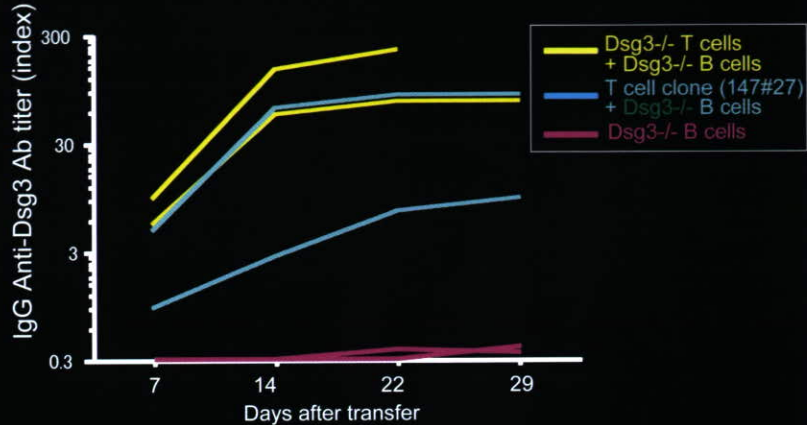


天疱瘡モデルマウスを用いた病原性を有する 自己反応性T細胞の同定および解析

T cell clone, 147#27, helped B cells
produce IgG anti-Dsg3 antibody *in vivo*.



Phenotype of the skin



- 尋常性天疱瘡はデスモグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体により誘導される自己免疫疾患である。
 - 尋常性天疱瘡モデルマウスから多彩な抗原特異性とサイトカイン産生能を持つDsg3反応性CD4⁺T細胞クローン株を樹立する実験系を確立した。
 - Dsg3反応性T細胞クローン株の中には、B細胞と共に免疫不全マウスに移入すると抗Dsg3抗体産生および皮膚びらんなどの発現型を誘導する病原性株と、抗体産生を誘導しない非病原性株が含まれていた。
 - 個々のT細胞株のサイトカイン発現パターン、T細胞受容体V_γ遺伝子の発現、T細胞エピトープを解析し統計学的に病原性との関連性を解析した結果、IL-4とIL-10が病原性と関連した(P = 0.04)。
- 今回確立した自己免疫モデルを用いた手法は自己免疫疾患の病態解明や新規分子標的治療法の開発に有用と考えられる。
(主任研究者: 天谷雅行)

標的抗原（デスモグレイン3）に患者自己抗体が結合した後の水疱形成機序

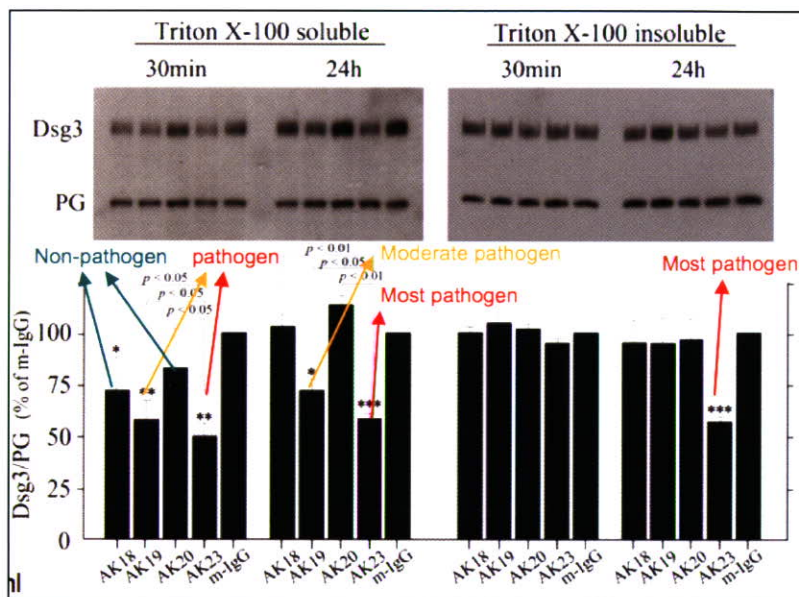


図1. 病原性の強い抗デスモグレイン3抗体はデスモグレイン3減少活性が強い。

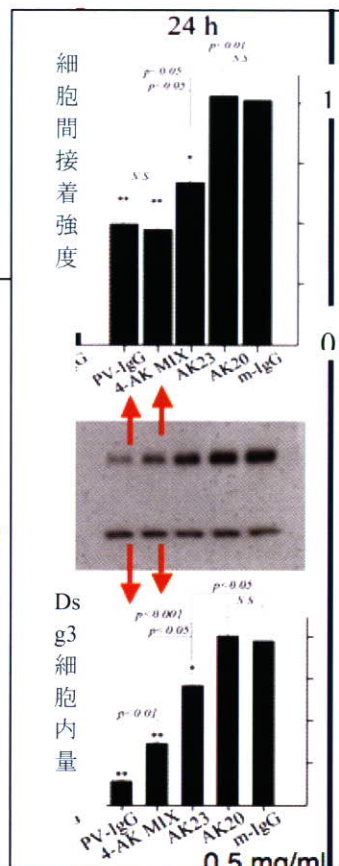


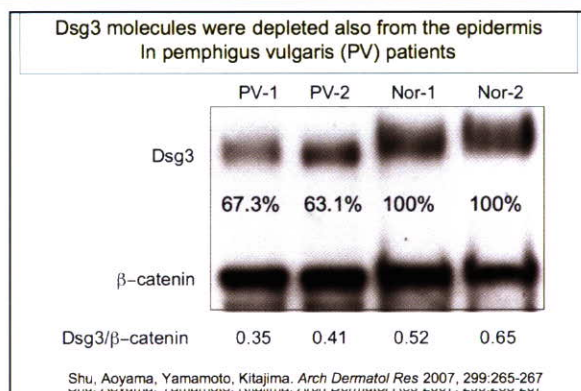
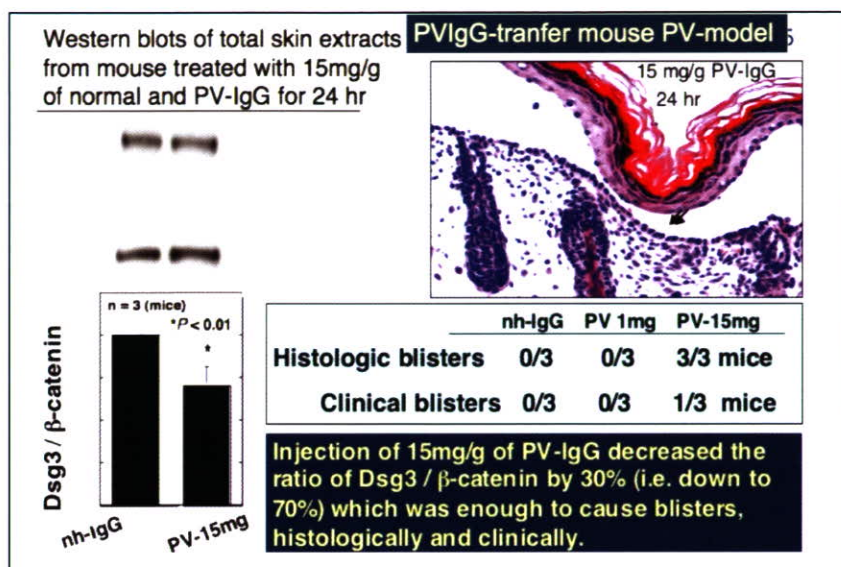
図2. デスモグレイン3含有量が少ない細胞は細胞間接着が弱い。

