

球数、血清アルブミン値、血清Ca値のデータをスコア化し2つの方法により皮膚症状を評価し、症例の得点分布を調べた。大半の症例は重症度分類基準による中等症に該当していた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K and Kaneko F: Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. **Brit J Dermatol** 146: 69-73, 2002
2. Oyama N, Takahashi H, Tojo M, Iwatsuki K, Iizuka H, Nakamura K, Homma Y and Kaneko F: Different properties of three isoforms (alpha, beta, and gamma) of transcription factor AP-2 in the expression of human keratinocyte genes. **Arch Dermatol Res** 294:273-280, 2002
3. Akiyama H, Huh W-K, Fujii K, Yamasaki O, Oono T and Iwatsuki K: Confocal laser microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in vitro. **J Dermatol Sci** 29: 54-61, 2002
4. Akiyama H, Oono T, Huh W-K, Yamasaki O, Ogawa S, Katsuyama M, Ichikawa H and Iwatsuki K: Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy** 48: 122-128, 2002
5. Akiyama H, Oono T, Huh W-K, Yamasaki O, Akagi Y, Uemura H, Yamada T and Iwatsuki K:

Actions of gluco-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus*. **J Dermatol** 29: 580-586, 2002

6. Oono T, Shirafuji Y, Huh W-K, Akiyama H and Iwatsuki K: Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. **Arch Dermatol Res** 294:185-189, 2002
7. Huh W-K, Oono T, Shirafuji Y, Akiyama H, Arata J, Sakaguchi M, Huh N-h and Iwatsuki K: Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. **J Mol Med** 80:678-684, 2002

日本語論文

1. 佐藤正隆、秋葉 均、尾山徳孝、岩月啓氏、金子史男: CpG oligodeoxynucleotides (ODN) によるマウスの2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) に対するアレルギー性接触皮膚炎増悪化のメカニズムについての検討. **福島医学雑誌** 52:237-250, 2002
2. 浅越健治、山崎 修、牧野英一、佐藤修平、平木祥夫、岩月啓氏: Sentinel-node biopsy を施行した悪性黒色腫10例の検討. **日本皮膚科学会雑誌** 112: 1807-1815, 2002
3. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 非A群レンサ球菌および類縁菌による皮膚感染症の臨床的検討. **日本皮膚科学会雑誌** 112:23-28, 2002
4. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムに対する白糖・ポビドンヨード配合軟膏 (ユーパスタ) の効果. **Ther Res** 23: 1619-1622, 2002
5. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムに対するロキシスロマイシンの効果.

