

顆粒球吸着除去療法（GCAP）施行マニュアル（案）

1. 操作方法

1) 準備する物品

①主な物品

- ・ GCAPカラム（アダカラム[®]）
- ・ 血液ポンプ（アダモニター[®]、既存の血液ポンプでも代用可）
- ・ 血液回路（アダサーキット[®]、既存の回路を組み合わせて代用可）
- ・ 生理食塩液
 - ・ カラム洗浄用 1500mL
 - ・ プライミング（抗凝固剤*添加）用 500mL
 - ・ 返血用 100～300mL
- ・ 抗凝固剤持続注入用ポンプ
- ・ 留置針** 2本

②周辺物品

- ・ 駆血帯
- ・ 清拭用アルコール綿
- ・ 止血パッド
- ・ 消毒用イソジン
- ・ 鉗子 必要量
- ・ 血圧計、体温計
- ・ 延長チューブ 2本
- ・ 三方活栓 2個
- ・ 10mL注射シリンジ 2本

* GCAP 治療で使用する抗凝固剤の推奨使用量

抗凝固剤	プライミング 使用量	循環開始時使用量	循環治療中継続使用量
ヘパリンナトリウム	2000単位	1000～3000単位	500～1500単位
ヘパリンカルシウム	2000単位	1000～3000単位	500～1500単位
低分子ヘパリン	1000単位	出血傾向 有 15～20単位/kg 無 10～15単位/kg	出血傾向 有 7.5～10単位/kg 無 7.5単位/kg
メシル酸 ナファモスタット	20mg	—	20～50 mg/時

** GCAP 治療に用いられる留置針

- ・ 18G クランピングチューブ付メディカットカニューラ
- ・ 18G メディカットカニューラ イージークランプ
- ・ 18G メディカットカニューラ
- ・ 18G ハッピーキャス クランプタイプ 等

2) 治療の流れ

① 洗浄およびプライミング (約30分)

- ・ 血液回路の組み立て
- ・ 洗浄、プライミング、気泡抜き
- ・ 抗凝固剤持続注入用ポンプの設置、準備
- ・ リークテスト

② 治療 (約60分)

- ・ 一般状態の観察 (血圧、脈拍、体温)
- ・ 血管確保 (脱血側、返血側)、血液回路との接続
- ・ 抗凝固剤の注入。上表に示す循環開始時使用量をワンショットで注入しする。
- ・ 抗凝固剤ワンショット注入後、毎分30mL程度の流速でポンプを回転させ、約60分間 循環させる (処理血液量1800mL)。
- ・ 循環治療中抗凝固剤添加生理食塩液を継続して注入する。

③ 返血 (約15分)

- ・ 循環が終了したら返血用生理食塩液を流して血液回路およびカラム内の血液を返血する。
- ・ 抜針、止血。
- ・ 一般状態の観察 (血圧、脈拍、体温)

2. GCAP 治療中に注意すべき副作用

1) 炎症性腸疾患80例を対象とした治験で報告された副作用

頭痛 (4例)

発熱、立ちくらみ、めまい、吐気、顔面発赤、(留置針刺入部の) 疼痛、下肢皮疹、飛蚊症様眼症状、動悸、鼻閉、気分不良 (各1例)

2) 膿疱性乾癬15例を対象とした多施設共同試験で報告された副作用

頭痛とめまい、合併症（水疱性類天疱瘡）の悪化、肺陰影*（各1例）
（*GCAP開始2ヵ月前にインフリキシマブの投与歴、1ヶ月前から試験終了まで
メトトレキサートの併用あり）

以上の報告例は何れも重篤なものではなかった。

3. 留置針刺入部からの感染防禦

刺入部は可能な限り健常皮膚を選ぶ。

健常皮膚に刺入する場合はアルコール綿による清拭で充分である。刺入部の近くに膿疱やピランがある場合は、イソジンで消毒する。

4. 使用禁忌ならびに慎重に使用すべき患者

1) 使用禁忌

1. 顆粒球数 2000mm^3 以下の患者
2. 感染症を合併している患者及び合併が疑われる患者

2) 慎重に適用すべき患者

1. 肝障害、腎障害のある患者
2. 抗凝固剤に対する過敏症の既往のある患者
3. 赤血球減少（ $300\text{万}/\text{mm}^3$ ）、極度の脱水（赤血球数 $600\text{万}/\text{mm}^3$ 以上）、凝固系の高度亢進（フィブリノーゲン $700\text{mg}/\text{dL}$ 以上）のある患者
4. 重篤な心血管系疾患のある患者
5. 体温 38°C 以上の患者

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

接合部型表皮水疱症の原因タンパクである17型コラーゲンの分子イメージング

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
研究協力者 西江 渉 北海道大学病院皮膚科 講師

研究要旨 接合部型表皮水疱症（JEB）は、17型コラーゲン（COL17）やラミニン332等の遺伝子異常により発症する。COL17の機能不全により発症するJEBでは、水疱形成に加え毛髪の異常や皮膚萎縮、一部の患者では基底膜の重層化など多彩な臨床所見を認めるが、これらの発症機序の多くは不明である。今回、表皮真皮間接合の維持以外にCOL17が持つ生理機能を解明する目的で、COL17の分子イメージングを行った。COL17のN末端へGFPを融合したコンストラクトを作製し、COL17発現の無いJEB患者由来培養表皮基底細胞へレトロウイルスを用い遺伝子導入した。その結果、COL17は細胞膜全体に発現していたほか、lamellipodiaやfilopodia、trailing ridgeを含むmigration trackなど広範に分布していることが判明した。本研究により、COL17は表皮真皮間接合の維持に加え、細胞の遊走など様々な生理機能へ関与していることが推測された。

A. 研究目的

17型コラーゲン（COL17）は、表皮真皮間接合の維持に不可欠な分子であり、COL17A1遺伝子の変異により表皮水疱症の一種である接合部型表皮水疱症（JEB）が発症する。COL17遺伝子変異によるJEBでは、水疱形成に加え、脱毛、歯牙の形成異常、皮膚萎縮など種々の特徴的所見を呈する。また、近年、COL17の細胞外領域にR1303Q変異をホモで有する患者では、光線過敏や多形皮膚萎縮、爪甲の脱落に加え、基底膜の重層化を認めることが報告されている（本年度の研究報告1を参照）。従って、COL17には表皮真皮間接合の維持以外に、未知の機能を有している可能性が予想される。本研究の目的は、ヘミデスモゾームタンパクとしての機能に加え、未だ明らかにされていないCOL17の生理機能を解明することである。

B. 研究方法

COL17を発現しない表皮基底細胞へCOL17のN末端へGFPを融合したりコンビナントタンパク（GFP-COL17）を発現させ、COL17の動態をダイナミックに捉える計画を立てた。COL17発現（-）表皮基底細胞は、c.1285delA、Q1387Xの変異を持つJEB患者（図1）から皮膚生検を行い、Cnt-57培地（CellnTech）を用い、表皮基底細胞を培養樹立した。次に、COL17A1 cDNAをpRetroQ-AcGFP-C1ベクターへin-frameになるよう導入し、Ampho293細胞へ遺伝子導入しレトロウイルスを作製した（図2、a）。GFP-COL17発現レトロウイルスをJEB患者表皮基底細胞へ遺伝子導入後、GFP-COL17タンパクの発現を、細胞ライセートおよび培養上清タンパクを用いウエスタンブロットにより確認した。抗体は、COL17（NC16A-3, Bruckner-Tuderman先生より供与）を用いた。作製したGFP-COL17発現JEB細胞は、コンフォーカル顕微鏡（Olympus, FV1000）

