

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

栄養障害型表皮水疱症モデルマウスへのヒトⅦ型コラーゲン導入による
トランスジェニックレスキュー

分担研究者 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 重症型である劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）はⅦ型コラーゲンの遺伝子変異により発症する。RDEB患者の遺伝子治療を考えた場合、遺伝子導入される標的細胞として、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の2つが挙げられる。今回、マウス表皮角化細胞および真皮線維芽細胞でヒトⅦ型コラーゲン遺伝子をそれぞれ強制発現する2系統のトランスジェニックマウスを作製し、RDEBモデルマウスと交配することによるトランスジェニックレスキューを試みた。

共同研究者

伊藤 圭 北海道大学医学部皮膚科
西江 渉 北海道大学医学部皮膚科
澤村 大輔 弘前大学医学部皮膚科教授

A. 研究目的

表皮水疱症(epidermolysis bullosa;EB)は、表皮-真皮境界部を構成する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により発症し、軽微な外力によって皮膚に水疱を形成する遺伝性皮膚疾患である。EBは水疱形成部位により大きく3型に分類されるが、基底膜直下の真皮最上部に水疱を形成する栄養障害型表皮水疱症(dystrophic EB;DEB)は、基底膜部に存在する係留線維の構成蛋白であるⅦ型コラーゲンをコードする遺伝子の変異により発症する^(1,2)。中でもⅦ型コラーゲンが完全に欠損するHallopeau-Siemens型(HS-RDEB)は、全身性的水疱形成、糜爛・潰瘍に加えて、脱毛や口腔・食道の粘膜障害が高頻度に出現し、生涯にわたって反復する水疱形成により、手指の棍棒状癒着や食道狭窄などの多臓器病変、著明な成長障害を示す(図1)。また、繰り返す水疱により、難治性潰瘍部や癒痕部に皮膚悪性腫瘍(主に有棘細胞癌)を合併し、若年期に致死的な経過をとるものがある⁽³⁾。

DEB発症の原因タンパクであるⅦ型コ

ラーゲンは2944個のアミノ酸からなり、約290kDaの前駆体蛋白質である $\alpha 1(\text{VII})$ 鎖が重合した三量体 $[\alpha 1(\text{VII})]_3$ で、分子中央のGly-X-Y繰り返し構造からなるコラーゲン領域により三重らせん構造を形成し、その両端のN末端側にNC-1ドメイン、C末端側にNC-2ドメインという非コラーゲン領域を有している^(4,5)。

このようにRDEBの原因となる遺伝子や蛋白分子構造については明らかになってきたが、本症に対する治療は未だ対症療法のみであるのが現状である。遺伝性疾患に対する根本的治療である遺伝子治療も未だ実用には至っていない。一方、培養表皮・培養真皮は、比較的容易に作成が可能で、既に患者からの表皮細胞を培養して潰瘍面に移植する自家培養表皮移植も試みられ、ある程度の効果が報告されている⁽⁶⁻⁸⁾。従って、正常な遺伝子を導入した培養表皮あるいは培養真皮を移植する治療が、今後DEB患者に対する治療法として期待されるが、Ⅶ型コラーゲン遺伝子を表皮細胞あるいは線維芽細胞のどちらに導入するのが適切かについて、in vivoでの検討は十分にされていない。

本研究の目的は、表皮角化細胞および真皮線維芽細胞に正常ヒトⅦ型コラーゲンを強制

発現するトランスジェニックマウス (Tgm) を作製し、それぞれのTgmとRDEBモデルマウス(米国Jefferson医科大学のJouni Uitto教授から供与⁽⁹⁾)と交配することで、実際に発現したⅦ型コラーゲンタンパクによってモデルマウスがレスキュー可能かについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 発現ベクターとトランスジェニックマウス (Tgm) の作製

ヒトⅦ型コラーゲンが表皮基底細胞で発現するプロモーターとしてヒトケラチン14(K14)を、真皮で発現するプロモーターとしてマウスⅠ型コラーゲン (COL1A2) を用い、下流にヒトⅦ型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) cDNA全長を発現するベクターを作成した(図2)。それぞれのベクターを、マウス受精卵雄性前核へ顕微注入し、胚を偽妊娠雌マウスの卵管内に移植することでTgmを作製した。

2. トランスジェニックレスキュー

ヘテロのRDEBモデルマウスと、K14およびCOL1A2プロモーターをそれぞれ交配し、マウスCol7a1ヘテロでTgを有するマウス (COL7^{m+/+,h+}) を得た。更にCOL7^{m+/+,h+}同士を交配し、ヒトCOL7のみ発現するレスキューマウス (COL7^{m+/+,h+}) を作成した (図3)。

3. 免疫組織化学染色と電子顕微鏡の観察

ヒトⅦ型コラーゲンの染色には、ヒト特異的に反応するLH7.2抗体 (Chemicon, Temecula, CA) を使用した。超微細構造の観察には、標準的な方法にて透過電子顕微鏡を用い、係留線維の有無や量を確認した。

尚、本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号) に則り、動物実験に関しては北海道大学動物実験の実施に関する基本指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. トランスジェニックマウス (Tgm)

K14プロモーターTgm(K14 Tgm)では、インジェクション数307個中、LH7.2抗体を用いた免疫組織染色で蛍光発色を確認できたのは5匹であった。発現を認めた5匹のうち表皮ケラチノサイト細胞質、および線状に基底膜部が強陽性となったTgmは2匹を (図4)、その後のトランスジェニックレスキューの実験に使用した。

