

200400786A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

「難治性皮膚疾患（重症多形滲出性紅斑（急性期）を含む）

の画期的治療法に関する研究」

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成17（2005）年4月

目 次

I. 総括研究報告

難治性皮膚疾患（重症多形滲出性紅斑（急性期）を含む）の画期的治療法に関する研究	橋本公二	1
---	------	---

II. 分担研究報告

重症多形滲出性紅斑診断基準案 2004 の作成	橋本公二	7
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	14
ヒト表皮角化細胞 side population に関する研究	岡野栄之	18
薬剤性過敏症症候群(DIHS)における EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 と多臓器障害との関連に関する研究	塩原哲夫	23
Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS) における他臓器障害-重篤な症例を中心に-	飯島正文	27
Stevens-Johnson 症候群の小児例と成人例の比較検討-主として原因および中毒性表皮壊死症への移行について-	池澤善郎	31
角膜上皮細胞の無血清培養法の開発	大橋裕一	41
Stevens-Johnson 症候群の小児例と成人例の比較検討-臓器障害と遷延化病変について -	相原雄幸	44
皮膚付属器を有する培養皮膚の作製	岸本治郎	49
三次元培養皮膚の有効性に関する臨床研究	白方裕司	54
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		57

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

難治性皮膚疾患（重症多形滲出性紅斑（急性期）を含む）の画期的治療法に関する研究

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（重症多形滲出性紅斑（急性期）を含む）の画期的治療法の開発のために、重症多形滲出性紅斑、中毒性表皮壊死症、薬剤性過敏症症候群の診断基準案に合致しない症例、まれな症例、典型例などの詳細を検討することにより、診断基準案の見直しを行った。この診断基準案 2004 に照らし合わせて今後さらに症例を検討することにより特異性、感受性の高い診断基準が整備されることを期待する。

分担研究者：玉井克人（大阪大学医学部遺伝子治療学助教授）、岡野栄之（慶応義塾大学医学部生理学教授）、塩原哲夫（杏林大学医学部皮膚科教授）、飯島正文（昭和大学医学部皮膚科教授）、池澤善郎（横浜市立大学医学部皮膚科教授）、大橋裕一（愛媛大学医学部眼科教授）、相原雄幸（横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター助教授）、岸本治郎（資生堂ライフサイエンスセンター副主任研究員） 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などの難治性皮膚疾患に対する画期的治療法の確立である。①付属器を備えた培養皮膚の開発、②栄養障害型先天性表皮水疱症に対しては培養皮膚を用いた治療法、遺伝子治療法、蛋白補充療法の開発、③重症多形滲出性紅斑（急性期）については診断基準、重症度基準の整備と、画期的治療法（大量免疫グロブリン療法、培養角膜移植）の開発を行

う。

皮膚付属器を有する培養皮膚の作製

自己培養皮膚をさらに発展させ、毛包および血管を含む機能的にも整容的にも優れた培養皮膚の作成が可能となれば、再生医療がさらに発展することが予想される。この目的のため、線維芽細胞、骨髄細胞、ES 細胞からの毛包、血管の細胞の誘導が可能か否かについて検討する。一種類の細胞から転写因子等を変更することにより多種の細胞が誘導可能となれば、培養が簡略化することができ、作製コスト、安全性からみても有効である。

栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療・蛋白補充療法

我々は表皮水疱症に対する自己培養皮膚移植の有用性を明らかにしてきたが、この疾患においては最終的には欠損遺伝子を補充する遺伝子治療法が必要とされる。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、それにより遺伝子導入された培養皮膚を作製する。本研究は、栄養障害型表皮水疱症に対する有効な治療法

を開発するのみならず、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。遺伝子治療に関しては、培養皮膚を用いる ex vivo 法と直接体内に遺伝子を導入する in vivo 法の2本柱で並行して行う。さらに、遺伝子レベルではなく蛋白レベルでの治療の可能性を探るため、VII型コラーゲン蛋白を合成する。

