

201024047B

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20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 玉井 克人

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I. 班員構成	1
II. 総合研究報告	
表皮水疱症の根治的治療法開発に関する研究	2
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
IV. ヒト幹細胞臨床研究実績計画書	
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	26

I . 班員構成

班 員 構 成

研究者名		研究実施場所	職名	主な研究分担
研究代表者	玉井 克人	大阪大学医学系研究科・遺伝子治療学・再生医学・皮膚科学	寄附講座教授	臨床研究プロトコールの作製・実施、治療効果および安全性評価、基礎研究の立案・実施
研究分担者	金倉 譲	大阪大学医学系研究科・血液・腫瘍内科・血液学	教授	臨床研究プロトコール作製、治療効果および安全性評価
	江副 幸子	大阪大学医学系研究科・血液・腫瘍内科・血液学、大阪大学医学部付属病院・未来医療センター	特任講師	臨床研究プロトコールの作製・実施
	片山 一郎	大阪大学医学系研究科・情報統合医学・皮膚科学	教授	臨床研究プロトコール作製、治療効果および安全性評価
	橋本 公二	愛媛大学・皮膚科学	教授	基礎研究の立案・実施

Ⅱ. 総合研究報告

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 20～22 年度の 3 年間に渡り研究を行った。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、骨髄間葉系幹細胞移植による治療の妥当性を検証した。また、移植骨髄細胞に対する免疫応答と、栄養障害型表皮水疱症皮膚における発癌リスクについて、それぞれ基礎的及び臨床的検討を行った。平成 21 年度は、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 $\text{Lin}^{-}\text{PDGFR}\alpha^{+}/\text{c-kit}^{-}$ 骨髄細胞が表皮細胞へと分化する事を見出した。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。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。また将来の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。これらの基礎的・臨床的研究成果を基に、「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た。平成 22 年度は、 $\text{Lin}^{-}\text{PDGFR}\alpha^{+}/\text{c-kit}^{-}$ 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
片山一朗 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

バックグラウンド)より骨髄を採取し、野生型同系妊娠マウス子宮壁(羊膜)上の卵黄囊静脈から胎生 14 日目の胎仔循環にマイクロニードルを用い 5×10^6 個の骨髄細胞を移植した(embryonic bone marrow transplantation: E-BMT)。E-BMT マウスの出生 12 週後に皮膚を生検し、GFP 陽性骨髄由来細胞による皮膚内細胞系譜を検討した。また、皮膚内 GFP 陽性細胞を含む皮膚細胞を培養し、免疫染色および RT-PCR により GFP 陽性細胞における発現蛋白を検討した。次いで、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスに E-BMT を施行し、骨髄細胞移植による表皮水疱症の病態改善効果を検討した。出生直後より皮膚に水疱を形成し、数日以内に致死となる VII 型コラーゲンノックアウトマウスに GFP 骨髄細胞を E-BMT し、皮膚病態および生存率に与える影響を検討した。

玉井、江副は、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、その実施に必要な臨床試験項目、技術的課題、倫理的課題を検討した。さらに、それらの検討を基にして、実施計画書の原案作成を開始した。

橋本は、骨髄細胞の採取・利用が困難な場合を想定し、骨髄以外の組織由来間葉系幹細胞を利用した治療法開発のための基礎的研究を進め、特に脂肪由来間葉系幹細胞の分離培養法を検討した。

片山は、重症栄養障害型表皮水疱症で最

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

平成 20 年度

玉井は、骨髄由来間葉系細胞の皮膚構成細胞への分化能を明らかにする目的で、GFP 遺伝子トランスジェニックマウス(C57B16

も重篤な合併症である皮膚有棘細胞癌について、臨床症例における情報を基に病態を研究した。

金倉は、他家間葉系幹細胞移植後の免疫応答制御のための基礎研究を進めた。特に今年度は、臍帯血由来造血幹細胞からBリンパ球への分化過程における間葉系幹細胞との相互作用を検討した。

平成 21 年度

玉井は、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 PDGFR α 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 (PDGFR α /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 PDGFR α 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、PDGFR α 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。

平成 22 年度

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。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、サブ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

平成 20 年度

玉井は、E-BMT マウス皮膚において、出生 12 週後の皮膚真皮内に多数の GFP 陽性細胞が存在すること、これら GFP 陽性細胞は、蛋白染色および遺伝子発現レベルで、線維芽細胞としての性質を持つことを明らかにした。即ち、E-BMT により移植骨髄細胞は皮膚に線維芽細胞を供給し得ることが明らかとなった。