天疱瘡抗体の中で本質的な病原性は抗 Dsg3 抗体にあると、これまでの研究で明らかにされていたが、班員の天谷ら各種病原性の異なった抗デスモグレイン3モノクローナル抗体を作成した。それらの抗体で培養表皮角化細胞を刺激すると、病原性の強さに応じて細胞(膜とデスモソーム)から Dsg3 が減少した。また、培養細胞をパイペティングすることによって細胞をばらすという細胞間接着強度の測定では、Dsg3 の減少と共に細胞間接着強度が減少した。

これらのことは、抗デスモグレイン3抗体が本質的な病原であることを示し、その作用機序はデスモグレイン3をデスモソームから減少させることであることを示している。これらは、本班研究で得られた新知見である。

(主任研究者:北島康雄、研究協力者:青山裕美)

標的抗原(デスモグレイン3)に患者自己抗体が結合した後の
水疱形成機序



患者表皮ではデスモグレイン3の含有量が減少している。

- 1) 患者血清から精製した PgG をマウスに注射すると 15mg/g の濃度で前例に組織学的に基底膜直上で水疱が出来、肉眼でも 1/3 でみられた。
- 2) 尋常性天疱瘡患者の皮膚凍結標本から蛋白を抽出し免疫ブロットで判定領すると、デスモグレイン3が β カテニンに対して約 35%減弱していた。
- 3) 以上は培養表皮角化細胞に天疱瘡 IgG を添加する時に見られる細胞およびデスモソームからのデスモグレイン3減少と同様に患者皮膚でもデスモグレイン3が天疱瘡抗体で減少することが推察された。
- 4) これらの新知見はデスモグレイン3減少機構を阻害することを標的とした治療法の開発の糸口を提供している。

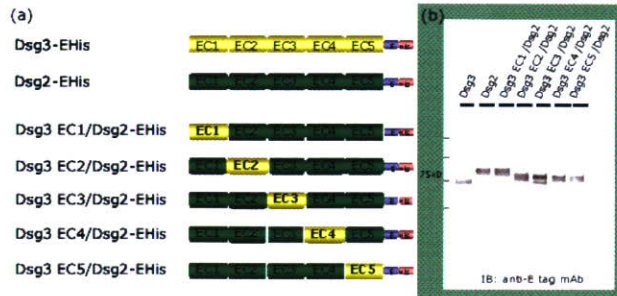
(主任研究者:北島康雄、研究協力者:青山裕美)

天疱瘡の病態解明と治療法の開発

- ① デスモグレイン・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。
- ② 通常为天疱瘡血清は主として Dsg3 の N 末端に反応した。
- ③ 腫瘍随伴性天疱瘡の血清は Dsg3 の C 末端部にも反応した。
- ④ 寛解期にも高い抗体価の抗 Dsg3 抗体を示した尋常性天疱瘡の患者血清も Dsg3 の C 末端部にも反応した。

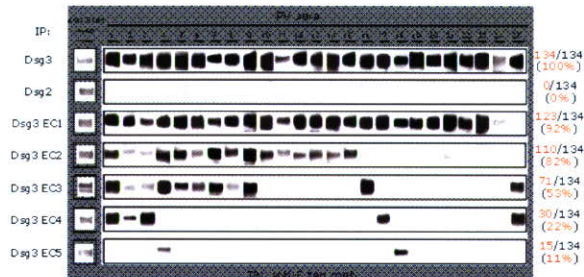
(難治性疾患克服研究事業)

1. Production of Dsg3/Dsg2 domain-swapped molecules by baculovirus expression system



2. Most anti-Dsg3 IgG in PV sera recognized the N-terminal EC1 domain of Dsg3

Immunoprecipitation-immunoblotting (IP-IB) with PV sera using Dsg3/Dsg2 domain-swapped molecules



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。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。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。天疱瘡の病態を解明するために以下の研究を行った。①デスモグレイン 2 (Dsg2) と Dsg3 のスワッピング分子のバキュロウイルス発現蛋白を作成し、天疱瘡患者血清を用いた免疫沈降法を確立した。この実験系で、通常为天疱瘡血清は主として Dsg3 の N 末端部に反応した。これに対して、腫瘍随伴性天疱瘡の患者血清は Dsg3 の細胞外の C 末端部にも反応した。さらに、寛解期にも高い抗体価の抗 Dsg3 抗体を示した尋常性天疱瘡の患者血清も Dsg3 の細胞外の C 末端部にも反応した。これらの結果から天疱瘡のエピトープの多様性が示された。また、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。

この実験以外に、以下のような研究を施行した。②Postembedding 免疫電顕を用いた研究により、IgG/IgA 天疱瘡において、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、IgG/IgA 天疱瘡とデスモソーム蛋白との関連が示された。③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。④久留米大学皮膚科における最近 11 年間の天疱瘡患者の統計的検討を行い、過去 11 年間に多種多様な天疱瘡患者がみられ、治療法も異なっていたことが示された。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。

今後、これらの研究をさらに進めることにより、天疱瘡の病態解明と治療法の開発に関して、より高度なレベルに達するように努力したい。

(分担研究者：橋本 隆)

(別添資料) 4

DSG3/5 SNP haplotype among 3 populations (British, Indian, Japanese)

	Haplotype frequencies		
	TCCTC	TCCCC	TCCTT
British controls@	1/308 (0.003)	10/308 (0.03)	45/308 (0.15)
British PV@	6/124 (0.05)	1/124 (0.02)	26/124 (0.21)
Indian controls@	ND**	12/196 (0.06)	50/196 (0.25)
Indian PV@	ND	11/56 (0.20)***	10/56 (0.18)
日本人controls	0/200	10/200 (0.05)	14/200 (0.07)
日本人PV	0/200	11/200 (0.055)	29/200 (0.145)#

*p=0.002 (Fisher), **Not described, ***p=0.002 ($\chi^2=9.54$)
#p=0.0098 ($\chi^2=6.66$) @depicted from Capon, et al (2006)

1. 我々は、英国人、インド人において、尋常性天疱瘡(PV)との関連が認められたDSG3 遺伝子内の5つの単一塩基多型(SNP)からなるハプロタイプの頻度を、日本人PV患者、コントロールにて検討した。

2. 日本人においては、TCCTT ハプロタイプの頻度がコントロールに比べて高かった(#印: p=0.0098, chi square=6.66)。

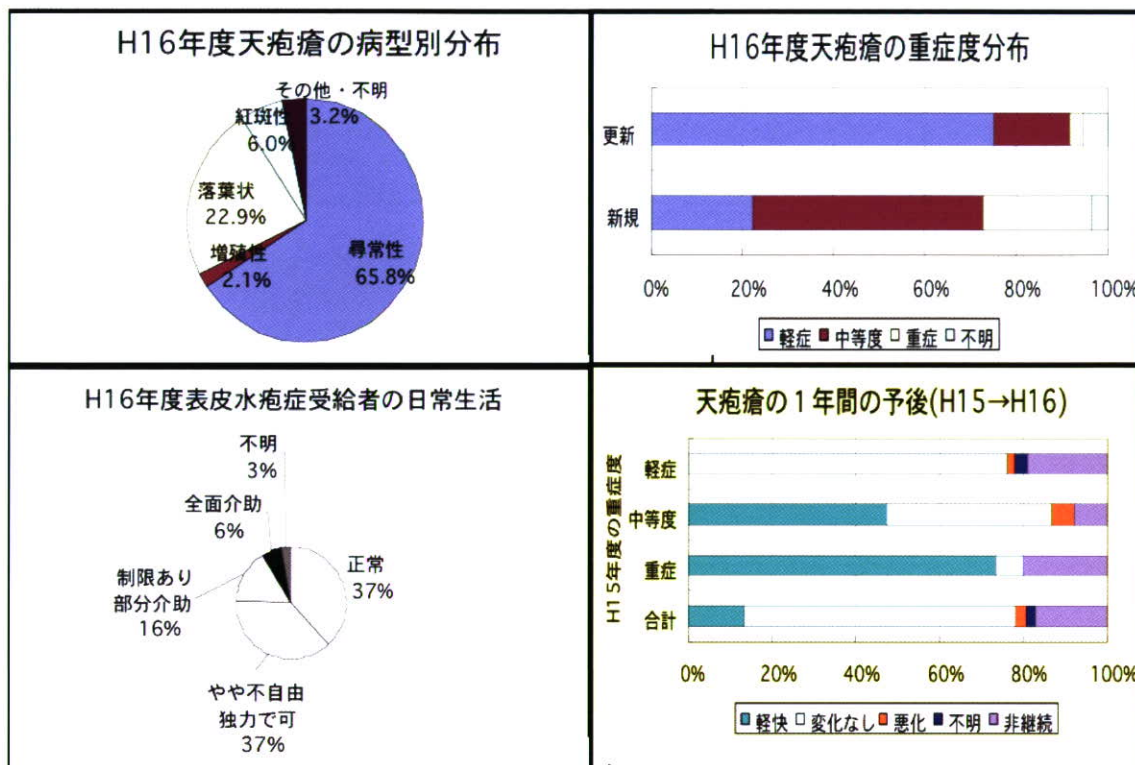
3. それに対し、英国人、インド人ではそれぞれTCCTC (*p=0.002)、TCCCC (**p=0.002, chi square=9.54)の頻度が有意に高かった。

4. 3つの人種に共通な配列であるTCC (最初の3つのSNP)の頻度も、日本人ではコントロールに比べ、有意に高く、この領域が疾患感受性領域である可能性が高い(データ省略)。

5. これら3つのSNPは、exon1-intron1に位置し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(3つのSNP位置情報は報告書に記載)。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: 新関寛徳)

臨床調査個人票の分析



○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。

○左上の図は天疱瘡H16年度約1900例の病型別患者割合である。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%)であった。

○左下の図は表皮水疱症のH16年度197例の日常生活の状態を示したものである。性年齢分布、発症年齢、症状等も報告書に示した。

○右上の図は当班で作成された天疱瘡の重症度分布である。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。

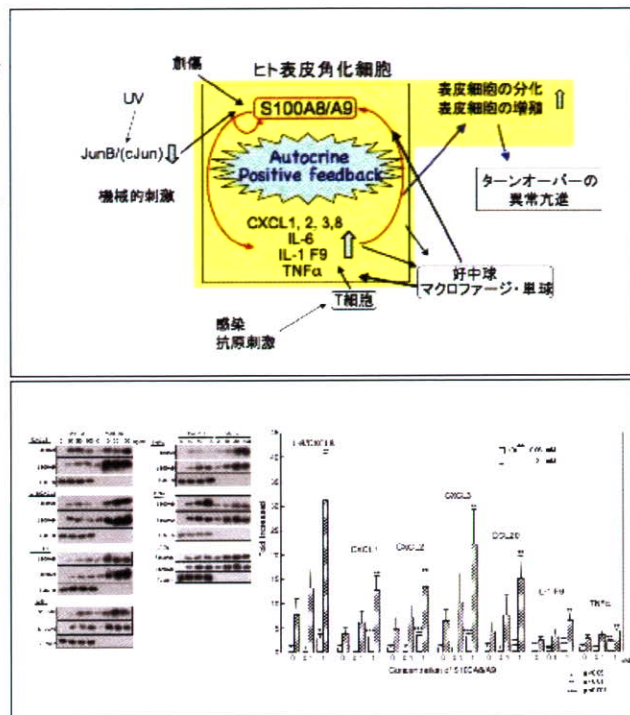
○右下の図は予後について分析試行したものである。天疱瘡のH16年度都道府県別受給者数を参照し、良好に入力されている7県217例を抽出し、重症度の変化を確認した。1年間に軽症・中等度から悪化したのは1.8%、5.3%、中等度・重症から軽快したのは47.4%、73.3%であった。正確な予後の検討には非継続の理由(治癒、死亡等)の把握が重要であることが確認された。
(分担研究者：黒沢美智子)

膿胞性乾癬の発生機序の解析

我々は、S100A8/A9タンパク質のヒト正常表皮角化細胞(NHK)における意義を検討して以下の結果を得た。

1. S100A8, A9はNHKで産生され分泌される。
2. S100A8/A9をNHKに作用させると、乾癬病変部で発現が亢進することが知られているサイトカイン類(IL-8/CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20, IL-1F9, IL-6, SPRRs, TNF α)の発現が誘導された。
3. 逆にこれらのサイトカインをNHKに作用させるとS100A8, A9の産生、分泌が増加した。
4. S100A8/A9は1 ng/mlの低濃度でもNHKのDNA合成を促進した。

以上の結果は、ヒト表皮角化細胞でS100A8/A9を基軸とする増殖のpositive feedback機構が働いていることを示唆する。S100A8/A9が好中球で大量に産生・分泌され、同時に自らのchemotactic factorであることを考慮すると、膿胞性乾癬の病態解明にもつながる知見であると考えられる。(難治性疾患研究克服事業)



我々はこれまでCa結合タンパク質S100ファミリーの皮膚における機能を解析してきた。S100ファミリーメンバーのうち、特にS100A8とS100A9は乾癬表皮で発現が亢進していること、炎症細胞の遊走や活性化に関与していることから、乾癬の発症や病態の維持に重要な役割を果たしている可能性があるが、表皮角化細胞における機能は明らかではなかった。我々は、S100A8/A9タンパク質のヒト正常表皮角化細胞(NHK)における意義を検討して以下の結果を得た。1. S100A8, A9はNHKで産生され分泌される。2. S100A8/A9をNHKに作用させると、乾癬病変部で発現が亢進することが知られているサイトカイン類(IL-8/CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20, IL-1F9, IL-6, SPRRs, TNF α)の発現が誘導された。3. 逆にこれらのサイトカインをNHKに作用させるとS100A8, A9の産生、分泌が増加した。4. S100A8/A9は1 ng/mlの低濃度でもNHKのDNA合成を促進した。以上の結果は、ヒト表皮角化細胞でS100A8/A9を基軸とする増殖のpositive feedback機構が働いていることを示唆する。S100A8/A9が好中球で大量に産生・分泌され、同時に自らのchemotactic factorであることを考慮すると、膿胞性乾癬の病態解明にもつながる知見であると考えられる。現在、トランスジェニックマウスを作成中であり、その解析を含めて膿胞性乾癬の病態発生とその治療を目指したい。

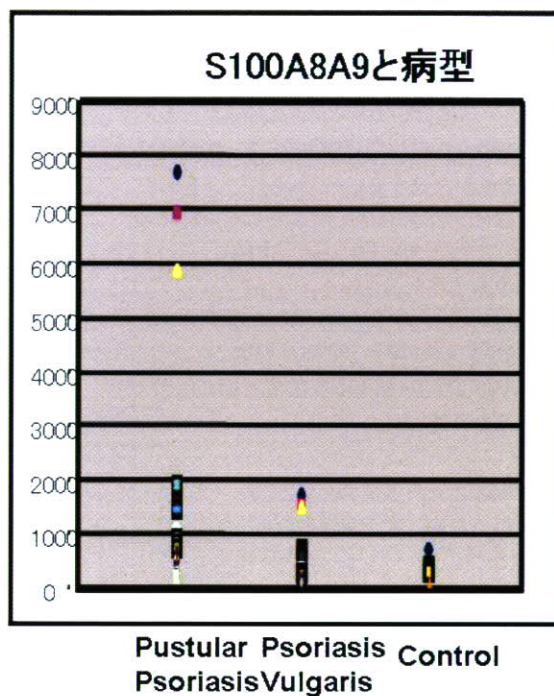
(分担研究者：許 南浩)