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、毛包、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がある。特に、線維芽細胞、骨髄細胞などが、表皮、毛包、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。また、ヘキスト 33343 色素を用いた side population (SP) 細胞の幹細胞としての可能性が示唆されており、SP 細胞を用いた培養皮膚の作製を検討する。また、SP 細胞から角膜を再生することが可能となれば、重症多形滲出性紅斑の角膜欠損に対応できると思われる。以上の如く、幹細胞を用いた自己培養皮膚・角膜移植の開発は、社会的に取り残されている難治性皮膚疾患患者(重症多形滲出性紅斑を含む)患者にとって、多大な福音となることが期待される。

重症多形滲出性紅斑(急性期)の診断基準の整備と治療法の確立

重症多形滲出性紅斑(急性期)は全身の皮膚・粘膜傷害と発熱を伴う疾患であり、30%は死に至る重篤な疾患であり、さらに20-30%は角膜上皮幹細胞が消失するため、癢痕性角膜混濁をきたし、重篤な視力障害を残す。従って、早期診断と迅速な治療が必要であり、そのための診断基準整備と治療法の確立が

急務である。この疾患の診断基準が整備され、画期的な治療法(大量γグロブリン療法、血漿交換療法、培養角膜移植)が確立されれば、死亡率の低下と後遺症の低減が期待され、患者の QOL の向上が期待される。

B. 研究方法

毛包、汗腺などの付属器を有する培養皮膚の作製

毛包、汗腺を有する培養皮膚の作製のために、それぞれの幹細胞の同定を行う。毛包、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β1 インテグリン、α6 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。さらに、三次元培養皮膚実験系を用いて、皮膚付属器を誘導する因子について、転写因子・細胞成長因子(Wnt, BMP など)に注目して検討する。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 細胞の分離法はマウスで確立したので、この方法を用いてヒト表皮から SP 細胞を分離し、幹細胞としての性質について検討する。

表皮幹細胞から角膜の誘導

表皮幹細胞としての SP 細胞を分離し、角膜へ誘導し、移植可能な角膜を作製する。そのために、先ず、角膜細胞と表皮細胞から RNA を抽出し、micro array 解析を行い、角膜に特異的に発現する転写因子を同定する。

種々のプロモーターを連結したヒト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 発現ベクターは作製を完了したので、表皮基底細胞分画で高率に発現するプロモーター(ヒトVII型コラー

ゲン、ケラチン 14、230kD 類天疱瘡抗原、尋常性天疱瘡抗原のプロモーター)と連結した発現ベクターを作製し、角化細胞に導入した後、ヌードマウスへ移植し、VII型コラーゲンの発現を検討する。

ノックアウトマウスを用いたヒトVII型コラーゲン発現ベクターによる治療効果の検討

VII型コラーゲン欠損マウス由来表皮細胞を培養し、ヒトVII型コラーゲン発現ベクターを用いてVII型コラーゲンを産生させた後、培養皮膚シートを作製する。

重症多形滲出性紅斑(急性期)の診断と画期的治療法の開発

重症多形滲出性紅斑(急性期)の診断基準案(平成13年度作成)の見直しを行う。特に重症度判定についての基準が完成していないため、この点について重点的に検討を行う。

治療法については、急性期の治療と合併症の治療について別に検討する。現在のところ、重症多形滲出性紅斑の治療に関しては大量ステロイド、ステロイドパルス療法が主になされているが、これらでは治療できない症例が少なくない。また、ステロイド剤による副作用も大きな問題となっている。そこで画期的治療法として、大量免疫グロブリン療法、血漿交換療法の可能性について分担研究者の施設を中心にその有効性について検討する。

小児重症多形滲出性紅斑(急性期)についての検討が全くなされておらず、その病態が成人と同様であるか否かについての検討を行う。

重症多形滲出性紅斑(急性期)の合併症としての癩痕性角膜懸濁は培養角膜移植以外に方法はなく、その作製には正常眼組織の採取

が必要となる。そこで、我々が提案する表皮幹細胞からの角膜再生を研究期間内に実現させる。角膜上皮細胞と表皮角化細胞からrRNAを抽出し、micro array解析により角膜に特異的に発現している蛋白、転写因子を同定する。また、角膜上皮細胞の無血清培養法を確立する。

