

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 北 島 康 雄

平成 20 (2008) 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	31
IV	別添資料 1 要点スライド形式	79
V	別添資料 2 診断治療ガイドライン2008	99

# I 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系研究科病態制御学講座・皮膚病態学	教授	総括、天疱瘡、先天性表皮水疱症
分担研究者 橋本 隆	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	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授	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皮膚・粘膜・結合織学分野	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
許 南浩	岡山大学大学院医歯学総合研究科細胞生物学	教授	膿疱性乾癬（発症機序）
小宮根真弓	自治医科大学皮膚科	准教授	膿疱性乾癬（発症機序）、先天性魚鱗癬様紅皮症
清水 宏	北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野	教授	先天性表皮水疱症（遺伝子診断）
橋本 公二	愛媛大学医学部皮膚科学	教授	先天性表皮水疱症（再生医療治療）
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	難治性皮膚疾患の遺伝子治療
池田 志孝	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（発症機序と統計）
山本 明美	旭川医科大学皮膚科	准教授	先天性魚鱗癬様紅皮症（発症機序）
黒沢美智子	順天堂大学医学部衛生学	准教授	天疱瘡、膿疱性乾癬 先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症（統計学、疫学）

研究協力者 新関 寛徳	奈良県立医科大学皮膚科学	講師	天疱瘡（病因遺伝子と治療）
小澤 明	東海大学医学部専門診療学系皮膚科学	教授	膿疱性乾癬（病因遺伝子と治療）
照井 正	日本大学医学部皮膚科	教授	膿疱性乾癬（発症機序と治療）
玉井 克人	大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学	准教授	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学講座	講師	先天性魚鱗癬様紅皮症、ケラチン病の病態
青山 裕美	岐阜大学医学部附属病院皮膚病態学	講師	天疱瘡（発症機序）

## 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系研究科病態制御学講座 皮膚病態学分野 教授

**研究要旨** 本研究は、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（①②③は難病指定）について診断基準の見直し、疫学的（特定治療研究対象疾患臨床調査個人票データベース利用）研究による患者数と治療状態の実体の把握、さらに原因遺伝子と臨床表現型との相関の解析、原因遺伝子、自己抗体産生から発症までの機序の分子生物学的解明、よって重症度判定、治療法、治療指針の改良と開発および診療ガイドラインの策定を研究目標とする。これは平成17年度からの3年計画の3年間の総合報告書である。（1）上記4疾患に加え類天疱瘡に関する診断と治療に関するガイドラインを、新しくEBMに基づいたガイドラインをほぼ完成に近い形で案としてまとめた（別添え2，ガイドライン参照）。（2）学的研究による患者数と治療状態の実体の把握、発症分子病態の解明、原因遺伝子の解析と臨床系の相関、原因遺伝子から発症までの機序、これらに基づく培養皮膚移植治療法と遺伝子治療法の開発という大きな目的に対して、上述したように本研究の3年計画の目標はほぼ達せられ、次期研究班研究への研究指針が得られたと考える。（3）遺伝子治療では、骨髄由来表皮ケラチノサイトの存在と、その細胞を利用した表皮水疱症の根治的治療法開発に道筋が得られた。また、HVJ-Eベクターに組織特異的な標的能を賦与する全く新しい方法を開発した。遺伝子発現の長期化のための技術と合体させれば、遺伝性皮膚疾患の治療にも貢献できることが予想される。

また、3年間、毎年臨床調査個人票データの利用申請を行い、入手したデータで稀少難治性皮膚疾患の受給者全体の疫学的特性（性・年齢分布等）、臨床医学的特性（病型別分布・重症度分布・症状・所見等）を示した。患者の予後（症状変化、治癒軽快、死亡等の把握）の分析方法を検討し、現在のデータの問題点を示した。治療ガイドライン作成に資するため、受給者の治療の実態を示した。この3年間で集積された科学的知見は、稀少難治性皮膚疾患の治療成績等の向上を図り、患者の医療、福祉改善に大きく寄与出来るものと考えられる。

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 教授

岩月啓氏

岡山大学大学院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 准教授

小宮根真弓

自治医科大学皮膚科 准教授

黒沢美智子

順天堂大学医学部衛生学 准教授

#### 研究協力者名（所属機関名）

小澤 明（東海大学医学部皮膚科 教授）

照井 正（日本大学医学部皮膚科 教授）

島田眞路（山梨大学医学部皮膚科 教授、平成17、18年度のみ）

新関寛徳（奈良県立医科大学 准教授）

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 准教授）

米田耕造（香川大学医学部皮膚科 講師）

青山裕美（岐阜大学医学部附属病院皮膚科 講師）

#### A. 研究目的

稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成17年度から19年度までの対象疾患は、①天疱瘡、②膿疱性乾癬、③表皮水疱症の特定治療研究対象疾患と④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（難病克服研究事業対象疾患）である。

本研究の目的は、1) この3年間で一応のEBMに基づいた診断と治療のガイドラインを作ることと、2) 以下に各疾患毎に記載した病態解明と治療法の開発および疫学調査である。

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、難治性で未だ1割は死に至る非常に悲惨な疾患である。自己抗体抗原分子と病原性モノクローナル抗体は確立されたが、抗体発生と水疱形成機序は不明である。病原性抗体 ELISA 値は保険適応まで開発したがこれに基づく的確な治療指針はない。

本研究は天疱瘡モデルマウスを用いた分子医学的天疱瘡水疱形成機序および病的抗体産生の免疫学的機序の解明から治療法に迫る。難病受給者票データベースを利用し、疫学特性を明らかにする。

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原因発症機序不明の疾患である。過去に疫学と一応の治療指針を作成したが不完全である。1) 膿疱の形成機序を炎症制御機構異常とケラチノサイト機能との関係を明らかにし、治療法を開発する。2) EBM 診断・治療指針の再評価し改訂する。3) 難病受給者票データベースで疫学特性を明らかにする。

③表皮水疱症は、重症例では全身の水疱と瘢痕により合指、四肢の運動制限のため極めてQOLの悲惨な状態になる。1) 病因VII型コラーゲン遺伝子の変異点 genotype/phenotype 解析し発症機序を解明する。2) 出生前診断指針の確立、3) 修復または欠損遺伝子導入再生表皮および幹細胞を用いた遺伝子治療法を細胞、動物レベルで解析する。4) 難病受給者票データベースを利用し、疫学特性を明らかにする。

④水疱型先天性魚鱗癬紅皮症は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。1) 病因ケラチン遺伝子の変異点 genotype/phenotype 解析に基づく発症機序を解析する。2) 基本的治療は③と同様な研究が必須である。3) 前期3年間で全国規模の疫学解析を本邦で初めて行い受診患者は年間55人と推計されたが、QOL 調査は行われていないので行う。