でタイムラプス観察した。

C. 研究結果

細胞ライセートタンパクを用いたウエスタンブロットでは、GFPの分子量分増加した207kD付近にタンパク発現を認めた(図2、c)。一方、培養上清を用いると、細胞外領域タンパクの分子量に相当する120kDにタンパクを認めた(図2、c)。これらの結果から、COL17のN末端にGFPを融合させたタンパクが、COL17発現(-) JEB患者由来表皮基底細胞で細胞膜タンパクとして正しく発現していることが確認できた。実際に、GFP-COL17発現JEB細胞をコンフォーカル顕微鏡で観察したところ、細胞膜と細胞接着面にGFP蛍光を確認した(図2、a)。次にGFP-COL17発現JEB細胞をタイムラプス観察したところ、GFP-COL17は細胞膜全体に加え、lamellipodiaやfilopodia、trailing ridgeを含むmigration trackなど広範に分布することが判明した(図3)。

D. 考察

COL17は表皮真皮間接合に重要だが、本研究によって、ヘミデスモゾームのみならず、予想より広範に発現していることが明らかとなった。特に、lamellipodiaやfilopodia、migration track上にもCOL17の発現を認めたことは、表皮基底細胞の遊走にCOL17も関与している可能性を示唆している。実際、COL17のC末端にR1303Q変異を持つ表皮基底細胞の遊走能が著明に低下する点とも合致する(本年度の研究報告1を参照)。今後、COL17の切断を含むプロセッシングや接着斑関連タンパクとの相互作用など、新知見の解明が期待される。

E. 結論

表皮細胞が遊走する際、COL17は、lamellipodiaやfilopodia、migration trackのほか細胞膜全体にダイナミックに発現している。COL17は表皮真皮間接合の維持に加え、細

胞の遊走などへ関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成24年度)

論文発表

1. Ujiie H, Aoyagi S, Hirata Y, Osawa R, Shimizu H : Linear Congenital Molluscum Contagiosum on the Coccygeal Region. *Pediatr Dermatol*, in press.
2. Toyonaga E, Inokuma D, Abe Y, Abe R, Shimizu H : Pagetoid dyskeratosis with parallel ridge pattern under dermoscopy. *Arch Dermatol*, in press.
3. Toyonaga E, Abe R, Moriuchi R, Ito K, Abe Y, Shimizu H : Indomethacin for Refractory Infantile Eosinophilic Pustular Folliculitis *Arch Dermatol*, in press.
4. Tanahashi K, Sugiura K, Takeichi T, Takama H, Shinkuma S, Shimizu H, Akiyama M : Prevalent founder mutation c.736T > A of LIPH in autosomal recessive woolly hair of Japanese leads to variable severity of hypotrichosis in adulthood. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, in press.
5. Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fujita Y, Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H : Stevens-Johnson syndrome / toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
6. Qiao H, Abe R, Saito N, Fujita Y, Hayashi-Ujiie I, Wang G, Haga S, Wu C, Ohmiya Y, Ozaki M, Shimizu H : A method for intravital monitoring of human cells using a far-red luminescent probe in graft-versus-host disease model mice. *J Invest Dermatol*, in press.
7. Omiya W, Ujiie H, Akiyama M, Izumi K,

- Shigematsu A, Onozawa M, Shimizu H : Coexistence of pustular and vegetative pyoderma gangrenosum in a patient with myelodysplastic syndrome. *Eur J Dermatol*, in press.
8. Mizuno O, Yanagi T, Baba K, Yamane N, Inokuma D, Ito K, Akiyama M, Shimizu H : Sweet's syndrome presenting with vegetative nodules on the hands : relationship to neutrophilic dermatosis of the dorsal hands. *Int J Dermatol*, in press.
 9. Izumi K, Yanagi T, Akiyama M, Moriuchi R, Arita K, Shimizu H : Intractable erythematous plaques on the hands : palmo-plantar eosinophilic pustular folliculitis. *Int J Dermatol*, in press.
 10. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H : Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapson. *Eur J Dermatol*, in press.
 11. Hamade Y, Arita K, Toyonaga E, Inokuma D, Hamasaka K, Shimizu H : Lichen Planus in Childhood Showing Various Cutaneous Features. *Acta Derm Venereol*, in press.
 12. Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H : Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clin Exp Dermatol*, in press.
 13. Watanabe M, Ujiie H, Iitani MM, Abe R, Shimizu H : Psoriatic onycho-pachydermo-periostitis progressing to generalized pustular psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 37 : 683-685, 2012.
 14. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H : Type VII Collagen Deficiency Causes Defective Tooth Enamel Formation due to Poor Differentiation of Ameloblasts. *Am J Pathol* 181 : 1659-1671, 2012.
 15. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, Shimizu H : Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4 + T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol* 142 : 167-175, 2012.
 16. Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H : The beta 9 Loop Domain of PA-PLA (1) alpha Has a Crucial Role in Autosomal Recessive Woolly Hair / Hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 132 : 2093-2095, 2012.
 17. Sasaki K, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H : CYP 4 F22 is highly expressed at the site and timing of onset of keratinization during skin development. *J Dermatol Sci* 65 : 156-158, 2012.
 18. Saito N, Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H : Prolonged elevation of serum granulysin in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 167 : 452-453, 2012.
 19. Pohler E, Mamai O, Hirst J, Zamiri M, Horn H, Nomura T, Irvine AD, Moran B, Wilson NJ, Smith FJ, Goh CS, Sandilands A, Cole C, Barton GJ, Evans AT, Shimizu H, Akiyama M, Suehiro M, Konohana I, Shboul M, Teissier S, Boussofara L, Denguezli M, Saad A, Gribaa M, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Brown SJ, Goudie DR, Reversade B, Munro CS, McLean WH : Haploinsufficiency for AAGAB causes clinically heterogeneous forms of punctate palmoplantar keratoderma. *Nat Genet* 44 : 1272-1276, 2012.
 20. Omiya W, Fujita Y, Baba K, Shibaki A,