一方、COL1A2プロモーターTgm (COL1 Tgm)では、マイクロインジェクション数553個中、LH7.2抗体を用いた免疫組織染色で蛍光発色を確認できたのは11匹であった。発現を認めた11匹のうち真皮全層、および線状に基底膜部が強陽性となったTgmは8匹を (図4)、その後のトランスジェニックレスキューの実験に使用した。

2. トランスジェニックレスキューマウス

マウスⅦ型コラーゲンを全く発現しないRDEBモデルマウスは、外的刺激により容易に表皮剥離を生じ生後2週以内に全てのマウスが死亡する。一方、K14 TgmおよびCOL1 Tgmと交配することで作成したレスキューマウスでは、いずれも水疱形成や成長障害といった異常は全く認めず、正常な表現型を呈していた。更に、LH7.2抗体による蛍光抗体法では、マウス皮膚の表皮-真皮境界部にヒトⅦ型コラーゲンの線状沈着を認めた(図5)。

Ⅶ型コラーゲンは、両端のNC-1ドメインを基板 (lamina densa) 部に起始し、基板より約360nm真皮内に半弧状に存在する(3)。透過電子顕微鏡による解析において、Wild typeマウス (C57BL/6Cr) と同様に、K14 Tgm、COL1 Tgmによるそれぞれのトランスジェニックレスキューマウスの皮膚で、表皮-真皮境界部の基板から真皮側に半弧状に存在する係留線維の形成を形態学的に確認し

た(図5)。なお、mouse *Col7a1*ノックアウトマウスでは、係留線維の形成は認めなかった(図5)。

D. 考察

本研究により、①K14プロモーターにより表皮基底細胞で、②COL1プロモーターにより真皮線維芽細胞でそれぞれヒトⅦ型コラーゲンタンパクが発現した場合、いずれにおいてもRDEBマウスの異常な表現型は消失し、失われた機能を代償することが可能であることが示された。本研究は、実際の疾患動物モデルを用いた実験であるため、DEB患者の治療を考える上で非常に重要である。つまり、適切な方法によってヒト*COL7A1* cDNA 遺伝子を表皮基底細胞のみならず真皮線維芽細胞へ導入すれば治療する事が可能であることを示している。さらに本研究結果は、将来DEB患者の遺伝子治療、あるいは自己の培養細胞へ遺伝子導入などを行う際、その標的とする細胞の選択に非常に役立つと思われる。

E. 結論

本研究では、DEBの原因遺伝子であるヒトⅦ型コラーゲン遺伝子を疾患モデルマウスであるRDEBマウスの表皮細胞および線維芽細胞へトランスジェニック導入した。その結果、いずれの場合でも、RDEBモデルマウスの異常な表現型を消失するのに十分な機能を有するヒトⅦ型コラーゲン係留線維の発現を確認し、今後、適切な方法によって表皮基底細胞あるいは真皮線維芽細胞へヒト*COL7A1* cDNA 遺伝子を導入出来れば、EBが治療可能である可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表(平成20年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Sakai K, Akiyama M, Yanagi T,

McMillan J, Suzuki T, Tsukamoto K, Sugiyama H, Hatano Y, Hayashitani M, Takamori K, Nakashima K, Shimizu H:

ABCA12 is a major causative gene for non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma.

J Invest Dermatol, in press.

2. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Palmer C, Smith F, McLean W, Shimizu H:

Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis.

J Invest Dermatol, in press.

3. Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean W, Shimizu H:

Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema.

J Invest Dermatol, in press.

4. Kanda M, Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nagasaki A, Shimizu T, Shimizu H:

Morphological and genetic analysis of steatocystoma multiplex in an Asian family with pachyonychia congenita type 2 harboring a KRT17 missense mutation.

Br J Dermatol, in press.

5. Inokuma D, Kodama K, Natsuga K, Kasai M, Abe M, Nishie W, Abe R, Hashimoto T, Shimizu H:

Autoantibodies against type XVII collagen C-terminal domain in a patient

- with bullous pemphigoid associated with psoriasis vulgaris.
Br J Dermatol, in press.
- Hsu C, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, Sandilands A, Chao S, Lee J, Sheu H, McLean W, Shimizu H:
Analysis of Taiwanese ichthyosis vulgaris families further demonstrates differences in FLG mutations between European and Asian populations.
Br J Dermatol, in press.
 - Akiyama M, Sakai K, Hayasaka K, Tabata N, Yamada M, Ujiie H, Shibaki A, Shimizu H:
Conradi-Hünemann-Happle syndrome with abnormal lamellar granule contents.
Br J Dermatol, in press.
 - Asaka T, Akiyama M, Domon T, Nishie W, Natsuga K, Fujita Y, Abe R, Kitagawa Y, Shimizu H:
Type XVII collagen is a key player in tooth enamel formation.
Am J Pathol 174:91-100, 2009.
 - Yanagi T, Akiyama M, Sakai K, Nagasaki A, Ozawa N, Kosaki R, Sago H, Shimizu H:
DNA-based prenatal exclusion of harlequin ichthyosis.
J Am Acad Dermatol 58:653-656, 2008.
 - Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Sakai K, Nishie W, Tanaka S, Shimizu H:
Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects.
Hum Mol Genet 17:3075-3083, 2008.
 - Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Yanagi T, McMillan JR, Higashi A, Shimizu H:
Congenital ichthyosiform erythroderma mimicking ichthyosis bullosa of Siemens.
Br J Dermatol 158: 191-194, 2008.
 - Tsubota A, Akiyama M, Kanitakis J, Sakai K, Nomura T, Claudy A, Shimizu H:
Mild recessive bullous congenital ichthyosiform erythroderma due to a previously unidentified homozygous keratin 10 nonsense mutation.
J Invest Dermatol 128:1648-1652, 2008.
 - Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H:
Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type.
J Immunol 180: 2581-2587, 2008.
 - Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Ota M, Hata H, Evans AT, Palmer CN, Shimizu H, McLean WH:
Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan.
J Invest Dermatol 128:1436-1441, 2008.
 - Murata J, Abe R, Shimizu H:
Increased soluble Fas ligand levels in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis

- preceding skin detachment.
J Allergy Clin Immunol 122:992-1000, 2008.
16. Moriuchi R, Akiyama M, Onozuka T, Shimizu H:
 A novel ATP2A2 missense mutation p.Asp254Gly in Darier disease restricted to the extremities.
J Am Acad Dermatol 58:S116-118, 2008.
17. Kivisaari AK, Kallajoki M, Mirtti T, McGrath JA, Bauer JW, Weber F, Onigova R, Sawamura D, Sato-Matsumura KC, Shimizu H, Csikos M, Sinemus K, Beckert W, Kahari VM: Transformation-specific matrix metalloproteinases(MMP)-7 and MMP-13 are expressed by tumour cells in epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinomas.
Br J Dermatol 158: 778-785, 2008.
18. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zambruno G: The classification of inherited epidermolysis bullosa(EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB.
J Am Acad Dermatol 58:931-950, 2008.
19. Arita K, South AP, Hans-Filho G, Sakuma TH, Lai-Cheong J, Clements S, Odashiro M, Odashiro DN, Hans-Neto G, Hans NR, Holder MV, Bhogal BS, Hartshorne ST, Akiyama M, Shimizu H, McGrath JA:
 Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis.
Am J Hum Genet 82: 73-80, 2008.
20. Akiyama M, Sakai K, Takayama C, Yanagi T, Yamanaka Y, McMillan JR, Shimizu H:
 CGI-58 is an alpha/beta-hydrolase within lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes.
Am J Pathol 173: 1349-1360, 2008.
21. Akiyama M, Sakai K, Hatamochi A, Yamazaki S, McMillan JR, Shimizu H: Novel compound heterozygous nonsense and missense ABCA12 mutations lead to nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma.
Br J Dermatol 158:864-867, 2008.
2. 学会発表
1. Shimizu H:
 (Lecture) Blistering diseases: Pathomechanisms and new therapeutic approaches.
 Hôpital St André Lecture. Bordeaux, France, 2008/07/03
2. Shimizu H:
 (Inviter Lecture) Humanization of autoantigen.
 The 14th Chinese Annual Congress of Dermatology. Shanghai, China, 2008/06/13
3. Shimizu H:
 (Invited Lecture) What's new in ichthyosis.
 Anhui Medical University Lecture. Shanghai, China, 2008/06/11

4. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Nishie W, McMillan J, Nakamura H, Shimizu T, Sawamura D, Shimizu H:

Bone marrow transplantation restores deficient epidermal basement membrane protein and improves the clinical phenotype in epidermolysis bullosa model mice.

The 6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2008. Philadelphia, USA 2008/06/11

5. Shimizu H:

(C.E.R.I.E.S. Symposium and Award) Blisters and skin aging: The role of epidermal structure molecules. International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, 2008/05/14

6. Asaka T, Akiyama M, Domonn T, Nishie W, Fujita Y, Tanimura S, Kitagawa Y, Shimizu H:

COL17 is a key player of epithelial-mesenchymal interaction in tooth formation.

International Investigative Dermatology 2008. Kyoto, 2008/05/14

7. Shimizu H:

(Inviter Lecture) Humanization of autoantigen: novel animal model for epidermolysis bullosa and bullous pemphigoid.

The 18th Korean Society for Investigative Dermatology. Seoul, Korea, 2008/03/22

8. Shimizu H:

(Invited Lecture) Comparison between western dermatology and asian dermatology.

Seoul National University Hospital

Lecture. Seoul, Korea, 2008/03/19

- H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

「XVII型コラーゲンに関する脱毛抑制剤、毛髪の色脱色抑制剤」(特願2008-132741)
発明者: 西村栄美、清水 宏、谷村心太郎、田所優子、澤村大輔、西江 涉

I. 引用論文

1. Christiano AM, Ryyanen M, Uitto J. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly→Ser substitution in the triple-helical domain of type VII collagen. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:549-3553.
2. Christiano AM, Greenspan DS, Hoffman GG, Zhang X, Tamai Y, Lin AN, Dietz HC, Hovnanian A, Uitto J. A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Nat Genet 1993;4:62-66.
3. Shimizu H, McGrath J, Christiano AM, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. J Invest Dermatol 1996;106:119-124.
4. Christiano AM, Greenspan DS, Lee S, Uitto J. Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1 (VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. J Biol Chem 1994;269:20256-20262.
5. Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L, Nishikawa T. Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. Lab Invest 1997;76:753-763.
6. Eisenberg M, Llewellyn DM, Moran

- K, Kerr A. Successful engraftment of cultured human epidermal allograft in a child with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Med J Aust* 1987;147:520-521.
7. McGrath JA, Schofield OMV, Ishida-Yamamoto A, O'Grady A, Mayou BJ, Navsaria H, Leigh IM, Eady RA. Cultured keratinocyte allografts and wound healing in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:407-419.
8. Eisenberg M, Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *Br J Plast Surg* 1998;51:608-613.
9. Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF, Uitto J. Targeted inactivation of the type VII collagen gene (*Col7a1*) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Cell Sci* 1999;112:3641-3648.



