

6) 乾癬類縁疾患の病変部における好中球走化因子発現の検討

分担研究者：田 上 八 朗（東北大皮膚科）

共同研究者：小 澤 麻 紀（東北大皮膚科）

要 約

膿疱性乾癬、掌跖膿疱症、尋常性乾癬の病変部における IL-8 と補体の発現を免疫組織化学染色法を用いて調べた。好中球に一致した部位に IL-8 の発現が認められたが、ケラチノサイトにはその発現は認められなかった。また、尋常性乾癬および掌跖膿疱症において、炎症の激しい病変境界部では角層下のケラチノサイトに、慢性炎症主体の成熟した病変部では角層に補体の分布がみられ、病変部の角層下で補体の活性化が起きていることが示唆された。一方、膿疱性乾癬では、表皮のほぼ全層にわたってび漫性に補体の分布が観察され、補体の活性化が病変部表皮の全層にわたって起きていると推察された。

は じ め に

膿疱性乾癬、掌跖膿疱症、尋常性乾癬といった乾癬類縁疾患では、病理組織学的に表皮内に膿疱の形成が認められる。これらの疾患の病変部から採取した鱗屑には強力な好中球走化作用があり、これは IL-8 と補体の C5a によることが知られている。このことから、乾癬類縁疾患での好中球遊走には IL-8 と C5a が重要な役割を果たしていると予想される。今回、わたしたちは乾癬類縁疾患の病変部における IL-8 と補体の発現について、免疫組織化学法を用いて検討した。

方 法 ・ 結 果

膿疱性乾癬、掌跖膿疱症、尋常性乾癬の病変部あるいは健常部と病変部の境界部をかけて皮膚組織を採取した。IL-8 の免疫組織化学染色にはパラフィン包埋切片を、補体の染色には凍結切片を用いた。

IL-8 は、いずれの疾患においても、病変部に浸潤している好中球の存在している部位に一致して陽性所見が認められた。掌跖膿疱症では単房性膿疱内の好中球に陽性所見を示したが、膿疱蓋に近い部分の好中球でより強い染色性が認められた。なお、表皮細胞は陰性であった。このことは、乾癬類縁疾患病変の鱗屑から得られた IL-8 は病変部に浸潤した好中球に由来するものであることを示唆している。

補体の染色については、残念なことに免疫組織化学染色法に用いることができる C5a に対する抗体がないため、病変部での C5a の存在を直接検出することはできなかった。そこで、C3b や C5b を染色することで補体の活性化が病変部のどこで起きているかを検討した。とくに C3 から分解されて生じる C3b はすぐに細胞膜表面に結合するという性質があるので、この因子の分布は補体の活性化が起きている部位を比較的反映していると考えた。

C3b は尋常性乾癬の病変境界部においては、角層下の表皮細胞に膜状に強陽性、成熟した病変部では角層で陽性所見がみられた。掌跖膿疱症では、膿疱の上蓋と辺縁部の表皮で細胞膜上に強陽性を示した。一方、膿疱性乾癬の病変部では、表皮ほぼ全層にわたってび漫性に陽性所見が認

められた。

考 按

乾癬類縁疾患の病態についてはまだ明らかでない部分も多いが、病変形成の第一段階は表皮内へのT細胞の浸潤であり、この浸潤T細胞から放出されるサイトカインによって様々な変化が引き起こされると考えられている。膿疱性乾癬、尋常性乾癬、掌蹠膿疱症のいずれの疾患においても、この初めの過程は共通しているが、これらの疾患の完成した病変部に認められる好中球の浸潤像は、膿疱性乾癬では Kogoj の海綿状膿疱、尋常性乾癬では Munro の微少膿瘍、掌蹠膿疱症では単房性膿疱とそれぞれに異なった浸潤形態を呈している。

前述したように、乾癬類縁疾患の病変部から採取した鱗屑は強力な好中球走化能を有する IL-8 と C5a を含んでおり、これらの因子が好中球の浸潤に重要な役割を果たしていることが予想された。In vitro の実験で角層と血清成分が接触すると補体の alternate pathway が活性化され、C5a が産生されることが示されている。通常、細胞膜表面に発現している補体の活性化抑制因子が、角層では存在しないためにこの活性化が起こるといわれている。一方、培養表皮角化細胞は IFN- γ や IL-17 といったサイトカインの刺激によって IL-8 を産生することが報告されている。これらの実験結果より、乾癬病変部では、まず、T細胞が表皮内へ浸潤し、次に角層が血清成分と接触することで補体が活性化されて C5a が産生される、また、浸潤したT細胞から放出されたサイトカインの刺激で表皮角化細胞より IL-8 が産生され、その結果、好中球の浸潤が起こることが示唆された。

今回、わたしたちが行った免疫組織化学染色の結果では、IL-8 は病変部に浸潤した好中球に一致して陽性所見を示し、表皮角化細胞では陰性であった。このことは、病変部の鱗屑に含まれた IL-8 は表皮角化細胞由来ではなく、むしろ浸潤した好中球由来のものであることを示唆している。また、補体の分布に関しては、尋常性乾癬および掌蹠膿疱症では病変境界部の角層下で補体の活性化が起きていることが示唆され、角層と血清成分が接触して補体が活性化されるという機序に矛盾しない結果が得られた。しかし、膿疱性乾癬では、病変部の表皮全体にび漫性に C3b が分布しており、これは角層と血清成分との接触だけでは説明がつかない結果であった。膿疱性乾癬における補体活性化の機序として、ひとつには表皮角化細胞上の補体活性制御因子である decay-accelerating factor や membrane cofactor protein の発現が低下している可能性が挙げられる。また、in vitro の実験で培養表皮角化細胞を IFN- γ で刺激すると C3 が産生されるとの報告もあり、膿疱性乾癬の病変部においても浸潤T細胞から放出される IFN- γ によって表皮角化細胞から補体が産生されている可能性もある。膿疱性乾癬における補体の活性化の機序に関しては、補体活性制御因子の発現などをさらに検討し、病態解明の一助にしたいと考える。

参考文献

- 1) Tagami H, Iwatuki K, and Takematsu H, Psoriasis and leukocyte chemotaxis. J Invest Dermatol. 88 (3 Suppl): 18-23, 1989.
- 2) Takematsu H, and Tagami H, Quantification of chemotactic peptides (C5a anaphylatoxin and IL-8) in psoriatic lesional skin. Arch Dermatol. 129: 74-80, 1993.
- 3) Terui T, Kato T, and Tagami H, Stratum corneum activation of complement through the antibody-