C. 研究結果

分担研究者の橋本公二は、重症多形滲出性紅斑、中毒性表皮壊死症、薬剤性過敏症候群の診断基準案に合致しない症例、まれな症例、典型例などの詳細を検討することにより、診断基準案の見直しを行い、重症多形滲出性紅斑診断基準案2004を作成した。

分担研究者の玉井は、骨髄細胞が皮膚の細胞になりうるかについて検討した。放射線照射したマウスにGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植し、骨髄細胞および骨髄由来細胞が緑色蛍光をもつキメラマウスを作成し、このGFP骨髄移植マウス背部皮膚に創傷を作製し、その治癒過程および治癒後の皮膚におけるGFP陽性細胞出現の有無、及びその局在を検討したところ、GFP陽性表皮細胞が創傷治癒部の表皮内に存在することを明らかにした。さらに、創傷治癒後の皮膚を生検して同様の解析を行った結果、一部の毛包にGFP陽性細胞が集積していること、また毛包間表皮に全層性GFP陽性表皮領域が存在することを確認した。

分担研究者の岡野は、表皮角化細胞の幹細胞を同定する目的で、ヒト角化細胞のside population細胞(SP細胞)の継代における比率について検討した。ヒト角化細胞を継

代し、各継代の細胞を数種類用意し、SP細胞と main population 細胞 (MP 細胞) をソーティングした。SP 細胞の比率は継代を繰り返すことに伴い減少した。現在の培養法、培養液では SP 細胞を効果的に維持することは困難であり、SP 細胞を減少させないような培養法の必要性を示唆した。

分担研究者の塩原は、薬剤性過敏症症候群 (DIHS) における Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7 などの血液中のヘルペスウイルス DNA を経時的に測定し、それらが多臓器障害と関連しているかどうかを検討した。DIHS では当初認められなかった HHV-6, EBV, HHV-7 そして CMV DNA が sequential に検出され、再活性化していることが明らかになり、一部のウイルス DNA の出現時に中枢神経症状、甲状腺機能異常などの臓器障害が認められたことから、DIHS においては様々なヘルペスウイルス再活性化と臓器障害が密接に関係していることを明らかにした。

分担研究者の池澤は、重症多形滲出性紅斑の本邦報告例を小児例と成人例に分けて集計し検討した。重症多形滲出性紅斑の原因と考えられたものは、小児では薬剤が 50%、感染症が 40%、成人では薬剤が 77%、感染症 13% であり、小児で感染症の比率が高いことが明かとなった。小児、成人ともに原因薬剤は抗けいれん薬が、感染症はマイコプラズマ感染が最も多く、小児ではマイコプラズマ感染が SJS 全体の原因の 28% を占めた。死亡率は小児 0.8%、成人 8% であり、マイコプラズマ感染による重症多形滲出性紅斑で中毒性表皮壊死症 (TEN) に移行した症例はみられなかった。小児の重症多形滲

出性紅斑は成人重症多形滲出性紅斑よりマイコプラズマ感染症が原因となることが多く、死亡率は低いことが明らかとなった。分担研究者の飯島は、重篤な他臓器障害を伴った DIHS の報告例について DIHS の診断基準 (厚生科学特別研究事業 診断基準と治療指針の研究 橋本研究班 2002 作成) をもとに詳細な解析を行った。その結果 DIHS で頻発する肝機能障害、造血器障害とともに腎機能障害、糖尿病、心筋炎、肺炎、胆嚢炎、甲状腺炎、脳炎を併発した例なども認められた。また死因としては敗血症などの他、心不全、腎不全、多臓器不全などが原因となることを明らかにした。