図1 Hallopeau-Siemens型RDEBの臨床像
全身の著明な水疱、潰瘍形成を認める。

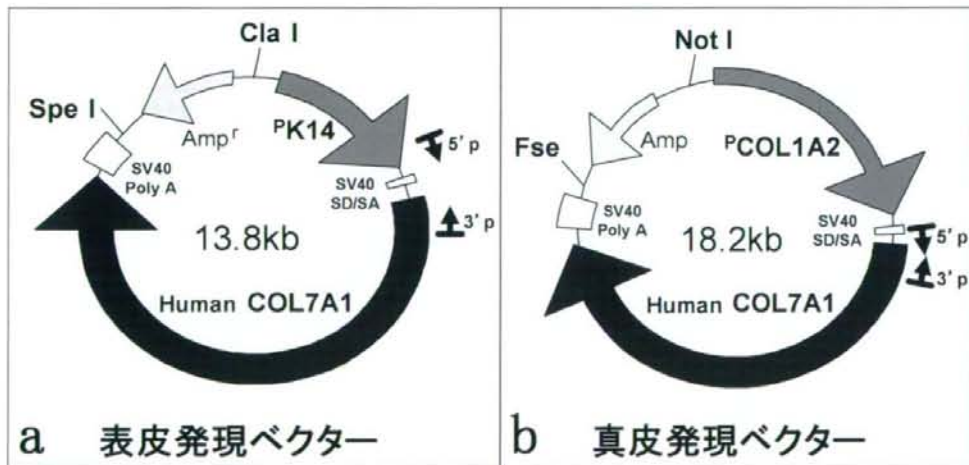


図2 Tgm作成用ベクター

a) 表皮ケラチノサイトでヒトⅦ型コラーゲンが発現するベクターの構造模式図。

^oK14: ヒトケラチン14プロモーター, Human COL7A1: 導入目的遺伝子 (ヒトⅦ型コラーゲン cDNA)

b) 真皮の線維芽細胞でヒトⅦ型コラーゲンが発現するベクターの構造模式図。

^oCOL1A2: I型コラーゲンプロモーター, Human COL7A1: 導入目的遺伝子 (ヒトⅦ型コラーゲン cDNA)

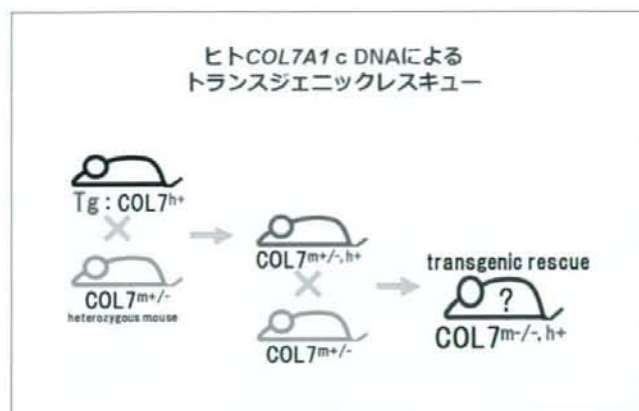


図3 トランスジェニックレスキューの方法

ヘテロのRDEBモデルマウスと、K14およびCOL1A2プロモーターをそれぞれ交配し、マウスCOL7a1ヘテロでTgを有するマウス (COL7^{m+/-}, h⁺) を得た。更にCOL7^{m+/-}, h⁺ 同士を交配し、ヒトCOL7のみ発現するレスキューマウス (COL7^{m+/-}, h⁺) を作成した

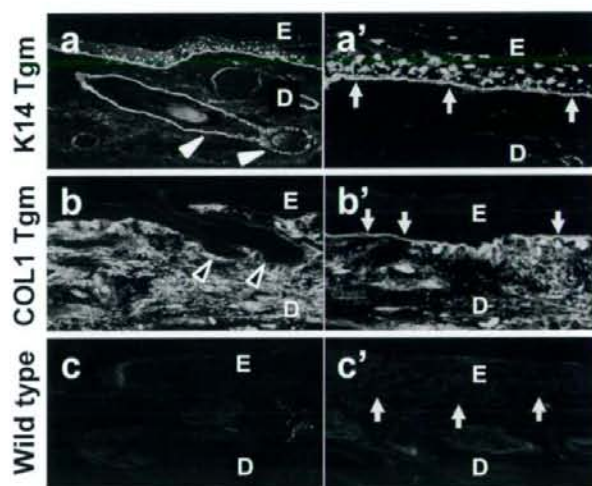


図4 Tgm皮膚におけるヒトCOL7タンパクの発現

- a) K14 Tgmの免疫蛍光抗体法所見;弱拡大像. 表皮内にドット状, 基底膜部に線状, および毛包上皮 (△) にもLH7.2抗体の沈着を認めた. a') 同;強拡大像. 表皮ケラチノサイト細胞質の一部および基底膜部に線状に沈着を認めた.
- b) COL1 Tgmの免疫蛍光抗体法所見;弱拡大像. 真皮全層にLH7.2抗体の沈着を認めた. 毛包上皮内 (▲) には反応を認めない. b') 同;強拡大像. 真皮内に広範囲に顆粒状の沈着および基底膜部に線状に沈着を認めた.
- c) Wild typeマウスの免疫蛍光抗体法所見;弱拡大像. c') 同;強拡大像. 表皮, 真皮および基底膜部に特異的反応を認めない.
- ↑; 基底膜部, E; 表皮, D; 真皮.

