

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

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

Stevens-Johnson 症候群（SJS）の早期診断の試み
—SJS と EM major の鑑別診断は可能か—

分担研究者 飯島正文 昭和大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 SJS の早期診断法の精度向上を目的に、重症型多形紅斑（EM major）と SJS の異同ないし移行について文献的考察ならびに自験例の解析を行った。フランス学派の言うように、EM major と SJS とが明確に鑑別できる、明らかに異なった病態であると理解する疾患概念には一定の合理性が認められる。しかしその症状は時間的経過とともに変化していく性質のものであるから、今後は時間軸も考慮に入れた臨床的・組織学的解析が必要と思われた。また自験例の解析は途上であるが、EM major の病像を呈する患者が近い将来 SJS（～TEN）に進展する可能性の判定には、皮膚病変の生検凍結標本を用いた迅速病理組織診断法が有用であり、その診断精度の向上には本研究の一層の発展が課題と考えられた。

研究協力者

北見 周 昭和大学医学部皮膚科 助手

A. 研究目的

近年、多形紅斑（EM）、Stevens-Johnson 症候群（SJS）、中毒性表皮壊死症（TEN）の 3 疾患を一連の病態として理解する疾患概念がほぼ確立された。特に、SJS と TEN とは一連の病態であり、最重症型薬疹である TEN の大多数が SJS から拡大・進展した SJS 進展型 TEN（TEN with spots）であるとの疾患認識はほぼ定着した感が強い。しかし一方、EM の中でも重症型の EM、すなわち発熱や粘膜症状を伴う重症型の EM、EM

major と SJS との異同～移行については諸説があり、未だ結論は出されていない。

本研究の目的は、EM major と SJS とが別個の独立した疾患なのか、あるいは一連の病態であるのかを文献的に考察、あるいは自験例を retrospective に検討し、重篤な後遺症をのこすことの多い SJS、あるいは時に死の危険性のある TEN の、しばしば EM major に類似する初期症状からの早期鑑別診断の精度向上をはかろうとするものである。

B. 研究方法

EM major と SJS との相互関係、あるいは異

同ないし相関性について論ぜられている学術論文を可能な限り収集し、特にフランス学派の動向を中心に文献を吟味した。また昭和大学病院附属東病院皮膚科に過去3年間、EM major（発熱や粘膜病変を伴う多形紅斑ないし中毒疹）もしくはSJSとして入院し、皮膚生検の施行されている全患者について、臨床症状ならびに病理組織学的所見について retrospective に検討した。

C. 研究結果

フランス学派によると、臨床的にEM majorでは四肢や顔面など体の末梢を主体（acral）に typical targets あるいは raised atypical targets が認められるのに対してSJSでは体幹を中心（non-acral）に広がる flat atypical targets が特徴的な所見であること、病理組織学的にはEM majorでは少数の表皮細胞壊死、真皮への豊富な細胞浸潤、多量の赤血球の血管外漏出、SJSでは多数の表皮細胞壊死、真皮へのより少ない細胞浸潤、より少量の赤血球の血管外漏出が特徴であって、両者は原因と病態の異なる別の疾患と定義付けている。EM major及びSJSで認められる多形紅斑様発疹を記載皮膚科学的に鑑別することはしばしば不可能であり、特にEM majorに特徴的とされる raised atypical targets と称される発疹は後にSJS（～TEN）に進展した患者でも認められ、この発疹が必ずしも鑑別診断に有用ではない。今後は時間軸も考慮に入れた臨床所見の解析が必要と思われ

た。また臨床症状での鑑別診断が時に困難な flat atypical targets も、病理組織学的に高度の表皮細胞壊死の所見が認められればSJS（～TEN）として初期から適切な対応が可能であり、その迅速病理組織診断がEM majorとSJSの鑑別診断に有用であることが再確認された。

D. 考察

Roujeauらフランス学派の言うように、臨床的にあるいは病理組織学的にEM majorとSJSとが明確に鑑別できる、明らかに異なった病態と理解する疾患概念には一定の合理性が認められる。しかし一方で、時間的経過とともに多形紅斑様発疹の臨床症状は次第に、時には急激に変化していく性質のものであるから、今後はEM majorとSJS（～TEN）で認められる多形紅斑様発疹の鑑別診断については、時間軸も考慮に入れた臨床的解析が必要と思われた。時に臨床的鑑別診断が困難な raised atypical targets や flat atypical targets も高度の表皮細胞壊死などの所見から病理組織学的にはある程度鑑別可能である。特に皮膚病変の生検凍結標本を用いた迅速病理組織診断法がEM majorとSJS（～TEN）との早期鑑別診断に有用であり、また重篤なSJS（～TEN）に対する発症初期からの適切な治療指針確立の指標となることが期待される。