- independent alternative pathway. *J Invest Dermatol.* 92:593-597, 1989.
- 4) Terui T, Ishii K, Ozawa M, Tabata N, Kato T, Tagami H, C3 production of cultured human epidermal keratinocytes by IFN- γ and TNF- α through different pathways. *J Invest Dermatol.* 108:62-67, 1997.
 - 5) Terui T, Okuyama R, Tagami H. Molecular events occurring behind ultraviolet-induced skin inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1 :461-467, 2001.
 - 6) Terui T, Sano K, Shiota H, Kunikata N, Ozawa M, Okada M, Honda M, Tamura G, Tagami H. TGF- β -producing CD4⁺ mediastinal lymph node cells obtained from mice tracheally tolerized to ovalbumin (OVA) suppressed both Th1- and Th2- induced cutaneous inflammatory responses to OVA by different mechanisms. *J Immunol* 167:3661-3667, 2001.
 - 7) Terui T, Sano K, Okada M, Shiota H, Honda M, Ozawa M, Hirasawa N, Tamura G, Tagami H, Production and pharmacologic modulation of the granulocyte-associated allergic responses to ovalbumin in murine skin models induced by injecting ovalbumin-Specific Th1 or Th2 Cells. *J Invest Dermatol* 117:236-243, 2001.
 - 8) Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzas E, Kovacs P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Watanabe T, Nagy A. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Letters* 502:53-56, 2001.
 - 9) Terui T, Takahashi K, Funayama M, Terunuma A, Ozawa M, Sasai S, Tagami H. Occurrence of neutrophils and activated Th1 cells in UVB-induced erythema. *Acta Derm Venereol* 81:8-13, 2001.
 - 10) Takahashi K, Aiba S, Uddin Z, Kasai H, Tagami H, Normal proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells of to streptococcal preparation OK-432 in patients with pustulosis palmaris et plantaris constitute a distinct feature from the reduced responses observed in those with psoriasis vulgaris, pustular psoriasis, and acrodermatitis continua of Hallopeau. *J of Dermatol Sci* 25:87-92, 2001.
 - 11) Nakagawa S, Bos JD. Role of Langerhans cells in the skin. What's new? *JEADV* 15:399-401, 2001.
 - 12) ランゲルハンス細胞と皮膚疾患、相場節也、日本皮膚科学会雑誌 111:1686-1689、2001

Expression of IL-8 and complement factors in pustular psoriasis, psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris.

Hachiro Tagami (Tohoku University School of Medicine)
Maki Ozawa (Tohoku University School of Medicine)

Summary

Expression of IL-8 and complement factors was assessed within the lesions of pustular psoriasis, psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris, with immunohistochemical technique. IL-8 staining was detected only in neutrophils within the lesions, whereas no staining was observed in the keratinocytes. Expression of C3b was observed in a granular pattern on the cell membrane of subcorneal keratinocytes around marginal lesions, and in a lamellar pattern within corneal layers around mature lesions of psoriasis vulgaris. In the lesions of pustulosis palmaris et plantaris, C3b was distributed in a granular pattern on the roof of pustule and on the cell membrane of subcorneal keratinocytes around pustules. On the other hand, distribution of C3b within the lesions of

pustular psoriasis was different from former diseases. C3b staining appeared predominantly in a granular pattern on the cell membrane of basal to spinous keratinocytes, and to a lesser degree in a cytoplasmic distribution.

7) 乾癬、膿疱性乾癬における血清 IL-18 レベル

協力研究者：水 谷 仁 (三重大学皮膚科)

共同研究者：山 中 恵 一、村 上 貴 章、杉 崎 一 美 (三重大学皮膚科)

要 約

乾癬では病変部組織において IL-10 の発現の低下と INF- γ の上昇の報告があり、乾癬では、Th1 condition と認識されており、INF- γ inducing factor といわれていた IL-18 値の上昇が予想される。そこで、尋常性乾癬、膿疱性乾癬の患者血清における IL-18 濃度を ELISA 法により測定したところ尋常性乾癬の患者で有意な上昇を認め、膿疱性乾癬血清ではさらに高い値を示した。また尋常性乾癬の患者において、扁桃誘発試験による血清 IL-18 の変動を調べた。興味あることに、扁桃誘発試験では誘発 3 時間後に明らかに血中の IL-18 の上昇が認められた。

血清 IL-18 の著しい増加を病勢と相関して乾癬、膿疱性乾癬で認めたことは、乾癬の病勢形成に IL-18 が関与されている可能性を示唆している。多くのサイトカインは血中での測定が困難であるが、IL-18 は測定可能であり、臨床的な乾癬の病勢の指標となりうるものと考えられる。扁桃誘発試験後乾癬は増悪することと考えあわせて、乾癬における IL-18 の積極的な関与を支持すると言えた。

は じ め に

IL-18 は当初、IFN-g 産生誘導因子として劇症肝炎より発見された IL-1 ファミリーのサイトカインであるが近年、単球、keratinocyte、骨芽細胞など様々な細胞から産生され、炎症性疾患の病態形成に深く関わっていることがわかってきた¹⁾。また最近では、IL-12 の存在下では IL-12 と共同し Th1 への shift が誘導され、IL-12 の非存在下では IL-18 単独で Th2 shift が誘導されることがわかってきた。¹⁾。我々は平成 12 年度第 1 回班会議において乾癬表皮、ならびに乾癬末梢血単球における Caspase-1 の発現を報告した。IL-18 は Caspase-1 により活性化分泌されるサイトカインでありうるため、乾癬においては、IL-18 の上昇が予想された。

乾癬においては、病変部組織において IL-12 のメッセージの発現の上昇の報告がある²⁾。一般的に乾癬では、Th1 condition と認識されているため、血清 IL-18 値の上昇が予想される。今回我々は尋常性乾癬、膿疱性乾癬の患者血清における IL-18 濃度を ELISA 法により測定し報告した。

また我々は以前より、乾癬において病巣感染の関与を報告している。すでに扁桃誘発試験後に末梢単核球よりの IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 産生の増加を認めることを報告している^{3) 4)}。今回尋常性乾癬の患者において、扁桃誘発試験後による血清 IL-18 の変動を観察した。

症例、方法、結果

1) 尋常性乾癬、膿疱性乾癬の患者血清における IL-18 濃度

尋常性乾癬患者 32 名、膿疱性乾癬患者 6 名を対象とした。血清分離剤入り採血管にて採血、室温 2 時間にて凝固後、遠心分離して得られた血清を-70℃にて保存し、解凍後 ELISA 法にて測

定した。

結果、健常人コントロールでは殆どの症例で測定限界値（5 pg/ml）以下であるのに対し尋常性乾癬患者では平均 173.7 pg/ml と高い値を示し有意に上昇していた。膿疱性乾癬では一例の著明な上昇例を含め平均 383.3 pg/ml とさらなる増加を認めた。健常人と尋常性乾癬間ならびに尋常性乾癬と膿疱性乾癬間の血清 IL-18 値には有意差を認めた（図 1）。

2) 扁桃誘発試験による血清 IL-18 の変動

コントロールには、円形脱毛患者における扁桃誘発試験の際に採取した血清を用いた。脱毛患者 4 症例では、扁桃誘発試験において扁桃誘発前、1 時間後、3 時間後のおのおのを採血したが、血清 IL-18 はいずれも検出出来なかった。

尋常性乾癬患者 6 症例で、扁桃誘発前、1 時間後、3 時間後の各々採血では採血前の濃度を 100% としたとき、1 時間後では、109.9% 微増にとどまったが、3 時間後では 150.4% と有意な上昇を認めた（図 2）。