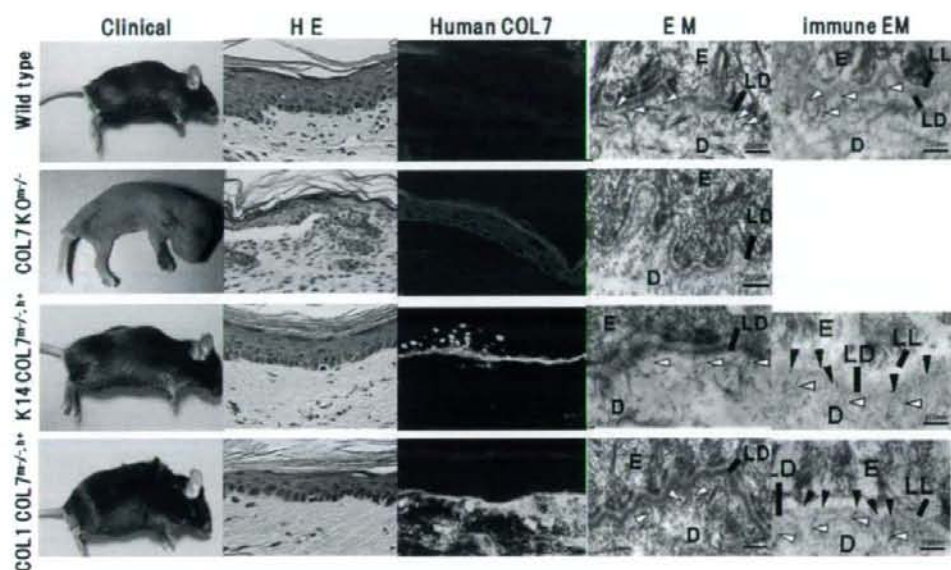


図5

マウスVII型コラーゲンを全く発現しないRDEBモデルマウス (COL7 KO) は、外的刺激により容易に表皮剥離 (表皮下水疱) を生じる。一方、K14 TgmおよびCOL1 Tgmと交配することで作成したレスキューマウスでは、いずれも水疱形成や成長障害といった異常は全く認めず、正常な表現型を呈している。更に、LH7.2抗体による蛍光抗体法では、マウス皮膚の表皮 - 真皮境界部にヒトVII型コラーゲンの線状沈着を認める。透過電子顕微鏡による解析において、Wild typeマウスと同様に、K14 Tgm、COL1 Tgmによるトランスジェニックレスキューマウスの皮膚では、明らかな係留線維の形成を認めた。

△; 係留線維, E; 表皮, D; 真皮, LD; 基底板 (lamina densa)。

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

ゲルなし羊膜三次元培養皮膚を用いた表皮水疱症の治療

研究分担者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学 教授

研究要旨 表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で培養皮膚の改良・開発を行い、平成18年度までに羊膜付き三次元培養皮膚を開発した。この新たな培養皮膚は基底膜を十分保持し、形態的には正常皮膚に最も近いもので、栄養障害型表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着への臨床応用にて非常に有用であることを示した。羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンを含有しているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンを含有しない簡易作製法を開発した。ゲルなし羊膜三次元培養皮膚はゲル付き羊膜三次元皮膚と比べて遜色ないことが明らかとなった。このゲルなし羊膜三次元培養皮膚の表皮水疱症に対する有用性について検討したところ、RDEB患者の皮膚欠損創に対しても有用であることが明らかとなった。

共同研究者
白方 裕司 愛媛大学大学院医学系研究科
感覚皮膚医学

をゲルの上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、7日間気相下にて培養したものを移植に用いた。

A. 研究目的

我々はこれまでに表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で、羊膜三次元培養皮膚を開発し、RDEBの手指棍棒状癒着・手掌の癒痕拘縮形成術に対し有効であることを明らかにしてきた。さらに羊膜付き三次元皮膚作製の簡易版として、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚を開発し、巨大色素性母斑切除部に移植し臨床的有用性を明らかにしてきた。今回ゲルなし羊膜三次元皮膚のRDEBに対する有効性について検討した。

B. 研究方法

患者生検皮膚からoutgrowth法を用いて線維芽細胞を培養し、継代4代目の細胞を使用した。角化細胞は無血清培養法にて培養し、3回継代した細胞を使用した。カルチャーインサートに直接線維芽細胞を播種し、翌日無細胞化処理した羊膜を載せ、4日間静置培養した。培養開始後5日目に患者由来角化細胞

C. 研究結果

栄養障害型表皮水疱症女性患者で、左手掌は癒痕拘縮のため棍棒状となっていた。腕神経叢ブロック下で左手掌の癒痕拘縮を解除し、欠損部に人工真皮を移植した。術後2週後には肉芽の形成が良好となり、創面にゲルなし羊膜三次元培養皮膚を移植し、タイオーバー固定した。移植片はほぼ生着し、移植後4週でほぼ上皮化が認められた(図1)。左手掌とはほぼ同様の手技、日程にて右手掌の癒痕拘縮に対してもゲルなし羊膜三次元移植を行った。約4週でほぼ上皮化し、手指の機能は大幅に改善された(図2)。

D. 考察

表皮水疱症の再生医療として、我々はこれまでに培養皮膚移植の有用性を示してきた。昨年度までの研究成果で羊膜を併用した三次元培養皮膚を開発し、表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着について癒痕拘縮形成術を施行

し、癒着を離開した部位に羊膜付き三次元培養皮膚を移植し良好な結果を得た。羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンゲルを用いているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンゲルを用いない簡易作製法を開発し、ゲルなし羊膜三次元皮膚の有用性について巨大色素性母斑患者にて確認した。今回ゲルなし羊膜三次元皮膚が栄養障害型表皮水疱症に対しても有効であるかについて、手指の棍棒状癒着離開部に移植し検討したところ、ゲル付き羊膜三次元皮膚と同様に生着し、手指の機能の改善が認められた。本研究においてゲルなし羊膜三次元培養皮膚の有用性が明らかとなった。

E. 結論

簡易作製法であるゲルなし羊膜付き三次元培養皮膚を用いて劣性栄養障害型表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着解離後の皮膚欠損部を治療し良好な結果を得た。ゲルなし羊膜三次元皮膚はRDEB患者の皮膚欠損創に対しても有用であると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhu P, Hata R, Cao F, Gu F, Hanakawa Y, Hashimoto K, Sakanaka M: Ramified microglial cells promote astrogliogenesis 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 inter-

mediary 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: PPAR γ is an important transcription factor in α ,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- κ B, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 20:901-9, 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

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.

