

た。また血中抗 GFP 抗体の産生は ELISA にて検出し得なかった。

D. 考察

胎生期 GFP 骨髄移植により生後長期間 GFP 発現している皮膚組織が長期にわたって生着することが明らかになった。これは1つのモデルケースであり、先天性表皮水疱症においても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に適応できると考えられる。その場合は、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なるが、導入遺伝子の細胞内での長期保持が必要であり、そのためにはウイルスベクターではなく、変異部位の修復を ex vivo で促進する技術の開発が望ましいと考えられる。

E. 結論

妊娠早期における胎児循環系に対する治療用遺伝子導入自家骨髄移植により、出生後の遺伝子治療を安全かつ有効に行うために必要な、導入遺伝子産物に対する免疫寛容誘導が可能になると予想される。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

1. Kaneda Y, and Tabata, Y. Non-viral vectors for cancer therapy. **Cancer Sci.** 97 : 348-354, 2006.
2. Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., and Kaneda, Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 354, 453-458, 2007

3. Kunugiza, Y., Tomita, N., Taniyama, Y., Tomita, T., Osato M.K., Tamai, K., Tanabe, T., Kaneda, Y., Toshikawa, H., and Morishita, R. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. **Gene Therapy**, 13, 1143-1152, 2006.
 4. Suvanasuthi, S., Tamai, K. and Kaneda, Y. Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. **J. Gene Medicine**, 9, 55-62, 2007
 5. Umegaki, N., Tamai, K., Nakano, H., Moritsugu, R., Yamazaki, T., Kaneda, Y., Katayama, I., and Hanada, H. Differential regulation of karyopherin alpha2 expression by TGF- β 1 and IFN- γ in normal human keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. **J. Invest. Dermatol.**, in press.
2. 学会発表
 - 1) 金田安史：ウイルスエンベロープを利用した DDS の開発 (平成18年11月20日；第54回日本ウイルス学会学術総会シンポジウム；名古屋)
 - 2) 金田安史：血管・リンパ管をターゲットにした分子治療法の開発 (平成18年6月15日；第26回日本静脈学会総会特別講演；旭川)
 - 3) 金田安史：HVJ-E ベクターと siRNA の組み合わせによる癌治療戦略 (平成18年9月30日；第65回日本癌学会学術総会シンポジウム；横浜)
 - 4) Kaneda, Y. : Progress of Human Gene Therapy in Japan ; Clinical

Trials and Vector Development
(平成18年5月31日；第9回アメリカ
遺伝子治療学会；Baltimore)

作製方法
(発明者：佐賀公太郎、河地正子、玉井克
人、金田安史；出願人；ジェノメディア
(株)、大阪大学) 2006年11月24日出願、
PCT/JP2006/3240489

**G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む）**

1) 改変パラミクソウイルスおよびその

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低侵襲性細胞移植による免疫寛容誘導の試み

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学教授

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。昨年度我々は、マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植法を報告したが、この方法により外来性遺伝子（GFP 遺伝子）導入骨髓細胞移植を行ったマウスに出生後 GFP 発現皮膚の移植を施行し、長期生着に成功した。そのマウスにおける GFP に対する免疫寛容の成立を解析したので報告する。

共同研究者
玉井克人
大阪大学大学院医学系研究科助教授
知野剛直
岐阜大学医学部皮膚科
北島康雄
岐阜大学医学部皮膚科教授

A. 研究目的

先天性表皮水疱症や先天性魚鱗癬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ことが殆どである。そのため、これら重症型遺伝子変異を持つ患者では原因遺伝子産物が先天的に完全欠損していることが多く、欠損蛋白に対する免疫寛容が破綻している可能性が示唆される。遺伝性皮膚疾患に対する遺伝子治療はこれら最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つつ、目的組織における治療用遺伝子発現細胞の長期生存を可能にしないといけない。胎生期に持続発現する抗原に対し、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。昨年度我々は、マウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を確立したが、今回はこれを利用

して胎生期マウスに遺伝子導入骨髓細胞移植を行い、出生後に GFP 発現の移植皮膚の長期生着に成功した。そのマウスの免疫系を解析し、免疫寛容誘導について検討する。

B. 研究方法

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（ 5×10^6 個）を移植し、出生後6週令の移植マウスに GFP 発現の皮膚を背部に移植した。そのマウスにおける GFP に対する抗体の ELISA による測定を行った。また細胞性免疫の誘発の有無を知るために脾臓より分離したリンパ球をまず GFP 発現骨髓細胞で刺激した後、 ^{51}Cr を取り込ませた GFP 発現骨髓細胞とインキュベートし、 ^{51}Cr の放出の測定によって細胞傷害性T細胞のアッセイを施行した。

C. 研究結果

胎生14日目に GFP 骨髓を移植したマウスでは、出生6週後に移植した GFP マウス皮膚片は拒絶されず生着し、また血中抗

GFP 抗体の産生は ELISA にて検出し得なかった。一方コントロール群 (GFP 骨髄移植なし) ではすべて GFP 皮膚移植片は拒絶され、また移植後 6 週目に抗 GFP 抗体の産生が確認された。さらに、胎生期 GFP 骨髄移植マウスに GFP 皮膚を移植しても、上記細胞傷害性 T 細胞アッセイによってまったく ^{51}Cr の放出を認めなかった。骨髄移植を受けなかったマウスにおいてはエフェクター細胞 (リンパ球) をターゲット細胞 (GFP 発現骨髄細胞) 増加させるにつれ高い ^{51}Cr の放出が見られ、エフェクター/ターゲット比が 100 のとき、約 30% の放出であった。

D. 考察

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し、GFP 骨髄由来細胞が皮膚を含む各種組織に生着して維持されることが明らかとなった。胎生期に発現した抗原に対し、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。本研究においても、胎生期に移植した遺伝子導入骨髄細胞は胸腺に生着していることが確認されており、導入遺伝子産物に対して中枢性免疫寛容が誘導されている可能性が示唆される。また、現在我々は、骨髄幹細胞の表皮細胞への形質転換の可能性を見出しつつある。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と皮膚での遺伝子発現を同時に維持することが可能になるかもしれない。