栄養障害型表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲンノックアウトマウスに E-BMT を施行した結果、平均生存率が約 3 週間延長し、水疱形成が抑制され、基底膜部位に、VII 型コラーゲンが供給されることが確認された。

さらに、これら線維芽細胞を供給し得る骨髄内細胞分画を検討した結果、PDGFR α 陽性、CD44 陽性間葉系細胞分画中に含まれる可能性を見いだした。

玉井、江副は、上述した研究内容を踏まえて、骨髄間葉系幹細胞移植臨床試験実施計画書 (案) を作成した。

橋本は、より安全かつ効率的に間葉系幹細胞を採取する方法論確立を目指して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の採取・培養法を

検討し、ヒト脂肪組織から 10 代以上の継代培養が可能な間葉系細胞の分離・培養法を確立した。

片山は、皮膚有棘細胞癌を合併した重症栄養障害型表皮水疱症症例において、皮膚有棘細胞癌組織が産生する細胞増殖因子の探索を進め、癌組織で G-CSF および PTH-rP が極めて強く発現していることを明らかにした。

金倉は、臍帯血由来 CD34 陽性細胞から B リンパ球への分化過程に対し、間葉系幹細胞が分化誘導作用を持つ因子を供給していることを明らかにした。

平成 21 年度

玉井は、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 (Lin⁻/PDGFR α ⁺/c-kit⁻) 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 (図 1, 2)。

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。

平成 22 年度

玉井はマウス Lin⁻/PDGFR α ⁺/c-kit⁻骨髓間

葉系幹細胞の骨髓内局在を、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髓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ー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) に骨髓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、骨髓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髓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髓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髓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 5×10^5 個の培養骨髓間葉系幹細胞 (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(図3)。

D. 考察

この3年間の研究により、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、 $\text{PDGFR}\alpha$ 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、 $\text{PDGFR}\alpha$ 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。

一方、橋本は、脂肪細胞由来間葉系幹細胞の分離・培養法を確立したため、骨髄由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞の異同、および表皮水疱症治療における有効性・安全性の比較検討が可能になった。脂肪由来間葉系幹細胞は 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。将来的には、骨髄間葉系幹細胞採取が困難な場合に、代替え方法として脂肪由来間葉系幹細胞を利用することが可能になるかもしれない。

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。

重症劣性栄養障害型表皮水疱症では青年期から壮年期にかけて、皮膚有棘細胞癌を高率に合併する。片山らが明らかにした皮膚有棘細胞癌から産生される G-CSF や PTH-rP が、腫瘍の増殖や転移などの病態にどのような意味を持つかは不明であるが、腫瘍マーカーとしての有用性が明らかとなれば、骨髄間葉系幹細胞移植適応判定の際の重要な指標となるかもしれない。

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。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無く、このことは、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。

現在厚労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 (研究代表者)

論文発表

1. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 2008, 26:223-34.
2. Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Cold shock domain protein A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum response element. *Oncogene*. 2008, 27:1821-33.
3. Saga K, Tamai K, Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. *J Biotech*. 2008 Feb 1;133(3):386-94.
4. Nakajima K, Tamai K, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a Splice Variant Induced by High Calcium Concentration and Specifically Expressed in Normal Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008 128: 1336-9.
5. Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D. Vitamin D(3) inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. *J Dermatol Sci*. 2008 50: 155-8.
6. Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, Tabata Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Tatsu Y, Yumoto N, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med*. 2008, Apr 9. [Epub ahead of print]
7. Aizu T, Tamai K, Nakano H, Rokunohe D, Toyomaki Y, Uitto J, Sawamura D. Calcineurin/NFAT-dependent regulation of 230-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2008, 51: 45-51.
8. Chino T, Tamai K, Yamazaki T, Otsuru S, Kikuchi Y, Nimura K, Endo M, Nagai M, Uitto J, Kitajima Y, Kaneda Y. Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. *Am J Pathol*. 2008, 173:803-14.
9. Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, Tamai K, Sawamura D. Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol*. 2008, 35:336-40.
10. 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.
11. Tamai K, Kaneda Y, Uitto J.

Molecular therapies for heritable blistering diseases, Trends Mol Med. 2009 Jul;15(7):285-92.

12. 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.
13. 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.
14. 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.