(別添資料) 7

膿疱性乾癬の 病態形成における S100A8/A9の関与の解明

1. 我々は、膿疱性乾癬患者群において、血清中のS100A8/A9が、健康コントロール群や尋常性乾癬患者群と比較して、きわめて高い値であることを示した。S100A8/A9は炎症性サイトカインによって誘導されるが、S100A8/A9も炎症性サイトカインを誘導することから、膿疱性乾癬の病態形成における炎症反応に深く関連していると考えられる。
2. 血清中のS100A8/A9の研究は膿疱性乾癬の診断、活動性の評価に、また、その阻害薬の開発は膿疱性乾癬の治療に、貢献すると考えられる。

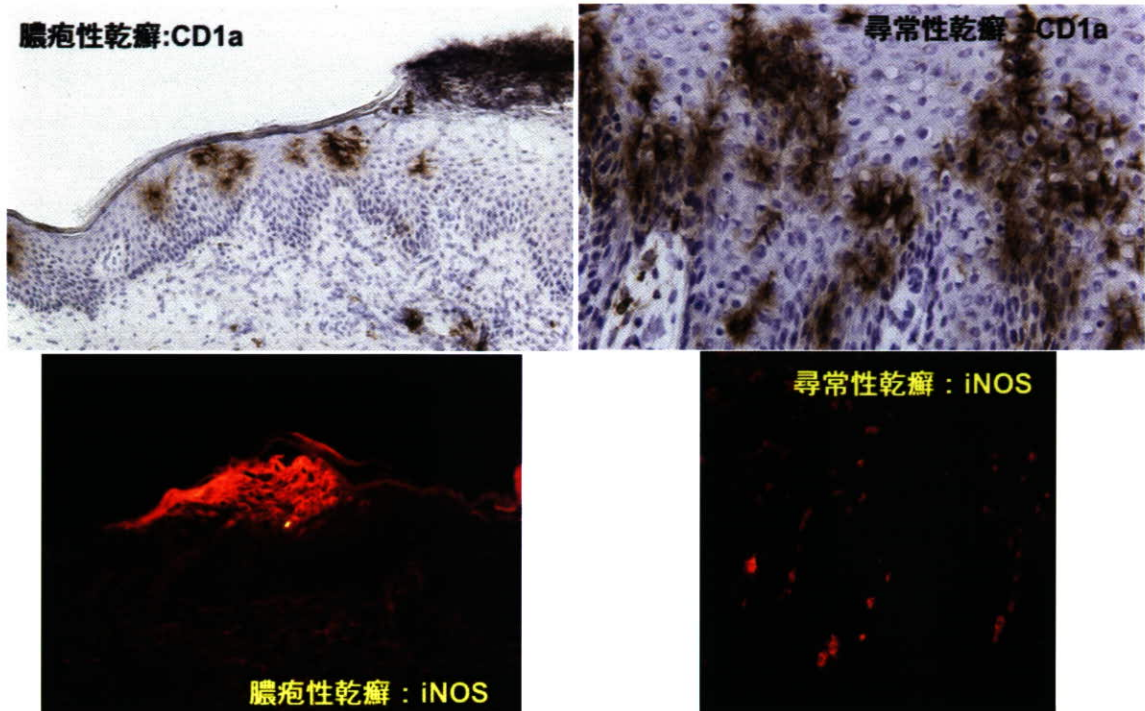
(難治性疾患克服研究事業)



1. 我々は患者血清中の S100A8/A9 が尋常性乾癬で健常人より高値を示すだけでなく、膿疱性乾癬ではさらに尋常性乾癬より高値をとることを明らかにした。また、in vitro では、S100A8/A9 の産生は炎症性のサイトカインによって誘導されると同時に、それ自体が炎症性サイトカインを誘導するという positive feed back 機構があることが示された。さらに、血清中 S100A8/A9 は、表皮角化細胞のみではなく、血球系細胞によっても産生され、関節症などの合併症や好中球数と関連すると考えられる。
2. 今後は、S100A8/A9 が膿疱性乾癬の重症度との関連性や他の炎症のマーカとの相関などをより詳しく解析し、膿疱性乾癬の診断、重症度評価などへのバイオマーカーとしての応用を検討する。
3. S100A8/A9 への抗体あるいは分子標的剤の使用による膿疱性乾癬の治療の糸口をみつける。

(分担研究者：岩月啓氏)

膿疱性乾癬の病態と治療に関する研究



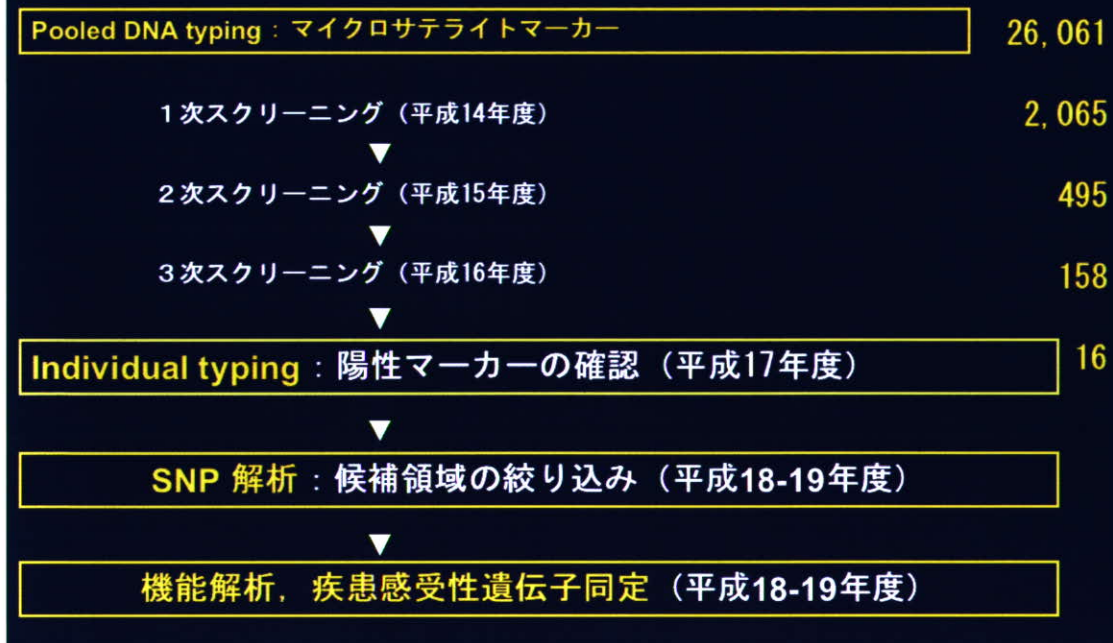
1) 膿疱性乾癬病変部ではCD1a陽性細胞数の極端な減少、表皮細胞の強いHLA-DRとiNOS発現が特徴的であった。CD1a陽性細胞は尋常性乾癬の局面に隣接した正常皮膚で増数しており、過度の炎症を抑制している可能性がある。今後、抑制性樹状細胞を膿疱性乾癬治療へ応用する研究につなげたい。

2) 膿疱性乾癬ではiNOSは表皮細胞に強く発現していたが、CD83陽性樹状細胞には陰性であった。一方で尋常性乾癬では多数のCD83陽性、iNOS陽性樹状細胞(TipDCと考えられる)が認められた。膿疱性乾癬と尋常性乾癬の病態の差異にTipDCの関与の相違が関連している可能性がある。

今後、組織より樹状細胞を分離培養し、表皮細胞や線維芽細胞との相互作用を検討し、その性質を明らかにすることにより、樹状細胞の膿疱性乾癬の病態への関与の仕方について検討する。また、組織より直接RNAを抽出してその発現パターンを検討し、膿疱性乾癬に特徴的な炎症分子について検討することにより、治療につながる研究に発展する可能性がある。

(分担研究者:小宮根真弓)

ゲノムワイドな遺伝的相関解析の流れ



多施設から集めた尋常性乾癬患者群および健康対照群の血液由来DNAを対象に、ゲノムワイドに遺伝的相関解析を行った。乾癬患者群、健康対照群各375例を3群（各125例）に分けて、3回のスクリーニングを行った。

全染色体にわたって設定した26,061個のマイクロサテライトマーカーを用い、1次スクリーニングを行い、2,065個のマーカーに有意な相関が認められた。2次スクリーニングでは、これら2,065個のマーカーのうち495個に、さらに3次スクリーニングでは、これら495個のうち158個に有意な相関が認められた。偽陽性を排除するため、1～3次の各集団を対象として、再び遺伝的相関解析を行い、最終的に有意な相関を示すマーカーを16個に絞り込んだ。

平成18年度からは、これらの領域を対象とし、SNPマーカーを用いた遺伝的相関解析による候補領域の絞り込みと、候補遺伝子の解析を進めている。

その結果、平成19年度までに少なくとも4個の候補遺伝子を絞り込んだ。

(研究協力者：小澤 明)

膿疱性乾癬の疫学および QOL 調査

1. 我々は、膿疱性乾癬の疫学調査を継続して実施すると同時にSF-36v2を用いたQOL調査と重症度/治療評価調査を行った。

2. 解析の結果、汎発性膿疱性乾癬患者のQOLの特徴として

①平均するとSF-36v2の下位尺度8つ（身体機能、日常役割機能・身体、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、日常役割機能・精神、心の健康）全てが低下している（表1）

②紅斑、粘膜炎、発熱といった臨床症状が汎発性膿疱性乾癬の患者群のQOL低下と相関している（表2）

ことが明らかになった。

3. これらの調査結果は今後の診断基準や重症度スコア作成に活用できる。

（難治性疾患克服研究事業）

表1:汎発性膿疱性乾癬患者におけるSF-36v2の各下位尺度における得点低下

下位尺度	得点の平均	標準偏差
身体機能	40.1	18
日常役割機能・身体	38.1	15.9
体の痛み	44.4	13.1
社会生活機能	38	10.4
全体的健康感	42.7	10.6
活力	37.3	15
日常役割機能・精神	38.9	15.4
心の健康	41.5	11.2

（50点が国民標準値の平均）

表2:汎発性膿疱性乾癬の臨床症状とSF-36v2下位尺度との有意確率

	身体機能	日常役割機能・身体	体の痛み	全体的健康感	活力	社会生活機能	日常役割機能・精神	心の健康
紅斑	0.6056	0.2300	0.3951	0.6112	0.7336	0.5398	0.0192*	0.6965
膿疱形成	0.1298	0.4245	0.6857	0.1657	0.4939	0.6470	0.5147	0.3698
膿海	0.7180	0.2525	0.2716	0.5161	0.3309	0.2355	0.2655	0.0865
粘膜炎	0.4995	0.0957	0.0291*	0.2564	0.0100	0.0246*	0.0539	0.0202
発熱	0.5896	0.1039	0.0398*	0.0040	0.8134	0.0338*	0.4872	0.1227

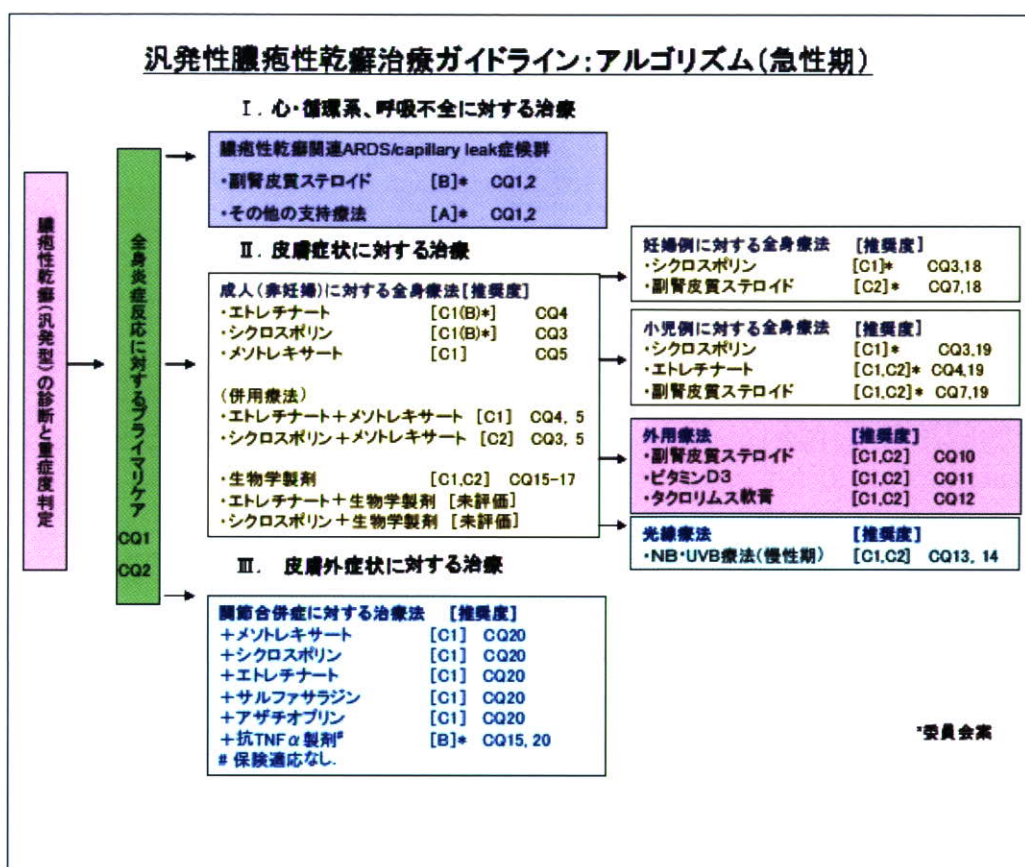
*有意差あり

- 我々は汎発性膿疱性乾癬における疫学調査を継続してきた。これらをもとに、より有用な診断基準や重症度スコアを検討中である。さらに、汎発性膿疱性乾癬患者のQOLの特徴を明らかにするために包括的健康関連QOL尺度 MOS 36-Item Short-Form Health Survey version 2 (SF-36 v2) と重症度/治療評価調査票を用いたQOL調査も実施してきた。
- 過去3年間では、汎発性膿疱性乾癬患者のQOLの特徴として①平均するとSF-36v2の下位尺度8つ（身体機能、日常役割機能・身体、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、日常役割機能・精神、心の健康）全てが低下している②紅斑、粘膜炎、発熱といった臨床症状が汎発性膿疱性乾癬の患者群のQOL低下と相関していることを明らかにしてきた。
- QOL低下に関係する臨床症状が判明してきたことは、今後の診断基準や重症度スコア作成の判断材料として有用であると考えられる。

（分担研究者：岩月啓氏）

（別添資料） 11

1. 膿疱性乾癬（汎発型）治療アルゴリズム



岩月啓氏¹、照井 正²、小澤 明³、小宮根真弓⁴、梅澤慶紀³、中西 元¹、原 弘之²、馬淵智生³、青山裕美⁵、北島康雄⁵

1. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚・粘膜・結合織学、2. 日本大学医学部皮膚科、3. 東海大学医学部専門診療学系、4. 自治医科大学皮膚科、5. 岐阜大学大学院医学研究科 皮膚病態学 (平成20年春 完成予定)

膿疱性乾癬（汎発型）治療ガイドラインの特徴

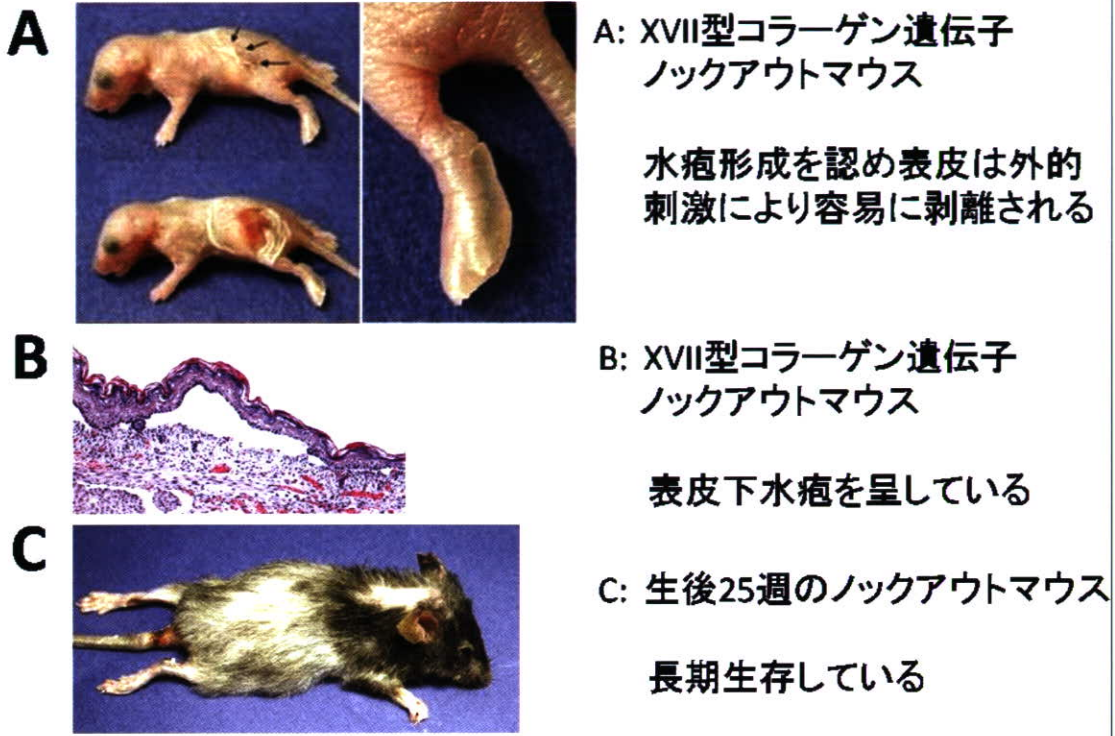
本ガイドライン（別添資料参照）の特徴は、1）膿疱性乾癬（汎発型）を全身性炎症反応とみなし、2）一次医療機関のプライマリーケア、3）二次・三次医療機関での全身管理、4）皮膚症状に対する治療に加えて、5）関節症などの合併症に対する治療を考慮し、6）急性期治療とともに、7）長期的治療計画、8）QOL向上についての視点での標準的治療を目指している。

膿疱性乾癬（汎発型）は稀少疾患であり、エビデンスレベルが高い臨床研究データを収集することが難しい。十分なエビデンスが得られない治療法の羅列では診療にあたる医師にかえって混乱を招くことが危惧されたので、委員会として推奨する治療法についての記述を盛り込む予定である。薬剤の安全使用には最大限の配慮しつつも、生命を脅かす病態に対応するために、安全性が確立されていない薬剤を組み入れざるを得ない箇所があるので（妊婦、授乳婦、小児に対する投薬など）、既報告をもとに委員会として十分な討議を行なう。

（分担研究者：岩月啓氏）

（別添資料）12

長期生存が可能な表皮水疱症モデルマウスの作成

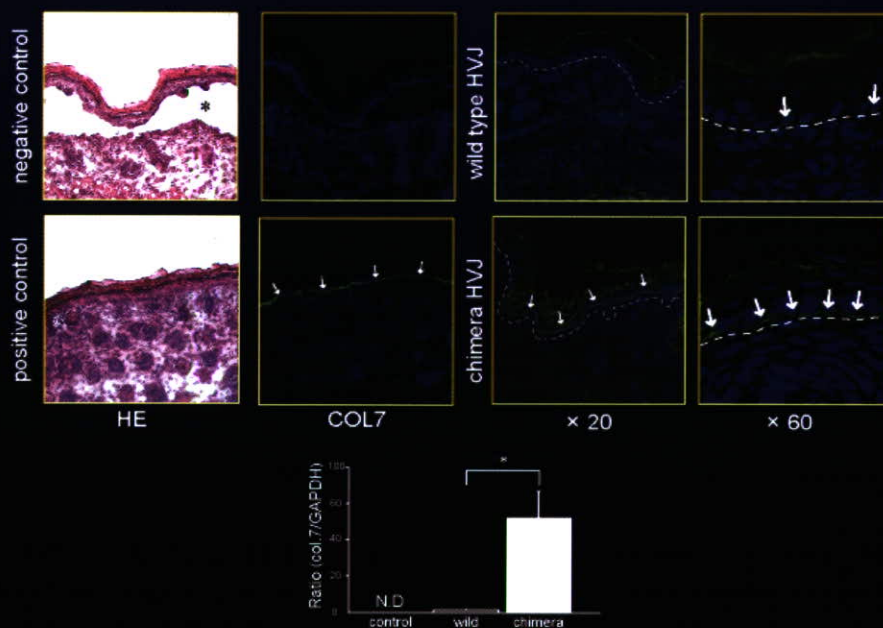


既存の表皮水疱症モデルマウスの殆どが胎生致死あるいは生後間もなく死亡するため、表皮水疱症の新規治療法開発には適していなかった。本研究では、XVII型コラーゲン遺伝子ノックアウトマウスを作成した。その結果、患者と同様に水疱形成が生じ、組織学的にも表皮下水疱を認めた。多くのノックアウトマウスは生後まもなく死亡したが、一部は長期生存が可能であった。本疾患モデルマウスは、今後、表皮水疱症の病態メカニズム解明と新規治療法開発に非常に有用であると思われる。

(分担研究者：清水宏)

標的化HVJ-Eを用いた表皮水疱症モデルマウスへの

7型コラーゲン遺伝子の皮膚特異的導入



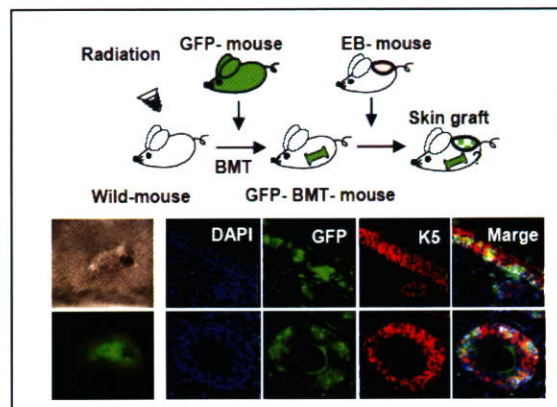
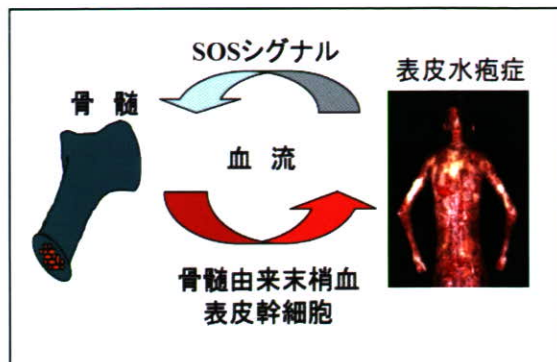
皮膚基底細胞 desmoglein 3 に対する一本鎖抗体と HVJ の F 蛋白変異体とのキメラ蛋白を標的分子として持つ標的化 HVJ envelope vector を開発した。このベクターに VII 型コラーゲン遺伝子を封入して表皮水疱症モデルマウスの水疱内に導入すると皮膚基底細胞での VII 型コラーゲン遺伝子発現が高効率で起こり VII 型コラーゲンの基底膜部位の集積に成功した。上図の上段の右側 2 つは、標的分子を持たない wild type の HVJ envelope vector による VII 型コラーゲン遺伝子の水疱内導入後の発現。下段の右側 2 つは標的分子を持つ HVJ envelope vector による VII 型コラーゲン遺伝子導入後の発現。白矢印で示すように基底膜に沿って VII 型コラーゲンの集積が認められた。VII 型コラーゲンの発現を RT-PCR で評価すると、グラフに示すように、標的化 HVJ envelope vector を用いると wild type の約 20 倍の発現増強があった。