なお、これら4疾患は患者数が少なく疫学と治療研究を行うには班研究としてでしか十分な経験が得られないため、①②では副作用のない良い治療法の開発、③④は遺伝子治療、皮膚再生治療の厚労省主導の班会議研究は厚生行政に貢献し、稀少難治性皮膚疾患患者の

保険・医療・福祉に大きく貢献する。

## B. 研究方法

### 1) 疾患別診断・治療ガイドライン

ガイドラインの作成は小グループ分担割り当てとし、最初の1年は従来のガイドライン作成を基本に開始したが、2年からはEBMに基づいたガイドライン作成法に変更し、改良を加わえた。

### 2) 各疾患の病態解明と診断・治療法の開発および疫学調査 疾患別に以下に示すごとく行った。

#### ①天疱瘡

(1) Desmoglein3<sup>-/-</sup>マウス両足底を組み換え Dsg3 タンパクで免疫し、その膝窩リンパ節細胞を抗原提示細胞存在下で組み換え Dsg3 タンパクにより繰り返し刺激し、限界希釈法で Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立した。得られた Dsg3 反応性 T 細胞株の病原性の有無は Dsg3<sup>-/-</sup>B 細胞と共に免疫不全マウスに移入した後のマウス口蓋粘膜における IgG 沈着や棘融解像の有無および抗 Dsg3 抗体産生から判断した。さらに、個々の T 細胞株の CD4/CD8 フェノタイプ、MHC 拘束性、T 細胞エピトープ、サイトカイン産生能、ケモカイン受容体発現パターン、T 細胞受容体遺伝子を決定した。病原性の有無により T 細胞株の特性を比較し、病原性と関連する分子を統計学的に抽出した。B 細胞からの抗 Dsg3 抗体産生にサイトカインが与える影響を検討するため、免疫した Dsg3<sup>-/-</sup>マウス脾臓から磁気ビーズを用いて B 細胞を単離し、可溶性 CD40L 存在下で IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  それぞれを添加し 7 日間培養後、培養上清中の IgG 抗 Dsg3 抗体価を ELISA で測定した(天谷)。

(2) 患者天疱瘡抗体で活性化される細胞内シグナル伝達経路の Dsg3 モノクローナル抗体による活性化を検討し、Dsg3 消失機序を

解析した(北島、研究協力者:青山裕美)。患者天疱瘡抗体で活性化される細胞内シグナル伝達経路を AK23 抗体でも解析した(北島)。

(3) IgG/IgA 天疱瘡における自己抗原の微小局在を postembedding 金コロイド免疫電顕にて検討した。②尋常性天疱瘡患者におけるプレドニゾロンとミゾリビン併用療法を解析し、この治療法の有効性を検討した。③久留米大学皮膚科における最近11年間の天疱瘡患者を統計的に解析し、患者背景について検討した。④久留米大学皮膚科における本年度の腫瘍随伴性天疱瘡患者について、各種の蛍光抗体法、免疫ブロット法、Dsg3 スワッピング分子を用いたエピトープマッピングにより検討した。⑤天疱瘡の病変皮膚における Th-17 細胞と制御性 T 細胞について、組織化学的手法により検討した。⑥寛解後も ELISA Dsg3 高値であった尋常性天疱瘡について各種の蛍光抗体法、免疫ブロット法、Dsg3 スワッピング分子を用いたエピトープマッピングにより検討した。⑦水疱性類天疱瘡の治療ガイドラインの Q & A を作成した(橋本隆)。

(4) ゲノムワイドな遺伝子マーカーを設定し、case-control study による相関解析(ゲノムワイドスキャン)により網羅的に発症感受性遺伝子を同定する(東海大学医学部分子生命科学猪子英俊教授において実施予定)。全国11施設より患者血液試料を一端奈良県立医科大学に保存し、300例を越えた時点で遺伝子解析を行う。候補遺伝子解析に関しては、デスモグレイン3遺伝子について6つの SNP を選択し、尋常性天疱瘡患者 100 例、健常人 100 例について1分子蛍光測定法を用いた SNP タイピングを行った(研究協力者、新関)。

(5) 厚労省難病受給者票データベースを利用するための承認申請と臨床医学的特性を示す H13 年以降の臨床調査個人票データを毎年厚労省に申請し、入手した。得られたデータ

で疾患受給者の臨床疫学像(性・年齢分布、発症年齢、病型別分布、症状、有所見割合、重症度別分布、日常生活)を示した。特定疾患疫学班と連携し、予後(症状変化、治癒軽快、死亡等の把握)の分析方法を検討し、現在のデータの問題点を示した。また当班の中で今後どのような利活用が可能で望ましいかを検討した。(池田、黒沢)。

## ②膿疱性乾癬

(1) 研究班にて収集した症例および特定疾患個人調査表データを用いた全国調査(厚生労働省に対してデータ借用の許可あり)により、膿疱性乾癬患者の臨床疫学データ解析結果を元にして、診断基準と重症度判定基準を作成した(岩月、池田、黒沢、研究協力者:小澤)。

(2) 改訂した診断基準と重症度判定基準を元にして、EBMの手法に準拠して治療ガイドラインを作成した(岩月委員長、別添え2,ガイドライン参照)。

(3) マイクロサテライトを用いた乾癬関連遺伝子解析の中から膿疱性乾癬に関連した遺伝子群を抽出し、解析した(研究協力者:小澤)。

(4) 膿疱性乾癬の病態の根幹となる事象について分子レベルでの解明した(岩月、許、照井、小宮根)。

(5) 膿疱性乾癬の診断と病態解明につながる新規バイオマーカーの意義について検討した(岩月、許、照井、小宮根)。

(6) 膿疱性乾癬治療のアウトカムをSF36を用いたQOL調査で解析した(岩月)。

## ③表皮水疱症

(1) 表皮水疱症患者の病変やDNAから遺伝子変異を同定し臨床と比較検討する(清水)

(2) 出生前診断の適応基準の作成を行う

(3) 表皮水疱症の新規治療、遺伝子治療法開発

(a) 皮膚基底細胞抗原である desmoglein

3 (Dsg3) に対する抗体のハイブリドーマより抗体遺伝子を分離し、一本鎖抗体を作製した。HVJのF蛋白遺伝子の様々な欠失変異体を作製し、これとGFP遺伝子とのキメラ遺伝子を培養細胞に発現させ、細胞膜上にキメラGFPを発現させるF変異体を同定し、この遺伝子と一本鎖抗体遺伝子を融合してキメラ遺伝子を構築し、これをサル腎臓細胞(LLCMK2)に導入して安定に発現する細胞クローンを分離した。これにwild-type HVJを感染させて、産生されるHVJを回収し、キメラ蛋白の挿入を免疫電顕、western blotで確認し、Dsg3に対する結合をELISAで測定した。またDsg3強発現NIH3T3細胞への感染をF蛋白の免疫染色で検証した。次いで、キメラHVJを紫外線で不活性化し、封入剤を用いてVII型コラーゲン発現プラスミドを封入し、キメラHVJ envelope vector (HVJ-E) を作製した。遺伝子表皮水疱症のモデルであるVII型コラーゲン遺伝子欠失マウスの水疱内にキメラHVJ-Eを導入し、VII型コラーゲン遺伝子発現を免疫染色とRT-PCRで調べた。

