

厚生労働科学研究費補助金
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

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成17(2005)年3月

目 次

I	班員構成	1
II	総合研究報告	2
	稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究	
	主任研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座	
	皮膚病態学分野 教授	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	25

班 員 構 成

研究者名	研究実施場所	職 名	主な研究分担
主任研究者 北島 康雄	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	教授	天疱瘡、角化症、総括
分担研究者 橋本 隆 天谷 雅行	久留米大学医学部皮膚科 慶應義塾大学医学部皮膚科	教授 専任講師	天疱瘡（診断、発症機序と治療） 天疱瘡（発症機序と治療）
岩月 啓氏	岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚科	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
清水 宏 橋本 公二 金田 安史	北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学分野 愛媛大学医学部皮膚科 大阪大学医学系研究科分子治療学遺伝子治療学	教授 教授 教授	先天性表皮水疱症（遺伝子診断） 先天性表皮水疱症（再生医療治療） 難治性皮膚疾患の遺伝子治療
池田 志孝 山本 明美	順天堂大学医学部皮膚科 旭川医科大学皮膚科学	教授 講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症、天疱瘡（発症機序と統計） 先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症（診断と発症機序）

研究協力者 本間 好 小澤 明 照井 正 小宮根真弓	福島県立医科大学生体情報伝達研究所生体物質研究部門 東海大学医学部皮膚科 日本大学医学部皮膚科 東京大学医学部皮膚科	教授 教授 教授 講師	膿疱性乾癬（発症機序） 膿疱性乾癬（病因遺伝子と治療） 膿疱性乾癬（発症機序と治療） 膿疱性乾癬（発症機序）、先天性魚鱗癬様紅皮症
黒沢美智子	順天堂大学医学部衛生学	助手	天疱瘡、先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症（統計学、疫学）
新関 寛徳	奈良県立医科大学皮膚科	講師	天疱瘡（病因遺伝子と治療）
玉井 克人	大阪大学医学系研究科分子治療学遺伝子治療学	助教授	先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症（遺伝子治療）
米田 耕造	香川大学医学部皮膚科	講師	ケラチン病の病態
市来 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	助教授	先天性表皮水疱症（ケラチン病） 天疱瘡（治療）

Ⅱ 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究

主任研究者 北島康雄

岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座 皮膚病態学分野 教授

研究要旨 当研究班では平成14年～16年において①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症、④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の4疾患についての診断基準の見直し、それに基づく疫学的研究による患者数と治療状態の実体の把握を行った。さらに発症分子病態の解明、原因遺伝子と臨床表現型との相関の解析、原因遺伝子から発症までの機序の解明、これらを基にEBMに基づく治療法の開発を研究目標とした。①、③、④の3疾患においては病因抗体や病因遺伝子が解明されたが、この過程からさらに新たな問題が提起され、詳細な発症機序の解明と満足すべき根本的治療の確立を目指した研究が必要と考えられた。一方、②膿疱性乾癬では、病因も不明であり特異的治療法も開発されていない。今後、稀少難治性皮膚疾患の病態解明と治療成績等の向上を図り、患者の医療、福祉改善に寄与するためには本研究の継続が必要である。

分担研究者：

橋本 隆

久留米大学医学部皮膚科 教授

天谷雅行

慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師

岩月啓氏

岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚科 教授

清水 宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学分野 教授

橋本公二

愛媛大学医学部皮膚科 教授

金田安史

大阪大学医学系研究科分子治療学遺伝子治療学 教授

池田志孝

順天堂大学医学部皮膚科 教授

山本明美

旭川医科大学皮膚科 講師

A. 研究目的

当研究班分科会の対象疾患は、特定疾患である①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症の3疾患および平成14年度に調査研究対象疾患として認められた④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症である。

①天疱瘡は抗自己表皮細胞接着分子抗体のため全身に水疱ができ、非常に悲惨な疾患である。自己抗体抗原分子の解明と抗体定量法は確立されたが、抗体発生の原因、抗体結合の水疱形成機序は不明である。従って、これら(EBM)に基づく的確な治療指針はないため、一割ほどの極めて治療抵抗性難治性の患者群があり、ステロイドの副作用、敗血症などを併発し死に至る。現在は基礎研究成果を踏まえ特に難治性群に対する治療法指針を開発する時期にある。そこで以下を研究目的とした。

自己抗体価測定法の開発（天疱瘡抗原ELISA法）とそれに基づいた治療指針の設定。

自己抗体産生機序・免疫寛容成立機序と抗

体結合後の水疱形成機序の解明（天疱瘡抗原ノックアウトマウス、天疱瘡モデルマウス）。

2)の研究結果に基づいた抗体減少を標的にした根本的（長期）治療と抗体結合後の水疱形成機序のブロックを標的にした緊急対症療法の開発。

病型診断の正確化と患者疫学（QOLを含む）の把握。

②膿疱性乾癬は、発熱と全身の無菌性膿疱を特徴とする重症かつ希な再発性の疾患である。過去に疫学と臨床経験的な治療法を列挙し一応の治療指針を作成したが、病因、発症機序が不明であるため不完全である。そこで以下を研究目的とした。

疾患の診断・治療ガイドラインの臨床的評価と予後・QOL解析、特に小児型の診断と治療指針を作成。

乾癬における「膿疱性」乾癬症例の位置付けを明らかにし、疫学的データの年次報告を行い、情報を提供。

膿疱性乾癬の病因を理解し、適切な治療法を選択するために、本疾患の膿疱形成機序を炎症反応の解析、特に好中球性炎症と表皮由来分子との連鎖の解明に寄って明らかにする。ゲノムワイドな遺伝子相関解析により本疾患遺伝子解析を行う。

患者支援ネットワークの設立

③表皮水疱症は、重症例では全身の水疱と瘢痕のために合指、四肢の運動制限を来し、極めてQOLの悲惨な状態になる。現在病因遺伝子の変異点は明らかになったので、その成果から病因遺伝子変異による臨床分類と遺伝子治療法と再生医学に基づく治療法の実現を行う。そこで以下を研究目的とした。

出生前診断法の確立。

三次元自己培養皮膚治療法の実現とその施行。

三次元自己培養皮膚遺伝子導入表皮再生治療法の実現。

変異遺伝子の修復、補填のための遺伝子導入法とその発現様態を細胞、動物レベルで実証する。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（本邦推定患者数150～200名）では、生下時から発症し全身の角質層の強度な肥厚と剥奪のため悲惨な外観となりQOLは劣悪である。病因はケラチン遺伝子変異によるが、診断基準、疫学、治療法は不明であるので、以下を研究目的とした。