- Odani T, Shimizu H : Unusual cutaneous manifestations of Churg–Strauss syndrome mimicking Wells' syndrome. *Eur J Dermatol* 22 : 576–578, 2012.
21. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto–Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H : Circumscribed palmar hypokeratosis : correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. *Br J Dermatol* 167 : 221–222, 2012.
22. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H : Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis–ichthyosis–deafness syndrome. *Br J Dermatol* 166 : 903–905, 2012.
23. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H : Antibodies to Pathogenic Epitopes on Type XVII Collagen Cause Skin Fragility in a Complement–Dependent and –Independent Manner. *J Immunol* 188 : 5792–5799, 2012.
24. Koguchi H, Arita K, Yamane N, Shinkuma S, Shimizu H : Erythema Annulare Centrifugum–like Neutrophilic Dermatitis : Effects of Potassium Iodide. *Acta Derm Venereol* : 333–334, 2012.
25. Kabashima–Kubo R, Nakamura M, Sakabe JI, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y : A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th 1 frequency : Possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci* 67 : 37–43, 2012.
26. Horie K, Shinkuma S, Fujita Y, Ujiie H, Aoyagi S, Shimizu H : Efficacy of N–(3,4–dimethoxycinnamoyl) –anthranilic acid (tranilast) against eruptive syringoma : Report of two cases and review of published work. *J Dermatol* 39 : 1044–1046, 2012.
27. Homma E, Aoyagi S, Baba K, Iitani MM, Hata H, Shimizu H : Angiosarcoma on the lower abdominal wall associated with chronic lymphedema in an obese woman. *Int J Dermatol* 51 : 1520–1522, 2012.
28. Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, Shimizu H : Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters : IgA and IgG autoantibodies target both laminin–332 and type XVII collagen. *Br J Dermatol* 166 : 1116–1120, 2012.
29. Hayashi I, Abe R, Yanagi T, Abe Y, Shimizu H : Yellow nail syndrome : nail change reflects disease severity. *J Dermatol* 39 : 415–416, 2012.
30. Aoyagi S, Hata H, Homma E, Shimizu H : Sequential Local Injection of Low–Dose Interferon–Beta for Maintenance Therapy in Stage II and III Melanoma : A Single–Institution Matched Case–Control Study. *Oncology* 82 : 139–146, 2012.

学会発表

- Shinkuma S, Sawamura D, Kawasaki H, Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H : Long–term follow–up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. The 72nd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology. Raleigh, USA, 2012/5/9–12
- Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Shinkuma S, Tanabe M, Nakamura H, Shimizu H : Monoclonal human IgG 1 and IgG 4 against COL17 induce skin fragility in neonatal COL17–humanized mice in a

- complement-independent manner. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
3. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto-Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H : Circumscribed palmar hypokeratosis (CPH) : Correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. 3rd World Congress of Dermoscopy. Brisbane, Australia, 2012/5/17-19
 4. Nishie W, Ujiie H, Shinkuma S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H : Neoepitopes on the modified amino-terminus of the shed ectodomain of collagen XVII. 42nd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Venice, Italy, 2012/9/19-22
 5. Nishie W, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H : Role of collagen XVII in migrating keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
 6. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H : Antibodies to epitopes on collagen XVII (COL17) induce skin fragility in COL17-humanized mice in a complement-dependent and -independent way. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
 7. Moriuchi R, Nishie W, Shinkuma S, Fujita Y, Shimizu H : Characteristic dermoscopic features of pseudoxanthoma elasticum : dots in the yellow net. 3rd World Congress of Dermoscopy. Brisbane, Australia, 2012/5/17-19
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

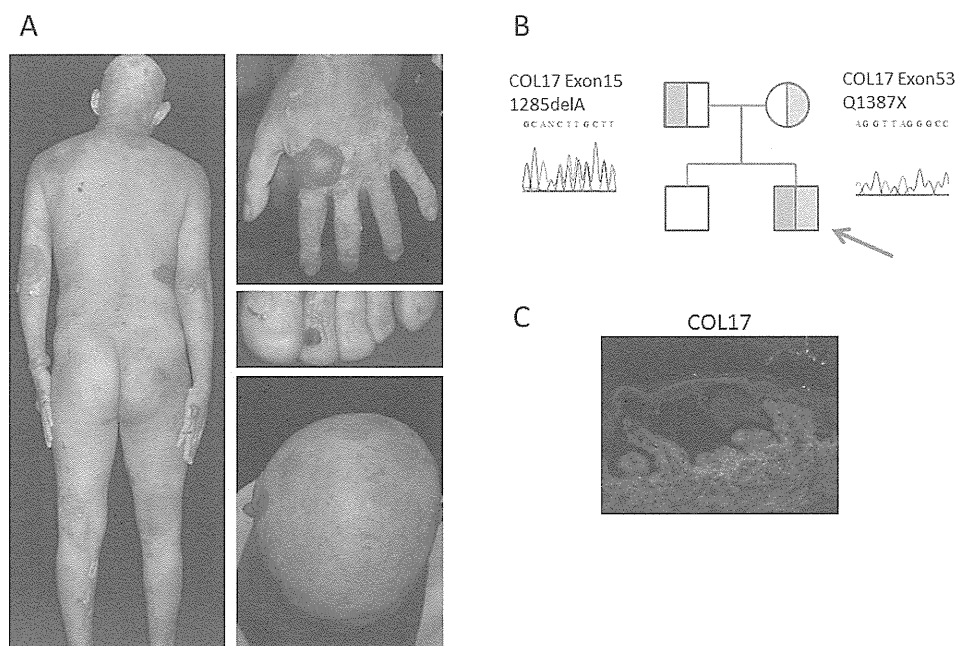


図1. COL17発現 (-) のJEB患者
(A) 頭髪は脱毛し全身に水疱形成と皮膚萎縮を認める。(B) 遺伝子変異検索の結果、c.1285delA、Q1387Xを認めた。(C) COL17 (抗体 : D20) の発現は消失している。

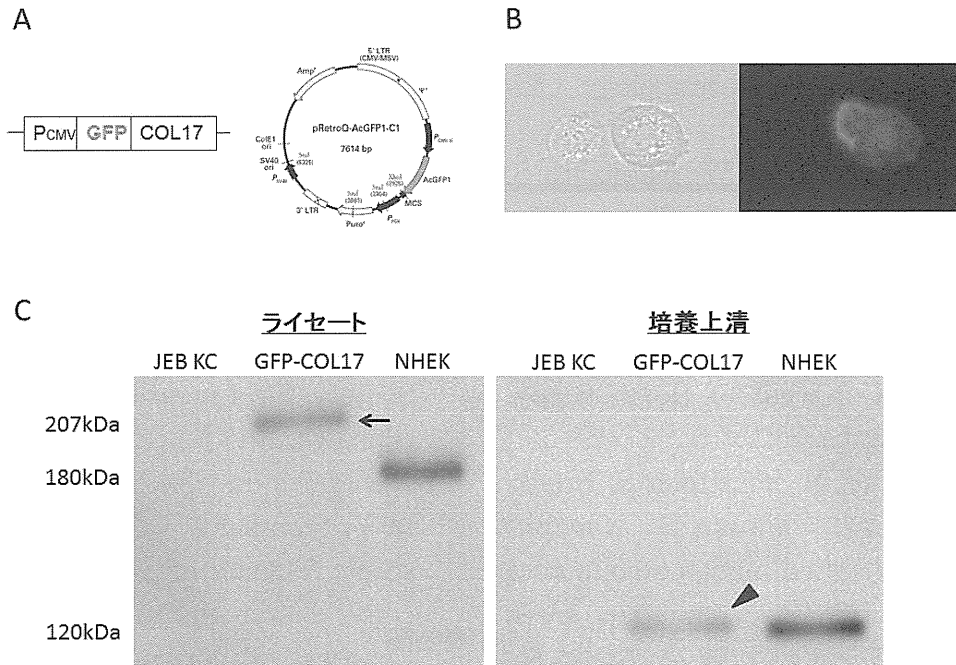


図2. JEB表皮基底細胞へ導入されたGFP-COL17タンパク発現

(A) GFP-COL17発現コンストラクト。(B) GFP-COL17を導入されたCOL17 (-) 表皮基底細胞の光学顕微鏡所見。左：フェーズコントラスト、右：GFP励起光。(C) ウェスタンブロットでは、GFP分の分子量が増えたタンパクをライセートに確認され (矢印)、培養上清では、120kDの細胞外領域タンパクを認める (矢頭)。従って、COL17タンパクは正しく膜へ輸送され細胞外領域がsheddingされていることが解る。