皮膚の科学1:1-7,2002

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

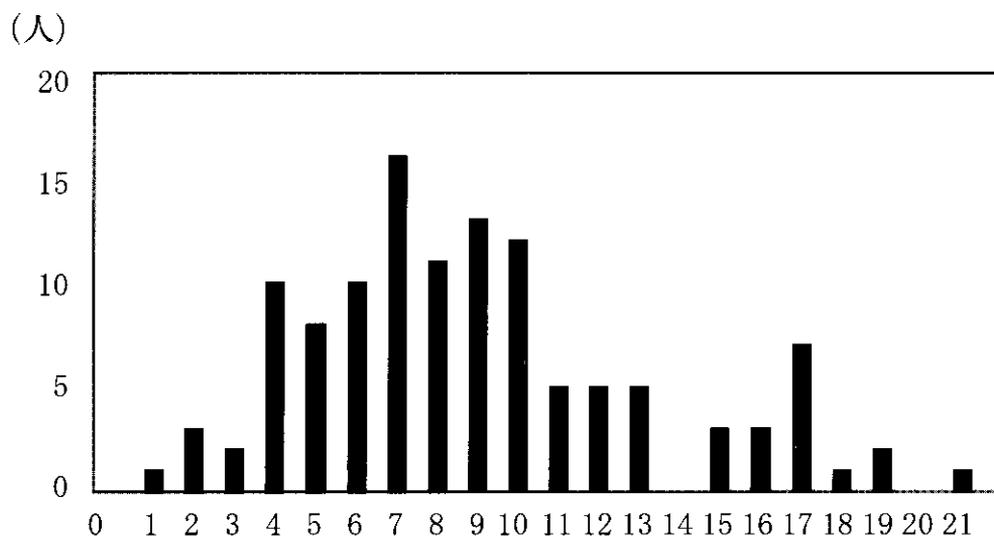
なし

2. 実用新案登録

なし

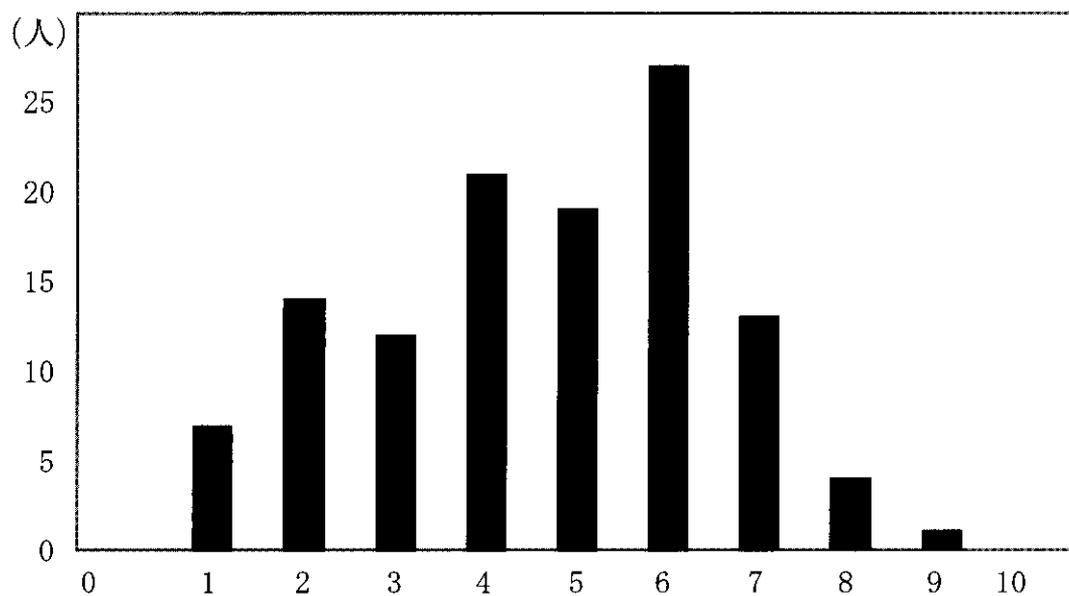
3. その他

なし



(点)

図1 スコアと人数分布(第1の方法)



(点)

図2 スコアと人数分布(第2の方法)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

膿疱性乾癬病変部における IL-8 mRNA 発現パターンの検討

分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学総合研究科
皮膚・粘膜・結合織学分野 教授

研究要旨 我々は膿疱性乾癬病変部におけるサイトカインの発現パターンを検討するため interleukin(IL)-8 mRNA の発現を、膿疱性乾癬 9 例、対照として尋常性乾癬 4 例、acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) 2 例よりパラフィン包埋切片を作成し、cRNA プローブを使用して tyramide *in situ* hybridization (ISH) 法で検討した。膿疱性乾癬病変部の IL-8 mRNA の発現は、顆粒層を中心に小膿瘍周囲に強く認められ、また、膿瘍内の細胞の一部にも発現していた。これに対して、尋常性乾癬では、その発現は角層直下の有棘層の一部のみで、程度も弱かった。AGEP では、発現のパターンは膿疱性乾癬に類似していた。膿疱性乾癬と尋常性乾癬の IL-8 mRNA の発現パターンが異なることは、その病態が異なることを示唆するが、AGEP とのパターンに差がなかったことは、類似の膿疱性疾患と共通の病態があるのかさらに症例を増やして検討する必要があると思われた。

共同研究者

松浦浩徳 岡山大学医学部附属病院
皮膚科助手
大藤玲子 岡山大学医学部附属病院
皮膚科医員

A. 研究目的

膿疱性乾癬は急激な発熱とともに全身の皮膚が潮紅し、無菌性膿疱が多発する稀な疾患である。その病因に関しては依然不明な点が多いが、病変部においては表皮角化細胞、浸潤してくる好中球、Tリンパ球、単球/マクロファージから産生されるサイトカインやケモカインが複雑なネットワークを形成していると考えられる。これまでに、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α などの発現が少数の症例の血清や皮膚組織で検討されており、ある程度の相関が示されている。しかし、稀な疾患のため症例数が少ないこと、サイトカインやケモカイン自体の安定性の問題があり、その病変部での発現に関しては、はっきりとした結論は出ていない。最近、tyramide を利用した高感度 *in situ*

hybridization 法を用いれば、通常のパラフィン切片からでも微量な mRNA の発現を検出できることが報告されるようになった。今回、我々はこの方法を利用し、膿疱性乾癬病変部における IL-8 mRNA の発現パターンと尋常性乾癬、acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) のそれを通常のパラフィン切片上で比較検討した。

B. 研究方法

標本：病理標本は通常ホルマリン固定をした上でパラフィンブロックとして保存していたもの（保存期間が5年未満のもの）を使用した。内訳は膿疱性乾癬 9 例、対照として尋常性乾癬 4 例、acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) 2 例であった。固定時間などの施設間での差による影響を検討するために膿疱性乾癬 9 例のうち 5 例は他施設から提供を受けた。これらより厚さ 3 μ m の連続切片を作成しシランコートスライドに貼付した。

cRNA プローブの作成：interferon- γ

で処理をした表皮角化細胞からmRNAを抽出し、ヒトIL-8遺伝子に対するプライマー¹⁾ 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGT-3' 5'-CCTCTTCAAAAAGTTCTCCACACC-3'でRT-PCRを実施した。次にPCR産物をPCR-Script Amp cloning kit (Stratagene)を使用し、発現ベクターpPCR-Script Amp SK(+) Plasmidにsubcloningした上でsequencingを実施し、オリエンテーションを確認、DIG-RNA labeling kit (Roche)でcRNAプローブを作成した。

Tyramide ISH法：すでに報告されているプロトコル²⁾に準拠して実施した。

C. 研究結果

膿疱性乾癬におけるIL-8 mRNAの発現：膿疱性乾癬ではいずれの症例でも、ほぼ表皮全層にわたって発現が認められ、特に顆粒層と小膿瘍周囲に発現が強かった(図1 A, C)。また、小膿瘍内部の細胞の一部に発現が認められた(図1 D)。陰性対照としてsense probeを使用した場合には有意の所見は認められなかった(図1 B)。パラフィン切片を作成した施設のの違いによる結果の差は認められなかった。

尋常性乾癬におけるIL-8 mRNAの発現：尋常性乾癬では発現は角層直下から有棘層上部に認められ、限局性であった(図2 A, B)。また、発現の程度も膿疱性乾癬に比べて弱かった。

AGEPにおけるIL-8 mRNAの発現：AGEPにおいては発現は膿疱性乾癬同様にほぼ表皮全層にわたって発現が認められ、特に小膿瘍周囲に発現が強かった(図3 A, B)。

