

びらんからの感染症を繰り返す。癬痕形成、爪の脱落、稗粒腫形成を認める。生後1か月で口腔内びらんと食道狭窄を生じ、やむをえず経鼻栄養となる程であった。(図1)

免疫組織学的検索：表皮真皮境界部におけるLH7.2 (type VII collagen) が陰性であった。これ以外の検索した基底膜関連蛋白は健常コントロールと同様の発現であった。HS-RDEB と診断された。

遺伝子検索：父方の変異は、exon4における434insGCATの4塩基挿入で、最終的にフレームシフトの結果exon5の180番目のアミノ酸に停止コドンを引き起こす。母方の変異は、exon86, 6781番目のCがTに変異したために引き起こされるナンセンス変異, R2261Xであった。この2つの変異いずれも、novel mutationであることが確認された。(図2)

D. 考察

日本人のHS-RDEBの新しい変異を確認し得た。既に170種以上の変異が確認されているVII型コラーゲンの変異でも、挿入変異は、まれで、10種類ほどの報告を見いだすのみである。4塩基挿入変異は、Whitlockら (J Invest Dermatol. 113, 673, 1999) により1例報告されているのみで、調べ得た限り、本症例は、日本人の家系で初めての4塩基挿入変異である。RDEBの病因となるVII型コラーゲンをコードするCOL7A1は、9kbと大きい。従って変異の種類が多く、これまで、欠失、点変異、一塩基挿入など様々な変異が報告されているが、4塩基挿入という複数塩基の挿入が確認された変異は極めてまれである。本症例の変異は、2つのアレルとも翻訳途中で停止コドンが生じるため臨床的な重症度と関連した。

E. 結論

今後、HS-RDEBあるいは、RDEBの遺伝子診断において、複数塩基の挿入変異が存在することも念頭において解析することが必要である。HS-RDEBあるいはRDEBの診療を行う上でCOL7A解析は、重要かつ必須である。

F. 健康危険情報

栄養障害型表皮水疱症は、若年から有棘細胞癌を発症することで知られている。栄養障害型表皮水疱症自体を完治させうる治療がまだ開発されていない現状では、有棘細胞癌の早期発見早期治療にも十分な対処が必要である。

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表 英語論文

1. Sawamura D, Yasukawa K, Kodama K, Yokota K, Sato-Matsumura KC, Tanaka T, Shimizu H: The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product. J Invest Dermatol 118; 967-971, 2002
2. Sawamura D, Akiyama M, Shimizu H: Direct injection of naked DNA and cytokine transgene expression: implications for keratinocyte gene therapy. Clin Exp Dermatol 27; 480-484, 2002
3. Sawamura D, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H. Epidermolysis bullosa: directions for future research and new challenges for treatment. Arch Dermatol Res in press
4. Kawasaki H, Sawamura D, Iwao F,

- Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, Shimizu H: Squamous cell carcinoma developed in a 12-year-old boy with non-Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* in press
5. Akiyama M, Takizawa Y, Sawamura D, Matsuo I, Shimizu H: Disruption of suprabasal keratin network by mutation M150T in the helix initiation motif of keratin 10 does not affect cornified cell envelope formation in human epidermis. *Exp Dermatol* in press
 6. Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Kon A, Akiyama M, Shimizu H: Identification of COL7A1 alternative splicing inserting 9 amino acid residues into the fibronectin type III linker domain. *J Invest Dermatol* in press
 7. Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Goto M, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: A novel paternal four base pairs insertion and a maternal nonsense point mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Dermatovenereol* in press
 8. Tomita Y, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Matsumura T, Shimizu H: The simultaneous occurrence of three independent squamous cell carcinomas in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. *Acta Dermatovenereol* in press
 9. Yasukawa K, Sato-Matsumura KC, McMillan J, Tsuchiya K, Shimizu H: Exclusion of COL7A1 mutation in Kindler syndrome. *J Am Acad Dermatol* 46: 447-450, 2002
 10. Sato-Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, Shimizu H: Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in 2 families with dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 138: 269-271, 2002
2. 学会発表
 松村和子, 澤村大輔, 中村秀樹, 清水宏. VII型コラーゲン遺伝子の4塩基挿入とナンセンス変異が検出されたHallopeau-Siemens劣性栄養障害型表皮水疱症(HS-RDEB) 日本研究皮膚科学会第27回年次学術大会・総会; 2002
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

図とその説明

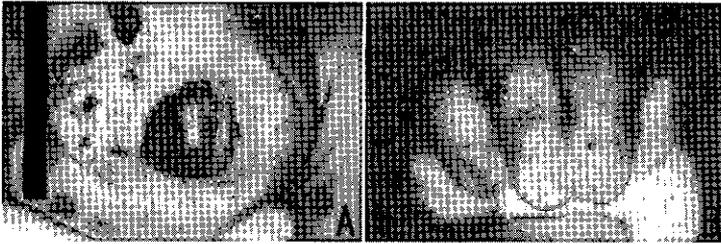


図1 Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症，出生時から口腔内を含む全身に水疱が新生し(A)，癬痕形成爪の脱落を来す(B)。

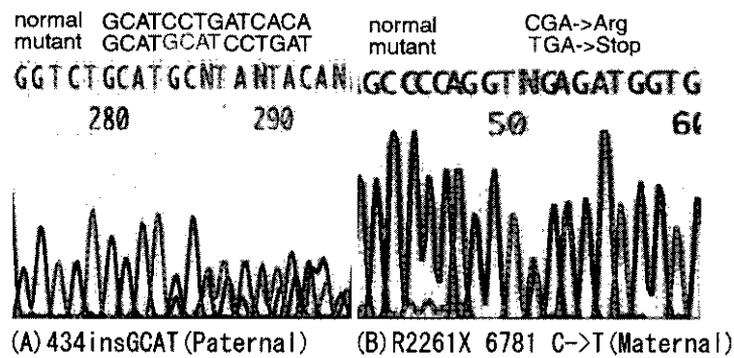


図2 遺伝子検索結果 exon4 における 434insGCAT の4塩基挿入(A)と exon86, 6781番目のCがTに変異したために引き起こされるナンセンス変異, R2261X(B) の compound heterozygote であることが判明した。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

遊走性環状紅斑を伴った単純型先天性表皮水疱症は
ケラチン5分子尾部の延長により生ずる

研究協力者 市來善郎 岐阜大学医学部皮膚病態学 講師

研究要旨 ケラチン病、すなわち先天性魚鱗癬様紅皮症、単純型先天性表皮水疱症の発症機序を明らかにするために1つのモデルとして、緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑という特異な臨床を呈した単純型先天性表皮水疱症（EBS）2例について、病理組織およびケラチン5（K5）、14（K14）の遺伝子変異を検討した。HE標本では表真皮境界に水疱を認め、電顕では有棘細胞においてデスモゾーム、ケラチン線維の減少および棘融解を認めた。また免疫組織染色ではK5染色性の減弱を認めた。末梢血から genomic DNA を分離しK5、K14の変異を調べるとK14には異常を認めなかったが、K5では exon 9 にヘテロの 1649delG の欠失変異を認めた。この変異はフレームシフトおよび読み過ぎし変異を起こしK5のV2ドメイン以下に正常より35個長い変異アミノ酸鎖を生じていると考えられた。

共同研究者

戸崎裕子、谷 麗紅、永井美貴、北島康雄
岐阜大学医学部皮膚病態学

Soo-Chan Kim, Junsu Park

Cutaneous Biology Research Institute,
Brain Korea 21 Project for Medical
Science, Yonsei University College of
Medicine, Seoul, Korea

A. 研究目的

ケラチン病、すなわち先天性魚鱗癬様紅皮症、単純型先天性表皮水疱症の発症機序を明らかにするために1つのモデルとして、単純型先天性表皮水疱症（EBS）を用いて genotype, phenotype の関係を明らかにする。EBSは、表皮基底細胞に発現するケラチン（K5、K14）の遺伝子異常によりケラチン中間径線維構築異常をきたすことで基底細胞に崩壊が生じ、臨床的には機械的外力により水疱を生ずる遺伝性疾患である。CoulombeによるDowling-Meara型のK14点突然変異を端緒に、多くの症例が報告されている。これらの症例におけるケラチン分子の変異部位と臨床症状の関係

からも、ケラチン分子の α ヘリックス構造がケラチン線維構築に重要であることが示されたが、頭部や尾部の機能は今だ不明である。今回、K5分子の尾部に変異を認めたEBS2例について genotype, phenotype の関係から、ケラチン分子の機能やケラチン病の病態についての解明を試みた。

B. 研究方法

以下に示す特異な臨床を呈したEBS2例について免疫組織学的、および分子生物学的に検討した。症例1：2才女児。出生直後より四肢に水疱を繰り返し生じるため岐阜大学皮膚科を受診した。家族に同症はない。初診時、足、腋窩および顎に、緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑を認めた。組織では表皮基底細胞内に裂隙を認め、電顕では有棘細胞においてデスモゾーム、ケラチン線維の減少および棘融解を認めた。以上よりEBSと診断したが病型は特定出来なかった。（図1）症例2：1才女児。出生直後より四肢に水疱を生じ再発、寛解を繰り返すため韓国Yonsei Universityを受診した。大腿に緊

満性の水疱を辺縁に伴い環状に拡大する紅斑を認めた。家族歴、母、叔父、叔母、祖父および従兄弟計5名に同症あるがいずれも成長とともに水疱は軽快し色素沈着を残している。組織所見は、免疫組織所見は症例1と同様であった。症例2もEBSと診断したが病型は特定出来なかった。(図2)

免疫組織学的検討は、患者皮膚の凍結切片を用いて、抗ケラチン5抗体 (C50, Lab Vision, Fremont, CA, USA) および抗ケラチン14抗体 (LL002, Lab Vision, Fremont, CA, USA)、パラフィン切片を用いて抗ケラチン5抗体 (RCK102, Sanbio, Uden, NL) で各々染色した。遺伝子変異は、患者末梢血から genomic DNA を抽出し、K5、K14遺伝子の各エクソンをPCRで増幅し、自動シーケンサー (ALOKA, Tokyo) でシーケンスした。

C. 研究結果

症例1、2ともにK5、K8に対する抗体 (C50) では基底細胞層はコントロールに比して極めて軽微に染色された。RCK102でもコントロールに比べると染色性は減弱していた。K14に対する染色性はコントロールと差がなかった。(図1、2)

遺伝子変異の検索では、症例1、2ともに、K14に異常を認めなかった。一方KRT5遺伝子では、症例1、2ともにエクソン9の1649Gにヘテロの欠失変異 (1649delG) を認めた。症例1の両親、祖母にこの変異は認めなかった。しかし症例2では同症認める母、叔父に同じ変異を認めた。1649delGはK5分子の尾部V2ドメインのC末41アミノ酸にフレームシフトを来し、さらに読み過ぎ変異および35アミノ酸鎖延長をもたらすと考えられた。

D. 考察

緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑という極めて特異な臨

床を呈した単純型先天性表皮水疱症 (EBS) 2例を経験した。ケラチンの免疫染色でK5の染色性が軽微であったことから、K5の異常が疑われたが、シーケンスでもKRT5の変異が確認された。これまでに遠心性紅斑を伴うEBSとしては、KawanaらのEBS with transient erythema circinatumがある。しかし彼等の例では、自験例と異なりトノフィラメントの異常凝集がみられたことから、Dowling-Meara型に近いものと考えられる。また遺伝子変異の検索がされていないため自験例との異同についてはこれ以上言及出来ない。

EBSは皮疹の分布や電顕所見などから、主としてWeber-Cockayne型、Köbner型、Dowling-Meara型の3型に分類されてきた。さらにその変異部位も、最も重症型のDM型では α ヘリックス構造の両端の保存された領域に集中し、軽症のWC型では α ヘリックス構造の1B, 2Aをつなぐlinkerに多く見られるなど genotype-phenotype の関係も明らかにされつつある。しかし自験例に認められたC末に近い変動領域であるV2の変異は初めての報告である。またフレームシフト変異によって、termination codonの読み過ぎしと尾部の延長を伴うEBSもこれまでに報告されていない。自験例がケラチンフィラメント構築に関係する α ヘリックスの変異ではなく、尾部に延長を伴う変異を認めたことと、遠心性に拡大する紅斑を伴うという特異な臨床像とを関係づけると極めて興味深い。すなわち本症例の病態の解明が、ケラチン分子の非 α ヘリックス構造領域の機能を明らかにする可能性を示唆している。

E. 結論

緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑という特異な臨床を呈した単純型先天性表皮水疱症 (EBS) 2例について、K5のexon9にヘテロの

1649delG の欠失変異を認めたこと、さらにこの変異はフレームシフトおよび読み過ぎし変異を起こしK5のV2ドメイン以下に正常より35個長い変異アミノ酸鎖を生じる可能性を報告した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

1 Li-Hong Gu, Yoshiro Ichiki, Miki Sato, Yasuo Kitajima: A novel non-sense mutation at E 106 of the 2B rod domain of keraqtin 14 cases dominant epidermolysis bullosa simplex. J Dermatology 29: 136-45. 2002.

2 Li-Hong Gu, Yoshiro Ichiki, Yasuo Kitajima: Aberrant expression of p16

and RB protein in eccrine porocarcinoma. J Cutan Pathol 29: 473-9. 2002.

日本語論文

1 市來善郎（分担）

後天性魚鱗癬、融合性細網状乳頭腫症、更年期角化症

最新皮膚科学体系 第7巻角化異常性疾患 p291-302（中山書店）

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図とその説明

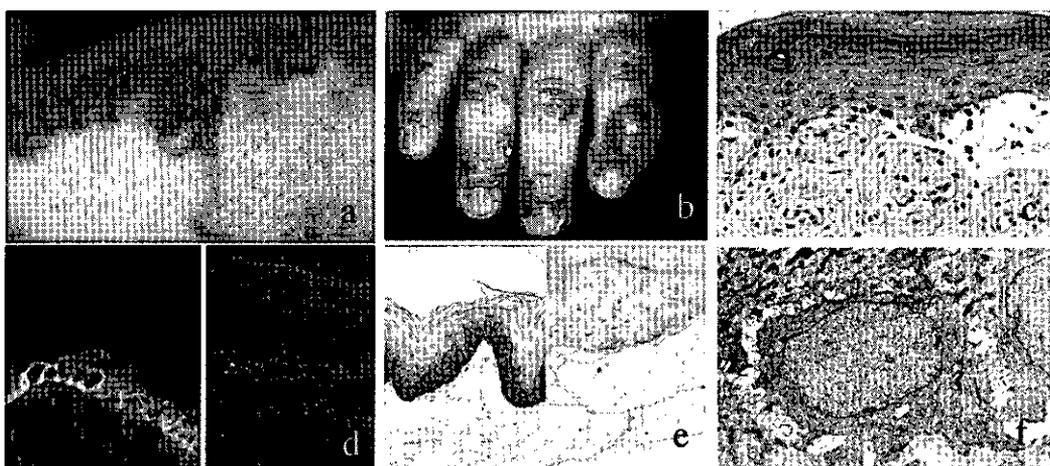


図1. 症例1 (a) 遠心性に拡大する紅斑とその辺縁に水疱を認める。(b) 手指など四肢には遠心性紅斑を伴わない水疱も認める。(c) 水疱部の病理組織は表皮基底細胞の変性と裂隙形成を示す。(d) 抗ケラチン5抗体 C50 では基底細胞層はほとんど染色されない。(e) 抗ケラチン5抗体 RCK102 では基底細胞層は僅かに染色される。(f) 基底細胞電顕像ではトノフィラメントの異常凝集塊は認めない。

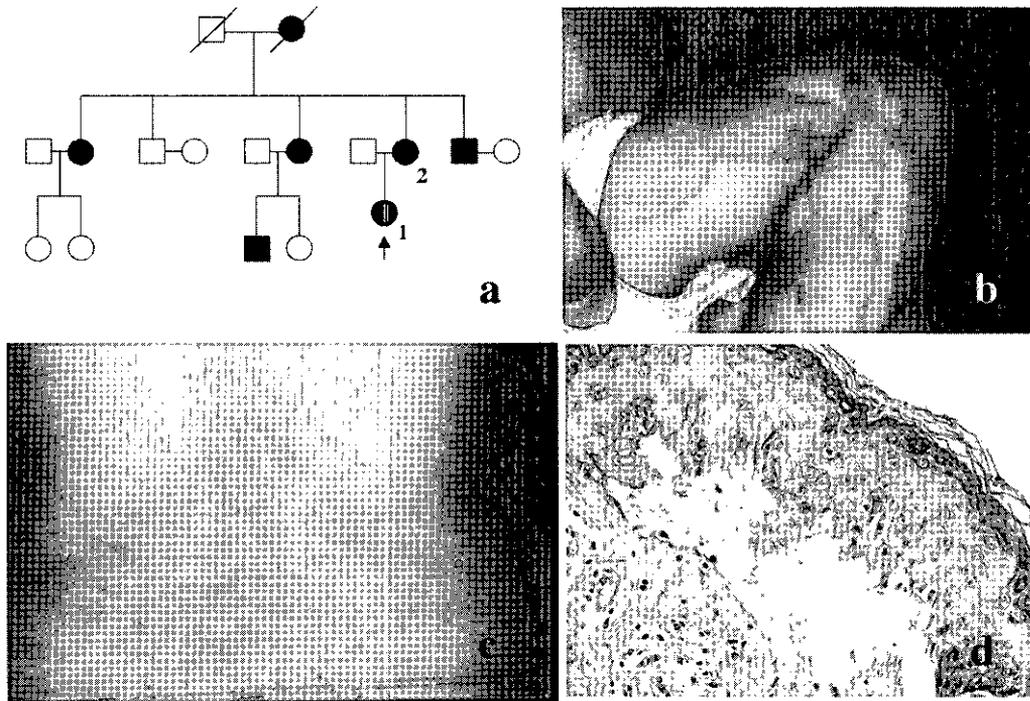
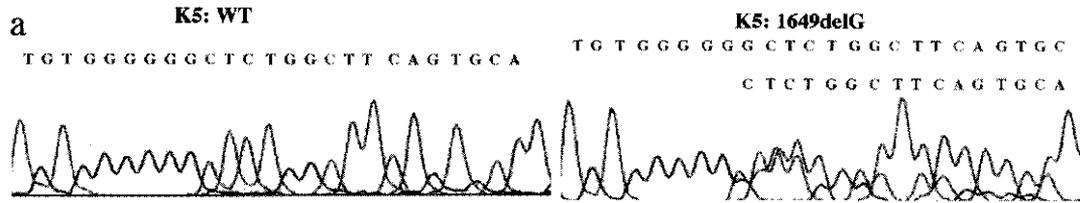


図2. (a) 症例2の家系図。(b) 症例2の臨床像。大腿部に遠心性に拡大する紅斑とその内部に色素沈着、辺縁に水疱を認める。(c) 症例2の母親の臨床像。体幹部にまだらな色素沈着を認める。(d) 症例1の病理組織像。表皮基底細胞に変性と裂隙形成を認める。



b

K5:	482
K5: 1649delG	SGEGVGPVNISVVTSSVSSGYGSGSGYGGGLGGGLGGGLGG
	523
K5:	GLAGGSSGSYYSSSSGGVGLGGGLSVGGSGFSASSGRGLGV
K5: 1649delG	GLAGGSSGSYYSSSSGGVGLGGGLSVG<u>ALASVQAVAEGWGW</u>
	564
K5:	GFGSGGGSSSSVKFVSTTSSSRKSFKS*
K5: 1649delG	<u>ALAVAGVAAPASNLSPPPPPPPGRASRAKNLLQVTAFOVQOP</u>
	605
K5:	
K5: 1649delG	<u>SPWRLPLLGSCSSHVLSFSGE*</u>

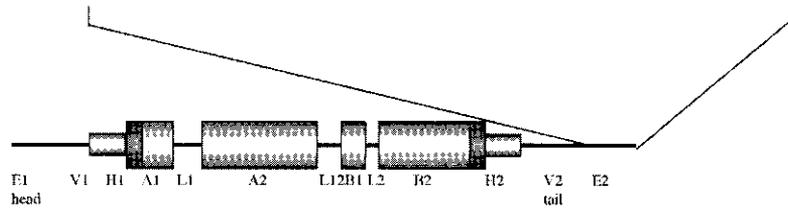


図3. (a) 症例1の末梢血より得られたDNAのシーケンスでは、KRT5エクソン9にヘテロ1649delGを認めた。(b) 1649delGは550以下のアミノ酸配列に異常を来し、さらに termination codon (591)以降に35個長いアミノ酸鎖をもたらした。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

遺伝子治療のための遺伝子導入効率増強に関する研究

分担研究者 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 長期遺伝子発現のために魚類の transposon/transposase の共導入系を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を骨格筋に HVJ-liposome で導入し、6ヶ月以上にわたって発現させることに成功した。また Semliki forest virus のレプリケースを利用して RNA を増幅させる系を用い培養細胞や骨格筋で LacZ 遺伝子を通常のプラスミドと比較して10倍以上の発現増強を起こすことができた。

A. 研究目的

表皮水疱症を代表とする難治性皮膚疾患に対する究極的な治療法は遺伝子治療である。そのための課題は全身の皮膚組織にいかにして遺伝子を導入し発現させることができるか、その発現レベル、期間を治療に十分な程度保証することができるかという技術的な問題が大きい。本研究では導入遺伝子の発現の長期化と増強に貢献する方法の開発を行った。

B. 研究方法

1) 長期遺伝子発現のために魚類の transposon/transposase の共導入系を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を骨格筋に HVJ-liposome で導入した。

2) 遺伝子発現増強のため Semliki forest virus (SFV) のレプリケースを利用して RNA を増幅させる系を改変し、CMV promoter 下でレプリケースと LacZ 遺伝子の mRNA を発現させるプラスミド pCMV-rep-LacZ を構築した。これを培養細胞や骨格筋に導入し、レプリケースをもたない LacZ 遺伝子 (pCMV-LacZ) と発現レベルを比較した。

C. 研究結果

魚類の transposon/transposase の共導入系を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を骨格筋に HVJ-liposome で導入したところ、

6ヶ月以上にわたって発現させることに成功した。サザンブロットを施行したが、3日目の時点ではゲノムへの挿入は認めなかった。1週間以降のサンプルからは導入遺伝子を検出することはできず、染色体ゲノムへの挿入が起こっているかどうかは不明であった。PCR によっては6ヶ月時点においても導入遺伝子の検出は可能であった。

pCMV-rep-LacZ, pCMV-LacZ を BHK-21細胞にリポフェクションで導入すると1日後の LacZ 遺伝子発現は差がなかったが、3日目より pCMV-rep-LacZ 導入群では LacZ 発現が日ごとに増加し、pCMV-LacZ 導入群と比較して10倍以上の遺伝子発現を起こすことができた。しかし細胞をかえるとこの効果が認められ無くなった。次にマウス骨格筋にプラスミドの直接注入を行なったところ、pCMV-rep-LacZ を用いたものでは通常のプラスミドと比較して10倍以上の LacZ の発現増強を起こすことができた。

D. 考察

transposon/transposase を用いた系では in vivo での遺伝子挿入の可能性についての結論を出すことができなかった。6ヶ月時点で残存する遺伝子のコピー数が激減しているためと考えられる。エレクトロポレーション法や超音波法の方が一度に導入できる遺伝子のコピー数が多いと考えられ

るので、今後はこれらの方法の併用を考えねばならない。またたとえ挿入されているとしてもランダム挿入と考えられるので、insertional mutagenesisを起こす危険性も否定できない。挿入部位の制御は今後も研究対象となろう。

レプリケースの遺伝子発現増強効果は確かに効果的ではあるが、細胞による相違については従来報告がなかった。レプリケースの活性化には細胞内因子がおそらく必要であり、種特異性や細胞特性がある可能性が考えられる。皮膚組織について今後たす必要がある。

E. 結論

transposon/transposase を用いた系では組織中での遺伝子長期発現が期待できることがわかった。またSFVのレプリケースを用いた系では遺伝子発現の増強効果がえられることがわかった。しかしそのメカニズムの解明はまだ十分ではない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki,

M., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. **Circulation** 105, 1233-1239, 2002.

2. Endoh, M., Koibuchi, N., Sato, M., Morishita, R., Kanzaki, T., Murata, Y. and Kaneda, Y.: Fetal gene transfer by intra-uterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. **Molecular Therapy**, 5, 501-505, 2002.

3. Kaneda, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T., Yamamoto, S., Ikegami, H., Suzuki, N., Nakamura, H., Morishita, R., and Kotani, H.: HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. **Molecular Therapy** 6, 219-226, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

化学療法剤を封入した医薬製剤（特願2002-320577）

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

先天性表皮水疱症の遺伝子治療法開発

研究協力者 玉井克人 弘前大学医学部皮膚科学 助教授

研究要旨 先天性表皮水疱症の遺伝子治療を実現するためには、1) 遺伝子診断による病型の決定と遺伝子治療適応症例の決定、2) 皮膚への遺伝子導入方法の開発、3) 治療用発現ベクターの開発、4) 治療効果、安全性の検討、5) 免疫反応回避方法の開発、6) 臨床応用、の各課題に対して取り組む必要がある。これら各課題に対する今年度の研究状況をまとめると共に、今後の展望と問題点について考察する。

共同研究者

菊池 康、花田勝美、橋本 功
弘前大学医学部皮膚科
遠藤誠之、金田安史
大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

A. 研究目的

皮膚基底膜領域の遺伝子異常により発症する先天性表皮水疱症は、各病型における異常遺伝子の種類が明らかにされた結果遺伝子診断が可能となり、正確な病型診断、遺伝相談、出生前診断などに応用されている。本研究班では、先天性表皮水疱症、とりわけ重症劣性栄養障害型表皮水疱症に対する有効な遺伝子治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

以下の内容を本研究班におけるわれわれの研究内容とする。

1) 遺伝子診断：全国の主要施設より遺伝子診断を依頼された栄養障害型表皮水疱症症例の末梢血10mlよりDNAを抽出し、PCRによりⅦ型コラーゲン遺伝子(COL7A1)のすべてのエクソンおよびその近傍イントロンを増幅した後、構造感受性ゲル電気泳動にて変異を含む断片をスクリーニングし、最終的に塩基配列を決定し

て変異の有無を検討する。

2) 皮膚への遺伝子導入方法の確立：化学的に皮膚を処理した後に超音波エネルギーを用いて遺伝子を導入する gene bath 法を確立する。

3) 治療用発現ベクターの開発：表皮ケラチノサイト由来 mRNA をテンプレートとして RT-PCR によりⅦ型コラーゲン cDNA をクローニングし、遺伝子発現プラスミド内に組み込んでⅦ型コラーゲン発現ベクターを作成する。

4) 治療効果、安全性の検討：Ⅶ型コラーゲンノックアウトマウス皮膚にⅦ型コラーゲン発現ベクターを導入し、皮膚症状の改善程度および異常症状出現の有無を検討する。

5) 免疫反応回避方法の開発：マウス胎児皮膚に遺伝子導入することにより遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導する。また免疫反応を回避可能な人工接着分子を作成する。

6) 臨床応用：以上の研究成果を基に、重症栄養障害型表皮水疱症患者皮膚に対する遺伝子治療法プロトコルを作成する。

C. 研究結果

上述した1)～6)の研究内容に対し、本年度は、以下の研究結果を得た。

1) 遺伝子診断：これまで行った栄養障害型表皮水疱症遺伝子診断により、54種類 COL7A1 変異を同定し、変異の種類と臨床症状との間にある程度相関があること、本邦症例高頻度変異である6573+1GtoC、8569GtoT、5818delC の出現頻度が約30%であることを明らかにした。また、遺伝子治療適応症例を選択した。

2) 治療用発現ベクターの開発：遺伝子発現プラスミドベクター pCAGGS を用いてⅦ型コラーゲン cDNA 発現ベクターを作成した。

3) ケミカルピーリングと超音波を組み合わせるにより皮膚に効率よく遺伝子導入が可能となることを明らかにした。

4) 治療効果、安全性の検討：米国 Jefferson 医科大学皮膚科、Jouni Uitto 教授との共同研究により、Ⅶ型コラーゲンノックアウトマウスの利用が可能となった。

5) 免疫反応回避方法の開発：マウス胎児皮膚に GFP 発現プラスミドを導入することにより、GFP に対する免疫寛容を誘導し得た。

6) 臨床応用：未試行。

D. 考察

栄養障害型先天性表皮水疱症遺伝子診断データベースの充実により、早期の臨床的予後決定が可能になった。指間の癒着、開口障害、食道狭窄、有棘細胞癌のなど重度の合併症が出現する前に遺伝子治療を開始することにより、皮膚症状の改善のみならず、重度合併症の出現を回避することが可能になるかもしれない。

Ⅶ型コラーゲンの供給細胞は表皮角化細胞と考えられるため、われわれの開発した遺伝子治療法は表皮角化細胞を標的とする。しかし、真皮線維芽細胞からもⅦ型コラーゲンが産生される可能性もあり、今後真皮線維芽細胞を用いた遺伝子治療法の可能性も検討する必要がある。

Ⅶ型コラーゲンが完全欠損している症例

では、Ⅶ型コラーゲンに対する免疫寛容が破綻しているため、遺伝子治療により強い免疫反応が喚起される可能性がある。成人症例に対する免疫寛容誘導方法が確立していない現時点では、最初の栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療臨床応用の際には、重症症例の中でアミノ酸置換型変異を持つ症例を選択すべきであろう。

E. 結論

Ⅶ型コラーゲン発現ベクターを皮膚に導入することが可能となった。今後、Ⅶ型コラーゲンノックアウトマウスを用いてわれわれの方法論の有効性、安全性を検討すると共に、より効率よく低侵襲な皮膚への遺伝子導入法を開発し、本研究班の研究期間内における臨床応用を目標としたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Nakamura H, Aoki M, Tamai K, Oishi M, Ogihara T, Kaneda Y and Morishita R: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model. *Gene Therapy* 9: 1221-1229, 2002
2. Meng X, Sawamura D, Ina S, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I: Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin. *Exp Dermatol*, 11:456-461, 2002
3. Matsuzaki Y, Tamai K, Kon A, Sawamura D, Uitto J and Hashimoto M: Keratinocyte respon-

sive element 3 (KRE3): Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter. J Invest Dermatol, 120:308-12, 2003

日本語論文

1. 玉井克人. 癩痕性類天疱瘡. 斎田俊明, 塩原哲男, 宮地良樹, 渡辺晋一編. 今日の皮膚疾患治療指針第3版 東京: 医学書院; 2002. p. 303-304.
2. 玉井克人. 疱疹状皮膚炎. 斎田俊明, 塩原哲男, 宮地良樹, 渡辺晋一編. 今日の皮膚疾患治療指針第3版 東京: 医学書院; 2002. p. 304-305.
3. 玉井克人. 先天性水疱症. 斎田俊明, 塩原哲男, 宮地良樹, 渡辺晋一編. 今日の皮膚疾患治療指針第3版 東京: 医学書院; 2002. p. 322-329.
4. 玉井克人. 先天性表皮水疱症の診断. 玉置邦彦編. 最新皮膚科学体系 第6巻 水疱症 膿疱症 東京: 中山書店; 2002. p. 160-165.
5. 玉井克人. 栄養障害型表皮水疱症. 玉置邦彦編. 最新皮膚科学体系 第6巻水

疱症 膿疱症 東京; 中山書店; 2002. p. 186-197.

6. 玉井克人. 先天性水疱症. 植木宏明, 富田靖, 玉置邦彦, 飯塚一編. 皮膚科専門医テキスト 東京; 南江堂; 2002. p. 322-324
 7. 玉井克人. 先天性表皮水疱症. 植木宏明, 富田靖, 玉置邦彦, 飯塚一編. 皮膚科専門医テキスト 東京; 南江 2002. p. 324-328
 8. 玉井克人. 一過性棘融解皮膚炎, Grover病. 植木宏明, 富田靖, 玉置邦彦, 飯塚一編. 皮膚科専門医テキスト 東京; 南江堂; 2002. p. 328-329.
 9. 玉井克人. 表皮水疱症: 診断と治療. 日本皮膚科学会専門医講習会テキスト 日本皮膚科学会研修委員会, 2002, p. 1-30頁
 10. 玉井克人. 先天性表皮水疱症. 今日の小児疾患治療指針. 印刷中
 11. 玉井克人. 先天性表皮水疱症. 皮膚疾患最新の治療. 印刷中
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
無し。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

自己培養皮膚を用いた栄養障害型表皮水疱症の治療

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 劣性栄養障害型表皮水疱症に対する ex vivo 遺伝子治療を行う上で、自己培養皮膚移植の確立が基本となる。遺伝子を導入するという点からすると、培養表皮シートより三次元培養皮膚のほうが適していると思われる。今年度は栄養障害型表皮水疱症患者 2 例について自己三次元培養皮膚を作製し、移植を行った。2 例とも三次元皮膚の生着と早期の上皮がみられた。副作用は認めなかった。1 例は手指の癒着に対して解放術と三次元培養皮膚移植を行い、機能的に著名な改善を認めた。三次元培養皮膚の新たな使用方法として有用であると思われた。

共同研究者
白方裕司
愛媛大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

本研究の目的は栄養障害型先天性表皮水疱症に対する自己培養皮膚を用いた ex vivo 遺伝子治療の確立である。栄養障害型表皮水疱症に対しては、現在までに自己培養表皮シート移植の有用性を明らかにしてきた。しかし、培養表皮シートは非常にうすく、欠損遺伝子を導入するには不適當であることがこれまでの研究より明かとなった。一方、三次元培養皮膚は真皮成分と表皮成分を併せ持ち、角層を有する点が特徴であり、遺伝子導入には最適であることが過去の研究より明かとなった。そこで、自己三次元培養皮膚を用いた ex vivo 遺伝子治療法を開発する目的のためには、自己三次元培養皮膚の有効性を示すことが必要である。そこで、本年度は栄養障害型表皮水疱症患者 2 例について自己三次元培養皮膚を作製し、移植を行い、自己三次元培養皮膚移植の有用性についての検討を行った。

B. 研究方法

Non Hollopeau-Siemens 型栄養障害型表皮水疱症患者 2 例（共同研究者の玉井によ

り VII 型コラーゲン遺伝子の変異を確認）の角化細胞と線維芽細胞（すでに角化細胞は無血清培養法にて培養・凍結保存しているもの、線維芽細胞は outgrowth 法にて培養・凍結保存しているもの）を用いた。三次元培養皮膚は Bell により開発されたカルチャーインサートを用いる方法で三次元培養皮膚を作製した。I 型コラーゲン溶液：6 容量に対して 0.1N NaOH：1 容量、8 倍濃度 DMEM：1 容量、20% FCS/DMEM：10 容量の割合で中和コラーゲン液を 4℃にて作成し、インサートに 1 ml ずつ添加し、室温で 10 分間静置しゲル化させ、予め培養しておいた線維芽細胞を 5×10^5 細胞/ml、10% FCS/DMEM の濃度に調整し、この細胞懸濁液：2 容量に対して中和コラーゲン液：8 容量の割合で混和し、細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整した。この溶液を各インサートに 3.5 ml ずつ添加しインキュベーター内でゲル化させ、引き続き 10% FCS/DMEM をゲルが浸る程度加え 5 日間培養した。培養開始後 5 日後にはゲル上部は収縮・陥凹し、この上に角化細胞を $3-4 \times 10^5$ 個播種した。その後 3 日間液相下で培養し、引き続き気相下培養を行うことにより三次元培養皮膚を作製した（図 1）。この自己三次元培養皮膚を 2 例の患者に移植した。

C. 研究結果

症例1：26歳、男性。出生時より四肢を中心に水疱を認め、表皮水疱症と診断。Ⅶ型コラーゲン遺伝子変異検索により、両対立遺伝子に変異を認め劣性栄養障害型表皮水疱症と診断した。四肢を中心に水疱、びらんが認められ、軽微な外傷により容易に水疱を形成した。爪は脱落していた。水疱を繰り返し形成する部位を選択し、機械的刺激を加え水疱を形成させた。水疱蓋を除去し、自己三次元培養皮膚により置き換えた。一週間後には上皮化がみられた。置き換えた部位は以前と比較すると水疱の形成が抑制された。副作用は認めなかった(図2)。

症例2：22歳、女性。出生時よりほぼ全身に水疱・びらん・潰瘍が多発、劣性栄養障害型表皮水疱症と診断される。平成10年6月培養表皮シート移植を他院より進められ、愛媛大学を受診した。Ⅶ型コラーゲン遺伝子変異を玉井により検索し、両対立遺伝子に変異が認められ劣性型と確定診断した。体幹・四肢に広範囲にびらん、潰瘍が多発し、爪は脱落。指間の癒着と屈曲拘縮を認めた。外科的に手掌の拘縮を解除し、人工真皮を移植した。移植後3週後に自己三次元培養皮膚を移植した(図3)。また、指間も同様に剥離し、自己三次元培養皮膚により治療した。週に1回の移植で、合計3回の移植を行い上皮化した。手指の機能は大幅に改善した。副作用は認めなかった。

D. 考察

三次元培養皮膚は角層を有し、最も皮膚に近いものである。作製には高度の技術を要するが、治療効果は表皮シートに比べると大きいと思われる。今回の研究では難治性潰瘍への移植ではなく、患者が最も負担となっている手指の癒着に対して三次元培養皮膚を移植した。過去の報告で、手指の棍棒状癒着に対する外科的治療の有効性が示されているが、これまでは皮膚移植を用いており一過性には有効であるが、数年の

うちに拘縮は再発してくる。培養皮膚の特徴として一度の採皮で繰り返し培養皮膚の作製が可能である点からすると、三次元培養皮膚による指間の治療が従来の皮膚移植と同等であれば、培養皮膚のほうが有用であると思われる。また、今回の研究で、再発部位に対する三次元培養皮膚による“張り替え”を試みた。観察期間が短いものの、“張り替え”部位には水疱の形成が少ないと患者は満足している。従来の難治性潰瘍に対する培養皮膚移植ではなく、張り替えという使用方法も新たな治療として可能性が得られたと思われる。張り替えだけでもある程度の効果が得られたので、遺伝子導入自己三次元培養皮膚移植が可能になればさらに治療効果は向上することが期待される。

E. 結論

自己三次元培養皮膚移植は栄養障害型表皮水疱症患者の治療に有用であることが明らかとなった。Ⅶ型コラーゲン遺伝子を導入した自己三次元培養皮膚が開発されればさらに有用性の向上がみられると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Klagsbrun M, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Mekada E: HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci in press*
2. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitzu M,

- Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M.: Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4⁺ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. **J Immunol** 170:2205-13, 2003
3. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, Hashimoto K: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. **J Dermatol in press**
 4. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, Hashimoto K: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol in press**
 5. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. **J Biol Chem.** 277:40390-40396, 2002
 6. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Different effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation **J Invest Dermatol** 119: 1231-1236, 2002
 7. Tsuda T, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. **J Dermatol Sci in press**
 8. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T: BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002
 9. Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K.: Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. **J Invest Dermatol.** 119:403-410, 2002
- 日本語論文
1. 白方裕司、橋本公二: 下腿潰瘍の治療: 培養皮膚による治療。皮膚病診療 24:1006-1011 2002. 09
 2. 橋本公二: 上皮再生の現状と新たな展望。Medical Science Digest 28:8-10, 2002. 12
 3. 白方裕司、徳丸晶、橋本公二: 先天性表皮水疱症の治療。玉置邦彦ほか編 最新皮膚科学体系 6 水疱症・膿疱症 P198-204 東京: 中山書店 2002. 05
 2. 学会発表
 1. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15,

2002, Los Angeles, USA

2. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological Research September 19, 2002, Geneva, Switzerland
3. Hashimoto K, Shirakata Y, Yamasaki K: Cre-loxP adenovirus mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes. Symposia "GENE THERAPY" 20th World Congress of Dermatology

June 5, 2002, Paris, France

4. Hashimoto K, M Tohyama: HHV-6 associated drug eruption (HADE). Symposia "CUTANEOUS DRUG ERUPTIONS & DRUG HYPERSENSITIVITY" 20th World Congress of Dermatology June 1, 2002, Paris, France

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図とその説明



図1 三次元培養皮膚のマクロ所見。角層を有するため支持体なしでも強固なシート状を呈する。

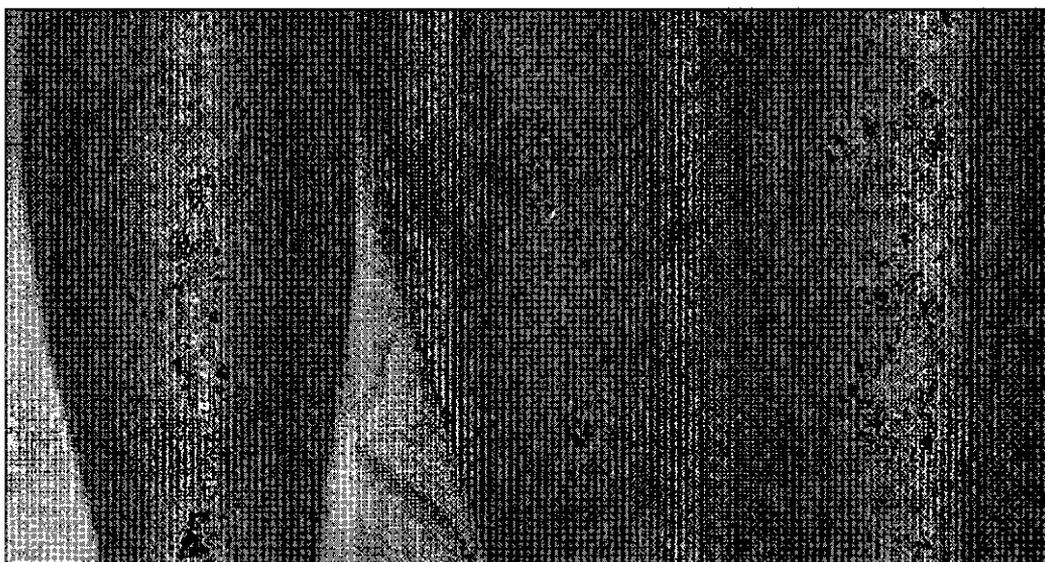


図2 栄養障害型表皮水疱症に対する三次元培養皮膚移植。下腿の広範囲の潰瘍面に自己三次元培養皮膚一色を行った。ほぼ生着し速やかに上皮化した。左：移植時、中：移植7日後、右：移植24日後。

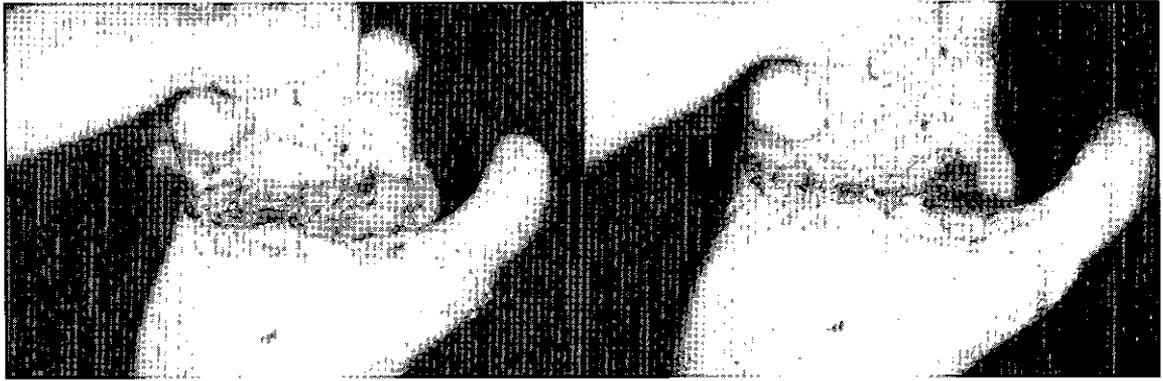


図3 栄養障害型表皮水疱症の手指の癒着に対する三次元培養皮膚移植。
右手の癒痕拘縮を解除し、人工真皮を移植後、自己三次元培養皮膚移植を行った。
三次元培養皮膚は良好に生着し、一週後には上皮化した。左：移植前、右：移植
後。