

20020744

厚生労働科学研究費補助金

特定疾患対策事業

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|------------------------------------|---|
| 難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究----- | 1 |
| 橋本公二 | |

II. 分担研究報告

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1. 自己三次元培養皮膚を用いた栄養障害型表皮水疱症の治療----- | 7 |
| 橋本公二 | |
| 2. アデノウィルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入----- | 13 |
| 白方裕司 | |
| 3. 栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療のための基礎研究----- | 17 |
| 玉井克人 | |
| 4. 角化細胞の stem cell の単離・培養----- | 20 |
| 大河内仁志 | |
| 5. 角化細胞 side population の解析----- | 23 |
| 岡野栄之 | |

| | |
|--------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 26 |
|--------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷----- | 29 |
|----------------------|----|

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

主任研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植の確立のために、角化細胞の完全無血清培養法を確立し、培養皮膚を作成した。この培養法を用いて難治性皮膚疾患の代表である劣性栄養障害型表皮水疱症に対し自己培養皮膚移植、三次元自己培養皮膚移植を2例の患者に施行し良好な結果を得た。また、劣性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のために原因遺伝子であるVII型コラーゲン遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込むことに成功した。超音波を利用した生体皮膚への遺伝子導入法の開発と免疫反応回避法の基礎研究を行った。さらに三次元培養皮膚への遺伝子導入法としてアデノウィルスベクターの系を確立した。表皮幹細胞研究に関しては、幹細胞の選択的培養の方法として side population 細胞の存在を、マウス角化細胞を用いて証明した。

分担研究者：国立国際医療センター部長、大河内仁志、大阪大学医学部遺伝子治療学助教授、玉井克人、慶応義塾大学医学部生理学教授、岡野栄之、愛媛大学医学部皮膚科助手、白方裕司

ことが期待される。そこで、VII型コラーゲンを高効率かつ安定的に発現させるための発現ベクター開発と、培養皮膚を作製する。本研究は、他の遺伝性皮膚疾患にも新たな遺伝子治療法を提供しうる。

A. 研究目的

本研究の目的は糖尿病性潰瘍、褥創、難治性下腿潰瘍、栄養障害型先天性表皮水疱症などの難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の確立であり、さらに、栄養障害型先天性表皮水疱症に対しては遺伝子治療法の開発を行う。中毒性表皮壊死症に対する培養皮膚の有効性について検討する。

完全無血清培養法による培養皮膚の作製

牛由来材料を使用しない培養法を確立したので、この方法を用いた培養皮膚の作製を行う。これにより、社会的に認可される培養皮膚の作製が可能となり、国民の医療の向上に貢献できると考える。

栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療
表皮水疱症に対しては、現在自己培養表皮移植の有用性が明らかとなっている。しかし、欠損遺伝子を補充する遺伝子治療法が開発されればさらに優れた効果が得られる

ヒトVII型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発

栄養障害型表皮水疱症患者への遺伝子治療を行う際に、患者が抗体を産生することが予想され、その結果として治療効果の減少が予想される。そこで、VII型コラーゲンの免疫寛容誘導法の開発を行う。免疫寛容誘導法が確立されれば、他の遺伝子治療にも応用できることが期待される。

皮膚構成細胞の stem cell の研究

皮膚構成細胞の stem cell の研究が培養皮膚開発に必須であることは当然であるが、表皮、毛嚢、汗腺、血管などの幹細胞を個々に同定し、その特徴を明らかにする必要である。特に、線維芽細胞、骨髄細胞などが、表皮、毛嚢、汗腺、血管の前駆細胞となる可能性が示唆されており、ES細胞も含めて皮膚構成細胞の stem cell に関して臨床応用の視点より、検討する。以上の如く、自己培養皮膚移植の開発は、社会的に取り残

されている難治性皮膚疾患患者にとって、多大な福音となることが期待される。

B. 研究方法

無血清三次元培養皮膚作成法の確立

角化細胞の完全無血清培養法は平成13年度に確立したので、この方法を発展させ完全無血清三次元培養皮膚の作製法を確立する。培養液自体の改善、代替物質、添加因子の検討を行い、完全無血清培養法を確立する。

三次元培養皮膚による栄養障害型表皮水疱症の治療

三次元培養皮膚を用いた ex vivo 遺伝子治療の有用性の検討のために、まず遺伝子導入なされていない三次元培養皮膚の有用性を確認する必要がある。そこで、栄養障害型表皮水疱症患者2例に対し自己三次元培養皮膚移植を行いその有用性、安全性について検討した。

