

200936055A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

表皮水疱症の根治的治療法確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 玉井 克人

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

表皮水疱症の根治的治療法確立に関する研究

玉井 克人 1

II. 分担研究報告

1. 骨髄間葉系幹細胞移植実施計画書の作成

江副 幸子 5

2. 脂肪由来間葉系細胞のサイトカインプロファイルに関する研究

橋本 公二 7

3. 表皮水疱症における遺伝的背景と妊娠・出産に関する考察
：健常子からの骨髄間葉系幹細胞採取にむけて

片山 一朗 11

4. 骨髄造血幹細胞純化における基礎研究

金倉 譲 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

IV. 研究成果の刊行物・別冊 21

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
総括研究報告書

表皮水疱症の根治的治療法確立に関する研究

研究代表者 玉井克人、所属 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

研究要旨 本研究班は、治療法の全くない遺伝性皮膚難病である表皮水疱症に対する根治的治療法開発のための基礎的、臨床的研究をすすめることを目的として組織された。平成 21 年度は、基礎研究としては表皮細胞へと分化する骨髄細胞分画の同定を目指し、骨髄間葉系細胞の中でも $\text{Lin}^{-}\text{PDGFR}\alpha^{+}/\text{c-kit}^{-}/\text{Sca-1}^{+}$ 骨髄細胞が表皮細胞へと分化する事を見出した（玉井、中神）。さらに、骨髄内未分化幹細胞を効率よく採取する方法論を検討した（金倉）。また、骨髄由来間葉系幹細胞と共に表皮水疱症治療に用いることが期待される脂肪由来間葉系幹細胞の性質を検討した（橋本）。一方、臨床研究開始に向けて、昨年度作成した間葉系幹細胞移植実施計画書（案）の改訂作業を進めると共に、ワーキンググループを組織し（江副、玉井）、また骨髄血提供可能な家系内健常者を得る可能性を増やすために、栄養障害型表皮水疱症の妊娠・出産の可能性を検証した。

研究分担者

江副幸子 大阪大学附属病院未来医療センター
橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科皮膚科学
片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学
金倉 讓 大阪大学大学院医学系研究科血液内科学
中神啓徳 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

A. 研究目的

表皮水疱症治療法としての骨髄間葉系幹細胞移植の妥当性を検証しつつ、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、研究班を組織した。平成 21 年度は VII 型コラーゲンを産生する表皮細胞への分化能を持つ骨髄細胞を探索し（玉井、中神）、またその高効率採取法を検討した（金倉）、また骨髄間葉系幹細胞移植実施に関する計画書の改訂作業、ワーキンググループ組織立ち上げを進めた（江副、玉井）。さらに、間葉系幹細胞移植実施の可能性を広げるために必要な基礎的、臨床的研究を進めた（橋本、片山）。

B. 研究方法

玉井、中神は、VII 型コラーゲンを

産生する表皮細胞への分化能を持つ骨髄細胞を同定することを目的として、間葉系幹細胞表面マーカーの一つとして知られる $\text{PDGFR}\alpha$ の遺伝子プロモーター下流に histone H2B と GFP の融合遺伝子を挿入したノックインマウス ($\text{PDGFR}\alpha/\text{H2B-GFP}$ マウス) から骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーにより $\text{PDGFR}\alpha$ 陽性細胞の表面マーカーの検討を進めた。次いで、採取した細胞を表皮細胞分化誘導培地で培養し、 $\text{PDGFR}\alpha$ 陽性（核内 GFP 陽性）細胞中で表皮細胞特異ケラチン 5 発現細胞への分化能を持つ骨髄内分画の詳細を検討した。

江副、玉井は、骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症治療臨床試験開始に向けて、昨年度作成した実施計画書（案）の内容について改訂作業を進めると共に、臨床試験ワーキンググループの組織化を進めた。また江副は未来医療センター内の Cell Processing Isolator の試運転を行った。

橋本は、昨年度に分離・培養法を確立した脂肪由来間葉系幹細胞について、その性質の詳細を検討した。

片山は、重症栄養障害型表皮水疱症女性患者における妊娠・出産について、遺伝子変異の種類による経膈分娩の可能性評価について検討した。

金倉は、骨髄内で極めてわずかな細胞分画である間葉系幹細胞や造血幹

細胞の高効率採取法確立に向けて研究を進めた。

C. 研究結果

玉井、中神は、PDGFR α /H2B-GFP マウスから骨髓細胞を採取し、間葉系幹細胞の表面マーカーとして知られるPDGFR α 陽性細胞の詳細をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、PDGFR α 陽性骨髓細胞は、造血細胞の分化マーカー lineage 陰性、c-kit 陰性、Sca1 陽性 (Lin⁻PDGFR α ⁺/c-kit⁻/Sca-1⁺) であること、これらの細胞は表皮細胞分化誘導培地で培養することにより、表皮細胞特異的ケラチン5陽性細胞へと分化することが明らかとなった。