GFP遺伝子トランスジェニックマウスより骨髓を採取し、野生型同系マウスに移植してGFP-BMTマウスを作成した。移植骨髓の生着を待って(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陽性ケラチノサイトの有無およびVII型コラーゲンの基底膜領域における発現を検討した(金田)。

(b) 骨髓由来ケラチノサイト形成機序に細胞融合が関与しているかどうかを知る目的で、雄マウスGFP骨髓を雌マウスに移植し、このマウス背部に雌VII型コラーゲンノックアウトマウス皮膚を移植した。植皮部GFP陽性骨髓由来ケラチノサイトの性染色体を解析

した。さらに、遺伝子工学的手法を利用して細胞融合性ケラチノサイトのみが選択的にGFP陽性となるマウスを作製し、骨髄由来ケラチノサイト形成における細胞融合機序の有無を検討した（研究協力者：玉井）。

（c）移植皮膚片に骨髄由来ケラチノサイトが形成される分子機構を解明するため、皮膚抽出液中の骨髄細胞動員活性物質を生化学的精製手法を用いて探索した（研究協力者：玉井）。

（4）元培養皮膚を用いた治療法の改良と遺伝子導入再生皮膚療法を行う（橋本公二）。労省難病受給者票データベースを利用するための承認申請と臨床医学的特性を示す（池田、黒沢）。

#### ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

（1）全国の大学病院、一般病院、医院などの皮膚科を定法通り選択し、アンケート用紙を送付した。得られた情報により、推定患者数を算出した。患者有りとの返答が有った施設に二次調査票を送付し、臨床症状を把握した。併せて遺伝子検索の有無、もし検索済みであれば遺伝子型につき調査を行った。遺伝子検索未施行の場合は、当科での解析の是非につき依頼した（本学倫理委員会許可済み）。また当科で経験した新患につき検討した。症例の遺伝子解析を行い genotype/phenotype 解析をする（池田）。

（2）ケラチン遺伝子変異のパーマネント導入株を作り、細胞レベルの研究を行った。表皮細胞を、伸展可能なシリコンウェルに播種し、ウェルを伸展することにより培養細胞に伸展刺激を加えた。まず、正常ヒト表皮角化細胞に機械的刺激を加えることにより、どのような変化が生じるのかを、ウェスタンブロット法、DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。次に、ATCCより購入したヒトケラチン1遺伝子を用い、BCIEの病原性変異として報告のある2種類の変異型、および野生

型GFPアデノウィルスベクターを作成した。このベクターを用いて変異ケラチン発現ベクター、正常ケラチン発現ベクターを、培養正常ヒト表皮細胞に導入した。これらの細胞に機械的刺激を加え、形態的变化を観察し、また遺伝子発現をDNA マイクロアレイによりケラチン細胞骨格の機能をお解析した。このうちいくつかのものについては、ELISA、ウェスタンブロットにて検討した小宮根）。

（3）角化制御酵素のKLK5, KLK7, inhibitor LEKTIの解析から臨床形成機序を解明する（山本）。

（4）BCIEなどのケラチン病の表皮角化細胞内タンパク凝集塊の蓄積機序を解明する（研究協力者：米田）。

#### （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：「天疱瘡における遺伝的背景の検索」。

## C. 研究結果 D. 考察

### 1) ガイドラインの作成

天疱瘡、類天疱瘡、膿疱性乾癬、表皮水疱症、水疱型魚鱗癬様紅皮症の5疾患について、従来型のガイドラインを可及的にEBMに基づいて作成した。かなり完成度の高いガイドラインとなったので、別添え2にまとめた。しかしながら、疑問形式でその回答がEBMに基づいた様式には完全には成っていないので、次期の研究班で完成して、一般学術誌に掲載出来ると考えられる。今回は、本研究班の年度末報告書に案としてまとめ報告する（別添え2参照）。

### 2) 各疾患の病態解明、治療法開発と疫学

#### ①天疱瘡：

（1）現在までに合計20個のDsg3反応性CD4陽性T細胞株を樹立し、そのうち13株はTCR遺伝子解析によりクローンであることが確認された。T細胞株のリコンビナントDsg3断片に対する反応性は多様で、Dsg3の細胞外ドメインに少なくとも4カ所のT細胞エピトープが存在した。T細胞エピトープ多様性を反映して、Dsg3反応性T細胞株が使用していたTCRVβ遺伝子、CDR3領域のアミノ酸配列に特定の遺伝子やモチーフは

見出されなかった。Dsg3反応性T細胞株のサイトカイン産生パターンも多彩であった。全Dsg3反応性T細胞株の病原性の検討を行ったところ、13株が病原性を有し、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスB細胞とともに免疫不全マウスに移入したところ、抗Dsg3抗体価の上昇と口蓋粘膜のIgG沈着、棘融解像を誘導したが、7株はこれらの所見を誘導できず、得られたT細胞株の中には病原性を持つ株と持たない株が含まれることが確認された。病原性の有無により各T細胞の特性を比較したところ統計学的にIL-4とIL-10が病原性と関連した。B細胞からの抗Dsg3抗体産生にサイトカインが与える影響を検討したところ、可溶性CD40L存在下でIL-4は、B細胞からの抗Dsg3抗体産生を促進したがIL-10は促進しなかった（天谷、別添え1，要点スライド参照）。

（2）培養表皮細胞およびネズミを用いて天疱瘡抗体および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形成し、細胞間接着力が減少することが示めされた。また、天疱瘡抗体注射天疱瘡モデルマウスの皮膚および患者皮膚でDsg3の減少がみられ、Dsg3の減少が水疱形成の基本的原因であると推察された（北島、研究協力者：青山別添え1，要点スライド参照）。

（3）天疱瘡抗体、AKシリーズモノクローナル抗デスモグレイン3抗体抗体によって、デスモソーム関連蛋白のp120ctnのチロシンリン酸化がエピトープに特異的に多様性を生じることが明らかとなった。これは、シグナル伝達の面から治療法の開発の可能性を示唆する（研究協力者：青山）。

（4）①IgG/IgA天疱瘡においては、IgGとIgAの自己抗体は表皮ケラチノサイトのデスモソームの細胞間に反応したことから、デスモソーム蛋白との関連が示された。②尋常性天疱瘡患者においてプレドニゾロンに加