分担研究者の大橋は、角膜上皮細胞の無血清培養法について検討し、皮膚角化細胞と同様の手技を用いることにより角膜上皮細胞の無血清培養法を確立した。

分担研究者の相原は、小児における重症多形滲出性紅斑の臓器障害および遷延化病変について成人と比較検討した。臓器障害は小児、成人とも肝障害、呼吸器障害が多く、そのほか骨髄、腎および尿路、上下部消化管、心臓、中枢神経系など広範囲に障害が認められた。小児では尿路障害や中枢神経障害が成人より多く、成人では上部消化管障害が小児より多かった。遷延化した病変は小児、成人ともに眼病変、呼吸器障害の順に多く、小児に特徴的なものとしては歯牙の形成障害がみられた。以上より、小児の重症多形滲出性紅斑は、臓器障害や遷延化病変の発症率は成人と比較して低くはないことが明らかとなった。

分担研究者の岸本は、毛包を始めとする皮膚付属器官を再生させる目的で、マウス毛乳頭細胞とヒト上皮細胞を免疫不全マウス

背部皮膚に細胞移植したところ、不完全ながら、ヒト様毛包構造を示すキメラ毛包の形成を認めた。さらにヒト様キメラ毛包の解析を進め、毛包への分化マーカー及び毛包発生過程で発現する因子の特異的発現を形成されたヒト様キメラ毛包で確認した。分担研究者の白方は、表皮真皮を有する三次元培養皮膚の有効性について、とくにその生着性について培養表皮シートと比較検討した。三次元培養皮膚は生着率が50-70%であり、培養表皮シートと比較して明らかに生着性が高いことを示した。

D. 考察

分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案2004を作成した。診断基準案2004を用いた診断における感度、特異性の検討が不十分であり、この成果をもたらすには、症例の積み重ねによる解析が必要不可欠である。特に眼症状のみの症例等、皮膚科領域では症例が集まらない例を中心に検討することにより診断基準をさらに確実なものにする必要がある。病態に関しては、DIHSにおいてヘルペスウイルスDNAの検出は、実際の再活性化を決定する上で非常に重要な検討事項と考えられる。DIHSではHHV-6のみならず、EBV, HHV-7, CMVなどのウイルスがsequentialに再活性化し、これらの一部が中枢神経症状や甲状腺機能異常などの多臓器障害と関連して出現していることが明らかとなった。このようなウイルスのsequentialな再活性化は、骨髄移植後の免疫不全状態からその回復につれてみられるヘルペスウイルスの再活性

化の順番と同様であり、さらに、臓器障害はGraft-versus-host diseaseで認められる臨床症状と類似性があると考えられた。重症多形滲出性紅斑については、本年度の研究で、小児と成人でその原因に関して明らかに差があることが明らかとなった。この成果は今後の診断基準、治療指針、重症度判定に有用であると思われる。幹細胞研究に関しては多くの知見が得られた。創傷刺激により骨髄細胞が表皮細胞を供給しうること、さらに少なくともその一部は毛包領域に集積し、表皮幹細胞として創傷治癒過程の表皮構築に寄与し得る事を示していると考えられる。骨髄中に存在する表皮幹細胞の前駆細胞を単離し、培養することが可能になれば、これに治療用遺伝子を導入することにより再生遺伝子治療が可能になる。本研究を進展させることにより、先天性表皮水疱症をはじめとする遺伝性皮膚難病に苦しむ多くの患者さんにとって、有効な治療法を提供することができるかも知れない。現時点で有効性が示されている培養皮膚移植について、ヒト角化細胞の幹細胞を用いることは遺伝子治療の観点からも重要である。このヒト表皮角化細胞の幹細胞としてのSP細胞が、継代により維持されるかは今後の再生医療においては非常に重要な要素となる。すなわち、SP細胞を維持・増殖することができれば、培養皮膚移植、遺伝子治療が大きく発展することが期待される。今回の検討において、現在の培養法ではSP細胞の維持が困難であることが明らかとなった。今後、SP細胞に最適な培養液、培養法の改善が必要であると思われる。毛包の再生についても基礎的な成果が得られた。毛乳頭細胞と角化細胞を混合でマウスに移植することにより毛包類似構造体の

形成が認められた。この毛包類似構造体は、毛包の発生期に特異的に発現することが知られている CD44, MSX-2, Ki67, P63 の発現が認められた一方、成熟した毛包で観察される K15 やトランスグルタミナーゼの染色性は陰性であったことから、得られた構造体は毛包の発生過程に類似した未成熟な毛包に相当すると考察された。また、ヒト様毛包構造に付随したマウス毛乳頭細胞において、活性型のマーカーであるパーシカンに対する染色性が陰性であったことは、異種間での上皮-真皮相互作用の過程で正常なシグナルの受け渡しが滞り、結果的にパーシカン発現の消失と、未成熟な毛包が形成された原因ではないかと考えられる。これらのデータから、培養条件などを詳細に改善することにより、成熟毛包の再生が期待できると思われる。今後は現在用いているマウス毛乳頭細胞を、誘導能を有するヒト毛乳頭細胞に置換した移植系での完全ヒト毛包再生が期待される。鍵となるヒト毛乳頭細胞の誘導能維持について培地成分の検討などが考えられる。

E. 結論

本研究により重症多形滲出性紅斑診断基準案 2004 を作成し、診断指針の確立が可能となり、重症多形滲出性紅斑の病態が明らか

となった。

難治性皮膚疾患に対する画期的治療法として、三次元培養皮膚の有用性を示し、それをさらに発展するための幹細胞の分離・維持の必要性、さらには骨髄細胞が表皮細胞の供給源として機能することが明らかとなった。今後表皮細胞に分化しうる骨髄細胞分画の同定と培養法の確立、表皮細胞への分化誘導法の確立とそれに係わる分子機構の解明、さらには骨髄由来表皮幹細胞への安全かつ安定的遺伝子導入法の確立が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

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
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

重症多形滲出性紅斑、中毒性表皮壊死症、薬剤性過敏症症候群の診断基準案の改訂

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 重症多形滲出性紅斑、中毒性表皮壊死症、薬剤性過敏症症候群の診断基準案に合致しない症例、まれな症例、典型例などの詳細を検討することにより、診断基準案の見直しを行った。この診断基準案 2004 に照らし合わせて今後さらに症例を検討することにより特異性、感受性の高い診断基準が整備されることを期待する。

A. 研究目的

重症多形滲出性紅斑（急性期）は口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたす。その原因は感染症、薬剤などが推定されており、診断基準案を作成したが、一部の症例で診断基準に合致しないものの存在が明らかとなった。そこで、重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案の見直しを目的とした。

B. 研究方法

重症多形滲出性紅斑を含む薬剤アレルギーを専門とする皮膚科教授との会合を開き、各施設から典型例、非典型例、診断基準案合致例、非合致例をもちより、症例ごとに

詳細に検討することにより特異性・感受性の高い診断基準案を改訂する。

C. 研究結果

診断基準案：資料参照

D. 考察

分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案 2004 を作成した。診断基準案 2004 を用いた診断における感度、特異性の検討が不十分であり、この成果をもたらすには、症例の積み重ねによる解析が必要不可欠である。特に眼症状のみの症例等、皮膚科領域では症例が集まらない例を中心に検討することにより診断基準をさらに確実なものにする必要がある。

E. 結論

本研究により重症多形滲出性紅斑診断基準案 2004 を作成し、診断指針の確立が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

英語論文

Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 123:1078-85, 2004

Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)₂vitamin D₃. *J Dermatol Sci.* 36:41-50, 2004

Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, Hasegawa H, Fujita S, Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M.: Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol.* 85:2639-42, 2004

Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, Hashimoto K, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, Ohnishi T.: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy. *Oncol Rep.* 12:73-8, 2004.

Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hashimoto K.: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. *J Invest Dermatol.* 122:1356-64, 2004

Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:100-5, 2005

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* in press

Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Cre-loxP

adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. *Br J Dermatol.* in press

2. 学会発表

Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Marked enhancement of IFN-g-induced fractalkine production by IFN-g, TNF-a and IL-1a in normal human keratinocytes. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004

Tokumaru S, Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Transactivation of EGFR via HB-EGF shedding protects human keratinocytes from UV-irradiation-induced apoptosis. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004

Yahata Y, Shirakata Y, Tohyama M, Murakami S, Iwatsuki K, Hashimoto K.: A patient with severe hypersensitivity to mosquito bites and chronic active Epstein-Barr virus infection. 8th Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004

Yang L, Shirakata Y, Dai X, Sayama K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M,

Yahata Y, Hashimoto K.: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalent. 8th Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004

Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: HB-EGF shedding is essential for UV-induced EGFR phosphorylation and epidermal hyperplasia. 34th annual meeting of European Society for Investigative Dermatology, Vienna, Austria, Sep 8, 2004.

Sayama K, Dai X, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Hashimoto K.: SOCS-1 negative feedback mechanism of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocyte. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004

Yahata Y, Yamasaki K, Shirakata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: SOCS 1 is a negative regulator of the MyD88-independent signaling pathway of the LPS-induced TLR4 natural immune response in HDMEC. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004

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

Stevens-Johnson 症候群診断基準案 2004

概念

発熱を伴う口唇、眼結膜、外陰部などの皮膚粘膜移行部における重症の粘膜疹および皮膚の紅斑で、しばしば水疱、表皮剥離などの表皮の壊死性障害を認める。原因の多くは、薬剤である。

主要所見 (必須)

1. 皮膚粘膜移行部の重篤な粘膜病変(出血性あるいは充血性)がみられること。
2. しばしば認められるびらんもしくは水疱は、体表面積の10%未満であること。
3. 発熱。

副所見

4. 皮疹は非典型的ターゲット状多形紅斑。
5. 病理組織学的に、表皮の壊死性変化を認める。

但し、TEN への移行があり得るため、初期に評価を行った場合には、極期に再評価を行う。

主要項目の3項目を全てみたす場合 SJS と診断する。

中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis ; TEN) 診断基準案 2004

概念

広範囲な紅斑と、全身の 10%以上の水疱、表皮剥離・びらんなどの顕著な表皮の壊死性障害を認め、高熱と粘膜疹を伴う。原因の大部分は薬剤である。

主要所見 (必須)

1. 体表面積の 10%を越える水疱、表皮剥離・びらんなどの表皮の壊死性障害。
2. ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) を除外できる。
3. 発熱。

副所見

4. 皮疹は広範囲のびまん性紅斑および斑状紅斑である。
5. 粘膜疹を伴う。
6. 病理組織学的に、顕著な表皮の壊死を認める。

主要 3 項目のすべてを満たすものを TEN とする。

サブタイプの分類

- 1 型 : SJS 進展型(TEN with spots)
- 2 型 : びまん性紅斑進展型(TEN without spots)
- 3 型 : 特殊型

参考所見

治療等の修飾により、主要項目 1 の体表面積 10%に達しなかったものを不全型とする。

参考資料

TEN の診断基準について

水疱、表皮剥離がはっきりしなくても、組織学的に表皮の壊死が存在すれば病変部と考えられるため、概念および診断基準主要項目 1 に、水疱、表皮剥離、びらんなどの“ 顕著な表皮の壊死性障害” という言葉を加えた。

全経過を通して治療等の修飾により皮疹が限局する場合があります、参考所見に不全型を加えた。

SJS の診断基準案について

TEN 同様、概念に、水疱、表皮剥離などの“ 表皮の壊死性障害” という言葉を加えた。”

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

栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療のための基礎研究：
遺伝子治療用ベクターとしての骨髄幹細胞利用の可能性検討

分担研究者 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16年度の研究内容は、表皮水疱症遺伝子治療のベクターとしての骨髄幹細胞の可能性について検討した。

共同研究者

山崎尊彦、知野剛直、大鶴聡、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

遺伝性皮膚疾患に対する有効な遺伝子治療を行うためには、1) 生体皮膚幹細胞への低侵襲・高効率遺伝子導入法の開発、2)、導入遺伝子の長期安定的発現維持法開発、3) 導入遺伝子産物に対する免疫寛容誘導法の開発、といった新たな基礎研究の進展が必要である。特に、生体表皮での長期安定的遺伝子発現を可能にするためには、表皮幹細胞への遺伝子導入が不可欠であり、表皮幹細胞そのもの、あるいは表皮幹細胞の前駆細胞を単離・培養し、これに治療用遺伝子を導入して生体へ移植する新しい医療技術の開発が不可欠である。われわれは、この新技术を再生遺伝子治療と仮称し、その方法論の開発研究を進めている。

