

		Head		Glu ¹⁶⁸	Rod	
				↓		
A						
	<i>H. sapiens</i>	140	IQEVTVNQSLLTPLNLQIDPSIQRVRT	EE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	<i>B. taurus</i>	141	IQEVTVNQSLLTPLNLQIDPTIQRVRT	EE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	<i>M. musculus</i>	134	IQEVTVNQSLLTPLNLQIDPTIQRVRT	EE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	<i>G. gallus</i>	146	IHEVTVNQSLLAPLKLQIDPEIQKVRT	QE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
B						
	K5	140	IQEVTVNQSLLTPLNLQIDPSIQRVRT	EE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	K1	152	IQEVTINQSLLOPLNVEIDPEIQKVK	SRE	REQIKSLN	NQFASFIDKVRFL
	K2e	150	IHEVSVNQSLLOPLNVKVDPEIQNVK	AOE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	K3	170	IQEVTINQSLLOPLNVEIDPQIGQV	KAOE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL
	K4	183	IQEVTINQSLLTPLHVEIDPEIQKVR	TEE	REQIKLLN	NKFASFIDKVQFL
	K6a	135	IQEVTVNQSLLTPLNLQIDPTIQRV	RAEE	REQIKTLN	NKFASFIDKVRFL

図5. 異なる種間 (K5) およびケラチンファミリーにおける Glu168 周囲のアミノ酸配列

Glu168は、異なる種間 (A) および他のケラチンファミリー間 (B) で高度に保存された部位であり、生理的に重要な機能を担うことが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植

研究分担者 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 骨髄間葉系幹細胞が表皮水疱症の剥離表皮部に集積し、表皮再生を誘導しているという我々が見いだした新たな生体内組織再生誘導メカニズムを基盤として、表皮水疱症患者剥離表皮部に他家骨髄間葉系幹細胞を移植することにより皮膚基底膜部に欠損していた接着分子の補充と剥離表皮再生誘導が同時に担保されると期待される。本年度は、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開始に向けて準備を進めた。

共同研究者

金田 安史 大阪大学遺伝子治療学

菊池 康 大阪大学皮膚科学

成し、平成22年度末にヒト幹細胞移植臨床研究を厚生労働省に申請した。

平成23年度は、ヒト幹細胞移植臨床研究実施計画実施に必要な業務を進めた。

A. 研究目的

先天性表皮水疱症は、皮膚基底膜接着分子の遺伝的欠損により日常生活の軽微な外力で表皮が基底膜部位で真皮から剥離し、生直後から一生涯、重傷熱傷様の難治性皮膚潰瘍を形成する遺伝性皮膚難病である。本邦表皮水疱症症例の過半数はVII型コラーゲン遺伝子異常により基底膜直下で真皮内水疱を形成する栄養障害型で、潰瘍治癒後の著明な瘢痕形成を特徴とし、重傷例では手指の棍棒状癒着、食道粘膜剥離に伴う食道瘢痕狭窄をきたし、経過とともに瘢痕癌を多発して致死性となることも少なくない。

我々は、VII型コラーゲン欠損マウスを用いた研究により、骨髄間葉系幹細胞が水疱部へと集積して剥離表皮の再生に寄与しているという新たな生体内再生誘導メカニズムの存在を明らかにした。水疱部位に集積した間葉系幹細胞は局所の炎症を抑制し、瘢痕形成も抑制され、さらに間葉系幹細胞の持つ再生誘導効果により機能的組織再生が誘導されることが期待される。これらの研究成果をもとにして、我々は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を作

B. 研究方法

平成23年度は、平成22年度末に提出した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」実施計画書および関連書類に関し、審査官からの疑義に対して回答しつつ必要書類の整備を進めるとともに、臨床研究実施のための準備を進めた。

C. 研究結果

審査官からの疑義に対する回答に関する複数回のやりとりを進めつつ実施計画書および関連文章を改訂した結果、平成23年8月22日に厚生労働大臣よりヒト幹細胞移植臨床研究実施の承認を得た。

昨年度（平成22年度）に大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会に提出し承認を得た実施計画書および関連文章に対し、厚生労働大臣の承認を得た最終版の改訂点をすべて表示し、最終決定書類と共に再度大阪大学医学部ヒト幹細胞倫理委員会に提出し、審査を受けて、平成23年11月13日に大阪大学医学部附属病院長より実施の承認を得た。

D. 考察

表皮水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究の承認が得られたことにより、ヒト幹細胞臨床研究の実施が可能となった。現在、臨床研究参加者のエントリーに向けて、大阪大学未来医療センターにおける最終受け入れ体制の準備を進めている。

今回の臨床研究は家族内の健常異性ドナーから骨髄血を採取して間葉系幹細胞を培養し、表皮水疱症患者の難治性皮膚潰瘍部周囲に皮下移植し、その安全性、有効性を評価する。平成24年度から6名の成人表皮水疱症患者を順次エントリーする予定である。