考 案

血清 IL-18 の濃度を ELISA にて測定した結果、尋常性乾癬の患者で有意な上昇を認め、膿疱性乾癬血清ではさらに高い値を示した。乾癬の炎症機序には未だ不明な部分が多いが、遺伝性、長期間での寛解再発、シクロスポリンの有効性などリンパ球系の関与が推測されている。サイトカイン profile からみると乾癬は、Th1 型と考えられている。我々が従来報告してきたように乾癬の病態と炎症性サイトカインの発現とは相関関係がある。IL-18 は炎症性サイトカインの一つと考えられており、Th1 へ、Th2 のいずれへも相乗効果を有する多機能サイトカインであるが、Th1 機能の発揮には IL-12 シグナルなどのプライミングが必要とされている。今回の検索で血清 IL-18 の著しい増加を病勢と相関して乾癬、膿疱性乾癬で認めたことは、乾癬の病勢形成に IL-18 が関与している可能性を示唆している。現在のところ乾癬のサイトカイン系を Th1 へプライミングしている機序の解明は今後の課題であるが、病巣部での IL-12 発現も報告されており、IL-18 は乾癬の炎症プロモーター機能を担っている可能性が高い。多くのサイトカインは血中での測定が困難であるが、IL-18 は測定可能であり、臨床的な乾癬の病勢の指標となりうるものと考えられる。

興味あることに、扁桃誘発試験では誘発 3 時間後に明らかに血中の IL-18 の上昇が認められた。既に我々が報告しているように、乾癬の扁桃扁桃誘発試験により、末梢血単球に IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 の発現誘導がかかる。IL-18 は IL-1 ファミリーのメンバーであるが、その発現誘導経路は IL-1 と必ずしも同一ではないと考えられてはいる。ともに炎症誘導に関与するサイトカインであることから、共通した誘導経路により活性化されている可能性が高い。乾癬における IL-18 誘導の特異性に関して明らかではないが、同時に行った円形脱毛症では IL-18 誘導は全くなく、扁桃誘発試験後乾癬は増悪することと考えあわせて、乾癬における IL-18 の積極的な関与を支持するといえる。

参考文献

- 1) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H and Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2

responses. *Annu Rev Immunol* 19, 423. 2001

- 2) Yawalkar N, Karlen S, Hunger R, Brand CU, Braathen LR. Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 111:1053, 1998
- 3) Taranishi Y, Mizutani H, Murata M, Shimizu M, Mathushima K. Increased spontaneous production of IL-8 in peripheral blood monocytes from the psoriatic patient. *J Dermatol Science* 10, 8. 1995
- 4) Mizutani H, Ohmoto Y, Mizutani T, Murata M, Shimizu M, Role of increased production of monocytes TNF- α IL-1 β and IL-6 in psoriasis. *J Dermatol Science* 14, 145, 1997

Summary

Because of the lesional inflammatory reactions with suppressed IL-10 and increased interferon-gamma (IFN-g) production, psoriasis has been speculated Th1 mediated disease. IL-18, originally cloned as IFN-g inducing factor, is a potent IFN-g inducer in psoriasis accompanied with IL-12. Then, the IL-18 levels of sera from psoriasis and pustular psoriasis patients were evaluated. The IL-18 levels measured with specific ELISA were significantly elevated in sera of psoriasis vulgaris and pustular psoriasis compared with that of normal control. However, the IL-18 levels of pustular psoriasis were markedly higher than that of psoriasis vulgaris. Exacerbation by focal infection is characteristic in psoriasis. The IL-18 levels of serum samples obtained pre- and after-tonsillar provocation test were measured with ELISA. IL-18 levels increased three hours after provocation. Present data suggest that the serum IL-18 levels may reflect activity of psoriasis and involvement of IL-18 in the pathogenesis of psoriasis.

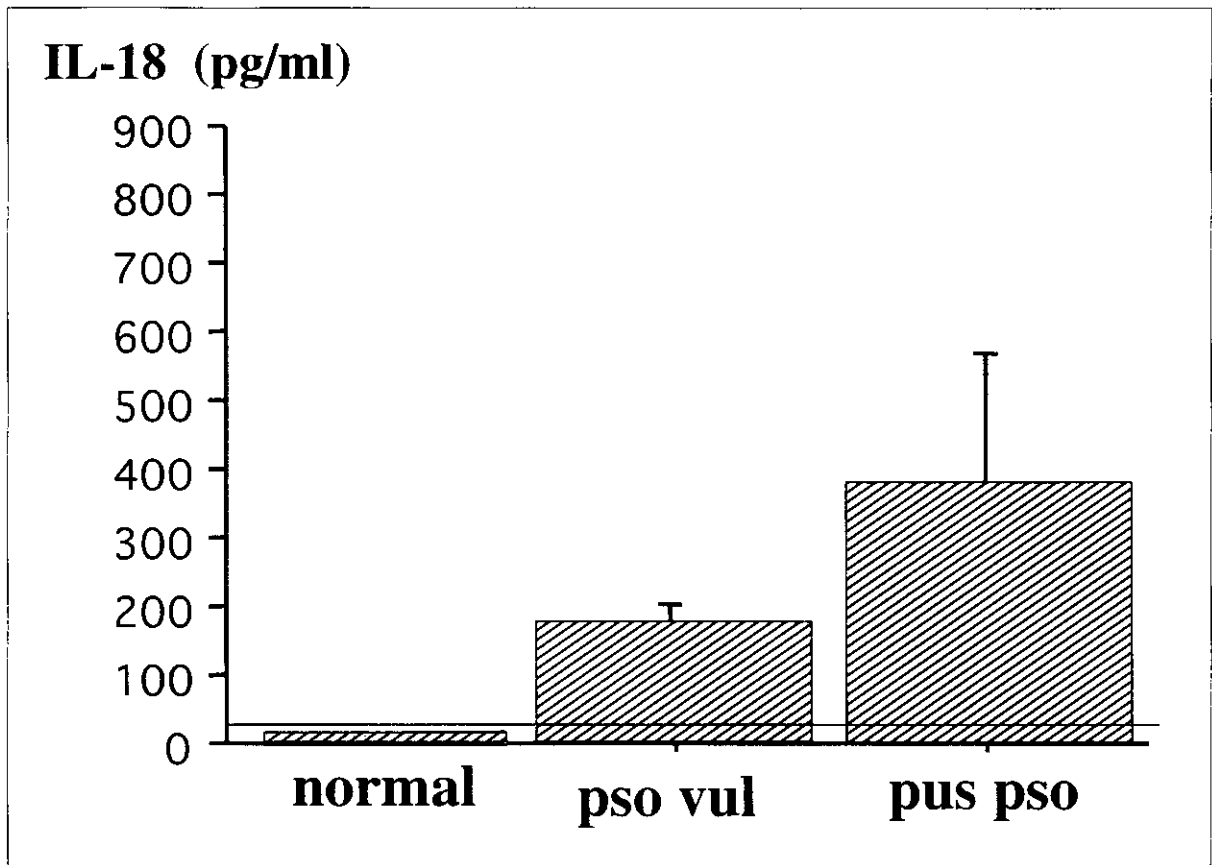


図 1 血清 IL-18 濃度 (mean±S.D.)