骨髄には造血幹細胞とともに、間葉系幹細胞と呼ばれる細胞集団が存在し、少なくとも骨、軟骨、脂肪など中胚葉組織の前駆細胞として機能していることが知られている。近年、この骨髄間葉系幹細胞が、中胚葉組織のみならず、外胚葉、さらには内胚葉組織の前駆細胞として機能し得る可能性が報告されつつある。もしこれら骨髄由来幹細胞が表皮幹細胞を供給し得るのならば、この細胞を遺伝性皮膚疾患に苦しむ患者さんの生体より単離し、これに欠損遺伝子を導入して再び患者さんの皮膚に移植することにより、再生遺伝子治療が可能になると予想される。本年度は、GFP 骨髄移植マウスを利用して、表皮細胞供給源としての骨髄細胞の機能を検討した。

B. 研究方法

放射線照射したマウスに GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植し、骨髄

細胞および骨髄由来細胞が緑色蛍光をもつキメラマウスを作成した。次いで、この GFP 骨髄移植マウス背部皮膚に創傷を作製し、その治癒過程および治癒後の皮膚における GFP 陽性細胞出現の有無、及びその局在を検討した。

C. 研究結果

骨髄細胞および骨髄由来細胞が緑色蛍光をもつキメラマウス背部皮膚に創傷を形成し、その治癒過程皮膚を組織学的に検討した結果、GFP 陽性表皮細胞が創傷治癒部の表皮内に存在することを明らかにした (図 1)。さらに、創傷治癒後の皮膚を生検して同様の解析を行った結果、一部の毛包に GFP 陽性細胞が集積していること、また毛包間表皮に全層性 GFP 陽性表皮領域が存在することを確認した。

D. 考察

上述した結果は、創傷刺激により骨髄細胞が表皮細胞を供給しうること、さらに少なくともその一部は毛包領域に集積し、表皮幹細胞として創傷治癒過程の表皮構築に寄与し得る事を示していると考ええる。骨髄中に存在する表皮幹細胞の前駆細胞を単離し、培養することが可能になれば、これに治療用遺伝子を導入することにより再生遺伝子治療が可能になる。本研究を進展させることにより、先天性表皮水疱症をはじめとする遺伝性皮膚難病に苦しむ多くの患者さんにとって、有効な治療法を提供するこ

とができるかも知れない。

E. 結論

骨髄細胞が表皮細胞の供給源として機能することが明らかとなった。今後表皮細胞に分化しうる骨髄細胞分画の同定と培養法の確立、表皮細胞への分化誘導法の確立と分化に係わる分子機構解明、骨髄から末梢組織への動員機構解明、さらには骨髄由来表皮幹細胞への安全かつ安定的遺伝子導入法を確立することにより、先天性表皮水疱症の根治的治療法を確立したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

Hiraoka K, Yamamoto S, Otsuru S, Nakai S, Tamai K, Morishita R, Ogihara T, Kaneda Y.: Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 173:4297-307, 2004

Matsuki A, Yamamoto S, Nakagami H, Aoki M, Tamai K, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R.: No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic

angiogenesis gene therapy in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 315:59-65, 2004

Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, Tamai K, Doi K, Morishita R, Nakamura T, Kubo T, Kaneda Y.: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. *FASEB J.* 18:212-4, 2004

Umegaki N, Moritsugu R, Katoh S, Harada K, Nakano H, Tamai K, Hanada K, Tanaka M. Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy. *Clin Exp Dermatol.* 29:42-5, 2004

Odanagi M, Kikuchi Y, Yamazaki T, Kaneko T, Nakano H, Tamai K, Uitto J, Hanada K.: Transcriptional regulation of the 230-kDa

bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol.* 13:773-9, 2004

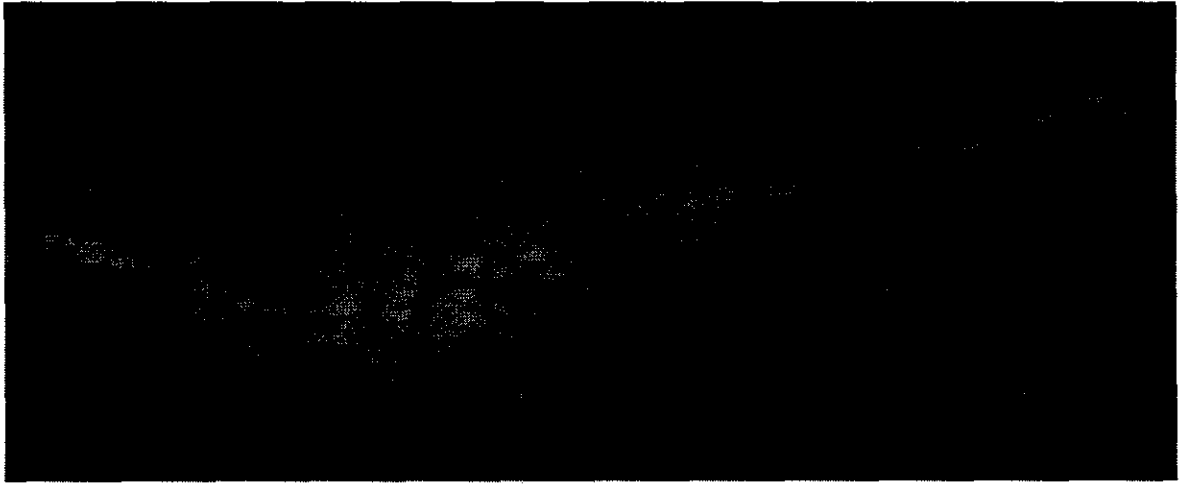
H. 的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 : なし

2. 実用新案登録 : なし

3. その他 : なし

図1 GFP陽性骨髄細胞由来表皮細胞の同定



ヒト表皮角化細胞 side population に関する研究

分担研究者 岡野栄之 慶応義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨 表皮角化細胞の幹細胞を同定する目的で、ヒト角化細胞の side population 細胞（SP 細胞）の継代における比率について検討した。ヒト角化細胞を継代し、各継代の細胞を数種類用意し、ヘキスト 33342 で染色後セルソーターを用いて SP 細胞と main population 細胞（MP 細胞）をソーティングした。2 代目の角化細胞の SP 細胞の比率は約 5%であったが、継代を繰り返すことに伴い SP 細胞の比率は減少した。現在の培養法、培養液では SP 細胞を効果的に維持することは困難であり、SP 細胞を減少させないような培養法の確立が必要であると思われる。

A. 研究目的

表皮角化細胞を用いた再生医療を推進するうえで、効率のよい細胞の分離と培養が必要である。このためには、表皮角化細胞の幹細胞を分離・培養することが最も適していると思われる。昨年度までの研究成果により、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髓細胞で行われているヘキスト 33342 を用いた分離法（SP 細胞）が角化細胞においても有用であることを示した。そこで、本年度は幹細胞としての SP 細胞が継代操作により維持されるか否かについて検討した。

B. 研究方法

凍結保存しておいた 2 代目のヒト表皮角化細胞を播種し、無血清培養法にて培養した。

継代を繰り返し、6 代目までで適宜保存した。2 - 6 代の細胞を同じ濃度で同時に播種し、培養後 5 日目の subconfluent になった条件で、トリプシン/EDTA を用いて細胞を回収し、ヘキスト 33342 を 10 ug/ml の濃度で添加し、37°C 60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を 3×10^6 /ml の濃度で再懸濁し、高速セルソーター（EPICS ALTRA, ベックマン・コールター社）を用いて SP 細胞の全細胞数に対する比率を測定した。

C. 研究結果

ヒト表皮角化細胞における SP 細胞の比率は骨髓細胞の SP 分画と比較してやや多く、おおむね 5%程度であった。これは初代培養の細胞、2 代目の細胞でもほぼ同程度であった。3 代目以降の細胞では、SP の比率