ヒトVII型コラーゲン発現ベクターの作製

ヒトVII型コラーゲン完全長 cDNA は平成13年度にクローニングできたので、発現ベクターを作製する。平成13年度に見いだした超音波を用いた遺伝子導入法にてVII型コラーゲン cDNA を培養皮膚に導入し遺伝子発現について検討する。

ヒトVII型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発

超音波・マイクロバブル法（ショットガン法）を用いてマウス胎仔皮膚に GFP 発現プラスミド DNA を導入した。その後出産を待って、naked DNA 法により新生マウス皮膚に GFP 発現プラスミドを導入した後、血清を採取して抗 GFP 抗体産生の有無を ELISA 法にて検討した。

皮膚構成細胞の stem cell の研究

毛嚢、汗腺を有する培養皮膚の作成のために、それぞれの幹細胞の同定を行う。毛嚢、汗腺に関しては、表皮角化細胞の stem cell のマーカーとされている $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンが有用なマーカーであるか否かについて、それぞれを強く発現してい

る細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて同定し、FACS により細胞を回収し培養を行う。抗体を使用しない stem cell の回収法として、ヘキスト 33342 を用いた side population の分離法を確立する。ES 細胞から表皮角化細胞への分化誘導について、ケラチンの発現パターンに基づいて検討する。

C. 研究結果

分担研究者である橋本は劣性栄養障害型表皮水疱症患者2例に対し自己三次元培養皮膚を施行し、その有効性を示した。26歳、男性、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。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後、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。22歳、女性、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部位に自己三次元培養皮膚を移植した。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。両者とも副作用は認めなかった。

分担研究者の白方は三次元培養皮膚への遺伝子導入法としてアデノウイルスベクターの有用性について検討した。ヌードマウスへ移植された三次元培養皮膚は生着し外見上はコントロールウイルスと差はみられなかった。移植後2日目の組織では、移植された三次元培養皮膚の基底層に導入遺伝子の強い発現が観察できた。その発現は基底層の細胞のほぼ全細胞に発現が認められた。10日後の組織では、導入遺伝子の発現は主に表皮の上層に認められ、基底層の一部にも導入遺伝子の発現が持続していた。

分担研究者の玉井は生体への遺伝子導入法として、超音波を利用した生体皮膚への遺伝子導入方法を確立した。ケミカルピーリ

ングと超音波を組み合わせることにより皮膚に遺伝子導入が可能となることが明らかになった。50%グリコール酸による角層処理単独、あるいは超音波処理単独では、いずれも皮膚に導入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現量は極めて少なかった（数十～数百 RLU/mg）。これに対し、両者を組み合わせた結果、約百倍の遺伝子導入高率増強効果が得られた。免疫反応回避方法の開発では、マウス胎仔皮膚に 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。day18 胎仔マウス皮膚に GFP 発現プラスミド DNA を導入した群の約 40%において、生後に導入した GFP 発現プラスミド産物に対する抗体産生が抑制された。胎仔皮膚に遺伝子導入しなかった群では、生後導入した遺伝子産物に対する抗体は 100%検出された。

分担研究者の大河内は ES 細胞から角化細胞の誘導について検討した。マウス ES 細胞を PA6 の feeder layer 上で培養し、ケラチン 14 の発現を検討したところ、BMP4 の濃度は 1-10ng/ml でケラチン 14 陽性細胞が 12-14 日の培養で出現した。角化細胞の新しい培養法の検討として、最初に角化細胞のシートを作成し、遠心性に拡大増殖する系においてはカルシウム濃度によって細胞動態が全く異なることが判明した。すなわち低カルシウム濃度では辺縁部の細胞は個々に遊走し、中央部の細胞は角化してしまうのに対し、高カルシウム濃度では細胞同士が緊密に連絡しあい、シート状に遠心拡大するとともに、中央部の角化が抑制された。アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D により、増殖と遊走が完全に阻害されたが、薬剤の除去により再び増殖を開始した。血清の添加により、分化が抑制され、シートの形状がより保たれることも判明した。

分担研究者の岡野はマウス表皮角化細胞における side population (SP) を検討した。マウス角化細胞においても SP 細胞の存在を証明した。SP 細胞の割合は、全細胞数の 0.1-5%の範囲であった。さらに、cell sorter