全国患者数の重症度判定、治療状況の把握、予後と診断書・重症度判定基準を作成するための第一次～三次調査による解析。

ケラチン遺伝子変異と臨床像の関係（genotype/phenotype）解析による発症機序の解明。

治療法に関しては上記2)の研究結果を待って、③と同様な研究が必須であり、これを行う。

B. 研究方法

①天疱瘡

蛍光抗体、免疫ブロット、ELISA、cDNA transfection など各種の方法による天疱瘡群疾患群総合的診断システムを確立する。

リコンビナント天疱瘡抗原 ELISA 法による病因抗体価をモニターした EBM による新しい治療指針の開発作成する。

天疱瘡モデルマウスの脾細胞よりモノクローナル抗体を作成し、新生仔マウスを用いた受動免疫系およびハイブリドーマの腹腔播種により、病的活性モノクローナル抗体を単離する。

病的活性を有する抗体と有さない抗体のエピトープの違いを詳細に検討する。

モノクローナル抗体の cDNA より自己反応性 B 細胞のトランスジェニックマウスを作成する。

天疱瘡抗体結合後活性化される細胞内シグ

ナル伝達とデスモソーム裏打ち分子群の動態変化から水疱形成機序を明らかにする。

新しい知見による調査計画を立て10年ぶりの疫学（特に予後調査と QOL）調査を行う。

②膿疱性乾癬

膿疱性乾癬の診断・治療・重症度の標準化を目的として、集積した症例についてガイドラインの検証を行う。その結果から診断、検査項目の取捨選択を行い、疫学的データベースとなり得る臨床調査個人票の改訂を実施する。

日本乾癬学会登録症例から小児例と成人例を抽出しその特徴を解析する。

膿疱性乾癬の QOL 評価のため SF-36 を用いた一次調査で回答のあった施設に対して二次調査を実施する。二次調査の前に岡山大学、岐阜大学の倫理委員会にて QOL 調査に関して審査を受け、調査する。

膿疱性乾癬の炎症反応の解析を、膿疱性乾癬患者の生検標本を収集し、病変内における炎症性サイトカイン（IL-8, IL-6 など）とエイコサノイド関連酵素（COX-1, 2, LOX-1, 2）の発現分析によって行う。

マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析のスクリーニングにより膿疱性乾癬の遺伝子解析を行う。

岡山大学医学部・歯学部附属病院を拠点として、関連病院、行政機関を組み入れた岡山皮膚難病ネットワークの設立を試みる。

③表皮水疱症

出生診断法を確立する。

表皮水疱症の患者の病変や DNA を採取する。免疫組織学的に水疱位置や基底膜抗原の発現状況、電顕的所見を観察し、ある程度病型を絞る。患者の DNA 配列をしらべ遺伝子変異を同定し、genotype/phenotype の解析をする。

栄養障害型表皮水疱症の三次元培養皮膚を用いた治療法の改良を行う。

三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターによる角化細胞へⅦ型コラーゲン遺伝子導入を行う。

HVJ エンベロープベクター成育マウスの皮膚組織への遺伝子導入効率を検討し、その効率を高めるため、様々なポリマーとの複合体形成やターゲティングベクターの開発を行う。

全身の皮膚組織に遺伝子を導入し発現させるための技術的な課題を解決し皮膚を標的とした遺伝子治療の開発研究を行う。そのため超音波造影法と chemical peeling の併用による遺伝子導入を開発する。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

平成14年度に患者数の把握、重症度判定、治療状況の把握、予後などにつき調査し、診断書・重症度判定基準を作成するために、全国一次調査を行い16年度までに三次調査を行う。

本調査は全国の多施設を対象に患者数の推定と臨床疫学像を明らかにすることを目的に実施した。先に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成され、対象を2002年1年間の受療患者とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科計 802 科に2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者ありと回答のあった施設を二次調査対象とした。新症例の集積と文献症例におけるケラチン遺伝子変異と臨床像の関係解析を行う。

患者皮膚の免疫電顕観察によるケラチン遺伝子変異と臨床形成機序を解明する。

非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症のモデルマウスにおける病態解明を行う。

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症などのケラチン病の表皮角化細胞に見られるタンパク凝集塊の蓄積機序を解明する。

（倫理面への配慮）

本研究において患者試料（生体組織、cDNA、

個人及び疫学情報)などの取り扱いについては患者に説明と同意を得た上でその管理には十分な配慮をした。また、実験動物使用時は動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施し、また、使用動物数は必要最小限にとどめた。

北海道大学大学院医学研究科の倫理委員会運営委員会承認：「重症型遺伝性皮膚疾患の出生前診断、2000, 4, 25」、「委託供給された自家培養表皮を用いた先天性表皮水疱症治療に関する臨床研究、2000, 10, 2」、愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理委員会承認：「培養表皮シート自家移植；受付番号3、培養表皮シート他科移植；受付番号8-3、培養真皮移植；受付番号11-11、三次元培養皮膚移植；受付番号11-12」。慶應義塾大学医学部動物実験委員会承認：「承認番号012048」岡山大学倫理委員会承認；「乾癬における遺伝的背景と遺伝子転写制御異常の検索；受付番号29」「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；受付番号40」。奈良県立医科大学倫理委員会承認（承認番号20）平成15年11月7日、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会承認 平成16年1月21日、岐阜大学倫理委員会承認（承認番号15-97）平成15年12月19日、久留米大学医学部倫理委員会承認（承認番号10）平成15年11月28日、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認（承認番号14-74-1）平成16年4月13日、愛媛大学医学部倫理委員会承認（承認番号30）平成16年4月27日岡山大学倫理委員会承認（承認番号16-1）；平成16年6月23日：「天疱瘡患者の遺伝的背景」。

C. 研究結果 D. 考察

①天疱瘡：

ナイーブな Dsg3^{-/-} マウスの脾細胞を自己抗原で免疫することなしに移植することで

天疱瘡モデルマウスが作成し、新しい自己免疫モデルマウスの作成法を示した。さらに、この天疱瘡モデルマウスは、6ヶ月以上にもわたり安定した病的抗体産生が認められるため、種々の免疫抑制療法の評価系として有用であることが示された。

Dsg3 反応性 B細胞は、除去、不活化も受けずに末梢リンパ組織に存在することが明らかにされ、除去あるいは不活化による免疫寛容からエスケープしていることが示唆された。また、末梢抗原である Dsg3 に反応性を持つ B細胞は、トレランスにより除去も不活化も受けずに存在することが明らかにされ、B細胞トレランスに新しい局面を開いた。

病原性のあるモノクローナル抗体 AK23 を作成し、これが Dsg3 分子の接着面を認識すること、病原性を示さない mAb は接着面以外の部位を認識することを示した。

培養表皮細胞を用いて天疱瘡病原性モノクローナル抗体 (AK23) は Dsg3 欠損デスモソームを患者抗体と同様に形成することが示された。

リコンビナント Dsg3-ELISA 法を確立し、保険収載された。

これによる抗体価を指標として、免疫グロブリン大量療法が血漿交換療法後の抗体価上昇を抑制することを示した。また、抗体価の上昇がみられたら、抗体価の安定を確認するまで治療の減量を行わず、上昇傾向が続く場合は少量のステロイドや免疫抑制剤を追加することが症状再発の回避に導くと考えられた。天疱瘡の27%以上の症例が「治癒」、さらに44%以上の症例が「寛解」に至っていることが明らかとなった。