本研究の進展により、これまで治療が困難であった表皮水疱症に対する安全かつ有効な再生医療が確立することを期待する。

E. 結論

平成23年度の研究進展により、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が可能となった。

F. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y. PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 108 (16) : 6609-14.
2. 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*. 2011 38 (5) : 489-92.
3. Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Nishikawa Y, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA, Katayama I. The course of pregnancy and

childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]

4. 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 156 (6) : 995-1005. 2011
5. 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 165 (1) : 199-201. 2011. Mar 17. [Epub ahead of print]
6. Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y. Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J Cell Mol Med*. 2011 Aug 3. [Epub ahead of print]
7. Kiyohara E, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther*. 2011 Sep 8. [Epub ahead of print]

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 名称：組織再生を誘導するためのペプチドとその利用
出願番号：特願2011-98270
出願日：平成23年4月26日
2. 名称：組織再生を誘導するためのペプチドとその利用

出願番号：特願2011 - 219454

(国内優先権主張出願)

出願日：平成23年10月3日

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表皮水疱症治療を目指した骨髄由来間葉系幹細胞の
損傷皮膚集積メカニズムの解明

研究分担者 金田安史 大阪大学医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 今回我々はマウス移植皮膚片への骨髄間葉系幹細胞動員機序における SDF-1 α /CXCR4の関与について検討した。その結果、移植皮膚片の血管内皮細胞から SDF-1 α が放出されること、骨髄から移植皮膚へ動員された PDGFR・陽性間葉系幹細胞表面に CXCR4 が発現していること、CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 の投与により移植皮膚片に集積する間葉系幹細胞が有意に減少することから、移植皮膚片への間葉系幹細胞集積機序に SDF-1 α /CXCR4 システムが重要であることが明らかとなった。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学再生誘導医学寄附講座
飯沼 晋 旭川医科大学皮膚科

A. 研究目的

我々は、表皮水疱症剥離表皮や遊離皮膚移植片などの損傷皮膚再生機序における骨髄間葉系幹細胞の寄与を明らかにしつつある。その中で骨髄より血液中に放出された間葉系幹細胞が何故皮膚傷害部位に取りこまれるのか、その分子機構の解明を目指した。

B. 研究方法

GFP陽性の骨髄細胞をガンマー線照射したマウスに移植し、GFP-BMTマウスを作成した。このマウスに表皮水疱症モデルマウスの皮膚を移植し、移植片への骨髄細胞の集積を評価する系を作成した。移植片におけるモカイン stroma-derived factor 1 α (SDF-1 α) の発現を免疫染色法で確認し RT-PCR で定量した。また、その受容体 CXCR4 の阻害剤の全身投与による骨髄細胞の移植皮膚への集積の影響を調べた。

C. 研究結果

移植皮膚片の血管内皮細胞から SDF-1 α が

放出されること、骨髄から移植皮膚へ動員された PDGFR・陽性間葉系幹細胞表面に CXCR4 が発現していること、CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 の投与により移植皮膚片に集積する間葉系幹細胞が有意に減少することから、移植皮膚片への間葉系幹細胞集積機序に SDF-1 α /CXCR4 システムが重要であることが明らかとなった。

D. 考察

骨髄からの間葉系幹細胞の放出は HMGB1 により促進されることを報告した。HMGB1 が間葉系幹細胞に CXCR4 の発現を増強させることもわかった。また移植片部位では低酸素状態になり、これが SDF-1 α の発現を促進することもわかり、HMGB1/ SDF-1 α / CXCR4 axis が骨髄間葉系幹細胞の皮膚傷害部位への集積を起こす機構であろうと考えられる (図 1)。

E. 結論

SDF-1 α /CXCR4 システムを活性化させることにより表皮水疱症難治性皮膚潰瘍部位への骨髄間葉系幹細胞集積を増強させて潰瘍上皮化を促進する新しい皮膚潰瘍治療法の開発が可能になると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath J, Uitto J, Kaneda Y. PDGFR- α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 108, 6609-6614, 2011.

学会発表

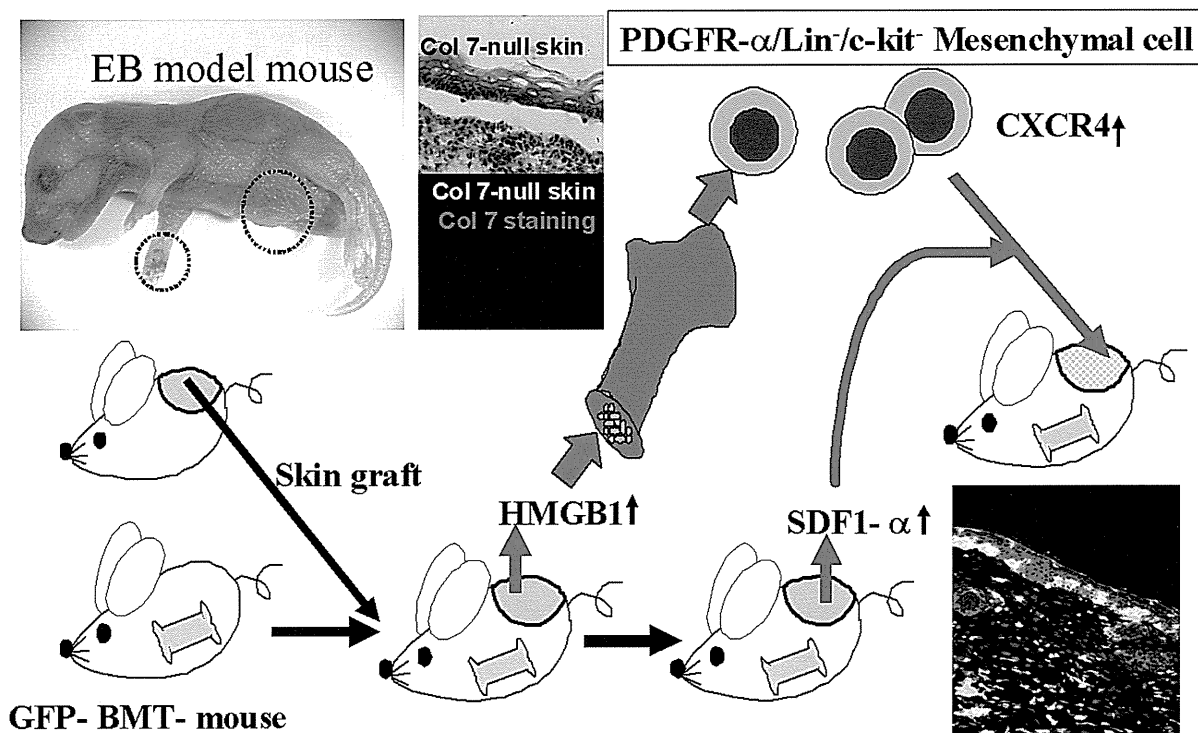
1. Tamai K, Chino T, Iinuma S, Manjo N, Fujita R, Yamazaki T, Kikuchi Y, Kaneda Y. HMGB1 mobilizes PDGFR- α -positive cells from bone marrow to regenerate injured epithelia. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会 2011年7月17日 福岡

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

図 1

Bone marrow replenishes epithelial/mesenchymal cells in EB skin through HMGB1/CXCR4/SDF1- α signaling axis



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、ブスルファンを含んだ前処置による同種造血幹細胞移植の有効性が米国より報告された。ブスルファンは血中濃度の有効域と中毒域が近く、また患者ごとの体内薬物動態のばらつきが大きいことが知られているが、ブスルファンの血中濃度測定を行える国内施設はごく限られており、我が国における実地臨床ではほとんど血中濃度測定に基づいた用量調節は行われていない。先天性表皮水疱症に対する安全な同種造血幹細胞移植法を開発するため、ブスルファン血中濃度測定系を確立した。

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

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。

しかし、本前処置で用いられる薬剤の一つであるブスルファンは血中濃度の有効域と中毒域が近く、また患者ごとの体内薬物動態のばらつきが大きいことが知られている。ブスルファンの血中濃度が至適濃度以下では十分なドナーの免疫抑制が得られず移植片の拒絶のリスクが高まる。一方、過量投与となると、ブスルファン特有の肝中心静脈閉塞症、肺障害等の治療関連合併症のリスクが高まる結果となるため、個々の患者の試験投与後の血中濃度解析によるC_{ss}（定常状態血中濃度）から指摘投与量（800～900 μg/L）を算出して、投与量を調節するtargeted dose adjustmentが安全性の高い前処置を行うためには重要である。しかしブスルファンの血中濃度測定を行える国内施設はごく限られており、残念ながら国内では実地臨床ではほとんど用いられていない。そこで我々は、先天性表皮水疱症に対する安全な同種造血幹細胞移植法を開発するため、名古屋大学医学部附属病院薬剤部との共同研究を通じて、ブスルファン血中濃度測定系を確立した（図1）。

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する、安全な同種造血幹細胞移植法を開発する。

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臨床計画を立案するとともに、前処置で用いる薬剤の一つであるブスルファンのHPLC法による血中濃度測定系を確立する。

C. 研究結果

1) ブスルファン血中濃度測定系の確立

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。彼らが採用しているブスルファン+フルダラビン+シ

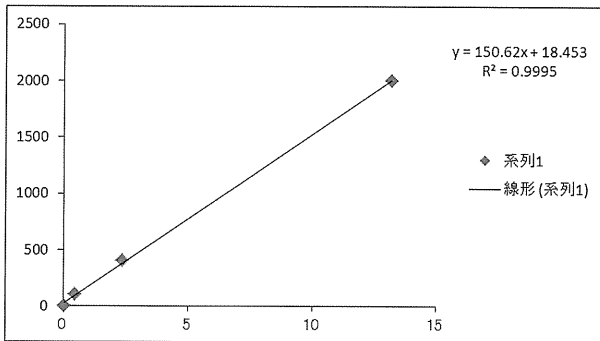


図1 院内ブスルファン血中濃度検量線 (HPLC法)