2. 学会発表

1. 玉井克人, シンポジウム：骨髄由来ケラチノサイトによる皮膚再生、第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋
2. 玉井克人, 教育講演：創傷治療のニューウエーブ、第107回日本皮膚科学会総会2008年4月20日、京都
3. Katsuto Tamai, Symposium: Development of NF-kB decoy ointment and clinical trial for atopic dermatitis, International Symposium of Atopic Dermatitis, May 12th, 2008, Kyoto
4. 玉井克人, 基調講演：遺伝性皮膚疾患の根治的治療法開発、第23回角化症研究会、2008年8月2日、東京
5. Katsuto Tamai, Workshop for molecular and cellular therapy for EB, Bone marrow transplants: from mouse to human, bone marrow can be an essential source of mesenchymal and epithelial progenitor cells in EB skin, October 3rd, 2008, Madrid
6. Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino, Yasushi Kikuchi, Ichiro

Katayama, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda. Bone marrow replenishes *de novo* keratinocytes in the regenerating hair follicles via circulating blood. Concurrent Minisymposium, Epidermal Structure and Function, International Investigative Dermatology Meeting 2008. May 14-17, Kyoto

7. 玉井克人, 梅垣知子, 馬淵恵理子, 片山一朗, 金田安史, 棘融解性水疱を生じた非ヘルリツ接合部型表皮水疱症の一例、第30回水疱症研究会、2008.10.26, 東京
8. 玉井克人, 山崎尊彦, 知野剛直, 金田安史 骨髄幹細胞動員因子を利用した新しい皮膚再生誘導医療の開発 第15回分子皮膚科学フォーラム 2008.11.14-15, 京都
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Takenao Chino and Yasuhumi Kaneda. 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.
15. 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

16. 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
17. 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
18. 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：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：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
 - 5) 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 玉井 克人

◆平成20年度

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Otsuru S, Tamai K , Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y	Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway.	Stem Cells	26	223-34	2008
Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K , Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y	Cold shock domain protein A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum response element.	Oncogene	27	1821-33	2008
Saga K, Tamai K , Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y	Functional modification of Sendai virus by siRNA.	J Biotech	Feb 1;133(3)	386-94	2008
Nakajima K, Tamai K , Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D	Identification of Skn-1n, a Splice Variant Induced by High Calcium Concentration and Specifically Expressed in Normal Human Keratinocytes.	J Invest Dermatol	128	1336-9	2008
Yamamoto C, Tamai K , Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D	Vitamin D(3) inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis.	J Dermatol Sci	50	155-8	2008
Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, Tabata Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Tatsu Y, Yumoto N, Tamai K , Tomono K, Kaneda Y	Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties.	J Cell Mol Med	Epub ahead of print		
Aizu T, Tamai K , Nakano H, Rokunohe D, Toyomaki Y, Uitto J, Sawamura D	Calcineurin/NFAT-dependent regulation of 230-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene expression in normal human epidermal keratinocytes.	J Dermatol Sci	51	45-51	2008
Chino T, Tamai K , Yamazaki T, Otsuru S, Kikuchi Y, Nimura K, Endo M, Nagai M, Uitto J, Kitajima Y, Kaneda Y	Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance.	Am J Pathol	173	803-14	2008
Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, Murai T, Tamai K , Sawamura D	Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa.	J Dermatol	35	336-40	2008

◆平成21年度

著者名	論文題目	雑誌名	巻・項、西暦年号
Hayashi H, Nakagami H, Takami Y, Koriyama H, Mori M, <u>Tamai K</u> , 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.	29:909-14,2009
<u>Tamai K</u> , Kaneda Y, Uitto J.	Molecular therapies for heritable blistering diseases.	Trends Mol Med.	15:285-92,2009
Hashikawa K, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, <u>Tamai K</u> , 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.	56:66-8,2009
Kimura Y, Miyazaki N, Hayashi N, Otsuru S, <u>Tamai K</u> , 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]

