

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

プラズマ技術を用いた角化細胞への遺伝子導入の試み

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 我々はこれまでに表皮水疱症に対する遺伝子再生医療の基礎的研究として様々な遺伝子導入法を開発してきた。すなわちアデノウィルスベクター、超音波+マイクロバブル、レンチウィルスベクターでの遺伝子導入効率、遺伝子発現について報告してきた。一方新たな遺伝子導入法としてプラズマ技術が注目されており、反復高電界下での分子振動の働きを利用した全く新たなコンセプトによる分子導入法で、遺伝子やその他の分子を効率よく簡便かつ迅速に導入することが可能である。数秒間のプラズマ照射で細胞・組織に分子導入が可能で、Hela、COSなどのcell lineでは高い導入効率が示されている。今回プラズマを用いた角化細胞への遺伝子導入を試みた。

A. 研究目的

表皮水疱症の遺伝子再生医療の大きな柱の一つは遺伝子導入法の確立であり、もう一つは培養皮膚である。これまでの研究成果により、培養表皮シート、三次元皮膚移植法を確立した。一方遺伝子導入法についてはアデノウィルスベクターや超音波+マイクロバブルによる遺伝子導入では一過性の発現と導入効率の低さが問題であった。培養皮膚を用いたex vivo遺伝子治療の開発には長期間遺伝子発現可能な導入法を開発する必要がある。レンチウィルスベクターを用いるとほとんどすべての角化細胞に遺伝子導入が可能であり、導入された角化細胞を用いても三次元培養皮膚の作製が可能であり長期間の遺伝子発現を確認した。一方新たな遺伝子導入法としてプラズマ技術が注目されている。プラズマは2000年に小出、阪本らにより開発された技術で、反復高電界下での分子振動の働きを利用した全く新たなコンセプトによる分子導入法であり、遺伝子やその他の分子を効率よく簡便かつ迅速に導入することが可能である。導入分子以外に必要な試薬などは原則不要であり、数秒間のプラズマ照射で細胞・組織に分子導入が可能で、Hela、COSなどのcell line

では高い導入効率が示されている。今回プラズマ技術を用いた角化細胞への遺伝子導入を試みた。

B. 研究方法

愛媛大学にて保存してあった正常ヒト皮膚角化細胞を無血清培養法にて培養した。6 cmのコラーゲンコートディッシュに角化細胞を播種し、50%程度のコンフルエンスとなった時点で遺伝子導入を行った。コントロールとしてはCOS7細胞を用いた。プラズマ発生装置の可変パラメーターとしては、電圧、duty, time, rotation speed, gas, gapがあるが、電圧、frequency, gasとgapは一定として、その他を変更し導入効率を観察した。遺伝子はGFPを用い、その濃度は2-16ug間で検討した。GFPの発現は蛍光位相差顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

プラズマ発生装置にディッシュを装着し、プラズマを照射する装置を用いた（図1）。電圧は2万5千ボルトに固定し、周波数は65で固定した。①コントロール群（照射なし）②duty；40, 2秒1回、③duty；40, 2秒2回、

④duty:60, 2秒1回の4群で比較した(図2)。①群では細胞に障害性はなく、3日後にはコンフルエントに達した。②群では照射直後には一部の細胞で浮遊したものがみられたが90%以上の細胞はダメージを認めず、3日後にはコンフルエントに達したがGFPの発現は全くみられなかった。③群では照射直後には照射部に一致して細胞壊死がみられ附着している細胞は10%以下となったが3日目には回復し増殖がみられた。遺伝子の発現はほとんどみられなかった。④群では照射部のダメージが強く、ほとんどの細胞が壊死となった。3日目でも細胞は回復せず不可逆的な細胞ダメージであった。遺伝子発現は全くみられなかった。COS7細胞でも同様の条件で遺伝子導入を試みたが10%以下の導入率であり、従来の報告とは異なっていた。

D. 考察

表皮水疱症に対する培養皮膚を用いたex vivo遺伝子導入法を確立するためには安全かつ安定した遺伝子導入法を確立する必要がある。今回試みたプラズマを用いた遺伝子導入はプラスミドのみを用い、試薬は不必要であるため安全性に関しては全く問題ないとおもわれるが、導入効率が極端に低く、遺伝子治療には適さないと思われる。コントロールとして用いたCOS7細胞においても遺伝子導入効率が極端に低かったことから手技的な問題があったと思われる。今後導入条件を詳細に検討したとしても導入効率に関してはウイルスベクターを凌駕するほどの成果は期待できないと思われる。

E. 結論

プラズマ技術を用いて角化細胞への遺伝子導入を試みたが細胞障害性が高く、導入効率が低いため培養皮膚を用いたex vivo遺伝子治療開発には適さないことが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. Shirakata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. : Auto- and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 58 : 162-4, 2010
2. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. : Inflammatory mediator TAK 1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS One.* 5 : e11275, 2010
3. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. : E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem.* 285 : 30042-9, 2010
4. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. : PPAR γ mediates innate immunity by regulating the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 60 : 179-86, 2010

学会発表

1. Tohyama M, Yang L, Tsuda T, Miyawaki S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. : Interferon alpha enhances IL-22 receptor expression on epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki,

- Finland, 9/8-11, 2010.
2. Shirakata Y, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K. : Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
 3. Shirakata Y, Ishikawa M, Murakami S, Hashimoto K. : Successful treatment of severe pemphigus vulgaris with high-dose intravenous immunoglobulin. 9th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Weimar, Germany, 6/9-12, 2010.
 4. Sayama K, Dai X, Shirakata Y, Tohyama M, Miyawaki S, Hirakawa S, Hashimoto K. : Mite allergen is a danger signal for the skin. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
 5. Sayama K, Yamamoto M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hirakawa S, Dai X, Akira S, Hashimoto K. : Conditional ablation of Ubcl3 in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased proliferation and apoptosis. The first Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, Japan, 10/1-3, 2010.