2) 倫理審査進行状況について

臨床研究計画を作成し、名古屋大学医学部倫理委員会に倫理審査を申請したところ、本症への移植については、保険適応が認められていないことから、診療費の負担方法についての説明が倫理委員会より求められた。小児患者に対する同種造血幹細胞移植には、1例あたりおよそ1,000万円の医療費を要するが、研究の実施にあたり、上記高額医療費を担保できる公的研究費の取得が必要であることから、厚生労働省科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業」を申請した。

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が必要である。本研究で確立したブスルファン血中濃度測定系は、本疾患における安全な同種造血幹細胞移植法の確立に大きく寄与するものと考えられる。

E. 結論

先天性表皮水疱症に対する安全な同種造血幹細胞移植法を開発するため、ブスルファン血中濃度測定系を確立した。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant*. 2011 ; 15 : 642-649.
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*. 2011 ; 17 : 516-523.
3. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatric blood & cancer*. 2011 (in press) .
4. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant*. 2011 ; 15 : 161-166.
5. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoim-

mune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. Bone marrow transplantation. 2011 (in press) .

6. Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. International journal of hematology. 2011 ; 93 : 779-781.

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

細胞積層技術を用いた脈管組込み培養皮膚作製法の開発

研究分担者 白方裕司 愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター 准教授

研究要旨 我々はこれまでに表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で、培養表皮シート、三次元培養皮膚移植、羊膜三次元培養皮膚、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚を開発し、表皮水疱症の治療に有効であることを明らかにしてきた。さらに次世代培養皮膚してナノ薄膜を用いて細胞を3次元積層化する「細胞積層法」を用いて線維芽細胞表面にナノ薄膜を形成し、カルチャーインサートに細胞を播種することで真皮層を形成することができることを報告した。このモデルをさらに進化させ、線維芽細胞層の間に脈管細胞を組み込むことにより脈管を含む真皮の再構成を試みた。

共同研究者

松崎 典弥 大阪大学大学院工学系研究科
明石 満 大阪大学大学院工学系研究科
平川 聡史 浜松医科大学

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。我々はこれまでに表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で、培養表皮シート、三次元培養皮膚移植、羊膜三次元培養皮膚、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚を開発し、表皮水疱症の治療に有効であることを明らかにしてきた。従来技術では、線維芽細胞を少量含んだコラーゲンゲルが真皮モデルとして用いられてきたが、真皮層に血管を含んだ培養皮膚の作製は確立できていない。これまでに新たな培養皮膚作製法として細胞積層技術を用いた真皮層の構築を開発し、角化細胞を重層化させることにより次世代培養皮膚の作製が可能であることを明らかにしている。細胞積層技術を血管内皮細胞に応用し、血管を含む真皮層の構築法の開発を目的とした。

B. 研究方法

正常ヒト血管内皮細胞は市販のものを購入し、専用の培地を使用した。正常ヒト線維芽細胞は10%DMEMで培養したものを使用した。線維芽細胞をフィブロネクチン溶液中で1分間反応させ洗浄・遠心操作を行った。引き続きゼラチン溶液中で1分間反応後洗浄・遠心操作を行った。フィブロネクチンコートとゼラチンコートを交互に繰り返し、それぞれ10回反応させた線維芽細胞を10%DMEMで懸濁し、カルチャーインサートへ播種した。まず線維芽細胞層を4層で作製し、その上に血管内皮細胞層を1層で形成し、さらに4層の線維芽細胞層を作製した。血管網のネットワークは抗CD31抗体で免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

4層の線維芽細胞層で血管内皮細胞をサンドイッチ培養することでインサート全面に網細血管様のネットワークが形成されているのを確認した。ネットワークが占める面積は約50-60%で、血管網間距離は50-150 μ mであった。共焦点レーザー顕微鏡での断面観察では間腔を形成していることが明らかとなった。

D. 考察

これまで、真皮層のコラーゲンゲル内に線維芽細胞と血管内皮細胞を供培養することで毛細血管網を真皮層に有する三次元培養皮膚の構築が報告されている。しかしコラーゲンゲルは作製工程が複雑であったり、均一な構造ができない等の課題があり、毛細血管網を均一かつ全体に構築することは困難であった。今回我々は細胞積層法を用いて血管内皮細胞をサンドイッチすることにより安定かつ再現性をもって血管網を有する真皮層の作製が可能であることを明らかにした。この技術は血管網を有する三次元培養皮膚を安定して作製する方法として有用な技術であると考えられる。

E. 結論

細胞積層法を用いることで血管網を有する真皮層を作製することが可能となった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K: Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 127:806-814, 2011
2. Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, Ikezawa Z, Iijima M, Shiohara T, Hashimoto K, Kamatani N, Nakamura Y: Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20:1034-41, 2011
3. Saleh MA, Ishii K, Kim Y, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M: Development of NC1 and NC2 domains of Type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of time course of epidermolysis bullosa acquisita patients *J Dermatol Sci.* 62:169-75, 2011
4. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shiraishi K, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, Sayama K: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced lymphatic endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 412:441-5, 2011
5. Tohyama M, Watanabe H, Murakami S, Shirakata Y, Sayama K, Iijima M, Hashimoto K: Possible involvement of CD14+ CD16+ monocyte lineage cells in the epidermal damage of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol.* 2011 in press
6. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K: Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol.* 2011 in press
7. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y: Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 65:50-7, 2012
8. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y: Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. *J Dermatol*

Sci. in press

9. 難波千佳、白方裕司、宮脇さおり、藤山幹子、花川 靖、白石 研、岡崎秀規、小田富美子、村上信司、橋本公二、佐山浩二、福田駿平、橋本 隆：Ⅶ型コラーゲンが抗原と思われた粘膜類天疱瘡の1例. 西日本皮膚科73:581-585,2011

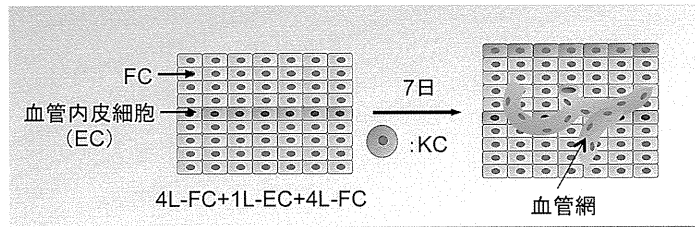
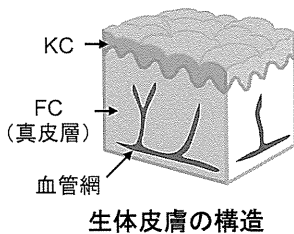
2. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Otani T, Hashimoto K, and Sayama K: Nuclear translocation of Bcl3 and p50 by IL-22 produces HB-EGF, IL-8, S100A7, and human β -defensin 2 in keratinocytes of psoriasis. The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain, 9/7-10, 2011.

学会発表

1. 白方裕司：皮膚の再構成と難病への応用. 難治性疾患克服研究事業、市民・研究者シンポジウム、難病研究と創薬2011、豊中市、10月16日、2011.

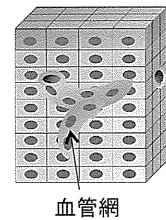
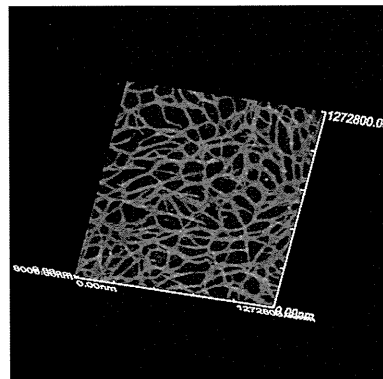
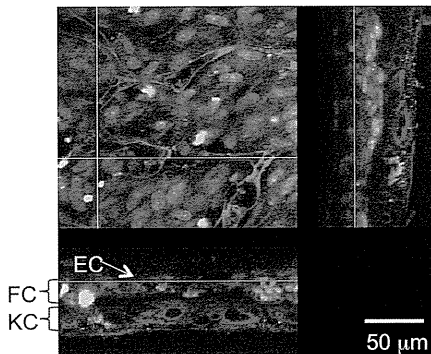
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

血管を含む次世代皮膚モデルの構築



● 共焦点レーザー顕微鏡による観察

赤: EC、緑: FC(線維芽細胞)、青: KC(ケラチノサイト)



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

細胞積層技術を用いた迅速培養皮膚作製法の開発

研究分担者 白方裕司 愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター 准教授

研究要旨 我々はこれまでに表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で、培養表皮シート、三次元培養皮膚移植、羊膜三次元培養皮膚、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚を開発し、表皮水疱症の治療に有効であることを明らかにしてきた。培養皮膚作製技術の簡易化、迅速化は改善してきているが未だ十分とはいえない。従来技術では、線維芽細胞を少量含んだコラーゲングルが真皮モデルとして用いられてきたが、作製工程が複雑、均一な構造ができない、コラーゲングルが薄くなるなどの問題があった。そこでこれらの問題点を解決すべく、ナノ薄膜を用いて細胞を三次元積層化する「細胞積層法」を用いて線維芽細胞表面にナノ薄膜を形成し、カルチャーインサートに細胞を播種することで真皮層を形成することを試みた。さらにその上面にケラチノサイトを接着させ、分化誘導させることで、真皮-表皮層を有する完全皮膚モデルの作製を試みたので報告する。

共同研究者

松崎 典弥 大阪大学大学院工学系研究科
明石 満 大阪大学大学院工学系研究科

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。我々はこれまでに表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で、培養表皮シート、三次元培養皮膚移植、羊膜三次元培養皮膚、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚を開発し、表皮水疱症の治療に有効であることを明らかにしてきた。培養皮膚作製技術の簡易化、迅速化は改善してきているが未だ十分とはいえない。従来技術では、線維芽細胞を少量含んだコラーゲングルが真皮モデルとして用いられてきたが、作製工程が複雑、均一な構造ができない、コラーゲングルが薄くなるなどの問題があった。そこでこれらの問題点を解決するために細胞積層法を用いた。細胞積層法とは、細胞接着タンパクであるフィブロネクチンとゼラチンの厚さ10nmのナノ薄膜を表面に作製して擬似的な細胞外マ

トリクス層を細胞表面に形成することで細胞間接着を誘起し、望みの細胞を望みの場所に配置した三次元積層組織を構築する手法である。細胞積層法を用いて線維芽細胞表面にナノ薄膜を形成し、カルチャーインサートに細胞を播種することで真皮層を形成し、さらにその上面にケラチノサイトを接着させ、分化誘導させることで、真皮-表皮層を有する完全皮膚モデルの作製を試みた。

B. 研究方法

正常ヒト皮膚角化細胞は無血清培養法にて培養したものをを用いた。正常ヒト線維芽細胞は10%DMEMで培養したものをを使用した。線維芽細胞をフィブロネクチン溶液中で1分間反応させ洗浄・遠心操作を行った。引き続いてゼラチン溶液中で1分間反応後洗浄・遠心操作を行った。フィブロネクチンコートとゼラチンコートを交互に繰り返し、それぞれ10回反応させた線維芽細胞を10%DMEMで懸濁し、カルチャーインサートへ播種した。1日後角化細胞を線維芽細胞層の上へ播種し2日後に空気曝露により重層化した。経時的

にサンプルを回収し組織学的に解析した。

C. 研究結果

細胞積層法を用いることで、1日で真皮層を形成することができた。インサートへ播種する線維芽細胞溶液の細胞密度と量を調整することで2~10層の線維芽細胞が重層化できた。次に線維芽細胞の層を2, 4, 8層で形成しその上に角化細胞を播種して空気曝露により重層化した。線維芽細胞層を欠く場合、すなわち直接インサートに角化細胞を播種した場合には明らかな表皮は形成されなかった。線維芽細胞層が2層、4層の場合でも良好な表皮は形成されなかったが、8層の線維芽細胞層の上に角化細胞を播種した場合には比較的良好な表皮の形成が認められた。

D. 考察

表皮水疱症に対する培養皮膚を用いたex vivo 遺伝子治療を開発するためには三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立と培養皮膚の改良が必要である。我々はこれまでに培養表皮シート、三次元培養皮膚移植、羊膜三次元培養皮膚、ゲルなし羊膜付き三次元皮膚というように培養皮膚に関して着実に改良してきているが培養皮膚作製技術の簡易化、迅速化は未だ十分とはいえない。従来技術では、線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルが真皮モデルとして用いられてきたが、作製工程が複雑、均一な構造ができない等の問題があった。今回用いた細胞積層法の場合、線維芽細胞層を1日で形成できるため作製工程の大幅な短縮が図られる。さらに思い通りの厚さで細胞層を形成できるメリットがある。角化細胞を播種して空気曝露により表皮の形成が確認できたことから今後の質的改良へとつながることが期待できる。

E. 結論

細胞積層法を用いることで新しい皮膚モデルを構築することができた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成23年度)

論文発表

1. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. : Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 127:806-814, 2011
2. Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, Ikezawa Z, Iijima M, Shiohara T, Hashimoto K, Kamatani N, Nakamura Y. : Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20:1034-41, 2011
3. Saleh MA, Ishii K, Kim Y, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M. : Development of NC1 and NC2 domains of Type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of time course of epidermolysis bullosa acquisita patients *J Dermatol Sci.* 62:169-75, 2011
4. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shiraishi K, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, Sayama K. : Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced lymphatic endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 412:441-5, 2011
5. Tohyama M, Watanabe H, Murakami S, Shirakata Y, Sayama K, Iijima M, Hashimoto K. : Possible involvement of

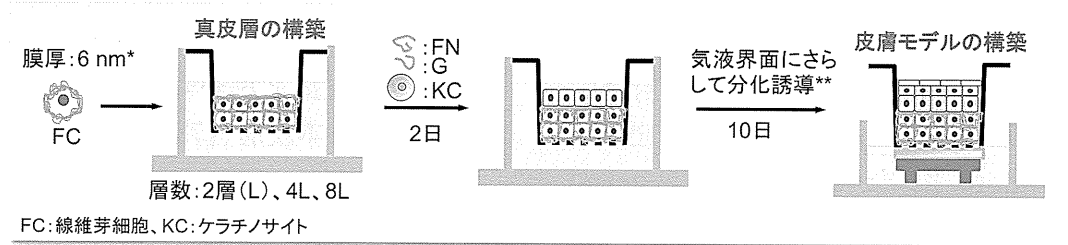
- CD14+ CD16+ monocyte lineage cells in the epidermal damage of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol*. 2011 in press
6. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K. : Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol*. 2011 in press
 7. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y. : Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. *J Dermatol Sci*. 65:50-7, 2012
 8. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y. : Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. *J Dermatol Sci*. in press
 9. 難波千佳、白方裕司、宮脇さおり、藤山幹子、花川 靖、白石 研、岡崎秀規、小田富美子、村上信司、橋本公二、佐山浩二、福田駿平、橋本 隆：Ⅶ型コラーゲンが抗原と思われた粘膜類天疱瘡の1例. *西日本皮膚科*73:581-585, 2011

学会発表

1. 白方裕司：皮膚の再構成と難病への応用. 難治性疾患克服研究事業、市民・研究者シンポジウム、難病研究と創薬2011、豊中市、10月16日、2011.
2. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Otani T, Hashimoto K, and Sayama K : Nuclear translocation of Bcl3 and p50 by IL-22 produces HB-EGF, IL-8, S100A7, and human β -defensin 2 in keratinocytes of psoriasis. The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain, 9/7-10, 2011.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

細胞積層法を用いた次世代皮膚モデルの構築



● 真皮層の構築

8L-FC



50 μm

● 皮膚モデルの構築

KC



4L-FC+KC



2L-FC+KC



8L-FC+KC



層数が制御された真皮層を有する皮膚モデルが構築できた

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表皮水疱症患者の外用療法に関する現状

研究分担者 青山裕美 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 准教授

研究要旨 平成22年4月より診療報酬制度の改訂に伴い、先天性表皮水疱症患者に対して、皮膚科か形成外科の医師は日常生活指導や皮膚処置について指導をし、病院・診療所は在宅難治性皮膚疾患処置指導管理料（500点）を月1回請求することが可能となった。さらに、病院・診療所は患者さんの皮膚病変やその他の合併症に対する指導に含めて、ガーゼ・包帯・絆創膏等の衛生材料を患者さんに提供している。在宅難治性皮膚疾患指導管理料を算定された症例では、自宅での皮膚処置に使用する特定保険医療材料（包帯・ガーゼ等は含まない）を病院・診療所が提供し、病院・診療所はその費用を診療保険請求することも可能となり、質の良い被覆剤を十分に使用できることになった。新しいシステムが開始され1年以上経過し、制度がどのように現場で運用されているかを調査し問題点を明らかにした。

共同研究者

岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

A. 研究目的

診療報酬制度の改訂にともない、表皮水疱症患者の外用治療の現状を調査し問題点があれば明らかにする。

B. 研究方法

a) 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班の研究分担者、研究協力者を通じて13施設の皮膚科で加療されている先天性表皮水疱症患者に関する聞き取り調査を行い、集計した。

b) 調査項目

疾患名、特定保険材料の内容と総額、衛生材料の支給量と金額、自費購入している材料費用について医療機関が把握している範囲内での調査を行った。

C. 研究結果

表皮水疱症重症12例、非重症21例を疾患名、特定保健医療材料、在宅難治性皮膚疾患指導管理料（実際の支給分費用）、自費購入分、

について表1にまとめた。さらに、その中から、代表的な2症例について外用剤使用に関して詳細な状況を表2に掲載した。

重症例は、ほとんどが劣性栄養障害型先天性表皮水疱症であった。特定医療材料は、26000円から240万円までばらつきがあった。患者は、毎日から隔日の処置が必要であるが、創面に固着しない特定医療材料は上皮化する速度が早く創傷治癒効果が高い反面、本来3日前後の貼付期間を想定して開発された製品でもあり、製品によっては周囲の材質が固くなっており、皮膚面に対して刺激になり使いづらいという感想もあった。

非重症型は、劣性栄養障害型が多いものの、単純型、病型不明も含まれる。特定医療材料の金額は14万円から4000円までと幅がある。在宅皮膚難病指導管理料（500点）を利用して提供したガーゼ・包帯・絆創膏等の衛生材料提供分はおおむね5000円であり、自費購入分は不明が多かった。

衛生材料は医療機関から支給する量に金額の上限を設定している施設が多いことがわかった。すなわち5000円から一万円分のガーゼ包帯などが支給され、それ以上に必要な場

合は自費で購入されている。その量は重症度に応じて異なっていた。

D. 考察

本来ガーゼと外用剤を併用して使用して創部の適度な湿潤を保つことが望ましい部位に対しても、ガーゼや包帯にかかる費用が毎月2万円以上かかる最重症例では、かかる費用を節約するために特定保険医療材料を多用するという、それぞれの材料の本来の使用方法が逆転した現象が生じている症例もある。重症例で特定医療材料の金額が低い症例では、衛生材料（ガーゼ）と外用剤にて処置をされているケースが多いことが推察される。創面の状態に応じ適切な被覆剤や衛生材料が適量使用できるシステムが必要である。病院から支給されるガーゼや包帯を含む材料は病院施設ごとに1万円から5000円までと規定されていることが多いことが明らかになった。指導管理料は指導に対しての報酬であるが、医療機関はその報酬分に応じた材料を支給するという考えを持っているようである。

E. 結論

特定医療材料が保険診療内で給付されることにより、特定医療材料は患者の自己負担なしに入手できるが、最重症例では、衛生材料を病院で規定された量では足りず不足分を自費購入するため、衛生材料にかかる費用が特定医療材料よりも嵩むことになる。結果的に外用剤とガーゼによる被覆が望ましい場合にも、創傷被覆剤で代用する、という現象が生じており問題と感じる。安価なガーゼ・包帯・絆創膏等の衛生材料が必要量提供できるシステムがあれば、特定医療材料を必要な部位に限定して使用し、外用剤とガーゼによる被覆を併用することによって、適材適所の外用療法を施行できるだけでなく、結果的に医療費の総額を抑えることが可能になる症例がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特許事項

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

表1 稀少難治性皮膚疾患患者の医療費（月額）

表皮水疱症 重症

	疾患名	特定保険医療材料	在宅難治性皮膚疾患指導管理料（実際の支給分費用）	自費購入分	総額（円）	備考
例1（A病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	384,930	約30,000	29,500	約45万	
例2（A病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	261,690	約30,000	約20,000	約30万	自費購入分のほかに、ボランティアからの補助あり
例3（B病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	160万～240万	10,000*	不明	161万～241万 + a	*1万円までと病院で決めている
例4（B病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	32万	10,000*	不明	33万 + a	*1万円までと病院で決めている
例5（C病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	52,000	4,994	約20,000	約8万	
例6（D病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	42,250	5,000*	不明	約5万 + a	*5,000円までと病院で決めている
例7（D病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	6,500	5,000*	不明	約1万 + a	*5,000円までと病院で決めている
例8（D病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	45,000	5,000*	23,000	約7万	*5,000円までと病院で決めている
例9（D病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	412,750	5,000*	12,000	約56万	*5,000円までと病院で決めている
例10（D病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	26,000	5,000*	10,000	約4万	*5,000円までと病院で決めている
例11（E病院）	劣性栄養障害型先天性表皮水疱症	2,908,395	5,000	殆ど無し**。	約290万	**ガーゼの代替としてメビレックス使用をしている部位が多く、ガーゼ、包帯費用が少なく、特定保険医療材料が高額になっていると考えられる。
例12（D病院）	接合部型先天性表皮水疱症	40,000	5,000*	5,000	約5万	*5,000円までと病院で決めている

表皮水疱症 非重症

	疾患名	特定保険医療材料	在宅難治性皮膚疾患指導管理料（実際の支給分費用）	自費購入分	総額（円）	備考
例1（H病院）	筋ジストロフィー-単純型	4,000	5,000	不明	約1万 + a	
例2（H病院）	単純型	0	5,000	不明	0.5万 + a	
例3（H病院）	単純型	8,000	5,000	不明	約0.6万 + a	
例4（H病院）	単純型	8,000	5,000	不明	約1.5万 + a	
例5（H病院）	単純型	0	5,000	不明	0.5万 + a	
例6（H病院）	単純型	4,000	5,000	不明	約1万 + a	
例7（H病院）	単純型	4,000	5,000	不明	約1万 + a	
例8（F病院）	表皮水疱症	0	6,823	0	約0.7万	
例9（F病院）	表皮水疱症	139,280	7,998	約3,000	約15万	
例10（F病院）	表皮水疱症	140,320	4,762	0	約14.5万	
例11（H病院）	幽門閉鎖-接合部型	0	5,000	不明	0.5万 + a	
例12（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	4,000	5,000	不明	約1万 + a	
例13（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	8,000	5,000	不明	約1.5万 + a	
例14（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	16,000	5,000	不明	約2万 + a	
例15（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	16,000	5,000	不明	約2万 + a	
例16（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	16,000	5,000	不明	約2万 + a	
例17（H病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	3,200	5,000	不明	約1万 + a	
例18（A病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	72,250	10,000*	約1,000	83,250	*1万円までと病院で決めている
例19（G病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	52,000	5,000*	不明	約6万 + a	*保険点数500点
例20（G病院）	劣性栄養障害型表皮水疱症	36,000	5,000*	不明	約4万 + a	*保険点数500点
例21（D病院）	栄養障害型先天性表皮水疱症	29,250	5,000*	10,000	約4.5万	*5,000円までと病院で決めている