2. 学会発表

Hashimoto K, Amagai M, Ikeda S: A double-blind clinical trial of IVIG for pemphigus in Japan. Post IID 2008 Satellite International Meeting on Autoimmune Bullous Diseases, May 17-19, Ootsu.

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 epithelial-mesenchymal in human living skin equivalents. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Hirakawa S, Watanabe S, Tanemura A, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. 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 Ubc13, 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.

Hirakawa S, Matsuo K, Hashimoto K: Lymph node lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor and lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 28-30, Nagoya, 2008. Selected for international session.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. UICC World Cancer Congress, Geneva, Switzerland August 27-31, 2008.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. 5th International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Hirakawa S, Nagamatsu S, Tanemura A, Matsuo K, Katayama I, Detmar M, Hashimoto K: Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary Paget's disease undergoing epithelial-mesenchymal transition. Gordon Research Conference, Molecular Mechanisms in Lymphatic Function and Disease. Ventura, March 2-7, U.S.A., 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.

Hashimoto K, Tohyama M: Drug-induced hypersensitivity syndrome. International symposium on solvent-induced, severe hypersensitivity reactions and human herpesvirus 6 reactivation, Nagoya, Nov. 29-30, 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.

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 NFκB, 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. 知的財産権の出願・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



ゲルなし羊膜三次元培養皮膚をもちいた左手掌瘢痕拘縮の治療
(劣性栄養障害型表皮水疱症)



ゲルなし羊膜三次元培養皮膚をもちいた右手掌瘢痕拘縮の治療
(劣性栄養障害型表皮水疱症)

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

表皮水疱症モデルマウスの胎生期循環系への骨髄細胞投与による治療効果の検討

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 表皮水疱症の治療のために、マウス胎仔への細胞導入法を確立し、この方法によりⅦ型コラーゲン遺伝子ノックアウトマウスの胎生期に野生型マウスの骨髄細胞の導入を行った。移植した骨髄細胞は皮膚組織に入り込み線維芽細胞となってⅦ型コラーゲンを基底膜部に供給できることが明らかになった。しかし食道粘膜組織にはⅦ型コラーゲンの供給の頻度は非常に低かった。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科准教授
知野 剛直 岐阜大学医学部皮膚科
北島 康雄 岐阜大学医学部皮膚科教授

A. 研究目的

先天性表皮水疱症に対しては遺伝子治療や細胞療法が根本的な治療法になると考えられており、その技術開発がなされてきた。このような先天性疾患では、野生型の骨髄細胞を全身に導入し、それが形質転換して欠損蛋白を供給できるとすれば、理想的な治療法となる。我々はマウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を確立した。今回はこれを利用して表皮水疱症モデルマウスの胎生期に野生型骨髄細胞の移植を行い、その細胞が皮膚組織や食道粘膜で分化して欠損蛋白を供給して欠損した形質を補充できるかどうかについて検討する。

B. 方法

表皮水疱症のモデルマウスである Type VII collagen ノックアウトの胎仔に対して胎生14日目に、卵黄囊静脈から10週令同種 GFP トランスジェニックマウス (GFP マウス) 由来の野生型骨髄細胞 5×10^5 個を含む生理食塩水 $10 \mu\text{l}$ を注入した。出生後12週間で GFP 陽性細胞を皮膚組織、食道粘膜において検索した。Type I 及び Type VII collagen, vimentin, fibro-

nectin の発現を免疫染色、RT-PCR により検出した。また基底膜部での線維構造を電顕により観察した。

C. 結果

出生後12週間で GFP 陽性細胞が多数皮膚組織に検出された。その細胞は紡錘型をしており、Type I collagen, Type VII collagen, vimentin, fibronectin がすべて陽性であり、線維芽細胞と推定された。その皮膚組織を観察すると、Type VII collagen が一部の基底膜に沿って局在していた。特に毛包部において顕著であった (図1)。電顕での観察では幼弱線維構造が形成されていたが、著明なアンカリングフィブリル構造は認められなかった。しかし皮膚組織での表皮と真皮の剥離は骨髄移植により少なくなったように見受けられる。食道粘膜では GFP 陽性細胞は極めてまれにしか認められなかったが、すべて vimentin 陽性であり、線維芽細胞に形質転換していた (図2)。Type VII collagen ノックアウトマウスは生後すぐに死亡する。骨髄細胞導入マウスは3週間生存したが、それ以上の生存は認められなかった。

D. 考察

胎生期での野生型骨髄細胞の移植によってⅦ型コラーゲン欠損マウスの皮膚組織や頻度は低い食道粘膜にも骨髄細胞が浸潤し、

Type VII collagen を供給できることが示された。生後すぐに死亡していた Type VII collagen 欠損の表皮水疱症モデルマウスは、この移植法によって3週間生存した。おそらく固形物の嚥下ができないため、それ以上の生存はできなかったと考えられる。この方法で胎生期に導入できる細胞数が限られるため、VII型コラーゲンの供給効率を増強するためには、皮膚組織や食道粘膜に到達して Type VII collagen を供給できる骨髄細胞分画を同定し、その細胞を濃縮して導入する必要があると考えられる。しかし付着系の骨髄間葉系細胞を導入すると卵黄囊静脈が閉塞し、胎仔はすべて死亡した。骨髄細胞の必要な分画を同定すれば、すぐにFACSかMACSで分離して導入することが必要であろう。

E. 結論

胎生期での骨髄細胞移植による表皮水疱症の治療のためにはさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成19年度)

1. 論文発表

1. Chino, T., Tamai, K., Yamazaki, T., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Nimura, K., Endo, M., Nagai, M., Uitto, J., Kitajima, Y., and Kaneda, Y. Bone marrow cell transfer in fetal mouse circulation can ameliorate genetic skin abnormalities by providing fibroblasts to uninjured skin. *American J. of Pathology*, In press.
2. 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 CXCR4/SDF1 pathway. *Stem Cells*, 26, 223-234, 2008.
3. Saga, K., Tamai, K., Kawachi, M., S

himbo, T., Fujita, H., Yamazaki, T., and Kaneda, Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. *J. Biotechnology*, 133, 386-394, 2008.

