

図2. 一過性発現確認 (RT-PCR)

NIH3T3細胞への遺伝子導入72時間後の細胞を回収し、CYP24a1およびCYP27b1の発現を確認した。

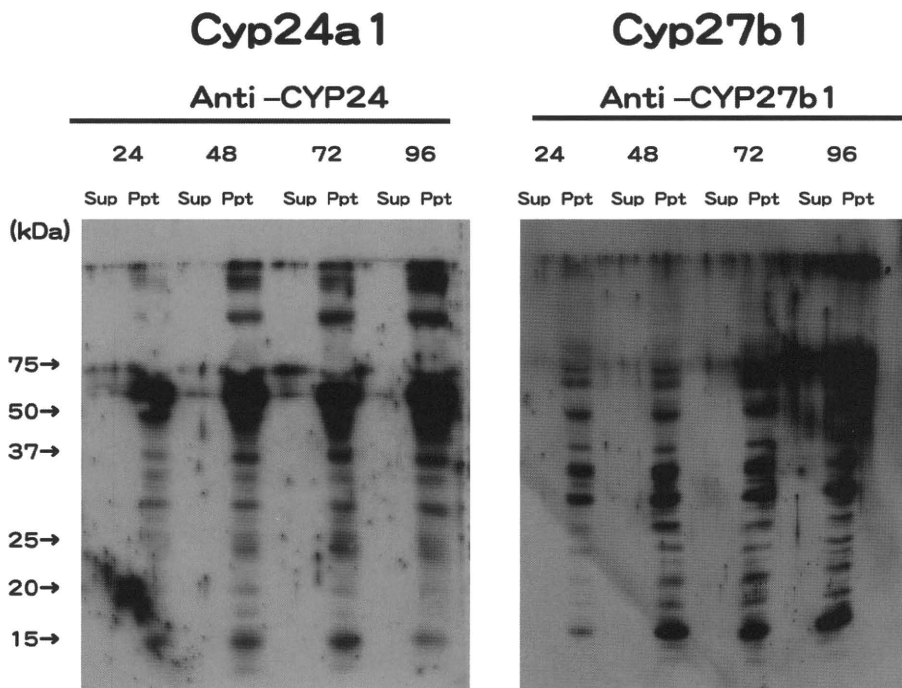


図3. 細胞での一過性発現確認 (WB HK293)

Cyp27b1, Cyp24a1共に所定サイズに強いバンドが反応した。

Cyp27b1: 56kD、Cyp24a1: 59kD。

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

膿疱性乾癬の重症度スコアと血清 YKL-40 値の相関

研究協力者 山西清文 兵庫医科大学皮膚科学 主任教授

研究要旨 YKL-40 (Chitinase3-like1 (CHI3L1)) はキチナーゼ様の構造をもつタンパクで、血中にも存在し、悪性腫瘍、関節リウマチ、喘息等で増加することが知られている。本研究では膿疱性乾癬患者の血清 YKL-40 値を治療前後で測定し、膿疱性乾癬重症度スコアと YKL-40 値の相関性を検討した。その結果、膿疱性乾癬の臨床症状に応じて血清 YKL-40 値の変動が観察され、膿疱性乾癬重症度スコアと YKL-40 値の間に統計的に有意な相関がみられた。

共同研究者

今井 康友 兵庫医科大学 皮膚科学
津田 達也 兵庫医科大学 皮膚科学
青地 聖子 岡山大学大学院 皮膚科学
岩月 啓氏 岡山大学大学院 皮膚科学

A. 研究目的

我が国では膿疱性乾癬（汎発型）の病勢の評価には従来より本研究班の重症度スコアが用いられている。臨床検査として実施される白血球数やCRP値などの非特異的炎症マーカーは必ずしも膿疱性乾癬重症度スコアとは相関せず、本疾患の重症度を反映するバイオマーカーは未だ確立されていない。YKL-40 (Chitinase3-like1 (CHI3L1)) はキチナーゼ様の構造を持つタンパクで、関節炎や骨関節症患者をはじめ、各種炎症性疾患や悪性腫瘍等の血中バイオマーカーとしての有用性が示唆されている。今回は、YKL-40が膿疱性乾癬の病勢を反映するマーカーとなり得るかどうか、膿疱性乾癬の重症度スコアと血中 YKL-40 値の相関について検討を行った。

B. 研究方法

血清 YKL-40 値は Quidel 社 ELISA キットを用いて測定した。
(倫理面への配慮)

倫理委員会で承認を得た研究計画に沿ってインフォームドコンセントを得たうえで、研究を行った。

C. 研究結果

21人の健常人 (Control)、尋常性乾癬 (PV) 41名、関節症性乾癬 (PsA) 18名、膿疱性乾癬 (PP) 21名について血清 YKL-40 値を測定した結果、健常者における血清 YKL-40 値の平均は 29.4 ng/mL であったのに対し、PsA、PP 患者はそれぞれ 99.1、270.0、493.5 であった。Dunn's test で検定したところ、PV、PsA ならびに PP 患者の血清 YKL-40 値は健常者よりも有意に高値を示し、さらに、PV 患者に比べ、PsA、PP 患者の血清 YKL-40 は有意に高値を示した (図 1)。

膿疱性乾癬 6 症例の血清を経時的に採取し、治療前後における血清 YKL-40 値の変動を Wilcoxon signed rank test で検定した。その結果、治療によって血清 YKL-40 値の有意な減少を認めた (図 2)。

D. 考察

YKL-40 はキチナーゼ様の構造を持つが糖鎖の加水分解活性はなく、ヒトにおける YKL-40 の機能はまだ十分には解明されていない。しかし、YKL-40 は滑膜細胞、軟骨細胞、好中球、マクロファージなどから分泌され、

ノックアウトマウスでは抗原特異的なT細胞の反応性低下が報告されており、少なくとも免疫の活性化に参与するタンパクと考えられる。臨床的には血清YKL-40値は関節リウマチでは関節破壊を反映すること、喘息の病勢を反映すること、乳癌、大腸癌、卵巣癌、悪性黒色腫で予後を反映することが報告されている。PPは、全身炎症反応症候群としてとらえるべき病態で、全身管理、皮膚病変の治療、関節症や眼合併症などの合併症予測のために、その病勢を反映する特異的なバイオマーカーが求められている。本研究から、血清YKL-40値は乾癬患者のなかでも、とりわけ膿疱性乾癬患者で高値であること、血清YKL-40値は膿疱性乾癬の治療前後で重症度スコアとよく相関することが明らかになり、YKL-40は膿疱性乾癬の病勢マーカーとして有用と思われる。

E. 結論

膿疱性乾癬の6例の経時的観察により、血清YKL-40値が膿疱性乾癬の病勢マーカーとして有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Tarutani M, Imai Y, Yasuda K, Tsutsui H, Nakanishi K, Yamanishi K. Neutrophil-dominant psoriasis-like skin inflammation induced by epidermal-specific expression of Raf in mice. J Dermatol Sci., 58, 28-35, 2010