江副、玉井は、昨年度作成した骨髓間葉系幹細胞移植臨床試験実施計画書案の改訂作業を進め、詳細な計画書を作成した。また、未来医療センター内に、臨床試験実施ワーキンググループを組織した。また江副は未来医療センター内 Cell Processing Isolator の試運転を開始し、安全性と共に骨髓間葉系幹細胞培養の妥当性を検証した。

橋本は、昨年度に採取・培養法を確立した脂肪組織由来間葉系幹細胞について、その性質検討を進め、FGF 刺激により HGF 産生が誘導されること、一方 TGF β 刺激では HGF 産生は抑制され、VEGF 産生が誘導されることが明らかとなった。

片山は、健常家族からの骨髓細胞採取を基本とする本臨床試験の可能性拡大に向けて、劣性栄養障害型表皮水疱症女性患者の妊娠・出産が可能であることを、遺伝子変異との関係から明らかにした。

金倉は、骨髓から未分化幹細胞を採取するための方法論を確立する目的で、骨髓造血幹細胞の未分化性を指示する新たな表面マーカーとして ESAM を同定した。

D. 考察

玉井らの研究に d より、骨髓内に存在し、Lin⁻PDGFR α ⁺/c-kit⁻/Sca-1⁺の表面マーカーを持つ細胞からケラチン5陽性細胞へと分化する事が明らかとなった。近年骨髓内間葉系幹細胞に、中胚葉由来細胞と外胚葉由来細胞の2

種類が存在することが明らかになり、PDGFR α は外胚葉由来間葉系幹細胞のマーカーとなり得る可能性が指摘されている。表皮細胞は外胚葉由来であることから、PDGFR α 陽性骨髓間葉系幹細胞を栄養障害型表皮水疱症患者皮膚に移植することにより、移植細胞由来表皮細胞がVII型コラーゲンを産生することにより、病態が改善することが期待される。

また、江副らにより臨床試験実施のための標準業務手順書や製品標準書、患者説明文書の作成、ワーキンググループ組織が進められ、臨床試験申請・実施に向けた状況が整いつつある。本研究の最終年である平成22年度には、是非とも臨床試験を開始したい。

一方、臨床試験実施の可能性を拡大するために、脂肪由来間葉系幹細胞研究を進め、脂肪由来間葉系幹細胞がHGFやVEGFと言った組織再生を誘導することが知られる増殖因子を産生することが明らかとなった。骨髓由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞との皮膚再生程度を比較検討する必要があるが、骨髓細胞採取が困難である場合、その代替案として脂肪細胞由来間葉系幹細胞を利用することの検討は、本研究における重要な課題である。

VII型コラーゲン産生性表皮細胞が、間葉系幹細胞のみならず造血幹細胞からも得られるという報告があり、従来の造血幹細胞分画は、さらに細分画される可能性がある。金倉は、造血幹細胞をさらに詳細に分画・検討し、ESAM陽性分画がより未分化な性質を持つことを見出した。この分画から表皮細胞が分化可能かどうかについて、今後検討が必要である。

劣性栄養障害型表皮水疱症に罹患した女性は、その症状の重篤さから妊娠・出産を回避する傾向が高い。今回片山らは、劣性栄養障害型表皮水疱症に罹患し、経膈分娩により出産した3症例について検討した。皮膚症状は極

めて重篤であるにもかかわらず、遺伝子変異パターンは最重症型ではなく、このことから遺伝子変異のパターンにより経膈分娩の可能性を評価出来ることを示唆している。骨髄間葉系幹細胞は家系内健常者から得る予定であり、劣性栄養障害型表皮水疱症の母から生まれる子供は配偶者が健常者である限り罹患せず、将来の骨髄細胞提供者となり得る可能性がある。

平成 22 年度には、これらの研究成果を基にして、安全かつ有効な臨床試験実施を実現したい。

E 結論

骨髄間葉系細胞移植が皮膚に線維芽細胞のみならず表皮細胞を供給し、表皮水疱症治療効果を発揮し得ることが示されるとともに、平成 22 年度の臨床試験実施のための環境が整いつつある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成 19 年度)

論文発表

1. Hayashi H, Nakagami H, Takami Y, Koriyama H, Mori M, Tamai K, Sun J, Nagao K, Morishita R, Kaneda Y. FHL-2 Suppresses VEGF-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activation via Interaction With Sphingosine Kinase-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29 (6):909-14.
2. Tamai K, Kaneda Y, Uitto J. Molecular therapies for heritable blistering diseases, *Trends Mol Med.* 2009 Jul;15(7):285-92.
3. Hashikawa K, Hamada T, Ishii N,

Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent COL7A1 mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn. *J Dermatol Sci.* 2009 Oct;56(1):66-8.