4. Kaneda, Y. Applications of HVJ in therapeutic delivery systems. *Expert Opin. on Drug Delivery*, 5, 221-233, 2008.

2. 学会発表

1. 第11回アメリカ遺伝子治療学会

"Bone marrow replenishes mesenchymal and epithelial progenitor cells to regenerate damaged skin, but only mesenchymal progenitor cells to the developing skin. K. Tamai, T. Chino, S. Otsuru, Y. Kikuchi and Y. Kaneda
平成20年5月29日 Boston.

2. 第67回日本癌学会学術総会 ワーク

ショップ"損傷組織による骨髄由来間葉系前駆細胞動員機構"玉井克人、金田安史 平成20年10月29日 名古屋

3. International Investigative Dermatology

Meeting. "Bone marrow replenishes de novo keratinocytes in the regenerating hair follicles via circulating blood" Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino, Yasushi Kikuchi, Ichiro Katayama, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda. May 14-17, 2008, Kyoto.

4. International Investigative Dermatology

Meeting. "Bone marrow cell transfer in utero can ameliorate genetic skin abnormalities by raising bone marrow-derived fibroblasts and keratinocytes." Takenao Chino, Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Yasuo Kitajima, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda. May 14-17, 2008, Kyoto.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

本研究に関連する特許の出願、登録は平成20年度にはなかった。

I. 引用文献

1. Chino, T., Tamai, K., Yamazaki, T., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Nimura, K., Endo, M., Nagai, M., Uitto, J., Kitajima, Y., and Kaneda, Y. Bone marrow cell transfer in fetal mouse circulation can ameliorate genetic skin abnormalities by providing fibroblasts to uninjured skin. American J. of Pathology. In press.

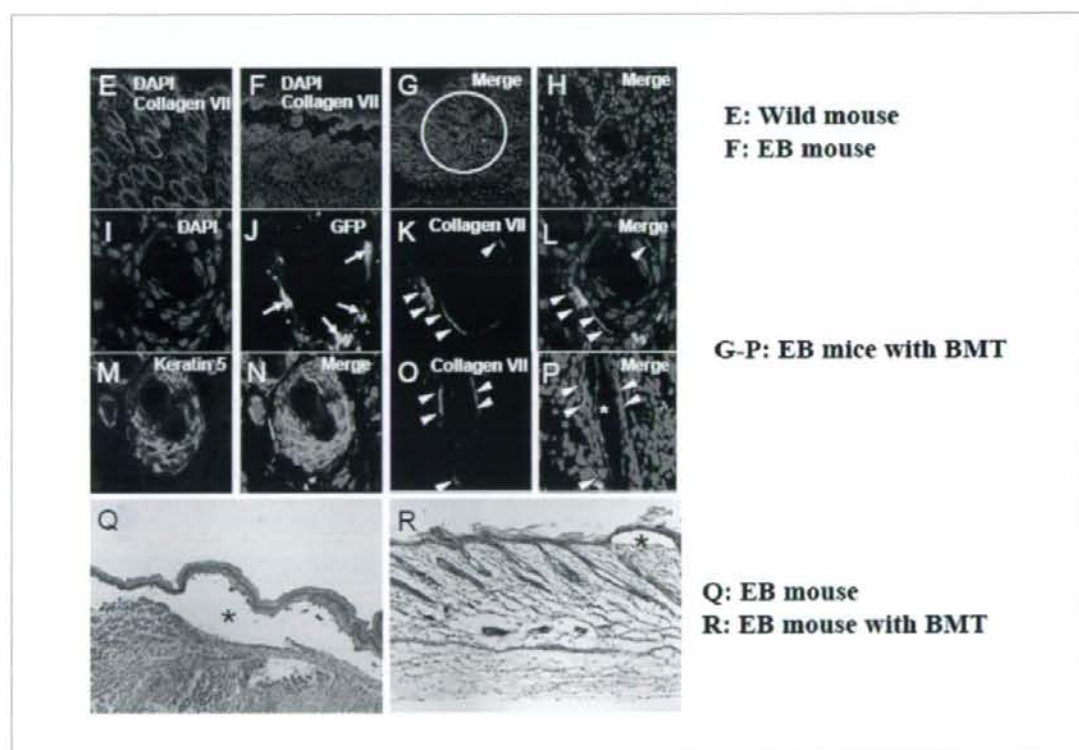


図1. 胎生期骨髄移植によるⅦ型コラーゲンノックアウトマウスの皮膚病態改善
 Ⅶ型コラーゲン欠損マウスの胎仔にGFPマウスの骨髄細胞を移植すると、生後、皮膚の毛包部の基底膜領域を中心として、GFP陽性の線維芽細胞が集積し、Ⅶ型コラーゲンを供給するようになった。