以上、3年間に得られた成果をもとに、難治性疾患のひとつである天疱瘡の克服にむけて、次年度以降のさらなる分子医学的研究と臨床的および疫学的研究の統合的研究の成果が期待される。

②膿疱性乾癬：

重症度分類診断基準にあてはめた方法でスコア化する方法によると、登録された330症例のうち抽出できた症例は118例であった。最高スコアを21点とした場合、(0-6点)；34例(28.8%)、(7-14点)；67例(56.8%)、(15-21点)；17例(14.4%)のような得点分布が得られた。一方、重症度分類基準にあてはめた場合、軽症(0-2点)；21例(7.8%)、中等症(3-6点)；79例(66.9%)、重症(7-10点)；18例(15.3%)の得点分布を得た。

日本乾癬学会では111名(男性42名、女性69名)の膿疱性乾癬患者が登録されており、発症年齢分布では女性の若年者が多く、小児は13例(男児1例、女児12例)であった。治療では、ステロイド、レチノイドを軸にPUVA、シクロスポリンが併用されていた。合併症として感染症、扁桃炎、歯牙感染が認められ、悪化因子としてストレス、日光、感染症、季節因子、外傷が登録されていた。一般血液検査では、白血球数増加、IgG増加、IgM増加、IgE増加、尿酸上昇、リウマチ因子陽性が認められた。また、Turner症候群に伴うGPPの症例報告が複数みられた。今後、原因が不明であるが故に一般的に広く指標となるべき汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインを作成しその内容を反映した改訂調査票で全国調査の必要があると思われた。

膿疱性乾癬のQOL調査として、SF-36を用いた一次調査を皮膚科認定施設(561施設)に行った(資料3)。この全国調査で、146施設に370名のGPP患者が受診していることが判明した。岡山大学、岐阜大学の倫理委員会にてQOL調査に関して審査を受けた後、一次調査で回答のあった146施設に対して二次調査を実施した。2004年11月現在、27例の回答があり、その解析結果は班会議において中間報告した。すべての回答を待ち、解析を実施する。今回の調査では、QOL調査と同

時に重症度/治療評価調査票を用いた膿疱性乾癬症例の重症度および治療経過を評価も実施している。

膿疱性乾癬と尋常性乾癬のIL-8 mRNAの発現パターンを解析したところ、その病態が異なることが示唆された。また、角層下膿疱形成過程において、IL-8だけでなく、C5aが好中球集積に重要な働きをしていることが示された。

ロキシシロマイシン、Parthenolide、Bay 11-7085、SB202190が表皮細胞によるケモカインTARC、CTACKの産生を抑制した。これらの物質が、膿疱性乾癬の治療薬として有用である可能性が示唆された。

乾癬患者由来角化細胞のEGFR過剰発現の原因として、転写因子AP-2の恒常性発現とEGFR遺伝子の低メチル化の関与を示した。

マイクロアレイ上の約60,000の遺伝子のうち約16,000が皮膚において構成的に発現していた。その中で約1,000の既知・未知遺伝子に病変部特異的な発現量の差異を認めた。そのうちのいくつかは、全長クローニングを行った。437例の尋常性乾癬患者血液をサンプリングした。そのうち375例を3群(各125例)に分けて、3回のスクリーニングを行った。全染色体にわたって設定した26,061個のマイクロサテライトマーカーについて1次スクリーニングを行い、2,065個のマーカーに有意な相関が認められた。これら2,065個のマーカーについて2次スクリーニングを行い、495個に有意な相関が認められた。さらに、これら495個のマーカーについて3次スクリーニングを行い、158個に有意な相関が認められた。

この158個の中には多くの偽陽性が含まれているため、1～3次の各集団を対象として、再度、遺伝的相関解析を行い、最終的に有意な相関が認められたマーカーを40個に絞り込

んだ。

患者支援ネットワークの設立：2003年7月27日、岡山皮膚難病支援ネットワーク設立とした。

以上、膿疱性乾癬の診断基準と重症度基準を見直し、現状に即した鑑別診断や検査項目を取捨選択し、認定指針と個人調査票を全国統一様式に改訂し、今後の疫学調査を可能にした。日本乾癬学会登録データから膿疱性乾癬症例を抽出し疫学的検討を行い、重症度の層別化と年齢による層別化解析を施行した。特に小児膿疱性乾癬の臨床的特徴について明らかにした。膿疱性乾癬 QOL を中心とした一次全国調査を完了し、現在、二次調査を実施中であり、第1回中間報告を行った。この二次調査結果をもとに診断および重症度判定に必要な診断項目の見直しを行っている。山陽地区に岡山皮膚難病支援ネットワークを設立し、行政とともに支援を実践する難病医療拠点のプロトタイプを形成した。

一方、膿疱性乾癬の疫学的調査に関しては永続的にデータを蓄積できるシステムはこれまで存在しなかった。今回の全国統一の改訂臨床個人票（新規、更新）はデータベース構築に大きく寄与できるものと考えられる。臨床医の手を離れた個人票を有効な形でデータベース化するのは行政側の努力に拠るところが大きい。今後、本研究班との連携のもとに貴重なデータを有効利用していきたいと考えている。

③表皮水疱症

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。

栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であるVII型コラーゲン遺伝子に存在する alternative splicing を発見し、創傷治癒や皮膚の remodeling にとの関係を明らかにした。

角化細胞に導入したVII型コラーゲンは、共焦点レーザー顕微鏡所見で正常角化細胞、患者由来角化細胞ともに蛋白の発現が確認された。

Genotype/phenotype の関連については表皮水疱症の原因遺伝子として、10の遺伝子が報告されている。日本人表皮水疱症における、遺伝子型と表現型の関連を明らかにするため、本邦表皮水疱症患者の遺伝子変異検索を行った。単純型ではその特異型である、epidermolysis bullosa with migratory circinate erythema を発見し 1649delG を、epidermolysis bullosa with mottled pigmentation にケラチン5遺伝子に2種類の変異 P25L と 1649delG を同定した。また、幽門閉鎖を合併する単純型の2家系において、プレクチン遺伝子の変異、Q305X と 1395G → A、R1189X と Q2538X を見出した。接合部型では、generalized atrophic benign epidermolysis bullosa (GABEB) の解析を行い、XVII型コラーゲン遺伝子に、1家系には 1258delA と Q1387X の組み合わせ、もう1家系には、4335delC のホモ接合を検出した。栄養障害型では、VII型コラーゲンの G2028R 変異により、通常の優性栄養障害型、痒疹型ならびに爪の変形のみ、異なった臨床症状が出現することが示された。また、Hallopeau-Siemens劣性栄養障害型において、新しい4塩基の挿入変異 434insGCAT を検

出した。日本人表皮水疱症における、遺伝子型と表現型の関連をさらに明らかにするため、遺伝子変異検索を継続して進める必要があると考えられた。

COL7A1 遺伝子検索を行った結果、5818 delC ならびに G1815R を見いだした。RDBE では有棘細胞癌を若年から高率に発症する可能性が高いため、患者への十分な啓蒙を行い定期的に専門施設を受診させる必要性を明らかにした。

超音波造影法による遺伝子導入は、In vivo での遺伝子機能解析には非常に有効で、今後治療遺伝子の検索や評価に汎用されることが期待された。さらに、超音波および造影剤を用いた低侵襲性遺伝子導入法を開発した。また遺伝子治療でⅦ型コラーゲン cDNA を発現させるための COL7A1 プロモーターのクローニングを行った。

表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植を開発し、実際に11例の患者（うち栄養障害型表皮水疱症患者7例を含む）に臨床応用し、有効な成績を得ることができた。また、保存法の開発により全国の施設に自己培養表皮シートを供給することができ、表皮水疱症患者4例が他施設の症例である。自己三次元皮膚を用いて、栄養障害型表皮水疱症患者3例を治療し、良好な成果を得た。三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクター、超音波を用いた新たな遺伝子導入法を確立した。以上のごとく、本研究は、基礎研究の成果に立脚しつつ臨床応用を着実に実施しており、稀少難治性疾患患者への有効な治療法を確立できたと考えられる。

長期遺伝子発現のために魚類の transposon/ transposase の共導入系を用い、ルン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。

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。

以上から、出生前診断については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。遺伝子治療に関しては3年間の主な研究内容はまとめると以下のごとく、平成14年度：1) 皮膚への遺伝子導入方法開発、2) 治療用Ⅶ型コラーゲン発現ベクターの開発、3) 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、平成15年度：1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の開発、2) 治療用発現ベクターの安全性向上を目的としたプロモーター開発、平成16年度：1) 骨髄由来幹細胞の表皮幹細胞への形質転換、2) 骨髄移植による免疫寛容誘導法開発であり、今後の継続により臨床応用実現可能な領域に近いと言える。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症:

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準による対象を2002年1年間の受療患者とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科計802科に2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。一次調査の返送数は507科、回収率は63.2%であった。回収された二次調査票から対象期間外の不適格例を考慮し、2002年1年間に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症により全国の病院を受療した患者数は55人（95%信頼区間35-75人）と推計された。対象外を除く二次調査票は28例で、男女各14例、年齢は2～65歳、地域集積性は認められず、家族歴を有するのは3例（10.7%）であった。臨床症状は全身性の皮疹27例（96.4%）、紅皮症19例（67.9%）、全身の水疱15例（57.7%）、手指拘縮あり3例（10.7

%)、姿勢異常1例(3.6%)、歩行障害有り4例(14.3%)等であった。鱗屑の性状や歩行障害の有無に性差が認められた。診断時と比較した現在の病状は改善と不変が同割合(42.9%)であった。

BCIEのgenotype/phenotype相関解析結果、a)ケラチン1の変異が見られる例では掌蹠角化や手指拘縮を生じる例があること、b)ケラチン10の変異例ではそれらが見られないこと、c)両ケラチンの2Bドメインに変異が見られる例の一部は環状皮疹を生じること、d)家系内においても臨床症状に差異があること、などを示した。

角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じるとTNF- α の産生が亢進、20Sプロテアソームの機能抑制があった。その結果、オートリン・パラクリン経路により角化細胞がアポトーシスにおちいることが示された。

BCIE4例において電顕的にコルネオデスマゾームの形態異常がみられた。また、コルネオデスマシン抗体の特異性をイムノブロット法により確認し、BCIE表皮における分泌障害を示唆する所見が得られた。すなわち、ケラチン線維の異常によって層板顆粒の分泌過程が2次的に障害されタンパク分解酵素の供給が不十分となり、角層細胞間の接着構造の分解過程が遅延すると推定された。

正常人およびBCIE患者の電子顕微鏡観察で患者角層においてcorneodesmosomeの細胞外領域の形態的異常が観察された。4)corneodesmosomeの細胞外部分に結合する蛋白、corneodesmosinの特異抗体を作成した。

以上から、約半数の患者において症状が永続的であり、また、原因遺伝子は明らかにされたもののその発症機序はもちろんその治療法さえもないのが現状であることから、その治療には根本的な遺伝子治療と遺伝子の異常から発症までの機序を明らかにしてその過程

を標的にした即効性、対症療法を開発する必要があると考えられる。

E. 評価

1) 達成度について

当初に上げた研究目的に対応した到達度をおよそのパーセントで評価した。

①天疱瘡：

自己抗体価測定法の開発(天疱瘡抗原ELISA法は完成し保険収録となった：到達度100%)とそれに基づいた治療指針の設定(全体として到達度50%)。

自己抗体産生機序・免疫寛容成立機序と抗体結合後の水疱形成機序の解明(天疱瘡抗原ノックアウトマウス、天疱瘡モデルマウス)(全体として到達度70%)。

この目的のために、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞より単離した抗体遺伝子cDNAよりH鎖、L鎖をタンデムにつないだ一本鎖抗体を作成し、反応特異性を検討する必要があるが、AK7 mAbよりB細胞トランスジェニックマウスを作成し、B細胞の運命を解析した(70%達成)。さらに病原性を持つAK23 mAbよりB細胞トランスジェニックマウスを作成中である(10%達成)。

研究結果に基づいた抗体減少を標的にした根本的(長期)治療と抗体結合後の水疱形成機序細胞内シグナル伝達ブロックを標的にした緊急対症療法の方の開発(全体として到達度30%)。

細胞内シグナル伝達ブロックを標的にした緊急対症療法の開発については、モノクローナル抗体を用いて抗体結合後にデスマゾーム構成分子Dsg3分子の消失を示し、水疱形成機序の解明に前進した(到達度60%)。作用機序からアプローチした治療法の開発のためにステロイドの作用点を解析した(到達度60%)したが、実際の作用点は不明であるので

全体的到達度は20%である。

病型診断の正確化と患者疫学（QOLを含む）の把握（到達度30%）。

②膿疱性乾癬：

疾患の診断・治療ガイドラインの臨床的評価と予後・QOL解析、特に小児型の診断と治療指針を作成（全体として到達度70%）。

しかし、QOL調査とともに進めている重症度/治療評価の臨床データ解析によって、重症度や治療経過の判定をもとにして、基準の鋭敏度や特異度を検討してガイドラインを再度見直す予定である（到達度10%）。

乾癬における「膿疱性」乾癬症例の位置付けを明らかにし、疫学的データの年次報告を行い、情報を提供（全体として到達度30%）。全国統一の改訂臨床個人票（新規、更新）によるデータベース構築（行政側到達度90%）を利用して本研究班との連携のもとに貴重なデータの有効利用による解析が必要である（到達度10%）。

膿疱性乾癬の病因を理解し、適切な治療法を選択するために、本疾患の膿疱形成機序を炎症反応の解析、特に好中球性炎症と表皮由来分子との連鎖の解明に寄って明らかにする（全体として到達度40%）。

しかし、上述の部分的（段階的）目的に対する到達度は40-50%であるものの、本質的な発症機序の解明については未だ不明であり全体としては到達度は10%でしかない。

ゲノムワイドな遺伝子相関解析により本疾患遺伝子解析を行う（全体として60-70%）。

かなり、標的遺伝子は絞られてきているので時期3年の間には期待できそうである。

患者支援ネットワークの設立（到達度40%）。岡山皮膚難病支援ネットワークを設立し、難病医療拠点のプロトタイプを形成した。

③表皮水疱症

出生診断法を確立する（到達度60%）。

表皮水疱症の患者の病変やDNAを採取す

る。免疫組織学的に水疱位置や基底膜抗原の発現状況、電顕的所見を観察し、ある程度病型を絞る。患者のDNA配列をしらべ遺伝子変異を同定し、genotype/phenotypeの解析をする（到達度60%）。

栄養障害型表皮水疱症の三次元培養皮膚を用いた治療法の改良を行う（到達度70%）。

三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターによる角化細胞へVII型コラーゲン遺伝子導入を行う（到達度30%）。

HVJエンベロープベクター成育マウスの皮膚組織への遺伝子導入効率を検討し、その効率を高めるため、様々なポリマーとの複合体形成やターゲティングベクターの開発を行う（到達度70%）。

全身の皮膚組織に遺伝子を導入し発現させるための技術的な課題を解決し皮膚を標的とした遺伝子治療の開発研究を行う。そのため超音波造影法とchemical peelingの併用による遺伝子導入を開発する（到達度50%）。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

平成14年度に患者数の把握、重症度判定、治療状況の把握、予後などにつき調査し、診断書・重症度判定基準を作成するために、全国一次調査を行い16年度までに三次調査を行う（到達度100%）。

新症例の集積と文献症例におけるケラチン遺伝子変異と臨床像の関係解析を行う（到達度70%）。

患者皮膚の免疫電顕観察によるケラチン遺伝子変異と臨床形成機序を解明する（到達度60%）。

非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症のモデルマウスにおける病態解明を行う（到達度0%）。

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症などのケラチン病の表皮角化細胞に見られるタンパク凝集塊の蓄積機序を解明する（到達度50%）。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

①天疱瘡：

我々が開発した天疱瘡抗原 ELISA 法は世界的にも用いられて、学術的国際的意義が極めて高い。

我々の天疱瘡モデルマウスは世界で始めてであり学術的にも国際的にも極めて有用である。

我々のモノクローナル抗体は世界で始めてであり学術的国際的に評価が高い。

AK7 mAb より B細胞トランスジェニックマウスを作成し、B細胞の運命を解析したが、病原性を持つ AK23 mAb より B細胞トランスジェニックマウスを作成中である。これらは極めて斬新的な学術的成果である。

抗体結合後の水疱形成機序細胞内シグナル伝達ブロックを標的にした緊急対症療法方の開発は世界的にも初めてである。

②膿疱性乾癬：

疾患の診断・治療ガイドラインの臨床的評価と予後・QOL 解析、特に小児型の診断と治療指針を作成は本疾患を理解するために必要であり社会的評価が極めて高い。

乾癬における「膿疱性」乾癬症例の位置付けを明らかにし、全国統一の改訂臨床個人票（新規、更新）によるデータベース構築して本研究班との連携のもとに貴重なデータを有効利用による解析する事は極めて社会的意義が高い。

膿疱性乾癬の病因を理解し、適切な治療法を選択するために、本疾患の膿疱形成機序を炎症反応の解析、特に好中球性炎症と表皮由来分子との連鎖の解明は国際誌にも発表されている。

ゲノムワイドな遺伝子相関解析により本疾患遺伝子解析は世界に先駆け進行中であり、解明されれば学術的国際的にも評価が高いと推察される。

患者支援ネットワークの設立は社会的ニーズが高く、岡山皮膚難病支援ネットワークを

設立し、難病医療拠点のプロトタイプを形成した結果は社会的、行政的に極めて高く評価されている。

③表皮水疱症

出生診断法を確立は学術的にレベルが高く、かつ社会的には極めてニーズが高い。

患者の DNA 配列をしらべ遺伝子変異を同定し、genotype/phenotype の解析結果は数多く国際誌に報告されレベルが高い。

栄養障害型表皮水疱症の三次元培養皮膚を用いた治療法は技術的にも高度であり、学術的にレベルが高く、また、患者ニーズも高い。三次元培養皮膚へのアデノウィルスベクターによる角化細胞へⅦ型コラーゲン遺伝子導入は学術的に高度であり、国際的にも初めての試みである。

HVJ エンベロープベクター成育マウスの皮膚組織への遺伝子導入効率を検討し、その効率を高めるため、様々なポリマーとの複合体形成やターゲティングベクターの開発は国際的に極めてレベルが高く、数多くの国際誌に報告されている。

全身の皮膚組織に遺伝子を導入し発現させるための技術的な課題を解決し皮膚を標的とした遺伝子治療の開発研究を行う。そのため超音波造影法と chemical peeling の併用による遺伝子導入を開発は極めて独創的であり、完成すれば国際的にインパクトが高い。

④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

平成14年度に患者数の把握、重症度判定、治療状況の把握、予後などにつき調査し、診断書・重症度判定基準を作成するために、全国一次調査を行い16年度までに三次調査を行いまとめたがこの結果は本疾患について始めて本邦における患者実体を明らかにして、社会的、学術的評価が極めて高い。

新症例の集積と文献症例におけるケラチン遺伝子変異と臨床像の関係解析結果は多くの国際誌に報告され、学術的国際的に評価が高

い。

患者皮膚の免疫電顕観察によるケラチン遺伝子変異と臨床形成機序を解明および水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症などのケラチン病の表皮角化細胞に見られるタンパク凝集塊の蓄積機序とその病態、細胞生物学的意義については数多くの国際誌に報告されている。

3) 今後の展望について

①天疱瘡では自己抗体の標的抗原の同定とそれを利用した抗体測定法は開発されたが、基本的治療法は無く、免疫抑制剤、ステロイドの全身投与による対症療法が主体で、なかには難治性で死に至る例も未だある。従って、さらに研究が必要である。一方、遺伝子解析からその欠損モデルマウス、これを利用した天疱瘡モデルマウス、病原性モノクローナル抗体の作成ができ、特的抗体産生機序の抑制法の開発、即効的対症療法の開発の可能性が極めて高い状態にある。

②膿疱性乾癬では最新の診断と治療指針を確立する必要がある。一方、発症機序の解明が現在も全く不明であり、根本的治療を解決するには発症機序を細胞・組織・人体レベルで明らかにしかつ遺伝子レベル（ゲノムワイドプロジェクト）で解明する必要がある。

③表皮水疱症および④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症では原因遺伝子は解明されているが、genotype/phenotype の関係と遺伝子異常とためにこれを明らかにする必要がある。一方、遺伝子臨床発症機序の関連が全く不明であり、効果的対症療法を開発する治療が必須であるが、かなり実現可能な研究成果が得られており、数年以内に動物モデルで可能になり、一部、トランジェントな遺伝子治療も患者で適用可能になるであろう。

4) 研究内容の効率性について

班員を9名に絞り、それぞれの班員に研究協力者を1～2名参加をお願いし、研究費を可及的に多く配分できるようにした。研究発

表は班員9名によるもののみを上げているが、国際的トップジャーナルに多くの発表がなされ、学術的に効率性が高い。また、疫学にも本研究班が長期間継続されているので効率的に協力が得られている。一方、9人の研究班員で4疾患の調査研究を行っているが、この4疾患は病態研究、治療法、遺伝子解析と遺伝子治療において互いに関係があり、少しずつ領域が違う研究者が一同に会して研究発表と情報交換を行っていることは効率性が極めて高い。

F. 結論

①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症、④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の4疾患についての診断基準の見直し、それに基づく疫学的研究による患者数と治療状態の実体の把握を行った。発症分子病態の解明、原因遺伝子の解析と臨床表現型との相関、原因遺伝子から発症までの機序、これらによるEBMに基づく治療法の開発という大きな目的に対して、上述した結果から本研究の段階的目的である3年計画の目標は70～80%は達せられたと考える。しかしながら、病因抗体や病因遺伝子が解明されたが、この過程からさらに新たな問題が提起され、発症機序は解決できていないこと、また、いずれのこれら稀少難治性皮膚疾患に関しても満足すべき根本的治療は未だ確立していないことから、この研究班の存続の必要性は極めて高い。一方、膿疱性乾癬では、病因も不明であり特異的治療法も開発されていない。今後、稀少難治性皮膚疾患の病態解明と治療成績等の向上を図り、患者の医療、福祉改善に寄与するためには本研究班の継続が必要であると考えます。

G. 研究発表

学会発表（国内）

1. 北島康雄：尋常性天疱瘡の棘融解は抗体

- 結合後どのようにしておきるか. 第 103 回日本皮膚科学会総会 (特別講演) 2004. 4.16. 京都
2. 北島康雄: 難病対策について. 日本臨床皮膚科学会中国四国地方会 (特別講演) 2003.7.27. 岡山
 3. 北島康雄: 天疱瘡の水疱形成期所と治療法の実際. 日本皮膚科学会大阪地方会 (特別講演) 2003.9.6. 和歌山
 4. 北島康雄: 角化過程におけるケラチノサイトの上方移行と細胞間接着制御とその異常. 第17回角化症研究会 2002.8.24. 東京
 5. 北島康雄: 私達の研究紹介: 皮膚科における Physician-scientist として. 第53回日本皮膚科学会中部支部総会 (会長講演) 2002.9.15. 岐阜
 6. 橋本 隆: 自己免疫性水疱症、最近の進歩. 第 102 回日本皮膚科学会総会 (教育講演) 2003.5.23. 浦安
 7. 岩月啓氏: Epstein-Barr ウイルスと皮膚のリンパ腫: 第 103 回日本皮膚科学会総会 (教育講演) 2004.4.16. 京都
 8. 岩月啓氏: EB ウイルスと発癌: 臨床的アプローチ. 第101回日本皮膚科学会総会 2002.6.9. 熊本
 9. 金田安史: 遺伝子治療の現状と将来展望. 第 102 回日本皮膚科学会総会 (教育講演) 2003.5.23. 浦安
 10. 橋本公二: DIHS. 第103回日本皮膚科学会総会 (教育講演) 2004.4.16. 京都
 11. 橋本公二: AD に合併する頸部色素沈着に対するタクロリムス軟膏の効果. 第 101 回日本皮膚科学会総会 2002.6.9. 熊本
 12. 天谷雅行: 表皮細胞接着と水疱症. 第 103 回日本皮膚科学会総会 2004.4.16. 京都
 13. 天谷雅行: デスモグレインを標的とする疾患, 天疱瘡とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群. 第 102 回日本皮膚科学会総会 2003.5.23. 浦安
 14. 天谷雅行: 皮膚科領域の translational research の展開, 天疱瘡, 分子から疾患へ. 第55回日本皮膚科学会西部支部総会 2003.10.25. 松山
 15. 池田志孝: 天疱瘡: 第 102 回日本皮膚科学会総会 2003.5.23. 浦安
 16. 池田志孝: ポストゲノムの夢を語る「水疱症」第66回日本皮膚科学会東京支部総会 2003.2.15. 東京
 17. 山本明美: 角化過程の理解と角化異常症、最近の到達点: 第 103 回日本皮膚科学会総会 2004.4.16. 京都
 18. 山本明美: ロリクリン異常症. 第 289 回日本皮膚科学会長崎地方会 (特別講演) 2003.4.13. 長崎
- 学会発表 (海外)
1. Kitajima Y: Relationship between dermatology and industry. The 20th World congress of dermatology, July.1-5. 2002 Paris, France.
 2. Tosaki H, Kim SC, Gu LH, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y. A norbel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema is due to elongated tail domain of keratin 5. 64rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, April 30-May 4, 2003
 3. Esaki C, Ichiki Y, Sato-Nagai M, Izumi T, Takagi H, Kitajima Y. Suppressive therapies for the abrupt rise in desmoglein auto-antibodies after plasmapheresis in 3 patients with pemphigus vulgaris. Australian Academy of Dermatology and Japanese Dermatology Association Joint

- Meeting. Ayers Rock Australia, Sep 18-21, 2003
4. Takagi H, Esaki C, Izumi T, Ichiki Y, Kitajima Y. An usual case of bullous pemphigoid associated with anti bodies to BP180, desmoglein1, desmoglein 3 and IgA to basement membrane Zone. Australian Academy of Dermatology and Japanese Dermatology Association Joint Meeting. Ayers Rock Australia, Sep 18-21, 2003
 5. Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K. PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 6. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M. In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 7. Hashimoto K. Drug induced hypersensitivity syndrome (DHIS). The 13th Korea Japan Joint meeting of Dermatology, Daejeon, Oct, 2003, Korea.
 8. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hashimoto K. Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 9. A Ishida-Yamamoto, S Yoshida, TJ O'Brien, G Serre, M Simon, H Iizuka. Lamellar granule proteins are sequentially synthesized and transported through the trans-Golgi network in keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003 2003.4.30-5.4, Miami Beach, Florida USA
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
- 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）
- 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）
- 所望の機能的性質を有する核酸の単離方法及びそのためのキット（発明者：金田安史、西川智之）（出願人：金田安史、西川智之、ジェノメディア株式会社）2003年11月20日出願 PCT/JP03/14857

別添資料 1

難治性疾患克服研究事業 稀少難治性皮膚疾患調査研究班

班員構成

	(研究実施場所)	職名	主な研究分担	
主任研究者	北島康雄	岐阜大学大学院医学研究科 病態新機序学講座 皮膚病態学分野	教授	天疱瘡、角化症、総括
分担研究者	藤本 陸	久留米大学医学部 皮膚科	教授	天疱瘡（診断、発症機序と治療）
	天谷雅行	慶徳義塾大学医学部 皮膚科	専任講師	天疱瘡（発症機序と治療）
	岩月徳氏	岡山大学大学院医学歯学 総合研究科 皮膚科	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
	清水 宏	北海道大学大学院医学 研究科皮膚科皮膚病学分野	教授	先天性表皮水疱症 （遺伝子診断）
	藤本公二	愛媛大学医学部 皮膚科	教授	先天性表皮水疱症 （再生医療治療）
	金田安史	大阪大学医学系研究科分子 治療学遺伝子治療学	教授	難治性皮膚疾患の遺伝子治療
	池田志季	順天堂大学医学部 皮膚科	教授	先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症、 天疱瘡（発症機序と診断）
	山本美英	旭川医科大学 皮膚科	講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、角化症 （診断と発症機序）
研究協力者	本間 好	福島県立医科大学 生体情報伝達研究所	教授	膿疱性乾癬（発症機序）
	小澤 明	生体物質研究部門 東海大学医学部 皮膚科	教授	膿疱性乾癬（病因遺伝子と治療）
	照井 正 小宮 眞真	日本大学医学部皮膚科	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
		東京大学医学部皮膚科	講師	膿疱性乾癬（発症機序）、先天性 魚鱗癬様紅皮症
	黒沢美智子	順天堂大学医学部 産生学	助手	天疱瘡、先天性表皮水疱症、先天性 魚鱗癬様紅皮症（統計学、疫学）
	新聞克徳	奈良県立医科大学 皮膚科	講師	天疱瘡（病因遺伝子と治療）
	玉井克人	大阪大学医学系研究科分子 治療学遺伝子治療学	助教	先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様 紅皮症（遺伝子治療）
	米田雄造	香川大学医学部皮膚科	講師	ケラチン病の病態
	市京 眞部	岐阜大学大学院医学研究科 病態新機序学講座 皮膚病態学分野	助教	先天性表皮水疱症（ケラチン病） 天疱瘡（治療）

当研究班分科会の対象疾患

特定疾患 ①天疱瘡、②膿疱性乾癬、
③表皮水疱症
非特定疾患 ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

研究目的

- ①天疱瘡
 - 自己抗体価測定法の天疱瘡抗原ELISA法とそれに基づいた治療指針の設定
 - 自己抗体産生機序・免疫寛容成立機序と抗体結合後の水疱形成機序の解明(天疱瘡モデル)
- ②膿疱性乾癬
 - 全国調査疫学と診断・治療ガイドラインの臨床的評価と予後・QOL解析、特に小児型
 - 膿疱形成機序、炎症反応様態の解明
 - ゲノムワイド遺伝子相関解析・遺伝子解析
- ③表皮水疱症
 - 出生前診断法の確立。
 - Genotype/phenotypeの解明と治療法開発
 - 三次元自家培養皮膚遺伝子導入表皮再生医療法の開発。遺伝子の修復、補填・遺伝子導入法
- ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症
 - 患者数の把握、重症度判定、治療状況の把握、予後などにつき疫学調査。
 - Genotype/phenotypeの解明と治療法開発

①天疱瘡は抗自己表皮細胞接着分子抗体のため全身に水疱ができ、非常に悲惨で、極めて治療抵抗性難治性の患者群がある疾患である。自己抗体抗原分子の解明されたが、抗体発生の原因、水疱形成機序は不明である。基礎研究成果を踏まえ治療法指針を開発する必要がある。

②膿疱性乾癬は、発熱と全身の無菌性膿疱を特徴とする重症かつ希な再発性の疾患である。詳細なQOLを含む疫学と診断・治療指針の作成と病因、発症機序の解明が必要である。

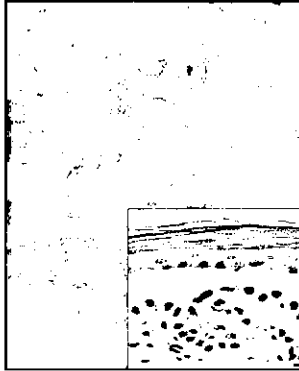
③表皮水疱症と④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症は、前者重症例では全身の水疱と癬痕のために合指、四肢の運動制限を来し、後者は生下時から発症し全身の角質層の強度な肥厚と剥奪のため悲惨な外観となり極めてQOLの悲惨な状態になる。両者とも病因遺伝子の変異点は明らかであるが、臨床形成機序は不明である。遺伝子治療法と再生医学治療法の開発が必要。後者は疫学も未だ行われていない。

別添資料 2

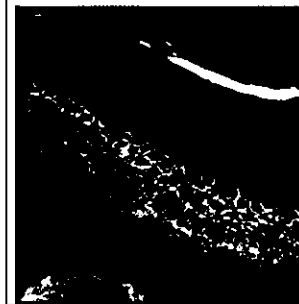
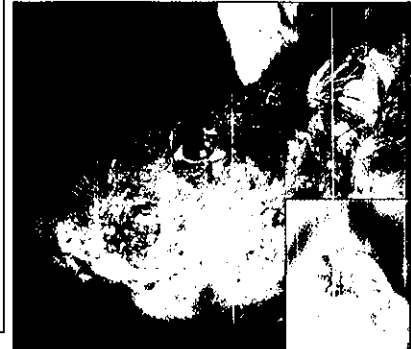
天疱瘡モデルマウスの開発及び病態解明と治療への展開

1. 尋常性天疱瘡抗原であるデスマグレイン3 (Dsg3)を欠損したDsg3^{-/-}マウスの脾細胞を、Dsg3を発現するRag2^{-/-}マウスに移植することにより、持続的にDsg3に対するIgG抗体を産生する天疱瘡モデルマウスを作成。
2. 天疱瘡モデルマウスより、水疱形成を誘導するモノクローナル抗体を単離し、水疱形成の分子機構解明に貢献。
3. 単離されたモノクローナル抗体cDNAより、Dsg3特異的B細胞トランスジェニックマウスを作成し、末梢自己抗原に対するB細胞トレランスのメカニズム解明を目指している。
4. 天疱瘡モデルマウスを用いて、抗CD40L抗体等種々の免疫抑制療法の効果を評価する系を確立。

尋常性天疱瘡臨床



天疱瘡モデルマウス



(難治性疾患克服研究事業)

1. ナイーブなDsg3^{-/-}マウスの脾細胞を自己抗原で免疫することなしに移植することで天疱瘡モデルマウスが作成し、新しい自己免疫モデルマウスの作成法を示した。さらに、この天疱瘡モデルマウスは、6ヶ月以上にもわたり安定した病的抗体産生が認められるため、種々の免疫抑制療法の評価系として有用であることが示された。

2. Dsg3反応性B細胞は、除去、不活化も受けずに末梢リンパ組織に存在することが明らかにされ、除去あるいは不活化による免疫寛容からエスケープしていることが示唆された。また、末梢抗原であるDsg3に反応性を持つB細胞は、トレランスにより除去も不活化も受けずに存在することが明らかにされ、B細胞トレランスに新しい局面を開いた。

3. 病原性のあるモノクローナル抗体AK23を作成し、これがDsg3分子の接着面を認識すること、病原性を示さないmAbは接着面以外の部位を認識することを示した。

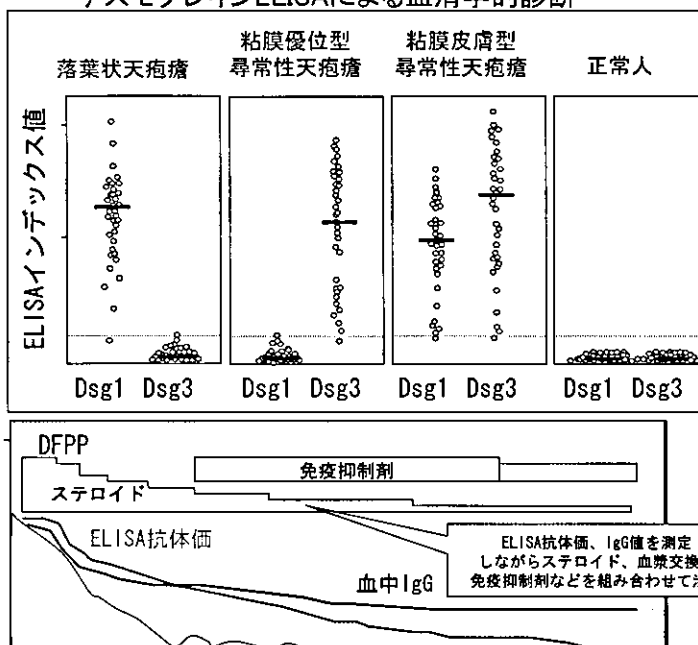
- 以上は天疱瘡のみならず広く自己免疫性疾患の本質的研究に貢献する。

別添資料 3

天疱瘡血清学的診断薬としてデスマグレインELISA法の開発

1. パキウイルス発現系を用いて、正しい3次元構造を有するデスマグレイン(Dsg)組換え蛋白を作成。
2. 組換えDsg1, Dsg3を抗原としたELISAを構築し、特異度、感度共に97%以上の天疱瘡に対する血清学的診断薬を開発。
3. ELISAにより得られる抗体価が病勢と平行して推移することから、病勢のモニタリングとしても有用。
4. 平成15年7月より保険収載される。
5. 日本のみならず、アメリカ、ヨーロッパの先進国をはじめ、世界中で診断薬として使用されている。
6. Dsg1・Dsg3—ELISAに基づいた標準的治療指針の設定が可能となり班会議で行う必要がある。

デスマグレインELISAによる血清学的診断



臨床症状に加えて抗体価をモニタリングすることでより効率的かつ副作用の少ない治療が可能になった。

(難治性疾患克服研究事業)

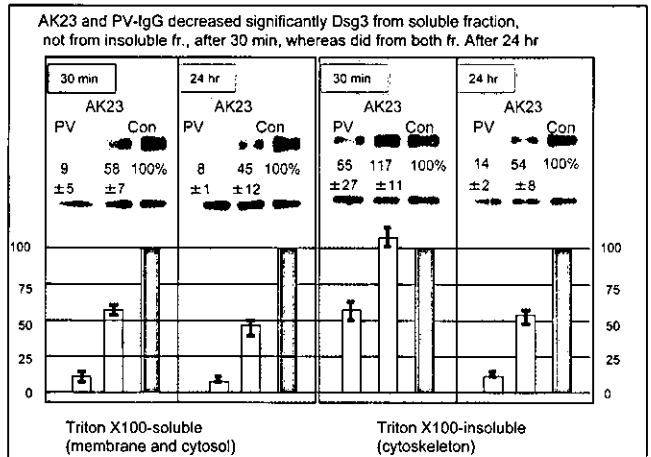
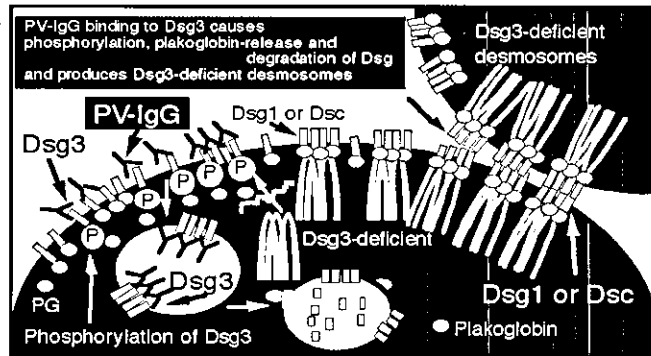
1. リコンビナントDsg3—ELISA法を確立し、保険適用化した。
2. これによる抗体価を指標として、免疫グロブリン大量療法が血漿交換療法後の抗体価上昇を抑制することを示した。また、抗体価の上昇がみられたら、抗体価の安定を確認するまで治療の減量を行わず、上昇傾向が続く場合は少量のステロイドや免疫抑制剤を追加することが症状再発の回避に導くと考えられた。
 - リコンビナントDsg3—ELISA法を指標にした治療指針の設定が必要である。

別添資料 4

標的抗原(デスモグレイン3)への 天疱瘡抗体結合後の 水疱形成機序の解明

1. 我々は、尋常性天疱瘡抗原であるデスモグレイン3 (Dsg3) に天疱瘡抗体 (PV-IgG) が結合すると細胞内にシグナル伝達が惹起されDsg3のリン酸化とプラコグロビンの乖離、Dsg3の分解が誘導され、その結果、Dsg3の枯渇したデスモソームが形成されることを示した (上図)。これは、Dsg3ノックアウトマウスが天疱瘡病態を呈することから発症機序の重要な過程の一つである。
2. さらに、病原性モノクローナル抗Dsg3抗体 (AK23) も、同様にDsg3を細胞膜およびデスモソームから枯渇させることを示した (下図)。
3. これらの細胞内シグナル伝達を阻害し、Dsg3枯渇過程を阻害する即効性治療薬の開発に貢献すると考えられる。

(難治性疾患克服研究事業)



1. 我々は先に天疱瘡抗体が細胞膜表面上のデスモグレイン3 (Dsg3) に結合するとカルシウムの細胞内流入、プロテインキナーゼCの活性化などのシグナル伝達、これとは別に、デスモグレイン3の20分以内のリン酸化とプラコグロビン・ケラチンからの乖離と分解が生じ30分で細胞膜プールから消失し、24時間ではデスモソームから消失することを培養細胞系で示してきた。

2. 過去3年間ではこれの確認と、天疱瘡病原性Dsg3モノクローナル抗体によっても同様な反応が生じることを示した。

・ 今後はこの反応が *in vivo* マウスでも起きるか、さらにこの反応系 (シグナル伝達) をブロックしたら治療効果がでるか等研究し、治療法の開発の糸口を見つける。