

図とその説明



図 尋常性乾癬病変部の免疫染色。角層下のケラチノサイト (KC) と角層細胞の細胞質と細胞膜に C3b が沈着している (A, C の矢印)。細胞膜に顆粒状の C3b の沈着がある (A)。角層下の KC の細胞質で C3a が弱陽性であった (B, D の矢印)。Isotype control は陰性であった (E)。IL-8 は基底層と有棘層下層 (F, H) と角層内好中球 (F, G) で陽性であった。拡大 (A, B, F: X100, C, D, E: X400, G, H: X200)。

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

膿疱性乾癬の病態と治療に関する研究

研究協力者 小宮根真弓 東京大学医学部附属病院皮膚科 講師

研究要旨 表皮細胞から産生されるケモカインは、膿疱性乾癬をはじめとする炎症性皮膚疾患の成立に必要である。表皮細胞の細胞株である HaCaT 細胞から産生される TARC および CTACK を抑制する分子について検討したところ、マクロライド系抗生物質であるロキシスロマイシン、NF κ B 阻害剤である Parthenolide、Bay11-7085、p38 阻害剤である SB202190 が TARC 産生を抑制し、さらに SB202190 は CTACK 産生を抑制した。これらの物質およびこれらに類似の作用を持つ物質は、膿疱性乾癬の治療薬として有用である可能性が考えられた。

共同研究者

柿沼 誉

東京大学医学部附属病院皮膚科助手

鑑 慎司

東京大学医学部附属病院皮膚科大学院博士
課程

A. 研究目的

膿疱性乾癬は、難治性の未だ原因不明の疾患であり、尋常性乾癬と類似の病態を持つとともに、異なる側面もかなりの部分併せ持つと考えられる。膿疱性乾癬患者に特徴的な炎症因子を見出し、その因子の産生に関与する特異的ファクターを解明し、治療に役立てたいと考え、この研究を計画した。本年度は、炎症因子として、皮膚へのリンパ球の浸潤に重要な役割をもつケモカインである TARC と CTACK に注目し、これらの因子の表皮細胞からの産生を特異的に阻害する因子について検討した。

B. 研究方法

表皮細胞の細胞株である HaCaT 細胞は、ドイツハイデルベルク大学の Fusenig, N 先生より許可を得、昭和大学の黒木登志夫先生より供与していただいた。培養には、Eagle's Minimum Essential Medium

(MEM) に 10% Fetal Calf Serum (FCS) を加えたものを用い、細胞は 40 継代から 6 継代のものを用いた。

HaCaT 細胞を 6 ウェルプレートに播種 24 時間培養後、TNF α (10 μ g/ml または 50 μ g/ml)、IFN γ (100U/ml)、IL-1 β (50 μ g/ml) を加えてさらに培養した。阻害剤を加える場合には、刺激する 1 時間前に阻害剤を培養液に加えた。24 時間培養後上清を回収し、上清中の CTACK、TARC 濃度を R&D system 社の ELISA キットを用いて測定した。細胞は別に回収して細胞数または蛋白濃度を測定した。

刺激後記載された時間に細胞を Lysis buffer にて回収し、SDS-PAGE にて電気泳動後、PVDF 膜に転写し、一次抗体とともに 4 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベート、洗浄後 2 次抗体とともに室温で 1 時間インキュベート、さらに洗浄後、Cell signaling 社の Chemiluminescence system を用いて化学発光させ、ECL フィルムに感光させた。

用いた試薬類は以下のとおりである。TNF α 、IFN γ 、IL-1 β は R&D system (MN, USA) より、PD153035、Parthenolide、Bay11-7085、SB202190、PD98059 は Calbiochem (USA) より、抗リン酸

化 ERK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 p38 抗体は Cell signaling 社 (USA) より、抗リン酸化チロシン抗体、抗 JNK 抗体、抗 ERK 抗体、抗 I κ Ba 抗体、抗 p38 抗体は Santa Cruz 社 (USA) より購入した。ロキシスロマイシンは(株)エーザイより提供されたものを使用した。

C. 研究結果

HaCaT 細胞を TNF α および IFN γ で刺激24時間後には、上清中に多量の TARC が検出された。また HaCaT 細胞を TNF α および IFN γ で刺激後5分後から60分後に回収した蛋白を用いてウェスタンブロットを行ったところ、図1に示すように、ERK、p38、JNK、STAT1、EGF 受容体のリン酸化が認められ、また I κ B の分解が観察された。

TNF α および IFN γ により活性化される分子に対する各種の阻害剤、および乾癬、掌せき膿疱症に有効性が報告されているロキシスロマイシンを刺激前に添加することにより、TARC 産生が阻害されるか否かを検討したところ、図2に示すような結果が得られた。すなわち、ロキシスロマイシンは濃度依存的に TARC 産生を抑制した(図2A)。また、p38阻害剤である SB202190、NF κ B 阻害剤である Bay および Parthenolide は TARC 産生を抑制したが、ERK 阻害剤である PD98059 は抑制しなかった。EGF 受容体阻害剤である PD153035 は TARC 産生を逆に誘導した(図2B)。

一方、TNF α および IL-1 β 刺激により、培養上清中に放出される CTACK は著明に増加した。刺激一時間前に各種阻害剤を加えたところ、図3に示すように、p38阻害剤である SB202190 は CTACK 産生を抑制した。NF κ B 阻害剤である Bay、Parthenolide、ERK 阻害剤である PD98059、EGF 受容体阻害剤である PD153035 は有意な抑制を示さなかった。

D. 考察

TARC および CTACK は CLA 陽性 T 細胞の皮膚への浸潤に非常に重要な役割を持ち、その2者の同時欠失により、マウスにおける遅延型皮膚アレルギー反応に認められる皮膚の炎症が起こらなくなることが報告されている。

一方、乾癬はシクロスポリンをはじめとする T 細胞活性化阻害剤が著明な効果を示し、また T 細胞と抗原提示細胞の相互作用をブロックする各種の新しい治療が効果を示すなど、その病態における T 細胞の役割は明らかである。乾癬には、関節症や、虹彩炎などの他臓器病変を合併するものも存在するが、主に皮膚を病変の主体としているため、皮膚の炎症、すなわち皮膚へのリンパ球浸潤を阻止することで、その症状の大部分を抑制することができると考えられる。そのため、TARC、CTACK などの、皮膚へのリンパ球浸潤を引き起こす可能性のあるケモカインを抑制することは、乾癬の治療にとって非常に重要な意義を持つと考えられる。TARC は、Th2 系のケモカインであり、Th1 系が主体である乾癬に、どの程度意味を持つ分子であるかは不明であるが、膿疱性乾癬は、Th1 系の炎症が主体の尋常性乾癬とは異なった側面を持つと考えられ、実際いくつかの例で、IgE 値の高値を示す例や、血清中の TARC が高値を示す症例が存在する(未発表)。そのため、これらのケモカインの産生を抑制しうる分子を探ることにより、膿疱性乾癬の治療につながる知見が得られるのではないかと考えられる。今回の検討により、ロキシスロマイシン、p38阻害剤、NF κ B 阻害剤は TARC 産生を抑制し、p38阻害剤は CTACK 産生を抑制した。シグナル伝達分子を特異的に阻害することにより、治療効果を期待する試みは、すでに NF κ B を阻害する NF κ B デコイ型核酸が、動脈硬化、糖尿病やアトピー性皮膚炎の治療に試行されているように、近年ますます盛んに

研究されてきている。乾癬の治療においては、抗 TNF α 抗体である Infliximab、Eterncept や、LFA-3/CD2 相互作用を抑制する Alefacept など、特定のサイトカインや、T細胞と抗原提示細胞の間を阻害する薬剤の治療への応用がなされており、すでにいくつかのものが臨床的に使用されている。しかしながらこれらの薬剤に反応しない患者があるため、他の作用機序をもつ薬剤の開発と、乾癬の病態の解明が待たれるところである。今回の検討により、p38阻害剤は、膿疱性乾癬を含む炎症性皮膚疾患で重要な位置を占める CTACK、TARC 産生を抑制したことは、この薬剤あるいはこれに類似の作用を持つ薬剤が膿疱性乾癬の治療薬として有用である可能性を示唆するものと考えられる。

E. 結論

膿疱性乾癬に対する新しい治療薬として、p38を阻害するような薬物が有効である可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表
1. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Mechanical stretching *in vitro* regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol** in press.
2. Tsunemi Y, Nishibu A, Saeki H, Oyama N, Nakamura K, Kishimoto M, Mitsui H, Tada Y, Torii H, Komine M, Asahina A, Kaneko F, Tamaki K. Lack of association between the promoter polymorphisms at positions -308 and -238 of the tumor necrosis factor alpha gene and psoriasis vulgaris in Japanese patients. **Dermatology** 207(4):371-374, 2003
3. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. **Clin Exp Immunol** 134(2):309-313, 2003
4. Tsunemi Y, Saeki H, Kishimoto M, Mitsui H, Tada Y, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K, Sekiya T. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene (CTLA4) polymorphisms in Japanese patients with psoriasis vulgaris. **J Dermatol Sci** 32(2):163-165, 2003
5. Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, Yano S, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. **J Dermatol Sci** 31(2):111-117, 2003
6. Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Watanabe T, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27)

- levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Allergy Clin Immunol* 111(3):592-597, 2003
7. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun* 301(4):841-847, 2003
2. 学会発表
1. 小宮根真弓、玉置邦彦. 表皮細胞に対するTNF α 、IFN γ によるシグナル伝達とマクロライドの作用. 第1回皮膚マクロライド研究会、2003
2. 小宮根真弓、玉置邦彦. マクロライドの表皮細胞における抗炎症作用のメカニズム. 第10回マクロライド新作用研究会、2003
3. 小宮根真弓、柿沼誉、玉置邦彦. ロキシシスロマイシンはHaCaT細胞からのTARC産生を抑制する：膿疱性乾癬の発症機序について. 稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成15年度第1回班会議総会、2003
4. 小宮根真弓：乾癬の病態：角化と炎症. 第18回日本乾癬学会学術大会、2003
5. 小宮根真弓、矢野正一郎、大河内仁志、玉置邦彦. The effects of mechanical stretch on epidermal keratinocytes. 第6回皮膚免疫を考える会、2003
6. 小宮根真弓、竹腰知紀、玉置邦彦. 尋常性乾癬 systemic therapy と topical therapy: 光線療法と局所療法の併用. 第67回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2003
7. Komine M, Tamaki K. Pathophysiology of Psoriasis: Insights from the Epidermis. The Jeju Psoriasis Symposium 2003. November 21-22, 2003. Jeju, Korea.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし。

図 1.

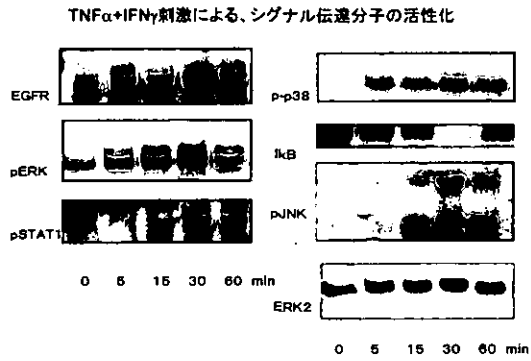
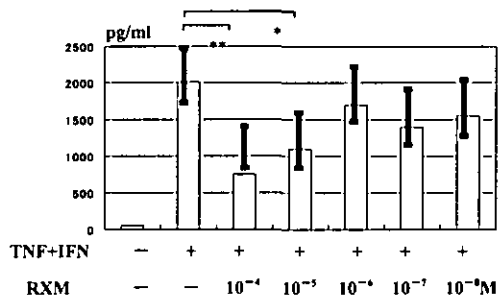


図 2

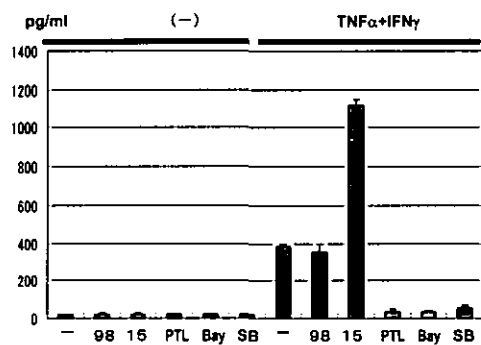
(A).

RXM suppresses TNF α and IFN γ induced TARC production from HaCaT Keratinocyte



(B).

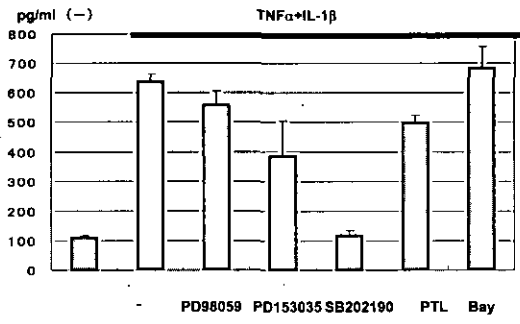
Inhibition of TARC production from HaCaT keratinocytes



98 : PD 98059
 15 : PD 153035
 PTL : Parthenolide
 Bay : Bay 11-7085
 SB : SB 202190

☒ 3.

**Inhibition of CTACK production from HaCaT
keratinocytes**



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

Ⅶ型コラーゲン遺伝子におけるalternative splicing

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 Ⅶ型コラーゲンは栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であり、表皮と真皮の結合に重要であると考えられている。今回我々は、Ⅶ型コラーゲン遺伝子に存在する alternative splicing を初めて見出した。それにより生ずる 9 アミノ酸 GPLTLPLSP は、本蛋白の fibronectin type III ドメインの linker 部に挿入されていた。さらに、創傷治癒に関与する TGF- β を培養表皮細胞に加えるとその alternative splicing が増加すること、また潰瘍周辺の表皮細胞ではその alternative splicing 増強されていることが明らかになった。以上より、この alternative splicing は表皮真皮の結合に変化をもたらし、創傷治癒や皮膚の remodeling に関与すると推測された。

共同研究者

後藤真希 北海道大学大学院医学研究科
皮膚科学野

澤村大輔 北海道大学大学院医学研究科
皮膚科学野 助教授

A. 研究目的

Ⅶ型コラーゲンは表皮真皮境界部に存在し、anchoring fibril の主要な構成成分である。Ⅶ型コラーゲンの遺伝子異常で栄養障害型表皮水疱症、自己抗体ができると後天性表皮水疱症が起こることから、Ⅶ型コラーゲンは表皮真皮の結合に重要であるとかんがえられている。その点から、もしⅦ型コラーゲンの発現や性質に変化があれば、表皮真皮の結合に変化がおこる可能性がある。

そこで今回、1) Ⅶ型コラーゲン、特に接着に関与する NC-1 ドメインをコードする領域に alternative splicing が存在するか？、2) もし、あれば表皮真皮の接着を変え、さらには創傷治癒や皮膚の再構成に関連する可能性はないか？ の 2 点を検討した。

B. 研究方法

1) Ⅶ型コラーゲンの NC-1 ドメインの機能の解析

すでにノーザンブロット法にて、Ⅶ型コラーゲン mRNA バンドが単一であることが確認されているので、alternative splicing による産物は 500bp 以下の長さであることが予想された。そこで、NC-1 ドメインに一致する cDNA を 300-500bp に 21 領域に分割し、それぞれを PCR で増幅した。そして、バンドが複数生ずるか確認した。

2) Alternative splicing のコンピューターによる解析

Alternative splicing から新しく生ずるアミノ酸の立体構造、NC-1 ドメインのどのサブドメインに挿入されるのか、それによってどのような状況が NC-1 ドメインにおこるのかを、コンピュータープログラムを用いて推測した。

3) TGF- β の効果

TGF- β はⅦ型コラーゲンの発現を強力に誘導する作用があるし、創傷治癒促進作用がある。そこで、培養表皮細胞に TGF- β を加え、alternative splicing の頻度が増加するかどうかを、検討した。

4) 生体の皮膚での確認

実際のヒト皮膚での alternative splicing を確認するため、熱傷や外傷などで皮膚潰瘍を生じている患者を選択し、正常部と潰瘍周辺から皮膚を採取した。皮膚をデスパラーゼ処理し表皮を分離した後、トリプシンにて表皮細胞を単離した。次に、表皮細胞から RNA を抽出し、オリゴ dT にてプライミングしリバーストランスクリプターゼにて cDNA を合成した。その後、PCR を行い alternative splicing の定量化を行った。

C. 研究結果

1) VII型コラーゲンのNC-1ドメインの alternative splicing

NC-1ドメインに新しい alternative splicing が存在することが、見出された(図1、レーン10)。その alternative splicing はエクソン18の acceptor site が5'側に 27bp 移動することで生じていた。その alternative splicing は表皮細胞、線維芽細胞の両者で認められた。

2) Alternative splicing のコンピューターによる解析

その alternative splicing によって新たに9アミノ酸が翻訳されることが判明した。そのうち、3個がプロリンでありこの9アミノ酸は turn 構造を作りやすいことが推測された。また、VII型コラーゲンのNC-1ドメインには9個のフィブロネクチンタイプ3の繰り返し構造があるが、この9アミノ酸はフィブロネクチンタイプ3の6と7番目の間にちょうどおさまると予想された。

3) TGF- β の効果

TGF- β を培養細胞に添加し、RT-PCR を行い alternative splicing を検討した所、TGF- β 添加によって alternative splicing の増加が認められた。

4) 生体の皮膚での確認

潰瘍辺縁部と健常部の表皮から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。その結果、健常部と比較して潰瘍辺縁部で、有為に

alternative splicing の増加が認められた。

D. 考察

近年、ヒトのすべてのゲノムの塩基配列が明らかにされ、以前は10万個と考えられた遺伝子数は、3から4万と是正された。そして、数少ない遺伝子から、多機能をもつ蛋白質を作り出す1つの手段として、alternative splicing が注目されている。今回、我々はVII型コラーゲン遺伝子に alternative splicing を確認した。

その alternative splicing 結果、蛋白では9アミノ酸の挿入となった。その9アミノ酸はプロリンが豊富で折り曲げ構造をとりやすい構造と推測された。VII型コラーゲンのNC-1ドメインには9個のフィブロネクチンタイプ3の繰り返し構造がある。フィブロネクチンタイプ3構造は、約90個のアミノ酸からなり、7つの β ストランドが見つかる。その3ストランドから1つの β シートが、さらに残りの4つからもう1つの β シートが作成される。2つの β シートは向かいあう構造をとり β バレル構造をとる。その結果、フィブロネクチンタイプ3のN末とC末から引っ張る力が働くと、あたかもバネのように伸びたり縮んだりすることが可能になる。今回の alternative splicing により生ずる9アミノ酸は丁度、6と7番目のフィブロネクチンタイプ3ドメインの間に存在し、バネの角度を変え、NC-1ドメイン全体の細胞外基質への接着能を変化させると推測した。

つぎに、その alternative splicing が表皮と真皮の接着に関与すると推測されたので、創傷治癒への関与も検討してみた。はじめに、創傷治癒を促進させるサイトカインであるTGF- β の影響を調べたところ、alternative splicing の増加が認められた。さらに、創傷治癒過程にある潰瘍辺縁の表皮を検討した結果、正常部と比較して alternative splicing の増加が観察された。

E. 結論

今回、我々が見い出した alternative splicing は、NC-1 ドメインの接着能や表皮と真皮の結合に変化をもたらし、その結果皮膚の創傷治癒に関連することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M, Shimizu H: Truncation of CGI-58 protein causes malformation of lamellar granules resulting in ichthyosis in Dorfman-Chanarin syndrome. *J Invest Dermatol* in press.
2. Arita K, Akiyama M, Sakai T, Shimizu H: Severely hyperkeratotic erythroderma associated with Hodgkin's disease-Dose high serum G-CSF contribute to the formation of skin lesions? *J Am Acad Dermatol* in press.
3. Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, Iwao F, Kodama K, Shimizu H: Squamous cell carcinoma in a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* in press.
4. Hayashi H, Shimizu T, Nakamura H, Shimizu H: Linear verrucous hemangioma on the trunk. *Acta Dermato Venereol* in press.
5. Iwao F, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Shimizu H: Elephantiasis nostras verrucosa successfully treated by surgical debridement. *Dermatol Surg* in press.
6. Masunaga T, Ishiko A, Takizawa Y, Kim SC, Lee JS, Nishikawa T, Shimizu H: Pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome showing novel 594 insC/Q425P mutations in integrin b4 gene (ITGB4). *Exper Dermatol* in press.
7. Nakamura H, Shimizu T, Kodama K, Shimizu H: Cutaneous digital metastasis in two patients with lung cancer. *Int J Dermatol* in press.
8. Nomura T, Sato-Matsumura KC, Kikuchi T, Abe M, Shimizu H: Rapid remission of severe pruritus from angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia by pulsed dye laser therapy. *Clin Exp Dermatol* in press.
9. Ogata A, Shimizu T, Abe R, Shimizu H, Sakai M: Expression of maf in the skin during rat embryonic development. *Acta histochem* in press.
10. Sawamura D, Sato-Matsumura KC, Shibaki A, Akiyama M, Kikuchi T, Shimizu H: A case of lichen amyloidosis treated with pulsed dye laser. *J Eur Acad Dermatol Venereol* in press.
11. Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Ishibashi T, Shimizu H: Cetirizine, an H1-receptor antagonist, suppresses the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential anti-inflammatory action. *Clin Exp Allergy* in press.
12. Tateishi Y, Sato H, Akiyama M, Abe M, Kobayashi H, Umehara S, Yamaguchi J, Shibaki H, Shimizu H: Severe generalized deep dermatophytosis due to Trichophyton

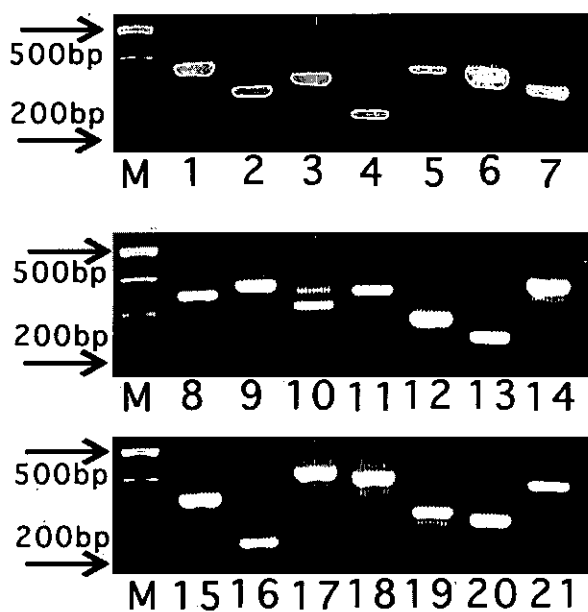
- rubrum (Trichophytic Granuloma) in a patient with atopic dermatitis. **Arch Dermatol** in press.
13. Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H: Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble fas ligand. **Am J Pathol** 162:1515-1520, 2003.
 14. Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H: The clinical spectrum of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis. **Clin Exp Dermatol** 28:235-240, 2003.
 15. 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** 12:638-645, 2003.
 16. Akiyama M, Takizawa Y, Suzuki Y, Shimizu H: A novel homozygous mutation 371delA in TGM1 leads to a classic lamellar ichthyosis phenotype. **Br J Dermatol** 148:149-153, 2003.
 17. Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, Onozuka T, Shimizu H: Erythrokeratoderma variabilis without connexin 31 or connexin 30.3 gene mutation: immunohistological, ultrastructural and genetic study. **Acta Derm Venereol** 83:266-270, 2003.
 18. Fujita Y, Shimizu T, Nishie W, Shimizu H: Contact dermatitis due to eugenol used to treat oral lichen planus. **Contact Dermatitis** 48:285, 2003.
 19. Hamada T, Wessagowit V, South AP, Ashton GH, Chan I, Oyama N, Siri wattana A, Jewhasuchin P, Charuwichitratana S, Thappa DM, Lenane P, Krafchik B, Kulthanan K, Shimizu H, Kaya TI, Erdal ME, Paradisi M, Paller AS, Seishima M, Hashimoto T, McGrath JA: Extracellular matrix protein 1 gene (ECM1) mutations in lipid proteinosis and genotype-phenotype correlation. **J Invest Dermatol** 120:345-350, 2003.
 20. Hayashi H, Shimizu T, Shimizu H: Multiple fixed drug eruption caused by acetaminophen. **Clin Exp Dermatol** 28:455-456, 2003.
 21. Hayashi H, Shimizu T, Shimizu H: Scrotal metastases originating from colorectal carcinoma. **Clin Exp Dermatol** 28:226-227, 2003.
 22. Iwao F, Sawamura D, Yokota K, Shimizu H: Granulomatous blepharitis successfully treated with tranilast. **Br J Dermatol** 149:222-224, 2003.
 23. Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Saitoh S, Wada T, Shimizu H, Ishii M: A novel P gene missense mutation in a Japanese patient with oculocutaneous albinism type II (OCA2). **J Dermatol Sci** 31:189-192, 2003.
 24. Kawasaki H, Sawamura D, Iwao F, Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, Shimizu H: Squamous cell carcinoma developing in a 12-year-old boy with nonHallelopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

- Br J Dermatol** 148:1047-1050, 2003.
25. Liu Y, Shimizu H, Hashimoto T: Immunofluorescence studies using skin sections of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients indicated that the antigen of anti-p200 pemphigoid is not a fragment of type VII collagen. **J Dermatol Sci** 32:125-129, 2003.
 26. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. **J Dermatol Sci** 31:169-177, 2003.
 27. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Ultrastructural orientation of laminin 5 in the epidermal basement membrane: an updated model for basement membrane organization. **J Histochem Cytochem** 51:1299-1306, 2003.
 28. McMillan JR, Haftek M, Akiyama M, South AP, Perrot H, McGrath JA, Eady RA, Shimizu H: Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1. **J Invest Dermatol** 121:96-103, 2003.
 29. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. **Exp Dermatol** 12:261-267, 2003.
 30. Okubo S, Sato-Matsumura KC, Abe R, Aoyagi S, Akiyama M, Yokota K, Shimizu H: The use of ELISA to detect desmoglein antibodies in a pregnant woman and fetus. **Arch Dermatol** 139:1217-1218, 2003.
 31. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Yokoshiki H, Chiba H, Shimizu H: Xanthoma striatum palmare as an early sign of familial type III hyperlipoproteinemia with an apoprotein E genotype epsilon2/epsilon2. **Clin Exp Dermatol** 28:321-322, 2003.
 32. Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: A novel insertion mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Acta Derm Venereol** 83:137-138, 2003.
 33. 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** 120:942-948, 2003.
 34. Sawamura D, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Epidermolysis bullosa: Directions for future research and new challenges for treatment. **Arch Dermatol Res** 295:34-42, 2003.
 35. Shimizu S, Yasui C, Yasukawa K, Nakamura H, Shimizu H, Tsuchiya K: Subcutaneous nodules on the buttocks as a manifestation of dialysis-related amyloidosis: a clinicopathological entity? **Br J Dermatol** 149:400-404, 2003.
 36. Shimizu T, Abe R, Nishihira J,

- Shibaki A, Watanabe H, Nakayama T, Taniguchi M, Ishibashi T, Shimizu H: Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-deficient mice. **Eur J Immunol** 33:1478-1487, 2003.
37. Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJ, Prescott AR, Wessagowit V, Oyama N, Akiyama M, Al Aboud D, Al Aboud K, Al Githami A, Al Hawsawi K, Al Ismaily A, Al-Suwaid R, Atherton DJ, Caputo R, Fine JD, Frieden IJ, Fuchs E, Haber RM, Harada T, Kitajima Y, Mallory SB, Ogawa H, Sahin S, Shimizu H, Suga Y, Tadini G, Tsuchiya K, Wiebe CB, Wojnarowska F, Zaghloul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RA, McLean WH, McGrath JA, Epstein EH: Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. **Am J Hum Genet** 73:174-187, 2003.
38. Suzuki T, Miyamura Y, Matsunaga J, Shimizu H, Kawachi Y, Ohyama N, Ishikawa O, Ishikawa T, Terao H, Tomita Y: Six novel P gene mutations and oculocutaneous albinism type 2 frequency in Japanese albino patients. **J Invest Dermatol** 120:781-783, 2003.
39. Tomita Y, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Matsumura T, Shimizu H: Simultaneous occurrence of three squamous cell carcinomas in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. **Acta Derm Venereol** 83:225-226, 2003.
40. Tsuji Y, Akiyama M, Arita K, Senshu T, Shimizu H: Changing pattern of deiminated proteins in developing human epidermis. **J Invest Dermatol** 120:817-822, 2003.
41. Umezawa Y, Ozawa A, Kawasima T, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Tezuka T, Igarashi A, Harada S: Therapeutic guidelines for the treatment of generalized pustular psoriasis (GPP) based on a proposed classification of disease severity. **Arch Dermatol Res** 295 Suppl 1:S43-54, 2003.
- H 知的財産の出願・登録状況
特になし。

図1 VII型コラーゲンのNC-1ドメインの alternative splicing

NC-1ドメインに新しい alternative splicing が存在することが、見出された (レーン10)。その alternative splicing はエクソン18の acceptor site が5'側に27bp移動することで生じていた。



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

劣性栄養障害性表皮水疱症患者に発症した多発有棘細胞癌
—本症における易発癌性に関する研究—

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頻度が高い劣性栄養障害性表皮水疱症（RDEB）罹患患者に多数の有棘細胞癌が生じた一例を検討した。COL7A1 遺伝子検索を行った。その結果、フレームシフトを生じ下流の exon73 で停止コドンを生じる欠失 5818delC ならびに Triple helical domain のグリシンがアルギニンに変異する G1815R を見いだした。本症例は、皮膚蛍光抗体法でⅦ型コラーゲンが僅かに減弱しているが、劣性栄養障害性表皮水疱症としては、最重症型ではなかった。嚥下困難や手指趾の融合や、爪の脱落はあるものの自立して生活しており、びらんは、自己処置し、約20年間専門医療機関を受診していなかった。44歳から両下肢のびらんが上皮化せず、皮膚科専門医の紹介により当科を受診した。独立した3か所に有棘細胞癌が発症しており、全切除の上植皮を行った。劣性栄養障害性表皮水疱症患者では、たとえ臨床症状が軽少であっても有棘細胞癌を若年から高率に発症する可能性が高いため、患者への十分な啓蒙を行い定期的に専門施設を受診させる必要性を明らかにした。

研究協力者

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・歯学部附属
病院・皮膚科・助手

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症は、Ⅶ型コラーゲンの genetic な変異で引き起こされる遺伝性皮膚疾患である。皮膚が脆弱で、物理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を来す極めて予後が悪い。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の生命予後は、若年から発症する扁平上皮癌が問題となっている。このため、同時に多数の扁平上皮癌を発症した栄養障害型表皮水疱症患者について臨床症状、遺伝子変異、基底膜関連タンパクの発現について明らかにするべく本研究を施行した。

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。腫瘍の組織学的検討、全身転移の有無を検討した。さらに患者の現在までの医療機関への受診状況を検討した。

(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、血族者は同意を撤回でき、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、癬痕形成、爪の脱落、稗粒腫形成を認める。手指と足趾は癒合しており、日常生活に支障がある。食道狭窄があり、低栄養状態が続いている。両側下肢、足背にかけて難治性の潰瘍がある。疣贅状に隆起したり、深い潰瘍となって扁平上皮癌を疑わせる部位が少なくとも独立して三箇所存在する（図1）。全身検索では、転移は見つからなかった。詳しく病歴を聴取したところ、患者は、20歳ごろまで定期的な通院をしていたが、症状が改善しないため、以後通院しなくなり、自己治療していた。44歳時に当科を受診したのは、扁平上皮癌発症のリスクを熟知していた地域の皮膚科専門医が受診を勧めたからであった。

免疫組織学的検索：表皮真皮境界部におけるLH7.2 (type VII collagen) が減少していた。これ以外の検索した基底膜関連蛋白は健常コントロールと同様の発現であった。nonHS-RDEBと診断された

組織学的検索：基底膜のアンチゲンマッピングでは、難治性潰瘍部、疣贅状に隆起している部位、いずれも高分化の扁平上皮癌であった。（図2）いずれも十分なマージンを取り、外科的に切除し、分層植皮した。組織学的に腫瘍が完全に切り切れていることを確認した。

遺伝子検索：父方の変異は、5818delCであり、最終的にフレームシフトの結果64アミノ酸下流の exon73 で停止コドンが生じる。これは、日本人で高頻度に認められる。母方の変異は G1815R のミスセンス変異で、exon65 の Triple helical domain における Glycine 置換である。母方の変異は、novel mutation であった。

D. 考察

44歳になって下肢に扁平上皮癌が多発した nonHS-RDEB の変異を確認し、切除した扁平上皮癌の組織学的検索を行った。本症例は、重症ではあるが、自己治療によって、手の機能が比較的良く保たれていた。しかし、扁平上皮癌の早期発症のリスク Kawasaki H, Sawamura D ら (Br J Dermatol 148 1047-50, 2004) を患者自身十分に理解せぬままに、専門医による治療から遠ざかっていた。幸いなことに、地域の皮膚科専門医により、多発した扁平上皮癌を発見され切除することができたが、発見が遅れば、早期に転移する可能性もあった。発癌の危険性を幼少時から十分に理解させることは難しい。nonHS-RDEB は、HS-RDEB よりも症状が軽いため、時に患者は通院を自己中止することがある。治療にはこのような状況を踏まえる必要がある。

E. 結論

RDEB 患者の治療にあたって、治療による改善がなくとも扁平上皮癌発症の可能性があるため通院の必要があることを患者に理解させると同時に皮膚科専門医のみならず、他科の医師にも広く RDEB に関する啓蒙を行うことがひつようである。

F. 健康危険情報

栄養障害型表皮水疱症は、若年から有棘細胞癌を発症することで知られている。栄養障害型表皮水疱症自体を完治させる治療がまだ開発されていない現状では、表皮水疱症自体の臨床症状が重症でなくとも有棘細胞癌の早期発見早期治療のため定期的な専門施設への受診を十分に啓蒙する必要がある。

G. 研究発表（平成15年度）

1. Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M, Shimizu H: Truncation of CGI-58 protein

- causes malformation of lamellar granules resulting in ichthyosis in Dorfman-Chanarin syndrome. **J Invest Dermatol** in press.
2. Arita K, Akiyama M, Sakai T, Shimizu H: Severely hyperkeratotic erythroderma associated with Hodgkin's disease-Dose high serum G-CSF contribute to the formation of skin lesions? **J Am Acad Dermatol** in press.
 3. Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, Iwao F, Kodama K, Shimizu H: Squamous cell carcinoma in a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. **Br J Dermatol** in press.
 4. Hayashi H, Shimizu T, Nakamura H, Shimizu H: Linear verrucous hemangioma on the trunk. **Acta Dermato Venereol** in press.
 5. Iwao F, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Shimizu H: Elephantiasis nostras verrucosa successfully treated by surgical debridement. **Dermatol surg** in press.
 6. Masunaga T, Ishiko A, Takizawa Y, Kim SC, Lee JS, Nishikawa T, Shimizu H: Pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome showing novel 594ins-C/Q425P mutations in integrin $\beta 4$ gene (ITGB4). **Exper Dermatol** in press.
 7. Nakamura H, Shimizu T, Kodama K, Shimizu H: Cutaneous digital metastasis in two patients with lung cancer. **Int J Dermatol** in press.
 8. Nomura T, Sato-Matsumura KC, Kikuchi T, Abe M, Shimizu H: Rapid remission of severe pruritus from angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia by pulsed dye laser therapy. **Clin Exp Dermatol** in press.
 9. Ogata A, Shimizu T, Abe R, Shimizu H, Sakai M: Expression of maf in the skin during rat embryonic development. **Acta histochem** in press.
 10. Sawamura D, Sato-Matsumura KC, Shibaki A, Akiyama M, Kikuchi T, Shimizu H: A case of lichen amyloidosis treated with pulsed dye laser. **J Eur Acad Dermatol Venereol** in press.
 11. Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Ishibashi T, Shimizu H: Cetirizine, an H1-receptor antagonist, suppresses the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential anti-inflammatory action. **Clin Exp Allergy** in press.
 12. Tateishi Y, Sato H, Akiyama M, Abe M, Kobayashi H, Umehara S, Yamaguchi J, Shibaki H, Shimizu H: Severe generalized deep dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* (Trichophytic Granuloma) in a patient with atopic dermatitis. **Arch Dermatol** in press.
 13. Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H: Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble fas ligand. **Am J Pathol** 162:1515-1520, 2003.
 14. Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H: The clinical spectrum of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar

- ichthyosis. **Clin Exp Dermatol** 28:235-240, 2003.
15. 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** 12:638-645, 2003.
 16. Akiyama M, Takizawa Y, Suzuki Y, Shimizu H: A novel homozygous mutation 371delA in TGM1 leads to a classic lamellar ichthyosis phenotype. **Br J Dermatol** 148:149-153, 2003.
 17. Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, Onozuka T, Shimizu H: Erythrokeratoderma variabilis without connexin 31 or connexin 30.3 gene mutation: immunohistological, ultrastructural and genetic study. **Acta Derm Venereol** 83:266-270, 2003.
 18. Fujita Y, Shimizu T, Nishie W, Shimizu H: Contact dermatitis due to eugenol used to treat oral lichen planus. **Contact Dermatitis** 48:285, 2003.
 19. Hamada T, Wessagowit V, South AP, Ashton GH, Chan I, Oyama N, Siri wattana A, Jewhasuchin P, Charuwichitratana S, Thappa DM, Lenane P, Krafchik B, Kulthanan K, Shimizu H, Kaya TI, Erdal ME, Paradisi M, Paller AS, Seishima M, Hashimoto T, McGrath JA: Extracellular matrix protein 1 gene (ECM1) mutations in lipoid proteinosis and genotype-phenotype correlation. **J Invest Dermatol** 120:345-350, 2003.
 20. Hayashi H, Shimizu T, Shimizu H: Multiple fixed drug eruption caused by acetaminophen. **Clin Exp Dermatol** 28:455-456, 2003.
 21. Hayashi H, Shimizu T, Shimizu H: Scrotal metastases originating from colorectal carcinoma. **Clin Exp Dermatol** 28:226-227, 2003.
 22. Iwao F, Sawamura D, Yokota K, Shimizu H: Granulomatous blepharitis successfully treated with tranilast. **Br J Dermatol** 149:222-224, 2003.
 23. Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Saitoh S, Wada T, Shimizu H, Ishii M: A novel P gene missense mutation in a Japanese patient with oculocutaneous albinism type II (OCA2). **J Dermatol Sci** 31:189-192, 2003.
 24. Kawasaki H, Sawamura D, Iwao F, Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, Shimizu H: Squamous cell carcinoma developing in a 12-year-old boy with nonHallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Br J Dermatol** 148:1047-1050, 2003.
 25. Liu Y, Shimizu H, Hashimoto T: Immunofluorescence studies using skin sections of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients indicated that the antigen of anti-p200 pemphigoid is not a fragment of type VII collagen. **J Dermatol Sci** 32:125-129, 2003.
 26. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Epidermal basement

- membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. **J Dermatol Sci** 31:169-177, 2003.
27. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Ultrastructural orientation of laminin 5 in the epidermal basement membrane: an updated model for basement membrane organization. **J Histochem Cytochem** 51:1299-1306, 2003.
 28. McMillan JR, Haftek M, Akiyama M, South AP, Perrot H, McGrath JA, Eady RA, Shimizu H: Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1. **J Invest Dermatol** 121:96-103, 2003.
 29. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. **Exp Dermatol** 12:261-267, 2003.
 30. Okubo S, Sato-Matsumura KC, Abe R, Aoyagi S, Akiyama M, Yokota K, Shimizu H: The use of ELISA to detect desmoglein antibodies in a pregnant woman and fetus. **Arch Dermatol** 139:1217-1218, 2003.
 31. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Yokoshiki H, Chiba H, Shimizu H: Xanthoma striatum palmare as an early sign of familial type III hyperlipoproteinemia with an apoprotein E genotype epsilon2/epsilon2. **Clin Exp Dermatol** 28:321-322, 2003.
 32. Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: A novel insertion mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Acta Derm Venereol** 83:137-138, 2003.
 33. 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** 120:942-948, 2003.
 34. Sawamura D, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Epidermolysis bullosa: Directions for future research and new challenges for treatment. **Arch Dermatol Res** 295:34-42, 2003.
 35. Shimizu S, Yasui C, Yasukawa K, Nakamura H, Shimizu H, Tsuchiya K: Subcutaneous nodules on the buttocks as a manifestation of dialysis-related amyloidosis: a clinicopathological entity? **Br J Dermatol** 149:400-404, 2003.
 36. Shimizu T, Abe R, Nishihira J, Shibaki A, Watanabe H, Nakayama T, Taniguchi M, Ishibashi T, Shimizu H: Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-deficient mice. **Eur J Immunol** 33:1478-1487, 2003.
 37. Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJ, Prescott AR, Wessagowit V,

- Oyama N, Akiyama M, Al Aboud D, Al Aboud K, Al Githami A, Al Hawsawi K, Al Ismaily A, Al-Suwaid R, Atherton DJ, Caputo R, Fine JD, Frieden IJ, Fuchs E, Haber RM, Harada T, Kitajima Y, Mallory SB, Ogawa H, Sahin S, Shimizu H, Suga Y, Tadini G, Tsuchiya K, Wiebe CB, Wojnarowska F, Zaghloul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RA, McLean WH, McGrath JA, Epstein EH: Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. **Am J Hum Genet** 73:174-187, 2003.
38. Suzuki T, Miyamura Y, Matsunaga J, Shimizu H, Kawachi Y, Ohyama N, Ishikawa O, Ishikawa T, Terao H, Tomita Y: Six novel P gene mutations and oculocutaneous albinism type 2 frequency in Japanese albino patients. **J Invest Dermatol** 120:781-783, 2003.
39. Tomita Y, Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Matsumura T, Shimizu H: Simultaneous occurrence of three squamous cell carcinomas in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient. **Acta Derm Venereol** 83:225-226, 2003.
40. Tsuji Y, Akiyama M, Arita K, Senshu T, Shimizu H: Changing pattern of deiminated proteins in developing human epidermis. **J Invest Dermatol** 120:817-822, 2003.
41. Umezawa Y, Ozawa A, Kawasima T, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Tezuka T, Igarashi A, Harada S: Therapeutic guidelines for the treatment of generalized pustular psoriasis (GPP) based on a proposed classification of disease severity. **Arch Dermatol Res** 295 Suppl 1:S43-54, 2003.
- 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。