E. 結論

SJSの早期診断法の精度向上を目的に、EM

major と SJS の異同ないし移行について文献的考察ならびに自験例の解析を行った。発熱、粘膜症状を伴う重症型多形紅斑 (EM major) と SJS (~TEN) で認められる多形紅斑様発疹を臨床的に鑑別診断することは時に困難であるが、病理組織学的には鑑別可能であり、特に皮膚病変の生検凍結標本を用いた迅速病理組織診断法の診断精度向上と一般への普及が今後の課題と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

論文発表

1. **飯島正文** : 重症型薬疹 . Stevens-Johnson 症候群 (SJS) . 玉置邦彦ほか編 最新皮膚科学大系 5 薬疹・中毒疹 P36-46 東京 : 中山書店 2004
2. **飯島正文** : 重症型薬疹 . 中毒性表皮壊死症 (TEN) 玉置邦彦ほか編 最新皮膚科学大系 5 薬疹・中毒疹 P47-55 東京 : 中山書店 2004
3. **飯島正文** : 皮膚粘膜眼症候群 . 清水直容ほか編 有害事象の診断学 . 医薬品と有害事象との因果関係の手引き . P81-86 東京 : デジタルプレス 2003

4. **飯島正文** : 薬物アレルギー防止と早期発見における薬剤師への期待 . 月刊薬事 45:2333-2335. 2003
5. 北見 周, 鈴木寛丈, **飯島正文** : TEN に進展する発疹 . Medicina 40:993-995. 2003
6. 鈴木寛丈, **飯島正文** : hypersensitivity syndrome. BIO Clinica 18:716-720. 2003
7. 北見 周, **飯島正文** : DIHS の臨床的特徴と診断基準 . アレルギー・免疫 10:830-833. 2003

学会発表

1. **飯島正文** : シンポジウム 15-重症型薬疹の診断と治療-Stevens-Johnson 症候群/TEN の診断と治療 . 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (横浜, 2003.5)
2. **飯島正文** : シンポジウム 1-重症薬疹の病態とその対策-重症型薬疹の分類と診断 . 第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (松山, 2003.10)
3. **飯島正文** : シンポジウム 7-治療薬による重篤な有害反応の予測・予防-Stevens-Johnson 症候群/TEN の早期診

断と治療. 第 24 回日本臨床薬理学会年会 (横浜, 2003.12)

(東京, 2003.7)

4. **飯島正文**: 生涯教育講演会-TEN with spots の早期診断と皮膚科専門医の役割-第 226 回日本皮膚科学会東海地方会 (名古屋, 2003.12)

7. 榑原佳奈子, 保坂浩臣, 北見 周, 中田土起丈, 末木博彦, **飯島正文**, 金沢日英: Stevens-Johnson 症候群 (SJS) 進展型 TEN の 1 例. 第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (松山, 2003.10)

5. 濱田和俊, 保坂浩臣, 西尾和倫, 北見周, 末木博彦, **飯島正文**, 平山良美: DLST でアセトアミノフェンに陽性を示した Stevens-Johnson syndrome (SJS) の幼児例. 第 33 回日本皮膚アレルギー学会 (東京, 2003.7)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

6. 宇野裕和, 杉山美紀子, 北見 周, 末木博彦, **飯島正文**, 真木剛浩, 小出良平: 明らかな薬剤摂取歴なしに発症した Stevens-Johnson Syndrome (SJS) の 1 例. 第 33 回日本皮膚アレルギー学会

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

中毒性表皮壊死症，スチーブンス・ジョンソン症候群，薬剤性過敏症症候群，多形滲出性
紅斑，紅斑丘疹型中毒疹におけるヒトヘルペスウイルス再活性化の有無の検討

分担研究者 池澤善郎 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学 教授

研究要旨 薬剤性過敏症症候群（DIHS）10例，中毒性表皮壊死症（TEN）5例，スチーブンス・ジョンソン症候群（SJS）4例，多形滲出性紅斑（EEM）6例，紅斑丘疹型中毒疹（MP）16例の計41症例で，ヒトヘルペスウイルス（HHV）の血清中ウイルス特異的抗体価測定，血清および末梢血白血球のPCR法によるウイルスDNA検出，サイトメガロウイルス（CMV）抗原測定を行い，HHV再活性化について比較検討した。DIHSでは，7例でHHV-6の活性化が，2例でCMVの活性化が認められた。TENではHHV-6、HHV-7の抗体価が上昇した例が1例およびCMV抗原陽性が1例みられたが，SJSではHHVの再活性化はみられなかった。EEMおよびMPでは，HHV-7の活性化が3例，CMVの活性化が2例，HHV-6とCMVの活性化が1例で認められた。これらの多くの症例ではステロイド剤の全身投与が行われたがHHV-6の抗体価の上昇はDIHSにおいてのみ著しく高値であり，それ以外の症例は軽度の上昇であった。以上より，HHV-6の再活性化はDIHSに特徴的な所見であり，ステロイド治療の影響によるものではことが示唆された。

研究協力者

相原道子（横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター、助教授）

三谷直子（横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター、診療医）

A. 研究目的

薬剤性過敏症症候群（DIHS）は，ある特定の薬剤を内服した後に発症し，経過中にヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）の再活性化を認める重症の薬疹であるが，そのウイルスの活性化については，ステロイド剤や免疫