◆平成22年度

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura Y., Miyazaki N., Eng M., Hayashi N., Eng M., Otsuru S., Tamai K., and Kaneda 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	10	1263-1270	2010
Shinbo T., Tanemura A., Yamazaki T., Tamai K., Katayama I., and Kaneda Y.	Serum Anti-BPAG1 Auto-Antibody Is a Novel Marker for Human Melanoma	PLOS ONE	5	E105666	2010
Takemoto H., Tamai K., Akasaka E., Rokunohara D., Takiyoshin N., Umegaki N., Nakajima K., Aizu T., Kaneko T., Nakano H., and Sawamura D.	Relation between the expression levels of the POU transcription factors Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation	Journal of Dermatological Science	60	193-205	2010
Koga H., Hamada T., Ishii N., Fukuda S., Sanbongi S., Nakaguchi S., Nakano H., Tamai K., Sawamura D., and Hashimoto T.	Exon 87 skipping of the COL7A1 gene is a dominant dystrophic epidermolysis bullosa	The Journal of Dermatology	38	489-492	2011
Fujita H., Tamai K., Kawachi M., Saga K., Shimbo T., Yamazaki T., and Kaneda Y.	Methyl-beta cyclodextrin alters the production and infectivity of Sendai virus	Arch Virol	Epub ahead of print	—	2011
Umegaki N., Nakano H., Tamai K., Mitsuhashi Y., Akasaka E., Sawamura D., and Katayama I.	Vörner type palmoplantar keratoderma: a novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesion and recurrent mutation causing digital mutilation	Br J Dermatol	Epub ahead of print	—	2011

研究分担者

”

金倉 讓

江副 幸子

◆平成20・21年度

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Shigeru Miyagawa, Goro Matsumiya, Toshihiro Funatsu, Masao Yoshitatsu, Naozumi Sekiya, Shinya Fukui, Takaya Hoashi, Masatsugu Hori, Hideki Yoshikawa, Yuzuru Kanakura , Jun Ishikawa, Katsuyuki Aozasa, Naomasa Kawaguchi, Nariaki Matsuura, Akira Myoui, Akifumi Matsuyama, Sachiko Ezo e, Hidehiro Iida, Hikaru Matsuda, Yoshiki Sawa.	Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: Report of a case.	Surg Today.	39	133-136	2009
Kentaro Fukushima, Itaru Matsumura, Sachiko Ezo e, Masahiro Tokunaga, Masato Yasumi, Yusuke Sato, Hirohiko Shibayama, Hiroyuki Tanaka, Atsushi Iwama, Yuzuru Kanakura .	FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells.	J Biol Chem.	Epub ahead of print		2009
Takafumi Yokota, Kenji Oritani, Stefan Butz, Koichi Kokame, Paul W Kincade, Toshiyuki Miyata, Dietmar Vestweber, Yuzuru Kanakura .	The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice.	Blood.	Epub ahead of print		2008
Kayako Isohashi, Mitsuaki Tatsumi, Ichiro Higuchi, Atsuo Inoue, Kazuya Nakajo, Jun Ishikawa, Eku Shimosegawa, Yuzuru Kanakura , Hironobu Nakamura, Jun Hatazawa.	18F-FDG-PET in patients with malignant lymphoma having long-term follow-up: staging and restaging, and evaluation of treatment response and recurrence.	Ann Nucl Med.	22	795-802	2008
Yusuke Sato, Itaru Matsumura, Hirokazu Tanaka, Sachiko Ezo e, Kentaro Fukushima, Masahiro Tokunaga, Masato Yasumi, Hirohiko Shibayama, Masao Mizuki, Takumi Era, Tsukasa Okuda, Yuzuru Kanakura .	AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells.	J Biol Chem.	283	30045- 30056	2008

Takafumi Yokota, Kenji Oritani, Karla P. Garrett, Taku Kouro, Makoto Nishida, Isao Takahashi, Michiko Ichii, Yusuke Satoh, Paul W. Kincade, <u>Yuzuru Kanakura</u> .	Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis.	J Immunol	181(9)	6061-6072	2008
Michiko Ichii, Kenji Oritani, Takafumi Yokota, Makoto Nishida, Isao Takahashi, Takahiro Shirogane, <u>Sachiko Ezo</u> , Saitoh N, Rie Tanigawa, Paul W. Kincade, <u>Yuzuru Kanakura</u> .	Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment.	Exp Hematol	36(5)	587-957	2008
Yamauchi A, Ikeda J, Nakamichi I, Kohara M, Fukuhara S, Hino M, <u>Kanakura Y</u> , Ogawa H, Sugiyama H, Kanamaru A, Aozasa K; Osaka Lymphoma Study Group.	Diffuse large B-cell lymphoma showing an interfollicular pattern of proliferation: a study of the Osaka Lymphoma Study Group.	Histopathology	52	731-737	2008
Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Suehisa E, Takano T, Hidaka Y, <u>Kanakura Y</u> .	Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/beta2-glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus.	Rheumatology (Oxford)	47(5)	684-689	2008