を用いた分離法の条件を決定した。

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減少した。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。

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、三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立が必要である。そこで、三次元培養皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入について検討を行ったところ、遺伝子導入された三次元培養皮膚はヌードマウス移植においても *in vivo* で遺伝子発現していることが確認できた。通常アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は一過性であり、増殖とともに減少していくことが明かとなっている。今回の検討でも 10 日目には GFP は表皮上層に認められた。しかし、一部ではあるが基底層に GFP の発現がみられたことは、おそらく表皮幹細胞に遺伝子が導入されたため、持続的に遺伝子が発現していたのではないかと推測できる。

VII型コラーゲンが欠損した重症栄養障害型表皮水疱症患者では、VIIコラーゲンに対する免疫寛容が破綻していると予想され、治療用遺伝子産物に対して免疫反応が誘導される可能性がある。胎児皮膚への遺伝子導入を利用した免疫寛容誘導法は、胎児診断と組み合わせることにより、より有効な遺伝子治療法となると思われる。免疫応答の可能性が低い遺伝子治療方法論の開発と併せて、今後さらに検討を進めていく予定である。

従来のES細胞から角化細胞を誘導する系を開発した。我々の確立した培養系は2週間で角化細胞が出現し、in vivoの発生過程に近づいたといえる。まだ角化細胞への分化が100%ではないので、分化効率を高める必要がある。さらに誘導された角化細胞を大量に増やすためには培養液を改良する必要がある。角化細胞はばらばらに播種された状態から増殖する場合とシート状に増殖する場合とでは培養液に対する反応が異なることが判明した。また角化細胞の協調した増殖と遊走のためには0.5mM以上のカルシウム濃度が必要であった。今回確立した系は皮膚切片を培養皿に静置した時と同じ現象を再現できたと考えられ、各種阻害剤の影響をシートの直径を計測することにより、定量化できた。今後、創傷治癒モデルとして薬剤のスクリーニングにも使用できる可能性が示唆された。

幹細胞の分離法としてSide population細胞の存在を明らかにしたことは、今後の表皮幹細胞を用いた皮膚の再生に大きな伸展をもたらすことが期待される。

E. 結論

自己三次元培養皮膚移植を確立し、三次元培養皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を確立した。胎児皮膚への遺伝子導入を利用した免疫寛容誘導法の基礎的研究を終了した。幹細胞に関しては、SP細胞を用いた表皮幹細胞の分離法の確立と、ES細胞から角化細胞の誘導の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

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* 30:135-140, 2003
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**.:

- Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation **J Invest Dermatol** 119: 1231-1236, 2002
7. Tsuda T, Thoyama 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** 31:37-42, 2003
 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
 10. Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, **Okano H**: RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 15194-15199, 2002
 11. Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N, Artavanis-Tsakonis S, **Okano H**: Involvement of a praline-rich motif and RING-H" finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. **Development** 129:1049-1059, 2002
 12. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, **Okano H**: Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1. **Differentiation** 71: 28-41, 2003
 13. Kayahara T, Sawada M, Takaiishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, **Okano H**, Chiba T: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. **FEBS Lett** 535: 131-135, 2003
 14. **Okano H**, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fates. **J Cell Sci** 115: 1355-1359, 2002
 15. Yano, S., Komine M, Fujimoto M, **Okochi, H.**, Tamaki, K: Interleukin 15 induces the Signals of Epidermal proliferation through ERK and PI3-kinase in human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT **Biochem Biophys Res Commun** 301:841-847, 2003
 16. Yano S, Nakamura K, **Okochi H**, Tamaki K: Analysis of the expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on the peripheral blood and cutaneous lymphocytes of alopecia areata patients. **Acta Derm Venereol** 2002;82:82-85
 17. 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
 18. 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
 19. Matsuzaki Y, **Tamai K**, Kon A, Sawamura

D, Uitto J and Hashimoto M: Keratinocyte responsive 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

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

5. **Okochi H**: A keratinocyte outgrowth system useful as a new tool for analyzing proliferation, migration and differentiation Timberline Symposium 2003 2003年2月3日ポータルランド (米国)

G. 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

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

自己三次元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。

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相当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く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* 30:135-140, 2003

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**: Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation **J Invest Dermatol** 119: 1231-1236, 2002
 7. Tsuda T, Thoyama 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** 31:37-42, 2003
 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

なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

図とその説明

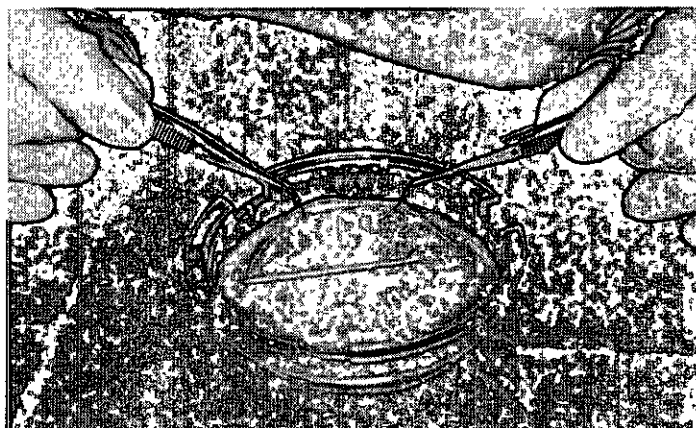


図1 三次元培養皮膚のマクロ所見。角層を有するため支持体なしでも強固なシート状を呈する。

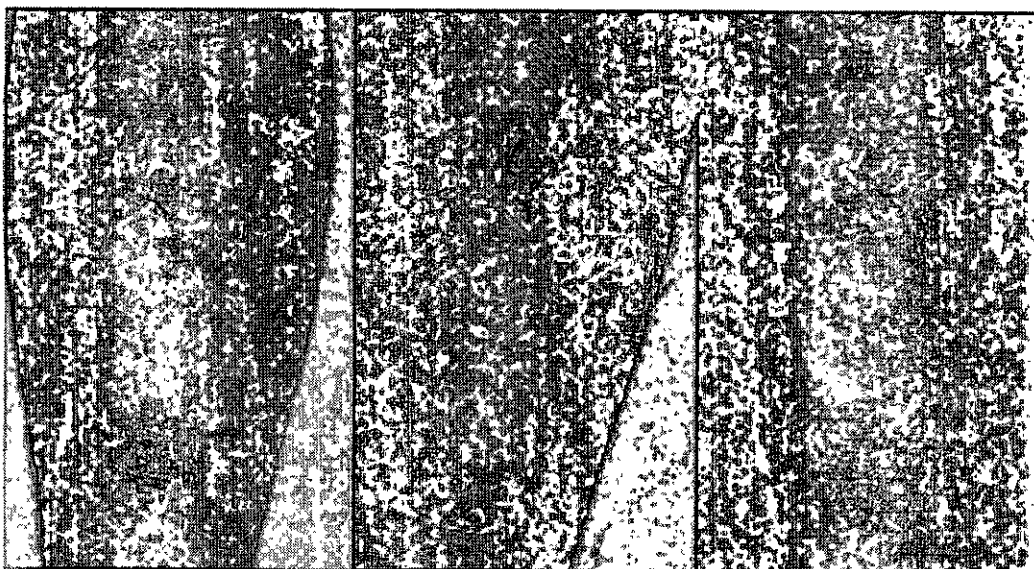


図2 栄養障害型表皮水疱症に対する三次元培養皮膚移植。
下腿の広範囲の潰瘍面に自己三次元培養皮膚一色を行った。ほぼ生着し速やかに上皮化した。左：移植時、中：移植7日後、右：移植24日後。

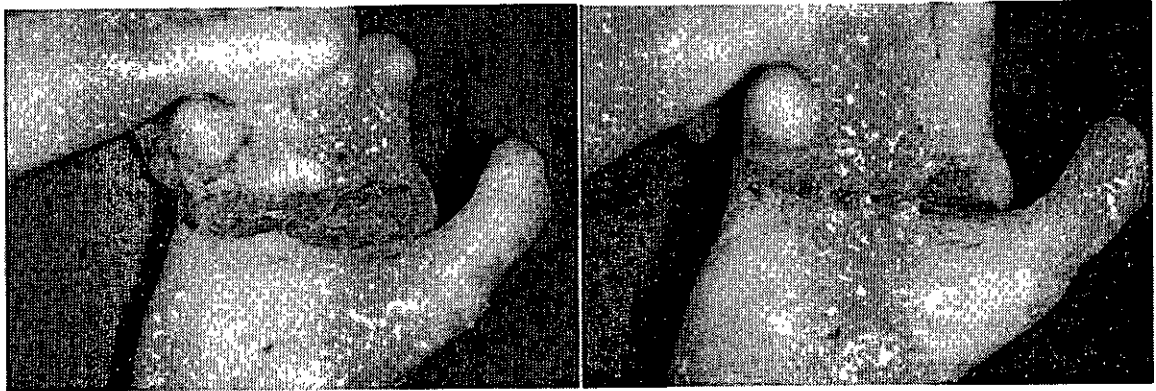


図3 栄養障害型表皮水疱症の手指の癒着に対する三次元培養皮膚移植。
右手の瘢痕拘縮を解除し、人工真皮を移植後、自己三次元培養皮膚移植を行った。三次元培養皮膚は良好に生着し、一週後には上皮化した。左：移植前、右：移植後。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

アデノウィルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入

分担研究者 白方裕司 愛媛大学医学部皮膚科学 助手

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、遺伝子導入法の確立が必要である。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。今年度は三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入について検討を行った。空気曝露後7日目に表皮真皮境界部へアデノウィルスベクターを注入し、ヌードマウスへ移植した。遺伝子は10日間持続発現していることが確認できた。

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への遺伝子導入法の確立が必要である。そこで、本年度は三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入について検討を行った。

B. 研究方法

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1ml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3.5ml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)。空気曝露後7日目にGFP遺伝子を挿入したアデノウィルスベクターを表皮真皮境界部に注入した。注入翌日に三次元培養皮膚をヌードマウス背部に移植し、移植後2日目、10日目に組織を採取し、GFPの発現を共焦点laser顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

ヌードマウスへ移植された三次元培養皮膚は生着し外見上はコントロールウイルスと差はみられなかった。移植後2日目の組織では、移植された三次元培養皮膚の基底層にGFPの強い発現が観察できた。GFPの発現は基底層の細胞のほぼ全細胞に発現が認められた。10日後の組織では、GFPの発現は表皮の上層に認められた。しかし、基底層の一部にGFPの発現が認められた。すなわ

ち、一部は基底層にとどまり、GFP を持続発現していた (図 2)。

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遺伝子を発現させるには現時点でもっとも適した人工皮膚である。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、三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立が必要である。そこで、三次元培養皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入について検討を行ったところ、遺伝子導入された三次元培養皮膚はヌードマウス移植においても in vivo で遺伝子発現していることが確認できた。通常アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は一過性であり、増殖とともに減少していくことが明かとなっている。今回の検討でも 10 日目には GFP は表皮上層に認められた。しかし、一部ではあるが基底層に GFP の発現がみられたことは、おそらく表皮幹細胞に遺伝子が導入されたため、持続的に遺伝子が発現していたのではないかと推測できる。

E. 結論

三次元培養皮膚への遺伝子導入法としてアデノウイルスベクターが有用であることが明かとなった。

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. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaito 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

2. **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* 30:135-140, 2003
3. 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
4. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, **Shirakata Y**, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K.: Phosphatidyl inositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *J Biol Chem* 277:40390-40396, 2002
5. Hanakawa Y, Amagai M, **Shirakata Y**, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation *J Invest Dermatol* 119: 1231-1236, 2002
6. Tsuda T, Thoyama 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* 31:37-42, 2003
7. 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

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

2. 白方裕司: 培養皮膚による表皮再生と
遺伝子治療。Medical Science Digest
28:11-14, 2002

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

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

G. 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。

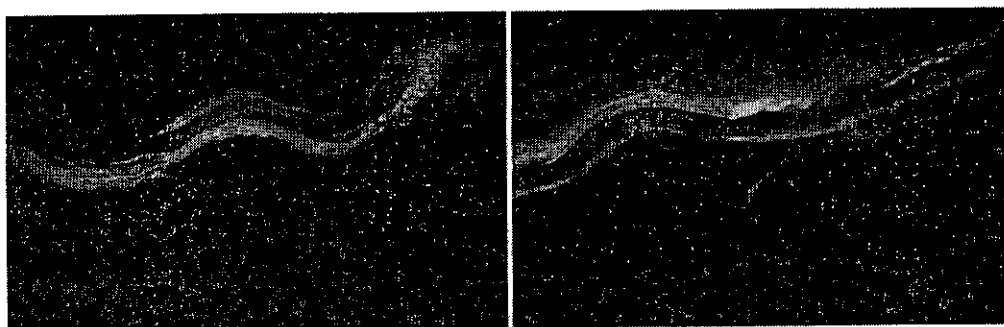


図2 三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入
左：ヌードマウス移植後2日、右：移植後10日。
移植後2日目では、移植された三次元培養皮膚の基底層全体に GFP の強い発現が観察できた。10日後の組織では、GFP の発現は表皮の上層に認められた。しかし、基底層の一部に GFP の発現が認められた。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療のための基礎研究

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 助教授

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のための基礎研究を行った。平成14年度の研究内容は、1) 超音波を利用した生体皮膚への遺伝子導入方法の開発、2) VII型コラーゲン発現ベクター胎児皮膚への遺伝子導入による免疫反応回避の可能性の検討である。

共同研究者
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

した。その後出産を待って、naked DNA法により新生マウス皮膚にGFP発現プラスミドを導入した後、血清を採取して抗GFP抗体産生の有無をELISA法にて検討した。

A. 研究目的

生体皮膚は分子量1,000をこえる分子の通過を妨ぐように進化している。われわれが本研究班における昨年度の研究により開発した栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療用VII型コラーゲン発現ベクターは分子量1,000,000を超える高分子DNAであり、従来の方法では生体皮膚への導入は極めて困難である。平成14年度における研究は生体皮膚への遺伝子導入法の開発を目的とした。また、共同研究者の遠藤らが開発した胎児皮膚への遺伝子導入法を利用して胎児皮膚に治療用遺伝子を導入することにより、遺伝子産物に対する免疫応答回避が可能であるかを検討した。

B. 研究方法

1) 皮膚への遺伝子導入方法の確立：角層を除去する目的で、弘前ヘアレスラット皮膚に50%グリコール酸を10分間塗布した後、同部位をルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドDNA溶液(1 μ g/ μ l in PBS)に浸し、治療用超音波発生装置(Ultax)を用いて種々の超音波エネルギーを照射した後、遺伝子導入高率をルシフェラーゼアッセイにて検討した。

2) 免疫反応回避方法の開発：共同研究者の遠藤らが開発した超音波・マイクロバブル法(ショットガン法)を用いてマウス胎児皮膚にGFP発現プラスミドDNAを導入

C. 研究結果

1) 皮膚への遺伝子導入方法の確立：ケミカルピーリングと超音波を組み合わせることにより皮膚に遺伝子導入が可能となることが明らかになった。50%グリコール酸による角層処理単独、あるいは超音波処理単独では、いずれも皮膚に導入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現量は極めて少なかった(数十-数百RLU/mg)。これに対し、両者を組み合わせた結果、約百倍の遺伝子導入高率増強効果が得られた。

2) 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。day18胎児マウス皮膚にGFP発現プラスミドDNAを導入した群の約40%において、生後に導入したGFP発現プラスミド産物に対する抗体産生が抑制された。胎児皮膚に遺伝子導入しなかった群では、生後導入した遺伝子産物に対する抗体は100%検出された。

D. 考察

皮膚は生体の最外層に位置するため、遺伝子治療に最も適した臓器であると考えられてきた。直接導入が可能であること、治療効果を容易に確認できること、さらに副作用が生じたときには速やかに除去できるこ

と、などが皮膚の遺伝子治療の利点としてあげられる。にもかかわらず皮膚疾患を対象とした遺伝子治療が進展しないのは、生体皮膚への遺伝子導入が極めて困難な為であろう。今回われわれは、角層の化学処理（ケミカルピーリング）と超音波を組み合わせることにより、生体皮膚に高分子 DNA を導入可能であることを見出した。いずれの方法も既に臨床で応用されている技術であり、この方法を利用することにより安全かつ高効率に遺伝子導入が可能である。今後この方法を用いて VII 型コラーゲン発現ベクターを生体皮膚に導入する方法論を確立する予定である。

VII 型コラーゲンが欠損した重症栄養障害型表皮水疱症患者では、VII コラーゲンに対する免疫寛容が破綻していると予想され、治療用遺伝子産物に対して免疫反応が誘導される可能性がある。胎児皮膚への遺伝子導入を利用した免疫寛容誘導法は、胎児診断と組み合わせることにより、より有効な遺伝子治療法となると思われる。免疫応答の可能性が低い遺伝子治療方法論の開発と併せて、今後さらに検討を進めていく予定である。

結論

新しい皮膚への遺伝子導入法を開発し、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

なし

G. 研究発表（平成 14 年度）

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 responsive 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

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.

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.

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.

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

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.

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