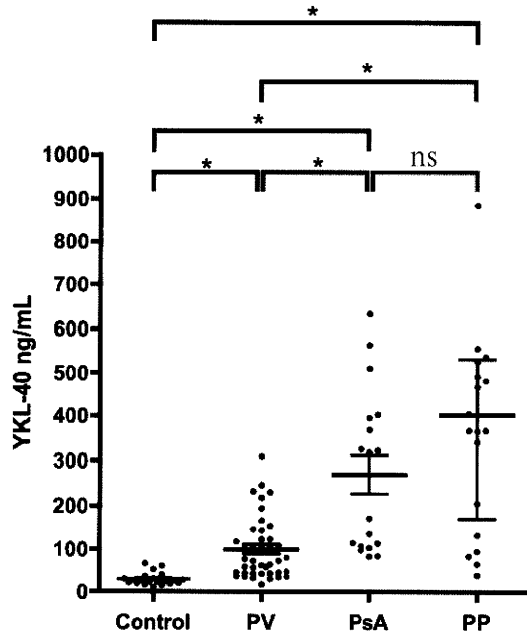
学会発表

1. 古川紗綾佳、今井康友、上田英一郎、山西清文、白血球除去療法が著効した膿疱性乾癬、第25回日本乾癬学会学術大会 2010.9.
2. Yasutomo Imai, Ryoko Takei-Tanigu-

chi, Kiyofumi Yamanishi, Effect of tacalcitol and cyclosporine A on protease-activated receptor 2-mediated CXCL1 and IL-8 production in human keratinocytes. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010.12.

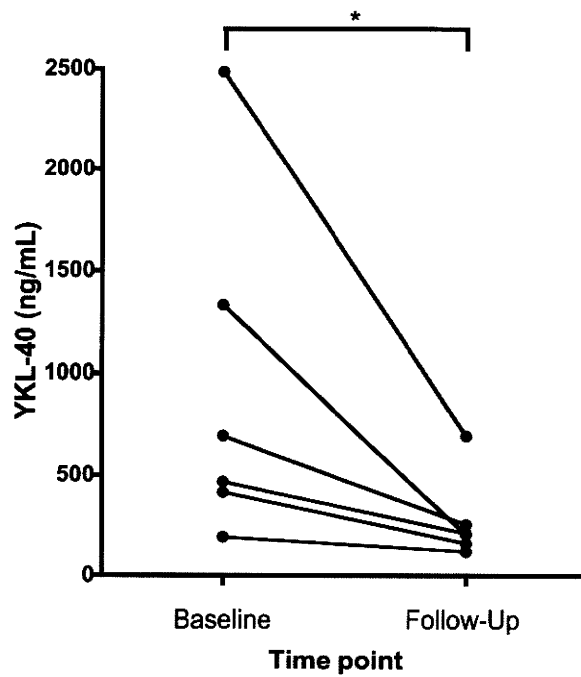
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



*, $P < 0.001$ (Dunn's test); ns, not significant

図1 健常人と乾癬患者における血清 YKL-40 値の比較



*, $P < 0.05$, Wilcoxon signed rank test

図2 膿疱性乾癬の治療前後における血清 YKL-40 値の変動

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

膿疱性乾癬における表皮細胞のCTACK発現調節についての検討

研究分担者 小宮根真弓 自治医科大学皮膚科学 准教授

研究要旨 乾癬局面周囲の健常皮膚において、リンパ球の浸潤なしに、すでに炎症性変化が生じていること、とくに炎症性樹状細胞が存在することを以前報告した。昨年度までの検討から、樹状細胞が直接表皮細胞に作用することによって表皮細胞にCTACK/CCL27の発現が誘導される可能性が示唆された。今回、表皮細胞におけるCTACK産生調節機序について、in vitroの系を用いて検討した。TNFによって誘導されたCTACKはIFN γ によって抑制されたが、この抑制は、EGF受容体、ERK依存的に生じ、さらにJAK、STAT1が関与していることを明らかにした。さらに、表皮細胞の分化に伴い、IFN γ による抑制がかかりにくくなることを明らかにした。

共同研究者

唐川 大 東京大 皮膚科
大槻マミ太郎 自治医大 皮膚科
玉置 邦彦 東京大 皮膚科
花川 靖 愛媛大 皮膚科
橋本 公二 愛媛大 皮膚科

細胞は、N.Fusenig氏より許可を得、黒木登志夫先生より供与していただいたものを使用した。正常ヒト表皮細胞は、クラボウより購入したものをを用いた。

CTACK/CCL27は培養上清中の濃度をELISAにて測定した。また、リアルタイムPCRにてメッセンジャーRNAを測定した。

STAT1DN、STAT1WTを含むプラスミドベクターは大阪市立大学中嶋弘一氏より供与されたもので、共同研究者である愛媛大花川靖氏によりアデノウイルスベクターが作成された。

A. 研究目的

膿疱性乾癬は、尋常性乾癬とは異なる側面を多数持つが、類縁疾患と考えられているように、類似の病態を示す部分も多い。尋常性乾癬局面周辺部の健常皮膚において、Tリンパ球がほとんど存在しない部分においても炎症性樹状細胞が表皮真皮境界部に存在しており、その部分の表皮にはケラチンK6、K16、ケモカインCTACK/CCL27の発現や転写因子であるC/EBP β の発現など、すでに炎症性変化が生じており、樹状細胞が直接表皮細胞に作用することによってこのような変化が生じうることをこれまでに示している。今回、表皮細胞におけるCTACK発現調節について、その機序を検討したので報告する。

C. 研究結果

- 1) 表皮角化細胞におけるCTACK産生はTNF α により誘導され、IFN γ によりその誘導が抑制された（図1）。
- 2) TNF α によるCTACK産生誘導は、NF κ Bあるいはp38MAPキナーゼの阻害により抑制され、CTACK産生誘導のIFN γ による抑制はERK阻害により解除された。
- 3) 表皮角化細胞においてIFN γ によりSTAT3およびSTAT1の活性の上昇とリン

B. 研究方法

- 1) 不死化した表皮角化細胞であるHaCaT

酸化が見られた。

- 4) ドミナントネガティブSTAT1 (STAT1DN) の導入によりIFN γ によるTNF α 誘導CTACK産生の抑制が部分的に解除された。
- 5) ワイルドタイプSTAT3 (STAT3WT) を導入することでTNF α によるCTACK産生誘導が低下した。
- 6) IFN γ によるCTACK誘導抑制はJAKの阻害により部分的に解除された (図2)。
- 7) IFN γ によるCTACK誘導抑制は高confluencyによるNHKの分化により解除された。
- 8) IFN γ によるCTACK誘導抑制はEGF受容体の阻害により解除された。
- 9) 表皮角化細胞において、IFN γ によりEGF受容体リガンドであるTGF α およびamphiregulinの産生が誘導された。

D. 考察

以上の結果から、表皮細胞におけるCTACKの発現をTNF α が誘導し、IFN γ が抑制し、その抑制にはEGF受容体、ERK、STAT1がポジティブに関与し、またSTAT3はTNF α によるCTACKの誘導にネガティブに関与していることが明らかとなった。さらに、IFN γ 刺激により表皮細胞からEGF受容体リガンドが産生されたことから、IFN γ はEGF受容体リガンドを介して表皮細胞のEGF受容体を刺激し、その下流にERKが存在する可能性が考えられた。この系にSTAT1が関与するとすれば、おそらくIFN γ によるEGF受容体リガンド産生の過程にSTAT1が関与している可能性が考えられる。これらをまとめると、図3のような仮説が立てられる。

その後の検討により乾癬局面部においてはCTACK/CCL27の発現は基底細胞層に局限しているのに対し、乾癬局面の辺縁部では、全層に発現が認められた。乾癬局面部ではおそらくTh1細胞から産生されるIFN γ が作用してCTACK/CCL27産生は抑制されており、