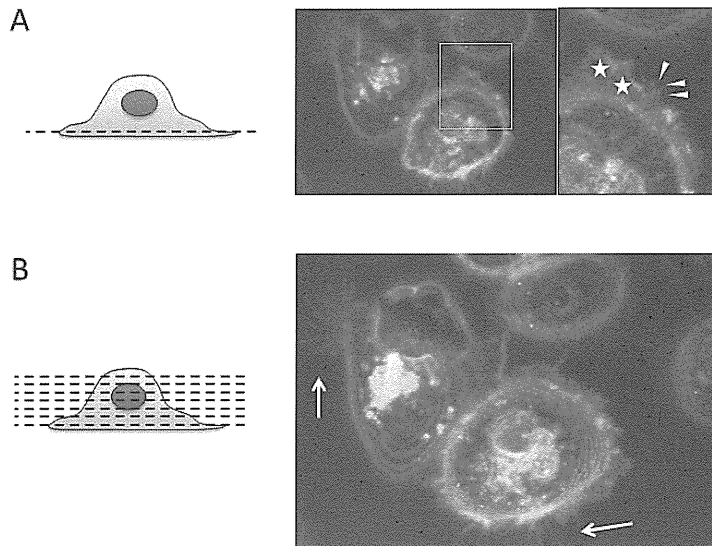


図3. JEB表皮基底細胞へ導入されたGFP-COL17タンパクのライブイメージング

(A) COL17は、lamellipodia (星) や filopodia (矢頭) にも発現している。(B) COL17は細胞膜全体と migration track (矢印) にも発現している。

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

接合部型表皮水疱症における表皮基底膜重層化の発症機序解明

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
研究協力者 西江 渉 北海道大学病院皮膚科 講師

研究要旨 表皮基底膜の重層化は、表皮水疱症の一型であるキンドラー症候群で特徴的所見であり、その他の病型では稀である。しかし、17型コラーゲン（COL17）の細胞外領域にホモで変異（c.3908 G>A, p.R1303Q）を有する接合部型表皮水疱症患者では、基底膜の重層化を認めることが最近報告されている。今回、同変異をホモで有する患者由来の表皮基底細胞を用い、基底膜重層化の病態メカニズム解明を試みた。その結果、COL17にR1303Q変異が生じると、細胞外領域C末端側の切断が阻害され、表皮基底細胞の遊走能が低下することが明らかとなった。実際に、遊走後に細胞外マトリクスへ足跡として残す migration track の量が増加していた。COL17のC末端は、ラミニン332などの細胞外タンパクと相互作用する部位であり、表皮細胞が遊走する際、COL17のC末端の切断は、細胞と細胞外マトリクスとの分離に重要な役割を担い、患者皮膚における基底膜の重層化の一因となっていることが推測された。

A. 研究目的

表皮水疱症は、原因タンパクにより、単純型（Keratin5、14等）、接合部型（Laminin332、Collagen17等）、栄養障害型（Collagen 7）、キンドラー症候群（FERMT1）の4型に分類されている（括弧内は主要なタンパクを示す）。これまでの研究により、多くの表皮水疱症について、遺伝子型～表現型の相関が明らかになったが、キンドラー症候群など、未だに発症機序が十分解明されていない疾患もある。生じる変異により予想外の臨床型を呈することもあるため、新規患者から基底膜タンパクの新たな機能が明らかになることもある。

本研究では、17型コラーゲン（COL17）の細胞外領域にホモで変異（c.3908 G>A, p.R1303Q）を有する接合部型表皮水疱症に着目した。COL17にR1303Q変異をホモで持つ接合部型表皮水疱症患者皮膚では、キンドラー症候群でみられるような基底膜の重層化が生じる。基底膜の重層化は、他の表皮水疱

症では稀であり、基底膜の構築におけるCOL17機能は未だ不明である。本研究では、基底膜構築におけるCOL17の生理機能を解明することが目的である。

B. 研究方法

COL17にR1303Q変異をホモで有する46才女性（岡山大学皮膚科より紹介）から皮膚生検を行い、基底膜タンパクが重層化していることを蛍光抗体法と電子顕微鏡学的観察により確認した（図1）。Cnt-57培地（CellnTech）を用い、表皮基底細胞を培養樹立後、ヘミデスモゾームおよびフォーカルコンタクトタンパクの発現を、以下の各抗体、COL17（NC16A-1, Bruckner-Tuderman先生より供与）、 β 1インテグリン（4B7R, Abcam）、Vinculin（V9131, Sigma）を用い、蛍光抗体法で解析した。細胞の遊走能は、5分ごと2時間タイムラプス観察を行い、Image J（Manual tracking）およびChemotaxis and Migration Toolソフトウェア（Ibidi）を用い

解析した。細胞接着能は、96 wellプレートへ4x10⁴/wellの細胞を播種1時間後に80%エタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色後OD.540nmで測定した。ECMタンパクは、20mMアンモニア溶液によって細胞を剥離後、プレート上に残った細胞外マトリクス (ECM) タンパクを直接 Laemmle's sample bufferで抽出し、SDS-PAGE後、ウエスタンブロットを施行した。抗体は、COL17 (NC16A-3, Bruckner-Tuderman 先生より供与)、ラミニン332 (H300、D4B5)を用いた。プラスミンによるCOL17の細胞外領域の切断は、培養上清へ0.025mg/mlのリコンビナントプラスミンを加え、1時間培養後に培地を回収し、アミコンウルトラ (ミリポア)を用い濃縮後、ウエスタンブロットを施行した。

C. 研究結果

COL17にR1303Q変異をホモで有する培養表皮基底細胞は、形態的にはNHEKsと著変なく、接着能の低下も認めなかったが、遊走能は低下していた (図2)。蛍光抗体法による観察では、Vinculinの発現は著変見られなかったが、 β 1インテグリンとCOL17が、細胞辺縁に一樣に細線維状にmigration trackとして発現していた (図3)。変異細胞ECM中のLaminin332のプロセッシングはNHEKsと著変なかったが、発現量は増加していた (図4、a)。興味深いことにR1303Q細胞では、97kDのCOL17細胞外領域タンパクを認めず (図4、a)、変異によりC末端の切断が阻害されることが判明した。切断に関わるプロテアーゼは不明であるが、プラスミンがCOL17のC末端を切断することが知られているが (J Invest Dermatol 129:1730, 2009)。培養上清へプラスミンを添加したところ、R1303Q変異を持つ培養表皮細胞でも97kDのポリペプチドを認めた (図4、b)。従って、プラスミン以外のプロテアーゼが、COL17のC末端の切断に関わっていることが示唆された。

D. 考察

COL17のC末端は、ラミニン332などの細胞外タンパクと相互作用する部位である。COL17は、C末端ほかNC16A領域内など複数個所で切断されることが知られているが、その生理機能は全く解明されていない。今回の研究によって、C末端の切断が表皮基底細胞の正常な遊走と基底膜の構築に必須であることが明らかとなった。

E. 結論

表皮細胞が遊走する際、COL17のC末端の切断は、細胞とECMとの解離に重要である。その機能障害は細胞遊走能の低下をきたし、患者皮膚における基底膜の重層化の一因となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成24年度)