えて、ミゾリピンを併用することにより、病態の改善が見られたことより、この治療法は将来使用するべき治療と思われた。③久留米大学皮膚科において、過去11年間に多種多様の天疱瘡患者がみられ、治療法も異なっていた。④腫瘍随伴性天疱瘡患者は、ラット膀胱上皮に反応し、免疫ブロット法でエンボプラキンとペリプラキンに反応し、Dsg3のEC1-3以外の部位に反応する傾向がみられた。⑤天疱瘡の病変皮膚において、Th-17細胞と制御性T細胞の浸潤が認められたことから、天疱瘡における細胞性免疫の重要性が示された。⑥寛解後もELISA Dsg3高値であった尋常性天疱瘡では、免疫ブロット法とELISA法でDsg3に反応し、Dsg3のEC1-3以外の部位に反応する蛍光がみられたことから、長期に渡る治療により、抗原のエピトープが変化していくことが示された。⑦水疱性類天疱瘡の治療ガイドラインのたたき台を作成した(橋本隆、別添え1、要点スライド参照)。

(5) H17年度は稀少難治性皮膚疾患3疾患の臨床調査個人票データH13-16年度全国分の利用申請を行い、電子化データを入手した。データはH15、16年度に全国で約50%前後が入力されていること、都道府県によって入力状況が異なることなどがわかった。天疱瘡についてはH16年度新規150例の内、診断基準を満たしているのは121例であることを確認した。また約1900例の病型別患者割合は尋常性天疱瘡(65.8%)、落葉状(22.9%)、紅斑性(6.0%)、増殖性(2.1%)、その他・病型不明(3.2%)であることと、病型別の特徴を示した。更に当班で作成された重症度の分布は新規申請者で軽症22.3%、中等度50.4%、重症24.0%、不明3.3%、更新者で軽症75.2%、16.7%、重症2.8%、不明5.3%であることがわかった(黒沢、別添え1、要点スライド参照)。

H18年度はH13-17年度データを申請・入

手し、天疱瘡について治療法の評価が可能かどうか試行したが、単年度データでは困難であり、連結データを用いて再検討すべきことが分かった(黒沢、別添え1、要点スライド参照)。

予後について、天疱瘡のH16年度都道府県別受給者数を参照し、良好に入力されている7県217例を抽出し、重症度の変化を確認した。1年間に軽症・中等度から悪化したのは1.8%、5.3%、中等度・重症から軽快したのは47.4%、73.3%であった。正確な予後の検討には非継続の理由(治癒、死亡等)の把握が重要であることが確認された(黒沢、別添え1、要点スライド参照)。

#### 6) 天疱瘡原因遺伝子検索

最初に各SNP(5'側よりSNP001-006)ごとのアレル頻度を患者群、コントロール群で比較したところ、DSG3遺伝子イントロン1付近の3つのSNPにおいてP値が5%以下(カイ二乗検定)を示した(表)。次にHaplo View(v3.32)を用いてハプロタイプ予測を施行したところ、前述の3つのSNPが連鎖不平衡ブロックを形成していた。このブロックについて5つのhaplotypeが予想され、各々の頻度を検討したところmajor haplotypeの頻度がコントロール群に比べ減少しており、逆に2群間で軽度の頻度差のあるhaplotypeを見出した。このhaplotypeは、英国人、インド人でPV患者との関連が報告されたDSG3遺伝子haplotypeと同一であることから人種を超えた候補領域と考えられる。これら3つのSNPは、exon 1-intron 1に位置し(表)、DSG3遺伝子の転写調節に関与している可能性が考えられた。機能解析は来年度以降の班会議で解析する予定である。DSG3の転写量が疾患に関与するのであれば、遺伝子多型を持たない患者にも治療法開発に応用できると考えられる(研究協力者:新関、別添え1、要点スライド参照)。

さらにはエクソン11の非同義置換を生じる SNP (rs16961975) が陽性の患者では、PV 患者全体で頻度の高い HLA-DRB1\*1401 の頻度が低く、代わりに DRB1\*0101 の頻度が高かった。DRB1\*0101 の頻度は日本人落葉状天疱瘡患者で比較的多く検出されるアレルであった (8 例/45例、 $P < 0.05$ )。今後、症例をふやしてこの 2 領域の遺伝子多型を検討することにより、機能的に直接発症に関わる遺伝子多型を同定しようと予想している。

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 (研究協力者：新関、別添え 1, 要点スライド参照)。

## ②膿疱性乾癬：

(1) 2006年に膿疱性乾癬 (汎発型) の診断基準と重症度判定基準を改訂、発表した。特定疾患個人調査票データに基づき、鋭敏度、特異度を考慮した基準になった。膿疱性乾癬に伴う合併症にも配慮した。

(2) 膿疱性乾癬に関する論文渉猟を行ない、膿疱性乾癬のプライマリーケア、皮膚病変治療、合併症治療、妊婦・授乳婦・小児症例の治療対応、近い将来使用されるであろう薬剤の評価などを盛り込んだ治療ガイドラインを作成中である。(作成者：岩月啓氏、中西元 (岡山大学)、照井 正、原 弘之 (日本大学)、小澤 明、梅澤慶紀、馬淵智生 (東海大学)、小宮根真弓 (自治医科大学)、北島康雄、青山裕美 (岐阜大学)、別添え 2, ガイドライン参照)

(3) 遺伝子解析は三次解析まで進み、既報告にはない新規候補遺伝子を含め、4 個の関連遺伝子が絞られた。1 個目の遺伝子は G タンパク連結型受容体のスーパーファミリーの 1 つで、感受性アレルはマイクロサテライト、そのマイクロサテライトは翻訳開始点の 5'

上流 995bp に存在していた。2 個目の遺伝子は HLA class I 領域 (6p21.3) に存在していた。以前われわれが乾癬感受性遺伝子の 1 つとして報告した新規遺伝子 SEEK1 遺伝子であると考えた。3 個目の遺伝子は Ca 非依存性細胞接着分子のスーパーファミリーの 1 つで、3 つの免疫グロブリンドメインで構成されていた。感受性アレルは SNP で、その SNP は第 1 イントロンに存在していた。4 個目の遺伝子は HLA class II 領域に存在する BTNL2 遺伝子であると考えた。BTNL2 遺伝子は免疫グロブリンのスーパーファミリーで T 細胞の活性化に必要な共刺激分子 (costimulatory molecule) として報告されている。乾癬の発症には遺伝的因子のほかに免疫異常も関与しており、乾癬の発症もしくは病態形成に影響を及ぼしているものと推測された。この HLA class II 領域との相関は HLA class I 領域との相関とは独立したものであった。1 個目と 3 個目の遺伝子について、発現している組織の特異性を確認した。また、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析にむけてサンプリングを継続した (研究協力者：小澤、別添え 1, 要点スライド参照)。

(4) 表皮細胞および炎症細胞から産生される S100A8/A9 が乾癬および膿疱性乾癬の炎症メディエーターとして重要であることが判明した (岩月、許、別添え 1, 要点スライド参照)。

(5) 新たなバイオマーカーとして S100A8/A9 の血清値が臨床と関与することを見出した (岩月、許)。

(6) 表皮角化細胞の増殖と分化に LXR を介して産生される SREBP-1c が関与していることが明らかにされた (研究協力者：照井)。

(7) 尋常性乾癬病変部の表皮内、真皮乳頭、および真皮上層には多数の CD11c 陽性樹状細胞が浸潤し、その一部は CD83 陽性であった。一方、膿疱性乾癬病変部では、CD11c 陽

性細胞の表皮内への浸潤は少なく、尋常性乾癬病変部との大きな違いであると考えられた。CD1a 陽性ランゲルハンス細胞数も、膿疱性乾癬病変部では、尋常性乾癬病変部に比べ少なかった。尋常性乾癬局面辺縁部の真皮表皮境界部に認められた CD83 陽性細胞は、尋常性乾癬病変部では多数認められたが膿疱性乾癬病変部では少数であった。膿疱性乾癬病変部では HLA-DR 陽性浸潤細胞および HLA-DR 陽性表皮細胞が、尋常性乾癬よりも顕著に認められた。膿疱性乾癬膿疱部表皮および膿疱内容において、iNOS の強い発現を認めたが樹状細胞には陰性であった。iNOS は、尋常性乾癬においては CD83 陽性樹状細胞に陽性であったが、表皮においてはその発現は弱いものであった（小宮根、別添え 1，要点スライド参照）。

尋常性乾癬と膿疱性乾癬におけるケモカイン、サイトカインプロファイルの相違が、このような樹状細胞の浸潤の差として現れている可能性があり、膿疱性乾癬表皮での iNOS 発現はその一つと考えられた（小宮根、別添え 1，要点スライド参照）。

8) 膿疱性乾癬患者の全国 QOL 調査 (SF 36v2) によって約40%の患者が身体機能、日常役割機能 (身体) において、20-28%が社会生活機能、日常役割機能 (精神) で 2SD 以上の低下を示した (岩月、別添え 1，要点スライド参照)。

### ③表皮水疱症

(1) 本邦における表皮水疱症に関する出生診断の適応基準を新たに作成した (別添え 1，要点スライド P.17 参照)。これは、重症表皮水疱症の出生前診断施行にあたり、標準的なガイドラインに成り得ると考える (清水)。

(2) 表皮水疱症の新規治療、遺伝子治療法開発

(a) Dsg3 を認識する一本鎖抗体と HVJ の F 蛋白欠失変異体とのキメラ遺伝子を作成

し細胞に導入して発現させたところ、F 蛋白のシグナルペプチドと膜貫通ドメインの間に標的分子挿入したコンストラクトのみが、細胞膜上にキメラ分子を局在させることができた。次いで、この細胞に wild-type HVJ を感染させて産生される virus progeny を調べると、ウイルスエンベロープに標的分子の挿入が確認され、F 蛋白の約 6% がキメラ-F となっていた。Dsg3 を付着させたプレートに対するキメラ HVJ の結合は、wild-HVJ の 10 倍以上強力であった。このキメラ HVJ を不活性化し、VII 型コラーゲンの発現プラスミドを封入し、表皮水疱症モデルマウスの水疱内に導入したところ、水疱内のほぼすべての皮膚基底膜に VII 型コラーゲンが局在するようになった。その発現は wild HVJ-E で遺伝子導入を行ったときの 20 倍以上であった (金田、別添え 1，要点スライド参照)。

この標識ベクター技術では水疱内に入れることで高効率に遺伝子導入ができる。しかしウイルスの HN 蛋白は完全に残存している。HVJ の HN 蛋白は本来のウイルス受容体であるシアル酸を認識するので、標的化のときの特異性が弱められる欠点があることと、さらにこの HN 蛋白は赤血球凝集に関与するので、全身投与時の赤血球凝集反応による毒性の原因となる。そこで、赤血球凝集に関与する HN の RNA を HN 特異的な siRNA でノックアウトする方法をすでに開発した。この siRNA 法と標的分子挿入技術を組み合わせれば、全身投与による標的遺伝子治療が可能になるであろう (金田、別添え 1，要点スライド参照)。

(b) 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（研究協力者：玉井、別添え1，要点スライド参照）。

（c）性染色体解析および細胞融合特異的GFP発現マウスの皮膚解析により、骨髄由来ケラチノサイト形成機序は細胞融合ではなく、骨髄細胞の表皮細胞への分化機序により形成されることが明らかとなった（研究協力者、玉井、別添え1，要点スライド参照）。

（d）マウス遊離皮膚片抽出液中に、骨髄間葉系幹細胞を皮膚へと動員する生体内生理活性物質KOI2が存在すること、皮膚移植後にKOI2は、移植部位及び循環血液中に大量に放出されることが明らかとなった。KOI2は既知の生体内蛋白であるが、骨髄間葉系幹細胞動員活性を持つことが今回の研究で初めて明らかとなった。本研究により、骨髄幹細胞移植により表皮水疱症を根治的に治療できる可能性が世界で初めて明らかになった。我々の基礎研究成果をもとに、南米チリの研究グループはVII型コラーゲン完全欠損患者皮膚潰瘍部に非血縁健康者由来骨髄間葉系幹細胞を移植した。その結果、長期間難治であった潰瘍部の速やかな上皮化が得られ、その皮膚基底膜部に欠損していたVII型コラーゲンの供給が確認された（IVth International Symposium of EB, Santiago, Chile）。現在チリの研究グループと情報を交換し、骨髄間葉系幹細胞移植による栄養障害型表皮水疱症治療の国際多施設共同研究を進める計画を策定中である（研究協力者、玉井、別添え1，要点スライド参照）。

（e）移植治療用3次元培養皮膚の改良。HE染色所見では、従来の3次元培養皮膚は基底細胞が不揃いで、角化細胞の形態が分化しやすい傾向が見られたが、羊膜付き3次元培養皮膚は基底細胞がコンパクトであり、そ

の配列は正常皮膚により近いものであった。

4型コラーゲン、7型コラーゲン、ラミニン5，インテグリン $\alpha$ 6，インテグリン $\beta$ 4は羊膜付き3次元皮膚では基底膜部に線状に発現しており、電子顕微鏡所見では線状にlamina densaが観察され、hemidesmosomeの形成も良好であった。24歳の栄養障害型表皮水疱症女性患者の右手掌の癬痕拘縮形成術を施行し、人工真皮を移植し、術後2週後に羊膜付き3次元培養皮膚を移植した。移植片はほぼ生着し、移植後2-3週で上皮化が認められた。手掌の開大ができるようになったため、患者の日常生活は大幅に改善された。羊膜付き3次元培養皮膚は手指の棍棒状手指癒着治療に非常に有用であることが今回の研究にて明らかとなった。今後はさらに症例数を増やし、その有用性を検討することが必要であると思われる（橋本公二）。

#### ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

（1）全国疫学調査により、本邦では55人（95%信頼区間35-75人）のBCIE患者が2002年に全国の医療機関を受診していることが推定された（池田、黒沢）。

（2）その内臨床情報が得られた28例中13例につき遺伝子変異情報が得られ、また新規に経験した症例につき臨床症状と遺伝子変異につき検討した（池田）。

（3）臨床型と遺伝子型の相関解析では、ほぼ全ての症例で典型的な症状が見られたが、以下の特異な点も見られた（池田）。

（a）K10変異症例にも掌蹠角化が生じ得る

（b）遺伝子型に拘らず、軽度の症状を示す例がある

（c）炎症症状が少なく、四肢に限局した皮疹を呈する症例がある

（d）生後しばらくして症状が出る例もある

（e）一見いわゆる掌蹠角化症に見える例もある

(4) 伸展刺激により、時間依存的に ERK、p38 がリン酸化したが、JNK のリン酸化は認められなかった。EGF 受容体阻害剤である AG1478 は、ERK のリン酸化レベルを全体的に引き下げ、伸展刺激によるリン酸化は保たれていたが、カルシウムチャネルブロッカーである Gadolinium は ERK リン酸化を抑制した。AG1478、Gadolinium はともに P38 のリン酸化は抑制しなかった。

DNA アレイ解析により、正常ヒト表皮細胞に機械的刺激を与えることにより、細胞骨格に関連する蛋白が多数誘導されることが明らかとなった。なかでも、アクチン関連蛋白、細胞外マトリックス蛋白、細胞接着因子に分類される遺伝子の誘導が多くあり、これらは TNF $\alpha$  などのサイトカインによる刺激では誘導を受けないことから、機械的刺激に特徴的な変化と考えられた。

正常ケラチン K1 および変異ケラチン K1 を正常ヒト表皮角化細胞に導入し、上清中のサイトカイン濃度について検討したところ、basic FGF の濃度が、変異ケラチン導入細胞で正常ケラチン導入細胞に比べ高かった。Basic FGF は、表皮増殖、血管増生作用を持つことが知られていることから、変異ケラチン K1 は表皮細胞での basic FGF 産生を亢進させることにより、BCIE におけるマスト細胞の浸潤、表皮肥厚、血管増生に関与している可能性があると考えられた。また、正常ケラチン K1 導入細胞では、コントロール細胞に比べ伸展刺激による発現の変化を受ける遺伝子数が少なく、変異ケラチン K1 導入細胞では、コントロール細胞に比べて伸展刺激により発現の変化を受ける遺伝子数が多かった。変異ケラチン K1 導入細胞においては、炎症に関与する分子の発現誘導が認められた(小宮根、別添え 1, 要点スライド参照)。

以上の結果のような世界的にも本症の全国レベルの調査はなく、極めて重要な情報が得

られた。その結果、従来報告されている遺伝子型—臨床症状の相関を示す症例に加え、否定形的な遺伝子型—臨床症状の相関を示す例が存在することが明らかとなった。(池田)

4) 抗生物質を用いたセレクションの結果、安定トランスフォーマントを得た。この安定トランスフォーマントは、培地にエクジソンを添加すると、野生型および変異ケラチンを発現した。ケラチンの発現はエクジソンの量に依存していた。われわれはエクジソン誘導発現の系を用いて、ケラチン病モデル細胞を樹立することに成功した(研究協力者:米田)。

## E. 評価

### 1) ガイドラインの作成

#### (1) 達成度

当初の目的に対して、天疱瘡では80%、類天疱瘡では95%、膿疱性乾癬では95%、表皮水疱症では90%、水疱型魚鱗癬様紅皮症では80%の到達度である。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

当該各疾患の診断・治療ガイドラインを作成することにより、安定した治療ができるようになり、日本発のガイドラインとして国内的にも国際的にも、社会的にも意義がある。

#### (3) 今後の展望について

まだ、EBM に基づかない部分、不完全な部分、複雑な部分があること、さらに、国際診断基準との整合性について検討を継続する必要がある。また、今後発展する新規治療法開発と並行して治療指針についても随時見直しが必要である。さらに次期研究班でより完成度の高いものになると期待される。

#### (4) 研究内容の効率性について

本研究班には疫学の専門家(黒沢)が参加しており、かつ、本研究班の班員・研究協力者はそれぞれの疾患について日本における第一者とも言うべき専門家集団であるので、極

めて効率的にガイドラインがまとめられた。従って効率性は高いと言える。

## 2) 各疾患の病態解明、治療法開発と疫学

### ①天疱瘡：

#### (1) 達成度。

天疱瘡の病態解明に関しては、天疱瘡モデルマウスの作成とその応用、病原性モノクローナル抗体の作成とその水疱形成機序解明研究へ応用、患者皮膚での Dsg3 の減少の発見、デスマグレインスワッピング分子を用いた研究等について80%達成した。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について。

本研究は学術的・国際的にもユニークであり、他に類を見ない。また、天疱瘡以外にも自己反応性T細胞の病態解明という点で、社会的意義も大きい。本研究班報告書で記載された治療法が標準的に用いられている。

H16年度データ約1900例を用いて天疱瘡の病型別患者割合を示した。これまで日本には天疱瘡の病型別患者割合示した疫学データはなかったので、本研究の意義は大きかった。当班で作成された重症度についても受給者の分布を初めて確認できた。特定疾患臨床研究班の中では最も臨床調査個人票データを利活用した班の一つである。社会的意義が大きい。

#### (3) 今後の展望について

本研究班の研究で開発された病原性抗デスマグレイン3モノクローナル抗体、天疱瘡モデルマウス、抗デスマグレイン3リンパ球を用いて抗体結合前および後の発症機序の解明が容易になり、この分野の研究はさらに大きく発展すると思われる。

疫学に関しては現在のデータは入力率が50-60%程度であるが入力率は毎年上昇しているので、これまで試行した分析を新しいデータで再分析する必要が生じる。ただ受給者の予後については、重症度別に予後の分析は試行したが、病型別、治療や症状別に予後がど

のように異なるのか更に分析していく。また、臨床調査個人票データが全数入力されても、非継続者の中に治癒・死亡例が多く含まれていると予想されるので、治癒と死亡をどのように把握するのか、検討すべき課題である。予後については都道府県等が把握しているデータなどを探索し、推計に用いることができるかどうか検討していくことになるだろう。

#### (4) 研究内容の効率性について

とくにPVモデルマウスを利用したため極めて効率的に、Dsg3反応性T細胞クローン株の *in vivo*での病原性を評価する実験系を確立した。

臨床調査個人票は厚生労働省の主導の基にデータベース化が進められている。特定疾患研究で患者の実態を把握するために行われてきた全国調査は標本調査であり、かなり効率的に利用できた、しかし、回答率も100%でないため、ばらつきや偏りが存在していたが臨床調査個人票データが全て入力されれば、全国調査より多くの情報が毎年入手でき受給者の実態を示すことができる。また毎年のデータを累積していくことで、長期的に臨床医学特性の変化を捉えることができ、これまで明らかにされなかった疾患の予後を高い精度で把握することも極めて効率的に可能となる。

### ②膿疱性乾癬：

#### (1) 達成度

研究班にて収集した症例および特定疾患個人調査表データを用いた全国調査（厚生労働省に対してデータ借用の許可あり）により、膿疱性乾癬患者の臨床疫学データ解析は95%。マイクロサテライトを用いた乾癬関連遺伝子解析の中から膿疱性乾癬に関連した遺伝子群を抽出し、解析するという研究は50%。膿疱性乾癬の病態の根幹となる事象について分子レベルでの解明は70%。膿疱性乾癬の診断と病態解明につながる新規バイオマーカーの意義、発症機序について検討は70%。膿疱性乾

癬治療のアウトカムを SF36 を用いた QOL 調査で解析は95%である。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

臨床疫学研究、治療ガイドライン作成と QOL 調査は難病疾患克服事業の根幹をなす成果であり、社会的意義が高い。

膿疱性乾癬の複雑な病態を理解するための研究は必須であるが、S100A8/A9 分子を介する炎症機序は、ランゲルハンス細胞の関与は新たに発見され、最先端の研究であり、学術的意義が高い。

(3) 今後の展望について

改訂した診断基準と重症度判定基準は、臨床における評価を得ながら修正する段階に入った。

作成中の治療ガイドラインは平成20年には発表予定であり、その有用性の評価を受け、アウトカムを QOL として解析する。膿疱性乾癬関連遺伝子については、継続して解析を進め、候補遺伝子の SNP 解析に移行する。膿疱性乾癬の複雑な病態を解明する基礎的研究はこれからも治療法を開発するには必須である。

(4) 研究内容の効率性について

臨床調査個人票は一定の臨床疫学統計データを取るのには効率的である。年次報告として毎年、結果を着実に公開することが可能となった。病態解明に関する研究は、臨床に還元できそうな研究にポイントを絞り、優先的に研究を進める方が効率的であろう。遺伝子解析の最終結論は先になるが、薬剤感受性に関する遺伝子解析データについては、優先的に研究を進め臨床貢献をする。

### ③表皮水疱症：

(1) 達成度

出生前診断はほぼ 100%達成。genotype/phenotype の解析は60%の達成度。表皮水疱症の新規治療、遺伝子治療法開発の達成度

は遺伝子導入法では80%、免疫寛容獲得法では80%達成で、臨床応用は今後可能な段階になりつつある。3次元培養皮膚移植法はほぼ95%の達成度である。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子の VII 型コラーゲン遺伝子をそのノックアウトマウスに導入法出来、かつ免疫寛容を得る方法を開発したことは、学術的国際的に意義が高く、臨床応用も近いことは社会的に意義も高い。

難治性の表皮水疱症の究極的な治療は遺伝子治療であり、従来からそれに向けた取り組みが行われてきた。治療実験に使用可能な、非致死性重症型表皮水疱症のモデルマウスを確立した点も学術的意義が大きい。これらの研究はすべて世界で唯一であり今回の成果は、この治療法の実現のための可能性を示した点で当初の目的を達成し、さらに今後の展望が開けている点から期待以上の成果であると判断できる。表皮水疱症患者は、地域特性がなく、全世界に万遍なく分布するので、本研究の国際的意義も高い(清水)。また、ベクター技術とあわせて新聞報道もなされた(金田、2007年8月5日朝日新聞朝刊)。さらに、実際の臨床では、羊膜併用三次元培養皮膚は世界で初めて有用性を示した研究成果であり、研究成果を国際誌に発表しており、学術的・国際的にも評価に値すると考えられる。実際に患者の難治性潰瘍と手指棍棒状癒着を治療しており、社会に還元できていると思われる。

(3) 今後の展望について

今後、患者骨髄由来表皮幹/前駆細胞、あるいは間葉系幹細胞に対する安全かつ高効率な欠損遺伝子導入法の開発を進めることにより、自己骨髄幹細胞移植による根治的表皮水疱症治療が可能になると期待される。

(4) 研究内容の効率性について

本研究期間内に当初の目的が達成されたこ



とより、研究内容の効率性は極めて高いと思われる。

また、表皮水疱症に対する診断基準、治療指針の作成と見直しと新しい出生前診断の適応基準の作成、そして新規治療法開発や病態メカニズム解明の開発のために、研究は効率的に実施された。また、研究費や人的配分に関しても効率的であった。

#### ④水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

##### (1) 達成度について

病因遺伝子に関して genotype/phenotype の解析は症例数が少なく60%の達成度である。伸展刺激についての基礎的知見を得、野生型および変異ケラチンK1発現ベクターの導入により、表皮細胞が外的力学的刺激に対する反応の差異を検討することができたが、そのシグナル阻害については未検討で、80%の達成である。

##### (2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

genotype/phenotype の解析および表皮細胞に対する力学的刺激についてのケラチン細胞骨格の機能とその変異ケラチンの影響に関する研究はほとんど行われていない。また、BCIE は変異ケラチンが原因で発症する疾患であるが、変異ケラチンによって、表皮細胞の力学的刺激に対する認容性がどのように変化するか全く検討されていない。今回の検討により、BCIE の皮疹の発症・増悪のメカニズムが明らかとなり、今後の治療に結びつく可能性がある学術的にも社会的にも意義が高い。国際的にもない。

##### (3) 今後の展望

今後、genotype/phenotype の解析には症例の蓄積が必要である。変異ケラチンによる表皮の炎症反応、あるいは表皮細胞の増殖、細胞骨格に関連する分子の発現異常が、どのようなシグナル伝達経路によって生じるのかを検討し、siRNA、低分子阻害剤、デコイ

核酸などによってこれらのシグナルをブロックすることができるか否かを検討し、BCIE の皮膚症状の軽減につながる薬剤についての知見を得たいと考えている。

##### (4) 研究内容の効率性について

全体にこのように稀な疾患の genotype/phenotype の解析をはじめ治療などの研究は班会議でないと効率的に行えないので、本会議は効率性には必須である。また、このような研究は、遺伝子治療によって根本的に疾患を治療する方法に関する研究ではないが、遺伝子の異常により症状が発症するメカニズムを解明し、その阻害法を明らかにすることにより、治療に結びつく知見を得ようとするものである。BCIE は全身の皮膚に病変が生じるが、軟膏などにその阻害物質を混じることにより症状の改善が得られれば、非常に効率的な研究であると考えられる。

## F. 結論

(1) 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、および、この4疾患に加え類天疱瘡に関する診断と治療に関するガイドラインを、新しくEBMに基づいたガイドラインをほぼ完成に近い形で案としてまとめた(平成19年度発行予定、別添え2、ガイドライン参照)。

(2) 学的研究による患者数と治療状態の実体の把握、発症分子病態の解明、原因遺伝子の解析と臨床系の相関、原因遺伝子から発症までの機序、これらに基づく培養皮膚移植治療法と遺伝子治療法の開発という大きな目的に対して、上述したように本研究の3年計画の目標はほぼ達せられ、次期研究班研究への研究指針が得られたと考える。

(3) 遺伝子治療では、骨髄由来表皮ケラチノサイトの存在と、その細胞を利用した表皮水疱症の根治的治療法開発に道筋が得られた。また、HVJ-E ベクターに組織特異的な標的

能を賦与する全く新しい方法を開発した。遺伝子発現の長期化のための技術と合体させれば、遺伝性皮膚疾患の治療にも貢献できることが予想される。

また、3年間、毎年臨床調査個人票データの利用申請を行い、入手したデータで稀少難治性皮膚疾患の受給者全体の疫学的特性（性・年齢分布等）、臨床医学的特性（病型別分布・重症度分布・症状・所見等）を示した。患者の予後（症状変化、治癒軽快、死亡等の把握）の分析方法を検討し、現在のデータの問題点を示した。治療ガイドライン作成に資するため、受給者の治療の実態を示した。

上述したこの3年間で集積された科学的知見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られる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Aoyama Y, Asai K, Hioki K, Funato M, Kondo N, Kitajima Y. Herpes gestationis in a mother and newborn: immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up of the enzyme-linked immuno-sorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain. *Arch*

*Dermatol.*;143(9):1168-72, 2007.

- 2) Yasuo Kitajima and Yumi Aoyama. A Perspective of Pemphigus from Bedside and Laboratory-Bench. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Special issue on "Immunologic Skin Diseases" 2007, in press.
- 3) Yumi Aoyama, Kanako Asai, Kana Hioki, Michinori Funato, Naomi Kondo and Yasuo Kitajima. Herpes gestationis in a mother and child. An immuno-clinical perspective based on a weekly follow-up study of BP-180 NC16a ELISA index. *Arch Dermatol.* ;143(9):1168-72, 2007.
- 4) Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Anti-desmoglein3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem*. 282(24):17866-17876, 2007.
- 5) Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Intraperitoneal infection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal desmoglein3 associated with generation of acantholysis. *Arch Dermatol Res* 299:165-167, 2007
- 6) Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda Y, Amagai M, Kitajima Y. No activation of urokinase plasminogen activator by anti-desmoglein 3 monoclonal IgG antibodies in cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci.*;47(2):119-125, 2007.
- 7) Alex I. Chernyavsky, Juan

- Arredondo, Yasuo Kitajima, Miki Sato-Nagai and Sergei A. Grando. Desmoglein vs. non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: Characterization of Novel Signaling Pathways Downstream of Pemphigus Vulgaris Antigens. **J Biol Chem** 282(18):13804-11382, 2007.
- 8) Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein3 augments desmoglein3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. **Autoimmunity**. 39(7):587-590, 2006.
- 9) Shu E, Yamamoto Y, Sato-Nagai M, Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG reduces the desmoglein 3/desmocollin 3 ratio on the cell surface in cultured keratinocytes as revealed by double-staining immunoelectron microscopy. **J Dermatol Sci**. 40(3): 209-211, 2005.
- 10) Aisa, Y., Mori, T., Nakazato, T., Yamazaki, R., Yamagami, J., Amagai, M., Ikeda, Y., and Okamoto, S. Cicatricial pemphigoid of the oropharynx after allogeneic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma. **Int J Hematol** 82:266-269, 2005.
- 11) Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Amagai, M. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 124:939-946, 2005.
- 12) Payne, A.S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J.R., and Siegel, D.L. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. **J Clin Invest** 115:888-899, 2005.
- 13) Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Saito, H., Oka, H., Tsunoda, K., Amagai, M., and Nishikawa, T. In vivo ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. **J Invest Dermatol** 124:984-989, 2005.
- 14) Yoshida, K., Saito, M., Amagai, M., and Ikeda, Y. Gottron-like papules induced by hydroxyurea. **Clin Exp Dermatol** 30:191-192, 2005.
- 15) Yoshida, K., Takae, Y., Saito, H., Oka, H., Tanikawa, A., Amagai, M., and Nishikawa, T. Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus. **J Am Acad Dermatol** 52:839-845, 2005.
- 16) Amagai, M., Ahmed, A.R., Kitajima, Y., Bystryrn, J.C., Milner, Y., Gniadecki, R., Hertl, M., Pincelli, C., Fridkis-Hareli, M., Aoyama, Y., et al. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? **Exp Dermatol** 15:815, 2005.
- 17) Anzai, H., Stanley, J.R., and Amagai, M. Production of low titers of anti-desmoglein 1 IgG autoantibodies in some patients with

- staphylococcal scalded skin syndrome. **J Invest Dermatol** 126:2139-2141, 2006.
- 18) Aoki-Ota, M., Kinoshita, M., Ota, T., Tsunoda, K., Iwasaki, T., Tanaka, S., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. **J Invest Dermatol** 126:105-113, 2006.
- 19) Calkins, C.C., Setzer, S.V., Jennings, J.M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kowalczyk, A.P. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. **J Biol Chem** 281:7623-7634, 2006.
- 20) Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., and Amagai, M. Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. **J Invest Dermatol** 126:2621-2630, 2006.
- 21) Stanley, J.R., and Amagai, M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. **N Engl J Med** 355:1800-1810, 2006.
- 22) Yoshida, M., Hamada, T., Amagai, M., Hashimoto, K., Uehara, R., Yamaguchi, K., Imamura, K., Okamoto, E., Yasumoto, S., and Hashimoto, T.. 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.
- 23) Ishiko, A., Dekio, I., Fujimoto, A., Kameyama, K., Sakamoto, M., Benno, Y., Amagai, M., and Nishikawa, T.. Abnormal keratin expression in circumscribed palmar hypokeratosis. **J Am Acad Dermatol** 57:285-291, 2007.
- 24) Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Kikuchi, Y., Nimura, K., Nishifuji, K., Amagai, M., et al. Development of tissue-targeting hemagglutinating virus of Japan envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. **Hum Gene Ther** 18:881-894, 2007.
- 25) Nishifuji, K., Sugai, M., and Amagai, M. Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **J Dermatol Sci**. in press, 2007
- 26) Takahashi, H., Amagai, M., Tanikawa, A., Suzuki, S., Ikeda, Y., Nishikawa, T., Kawakami, Y., and Kuwana, M. T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol** 127:324-330, 2007.
- 27) Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I: Anti-p200 pemphigoid: A novel autoimmune subepidermal blistering disease. **J Dermatol** 34(1):1-8,2007
- 28) Fukumoto T, Shiroyama Y, Niizeki H, Kobayashi N, Asada H, Ishii N, Hashimoto T, Miyagawa S: