

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

1. Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. *International journal of hematology* 2012;95:675-679.
2. 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* 2012;58:780-784.
3. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation* 2012;47:600-602.
4. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2012;120:1485 - 1488.
5. Asai D, Osone S, Imamura T, Sakaguchi H, Nishio N, Kuroda H, Kojima S, Hosoi H. Allo-SCT in a patient with CRMCC with aplastic anemia using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow*

Transplant. 2012 Aug;47 (8) :1126-7.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

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

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現状

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 我々は、表皮水疱症の皮膚病態改善に骨髄由来間葉系幹細胞移植が有効である可能性を、マウスモデルを用いて検証し、その結果を基にして「表皮水疱症患者を対象としたヒト幹細胞移植臨床研究」をヒト幹細胞移植臨床研究として申請し、昨年度末に実施承認を得た。平成24年度は、実際の臨床研究実施に向けて、工程管理システムの作成、ドライ・ラン、コールド・ランを実施し、その結果を踏まえて実施計画書の一部を改訂したため、再度改訂版実施計画書の実施承認を得て臨床研究を開始する。

共同研究者

金田安史 大阪大学 遺伝子治療学

A. 研究目的

これまで我々は、表皮水疱症病態で骨髄内間葉系幹細胞が剥離表皮部に集積して皮膚再生に寄与していることから骨髄間葉系幹細胞移植が表皮水疱症治療に有効である可能性を見出した。これらの研究成果を基に「表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」を計画・立案し、ヒト幹細胞移植臨床研究としての実施承認を得た。

平成24年度は、臨床研究開始に向けた最終調整を実施し、臨床研究開始を可能にすることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

1. 表皮水疱症間葉系幹細胞移植治療工程管理システムの作製

国内電機メーカーと共同で、コンピューター画面上で骨髄血の培養開始、培地交換、継代操作、細胞回収、移植様細胞調整、規格試験、製品出荷までのすべての操作に関する手順をコンピューター画面上で確認し、各操作終了後にコンピューター内にその内容、時間、コメントが記録されるシステム開発を進めた。

2. ドライ・ラン実施：

作製した工程管理システムにしたがって、コンピューター画面上で骨髄血培養開始から最終製品（間葉系幹細胞浮遊生理食塩水）出荷までのすべての手順を確認し、不明瞭な手順内容についてより詳細に記述するよう改訂作業を進めた。

3. コールド・ラン実施：

倫理委員会により承認を得て、文章で同意を得た整形外科手術患者から骨髄血を採取し、工程管理システムに従って骨髄間葉系幹細胞培養、規格試験、製品出荷までの一連の作業を実施して各ステップの手順を確認した。

4. 実施計画書、製品標準書、手順書の改訂および改訂版の承認取得：

ドライ・ラン、コールド・ランの結果を踏まえて、実施計画書、製品標準書、手順書の改訂作業を進めた。

C. 研究結果

工程管理システムを作成し、その手順に従ってドライ・ラン1回、コールド・ラン4回実施した。その結果、プロトコールに一部改訂が必要であることが明らかとなり、その内容を反映して実施計画書、製品標準書、手

順書の改訂作業を進めた。具体的には、実施計画書に記載した最低必要継代数（2継代）よりも少ない継代数（1継代）で必要細胞数（ 1×10^7 個）が得られる場合があることが判明したため、1継代でも必要細胞数が得られ次第移植実施可能とするようプロトコルを改訂した。

D. 考察

コールド・ランを実施した結果、基本的には20ccの骨髓血を培養後1継代で必要細胞数（ 1×10^7 個）が得られることが明らかとなったため、最低2継代の培養を実施することとしていた実施計画書などプロトコル改訂の必要性が議論された。実施計画書改訂のためには、再度阪大倫理委員会や厚労省の審査承認取得が必要であり、臨床研究開始時期が遅延する可能性があった。しかし、継代数増加に伴い培養間葉系幹細胞の多分化能、自己複製能が低下することは良く知られており、より少ない継代数で得た細胞を治療に用いることは、有効性・安全性を保証する上で重要であると判断し、プロトコル改訂作業を進め、年度内に終了した。平成25年度には臨床研究を実施する予定である。

E. 結論

表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞移植実施のために必要な準備を整えた。

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. Saga K, Tamai K, Yamazaki T, Kaneda Y. Systemic administration of a novel immune-stimulatory pseudovirion suppresses lung metastatic melanoma by regionally enhancing IFN- γ production. Clin Cancer Res. 2012 Dec 18. [Epub ahead of print]

2. Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M. Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques. J Immunol. 2012 Dec 14. [Epub ahead of print]
3. Endo M, Zoltick PW, Radu A, Qiuji J, Matsui C, Marinkovich PM, McGrath J, Tamai K, Uitto J, Flake AW. Early intra-amniotic gene transfer using lentiviral vector improves skin blistering phenotype in a murine model of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Gene Ther. 2012 May ; 19 (5) : 561-9. doi : 10.1038 / gt.2011.135.
4. Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. FASEB J. 2012 Feb 21. [Epub ahead of print]
5. Ohashi M, Shu E, Nagai M, Murase K, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hiroka T, Seishima M, Kitajima Y, Aoyama Y. Two cases of recessive dystrophic epidermolysis bullosa diagnosed as severe generalized. J Dermatol 38 : 893-9, 2012
6. 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. 37 : 10-4. 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 発明名称：組織再生を誘導するためのペ

プチドとその利用： PCT 出願：2012年 4
月 3 日 (CT/JP2012/059113)

2. 発明名称：HMGB 1 断片を利用した新規心筋梗塞の治療法：2009年 4 月30日 (特願2012-235785)

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血管・リンパ管組込み培養皮膚作製の試み

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、RDEBの治療に有効であることを明らかにしてきた。平成23年度には、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、さらに血管内皮細胞を線維芽細胞層の間に組み込むことにより血管を含む真皮の再構成が可能であることを報告した。今回は血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞を同時に組み込むことにより血管網、リンパ管網が形成されるかについて検討した。

共同研究者

松崎 典弥、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。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。さらには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に成功している。血管網の形成に加えリンパ管網の形成も重要であることから、両者を同時に培養しそれぞれの脈管が形成されるかについて

検討した。

B. 研究方法

正常ヒト血管内皮細胞はLonza社から購入し、EGM2培地を使用した。正常ヒトリンパ管内皮細胞もLonza社から購入し培地はEGM2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、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層で作製した。翌日血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞を同様にフィブロネクチンコートとゼラチンコートにてナノ薄膜を形成し、両者を4層の線維芽細胞層の上に播種した。さらにその上にナノ薄膜を形成した線維芽細胞にて4層の細胞層を作製した。すなわち4層の線維芽細胞層で血管内皮細胞層とリンパ管内皮細胞層をサンドイッチする手法を選択した。血管内皮細胞は抗CD31抗体で、リンパ管内皮細胞はLYVE-1抗体にて

二重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層とリンパ管内皮細胞層をサンドイッチ培養することでインサート全面に血管・リンパ管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。さらには血管内皮細胞同士、リンパ管内皮細胞同士が接着し、血管網にはリンパ管内皮細胞は含まれず、リンパ管網には血管内皮細胞は含まれていなかった(図)。

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。これまでに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ている。今回は血管に加えリンパ管を再構成できるかについて検討したところ、リンパ管内皮細胞も管腔を形成し、ネットワークが形成できていることが明らかとなった。血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞を同時に播種しても、それぞれの細胞は同じ種類の細胞で接着し、血管網とリンパ管網が独立して再構成できることが明らかとなった。この技術は血管網のみならずリンパ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

細胞積層法を用い血管内皮細胞層とリンパ管内皮細胞層をサンドイッチすることで血管網・リンパ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24年度)

論文発表

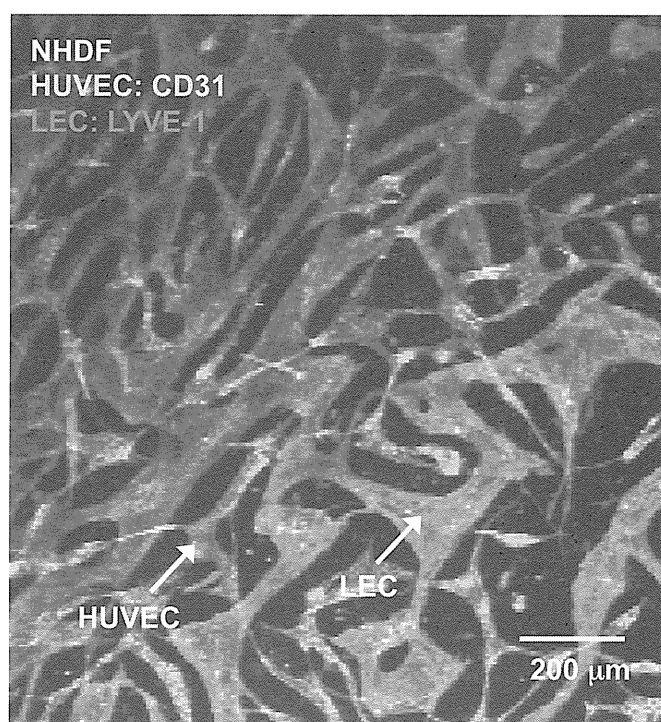
1. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y: Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 65 : 50-7, 2012
2. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y: Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. *J Dermatol Sci.* 2012, 65 : 224-6
3. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M: Pathogenic anti-desmoglein 3 mAbs cloned from a paraneoplastic pemphigus patient by phage display. *J Invest Dermatol.* 2012, 132 : 1141-8.
4. Tohyama M, Yang L, Hanakawa Y, Dai X, Shirakata Y, Sayama K: IFN- α enhances IL-22 receptor expression in keratinocytes: a possible role in the development of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012, 132 : 1933-5.
5. Soma T, Fujiwara S, Shirakata Y, Hashimoto K, Kishimoto J: Hair-inducing ability of human dermal papilla cells cultured under Wnt/ β -catenin signalling activation. *Exp Dermatol.* 2012, 21 : 307-9.

学会発表

1. 白方裕司：難治性自己免疫性水疱症に対する治療戦略。第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1日 京都
2. 白方裕司：細胞積層法による機能性皮膚モデルの創製。三次元生体組織構築公開シンポジウム 平成24年11月28日 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



図：血管内皮細胞をCD31、リンパ管内皮細胞をLYVE-1で二重染色した。血管網、リンパ管網のネットワークはそれぞれ独立して形成されていた。

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

細胞積層技術を用いた樹状細胞組み込み培養皮膚作製の試み

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、RDEBの治療に有効であることを明らかにしてきた。平成23年度には、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、さらに血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞を線維芽細胞層の間に組み込むことにより血管網、リンパ管網を含む真皮の再構成が可能であることを報告した。今回は樹状細胞を真皮内に組み込むことができるかについて検討した。

共同研究者

松崎 典弥、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。これまでの成果として、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。さらには細胞積層技術を用いることにより血管、リンパ管を含む真皮層の構築に成功している。培養皮膚を用いた今後の臨床応用、基礎研究において樹状細胞を含んだ培養皮膚が期待されている。そこで真皮層に樹状細胞を組み込むことができるかについて検討した。

B. 研究方法

ヒト樹状細胞はLonza社から購入し、

LGM-3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。線維芽細胞とヒト樹状細胞をそれぞれ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、10回反応させた線維芽細胞と樹状細胞を混合しカルチャーインサートへ播種した。細胞はあらかじめセルトラッカー（Invitrogen社）にて染色しておいた（線維芽細胞をred、樹状細胞をgreen）。線維芽細胞と樹状細胞の細胞数は、10：1の割合で播種した。真皮層は約6層になるように細胞数を調整した。経時的に共焦点レーザー顕微鏡にて観察した

C. 研究結果

約6層の真皮層内で樹状細胞が生存していることが確認された。播種した細胞濃度と同様に約1割の細胞が樹状細胞であると考えられた。時系列では播種1日後、3日後、6日後、7日後でも細胞数はほとんど変わらなかった。細胞が減少している様子は観察しなかった（図）。

D. 考察

これまでの報告で樹状細胞を導入した培養皮膚の報告は少なく、表皮真皮境界部に樹状細胞を導入した報告と表皮内にランゲルハンス細胞を導入した報告がみられるのみである。長期的に安定して樹状細胞が導入されているかについての検討は成されていない。我々は線維芽細胞と樹状細胞を混合して播種することで1日で樹状細胞を含んだ真皮層が形成できる方法を確認した。組み込まれた樹状細胞が減少することなく7日間は生存していることも確認できている。これまでは比較的困難であった樹状細胞組込み培養皮膚が比較的簡単に作製できることは大きな成果であると思われる。今後は組み込まれた樹状細胞が機能を保持しているかについての検討が必要であると思われる。

E. 結論

細胞積層法を用いることにより樹状細胞を含んだ真皮層の構成が簡便かつ迅速に作製できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

1. 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
2. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y : Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. J Dermatol Sci. 2012, 65 : 224-6
3. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M :

Pathogenic anti-desmoglein 3 mAbs cloned from a paraneoplastic pemphigus patient by phage display. J Invest Dermatol. 2012, 132 : 1141-8.

4. Tohyama M, Yang L, Hanakawa Y, Dai X, Shirakata Y, Sayama K : IFN- α enhances IL-22 receptor expression in keratinocytes : a possible role in the development of psoriasis. J Invest Dermatol. 2012, 132 : 1933-5.
5. Soma T, Fujiwara S, Shirakata Y, Hashimoto K, Kishimoto J : Hair-inducing ability of human dermal papilla cells cultured under Wnt/ β -catenin signalling activation. Exp Dermatol. 2012, 21 : 307-9.

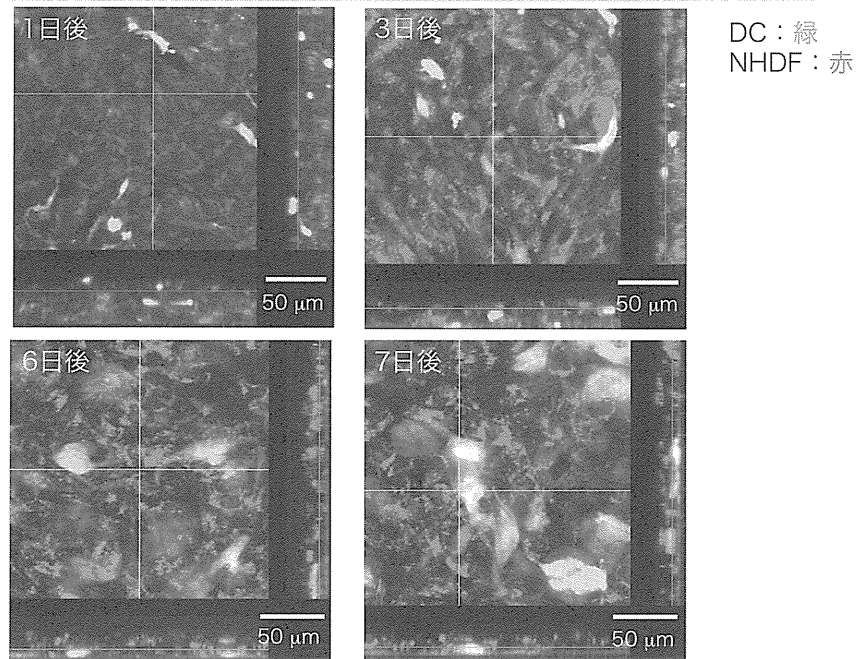
学会発表

1. 白方裕司 : 難治性自己免疫性水疱症に対する治療戦略。第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1日 京都
2. 白方裕司 : 細胞積層法による機能性皮膚モデルの創製。三次元生体組織構築公開シンポジウム 平成24年11月28日 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

樹状細胞を導入した真皮層の構築



図：線維芽細胞をセルトラッカーレッド、樹状細胞をセルトラッカーグリーンで染色し、ナノ薄膜形成処理後に細胞数を10:1の割合で真皮を構成した。経時的に共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

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

名大皮膚科における最近2年間の魚鱗癬様紅皮症の病因遺伝子変異解析

研究分担者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野 教授

研究要旨 常染色体劣性先天性魚鱗癬の主な病型は先天性魚鱗癬様紅皮症（CIE）、葉状魚鱗癬（LI）と道化師様魚鱗癬（HI）であり、*ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22*等複数の病因遺伝子が同定されている。これまで私達は日本人での病因遺伝子変異検索を網羅的に行いCIEの主要な病因遺伝子が*ABCA12*であること、LIの主要な病因遺伝子が*TGM1*であることを報告した。今回、岡山大学のCIE患者1例において、1つの新規遺伝子変異を含む2つの*ABCA12*遺伝子変異を同定した。岡山大学の症例以外にも最近2年間に名大病院と他施設からの症例、CIE 6家系8名、LI 5家系7名の合計11家系15名において患者末梢血より抽出したDNAをPCR法にて増幅、direct sequence法にて解析し、遺伝子変異検索を行っている。そのうちCIE患者1家系1名において既報告の*ABCA12*遺伝子変異を、また、LI患者2家系2名では、2つの既報告の*ABCA12*遺伝子変異を同定した。*TGM1*, *LOXE3*, *ALOX12B*, など他の遺伝子変異は検出されなかった。その他の家系においてはいずれの遺伝子変異も検出されなかった。*ABCA12*はCIEの主要な病因遺伝子であり、LIにおいても病因遺伝子の1つであることが示唆された。しかしdirect sequence法では病因遺伝子変異が同定されない症例が多く、今後課題が残された。