さらに表皮細胞は過増殖を示すので、IFN γ による抑制がかかりやすい状態になっている可能性が示唆される。一方乾癬局面の辺縁部では、まだT細胞の浸潤がなく、IFN γ の作用はあまりなく、しかし炎症性樹状細胞からのTNF α あるいは直接接触によってCTACK/CCL27の発現が誘導されている可能性がある。さらにこの部分の有棘層の表皮細胞は過増殖ではなく分化しており、IFN γ が存在していてもその影響を受けにくくなっている可能性がある。

E. 結論

CTACK/CCL27は乾癬局面形成の初期に、おそらく炎症性樹状細胞からのTNF α ないし直接接触によって表皮に誘導されてTリンパ球の遊走を誘導するが、乾癬局面形成の後期にはその発現がおそらく浸潤Tリンパ球から産生されるIFN γ によって抑制される。乾癬局面形成の後期にはIL-8などが産生され、好中球遊走に参与するものと推測された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. Karakawa M, Komine M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Tada Y, Saeki H, Tamaki K: Duration of remission period of narrowband ultraviolet B therapy on psoriasis vulgaris. J Dermatol, accepted
2. Takekoshi T, Tada Y, Watanabe T, Sugaya M, Hoashi T, Komine M, Kawashima T, Shimizu T, Hau CS, Asahina A, Yokomizo T, Sato S, Tamaki K: Identification of a novel marker for dendritic cell maturation, mouse transmembrane protein 123. J Biol Chem. 2010; 285 (41): 31876-84.
3. Nakajima A, Matsuki T, Komine M,

- Asahina A, Horai R, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y: TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in Il1rn-/- mice. *J Immunol.* 2010; 185 (3): 1887-93.
4. Karakawa M, Komine M, Tamaki K, Ohtsuki M: Roxithromycin downregulates production of CTACK/CCL27 and MIP-3alpha/CCL20 from epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2010; 302 (10): 763-7.
 5. Torii H, Nakagawa H; Japanese Infliximab Study investigators: Infliximab monotherapy in Japanese patients with moderate-to-severe plaque psoriasis and psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Dermatol Sci.* 2010; 59 (1): 40-9.
 6. Asahina A, Nakagawa H, Etoh T, Ohtsuki M; Adalimumab M04-688 Study Group: Adalimumab in Japanese patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: efficacy and safety results from a Phase II/III randomized controlled study. *J Dermatol.* 2010; 37 (4): 299-310.
- 態と治療における生物学的製剤の位置づけ (会議録)、第73回東京支部総会、2010年2月、東京.
5. 小宮根真弓 (自治医科大学 皮膚科学講座): 乾癬治療 外用剤だからできることを見直そう 部位から免疫まで 乾癬の病態と活性型ビタミンD3外用薬の作用 (会議録)、第109回日本皮膚科学会総会、2010年4月、大阪.
 6. 小宮根真弓 (自治医科大学 皮膚科学講座): 乾癬 掌蹠膿疱症の新しい病因論と治療 尋常性乾癬の病態における表皮の役割 (会議録)、第109回日本皮膚科学会総会、2010年4月、大阪.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得 該当なし。
 2. 実用新案登録 該当なし。

学会発表

1. 小宮根真弓: Keratinocytes: their roles in the pathogenesis of psoriasis. 第25回、日本乾癬学会、2010年9月、山口.
2. 小宮根真弓: ビタミンD3外用薬の使い方を考える; 乾癬治療における活性型ビタミンD3外用剤の位置づけ、第25回、日本乾癬学会、2010年9月、山口.
3. 小宮根真弓: 乾癬の病態と治療における生物学的製剤の位置づけ、第73回東京支部総会、2010年2月、東京.
4. 小宮根真弓 (自治医科大学): 乾癬の病