D. 考察

パラフィン切片からtyramideISH法を用いることで発現量が少ないと考えられるIL-8 mRNAを検出することができた。このことは、症例数が少ない膿疱性乾癬にお

いて過去の標本を活用することが可能となり、サイトカインネットワークの解明などに応用することが可能である。また、膿疱性乾癬において表皮でのIL-8 mRNA発現が強く、小膿瘍内部の細胞での発現が少なかったことは、炎症反応の場が、浸潤してきた細胞より表皮にあることを示唆しているように思える。しかし、標本を採取した時期が発現パターンに影響を与えている可能性は否定できないので、発病初期と経時的な標本を比較してみる必要があるだろう。また、tyramide ISH法は高感度ではあるが、それゆえに蛋白レベルでの発現が実際にどの程度あるのかを推定することは困難である。この点に関してもmRNAと蛋白の発現の間にどの程度の相関があるのかさらに検討が必要と思われる。対照として使用した、尋常性乾癬において発現が角層直下周囲に認められたことはこれまで報告されているように、炎症の場の一つが角層とその周囲であることを意味している。発現量に関しても単純に比較することはできないが、IL-8 mRNAの発現からみた場合、膿疱性乾癬と尋常性乾癬は異なった病態をとっているといえる。しかし、一方でAGEPにおけるIL-8 mRNAの発現パターンは膿疱性乾癬と差が認められなかった。AGEPの病因としては、薬剤の他に膿疱性乾癬と共通の病態を推察する向きもあり、類似の膿疱性疾患における発現を症例をさらに増やして検討する必要があると考えられた。

E. 結論

tyramideISH法を用いることで、通常ホルマリン固定をしたパラフィンブロック切片からでもmRNAの検出が可能であった。また、固定条件の異なる施設からの標本でも結果に有意の差は認められなかった。このことは、症例の少ない膿疱性乾癬において、サイトカインネットワークの解明など病態の解析に本法は有効な手段であると

考えられた。また、検討した症例は少ないが、膿疱性乾癬とAGEPにおけるIL-8 mRNAの発現パターンに類似性が認められたことは、膿疱性疾患と共通の病態があるのかさらに症例を増やして検討する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K and Kaneko F: Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. **Brit J Dermatol** 146: 69-73, 2002
2. Oyama N, Takahashi H, Tojo M, Iwatsuki K, Iizuka H, Nakamura K, Homma Y and Kaneko F: Different properties of three isoforms (alpha, beta, and gamma) of transcription factor AP-2 in the expression of human keratinocyte genes. **Arch Dermatol Res** 294:273-280, 2002
3. Akiyama H, Huh W-K, Fujii K, Yamasaki O, Oono T and Iwatsuki K: Confocal laser microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in vitro. **J Dermatol Sci** 29: 54-61, 2002
4. Akiyama H, Oono T, Huh W-K, Yamasaki O, Ogawa S, Katsuyama M, Ichikawa H and Iwatsuki K: Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy** 48: 122-128, 2002
5. Akiyama H, Oono T, Huh W-K, Yamasaki O, Akagi Y, Uemura H,

Yamada T and Iwatsuki K: Actions of gluco-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus*. **J Dermatol** 29: 580-586, 2002

6. Oono T, Shirafuji Y, Huh W-K, Akiyama H and Iwatsuki K: Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. **Arch Dermatol Res** 294:185-189, 2002
7. Huh W-K, Oono T, Shirafuji Y, Akiyama H, Arata J, Sakaguchi M, Huh N-h and Iwatsuki K: Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. **J Mol Med** 80:678-684, 2002

日本語論文

1. 佐藤正隆、秋葉 均、尾山徳孝、岩月啓氏、金子史男: CpG oligodeoxynucleotides (ODN) によるマウスの2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) に対するアレルギー性接触皮膚炎増悪化のメカニズムについての検討. **福島医学雑誌** 52:237-250, 2002
2. 浅越健治、山崎 修、牧野英一、佐藤修平、平木祥夫、岩月啓氏: Sentinel-node biopsy を施行した悪性黒色腫10例の検討. **日本皮膚科学会雑誌** 112: 1807-1815, 2002
3. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 非A群レンサ球菌および類縁菌による皮膚感染症の臨床的検討. **日本皮膚科学会雑誌** 112:23-28, 2002
4. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムに対する白糖・ポビドンヨード配合軟膏 (ユーパスタ) の効果. **Ther Res** 23: 1619-1622, 2002
5. 山崎 修、秋山尚範、大野貴司、岩月啓氏: 黄色ブドウ球菌のバイオフィル

ムに対するロキシスロマイシンの効果.
皮膚の科学1:1-7,2002

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1) De Larco JE, Wuertz RK, Rosner KA, Erickson SA, Gamache DE, Manivel C: A potential role for Interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J pathol* 158: 639-646, 2001

2) 佐藤雄一, 土屋紅緒, 亀谷 徹: パラフィン切片を用いた高感度 tyramide in situ hybridization, 免疫組織化学法と高品質 DNA 抽出法, 組織細胞化学2001