抑制剤による治療の影響が議論されている。そこで，中毒性表皮壊死症（TEN）やスチーブンス・ジョンソン症候群（SJS）など，DIHSと同様ステロイド剤や免疫抑制剤による治療を行った重症薬疹や，入院加療を要した多形滲出性紅斑（EEM）および紅斑丘疹型中毒疹（MP）の患者において，HHVの再活性化の有無と治療の影響について比較検討した。

B. 研究方法

2000年1月から2003年5月に横浜市立大

学医学部附属病院皮膚科および横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター 皮膚科を受診した中毒疹患者で、HHVの特異的抗体価の変動、あるいは血清中および末梢白血球中のHHV DNAやCMV抗原の有無について検査し得た症例を集計した。対象はDIHS 10例(男性7例,女性3例,16-77歳), TEN 5例(男性3例,女性2例,17-73歳), SJS 4例(男性1例,女性3例,26-54歳), 多形滲出性紅斑(EEM) 6例(男性2例,女性4例,32-72歳), 紅斑丘疹型中毒疹(MP) 16例(男性7例,女性9例,15-75歳)であった。HHV活性化の指標として以下の1つ以上の検査結果を用いた。①ペア血清で血清中ウイルス特異的IgGの4倍以上の上昇,但しIVIg前後で抗体価が上昇し,その後速やかに低下した場合は除く。②血清中ウイルス特異的IgMの出現。③末梢白血球中ウイルスDNAコピー数の上昇。④CMV pp65抗原陽性細胞の有無。⑤血清中ウイルスDNAの証明。HHV-6,7,CMV DNAの末梢白血球中コピー数はreal-time PCR法にて測定した。

C. 研究結果

DIHSでは、7例でHHV-6の活性化が認められ、そのうち4例でCMVの再活性化が、2例でHHV-7の再活性化がみられたが、これらはHHV-6より抗体上昇やウイルスDNAの出現が遅れる傾向が認められた。HHV-6の活性化がみられなかった2例ではCMVの活性化が認められた。TENではHHV-6、HHV-7の

抗体価が上昇した例が1例およびCMV抗原陽性が1例みられたが、SJSではHHVの再活性化はみられなかった。EEMではHHV-7の活性化およびHSVとCMVの活性化がそれぞれ1例ずつ認められた。MPでは2例でHHV-7、1例でCMV、また1例でHHV-6とCMVの活性化を認めた。これらの多くの症例ではステロイド剤の全身投与が行われたがHHV-6の抗体価の上昇はDIHSにおいてのみ著しく高値であり、それ以外の症例は軽度の上昇であった。DIHSでは少量のステロイド剤あるいは抗アレルギー薬内服やステロイド剤外用の治療で軽快した例が3例あったが、これらの症例においてもHHV-6の再活性化はステロイド剤投与例と同様に認められTENではステロイドパルス療法直後の病初期に末梢白血球中HHV-7 DNAが少量検出された例が1例みられた。人免疫グロブリン製剤の使用前後でHHV抗体価の有意な変動は認められなかった。

D. 考察

TENやSJSなどの重症薬疹や入院を要するような比較的重症の中毒疹では、一部の症例でHHV-6、HHV-7、CMVの再活性化が認められたが、いずれも軽度であった。著しい抗体価の上昇を伴うHHV-6の再活性化はDIHSにおいてのみ認められた。よって、重症薬疹におけるステロイド剤の大量投与や免疫抑制剤による治療は、これらのウイルスの再活性化を促す可能性があるが、HHV-6の著しい再活性化には至らないことが示唆

された。さらに、DIHS では HHV-6 再活性化によって引き起こされる免疫抑制状態あるいは HHV-6 再活性化以前から存在する何らかの原因による免疫抑制状態によって他の HHV の再活性化が引き続き生じる可能性が考えられた。

E. 結論

HHV-6 の再活性化は DIHS に特徴的な所見であり、ステロイド治療の影響によるものではないことが示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成 15 年度）

論文発表

英語論文

1. Jin GB, Nakayama H, Shmyhlo M, Inoue S, Kondo M, **Ikezawa Z**, Ouchi Y, Cyong JC: High positive frequency of antibodies to metallothionein and heat shock protein 70 in sera of patients with metal allergy. Clin Exp Immuno 2003, 131:275-279
2. Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K, Shimojo N, Kohno Y, Shibata R, Nishima S, Ohsuna H, **Ikezawa Z**: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. Allergology International 2003, 52:139-147
3. Katsuno M, Aihara M, Kojima M, Osuna

H, Hosoi J, Nakamura M, Toyoda M, Matsuda H, **Ikezawa Z**: Neuropeptides concentrations in the skin of a murine (NC/Nga mice) model of atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2003, 33:55-65