論文発表

1. Ujiie H, Aoyagi S, Hirata Y, Osawa R, Shimizu H: Linear Congenital Molluscum Contagiosum on the Coccygeal Region. *Pediatr Dermatol*, in press.
2. Toyonaga E, Inokuma D, Abe Y, Abe R, Shimizu H: Pagetoid dyskeratosis with parallel ridge pattern under dermoscopy. *Arch Dermatol*, in press.
3. Toyonaga E, Abe R, Moriuchi R, Ito K, Abe Y, Shimizu H: Indomethacin for Refractory Infantile Eosinophilic Pustular Folliculitis *Arch Dermatol*, in press.
4. Tanahashi K, Sugiura K, Takeichi T, Takama H, Shinkuma S, Shimizu H, Akiyama M: Prevalent founder mutation c.736T>A of LIPH in autosomal recessive woolly hair of Japanese leads to variable severity of hypotrichosis in adulthood. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, in press.
5. Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fu-

- jita Y, Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H: Stevens–Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
6. Qiao H, Abe R, Saito N, Fujita Y, Hayashi-Ujiie I, Wang G, Haga S, Wu C, Ohmiya Y, Ozaki M, Shimizu H: A method for intravital monitoring of human cells using a far-red luminescent probe in graft-versus-host disease model mice. *J Invest Dermatol*, in press.
 7. Omiya W, Ujiie H, Akiyama M, Izumi K, Shigematsu A, Onozawa M, Shimizu H: Coexistence of pustular and vegetative pyoderma gangrenosum in a patient with myelodysplastic syndrome. *Eur J Dermatol*, in press.
 8. Mizuno O, Yanagi T, Baba K, Yamane N, Inokuma D, Ito K, Akiyama M, Shimizu H: Sweet's syndrome presenting with vegetative nodules on the hands: relationship to neutrophilic dermatosis of the dorsal hands. *Int J Dermatol*, in press.
 9. Izumi K, Yanagi T, Akiyama M, Moriuchi R, Arita K, Shimizu H: Intractable erythematous plaques on the hands: palmo-plantar eosinophilic pustular folliculitis. *Int J Dermatol*, in press.
 10. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H: Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapson. *Eur J Dermatol*, in press.
 11. Hamade Y, Arita K, Toyonaga E, Inokuma D, Hamasaka K, Shimizu H: Lichen Planus in Childhood Showing Various Cutaneous Features. *Acta Derm Venereol*, in press.
 12. Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H: Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clin Exp Dermatol*, in press.
 13. Watanabe M, Ujiie H, Iitani MM, Abe R, Shimizu H: Psoriatic onycho-pachydermoperiostitis progressing to generalized pustular psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 37: 683–685, 2012.
 14. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H: Type VII Collagen Deficiency Causes Defective Tooth Enamel Formation due to Poor Differentiation of Ameloblasts. *Am J Pathol* 181: 1659–1671, 2012.
 15. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, Shimizu H: Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol* 142: 167–175, 2012.
 16. Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H: The beta9 Loop Domain of PA-PLA(1)alpha Has a Crucial Role in Autosomal Recessive Woolly Hair/Hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 132: 2093–2095, 2012.
 17. Sasaki K, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H: CYP4F22 is highly expressed at the site and timing of onset of keratinization during skin development. *J Dermatol Sci* 65: 156–158, 2012.
 18. Saito N, Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H: Prolonged elevation of serum granulysin in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 167: 452–453, 2012.
 19. Pohler E, Mamai O, Hirst J, Zamiri M,

- Horn H, Nomura T, Irvine AD, Moran B, Wilson NJ, Smith FJ, Goh CS, Sandilands A, Cole C, Barton GJ, Evans AT, Shimizu H, Akiyama M, Suehiro M, Konohana I, Shboul M, Teissier S, Boussofara L, Denguezli M, Saad A, Gribaa M, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Brown SJ, Goudie DR, Reversade B, Munro CS, McLean WH: Haploinsufficiency for AAGAB causes clinically heterogeneous forms of punctate palmoplantar keratoderma. *Nat Genet* 44: 1272-1276, 2012.
20. Omiya W, Fujita Y, Baba K, Shibaki A, Odani T, Shimizu H: Unusual cutaneous manifestations of Churg-Strauss syndrome mimicking Wells' syndrome. *Eur J Dermatol* 22: 576-578, 2012.
21. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto-Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H: Circumscribed palmar hypokeratosis: correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. *Br J Dermatol* 167: 221-222, 2012.
22. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H: Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br J Dermatol* 166: 903-905, 2012.
23. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Antibodies to Pathogenic Epitopes on Type XVII Collagen Cause Skin Fragility in a Complement-Dependent and -Independent Manner. *J Immunol* 188: 5792-5799, 2012.
24. Koguchi H, Arita K, Yamane N, Shinkuma S, Shimizu H: Erythema Annulare Centrifugum-like Neutrophilic Dermatitis: Effects of Potassium Iodide. *Acta Derm Venereol*: 333-334, 2012.
25. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe JI, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci* 67: 37-43, 2012.
26. Horie K, Shinkuma S, Fujita Y, Ujiie H, Aoyagi S, Shimizu H: Efficacy of N-(3,4-dimethoxycinnamoyl)-anthranilic acid (tranilast) against eruptive syringoma: Report of two cases and review of published work. *J Dermatol* 39: 1044-1046, 2012.
27. Homma E, Aoyagi S, Baba K, Iitani MM, Hata H, Shimizu H: Angiosarcoma on the lower abdominal wall associated with chronic lymphedema in an obese woman. *Int J Dermatol* 51: 1520-1522, 2012.
28. Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, Shimizu H: Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen. *Br J Dermatol* 166: 1116-1120, 2012.
29. Hayashi I, Abe R, Yanagi T, Abe Y, Shimizu H: Yellow nail syndrome: nail change reflects disease severity. *J Dermatol* 39: 415-416, 2012.
30. Aoyagi S, Hata H, Homma E, Shimizu H: Sequential Local Injection of Low-Dose Interferon-Beta for Maintenance Therapy in Stage II and III Melanoma: A Single-Institution Matched Case-Control Study. *Oncology* 82: 139-146, 2012.

学会発表

1. Shinkuma S, Sawamura D, Kawasaki H,

- Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H: Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. The 72nd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology. Raleigh, USA, 2012/5/9-12
2. Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Shibaki A, Shinkuma S, Tanabe M, Nakamura H, Shimizu H: Monoclonal human IgG1 and IgG4 against COL17 induce skin fragility in neonatal COL17-humanized mice in a complement-independent manner. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
3. Nishimura M, Nishie W, Nakazato S, Nemoto-Hasebe I, Fujita Y, Shimizu H: Circumscribed palmar hypokeratosis (CPH) : Correlation between histopathological patterns and dermoscopic findings. 3rd World Congress of Dermoscopy. Brisbane, Australia, 2012/5/17-19
4. Nishie W, Ujiie H, Shinkuma S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Neoepitopes on the modified amino-terminus of the shed ectodomain of collagen XVII. 42nd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Venice, Italy, 2012/9/19-22
5. Nishie W, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Role of collagen XVII in migrating keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
6. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H: Antibodies to epitopes on collagen XVII (COL17) induce skin fragility in COL17-humanized mice in a complement-dependent and -independent way. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, 2012/12/07-09
7. Moriuchi R, Nishie W, Shinkuma S, Fujita Y, Shimizu H: Characteristic dermoscopic features of pseudoxanthoma elasticum: dots in the yellow net. 3rd World Congress of Dermoscopy. Brisbane, Australia, 2012/5/17-19
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