(分担研究者：金田安史)

骨髄由来表皮幹細胞による 皮膚再生機序の解明と 表皮水疱症治療への応用

我々は、表皮水疱症患者皮膚では継続的に表皮幹細胞が水疱蓋として脱落しているにもかかわらず、再生を繰り返すという事実から、骨髄から末梢血を介した皮膚への表皮幹細胞供給機構の存在を想定して研究を進めてきた(上図)。その結果、1)骨髄は表皮及び毛包角化幹細胞を水疱部皮膚に供給し得ること(下図)、2)骨髄幹細胞移植により基底膜接着分子を表皮水疱症皮膚に供給し得ること、3)水疱部皮膚は骨髄幹細胞誘導因子を産生・放出していることを明らかにした。これらの研究成果を基にして、現在骨髄幹細胞移植による表皮水疱症治療のための臨床試験プロトコル作製を進めている。

(難治性皮膚疾患克服事業)



過去3年の研究成果

1. 我々は、表皮幹細胞が生下時より生涯にわたり、水疱蓋として脱落する表皮水疱症皮膚に対して、骨髄由来表皮幹細胞の代償的供給メカニズムの存在を想定して研究を進めた。その結果、骨髄内に表皮及び毛包角化細胞に分化し得る幹細胞が存在することを明らかにした。
 2. 創傷部皮膚、特に移植皮膚片内に多数骨髄由来角化細胞が存在し、VII型コラーゲンを始めとする、表皮水疱症治療に必要な基底膜接着分子を供給していることを明らかにした。
 3. 表皮水疱症水疱部皮膚は、骨髄由来間葉系幹細胞誘導因子を産生・放出し、末梢循環を介して骨髄由来間葉系幹細胞を潰瘍部に動員して再生誘導していることを見出し、この骨髄由来末梢循環間葉系幹細胞動員活性を利用した新しい再生誘導医療開発のための道筋を得た。
- 今後は上述した成果を基にして、骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症治療の臨床応用を進めて行く予定である。

(研究協力者：玉井克人)

(別添資料) 15

表皮水疱症の出生前診断の施行基準 2007 (文責: 清水 宏)

1. 概念

表皮水疱症は、原因遺伝子、臨床症状の両面において、多彩な疾患である。きわめて重症な臨床型はいずれも常染色体劣性遺伝形式をとる。過去に重症型の患児を出産した両親は保因者である可能性が非常に高い。1990年以前は、保因者同士のカップルで再び妊娠した際、胎児が同様に罹患している25%の危険率を恐れて、墮胎というつらい選択をせざるを得ないケースが大半であった。

しかし各病型の原因遺伝子が同定され、出生前診断が技術的に可能となった1990年以降、このような両親が出生前診断を希望することは十分理解しえる。

国際的にも、表皮水疱症の出生前診断は、技術的に可能であり、十分に経験を積んだ複数の限られた施設でのみ施行されている。個々の施設、各国の事情により出生前診断の施行基準、診断基準にある程度の多様性があるが、いずれの場合においても、出生前診断の施行にあたっては、倫理の問題を十分考慮することが必要不可欠である。

以下に、日本における施行基準を示す。

2. 施行基準

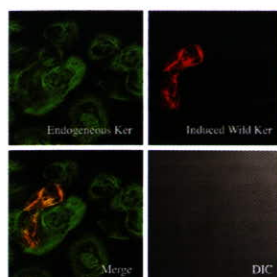
- (1) 対象は重症型の表皮水疱症の患児を過去に出産した両親（保因者であることが確実である）が再び妊娠した場合に限る。
- (2) 遺伝性皮膚疾患の十分な知識、診断技術、経験をもつ医師により遺伝相談を受けることが必須である。リスクなども十分認識したうえで当事者が出生前診断を強く希望する場合に限る。
- (3) 当該医療機関の倫理委員会の承認を得ていること。
- (4) 主な対象病型は、Herlitz 接合部型（ラミニン332変異）、先天性幽門閉鎖症合併接合部型（ $\alpha 6$ あるいは $\beta 4$ インテグリン変異）、先天性幽門閉鎖合併単純型（プレクチン変異）、Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型（VII型コラーゲン変異）の4病型。その他の病型については、個々の症例、事情により勘案する。

3. 診断法の基準

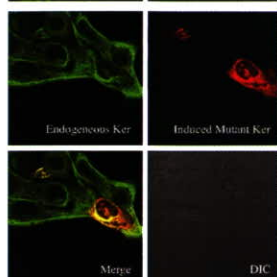
- (1) DNAレベルの診断:原因遺伝子と当該家系における遺伝子変異が確定しており、技術的に診断可能な場合。
- (2) タンパクレベル、微細形態レベルの診断:DNAレベルの診断が不可能な場合、胎児皮膚生検によりタンパクレベル、微細形態レベルで出生前診断が施行可能。妊婦の負担を考えた場合、妊娠より早期に施行可能なDNA診断が望まれる。
- (3) タンパクレベルの診断（胎児皮膚生検）
 - ① Herlitz 接合部型
ラミニン332に対するモノクローナル抗体が陰性である
 - ② 幽門閉鎖合併接合部型
 $\alpha 6$ インテグリンあるいは $\beta 4$ インテグリンにたいするモノクローナル抗体が陰性である
 - ③ Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型
Type VII collagenに対するモノクローナル抗体が陰性であること

ケラチン病モデル細胞の作成および病態解明

野生型ケラチン発現細胞



ケラチン病モデル細胞



1. 野生型ケラチン 14 の cDNA と、ケラチン 14 の 125 番目の Arg が Cys に変化した変異ケラチン 14[K14(R125C)]cDNA を pIND/V5-His ベクターに挿入することにより、野生型ケラチン発現細胞ならびにケラチン病モデル細胞を作成した。
2. このモデル細胞を用いて、ケラチン病治療薬を探索する系を確立した。

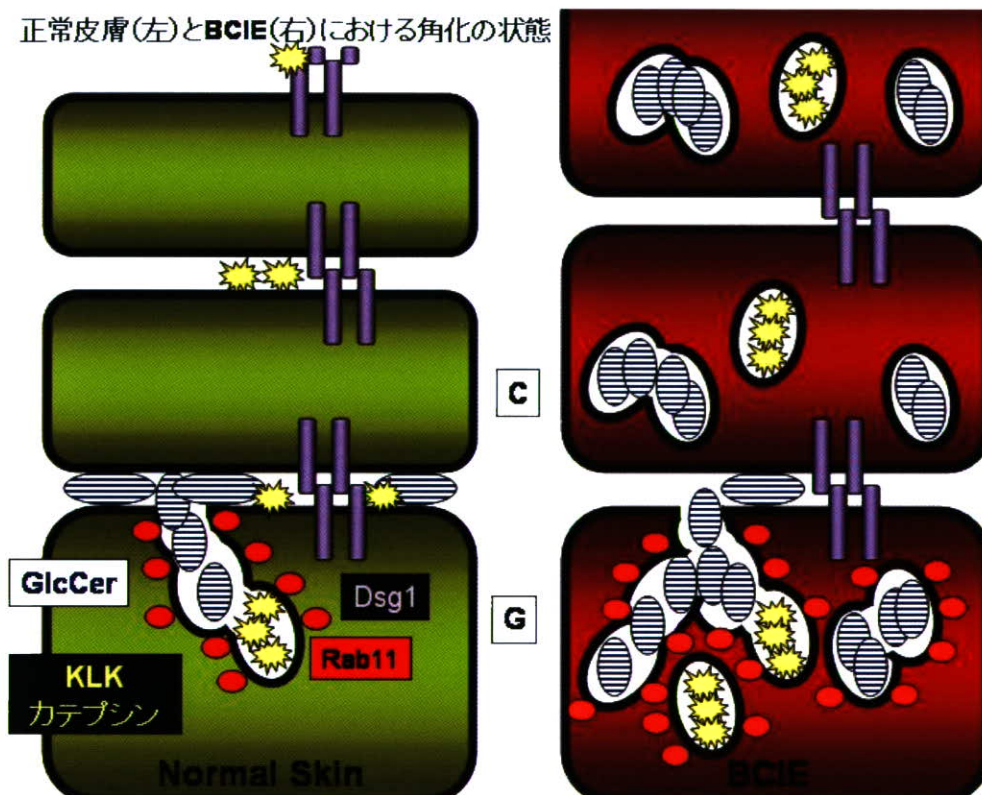
(難治性疾患克服研究事業)

pIND/V5-His ベクターに挿入した。ケラチン 14 の 125 番目の Arg が Cys に変化した変異ケラチン 14 [K14(R125C)] cDNA を同じベクターに挿入した。HaCaT 細胞にトランスフェクションすることにより、野生型ケラチン発現細胞ならびにケラチン病モデル細胞を作成した。

2. 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。その発現量は、添加エクジソン量に依存性であった。
- ・ 以上はケラチン病のみならず、脳のポリグルタミン病、アルツハイマー病など神経細胞死が関与する病態の解明にも貢献する。

(研究協力者：米田耕造)

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の発症機序



1. 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）は細胞骨格のひとつであるケラチンタンパクの異常による角化異常症である。しかし、角質肥厚の病態は不明であり、有効な治療法も開発されていない。我々は先に本研究班においてBCIEにおいては角化に関連の深い細胞内小器官である層板顆粒の分泌が不十分であることを明らかにしてきた。

2. 過去3年間では層板顆粒の新しい成分としてカテプシンD、カテプシンVを同定した。Rab11が層板顆粒の細胞内輸送に関与していることを示唆する知見を得た。また、BCIEでは各種の層板顆粒分子とRab11の発現や局在が異常となっていることを明らかにした。

・正常皮膚およびBCIEをはじめとする角化異常症における角化の機構、特に層板顆粒の輸送と分泌のメカニズムについては不明な点が数多く残されており、今後のさらなる研究が必要である。

(分担研究者：山本明美)

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の皮疹形成機序と治療 に関する研究

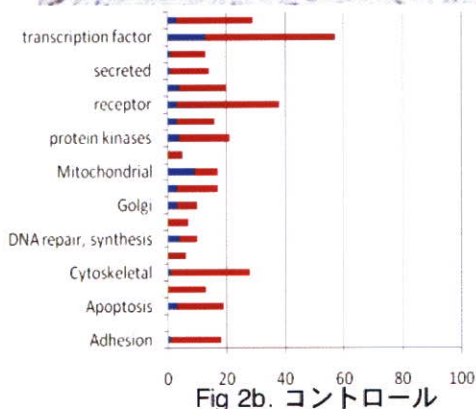
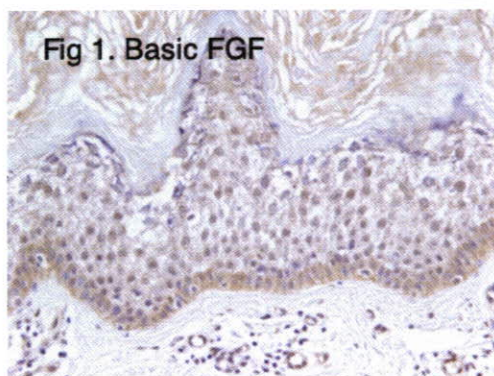


Fig 2a. 変異ケラチンK1

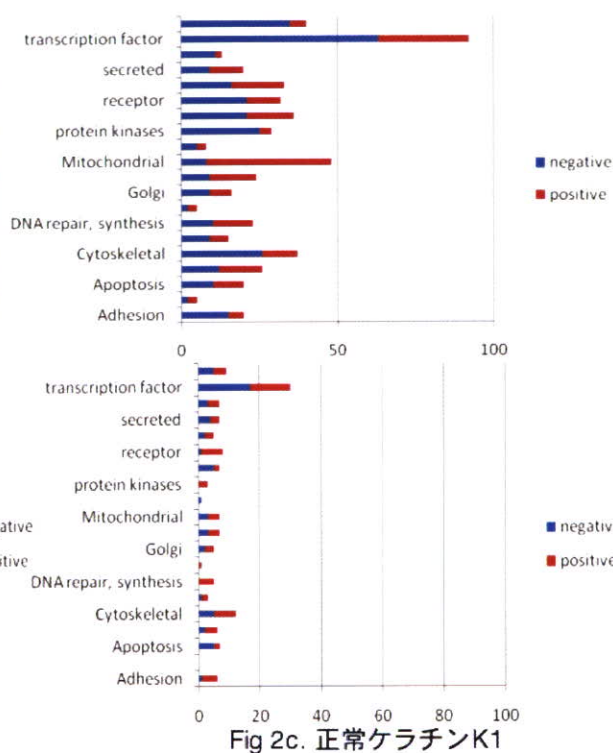


Fig 1. BCIE患者病変部皮膚では、正常人コントロールに比べ、basic FGFが強く発現していた。Basic FGFには表皮増殖作用、血管増生作用、マスト細胞遊走作用があり、BCIEでの表皮増殖、血管増生、マスト細胞の増加を説明できる。変異ケラチンK1導入正常ヒト表皮細胞では野生型ケラチンK1導入細胞に比べて上清中のbasic FGF濃度が高かったことはこの結果を裏付ける。

Fig 2. 変異ケラチンK1導入細胞は、伸展刺激によって発現に影響を受ける分子の数が、正常コントロールに比べ多く、野生型ケラチンK1導入細胞は、正常コントロールに比べ少なかった。また変異ケラチンK1導入細胞では、炎症にかかわる分子の発現誘導が認められた。このことは、BCIE患者皮膚において変異ケラチンK1は表皮細胞のintegrityを低め、表皮細胞の伸展・収縮などの力学的刺激への耐性を弱めており、その結果多くの炎症成分の発現が誘導され、皮疹の形成に至っている可能性が考えられる。

この研究は、今後これらの炎症分子や、細胞骨格関連分子発現のメカニズムを解明し、そのシグナル伝達を阻害するような低分子化合物やsiRNA、デコイ核酸などを用いて、BCIEの皮疹形成を抑制することにより、治療に直接に結びつく研究に発展する可能性がある。

(分担研究者：小宮根真弓)

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

発行 平成20年3月24日

発行所 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班事務局
岐阜大学大学院医学研究科病態制御学講座皮膚病態学
〒501-1194 岐阜市柳戸1番1

☎058-230-6394 FAX: 058-230-6396