共同研究者

柴田 章貴 名古屋大学大学院医学系研究科
皮膚病態学分野

杉浦 一充 名古屋大学大学院医学系研究科
皮膚病態学分野准教授

青山 裕美 岡山大学大学院医歯薬学総合研
究科皮膚科分野准教授

岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研
究科皮膚科分野教授

A. 研究目的

魚鱗癬様紅皮症の中で先天性魚鱗癬様紅皮症（CIE）、葉状魚鱗癬（LI）では*ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22*等複数の病因遺伝子が同定されている。本研究では、患者およびその家族において各病因遺伝子の検索を行い、その結果か

ら遺伝子型／表現型相関を検討し、さらには魚鱗癬様紅皮症の病態を解明することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では魚鱗癬様紅皮症の病因遺伝子*ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22*の患者および家族における変異遺伝子の有無を検討した。

CIE、6家系8名、LI、5家系7名の合計11家系15名において末梢血より抽出したgenomic DNAをPCR法にて増幅、direct sequence法を行い*ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22*の変異解析を行った。

C. 研究結果

CIE 1 家系において患者および父に新規遺伝子変異である c. 6431T>C (p. Phe2144Ser) を、また患者および母に既報告の c. 4139A>G (p. Asn1380Ser) の *ABCA12* 遺伝子変異を同定し、遺伝子診断し得た。さらに CIE 患者 1 家系 1 名において既報告の *ABCA12* 遺伝子変異を同定した。また、LI 患者 2 家系 2 名では、2 つの既報告の *ABCA12* 遺伝子変異を同定した。*TGM1*, *LOXE3*, *ALOX12B*, など他の遺伝子変異は検出されなかった。

その他の家系においてはいずれの遺伝子変異も検出されなかった。

D. 考察

魚鱗癬様紅皮症のうち、CIE・LI では病因遺伝子として *ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22* 等複数の病因遺伝子が同定されている。

本研究では、これらの遺伝子の変異検索を施行した。CIE 患者 1 例において、1 つの新規遺伝子変異を含む 2 つの *ABCA12* 遺伝子変異を同定した。さらに CIE 患者 1 家系において 1 名において既報告の *ABCA12* 遺伝子変異を、また LI 患者 2 家系 2 名で 2 つの既報告の *ABCA12* 遺伝子変異を同定した。*ABCA12* は CIE の主要な病因遺伝子であり、LI においても病因遺伝子の 1 つであることが示唆された。

病因遺伝子変異が同定されなかった症例においては direct sequence 法では検出できない exon deletion や promoter 領域の変異の関係が示唆された。

魚鱗癬様紅皮症の病因遺伝子として同定されている *ABCA12*, *TGM1*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *NIPAL4*, *CYP4F22* の変異を検索することは、それらの遺伝子の表現型との関係を解明する手がかりとなり、ひいては、魚鱗癬様紅皮症の病態解明につながるものと期待できる。さらには変異遺伝子の種類に応じた遺伝子変異データに基づき、テーラーメ

イド治療にも応用できることが期待される。

E. 結論

今回の研究結果からは、*ABCA12* は CIE の主要な病因遺伝子であり、LI においても病因遺伝子の 1 つであることが示唆された。

しかし direct sequence 法では exon deletion や promoter 領域の変異を検出することができないため、病因遺伝子変異が同定されない症例も多く、今後課題が残された。

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. Takeichi T, Sugiura K, Matsuda K, Kono M, Akiyama M. Novel *ABCA12* splice site deletion mutation and *ABCA12* mRNA analysis of pulled hair samples in harlequin ichthyosis. *J Dermatol Sci* 2012 ; 12 : 333-337

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表皮角化細胞におけるオートファジー：KOマウスによる解析

研究分担者 池田志孝 順天堂大学大学院医学研究科皮膚科学・アレルギー学 教授

研究要旨 オートファジーとは細胞内成分や細胞内小器官を分解する自食作用システムのことであるが、近年、神経変性疾患や悪性腫瘍などにオートファジーが関与しているとの報告が散見される。しかし、皮膚におけるオートファジーの関与においては未解明な部分が多い。われわれは、ATG7ノックアウトマウスの皮膚を重症免疫不全マウスに移植し、その移植片を観察する方法を用いて、皮膚におけるオートファジーの関与を検討した。

共同研究者

高木 敦（順天堂大学大学院医学研究科
皮膚科学・アレルギー学）

吉原 渚（同上）

春名 邦隆（同上）

須賀 康（同上）

E. 結論

皮膚の角化においてオートファジーが関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

A. 研究目的

皮膚におけるオートファジー機能を調べる。

B. 研究方法

ATG7ノックアウトマウスの皮膚を重症免疫不全マウスに移植し、その移植片を観察する。コントロールには、ワイルドタイプマウスの皮膚を使用する。

C. 研究結果

肉眼像では差は見られなかった。

病理組織学的には、ATG7 KOマウスの移植片において、表皮肥厚と過角化が見られた。電子顕微鏡では、ケラトヒアリン顆粒の小径化と現象が見られた。

D. 考察

マウス皮膚移植片において、ケラトヒアリン顆粒が低下していることは、顆粒層におけるオートファジーの機能が主に正常角化に寄与していると考えられた。

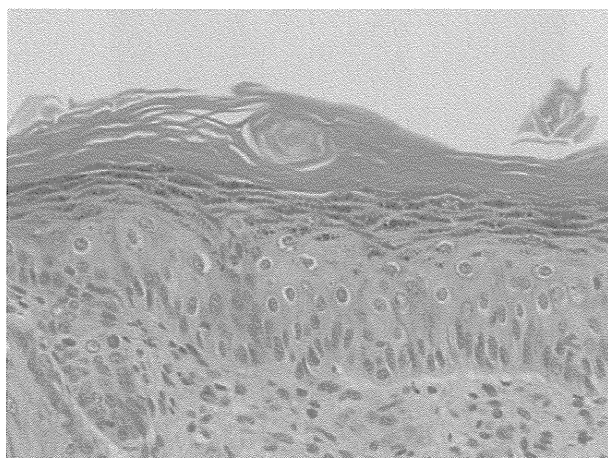
G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

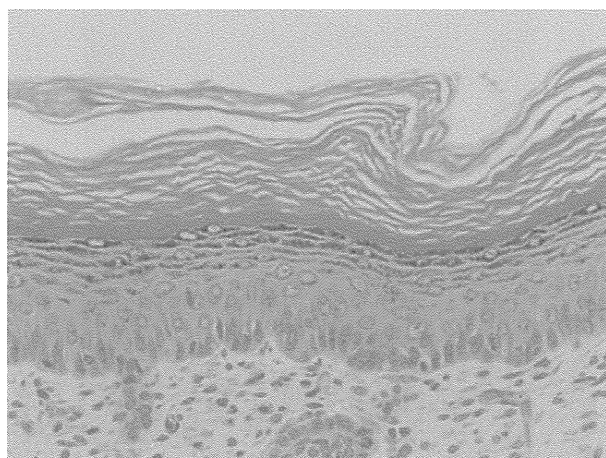
1. Kurosawa M, Takagi A, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Yokoyama K, Kitajima Y, Aoyama Y, Iwatsuki K, Ikeda S: Epidemiology and clinical characteristics of bullous congenital ichthyosiform erythroderma (keratinolytic ichthyosis) in Japan: Results from a nationwide survey. J Am Acad Dermatol. 2012 [Epub ahead of print]
2. Suzuki A, Haruna K, Mizuno Y, Kuwae Y, Ono Y, Okumura K, Negi O, Kon Y, Takeuchi K, Takamori K, Ikeda S, Suga Y: Successful treatment of three cases of generalized pustular psoriasis with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. Ther Apher Dial. 2012; 16: 445-8.
3. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T,

- Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M : Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012 ; 44 : 1222-6.
4. Nguyen TT, Niyonsaba F, Ushio H, Akiyama T, Kiatsurayanon C, Smithrithee R, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H : Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasin and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPKs and NF- κ B. *J Dermatol Sci.* 2012 Oct ; 68 (1) : 63-6.
5. Furusawa K, Hasegawa T, Ikeda S : Immunosuppressant and infliximab-resistant generalized pustular psoriasis successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Ther Apher Dial.* 2012 ; 16 : 379-80.
6. Iida H, Hasegawa T, Okuma K, Io H, Tomino Y, Ikeda S : Successfully maintained hemodialysis for the treatment of chronic renal failure in a patient with Hallopeau-Siemens type recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol.* 2012 ; 39 : 1088-9.
7. Torii H, Sato N, Yoshinari T, Nakagawa H ; Japanese Infliximab Study Investigators : Dramatic impact of a Psoriasis Area and Severity Index 90 response on the quality of life in patients with psoriasis : an analysis of Japanese clinical trials of infliximab. *J Dermatol.* 2012 ; 39 : 253-9.
8. Kitamura N, Yokoyama H, Yashiro T, Nakano N, Nishiyama M, Kanada S, Fukai T, Hara M, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C : Role of PU.1 in MHC class II expression through transcriptional regulation of class II transactivator p1 in dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 ; 129 : 814-824.
- 学会発表
1. Yoshihara N, Takagi A, Ueno T, Ikeda S : The role of autophagy in epidermal keratinocytes, 37th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 7-9, 2012.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
- なし

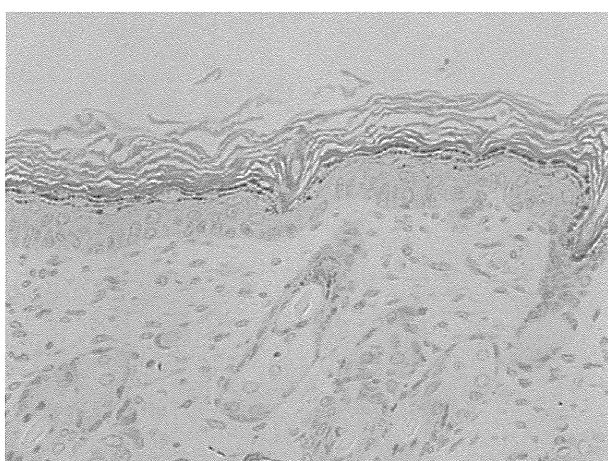
▼ ATG7 KO 皮膚移植後7日目 ×400



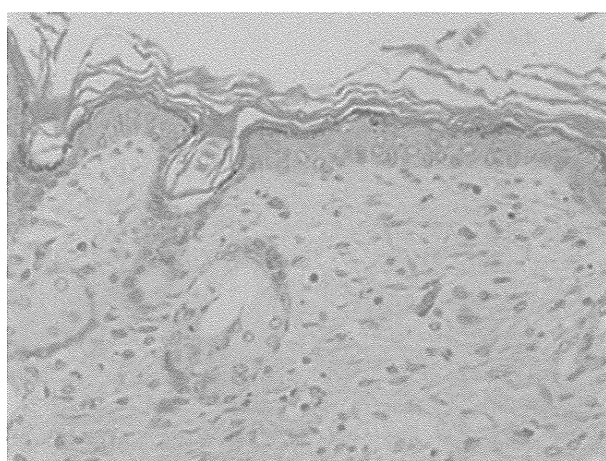
▼ WILD 皮膚移植後7日目 ×400



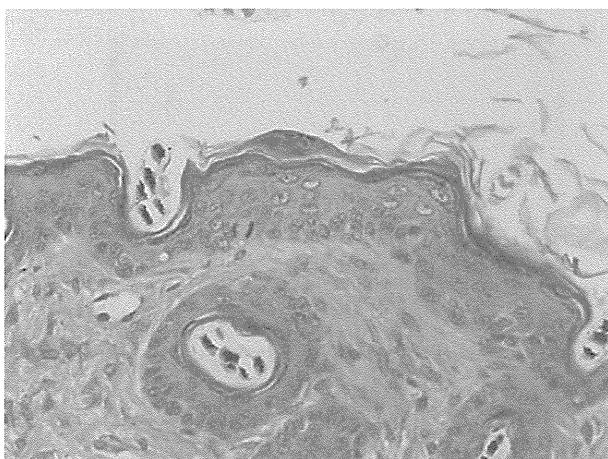
▼ ATG7 KO 皮膚移植後14日目 ×400



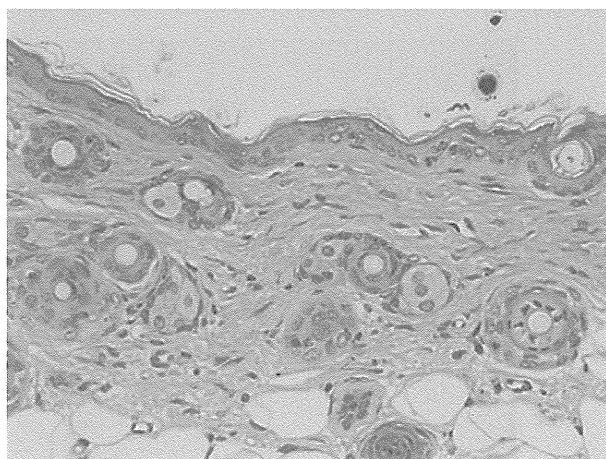
▼ WILD 皮膚移植後14日目 ×400



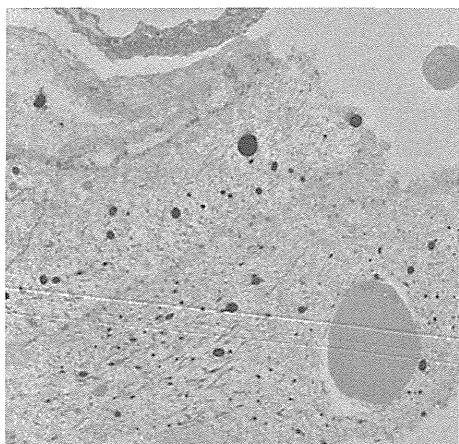
▼ ATG7 KO 皮膚移植後28日目 ×400



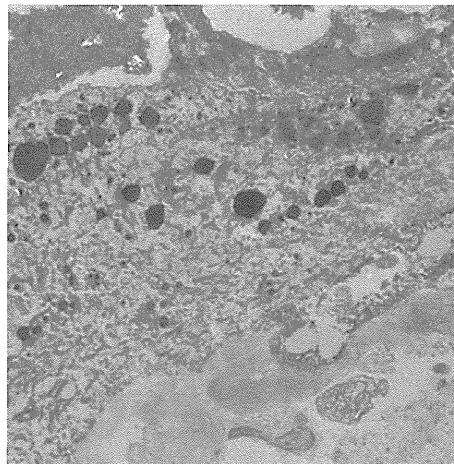
▼ WILD 皮膚移植後28日目 ×400



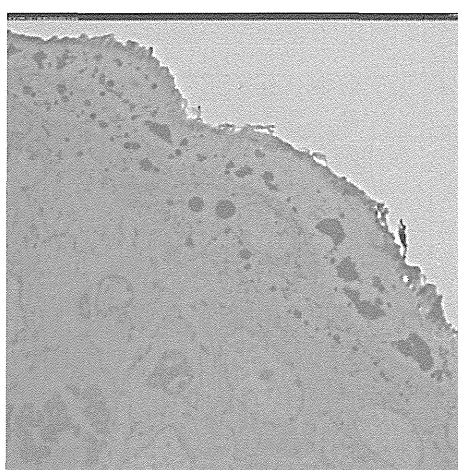
▼ ATG 7 KO 皮膚移植後7日目 SEM



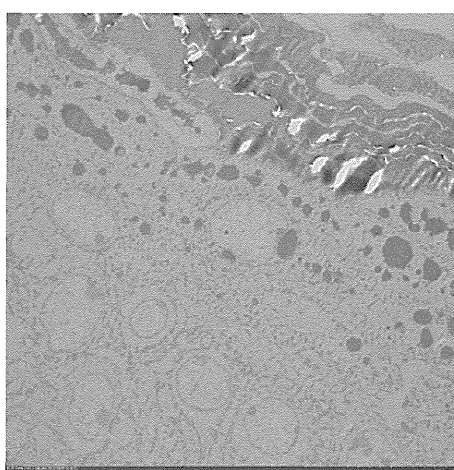
▼ WILD 皮膚移植後7日目 SEM



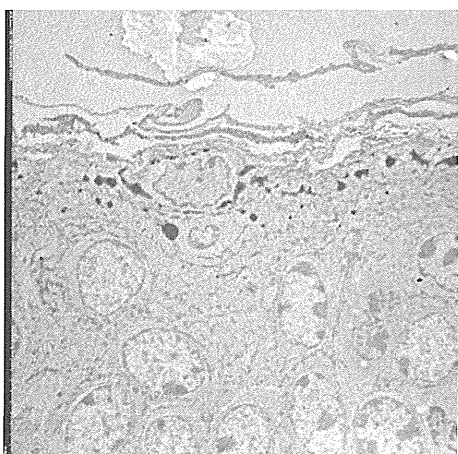
▼ ATG 7 KO 皮膚移植後14日目 SEM



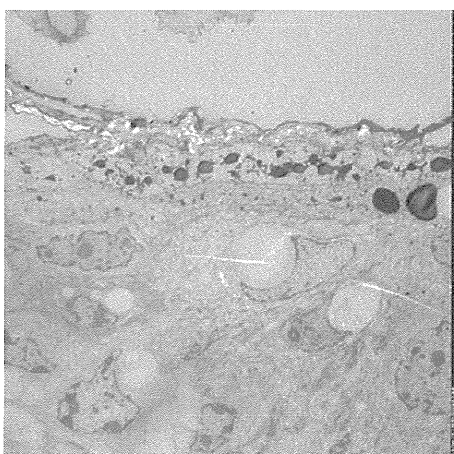
▼ WILD 皮膚移植後14日目 SEM



▼ ATG 7 KO 皮膚移植後28日目 SEM



▼ WILD 皮膚移植後28日目 SEM



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

表皮角化細胞におけるオートファジー：扁平上皮癌における解析

研究分担者 池田志孝 順天堂大学大学院医学研究科皮膚科学・アレルギー学 教授

研究要旨 オートファジーとは細胞内成分や細胞内小器官を分解する自食作用システムのことであるが、近年、神経変性疾患や悪性腫瘍などにオートファジーが関与しているとの報告が散見される。しかし、皮膚におけるオートファジーの関与においては未解明な部分が多い。皮膚疾患の病態とオートファジーの関与を調べるため、ヒトの有棘細胞癌におけるオートファジーの関与について検討を行った。すなわち順天堂大学皮膚科に来院し切除を行った有棘細胞癌患者50例に対し、オートファジーのマーカーであるLC3抗体を用いた免疫染色を行い、腫瘍におけるオートファジーの発現と臨床像の関係を探索した。

共同研究者

高木 敦 順天堂大学大学院医学研究科皮膚科学・アレルギー学

吉原 渚 同上

春名 邦隆 同上

須賀 康 同上

A. 研究目的

有棘細胞癌におけるオートファジーの関与を調べる。

B. 研究方法

順天堂大学で切除した有棘細胞癌50例を対象に、オートファジーマーカーであるLC3抗体で免疫特殊染色を行い、腫瘍におけるオートファジーの発現と臨床像について検討した。

C. 研究結果

すべての有棘細胞癌は、染色の範囲や濃度に変化はあるものの、LC3抗体に対し染まった。腫瘍細胞の30%以上でLC3抗体に対し、染色性を示したら、陽性とし、30%以下の場合陰性とし、その染色性と臨床像について解析した。

50例中28例の56%が陽性を示した。臨床病期が進むにつれ、また腫瘍径が大きくなるにつれて陽性率が高い傾向がみられた。

つれて陽性率が高い傾向がみられた。

D. 考察

有棘細胞癌におけるオートファジーの発現は臨床病期や腫瘍径と関連があった。このことは、腫瘍におけるオートファゴソームの形成が、腫瘍の生存や成長に貢献している可能性を示唆するものである。

E. 結論

皮膚有棘細胞癌においてLC3発現率は病期進行、腫瘍径と関与している傾向がみられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

1. Kurosawa M, Takagi A, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Yokoyama K, Kitajima Y, Aoyama Y, Iwatsuki K, Ikeda S : Epidemiology and clinical characteristics of bullous congenital ichthyosiform erythroderma (keratinolytic ichthyosis) in Japan : Results from a nationwide survey. J Am Acad Derma-

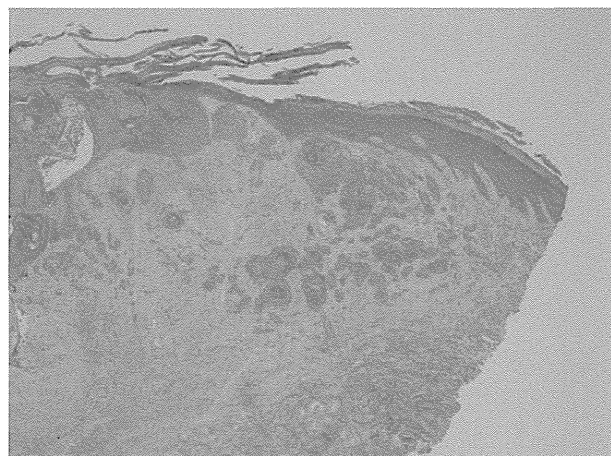