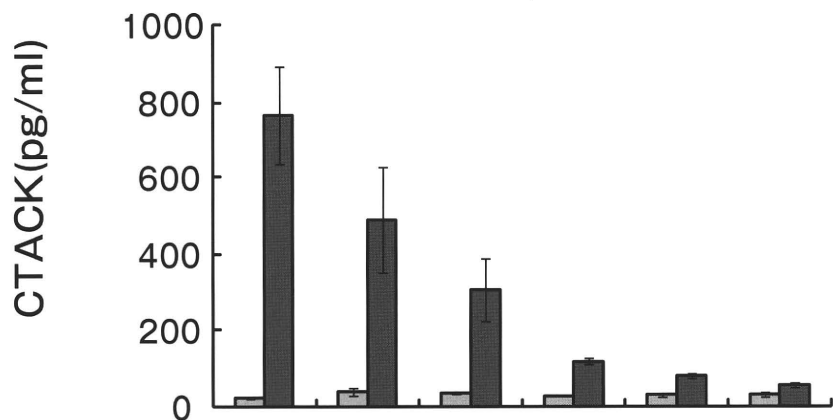


图 1

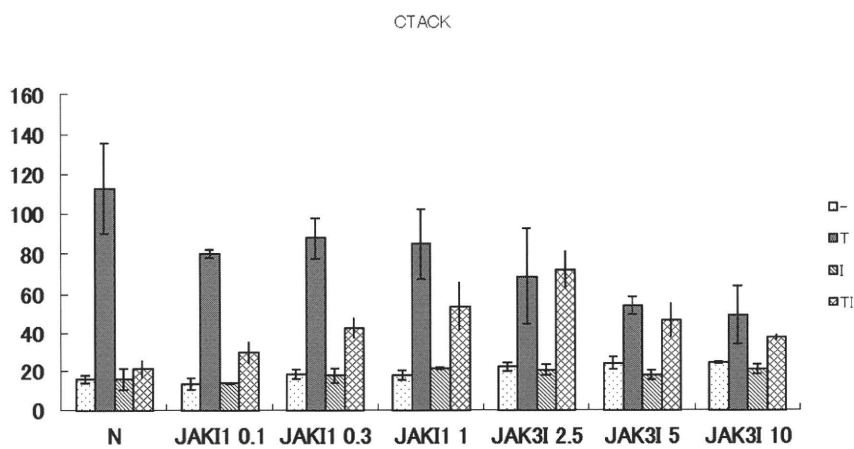


图 2

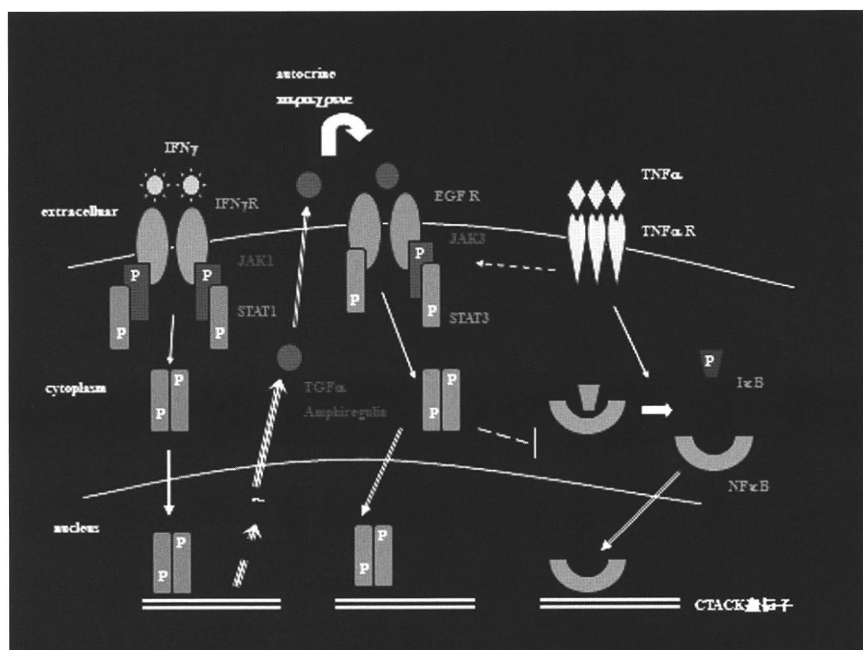


图 3

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

ゲノムワイドな遺伝的相関解析による乾癬感受性遺伝子の同定

研究協力者 小澤 明 東海大学医学部専門診療学系皮膚科学 教授

研究要旨 汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明することを目的とし、その前段階として、尋常性乾癬について解析を行っている。ゲノムワイドな遺伝的相関解析で絞り込んだ4個の候補遺伝子のうち、Gタンパク連結型受容体スーパーファミリー（GPCR 遺伝子）は、最も乾癬と関連が強くみられた。今年度は、このGPCR 遺伝子がコードする蛋白のリガンドを同定することを目標に、Yeast two hybrid法を用いて、GPCRと相互作用のある蛋白質を網羅的に探索を行った。結果、57個の遺伝子由来の蛋白が同定され、その中で興味深い一つの相互作用群が見出された。

共同研究者

馬淵 智生 東海大学医学部

専門診療学系講師

赤坂 江美子 東海大学医学部

専門診療学系助教

比留間 梓 東海大学医学部

専門診療学系大学院3年

猪子 英俊 東海大学医学部

分子生命科学教授

岡 晃 東海大学医学部

分子生命科学講師

A. 研究目的

汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明する。その前段階として、尋常性乾癬の疾患感受性遺伝子を同定する。

平成14年度より多施設から集めた尋常性乾癬患者群およびコントロール群の血液由来のDNAを対象とし、ゲノムワイドに遺伝的相関解析を行っている。尋常性乾癬患者561例を対象に、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て遺伝的相関解析を行った。最終的に有意な相関が認められた16個のマーカーの近傍領域について、SNPマーカーを用いた遺伝的相関解析を行った。その結果、①Gタンパク

連結型受容体スーパーファミリー（GPCR 遺伝子）、②SEEK1遺伝子（HLA class I 領域6 p21.3に存在）、③Ca²⁺非依存性細胞接着分子スーパーファミリー、④BTNL2遺伝子が疾患感受性候補遺伝子として絞り込まれた。

平成22年度の取り組みとしては、①について、GPCRのリガンドの同定を目的に調査を行っている。

B. 研究方法

Yeast two hybrid法を用いて、GPCR 遺伝子がコードする蛋白と相互作用をする蛋白の網羅的な検出を実施した。

また、得られた結果に対し、公共データベース上にあるすべてのタンパク間相互作用情報を用いて、in silicoにてネットワーク解析を実施した。

C. 研究結果

Yeast two hybrid法を用いたスクリーニングにて、143個の陽性クローンを獲得した。次に、これらをすべてシークエンシングし、57個の遺伝子由来の蛋白を同定した。このうち、同一の蛋白が複数のクローンに存在したものは25個であった。

次に、これらの情報と公共データベース上に

ある蛋白間相互作用情報を用いてネットワーク解析を実施した。その結果、興味深い一つの相互作用群が見出された(図1)。CCL2とARL6IP5は共に、今回の実験で複数クローンが検出された蛋白である。GPCRのリガンドになりうるものとして検出された蛋白は、このCCL2のみであった。また、CCR5はネットワーク解析により見出され、CCL2とARL6IP5に共通した相互作用蛋白である。

D. 考察

CCL2 (chemokine ligand 2) は、乾癬皮疹部で顕著にその発現が上昇していることが確認されているケモカインである。また、マクロファージに対して走化性を有し、創傷治癒や皮膚炎症の重要な因子であると考えられている。乾癬との関連が疑われるケモカインである。

ARL6IP5 (ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5) は、細胞の分化に関与すると考えられているが、その機能の詳細は不明である。しかしこの蛋白は、グルタミン酸輸送体であるEAAC1と結合して、その機能を阻害することが分かっており、EAAC1を介して創傷治癒に機能していると考えられる。乾癬との関わりに関しては現在のところ不明である。

CCR5 (chemokine receptor 5) は、主にT細胞やマクロファージで発現しているが、皮膚の修復のピークにおいて発現の停止が見られるとの報告があり、創傷治癒に何かしら関連があると考えられる。

以上のように、今回の実験結果において、皮膚での創傷治癒、炎症に関与する分子群と相互作用を示す可能性が示唆され、乾癬との関連が期待される。

E. 結論

GPCRのリガンド候補として、乾癬皮疹部で発現の上昇がみられるケモカインが見出された。またGPCRは、皮膚での創傷治癒、炎症に関与する分子群と相互作用を示す可能性

が示唆され、乾癬との関連が期待される。

今後の計画としては、実際にこのケモカインとGPCRとの相互作用を、直接確かめる実験を行うことを計画している。これにより、乾癬における当該遺伝子の関与を立証していきたい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. Asahina A, Nakagawa H, Etoh T, Ohtsuki M; Adalimumab M04-688 Study Group. Adalimumab in Japanese patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis : Efficacy and safety results from a Phase II / III randomized controlled study. *J Dermatol.* 37 : 299-310,2010
2. Riveira-Munoz E, He SM, Escaramis G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, Oka A, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PL, Armour JA, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun LD, Cui Y, Yin XY, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok PY, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang XJ, Elder JT, Estivill X : Meta-Analysis Confirms the *LCE3C-LCE3B* Deletion as a Risk Factor for Psoriasis in Several Ethnic Group and Finds Interaction with *HLA-Cw6*. *J Invest Dermatol online.* 2010 Nov 25
3. J. Graham Smith Jr, M.D., Emeritus Professor, University of South Alabama, 1928-2010. *J Dermatol.* 37 : 861-863,2010

4. 赤坂江美子、小澤明：病院皮膚科での光線療法をするコツ、Monthly Book Dermatol72：79-82,2010

学会発表

1. 小澤明、馬淵智生、赤坂江美子、比留間梓、加藤正幸、生駒憲広、田宮紫穂、松山孝. 乾癬におけるシクロスポリン療法～問題点の整理と対策～. 第109回日本皮膚科学会総会、平成22年4月17日～19日、大阪
2. 小澤明. ジェネリック製剤の現状と将来、そして選択の基準～質・プライス・安全性～. 第109回日本皮膚科学会総会、平成22年4月17日～19日、大阪
3. Yahagi E, Akasaka E, Hiruma A, Mabuchi T, Ikoma N, Tamiya S, Matsuyama T, Kusakabe Y, Kurihara S, Ozawa A. Clinical evaluation as to topical therapy for nail psoriasis using high concentration maxacalcitol lotion; vitamin D3 lotion. The 14th Annual Meeting The Korean Society for Psoriasis, 平成22年5月15日、韓国・ソウル
4. 赤坂江美子、小澤明. 乾癬における生物学的製剤治療と外用療法. 第25回日本乾癬学会、平成22年9月3日～4日、山口
5. 武藤正彦、飯塚一、板見智、小澤明、川久保洋、佐伯秀久、島田眞路、深井和吉、真鍋求、三橋善比古. 日本人乾癬患者集団における Vascular endothelial growth factor (VEGF) の一塩基多型解析. 第25回日本乾癬学会、平成22年9月3日～4日、山口
6. 比留間梓、赤坂江美子、馬淵智生、加藤正幸、生駒憲広、田宮紫穂、松山孝、小澤明、岡晃、猪子英俊. 乾癬の原因遺伝子解析～Ca²⁺非依存性細胞接着分子スーパーファミリーの遺伝子発現の検討～. 第25回日本乾癬学会、平成22年9月3日～4日、山口
7. Hiruma A, Oka A, Akasaka E, Mabuchi

T, Yamaoka H, Kato M, Ikoma N, Tamiya S, Matsuyama T, Inoko H, Ozawa A. An evaluation of correlation between genotypes and expressions in the psoriasis-susceptibility gene coding for a cell adhesion molecule. 日本研究皮膚科学会第35回年次学術大会・総会、平成22年12月3日～5日、和歌山

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特記すべき事項なし

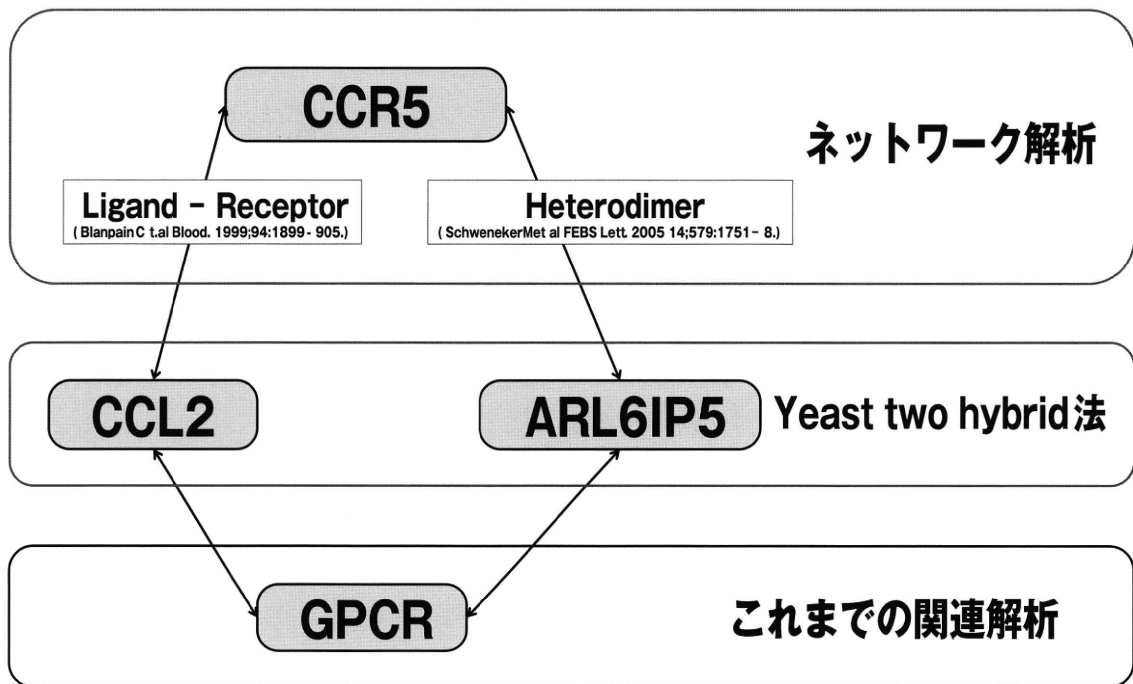


図1. ネットワーク解析により見出された蛋白相互作用群

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

分子標的薬インフリキシマブの効果予測因子の探索（I）

研究分担者 武藤正彦 山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨 膿疱性乾癬（GPP）の治療に抗TNF α 阻害薬（インフリキシマブ）が保険適応となり、GPP診療ガイドラインにも収載された。より適切かつ効率的なGPP治療を目指したその事前予測指標の開発が急がれるところである。

今回の研究では、（1）予備的検討として、尋常性乾癬でインフリキシマブが臨床的に有効であった1例について、投与前後における遺伝子発現解析を実施した。その結果、IL-8遺伝子発現の減少とHLAクラスI遺伝子発現の亢進が観察された。（2）また、GPP患者9名のTNF α プロモーター領域のSNP解析から、正常者群との有意なズレは認められなかった。

従って、インフリキシマブの効果判定の予測指標として、IL-8遺伝子発現の変動率があげられると考えた。

共同研究者

田中 朱美 山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野

浪花研一郎 山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野

A. 研究目的

膿疱性乾癬（以下GPPと略す）は膿疱形成を中心とした乾癬の重症型である。GPP診療ガイドラインには、生物学的製剤を含むエトレチナート、シクロスポリンおよびメトトレキサートより構成される全身療法が記載されている。GPP患者毎に至適治療法が異なるため、治療最適化のための事前予測指標が判れば、オーダーメイド医療の飛躍的進歩が可能となる。

本研究では、主要な全身療法治療薬の事前予測指標の探索を行ってきた。今回の研究は、GPPに保険適応となった抗TNF- α 阻害薬（インフリキシマブ）に関する効果事前予測に貢献しうる指標について検討した。

B. 研究方法

1) 同意の得られた尋常性乾癬（70歳男、

PASIスコア25）患者1名につき、インフリキシマブ投与前後での末梢血由来RNAを用いて、cDNAを作製し、DNAマイクロアレイ解析を実施し遺伝子発現能を調べた。正常対照者1名からの末梢血由来RNAを陰性対照とした。経時的遺伝子変動を調べるために、インフリキシマブ投与前日、投与1日後、10日後の3点について評価した。2) TNF- α プロモーター領域内のSNP解析（-238、-308、-857、-863、-1031）を9名のGPP患者について検討した。

C. 研究結果

1) DNAマイクロアレイ解析

図1に示すように、正常コントロールに比べて、尋常性乾癬患者で発現が亢進している遺伝子群（SIRPB, TPST1, HRK, DAAM1, GSTT1他）と、逆に発現が低下している遺伝子群（FGF5, ABCA17, BTNL3他）の2群が存在することが判明した。

同一患者内での経時的遺伝子発現変動をみたのが図2である。IL-8は投与10日後にその発現能が低下していた。さらに、HLAクラスI抗原の遺伝子発現能が投与10日後にむ

しる亢進していた。抗TNF α 阻害薬は、IL-8の遺伝子発現を減少させることで有効性を発揮していることが示唆される。

2) TNF- α 遺伝子プロモーター領域のSNP解析

GPP患者9名のTNF- α 遺伝子プロモーター領域のSNP(5ヶ所)は、正常対照群との間でその頻度に有意差は認められなかった。

D. 考察

DNAマイクロアレイ解析結果の解釈は複雑であるが、今回の解析から、IL-8に注目した解析を行えばよいことが示唆された。すなわち、これまでのGPP患者由来好中球レセプター遺伝子多型の観察事実と合わせて考えると、当該乾癬患者において、インフリキシマブが有効なGPP患者と、無効であったGPP患者とを用いて、IL-8遺伝子の機能解析を行うことで、真の原因究明につながることを期待される。

TNF- α 遺伝子プロモーター自体には、正常者群との間に有意な多型が存在しないことが示唆された。

これまでに行ってきた本研究の乾癬治療(全身療法)のアルゴリズムを図3にまとめておく。

E. 結論

DNAマイクロアレイ解析から、IL-8遺伝子の発現調節機構の解明が重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表(平成22年度)

論文発表

1. Ogawa E, Owada Y, Ikawa S, Adachi Y, Egawa T, Nemoto K, Suzuki K, Hishinuma T, Kawashima H, Kondo H, Muto M, Aiba S, Okuyama R: Epidermal-type

FABP (FABP5) regulates keratinocyte differentiation via the 13 (s) -HODE-mediated activation of the NF- κ B signaling pathway. J Invest Dermatol, November 11, 2010 [Epub ahead of print]

2. Muto M: The detection of genetic variants concerning psoriasis susceptibility. Dermatologie in Beruf und Umwelt, 58 (2): 82-83, 2010
3. Nakamura Y, Fujimoto M, Hayashida N, Takii R, Nakai A, Muto M: Silencing HSF 1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in a human melanoma cell line. J Dermatol Sci, 60: 187-192, 2010
4. Muto M, Deguchi H, Tanaka A, Inoue T, Ichimiya M: Association between T-lymphocyte regulatory gene CTLA 4 single nucleotide polymorphism at position 49 in exon 1 and HLA-DRB 1 *08 in Japanese patients with psoriasis vulgaris. J Dermatol Sci, in press
5. Yuki T, Hachiya A, Kusaka A, Sriwiranont P, Visscher MO, Morita K, Muto M, Miyachi Y, Sugiyama Y, Inoue S: Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. J Invest Dermatol, December 16, 2010 [Epub ahead of print]
6. Wakamatsu K, Naniwa K, Hagiya Y, Ichimiya M, Muto M: A case of psoriasis verrucosa. J Dermatol, 37: 1060-1062, 2010
7. 浪花研一郎、山口道也、武藤正彦: 汎発性膿疱性乾癬. 皮膚病診療、32 (11): 1183-1186, 2010

学会発表

1. Muto M: The detection of genetic variants concerning psoriasis susceptibility.

The 9th meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2010.6.8-10, Weimar

2. Muto M : Yamaguchi M, Deguchi H, Abe Y, Ichimiya M, Allelic polymorphism and haplotypes of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in human melanoma. The 1st Eastern Asia Dermatology Congress, 2010.9.30-10.2, 福岡市

3. Nemoto K, Adachi Y, Okuyama R, Owada Y, Muto M : Decreased adhesion ability in the mouse keratinocyte lacking fatty acid binding protein 5 (FABP5) gene. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010. 12.3-5, Wakayama

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

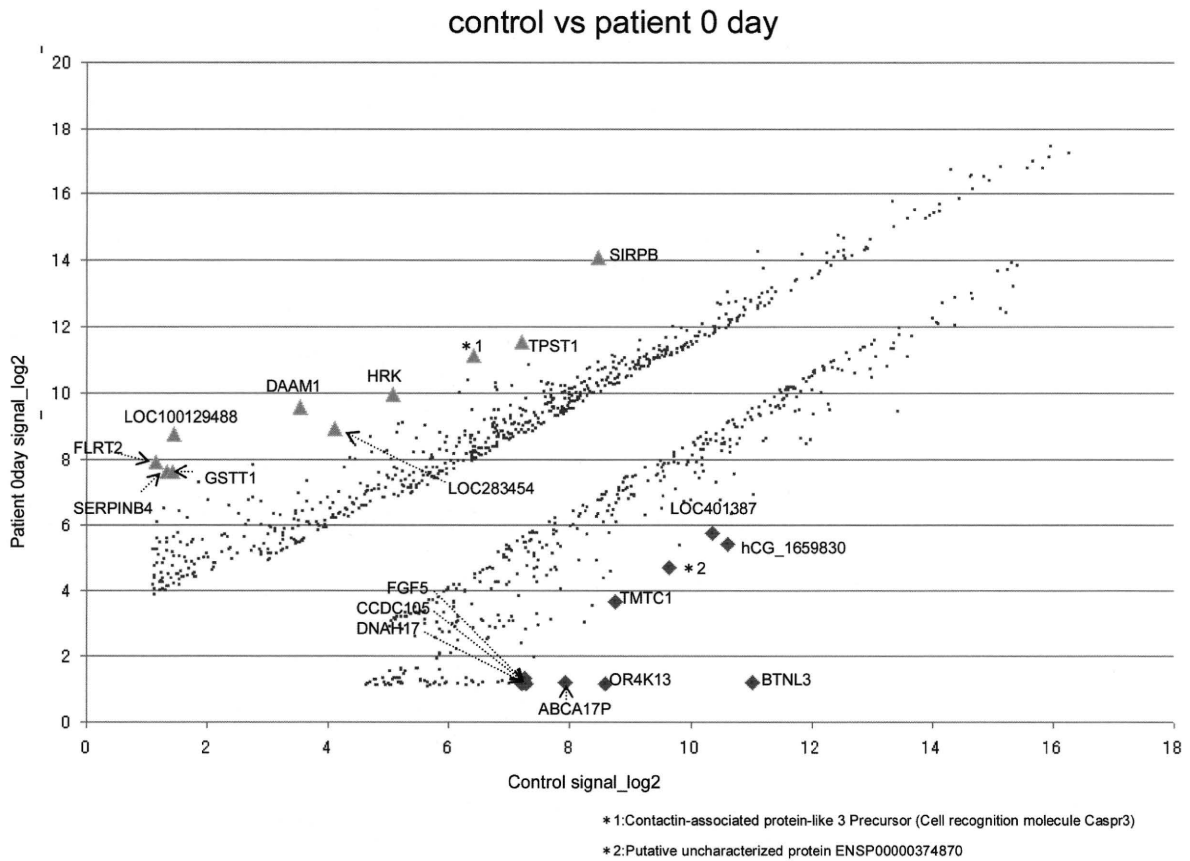


図1. 尋常性乾癬患者における遺伝子発現のまとめ

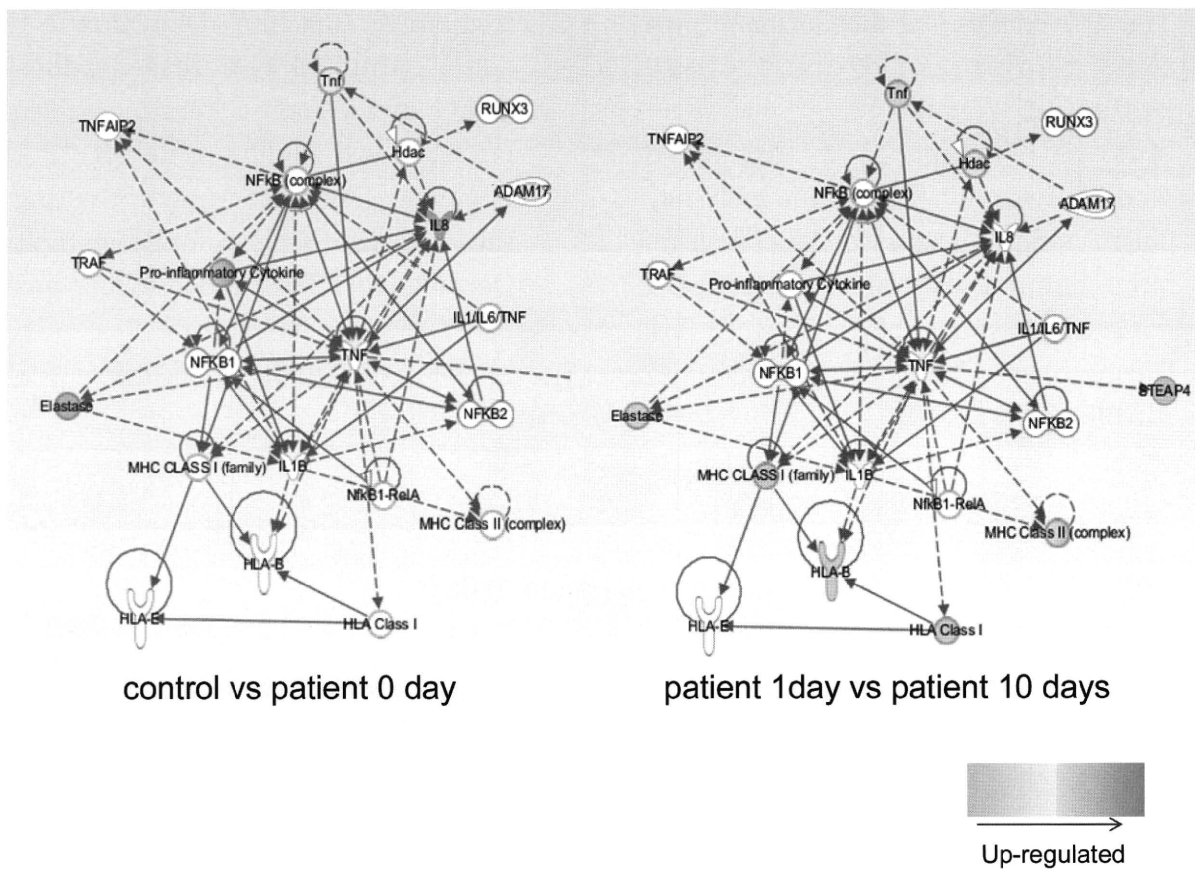


図 2. インフリキシマブ投与前後での遺伝子発現解

乾癬治療（全身療法）のアルゴリズム

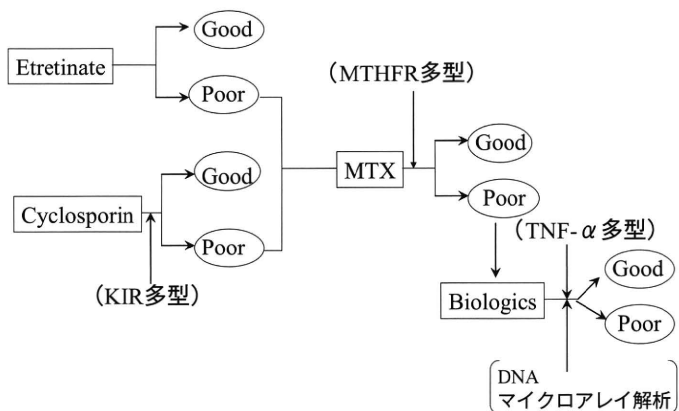


図 3. 乾癬治療（全身療法）のアルゴリズム

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

HVJ-E vectorの表皮水疱症治療への有用性

研究分担者 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 これまで我々は、表皮基底細胞標的HVJ-Eの構築に成功し、水疱内投与では効率よく基底細胞にVII型コラーゲン遺伝子を導入させることに成功した。またこのベクターを利用してマウス胎生期循環系への核酸導入法も確立した。一方、表皮水疱症では基底細胞癌が多発する。HVJ-Eは抗腫瘍免疫の活性化や直接的な癌細胞死誘導活性を有するので、表皮水疱症で基底細胞癌を有する患者への投与による癌治療と再発抑制効果も期待される。今回は皮膚癌細胞を用いて、抗癌剤との治療効果の比較検討を行い、その有用性が示された。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学 再生誘導医学

清原 英司 大阪大学 皮膚科学

A. 研究目的

先天性表皮水疱症は基底膜領域接着分子欠損病であり、表皮の剥離、修復を繰り返し、組織の癒痕化が顕著になる。一方で、基底細胞癌の発生が高頻度に認められ、これが生命予後を左右する。表皮水疱症治療の根治療法のためには、欠損分子を全身の皮膚に補う、あるいは、欠損遺伝子を全身の表皮細胞で修復する、といった方法が理想的であり、我々も含めた国内外の関連の研究者が取り組んでいるが、依然として極めて難しい。したがってそれが開発されるまで、姑息的な療法であっても、患者の症状を少しでも軽減する治療法が必要である。中でも癌の抑制、再発予防は極めて重大な課題であり、今後さらに必要性が増すものと考えられる。我々が開発してきたHVJ envelope vector (HVJ-E)は不活化センダイウイルス粒子をベクター化したもので、すでに遺伝子導入や薬剤導入の実績がある。最近このベクター自身に抗腫瘍効果があることが見出された。その作用機構の1つは多彩な抗腫瘍免疫の活性化であり、もう1つはヒト癌に対する選択的な細胞死誘導機

構である。しかし他の治療法との比較はなされていない。

本研究では、皮膚癌細胞の増殖抑制及び転移抑制効果について既存の抗癌剤との比較を行い、その表皮水疱症における基底細胞癌治療の有用性の検証を目指した。

B. 研究方法

マウスメラノーマでも最も悪性度が高く転移が高頻度におこるB16BL6細胞の皮下腫瘍をC57BL/6マウスに作成した。この腫瘍が直径約7mmになったときにHVJ-E（ 5×10^{10} 粒子）を腫瘍内に5日ごとに3回投与した。他の群はメラノーマ治療に用いられている抗癌剤のダカルバジン（DTIC）30 μ g、60 μ gおよび生理食塩水を投与した。1群5匹のマウスを用いた。投与開始4週間後に、腫瘍径と肺への転移数をカウントした。

C. 研究結果

腫瘍径より算出した腫瘍容積の平均値は、生理食塩水投与群は14000mm³を超え、全例死亡した。DTIC投与群は、投与量に関わらず、腫瘍容積は約1000mm³であった。HVJ-E投与群では、約6000mm³であり、HVJ-Eが最も著明は抑制効果を示した。一方、肺への自然転移による転移巣をカウントすると、DTIC30

μg、60μg投与群はそれぞれマウス1匹あたり平均10個、9個であった。HVJ-E投与群は平均0.5個であり、明らかな転移抑制効果が認められた。なおHVJ-EとDTICの併用群を新たに作成し検討したところ、肺転移数は2-3個であり、HVJ-E単独群で高い抑制効果を得た。

D. 考察

基底細胞癌の実用的なモデルがないので、今回は皮膚癌細胞を用い、また抗腫瘍免疫の効果も観るためにマウスモデルで実験を行った。HVJ-E単独の腫瘍内投与で、肺転移をほぼ完全に抑制可能である。抗癌剤の併用で効果が薄れたことは、免疫細胞の抑制が起こった可能性が示唆され、この転移抑制がHVJ-Eのもつ抗腫瘍免疫活性化能によるものであることを示唆している。したがって表皮水疱症で見られる基底細胞癌においても同様な腫瘍縮小、転移抑制が期待され、また抗腫瘍免疫の活性化による再発予防の可能性もある。すでに毒性試験などの前臨床試験も終了し、また臨床用のHVJ-Eも開発されたことを基に、メラノーマ治療の臨床研究が進行中である。今後は、HVJ-Eの癌治療の適応拡大を図り、表皮水疱症患者における基底細胞癌をターゲットにした臨床研究を実施する方向で研究を進める予定である。

E. 結論

先天性表皮水疱症に頻発し生命予後を左右する基底細胞癌に対する治療及び再発予防のため、HVJ-Eの有用性を示唆する成果を得た。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Kaneda Y. Update on non-viral delivery methods for cancer therapy ; Possibilities of DDS with anti-cancer activities

beyond delivery as a new therapeutic tool. *Exp. Opin. Drug Del.* 7 (9), 1079-1093, 2010.