E. 結論

マウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を用い、異種抗原に対する免疫寛容を誘導できた。先天性皮膚疾患の究極治療における有用な方法となると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

1. Kaneda Y., and Tabata, Y. Non-viral vectors for cancer therapy. **Cancer Sci.** 97: 348-354, 2006..
2. Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., and Kaneda, Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 354, 453-458, 2007
3. Kunugiza, Y., Tomita, N., Taniyama, Y., Tomita, T., Osato M.K., Tamai, K., Tanabe, T., Kaneda, Y., Toshikawa, H., and Morishita, R. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. **Gene Therapy**, 13, 1143-1152, 2006.
4. Suvanasuthi, S., Tamai, K. and Kaneda, Y. Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. **J. Gene Medicine**, 9, 55-62, 2007
5. Umegaki, N., Tamai, K., Nakano, H., Moritsugu, R., Yamazaki, T., Kaneda, Y., Katayama, I., and Hanada, H. Differential regulation of karyopherin alpha2 expression by TGF- β 1 and IFN- γ in normal human keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. **J. Invest. Dermatol.**, in press.

2. 学会発表
- 1) 金田安史：ウイルスエンベロープを利用した DDS の開発（平成18年11月20日；第54回日本ウイルス学会学術総会シンポジウム；名古屋）
 - 2) 金田安史：血管・リンパ管をターゲットにした分子治療法の開発（平成18年6月15日；第26回日本静脈学会総会特別講演；旭川）
 - 3) 金田安史：HVJ-E ベクターと siRNA の組み合わせによる癌治療戦略（平成18年9月30日；第65回日本癌学会学術総会シンポジウム；横浜）
 - 4) Kaneda, Y. : Progress of Human

Gene Therapy in Japan ; Clinical Trials and Vector Development（平成18年5月31日；第9回アメリカ遺伝子治療学会；Baltimore）

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1) 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法

（発明者：佐賀公太郎、河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2006年11月24日出願、PCT/JP2006/3240489

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

骨髄細胞移植を利用した栄養障害型先天性表皮水疱症の根治的治療法開発

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根治的治療を可能にするため、骨髄細胞による表皮再生の可能性を検討した。その結果、骨髄由来表皮細胞が、マウス背部に移植した皮膚において毛包および表皮ケラチノサイトに多数存在することを明らかにした。さらに、これら骨髄由来表皮細胞が VII 型コラーゲンを産生し、表皮剥離を抑制することを確認した。これらの結果は、骨髄移植による表皮水疱症の根治的治療の可能性を示すと同時に、自己骨髄細胞への欠損遺伝子導入後、局所あるいは全身的に移植する、骨髄幹細胞遺伝子治療法開発への道を開くと期待される。

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

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法を確立することを目的として、骨髄細胞による表皮再生能および VII 型コラーゲンの産生能を検討した。

B. 研究方法

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て GFP-BMT マウスを作成した。移植骨髄の生着を待って（移植後 6 週間）、新生 VII 型コラーゲンノックアウトマウス皮膚を切除して GFP-BMT マウス背部皮膚に移植した。皮膚移植 2 週後に植皮部皮膚を生検し、GFP 陽性表皮細胞の有無および VII 型コラーゲンの基底膜領域における発現を検討した。

C. 研究結果

1) GFP 陽性骨髄細胞を移植した GFP-

BMTマウス背部に移植した VII 型コラーゲンノックアウトマウス皮膚の再生過程で、骨髄由来 GFP 陽性表皮細胞が新生毛包内および再生表皮内に多数存在することが確認された。さらに、骨髄由来表皮細胞が存在する部位に一致して、VII 型コラーゲンノックアウトマウス皮膚の基底膜領域に VII 型コラーゲンが存在していることが明らかとなった。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症の根治的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、骨髄幹細胞由来表皮細胞の存在について研究を続け、骨髄内に表皮前駆細胞が存在すること、その細胞は移植皮膚片に動員されて、新生毛包内でケラチノサイトへと分化し、さらに再生表皮へケラチノサイトを供給しうることを明らかにした。さらに VII 型コラーゲンノックアウトマウス皮膚を GFP-BMT マウス背部皮膚に移植する実験系を用いることにより、骨髄細胞由来表皮細胞は VII 型コラーゲンを産生して

水疱形成を抑制することが確認された。これらの研究成果は、骨髄移植が栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法に成り得る可能性を示唆すると共に、骨髄内に表皮前駆細胞が存在し、少なくとも移植皮膚片内で機能的表皮角化細胞に分化、増殖し得ることを初めて示すものである。今後この骨髄内表皮前駆細胞の性質が明らかになれば、患者生体内よりこれらの細胞を単離し、VII型コラーゲン遺伝子を導入した後に再度移植することにより、自己造表皮幹細胞を利用した新たな幹細胞遺伝子治療法の確立が可能になると期待される。

E. 結論

骨髄由来表皮前駆細胞の存在と、その細胞を利用した表皮水疱症の根治的治療法開発の可能性が初めて示された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表 (平成18年度)

論文発表

1. Kaneko T, Tamai K, Matsuzaki Y, Yamazaki T, Nakano H, Kon A, Hashimoto I, Hanada K, Kaneda Y, Uitto J. Interferon-gamma down-regulates expression of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene (BPAG1) in epidermal keratinocytes via novel chimeric sequences of ISRE and GAS. **Exp Dermatol**. 2006 Apr;15(4):308-14.
2. Nishikawa T, Nakagami H, Matsuki A, Maeda A, Yo CY, Harada T, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. Development of High-Throughput Functional Screening of Therapeutic Genes, Using a Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vector. **Hum Gene Ther**. 2006 Mar 24; 17(4):470-5.
3. Kunugiza Y, Tomita N, Taniyama Y, Tomita T, Osako MK, Tamai K, Tanabe T, Kaneda Y, Yoshikawa H, Morishita R. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. **Gene Ther**. 2006 Mar 30; 13(15):1143-52.
4. Mima H, Yamamoto S, Ito M, Tomoshige R, Tabata Y, Tamai K, Kaneda Y. Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. **Mol Cancer Ther**. 2006 Apr; 5(4):1021-8.
5. Saito Y, Nakagami H, Morishita R, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. **Circulation**. 2006 Sep 12;114(11):1177-84. Epub 2006 Sep 4.
6. Yasuoka E, Oshima K, Tamai K, Kubo T, Kaneda Y. Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. **J Mol Med**. 2006 Oct 28; [Epub ahead of print]
7. Iwata T, Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Tamai K, Tomita Y. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa caused by a novel G2037R mutation and by a known G2028R mutation in the type VII collagen gene (COL7A1). **J Dermatol**. 2006