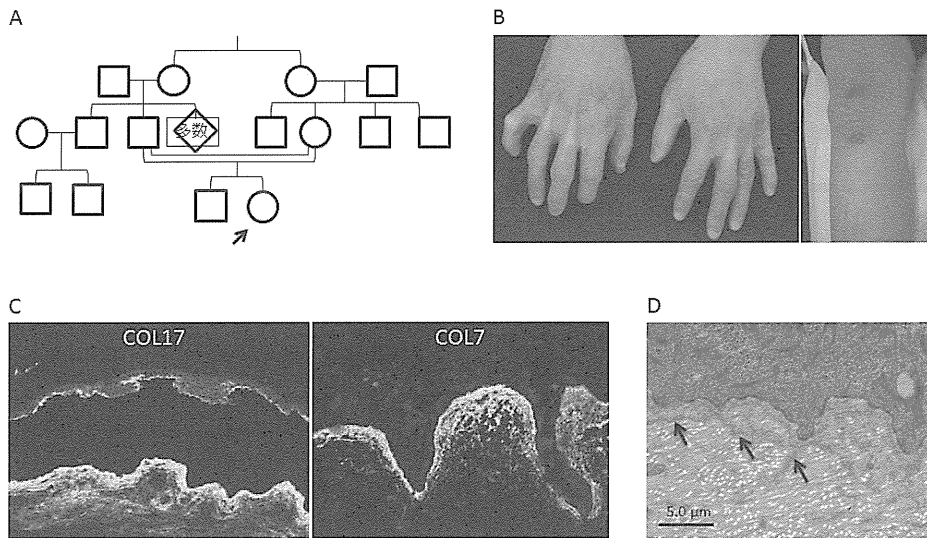


図1. *COL17A1*にc.3908 G>A, p.R1303Q変異をホモで有する患者
 (A) 症例の家系図と (B) 臨床所見。爪甲の脱落を伴う手指の固縮と膝に水疱形成を認める。(C) COL17 (抗体: D20)、COL7 (抗体: LH7.2) いずれも基底膜の重層化を認める。(D) 電子顕微鏡所見。重層化した基底膜を認める (矢印)。

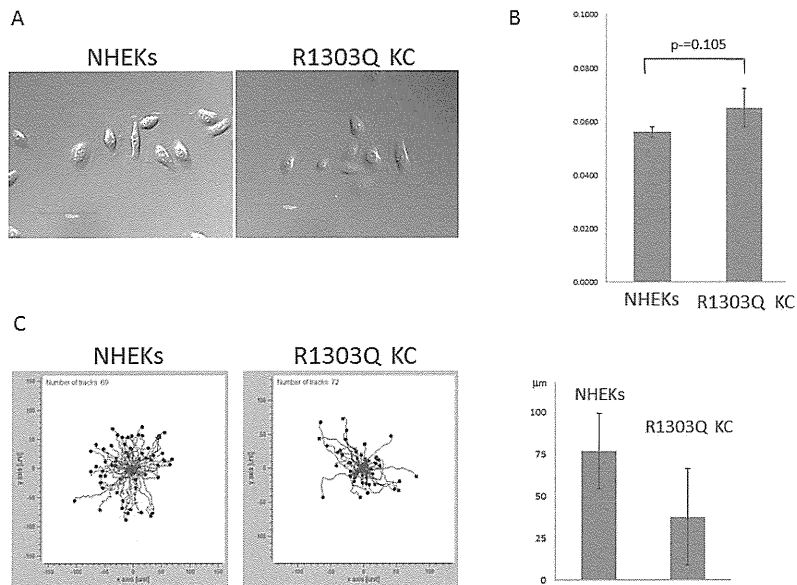


図2. R1303Q変異をCOL17に有する基底細胞の遊走能は低下する
 (A) 位相差光学顕微鏡下での観察では、NHEKsに比較し、R1303Q基底細胞の形態には大きな変化は認めない。(B) 細胞接着能の低下は認めない。(C) R1303Q変異を有する多くの細胞では、遊走能が低下している。

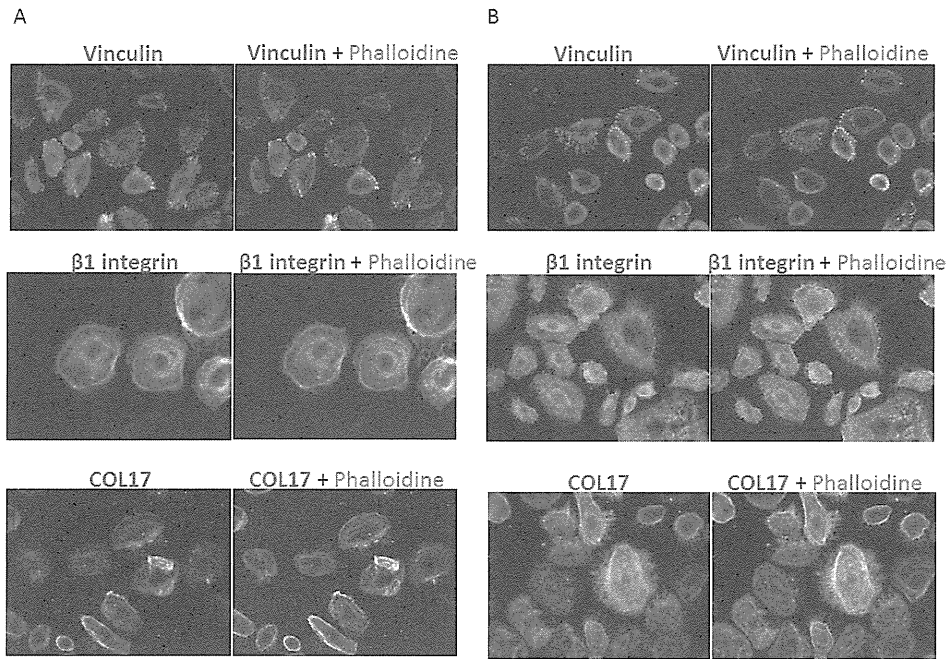


図 3. NHEKs および R1303Q ケラチノサイトにおける Vinculin、 β 1 インテグリン、COL17 の発現様式

(A) NHEKs および (B) R1303Q ケラチノサイト。R1303Q ケラチノサイトでは、細胞周囲に細線維状の migration track を多く認める。

