

20020797 A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

表皮自然免疫機構の解明とその

皮膚アレルギー治療への応用

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐山 浩二

平成 15(2003)年 4 月

# 目 次

## I 総括研究報告

表皮自然免疫機構の解明とその皮膚アレルギー治療への応用	-----1
佐山浩二	

## II 分担研究報告

1. ストレスによる ASK1 の活性化機構の解明	-----6
一條秀憲	
2. ヒト上皮細胞の産生する抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する 効果についての検討	-----9
菅井基行	
3. 重層化表皮の作成とアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入	
橋本公二	-----12

III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----15
--------------------	---------

IV 研究成果の刊行物・別冊	-----20
----------------	---------

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
総括研究報告書

表皮自然免疫機構の解明とその皮膚アレルギー治療への応用

主任研究者 佐山 浩二 愛媛大学医学部 助教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎は Th2 優位の疾患であるが、本研究において、ASK1 が Th1 細胞に対するケモカインである MIP1  $\alpha$ ,  $\beta$  の産生を制御しており、Th1/2 バランスの制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、ストレスによる ASK1 の活性化には、Thr845 のリン酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、ASK1 により表皮角化細胞から誘導される抗菌ペプチドは、MRSA に対して、抗生剤との相乗作用を有し、従来型の化学療法を相補する薬剤となりうることを明らかにした。

分担研究者

一條秀憲・東京大学大学院薬学系  
研究科・教授  
菅井基行・広島大学大学院医歯薬  
総合研究科・教授  
橋本公二・愛媛大学医学部・教授

A. 研究目的

表皮角化細胞は分化することにより、多層構造をもつ表皮を形成する。分化機構は、構造的な分化を制御すると同時に自然免疫をも制御していると考えられる。アトピー性皮膚炎を代表とする皮膚アレルギー疾患の研究はリンパ球を中心とした免疫学的研究が中心であったが、分化異常があると考えられるアトピー性皮膚炎の病態のなかで、表皮角化細胞の免疫機能への関与はあまり検討されることはなかった。しかし、我々は炎症の場そのものである表皮角化細胞の分化機構が免疫機構に関わっていることをすでに明らかにしてきており、アトピー性皮膚炎では分化異常があることから、免疫異常と分化異常との関連を明らかにし、分化異常に基づく新たな治療方法を開発する必要がある。そこで、アトピー性皮膚炎における局所免疫異常に ASK1 が関わっている

かどうか検討し、これに基づき新たなアトピー性皮膚炎の治療薬開発を目指すことを目的とする。表皮角化細胞は種々のサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子を産生し、アトピー性皮膚炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、その作用機序については十分に解明されておらず、アトピー性皮膚炎の表皮で分化異常が見られることから、表皮の分化機構が何らかの形で関連しているのではないかと想定されているにすぎなかった。MAPKKK ファミリーに属する ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) は表皮細胞内の重要な分化誘導因子であるが、我々はすでに、ASK1 を中心とした表皮の分化機構が皮膚における MIP3- $\alpha$ 、 $\beta$ -defensin の産生を制御し、獲得免疫、自然免疫の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。すなわち、従来別個と考えられてきた表皮のバリア形成と免疫機能（自然・獲得）の獲得は、いずれも同じ分化機構が制御することが明らかとなった。アトピー性皮膚炎では表皮バリア障害が見られるが、その原因になっている表皮細胞の分化制御機構の異常が、表皮におけるアレルギー炎症の発

症にも関与する可能性がある。

注目すべき事に ASK1 が  $\beta$ -defensin の産生を制御することを我々は明らかにしており、従来不明であったアトピー性皮膚炎の皮膚における細菌の増殖機構すなわち皮膚の自然免疫機構の解明につながる。表皮細胞が産生する抗菌ペプチド  $\beta$ -defensin の産生も ASK1 が制御することより、アトピー性皮膚炎の細菌感染にも関与している可能性がある。さらに、アトピー性皮膚炎は Th2 優位のアレルギー疾患として知られているが、その研究の中心はリンパ球を中心とする免疫系であり、表皮角化細胞の関与はほとんど検討されていない。

そのために、1) ASK1、抗菌ペプチドの皮膚での発現、2) 角化細胞からの Th2 細胞に対するケモカインの産生に ASK1 が関わっているかどうか 3) ASK1 の活性化機構の解明 4) 抗菌ペプチドの作用機序、以上の4点を明らかにする。以上の如く、本研究は従来の皮膚アレルギー研究に、角化細胞の視点から新たに取り組むものである。研究体制については、ASK1 の基礎的研究は東京大学、一條が、 $\beta$ -defensin の基礎的研究は広島大学、菅井が、重層化表皮角化細胞の培養は愛媛大学、橋本が、角化細胞からのケモカイン産生および、アトピー性皮膚炎患者表皮での、ASK1、 $\beta$ -defensin の発現は佐山が担当し、佐山がこれらの研究を統括する。本研究により、アトピー性皮膚炎におけるアレルギー炎症発症機序および細菌感染機序の解明が可能となり、ASK1 に対するアゴニスト、アンタゴニストの開発により、これらを用いた新たなアトピー性皮膚炎の治療薬が開発可能となり、アトピー性皮膚炎患者にとって朗報となる。

