1容量、20%FCS/DMEM：10容量の割合で中和コラーゲン液を4°Cにて作製し、インサートに1mlずつ添加し、室温で10分間静置しゲル化させた。線維芽細胞を 5×10^5 細胞/ml、10%FCS/DMEMの濃度に調整し、この細胞懸濁液：2容量に対して中和コ

ラーゲン液：8容量の割合で混和し、細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整し、各インサートに3.5mlずつ添加しインキュベーター内でゲル化させた。その後10%FCS/DMEMをゲルが浸る程度加え5日間静置培養した。5日後に収縮陥凹したゲル上に角化細胞を播種し、表皮細胞増殖用培地を緩やかに添加しさらに2日間液相下で培養を続けた。2日後空気に暴露することにより(気相下培養)重層化させた。bFGFは30 ng/mlの濃度で培地に添加し、液相下培養の時点から使用を開始し、2日に1回培養液を交換した。

C. 研究結果

組織学的所見：ヘマトキシリンエオジン染色の結果では、重層化開始後2週まではbFGF添加群と非添加群では真皮相当部の厚さは優位な差は認められなかったが、重層化4週後では真皮の厚さは添加群において明らかに厚い状態を保っていた。非添加群と比較すると約1.7倍真皮が厚い状態であった。

D. 考察

表皮角化細胞の培養法が1975年にRheinwaldとGreenにより確立されて以降、は、角化細胞培養は急速に展開し、1980年代には表皮角化細胞の無血清培養法が開発され、再生医療の先陣を切るかたちで1981年にはO'Connorらにより初の培養表皮シート移植の臨床応用が実施された。本邦においては1985年頃より培養表皮シート移植が行われ、主に新鮮熱傷、熱傷瘢痕、刺青、母斑や、下腿潰瘍、表皮水疱症などの難治性再発性潰瘍の治療に応用されている。一方、培養皮膚の改善も精力的に行われ、1983年

には、Bellによりliving skin equivalent、いわゆる三次元培養皮膚の作製法が開発された。

FGFは1974年に牛下垂体より得られた線維芽細胞の増殖を促進する蛋白として発見され、線維芽細胞増殖因子と命名された。その後の研究により現在では22種類のファミリーメンバーが同定されている。bFGFはFGF2と番号づけられており、現在では遺伝子組み換えヒト型bFGFとして創傷治癒促進薬として販売されている。

今回我々は三次元培養皮膚の質の向上を目的としてbFGFの効果を検討した。すでに臨床応用されており、単独でも創傷治癒促進効果があることから、bFGFが三次元培養皮膚に何らかの影響を与えるのではないかと考えた。従来知見では、三次元培養皮膚は空気暴露後の培養期間が長くなれば真皮成分の菲薄化がみられる現象があった。今回の検討により、bFGFを培地に添加することで真皮成分の菲薄化が抑制され、4週間にわたり維持されていた。長期間にわたり真皮成分が厚い状態で維持出来ることは、今後の再生医療を推進するうえで有用であると思われる。

E. 結論

三次元培養皮膚作製時にbFGFを培養液に添加することにより、真皮成分の退縮が抑制され、長期間真皮が厚い状態で保持された。このことは実際の臨床応用において三次元皮膚の使用期間が延びることになり、移植時期の選択範囲が広がるという利点が得られると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 20 年度)

1. 論文発表

Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 159:981-4, 2008

Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. *J Cell Physiol.* 214:465-73, 2008

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci* 50:53-60, 2008

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K: The NF-kB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 20:901-9, 2008

白方裕司:【特集/水疱症の診断と治療】—先天性表皮水疱症— 接合部型表皮水疱症・栄養障害型表皮水疱症の診断と治療 *MB Derma*; 137: 19-26, 2008.

白方裕司:【ステイブンス・ジョンソン症候群と向き合う】行政・患者サイドから見た SJS 厚生労働科学重症薬疹研究班の研究について *Visual Dermatology*; 7: 791, 2008.

2. 学会発表

Tokumaru S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Yang L, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for lymphatic endothelial cell migration induced by VEGF-A. *International Investigative Dermatology*, May 14-17, Kyoto, 2008.

Yang L, Shirakata Y, Hirakawa S, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Myofibroblasts differentiation is modulated by epithelialmesenchymal in human living skin equivalents. *International Investigative Dermatology*, May 14-17, Kyoto, 2008.

Tohyama M, Hanakawa Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: Augmentation of IL-22 receptor expression and IL-20 subfamily production plays a critical role in psoriasis. *International Investigative Dermatology*, May 14-17, Kyoto, 2008.

Sayama K, Yamamoto M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Akira S, Hashimoto K:

Conditional ablation of Ubc 13, a mediator of innate immunity, in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased proliferation, and apoptosis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Shirakata Y, Yang L, Hanakawa Y, Tokumaru S, Hirakawa S, Tohyama M, Dai X, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K: Keratinocyte-specific SOCS3 knockout mice show clinical phenotypes similar to human psoriasis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Kishimoto J, Shirakata Y, Fuziwara S, Soma T, Hashimoto K: Hair-inducing ability of cultured human dermal papilla cells. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K: Successful treatment of giant congenital melanocytic nevus with new skin equivalent using amnion membrane. The 17th congress of the

European Academy of Dermatology Venereology, Sep 17-20, Paris, 2008.

Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Dai X, Hirakawa S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Human amnion improves the development of basement membrane and epidermogenesis in a living skin equivalent. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K: The NFkB, p38, and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特許取得：なし
実用新案登録：なし
その他：なし

[IV]

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者：橋本 公二

Zhu P, Hata R, Cao F, Gu F, Hanakawa Y, Hashimoto K, Sakanaka M: Ramified microglial cells promote astroglialogenesis and maintenance of neural stem cells through activation of Stat3 function. *FASEB J.* 22:3866-77, 2008

Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 159:981-4, 2008

Nanba D, Inoue H, Shigemitsu Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. *J Cell Physiol.* 214:465-73, 2008

Isokame M, Hieda M, Hirakawa S, Shudou M, Nakashiro K, Hashimoto K, Hamakawa H, Higashiyama S: Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci* 121:3608-18, 2008

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci* 50:53-60, 2008

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K: The NF-kB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 20:901-9, 2008

Watanabe H, Daibata M, Tohyama M, Batchelor J, Hashimoto K, Iijima M: Chromosomal integration of human herpesvirus 6 DNA in anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 158: 640-642, 2008.

石川真奈美, 岡崎秀規, 藤山幹子, 村上信司, 橋本公二, 野間陽子: 【高齢者の皮膚病 炎症性】臨床例 アロプリノールが原因薬剤として疑われた TEN 型薬疹 皮膚病診療; 30: 279-282, 2008.

橋本公二, 藤山幹子: 【第 1 巻 湿疹・皮膚炎／蕁麻疹／痒疹／薬疹】薬疹 DIHS (drug-induced hypersensitivity syndrome) 皮膚科診療カラーアトラス大系; 1: 152-153, 2008.