- Aug;33(8):550-6.
8. Umegaki N, Tamai K, Nakano H, Moritsugu R, Yamazaki T, Hanada K, Katayama I and Kaneda Y. Differential regulation of karyopherin alpha 2 expression by TGF- β_1 and IFN- γ in normal human epidermal keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. **J Invest Dermatol.** 2007 Jan 25;
 9. Suvanasuthi S, Tamai K and Kaneda Y. Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. **J Gene Med.** 2007 Jan;9(1):55-62.
 10. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007 Mar 9;354(2):453-8. Epub 2007 Jan 10.
 11. Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H, Tamai K, and Kaneda Y. Comparative Roles of Twist-1 and Id-1 in Transcriptional Regulation by BMP Signaling. **J Cell Sci** In press.
- H. 的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 発明の名称：間葉系幹細胞誘導剤及び組織再生促進剤並びに間葉系幹細胞の調整方法、出願番号：特願2006-77243、出願日：2006年3月20日
 2. 発明の名称：骨髄間葉系幹細胞誘導因子とその同定・分離法、出願番号：特願2006-293582、出願日：2006年10月30日
 3. 発明の名称：間葉系幹細胞誘導剤及び組織再生促進剤並びに間葉系幹細胞の調整方法、出願番号：PCT/JP2006/315406、出願日：2006年8月3日

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班
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE) の臨床疫学研究
— 軽症例における遺伝子変異の同定 —

分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 BCIE はケラチン1またはケラチン10の変異により生じる稀少遺伝性疾患であり、生直後より生じる水疱と全身皮膚の潮紅・落屑を特徴とする。遺伝子変異と臨床症状との相関解析は患者の予後を推測するうえで重要となる。今回は最近当科で経験した BCIE 症例について遺伝子変異の同定を試みた。その結果、ケラチン10の R156C の変異が同定された。過去に報告のあったケラチン10の R156C 変異を有する症例はいずれも典型的、もしくは重症例ばかりであったが、一方自験例は軽症例であった。即ち従来と異なった genotype-phenotype 相関が検出された。

共同研究者

春名邦隆、須賀 康

順天堂大学医学部皮膚科

A. 研究目的

BCIE はケラチン1 (K1) またはケラチン10 (K10) の変異により生じる稀少な常染色体優性遺伝性疾患であり、生直後より生じる水疱と全身皮膚の潮紅・落屑を特徴とする。臨床症状は一般に重症であるが、軽症例の報告もあり、遺伝子変異と臨床症状の相関についてはこれまでも議論されてきた。今回は最近経験した BCIE 症例について遺伝子変異を同定し、既報告と比較検討した。

B. 研究方法

新規症例を経験したので、臨床症状を記録すると共に、電顕を含む病理学的検討を行った。また患者の承諾を得た後、通常の方法を用いて、K1 ないし K10 の遺伝子変異を検索した。

C. 研究結果

症例：37歳、男

主訴：四肢関節部の角化性皮疹

家族歴：特記事項なし

現病歴：生下時には全身に潮紅や水疱形成はなく強い乾皮症様を呈していた。小児期より四肢の関節伸側部、屈側部に角化局面を認めるようになった。躯幹は乾皮症様で淡い紅斑と鱗屑を伴っていたという。また毛髪や爪、粘膜は正常とのことであった。

現症：体幹は乾皮症様で軽度潮紅があり魚鱗癬様の鱗屑をびまん性に認める (fig. 1a)。特に肘関節、膝関節では角化性局面と比較的厚い鱗屑がみられた (fig. 1b)。手背、足背部はやや紅色調で軽度の角質肥厚と鱗屑がみられた。一方、掌蹠では hyperlinearity が多少みられる程度であり過角化は明らかではなかった (fig. 1c)。

病理組織像：左膝の角化局面より皮膚生検術を行なった。弱拡大像では著明な表皮肥厚と過角化がみられ (fig. 2a)、強拡大像では好塩基性に染まる大小不規則なケラトヒアリン顆粒がみられ、顆粒変性の像と考えられた (fig. 2b)。

電子顕微鏡像：顆粒細胞の核を取り巻くようにトノフィラメントの凝集塊がみられ、また細胞質内にケラチンランプも認めた (fig. 3)。

遺伝子解析：上記所見より BCIE を考え、遺伝子解析を行なった。白血球からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により増幅した産物をシーケンス用のプライマーを用いて解読した。その結果、K10 遺伝子の 1A 領域において、健常人では 156 番目のアミノ酸は CGC のアルギニンであるが、患者では片方のアレルでそれをシステイン (TGC) へ置換する点突然変異 (466 番の塩基が C から T に 1 塩基変異) が検出された (fig. 4)。

D. 考察

K10 遺伝子の R156C 変異症例はこれまでに 7 症例の報告がある¹⁻⁶⁾。そのいずれもが典型的もしくは重症例であった。一方、今回経験した症例は過去と同じ変異を持つにも関わらず軽症の臨床像を呈し、遺伝子変異と臨床症状の重症度は必ずしも一致しなかった。その理由としては適切なスキンケアの有無、他の遺伝子の多型⁷⁾などが関係する可能性を考えた。なお、掌蹠角化については既報告の 7 例と本症例のすべてでなし、あるいははごく軽度でしかなかった。今後更に本邦症例における情報を集積し、genotype phenotype 解析を進めていく。

E. 結論

これまで報告の無かった、K10 遺伝子の R156C 変異をもつ軽症 BCIE 症例を報告した。

F. 参考文献

1. Rothnagel JA, Fisher MP, Axtell SM *et al.* A mutational hot spot in keratin 10 (KRT10) in patients with epidermolytic hyperkeratosis. *Hum Mol Genet.* 2:2147-2150, 1993.
2. Chipev CC, Yang JM, DiGiovanna

JJ *et al.* Preferential sites in keratin 10 that are mutated in epidermolytic hyperkeratosis. *Am J Hum Genet.* 54:179-190, 1994.

3. Syder A, Yu QC, Paller AS, Giudice G, Pearson R, Fuchs E. Genetic mutations in the K1 and K10 genes of patients with epidermolytic hyperkeratosis. *J Clin Invest.* 93:1533-1542, 1994.

4. Yang JM, Nam K, Kim SW *et al.* Arginine in the beginning of the 1A rod domain of the keratin 10 gene in the hot spot for the mutation in epidermolytic hyperkeratosis. *J Dermatol Sci.* 19:126-133, 1999.

5. McLean WH, Morley SM, Higgins C *et al.* Novel and recurrent mutations in keratin 10 causing bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Exp Dermatol.* 8:120-123, 1999.

6. Saeki H, Hattori N, Mitsui H *et al.* A keratin 10 gene mutation (Arg156Cys) in a Japanese patient with bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *J Dermatol.* 29:168-171, 2002.

7. Yasukawa K, Sawamura D, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu H. Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly. *J Biol Chem.* 277:23670-23674, 2002.

G. 健康危険情報

なし。

H. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Shiraki Y, Hiruma M, Hirose N, Sugita T and Ikeda S: A nationwide survey of Trichophyton tonsurans infection among combat sport club members in Japan using a questionnaire form and the hairbrush method. **J Am Acad Dermatol.** 54:622-6, 2006.
2. Kondo M, Nakano N, Shiraki Y, Hiruma M, Ikeda S, et al: A Chinese-Japanese boy with black dot ringworm due to Trichophyton violaceum. **J Dermatol.** 33:165-8, 2006.
3. Haruna K, Shiraki Y, Hiruma M, Ikeda S, et al: A case of lymphangitic sporotrichosis occurring on both forearms with a published work review of cases of bilateral sporotrichosis in Japan. **J Dermatol.** 33:364-7, 2006.
4. Mizuno Y, Suga Y, Hasegawa T, Haruna K, Kohroh K, Ogawa H, Ikeda S, et al: A case of peeling skin syndrome successfully treated with topical calcipotriol. **J Dermatol.** 33:430-2, 2006.
5. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, et al: Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinase p38 and ERK in mast cells. **J Dermatol Sci.** 43:63-6, 2006.
6. Shiraki Y, Hiruma M, Matsuba Y, Kano R, Makimura K, Ikeda S, et al: A case of tinea corporis caused by Arthroderma benhamiae (teleomorph of Tinea mentagrophytes) in a pet shop employee. **J Am Acad Dermatol.** 55:153-4, 2006.
7. Takagi A, Nishiyama C, Kanda S, Niwa Y, Fukuyama K, Ikeda S, et al: Prolonged MHC class II expression and CIITA transcription in human keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 25:388-93, 2006.
8. Shiraki Y, Hiruma M, Kano R, Miyamoto C and Ikeda S: Case of tinea capitis caused by Trichophyton mentagrophytes (molecular type Arthroderma benhamiae): prevalence of a new zoonotic fungal infection in Japan. **J Dermatol.** 33:504-6, 2006.
9. Pongpermdee S, Takagi A, Mayuzumi N, Ogawa H, Ikeda S, et al: Expression of SERCA2 (Darier's disease gene product) in acantholytic dermatoses. **J Dermatol Sci.** 43:146-9, 2006.
10. Fan P, Gao T, Li M, Liao W, Fu M, Liu Y and Ikeda S: A case of impetigo herpetiformis associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. **J Dermatol.** 33:563-6, 2006.
11. Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, et al: Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. **J Immunol.** 177:1609-17, 2006.
12. Mizuno Y, Suga Y, Haruna K, Muramatsu S, Hasegawa T,

- Kohroh K, Shimizu T, Komatsu N, Ogawa H and Ikeda S: A case of Japanese neonate with congenital ichthyosiform erythroderma diagnosed as Netherton syndrome. **Clin Exp Dermatol.** 31:677-80, 2006.
13. Nakamura T, Sekigawa I, Ogasawara H, Mitsuishi K, Hira K, Ikeda S, et al: Expression of DNMT-1 in patients with atopic dermatitis. **Arch Dermatol Res.** 298:253-6, 2006.
 14. Komatsu N, Suga Y, Saijoh K, Liu AC, Khan S, Mizuno Y, Ikeda S, et al: Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes. **J Invest Dermatol.** 126: 2338-42, 2006.
 15. Hasegawa T, Matsukura T, Mizuno Y, Suga Y, Ogawa H and Ikeda S: Clinical trial of a laser device called fractional photothermolysis system for acne scars. **J Dermatol.** 33:623-7, 2006.
 16. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A and Ikeda S: Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **J Med Microbiol.** 55:1175-85, 2006.
 17. Kikuchi Y, Takai T, Ota M, Kato T, Takeda K, Mitsuishi K, Ikeda S, et al: Application of immunoreaction enhancer solutions to an enzyme-linked immunosorbent assay for antigen-specific IgE in mice immunized with recombinant major mite allergens or ovalbumin. **Int Arch Allergy.** 141:322-30, 2006.
 18. Nakano N, Hiruma M, Shiraki Y, Chen X, Porgpermdée S and Ikeda S: Combination of pulse therapy with terbinafine tablets and topical terbinafine cream for the treatment of dermatophyte onychomycosis: a pilot study. **J Dermatol.** 33:753-8, 2006.
 19. Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T, Okumura K, Ikeda S, et al: Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite major allergen Der f 1. **J Invest Dermatol.** 126: 2719-23, 2006.
- 日本語論文
1. 水野優起、須賀康、春名邦隆、上郎一弘、村松重典、矢口均、小川秀興、池田志孝ほか：順天堂大学皮膚科角化症専門外来で経験した小児 Netherton 症候群 4 症例の検討、日皮会誌、116: 1319-1331, 2006.
- I. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
25. 特許取得
特になし
 26. 実用新案登録
特になし
 27. その他
特になし

図とその説明

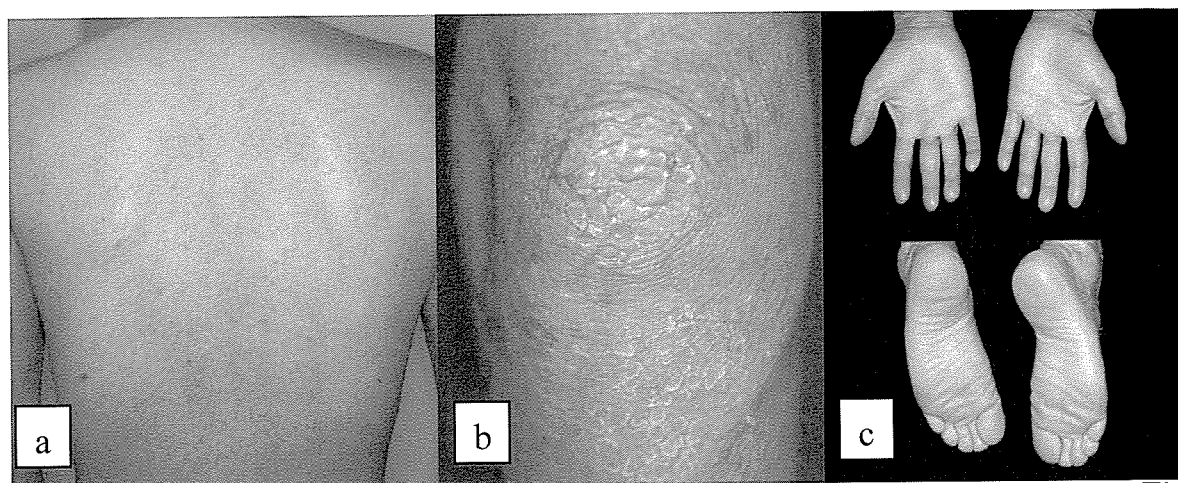


Fig.1

Fig. 1 : a. 体幹の臨床像、b. 左肘部の臨床像、c. 掌蹠の臨床像

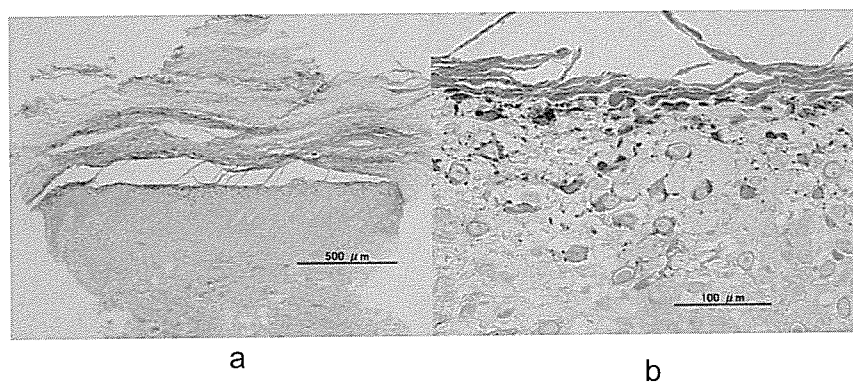


Fig.2

Fig. 2 : HE染色所見 a. 弱拡大, b. 強拡大

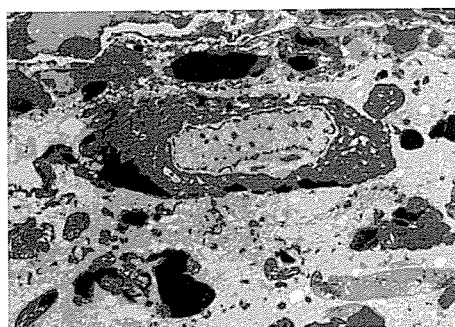


Fig.3

Fig. 3 : 電顕像

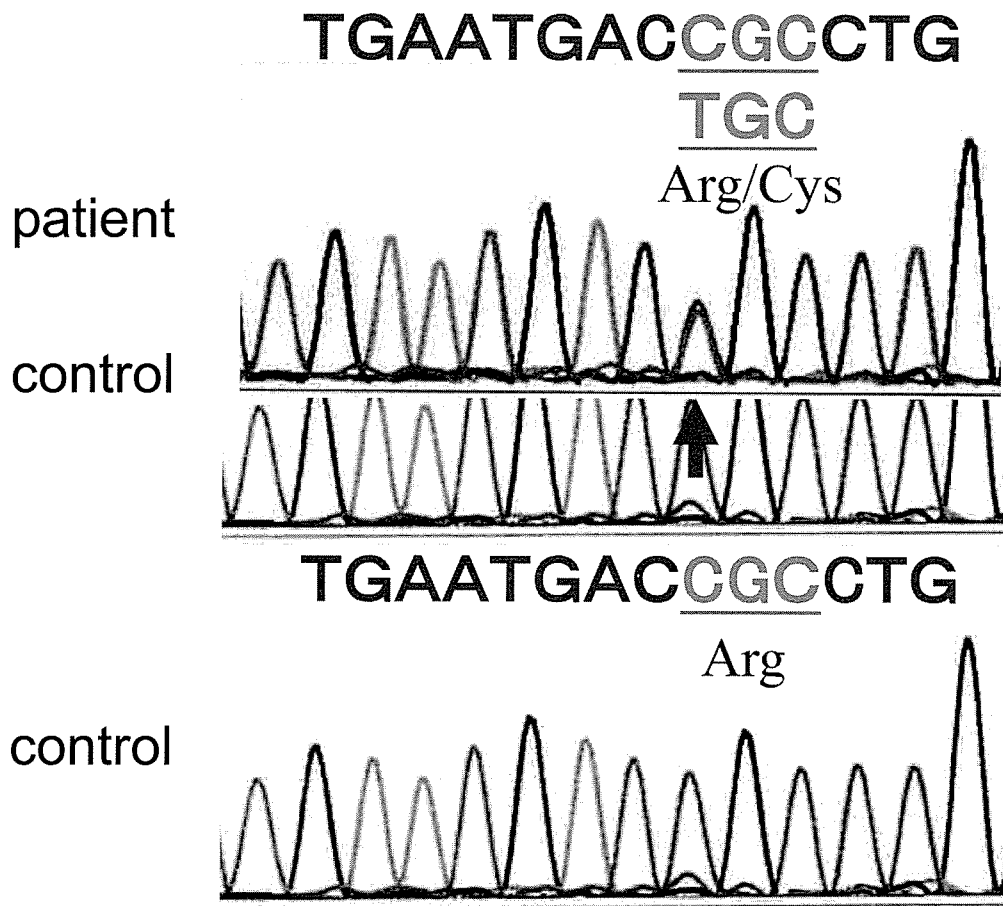


Fig.4

Fig. 4：ケラチン10遺伝子のダイレクトシーケンスの結果 patient と control

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

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症における皮疹形成機序と治療に関する研究

分担研究者 小宮根真弓 東京大学医学部附属病院皮膚科・講師

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症は、ケラチン K1 あるいはケラチン K10 遺伝子の異常により発症することが知られているが、その皮疹の形成メカニズムについては、未知の部分が多い。これまでに我々は、機械的刺激が正常ヒト表皮角化細胞に与える影響について報告してきたが、今回は、正常ヒト表皮角化細胞に正常および変異ケラチン K1 を強制発現させることにより、炎症性サイトカインや細胞成長因子の発現に与える影響について検討した。その結果、変異ケラチン K1 導入により、basic FGF 産生が亢進することが認められ、これが、BCIE におけるマスト細胞の増数、表皮肥厚、血管増生に関与している可能性が考えられた。

共同研究者
花川 靖
愛媛大学医学部皮膚科
橋本 公二
愛媛大学医学部皮膚科
大河内仁志
国立国際医療センター研究所
再生医療研究部
Miroslav Blumenberg
Department of Dermatology
New York University Medical Center
玉置邦彦
東京大学医学部附属病院皮膚科

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）は、ケラチン 1 あるいはケラチン 10 の遺伝子異常により生じる遺伝性疾患である。変異の部位によって、臨床症状に違いがある。ケラチンは中間径フィラメントに属する細胞骨格蛋白のひとつであり、表皮細胞の形状を維持し、外界からの機械的刺激に対して細胞を守る働きがあると考えられる。変異ケラチンでは、その正常機能が阻害されていると考えられる。水疱型先天性魚鱗癬

様紅皮症におけるケラチン K1 遺伝子異常が、病変形成にどのように関わっているのか、また機械的刺激は病変形成にどの程度関与しているのかについて、遺伝子導入をした細胞に機械的刺激を加えることにより、その形態変化、産生されるサイトカイン、シグナル伝達機構について検討する。最終的には siRNA などにより異常ケラチンの発現を抑える方法を検討し、siRNA が治療に応用できるか否かについて検討することが目的である。

今回、BCIE 患者皮疹部真皮乳頭層部において、マスト細胞の増数を確認した。ケラチン K1 遺伝子変異によるマスト細胞増数の機序について検討したので報告する。

B. 研究方法

1) 変異ケラチンベクターの作成

ATCC より購入したヒトケラチン 1 遺伝子を、まず GFP ベクターにサブクローニングし典型的な重症水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症を生じることが報告されている、1 A ドメインの変異を作成した。さらに、軽症の水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症を生じることが報告されている、2 B ドメインの

変異を作成した。

2) これらの GFP 発現ベクターを、アデノウィルスに導入し、アデノウィルスベクターを作成した。

3) ケラチン K1 野生型および変異アデノウィルスベクターを正常ヒトケラチノサイトに導入し、上清中のサイトカイン、ケモカインを ELISA 法にて検討した。

4) 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者皮膚において、MAST 細胞数を確認するため、トルイジンブルー染色を行った。また basic FGF の発現をみるため、ホルマリン固定パラフィン包埋標本にて、抗 bFGF 抗体を用いて、免疫染色を行った。

C. 研究結果

1) 手掌に病変をもつ BCIE 患者の手掌皮膚組織像では、BCIE に特徴的な顆粒変性、過角化、表皮増殖に加え、真皮上層の血管造生、軽度の細胞浸潤が認められる(図 1)。トルイジンブルー染色にて異染性を示すマスト細胞画像数しているのが観察された(図 2)。トルイジンブルー染色、ナフトール ASD 染色にて、マスト細胞数の評価を行ったところ、正常人の手掌皮膚と比べ、マスト細胞数が増数していた(図 3)。ケラチン K9 に変異を持ち、BCIE と同様に顆粒変性を認める Vörner 型掌せき角化症患者の手掌皮膚でも同様にマスト細胞数を計測したところ、やはり正常人に比べて増数が認められた(図 3)。

2) アデノウィルスベクターを用いて、変異ケラチン K1 および野生型ケラチン K1 を正常ヒトケラチノサイトに導入し、これらの細胞の培養上清を用いて、ELISA 法にてマスト細胞遊走に参与する因子を測定した。

CTACK、TNF α 、VEGF、SCF 産生は、野生型、変異型の間で差を認めなかった。Basic FGF では、変異型ケラチン K1 導入ケラチノサイトは野生型ケラチン K1 導入ケラチノサイトに比べ、約 1.5 倍の

値を示した(図 4)。

3) BCIE および Vörner 型掌せき角化症患者の手掌皮膚を用いて、免疫染色にて basic FGF の局在を検討したところ、正常人手掌皮膚では、表皮の有棘層上層から顆粒層にかけて染色されるのに対し、BCIE および Vörner 型掌せき角化症患者皮膚では、基底層に強く染色された(図 5)。

D. 考察

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE) 患者の病変部手掌皮膚におけるマスト細胞数の増数はこれまでに報告がない。BCIE 患者はしばしば掻痒を訴えるが、掻痒の原因として、これら増数したマスト細胞からのヒスタミンなどの起痒物質が関与している可能性が考えられる。

マスト細胞遊走因子のうち、今回検討した中では、basic FGF が、変異ケラチン導入ケラチノサイトで、野生型導入ケラチノサイトに比べ、産生が亢進していた。さらに、免疫染色にて、表皮基底層での basic FGF 発現増強が示された。基底層ではケラチン K1 は通常発現しておらず、基底層における bFGF 発現増強のメカニズムは不明であるが、bFGF はマトリックスに沈着しやすい性質があるため、有棘層において産生されたものが、基底細胞層に沈着している可能性が考えられる。Basic FGF は、創傷治癒促進作用、血管新生作用についてよく知られており、臨床応用もされているが、マスト細胞遊走能をもち、さらに表皮細胞増殖促進作用も報告されている。これらのことから、BCIE や掌せき角化症における表皮肥厚、真皮乳頭層の血管増生、マスト細胞数の増加に参与している可能性が考えられる。

E. 結論

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の皮疹形成に関して、表皮細胞から産生される basic FGF が、表皮肥厚、真皮乳頭層血管増生、

マスト細胞の遊走に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

- 13) Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Nakamura K, Tsunemi Y, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. CCL28 production in HaCaT cells was mediated by different signal pathways from CCL27. **Exp Dermatol** 15:95-100, 2006
- 14) Komine M, Karakawa M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Asahina A, and Tamaki K. Early inflammatory changes in the “peri-lesional skin” of psoriatic plaques: Is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? **J Invest Dermatol** 2007 (in press)
- 15) Kikuchi K, Komine M, Takekoshi T, Tamaki K. Serum uric acid levels in patients with vitiligo receiving narrowband ultraviolet B phototherapy. **Clin Exp Dermatol** 32:107-8, 2007
- 16) Masui Y, Sugaya M, Kagami S, Fujita H, Yano S, Nagao M, Komine M, Saeki H, Ihn H, Kikuchi K, Tamaki K. Sezary syndrome treated with narrowband ultraviolet B: time-course measurement of serum levels of CCL17/CCL27. **Clin Exp Dermatol** 32:57-9, 2007
- 17) Saeki H, Nakamura K, Tsunemi Y, Komine M, Tamaki K. Novel mutation (Asp158Val) in H1 domain of keratin 5 gene in a Japanese patient with Kobner-type epidermolysis bullosa simplex. **J Dermatol** 33:692-5, 2006
- 18) Kuwano Y, Watanabe R, Fujimoto M, Komine M, Asahina A, Tsukada N, Tamaki K. Treatment of HIV-associated eosinophilic pustular folliculitis with narrow-band UVB. **Int J Dermatol** 45:1265-7, 2006
- 19) Hattori N, Komine M, Kaneko T, Shimazu K, Tsunemi Y, Koizumi M, Goto J, Hashimoto T. A case of epidermolysis bullosa simplex with a newly found missense mutation and polymorphism in the highly conserved helix termination motif among type I keratins, which was previously reported as a pathogenic missense mutation. **Br J Dermatol** 155:1062-3, 2006
- 20) Shimazu K, Tsunemi Y, Hattori N, Saeki H, Komine M, Adachi M, Tamaki K. A novel keratin 9 gene mutation (Met156Arg) in a Japanese patient with epidermolytic palmoplantar keratoderma. **Int J Dermatol** 45 (9) :1128-30, 2006
- 21) Nakashima H, Komine M, Sasaki K, Mitsui H, Fujimoto M, Ihn H, Asahina A, Kikuchi K, Tamaki K. Necrolytic migratory erythema without glucagonoma in a patient with short bowel syndrome. **J Dermatol** 33:557-62, 2006
- 22) Takekoshi T, Asahina A, Komine M, Tamaki K. Treatment of psoriasis vulgaris with narrow-band UVB and topical Maxacalcitol.

Acta Derm Venereol. 86:375-6, 2006

- 23) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Nagakubo D, Nakayama T, Yoshie O, Kagami S, Shimazu K, Kadono T, Sugaya M, Komine M, Matsushima K, Tamaki K. CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. *Eur J Immunol* 36:2116-27, 2006
- 24) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Activation of Akt by mechanical stretching in human epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol* 15:356-61, 2006
- 25) Tada Y, Asahina A, Takekoshi T, Kishimoto E, Mitsui H, Saeki H, Komine M, Tamaki K. Interleukin 12 production by monocytes from patients with psoriasis and its inhibition by ciclosporin A. *Br J Dermatol* 154:1180-3, 2006

日本語論文

- 4) 嶋津苗胤、常深祐一郎、服部尚子、佐伯秀久、小宮根真弓、玉置邦彦、足立真、今門純久：ケラチン9遺伝子の1A領域に新規点突然変異（Met156 Arg）を認めた Voerner 型掌蹠角化症の1例、角化症研究会記録集20;151-153、2006.03.
- 5) 小宮根真弓、矢野正一郎、南谷洋策、常深祐一郎、玉置邦彦、Blumenberg Miroslav、大河内仁志：表皮細胞に対する機械的伸展刺激の作用、角化症研究会記録集20;48-51, 2006.03.

学会発表

- 1) Mayumi Komine, Shoichiro Yano, Hitoshi Okochi, Miroslav Blumenberg, Kunihiro Tamaki:

Mechanical stretch induces extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and actin-related cytoskeleton proteins, by regulating Rho, cdc42 and Rac family gene expression in normal human keratinocytes. 第67回米国研究皮膚科学会、2006年5月、フィラデルフィア、アメリカ合衆国。

- 2) Komine M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani M, Saeki H, Asahina A, Tamaki K. Immunohistochemical characterization of the marginal lesion of psoriatic plaques, 第31回日本研究皮膚科学会、平成17年6月、京都。
- 3) Komine M, Deng D, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani M, Saeki H, Asahina A, Tamaki K, Immunohistochemical Study of NB-UVB-treated Skin of Psoriasis Patients、第9回日本・中国合同皮膚科学会、平成17年9月、成都、中国。
- 4) 小宮根真弓、花川 靖、常深祐一郎、佐々木苗胤、大河内仁志、橋本公二、玉置邦彦：水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者に関する表皮細胞からの basic FGF 産生について、basic FGF 研究会、平成17年10月、東京。
- 5) 小宮根真弓、The effects of Mechanical Stress on Epidermal Keratinocytes、九州基礎皮膚科研究会、平成17年12月16日、福岡。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

28. 特許取得
該当なし。
29. 実用新案登録
該当なし

図とその説明

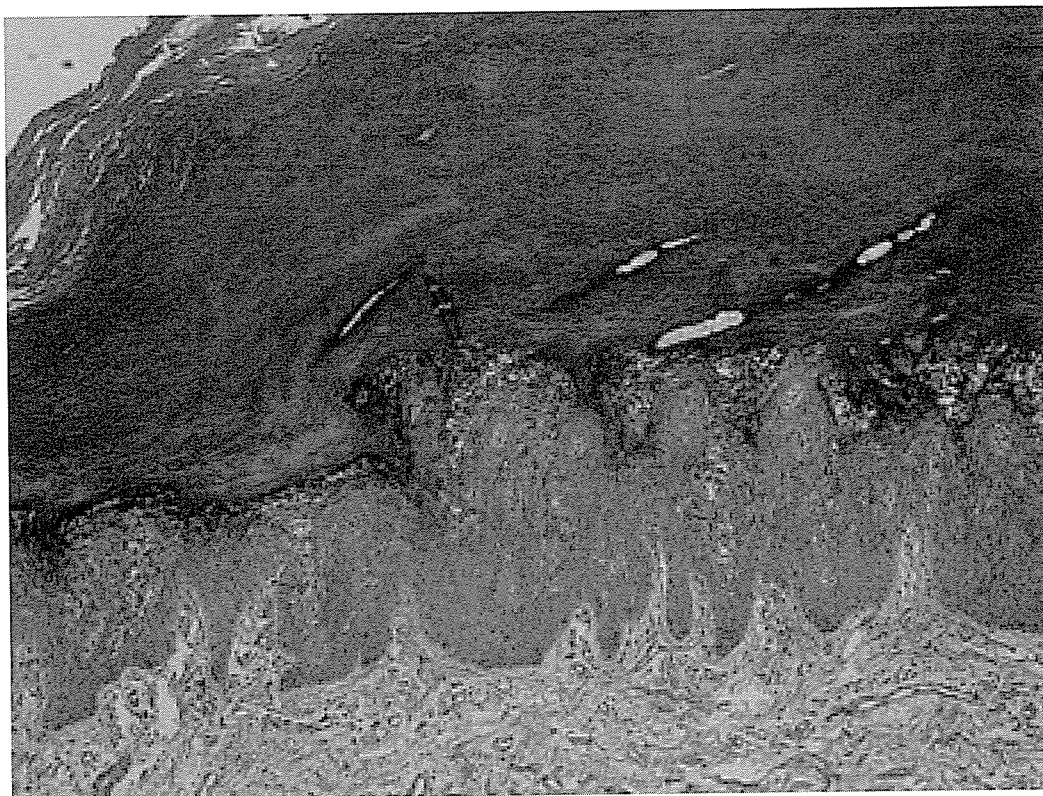
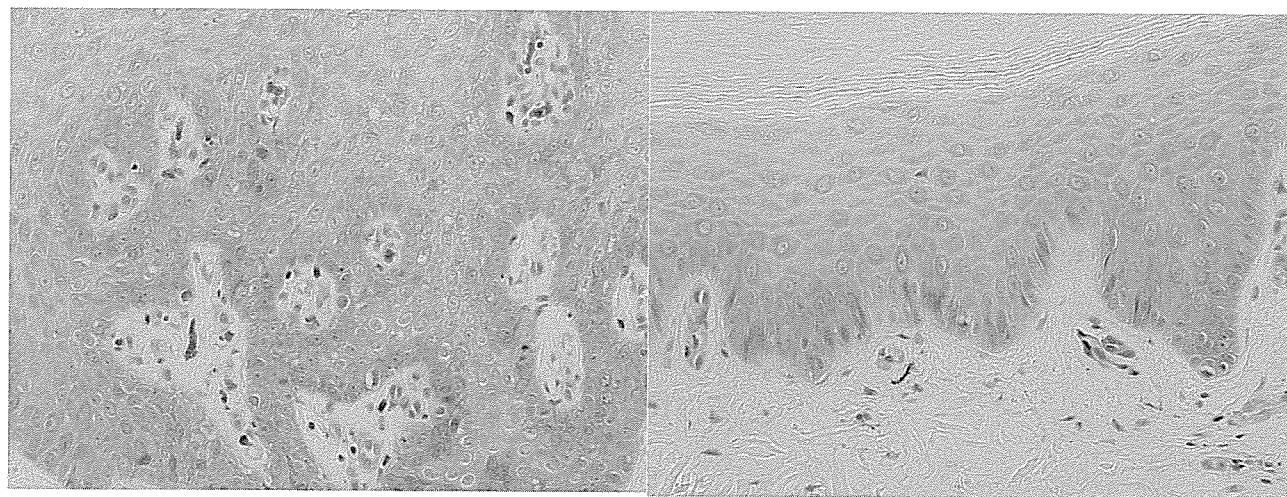


図1：BCIE 患者手掌皮疹部のヘマトキシリン/エオジン染色組織像。

表皮の過角化、表皮増殖、顆粒変性に加え、真皮上層の血管拡張、血管周囲の細胞浸潤を認める。

トルイジンブルー染色



BCIE with K1 mutation

Normal control

図 2 : BCIE 患者手掌皮疹部において、トルイジンブルーに異染性を示すマスト細胞が、正常ヒト手掌皮膚に比べ増加しているのが観察された。