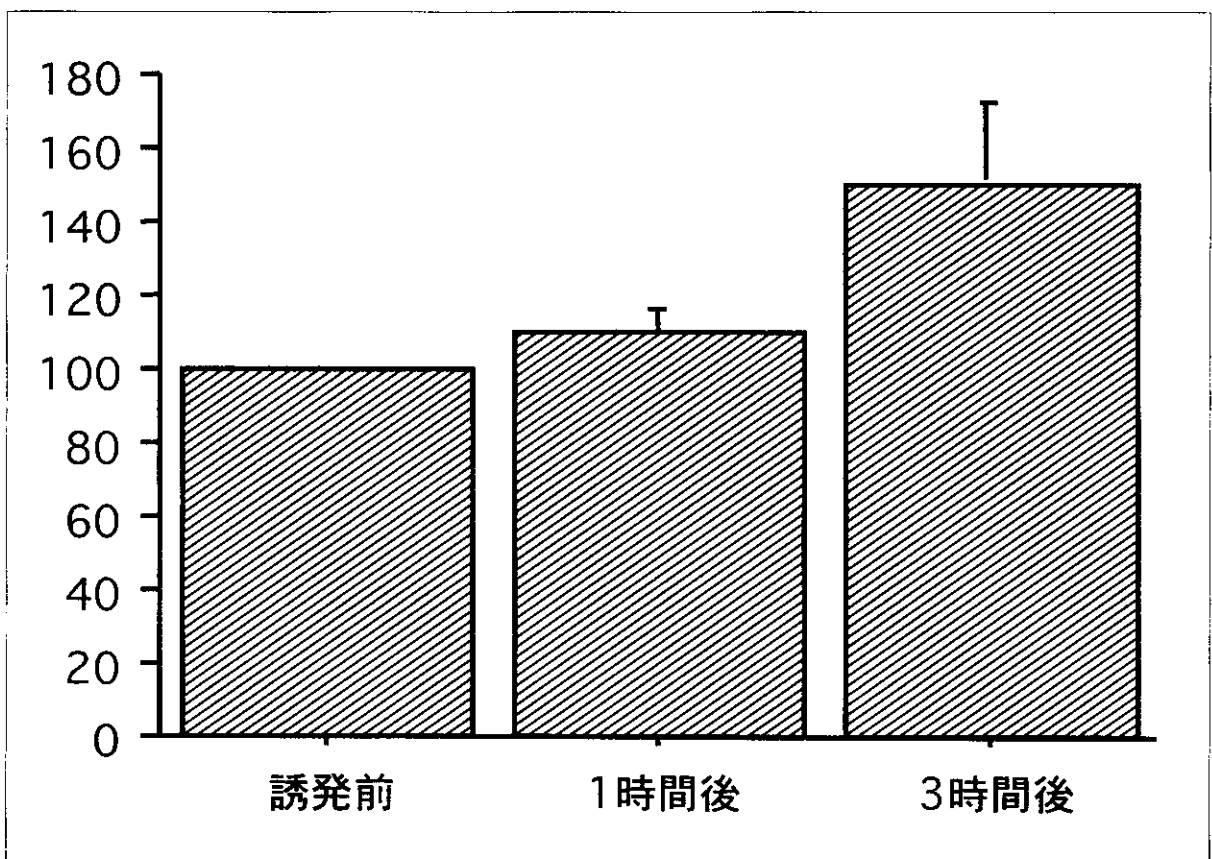


図 2 扁桃誘発試験による血清 IL-18 の変化 (mean±S.D.)

8) 膿疱性乾癬モデルマウス作成の試み

協力研究者：水谷 仁 (三重大学皮膚科)

共同研究者：村上 貴章、小西 博、山中 恵一、杉崎 一美
(三重大学皮膚科)

要 約

昨年、膿疱性乾癬皮膚に Caspase-1 が存在するところから、乾癬のマウスモデルとして Caspase-1 の高発現モデルを作成した。このモデルは持続性の皮膚炎を示し、好中球の増多を示したが、このモデルは乾癬が Th1 型サイトカイン疾患であるのに対して Th2 型のサイトカインプロファイルを示すことが問題であった。そこで、stat6 を抑制して Th2 型サイトカインへのシグナルを阻止する試みを行った。その結果、高 IgE 血症は抑制されたが、皮膚症状は明らかであり、より乾癬に特徴的な病理組織所見を持ったマウスが作成できた。

は じ め に

乾癬、膿疱性乾癬の乾癬では病変部組織ならびに末梢単球に IL-1 β の産生増加があり、その分泌酵素である Caspase-1 の発現があり、最近 IL-18 の発現もあきらかになった。IL-18 は IL-12 の存在下では Th1 への誘導を行い、IFN- γ の産生を誘導する (1)。膿疱性乾癬皮膚には CASPASE-1 が存在するところから、乾癬のマウスモデルとして CASPASE-1 の高発現モデルを作成した (2)。このモデルは持続性の皮膚炎を示し、好中球の増多を示した。しかし、ヒトの乾癬が基本的には Th1 型サイトカイン疾患であり、IFN- γ などの産生増加を示すのに対して、このマウスは Th2 型のサイトカインプロファイルを示すことが問題であった。そこで、Th1 型サイトカインプロファイルの形成には Th1 環境における発達が重要であるところから、Th2 型サイトカインシグナルを阻止して Th1 型サイトカインプロファイルへの移行を試みた。

方 法 、 結 果

1) マウス

マウスは既に報じた C57/BL6 バックグラウンドの K14 プロモーターにより発現するヒト Caspase-1 トランスジェニックマウス (CspTg) (2) と大阪大学微生物病研究所癌抑制遺伝子研究分野・審良静夫教授より供与を受けた stat6 ノックアウトマウス (stat6KT) (3) を用いた。

2) 実験

CspTg オスと stat6KT メスを交配し、F1 である CspTg/stat6+/- を得、さらに stat6KT と交配して CspTg/stat6KT を得た。

・経過

CspTg は既報のごとく生後 8 週前後から皮膚炎を発症し、全身に拡大した。stat6KT は特に皮膚病変は示さなかった。CspTg/stat6KT は生後 8 週前後より CspTg 同様に、皮膚病変を発症し、徐々に全身に拡大した。肉眼的な病変は急性期病変ではびらん痂皮を伴い、慢性期に移行

するに従って、苔癬化と鱗屑形成を示した。

- 病理組織学的所見

CspTg 病変部皮膚組織は表皮の増殖肥厚、表皮突起の延長、血管拡張を認めた。CspTg/stat6KT は CspTg に比べ痂皮形成、角化が著明であり、好中球性角層下膿疱の形成が明瞭であった。以上の所見は CspTg/stat6KT は乾癬の組織学的特徴をよく備えていると考えられている。

- 免疫学的特徴

血清 IgE 値を測定すると CspTg は極めて高い値を示した。一方、CspTg/stat6KT は stat6 シグナルが入らないため、予想したように血清 IgE は正常ならびに stat6KT 同様に測定限界以下にとどまった。

- 浸潤細胞

アトピー性皮膚炎の病巣部マスト細胞数は極めて増加しているが、乾癬の病変部においてもマスト細胞の増加が知られている。CspTg の病変部マスト細胞数はアトピー性皮膚炎同様極めて増加しているが、CspTg/stat6KT では正常マウスよりは増加しているが CspTg と正常の中間の値を示した。

考 案

膿疱性乾癬ならびに尋常性乾癬の研究を阻んでいることの 하나가、適切なマウスモデルが存在しないことである。両疾患の異同については議論の余地のあるところであるが、一部の症例において尋常性乾癬と膿疱性乾癬双方の皮膚所見を示す症例があるところから、膿疱性乾癬が尋常性乾癬の延長線上にあるといえる。多くの難治性疾患が特異的な細胞、免疫、遺伝学的な特徴をもつものに対して乾癬の診断はあくまでもヒトにおける皮膚表現形と組織学的特徴を根拠にしており、マウス疾患モデルを作成するにあたって、モデルとしての指標がなく、膿疱性乾癬についてはヒトにおける診断基準がそのまま適応できず一層困難となっている。

乾癬、膿疱性乾癬の乾癬では病変部組織ならびに末梢単球に IL-1 β の産生増加があり、その分泌酵素である Caspase-1 の発現があり、最近 IL-18 の発現もあきらかになった。IL-18 は IL-12 の存在下では Th1 への誘導を行い、IFN- γ の産生を誘導する (1)。膿疱性乾癬皮膚に Caspase-1 が存在するところから、乾癬のマウスモデルとして Caspase-1 の高発現モデル：CspTg を作成した (2)。この CspTg は持続性の皮膚炎を示し、好中球の増多を示した。しかし、このモデルはヒトの乾癬が基本的には Th1 型サイトカイン疾患であり、IFN- γ などの産生増加を示すものに対して、Th2 型サイトカインプロファイルを示すことが問題であった。現在のところ乾癬のサイトカイン系が持続的に Th1 へ傾斜している機序は不明である。今回、臨床的な皮膚症状が乾癬に近似するが、Th2 型のサイトカインプロファイルをもつ CspTg を、ノックアウトマウス (3) を用いて stat6 を除くことにより Th2 系サイトカインのシグナル伝達を止め、乾癬類似の病態形成を試みた。その結果、stat6 シグナルを止められた CspTg は、より乾癬に類似した皮膚症状を発現し、組織学的にもより乾癬の特徴を備えたモデルを作成することができた。残念ながら、CspTg/stat6KT ではヒトの膿疱性乾癬の様な明らかな膿疱形成は見られなかった。ヒトと比較してマウスでは表皮が非薄であり、表皮細胞の物理的強度も低く、ヒトのような丈夫な角層も形成されないため、CspTg/stat6KT が膿疱性乾癬の病態をとったとしても肉眼的な膿疱の確認が困難である可能性がある。

乾癬における Th1 への傾斜機構の解明は今後の課題として残されるが、CspTg/stat6KT は乾癬のモデルとして十分な条件を備えており、今後乾癬の発症機序および免疫学的背景の検索に有効なモデルとして詳細な検討を加えていく予定である。

Summary

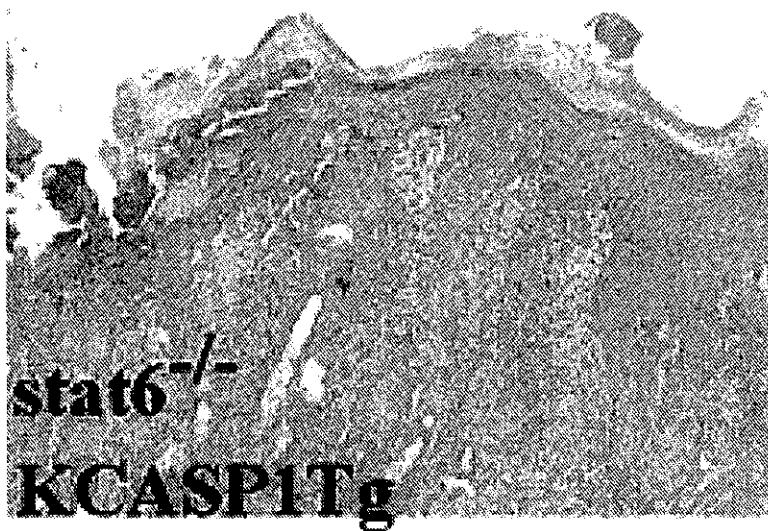
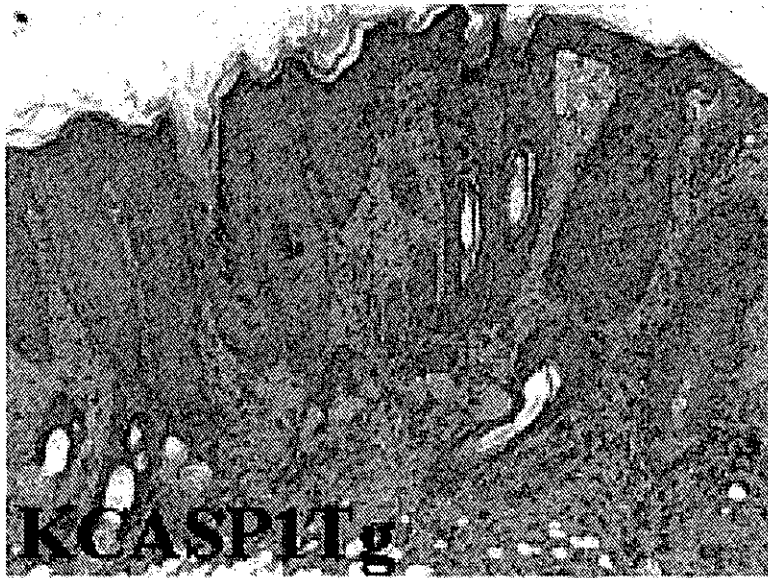
A new mouse model of psoriasis

Hitoshi Mizutani (Mie University Faculty of Medicine)

Because of the lack of an animal model for psoriasis, research into the pathogenesis of psoriasis has been hampered. Dependent on the expression of caspase-1 in the pustular psoriasis lesions, we developed keratinocytes specific caspase-1 transgenic mice (CspTg). KCTg expressed cutaneous manifestations mimic psoriasis, however, their immunological profile was Th2. Immunological profile of psoriasis has been speculated TH1. To make Th1 based CspTg, we generated stat6-/-CspTg. The cutaneous manifestations of stat6-/-KCTg mimic psoriasis without elevation of plasma IgE levels. stat6-/-CspTg histopathological findings, acanthosis with subcorneal neutrophilic pustules was compatible to psoriasis. This mice is a potent model for investigation of psoriasis.

参考文献

- 1) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H and Okamura H, Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19, 423. 2001
- 2) Yamanaka K, Tanaka M, Tsutsui H, et al. Skin-specific caspase-1-transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18. *Journal of Immunology*, 165:997-1003, 2000.
- 3) Takeda, K Kishimoto T, Akira S. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of Molecular Medicine*, 75:317-26, 1997.



WT



図 1 カスパーゼ/トランスジェニックマウス (KCASP1Tg)、stat6^{-/-}KCASP1Tg、正常マウス (WT) の皮膚病理学的変化。

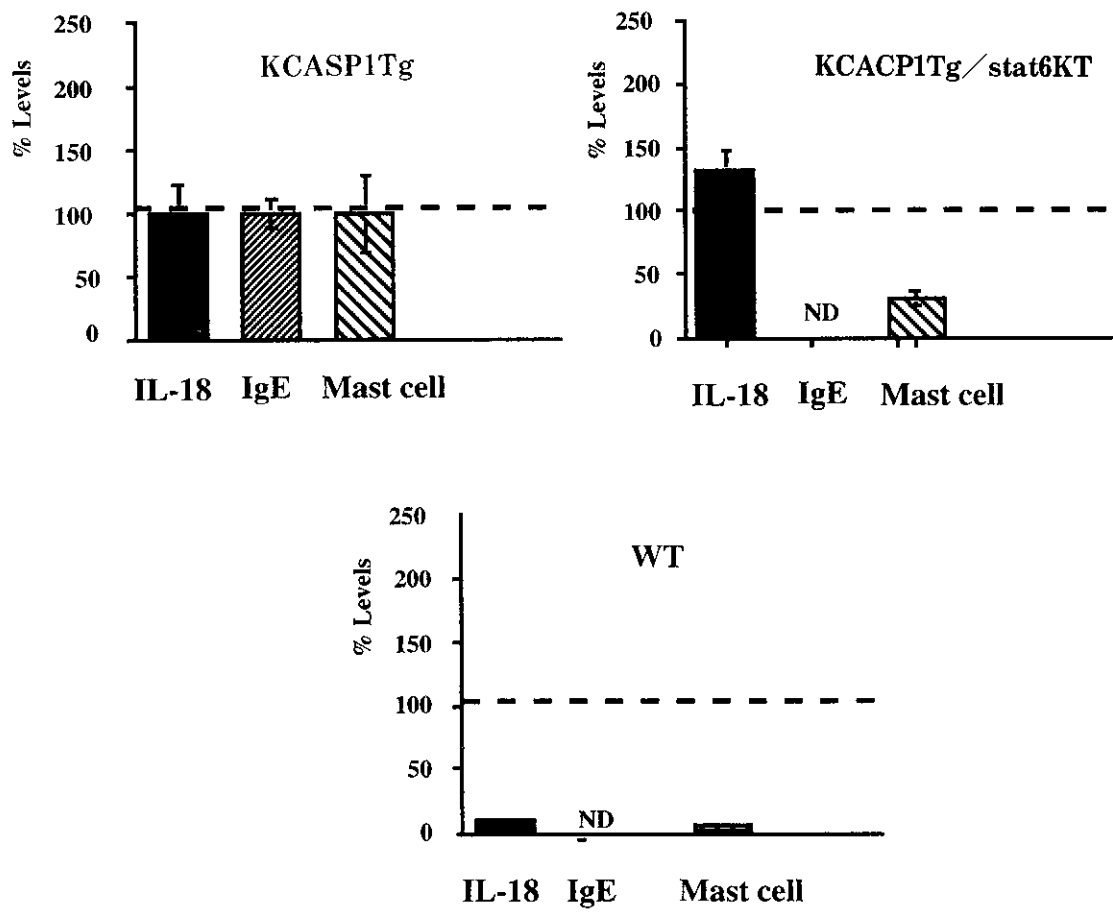


図 2 血清 IL-18、血清 IgE、皮膚浸潤マスト細胞数。KCASP1Tg を 100%としたときの同 stat6KT、正常マウスでの相対的値 (%)

9) 膿疱性乾癬／尋常性乾癬の責任遺伝子の解析

協力研究者：小澤 明（東海大学医学部医学科感覚学系皮膚科学部門）

共同研究者：飯塚 万利子、馬 淵 智 生、梅 澤 慶 紀、松 山 孝

（東海大学医学部医学科感覚学系皮膚科学部門）

岡 晃、田 宮 元、猪 子 英 俊

（東海大学医学部医学科分子生命科学2部門）

研 究 要 旨

汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析により、その免疫遺伝子学的背景の解明、あるいはその病態形成機序の検討を目的とする。その前段階として、尋常性乾癬について解析を進めている。前年度までに行った遺伝子の絞り込みから、第6染色体のHLAクラスI領域にある、*SEEKI* 遺伝子とS遺伝子との相互作用が尋常性乾癬の発症に関与するのではないかと推察した。2001年度の研究課題としてこれらの遺伝子がどのように相互作用するかを解明するため、乾癬患者の病変部と非病変部皮膚、および健常人皮膚を用いて両遺伝子のmRNA量を検討した。将来的には尋常性乾癬に用いた手法に準じ、汎発性膿疱性乾癬の疾患感受性遺伝子を解析する予定である。

A. 研究目的

汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析により、その免疫遺伝子学的背景の解明、あるいはその病態形成機序の検討を行うことを目的とする。われわれは、その研究の前段階として、まず比較的症例の多い尋常性乾癬について解析を進めている。すなわち複数の遺伝子に関与すると思われる尋常性乾癬候補遺伝子の解析を行うことで、その発症機序を解明する方法を採っている。平成12年度までの研究では、尋常性乾癬疾患感受性遺伝子について、第6染色体のHLA-C遺伝子近傍の候補領域において、単塩基置換多型SNPs (single nucleotide polymorphisms) をマーカーにもちいた解析を行った。その結果 *SEEKI* 遺伝子 (specific expression in epidermal keratinocyte)、S遺伝子上のcSNPs (coding SNPs) が、乾癬と強い相関を認めたことを報告した。*SEEKI* 遺伝子ならびにS遺伝子のうちS遺伝子に関しては、過去の報告で日本人と欧米人で連鎖不平衡を示す多型部位が異なること、またS遺伝子のノックアウトマウスにおいても、乾癬様の症状を示さなかったという報告もあることなどから、直接乾癬発症に関与する可能性は低いと考えられた。よって乾癬発症に関与する遺伝子は、残るもう一方の *SEEKI* 遺伝子である可能性が考えられた。その後現在までに、外国の研究者からも、染色体地図で表す6p21.3、われわれの報告とほぼ同じ遺伝子領域について、乾癬との関連を指摘する報告が複数ある。今年度の研究課題として *SEEKI* 遺伝子とS遺伝子がどのように相互に作用するかを解明てゆく手がかりとして、乾癬患者の病変部と非病変部皮膚、および健常人皮膚を用いて *SEEKI* 遺伝子とS遺伝子のmRNA量を検討した。

B. 研究方法

1) 東海大学医学部附属病院皮膚科外来受診ならびに入院した尋常性乾癬患者7例の、乾癬病変

部および非病変部の皮膚、ならびに健常人コントロールの皮膚を用いて、*SEEKI* 遺伝子の mRNA の発現を比較した。

2) 論理面への配慮、東海大学医学部論理委員会での審議を経て、患者および健康人の皮膚採取に際しては、研究目的、方法などの説明を行い同意を得た。

3) *SEEKI* 遺伝子と *S* 遺伝子の転写産物を一本鎖特異的かつ定量的 RT-PCR を行うことによりこれらの遺伝子の発現量を推定した。その mRNA 量について、患者病変部・非病変部、健常人皮膚で比較を行った。

C. 研究 成 果

乾癬患者のうち 3 例では、病変部皮膚は *S* 遺伝子の mRNA 量が非病変部に比べ有意に多い傾向を示した。ただし残りの 4 例では両者に有意な差は認めなかった。一方、*SEEKI* 遺伝子は特に乾癬患者 4 症例の病変部において mRNA が認められたが、非病変部や健常人ではほとんど mRNA が検出されなかった。

D. 考 案

現在までの研究結果より、*SEEKI* 遺伝子単独で尋常性乾癬発症を説明することは困難であるが、この遺伝子が尋常性乾癬病変部においてなんらかの役割を果たしていることが考えられる。もし *SEEKI* 遺伝子が、我々の想定したように *S* 遺伝子の塩基配列に結合して、mRNA の翻訳障害とポリペプチドの合成を阻害し、乾癬発症に寄与するならば、乾癬患者の病変部と非病変部皮膚で *S* 遺伝子あるいは *SEEKI* 遺伝子の mRNA 量に差がみられるのではないかと考え検討を進めた。今回 *SEEKI* 遺伝子の mRNA 量は尋常性乾癬患者病変部でより多く見られる傾向が認められた。*SEEKI* 遺伝子に関しては症例により結果にばらつきがあり、統一した結論を出すのはさらなる症例の蓄積が必要と考えられた。

E. 結 論

今後の研究課題として、尋常性乾癬患者皮膚におけるこれらの遺伝子の発現解析を可能な限り症例数を増やして詳細に検討し、乾癬患者皮膚において *SEEKI* 遺伝子が乾癬の病態にどのように関与するのかを、解析してゆく必要がある。そして *SEEKI* 遺伝子、*SEEKI* 遺伝子の mRNA の抗体をつくり動物モデルで乾癬病変の再現を試みるなどの方法も検討している。さらに、第 6 染色体以外の染色体についても、ゲノムワイドに解析を行うことによって、複数存在すると思われる他の尋常性乾癬責任遺伝子の検索を進めている。将来は、膿疱性乾癬の責任遺伝子をつきとめるために、同様の遺伝子マーカーの多型性解析や、患者皮膚を用いた遺伝子の解析をすすめるための計画を立案し、または実際に解析に用いることが可能な症例数がどれくらいであるか、などの検討を加えていく予定である。

英 文 抄 録

Analysis for the susceptible gene in pustular psoriasis to elucidation of an immunity gene study-background or etiology of disease was carried out. At first, we analysis for the susceptible gene in psoriasis vulgaris. We have determined the genomic sequence of surrounding HLA-C gene. The results suggests that one of the new genes, *SEEKI* and *S*

gene were considered as participates in development of symptoms the psoriasis vulgaris by the interaction. The amount of mRNA of both genes in psoriasis lesional skin, non lesional skin and control skin ware examined in this year.

10) 膿疱性乾癬の宿主要因解析

協力研究者：武 藤 正 彦（山口大学医学部分子感知医科学講座皮膚科）

共同研究者：谷 藤 順 士（市立釧路総合病院皮膚科）

古 屋 和 彦（函館中央病院皮膚科）

塩 澤 俊 一、小 西 良 武（神戸大学医学部保健学科）

汎発性膿疱性乾癬は未だ病因不詳の難病である。本症は多因子疾患であると推測されており、その発症に寄与する遺伝的要因を解明することを目的として、本症の多発家系の収集を試みた。4名の罹患同胞を含む二家系を対象とした。HLA 遺伝子型（ハプロタイプ）を検討した結果、各々の罹患同胞の間では1個のHLA 遺伝子型（ハプロタイプ）が共有されていた。さらにこれら二家系のうち一家系の兄妹発症例においてアポトーシス関連分子である death receptor 3（DR3）の遺伝子変異を見出した。

はじめに

汎発性膿疱性乾癬（GPP）の病因については未だ不詳であるが、複数の遺伝的要因と複数の環境因子の相互作用により発症する多因子疾患と考えられている。疾患感受性遺伝子の同定には罹患同胞対法を用いた連鎖解析は有用な手法であるが、本症の多発家系の収集はその発症頻度が極めて低く容易ではない。幸いにもわれわれは2組の罹患同胞を含む二家系23名のDNAを有しており、免疫系機能遺伝子であるMHCおよびdeath receptor 3（DR3）を中心に遺伝的要因の解析を進めている。

方 法

患者およびその家族の承諾を得た後、汎発性膿疱性乾癬多発家系二家系（GPP1およびGPP2：図1）についてのヘパリン加血液からフェノール・クロホルム法によりDNAを抽出した。PCR-SSP法によるHLAのgenotypingにはペルフリーズ社のキットを用いた。アポトーシス関連分子であるDR3の遺伝子多型解析は標的部位を含むDNA断片をPCRにより増幅し、その産物をdirect sequencingした。

結 果

1. 2組の罹患同胞の間では各々1個のHLAハプロタイプが共有されていた。
2. DR3遺伝子の多型が細胞外ドメイン部分で認められた。

考 案

従来の集団調査においても、汎発性膿疱性乾癬はHLA-DQB1*03と相関することが報告されており^{1), 2)}、今回の解析で得られた二組の罹患同胞間で各々1個のHLAハプロタイプが共有されていたという結果は、汎発性膿疱性乾癬発症の一つの遺伝的要因としてHLAと連鎖した疾患感受性遺伝子の存在を示唆する。HLAに加え、他の免疫系機能分子であるDR3の遺伝子に変異を見出した。DR3分子の異常は既に慢性関節リウマチでも報告されており³⁾、GPPにおいても

その原因候補遺伝子である可能性が強く示唆される。

現在、DR3の変異がGPPを含む乾癬全体に普遍化できるものか否かを乾癬多発家系および集団調査で確認しようと試みているところである。

参考文献

- 1) Akira Ohkawara et al: Generalized pustular psoriasis in Japan: two distinct groups formed by difference in symptoms and genetic background. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 76:68-71, 1996.
- 2) Akira Ozawa et al: HLA class I and II alleles and susceptibility to generalized pustular psoriasis: significant associations with HLA-Cw1 and HLA-DQB1*0303. *J Dermatol* 25:573-581, 1998.
- 3) Shiozawa S et al: An approach to identify new genes in autoimmune diseases: lessons from rheumatoid arthritis. *Rev Immunogenetics* 2: 133-139, 2000.

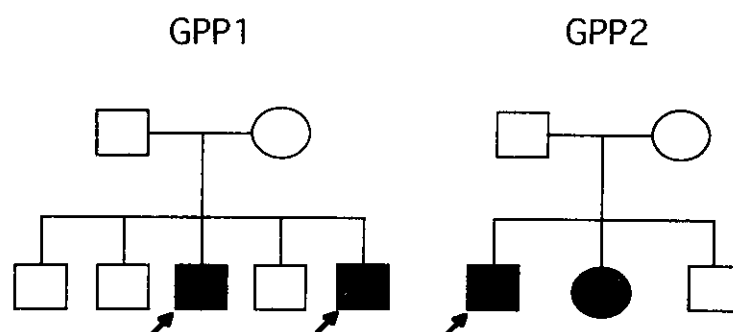
Generalized pustular psoriasis and disease susceptibility gene

Masahiko Muto¹, Junji Tanifuji², Kazuhiko Furuya³, Shunichi Shiozawa⁴ and Yoshitake Konishi⁴

1. Department of Dermatology and Biomolecular Recognition, Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Japan
2. Department of Dermatology, Kushiro City General Hospital, Kushiro, Japan
3. Department of Dermatology, Hakodate Central General Hospital, Hakodate, Japan
4. Department of Rheumatology, Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan

Summary

An attempt to screen for disease susceptibility genes was done to examine genetic factors involved in the development of generalized pustular psoriasis (GPP). Family study of two multiplex affected family with a total of 23 family members including 4 affected-siblings was performed by using HLA haplotype and death receptor 3 (DR3) gene polymorphism. Each affected sib-pair shared one HLA haplotype, respectively. We found a mutation of DR3 mapped on chromosome 1p, an apoptosis-inducing receptor. The fine analysis of the DR3 as a possible candidate gene for GPP is in progress.



11) 乾癬に対する各種治療法による治療後の組織所見の比較

研究協力者：三 橋 善比古（山形大学医学部皮膚科）

共同研究者：片 桐 美 之、川 口 雅 一（山形大学医学部皮膚科）

要 約

4種類の代表的な乾癬の治療法、すなわち、副腎皮質ステロイドホルモン（ステロイド）外用、活性型ビタミンD₃（VD₃）外用、シクロスポリン内服、エトレチナート内服による治療後の組織像を観察した。その結果、それぞれの組織像が異なっていることが明らかになった。すなわち、ステロイドでは炎症所見の消褪と表皮構築の正常化が同時にみられるのに対し、VD₃では表皮の肥厚が残存する傾向がみられた。シクロスポリンでは、炎症の消褪は著明であるのに過角化が残存し顆粒層の出現はみられなかった。エトレチナートでは、不全角化が巣状に残存し、顆粒層から角質層内に周期的な剥離の像が見られた。これらの組織像の違いは、それぞれの作用機序の違いを反映しているものと思われる。今後、治療期間や投与量、および、ステロイドやVD₃では用いる薬剤の種類などを変え、症例数を増して、in vitro で得られた所見と実際に患者に用いた時の相違を検索する必要があるものと考えられる。

は じ め に

乾癬に対して、副腎皮質ステロイドホルモン（ステロイド）や活性型ビタミンD₃（VD₃）の外用、PUVA療法、エトレチナートやシクロスポリンの内服など、様々の治療が行われている。それぞれの治療法の作用機序はよく研究されているが、実際に患者に用いたときの組織の変化についてまとめた報告はほとんどみられない。そこで、主な治療を行ったときの組織の変化を比較する。

材 料 と 方 法

乾癬に対してよく行われている治療法である、ステロイド外用、VD₃外用、エトレチナート内服、シクロスポリン内服を行った尋常性乾癬患者を対象とした。ステロイド外用は strong クラスを用い、VD₃外用は calcipotriol を用いて、一つの病変部を2分割して4例について比較し、エトレチナート（チガソン[®]）内服、はそれぞれ2例ずつ観察した。

治療前および治療1～4週後の臨床的变化と、病変部から採取した組織像を観察した。治療後の生検は、治療前の生検部位と同じ乾癬局面内から行った。採取した組織は10%中性ホルマリン固定を行い、ヘマトキシレン・エオジン染色を施して観察した。

結 果

検索した全ての症例の治療前の組織所見は、尋常性乾癬の特徴を有していた。すなわち、不全角化を伴う過角化、顆粒層の消失、表皮突起の延長と真皮乳頭腫症および真皮上層の血管周囲性小円形細胞浸潤がみられた。角層には Munro の微小膿瘍がみられた。

ステロイド外用とVD₃外用1週間後の臨床所見は、両者ともに紅斑が薄くなり、角化も減少

した。2週間後には両者とも紅斑が消失し、鱗屑もほとんど消失していた(図1、図2)。

組織学的には、両者ともに過角化が減少し顆粒層が出現していた。炎症性細胞浸潤も少なくなっていたが、細胞浸潤はVD₃外用の方がやや強く、ステロイドではより軽快していた。表皮の構築が、ステロイドで、より正常に近付いており、VD₃では不規則な表皮肥厚がやや残存していた(図3、4、5)。

シクロスポリン内服1カ月後、臨床的には紅斑が消褪し、軽度の鱗屑を残すのみであった。この時の組織所見は、過角化が残存し、各層細胞内に核が抜けたあとと思われる小空胞を認めた。不全角化はほとんど消失していたが、顆粒層の出現は遅れ、一部で認められるのみであった。表皮突起の延長は軽減して乳頭腫症は減少していた。真皮上層の血管周囲性細胞浸潤は著明に減少していた(図6、7)。

エトレチナート内服では、過角化のところどころに不全角化が巣状に残り、角質が層状に剥離する像がみられた。顆粒層が2~3層出現していたが、ここでも剥離傾向を示す裂激の形成が認められた。表皮は扁平に肥厚して、表皮突起が消失していた。真皮上層の炎症性細胞浸潤は著明に減少していた(図8)。

考 察

今回、ステロイドとVD₃外用、およびシクロスポリンとエトレチナート内服時の尋常性乾癬の組織の変化を比較した。こちらの薬剤は乾癬の治療に頻用されており、それぞれ異なった作用機序を持っている。従って、組織学的にも異なった変化を生じて臨床的寛解に至っているものと推測されるが、これらを比較した報告は少ない。

ステロイドは抗炎症作用を発揮して、乾癬における炎症を抑制している¹⁾と思われる。今回の観察でも、治療後著明な炎症性細胞浸潤の消褪が確認された。また、表皮の構築に著明な改善がみられたが、炎症の消褪によると同時に、ステロイドの角化細胞に対する分化促進作用が関与していたものと推測される。

VD₃は角化細胞の増殖抑制と分化促進、EGFレセプター発現の抑制、IL-8発現抑制、ビタミンDレセプター発現促進などの作用を持つ²³⁾。今回の観察では、治療後、組織学的にも著明な改善を認めた。炎症細胞の消褪はステロイドよりやや劣るものの、ステロイドにほぼ匹敵する効果を示していた。過角化の改善、顆粒層の出現はステロイドとほぼ同程度であった。不規則な表皮肥厚が、ステロイドに比べて残存傾向にあった。

シクロスポリンはヘルパーT細胞の活性を抑制して炎症と免疫を抑制する⁴⁵⁾。今回の観察でも、内服後は著明な炎症細胞浸潤の改善を認めた。特異な所見は、不全角化が消褪しているのに過角化が残存していることであった。角層内には、核が抜けた後を示すと思われる空胞が見られた。また、表皮肥厚や表皮突起の延長も残存傾向を示し、臨床的な改善度に比べて組織学的には乾癬の像をより残している印象を受けた。

エトレチナートはトランスグルタミナーゼ1の抑制、K1、K6、K10、K16などのケラチン蛋白の合成抑制、角化細胞デスモソームの数と大きさを減少させる⁵⁾。今回の観察では、治療後の表皮の肥厚が改善して扁平化していたが、過角化と不全角化とは一部に残存していた。しかし、顆粒層は数層出現していた。特異な点は、顆粒層から角層内にかけて、周期的な裂激の形成を認めたことであった。このことは、角化細胞が顆粒層に達した後、周期的に早期剥離を生じる機序が起こっていることを推測させる。エトレチナートはデスモソームの数と大きさを減少させると