

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成19（2007）年3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	1
---	---

橋本公二

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)の治療指針案の作成	11
---------------------------------------	----

橋本公二

播種状紅斑丘疹型薬疹、Stevens-Johnson 症候群・中毒性表皮壊死症、 薬剤性過敏症症候群における薬剤添加リンパ球刺激試験の研究	20
--	----

塩原哲夫

重症型薬疹の登録表作成の試み -Stevens-Johnson 症候群(SJS)/ Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) 登録表-	25
--	----

飯島正文

本邦における最近の Stevens-Johnson 症候群と 中毒性表皮壊死症の治療の現状	30
--	----

池澤善郎

カルバマゼピンによる薬剤性過敏症症候群における HLA の解析	37
---------------------------------	----

森田栄伸

眼障害を伴う Stevens-Johnson 症候群 (SJS) / 中毒性表皮壊死症 (TEN) の解析	39
木下 茂	
ヒト表皮角化細胞 side population の長期増殖能力に関する研究	43
岡野栄之	
移植皮膚に対する骨髄由来表皮前駆細胞の役割検討	50
玉井克人	
中毒性表皮壊死症 (TEN) に対するシクロスポリン A (CsA) 治療についての検討	54
相原雄幸	
皮膚付属器を有する培養皮膚の作製	59
岸本治郎	
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	65
白方裕司	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	72
Ⅳ. 研究成果印刷物	91
Ⅴ. 平成 18 年度班会議プログラム	252

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 愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 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重症度スコア、治療指針案を作成した。再生遺伝子治療分野では羊膜を使用した新しい三次元培養皮膚の開発、長期間の毛乳頭細胞培養法の開発、骨髄間葉系幹細胞を用いた表皮再生法の開発を行った。

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）

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学教授）

飯島正文（昭和大学医学部皮膚科学教授）

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）

森田栄信（島根大学医学部皮膚科学教授）

木下 茂（京都府立医科大学眼科学教授）

相原雄幸（横浜市立大学附属市民総合医療センター 小児総合医療センタ

一準教授）

岸本治郎（資生堂ライフサイエンスセンター毛髪研究所長）

白方裕司（愛媛大学大学院医学系研究科附属再生医療研究センター講師）

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。現在までの培養表皮の作製法は牛胎児血清を使用する方法が用いられており、プリオンの感染の危険性が完全には排除できない。従って、牛由来材料を用いない培養法の確立が急務であったが、我々は牛由来材料を使用しない培養法を確立したので、この方法を用いた培養皮膚の作製を行う。血清は自己血清を用い、添加因子は胚芽を用いたセルフリー蛋白合成システム(愛媛大学にて開発した新たな蛋白合成法)を利用する。これにより、安全性の点で社会的に認知される培養皮膚の作製が可能となり、患者の QOL の向上、ひいては国民の医療の向上にも貢献できると考える。

①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。毛包の誘導には毛乳頭細胞が重要であることが明らかとなったため、毛乳頭細胞を長期間維持できる培養法を確立し、これらを用いて毛包付き三次元培養皮膚の作製法を開発することを重点的に行う。

②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。培養皮膚を用いる方法としては超音波を用いた安全な遺伝子導入法を改良し、遺伝子導入効率を上昇させる方法を開発する。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。治療には大量の蛋白が必要となることが予想されるため、愛媛大学工学部の遠藤教授により開発された無細胞蛋白合成システムを利用する。本法において無細胞蛋白自動合成装置を用いることにより大量かつ迅速に蛋白の合成が可能となる。蛋白補充療法をさらに発展させた組織補充療法としての羊膜の有用性についての検討を行う。羊膜破VII型コラーゲンを保持していることが示されており、これを用いた三次元皮膚の作製法を確立する。

③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。

④ヒトⅦ型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発

栄養障害型表皮水疱症患者への遺伝子治療を行う際に、患者が抗体を産生することが予想されその結果として治療効果の減少が予想されたため、Ⅶ型コラーゲンの免疫寛容誘導法の開発を行う。免疫寛容誘導法が確立されれば、他の遺伝子治療にも応用できることが期待される。

⑤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。すなわち、皮膚病変のみならず眼病変を考慮した診断基準の整備が必要であり、そのために眼科と詳細な意見交換を行い、診断基準を整備する。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

①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、培養皮膚を作製するとともに、SP 細胞から毛包・汗腺の誘導が可能であるかについて検討する。SP 細胞に特異的に発現している遺伝子を DNA microarray にて検索し、幹細胞のマーカーを検討する。さらに表皮幹細胞の維持に最適な培養液を開発する。(担当:岡野、岸本、白方、橋本)

②血管を有する培養皮膚の作製

創傷治癒においては上皮の再生のみならず、血管の再生は必須である。そこで、血管を有する培養皮膚の作製法を開発する。三次元培養皮膚はすでに作製できており、この真皮成分に血管内皮細胞を追加することにより作製可能な条件を決定する。管腔形成に VEGF-STAT3 の経路が必須であることを明らかにしており、これらの経路を活性化する条件を検索することにより作製可能になると思われる。また、新たなアイデアとして、表皮幹細胞、線維芽細胞幹細胞からの血管内皮細胞への誘導について検討する。(担当:白方、橋本)

③毛の外毛根鞘細胞を用いた培養皮膚

の開発

外毛根鞘は基本的には表皮角化細胞と同様の細胞であることから、毛から皮膚の作製が可能となれば臨床応用を考えると利点が多いと思われる。そこで、毛の外毛根鞘細胞から角化細胞を培養し、培養皮膚が可能であるかについて検討する。この方法を用いて、培養皮膚を作製し、難治性皮膚疾患患者に対して臨床応用を開始する。(担当:白方、岸本、橋本)

④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。次ぎに、その転写因子を誘導するサイトカイン、細胞成長因子を同定する。最後に SP 細胞にサイトカイン等の刺激にて角膜特異的なマーカー(ケラチン 12)を誘導する条件を決定し、三次元角膜を作成する。機能的に角膜として機能するかについてはラビット移植モデルで確認する。(担当:白方、木下)

⑤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、これをレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターへ組み込み比較検討する。これらベク

ターを用いて、栄養障害型表皮水疱症患者由来培養表皮細胞(VII型コラーゲン欠損株)に導入し、VII型コラーゲンの経時的発現を検討し、遺伝子導入培養皮膚シートをSCIDマウス皮膚に移植し、導入ベクター由来VII型コラーゲンの発現、係留線維の形成を検討する(担当: 玉井、白方、橋本)

⑥ヒトVII型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発

重症栄養障害型表皮水疱症患者ではVII型コラーゲンが完全欠損しており、VII型コラーゲンに対する免疫寛容が破綻している。従って、遺伝子治療を行う際に、VII型コラーゲンに対する抗体を産生することが予想され、治療効果の減弱、後天性表皮水疱症の発症が懸念される。この問題点を解決するために、VII型コラーゲン発現ベクターを用いて免疫寛容を誘導する方法論の確立を行う。マウス胎児皮膚に目的とする遺伝子産物を発現させ、免疫寛容を誘導する。出生後に皮膚に遺伝子を導入し、目的遺伝子を再度発現させ抗体産生の有無をELISA法により検討する。(担当: 玉井)

⑦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(玉井、白方)

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。これを用いてVII型コラーゲン欠損マウスに自己培養皮膚移植を行い、ヒトVII型コラーゲン発現ベクターによる治療効果及びその持続性について、臨床的・組織学的に検討する。VII型コラーゲンノックアウトマウスは米国Thomas Jefferson大学のUitto教授より供与されている。さらに、このマウスより経時的に採血し、抗ヒトVII型コラーゲン抗体産生の有無、抗体産生と臨床効果の持続性の関係等を解析する。(担当: 玉井、白方)

⑧ヒトVII型コラーゲン完全蛋白ならびにキメラ蛋白による栄養障害型表皮水疱症の治療の研究(玉井、白方)
蛋白補充療法のためにVII型コラーゲン蛋白を無細胞蛋白合成系にて作製する。そのために専用の発現ベクターにVII型コラーゲン遺伝子を組み込み、蛋白を合成する。non Hallopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症患者ではVII型コラーゲンのNC1領域は発現しているが、collagen, NC2領域の欠損のため皮膚の脆弱性が生じる。これら患者ではNC1に対する免疫寛容は成立しており、逆にcollagen, NC2領域に対する免疫寛容は成立していないと考えられる。これらの患者ではfull length cDNAを用いた遺伝子治療よりも、キメラ蛋白を用いた補充療法のほうが治療効果があることが期待されるため、VII型コラ

ーゲンNC1領域とフィブロネクチンを連結したキメラ蛋白を無細胞蛋白合成システムにて作製し、その効果について完全長Ⅶ型コラーゲンと比較検討する。

上記蛋白補充療法のさらに高度なものとして、組織補充療法の開発を試みる。Ⅶ型コラーゲンを含むメンブレンとして羊膜を使用し、これを足場として角化細胞を培養することによりⅦ型コラーゲン膜を有する三次元自己培養皮膚を作製する。実際に栄養障害型表皮水疱症患者へ移植し、その有効性を確認する。（担当：玉井、白方）

⑨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（担当：橋本、飯島、池澤、塩原、相原、木下、森田、白方）

重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準2005が作成できたので、この診断基準をもとにこれまで収集した患者についてその感受性、特異性を検討する。並行して、診断基準を基に重症度判定案を作成したので、平成18年度は重症度判定2006を作成し、これを基に治療指針を制定する。

DNA 多型と重症多形滲出性紅斑（急性期）の発症及び病態との関連を検索し、現時点では明らかになっていない遺伝的背景を同定する。これらの関連性を明らかにすることにより、重症多形滲出性紅斑（急性期）の発症の事前診

断や薬剤の使い分け、及び病態を明らかにすることにより、新しい治療法の開発をめざし、オーダーメイド医療確立に貢献する。

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症例を重ねることにより検討する。

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。引き続いて、特異的に発現している転写因子を表皮角化細胞 SP 細胞に強制発現させることにより、角膜特異的な蛋白を誘導できるかについて検討する。これらの基礎的研究と平行して、ヒト角膜から分離した角膜上皮細胞を用

いた三次元培養角膜を作製し、角膜上皮欠損患者へ移植しその有用性を検討する。

C. 研究結果

分担研究者の橋本公二は、そのほかの分担研究者と共同で、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 2005 に合致しない症例、まれな症例、典型例、非典型例、中等症、重症例、治療成功例の臨床経過を詳細に検討することにより治療指針案を作成した。

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髓細胞移植により、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。また新たな再生医療として、骨髓間葉系幹細胞が創傷部へ遊走し、表皮角化細胞へと分化し、表皮を再生しうることをマウスの移植系を用いて明らかにした。

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 SP 細胞が長期にわたり増殖が可能であるかについて検討した。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、それぞれの分画を培養し、継代を繰り返したところ、初期の増殖能は SP 細胞が優れていたが、長期にわたる培養では MP 細胞のほうが増殖能は勝っていた。この結果は、SP 細胞は stem cell としての性質と言うよりはむしろ transit amplifying cell としての性質を有していると思われる。分担研究者の塩原は、播種状紅斑丘疹型薬疹(MP)、Stevens-Johnson 症候群・中毒性表皮壊死症(SJS/TEN)、drug-induced hypersensitivity syndrome(DIHS)において発症初期と回復期における薬剤添加リンパ球刺激試験の stimulation index 値を比較検討した。MP や SJS/TEN では SI 値は発症初期に陽性となり、完全回復期には陰性となったのに対して、DIHS では SI 値は発症初期に陰性であったが、発症約 5〜7 週後に陽性となる傾向が確認された。

分担研究者の池澤は、2000 年〜2005 年までの6年間に本邦において原著論文として報告された Stevens-Johnson 症候群 (SJS) 43 例と中毒性表皮壊死症 (TEN) 54 例の治療および予後について集計し、SJS/TEN の本邦における治療の現状を調査した。SJS および TEN の大部分でステロイドの全身投与が

行われ、その多くはパルス療法であった。TEN では大量ガンマグロブリン療法または血漿交換療法が併用され、この両者が併用された 2 症例はいずれも急激な進行にもかかわらず救命されたことから、最重症例にはこれら 3 療法の速やかな施行が有用である可能性が示唆された。

分担研究者の飯島は、SJS と TEN の診断基準および治療指針(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 2005 作成)をもとに両者の本邦における頻度、病型、診断、治療、予後の現況を把握するため、調査登録表の作成を試みた。今後疫学調査と平行して症例の蓄積のためにこの調査登録票をいかに活用していくかが課題であると思われる。

分担研究者の木下は、SJS/TEN における眼合併症の病態を解析し、有効な治療法について検討した。急性期より治療に関与できた症例について、その治療内容と視力予後を解析した。また慢性期(瘢痕期)患者の眼所見を詳細に解析し、視力に影響する因子を検討した。その結果、発症初期より全身および局所にステロイドを投与した患者は、全例で視力障害を残さなかった。慢性期の視力障害患者は全例で角膜上皮幹細胞を消失しており、角膜上皮幹細胞消失による結膜侵入、角膜混濁の程度が視力と相関した。以上より、

急性期にステロイドを十分に使用して眼表面の炎症を軽減し、角膜上皮幹細胞消失を回避することが視力予後改善のために重要であると考えられた。

分担研究者の相原は、中毒性表皮壊死症(TEN)に対する早期大量ステロイド薬が有効でない症例の存在に着目し、ciclosporin A(CsA)の使用例について文献的検討を行った。その結果、1989 年の最初の報告以降これまでに 12 論文が報告されていた。症例報告が大部分であり、比較試験はなかった。皮疹の進行停止や再上皮化などが比較的早期になるなど有効性を示唆する報告があった。しかしながら、ステロイド薬との併用例も多く、有効性を評価するためには今後比較試験などの検討が必要であることを明らかにした。分担研究者の森田は、重症型薬疹の頻度の高い薬剤のひとつカルバマゼピンによる副作用が HLA タイプと関連する場合があります、カルバマゼピンによる Stevens-Johnson 症候群が HLA-B 遺伝子と関連するとの報告に着目し、カルバマゼピンによる薬疹と HLA-B 遺伝子座の関連を検討した。カルバマゼピンによる drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) の 5 例およびカルバマゼピンによる播種状紅斑丘疹型薬疹 (MP) の 2 例において HLA-B の遺伝子タイピングを行

った。患者に共通してみられるタイプはみられなかったが、B*400201 と B*5101 がそれぞれ 3 例にみられ HLA-B は疾患感受性遺伝子である可能性を明らかにした。

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さらに進め、低血清の線維芽細胞培養用培地 MDHFⅢ培地での長期継代培養を行った。また、Wnt 経路の擬似活性化剤 BIO(GSK-3beta inhibitor 9) の添加により、毛乳頭マーカー遺伝子の発現が亢進されることを見出した。これらの結果から、MDHFⅢ培地に BIO を添加した培養方法により、毛包誘導能を維持したヒト毛乳頭細胞を効率的に、かつ大量に得ることが可能となることが示唆された。

分担研究者の白方は、羊膜付き三次元培養皮膚を開発し、その生着性、有効性につき in vivo で検討を行った。羊膜付き三次元培養皮膚は従来の培養皮膚のなかで最も正常皮膚に近いものであり、有効であることを証明した。

D. 考察

診断基準 2005 を基に、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、

治療指針案を作成した。基本的には副腎皮質ステロイド剤の使用が必要であると考え、さらに大量のステロイド剤を使用する必要があると考える。今後はこの治療指針案に基づいた治療を行い、治療成功例、治療難渋例等の症例を蓄積する必要があると考える。また、新たな治療法として血漿交換療法、シクロスポリン、大量ガンマグロブリン製剤が治療の選択肢の一つとなりうることが示された。診断に関しては薬剤によるリンパ球幼若化試験の有用性について、SJS/TEN では病初期しか陽性にならないことが明らかとなった。このことより、被疑薬の検査は病初期に行う必要があることを周知させることが重要であると思われる。また、ある特定の HLA 型が重症薬疹の発症に関与するという知見が得られた。症例を集積し、関与が明らかとなれば発症を予防することが可能となると思われる。

幹細胞研究に関しては、創傷刺激により骨髄細胞が表皮へ遊走し、表皮細胞になりうることが明かとなった。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 細胞が注目されている。本年度の研究成果において、長期間の培養では SP 細胞は増殖能が低下することが明らかとなった。すなわち、SP 細胞は表皮の幹細胞としては合わない点があり、その他の幹細胞分離同定法の開発が必要であることが明らかとなった。

毛包の再生については毛乳頭細胞が重要であることはすでに明らかとしているが、培養系に持ち込んだ場合、性質が変化することを見いだしている。毛包誘導能を有する毛乳頭細胞の培養系の開発が必要であり、そのための最適な培養法を開発した。この培養法をさらに改良することにより優れた毛包再生法が開発できるものと考ええる。培養皮膚に関しては一定の成果が得られている。羊膜を併用した培養皮膚を開発し、その有効性が示された。この新しい羊膜付き三次元培養皮膚を臨床に応用し、難治性皮膚疾患に対する有効性を検討する必要がある。

E. 結論

本研究により重症多形滲出性紅斑治療指針案を作成し、重症多形滲出性紅斑に対する治療法が確立できた。

難治性皮膚疾患に対する画期的治療法として、羊膜付き三次元培養皮膚を新たに開発し、さらに発展するための幹細胞の分離・維持の必要性、さらには骨髓細胞を用いた表皮の再生医療法の可能性を明らかにした。今後表皮細胞に分化しうる骨髓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、さらには骨髓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 18 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：3 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

Stevens-Johnson 症候群（SJS）、Toxic Epidermal Necrolysis（TEN）の治療指針案の作成

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 Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症（Toxic Epidermal Necrolysis（TEN））の診断基準 2005 および重症度スコア案を基に、治療指針案を作成した。今後はこの治療指針案に基づいた治療を行い、予後判定や後遺症の頻度について検討を加える必要があると考える。また、薬剤過敏症症候群についての治療指針案の作成が必要と考える。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群は 口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部の出血性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 を作成した。さらに、治療指針のために、重症度スコアを作成した。これらの資料を基に、SJS/TEN の治療指針案を作成することを目的とした。

B. 研究方法

Stevens-Johnson 症候群、TEN, DIHS 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、中等症、重症例、治療成功例の臨床経過を詳細に検討することにより治療指針案を作成する。

C. 研究結果

治療指針案：資料参照

D. 考察

分担研究者の施設で経験した Stevens-Johnson 症候群、TEN の症例を詳細に検討することにより、治療指針案を作成した。治療指針案に基づいた治療を行い、

予後や後遺症の程度、頻度を検討することが今後の課題であり、症例の積み重ねによる解析が必要不可欠である。さらには類症である薬剤過敏症症候群の治療指針案の作成が急務であると考ええる。

E. 結論

本研究により Stevens-Johnson 症候群, TEN の治療指針案を作成した。次年度以降、治療指針案に基づいた治療が行われることを期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 18 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. 42:111-9, 2006
2. Dai X, Sayama K, Yamasaki K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K: SOCS1 negative feedback of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocytes. J Invest Dermatol. 126:1574-81, 2006
3. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, Tsuda T, Sayama K, Iwai M, Horiuchi M, Hashimoto K: A novel function of angiotensin II in skin wound healing: Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. J Biol Chem 281:13209-16, 2006.
4. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K: New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. Cell Tissue Res 326:69-77, 2006.
5. Sayama K, Hanakawa Y, Nagai H, Shirakata Y, Dai X, Hirakawa S, Tokumaru S, Tohyama M, Yang L, Sato S, Akira S, Hashimoto K: TAK1 is essential for differentiation and the prevention of apoptosis in epidermis. J Biol Chem. 281:22013-20, 2006.
6. Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. Oncogene 26:339-48, 2007.
7. Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S,

- Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 45:69-72, 2007.
8. Nanba D, Kinugasa Y, Morimoto C, Koizumi M, Yamamura H, Takahashi K, Takakura N, Mekada E, Hashimoto K, Higashiyama S.: Loss of HB-EGF in smooth muscle or endothelial cell lineages causes heart malformation. *Biochem Biophys Res Commun* 350:315-321, 2006.
 9. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, and Sugai M.: Innate defences against methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA) infection. *J Pathol* 208:249-260, 2006.
 10. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T.: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP-230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 41:21-30, 2006.
 11. Niiya H, Lei J, Guo Y, Azuma T, Yakushijin Y, Sakai I, Hato T, Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M.: Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells. *Exp Hematol* 34:642-653, 2006.
 12. Cao F, Hata R, Zhu P, Ma YJ, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto Y, Hashimoto K, Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M.: Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98:459-470, 2006.
 13. Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M: Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infect Immun* 74:5211-20, 2006.
 14. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H.: Antimicrobial peptides human β defensins stimulate keratinocyte migration, proliferation of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594-604, 2007.
- 学会発表
1. Y Shirakata, X Dai, S Tokumaru, Y Hanakawa, M Tohyama, L Yang, K Sayama, and K Hashimoto : PPAR γ /C/EBP α signaling

- pathway plays a key role in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced keratinocyte differentiation. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
2. S Tokumaru, Y Shirakata, Y Hanakawa, X Dai, K Kameda, M Tohyama, K Sayama, **K Hashimoto**: hBD1-induced keratinocyte migration is mediated through HB-EGF/EGFR transactivation mechanism. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
 3. L Yang, K Yamasaki, Y Shirakata, X Dai, S Tokumaru, M Tohyama, Y Hanakawa, K Kameda, K Sayama, **K Hashimoto**: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal human keratinocytes. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
 4. K Shiraishi, Y Shirakata, K Yamasaki, Y Hanakawa, S Higashiyama, **K Hashimoto**: Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
 5. Y. Shirakata, X. Wang, L. Yang, M. Tohyama, S. Tokumaru, K. Sayama, **K. Hashimoto**: Keratinocyte growth factor has an anti-apoptotic effect on UVB-irradiated normal human keratinocytes. The 34th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Paris, France, Sep 7-9, 2006
 - G. 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

SJS および TEN の治療指針案 2006

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) および中毒性表皮壊死症(TEN)の治療には、まず被疑薬の中止を行う。嚴重な眼科的管理、皮疹部および口唇・外陰部粘膜の局所処置、補液・栄養管理、感染防止が重要である。

薬物療法としては、確立されたものではないが効果を期待できる治療法として、早期の副腎皮質ステロイド薬の全身療法が第一選択となっている。症例に応じて他の治療法や併用療法を実施する。

1. 副腎皮質ステロイド薬の全身投与

症例により状態が異なるため一律には決めがたいが、推奨される投与法は下記の通りである。発症早期に開始することが望ましい。治療効果の判定には、紅斑・表皮剥離・粘膜疹の進展の停止、びらん面からの浸出液の減少、解熱傾向、末梢血白血球異常の改善、肝機能障害などの臓器障害の改善などを指標とする。重篤な感染症を合併している場合にはステロイド薬投与とともに抗菌薬や免疫グロブリン製剤などを併用し感染対策を十分に行う。

ステロイド療法

プレドニゾロンまたはベタメタゾン、デキサメタゾンをプレドニゾロン換算で、中等症は 0.5～1 mg/kg/日、重症は 1～2 mg/kg/日で開始する。

ステロイドパルス療法

重症例や急激に進展する症例ではパルス療法も考慮する。パルス療法は、メチルプレドニゾロン 500 mg～1000 mg/日を 3 日間投与する（小児では年齢および体重を考慮し適宜増減**）。中等症の場合は、より少量（250 mg/日）の投与で効果がみられることがある。初回のパルス療法で効果が十分にみられない場合、または症状の進展が治まったのちに再燃した場合は、数日後にもう 1 クール施行するか後述するその他の療法を併用する。

パルス療法直後のステロイド投与量は十分量（プレドニゾロン換算で 1～2 mg/kg/日）を投与し、漸減する。減量速度は個々の症例の回復の程度により調整する。