

「厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)汎発性膿疱性乾癬における重症度評価と

Quality of Life(QOL)の相関に関する研究」への参加同意撤回書

岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座・皮膚病態学

難治性疾患克服研究事業稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班

北島康雄 教授殿

岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻皮膚・粘膜・結合織学分野

岩月啓氏 教授殿

病 院 名:

カルテ番号:

氏 名 :

私は汎発性膿疱性乾癬における重症度評価と Quality of Life(QOL)の相関に関する研究について参加することに同意し同意書に署名しましたが, その同意を撤回することを
担当医師 _____ に伝えここに同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

(自署)

患者氏名 _____ 印

生年月日 _____

住所・連絡先 _____

家族等氏名 _____ 印

生年月日 _____

患者との続柄 _____

住所・連絡先 _____

(注) 家族等とは後見人, 保佐人, 親権者, 配偶者, 成人の子又は兄弟姉妹等をいう。

本研究に関する同意撤回書を, 私が受領したことを証します。

担当医師名 _____ 印

資料 4

膿疱性乾癬 QOL・重症度/治療評価調査票 記載日 平成 年 月 日

イニシャル	姓	名	性別	1. 男	生年	1.大正 2.昭和		
				2. 女	月日	3.平成 年 月 日		
発病年月	1.昭和 2.平成 年 月	初診年月日	1.昭和 2.平成 年 月 日		体重	kg		
診断名	1. 汎発性膿疱性乾癬 2. 疱疹状膿疱疹 3. 稽留性肢端皮膚炎の汎発化 4. その他 ()							
経過 (現時点)	1. 治癒 2. 軽快 3. 不変 4. 悪化 5. 軽快・再発を繰り返す(初診以降の再発回数 回)							
	初診時			現時点				
臨床 所見	紅斑	1. ほぼ全身に及ぶ 2. 体表面積の50%前後 3.一部の皮膚 4. なし			紅斑	1. ほぼ全身に及ぶ 2. 体表面積の50%前後 3.一部の皮膚 4. なし		
	膿疱形成	1. ほぼ全身に及ぶ 2. 体表面積の50%前後 3.一部の皮膚 4. なし			膿疱形成	1. ほぼ全身に及ぶ 2. 体表面積の50%前後 3.一部の皮膚 4. なし		
	膿海	1. あり 2. なし			膿海	1. あり 2. なし		
	粘膜疹	1. あり 2. なし			粘膜疹	1. あり 2. なし		
	発熱	1. 39℃以上 2. 38℃以上39℃未満 3. 38℃未満 4. なし			発熱	1. 39℃以上 2. 38℃以上39℃未満 3. 38℃未満 4. なし		
血液 所見	赤血球数	_____ x10 ⁴ /mm ³			赤血球数	_____ x10 ⁴ /mm ³		
	白血球数	_____ /mm ³			白血球数	_____ /mm ³		
	赤沈	_____ mm/60分			赤沈	_____ mm/60分		
	血清Ca	_____ mg/dl			血清Ca	_____ mg/dl		
	血清蛋白	_____ g/dl			血清蛋白	_____ g/dl		
	血清アルブミン	_____ g/dl			血清アルブミン	_____ g/dl		
CRP	_____ mg/dl			CRP	_____ mg/dl			
内服 治療	1. エトレチナート	() mg/日			1. エトレチナート	() mg/日		
	2. シクロスポリン	() mg/kg/日			2. シクロスポリン	() mg/kg/日		
	3. メトトレキサート	() mg/週			3. メトトレキサート	() mg/週		
	4. 副腎皮質ステロイド	() mg/日			4. 副腎皮質ステロイド	() mg/日		
	5. その他	(内容 処方量)			5. その他	(内容 処方量)		
外用 ・そ 他の	1. 副腎皮質ステロイド外用	1. あり 2. なし			1. 副腎皮質ステロイド外用	1. あり 2. なし		
	2. 活性型ビタミンD ₃ 外用	1. あり 2. なし			2. 活性型ビタミンD ₃ 外用	1. あり 2. なし		
	3. 光線療法	1. PUVA 2. その他 ()			3. 光線療法	1. PUVA 2. その他 ()		
	4. その他	(内容)			4. その他	(内容)		
治療 経過	初期治療開始2週間後の反応 1. 有効 2. やや有効 3. 不変 4. 悪化 これまでの治療内容の変更 1. あり 2. なし ありの場合 (i: 他の内服薬への変更 ii: 他の内服薬追加 iii: 外用・光線療法の追加)							

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

出生前診断：施行ガイドラインの設定に向けて

分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

研究要旨 本邦での出生前診断は、重症型表皮水疱症や重症型魚鱗癬において、1990年頃から施行されている。我々の研究グループは、本邦において既に34例の出生前診断を施行してきた。皮膚科領域における分子生物学的研究の急速な進歩により、最近、病型の臨床重症度や新しい病型の発見があり、出生前診断の診断方法、適応症例についての病型分類、倫理基準も多様化してきた。それぞれの疾患での新しい診断基準、医師間ごとの異なった倫理基準を総合的に検討し、日本社会のコンセンサスに合わせた出生前診断の新しいガイドラインの設定が必要不可欠であることが明らかとなった。

研究協力者

後藤真希、澤村大輔、秋山真志
北海道大学大学院医学研究科・皮膚科病学
分野

A. 研究目的

一般的に出生前診断の適応となる表皮水疱症の重症型は、Herlitz 接合部型、幽門閉鎖接合部型、劣性栄養障害型の3病型である。魚鱗癬では、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症や道化師様魚鱗癬がある。このような重篤な症状を示す疾患に対して、1990年頃より、我々の研究グループを中心に出生前診断が施行されており、現在までに自験例の総計は34例となっている（表1）。日本国内のみならず国際的にも非常に多くの研究者が、各医療施設のコンセンサスに従って、出生前診断を施行している。最近では、出生前診断の適応となる重症型表皮水疱症や重症型魚鱗癬の原因遺伝子が多数報告され、出生前診断の方法や分類が大きく変化している。

B. 研究方法

妊娠19—20週において、胎児皮膚をパンチ生検で採取、凍結ブロックを作成し凍結切片を作成の後、モノクローナル抗体を用

いて免疫組織化学的手法により、蛋白レベルでの変化を検討した。あるいは、電顕検索にて胎児皮膚の微細構造を詳細に観察した。さらに、近年は分子生物学的研究の進歩により、重症型表皮水疱症や重症型魚鱗癬の原因遺伝子が次々に解明され、DNAレベルで診断可能となった。妊娠10—11週における絨毛生検法と妊娠12—14週における羊水穿刺にて、胎児組織を採取した。胎児由来細胞である胎盤絨毛や羊水細胞からDNAを抽出し、PCR法にて遺伝子増幅を行い、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定、制限酵素を用いて制限酵素消化を確認の上、遺伝子型に基づき出生前診断を行った。

魚鱗癬については、我々の研究グループでの診断基準案に基づいて行った（表2）。尚、出生前診断を行う上で、出生前診断の制約と限界、検査における危険性などを十分に説明した上で、ある程度の助言を与えることができるが、最終的な決定は患者あるいは保因者である夫婦自身によるものであった。

C. 研究結果

出生前診断の自験例の総計は34例、うちDNA診断（絨毛生検と羊水穿刺）21例、

胎児皮膚生検による診断13例であった(表1)。表皮水疱症における出生前診断の病型は、Herlitz 接合部型、幽門閉鎖接合部型、劣性栄養障害型、病型不詳の重症型がそれぞれ、11例、2例、7例、3例であった。そのうち、DNA 診断を行ったのは14例で、胎児皮膚生検は9例であった。また、魚鱗癬での病型は、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症が2例でいずれも DNA に基づいて診断され、道化師様魚鱗癬3例については、原因遺伝子が同定されていないため、胎児皮膚生検により形態学的所見にて診断を行った。

D. 考察

1) 表皮水疱症

劣性栄養障害型表皮水疱症は、VII型コラーゲンの遺伝子の変異部位やパターンによりVII型コラーゲン蛋白自体が全く発現しない Hallopeau-Siemens 型と、不完全ながらも多少は発現している非 Hallopeau-Siemens 型に分類される。Hallopeau-Siemens 型のような手指の癒着などを伴う非常に重篤な生命予後の悪い疾患に関して出生前診断の適応となり、実際に我々も Hallopeau-Siemens 型について出生前診断を行ってきた。非 Hallopeau-Siemens 型でも Hallopeau-Siemens 型に類似した症状を呈することもあることから、出生前診断の適応となり得る。このように、劣性栄養障害型の非 Hallopeau-Siemens 型でも臨床重症度に大きな多様性があるので、出生前診断についても議論の余地がある。

また、表皮水疱症の幽門閉鎖接合部型表皮水疱症は、非常に予後が不良で早期に死に至ることが知られている。これらは $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの遺伝子変異により生じる疾患で、我々も $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンのモノクローナル抗体を用いて、出生前診断も行ってきた。しかし、最近プレクチン遺伝子の変異により、単純型ではあるが幽門閉鎖を合併する重篤な型があることが見出

された。我々の経験した2例とも早期に死亡していることから、単純型では初めての重症型であり、今後出生前診断の適応になると考えられた。

2) 魚鱗癬

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症はケラチン1、ケラチン10遺伝子のいずれかの遺伝子変異により生ずる疾患で、常染色体性優性遺伝形式をとる遺伝病である。遺伝子変異の種により重症度に違いがあり、臨床症状に差があることがわかってきた。一部の症例では豪猪皮様などと称される皮膚症状、特異な悪臭を放つため、患者の苦痛は想像を絶するものである。このような家系の患者の妊娠時は、強く出生前診断を望むことが多い。国際的にも本症の出生前診断は多数報告されており、我々の研究グループも施行してきている。さらに、大変稀ではあるが、道化師様魚鱗癬もほとんどの例が出生直後に死に至るため、出生前診断の適応となる。しかしながら、いまだ原因遺伝子が不明であるため、胎児皮膚生検を施行し、胎児皮膚の超微形態学的検索によって診断を行っている。このような疾患では原因遺伝子が早期に同定され、遺伝子診断による早期妊娠時期の出生前診断が望まれる。

E. 結論

現在、上述した皮膚科領域の疾患に出生前診断という適切な選択を与え、健康な胎児を出生に導く社会的ニーズが望まれている。従って、出生前診断の診断基準、適応症例についての病型、医師間ごとの異なった倫理規定を総合的に検討し、日本社会のコンセンサスに合わせた出生前診断の新しいガイドラインの設定が必要不可欠であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成16年度)

論文発表

英語論文

1. Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, McMillan JR, Eady RAJ, Shimizu H: Gap junction development in the human fetal hair follicle and bulge region. *Br J Dermatol* 150:429-434, 2004.
2. Murata T, Masunaga T, Ishiko A, Shimizu H, Nshikawa T: Differences in recurrent COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa: ethnic-specific and worldwide recurrent mutations. *Arch Dermatol Res* 295:442-447, 2004.
3. Onozuka T, Sawamura D, Yokota K, Shimizu H: Mutational analysis of the ATP2A2 gene in two Darier disease families with intrafamilial variability. *Br J Dermatol* 150:652-657, 2004.
4. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Sato-Matsumura KC, LaDuca J, Lee JY, Masunaga T, Shimizu H: The G2028R glycine substitution mutation in COL7A1 leads to marked inter-familial clinical heterogeneity in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci* 34:195-200, 2004.
5. Sawamura D, Ina S, Goto M, Akiyama M, Shimizu H: In vivo transfer of TGF-alpha and beta genes to keratinocytes. *J Dermatol Sci* 34:234-236, 2004..
6. Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H, Matsuo I: Remodeling of desmosomal and hemidesmosomal adhesion systems during human hair follicle development. *J Dermatol Sci* 35:154-157, 2004.
7. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, McMillan J, Shimizu H: A novel clinical subtypes of epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is caused by plectin gene (PLEC1) mutations. in press.
8. Goto M, Sato-Matsumura K, Sawamura D, Yokota K, Nakamura H, Shimizu H: Tyrosinase gene analysis in Japanese patients with oculocutaneous albinism. *J Dermatol Sci* in press.
9. Sawamura D, Abe R, Goto M, Akiyama M, Hemmi H, Akira S, Shimizu H: Direct injection of plasmid DNA into the skin induces dermatitis by activation of monocytes through toll-like receptor 9. *J Gene Med* in press.
10. Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H: Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in a Japanese family of Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* in press.
11. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Nakamura H, Takizawa Y, Sawamura D, Matsunaga K, Suzumori K, Shimizu H: DNA-based prenatal exclusion of bullous congenital ichthyosiform erythroderma at the early stage, 10-11 weeks' of pregnancy in two consequent siblings. *J Am Acad Dermatol* in press.
12. Yasukawa K, Sawamura D, Akiyama M, Motoda N, Shimizu H: Keratotic lesions in epider-

molysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *J Am Acad Dermatol* in press.

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。

表1 出生前診断の自験例34例

A) DNA診断(絨毛生検、羊水穿刺 21例)

病型	患者番号	結果
チロジナーゼ陰性型眼皮膚白皮症	No. 108	正常
無汗性外胚葉形成不全症		正常
劣性栄養障害型 EB	No. 39A	罹患
チロジナーゼ陰性型眼皮膚白皮症	No. 84	罹患
劣性栄養障害型 EB	No. 39B	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 26	正常
劣性栄養障害型 EB	No. 38	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 57	正常
Herlitz 接合部型 EB (双胎)	No. 26	正常
Herlitz 接合部型 EB (双胎)	No. 26	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 143	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 57	正常
チロジナーゼ陰性型眼皮膚白皮症	No. 84	正常
チロジナーゼ陰性型眼皮膚白皮症	No. 186	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 201	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 143A	正常
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症	No. 81	正常
劣性栄養障害型 EB	No. 336	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 143B	正常
水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症	No. 81A	正常
劣性栄養障害型 EB	No. 336	罹患

B) 胎児皮膚生検法 13例

病型	患者番号	結果
Herlitz 接合部型 EB	No. 26A	正常
チロジナーゼ陰性型眼皮膚白皮症	No. 109	罹患
劣性栄養障害型 EB	No. 36	正常
幽門閉鎖接合部型 EB	No. 29A	正常
病型不詳重症型 EB	No. 17A	正常
幽門閉鎖接合部型 EB	No. 29B	正常
病型不詳重症型 EB	No. 17B	正常
Herlitz 接合部型 EB	No. 143	罹患
道化師様魚鱗癬	No. 83A	罹患
劣性栄養障害型 EB	No. 173	正常
病型不詳重症型 EB	No. 264	正常
道化師様魚鱗癬	No. 277-K	正常
道化師様魚鱗癬	No. 83B	正常

表2 重症型魚鱗癬における出生前診断の基準案

道化師様魚鱗癬

- 1) 罹患者（発端者）において道化師様魚鱗癬が確定診断されている。
確定診断には、以下の2項目を満たす必要がある。
 - a. 臨床的に出生時、板状の角化を全身にみとめ、著明な眼瞼外反、口唇の突出開口を認める。
 - b. 電顕にて、層板顆粒の異常と角化細胞内の著明な脂肪滴の蓄積を認める。
 - 2) 両親の強い希望があり、出生前診断が行われない場合、胎児を中絶する可能性が示唆されている。
-

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

- 1) 発端者において、臨床、病理学的に本症が確定診断されている。
 - 2) 発端者において、ケラチン1または10の遺伝子に病因遺伝子変異が同定されている。
 - 3) 両親の強い希望があり、出生前診断が行われない場合、胎児を中絶する可能性が示唆されている。
-

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

Muta mouse を用いたキメラオリゴ核酸導入による In vivo 変異挿入率の検討

分担研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 遺伝性疾患の治療として遺伝子治療が十数年来期待されてきた。ADA 欠損症や X-SCID、血友病 B のように一部の細胞に正常遺伝子が発現することによって形質が改善する例もあるが、それでも半永続的に導入遺伝子を発現させることは不可能である。筋ジストロフィーや表皮水疱症のような遺伝性疾患では特に傷害されている広範囲の組織に長期に遺伝子を発現させる技術開発が求められている。長期遺伝子発現の究極的な方法は変異部位を修正して内在性の遺伝子を正常化する方法である。そのための方法として RNA-DNA キメラオリゴ核酸が効率よく変異修正できることが報告されたが、その後再現性について疑問がもたれ始めている。今回我々は lacZ の 1 つのヌクレオチドを変異させ、LacZ の活性を失活させるキメラオリゴ核酸 2 種を合成した。ラムダファージの lacZ 遺伝子をもつ Muta mouse の肝臓にこれらのキメラオリゴ核酸を HVJ-liposome を用いて導入し、1 週間後に肝臓から DNA を抽出し、lambda::lacZ 粒子を in vitro packaging によって作成した。これを *E.coli delta lac galE* に感染させ p-gal agar 上での lacZ- plaque 数をカウントした。この方法による変異頻度は 1/20000 以下であり、非導入群のコントロールと比較して有意差が無いことが判明した。

A. 研究目的

キメラオリゴ核酸による標的遺伝子への変異挿入率を生体組織へのキメラオリゴ核酸核酸導入によって評価し、遺伝性疾患の究極的な遺伝子治療の可能性について検討する。

B. 研究方法

Muta mouse に挿入されている lambda gt10 lacZ の配列の GAA (Glu をコード) に点変異を挿入するための 2 種の RNA-DNA キメラオリゴ核酸 LZ-2, LZ-3 を図 1 のように作成した。これが予想通りはたらけば LZ-2 は GAA を CAA (Gln) に、LZ-3 は GAA を GCA (Ala) に変更させることになり、LacZ 活性が失われる。このキメラオリゴ核酸を HVJ-AVE liposome に封入して、Muta mouse の肝臓被膜下に注入した。1 週間後に肝臓の遺伝子を抽出して、lambda::lacZ 粒子を in vitro packaging によって作成した。これを *E.*

coli delta lac galE に感染させ p-gal agar 上での lacZ- phage 数をカウントした。

C. 研究結果

肝臓への蛍光オリゴ核酸導入効率は約 35% であった。LZ-2 の場合、lacZ- plaque 数からの変異率は 14.31×10^{-5} であり、非導入群では 15×10^{-5} であり、LZ-3 の場合は変異率が 2.7×10^{-5} であり、非導入群では 7×10^{-5} であり、有意差を認めなかった。Plaque から DNA を抽出し、シーケンス或いは PCR での制限酵素切断パターンから変異の有無を検出したが、全く変異が生じていなかった。

D. 考察

HVJ-liposome 法による肝臓への遺伝子導入効率は 35% であり、オリゴ核酸の導入法としては最適のものと考えられる。しかし報告されたものと同じのキメラオリゴ核酸は標的遺伝子への変異の挿入には効果が

ないと判断される。

E. 結論

生体組織における標的遺伝子への変異の挿入、変異の修正にはさらに開発が必要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表（平成16年度）

1. 論文発表

英語論文のみ

1. Ino, A., Yamamoto, S., Kaneda, Y., and Kobayashi, I.: Somatic gene targeting with RNA/DNA chimeric oligonucleotides: an analysis with a sensitive reporter mouse system. **J Gene Med.** 2004 6, 1272-1280.
2. Yokozeki, H., Wu, M-H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element "decoy" against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. **Gene Therapy**, in press.
3. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M-H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element "decoy" against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. **Gene Therapy**, in press.
4. Masuda, K., Yamamoto, S., Endoh, M., and Kaneda, Y.: Transposon-

independent enhancement of transcription by Sleeping Beauty transposase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 317, 796-800, 2004.

2. 学会発表

Yasufumi Kaneda: The 12th European Society Gene Therapy (Invited lecture) "Development of novel non-viral gene delivery system" (November 5, 2004, Tampere, Finland)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許の名称：遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター

特許番号：769385、発明者名：金田安史、出願人：金田安史、ジェノメディア（株）

備考：オーストラリアでの特許権取得（平成16年7月8日）

2. 実用新案登録

特許の名称：ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント

出願日：平成16年6月10日

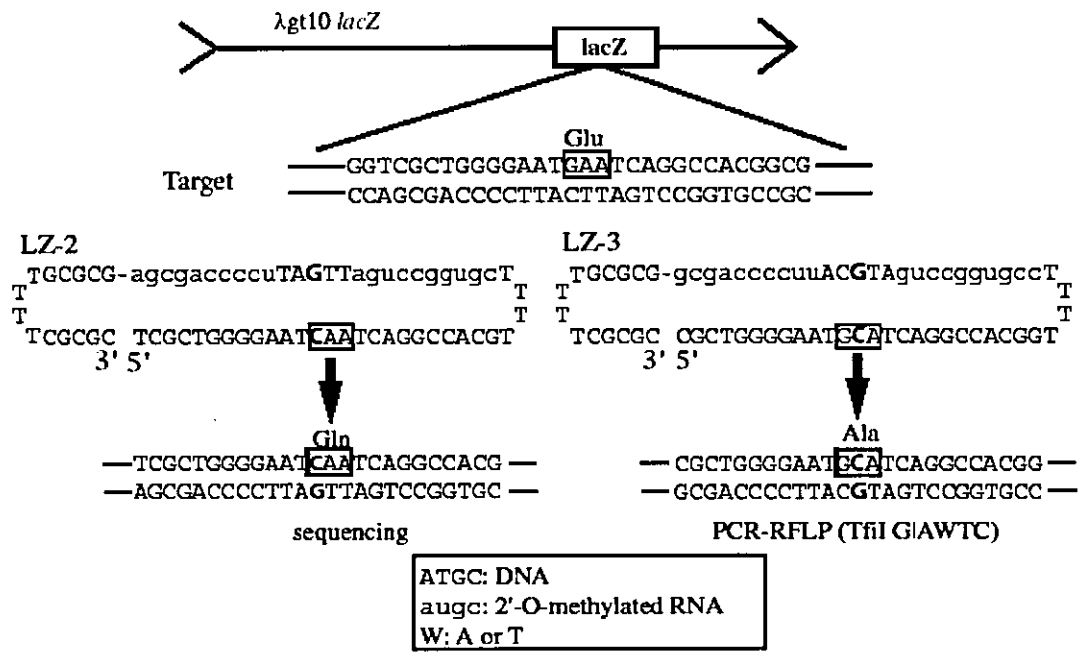
特許番号：特願2004-172449号、発明者：金田安史、福村正之、出願人：ジェノメディア（株）

特許の名称：脳機能改善のための医薬および方法

出願日：平成16年7月29日

特許番号：特願2004-222649号、発明者：金田安史、森下竜一、島村宗尚、出願人：アンジェス MG（株）

图 1



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

超音波とマイクロバブルを用いた三次元皮膚への遺伝子導入

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 表皮水疱症の遺伝子治療の基礎的検討として、三次元培養皮膚への超音波とマイクロバブルを用いた遺伝子導入について検討した。正常ヒト皮膚由来の線維芽細胞と角化細胞を用いて三次元培養皮膚を作製し、空気曝露による重層化7日目に表皮と真皮を剥離し、その間隙に GFP plasmid とマイクロバブル混合液10ul を注入し、超音波をかけてその後の GFP の発現を経時的に検討した。2日後には基底層中心に GFP の発現が認められたが、14日後には角層にしか発現は認めなかった。遺伝子導入を繰り返した場合は、発現量は回数に比例して増加した。遺伝子導入した三次元培養皮膚をマウスへ移植したところ、良好に生着し、GFP の発現も認められたが、14日目には角層にしか発現は認めなかった。

共同研究者

金田安史（大阪大学遺伝子治療学）

玉井克人（大阪大学遺伝子治療学）

白方裕司（愛媛大学皮膚科学）

A. 研究目的

表皮水疱症の培養皮膚を用いた ex vivo 遺伝子治療のために、三次元培養皮膚への non-viral ベクターによる遺伝子導入法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養し、5日目に正常ヒト角化細胞をゲルの上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、三次元培養皮膚を作製した。この三次元培養皮膚の表皮と真皮を機械的にいったん剥離し、その間隙に GFP を発現するプラスミドとマイクロバブル（MB-3; Neppa Gene）の混合液（plasmid; 5ug + MB-3; 5ul, total 10ul）を添加した。表皮をもとに戻し、6 well plate に PBS を添加した底面より、超音波プローブを密着させ、2 Hz, Intensity 8、60秒間超音波をかけた。その後、空気曝露の状態ですらに培養を続け、経時的に

検体を採取し、GFP の発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。In vivo での発現については、上記方法で GFP plasmid を導入した三次元培養皮膚を nude mouse へ移植し、経時的に検体を採取し、HE 染色にて生着しているかについて確認し、GFP の発現は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

超音波とマイクロバブルを用いた GFP の遺伝子導入が可能であった。1回の遺伝子導入では、導入後2日目には基底層を中心に遺伝子の発現が認められた。導入効率はおおむね 20-30% であった。経時的な観察では導入効率は変化がなかったが、その局在は時間が立つにつれて表皮上層に移動し、導入後14日目には角層を中心に遺伝子の発現がみられたが、基底層ではほとんど発現がみられなかった。導入効率を改善させる目的で、導入回数を変化させ、回数の増加に伴う遺伝子発現効率について検討した。1回目の導入後2日目と4日目に同様の手技にて遺伝子を導入し、観察したところ、1回の遺伝子導入と比較して、2回、3回と導入を繰り返すことにより遺伝子発

現は増加した。In vitroでの遺伝子発現が、移植後にも発現しているかについて nude mouseへの移植で検討した。空気曝露後7日目の三次元培養皮膚に同様の条件で GFP plasmidを導入し、翌日 nude mouseへ移植し、経時的にサンプルを回収した。HE染色では、三次元培養皮膚は良好に生着し、超音波とマイクロバブルによる toxicity は認めなかった。GFPの局在は移植後2日後には基底層を中心として遺伝子発現がみられたが、14日目には角層中心にしか発現はみられなかった。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症の最終的な治療の目標は遺伝子治療である。遺伝子治療には大きく in vivo法と ex vivo法があり、水疱形成の抑制に関しては in vivo法が適していると思われる。しかし、水疱後のびらん、潰瘍については、欠損している表皮を再生する必要がある。我々はこれまでに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、自己三次元培養皮膚移植の有用性を示してきた。すなわち、栄養障害型表皮水疱症患者の難治性皮膚潰瘍に対しては、自己培養皮膚移植が現時点では最も有効であると思われる。この培養皮膚をさらに発展し、培養皮膚を用いた遺伝子治療が難治性皮膚潰瘍の最も良い治療法であると思われる。今回の検討にて、三次元培養皮膚に超音波とマイクロバブルを用いて遺伝子導入することが可能であることを見いだしたことは今後の遺伝子治療の基礎的データとして有用であると思われる。ウィルスベクターを用いた遺伝子導入については、アデノウィルスベクターを用いて三次元培養皮膚に遺伝子導入が可能であることを本研究班にて過去に報告してきたが、常に安全性に関する懸念がつきまとっている。その点、超音波とマイクロバブルを用いる遺伝子治療は安全性の面ではウィルスベクターをしのいでいると思われる。アデノウ

ィルスベクターとの相違点としてはその導入効率であるが、頻回の遺伝子導入により、効率を上げることができると示唆された。今後はさらに、導入効率、長期にわたる遺伝子発現のための工夫が必要であると思われる。

E. 結論

超音波とマイクロバブルを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入に成功し、表皮水疱症患者への遺伝子治療の基礎的データを収集することができた。これらのデータは、培養皮膚を用いた遺伝子治療の確立に大きく寄与すると思われる。

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

1. 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.* 2004, 36:41-50
2. 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.* 2004, 85:2639-42
3. Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, Hashimoto K, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, hnishi T.: Midkine promoter-based conditionally repli-

cative adenovirus for malignant glioma therapy. **Oncol Rep.** 2004, 12:73-8.

4. Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumara 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** . 2004, 122:1356-64.
 5. Min LJ, Cui TX, Yahata Y, Yamasaki K, Shiuchi T, Liu HW, Chen R, Li JM, Okumura M, Jinno T, Wu L, Iwai M, Nahmias C, Hashimoto K, Horiuchi M.: Regulation of collagen synthesis in mouse skin fibroblasts by distinct angiotensin II receptor subtypes. **Endocrinology**. 2004, 145:253-60.
2. 学会発表
1. Yuji Shirakata, Sho Tokumaru, Yoko Yahata, Mikiko Tohyama,

Yasushi Hanakawa, Koji Sayama, Koji Hashimoto: HB-EGF shedding is essential for UV-induced EGFR phosphorylation and epidermal hyperplasia. 34th annual meeting of European Society for Dermatological Research 2004.09.07 Vienna Austria

2. Lujun Yang, Yuji Shirakata, Xiuju Dai, Yoko Yahata, Koji Sayama, Koji Hashimoto: Microbubble-Enhanced Ultrasound for Gene Transfer into Living Skin Equivalent. 8th China-Japan Joint Meeting of Dermatology 2004.11.12 Kuming China

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

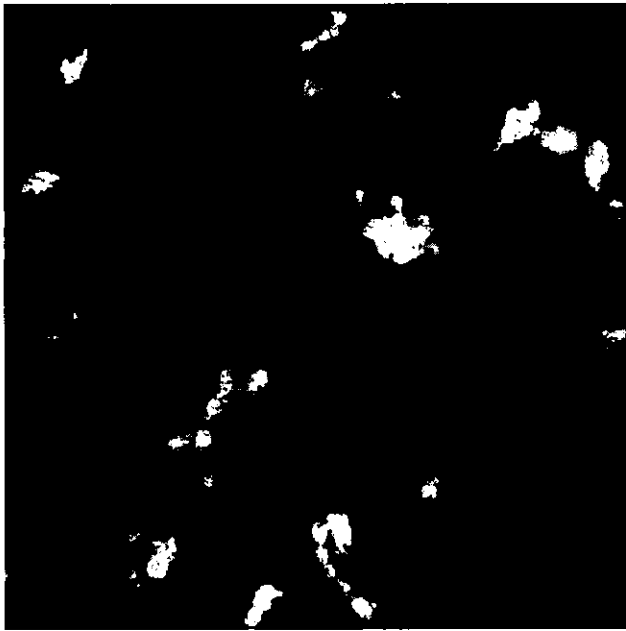


図 1: 超音波とマイクロバブルを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入。導入後 2 日目の水平断の所見。GFP 蛋白の発現が約 20 - 30% の角化細胞で認められる。

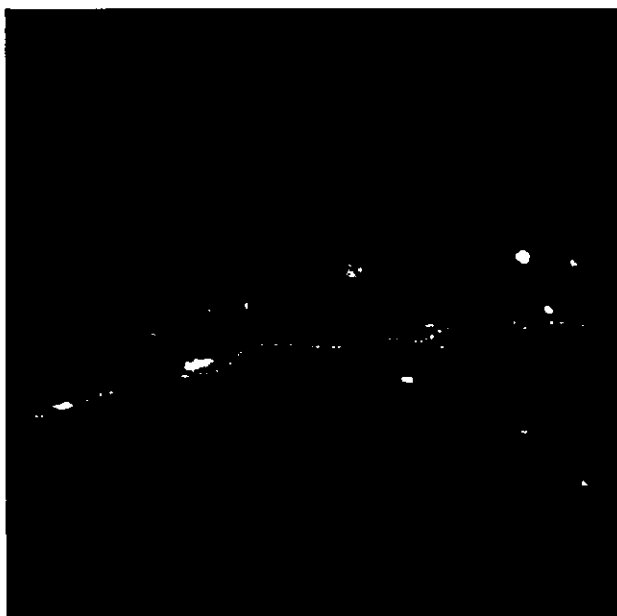


図 2: 遺伝子導入後 2 日目の垂直断面の所見。GFP 蛋白は基底層を中心に認められる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
分担研究報告書

栄養障害型先天性表皮水疱症の遺伝子治療

研究協力者 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 栄養障害型先天性表皮水疱症の遺伝子治療を可能にするためには、1) 遺伝子導入用表皮幹細胞の単離・培養法の確立、2) 塩基配列特異的かつ安定的な遺伝子導入法の開発、3) 導入遺伝子産物に対する免疫応答制御、のそれぞれの課題に対して研究を進める必要がある。われわれは、1) に対しては骨髄由来幹細胞の表皮幹細胞への形質転換、2) に対しては相同組み換え効率の向上、3) に対しては骨髄細胞や胎児皮膚への遺伝子導入による免疫寛容誘導により、それぞれの課題を克服することを目指している。

共同研究者

山崎尊彦、大鶴聰、菊池 康、金田安史
大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学
知野剛直、北島康雄
岐阜大学医学部皮膚科

観察した。

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を可能にするためには、1) 表皮幹細胞の単離・培養法、2) 染色体に対する塩基配列特異的遺伝子導入法、3) 導入遺伝子産物に対する免疫寛容誘導法、それぞれの方法論を確立する必要がある。平成16年度は、1) 骨髄幹細胞の表皮細胞への分化能検討、2) 骨髄移植による免疫寛容誘導、のそれぞれについて研究を行った。

B. 研究方法

- 1) GFP 遺伝子トランスジェニックマウスより骨髄を採取し、野生型同系マウスに移植した。6週間後に背部皮膚を切除して潰瘍モデルを作成し、その創傷治癒過程で潰瘍部皮膚を生検、GFP 陽性表皮細胞の有無を検討した。
- 2) GFP 遺伝子トランスジェニックマウス骨髄を移植した野生型同系マウス背部に GFP トランスジェニックマウス皮膚を移植、移植片の拒絶の有無を経時的に

C. 研究結果

- 1) GFP 陽性骨髄細胞を移植したマウス背部皮膚の潰瘍治癒過程で経時的に皮膚生検し、GFP 陽性表皮細胞の有無を検討した。その結果、潰瘍閉鎖前、及び閉鎖後の再生表皮中に GFP 陽性表皮細胞がキメラ状態で存在すること、毛包内に GFP 陽性表皮細胞が集簇していることが確認された。
- 2) GFP 陽性骨髄細胞移植マウス背部皮膚に GFP 陽性マウス皮膚を移植し、拒絶反応の有無を検討した。その結果、GFP 陽性骨髄細胞の移植によって GFP に対する免疫寛容が誘導されることが明らかとなった。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症 dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) の遺伝子治療を可能にするためには、患者本人の細胞を利用して、皮膚基底膜領域に長期間安定的に欠損遺伝子産物 (VII型コラーゲン) を供給する方法論の確立が必要である。われわれは、骨髄幹細胞由来で表皮細胞への分化能を有する末梢血付着幹細胞、peripheral blood adhesive stem cell (PBASC)

を同定した。PBASCにⅦ型コラーゲン遺伝子を導入した後、これを患者皮膚に投与することにより、PBASCが表皮幹細胞に分化して長期間Ⅶ型コラーゲンを供給することが可能になると予想され、表皮水疱症の根治的治療法につながることを期待される。

Ⅶ型コラーゲンが完全欠損している患者ではⅦ型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るため、Ⅶ型コラーゲン遺伝子を導入した細胞に対する拒絶反応が生じ、治療効果が持続しない可能性が高い。即ち栄養障害型表皮水疱症に対する有効な遺伝子治療を行うためには、治療に先だってⅦ型コラーゲンに対する免疫寛容を誘導する必要がある。われわれは、骨髓細胞に欠損遺伝子を導入し、これを移植することより導入遺伝子に対する免疫寛容誘導が可能であることを見いだした。重症表皮水疱症患者に対する骨髓移植の安全性についてはなお十分な検討を要するが、低侵襲かつ安全な方法論が確立されれば、免疫寛容誘導法として臨床応用が可能になると思われる。PBASC再生遺伝子治療と組み合わせることにより、栄養障害型表皮水疱症に対する有効かつ安全な遺伝子治療が可能なる事を期待する。

E. 結論

骨髓幹細胞を利用した遺伝子治療、免疫寛容誘導法の開発を進めた。これらの方法を利用して、表皮水疱症をはじめとする遺伝性皮膚疾患の遺伝子治療が可能になると思われる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表（平成16年度）

1. 論文発表

1. Hiraoka K, Yamamoto S, Otsuru S, Nakai S, Tamai K, Morishita R,

Ogihara T, Kaneda Y. Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4297-307.

2. 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*. 2004 Feb 27;315(1):59-65.

3. 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*. 2004 Jan;18(1):212-4. Epub 2003 Nov 20.

4. 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*. 2004 Jan;29(1):42-5.

5. 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.** 2004 Dec;13(12):773-9.

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症の発症機序の分子医学的解析
（第2報）

研究協力者 市來善郎 岐阜大学大学院医学研究科
病態制御学講座 皮膚病態学分野 助教授

研究要旨 我々は、ケラチン5 (K5) 遺伝子変異 (1649delG) によって生じた遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症3例を報告してきた。さらにこの変異によって延長したK5のC末の12個のポリペプチドに対するポリクローナル抗体 (NT240) を用いた免疫ブロッティングおよび免疫組織染色で、患者皮膚に変異K5蛋白が発現していることを確認した。今回、本症の発症メカニズムを解明する目的で変異K5 pCMV ベクターを用いて種々の培養ケラチノサイト (HaCaT, DJM-1, NHEK) にトランスフェクションし形態的異常を観察した。wild type に比べ変異K5 遺伝子を導入した HaCaT, DJM-1 でケラチン凝集塊の数が多傾向があったが有意差はなかった。NHEK では凝集塊に差はなかった。これは患者病変部の電顕像でトノフィラメントの異常凝集塊がみられなかったことと一致し、この変異がケラチン線維形成には大きく影響しないことを示唆している。

共同研究者
戸崎裕子
岐阜大学大学院医学研究科皮膚病態学
北島康雄
岐阜大学大学院医学研究科皮膚病態学・教授

A. 研究目的

単純型先天性表皮水疱症 (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常染色体優性の遺伝性疾患である。Coulombe による Dowling-Meara 型の K14 点突然変異を端緒に、多くの EBS 患者においてケラチン遺伝子の連鎖が解析され、特定の領域の点突然変異と EBS の表現型との関係が明らかになった。すなわちケラチン分子中央の α ヘリックス構造の両端に位置する分子種間でよく保存された 20 アミノ酸の変異が重症の EB (Dowling-

Meara 型) に、また α ヘリックス構造をつなぐリンカーのアミノ酸異常が軽症の EBS (Köbner 型) に見い出され、 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。しかし症例が蓄積されるにつれて同じ部位でも置換されるアミノ酸の種類によって表現型が異なったり、常染色体劣性の遺伝形式を示す症例、またケラチン分子の頭部に変異を認め、下腹部、腋窩、四肢などに斑状の色素斑を生ずる mottled 型などが報告されるようになり遺伝子型と表現型の関係は混沌としてきた。最近、我々は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 EBS3 例を遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症として報告し、ケラチン5 (K5) 分子の尾部に遺伝子変異と患者皮膚に変異 K5 蛋白の発現を確認した。今回、この K5 変異がケラチン線維形成に与える影響を検討する目的でトランスフェクションによる実験を試みた。

B. 研究方法

症例：EB3例の臨床所見の概略は以下の通りである。出生直後より四肢に水疱を繰り返し生じ、生後6ヵ月頃から大腿、体幹などに、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。紅斑は1ヵ月に数cmの速度で外方に拡大、中央には褐色まだらな色素沈着を残した。病理組織所見は表皮基底細胞内に裂隙を認めた。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がトノフィラメントの凝集塊は見られなかった。3症例につき、患者末梢血のgenomic DNAの分析ではK14には異常を認めなかったが、K5ではexon9にヘテロの1649delGの欠失変異を認めた。

トランスフェクションによる変異K5蛋白の発現：患者末梢血DNAから変異を含むK5エクソン9をPCRで増幅し、北海道大学安川先生から供与されたK5cDNAにライゲーションしFLAGとともにCMV-Tag expression vectorに組み込んだ。

変異K5cDNAはコントロールである正常K5cDNAとともにLipofectamin 2000を用いて、3種の培養ケラチノサイト(NHEK, HaCaT, DJM-1)および293Tにトランスフェクションした。遺伝子導入24時間後、以下に示す抗体を用い免疫ブロッキングを行い、さらに二重染色で免疫組織学的にK5、変異K5、K14の局在を検討した。抗K5抗体(C50, Lab Vision, Fremont, CA, USAおよびRCK102, Sanbio, Uden, NL)、抗K14抗体(LL002, Lab Vision, Fremont, CA, USA)。抗変異K5抗体:(NT240:KRT5の1649delG変異により生じる変異アミノ酸鎖のC末のポリペプチド(CSSHVLSFSGE)をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作成後アフィニティカラムで精製し使用。)

C. 研究結果

免疫ブロッキング：293T細胞に変異

K5 (MT K5) および正常K5 (WT K5) を各々導入し、抗FLAG抗体、抗K5抗体(C50)、抗変異K5抗体(NT240)でブロッキングを行なった。抗FLAG抗体ではMT K5, WT K5各々60kD, 58kDにバンドを認めた。一方正常K5を認識するAF138はWT K5のみを、また変異K5を認識するNT240はMT K5のみにバンドを認めた(図1)。

免疫組織染色：MT K5およびWT K5を導入したNHEK, HaCaT, DJM-1は抗FLAG抗体による組織染色で細胞質に導入蛋白の発現が確認された。MT K5, WT K5いずれにおいてもケラチン凝集塊が認められ、NHEKでは同等に、HaCaT, DJM-1ではMT K5に多い傾向が見られた(図2)。DJM-1へのMT K5, WT K5のトランスフェクション後にanti FLAGとK14で二重染色すると、WT, MTともに導入蛋白とK14の局在が一致しMT K5もケラチン14とヘテロダイマーを形成できることが確認された(図3)。

D. 考察

我々はこれまでに遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症計3例を経験し、遺伝子変異の検索でKRT5のexon9に欠失変異1649delGを認めた。この変異はK5蛋白の尾部V2ドメイン以下に35個長いアミノ酸鎖を生ずる可能性が示唆されたので、このアミノ酸鎖C末を認識する抗体(NT240)を作成し、患者皮膚で免疫組織学的に検討したところ、変異ケラチン蛋白の発現が確認された。

今回はこの変異ケラチン蛋白がケラチンフィラメントネットワーク形成にどのような影響を及ぼすかを検討するために各種ケラチノサイトにトランスフェクションを行った。wild type K5に比べ変異K5遺伝子を導入したHaCaT, DJM-1でケラチン凝集塊が多い傾向があったが有意差はなかった。NHEKでは凝集塊の数に差はなか