## B. 研究方法

1) 愛媛大学、橋本は分化・重層化した角化細胞への遺伝子導入法を検討する。そのた

め、まず気相下培養法を用いて重層化角化細胞の培養法を確立する。また Cre/loxP システムを用いた、アデノウイルスベクターの作成法、293 細胞を用いた大量培養法を確立する。さらに、重層化角化細胞への遺伝子導入法を確立する。

3) 東京医科歯科大学、一條は Thr843, Thr845, Thr847, Thr849 を Alanine に置換した ASK1 の変異体を作成し、細胞に導入し細胞内における ASK1 の活性化機構を解明する。ASK1 の活性は IVK にて測定する。

2) 愛媛大学、佐山はアトピー性皮膚炎患者病変部における ASK1 および、抗菌ペプチドの発現を検討するために、患者より得た病変部皮膚を免疫組織染色する。さらに、角化細胞からの Th1 細胞に対するケモカインの産生を ASK1 が制御しているかどうか検討するために、活性型の ASK1 を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、角化細胞で ASK1 を発現させ、ケモカインの産生を ribonuclease protection assay 法、Western blot 法、ELISA 法にて検討する。

4) 広島大学、菅井は hBD-1、2、3 および CAP18 の合成ペプチドを作製し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を検討した。電子顕微鏡による細菌の超微細形態の観察、種々の抗菌ペプチドの併用効果の検討、 $\beta$ -ラクタム剤併用による抗菌効果の検討を行った。

## C. 結果

平成 14 年度の研究によって得られた結果は以下のごとくである。

1) まず、角化細胞を効率よく分化・重層化させ培養する方法を確立した。つぎに三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。まず、コラーゲンゲル上に角化細胞を播種する直前にアデノウイルスベクターを感染させ空気暴露により重層化させたところ、EGFP の発現は角層に局限し、基底細胞

での発現はほとんど認められなかった。そこで、重層化後7日目の角層が完成した後、一時的に表皮と真皮を剥離し、直接アデノウイルスベクターを感染させたところ、EGFPは基底層と傍基底層に強く発現していた。Cre/loxP系アデノウイルスベクターを用いた重層化角化細胞への遺伝子導入法は、ASK1の発現、角化細胞の分化モデルシステムとして最適であると考えられる(橋本公二)。

2) ASK1の変異体を用いてASK1の活性化機構を調べた。IVKでASK1の活性を測定したところ、Thr843, Thr845, Thr847, Thr849すべてを置換したASK1変異体では、活性は見られなくなった。さらに、Thr845あるいはThr849のみを置換した変異体でもASK1の活性は見られなくなったが、Thr847あるいはThr843を置換した変異体では、活性の低下は認められなかった。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞ストレスにより、ASK1のThr845のリン酸化が起こり、IVKにより測定したASK1の活性と平行していた(一條秀憲)。

3) 表皮における、ASK1および抗菌ペプチドの発現を検討した。正常ヒト表皮では、表皮上層でASK1の発現が見られたが、アトピー性皮膚炎患者の病変部表皮では、表皮上層での発現が低下していた。さらに、アトピー性皮膚炎患者の病変部表皮では、 $\beta$  defensin 1-3、およびCRAMPの表皮上層での発現が低下していた(佐山浩二)。

4) ASK1による角化細胞からの、Th1細胞に対するケモカイン産生の検討。アデノウイルスベクターを用いた角化細胞への活性化型ASK1遺伝子導入により、12時間で、MIP1 $\alpha$ 、MIP1 $\beta$ mRNAの著しい発現が認められた。また、ELISA法でもタンパクの産生が確認できた。(佐山浩二)。

5) 抗菌ペプチドを黄色ブドウ球菌に作用させ電顕的に観察した。細胞壁にランダムに穿孔を生じ細胞質内容物の漏出が認められた。しかし、抗菌ペプチドの種類により惹

起される形態変化に大きな違いは認められなかった(菅井基行)。

6) 黄色ブドウ球菌に対する抗菌ペプチドの作用機序を検討した。異なる $\beta$ -ディフェンシン間の併用では相乗的効果のみ認められたが、 $\beta$ -ディフェンシンとCAP18を併用することで相乗的効果が認められた。メチシリンを作用させ3時間培養した菌は未処理菌に比べ、すべての抗菌ペプチドに対して感受性が上昇した。MRSAを含む臨床分離株15株について同様の方法で検討した結果、その効果に株間で差は認められるものの全ての株についてsub-MICのメチシリン処理により感受性が上昇した(菅井基行)。

#### D. 考察

表皮の分化異常はアトピー性皮膚炎の病態の中で非常に重要な役割を果たしていると考えられる。アトピー性皮膚炎と表皮バリア機能の異常については、表皮バリア機能の異常に伴い、サイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子の産生が増強し、さらに、小さなバリア障害が持続することにより、IL-1とTNF- $\alpha$ の増加を伴った表皮肥厚が起きることがアトピー性皮膚炎の病態に関係すると報告されている。しかし、これらの研究は主としてサイトカイン、ケモカインの増加といった現象観察に終わっており、その産生機構、特に表皮の分化と関連づけた表皮細胞内シグナル伝達機構に関してはほとんど研究されていない。その理由として、表皮角化細胞内における分化誘導機構に関しては、PKCの関与が報告されているのみで、詳細が不明であったためと考えられる。

ASK1は分担研究者である一條がapoptosisを誘導するkinaseとして発見・同定したMAPKKKであり、さまざまなストレス、TNF- $\alpha$ 、IL-1などにより活性化される。我々はASK1が生理学的な条件下では表皮細胞の分

化誘導因子として作用するのではないかと考え、アデノウイルスベクターを用いてヒト培養表皮細胞へASK1を遺伝子導入し、ASK1が表皮角化細胞の分化を誘導することを明らかにした。また、我々は、MIP-3 $\alpha$ 産生が分化した表皮細胞で高い産生能を持つことから、ASK1との関連を検討したところ、ASK1がMIP-3 $\alpha$ の強力な産生誘導能をもつことを明らかにした。一方、MIP-3 $\alpha$ と同様に、ASK1が $\beta$ -defensin 1-3の強力な産生誘導能をもつことも明らかにした。さらに、細菌感染によるアトピー性皮膚炎増悪の最も多い原因菌である黄色ブドウ球菌に対する抗菌機序を合成抗菌ペプチドを用いて明らかにしてきた。

そこで、アトピー性皮膚炎における分化異常には、ASK1の発現低下が関与しているのではないかと考え、病変部の皮膚で免疫染色を行ったところ、表皮上層での発現が低下していた。すなわち、アトピー性皮膚炎における分化異常にはASK1の発現低下が関与している可能性が考えられる。さらに、抗菌ペプチドも表皮上層での発現が低下しており、アトピー性皮膚炎患者の病変部皮膚における易感染性は抗菌ペプチドの減少が原因である可能性がある。ASK1は抗菌ペプチドの産生を制御することから、ASK1の発現低下により抗菌ペプチドの産生が低下し、易感染性を来している可能性が考えられる。さらに、アトピー性皮膚炎はTh2優位の疾患として知られているが、角化細胞はASK1による分化誘導に伴い、Th1に対するケモカインであるMIP1 $\alpha$ 、MIP1 $\beta$ を産生することが明らかになったことから、皮膚ではTh1/Th2バランスは表皮の分化により制御されている可能性が示唆された。

これまでに抗菌ペプチド単独での黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果について報告してきたが、本研究では抗菌ペプチド間およびメチシリンとの併用による相乗効果が認

められた。すなわち、これらの抗菌ペプチドが従来型の化学療法を相補する薬剤となりうることが示された。

ASK1の活性化に関しては、Thr845のリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、ケモカイン、デフェンシンの産生においても、ASK1のThr845のリン酸化が重要な役割を果たしている可能性がある。この機構を明らかにすれば、角化細胞からのケモカイン、デフェンシンの産生を制御できる可能性があり、治療薬開発につながる可能性が示唆された。

#### E. 結論

我々はASK1が表皮細胞内における重要な分化誘導因子であり、さらに獲得免疫、自然免疫をも制御する可能性を明らかにしてきたが、本研究においては、アトピー性皮膚炎患者における易感染性および、Th2優位の原因として、病変部表皮におけるASK1の発現低下の可能性が考えられることを明らかにした。ASK1の活性化機構は一條が明らかにしてきており、ASK1の活性制御により、アトピー性皮膚炎の治療につながる可能性が考えられる。また、抗菌ペプチドが従来型の化学療法を相補する薬剤となりうることが菅井により示されており、ASK1に加えて抗菌ペプチドも治療薬として用いることができる可能性があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, **Sayama K**, Hanada T, Yoshimura A, Hashimoto K: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, (in press)
2. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, **Sayama K**, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto

- K: Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth. *J Invest Dermatol*, (in press)
3. Tsuda T, Thoyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, **Sayama K**, Hashimoto K: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. *J Dermatol Sci* (in press)
  4. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, **Sayama K**, Murakami S, Hashimoto K: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. *J Dermatol* (in press)
  5. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitu M, Ishida Y, Shirakata Y, **Sayama K**, Hashimoto K, Yasukawa M. Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. *J Immunol*. 2003;170(4):2205-13.
  6. Li M, **Sayama K**, Tohyama M, Hashimoto K. A case of cold-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol*. 2002;147(2):368-70
  7. **Sayama K**, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *J Biol Chem* 277:40390-40396, 2002
  8. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, **Sayama K**, Hashimoto K: Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. *J Invest Dermatol* 119:1231-6, 2002
2. 学会発表
    1. **K Sayama**, K Yamasaki, Y Shirakata, S Dedhar and K Hashimoto. Integrin-linked kinase is the key regulator of early-phase keratinocyte differentiation in collaboration with PI3 kinase. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
    2. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, **Sayama K**, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
    3. K. Midorikawa, H. Komatsuzawa, **K. Sayama**, K. Yamasaki, M. Sugai, and K. Hashimoto. Direct contact of *S. aureus* with keratinocytes triggers the production of beta-defensins and CAP18 – an innate defense against bacterial infection of the skin–63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
    4. Dai XiuJu, K Yamasaki, Y Shirakata, **K Sayama**, K Hashimoto. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D3 on the expression of cell cycle-regulating genes in keratinocytes. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
    5. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, **Sayama K**, Hashimoto K: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological Research September 19, 2002, Geneva, Switzerland
  - H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

ストレスによる ASK1 の活性化機構の解明

分担研究者 一條秀憲 東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究要旨

多くの kinase の活性化において、活性化領域のリン酸化は共通した活性化制御機構であるが、ASK1 の詳細な活性化機構は明らかでない。ASK1 変異変異体を用いて ASK1 の活性化機構を検討した。Thr845 あるいは Thr849 が重要な役割を果たしているが、Thr847 あるいは Thr843 は ASK1 の活性化には直接は関与していないと考えられる。さらに、ストレスによる ASK1 の活性化には、Thr845 のリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

皮膚における局所免疫には、角化細胞からの MIP3  $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 産生が重要な役割を果たしている。角化細胞からのケモカイン、デフェンシンの産生を ASK1 が制御していることは愛媛大学、佐山がすでに明らかにしているが、ASK1 の詳細な活性化機構は明らかでない。多くの kinase の活性化において、活性化領域のリン酸化は共通した活性化制御機構である。MAP kinase kinase kinase である ASK1 の活性化領域には、進化的に保存された特徴的な Thr 残基の領域がある。この領域には4個の Thr 残基が存在しているが、どの Thr 残基のリン酸化が ASK1 の活性化にとって重要であるかは明らかになっていない。そこで、ASK1 の変異体を用いて、どの Thr 残基がストレスによる ASK1 の活性化に重要であるか明らかにする。

B. 研究方法

1) ASK1 変異体の作成

Thr843, Thr845, Thr847, Thr849 を Alanine に置換した ASK1 の変異体を作成し、Hemagglutinin (HA) をタグとして使用した。

0.1-1  $\mu\text{g}/\text{well}$  のプラスミドを Tfx-50 を用いて細胞に導入した。

2) In vitro immune complex kinase assay (IVK)

細胞を lysis buffer (20 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% triton X-100, 1% deoxycholate, 12 mM  $\beta$  glycerophosphate, 10 mM NaF, 1mM sodium orthovanadate, 3 mM DTT, 1mM PMSE, 1.5% aprotinin) で回収し、抗 ASK1 抗体で免疫沈降する。免疫複合体を、GST-MKIK6KD および [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP と反応させる。反応を sample buffer にて停止後、SDS-PAGE を行い、BAS imaging plate に露光した。ASK1 の活性は、リン酸化 GST-MKK6KD として得られた。

3) JNK, p38 MAPK のリン酸化

細胞を  $\text{H}_2\text{O}_2$  で刺激し、lysis buffer (50 mM, Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM PMSE, 150 units/ml) で回収し、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いて、Western blot を行った。Blot は ECL 法で発色し、シグナルを定量化した。

C. 結果

IVK で ASK1 の活性を測定したところ、



Thr843, Thr845, Thr847, Thr849 すべてを置換した ASK1 変異体では、活性は見られなくなった。さらに、Thr845 あるいは Thr849 のみを置換した変異体でも ASK1 の活性は見られなくなったが、Thr847 あるいは Thr843 を置換した変異体では、活性の低下は認められなかった。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞ストレスにより、ASK1 の Thr845 のリン酸化が起こり、IVK により測定した ASK1 の活性と平行していた。

#### D. 考察

ASK1 の活性には、Thr845 あるいは Thr849 が重要な役割を果たしているが、Thr847 あるいは Thr843 は ASK1 の活性には直接は関与していないと考えられる。さらに、ストレスによる ASK1 の活性化には、Thr845 のリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、ケモカイン、デフェンシンの産生においても、ASK1 の Thr845 のリン酸化が重要な役割を果たしている可能性がある。この機構を明らかにすれば、角化細胞からのケモカイン、デフェンシンの産生を制御できる可能性が示唆された。

#### E. 結論

Thr リン酸化による ASK1 活性化制御機構が明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. and Ichijo, H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid. Redox Signal*, 4, 415-425 (2002).

2. Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell. Physiol.*, 191, 95-104 (2002).

3. Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.*, 16, 1345-1355 (2002).

4. Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. and Miura, M. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. *Nat. Cell Biol.*, 4, 705-710 (2002).

5. Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K. and Ichijo, H. Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway: a new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J. Biol. Chem.*, 277, 40703-40709 (2002).

6. Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A. and Ichijo, H. Phosphorylation and Inactivation of Mcl-1 by c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 277, 43730-43734 (2002).

7. Takeda, K. and Ichijo, H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. (review) *Genes Cells*, 7, 1099-1111 (2002).

8. Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaize, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Ichijo, H. and Guguen-Guillouzo, C. Liver protection from apoptosis

requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation.

*J. Biol. Chem.*, 277, 49220-49229 (2002).

9. Jibiki, I., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., **Ichijo, H.**, and Horie, T. Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates nitric oxide-induced activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells.

*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167, 856-861 (2002).

10. Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., **Ichijo, H.**, Saeki, K., Isemura, M., Yuo, A. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis.

*Biochem. J.*, 368, 705-720 (2002).

## 2. 学会発表

1. Ichijo, H.: Regulation of stress-induced cell death by the ASK1-MAP kinase cascade. The 11th Cancer Research Institute Cancer Symposium "Novel Molecular Targets for Cancer Therapy", April 26-27, 2002, Seoul.

2. Ichijo, H., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K.: Stress-induced apoptosis by the ASK1-MAP kinase cascade. First International Cell

Death and Differentiation Conference "Apoptosis in Cancer and Conference", October 6-10, 2002, Capri, Italy.

3. Ichijo, H.: Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate immunity. Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4)", January 30-February 4, 2003, Keystone, Taos, U.S.A..

4. Saegusa, K., Matsuzawa, A., Ichijo, H., Takeda, K., Nishitoh, H.: Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate immunity. Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4)", January 30-February 4, 2003, Keystone, Taos, U.S.A..

5. Nishitoh, H., Kadowaki, H. and Ichijo, H.: Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1. Keystone Symposia "Conformational Diseases of the Secretory Pathway", March 1-6, 2003, Keystone, Taos, U.S.A..

6. Takamatsu, H., Ohtuska, M., Akazawa, H., Ichijo, H., Komuro, I. and Adachi-Akahane, S.: Enhanced SR  $Ca^{2+}$  content in  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger (+/-) mouse heart. The 47th Biophysical Society Annual Meeting, March 1-5, 2003, San Antonio, Texas, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

ヒト上皮細胞の産生する抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する  
効果についての検討

分担研究者 菅井基行 広島大学大学院医歯薬総合研究科・教授

研究要旨

抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する相乗作用を検討したところ、 $\beta$ -ディフェンシンと CAP18 を併用することで相乗効果が認められた。さらに、メチシリン処理により MRSA を含む臨床分離株 15 株ですべての抗菌ペプチドに対して感受性が上昇した。抗菌ペプチド間およびメチシリンとの併用による相乗効果が認められたことで、これらの抗菌ペプチドが従来型の化学療法を相補する薬剤となりうることが示された。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚に疾患を起こす代表的な菌の一つであり、アレルギー性皮膚炎等の際に感染し遷延化、増悪化することが知られている。また黄色ブドウ球菌は皮膚疾患だけでなく、他の化膿性疾患、食中毒、腸炎および毒素性ショック症候群等の原因菌である。黄色ブドウ球菌の感染症治療は $\beta$ -ラクタム剤等の化学療法剤が用いられるが、近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の出現により治療に難渋するケースが増え、私どもも伝染性膿痂疹をおこす黄色ブドウ球菌における MRSA の比率の増加を確認している。また最近では MRSA 感染症に有効とされるグリコペプチド系の薬剤に耐性を示す菌の出現も報告されている。私どもはヒトの産生する抗菌ペプチドに着目し、特に上皮系の菌が産生する $\beta$ -ディフェンシン（hBD1, hBD2, hBD3）および CAP18 の合成ペプチドを用いて黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果および黄色ブドウ球菌接触時のヒトケラチノサイトの抗菌ペプチド産生性について検討してきた。本研究ではさらにこれらの抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する効果につ

いて検討した。

B. 方法

- 1) 電子顕微鏡による観察：黄色ブドウ球菌に種々の合成ペプチドを作用させた後、透過型電子顕微鏡による超微細形態観察を行った。
- 2) 種々の抗菌ペプチドの併用効果の検討：4種類の抗菌ペプチド（hBD1, hBD2, hBD3, CAP18）を併用しその抗菌効果について単独時の効果と比較検討した。抗菌効果の検討には種々の濃度の合成ペプチドを加えた 10mM リン酸緩衝液の中で黄色ブドウ球菌を 2 時間作用後、寒天培地にまき、コロニー数をカウントした。
- 3)  $\beta$ -ラクタム剤併用による抗菌効果の検討：sub-MIC のメチシリンを添加培養した菌と未処理菌の抗菌ペプチドの抗菌力を測定した。

C. 結果

- 1) 抗菌ペプチドを黄色ブドウ球菌に作用させると、細胞壁にランダムに穿孔を生じ細胞質内容物の漏出が認められた。しかし、抗菌ペプチドの種類により惹起される形態

変化に大きな違いは認められなかった。

2) 異なるβ-ディフェンシン間の併用では相加的効果のみ認められたが、β-ディフェンシンとCAP18を併用することで相乗的効果が認められた。

3) メチシリンを作用させ3時間培養した菌は未処理菌に比べ、すべての抗菌ペプチドに対して感受性が上昇した。MRSAを含む臨床分離株15株について同様の方法で検討した結果、その効果に株間で差は認められるものの全ての株についてsub-MICのメチシリン処理により感受性が上昇した。

#### D. 考察

これまでにそれぞれの抗菌ペプチド単独での黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果について報告してきたが、本研究で抗菌ペプチド間およびメチシリンとの併用による相乗効果が認められたことで、これらの抗菌ペプチドが従来型の化学療法を相補する薬剤となりうることが示された。電子顕微鏡による観察で細胞壁での穿孔が認められたことから、メチシリンとの併用効果はメチシリンで細胞壁が脆弱化し抗菌ペプチドにより細胞壁の穿孔が生じやすくなったことによることが考えられた。

#### E. 結論

抗菌ペプチドの抗菌機序は細胞壁に穿孔を生じ細胞質内容物の漏出によるものであることが示された。また、抗菌ペプチドは黄色ブドウ球菌に対してβ-ラクタム剤との併用効果が認められた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: Takahashi J, Komatsuzawa H, Yamada S, Nishida

T, Labischinski H, Fujiwara T, Ohara M, Yamagishi J, Sugai M. Molecular characterization of an atl null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol*. 2002;46(9):601-12.

2: Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun*. 2002 Oct;70(10):5835-45.

3: Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, Ohara M, Kurihara H, Sugai M. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene*. 2002 Apr 17;288(1-2):195-201.

4: Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, Hayashi T, Aepfelbacher M, Ohara M, Komatsuzawa H, Watanabe H, Sugai M. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *J Infect Dis*. 2002 May 15;185(10):1511-6.

5: Komatsuzawa H, Ohta K, Yamada S, Ehler K, Labischinski H, Kajimura J, Fujiwara T, Sugai M. Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jan;46(1):75-81. PMID: 11751114 [PubMed - indexed for MEDLINE]

6: Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, Stanley JR. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest*. 2002 Jul;110(1):53-60.

7: Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, Stanley JR. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *J Invest Dermatol*. 2002 May;118(5):845-50.

## 2. 学会発表

1. ヒト上皮細胞が産生する抗菌ペプチドの *S. aureus* に対する抗菌活性および発現様式. 應原一久、小松澤均、栗原英見、菅井基行. 第75回日本細菌学会総会、2002年4月(横浜)
2. MRSA のβ-ラクタム剤耐性度に影響を及ぼす因子 *fntC* について. 小松澤均、西裕美、藤原環、石川武憲、菅井基行. 第75回日本細菌学会総会、2002年4月(横浜)
3. ヒト抗菌ペプチドの歯周病原菌に対する抗菌力について. 應原一久、小松澤均、内田雄士、柴秀樹、栗原英見、菅井基行. 第45回日本歯周病学会、2002年4月(千葉)
4. ヒト上皮細胞が産生する抗菌ペプチドの *S. aureus* に対する抗菌活性について. 應原一久、菅井基行、小松澤均. 第50回日本化学療法学会総会、2002年5月(神戸)
5. Direct contact of *S. aureus* with keratinocytes triggers the production of β-defensins and CAP18 – an innate defense against bacterial infection of the skin – K. Midorikawa, H. Komatsuzawa, K. Sayama, K. Yamasaki, M. Sugai, and K. Hashimoto *Investigative Dermatology*, 2002, June (LA)
6. Molecular Mechanism for specific cleavage of Desmoglein 1 by Exfoliative toxins  
Y. Hanakawa, N. M. Schechter, C. Lin, L. Garza, H. Li, M. Sugai, T. Yamaguchi, Y. Fudaba, K. Nishifuji, M. Amagai, J. R. Stanley  
*Investigative Dermatology*, 2002, June (LA)
7. Exfoliative toxin B and Newly identified exfoliative toxin D both specifically target Desmoglein 1  
K. Nishifuji, T. Yamaguchi, Y. Fudaba, T. Nishikawa, M. Sugai, J. R. Stanley and M. Amagai  
*Investigative Dermatology*, 2002, June (LA)
8. 黄色ブドウ球菌が産生する新規表皮剥脱毒素 ETD.  
菅井基行、山口隆之、西藤公司、天谷雅行、札幌康之、片柳克夫、小原勝、小松澤均. 第49回毒素シンポジウム、2002年7月
9. 角化細胞の β-defensin と CAP18 の産生は黄色ブドウ球菌の接触により誘導. 緑川和重、小松澤均、佐山浩

二、山崎研志、菅井基行、橋本公二. 第27回研究皮膚科学会、2002年8月(京都)

10. ETD, a novel exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus*. M. Sugai, T. Yamaguchi, K. Nishifuji, Y. Fudaba, T. Takata, M. Ohara, H. Komatsuzawa, K. Katayanagi, M. Amagai. *Awaji International forum on Infection and Immunity*, 2002, August (Awaji)
  11. Influence of factors associated with cell wall synthesis on the methicillin and vancomycin resistances in *Staphylococcus aureus*.  
H. Komatsuzawa, T. Fujiwara and M. Sugai. *International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections*, 2002, October (Tsukuba)
  12. Recent developments in exfoliative toxin and its related diseases. M. Sugai. *International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections*, 2002, October (Tsukuba)
  13. ETD, a novel exfoliative toxin produced by *Staphylococcus aureus*. T. Yamaguchi, K. Nishifuji, M. Sasaki, Y. Fudaba, M. Aepfelbacher, T. Takata, M. Ohara, H. Komatsuzawa, M. Amagai and M. Sugai  
*International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections*, 2002, October (Tsukuba)
  14. ヒト上皮細胞が産生する抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する作用. 應原一久、小松澤均、栗原英見、菅井基行. 広島感染症研究会、2002年11月(広島)
  15. ヒト上皮細胞に対する *S. aureus* 接触時の抗菌ペプチドの mRNA 発現解析および抗菌ペプチド作用 *S. aureus* の超微形態観察. 應原一久、山田作夫、小松澤均、菅井基行. 第50回化学療法学会西日本総会、2002年12月(広島)
  16. 新しい表皮剥脱毒素ETDの結晶構造解析  
片柳克夫、山口隆之、菅井基行. 日本結晶学会平成14年度年会、2002年12月
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

重層化表皮の作成とアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入

分担研究者 橋本公二 愛媛大学 教授

研究要旨

表皮角化細胞を分化・重層化させる培養方法の確立のために、気相培養法を行い、重層化した表皮角化細胞の培養を行うことが可能となった。さらに、Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は重層化した角化細胞においても良好に作動することが明らかとなった。重層化した表皮角化細胞への Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、分化した表皮角化細胞における遺伝子発現のモデルシステムとして最適であると考えられる。

A. 研究目的

表皮角化細胞は分化することにより、多層構造をもつ表皮を形成する。分化機構は、構造的な分化を制御すると同時に自然免疫をも制御していると考えられ、分化・多層化した表皮角化細胞での遺伝子の機能を確認する必要がある。しかし、通常の培養方法では、単層の角化細胞しか培養することができず、遺伝子機能の解析は困難であった。そこで、この研究では表皮角化細胞を分化・重層化させる培養方法の確立と、Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の確立を目的とする。

B. 研究方法

1) 三次元培養皮膚の作製法：

Bell の方法に準じカルチャーインサート（コースター社）を用いて三次元培養皮膚を作成した。I 型コラーゲン溶液（セルマトリクスタイプ 1A：新田ゼラチン）：6 容量に対して 0.1N NaOH：1 容量、8 倍濃度 DMEM：1 容量、20%FCS/DMEM：10 容量の割合で中和コラーゲン液を作成し、インサートに 1 ml ずつ添加し、ゲル化させた。

予め培養しておいた対数増殖期の線維芽細胞をトリプシンで分散し、細胞懸濁液を調整し、線維芽細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整し、各インサートに 3.5ml ずつ添加しインキュベーター内でゲル化させた。ゲル化を確認した後 10%FCS/DMEM をゲルが浸る程度加え 5 日間静置培養した。培養開始後 5 日後にはゲル上部は収縮し直径 13-15mm 程度となり、この陥凹している上に角化細胞を播種し、角化細胞がゲルに密着するように 1.5-2.0 時間インキュベーター内で静置したのち、さらに 2-3 日間液相下で培養を続けた。引き続き空気にさらすことにより分化を誘導し（気相下培養）重層化させ、三次元培養皮膚を作成した。

2) アデノウイルスベクターの作製：

COS-TPC 法を用いてアデノウイルスベクターを作製した。Cre recombinase を組み込んだアデノウイルスベクター(AdexCre)と loxP 配列で挟まれた Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP)を組み込んだアデノウイルスベクター(AdexLNEGFP)をそれぞれ 293 細胞へ感染させ、大量に増殖させた

後、超音波処理、塩化セシウム密度勾配法にて精製・濃縮し PBS(-)に対して透析したものを使用した。濃縮ウイルス液の力価は  $1 \times 10^9$  PFU/ml であった。

### C. 結果

単層培養表皮角化細胞へ AdexCre, AdexLNEGFP を MOI=5+5, MOI=10+10 で感染させ、経時的に蛍光位相差顕微鏡にて観察した。6 時間後には EGFP の発現が認められ、角化細胞のほぼ 100%の細胞で EGFP の発現が認められた。EGFP の発現は時間経過とともに発現が増強し、24-36 時間でピークに達した。

つぎに三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。まず、コラーゲンゲル上に角化細胞を播種する直前にアデノウイルスベクターを感染させ空気暴露により重層化させたところ、EGFP の発現は角層に限局し、基底細胞での発現はほとんど認められなかった。そこで、重層化後 7 日目の角層が完成した後、一時的に表皮と真皮を剥離し、直接アデノウイルスベクターを感染させたところ、EGFP は基底層と傍基底層に強く発現していた。

### D. 考察

Bell の方法に準じた気相培養法で、重層化した表皮角化細胞の培養を行うことが可能となった。さらに、遺伝子の on/off システムとしての Cre/loxP アデノウイルスベクターは重層化した角化細胞においても良好に作動することが明かとなった。

### E. 結論

重層化した表皮角化細胞への Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、分化した表皮角化細胞における遺伝子発現のモデルシステムとして最適であると考えられる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, Hashimoto K: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, (in press)
2. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto K: Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth. *J Invest Dermatol*, (in press)
3. a K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *J Biol Chem*. 277:40390-40396, 2002
4. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation *J Invest Dermatol* 119: 1231-6, 2002
5. Tsuda T, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes *in vitro*. *J Dermatol Sci in press*
6. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T: BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 30:224-232 2002
7. Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T,

- Hanakawa Y, ○**Hashimoto K**, Tamaki K.: Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *J Invest Dermatol*. 2002;119(2):403-10.
8. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, ○**Hashimoto K**: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. *J Dermatol in press*
9. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, ○**Hashimoto K**: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation *Br J Dermatol in press*
10. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiyama S, Kosai K, Hanakawa Y, ○**Hashimoto K**, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001 108(12):1781-8
11. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, ○**Hashimoto K**: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. *J Dermatol in press*
12. Ii M, Sayama K, Tohyama M, ○**Hashimoto K**: A case of cold-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol*. 2002;147: 368-70.
2. Angeles, USA
2. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, **Sayama K**, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
3. K. Midorikawa, H. Komatsuzawa, **K. Savama**, K. Yamasaki, M. Sugai, and K. Hashimoto. Direct contact of *S. aureus* with keratinocytes triggers the production of beta-defensins and CAP18 – an innate defense against bacterial infection of the skin—63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
4. Dai XiuJu, K Yamasaki, Y Shirakata, **K Savama**, K Hashimoto. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D3 on the expression of cell cycle-regulating genes in keratinocytes. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
5. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, **Sayama K**, Hashimoto K: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological Research September 19, 2002, Geneva, Switzerland

H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 学会発表

1. **K Savama**, K Yamasaki, Y Shirakata, S Dedhar and K Hashimoto. Integrin-linked kinase is the key regulator of early-phase keratinocyte differentiation in collaboration with PI3 kinase. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, <b>Hashimoto K</b>	SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes.	<i>J Invest Dermatol</i>	in press		2002
Yamasaki K, Torii N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, <b>Hashimoto K</b>	Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth.	<i>J Invest Dermatol</i>	in press		2002
K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, <b>Hashimoto K</b>	Phosphatidyl inositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes	<i>J Biol Chem.</i>	277	40390-40396	2002
Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, <b>Hashimoto K</b>	Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation	<i>J Invest Dermatol</i>	119	1230-1236	2002
Tsuda T, Thoyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, <b>Hashimoto K</b>	Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes <i>in vitro</i> .	<i>J Dermatol Sci</i>	In press		2002
Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, <b>Hashimoto K</b> , Nishikawa T	BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid	<i>J Dermatol Sci</i>	30	224-232	2002
Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Tamaki K.	Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins.	<i>J Invest Dermatol.</i>	119(2)	403-410	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, <b>Hashimoto K</b>	Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex.	<i>J Dermatol</i>	In press		2002
Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, <b>Hashimoto K</b>	A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation	<i>Br J Dermatol</i>	In press		2002
Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Nagata K, Yoshimura A	Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis.	<i>J Clin Invest</i>	108(12)	1781-1788	2001
Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, <b>Hashimoto K</b>	Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex.	<i>J Dermatol</i>	In press		2002
Ii M, Sayama K, Tohyama M, <b>Hashimoto K.</b>	A case of cold-dependent exercise-induced anaphylaxis.	<i>Br J Dermatol</i>	147	368-70	2002
Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. and <b>Ichijo, H.</b>	Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice.	<i>Antioxid. Redox Signal</i>	4	415-425	2002
Tobiume, K., Saitoh, M. and <b>Ichijo, H.</b>	Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer.	<i>J. Cell. Physiol.</i>	191	95-104	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and <b>Ichijo, H.</b> , Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., <b>Ichijo, H.</b>	ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats.	<i>Genes Dev.</i>	16,	1345-1355	2002
Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., <b>Ichijo, H.</b> , Okano, H. and Miura, M.	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in <i>Drosophila</i> .	<i>Nat. Cell Biol.</i>	4	705-710	2002
Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K. and <b>Ichijo, H.</b>	Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway: a new mode of regulation of the MAP kinase cascade.	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	40703-40709	2002
Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A. and <b>Ichijo, H.</b>	Phosphorylation and Inactivation of Mcl-1 by c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in response to oxidative stress.	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	43730-43734	2002
Takeda, K. and <b>Ichijo, H.</b>	Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. (review)	<i>Genes Cells</i>	7	1099-1111	2002
Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., <b>Ichijo, H.</b> and Gugen-Guillouzo	C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	49220-49229	2002
Jibiki, I., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., <b>Ichijo, H.</b> , and Horie, T.	Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates nitric oxide-induced activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells.	<i>Am. J. Respir. Crit. Care Med.</i>	167	856-861	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., <b>Ichijo, H.</b> , Saeki, K., Isemura, M., Yuo, A..	Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis.	<i>Biochem. J.</i>	368	705-720	2002
Takahashi J, Komatsuzawa H, Yamada S, Nishida T, Labischinski H, Fujiwara T, Ohara M, Yamagishi J, <b>Sugai M.</b>	Molecular characterization of an atl null mutant of Staphylococcus aureus.	<i>Microbiol Immunol</i>	46	601-612	2002
Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, <b>Sugai M</b>	Identification of the Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B.	<i>Infect Immun.</i>	70(10)	5835-45	2002
Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, OharaM, Kurihara H, <b>Sugai M</b>	Identification of six major outer membrane proteins from Actinobacillus actinomycetemcomitans.	<i>Gene</i>	288	195-201	2002
Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, Hayashi T, Aepfelbacher M, Ohara M, Komatsuzawa H, Watanabe H, <b>Sugai M</b>	Clonal association of Staphylococcus aureus causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan.	<i>J Infect Dis.</i>	185(10)	1511-1516	2002