4. Kimura Y, Miyazaki N, Hayashi N, Otsuru S, Tamai K, Kaneda Y, Tabata Y. Controlled release of bone morphogenetic protein-2 enhances recruitment of osteogenic progenitor cells for *de novo* generation of bone tissue. *Tissue Eng Part A.* 2009 Nov 3. [Epub ahead of print]

学会発表

1. 玉井克人、教育講演：表皮水疱症の病態・診断・治療、第 108 回日本皮膚科学会総会・学術大会、2009 年 4 月 24 日、博多市
2. 玉井克人、教育講演：表皮水疱症の患者さんから学んだこと、第 25 回日本臨床皮膚科医会総会、2009 年 5 月 8 日、高知市
3. 玉井克人、教育講演：動き出した遺伝性皮膚難病の根治的治療法開発、神奈川県皮膚科医会第 130 回例会、2009 年 6 月 25 日、横浜市
4. 玉井克人、シンポジウム：骨髄由来幹細胞による皮膚再生メカニズム、第 73 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2009 年 9 月 26 日、山梨市

5. 玉井克人、シンポジウム：骨髄由来多能性幹細胞動員因子を利用した非瘢痕性機能的皮膚組織再生誘導医療の開発、第61回日本皮膚科学会西部支部学術大会、別府市

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 発明名称：損傷組織の機能的再生促進医薬出願番号：PCT 出願：2009年4月30日（PCT/JP2009/058519）
2. 発明名称：末梢循環への骨髄由来多能性幹細胞動員薬 PCT 出願：2009年4月30日（PCT/JP2009/058515）
3. 発明名称：生体内機能的細胞の高効率採取法 PCT 出願：2009年4月30日（PCT/JP2009/058525）
4. 発明名称：骨髄間葉系および/または多能性幹細胞の血中動員による組織再生促進剤特願：2009-247143 出願日：2009年10月28日
5. 発明名称：埋め込み式生体内物質採取デバイス出願番号：特願2009-248107 出願日：2009年10月28日

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

骨髄間葉系幹細胞移植実施計画書の作成

研究分担者 江副 幸子 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 特任講師

研究要旨

分担者は、本研究の実施に向けてGMPに準拠した製造のため製品標準書及び製造手順書（SOP）の作成を行った。また、製造においては大阪大学医学部附属病院未来医療センターに新たに設置されたCell Processing Isolatorを使用することとし、Isolatorの試運転、バリデーションなどの整備を行った。さらに、Cell Processing Isolator内の環境モニタリングと製造指図書と製造記録書が一括してコンピューター管理の下で管理できる工程管理システムの開発に携わった。

A. 研究目的

「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」の実施体制の整備

B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおいて本研究の臨床研究を実施するために、未来医療センターにおいて開発されている様式を基に製品標準書、標準業務手順書（SOP）の作成に着手した。細胞の調製と培養には未来医療センターに導入されたCell Processing Isolatorを用いることとし、ヒト骨髄細胞を用いた骨髄間葉系幹細胞培養の試運転を数回行い、また、バリデーションを実施し、Cell Processing Isolatorが清潔、安全に使用でき、細胞の増殖に優れた環境であることを確認した。さらに未来医療センターCell Processing Center(CPC)において開発、導入されている工程管理システムをCell Processing Isolatorに導入するため、工程管理システムの新たな開発に携わった。

C. 研究結果

製品標準書、及び製造工程の標準業務手順書を作成した。その中で、ドナーからの骨髄採取の工程に於いてドナーの安全性の確保において不明瞭な部分が明らかになったため、骨髄採取担当者に報告を行った。また、骨髄間葉系幹細胞を注入する際の手法が統一されていない部分を残していたため、検討を加えた。

Cell Processing Isolatorの試運転に於いては、全ての感染症検査において以上を認めず、清浄度が確認された。また、培養細胞の生存率、及び表面抗原においても異常を示さず、細胞培養に於いて問題ないと考えられた。しかし、作業空間が狭いため作業がしにくくさらなる工夫が必要であることも明らかとなった。工程管理システムについては手袋を外さずにIsolator内で操作できるような工夫も必要であることが明らかとなった。