(日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京, 98-107, 2001

図とその説明

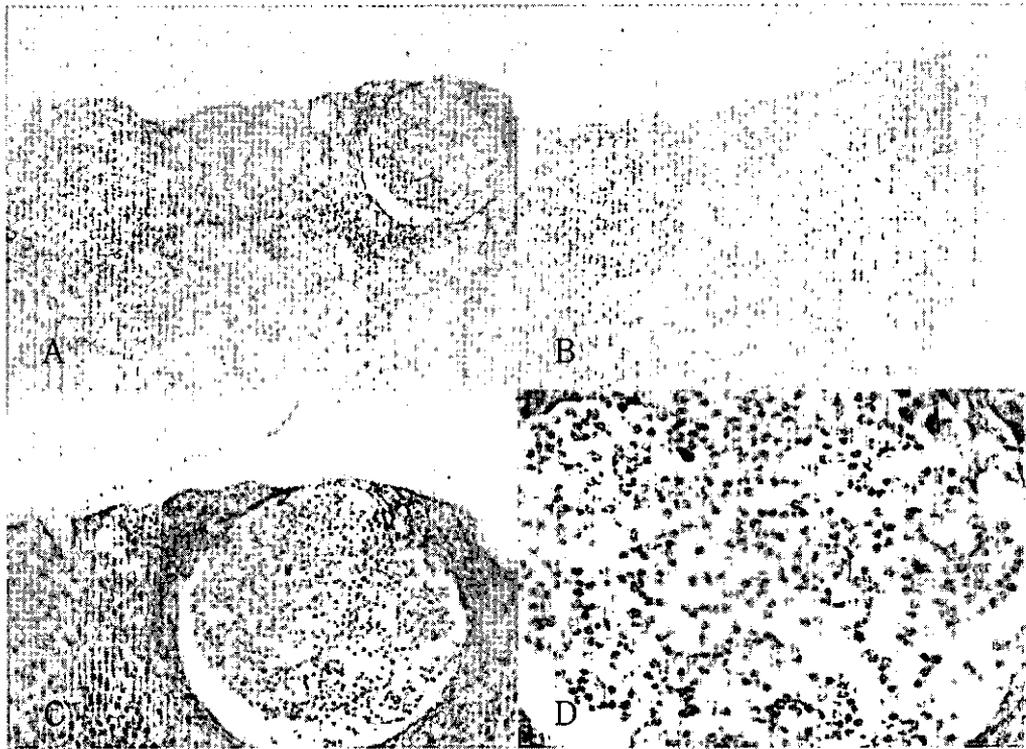


図1 膿疱性乾癬における IL-8 mRNA の発現
A) 表皮角化細胞に強く発現が認められる。(antisense probe)
B) 陰性対照 (sense probe)
C) 小膿瘍周囲の角化細胞に強い発現を認める。
D) 小膿瘍内部の細胞の一部も陽性



図2 尋常性乾癬における IL-8 mRNA の発現
 A) 角層直下から有棘層上部に限局性の発現を認める。
 B) 強拡大像

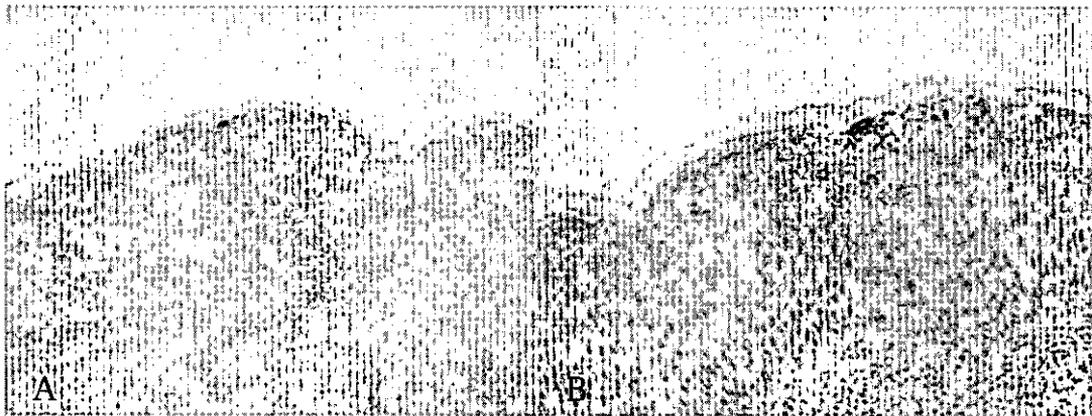


図3 AGEP における IL-8 mRNA の発現
 A) 有棘層から角層直下まで広い範囲に発現を認める。
 B) 強拡大像。小膿疱周囲の角化細胞に強い発現を認める。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

EGFR 過剰発現機構の解析

研究協力者 本間 好 福島医科大学・生体情報伝達研究所・生体物質 教授

研究要旨 乾癬患者由来角化細胞では恒常的に EGFR が過剰発現している。この原因として、転写因子 AP-2 の恒常性発現と EGFR 遺伝子の低メチル化が関与する可能性を見出した。本研究では、主に AP-2 とエピジェネティクスに注目して乾癬の病態解明を目指す。今回は AP-2 に関連した知見を報告する。AP-2 は α 、 β 、 γ の 3 種のアイソフォームが存在するが、そのうち AP-2 α は基底細胞に、AP-2 γ は表皮全体に分布した。これに対して、AP-2 β の発現は認めなかった。一方、AP-2 α および γ は EGFR やケラチン K14 のプロモーター領域に結合したが、AP-2 γ は、さらにケラチン K1、TGase1、インボルクリン遺伝子のプロモーター領域にも結合した。これらの結果は、AP-2 α は主に細胞増殖に、AP-2 γ はより広範なケラチノサイト機能に関与することを示唆する。

共同研究者

尾山徳孝

福島医大・医・皮膚科 助手

鎌滝章央

福島医大・生情研・生体物質 助手

AP-2 は α 、 β 、 γ の 3 種のアイソフォームが存在するが、そのうち AP-2 α は基底細胞の核に、AP-2 γ は表皮全体に一様に分布した。これに対して、AP-2 β の発現は認めなかった。乾癬（尋常性）サンプルにおいても、同様の結果が得られた。すなわち、AP-2 α の発現は増殖細胞とほぼ一致して基底細胞からほぼ数層程度まで検出されたが、AP-2 γ はより広範に分布した。

一方、AP-2 α および γ の転写因子としての機能を DAN 結合能で評価すると、AP-2 α は EGFR やケラチン K14 のプロモーター領域に強力に結合した。これに対し、AP-2 γ は EGFR やケラチン K14 のプロモーター領域にも結合したが、さらにケラチン K1、TGase1、インボルクリン遺伝子などのプロモーター領域にも結合した。これらの結果は、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* での転写活性測定結果と一致した。

A. 研究目的

乾癬患者ケラチノサイトにおける恒常的な EGFR 過剰発現の解析から、転写因子 AP-2 の発現とエピジェネティクスが病態形成に関与する可能性が示唆された。本研究では、ケラチノサイトにおける AP-2 アイソフォームの発現と機能の解析を主な目的とする。

B. 研究方法

AP-2 の発現は、アイソフォーム特異的な抗体を用いた免疫染色法にて、遺伝子プロモーター領域との結合能は、リコンビナントタンパク質を用いた EMSA 法にて解析した。またプロモーター活性への影響は、既報にしたがって GFP またはルシフェラーゼをレポーターとして測定した。

C. 研究結果

D. 考察

AP-2 は細胞の増殖、分化、がん化などに関与する転写因子である。サイトカインやプロスタグランジンなどにより一過性に誘導されることから、生体防御や炎症など

の生体反応において中心的な役割を担うことが明らかにされている。乾癬患者由来のケラチノサイトが IL-6 などのサイトカインを産生する事実を総合すると、乾癬組織における AP-2 の恒常的発現は、免疫細胞およびケラチノサイト自身が産生するサイトカインがポジティブネットワークを形成することによるためと考えられた。

AP-2には α 、 β 、 γ の3種のアイソフォームが存在するが、それらの皮膚組織における機能は不明であった。今回の研究により、AP-2 α は主に細胞増殖に、AP-2 γ は細胞分化を含むより広範なケラチノサイト機能に関与することが示唆された。今後、膿疱性乾癬についても検討する。

E. 結論

AP-2の α 、 β 、 γ の3種のアイソフォームのうち AP-2 α は基底細胞に、AP-2 γ は表皮全体に一様に分布した。AP-2 β の発現は認めなかった。乾癬（尋常性）サンプルにおいては、AP-2 α の発現パターンは細胞増殖像とほぼ一致し、また AP-2 γ は正常同様、広範囲に分布した。

以上より、乾癬における AP-2 α の過剰発現は乾癬におけるケラチノサイト過増殖に関与する可能性が示唆された。一方、AP-2 γ の関与については今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

1. Oyama N, Takahashi H, Tojo M, Iwatsuki K, Iizuka H, Koichiro N, Homma Y, Kaneko F: Different properties of three isoforms (α , β , and γ) of transcription factor AP-2 in the expression of human keratinocyte genes. **Arch Dermatol**

Res 294: 273-280, 2002

2. Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, Sekimata M, Homma Y, Suzuki T: An invasion-independent pathway of bolld-borne metastasis. **Am J Pathol** 160: 1973-1980, 2002
3. Homma MK, Li D, Krebs EG, Yuasa Y, Homma Y: Association and regulation of casein kinase 2 activity by adenomatous polyposis coli protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 5959-5964, 2002
4. Nakano T, Osanai T, Tomita H, Sekimata M, Homma Y, Okumura K: Enhanced activity of variant phospholipase C- δ 1 protein (R257H) detected in patients with coronary artery spasm. **Circulation**, 105: 2024-2029, 2002
5. Kabuyama Y, Hamaya M, Homma Y: Early signaling events induced by 280-nm UV irradiation. **Eur J Biochem** 269: 664-670, 2002
6. Kobayashi N, Kabuyama Y, Sasaki S, Kato K, Homma Y: Suppression of corneal neovascularization by culture supernatant of human amniotic membrane. **Cornea** 21: 62-67, 2002

2. 学会発表

1. 関亦正幸, 本間好: MBD2 結合タンパク質 MIZF は塩基配列特異的転写制御因子である. 第25回分子生物学会年会, 2002
2. 北村卓也, 関亦正幸, 佐藤弘一郎, 菊地臣一, 本間好: erbB2 発現調節機構における poly (ADP-ribose) polymerase の役割. 第25回分子生物学会年会, 2002

3. 本間美和子, 本間好: CK2 による翻訳開始因子 eIF5 のリン酸化の役割. 第25回分子生物学会年会, 2002
 4. 本間美和子, 関亦正幸, 本間好: APC タンパクの CK2 活性制御ドメインによる増殖制御. 第75回生化学会大会, 2002
 5. 山鹿真幸, 関亦正幸, 藤井誠, 鎌田英明, 平田肇, 本間好, 八木澤仁: 新規 PLC δ 1 結合タンパク質 p122/Rho GAPは raft に存在する. 第75回生化学会大会, 2002
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
- なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
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 東海大学医学部皮膚科 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う。平成14年度は、(1)マイクロアレイを用いた乾癬関連遺伝子の発現プロファイリング、(2)マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析、を行った。これらの解析手順・解析結果を踏まえて、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析に応用していく。

共同研究者

梅澤慶紀
東海大学医学部皮膚科講師
飯塚万利子
東海大学医学部皮膚科助手
馬淵智生
東海大学医学部皮膚科大学院生
猪子英俊
東海大学医学部分子生命科学2教授
田宮 元
東海大学医学部分子生命科学2助手
岡 晃
東海大学医学部分子生命科学2奨励研究員
中山樹一郎
福岡大学医学部皮膚科教授
久保田由美子
福岡大学医学部皮膚科講師
照井 正
東北大学医学部皮膚科助教授
小澤麻紀
東北大学医学部皮膚科助手
橋本 隆
久留米大学医学部皮膚科教授
安元慎一郎
久留米大学医学部皮膚科助教授
池田志孝
順天堂大学医学部皮膚科助教授
松本義也
愛知医科大学皮膚科教授

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。

B. 研究方法

(1)尋常性乾癬患者の病変部・非病変部および健常者の皮膚組織由来のDNAを対象とし、マイクロアレイを用いた大規模な発現遺伝子プロファイリングを行う。(2)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のDNAを対象とし、マイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに遺伝的相関解析を行う。

C. 研究結果

(1)マイクロアレイ上の約60,000の遺伝子のうち約16,000が皮膚において構成的に発現していた。その中でも約1,000の既知・未知遺伝子に病変部特異的な発現量の差異を認めた。(2)316症例サンプリングし、17, 19番染色体について一次スクリーニングを行った。17番染色体については403個のマーカーのうち約60個に、19番染色体については274個のマーカーのうち約40個に相関が認められた。それらの中には、疾患感受性候補遺伝子領域に位置するマーカーも含まれていた。

D. 考察

(1)病変部特異的な発現量の差異を認めた遺伝子について、全長クローニングも含めた疾患関連遺伝子の同定を行い、乾癬の発症および病態の維持に関連する遺伝子を網羅的に解析する必要がある。(2)一次スクリーニングのみでは偽陽性が多数含まれている。別の患者群および健康対照群を対象として二次・三次スクリーニングを行う必要がある。他の染色体についても順次解析を行う。

E. 結論

(1), (2)で得られた情報を照らし合わせることによって、より迅速な疾患関連遺伝子の同定を目指す。その手法を生かして、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析を進める。同時に、多施設の協力を得て、汎発性膿疱性乾癬のサンプリングも進める。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

Matsuzaka Y, Okamoto K, Tsuji H, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Identification of the *hRDH-E2* gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion. **Biochem Biophys Res Commun** 297(5): 1171-1180, 2002

日本語論文

なし

2. 学会発表

1. Umezawa Y, Ozawa A, Kawashima M, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Teduka T, Igarashi A, Harada S A Guidelines for Generalized Pustular Psoriasis in Japan

The 6th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, May 11, 2002, Seoul

2. Mabuchi T, Iizuka M, Umezawa Y, Matsuyama T, Kawakubo Y, Ozawa A, Okamoto K, Oka A, Tamiya G, Inoko H

Profiring Gene Expression in Psoriasis Vulgaris by Microarray Technology

The 6th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, May 11, 2002, Seoul

3. 梅澤慶紀, 生駒憲広, 塗木裕子, 飯塚万利子, 松山 孝, 川久保 洋, 小澤明

小児膿疱性乾癬の1例

第26回日本小児皮膚科学会学術大会, 平成14年5月25, 26日, 東京

4. Mabuchi T, Iizuka M, Umezawa Y, Matsuyama T, Kawakubo Y, Ozawa A, Okamoto K, Oka A, Tamiya G, Inoko H

Expression Profiring of Psoriasis Vulgaris Using Microarray Technology

20th World Congress of Dermatology 2002, July 4-5, 2002, Paris

5. Umezawa Y, Ozawa A, Kawashima M, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Teduka T, Igarashi A, Harada S

A Guideline for Treatment in Generalized Pustular Psoriasis

20th World Congress of Dermatology 2002, July 4-5, 2002, Paris

6. 梅澤慶紀, 土井美果, 馬淵智生, 飯塚万利子, 松山 孝, 小澤明

汎発性膿疱性乾癬の2例

第17日本乾癬学会, 平成14年10月11-13日, 鹿児島

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

炎症性皮膚疾患における *hRDH-E2* 遺伝子およびその応用

2002年10月15日出願依頼票提出

2. 実用新案登録

特記すべき事項なし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

優性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子解析
—臨床症状と遺伝子変異の相関の検討—

分担研究者 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

研究要旨 先天性表皮水疱症のうち、優性栄養障害型表皮水疱症（DDEB）について臨床症状と遺伝子変異の相関を検討した。臨床的に爪甲萎縮が主体のDDEBの家系（4世代）についてCOL7A1遺伝子検索を行ったところ、ミスセンス変異G2028Rを見出した。この変異については、すでに全く無関係な2家系において報告されているが、それらの臨床症状は、一方の主症状が水疱・癬痕形成で、他方の主症状が痒疹様結節と全く異なっていた。そこで、これらの2家系についてもCOL7A1遺伝子変異につき再検討したところ、臨床症状の相違は遺伝子多型もしくは遺伝子発現レベルにあると考えられた。このように、同じ遺伝子変異でも臨床症状が大きく異なることもあることを示し、注意深い遺伝子解析の必要性を明らかにした。

共同研究者

中村裕之 北海道大学大学院医学研究科・
皮膚粘膜病学分野
澤村大輔 北海道大学大学院医学研究科・
皮膚粘膜病学分野 助教授

A. 研究目的

DDEBは、臨床的に皮膚が脆弱で、物理的刺激により容易に水疱を生じるほか、癬痕・稗粒腫の形成及び爪甲萎縮を伴う。遺伝子解析研究では、VII型コラーゲン分子を構成するポリペプチド内でグリシンが他のアミノ酸に変換されることにより生じることがわかっている。しかし、最近ではこのグリシン置換と他の何らかの要因の共存が臨床症状に反映されていることを示唆する報告が見られる。すなわち、DDEBの詳細な病態把握の基礎データとして遺伝子解析は必要不可欠な手法であり、臨床症状と遺伝子変異の相関を把握する上でもデータの蓄積は欠かせない。特に今後、出生前診断を含めた遺伝子カウンセリングを行う上ではCOL7A1遺伝子の変異検索が必須であるため本研究を施行した。

B. 研究方法

対象者から採取した末梢血単核球からgenomic DNAを抽出し、それらを用いてダイレクトシーケンス法を行い、COL7A1遺伝子に関する変異検索を施行した。

C. 研究結果

臨床症状：

家系1；発端者は生直後から足趾の爪甲萎縮が著明であったが、水疱形成はほとんど認められなかった（図1）。発端者の家系を構成する者のうち約半数に同様の症状を認めた。

家系2；発端者は生直後から四肢末端部を中心に水疱の出没を反復し、後に癬痕、稗粒腫及び爪甲萎縮を伴うようになった（図2）。同家系の他の者には臨床症状を認めなかった。

家系3；発端者は前頸骨部を中心に非常に強い痒みを伴う痒疹様丘疹もしくは結節稗粒腫を認め、爪甲萎縮を伴っていた（図3）。

遺伝子検索：家系1で臨床症状を認めた

者全員において、エクソン73の6082番目のGがAに変異したために生じるミスセンス変異G2028R（グリシン置換）が見出された（図4）。しかし、その他のエクソン、イントロン、及びプロモーター領域において有意な遺伝子変異は見出されず、また臨床症状を認めなかったものにはG2028Rは見出されなかった。家系2及び家系3の発端者においても同様の結果を得た。

D. 考察

今回、同じ遺伝子変異にも関わらず、臨床症状が全く異なるDDEBの3家系について検討した。通常、DDEBはその病因蛋白であるVII型コラーゲンをコードするCOL7A1遺伝子におけるグリシン置換によって生じるとされている。最近ではグリシン置換があっても臨床症状を認めないことがあること、グリシン置換と他のミスセンス変異もしくはノンセンス変異との共存で臨床症状に違いのあること、及び同じグリシン置換でも複数例の報告があることなどが指摘されている。すなわち、グリシン置換以外の何らかの要因によって臨床症状に差異を生じることが考えられる。これまでにグリシン置換変異を認めたDDEBにおいて、複数例報告されているものもあるが、通常、臨床症状の相違は明らかではない。本研究の対象である3家系では、臨床症状の相違が顕著でありながら遺伝子変異は同じグリシン置換であった。その他の遺伝子領域に関する検索の結果、COL7A1遺伝子のイントロン領域における遺伝子多型もしくは遺伝子発現レベルでの相違が関連しているものと考えられた。

E. 結論

今後、DDEBの遺伝子診断において、同じ遺伝子変異でも臨床症状が大きく異なることがあることも考慮に入れる必要があると考えられる。DDEBの診療を行う上でCOL7A1遺伝子解析は重要かつ必須で

ある。

F. 健康危険情報

優性栄養障害型表皮水疱症は多彩な臨床症状を呈し、遺伝子変異との相関が不明瞭な部分もあるので、出生前診断を含めた遺伝子カウンセリングの際には十分な注意が必要である。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Yasukawa K, Sawamura D, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu H: Dominant and recessive compound heterozygous mutations in Epidermolysis Bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly. *J Biol Chem* 277: 23670-23674, 2002
2. Sawamura D, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Epidermolysis bullosa: directions for future research and new challenges for treatment. *Arch Dermatol Res*, in press.
3. Kawasaki H, Sawamura D, Iwao F, Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, Shimizu H: Squamous cell carcinoma developed in a 12-year-old boy with non-Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, in press.
4. Akiyama M, Takizawa Y, Sawamura D, Matsuo I, Shimizu H: Disruption of suprabasal keratin network by mutation M150T in the helix initiation motif of keratin 10 does not affect cornified cell envelope formation in human

- epidermis. *Exp Dermatol*, in press.
5. Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Kon A, Akiyama M, Shimizu H: Identification of COL7A1 alternative splicing inserting 9 amino acid residues into the fibronectin type III linker domain. *J Invest Dermatol*, in press.
 6. Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: A novel paternal four base pairs insertion and a maternal nonsense point mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Dermato-Venereol*, in press.
 7. Tomita Y, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Matsumura T, Shimizu H: The simultaneous occurrence of three independent squamous cell carcinomas in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. *Acta Dermato-Venereol*, in press.
 8. Yasukawa K, Sato-Matsumura KC, Mcmillan JR, Tsuchiya K, Shimizu H: Exclusion of COL7A1 mutation in Kindler syndrome. *J Am Acad Dermatol* 46: 447-450, 2002
 9. Sato-Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, Shimizu H: Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in 2 families with dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 138: 269-271, 2002
2. 学会発表
- 中村裕之、澤村大輔、ラドゥカ ジェフ、リー ジェイ・ユ・ユン、増永拓司、清水宏. COL7A1 遺伝子に同じ G2028R 変異を有する優性栄養障害型表皮水疱症の臨床重症度は家系により大きく異なる. 日本研究皮膚科学会第27回年次学術大会・総会; 2002
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

図とその説明

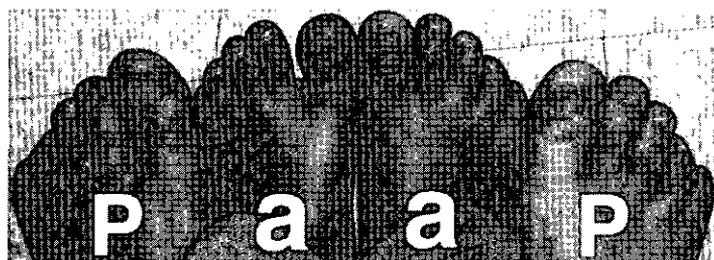


図1 家系1の臨床像。発端者(P)と第1子(a)に足趾の爪甲萎縮を認める。水疱、癬痕、及び稗粒腫などは認めない。

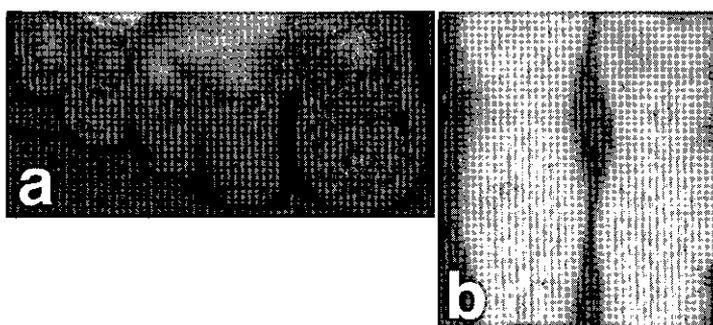


図2 家系2の臨床像。足趾の爪甲萎縮を認め(a)、水疱、癬痕、及び稗粒腫などを認める(b)。

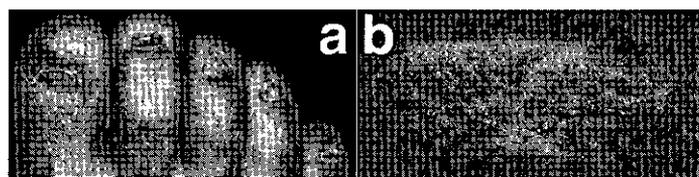


図3 家系3の臨床像。足趾の爪甲萎縮を認め(a)、前頸骨部に痒疹様結節を多数認める(b)。

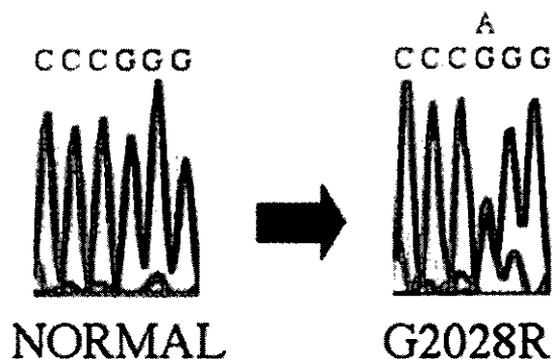


図4 遺伝子変異検索結果。エクソン73の6082番目のGがAに変異して生じたミスセンス変異G2028R（グリシン置換）。罹患者すべてに認められ、他に有意な変異は認められなかった。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Hallopeau-Siemens型栄養障害性表皮水疱症の遺伝子解析
— 4塩基挿入置換とナンセンス点変異 compound heterozygote の新規検証—

分担研究者 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

研究要旨 表皮水疱症のなかでも最重症型である Hallopeau-Siemens 型栄養障害性表皮水疱症（HS-RDEB）の COL7A1 遺伝子検索を行った。その結果、新規 4塩基挿入変異 434insGCAT ならびに新規ナンセンス点変異 R2261X を見いだした。本症例は、生直後から難治性のびらんが全身に繰り返し出現し、爪が生後数ヶ月で脱落し、臨床的に最重症型であった。本症例の 4塩基挿入変異は、COL7A1 の翻訳開始部位に近い変異であり、臨床重症度に対応している。COL7A1 への複数塩基の挿入は希であり、日本人の 4塩基挿入変異は、本症例が初めての報告である。変異と臨床症状の相関を示し、さらに HS-RDEB で複数塩基対の挿入変異も念頭において解析する必要性を明らかにした。

共同研究者

澤村大輔 北海道大学大学院医学研究科・
皮膚粘膜病学分野・助教授
松村和子 北海道大学医学部附属病院・
皮膚科・助手

A. 研究目的

HS-RDEB は、Ⅶ型コラーゲンの genetic な変異で引き起こされる栄養障害型表皮水疱症のなかでも最重症型である。皮膚が脆弱で、物理的的刺激により次々と容易に水疱を生じるほか、四肢の拘縮や食道の狭窄、さらには10代で扁平上皮癌を発症するなど、極めて予後不良な疾患である。病態の把握、予後の推測の基礎データとして遺伝子解析は欠かせない。特に栄養障害型表皮水疱症 COL7A1 は、変異の種類、部位ともに多くにわたるため、詳細な検索の後、初めて明らかにされる。特に小児では、病型診断が難しく、免疫組織学的なアンチゲンマッピングと COL7A1 の変異検索が必須であるため本研究を施行した

B. 研究方法

皮膚凍結標本を用いて基底膜関連のモノ

クローナル抗体 S1193 (BPAG1), HDD20 (BPAG2), GoH3 (alpha 6 integrin), 3E1 (beta 4 integrin), 121 (plectin), 19DEJ1 (uncein), GB3 (laminin 5), LH7.2 (type VII collagen) の免疫組織学検索を行った。ならびに末梢血単核球から抽出した genomic DNA を用いて COL7A1 変異検索をダイレクトシーケンス法を用いて施行した。
(倫理面への配慮)

本研究は、インフォーム・ド・コンセントに基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面による個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、そのことで何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

C. 研究結果

臨床症状：生下時から全身に水疱が生じ、