

2005 00880 A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成18（2006）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(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)、 薬剤性過敏症症候群(DIHS)の診断基準 2005 の作成 橋本公二 ……	7
マウス胎仔循環系への骨髄移植による免疫寛容誘導法開発 玉井克人 ……	16
ヒト表皮角化細胞 side population 特異的遺伝子発現に 関する研究 岡野栄之 ……	19
Stevens-Johnson 症候群と drug-induced hypersensitivity syndrome 発症における免疫学的背景の比較検討 塩原哲夫 ……	28
Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) の治療 —ステロイドパルス療法と少量免疫グロブリン静注療法の併用療法— 飯島正文 ……	32
重症薬疹患者登録カード（2005 年版）作成の試み 池澤善郎 ……	41
Stevens-Johnson 症候群(SJS)および中毒性表皮壊死症(TEN)における 眼合併症の解析 木下 茂 ……	50
小児 Stevens-Johnson 症候群とマイコプラズマ感染症との 関連についての検討 相原雄幸 ……	54
皮膚付属器を有する培養皮膚の作製 岸本治郎 ……	57
羊膜を用いた新しい三次元培養皮膚の開発に関する研究 白方裕司 ……	64
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	69
IV. 研究成果印刷物（代表論文のみ） ……	87

# I. 総括研究報告

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、薬剤性過敏症候群の診断基準 2005 を作成した。また重症多形滲出性紅斑、中毒性表皮壊死症に対する画期的治療法開発の基礎として、ステロイドパルス療法と少量免疫グロブリン療法について検討したところ、免疫グロブリンは大量でないとも効果がないことが明らかとなった。表皮水疱症に対する遺伝子治療の基礎研究のために、導入された遺伝子産物に対する免疫寛容誘導法を開発した。培養皮膚に関しては新しい三次元皮膚を開発し、毛包誘導能を有する毛乳頭細胞の低血清培養法を開発した。表皮幹細胞については特異的に発現している遺伝子について検索した。

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）、木下 茂（京都府立医科大学眼科教授）、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 準教授）、岸本治郎（資生堂ライフサイエンスセンター主任研究員） 白方裕司（愛媛大学医学部皮膚科講師）

#### 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。

#### 栄養障害型先天性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。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、瘢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 $\gamma$ 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 $\beta$ 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。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。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16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）の合併症としての瘢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 2005 を作成した。さらに治療指針を作成するにあたって、まず重症度判定を行う必要があるため、重症

度をスコア化する方法で重症度判定案を作成した。遺伝性皮膚疾患に対する有効かつ安全な遺伝子治療法を確立するためには、治療用遺伝子産物に対する拒絶免疫反応を回避しつつ、治療用遺伝子を長期安定的に目的組織で発現させる必要がある。分担研究者の玉井は、マウス胎仔循環系への骨髄細胞移植により、出生後のマウスにおける外来性遺伝子（GFP 遺伝子）に対する免疫寛容を誘導し、GFP 発現皮膚移植片に対する拒絶反応を回避できることを確認した。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）における遺伝子発現について検討した。ヒト角化細胞を培養し、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。それぞれの分画から mRNA を抽出し、PCR にて増幅した後、micro array 解析を行った。SP 分画でより強く発現している遺伝子は約 100 個、逆に減少している遺伝子は約 200 個が認められた。分担研究者の塩原は、同じ薬剤でもたらされる Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) の発症時における免疫学的、ウイルス学的な背景を解析した。両疾患では発症に至るまでの薬剤内服日数が相違し、発症時の CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞数、免疫グロブリン値でも著明な相違が認められた。また、発症時の抗 herpes simplex virus IgG 抗体価においても有意な差が検出された。個体における薬剤に対する免疫学的な modulation の感受性の相違やウイルス再活性化状況などの相違が SJS、DIHS という異なった病態の発症に反映している可能性を明らかにした。分担研究者の池澤は、重症薬疹の疫学的調査の必要性について検討した。これまで本邦における重症薬疹患者の疫学的調査は、各施設からの症例報告に記載されたデータに基づいて行われてきた。しかしながら、その診断に至った経緯や臨

床症状、検査値などの記載内容は必ずしも十分とは言えず、これらを用いた詳細な疫学的解析は難しいのが現状であった。そこで、重症薬疹の疫学的調査のために各施設で共通して使用することを目的としたケースカードの作成を試みた。現時点では解析に必要な内容を可能な限り網羅するものを作成し、さらに今後はより簡便な、現実的に使用に耐えうるものを作成する必要性を示した。分担研究者の飯島は、重症多型浸出性紅斑として入院した症例と経過中にTENに移行した症例も含めて、ステロイドパルス療法（メチルプレドニゾロン 1,000 mg / 日：パルス療法）と少量免疫グロブリン静注療法（5 g / 日：少量 IVIG 療法）の併用療法を行った症例について文献的考察もふまえて解析を行った。その結果、高熱はすみやかに解熱するが、皮疹の進行を抑える臨床的効果は認められなかった。免疫グロブリン療法の用量は、5 g / 日では不十分で、少なくとも10g / 日、重症例では20g / 日以上が必要と考えられた。この治験により画期的治療法、治療指針案が作成できるものと考えた。分担研究者の木下は、重症多型浸出性紅斑とTENにおける眼障害の実態を把握することを目的として、多数例を対象として瘢痕期の視力に影響を及ぼす因子を解析した。その結果、輪部上皮の残存程度、角膜上皮障害、上皮欠損、血管侵入、角膜混濁、角化が瘢痕期の視力に影響しており、急性期に輪部上皮の消失を抑制することが重要であることが明らかとなった。これらの結果を基に、SJS/TENの診断基準（2005）とSJS/TEN重症度スコア判定に眼科的所見が追加され診断基準2005が充実したものとなった。分担研究者の相原は、本邦における重症薬疹患者、特にStevens-Johnson症候群の疫学調査を各施設からの症例報告に基づいて行ない、その結果、1981年から2004年までに小児123症例、成人208症例の論文報告を詳細に検討した。その中で、原因として薬剤につい

て頻度の高い感染症であるマイコプラズマ感染症の関与について検討を行った。その結果、*M.pneumoniae* 感染に伴うSJS症例の検討から、その特徴として若年者に多く、薬剤など他の原因によるSJSに比較して後遺症の頻度や死亡率が低いことなどが明らかになった。また、SJSは*M.pneumoniae*の直接侵襲によるものか否かは結論づけられていないことが明らかとなり、今後の課題であると思われた。さらに、*M.pneumoniae* 感染症では抗菌薬などを比較的長期間内服するため、感作が成立しやすく、薬剤に対する過剰な免疫反応が惹起されSJS発症に関与している可能性も推察された。分担研究者の岸本は、上皮と真皮の相互作用に着眼点をおいた、細胞移植による毛包を始めとする皮膚付属器官の再生を目指した基盤研究を進め、ヒト毛乳頭細胞の培養法の培地の検討を行い、低血清の線維芽細胞培養用培地 modified alpha MEM 培地は DMEM 培地と比べ、1/10 量の血清で同等の増殖能を維持することができ、さらに同条件では有意に増殖速度を促進することを見出した。この効果は modified alpha MEM 培地に含まれる EGF に特に強く依存していることが判った。これらの結果から、ヒト毛乳頭細胞の効率的培養に modified alpha MEM 培地が利用可能であることを示した。分担研究者の白方は、三次元培養皮膚を改良し、基底膜を有する新しい三次元培養皮膚作成法を開発した。この三次元培養皮膚は表皮水疱症に対する蛋白補充療法の上をゆく、いわゆる組織補充療法としての可能性を示唆している。

#### 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2005を作成した。特に、眼科所見を詳細に検討することにより充実した診断基準が作成できたとかがえ

る。この診断基準 2005 を用いた診断における感度、特異性の検討が今後の課題であり、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、同じ薬剤でもたらされる Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) の発症時における免疫学的、ウイルス学的な背景が明かとなった。両疾患では発症に至るまでの薬剤内服日数が相違し、発症時の CD3+, CD8+T 細胞数、免疫グロブリン値でも著明な相違が認められた。また、発症時の抗 herpes simplex virus IgG 抗体価においても有意な差が検出された。個体における薬剤に対する免疫学的な modulation の感受性の相違やウイルス再活性化状況などの相違が SJS、DIHS という異なった病態の発症に反映している可能性が示唆され、これら免疫状態の正確な把握により診断が早期に下されることが思われる。また、変調した免疫状態を是正することにより、両疾患を速やかに治療できうる可能性を示唆している。重症多形滲出性紅斑の疫学についてはこれまでに十分な検討がなされていなかった。それは、患者の登録、把握が十分にできていないことによる。すなわち、ケースカードを用いることにより漏れのないデータの集積が可能となることが予想される。今回作成したケースカード案を次年度以降積極的に利用することにより、疫学研究、QOL 調査などが比較的簡単に行えると思われる。まずは分担研究者の施設で試験的に利用し、適宜改正していくことが重要とおもわれる。治療指針の確立、画期的治療法の開発が最終の目的であるが、重症多形浸出性紅斑においては免疫グロブリン療法が期待されている。その用量については国内外で意見の相異がみられるものの、少量のグロブリンでは病態を押さえ

れないことが判明した。この結果は、大量免疫グロブリン療法の重要性を指示する結果となり、次年度以降その用量についての検討の必要性を含んでいる。研究に関しても多くの知見が得られた。マウス胎仔循環系への骨髄細胞移植により、出生後のマウスにおける外来性遺伝子 (GFP 遺伝子) に対する免疫寛容を誘導し、GFP 発現皮膚移植片に対する拒絶反応を回避できることを確認できたことは、今後の遺伝子治療にとって大きな収穫であった。この結果は皮膚疾患のみならず、ほかの遺伝性疾患にも応用可能で有る点において、重要な結果であると思われる。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、SP 細胞の性質を把握するために特異的に発現している遺伝子が判明した。この結果を基に、いかに幹細胞を効率的に培養、維持できるかの検討が今後必要である。毛包の再生についても基礎的な成果が得られた。毛乳頭細胞が毛包誘導に重要であることは前年度までに明らかにしていたが、効率的に培養、増殖させることが困難であった。これは培養法に関する改良に力をそそいでいなかったことに起因する。今回の検討により、毛乳頭細胞を効率よく増殖培養できる培養液を開発できた。この結果は、今後の実験、研究の発展に大きな影響を与えると思われる。効率よく増殖した毛乳頭細胞が実際に毛包誘導能を維持しているかの検討が次年度以降の課題である。培養皮膚移植については地道に開発改良に取り組んでいたが、本年度開発した羊膜併用三次元皮膚は最も正常皮膚に近い培養皮膚



であると思われる。次年度以降に臨床応用を行い、有用性の検討をはかることがひつようである。

#### **E. 結論**

本研究により重症多形滲出性紅斑診断基準2005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、生着性にすぐれた新たな三次元培養皮膚を開発した。表皮幹細胞の性質を明らかにし、さらには遺伝子治療のための免疫寛容誘導法を開発した。

新たな三次元培養皮膚を開発し、付属器を有する培養皮膚のための毛乳頭細胞の効率のよい培養法を開発した。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表（平成17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2件
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

重症多形滲出性紅斑(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)、薬剤性過敏症症候群(DIHS)  
の診断基準 2005 の作成

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 2004 をもとに、合致しない症例、まれな症例、典型例などの詳細を検討し、さらに眼科的所見を追加することにより診断基準 2005 を作成した。

**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 2004 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。また、眼科所見の重要性が明らかとなったため、診断基準案の見直しを行い診断基準 2005 を作成することを目的とした。

**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 2005 を改訂する。また、眼科的所見を追加することにより、より充実した診断基準を作成した。

**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 を見直し、診断基準 2005 を作成した。診断基準 2005 を用いた診断における感度、特異性の検討が今後の課題であり、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。

**E. 結論**

本研究により重症多形滲出性紅斑診断基準2005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17年度）

論文発表

1. Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. J Dermatol Sci in press
2. Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, Tennenbaum T.: The role of protein kinase C {delta} activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. J Cell Sci. in press
3. Yoshida, T. Hamada, M. Amagai, K. Hashimoto, R. Uehara, K. Yamaguchi, K. Imamura, E. Okamoto, S. Yasumoto, T. Hashimoto: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. J Dermatol Sci. 41:21-30, 2006
4. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, Sugai M: Innate defences against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection. J Pathol. 208:249-60, 2006
5. 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
6. 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 124:939-46, 2005
7. 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. 152:1391-2, 2005

- immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:505-11, 2005
8. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, and Hashimoto K: Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118: 2363-2370, 2005
  9. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of  $\beta$ -defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immun* 35:1886-1895, 2005
  10. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 40:105-114, 2005
  11. Tohyama M, Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Nagai H, Takashima A, Hashimoto K: dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:505-11, 2005
  12. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K: Induction of keratinocyte migration via transactivation of the EGF receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* 175:4662-8, 2005
  13. Sekiguchi A, Kashiwagi T, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Hashimoto Y, Kimura H, Tohyama M, Hashimoto K, Iizuka H.: Drug-induced hypersensitivity syndrome due to mexiletine associated with human herpes virus 6 and cytomegalovirus reactivation. *J Dermatol* 32:278-81, 2005
  14. Shushakova N, Tkachuk N, Dangers M, Tkachuk S, Park JK, Zwirner J, Hashimoto K, Haller H, Dumler I: Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor. *J Cell Sci.* 118:2743-53, 2005

15. Gu F, Hata R, Ma YJ, Tanaka J, Mitsuda N, Kumon Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nakajima K, Sakanaka M: Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *J Neurosci Res.* 81:163-71, 2005
16. Komine M, Kakinuma T, Kagami S, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K: Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J Invest Dermatol.* 125:491-8, 2005
17. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M.: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 55:888-96, 2005
2. K. Sayama, S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, M. Tohyama, H. Komatsuzawa, S. Higashiyama, M. Sugai, and K. Hashimoto: The innate antimicrobial peptide LL-37 induces keratinocyte migration via HB-EGF-mediated transactivation of EGF Receptor and STAT3 phosphorylation. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
3. X. Dai, K. Sayama, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, M. Tohyama, Y. Yahata, S. Tokumaru, and K. Hashimoto: STAT5a-PPAR $\gamma$  is a novel differentiation-regulating pathway in human keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
4. Y. Hanakawa, M. Amagai, K. Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, M. Tohyama, K. Sayama, and K. Hashimoto Differential effects of dominant negative mutants of desmocollin 3a and 3b on cell-cell adhesion of keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.

学会発表

1. Y. Yahata, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, T. Mochizuki, S. Hirakawa and K. Hashimoto: The MyD88-dependent signaling pathway of the *Sporothrix schenckii* antigen-induced TLR2 natural immune response in HDMEC. 35<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting. Sep 22, 2005, Tubingen, Germany.

5. S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, K.Kameda, K. Sayama, and K. Hashimoto: Endothelin-induced keratinocyte migration requires Arc activation and EGFR transactivation via the ETB receptor. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  6. J. Kishimoto, Y. Ishimatsu-Tsuji, R. Ehama, T. Soma, S. Suzuki, Y. Shirakata and K. Hashimoto: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  7. M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Y. Hanakawa, X. Dai, Y. Yahata, S. Tokumaru, H. Komatsuzawa, M. Sugai and K. Hashimoto: CCL16, a member of ELR-CXC chemokine, is an endogenous antimicrobial agent derived from keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
  8. Y. Shirakata and K. Hashimoto: Successful treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous cultured skin. 7<sup>th</sup> Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, June 4<sup>th</sup>, 2005, Dresden, Germany.
- 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 2005

### 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. 角膜上皮障害と偽膜形成のどちらかあるいは両方を伴う両眼性の非特異的結膜炎。
6. 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。



## Toxic epidermal necrolysis (TEN) 診断基準 2005 中毒性表皮壊死症

### 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。眼症状は、角膜上皮障害と偽膜形成のどちらかあるいは両方を伴う両眼性の非特異的結膜炎。
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。

## Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) 診断基準 2005 薬剤性過敏症症候群

### 概念

高熱と臓器障害を伴う薬疹で、薬剤中止後も遷延化する。多くの場合、発症後 2 から 3 週間後に HHV-6 の再活性化を生じる。

### 主要所見

- 1) 限られた薬剤投与後に遅発性に生じ、急速に拡大する紅斑。  
しばしば紅皮症に移行する。
- 2) 原因薬剤中止後も 2 週間以上遷延する
- 3) 38 度以上の発熱
- 4) 肝機能障害
- 5) 血液学的異常：a, b, c のうち一つ以上
  - a. 白血球増多 ( $11000/\text{mm}^3$  以上)
  - b. 異型リンパ球の出現 (5 % 以上)
  - c. 好酸球増多 ( $1500/\text{mm}^3$  以上)
- 6) リンパ節腫脹
- 7) HHV-6 の再活性化

典型 DIHS : 1-7 全て

非典型 DIHS : 1-5 全て、ただし 4 に関しては、その他の重篤な臓器障害をもって代えることができる。

### 参考所見

1. 原因薬剤は、抗けいれん剤、ジアフェニルスルフォン、サラゾスルファピリジン、アロプリノール、ミノサイクリン、メキシレチンであることが多く、発症までの内服期間は 2 週から 6 週間が多い。
2. 皮疹は、初期には紅斑丘疹型、多形紅斑型で、後にしばしば紅皮症に移行する。顔面の浮腫・紅斑、口囲の紅色丘疹、膿疱、小水疱、鱗屑は特徴的である。粘膜には発赤、点状紫斑、軽度のびら

- んがみられることがある。
3. 臨床症状の再燃がしばしばみられる。
  4. HHV-6 の再活性化は、①ペア血清で HHV-6IgG 抗体価が 4 倍（2 管）以上の上昇、②血清（血漿）中の HHV-6DNA の検出、③末梢血単核球あるいは全血中の明らかな HHV-6DNA の増加のいずれかにより判断する。ペア血清は発症後 14 日以内と 28 日以降（21 日以降で可能な場合も多い）の 2 点にすると確実である。
  5. HHV-6 以外に、サイトメガロウイルス、EB ウィルス、HHV-7 の再活性化を認めることもある。
  6. 多臓器障害として、腎障害、糖尿病、脳炎、肺炎、甲状腺炎、心筋炎も生じうる。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

マウス胎仔循環系への骨髄移植による免疫寛容誘導法開発

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** 遺伝性皮膚疾患に対する有効かつ安全な遺伝子治療法を確立するためには、治療用遺伝子産物に対する拒絶免疫反応を回避しつつ、治療用遺伝子を長期安定的に目的組織で発現させる必要がある。今回我々は、マウス胎仔循環系への骨髄細胞移植により、出生後のマウスにおける外来性遺伝子（GFP 遺伝子）に対する免疫寛容を誘導し、GFP 発現皮膚移植片に対する拒絶反応を回避できることを確認した。

共同研究者  
知野剛直  
大阪大学大学院医学系研究科遺伝子  
治療学  
橋本公二  
愛媛大学医学部皮膚科教授  
白方裕司  
愛媛大学医学部皮膚科講師

抗原に対し、胸腺において中枢性免疫寛容が誘導されることが知られている。今回我々は、マウス胎仔循環系に対する遺伝子導入骨髄細胞移植を行うことにより、出生後マウスにおける導入遺伝子産物に対する免疫寛容誘導の有無を検討した。

## B. 研究方法

### A. 研究目的

先天性表皮水疱症の劣性重症型では原因遺伝子の両アレルにナンセンス変異を持つため、完全欠損している原因遺伝子産物に対する免疫寛容が破綻している可能性が示唆される。本症に対する遺伝子治療はこれら重症病型に適応されることが期待されるため、有効かつ安全な遺伝子治療を行うためには治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導しなくてはならない。一方、胎生期に持続発現する

胎生 14 日目マウス（C57/B16）に対し、妊娠マウス子宮表面に露出する胎盤由来胎仔循環（卵黄嚢静脈）を利用して実体顕微鏡下に 10 週令同種 GFP トランスジェニックマウス（GFP マウス）由来骨髄細胞（ $5 \times 10^5$  個）を移植した。出生後、6 週齢で免疫組織における GFP 骨髄移植細胞由来細胞の生着を検討した。さらに、生後 10 週齢マウス背部皮膚に GFP マウス皮膚片を移植し、拒絶反応および抗 GFP 抗体産生の有無を検討した。