D. 考察

表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞皮下移植術は既にチリで行われているが、少数例の研究であり、また、本邦で多い栄養障害型表皮水疱症に対する安全性有効性はいまだ確立されていない。本研究を安全に、倫理的に遂行するために、十分な製造環境の整備と実施体制の整備が必要であると考え。骨髄間葉系幹細胞の製造にあたっては、ドナー骨髄細胞の不均一性はあるものの、均一な結果を得るために、統一した工程を決めることが大切であると考え。製品の安全性と清浄度の保持のために大阪大学未来医療センター内に導入されたCell Preprocessing Isolator を用いてGMPに準拠した製造を行うこととした。Cell Processing Isolatorは完全閉鎖系での調製と培養が行えるため、清浄度がたもたれるが、狭い空間での手袋を介した作業となり、取扱いに熟練が必要である。さらなる改良も必要であることがわかった。品質補償のための工程管理システムの導入はCell Processing Isolatorにおいても有用であることを確認した。

E. 結論

「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」の製品標準書と標準業務手順書の作成を開始した。Cell Processing Isolatorの試運転と工程管理システムの開発を行い、実践で使用できるようになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 第8回日本再生医療学会総会
藤井妙恵, 江副幸子, 松山晃文,
高岡 文, 名井 陽, 澤 芳樹
細胞・組織利用製剤エンドトキシン測定における細胞内成分の影響
2009. 3. 5-6, 東京, 坪田一男

2. The 7th Stem Cell Research Symposium

Sachiko Ezoe, Itaru Matsumura,
Hirokazu Tanaka, Yusuke Satoh,
Yuzuru Kanakura
SIRT1 Deficiency Suppressed the Maintenance of Hematopoietic Stem Cell Pool
2009, 5, 15-16, 東京

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

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

脂肪由来間葉系幹細胞のサイトカインプロファイルに関する研究

研究分担者 橋本公二
愛媛大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離、培養を行い、そのサイトカイン産生について検討した。FGF2,TGF-beta 刺激により FGF2, VEGF の mRNA 発現が増強され、FGF2 刺激にて HGF mRNA 発現が増強した。蛋白レベルでは FGF2, TGF-beta により VEGF の産生が増加し、FGF2 刺激により HGF は蛋白レベルでも増加した。今後線維芽細胞との比較検討、ならびに分化誘導にて他の細胞へ分化できるかどうかについての検討が必要である。

A. 研究目的

表皮水疱症は細胞骨格ならびに基底膜の蛋白をコードする遺伝子異常により発症する疾患で、根治的治療は遺伝子治療である。遺伝子治療が実際に行うことができるまでには相当のハードルがあり、現実には直面する患者の症状を改善するにはなんらかの治療法の開発が必要である。現時点では最も有効であると思われる治療法は再生医療である。これまでの研究成果においては自己ないしは同種培養皮膚を用いた治療法が最も有効であるが、培養皮膚作製には高度な技術が必要であり一般化していないのが現状である。最新の基礎的研究成果によると骨髄由来間葉系幹細胞が表皮水疱症の治療に有用であるとされている。昨年度、骨髄以外の組織から間葉系幹細胞を分離培養することに成功した。すなわち脂肪組織からシャーレ底面に付着する細胞集団を得ることができ、形態的には線維芽細胞に類似する細胞であった。そこで本年度は脂肪由来間葉系幹細胞のサイトカイン産生プロファイルについて検討した。

B. 研究方法

手術時に得られた余剰脂肪組織を PBS にて十分洗浄し、ハサミにて細切後、37℃にてトリプシン処理を行った。遠心操作を行い沈降してきた細胞を回収し、10% FCS/DMEM にて懸濁し、組織培養用シャーレに播種した。培養液を2日に1回交換し5%CO₂, 37℃にて培養した。コンフルエントに達した時点で0.125%トリプシン・0.1%EDTA 溶液を用いて細胞を分離分散し1:3の割合で継代し、適宜保存した。サイトカイン産生については凍結保存しておいた脂肪由来間葉系幹細胞を6 well plate に播種し、翌日各種 growth factor を添加し培養を継続した。経時的に細胞、培養液を回収し、サイトカインの産生について real time PCR, ELISA 法にて解析した。

C. 研究結果

FGF2 添加により VEGF, HGF の産生は増加したが、KGF の産生は著変なかった。一方、TGF-beta 添加にて VEGF は著明に増加したが、HGF, KGF は産生が著明に抑制された。FGF2, TGF-beta 同時添加群では VEGF の産生は相加的に増加した（図1）。mRNA 発現に関しては、FGF2,TGF-beta 刺激によ

り FGF2, VEGF の mRNA 発現が増強され、FGF2 刺激にて HGF mRNA 発現が増強した (図 2)。

D. 考察

表皮水疱症の再生医療である培養皮膚は、線維芽細胞や角化細胞を培養し、大量に増殖させ人工皮膚を作製し難治性潰瘍面へ移植することで創傷治癒を促進させるものであり、有効な治療法である。その他の治療法として骨髄細胞を用いた皮膚再生が報告されている。すなわち骨髄穿刺した細胞を難治性皮膚潰瘍の周囲に局所注入することにより創の上皮化を促進させる治療法である。骨髄細胞による潰瘍治療は骨髄に含まれる間葉系幹細胞による創の上皮化促進であると考えられている。さらに骨髄から間葉系幹細胞を分離増殖させ、広範囲の皮膚潰瘍を治療することができるとの報告があり、実際に表皮水疱症への治療の可能性が検討されている。間葉系幹細胞を用いた治療を推進する場合に、骨髄以外の組織から大量に分離培養できれば治療効果が増すことが期待できる。これまでに我々は、比較的大量にかつ容易に手に入れることが可能な脂肪組織から付着系の細胞を分離培養できることを明らかにした。この線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞の性質を有していれば表皮水疱症の新たな治療法として有効であることが期待できる。本年度の研究成果として、脂肪由来間葉系幹細胞は FGF2 や TGF-beta により、一部のサイトカインの誘導効果がみられることが明らかとなった。これらのデータは間葉系幹細胞の増殖や治療効果を推察する点で重要であると思われる。また、これらのサイトカインを単独も

しくは組み合わせて添加することにより間葉系幹細胞を効率よく増やすことができると思われる。

E. 結論

脂肪組織由来間葉系幹細胞は FGF2, TGF-beta により VEGF などのサイトカインの産生が亢進することが明らかとなった。その他のサイトカイン刺激で産生亢進する因子の検索や、線維芽細胞との比較ならびに多分化能の検索が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成 21 年度)

論文発表

1. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S.: Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 2009 116:685-90.
2. Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 123:971-2
3. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.: Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal

- epithelial cells to viral infections. *Mol Vis.* 2009 15:937-48
4. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K.: IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol.* 2009 39:2279-88
 5. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K.: Living Skin Equivalents Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J Dermatol Sci.* 2009 56:188-95
 6. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.: Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-Induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. *Am J Pathol.* 2009 175:2235-48
 7. 相原道子, 狩野葉子, 飯島正文, 池澤善郎, 塩原哲夫, 森田栄伸, 木下 茂, 相原雄幸, 白方裕司, 藤山幹子, 北見 周, 渡辺秀晃, 外園千恵, 桃島健治, 小豆澤宏明, 浅田秀夫, 橋本公二 : Stevens-Johnson 症候群および中毒性表皮壊死症 (TEN) の治療指針。－平成 20 年度厚生労働科学研究補助金 (難治性疾患克服研究事業) 重症多形滲出性紅斑に関する調査研究班による治療指針 2009 の解説－。日本皮膚科学会雑誌; 119: 2157-2163, 2009.
 8. 藤山幹子, 橋本公二 : 薬剤性過敏症症候群と HHV-6 の再活性化について。ウィルス; 59: 23-30, 2009.
 9. 石川真奈美, 白方裕司, 村上信司, 藤山幹子, 谷本圭子, 浦部由佳里, 佐藤直樹, 宮脇さおり, 岡崎秀規, 平川聡史, 徳丸晶, 花川靖, 佐山浩二, 橋本公二 : 大量ガンマグロブリン静注療法が奏功した難治性尋常性天疱瘡の 1 例。西日本皮膚科 71:561-65, 2009
 10. 岡崎秀規, 藤山幹子, 村上信司, 石川真奈美, 佐藤直樹, 宮脇さおり, 白石 研, 橋本公二 : 薬剤性過敏症症候群 (DIHS) の特徴的な顔面の所見と HHV-6 再活性化との時間的關係。日本皮膚科学会雑誌 119:2187-93
- 学会発表
1. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada, 5/6-9, 2009.
 2. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K.: Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European

Society for Dermatological Research,
Budapest, Hungary, 9/10-12, 2009.

3. Shirakata Y, and Hashimoto K.:
Development of a new skin equivalent
using de-epithelialized amnion
membrane. The 4th Joint Meeting of
Japanese Dermatological Association
and Australasian College of
Dermatologists, Sapporo, 7/10-12, 2009.
4. Hirakawa S, and Hashimoto K.: Lymph
node lymphangiogenesis-a new concept
in cancer metastasis. Symposium in 7th
World Congress on Melanoma and 5th
Congress of the European Association of
Dermato-Oncology (EADO), Vienna,
Austria, 5/12-16, 2009.
5. Hirakawa S, Sato E, Okazaki H, Shodou
M, Oike Y, and Hashimoto K.:
Lymphatic hyperpermeability and
persistent inflammation induced by
cutaneous delayed-type hypersensitivity
reactions in angiotensin-related growth
factor transgenic mice. 39th Annual
European Society for Dermatological
Research(ESDR) Meeting, Budapest,
Hungary, 9/9-12, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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

表皮水疱症における遺伝的背景と妊娠・出産に関する考察:
健常子からの骨髄間葉系幹細胞採取にむけて

分担研究者 片山一朗、所属 大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科学 教授

研究要旨

表皮水疱症において、女性の劣性栄養障害型表皮水疱症患者の妊娠出産は、分娩時管理の困難性や出産時の粘膜皮膚剥離の懸念から回避される傾向が多い。そのため、以後の健常子骨髄由来間葉系幹細胞採取の可能性は極めて低い。今回我々は、3例の女性の重症栄養障害型表皮水疱症患者の妊娠経過と経膈分娩を経験し、分娩法の決定を遺伝子診断に基づいた重症度を参考にする可能性を検討した。これらの情報により、今後の表皮水疱症患者における経膈分娩の基準を確立し、将来の健常子由来骨髄採取の可能性に道を開くと期待する。

共同研究者

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子
治療学
梅垣知子 大阪大学大学院医学系研究科
皮膚科学

本研究では、劣性栄養障害型表皮水疱症に罹患した女性における妊娠・出産の可否に関する選択基準の1つとして、遺伝子診断による重症度を挙げ、重症度と分娩方法の関連について考察した。

A. 研究目的

表皮水疱症は全身の皮膚に水疱を生じる遺伝性疾患で、とりわけ皮膚症状が重篤な劣性栄養障害型先天性表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa: RDEB) は VII 型コラーゲンの遺伝子異常によって生じる。また RDEB は生下時から水疱、びらん後に瘢痕治癒を繰り返すため、一般に低栄養と貧血を伴う事が多い。そのため重症の女性 RDEB 患者が妊娠した場合、その妊娠経過管理に非常に困難を伴う事が多く、母体の全身状態の悪化や胎児の発育不全などのリスクも高いため、妊娠・出産は回避される傾向が多い。出産を選択した際には、皮膚科、産科の密な連携を要する。また分娩に際しては様々なリスクが伴う事が知られている。特に全身麻酔における気管挿管後の気管狭窄や、経膈分娩後の膈の狭窄、帝王切開後の創部のトラブルなどがあり、より安全性・有効性が高い分娩方法の選択が要求される。しかし、これまで症例蓄積がほとんどなく、一定の分娩方法の選択基準もない。

現在本研究班が目指している、健常家族由来骨髄間葉系幹細胞移植治療を可能にするためには、劣性栄養障害型に罹患した女性の妊娠・出産を可能にすることが極めて重要である。何故なら、配偶者が健常人である場合、劣性栄養障害型の妊婦内胎児は健常であるから、出生児の臍帯血、さらには成長後に健常子由来骨髄間葉系幹細胞移植が可能になると期待されるからである。

B. 研究方法

3例の女性重症栄養障害型表皮水疱症患者の妊娠経過・経膈分娩に関して、遺伝子診断に基づく重症度を基準として検討・考察した。

C. 研究結果

症例1:21歳女性。
家族歴なし。夫:正常男子

現病歴:患者は生下時より機械刺激により全身の皮膚に水疱びらんを生じており、臨床的に RDEB の診断を得ていた。外力が加わる部位を中心として全身に水疱新生とびらん潰瘍を認め、瘢痕治癒し、手足の皮膚は癒着し融合していた。妊娠が明らかになり、産婦人科にて経過観察された。39 週と6日に経膈分娩にて 2996g の正常男児を娩出。産後、膈の状態も問題なく、合併症なし。

症例2:27歳女性。
家族歴なし。夫:正常男子

生下時より全身に水疱形成あり、遺伝子診断にて Exon103 c.7741G>A (p.G2581R)、Exon112 c.8329C>T (p.R2777X)の変異を確認され、RDEBの診断を得ている。27歳時に妊娠し、19週目に切迫流産にて産婦人科入院となるが、改善。40週2日に2884kgの正常男子を経膈分娩にて娩出。分娩時出血性ショックを起こすも、急速輸液にて改善。産後

膣の状態も問題なく、母子ともに経過良好。さらに27歳時に2度目の妊娠し、膣の状態が問題なかったため、再度40週0日に3108gの女児を経膣分娩にて娩出。産後、母子ともに経過良好。

症例3:30歳女性。
家族歴なし。夫:正常男子

生下時より全身に水疱形成あり、遺伝子診断にてc.8644G>A (p.Glu2882Lys)/ c.8569G>T (p.Glu2857X)の変異を確認され、RDEBの診断を得ている。30歳で妊娠し、経過中胎児の発育も良好で、母体の皮疹、全身状態とも安定していた。40週0日に2508gの正常男児を経膣分娩にて娩出。産後、母子ともに経過良好で、膣の硬化などの合併症は認めなかった。

D. 考察

我々は3例の重症のRDEB患者の経膣分娩を経験した。重症のRDEB患者であっても、経膣分娩の産後に特に膣の狭窄などの合併症を認めていない。帝王切開を選択した場合、腰椎麻酔では皮膚のびらんや感染により脊髄への感染症を起こすリスクも考えられ、また全身麻酔になった場合には、術後挿管による気道狭窄を起こすリスクも考えられる。こういったリスクを回避し、より安全な分娩方法を選択するための一定の方針が必要と考えられる。今回我々は遺伝子検索による変異に基づいた重症度を分娩方法の選択の要素として考えた。一般に皮膚の癬痕形成・癒着は、同じ遺伝子変異であっても生後の生活習慣や皮膚のケアなどが大きく影響するが、膣の状態は性行為による接触以外の外的要因を受けることがほとんどなく、遺伝子変異による重症度が経膣分娩後の膣の狭窄リスクを予想しうるのではないかと考える。今回の3例において重症の遺伝子変異を有しているものの、経膣分娩にて特に大きな合併症なく娩出されており、その他の合併症や母体・胎児状態に緊急性がなければ重症のRDEB患者であっても経膣分娩は十分考慮しうる分娩方法と考えられた。

RDEBにおける安全な経膣分娩の可否について遺伝子変異の種類によって予想が可能となれば、劣性栄養障害型表皮水疱症に罹患した女性の妊娠・出産例が増加し、結果として健全子由来骨髄間葉系幹細胞移植の可能性が拡大すると期待される。

E. 結論

女性重症栄養障害型表皮水疱症患者の妊娠経過・経膣分娩方法選択に関して、遺伝子変異による重症度の観点から、分娩経過についての詳細な症例の蓄積が望まれる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成21年度)

1. 論文発表

- 1) Terao M et al. Tumor necrosis factor- α processing inhibitor-1 inhibits skin fibrosis in a bleomycin-induced murine model of scleroderma. *Exp Dermatol*. 2010 Jan;19(1):38-43.
- 2) Murakami Y et al. Case of schwannomatosis. *J Dermatol*. 2009 Sep;36(9):508-11.
- 3) Nakajima T et al. Venous insufficiency in patients with necrobiosis lipoidica. *J Dermatol*. 2009 Mar;36(3):166-9.
- 4) Takahashi Y et al. Intractable wounds caused by pyoderma gangrenosum in a patient with critical limb ischemia treated with cyclosporine and adjuvant sympathectomy. *Dermatol Surg*. 2009 Apr;35(4):699-703.
- 5) Amagai M et al. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Apr;60(4):595-603.
- 6) Ishida I et al. Stage III melanoma treated with chemotherapy after surgery during the second trimester of pregnancy. *Arch Dermatol*. 2009 Mar;145(3):346-8.
- 7) Gunadi, Miura K et al. Two novel mutations in the ED1 gene in Japanese families with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Pediatr Res*. 2009 Apr;65(4):453-7.

2. 学会発表

- 1)片山一朗 皮膚のリモデリングとその制御「アトピー性皮膚炎と強皮症をモデルとして」第16回福島県アレルギー研究会 2009.2.28 福島
- 2)片山一朗 アレルギー性皮膚疾患と環境因子 日本産業皮膚衛生協会 講演会 2009.5.19 京都
- 3)Katayama I, Neural and inflammatory aspects of itch responses in atopic dermatitis: New action mechanism of anti-histaminic drug on mite antigen-induced skin lesions in NC/Nga mice. 5th International Workshop for the Study of Itch Atopic Dermatitis Luncheon Seminar, 2009.10.26 東京
- 4)片山一朗 皮膚の栄養学とアレルギー 静岡県皮膚科医会第133回例会 2009.11.14 静岡
- 5)Katayama I, Topical vitamin D3(tacalcitol) and solar irradiation therapy for vitiligo vulgaris: comparative study with combined narrow band UVB and topical vitamin D3 therapy, 第22回日本色素細胞学会ランチョンセミナー2009.12.5 福岡

