

201024047A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 玉井 克人

平成 23 (2011) 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. Cell Processing Isolator(CPI)の環境検査

江副 幸子 ..... 4

### 2. 脂肪由来間葉系幹細胞のサイトカイン産生誘導に関する研究

橋本 公二 ..... 6

### 3. 広範囲表皮壊死を伴う皮膚疾患における血中 HMGB1 濃度の検討

片山 一朗 ..... 10

### 4. 再生医療におけるマイコプラズマ否定試験の開発

金倉 讓 ..... 14

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 ..... 25



# I . 総括研究報告

## 表皮水疱症の根治的治療法開発に関する研究

研究代表者 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** 本研究班は、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、臨床的研究をすすめることを目的として組織され、平成 22 年度は、 $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}/c-kit$  骨髄間葉系幹細胞の多能性についてさらに詳細に検討すると共に、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。そして、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。

### 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  
片山一郎 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学  
金倉 謙 大阪大学大学院医学系研究科血液内科学

### 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 20 年度は骨髄由来間葉系細胞の皮膚構成細胞への分化能、および表皮水疱症マウスモデルへの移植による治療効果の検討、間葉系幹細胞移植の有効性、安全性を高めるために必要な基礎的研究を進めた。平成 21 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た。平成 22 年度は、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、本研究班メンバーを中心に、平成 21 年度に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プ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。さらに、玉井の研究成果を基に、同マウスを用いて同種間葉系幹細胞皮下移植の治療効果を検討した。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。

### C. 研究結果

玉井はマウス  $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}/c-kit$  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、玉井の共同研究者で、表皮水疱症の世界的権威である米国ジェファソン医科大学皮膚科教授 Jouni Uitto 博士から供与された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）に骨髄間葉系幹細胞を皮下移植して治療効果を検討した。しかし、同マウスは哺乳が困難なため生後数日で死亡してしまい、骨髄間葉系幹細胞移植治療効果の長期観察が困難であった。しかし、Uitto 教授のグループは新生マウス腹腔内に栄養液を投与することで長期生存を可能にし、我々の情報を基に骨髄間葉系幹細胞を皮下移植して、移植細胞により基底膜に VII 型コラーゲンが供給され、治療効果が得られることを確認した（私信）。一方我々は、GFP トランスジェニックマウス由来骨髄間葉系幹細胞をヌードマウス背部に作成した皮膚

潰瘍周囲に皮下移植し、潰瘍閉鎖後も移植細胞が長期間生着していること確認した。これらの研究成果を踏まえて、やはり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分担研究者と共に「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」実施プロトコールを作成した。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  $5 \times 10^5$  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康家族由来）を 2cm 間隔で皮下移植することとした。

完成したプロトコー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。

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。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ールを作成した。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。

他家骨髄間葉系幹細胞移植の際に生じ

る免疫応答制御は、治療の有効性・安全性を得る上で極めて重要であることは言うまでもない。骨髄間葉系幹細胞は生体内で免疫抑制作用、抗炎症作用を発揮することが知られ、この作用を基にして GVHD の治療として同種骨髄間葉系幹細胞移植臨床試験が進行している。今後、移植した間葉系幹細胞と患者の造血系細胞の相互作用についてより詳細なメカニズムが明らかになることで、間葉系幹細胞移植の長期治療効果について詳細な議論が可能になると期待される。

また、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。

現在厚生労働省に申請中の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、骨髄間葉系幹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。現在厚生労働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（研究代表者）

##### 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 the expression of level of the POU transcription factor Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci.*2010. Dec; 60 (3): 203-5 Epub 2010 Oct 20.
  4. Koga H, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Sakaguchi S, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto T. Exon 87 skipping of the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol.* 2010 Sep 20. [Epub ahead of print]
  5. Fujita H, Tamai K, Kawachi M, Saga K, Shimbo T, Yamazaki T, Kaneda Y. Methyl-beta cyclodextrin alters the production and infectivity of Sendai virus. *Arch Virol.* 2011 Feb 11. [Epub ahead of print]
  6. Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I. Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesion and recurrent mutation causing digital mutilation. *Br J Dermatol.* 2011. Mar 17. [Epub ahead of print]
  4. 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
  5. 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
- G. 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

## 2. 学会発表

1. Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino and Yasuhumi Kaneda. Contribution of PDGFR $\alpha$ -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, 2010, Washington, DC, USA.
2. 玉井克人, 教育講演: 未来皮膚科学: 皮膚は地球を救う, 第 109 回日本被皮膚科学会総会, 2010 年 4 月 16 日, 大阪
3. 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



## 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

Cell Processing Isolator (CPI) の環境検査

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**

再生医療で用いられる細胞製剤の細胞調製は、主にCell Processing Center (CPC) と呼ばれる施設で行われている。CPCは施設維持費や消耗品費用など、負担が小さくないため、再生医療の普及にはこの負担をいかに軽減するかが課題となる。そこで、完全閉鎖系で無菌的に細胞調製ができるCell Processing Isolator (CPI) の活用が注目される。本題では、CPIの活用にあたり環境検査の実施方法や細胞調製操作における問題点等について検討した。

**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」実施に先立ち、間葉系幹細胞培養のためのCPI環境検査の方法を検証する。

**B. 研究方法**

健常ドナーからインフォームドコンセントを得て採取したヒト骨髄細胞から間葉系幹細胞への誘導培養を行った。骨髄細胞の受入から培養、凍結保存までの一連の工程を数回行い、培養細胞の観察、培養上清の感染症検査（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験）を実施した。また、環境検査は付着菌検査と落下菌検査を各培養スケジュールの重要工程で実施した。

**C. 研究結果**

3回の試運転の中で、いずれのステップにおいても付着菌・落下菌検査で菌は検出されなかった。CPIは完全閉鎖作業空間であるが、細胞その他試薬などの出し入れは、付属のパスボックスを介して行われるため、パスボック

を介した細菌などの混入が最も懸念される。そこで、パスボックスを介した試薬等の出し入れ時における環境検査を重点的に行ったが、異常を認めなかった。細胞観察モジュールを用いた培養細胞の観察では、雑菌の混入も無く、形態異常や生存率の低下は認められなかった。また、同時に同じソースの細胞をCPC内の安全キャビネット、CO<sub>2</sub>インキュベーターで調製培養したものと比較した場合、細胞数や生存率、表面マーカーによる純度において有意な違いは認められなかった。

**D. 考察**

本プロジェクトは大阪大学医学部附属病院未来医療センターのCPIを用いる最初のプロジェクトとなる。そのため、実施に先立ち、CPIの無菌性の確保と培養環境の妥当性および環境検査の妥当性につき確認を行った。培養の環境としては、従来行ってきたCPCの安全キャビネットおよびCO<sub>2</sub>インキュベーターに全く遜色はなかった。また、パスボックスを介した試薬



等の出し入れに際しても無菌性の確保の上で問題はなかった。

作業の問題点として、グローブや作業スペースの狭さによる操作性の悪さが挙げられた。作業者のための効率的な訓練項目の設定をし、安全で安定的なCPIの活用を目標としたい。

#### 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」のコールドランを数回行い、感染症検査、CPIの環境検査を行った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differently affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells.

Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y.

Immunol Lett. 30;136:61-73. 2011

2. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1.

Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, Kanakura Y.

J Biol Chem. 285(41):31774-31782  
2010

##### 2. 学会発表

1. 15<sup>th</sup> Congress of Europe Hematology Association

BCR-ABL BUT NOT JAK2 V617F INHIBITS ERYTHROPOIESIS THROUGH THE RAS SIGNAL BY INDUCING P21<sup>CIP1/WAF1</sup>

Masahiro Tokunaga, Sachiko Ezoe, Itaru Mtsumura, Yuzuru Kanakura  
2010, 6, 10-13, Barcelona, Spain,

2. 第10回日本再生医療学会総会  
再生医療におけるCell Processing Isolator (CPI) の環境検査  
笹井雅弘、江副幸子等  
2011年3月1日-2日,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

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誘導に関する研究

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、そのサイトカイン誘導について経時的に検討した。FGF2 刺激により FGF2 は 3-12 時間後に遺伝子発現が約 2 倍に増強し、VEGF は 3-12 時間後で発現が増強され、HGF は 6 時間をピークに約 3 倍の遺伝子発現増強がみられた。TGF-beta1 刺激では FGF2 は 3-12 時間、TGF-beta1 は 12 時間後、VEGF は 3 時間後、IGF1 は 12 時間後をピークとして発現が増強した。FGF2 と TGF-beta1 との相乗効果はほとんど認めなかった。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が実現までにはかなりの期間を要すると思われる。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。昨年度までに、脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養することに成功し、そのサイトカイン産生について明らかにした。本年度は FGF2 と TGF-beta1 刺激によるサイトカイン産生誘導について検討を加えた。

**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℃にてコラゲナーゼ処理を行った。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%CO<sub>2</sub>、37℃にて培養した。シャーレ底面に付着した細胞が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剥離し、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 cm dish に播種し、サブコンフルエントに達した時点で FCS 非添加 DMEM に培地交換した。翌日再度培地交換し、FGF2、TGF-beta1 を添加し経時的に RNA を回収した。サイトカインの遺伝子発現について real time PCR にて解析した。

**C. 研究結果**

FGF2 添加により FGF2 の発現は 3-12 時間でやく 2.2 倍の発現増強がみられた。TGF-beta1 の誘導はみられず、KGF は 24 時間後には発現の低下がみられた。VEGF は 3 時間以降で 2 倍程度の発現誘導が持続し、HGF は 6 時間後に 3 倍程度の誘導がみられた。IGF1 は 3 時間以後徐々に発現の低下が

みられた。TGF-beta1 の刺激では FGF2 の発現は 3-12 時間でやく 2.4 倍の発現増強がみられた。TGF-beta1 は 12 時間後に 1.5 倍の誘導が認められ、KGF は 24 時間後には発現の低下がみられた。VEGF は 3 時間をピークとして 3.5 倍の発現誘導がみられ、HGF は 3 時間以後徐々に発現の低下がみられた。IGF1 は 12 時間後に 1.6 倍の誘導が認められた。FGF2 と TGF-beta1 との相乗効果は VEGF の発現に関してのみ 6-12 時間後の間で相乗効果が認められた (図)。

#### D. 考察

難治性皮膚潰瘍の再生医療として骨髄細胞を用いた治療が期待されている。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は、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、VEGF, FGF2, HGF といったおもに血管新生を誘導

するサイトカインの発現が増強することが明らかとなった。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による創傷治癒促進効果が増強されることが期待できる。

#### E. 結論

脂肪組織由来間葉系幹細胞は FGF2, TGF-beta により VEGF, FGF2, HGF などの血管新生促進因子の産生が亢進することが明らかとなった。今後は脂肪組織由来間葉系幹細胞の多分化能の検索 (角化細胞への分化、上皮化) が必要である。

#### 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

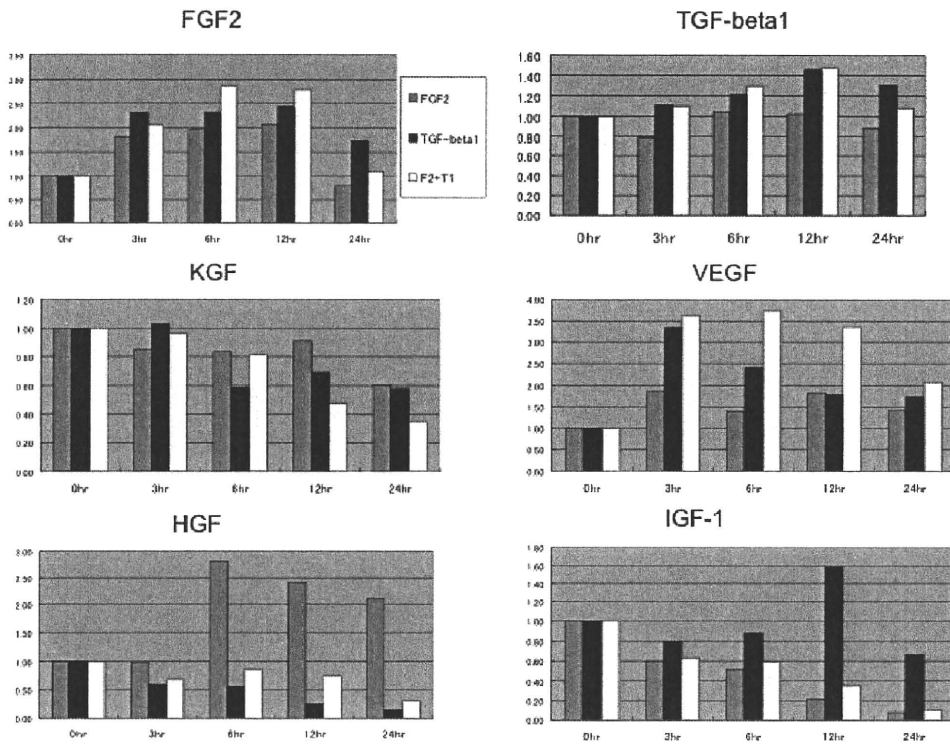
1. Shirakata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K.: Auto- and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 58:162-4, 2010
2. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto 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 $\gamma$  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
  3. Shirakata Y, Ishikawa M, Murakami S, Hashimoto K.: Successful treatment of severe pemphigus vulgaris with high-dose intravenous immunoglobulin. 9<sup>th</sup> 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 40<sup>th</sup> 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.
- 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 40<sup>th</sup> 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 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 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



### Cytokine mRNA Induction in Adipose-derived Stem Cells by FGF2(F2), TGF-beta1(T1)



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

広範囲表皮壊死を伴う皮膚疾患における血中 HMGB1 濃度の検討

研究分担者 片山一朗  
大阪大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** 表皮水疱症剥離表皮から血中に放出される HMGB1 は骨髄間葉系幹細胞を血中に動員し、さらに剥離表皮部に集積させて皮膚再生を誘導していると考えられる。本研究では表皮水疱症と同様に表皮剥離、壊死を伴う重症薬疹（ステイブンス・ジョンソン症候群；SJS、中毒性表皮壊死；TEN）やぶどう球菌性熱傷様皮膚症候群（SSSS）における血中 HMGB1 濃度を、表皮水疱症、表皮壊死を伴わない他の薬疹、健常人と比較検討した。その結果、HMGB1 の血中濃度は表皮水疱症で最も高く、次いで表皮壊死を伴う皮膚疾患で有意に上昇していることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

表皮水疱症（epidermolysis bullosa, EB）は、基底膜接着分子の遺伝的欠損により全身広範囲の表皮が剥離して水疱・潰瘍を形成する。最近玉井らは、剥離表皮が壊死する過程で血中に放出される HMGB1（high mobility group box 1）が、骨髄間葉系幹細胞を水疱部に動員して皮膚再生を誘導していることを、マウス GFP 骨髄移植モデルを用いて明らかにしている。

本研究では、表皮水疱症と同様に広範囲表皮壊死を伴う Stevens-Johnson syndrome（SJS）または toxic epidermolytic necrolysis（TEN）、staphylococcal scalded skin syndrome（SSSS）、表皮壊死を伴わない薬疹、健常ボランティアそれぞれにおける血中 HMGB1 濃度を測定し、劣性栄養障害型表皮水疱症（recessive dystrophic EB, RDEB）患者血中 HMGB1 濃度と比較検討した。

**B. 研究方法**

大阪大学医学部倫理委員会の承認を得て、EB、STS、TEN、SSSS に罹患した患者から得られた保存血清および同意を得た健常ボ

ランティア血清を献体とし、HMGB1 ELISA kit（株式会社シノテスト、東京、日本）を用いて血清 HMGB1 濃度を定量し、比較検討した。

**C. 研究結果**

HMGB1 血中濃度（単位 ng/ml）は RDEB が最も高く平均値 320（n=3）、SJS/TEN では平均値 17.1（n=11、最大値 45.38、最小値 9.3）、SSSS では 14.7（n=1）、その他の薬疹は平均値 3.9625（n=8、最大値 7.7、最小値 1.9）、健常人コントロールは平均値 3.85（最大値 9.2、最小値 1.2）であった。

**D. 考察**

玉井らの研究結果によると、マウスを用いた実験では剥離表皮の壊死過程で血中に放出される HMGB1 は、骨髄内に存在する血小板増殖因子受容体  $\alpha$ （platelet-derived growth factor alpha, PDGFR $\alpha$ ）陽性間葉系幹細胞を刺激して末梢血液中に動員し、さらに壊死組織部に誘導して組織再生を誘導していると考えられる。

今回の研究結果から、RDEB では、血中



HMGB1濃度は健常人コントロールの約80倍、SJS/TENでは約4.4倍、SSSSでは約3.8倍の上昇を認め、恒常的に全身皮膚のいたるところで表皮剥離、表皮壊死を来すRDEBは例外的に血中HMGB1の著明上昇を来していることが明らかとなった。一方、皮膚炎は伴うものの表皮壊死を来さない多形紅斑型薬疹、播種状紅斑丘疹型薬疹では健常人と有意差は無く、HMGB1は炎症ではなく表皮壊死を伴う病態の極めて鋭敏なマーカーとなりうること、重傷度（壊死程度）判定に有用であることが明らかとなった。

今後、ヒト骨髄間葉系幹細胞の動員に必要な血中HMGB1濃度が明らかになれば、表皮水疱症を始めとする種々の病態で生じる壊死組織の再生機序での骨髄間葉系幹細胞寄与程度が判定可能になる。将来的には、血中HMGB1濃度は低いが現局性に著明な組織壊死が生じている組織損傷の治療に、HMGB1投与による骨髄間葉系幹細胞血中動員を利用した生体内組織再生誘導医療が可能になると期待される。

#### E. 結論

表皮水疱症、重症薬疹では HMGB1 血中濃度が有意に上昇していた。HMGB1 は組織壊死の有無、重傷度の判定に有用であり、将来的には骨髄間葉系幹細胞動員医療の適応判定に有用となることが期待される。

#### 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. Terao M, Nishida K, Murota H, Katayama I : Clinical effect of tocoretinate on lichen and macular amyloidosis. *J Dermatol.* 2011 Feb; 38(2) : 179-84.  
doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00962.x. Epub 2010 Sep 29.
2. Nishioka M, Tanemura A, Yamanaka T, Umegaki N, Tani M, Katayama I, Takemasa I, Sekimoto M, Tomita K, Tamai N : A case of giant squamous cell carcinoma of the buttock possibly arose from syringocystadenoma and invaded to the rectum. *J Skin Cancer.* 2011; 2011:213406. Epub 2010 Oct 18.
3. Kira M, Katayama I : Superimposed linear psoriasis. *J Dermatol.* 2010 Dec;37(12):1063-1065. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00945.x.
4. Takahashi Y, Murota H, Tarutani M, Sano S, Okinaga T, Tominaga K, Yano T, Katayama I : A case of juvenile dermatomyositis manifesting inflammatory epidermal nevus-like skin lesions: unrecognized cutaneous manifestation of blaschkitis? *Allergol Int.* 2010 Dec; 59(4):425-428. Epub 2010 Oct 25.
5. Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, Azukizawa H, Tanemura A, Umegaki N, Terao M, Kotobuki Y, Katayama I : Impact of sedative and non-sedative antihistamines on the impaired productivity and quality of life in patients with pruritic skin diseases. *Allergol Int.* 2010 Dec; 59(4):345-354. Epub 2010 Aug 25.

6. Hirakawa S, Tanemura A, Mori H, Katayama I, Hashimoto K : Multiple lymphadenopathy as an initial sign of extramammary Paget disease. *Br J Dermatol.* 2011 Jan;164(1):200-203. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10052.x.
  7. Matsui S, Kitaba S, Itoi S, Kijima A, Murota H, Tani M, Katayama I: A case of disseminated DLE complicated by atopic dermatitis and Sjögren's syndrome: link between hypohidrosis and skin manifestations. *Mod Rheumatol.* 2011 Feb ; 21(1):101-105. Epub 2010 Sep 8.
  8. Shima Y, Kuwahara Y, Murota H, Kitaba S, Kawai M, Hirano T, Arimitsu J, Narazaki M, Hagihara K, Ogata A, Katayama I, Kawase I, Kishimoto T, Tanaka T: The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Dec; 49(12):2408-2412. Epub 2010 Sep 5.
  9. Nishioka M, Tanemura A, Yamanaka T, Tani M, Miura H, Asakura M, Tamai N, Katayama I: Pilomatrix carcinoma arising from pilomatricoma after 10-year senescent period: Immunohistochemical analysis. *J Dermatol.* 2010 Aug; 37(8): 735-739.
  10. Sumikawa Y, Ansai S, Kimura T, Nakamura J, Inui S, Katayama I: Interstitial type granuloma annulare associated with Sjögren's syndrome. *J Dermatol.* 2010 May; 37(5): 493-495. PMID: 20536658 [PubMed - indexed for MEDLINE]
  11. Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Kotobuki Y, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Yutsudo M, Ozono K, Katayama I: Cutaneous symptoms in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2010 Oct; 163(4): 881-884.
  12. Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol.* 2010 Jul; 11(7): 594-600.
  13. 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.
  14. Murota H, Takahashi A, Nishioka M, Matsui S, Terao M, Kitaba S, Katayama I Showering reduces atopic dermatitis in elementary school students. *Eur J Dermatol.* 2010 May-Jun; 20(3): 410-411
- Related citations
15. Murota H, Abd El-latif MA, Tamura T, Amano T, Katayama I: Olopatadine hydrochloride improves dermatitis score and inhibits scratch behavior in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 153 (2):121-132.
  16. Hanafusa T, Umegaki N, Yamaguchi Y, Katayama I: Good's syndrome (hypogammaglobulinemia with thymoma) presenting intractable opportunistic infections and hyperkeratotic lichen planus. *J Dermatol.* 2010 Feb; 37(2): 171-174.
  17. Abd El-Latif MA, Murota H, Terao M, Katayama I: Effects of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor and low-density

- lipoprotein on proliferation and migration of keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2010 Jul; 163(1):128-137.
18. Katayama I, Kotobuki Y, Kiyohara E, Murota H: Annular erythema associated with Sjögren's syndrome: review of the literature on the management and clinical analysis of skin lesions. *Mod Rheumatol.* 2010 Apr; 20(2): 123-129. E
19. Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Effects of nonsedative antihistamines on productivity of patients with pruritic skin diseases. *Allergy.* 2010 Jul; 65(7): 929-930.
20. Terao M, Murota H, Kitaba S, Katayama I: Tumor necrosis factor-alpha processing inhibitor-1 inhibits skin fibrosis in a bleomycin-induced murine model of scleroderma. *Exp Dermatol.* 2010 Jan; 19(1):38-43. Epub 2009 Sep 16.
21. Nishimura Y, Yamaguchi Y, Tomita Y, Hamada K, Maeda A, Morita A, Katayama I: Epithelioid sarcoma on the foot masquerading as an intractable wound for > 18 years. *Clin Exp Dermatol.* 2010 Apr; 35(3):263-268.
22. Kitaba S, Murota H, Yahata Y, Azukizawa H, Katayama I: Novel functional aspect of antihistamines: the impact of bepotastine besilate on substance p-induced events. *J Allergy (Cairo).* 2009; 2009:853687. Epub 2009 Jun 21.
23. 田中智子、横関博雄、片山一朗、金田眞理、田村直、菅野範英、吉岡洋、玉田康彦、四宮滋子: 原発性局所多汗症診療ガイドライン日本皮膚科学会雑誌 120, 1607-1625 2010
24. 山中隆嗣、種村篤、金田眞理、片山一朗、平川聡史、橋本公二: 他脳転移を来たした乳

Paget 癌の1例: 剖検結果と進展様式の考察 皮膚の科学 9 (3) : 229-236, 2010

#### 学会発表

1. Kotobuki Y, Katayama I: Proinflammatory Cytokines Regulate MITF-related Molecules Expression and Melanin Production in vitro. -Possible Pathogenesis of Vitiligo- 1st Vitiligo World Congress, Milano, Sep.23-25, 2010
2. Yajima T, Katayama I: Five Cases of Vitiligo Vulgaris Complicated by Adult Atopic Dermatitis. 1st Vitiligo World Congress, Milano, Sep.23-25, 2010
3. Itoi S, Katayama I: Five Cases of Vitiligo Vulgaris Complicated by Adult Atopic Dermatitis. 1st Vitiligo World Congress, Milano, Sep.23-25, 2010
4. 村上有香子、金田眞理、田中まり、片山一朗: 第109回日本皮膚科学会総会 (2010. 4)
5. 田中まり、金田眞理、片山一朗: 結節性硬化症の顔面血管線維腫に対するラパマイシン軟膏外用療法 第61回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (2010. 9) 大阪

#### 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（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

再生医療におけるマイコプラズマ否定試験の開発

研究分担者 金倉 謙 大阪大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

マイコプラズマ否定試験は、細胞・組織製剤の品質管理においても無菌試験、エンドトキシン検査とともに実施すべき非臨床安全性試験の項目として「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（1314号）にも明記されている。日本薬局方に定めるマイコプラズマ試験は、A.培養法、B.指標細胞を用いたDNA染色法、C.ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出の三法であり、そのうち2種を実施すべきであるとされている。

細胞・組織製剤においては製品の保存ができないことが殆どであり、完成とともにすみやかに投与される。そのため、培養法では投与後に結果が出ることになり、品質検査として適切とは言えない。一方、PCRは数時間で結果が出るため迅速性という意味では適切と言える。これまで局方に例示されているNested-PCRは極めて感度がよく、医薬品の品質検査には有用な検査であるが、再生医療における細胞成分、血清等が含まれる場合には高頻度に非特異的なバンドが検出され、特異性の面での問題がある。そこで我々は、細胞・組織製剤の品質検査のための非特異的なバンドがでないPCRの方法の開発を行っている。特異性に優れたプライマーの開発を行うこととした。

#### A. 研究目的

細胞・組織製剤の感染症試験として適切なマイコプラズマPCR検出法を開発する。

#### B. 研究方法

既にKuppeveldにより報告されているPCR法は、細胞、組織製剤の検出においても非特異的なバンドが出ず、特異性には優れているが、日局方によるNested-PCRに比べると感度が劣る。そのため、Kuppeveldのプライマーを1st PCRのプライマーとし、その内側に2nd PCRのプライマーを設定することでNested PCRを行い、各種マイコプ

ラズマ菌体を用い、感度と特異性について日局方との比較を行った。

#### C. 研究結果

Kuppeveldのプライマーの内側ではほとんどのマイコプラズマに共通する領域に5'→3'と3'→5'それぞれ2種類のプライマーを設定した。いずれのプライマーにおいても日局方によるNested PCRと同等の感度でbandを得ることができたが、非特異的バンドが検出された。血清を含む培地においてもそれらのバンドは検出なかったため、菌体の成分に反応するものと考えられた。アニーリングの温度を変化させ

て試行したが非特異的バンドの消失は認めなかった。

#### D. 考察

ここまでの試行においては非特異的バンドの出ない有効な2nd PCR プライマーを設定することはできなかった。今後はさらに、有用なプライマーを探すと同時に、培地の条件などにも検討を加える必要があると考える。

#### 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」の感染症検査におけるマイコプラズマ検出法の開発を行った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differently affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells.

Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y.

Immunol Lett. 30;136:61-73. 2011

2. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21<sup>CIP1/WAF1</sup>.

Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, Kanakura Y.

J Biol Chem. 285(41):31774-31782, 2010

##### 2. 学会発表

1. 15<sup>th</sup> Congress of Europe Hematology Association  
BCR-ABL BUT NOT JAK2 V617F INHIBITS ERYTHROPOIESIS THROUGH THE RAS SIGNAL BY INDUCING P21<sup>CIP1/WAF1</sup>

Masahiro Tokunaga, Sachiko Ezoe, Itaru Mtsumura, Yuzuru Kanakura  
2010, 6, 10-13, Barcelona, Spain,

#### 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表