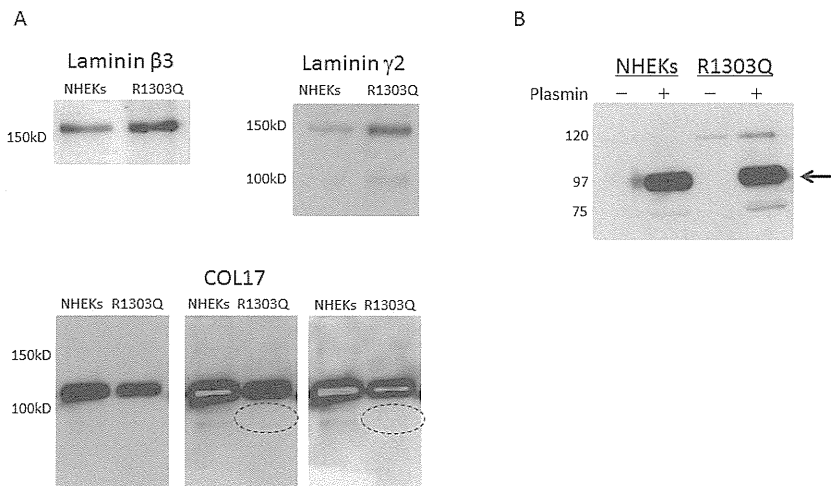


図 4. ECM タンパクの発現とプラスミンによる COL17 の切断

(A) ECM 中のラミニン 332 の沈着量は増えているが、プロセッシングは NHEKs と著変ない。COL17 の発現は増加していないが 97kD の更に切断された細胞外領域タンパク (点線円) が変異細胞では認めない。右 2 列は過剰露出した画像。(B) 培地へプラスミンを添加すると、変異細胞でも 97kD の切断片を認める。

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 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 我々は表皮水疱症における表皮再生を促す因子としてHMGB 1を同定し、これが骨髄間葉系幹細胞を血液中に流出させ、SDF-1 α /CXCR 4のシグナルによって損傷部位に集積することを報告した。今回は、HMGB 1の表皮細胞からの放出メカニズムを検討し、3つの異なる機序の可能性を示した。1つ目は表皮細胞膜上プールからの遊離、2つ目は既知の表皮細胞壊死による受動的分泌、3つ目は組織壊死で活性化されるマクロファージ由来TNF- α 刺激による表皮細胞の能動的なHMGB 1分泌である。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学 再生誘導医学
菊池 康 大阪大学 再生誘導医学

より観察した。さらにマウス切除皮膚抽出液中のHMGB 1とsyndecan-1の結合状態を免疫沈降法により解析した。

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いて損傷皮膚より放出されるHMGB 1が骨髄間葉系幹細胞の末梢への動員の重要性を示してきた。しかしHMGB 1が皮膚細胞から放出される機構は明らかになっていない。その分子機構の解明を目指した。

B. 研究方法

正常ヒト表皮角化細胞株HaCaTの培養上清中にTNF- α を添加し、培地中のHMGB 1濃度変化をELISAにて測定した。TNF- α 刺激前後での細胞死の評価とし培地中のLDHを測定した。次に、TNF- α 刺激前後のHMGB 1細胞内局在変化を蛍光免疫染色およびWestern blotで、HMGB 1 mRNA量をRT-PCRで測定した。生理食塩水に浸したマウス切除皮膚片からのsyndecan-1およびHMGB 1の経時的な溶出をWestern blotで評価した。マウス皮膚組織におけるHMGB 1とsyndecan-1の局在を免疫染色に

C. 研究結果

TNF- α の濃度依存的、刺激時間依存的に培地中HMGB 1濃度が上昇した。培地中のLDH量は変化しなかった。一方、TNF- α 刺激により核内HMGB 1が減少する一方、細胞質内HMGB 1量に変化は見られなかった。このときHMGB 1 mRNA量は変化がなかった。マウス切除皮膚片からのsyndecan-1溶出とHMGB 1溶出動態がほぼ一致した。表皮毛包や表皮細胞においてHMGB 1とsyndecan-1が共局在していた。マウス切除皮膚抽出液中のHMGB 1とsyndecan-1の結合が免疫沈降法により明らかになった。

D. 考察

表皮細胞からのHMGB 1放出メカニズムとして、図1のように3つの機構が考えられる。1つは表皮細胞壊死による受動的分泌、2つ目はおそらく壊死組織から分泌されるTNF- α 刺激による表皮細胞の能動的HMGB 1分泌、さらにsyndecan-1と結合して表皮細胞上にプールされているHMGB 1の放出

である。能動的に分泌されるHMGB1はアセチル化していることが知られている。Syndecan-1と結合しているHMGB1の放出には、損傷皮膚組織で活性化されるThrombinやPlasminが関与していると考えられる。

E. 結論

創傷皮膚では、3つのメカニズムによりHMGB1が経時的に放出され、骨髄間葉系幹細胞を末梢に動員し、損傷皮膚における炎症と再生機序を調節しつつ組織修復を制御している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

1. 金田安史“体内細胞動員による再生治療”
Drug Delivery System vol. 27 (4),
246-256, 2012.

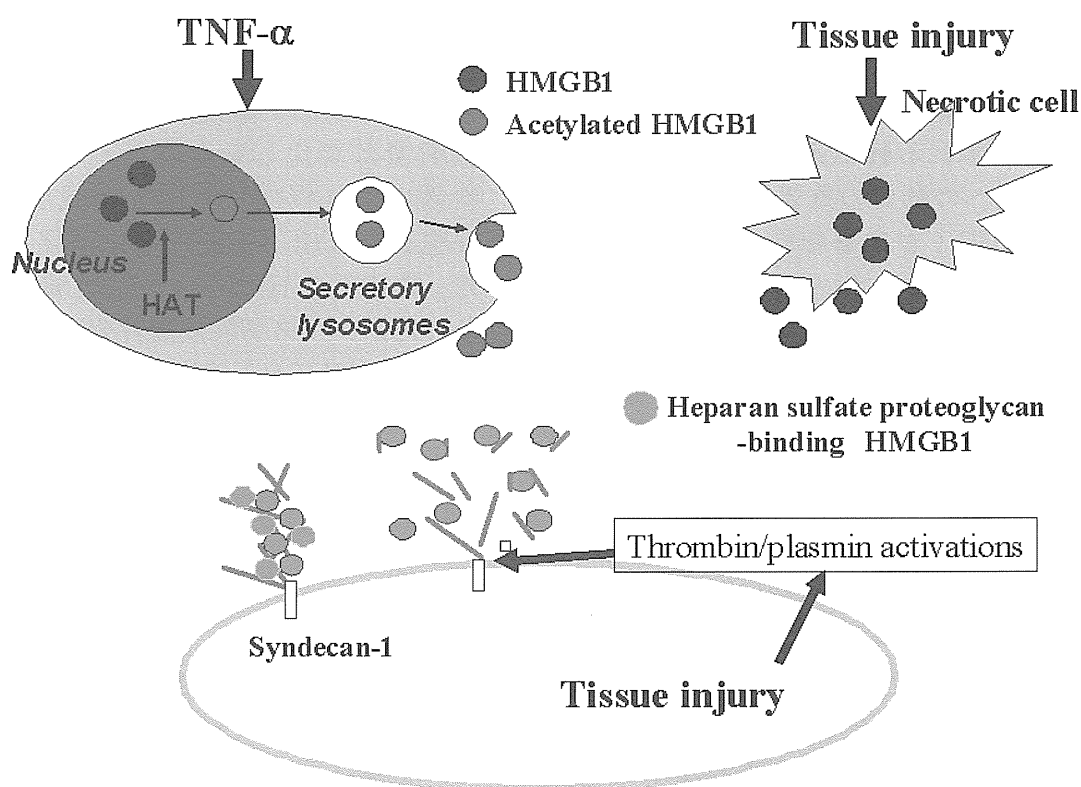
学会発表

1. Kaneda, Y. 第18回日本遺伝子治療学会
理事長講演“Future direction of Gene
Therapy” 2012/06/28熊本

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

図1: HMGB1の放出メカニズム



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 先天性表皮水疱症に対する同種造血幹細胞移植の有効性が米国ミネソタ大学より報告されているが、同グループから2012年アメリカ血液学会にて、造血幹細胞と同時に行う Mesenchymal stromal cell (MSC) 輸注および非骨髄破壊的前処置の導入による移植予後の改善が報告された。本邦における先天性表皮水疱症に対する安全な同種造血幹細胞移植の実現のためには、MSC同時輸注の導入が必要である。今回我々は、移植後二次性生着不全を来した再生不良性貧血患者に対して、骨髄およびMSCの同時輸注による同種造血幹細胞移植を実施し、その安全性を確認した。

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

A. 研究目的

先天性表皮水疱症に対する有効性が報告された、骨髄およびMSCの同時輸注による同種造血幹細胞移植の安全性を確認する。

B. 研究方法

名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもと、現在、ミネソタ大学で先天性表皮水疱症に対して行われている同種造血幹細胞移植と同様に、非骨髄破壊的前処置に引き続き、同種造血幹細胞およびMSCの同時輸注を、移植後二次性造血不全を来した再生不良性貧血患者に対して施行した。

C. 研究結果

1) MSCの調製

本研究におけるMSCの提供者は、造血細胞移植の血縁者ドナーと同一である。まず、ドナーの血液から血液成分分離装置を用いて濃厚血小板 (PC) 10単位 (約200ml) を採取した。採取後、直ちに-80℃で凍結した。翌日、凍結した濃厚血小板を解凍して培養に用いる

血小板融解産物 (Platelet lysate) を調製した。続いて、移植ドナーからMSC培養用の骨髄液30mlを採取し、単核球を分離した。骨髄単核球をPlatelet lysateを添加した培養液を用いてGMP基準に準拠した名古屋大学医学部セルプロセッシングセンターにて3週間培養することにより、十分量のMSCを調製した (図1、2)。

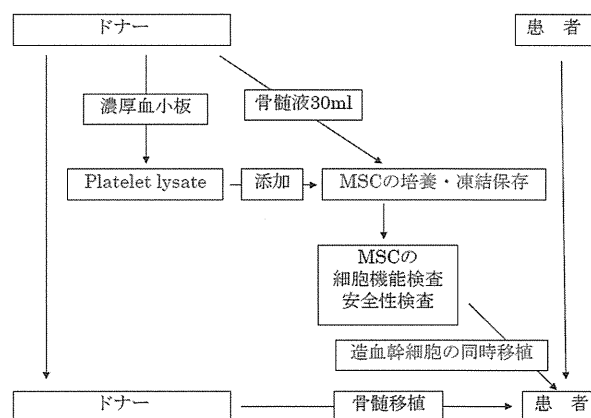


図1 MSC投与までの流れ

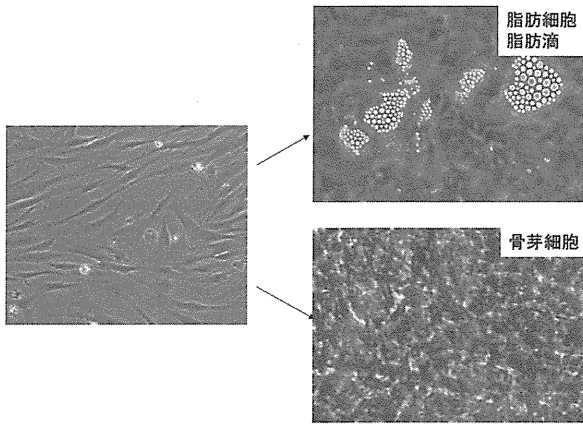


図2 培養MSCの分化能の確認

2) 前処置

ミネソタ大学グループは、先天性表皮水疱症に対する移植前処置として、初期の13例はブスルファン+フルダラビン+シクロフォスファミドの組み合わせによる骨髄破壊的前処置を採用していたが、直近の5例に関してはフルダラビン+シクロフォスファミド+全身放射線照射3Gy+ATGによる骨髄非破壊的前処置に変更し、全例の生存を報告している。本症例では、類似した骨髄非破壊的前処置であるフルダラビン+メルファラン+全身放射線照射5Gy+ATGの組み合わせを用いた(図3)。

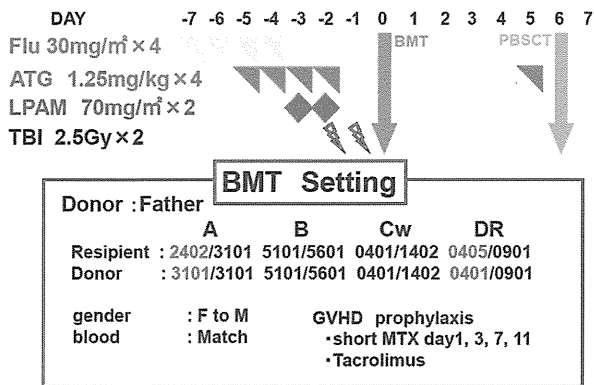


図3 移植前処置およびドナー情報

3) 造血幹細胞およびMSC輸注

MSCは移植日に静脈内に投与し、MSC投与後4時間後に造血幹細胞移植を通常通り行う計画とした。本症例では、 $0.56 \times 10^6/\text{kg}$ のMSCを輸注したのち、予定通り同一ドナーの骨髄細胞を輸注した(図4)。なお、本症

例はHLA不一致ドナーからの造血幹細胞移植であるため、生着を確実なものとする目的で5日後に同一ドナーの末梢血幹細胞を計画的に追加輸注した。

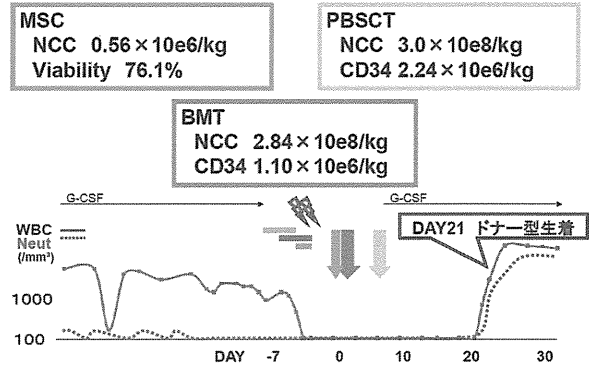


図4 造血幹細胞移植およびMSC輸注

4) 移植後経過

移植後21日目に生着が得られ、急性GVHDの発症は認められなかった。サイトメガロウイルスおよびEBウイルスの再活性化を認めたが、抗ウイルス薬によりコントロール可能であった。移植後9か月後の現在、良好な造血を維持しながら生存中である。

D. 考察

ミネソタ大学から報告された骨髄非破壊的前処置およびMSCの同時輸注の導入は、MSCの免疫抑制能による重症GVHD予防および先天性表皮水疱症に対する直接的な治療効果の両面から、先天性表皮水疱症に対しては理想的な移植方法であると考えられる。今回、別疾患ではあるがほぼ同一の移植法を安全に施行可能であることが確認できた。

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、骨髄非破壊的前処置に続いて造血幹細胞移植およびMSC同時輸注からなる移植法を確立した。

F. 健康危険情報

なし