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

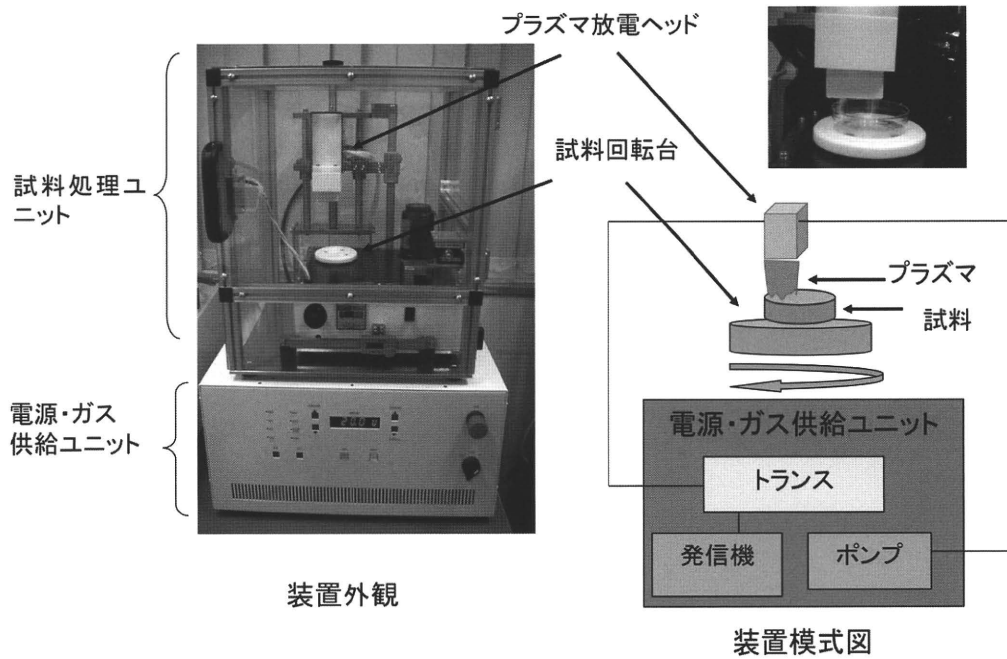


図1 プラズマ発生装置

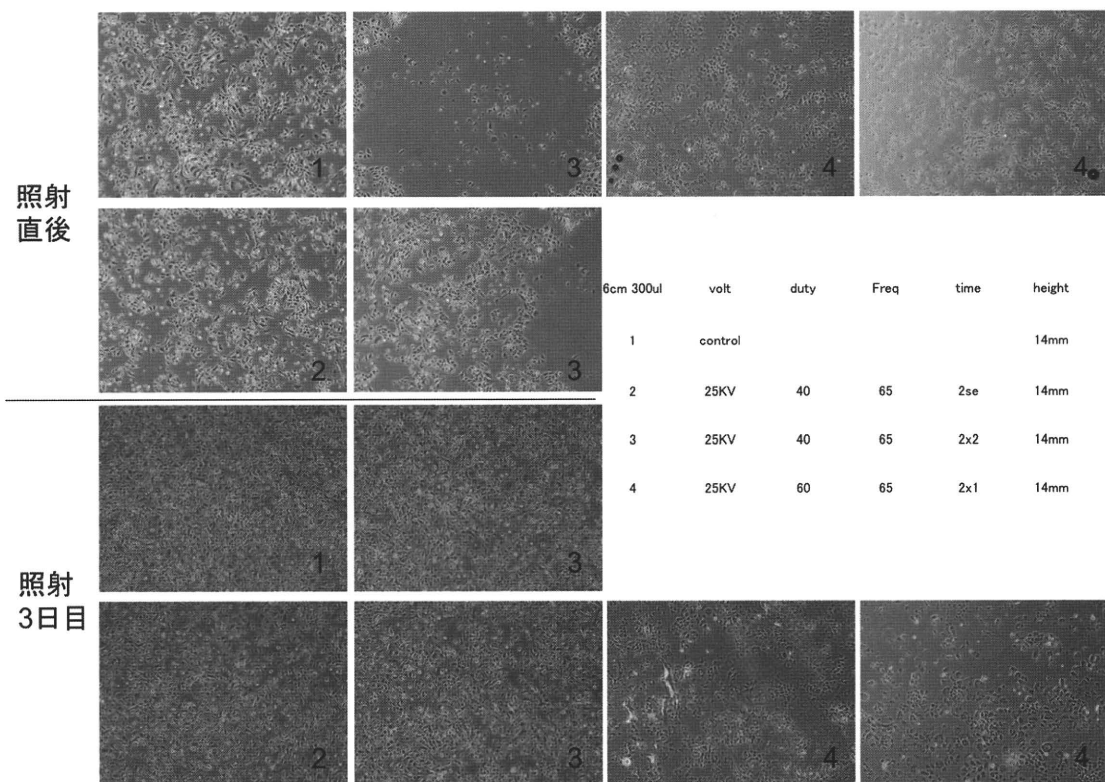


図2 角化細胞へのプラズマを用いた遺伝子導入：形態変化

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

難治性皮膚疾患に対する骨髄幹細胞移植治療実現のための基礎研究

研究協力者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学寄附講座 教授

研究要旨 これまで我々は、治療法の全く無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、臨床的研究を進め、骨髄細胞の皮膚構成細胞への分化能を検討し、骨髄間葉系幹細胞移植による治療の妥当性を検証するとともに、表皮細胞へと分化する骨髄細胞分画の同定を進め、骨髄間葉系細胞の中でも $\text{Lin}^-/\text{PDGFR } \alpha^+/\text{c-kit}^-$ 骨髄細胞が表皮細胞へと分化する事を見出した。これらの研究成果を基に、「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」実施のためのワーキンググループを組織し、ヒト幹細胞臨床研究申請に必要なすべての書類を作成し、大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会に提出して審査を受け、3度の改訂作業の後に承認を得た。厚生労働省にヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書類一式を提出して申請受理された。

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
菊池 康 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学
知野 剛直 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学

で協議の上、骨髄間葉系幹細胞移植プロトコルの作成を進めた。プロトコル作成には、表皮水疱症研究の世界的権威で、玉井の共同研究者である米国フィラデルフィア、ジェファーソン医科大学皮膚科学教室主任教授の Jouni Uitto 博士、英国のロンドン王立大学分子皮膚科学教授の John A McGrath 教授も参加した。Uitto 教授は栄養障害型表皮水疱症モデルマウス（VII型コラーゲンノックアウトマウス）の開発者で、玉井に同マウスを供与した。また McGrath 教授は、サバティカルを取得して来日し、平成22年4月1日から8月31日まで大阪大学大学院医学系研究科客員教授に就任し、この間、表皮水疱症患者に対する骨髄間葉系幹細胞移植プロトコル作成に関与した。

（倫理面への配慮）

作成した間葉系幹細胞移植プロトコルを基にして、「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」実施計画書作成を進め、大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会に提出して倫理的妥当性について審査を受けた。

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、研究を進めた。平成22年度は皮膚構成細胞へと分化する骨髄間葉系幹細胞の性質検討および臨床研究開始に向けたワーキンググループを組織してヒト幹細胞臨床研究申請に必要な書類を完成し、臨床研究申請を進めた。