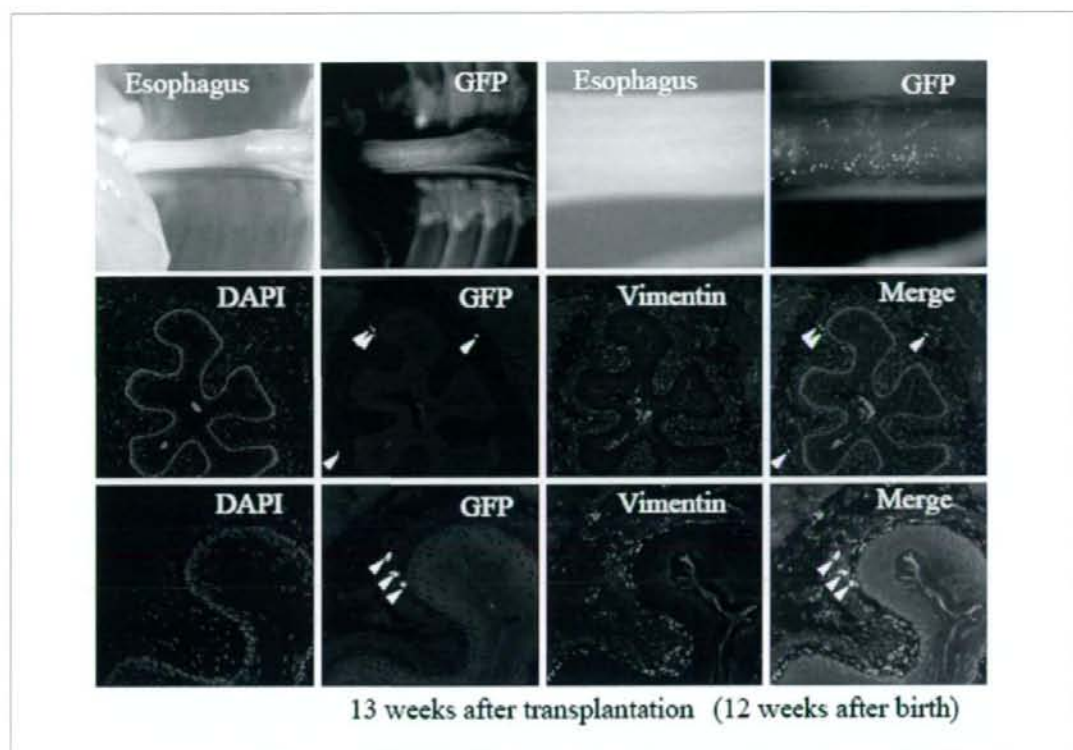


図2. 胎生期骨髄移植による食道粘膜部への線維芽細胞供給

胎生期骨髄移植によりⅦ型コラーゲン欠損マウスの食道粘膜にも GFP陽性の線維芽細胞が見出されたが、その頻度は皮膚に比べて極めて低かった。

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

骨髄細胞の皮膚構成細胞への分化能

研究協力者 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、骨髄由来細胞が表皮水疱症における水疱部表皮再生に寄与している可能性を検討し、治療法開発につなげるべく研究を進めている。特に平成20年度は、骨髄細胞の皮膚構成細胞への分化能を検討し、真皮線維芽細胞、表皮角化細胞を含む複数の皮膚構成細胞が骨髄由来細胞から供給される可能性を明らかにした。

共同研究者

金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科
遺伝子治療学

A. 研究目的

先天性表皮水疱症の根治的治療法を確立することを目的として、骨髄細胞の皮膚構成細胞への分化能を検討した。

B. 研究方法

GFP遺伝子トランスジェニックマウスより骨髄を採取し、野生型同系マウスに移植してGFP-BMTマウスを作成した。具体的には、8週齢雌C57Bl6マウスに致死量(10Gy)のX線照射後、8週齢同型雄GFPマウス脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈より移植した(5x10⁵個/匹)。移植骨髄の生着を待って(移植後6週間)、GFP-BMTマウス皮下に皮膚抽出液(新生仔マウス皮膚を生理食塩水により抽出)を充填したシリコンチューブを移植し、7日後に移植シリコンチューブを回収し、チューブ内部に集積した細胞を培養・増殖し、その性質を種々の細胞染色法、およびフロー・サイトメトリー法にて検討した。また、8週齢雌C57Bl6マウスの尾静脈より皮膚抽出液を投与し、経時的に採血して末梢血中に出現する細胞の性質を、フロー・サイトメトリー法にて検討した。

C. 研究結果

シリコンチューブに集積した細胞(tube-entrapping cell, TECs)は、培養24時間後にはプラスチックシャーレで付着性増殖能を示した。これら培養TECsの形態は、線維芽細胞様形態、上皮細胞様形態、神経細胞様形態など様々な形態を示した。また、種々の分化誘導培地で培養を続けた結果、Ca沈着性骨芽細胞、脂肪産生性脂肪細胞、ケラチン5発現性上皮細胞への分化能を示した。さらに、フロー・サイトメトリー解析にて間葉系幹細胞で発現していることが知られるplatelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α)およびCD44の発現を検討した結果、培養TECsの約20%がPDGFR α /CD44陽性細胞(P44細胞)であることが明らかとなった。一方、これらP44細胞は、骨髄内では約0.5%程度、末梢血中では0.1%程度しか存在せず、生理的条件下では骨髄からの動員は極めて乏しいことが明らかとなった。一方、皮膚抽出液を静脈内投与したマウスでは、末梢血液中に一時的にP44細胞が有意に増加することが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、骨髄内に、間葉系及び上皮系の分化能を有するP44細胞が存在すること、皮膚の損傷刺激により産生・放出されるSOSシグナルが、P44細胞を骨髄内から末梢循環を介して損傷部皮膚に動員することが初