- tol. 2012 [Epub ahead of print]
2. Suzuki A, Haruna K, Mizuno Y, Kuwae Y, Ono Y, Okumura K, Negi O, Kon Y, Takeuchi K, Takamori K, Ikeda S, Suga Y : Successful treatment of three cases of generalized pustular psoriasis with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Ther Apher Dial.* 2012 ; 16 : 445-8.
 3. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M : Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012 ; 44 : 1222-6.
 4. Nguyen TT, Niyonsaba F, Ushio H, Akiyama T, Kiatsurayanon C, Smithrithee R, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H : Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasis and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPKs and NF- κ B. *J Dermatol Sci.* 2012 Oct ; 68 (1) : 63-6.
 5. Furusawa K, Hasegawa T, Ikeda S : Immunosuppressant and infliximab-resistant generalized pustular psoriasis successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Ther Apher Dial.* 2012 ; 16 : 379-80.
 6. Iida H, Hasegawa T, Okuma K, Io H, Tomino Y, Ikeda S : Successfully maintained hemodialysis for the treatment of chronic renal failure in a patient with Hallopeau-Siemens type recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol.* 2012 ; 39 : 1088-9.
 7. Torii H, Sato N, Yoshinari T, Nakagawa H ; Japanese Infliximab Study Investigators : Dramatic impact of a Psoriasis Area and Severity Index 90 response on the quality of life in patients with psoriasis : an analysis of Japanese clinical trials of infliximab. *J Dermatol.* 2012 ; 39 : 253-9.
 8. Kitamura N, Yokoyama H, Yashiro T, Nakano N, Nishiyama M, Kanada S, Fukai T, Hara M, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C : Role of PU.1 in MHC class II expression through transcriptional regulation of class II transactivator pI in dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 ; 129 : 814-824.
- 学会発表
1. Yoshihara N, Takagi A, Ueno T, Ikeda S : The role of autophagy in epidermal keratinocytes, 37th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 7-9, 2012.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

[図] 有棘細胞癌におけるLC3発現と臨床病気、腫瘍径の関連

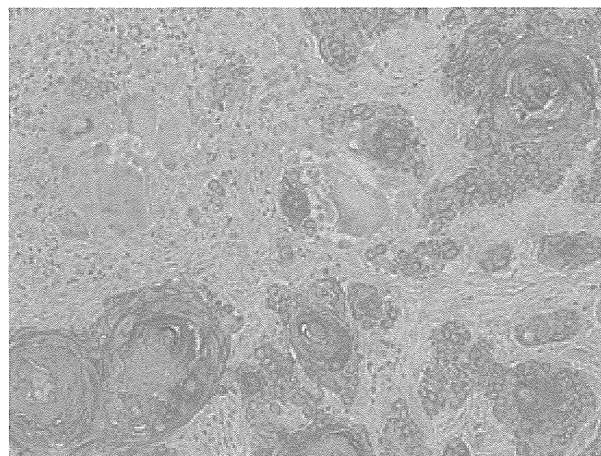
Stage	Number of cases	LC3 expression positive	Positive rates
Stage I	25	10	40%
Stage II	15	8	53%
Stage III/IV	10	10	100%

Tumor size	Number of cases	LC3 expression positive	Positive rates
0 - 2 cm	28	11	39.2%
2 - 4 cm	13	8	61.5%
> 4 cm	9	9	100%

▼皮膚有棘細胞癌 stage I

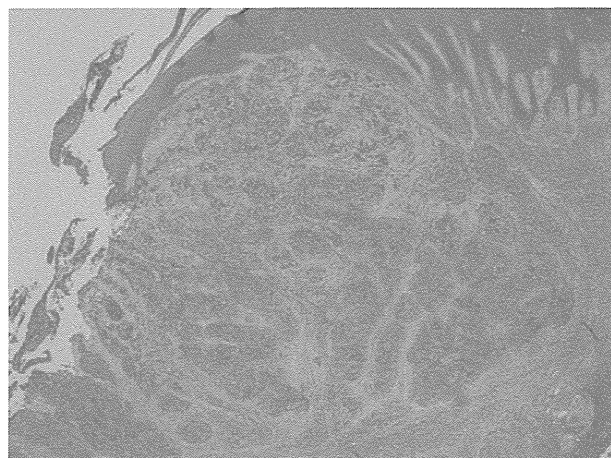


×100

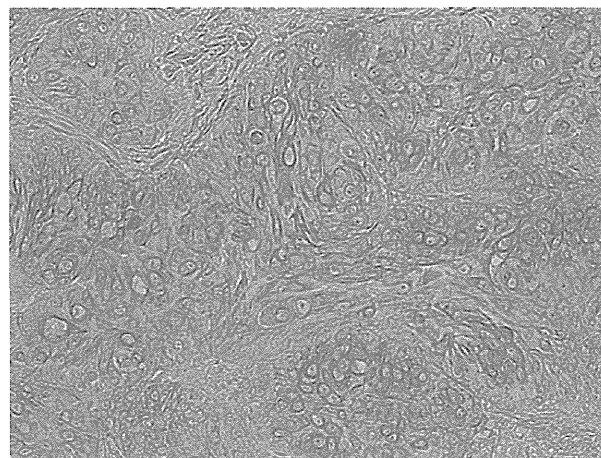


×400

▼皮膚有棘細胞癌 stage IV



×100



×400

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

正常ヒト表皮のタイトジャンクションの存在部位の検討
－魚鱗癬群表皮のバリア破綻を理解するために－

研究分担者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 准教授

研究要旨 魚鱗癬群の疾患患者の表皮では共通してバリア機能が破綻している。そのバリア機能の一端をつかさどっているタイトジャンクションが正常皮膚ではどのような状態にあるのかヒトとマウスにおいて超微細構造的に検討した。その結果、表皮の顆粒層の1-2層目を含む複数層で網の目状にタイトジャンクションが張り巡らされていることがわかった。これは細胞死が不断におきている表皮においては途切れのないバリア構造を構築するための極めて巧妙な仕組みであることが明らかにされた。

共同研究者

井川 哲子 旭川医大皮膚科

岸部 麻里 旭川医大皮膚科

colloidal lanthanum nitrate含有液に浸透し電顕的な表皮内へのトレーサー浸透試験を行った。詳細は参考文献の1に記載した。

A. 研究目的

表皮の最も重要な機能は生体と外界との境界面に物理的バリアを形成することであるが、魚鱗癬群の患者表皮ではバリア機能が破綻している。そのバリア機能をなす構造の実態は角質層とタイトジャンクション（TJ）と考えられている。現在、表皮においてTJは顆粒層の上から2層目（SG2）に存在するという考えが広く受け入れられている。しかし、我々や他の研究グループは表皮角層内にTJ由来と思われる細胞間接着構造をみとめていること、および、角層とSG2の間に介在する顆粒層最上層（SG1）が何のバリア構造も持たない層であるという考えは表皮がはたすべきバリア機能の重要性の観点から不自然と考えたため、我々は表皮におけるTJの実際の局在様式を微細構造的に検討した。

B. 研究方法

ヒト表皮の垂直切片および、表皮剥離シートにおけるoccludin抗体を用いた蛍光抗体法と免疫電顕法、およびヒトとマウスの皮膚を

C. 研究結果

まずヒト表皮の垂直切片および、表皮剥離シートにおける蛍光抗体法によって、occludin抗体陽性のTJ関連構造が表皮顆粒層の複数層にまたがって存在することがわかった（図1）。さらに同抗体を用いた免疫電顕法によって、SG1、SG2に形態的にTJと考えられる細胞間接着構造が存在し、これらはoccludin抗体陽性であることからTJであることを確認した（図2）。またヒトとマウスの皮膚をcolloidal lanthanum nitrate含有液に浸透したところ、浸透はSG2のTJでブロックされる場合と、これは通過してSG1のTJでブロックされる場合があることがわかった（図3）。

D. 考察

このことから表皮のバリアは①SG2におけるTJ形成にはじまり、②SG1のTJでの補強とそれに次ぐ角層バリアの形成という一連の過程によって構築されているものと考えられた。また、顆粒層のTJが複数層にまたがる