B. 研究方法

これまでに進めた骨髄間葉系幹細胞に関する基礎的研究をさらに充実させつつ、ヒト幹細胞臨床研究申請に必要な書類一式の作成を進めた。具体的には、大阪大学附属病院未来医療センター内に組織したワーキンググルー

C. 研究結果

玉井はマウス $\text{Lin}^-/\text{PDGFR } \alpha^+/\text{c-kit}^-$ 骨髄間葉系幹細胞の骨髄内局在を、2光子顕微鏡を用いて詳細に検討した。その結果、骨皮質の内面に多く存在すること、末梢組織損傷時に骨髄内類洞周囲に集積し、さらに末梢血中に動員され、最終的に損傷組織に集積して組織再生に寄与していることが確認された。また、表皮水疱症の世界的権威である英国ロンドン王立大学分子皮膚科学教授 John A McGrath 教授を大阪大学に客員教授として迎え、McGrath 教授の指導を得ながら「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」実施プロトコルを作成した。具体的には、文章により同意を得られた20歳以上65歳未満の栄養障害型あるいは接合部型表皮水疱症の患者6例を対象とし、6週間以上継続する難治性皮膚潰瘍を1箇所選択し、潰瘍周囲皮膚に1箇所あたり 5×10^5 個の培養骨髄間葉系幹細胞（文章で同意の得られた性の異なる健常家族由来）を2cm間隔で皮下移植することとした。

完成したプロトコルを基にして臨床研究実施計画書を作成し、大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会に提出して審査を受け、3回の改訂作業の後に最終承認を得た。同時に承認を得た症例報告書、患者およびドナーの同意説明文書、同意書、同意撤回書、などと共に、製品標準書、手順書、COA 関連書類を整備し、厚生労働省にヒト幹細胞臨床研究実施計画書類一式を提出して申請受理された。

D. 考察

骨髄内に皮膚線維芽細胞や表皮細胞に分化可能な間葉系幹細胞分画が存在すること、それらの分画は、骨髄内 $\text{Lin}^-/\text{PDGFR } \alpha^+/\text{c-kit}^-$ の表面マーカーを持つ細胞集団である事が明らかとなった。近年骨髄内間葉系幹細胞に、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 陽性骨髄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、移植細胞由来線維芽細胞や表皮細胞が患者皮膚に生着し、VII型コラーゲンその他の基底膜成分を産生して患者皮膚基底膜部に供給することにより、表皮水疱症の病態が改善することが期待される。実際、米国ジェファーソン医科大学皮膚科教授 Jouni Uitto 博士はVII型コラーゲンノックアウトマウス皮下への同種骨髄間葉系幹細胞移植により効果が得られることを証明した。さらに、玉井らと情報交換している南米チリの研究グループは、VII型コラーゲンが完全欠損する表皮水疱症患者2名に骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究を実施し、移植後1週間目に皮膚基底膜部にVII型コラーゲンが供給され、潰瘍の上皮化促進効果が得られることを明らかにした。

これらの研究成果は、本研究の目的である「表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」実施の妥当性を示す重要な実験的根拠となり、その内容は臨床研究実施計画書内に反映された。しかし、米国、チリいずれのグループの研究も、患者と骨髄間葉系幹細胞ドナー間でのHLA一致程度と移植細胞生着期間の相関関係や、移植間葉系幹細胞が皮膚を構成するどの細胞に分化しているか、などの重要な疑問に対して答えを出してはいない。我々は、患者と性の異なるドナーを選択することにより、性染色体を指標にHLA一致程度と生着期間の相関解析、および移植間葉系幹細胞の皮膚内分化系譜の解析が可能なプロトコルを作成した。その内容は既に大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会の承認を得て、さらに必要書類一式と共に厚生労働省への提出を終了している。現在、審査・承認を待っている状況である。ヒト幹細胞移植臨床研究の承認が得られ次第、安全かつ有効な臨床研究を実施したい。

E. 結論

本研究により、骨髄間葉系細胞移植が皮膚

に線維芽細胞や表皮細胞を供給し、表皮水疱症治療効果を発揮し得ることが明らかとなった。現在厚労省に申請中のヒト幹細胞臨床研究「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」が実施されることにより、表皮水疱症に対する有効な治療法が確立すると確信する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. 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*. 2010 Apr ; 16 (4) : 1263-70.
2. Shimbo T, Tanemura A, Yamazaki T, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y. Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *PLoS One*. 2010 May 10 ; 5 (5) : e10566.
3. Takemoto H, Tamai K, Akasaka E, Rokunohe D, Takiyoshi N, Umegaki N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D. Relation between expression levels of the POU transcriptional factor Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci*. 2010 Dec. ; 60 (3) : 203-5.

学会発表

1. Tamai K, Yamazaki T, Chino T and Kaneda Y. Contribution of PDGFR α - positive bone marrow cells for epithelial regeneration in genetic blistering skin

disease, RDEB. Oral Presentation, 13th Annual Meeting, American Society of Gene and Cell Therapy, May 19-22, Washington, DC, USA.

1. 玉井克人、教育講演：未来皮膚科学：皮膚は地球を救う、第109回日本皮膚科学会総会、2010年4月16日、大阪
2. 玉井克人、スイーツセミナー：骨髄細胞は皮膚を作れるか？、日本皮膚科学会東北6県合同地方会学術大会第349回例会、2010年2月6日、仙台
3. 玉井克人、知野剛直、飯沼晋、金田安史、梅垣知子、片山一朗、移植皮膚片における表皮恒常性維持機構、第25回角化症研究会、2010年7月31日
4. 玉井克人、シンポジウム：表皮水疱症の病態、第42回日本臨床分子形態学会、2010年9月24日、三島

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 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 国際出願番号：PCT/JP2010/069133 国際出願日：2010年10月28日
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
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）
分担研究報告書

先天性表皮水疱症に対する造血幹細胞移植法の開発

研究分担者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授

研究要旨 これまで対症療法のみで根治療法の存在しなかった先天性表皮水疱症に対して同種造血幹細胞移植を行い、その安全性と有効性を検討する。本研究による移植例は国内初となることが予想され、その成否は今後の国内の先天性表皮水疱症患者に対する同種造血幹細胞移植の導入に大きな影響を及ぼすものと考えられる。シクロフォスファミドの投与量などの点において、安全性に重点を置いた研究計画を検討している。

共同研究者

村松 秀城 名古屋大学医学部附属病院
小児科 助教

用しているブスルファン+フルダラビン+シクロフォスファミドによる前処置は造血幹細胞移植の前処置としては一般的なものであるが、シクロフォスファミドの投与量設定が50mg/kg/日×4日間であり、7例中1例にシクロフォスファミドの重要なdose limiting toxicityである心筋毒性による死亡が発生していることから、過量である可能性があると考えられる。我々は、シクロフォスファミドを減量した前処置を予定している。

A. 研究目的

これまで対症療法のみで根治療法の存在しなかった先天性表皮水疱症に対して同種造血幹細胞移植を行い、その安全性と有効性を検討する。

B. 研究方法

免疫破壊的化学療法による前処置に引き続き、同種造血幹細胞移植を行う。集中的な皮膚管理と、嘔吐を繰り返すことで食道炎から食道狭窄症をきたすことがあるため移植前後を通じて胃管栄養とする以外は通常と同種造血幹細胞移植と同様の方法で行う。

C. 研究結果

名古屋大学医学部倫理委員会申請を目指し、研究計画書を作成した。現在申請準備中である。2010年にアメリカのグループが発表した論文（NEJM 2010 J. Wagner *et al.*）では、7例の先天性表皮水疱症に対して造血幹細胞移植を行い、驚くべき皮膚所見の改善を報告しているが、うち2例が死亡している。死因は前処置による心筋毒性が1例と、臍帯血移植例における生着不全1例である。彼らが採

D. 考察

先天性表皮水疱症患者に対する同種造血幹細胞移植は、世界的にも前述のアメリカからの7例の報告しかなく、本研究による移植例は国内初の移植となるものと考えられる。その成否は今後の国内の先天性表皮水疱症患者に対する同種造血幹細胞移植の導入に大きな影響を及ぼすことが予想されることから、安全性に重点を置いた研究計画を検討している。

E. 結論

これまで対症療法のみで根治療法の存在しなかった先天性表皮水疱症に対して同種造血幹細胞移植を行い、その安全性と有効性を検討する。現在研究計画書を作成終了し、名古屋大学医学部倫理委員会への申請準備中である。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15 ; 115 (15) : 3158-61.
2. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
3. Kanazaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kane-gane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA 1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder : mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 116 : 4631-4638.
4. Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Ristano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Param-

eters : Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

脂肪由来間葉系幹細胞のサイトカイン産生に関する研究

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のひとつとして骨髄由来間葉系幹細胞による治療が注目されている。骨髄以外の組織である脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在し、その細胞は皮膚創傷治療促進効果を有していることが報告されている。そこで今回我々は脂肪組織から間葉系幹細胞（adipose-derived stem cell：ASC）を分離培養し、細胞の形態、増殖能、分化能さらにサイトカイン産生について線維芽細胞と比較検討した。ASC細胞は線維芽細胞様の形態を呈し、増殖能は約1/3であった。継代しても脂肪細胞への分化能は維持されていた。サイトカインに関してはVEGF、KGFを多く分泌し、HGFは線維芽細胞のほうがより多く分泌していた。ASC細胞は形態、増殖能、サイトカイン分泌の面からみて線維芽細胞とは異なる細胞であり、VEGF、KGF分泌により創傷治療を促進する可能性が示唆された。

A. 研究目的

表皮水疱症の遺伝子再生医療の大きな柱の一つは遺伝子導入法の確立であり、もう一つは培養皮膚を含めた再生医療である。近年皮膚細胞以外の細胞を用いた治療の可能性が示唆されており、もっとも研究が進んでいるのは骨髄由来間葉系幹細胞である。この細胞を得るには骨髄液を採取する必要がある、かなりの負担を強いられている。また採取できる骨髄の量は限りがあるため大量に得ることは難しいと思われる。これらの問題点が少ない組織として脂肪組織が注目されている。脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在し、創傷治療促進効果を有していることが報告されている。そこで表皮水疱症に対する再生医療の手段の一つとして脂肪組織由来間葉系幹細胞に着目し、その動態やサイトカイン産生について検討した。

B. 研究方法

手術時に得られたヒト脂肪組織を生理食塩水にて十分洗浄し、血球成分をできる限り除去した。ハサミを用いて細切し0.75%コラゲナーゼ溶液にて時々攪拌しながら37°で90分

間処理した。1000rpmにて遠心し、ペレットを10%FCS/DMEMにて懸濁しコラーゲンコートディッシュに播種した。細胞が増殖した段階で適宜保存し継代を行った。脂肪細胞への分化誘導は専用の培地に変更し7-14日間培養後Alizarin Red染色を行った。サイトカイン産生については培養液を回収し、培養液中のサイトカイン量をELISA法にて測定した。

C. 研究結果

培養開始翌日にはシャーレ底面に付着する細胞が数多くみられ、培養継続により線維芽細胞様の形態を呈した。コンフルエントに達した時点で継代を行ったが、継代した細胞も順調に増殖した。継代を9回行ったが形態の変化はほとんど認めなかった。数回継代した時点で脂肪細胞への分化を誘導する培地に変更し、3日に1回培地を交換したところ、7日目以降に細胞内に脂肪滴を有する細胞が出現した。10日目にAlizarin Red染色をおこなったところ脂肪であることを確認した。コントロールとして用いた線維芽細胞ではこのような脂肪を有する細胞は認めなかった（図

1)。細胞の形態と増殖能についても線維芽細胞と比較した。増殖が亢進につれて線維芽細胞は細長くなるがASC細胞は細長くはならず比較的太い形態を示した。シャーレー杯になった時点で細胞数を測定すると線維芽細胞の約1/3であった。継代数をあわせた細胞で増殖アッセイを行ったところ、どの継代の細胞においても増殖能は線維芽細胞の約1/2から1/3であった。このASC細胞のサイトカイン産生について培地中に分泌されるタンパクをELISAにて測定した。細胞100万個あたりのサイトカイン量ではVEGFとKGFはASCのほうが多く、HGFについては線維芽細胞のほうが多量に分泌していた(図2)。FGF2は両者間では差はなく、TGF- β 1はASCでは検出限度以下であった。

D. 考察

表皮水疱症に対する再生医療については近年様々な治療法が試みられている。我々は培養皮膚を用いた治療の可能性を探索し、培養表皮シート移植や三次元培養皮膚が有用であることを示してきた。培養皮膚は一旦細胞を培養し、三次元構築を行うものであり、その作製法はやや複雑で、時間的にも作製に日時がかかる。近年皮膚細胞以外の細胞を用いた治療の可能性が示唆されており、もっとも研究が進んでいるのは骨髄由来間葉系幹細胞である。骨髄由来幹細胞を皮膚欠損部周囲に注射することにより再生した表皮に骨髄由来細胞をみることができたとの報告があり、表皮水疱症への応用が期待されている。骨髄幹細胞を得るには骨髄液を採取する必要があるが、かなりの負担を強いられている。また採取できる骨髄の量は限りがあるため大量に得ることは難しいと思われる。幹細胞のソースとして脂肪組織が注目されている。脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在し、創傷治癒促進効果を有していることが報告されている。そこで表皮水疱症に対する再生医療の手段の一つとして脂肪組織由来間葉系幹細胞に着目し、その動態やサイトカイン産生について検討した。

今回培養した間葉系幹細胞は培養も比較的簡単で、線維芽細胞様の形態を示したが、増殖能力は50%以下であり、サイトカインの産生も全く異なる細胞であった。ただし、脂肪細胞への分化能は維持されており、この点でも線維芽細胞とは異なる細胞であると思われる。今後の課題としては実際に脂肪由来間葉系幹細胞が創傷治癒促進効果を有しているか否か、局所注入にて表皮に分化する能力を有しているか否かの検討が必要である。

E. 結論

脂肪組織から間葉系幹細胞を培養し、その形態、増殖能、分化能、サイトカイン産生について検討し、線維芽細胞とは異なる細胞であることを示した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成22年度)

論文発表

1. Shirakata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. : Auto-and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 58 : 162-4, 2010
2. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. : Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS One.* 5 : e11275, 2010
3. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. : E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme

Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem.* 285 : 30042-9, 2010

4. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. : PPAR γ mediates innate immunity by regulating the $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 60 : 179-86, 2010

学会発表

1. Tohyama M, Yang L, Tsuda T, Miyawaki S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. : Interferon alpha enhances IL-22 receptor expression on epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
2. Shirakata Y, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K. : Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
3. Shirakata Y, Ishikawa M, Murakami S, Hashimoto K. : Successful treatment of severe pemphigus vulgaris with high-dose intravenous immunoglobulin. 9th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Weimar, Germany, 6/9-12, 2010.
4. Sayama K, Dai X, Shirakata Y, Tohyama M, Miyawaki S, Hirakawa S, Hashimoto K. : Mite allergen is a danger signal for the skin. The 40th Annual Meeting of the European Society for

Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.

5. Sayama K, Yamamoto M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hirakawa S, Dai X, Akira S, Hashimoto K. : Conditional ablation of Ubc13 in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased proliferation and apoptosis. The first Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, Japan, 10/1-3, 2010.

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

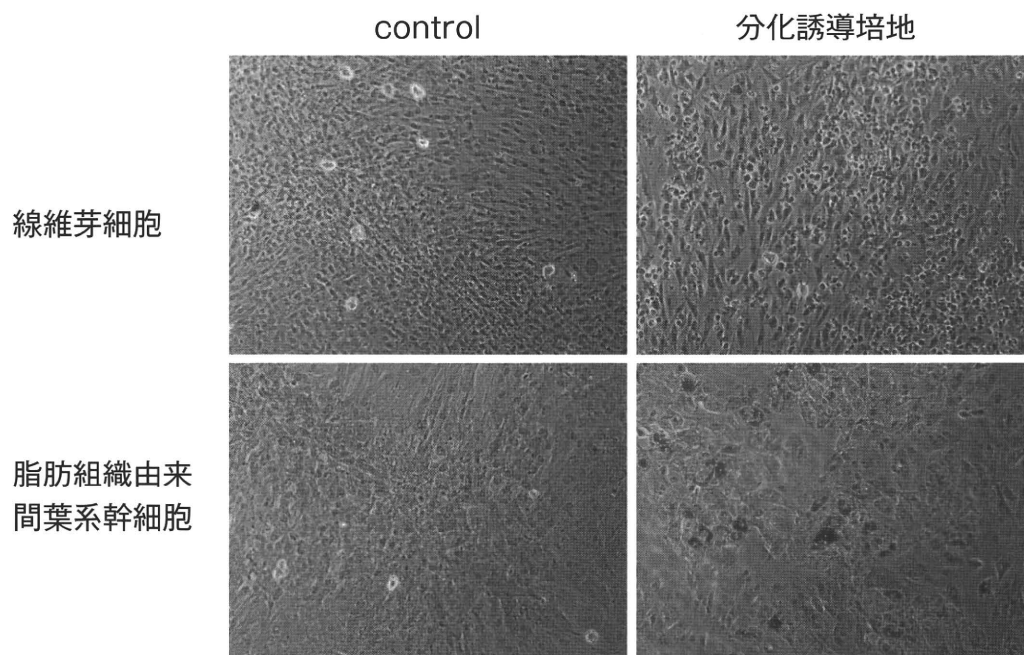


図1 脂肪細胞への分化誘導
脂肪細胞への分化誘導培地に変更後10日目

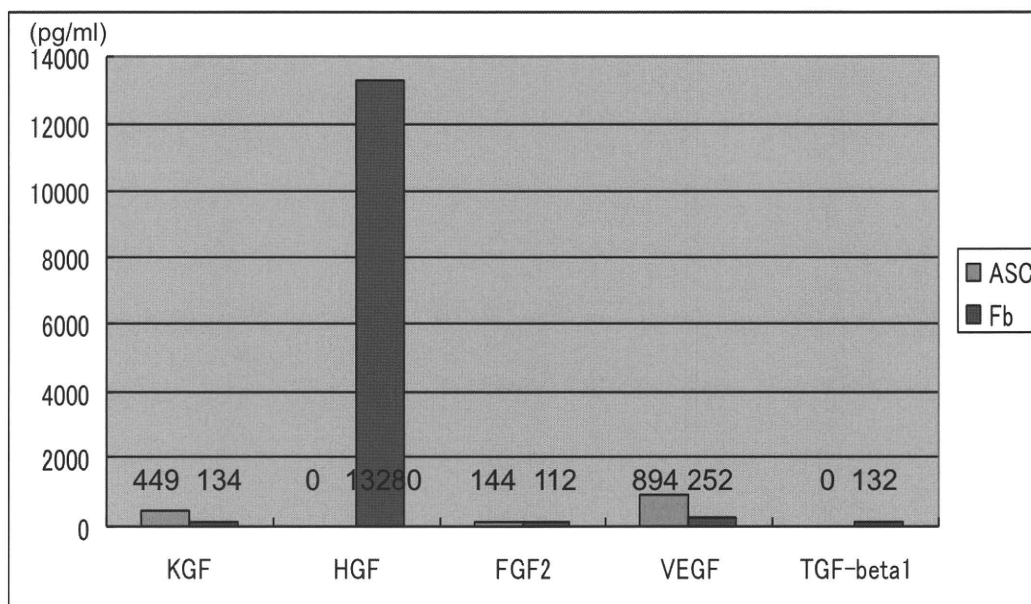


図2 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)のサイトカイン産生プロフィール

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)と線維芽細胞(Fb)
100万個あたりのサイトカイン産生量

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

筋ジストロフィーおよび幽門閉鎖同時合併単純型表皮水疱症

研究分担者 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 プレクチンは細胞骨格のクロスリンカー蛋白であり、両端の globular domain に rod domain が挟まれる構造を有している。プレクチンの欠損によって筋ジストロフィー合併単純型表皮水疱症（EBS-MD）、幽門閉鎖合併単純型表皮水疱症（EBS-PA）の二つの疾患が生じる。EBS-MD 患者では、全長のプレクチンを発現しないが、rod domain が欠損した蛋白（rodless）の発現が保たれており、逆に EBS-PA では全長、rodless とともに発現が著明に減弱あるいは消失する。筋ジストロフィー（MD）と幽門閉鎖（PA）を同時に発症した表皮水疱症（EBS）の症例は、過去に報告されていなかった。今回我々は、世界で初めて MD・PA 同時合併の EBS 症例を経験した。プレクチン遺伝子の最後のエクソンに中途終止コドンを起こす変異を同定し、プレクチンの mRNA レベル、蛋白レベルの発現について解析した。

共同研究者

新熊 悟 北海道大学 皮膚科
夏賀 健 北海道大学 皮膚科
西江 渉 北海道大学 皮膚科

A. 研究目的

プレクチンは、中央の rod domain を N 末端と C 末端の globular domain がそれぞれ挟み込む、独特なダンベル様構造を呈する細胞骨格リンカー蛋白であり、皮膚・筋肉・消化管をはじめとした様々な臓器で発現している。プレクチンには全長の蛋白とともに、rod domain が除かれた rodless プレクチンが選択的スプライシングによって生じることが知られている。

プレクチンの変異によって筋ジストロフィー合併型表皮水疱症（EBS-MD）と幽門閉鎖合併型表皮水疱症（EBS-PA）の二つの疾患が生じることが報告されてきた。昨年度の研究成果によって、EBS-MD では全長のプレクチンは消失しているものの、rodless プレクチンの発現が保たれており、EBS-PA では全長/rodless プレクチンともに

欠損ないし著明に減弱していることが明らかになった（引用文献 1）。

EBS-PA は EBS-MD に比べて皮膚症状、予後ともに重篤であるが、EBS-PA 患者で筋ジストロフィー（MD）を生じた症例は報告されていなかった。今回我々は MD と幽門閉鎖（PA）を同時合併した EBS（EBS-MD/PA）患者を新規に同定した。本症例について、プレクチンの発現パターンを明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

EBS-MD/PA 患者について、プレクチンの遺伝子変異検索を施行した。さらに患者皮膚を用いて、プレクチンの発現パターンを蛍光抗体法で解析した。同時に患者由来培養線維芽細胞を用いてプレクチンの mRNA、蛋白レベルでの発現を解析した。

C. 研究結果

症例は 0 歳、男児。出生時から皮膚欠損と皮膚の水疱形成を認めた（図 1 A、1 B）。腹部 X 線所見から幽門閉鎖が同定された（図 1

C)。筋緊張の低下、嚥下・呼吸困難を認め、出生直後のcreatin kinase(CK)は11,852U/Lであった(正常値;60-400U/L)。筋酵素はその後も高値のままで経過し、25日齢の段階では、CKが1924U/L、アルドラーゼは40.0U/L(正常値1.7-5.7U/L)であった。

患者皮膚の電子顕微鏡所見から、皮膚の分離部位は皮膚基底細胞内にあることが判明した(図1D)。

患者末梢血細胞から抽出したゲノムDNAからプレクチンの変異解析を行ったところ、患者は母親由来のc.10984C>T(p.Glu3662X)とde novoであるc.11453_11462delのcompound heterozygoteであった(図2A、2B、3C)。変異はともに最後のエクソンであるエクソン32に位置していた。これらの変異についてはそれぞれ、制限酵素*BsrI*、*Bbv-CI*による処理にてダイレクトシーケンスの結果を確認した(図2C、2D)。

患者凍結皮膚に図3Aの抗体を用いて蛍光抗体法を施行した。患者皮膚は、PN643、HD1-121、PC815には弱く反応したが、C20には反応しなかった(図4)。

免疫プロットによる解析では、正常ヒト線維芽細胞抽出液で全長のプレクチンとrodlessプレクチンが発現していたが、患者由来線維芽細胞抽出液では全長のプレクチンが著明に減弱し、さらに短縮していた(図5)。

図3Bに記したプライマーを用いて、プレクチンのmRNAレベルの発現を確認した。患者由来線維芽細胞では、全長とrodlessプレクチンをコードする転写産物がともに減少していた(図6)。

D. 考察

EBS-MD/PAでは、短縮し、しかも発現が著明に減少したプレクチンが発現することが明らかとなった(図3D)。この結果は、EBS-MDにおいて全長のプレクチンは消失したうえでrodlessプレクチンの発現が保たれていること、EBS-PAでは全長/rodlessプレクチンともに欠損ないし著明に減弱している

といった発現パターンと異なったものであった。なお、図は全て引用文献2から引用した。

E. 結論

プレクチンが短縮し、しかも発現量が著明に低下することで、EBSにMDとPAが同時に合併する臨床型を呈する。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成22年度)

論文発表

1. Ujiie H, Nishie W, Shimizu H: Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin*, in press.
2. Nakamura H, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Sawamura D, Akiyama M, Shimizu H: DNA-based Prenatal Diagnosis of Plectin-deficient Epidermolysis Bullosa Simplex Associated with Pyloric Atresia. *Int J Dermatol*, in press.
3. Kikuchi K, Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Kajita S, Sato H, Shimizu H: Subepidermal blistering disease with three distinct autoantibodies: anti-BP230, anti-laminin gamma-1, and anti-laminin-332. *J Am Acad Dermatol*, in press.
4. Lin HY, Yanagi T, Akiyama M, Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, Arita K, Shimizu H: Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies against type VII collagen and laminin-332. *Br J Dermatol*, in press.
5. Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, McMillan JR, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H: Blockade of antibody-initiated tissue damage by using

- recombinant fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *Am J Pathol* 176 : 914-925, 2010.
6. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H: What's new in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 37 : 194-204, 2010.
 7. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H : A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J Immunol* 184 : 2166-2174, 2010.
 8. Shinkuma S, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H : Epidermolysis bullosa in Japan. *Dermatol Clin* 28 : 431-432, xvi, 2010.
 9. Shimizu S, Natsuga K, Shinkuma S, Yasui C, Tsuchiya K, Shimizu H : Localized Linear IgA/IgG Bullous Dermatitis. *Acta Derm Venereol* 90 : 621-624, 2010.
 10. Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto-Ohguchi Y, Aoyagi S, Akiyama M, Kuroyanagi Y, Shimizu H : Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute. *Acta Derm Venereol* 90 : 165-169, 2010.
 11. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H : A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20 : 74-76, 2010.
 12. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Shibata M, Nishimura M, Hashimoto T, Shimizu H : Circulating IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 162 : 513-517, 2010.
 13. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H : Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat* 31 : E1687-1698, 2010.
 14. Natsuga K, Nishie W, Arita K, Shinkuma S, Nakamura H, Kubota S, Imakado S, Akiyama M, Shimizu H : Complete paternal isodisomy of chromosome 17 in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol* 130 : 2671-2674, 2010.
 15. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H : Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat* 31 : 308-316, 2010.
 16. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao HJ, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long HA, Nishie W, Shimizu H : Human IgG 1 Monoclonal Antibody against Human Collagen 17 Non-collagenous 16A Domain Induces Blisters via Complement Activation in Experimental Bullous Pemphigoid Model. *J Immunol* 185 : 7746-7755, 2010.
 17. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H : Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 107 : 14345-14350, 2010.

学会発表

1. Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito K, Shimizu H : New insight into genotype-phenotype correlation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a range of COL7A1 missense mutations. 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 2010/9/8-11
2. Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito K, Akiyama M, Shimizu H : Distinctive anchoring fibril structures produced by different COL7A1 mutations. 37th Annual meeting of the SOCIETY FOR CUTANEOUS ULTRASTRUCTURE RESEARCH Helsinki, Finland, 2010/9/7-8
3. 新熊 悟、西江 渉、夏賀 健、伊藤 圭、中村秀樹、清水 宏 : 劣性栄養障害型表皮水疱症患者における遺伝子型-表現型の相互関係の解析。日本皮膚科学会第383回北海道地方会、札幌、2010/8/28

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

I. 引用文献

1. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H : Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. Hum Mutat 31 : 602-10, 2010
2. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka

H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H : Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. Hum Mutat 31 : E1687-98, 2010

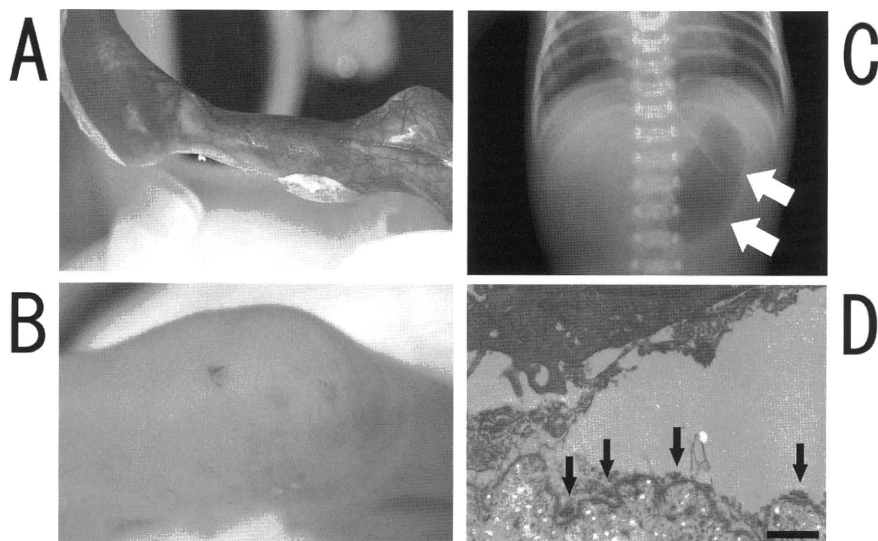


図1. 患児の臨床症状および電子顕微鏡検査

(A、B) 出生時から皮膚欠損と皮膚の水疱形成を認め、また、筋緊張の低下、嚥下・呼吸困難などの筋症状も認めた。(C) 腹部X線所見から幽門閉鎖が同定された。(D) 患者皮膚の電子顕微鏡検査で、皮膚基底細胞内に裂隙を認めた。

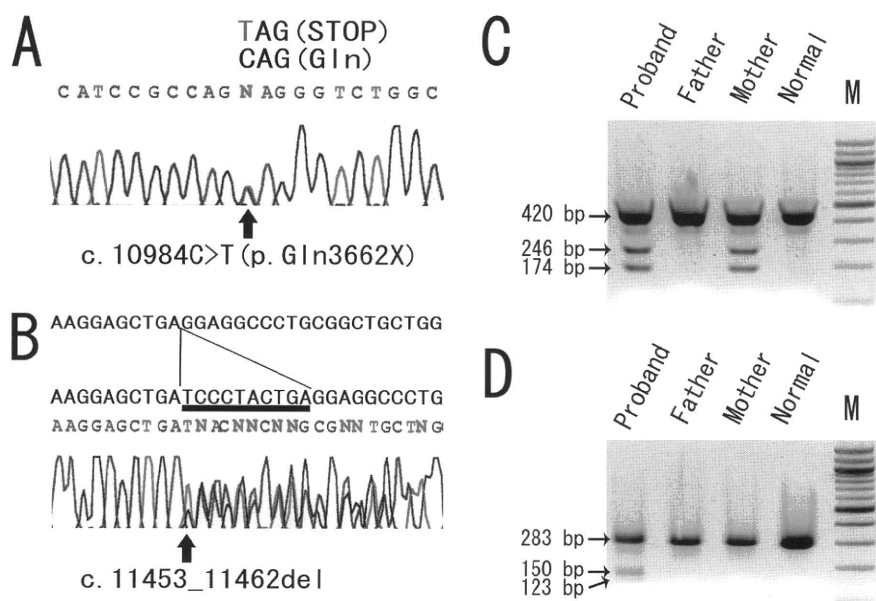


図2. 遺伝子変異解析

患者末梢血細胞から抽出したゲノムDNAからプレクチンの変異解析を行ったところ、c.10984C>T (p.Glu3662X) と c.11453_11462del の compound heterozygote 変異を認めた。

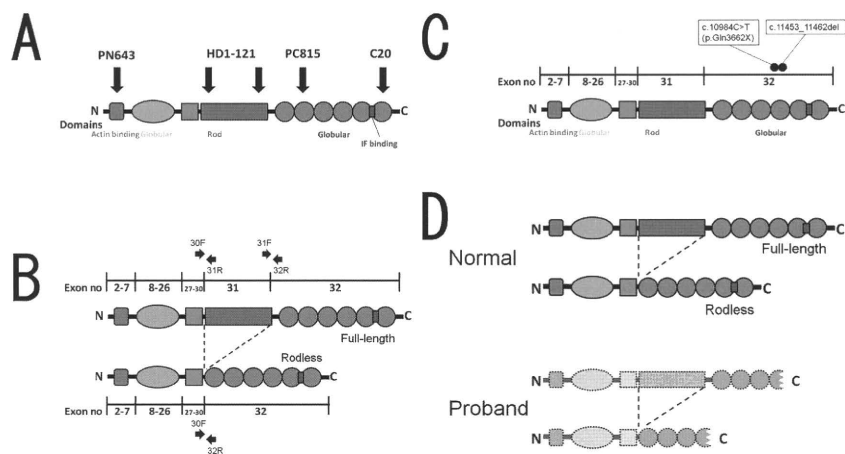


図3. プレクチンの構造

プレクチンは、中央のrod domainをN末端とC末端のglobular domainがそれぞれ挟み込む、独特なダンベル様構造を呈する細胞骨格リンカー蛋白である。プレクチンには全長の蛋白とともに、rod domainが除かれたrodlessプレクチンが選択的スプライシングによって生じる。

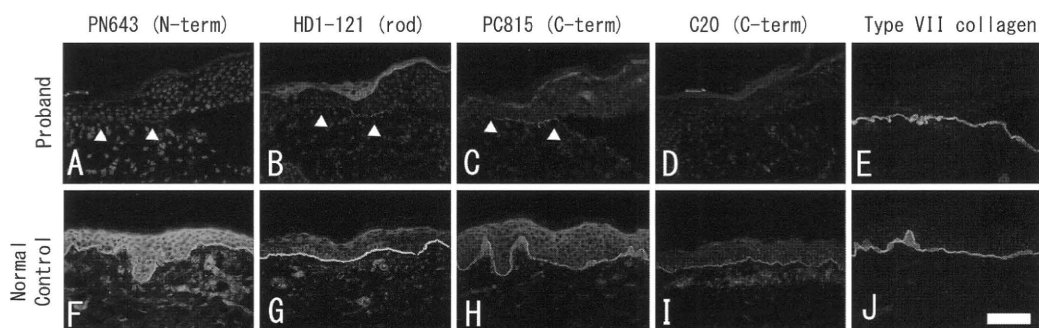


図4. 免疫組織学的検査

患者凍結皮膚に図3Aの抗体を用いて蛍光抗体法を施行した。患者皮膚は、PN643、HD1-121、PC815には弱く反応したが、C20には反応しなかった。

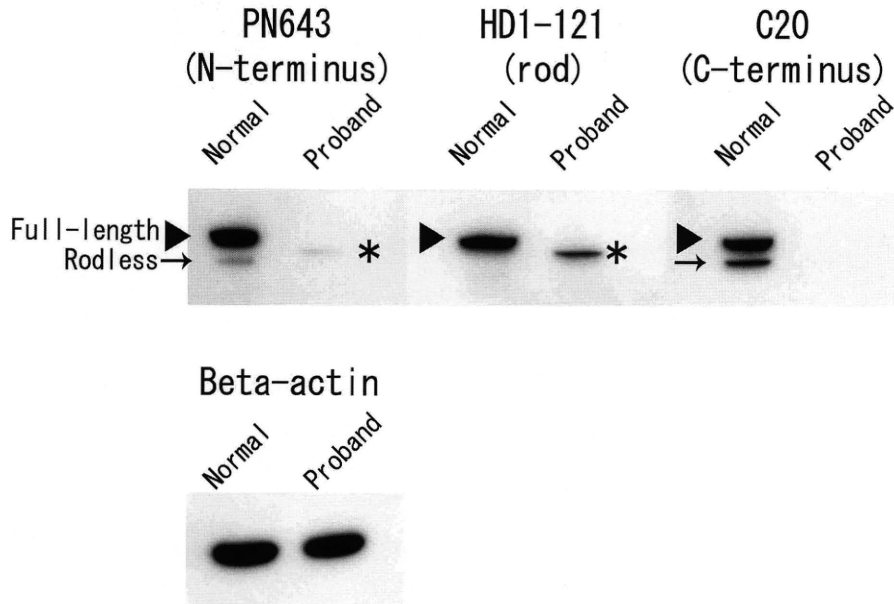


図5. 免疫プロットによる解析

正常ヒト線維芽細胞抽出液で全長のプレクチンと rodless プレクチンが発現していたが、患者由来線維芽細胞抽出液では全長のプレクチンが著明に減弱し、さらに短縮していた。

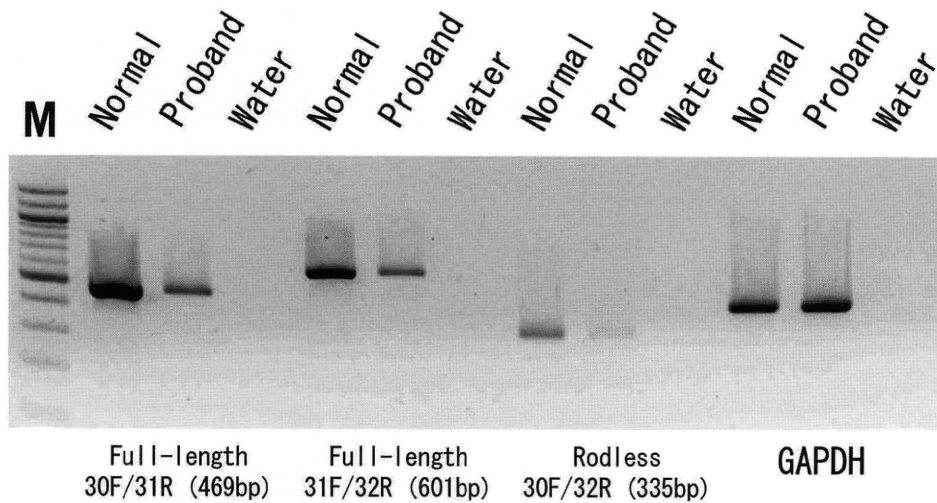


図6. mRNA レベルにおけるプレクチン発現量の解析

図3Bに記したプライマーを用いて、プレクチンのmRNAレベルの発現を確認した。患者由来線維芽細胞では、全長と rodless プレクチンをコードする転写産物がともに減少していた。