

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 ～ 平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成19（2007）年3月

## 目 次

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | 班員構成 .....  | 1  |
| II.  | 総合研究報告<br>難治性皮膚疾患（重症多形滲出性紅斑（急性期）を含む）の<br>画期的治療法に関する研究 ..... | 3  |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 .....  | 49 |

〔I〕

班員構成

## 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 | 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     | 研究総括                      |
| 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    | VII型コラーゲン遺伝子治療法の開発        |
|       | 岡野 栄之 | 慶応義塾大学医学部生理学             | 教授     | 表皮幹細胞の分離法の確立              |
|       | 飯島 正文 | 昭和大学医学部皮膚科               | 教授     | 重症多形滲出性紅斑の新規治療法の開発        |
|       | 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     | 重症多形滲出性紅斑の新規治療法の開発        |
|       | 塩原 哲夫 | 杏林大学医学部皮膚科               | 教授     | 重症多形滲出性紅斑の新規治療法の開発        |
|       | 木下 茂  | 京都府立医科大学眼科学              | 教授     | 重症多形滲出性紅斑の眼病変に対する新規治療法の開発 |
|       | 大橋 裕一 | 愛媛大学大学院医学系研究科視機能外科学      | 教授     | 重症多形滲出性紅斑の眼病変の診断基準確立      |
|       | 森田 栄伸 | 島根大学医学部皮膚科学              | 教授     | 重症多形滲出性紅斑の新規治療法の開発        |
|       | 相原 雄幸 | 横浜市立大学・小児総合医療センター小児科     | 準教授    | 小児重症多形滲出性紅斑の診断基準の作成       |
|       | 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 | 毛包の再生                     |

|  |       |                           |    |                     |
|--|-------|---------------------------|----|---------------------|
|  | 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 | 培養法の改善、新規培養皮膚作製法の開発 |
|--|-------|---------------------------|----|---------------------|

[III]

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

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 難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植の確立のために、角化細胞の完全無血清培養法を確立し、7例の劣性栄養障害型表皮水疱症に対し自己培養表皮シート移植・自己三次元培養皮膚移植を施行し良好な結果を得た。さらに、正常皮膚に最も近い羊膜付き三次元培養皮膚を開発した。劣性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のために、生体皮膚への遺伝子導入法を確立し、VII型コラーゲン遺伝子発現ベクターを開発し、遺伝子治療に備えることができた。胎児皮膚への遺伝子導入を利用した免疫寛容誘導法を開発し遺伝子治療に備えることができた。幹細胞研究に関しては、骨髄間葉系幹細胞が表皮角化細胞へと分化誘導されることを示し、骨髄細胞を用いた皮膚再生医療の可能性が示唆された。皮膚付属器の培養として、毛包の再生に成功し、毛乳頭細胞の長期培養法を開発した。重症多形滲出性紅斑（急性期）については診断基準 2005 を作成し、重症度スコア、治療指針、診断マニュアルを作成した。

分担研究者：

玉井克人（大阪大学医学系研究科・助教授）

岡野栄之（慶応義塾大学医学部・教授）

塩原哲夫（杏林大学医学部・教授）

飯島正文（昭和大学医学部・教授）

池澤善郎（横浜市立大学医学部・教授）

木下 茂（京都府立医科大学・教授）

大橋裕一（愛媛大学医学系研究科・教授）

森田栄伸（島根大学医学部・教授）

相原雄幸（横浜市立大学附属市民医療センター・準教授）

岸本治郎（資生堂ライフサイエンス研究センター・毛髪研究所長）

白方裕司（愛媛大学医学系研究科・講師）

1. 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働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。羊膜は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 $\gamma$ 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。

## 2. 研究方法

### ①毛包を有する培養皮膚の作製

毛包を有する培養皮膚の作製のために、幹細胞の同定を行う。毛包に関しては、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。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、表皮幹細胞としての性質を有しているかについておもに細胞増殖能を示標に検討する。

### 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の経路が重要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、強力な血管新生因子であるbFGFの

シグナル伝達系における STAT3 の関与について管腔形成能、遊走能を示標に検討する。

### 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。

### 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、まず、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。

### ⑤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。レトロウイルスベクター、HVIリポソームベクターの利用についても比較検討する。超音波を用いた遺伝子導入法にてVII型コラーゲン cDNA を培養皮膚に導入し遺伝子発現について検討する。さらにこのベクターを用いて、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ノーザンブロット法およびウエスタンブロット法にて検討する。さらに、遺伝子導入培養皮膚シートを SCID マウス皮膚に移植し、経時的に組織を採取し、導入ベクター由来VII型コラーゲンの発現を蛍光抗体法により、また係留線維の形成を免疫電顕で観察し有効性を検討する。

### 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。

### 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

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。

#### 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

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が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。

#### 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

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。また、特定の遺伝子の関与について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。引き続き、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。さらに、これらの手法を用いて、三次元培養角膜を作製し、モデルラビットへ移植し、その有効性について検討する。

(倫理面への配慮)

培養皮膚移植に関しては愛媛大学医学部倫理委員会の承認をすでに得ている。本研究は余剰ヒト皮膚を用いるが、試料等の保存及び使用方法について十分な説明を行った上で、自由意志に基づく文書による同意(インフォームド・コンセント)を得た上で行う。この臨床研究についても愛媛大学倫理委員会の承認を得ている。遺伝子多型解析については愛媛大学医学部ヒトゲノム倫理委員会の承認を得ている。

### 3. 研究結果及び考察

#### ①毛包を有する培養皮膚の作製

毛包を有する培養皮膚の作製のために幹細胞の同定を行った。毛包においても表皮角化細胞の 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ことを明らかにし、これらのマーカーを強く発現している細胞の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、毛漏斗部に局在

しており、幹細胞の局在部位と一致していた。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。さらに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 培地を開発した。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、表皮幹細胞としての性質を有しているかについておもに細胞増殖能を示標に検討した。SP 細胞はその他の分画の細胞と比較すると増殖能が高く、幹細胞としての性質を一部有していることが明らかとなった。さらに、ヒト角化細胞の SP 細胞の継代における比率について検討したところ、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。

#### ②血管を有する培養皮膚の作製

血管を有する培養皮膚の開発のために、管腔形成に重要な因子を特定した。強力な血管新生因子である VEGF のシグナル伝達で管腔形成が促進され、これは転写因子である STAT3

の経路が重要であることを明らかにした。また、血管新生因子である bFGF のシグナル伝達系においても STAT3 が管腔形成ならびに細胞遊走に重要な役割を果たしていることを示した。従って、これらの経路を活性化する条件を検索することにより血管を有する培養皮膚の作製が可能になると思われる。

#### ③毛の外毛根鞘細胞を用いた培養皮膚の開発

抜去毛を洗浄後、トリプシンにて処理し、コラーゲンコートディッシュに密着させ無血清培養にて explant culture を行った。外毛根鞘付近より細胞の outgrowth が認められ、細胞の形態から角化細胞であることを確認した。この細胞は数回継代が可能であり、継代した細胞を用いて培養皮膚の作成が可能であることを明らかにした。

#### 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、まず、角膜細胞と表皮細胞から RNA を抽出し、micro array 解析を行った。候補となる遺伝子を数個あげることができた。しかし、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)を誘導することは困難であった。単一のサイトカイン、細胞成長因子などでは角膜へ誘導することは困難であり、今後は複数の因子の組み合わせ、時間的な刺激の変更などを検討する必要があると思われる。

#### ⑤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た。この発現ベクターを角化細胞に導入した後、免疫組織学的に導入された遺伝子が角化細胞で発現していることを確認した。また、ウェスタンブロット法にて発現しているタンパクが 7 型コラーゲンであることを確認した。さらにこのベクターを用いて、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PCR法およびウエスタンブロット法にて検討した。遺伝子導入培養皮膚シートを SCID マウス皮膚に移植し、経時的に組織を採取し、導入ベクター由来VII型コラーゲンの発現を蛍光抗体法により、また係留線維の形成を免疫電顕で観察し、その発現を確認した。

#### ⑥ヒトVII型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発

胎生 14 日目マウス(C57/Bl6)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(卵黄囊静脈)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)由来骨髓細胞( $5 \times 10^5$  個)を移植した。出生後、6 週齢で免疫組織における GFP 骨髓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。胎生 14 日目に GFP 骨

髄を移植したマウスでは、出生 6 週目以降においても移植 GFP 骨髄由来細胞が骨髄、胸腺、脾臓の各組織に長期生着していた。また、10 週目に移植した GFP マウス皮膚片は拒絶されることなく生着し、また抗 GFP 抗体の産生も ELISA により検出し得なかった。一方胎生期に GFP 骨髄移植を行わなかった群では、GFP マウス皮膚は全例で拒絶され、また抗 GFP 抗体の産生が ELISA にて確認された。胎生期 GFP 骨髄移植により生後長期間 GFP 発現骨髄細胞に対する免疫寛容が成立することが明らかとなった。出生前診断により妊娠早期に胎児遺伝子の両アレルにナンセンス変異の存在が確認された場合、胎児骨髄細胞を採取して治療用遺伝子を導入し、再び胎児循環系に移植することにより、治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導することが可能になると思われた。

#### 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

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した。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・組織学的に検討した。遺伝子導入した培養皮膚は生着し、稽留繊維の形成が確認された。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を検討したところ、抗体は認

められなかった。

#### 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

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を試みた。遺伝子のサイズがかなり大きく、コラーゲン繊維を形成させることは不可能であった。キメラ蛋白にても同様で、タンパク補充療法は無細胞タンパク合成系では困難であることが予想された。そこで、組織補充療法として羊膜の有用性を検討した。上皮成分をのぞいた羊膜は基底膜の成分を保持しており三次元培養皮膚の新たなスキュフォードの可能性がある。線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの上面に羊膜を密着させ、その上に角化細胞を播種し空気に曝露することで重層化させた。羊膜付き三次元皮膚はコンパクトな基底細胞が整然と配列し正常皮膚に近い状態であった。従来の三次元皮膚と比べて、羊膜付き三次元皮膚は分化マーカー、細胞間接着分子の発現は、より正常皮膚に近いものであった。基底膜の成分であるIV型コラーゲン、VII型コラーゲン、ラミニン5は基底膜部に線状に発現が認められ、電子顕微鏡所見ではミデスモゾームは発達しており、lamina densaも線状に発現していた。マウスへの移植実験では羊膜付き三次元皮膚は生着良好で、生着した培養皮膚は、形態は正常皮膚に極めて近いもので、基底膜の発達も良好であった。羊膜付き三次元皮膚は栄養障害型表皮水疱症患者

の治療において優れた結果が期待できると考えられる。

#### 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

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）の見直しを行い、診断基準2005を制定した。また、重症度判定についての基準が整備されていなかったため、重症度スコアを制定した。特定の遺伝子の関与について 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するために、患者と健常人からDNAを抽出し、試料収集に取りかかった。

治療法については、治療指針が整備されていなかったため、診断基準と重症度をもとに治療指針を作成した。重症多形滲出性紅斑の治療は大量ステロイド、ステロイドパルス療法が第1選択であり、これらでは治療できない症例や治療抵抗性の症例では大量免疫グロブリン療法、血漿交換療法が有効であることを示した。

重症多形滲出性紅斑（急性期）の合併症としての癬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。羊膜を用いた三次元培養角膜の作製法を確立し、その有効性について臨床応用を行ったところ、有用であることをあきらかにした。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

①毛包を有する培養皮膚の作製（達成度 7

5%）

毛乳頭細胞と角化細胞をそれぞれ別に分離し、ヌードマウスへ移植することにより毛包の再生に成功した。毛包の再生には毛乳頭細胞が非常に重要であること、さらに継代を行うと毛包形成能が低下することを示し、毛包形成能を有する毛乳頭の培養法重要であることを示した。この点を解決すべく、毛乳頭に特化した培養液を開発した。

②血管を有する培養皮膚の作製（達成度 50%）

血管新生については皮膚毛細血管内皮細胞を用いて、その遊走と管腔形成に VEGF-STAT3、bFGF-STAT3 のシグナル伝達系が重要であることを見いだした。しかし、これら付属器を有する三次元培養皮膚の作製には至らなかった。

③毛の外毛根鞘細胞を用いた培養皮膚の開発（達成度 90%）

抜去毛から無血清培養にて角化細胞の培養法を確立できた。この細胞は数回継代が可能であり、継代した細胞を用いて培養皮膚の作成が可能であることを明らかにした。培養法は確立できたが、実際の培養表皮シート移植は未だ行っていない。

④表皮幹細胞から角膜の誘導（達成度 50%）

表皮幹細胞としての SP 細胞を分離し、培養する方法は確立できた。しかし、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）を誘導することは困難であった。単一のサイトカイン、細胞成長因子などでは角

膜へ誘導することは困難であり、今後は複数の因子の組み合わせ、時間的な刺激の変更などを検討する必要があると思われる。

⑤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（達成度 90%）

表皮基底細胞分画で高率に発現するプロモーターと連結した発現ベクターを作製した。この発現ベクターが角化細胞で発現していることを確認し、ウェスタンブロット法にて発現しているタンパクがVII型コラーゲンであることを確認した。さらにこのベクターを用いて、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PCR法およびウェスタンブロット法にて検討した。遺伝子導入培養皮膚シートをSCIDマウス皮膚に移植し、経時的に組織を採取し、導入ベクター由来VII型コラーゲンの発現を蛍光抗体法により、また係留線維の形成を免疫電顕で観察し、その発現を確認した。

⑥ヒトVII型コラーゲンに対する免疫寛容誘導法の開発（達成度 90%）

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る。免疫寛容誘導法が確立できれば、他の遺伝子治療にも応用できることが期待される。免疫反応回避方法の開発では、マウス胎仔皮膚に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。胎生期GFP骨髄移植によ

り生後長期間GFP発現骨髄細胞に対する免疫寛容が成立することが明らかとなった。出生前診断により妊娠早期に胎児遺伝子の両アレルにナンセンス変異の存在が確認された場合、胎児骨髄細胞を採取して治療用遺伝子を導入し、再び胎児循環系に移植することにより、治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導することが可能になると思われた。

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（達成度 75%）

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した。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ったところ、遺伝子導入した培養皮膚は生着し、稽留繊維の形成が確認された。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を検討したところ、抗体は認められなかった。

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（達成度 75%）

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を試みたが、コラーゲン繊維を形成させることは不可能であった。キメラ蛋白にても同様で、タンパク補充療法は無細胞タンパク合成系では困難であることが予想された。しかし新たな方法論として、組織補充療法としての羊



膜付き三次元皮膚を開発した。羊膜付き三次元皮膚は正常皮膚に近い状態で、分化マーカー、細胞間接着分子の発現は、より正常皮膚に近いものであった。基底膜の成分であるIV型コラーゲン、VII型コラーゲン、ラミニン5は基底膜部に線状に発現が認められ、電子顕微鏡所見ではミデスモゾームは発達しており、lamina densaも線状に発現していた。マウスへの移植実験では羊膜付き三次元皮膚は生着良好で、生着した培養皮膚は、形態は正常皮膚に極めて近いもので、基底膜の発達も良好であった。羊膜付き三次元皮膚は栄養障害型表皮水疱症患者の治療において優れた結果が期待できると考えられる。

#### 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(達成度 95%)

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)の見直しを行い、診断基準2005を制定した。また、重症度スコアを制定した。特定の遺伝子の関与についてDNA多型を検索するために、患者と健常人からDNAを抽出し、試料収集に取りかかった。治療法については、診断基準と重症度をもとに治療指針を作成した。重症多形滲出性紅斑の治療は大量ステロイド、ステロイドパルス療法が第1選択であり、これらでは治療できない症例や治療抵抗性の症例では大量免疫グロブリン療法、血漿交換療法が有効であることを示した。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的

意義について

有効な治療法が存在しなかった栄養障害型表皮水疱症患者に対する自己三次元皮膚移植の有効性を示すことができ、組織補充療法としての羊膜付き三次元皮膚が開発できたことは学術的にも評価されると思われ、国際的にも自己培養皮膚移植の有効性を示したのは我々が初めてである。また、社会的には、この治療法を患者に還元できることは評価が高いと思われる。栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療を推進するため、原因遺伝子である7型コラーゲン遺伝子の発現ベクターを開発し、その導入法を確立できたことは学術的に意義のあることと考える。遺伝子治療の際に生じる免疫反応を回避する免疫寛容誘導法を確立することができた。これは学術的に大きな成果であるといえる。重症多形滲出性紅斑の診断基準を確立し、重症度スコアを制定し、治療指針を制定したことは社会的に意義が高いと思われる。

#### 3) 今後の展望について

自己培養皮膚移植の有効性を証明することができた結果、今後は症例数を増やして、全国規模で治療法を推進したい。また、組織補充療法としての羊膜付き自己三次元培養皮膚を用いた栄養障害型表皮水疱症の治療法確立が今後の展望である。さらに栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療をめざし、できれば臨床応用へ発展させたいと考えている。培養皮膚の作製は確立できた

が、付属器を備えた培養皮膚、特に毛包、血管を含む培養皮膚ができれば、その応用範囲は計り知れない。したがって、付属器を備えた培養皮膚の作製法の確立を今後達成したいと考えている。重症多形滲出性紅斑については診断基準、重症度スコア、治療指針を整備したので、これらを基に疫学調査にとりかかりたいと考えている。遺伝子検索については試料の収集が順調にすすんでいるので、今後実際の遺伝子検索に取りかかる予定である。

#### 4) 研究内容の効率性について

もともと正常皮膚に近い羊膜付き三次元培養皮膚が開発できた。これを用いることにより皮膚科領域での再生医療がますます発展すると思われる。また、この技術は薬剤透過性や薬剤刺激テストの疑似皮膚として有用であると思われる。栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療については、発現ベクターを開発できたことは今後の皮膚疾患に対する遺伝子治療法のみならず、他の分野における遺伝子治療へ応用可能であると考えられる。また、かねてより問題となっていた免疫寛容誘導法についての方法論が確立できたことは、実際の遺伝子治療を行ううえで大きな成果であると思われる。多形滲出性紅斑の診断基準については国内トップレベルの研究者を分担研究者としてむかえることができ、頻回に検討を加えることにより診断基準を効率よく作成できたと考えられる。また、この診断基準を作成できた

ことにより、効率よく重症度スコアの制定、ひいては治療指針の作成へとつながっていると思われる。本研究班としては、基礎的研究と臨床研究ならびに診断基準の整備などを非常に効率よく行うことができたと考ええる。

## 5. 結論

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法を確立し、実際に患者に臨床応用し、有効な成績を得ることができた。また、正常皮膚に近い羊膜付き三次元培養皮膚が開発できた。VII型コラーゲン遺伝子発現ベクターを開発し、遺伝子治療に備えることができた。胎児皮膚への遺伝子導入を利用した免疫寛容誘導法を開発し、遺伝子治療に備えることができた。重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準、重症度スコア、治療指針を作成した。

## 6. 研究発表

### 1. 国内)

口頭発表：63件

原著論文による発表：25件

それ以外（レビュー等）の発表：103件

そのうち主なもの

論文発表

橋本公二：【話題の疾患と治療】  
Drug-induced hypersensitivity

syndrome(DIHS) 感染・炎症・免疫;35: 91-93, 2005.

橋本公二:診断の指針・治療の指針 新しいタイプの薬疹 Drug induced hypersensitivity syndrome(DIHS) 総合臨床;54:2293-2294, 2005.

橋本公二, 藤山幹子:重症薬疹の新しい考え方 —DIHS を中心に— 日本小児皮膚科学会雑誌;24:176-177, 2005.

藤山幹子、橋本公二:薬剤過敏症症候群(DIHS)の新しい展開 臨床皮膚科 60:32-5, 2006

藤山幹子、橋本公二:薬剤過敏症症候群(DIHS: drug-induced hypersensitivity syndrome) 日本醫事新報 4275:62-6, 2006

橋本公二, 藤山幹子:DIHS の病態と治療 アレルギー科;20:192-196, 2005.

玉井克人, 金田安史, 中邨弘重, 青木元邦, 森下竜一, 橋本公二, 森田明里, 片山一郎, 花田勝美:【遺伝子治療学 遺伝子診断の進歩と遺伝子治療の展望】 遺伝子治療 現状の展望 各論 膠原病・アレルギー疾患に対する遺伝子治療 NFκB デコイ DNA によるアトピー性皮膚炎治療 日本臨床;63:659-663,

2005.

藤山幹子, 橋本公二:【皮膚疾患】薬疹・中毒疹 今日の治療と看護 改訂第2版:1132-1135, 2004

藤山幹子, 橋本公二:【皮膚感染症の最近の動向と対応】HHV-6,HHV-7 感染症 化学療法の領域;20:841-844, 2004.

徳丸 晶, 白方裕司, 橋本公二:表皮幹細胞 分子細胞治療 ; 3 : 98(380)-100(382), 2004.

白方裕司, 橋本公二:培養皮膚の臨床応用 皮膚科の臨床 ; 46 : 173-180, 2004.

橋本公二:【新しい薬疹】平成13年度厚生科学研究班「Stevens-Johnson 症候群, Toxic epidermal necrolysis(TEN)とhypersensitivity syndrome の診断基準及び治療指針の研究」 Derma ; 86 : 8-12, 2004.

橋本公二, 藤山幹子:薬剤性過敏症症候群(DIHS) 日本皮膚科学会雑誌 ; 114:2175-2177, 2004.

末木博彦, 飯島正文:SJS/TEN の早期診断と治療 —皮膚科医の役割—. 皮膚アレルギーフロンティア 4 : 73-77, 2006

飯島正文：薬疹．日本皮膚科白書 第103回日本皮膚科学会総会記念 改訂版．64-70, 2005

飯島正文：Stevens-Johnson 症候群 (SJS)/ 中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis, TEN) の診断と治療．日集中医誌 12:183-186, 2005

末木博彦, 飯島正文：重症薬疹におけるステロイドのエビデンス．皮膚アレルギーフロンティア．9:180-182, 2005

飯島正文：Stevens-Johnson 症候群，最新皮膚科学大系(玉置邦彦総編集) 5巻 薬疹・中毒疹，中山書店．p.36-46, 2004

飯島正文：中毒性表皮壊死症 (TEN)，最新皮膚科学大系(玉置邦彦総編集) 5巻 薬疹・中毒疹，中山書店．p.47-55, 2004

池澤善郎：薬剤アレルギーのための負荷テスト．小児内科，38:1436-1439, 2006, 8.

山根裕美子, 相原道子, 池澤善郎：薬疹とアレルギー．臨牀看護，32:1478-1483, 2006, 9.

池澤善郎：6. 中毒性表皮壊死融解症 (TEN). A. これだけは知っておくべき薬疹の基礎知識 1. 薬疹の分類, 皮膚科診療プラクティス 19 薬疹を極める (塩原哲夫, 宮地良樹, 瀧川雅浩編), 49-53, 文光堂, 東京, 2006.

池澤善郎：重症薬疹の病型・診断・治療．第10章その他の非腫瘍性皮膚疾患, 皮膚疾患の最新医療 (斎田俊明, 飯塚 一, 清水 宏, 竹原和彦, 古江増隆, 池田志孝, 石川 治, 玉井克人編), 208-212, 先端医療技術研究所, 東京, 2006.

池澤善郎：106 中毒性表皮壊死症の診断と治療指針. 環境障害・電解質異常・皮膚障害の診断・治療・ケア, 救急・集中治療ガイドラインー最新の診療指針ー(岡元和文編), 799-801, 総合医学社, 東京, 2006.

池澤善郎：1. 薬疹の頻度, 2. 薬疹の臨床, 3. 薬物アレルギー機序と薬疹の発疹型, 4. 薬疹にみる薬物アレルギーの交差反応 コラム1：重症薬疹とその診断基準 コラム2：薬疹とウイルス感染, とくに伝染性単核球症のアンピシリン疹と drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) について. 薬物アレルギー, 薬物療法学(石崎高志, 鎌滝哲