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

骨髓造血幹細胞純化における基礎研究

研究分担者 金倉 讓 大阪大学医学系研究科 教授

研究要旨

分担者は、骨髓間葉系幹細胞および造血幹細胞の移植のために、より未分化な幹細胞を純化するための手法の開発研究を行っている。平成21年度において分担者は、骨髓造血幹細胞のより未分化性を示す表面マーカーとしてESAMの同定を行った。

A. 研究目的

造血幹細胞（HSC）のより未分化な分画を純化する手法の開発を試みる。

B. 研究方法

分担者らは、E14.5のマウス胎児肝からRag1^{Lo} c-kit^{Hi} Sca1⁺の初期リンパ球前駆細胞(ELP)とRag1⁻ c-Kit^{Hi} Sca1⁺のHSC分画を分離、mRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行い、HSC分画に有意に発現が増強する因子としてESAMを同定した。さらにマウス胎児肝細胞の幹・前駆細胞分画をESAMの発現の強度により2つに分類し、FACS解析、コロニーアッセイ、MS5共培養、マウス移植実験を行い、その性質について検討した。

C. 研究結果

Lin⁻ c-kit^{Hi} Sca-1⁺ (LSK)細胞はESAMの発現によって2つの分画に分けることができ、ESAMの発現はリンパ球系単球系の分化マーカーであるCD48の発現とともに減少した。コロニーアッセイにおいてESAM^{Hi}HSC

はESAM^{-Low}の分画に比べてCFU-Mix形成能が著明に高く、またMS5との共培養において多系統への分可能を保持していたことからESAM^{Hi}分画に造血幹細胞が濃縮されていると考えられる。致死量放射線照射マウスへの移植実験においてはESAM^{Hi}分画を移植したマウスでのみ3系統の造血再構築能を有していた。さらに、胎児肝のみならず、老齢マウスの骨髓においてもRag1⁻LSK分画においてESAMの発現が増強していたことより、ESAMはマウスの一生涯を通じて造血幹/前駆細胞のマーカーとして有用な指標となりうると考えられる。

D. 考察

HSCに強発現し、ELPには発現しないマウス未分化造血幹/前駆細胞のマーカーとしてESAMを同定した。これにより造血幹細胞分画をより高い純度で濃縮でき、そのことは移植の戦略に貢献しうると考える。さらにこのことは造血細胞の初期分化について示唆を与えるとともに造血幹細胞の性質につい

てより詳細な理解をもたらすものである。

E. 結論

造血幹細胞を濃縮する新たなマーカーとしてESAMを同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Polymorphous lymphoproliferative disorder: a clinicopathological analysis. Nakamichi N, Wada N, Kohara M, Fukuhara S, Sugiyama H, Ogawa H, Hino M, Kanamaru A, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Virchows Arch. 2010
 2. Diffuse large B-cell lymphoma with a high number of epithelioid histiocytes (lymphoepithelioid B-cell lymphoma): a study of Osaka Lymphoma Study Group. Wada N, Ikeda J, Kohara M, Ogawa H, Hino M, Fukuhara S, Kanamaru A, Sugiyama H, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Virchows Arch. Sep;455(3):285-93. 2009
 3. Antifungal activity of micafungin in serum. Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, Yasumi M, Ujiie H, Masaie H, Nakazawa T, Mochizuki N, Kishino S, Kanakura Y. Antimicrob Agents Chemother. 253(10):4559-4562. 2009
 4. Presence of platelet-associated anti-glycoprotein (GP)VI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y. J Thromb Haemost. ;7(8):1373-83. 2009
 5. Peripheral T-cell lymphoma of Lennert type complicated by monoclonal proliferation of large B-cells. Chihara T, Wada N, Kohara M, Matsui T, Masaya H, Maeda T, Shibayama H, Kanakura Y, Tani M, Morii E, Aozasa K. Pathol Res Pract. 2009
 6. Standardized uptake value on FDG-PET as a marker for disease activity in patients with non-Hodgkin's lymphoma: comparison with serum soluble interleukin-2 receptor values. Tatsumi M, Sugahara H, Higuchi I, Fukunaga H, Nakamura H, Kanakura Y, Hatazawa J. Int J Clin Oncol. 14(2):150-8. 2009
 7. Intravascular lymphomatosis initially suspected from uterine cytology: a case report. Nakamichi I, Shimazu K, Ikeda J, Yamauchi A, Ishiko J, Mizuki M, Kanakura Y, Aozasa K. Acta Cytol. 53(2):198-200. 2009
- 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表