日本語論文

1. 浅子佳子、三谷直子、山田正子、掛水夏恵、山川有子、相原道子、日比潔、安藤大作、安田元、**池澤善郎**：血漿交換療法が奏功したオメプラゾールによる TEN 型薬疹の 1 例、日皮アレルギー、11：27-33, 2003.
2. 三谷直子、杉山朝美、相原道子、**池澤善郎**：少量のプレドニゾロン内服で軽快した塩酸メキシレチンによる drug-induced hypersensitivity syndrome の 1 例；塩酸メキシレチンによる drug-induced hypersensitivity syndrome の文献的検討 日皮アレルギー、11：71-77, 2003.
3. 山口絢子、山川有子、相原道子、牧万里子、佐々木哲雄、柳浩正、**池澤善郎**：ヒト免疫グロブリンが奏功した TEN 型薬疹の 1 例、日皮アレルギー、11：87-93, 2003.

学会発表

1. **池澤善郎**：重症薬疹の病態に基づいた治療、第 55 回日皮西部支部総会学術大

会シンポジウム「重症薬疹の病態とその対策」、2003.10.25. 松山

2. 猪又直子, 大砂博之, 千葉由幸, 蒲原毅, **池澤善郎**: アスピリン蕁麻疹・血管浮腫 9 例の検討. 第 53 回日本アレルギー学会総会, 岐阜, 2003, 10.
3. 浅子佳子, 三谷直子, 勝野正子, 掛水夏恵, 山川有子, 相原道子, 日比潔, 安藤大作, 安田元, **池澤善郎**: 血漿交換療法が奏功したオメプラゾールによる TEN 型薬疹の 1 例, 日本皮膚科学会第 779 回東京地方会, 2003. 1. 18, 横浜.
4. 綾部原子, 山田正子, 三谷直子, 相原道子, **池澤善郎**: トラネキサム酸による固定薬疹の 1 例, 日本皮膚科学会第 784 回東京地方会, 2003. 9. 20, 伊勢原.
5. 三谷直子, 山川有子, 相原道子, 猪又直子, **池澤善郎**: HHV-6, HHV-7, VZV 再活性化を伴った drug-induced hypersensitivity syndrome, 第 102 回日本皮膚科学会総会, 2003. 5. 23-25, 浦安.

6. 三谷直子, 山田正子, 山川有子, 相原道子, **池澤善郎**: HHV-6, HHV-7, CMV の再活性化を認めたシアナミドによる drug-induced hypersensitivity syndrome, 第 33 回日本皮膚アレルギー学会総会学術大会, 2003. 7. 5-6, 東京.
7. 綾部原子, 山川有子, 相原道子, **池澤善郎**: 非イオン性造影剤で薬疹を生じた症例の背景と皮膚試験結果, 第 28 回日本接触皮膚炎学会総会学術大会, 2003. 12. 13-14. 大阪

II. 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

培養角化細胞による表皮様構造の形成機序に関する研究

分担研究者 加藤光保 筑波大学基礎医学系 教授

研究要旨 培養自家皮膚による再生医療を推進していくにあたって、角化細胞が重層扁平上皮構造を形成する分子機序を明らかにすることは、培養皮膚形成の技術革新をもたらす可能性がある重要な研究課題である。今回、私達は、界面培養によって角化細胞が重層扁平上皮様構造を形成するのに転写因子 AP1 の活性が必要であることを、AP1 活性に優勢抑制活性を示す変異 JunB 蛋白を発現させると、界面培養を行っても多層化が進行しないことによって明らかにした。また、通常の 2 次元培養を行っている時に角化細胞は多層化しないが、この時には、転写抑制作用をもつ AP1 ファミリー転写因子である JunD の発現が高く、AP1 活性が低く保たれていた。

A. 研究目的

角化細胞をコラーゲンゲルなどの間質上に培養し、表面を空気に露出（界面培養）すると、角化細胞は重層化や分化を示し、生体内と同様の表皮様構造を形成する。このことは、すでに 20 年以上前から知られているが、どのような細胞内シグナル伝達機序によって、組織構築の形成が開始されるかについては明らかになっていない。培養角化細胞による表皮様構造の再構成は、火傷など種々の皮膚病変に対する培養自家皮膚移植・再生医療のさらなる発展のために必要不可欠な技術であるが、界面培養を行うという制約の中では、提供できる再構築表皮組織の大きさなどの点で限界がある。本研究では、界面培養がどのような機序で培養角化細胞の重層化を誘導するかを明らかにすることを目的とし、将来的には界面培養を必要としない安定な表

皮再構築培養法の開発を目指している。

本年度は AP1 系転写因子群の活性が、界面培養による表皮様構造の再構築に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

① 界面培養法による角化細胞の重層化過程における AP1 系の関与を調べることを目的として、c-Fos, c-Jun, JunB, 転写活性化ドメインを欠失させた JunB (JunB Δ N) の発現ベクターを作成し、ヒト角化細胞株 HaCaT に発現させ、安定発現細胞株を作成した。これらの細胞株を用いて界面培養を行い、角化細胞の重層化や分化に及ぼす AP1 系の作用を調べた。

② ヒト角化細胞株 HaCaT を通常の 2 次元培養を行なっている条件で、RNA を回収し、Gene Chip 解析によって、AP1 ファミリー転

写因子群の発現レベルを調べた。

C. 研究結果

c-Fos, c-Jun, JunB, JunB Δ N の発現ベクターを作成した。いずれの転写因子も N 末端に FLAG-tag を付け、抗 FLAG 抗体で蛋白の発現を確認できるようにした。COS7 細胞に発現させ、それぞれの蛋白が発現されることをウエスタンブロッティング法で確認した。さらに、AP1 活性に反応して転写活性が亢進する pAP1-Luc をレポーターとして、これら発現ベクターの活性を調べたところ、c-Fos と c-Jun は、AP-1 活性の強い亢進を誘導した。JunB は、内在性の微弱な AP1 活性に影響を与えず、JunB Δ N は、内在性の AP1 活性ならびに、c-Fos や c-Jun の発現によって、活性化された AP1 レポーターの発現に優勢抑制活性を示した。

上記の発現ベクターを HaCaT 細胞に導入し、安定発現細胞株を作成した。c-Jun と JunB Δ N を強く発現する安定発現細胞株が複数個得られたため、まず、これらから解析することとした。c-Jun 発現細胞株は、AP1 活性が亢進し、JunB Δ N 発現細胞株は、AP1 活性が著明に抑制されていた。通常の 2 次元培養条件下では、これらの細胞群の増殖程度に著明な差は見られなかった。

c-Jun 発現細胞株と JunB Δ N 発現細胞株を、ヒト線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に播き、界面培養を行なって、3 次元構造を形成させたところ、c-Jun 発現細胞株は、コントロールと同様の著明な多層化を示し、重層扁平上皮様構造を形成したが、JunB Δ N 発現細胞株は、重層構造形成能が著しく低下して

いた。

また、通常の 2 次元培養条件下で HaCaT 細胞から total RNA を回収し、Affymetrix 社の GeneChip で遺伝子の発現レベルを解析したところ、転写抑制能をもつ JunD が、圧倒的に強く発現しており、Fra-1, Fra-2, JunB は中等度に発現、c-Fos, c-Jun の発現は低く抑えられていた。

D. 考察

角化細胞の AP1 活性は、通常の 2 次元培養条件下では、JunD の発現などにより低く抑制されており、この条件での細胞増殖に、あまり影響していないが、表面を空気に露出（界面培養）し、角化細胞が 3 次元構造を形成する時には、AP1 活性が必須であることが示唆された。

E. 結語

界面培養による角化細胞の重層構造の形成に AP1 ファミリー転写因子群が関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(平成 15 年度)

論文発表

英語論文

1. Kondo M, Suzuki H, Takehara K, Miyazono K, **Kato M**: Transforming growth factor- β signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. **Cancer Sci** 2004, 95: 12-17

日本語論文

2. Sasaki T, Suzuki H, Yagi K, Furuhashi M, Yao R, Susa S, Noda T, Arai Y, Miyazono K, **Kato M**: Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor- β -induced repression of c-myc. **Cancer Res** 2003, 63: 801-806
 3. Nakayama K, Tamura Y, Suzawa M, Harada S, Fukumoto S, **Kato M**, Miyazono K, Rodan GA, Takeuchi Y, Fujita T: Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells. **J Bone Miner Res** 2003, 18: 827-835
 1. **加藤光保**:三次元培養モデルを用いた癌の浸潤能の解析。Medical Science Digest 29: 4-5, 2003
 2. **加藤光保**:トランスフォーミング増殖因子 β による転写制御。蛋白質核酸酵素 48: 2247-2253, 2003
- H. 知的所有権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許出願
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

皮膚付属器を有する培養皮膚の作製

分担研究者 岸本治郎 資生堂ライフサイエンスセンター プロジェクトリーダー

研究要旨 上皮と真皮の相互作用に着眼点を置いた細胞移植、及び三次元培養皮膚上で毛包を始めとする皮膚付属器官を再生させることを目指している。既に毛包誘導能を有することが実証されているマウス毛乳頭細胞の効率的単離法を確立し、これを用い、ヒト新生児包皮由来の表皮細胞が毛包上皮への分化能を有することを、拒絶反応のみられないヌードマウス背部皮膚への細胞移植法により検証した。本年度は成人包皮由来の上皮細胞の毛包上皮分化能について検証し、その結果、成熟した成人包皮中にも毛包分化能を有する上皮細胞が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究の目的は術後のQOL向上を目指して、毛髪を始めとする皮膚付属器官を有する自己培養皮膚作製技術を確立することである。これまで表皮と真皮からなる三次元皮膚モデルの作製方法は確立されてきたが、付属器を皮膚モデル内で再生させ、移植後、毛髪等を有する機能的にも患者のQOL向上のためにも優れた皮膚組織の作製には成功していない。その理由として、ヒト毛包の再生には毛包誘導能を有する毛乳頭細胞と分化能を有する毛包上皮細胞の2種の細胞の相互作用（上皮—真皮の相互作用）が必須であるが、ヒト由来の細胞ではいずれの細胞も新鮮な誘導能、分化能を有する細胞の供給が困難であった。そこで、我々が既に確立していたマウス毛乳頭細胞の大量

単離方法を利用して、誘導能を有する毛乳頭細胞の供給源を確保した上で、まずヒト上皮細胞の分化能の検定を行った。

B. 研究方法

マウス毛乳頭画分の調製

生後2-4日目の新生児マウスの背部皮膚組織を剥離し、0.25%トリプシン/10mMEDTA溶液中に一晩、4℃で浮遊させた後、表皮シート部分をピンセットではがしとり、毛包が含まれる真皮組織のみにした。マウス用の小ハサミを用いて裁断した後に、0.25%コラゲナーゼ溶液中で37℃1時間、攪拌し、真皮結合組織より細胞を剥離させた。70 μ mのメッシュトレーナーで未消化の毛包や結合組織を除き、得られた細胞液を凍結保存し、再融解したものを毛乳頭濃縮画分とし

て用いた。パーシカナー-GFP トランスジェニックマウス由来の皮膚より同様の細胞を調製し、上皮特異的抗体 CD49 f で標識後に FACS 解析を行い、目的の毛乳頭細胞が含まれること、及び上皮細胞が死滅して選択的に除去されていることを確認した。

ヒト成人包皮由来上皮細胞の調製

新生児包皮組織は HAB 研究機構を通じて供給される、割礼により生ずる正常余剰組織を用いた。ヒト成人包皮組織は愛媛大医学部を通じて健常人より余剰組織を得た。いずれも倫理審査を経て入手した。包皮組織は 1cm 角に切り分けた後、デスパーゼ (400u/ml) で一晩処理し、翌日、得られた表皮シートをトリプシン-EDTA (0.05% -0.53mM) 溶液中で 37℃、15 分間処理し、表皮細胞の細胞懸濁液を得た。これを移植に供するか、あるいは、I 型及び IV 型コーゲンコートされた培養フラスコに 5×10^3 cell/cm² の細胞密度で播種して培養を行った。培地は市販の SFM 培地 (Invitrogen) を用い、2 日に 1 度培地交換を行った。

発毛誘導能の検証

分離した毛乳頭細胞画分 1×10^7 と、別に調製したヒト上皮細胞 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ を移植直前に混合し、遠心して培養液を取り除き、細胞塊にした。この細胞塊をヌードマウス (balb/c nu/nu) 背部皮膚に埋め込んだシリコン製のドーム型チャンバー内に流し込ん

だ。1 週間後、チャンバーをはずし、さらに 2 週間目以降に移植部位の毛髪形成の有無の肉眼観察を行った。

移植部位の形態観察

移植後 3-4 週間の時点で移植部位の組織片を採取し、毛包形成の有無は HE 染色による形態観察、ヒト細胞種の特異性は Hochest33258 による核染色、毛包上皮の特異性にはヒトケラチン抗体による免疫染色を行った。

C. 研究結果

移植後約 4 週間で大量調製したマウス毛乳頭細胞濃縮画分とヒト包皮由来上皮細胞の組合せによって移植部皮膚真皮組織中にマウス-ヒトキメラ毛包の形成が確認された。Hochest 核染色により、上皮部分はヒト由来、毛乳頭部はマウス種であることが確認された。毛包上皮部分は、中央が角化し、毛幹様構造が認められた。マウス毛包と比べ、断面積で顕著な増加が認められた。ヒトケラチン抗体で陽性であった。またキメラ毛包は一定領域に密集する傾向が認められた。初代から継代 3 代目までの上皮細胞を用いた場合毛包形成が認められたが 4 代目以降では認められなかった。次に成人の包皮由来の上皮細胞を用いた場合にも、同様にしてキメラ毛包が認められた。単離された新鮮上皮細胞及び継代 2 代目まででキメラ毛包形成が認められた。いずれの場合も、皮膚外部までの毛幹部の伸長は認められてい

ない。

D. 考察

細胞移植による毛包再生は技術的に未完成で未だ成功例がない。本実験で得られた毛包様構造もヒト-マウス間のキメラ毛包で毛幹伸長までは認められないが、ヒト様毛包が初めて認められたことは完全なヒト毛包再生に向けての重要なステップである。これまでの研究成果で、1) マウス毛乳頭-ヒト毛包上皮細胞からなるキメラ毛包の形成が確認され、2) 継代3代目までの培養表皮細胞で毛包再生が認められ、3) ヒト包皮由来表皮細胞が毛包上皮分化能を有すること、が明らかとなった。本研究において、実験材料に供した成人包皮組織は20代で成熟した個体由来であるが、発生後期と考えられる新生児包皮と類似の毛包分化能を有することが明らかとなった。新生児と比べ、より少ない継代数でのみ分化能が認められたことは、含まれる上皮幹細胞の比率が低下していると考察できる。現在のところ、マウスでは成熟した皮膚由来の表皮細胞では毛包再生が困難であることが知られているが、ヒト成熟皮膚組織由来細胞でヒト様毛包が形成されたことは、将来の上皮幹細胞の供給源の可能性として重要な知見であると考えられた。

E. 結論

新生児のみならず成人包皮組織由来の表皮細胞も毛包分化能を有することが明らか

となった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成15年度）

論文発表

英語論文

1. Botchkarev VA, **Kishimoto J**: Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. **J Invest Dermatol Symp Proc** 2003, 8:46-55
2. Nitta H, **Kishimoto J**, Grogan TM: Application of automated mRNA In Situ hybridization for formalin-fixed, paraffin-embedded mouse skin sections: effects of heat and enzyme pretreatment on mRNA signal detection. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2003, 11:183-7
3. Kobayashi K, **Kishimoto J**, Hattori S, Wachi H, Shinkai H, Burgeson RE: Matrix metalloproteinase-9 expression is coordinately modulated by the KRE-M9 and TPA responsive elements. **J Invest Dermatol** in press

日本語論文

1. **岸本治郎**: 高速セルソーターを用いた毛包特異的凝集間充織細胞の単離とその発毛誘導能の検証. **Cytometry Res.** 12, 11-17, 2002

2. 岸本治郎：毛包の再生. 日本農芸化学会誌 77,12-15, 2003

キメラ毛包再構成の試み. 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月11日 神戸

学会発表

1. Souma T, Tajima M, Kishimoto J: Localization of versican in human hair follicle -Implication of proteoglycan involvement in anagen induction and hair elongation. International Investigative Dermatology, May 1, 2003, Miami, USA
2. 江浜律子、出田立郎、矢野喜一郎、相馬勤、岸本 治郎：ヒト由来細胞による

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 出願中 2 件
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

自己培養表皮シートによる表皮水疱症の治療に関する研究

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 栄養障害型表皮水疱症は基底膜の構成成分であるVII型コラーゲン遺伝子異常による疾患であり、容易に水疱を形成し、難治性皮膚潰瘍を呈する。栄養障害型表皮水疱症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、培養皮膚を作製した。10例の劣性栄養障害型表皮水疱症患者からすべて角化細胞の培養に成功し、7例の患者に対し自己培養皮膚移植を施行し良好な結果を得た。頻回の培養表皮シート移植にて潰瘍面は大幅に減少した。

A. 研究目的

本研究の目的は栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養皮膚移植法ならびに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、現在まで有効な治療法が乏しく自己培養表皮シート移植の有用性が示唆されている。そこで、栄養障害型表皮水疱症患者10例について、自己角化細胞の無血清培養法による培養ならびに自己培養表皮シート移植についての有用性の検討を行った。

B. 研究方法

栄養障害型表皮水疱症患者10例の比較的水疱を形成しにくい一見正常の皮膚から2 x 3 cmの大きさの皮膚を全層で採取した。ハサミで皮膚片から脂肪組織と真皮をできる限り取り除き、ダルベッコリン酸緩衝液

(PBS) 10 ml（日水製薬（株）製）にて2回洗浄した。70%エタノールに1分間浸し滅菌し、PBS 10 mlにて洗浄後、メスを用いて幅3mm長さ10mm程度の短冊状に切り、ディスパーゼ液5 ml（ディスパーゼ II, 合同酒精社、250 単位/ml ダルベッコ変法 MEM 培地；DMEM）に浸し、4℃で一晩（18-24時間）静置した。翌日、ピンセットを用いて表皮を真皮から剥離し、表皮を DMEM 5 ml にて洗浄、続いて、PBS 5 ml にて洗浄後、0.25 %トリプシン 5 ml 溶液中にひたし、37℃、10 分間の処理を行った。表皮をトリプシン中和液 5 ml 入れたプラスチックシャーレに移しピンセットにて表皮片をほぐし、50 ml の滅菌チューブに移した。ディッシュに残存している細胞を PBS 10 ml にて回収し、表皮角化細胞浮遊液を調整した。細胞数を数え、1000 rpm, 5 分間

遠心し細胞を沈殿させた。上清を吸引し、細胞を増殖液体培地1にて懸濁し、100 mm コラーゲンコートシャーレ（旭テクノグラス、I型コラーゲンコートディッシュ；4010-010）当たり 3×10^6 細胞/10 ml 培養液の割合で播種した。該培養は37℃、飽和水蒸気下5%炭酸ガス気相下で行い、培養開始後20から24時間後及び以後1日おきに培地交換を行った。ヒト表皮細胞は7日間位でフラスコ面一杯にまで良好に増殖したので、次いで継代処理を行い、2世代目の継代培養を行った。

継代処理は、液体培地を除きダルベッコPBS（-）（日水製薬（株）製）10 ml で1回細胞表面を洗った後、トリプシン及び0.01% EDTAを含むリン酸緩衝液3 ml を加えて細胞付着面を下にして37℃のインキュベータで5分間静置し、表皮細胞が付着面から剥がれた状態であることを確認した後、3 ml のトリプシンインヒビター（Gibco、trypsin inhibitor, soybean #17075-029, 25ug/ml）ml を添加しトリプシンの効果を中和した後、増殖液体培地1を10 ml 加え1000回転で約5分間遠心分離して得た沈殿物を10 ml の増殖液体培地1を加えて細胞を再浮遊して懸濁させることにより行った。

継代培養は、植込細胞数が 5.0×10^5 細胞/10.0 ml になるように植え込む以外は、上記の初代培養と同様にして実施した。

表皮細胞は、5日間でディッシュ一杯にま

で良好に増殖した。更に、同様にして継代処理と継代培養とを繰り返すことにより、ヒト表皮角化細胞を良好に増殖させることが出来た。

C. 研究結果

10例全例角化細胞の培養に成功した。1例は継代3代目で増殖しなくなり、3代継代の細胞では培養表皮シートの作製はできず、2代継代の細胞を用いて自己培養表皮シートの作製を行った。残り9例は順調に増殖し、4代継代の細胞を用いて自己培養表皮シートの作製が可能であった。なお、表皮水疱症以外の患者から得た皮膚、ならびに正常皮膚からの培養と比較すると、栄養障害型表皮水疱症患者の角化細胞の培養は困難であり、細胞の増殖もやや不良の印象を得た。以下に代表的症例について述べる。

症例1：22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月自己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検索により、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。上腕屈側より2 x 3 cmの皮膚を採取し、自己角化細胞を培養した。細胞は順調に増殖し、適宜保存を行い、4代継代した細胞を用いて自己培養表皮シートを作製した。

1週間に3回の移植を行い1か月後には潰瘍面は著明に縮小した(図1)。以後、年に1-2回入院のうえ残存している潰瘍面に自己培養表皮シート移植を施行した。5年後には腰部に10cm大の潰瘍を残すのみとなった。なお、自己培養表皮シートは凍結細胞を用いて作製することができたため、追加の皮膚採取は不要であった。副作用は認めなかった。

症例2: 34歳、女性。出生時よりほぼ全身に水疱・びらん・潰瘍が出現。昭和51年より当科に通院。組織学的検索・電子顕微鏡所見にて劣性栄養障害型表皮水疱症と診断した。保存的治療を行っていたが体幹・四肢に広範囲な潰瘍が残存するため平成7年12月より自家培養表皮シート移植を開始した。右足内顆の直径5cmの潰瘍は培養表皮シート移植12回で上皮化した。上皮化した部位は、以前と比べると水疱・糜爛の形成が少ない印象を得ている。背部から腰部、臀部、側腹部に広範囲に潰瘍びらんを認め、週に3-4回の培養表皮シート移植を施行した。上皮化に要する時間は保存的治療と比較すると約半分以下となり、潰瘍面積もかなり縮小した(図2)。全経過を通じて副作用は認めなかった。なお、自己培養表皮シートは凍結細胞を用いて作製することができたため、追加の皮膚採取は不要であった。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症に対する有効な治療

法はなかったが、自己培養表皮シートを用いて潰瘍の縮小をみることができた。培養皮膚の特徴はその拡大性と保存性であるが、栄養障害型表皮水疱症は潰瘍面積が広く、かつ繰り返し水疱・潰瘍を形成するため、この保存性と拡大性ともに生かされる疾患であると思われる。また、自己の細胞を用いての培養表皮シート移植の有効性が示されたと考えられ、自己の細胞を用いることにより安全性を確保できたと考えられる。現時点においては自己培養表皮シート移植が最も有効な治療法であり、栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植法が確立できたと考えられる。

E. 結論

自己培養表皮シート移植を10例の患者に対し施行し、その有効性を示したことより、栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植法が確立できたと考えられ、自己培養皮膚を用いた遺伝子治療への基礎が確立できたものと思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成15年度)

論文発表

英語論文

1. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is

- essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. **J Biol Chem** 2003, 278:40026-31
2. Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, **Shirakata Y**, Nishikawa SI, Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T.: Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment. **EMBO J** 2003, 22:2981-2991.
 3. Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, **Shirakata Y**, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, Hashimoto K: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2003, 120:571-80.
 4. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, **Shirakata Y**, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto K: Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor β autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth. **J Invest Dermatol** 2003, 120:1030-1037.
 5. Hamada K, Kohno S, Iwamoto M, Yokota H, Okada M, Tagawa M, Hirose S, Yamasaki K, **Shirakata Y**, Hashimoto K, Ito M.: Identification of the Human IAI.3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy. **Cancer Res** 2003, 63:2506-12.
 6. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitu 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** 2003, 170:2205-13.
 7. **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** 2003, 30:135-40.
 8. 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** 2003, 149:185-8.