2. Kaneda Y. A non-replicating oncolytic vector as a novel therapeutic tool against cancer. *BMB Report*, in press.

学会発表

1. 金田安史：遺伝子治療の過去・現在・未来 第109回日本皮膚科学会総会（特別講演） 2010年4月16日（大阪）
2. 金田安史：癌の分子治療法の現状と将来展望 第7回日本中性子捕捉療法学会（教育講演） 2010年8月5日（東京）

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし。

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

表皮水疱症再生・遺伝子治療に有用な骨髄内細胞の同定

研究分担者 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 我々は表皮水疱症に対する根治的治療法確立を目指して、骨髄細胞を利用した再生医療、遺伝子治療の開発を進めている。マウス骨髄内の未分化（Lineage-negative；L⁻）細胞をさらにc-kit陽性/陰性（K^{+/-}）細胞とPDGFR α 陽性/陰性（P^{+/-}）細胞に分画して増殖能、分化能を比較検討した。骨髄内でL⁻細胞は3.6%を占め、そのうちK⁺P⁻細胞は1.7%、K⁻P⁻細胞は1.6%、K⁻P⁺細胞は0.3%、K⁺P⁺は0%であった。K⁺P⁻細胞は通常の培養で付着性増殖を示さず、K⁻P⁻細胞とK⁻P⁺細胞は線維芽細胞様の付着性増殖能を示した。K⁻P⁺細胞は骨芽細胞、脂肪細胞など間葉系細胞やケラチン5陽性上皮細胞への多分化能を有する一方、K⁻P⁻細胞は骨分化能のみを示し、多分化能は有していないことが明らかとなった。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学 再生誘導医学
菊池 康 大阪大学 再生誘導医学
知野 剛直 大阪大学 再生誘導医学

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症は皮膚基底膜部でVII型コラーゲンが欠損し、基底膜直下に水疱形成する遺伝性水疱性皮膚疾患である。我々は、VII型コラーゲン欠損マウス胎生循環中に骨髄細胞を移植することにより、移植骨髄細胞に対する免疫寛容を誘導すると共に、皮膚に移植骨髄細胞由来線維芽細胞を誘導して基底膜部にVII型コラーゲンを供給し得ること、その結果皮膚病態が改善し、生存率向上が得られることを明らかにした。またGFP要請骨髄細胞を移植したマウスの皮膚に損傷を作り、ここにVII型コラーゲン欠損マウスの皮膚を移植すると、GFP陽性でKeratin 5陽性の細胞が移植皮膚に散見されるようになった。これらのことは骨髄細胞が皮膚の幹細胞ソースとなりうることを示唆している。実際にアメリカでは表皮水疱症の患者に対する骨髄移植が始められている。しかし死亡率が高いうえに、実際に骨髄細胞が有

効性に寄与したかどうかの知見は得られていない。骨髄細胞のどの分画の細胞が皮膚に分化しうるのかを決定する研究が表皮水疱症の根治治療のために必要である。本研究は、将来の表皮水疱症の遺伝子、再生治療のための標的細胞を決定することを目的として以下の研究を進めた。

B. 研究方法

皮膚の剥離片の抽出液を詰め込んだシリコンチューブをマウス皮下に埋め込み1週間後に集積する細胞の表面マーカーをFACSで解析したところ、間葉系幹細胞のマーカーであるPDGFR α が末梢血や骨髄中と比較して数十倍の頻度で存在することが分かった。PDGFR α 陽性細胞は骨髄内の未分化（Lineage-negative；L⁻）分画に属するので、c-kit陽性/陰性（K^{+/-}）細胞とPDGFR α 陽性/陰性（P^{+/-}）細胞に分画して増殖能、分化能を比較検討した。

C. 研究結果

マウス骨髄内でL⁻細胞は3.6%を占め、そのうちK⁺P⁻細胞は1.7%、K⁻P⁻細胞は1.6%、K⁻P⁺細胞は0.3%、K⁺P⁺は0%であった。

K⁺P⁻細胞は通常の培養で付着性増殖を示さず、K⁺P⁻細胞とK⁺P⁺細胞は線維芽細胞様の付着性増殖能を示した。K⁺P⁺細胞は骨芽細胞、脂肪細胞など間葉系細胞やケラチン5陽性上皮細胞への多分化能を有する一方、K⁺P⁻細胞は骨分化能のみを示し、多分化能は有していないことが明らかとなった。次いでGFPで標識したPDGFR α 陽性細胞をPDGFR α 陰性細胞と混ぜ合わせて骨髄移植したマウスに、皮膚損傷を作り、VII型コラーゲンノックアウトマウスの皮膚を移植すると、ケラチン5陽性でGFP陽性細胞が移植皮膚に出現した。

D. 考察

骨髄細胞移植による表皮水疱症の根治的治療を成功させるためには、c-kit陰性・PDGFR α 陽性骨髄細胞移植が有望であることが推定される。この細胞は皮膚で分化したのちVII型コラーゲンを作ることができると考えられるが、それがanchoring fibrilを形成して表皮の剥離を防ぐことができるかどうかはまだ分からない。持続的なPDGFR α 陽性骨髄幹細胞の損傷部への誘導が必要であろうと推測している。実際の治療においては、自己のPDGFR α 陽性細胞の移植が望ましい。しかしそのためにはVII型コラーゲン遺伝子の挿入あるいは変異部位の修正が必要である。そのための遺伝子導入法と遺伝子修正法が望まれる。Zinc-finger nucleaseを用いた遺伝子修正法は一時有望であったが、off-target (他の部位に遺伝子が挿入される) 影響が指摘され始めている。レトロウイルスやレンチウイルスベクターは発癌の影響を排除しきれていない。それらを勘案しながら、より安全で効果的な導入法を検討したいと考えている。

E. 結論

表皮水疱症に対する再生医療、幹細胞遺伝子治療法開発のための標的細胞として骨髄のc-kit陰性・PDGFR α 陽性細胞の有用性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. Kaneda Y. Update on non-viral delivery methods for cancer therapy ; Possibilities of DDS with anti-cancer activities beyond delivery as a new therapeutic tool. *Exp. Opin. Drug Del.* 7(9), 1079-1093, 2010.
2. Kaneda Y. A non-replicating oncolytic vector as a novel therapeutic tool against cancer. *BMB Report*, in press.

学会発表

1. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Kaneda Y. Contribution of PDGFR α -positive bone marrow cells for epithelial regeneration in genetic blistering skin disease, RDEB. 第13回米国遺伝子・細胞治療学会 2010年5月22日 (Washington, D.C., USA)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし。