

付した。二次調査の実施計画は本班と疫学班の主任研究者所属施設（岐阜大学及び順天堂大学）の倫理委員会で審査を受け、承認後の7月に2次調査を開始、8月末まで回収した。10月に二次調査票未回収の施設に督促状、その他の施設に礼状を送付した。

一次調査で得られた報告患者数をもとに未回答施設を考慮した推計患者数をマニュアルに添って算出した。二次調査結果からは当該疾患の臨床疫学像を把握するものである。

C. 研究結果（進捗状況）

病床規模別の対象率、抽出率、抽出数、報告患者数を表1に示す。

調査対象802科のうち、507科より回答があり、回収率は63.2%、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の報告患者数は38名であった。返送された二次調査票28例に重複例、他疾患報告例はなかったが、対象期間外の不適格例が3例あった。この成績に基づき2002年1年間に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症により全国の病院を受療した患者数は63人（95%信頼区間41-86人）と推計された。

また、参考疾患について2002年1年間に全国の病院を受療した患者数の推計をし、下記のような結果を得た。非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（NBCIE）113名（95%信頼区間46~179名）、葉状魚鱗癬（LI）33名（95%信頼区間23~43名）、家族性天疱瘡250名（95%信頼区間194~305名）。ただし、3疾患は2次調査を実施していないため、参考推計として、示した。

E. 結論

特定疾患の疫学に関する研究班と共同で水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の全国疫学調査を実施し、当該疾患の患者数を推計した。3疾患の患者数についても参考推計を行った。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成15年度）

1. 論文発表

英語論文

なし

日本語論文

なし

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

参考文献

- 1). 大野良之他編. 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班、名古屋, 1994.

表1 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症及び参考疾患の
全国疫学調査一次調査結果

皮膚科						BCIE 報告患者数			NBCIE 報告患者数			LI 報告患者数			家族性天疱瘡報告患者数		
						男	女	計	男	女	計	男	女	計	男	女	計
規模	対象数	抽出率	抽出数	返送数	返送率												
20-99床	899	6.2%	56	27	48.2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100-199床	597	9.9%	59	25	42.4%	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1
200-299床	359	19.8%	71	35	49.3%	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
300-399床	330	39.7%	131	79	60.3%	1	1	2	0	3	3	0	1	1	2	2	4
400-499床	176	80.1%	141	84	59.6%	1	0	1	0	1	1	2	1	3	7	5	12
500床以上	229	100.0%	229	162	70.7%	2	5	7	3	10	13	2	2	4	26	19	45
大学病院	115	100.0%	115	95	82.6%	16	11	27	7	11	18	12	2	14	58	33	91
計	2705		802	507	63.2%	21	17	38	12	26	38	16	6	22	95	59	154

BCIE：水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

NBCIE：水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

LI：葉状魚鱗癬

資料 1

稀少難治皮膚-依 3
2003 年 7 月

皮膚科 責任者様

厚生労働省厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 主任研究者 北島 康雄
(岐阜大学医学部皮膚科学)
疫学調査担当 池田 志孝
(順天堂大学医学部皮膚科学)
特定疾患の疫学に関する研究班 主任研究者 稲葉 裕
(順天堂大学医学部衛生学)
稀少難治性皮膚疾患担当 黒沢美智子
(順天堂大学医学部衛生学)

拝啓

時下、益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

過日、稀少難治性皮膚疾患の疫学調査(一次調査)につきまして、貴診療科のご協力をお願い申し上げましたところ、ご多忙中にもかかわらずご協力をいただき誠にありがとうございました。

ご回答に基づきまして、調査個人票を同封致しました。重ねてのお願いで誠に恐縮でございますが、昨年1年間(2002年1月1日~2002年12月31日)の貴診療科における水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の受診患者症例につきまして、調査個人票にご記入いただき、8月31日までにご返送下さいませようお願い申し上げます。個人調査票の記載内容に関しましては、個人の秘密は固く守り、また患者の皆様へ直接の問い合わせは致しません。

ご多忙のところ誠に恐れ入りますがご協力下さいますようお願い申し上げます。

この件に関しましてご不明の点がございましたら、下記までお問い合わせください。

何卒ご協力のほど、よろしくご協力の程お願い申し上げます。

敬具

全国疫学調査事務局: 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
名古屋大学大学院医学系研究科 予防医学/医学推計・判断学教室気付
特定疾患の疫学に関する研究班 全国疫学調査事務局
電 話: 052-744-2132
ファクシミリ: 052-744-2971

臨床事項に関する問い合わせ: 〒113-8421 文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部皮膚科学講座
稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 疫学調査担当 池田 志孝
電 話: 03-5802-1089
ファクシミリ: 03-3813-9443

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma, BCIE)
診断の手引き (平成 14 年 12 月)

(厚生労働省特定疾患研究、皮膚・結合組織研究班、稀少難治性皮膚疾患分科会版)

1) 概念

常染色体優性遺伝性疾患。出生時から全身の皮膚にびまん性の潮紅と鱗屑を認め、水疱形成も伴う。組織学的には顕著な角質増殖と顆粒変性が特徴的である。ケラチン 1 ないし 10 の遺伝子変異による。

2) 診断の手引き

- a) 生下時より生じる全身性びまん性潮紅。
- b) 機械的刺激を受ける部位に弛緩性水疱と浅いびらんを生じる。
- c) 小児期以後、成長とともに水疱形成は減少する。
- d) 成長とともに全身の潮紅も減弱するが、一方全身の角質増殖、鱗屑が顕著になる。
- e) 関節屈側では角質肥厚が顕著で、灰褐色調、粗造、疣状、豪猪皮状になる。
- f) 掌蹠の角化は強い例から正常例まで、様々である。
- g) 組織学的には、光顕では著明な過角化と表皮肥厚、顆粒変性（有棘層上層から顆粒層にかけて表皮細胞の核周囲の空胞と粗大なケラトヒアリン顆粒がみられ、細胞内浮腫が顕著）がみられる。
- h) 電顕的には、有棘細胞、顆粒細胞の細胞質内にケラチン線維の大小の凝集塊が見られる。

3) 亜型

Siemens 型水疱性魚鱗癬は上記の症状が軽度な亜型であり、ケラチン 2e 遺伝子の変異により生じる。

4) 鑑別診断—以下の疾患を除外出来ること。

葉状魚鱗癬、非水疱型魚鱗癬様紅皮症、先天性表皮水疱症、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 全国疫学調査個人票

厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業
「稀少難治性皮膚疾患調査研究班」
「特定疾患の疫学に関する研究班」

貴施設名

所在地

記載者御氏名

記載年月日: 2003年 月 日

担当科名: 1.皮膚科 2.その他()

この票は実態把握のためにのみ使用し、個人の秘密は厳守します。該当する番号を選択、またはご記入下さい。

貴院の患者コード*		性 別	1.男 2.女	貴施設 通し番号**	
生年月日	(1.明治 2.大正 3.昭和 4.平成)	年	月	日	現在の年齢 歳
患者の現住所	1.()都道府県()市郡区 2.不明				
家族歴 (同症)	1.なし 2.あり→ 3.不明	家族例の場合【J-1の子】の様に御記載ください。 【 の 】		家族図を御記入戴ければ幸いです。	
	続柄	1.父 2.母 3.兄弟 4.姉妹 5.その他()			
医療費の公費負担	1.なし 2.あり→ 3.不明	a.特定疾患治療研究費〔病名: ()〕 b.その他()			
受療状況 (最近1年間)	1.主に入院 2.主に通院 3.入院と通院 4.転院(転院先: ()) 5.死亡 6.その他() 7.不明				
入院回数	1.貴施設()回 2.他施設()回 3.不明	推定発症年月	平成	年	月・不明
初診医療機関	1.貴施設 2.他施設 3.不明	貴施設初診年月	平成	年	月・不明
診断した医療機関	1.貴施設 2.他施設 3.不明	確定診断年月	平成	年	月・不明
症 状	皮疹の分布	1.全身性 2.限局性(部位: ())		紅皮症	1.なし 2.あり
	水疱形成の時期	1.新生児期のみ 2.新生児期以降にもあり			
	水疱形成部位	1.全身性 2.限局性(部位: ())			
	鱗屑の性状	1.豪猪皮状 2.大型 3.細かい		鱗屑の剥脱	1.なし 2.あり
	鱗屑の色	1.褐色 2.白色		環状の皮疹	1.なし 2.あり
	掌蹠角化	1.なし 2.あり→(表面の性状: 1.スムーズ 2.線状 3.脳回転状 4.細鱗屑)			
	手指の拘攣	1.なし 2.あり→(部位: ())			
	姿勢の異常	1.なし 2.あり→(状態: ())			
歩行障害	1.なし 2.あり	コロジオンベイビーであったか		1.ない 2.あった	
病理組織学検査	1.なし 2.あり→(顆粒変性: 1.なし 2.あり)				
転 帰 (最終受診時)	最終受診日: 平成()年()月()日 1.治療 2.改善*** 3.不変*** 4.悪化*** 5.死亡				***診断時と比較

* 貴院で無作為にコードを作成し、御記入下さい(例、J-1など)

**複数の症例がある場合に貴院で通し番号を作成してご記入下さい。

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

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）に特徴的な過角化の形成機構の解析
コルネオデスモゾームの異常

分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 K1, K10 のロッドドメインの異常による疾患である、BCIE における角質肥厚の機序を探る目的で、患者表皮のコルネオデスモゾームについて調べた。BCIE 4 例において電顕的にコルネオデスモゾームの形態異常がみられた。K1 のテールドメインの変異による角化異常症である Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬のコルネオデスモゾームを観察したところ、BCIE と同様に角化細胞が扁平化せずに角化する部位では異常がみられた。しかし、扁平化する部位では正常であった。よって、K1, K10 変異による角質肥厚のみられる疾患では、細胞骨格の異常によって角質化の前の細胞形態の変化が不十分である場合にコルネオデスモゾームが病的となる可能性が考えられた。また、コルネオデスモゾームに特異的なタンパクであるコルネオデスモシンの抗体の作成に成功し、この特異性をイムノブロット法により確認し、BCIE 表皮における分泌障害を示唆する所見が得られた。

共同研究者

岸部麻里

旭川医科大学医学部皮膚科大学院生

飯塚一

旭川医科大学医学部皮膚科教授

秋山真志

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学

分野講師

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

A. 研究目的

本研究の目的は水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の病態形成機構をあきらかにするために角層肥厚の機序について検討することである。BCIE はケラチン 1 もしくは 10 のロッドドメインの変異による重篤な角化異常症である。デスモゾームは表皮角層ではコルネオデスモゾームと呼ばれる特殊な形態をとり、その形成と分解は角層接着、剥離を制御していると考えられてい

る。我々は本研究の第 1、2 報において BCIE 2 例の角層のコルネオデスモゾームの形態異常がみられることを報告した。今回はさらに症例を加えてコルネオデスモゾームの形態を検討した。

また、BCIE とは異なる種類のケラチン変異、すなわち K1 のテールドメインの変異による角化異常症である Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬のコルネオデスモゾームを観察し、BCIE での結果と比較検討した。

さらに、前年度までに作成したコルネオデスモゾームに局在するタンパクであるコルネオデスモシン（CDSN）に対する抗体の特異性をイムノブロット法により確認した。また、この分子の発現を BCIE 表皮において検討した。

B. 研究方法

透過電顕法は常法によった。BCIE 患者材料は北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学で作成されたものである。Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬患者材料は旭

川医大皮膚科で作成したものである。

免疫ブロット法：CDSNの中央部分に相当する14個のアミノ酸とそのC末端にCを付加したペプチド（CAAGPPISEG KYFSS）を抗原として、得られた抗血清を、上記ペプチドをもちいてアフィニティ精製し、正常表皮抽出液を用いて常法により免疫ブロットを施行した。

免疫組織化学法：無固定皮膚を凍結固定、凍結置換しLowicryl K11M樹脂に包埋し、準超薄切片を作成、CDSN抗体（500倍希釈）と反応後、5 nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG（Amersham, Buckinghamshire, UK）にて標識し、免疫ゴールドシルバーステインング法によって増感、可視化した。

C. 研究結果

BCIE患者角層を電顕的に観察し、コルネオデスモゾームの形態的異常が、第2報と合わせて合計4例で共通して見出された（図1, 2）。すなわち、電子密度の不均一性、形状の変化などである。

我々の作製したCDSN抗体は免疫ブロット法において、表皮の約50kDaのCDSNに相当すると考えられる蛋白を認識した。またBCIE患者角層の一部の細胞質がCDSN陽性であり、本症における層板顆粒の放出が不完全である可能性が示唆された（図3）。K1のテールドメインの変異による角化異常症であるCurth-Macklin型豪猪皮状魚鱗癬のコルネオデスモゾームを観察したところ、角化細胞の分化にともなう形態変化の異常の度合いによって異なる結果が得られた（図4-7）。すなわち、BCIEと同様に角化細胞が扁平化せずに角化する部位では異常がみられた（図6）。しかし、扁平化する部位ではほぼ正常であった（図7）。

D. 考察

BCIE患者角層を電顕的に観察し、コル

ネオデスモゾームの形態的異常を見いだした。これは第2報と合わせて合計4例で共通であった。比較対照疾患として選んだCurth-Macklin型豪猪皮状魚鱗癬は、K1のテールドメインの変異による角化異常症である。本症患者のコルネオデスモゾームを観察したところ、BCIEと同様に角化細胞が扁平化せずに角化する部位では異常がみられた。しかし、扁平化する部位では正常であった。よって、K1, K10変異による角質肥厚のみられる疾患では、細胞骨格の異常によって角質化の前の細胞形態の変化が不十分である場合に、コルネオデスモゾームが異常となる可能性が考えられた。

CDSNは層板顆粒に含まれるタンパクである。我々の作製した抗体はCDSN特異的と考えられた。この抗体を用いた免疫組織化学法によって、BCIEにおける層板顆粒の放出障害が示唆された。これも、ケラチン細胞骨格の異常によって細胞の扁平化に伴う層板顆粒の放出が損なわれるためと考えられる。

E. 結論

我々のこれまでの研究によってBCIEにおける角質肥厚にコルネオデスモゾームの形成異常が関与していることが示唆された。これは角化細胞の細胞骨格の異常によって角化に伴う細胞の形態変化がそなわれるために、層板顆粒の放出が異常になるためである可能性が考えられた。我々が作成したCDSN抗体はこの点をさらに明らかにするための有力な情報を与えると期待できる。今後はBCIEおよび他の角化異常症においてCDSN、その他の層板顆粒およびコルネオデスモゾーム関連分子の発現とその分布を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Ishida-Yamamoto A, Loricrin keratoderma. A novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin. **Journal of Dermatological Science** 31:3-8, 2003
2. Ishida-Yamamoto A, Richard G, Takahashi H, Iizuka H. In vivo studies of mutant keratin 1 in ichthyosis hystrix Curth-Macklin. **J Invest Dermatol** 120:498-500, 2003
3. Ishii N, Nakane H, Ishida-Yamamoto A. Application and limitations of three-dimensional reconstruction of the epidermal-dermal junction using electron microscopy. **J Dermatol Sci** 32:231-235, 2003
4. Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, Miyauchi Y, Takahashi H, Yoshida S, O'Brien TJ, Serre G, Iizuka H. Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. **J Invest Dermatol** in press
5. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T, Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. **Clin Exp Dermatol** 29: 62-66, 2004

日本語論文

1. 山本明美 角化症 ダイナミックメディシン7. 下条文武、斉藤康、監修、西村書店、新潟、p48-52 2003
2. 山本明美 魚鱗癬 今日の小児治療指針 第13班、大関武彦、他編、医学書院、東京、p572 2003
3. 山本明美 類乾癬 皮膚科 専門医に

きく最新の臨床、玉置邦彦、他編、中外医学社、東京、p28-29 2003

2. 学会発表

1. 山本明美 ロリクリン異常症 日本皮膚科学会第289回長崎地方会(特別講演) 2003.4.13, 長崎市
2. A Ishida-Yamamoto, S Yoshida, TJ O'Brien, G Serre, M Simon, H Iizuka Lamellar granule proteins are sequentially synthesized and transported through the trans-Golgi network in keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003 2003.4.30-5.4, Miami Beach, Florida USA
3. 山本明美、飯塚 一 表皮層板顆粒形成機構の形態的解析 第18回角化症研究会 2003. 8. 9. 東京都
4. 山本明美 電顕をつかって角化と角化症の謎をとく 第30回日本電顕皮膚生物学会(第30回記念企画) 2003. 9. 12, 金沢市
5. 山本明美 病理組織標本にみられる表皮文化の異常とその背景 平成15年度頭部支部企画前実績講習会 2003.9. 26, 旭川市
6. 山本明美、飯塚 一 層板顆粒のcryoultramicrotomy法による研究 第17回表皮細胞研究会 2003.10.18, 角館町
7. 山本明美 角化の常識の検証 第67回日本皮膚科学会東京支部学術大会(教育講演) 2004.2.15, 東京都

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

図とその説明



正常対照皮膚

図1 (上)BCIE 症例 3。25歳、女性の電顕像。コルネオデスモゾームの電子密度が不均一で形もいびつである(→)。ケラチン変異 K10 M150T。腕より生検した。(下) 正常皮膚におけるコルネオデスモゾーム(→)。



図2 BCIE 症例 4。1ヶ月、男児の電顕像。ケラチン変異：K10 L153V。生検部位：不明。コルネオデスモゾームの形態が異常である(→)。

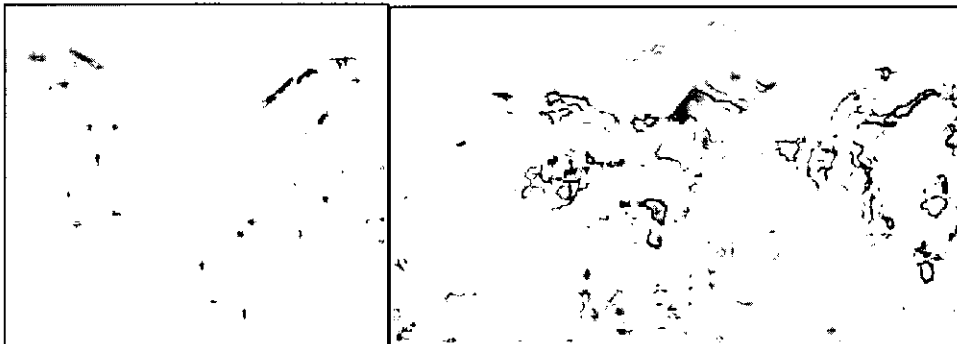


図3 (左)正常表皮と(右)BCIE 患者表皮における CDSN の発現。前者では顆粒細胞の胞体のみが陽性であるが、後者では角層と顆粒細胞の細胞質が陽性になっている。

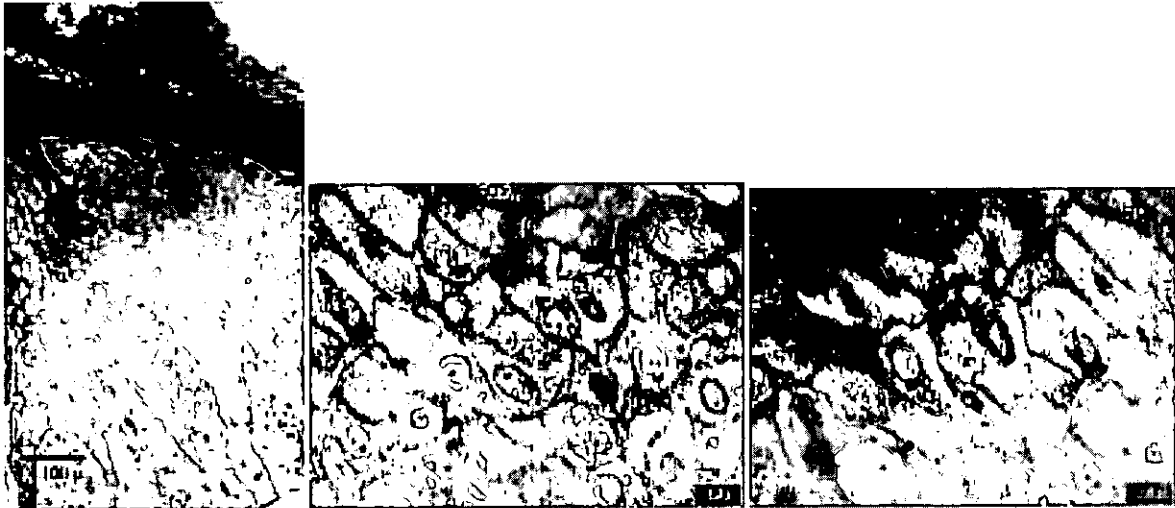


図4 Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬の準超薄切片。(左)弱拡大像。(中、右)角化細胞が扁平化せずに角化する部位。



図5 Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬の準超薄切片。角化細胞が扁平化した後に角化する部位。

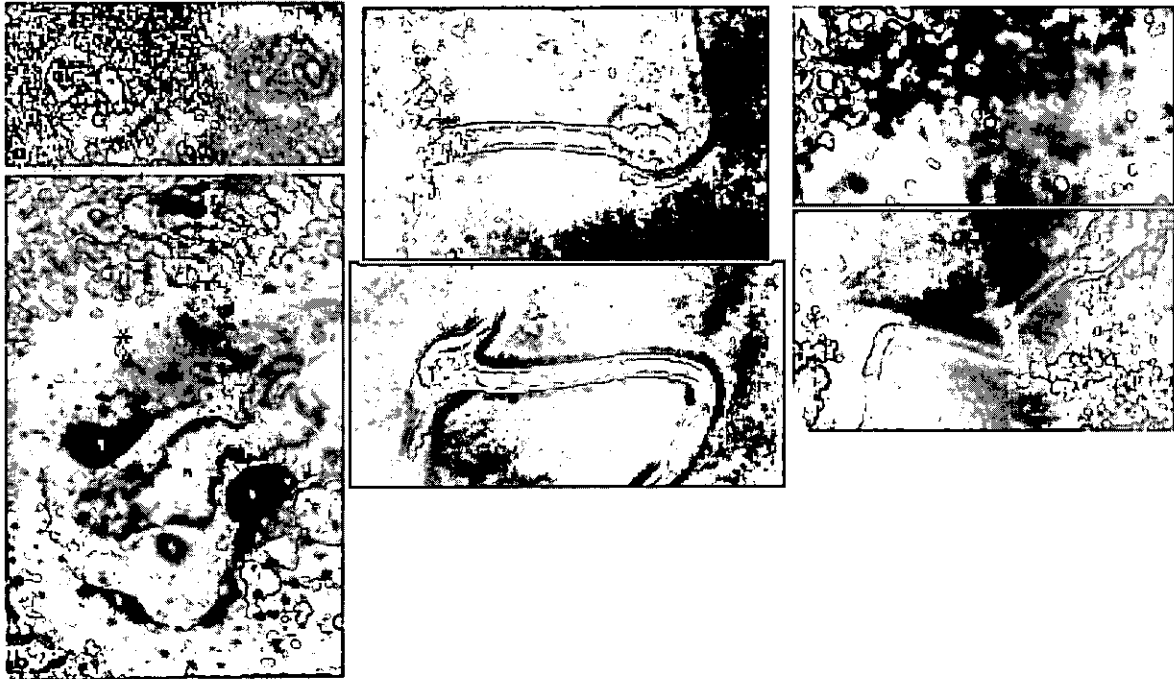


図6 Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬。角化細胞が扁平化せずに角化する部位。コルネオデスマゾームの形態に異常が見られる。

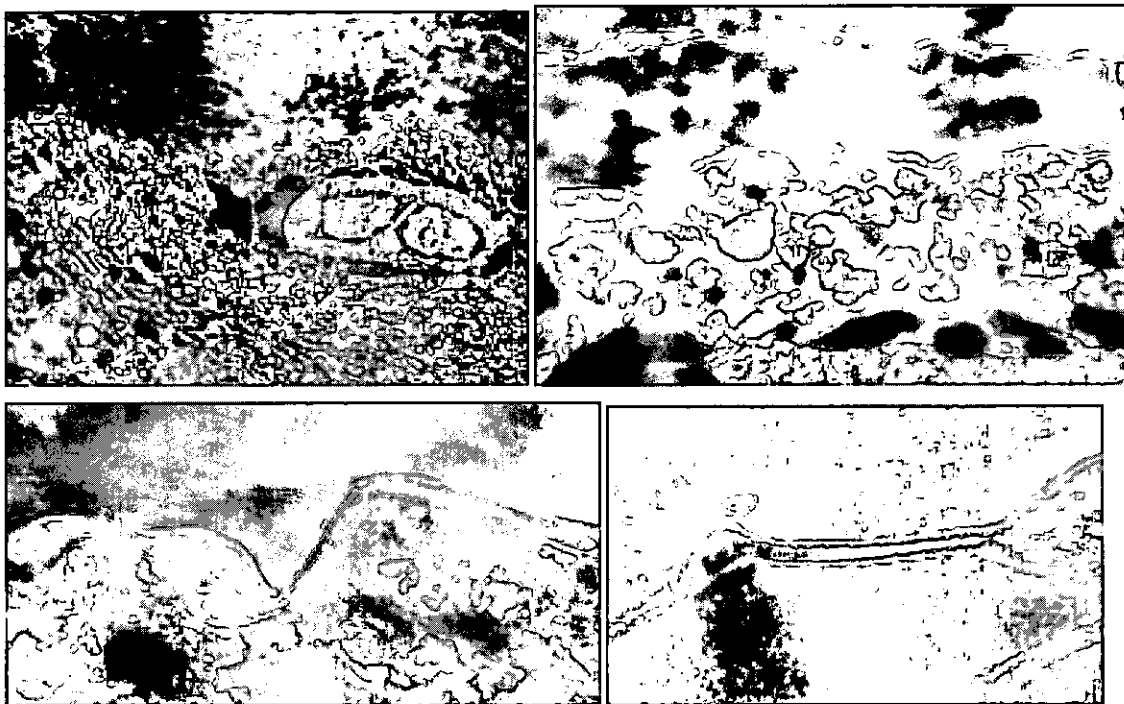


図7 Curth-Macklin 型豪猪皮状魚鱗癬。角化細胞が扁平化した後に角化する部位。コルネオデスマゾームの形態は正常である。

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

ケラチン病の発症機構に関する研究

研究協力者 米田耕造 秋田大学医学部感覚器学講座皮膚科学形成外科学講師

研究要旨 単純型表皮水疱症は、基底細胞においてケラチン中間径線維を構築するケラチン分子をコードする遺伝子に点突然変異あるいは欠失が生じ、結果的にケラチン線維構築が破綻し基底細胞が脆弱となることが発症原因と考えられてきた。今回われわれは、細胞質に変異ケラチン凝集塊が存在する角化細胞では、ER ストレスが生じていることを見つけた。かつ変異ケラチン凝集塊を持つ角化細胞では、TNF- α の産生が亢進していることも明らかにした。TNF- α の産生亢進には変異ケラチン凝集塊による 20S プロテアソームの機能抑制が直接関係していた。さらに、TNF- α の中和抗体を用いると角化細胞のアポトーシスが抑制された。これらの結果は、角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じると TNF- α が産生され、オートリン・パラクリン経路により角化細胞がアポトーシスにおちいることを示すものである。ケラチン病の原因として、変異ケラチン凝集塊を生じた角化細胞がアポトーシスにおちいるという現象も考慮すべきだと思われた。

共同研究者

真鍋 求 秋田大学医学部教授

稲垣暢也 秋田大学医学部教授

藤田幸子 秋田大学医学部皮膚科研究員

ン14の 125 番目の Arg が Cys に変化した変異 [K14 (R125C)], 270 番目の Val が Met に変化した変異 [K14 (V270M)], 384 番目の Leu が Pro に変化した変異 [K14 (V384M)] は PCR 法により作成した。

A. 研究目的

ケラチン病は、ケラチン遺伝子に点突然変異、欠失が入ることにより、正常なケラチン中間径線維が形成されなくなることが、原因と考えられてきた。正常なケラチン中間径線維が形成されない角化細胞は、外力に対する抵抗性が低下し、微細な外からの外力により、細胞が壊れやすくなる。しかしながら、細胞が壊れる過程に至る分子メカニズムについては、何も判明していない。この分子メカニズムを明かにすることを研究目的とした。

b) 細胞培養とトランスフェクション

ヒト表皮細胞由来である HaCaT 細胞を DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、100 units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、10%FBS を含む培地中で培養した。HaCaT 細胞はトランスフェクションの前日に継代した。DNA トランスフェクションには、Lipofect AMINE plus 試薬 (Invitrogen) を用いた。トランスフェクション後48時間培養した後、細胞を実験に用いた。

B. 研究方法

a) プラスミド作製

野生型ケラチン14 [K14 (WT)] の cDNA をほ乳類発現ベクターである pcDNA 3.1/V5-His ベクターに挿入した。ケラチ

c) 一次抗体

抗 V5 抗体は Invitrogen 社より購入した。抗 cleaved caspase-3 抗体、抗 cleaved caspase-8 抗体、抗 cleaved caspase-9 抗体、抗 caspase-12 抗体は Cell Signaling

社より購入した。

d) 蛍光抗体法

トランスフェクション後48時間カバーガラス上に培養した HaCaT 細胞を -20°C メタノールで10分間固定した。適当な倍率に希釈した上記の一次抗体を 4°C 一晩反応させ、それぞれに対応する FITC ラベルあるいはローダミンラベル二次抗体を用いて染色した。

e) 免疫ブロット法

トランスフェクション後48時間培養した HaCaT 細胞を Laemmli buffer に溶解し、氷上で30分静置した。15000回転で1分間遠心後、上清を回収した。蛋白濃度は Bradford 法を用いて測定した。30 μg の量の蛋白質を SDS-PAGE に展開し、その後、蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を、上記の一次抗体で、室温で2時間反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用して目的とする蛋白質を検出した。

f) Annexin-V および TUNEL 染色

トランスフェクション後48時間培養した106個の HaCaT 細胞を FITC ラベル annexin-V と室温で15分反応させた後、フローサイトメーターでアポトーシスに陥っている細胞を検出した。TUNEL 染色は Intergen 社の ApopTag アポトーシス・ダイテクション・キットを用いて施行した。

g) TNF α 測定

培養液中の TNF α は BioSource 社のソリッドフェーズ Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay キットを用いて測定した。

C. 研究結果

Annexin-V 染色を施した HaCaT 細胞をフローサイトメーターで検索したところ、

K14 (R125C), K14 (V270M), K14 (V384M) をトランスフェクションした細胞では、K14 (WT) をトランスフェクションした細胞に比較してアポトーシスに陥っている細胞が有意に増加していた。この結果は TUNEL 染色でも確認した。

蛍光抗体法と免疫ブロット法を用いた検索により (アポトーシスに陥っている細胞では) カスパーゼ3とカスパーゼ8が活性化されていることが判明した (図)。

K14 (R125C) をトランスフェクションした細胞では、K14 (WT) をトランスフェクションした細胞に比較して培地中の TNF α 量が増加していることが判明した。

D. 考察

ケラチン病の代表的疾患である単純型先天性表皮水疱症は、ケラチン14蛋白質の変異により生じることが分かっている。変異ケラチン14cDNA をトランスフェクションした細胞では、TNF α 産生が増加していることおよび細胞自身がアポトーシスに陥っていることが判明した。近年ケラチン8およびケラチン18蛋白質は、肝細胞において TNF α により誘導されるアポトーシスを抑制することが証明された。今回の研究結果より単純型先天性表皮水疱症の病変皮膚で観察される細胞の空胞変性にアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

E. 結論

単純型先天性表皮水疱症に代表されるケラチン病の発症機構にアポトーシスが関与する可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表

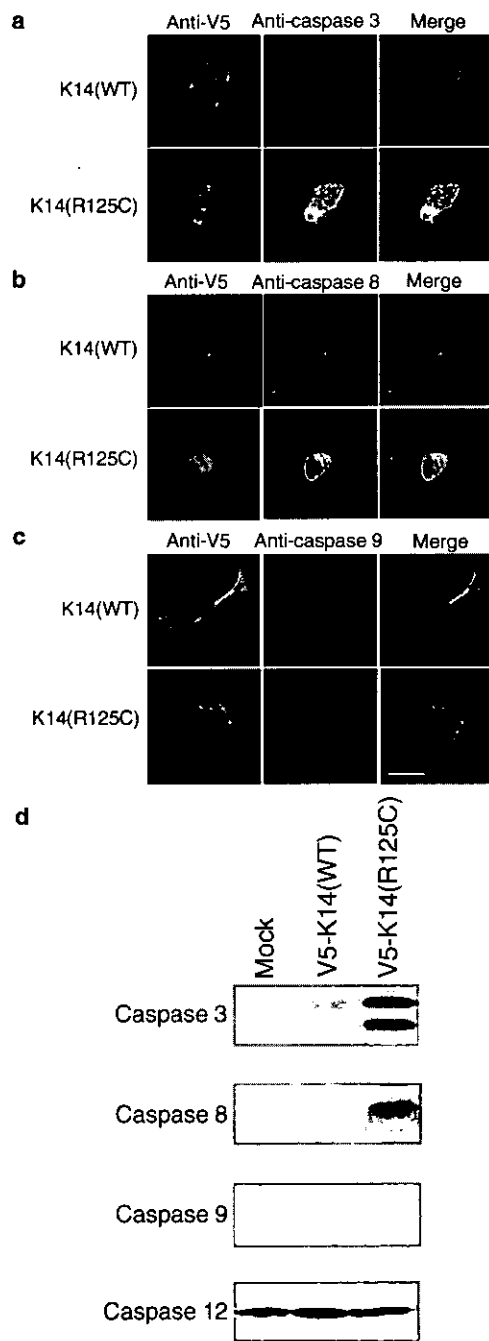
英語論文

Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ,

Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N: An Autocrine/Paracrine Loop Linking Keratin 14 Aggregates to Tumor Necrosis Factor {alpha}-mediated Cytotoxicity in a Keratinocyte Model of Epidermolysis Bullosa Simplex. *J Biol Chem* 279:7296-7303, 2004

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

図の説明：K14 (R125C) 細胞におけるカスパーゼの活性化。(Yoneda K et al, J Biol Chem 279:7296-7303, 2004 より転載)



[IV]

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌

著者名	論文題目	雑誌名	巻：頁、西暦年号
Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, Wess J, Beaudet AL, Kitajima Y, Grand SA	Synergistic control of epithelial cell adhesion through muscarinic and nicotinic subtypes of cholinergic receptors	Exp Cell Res	in press
Ban M, Ichiki Y, Kitajima Y	An outbreak of eruptive pseudoangiomatosis-like lesions due to mosquito bites : erythema punctatum Higuchi	Dermatology	in press
Izumi T, Ichiki Y, Esaki C, Kitajima Y	Monitoring of ELISA for anti-BP180 Antibodies: Clinical and therapeutic analysis of steroid treated patients with bullous pemphigoid	J Dermatol	in press
Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grand SA	Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes	J Biol Chem	279(3) : 2135-2146, 2004
Kitajima Y	Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus	Arch Dermatol Res	295 : S17-S23, 2003
Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grand SA	Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion	Life Sciences	72 : 2081-2085, 2003
Siegel DH, Ashton GHS, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJD, Prescott AR, Wessagowit V, Oyama N, Akiyama M, Aboud DA, Aboud KA, Githami AA, Hawsawi KA, Ismaily AA, Suwaid RA, 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, Zaghoul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RAJ, McLean WHI, McGrath JA, Epstein, Jr EH	Loss of kindlin-1, a human homolog of caenorhabditis elegans actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes kindler syndrome	Am J Hum Genet	73 : 174-187, 2003
Ban M, Sugie S, Kamiya H, Kitajima Y	Microcystic adnexal carcinoma with lymph node metastasis	Dermatology	207 : 395-397, 2003
Kamiya H, Araki M, Kitajima Y	Nodular fasciitis of the cheek	Eur J Dermatol	13 : 189-191, 2003
Kamiya H, Kitajima Y	Successful use of preserved sclera in five cases of eyelid reconstruction and a detailed report of one representative case	Eur J Dermatol	13 : 267-271, 2003
Kamiya M, Ichiki Y, Kamiya H, Yamamoto A, Kitajima Y	Detection of nonmelanoma skin cancer micrometastases in lymph nodes by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction for keratin 19 mRNA	Br J Dermatol	149(5) : 998-1005, 2003
Gu LH, Kim SC, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y	An unusual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5	J Invest Dermatol	21 : 482-485, 2003
北島康雄	先天性表皮水疱症	小児科診療 66(増刊)	123-127, 2003
Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, Hashimoto T, Yancey KB	A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy	J Dermatol	31(1):10-5, 2004
Umamoto N, Demitsu T, Toda S, Noguchi T, Suzuki SI, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T	Links No abstract A case of anti-p200 pemphigoid clinically mimicking inflammatory epidermolysis bullosa acquisita	Br J Dermatol	148(5):1058-1060, 2003
Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai M, Nagata Y, Strasz Z, Jablonska S	Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3	J Am Acad Dermatol	48:117-122, 2003

<u>Hashimoto T</u>	Recent advances in the study of pathophysiology in pemphigus (Review article).	Arch Dermatol Res	295:S2-S11, 2003
Lee JB, Fumimori T, Kurose K, Mori O, <u>Hashimoto T</u>	A case of bullous pemphigoid successfully treated by plasmapheresis: Assessment of the change in titers of circulating antibodies by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay	J Dermatol	30(4):326-31, 2003
Niimi Y, Kawana S, <u>Hashimoto T</u> , Kusunoki T	Paraneoplastic pemphigus associated with uterine carcinoma	J Am Acad Dermatol	48(5 Suppl):S69-72, 2003
Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanata S, <u>Hashimoto T</u> , Sijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H, Itoh K	IgG reactivity to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients	Tissue Antigens	61:352-361, 2003
Lee JB, Liu Y, <u>Hashimoto T</u>	Cicatrical pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180	J Dermatol Sci	32(1):59-64, 2003
McMillan JR, Matsumura T, <u>Hashimoto T</u> , 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(3):261-7, 2003
Umamoto N, Demitsu T, Toda S, Ohsawa M, Noguchi T, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, <u>Hashimoto T</u>	A Case of Nonscarring Subepidermal Blistering Disease Associated with Autoantibodies Reactive with Both Type VII Collagen and Laminin 5	Dermatology	207(1):61-64, 2003
Tsukada Y, Kawase MK, Murashima A, Kitahora T, <u>Hashimoto T</u> , Komai A	Bullous pemphigoid associated with dermatomyositis successfully controlled with minocycline	Clin Exp Dermatol	28(5):563-564, 2003
Abreu-Velez AM, Beutner EH, Montoya F, Bollag WB, <u>Hashimoto T</u>	Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia	J Am Acad Dermatol	49(4):609-14, 2003
Abreu-Velez AM, <u>Hashimoto T</u> , Bollag WB, Tobon Arroyave S, Abreu-Velez CE, Lóndono ML, Montoya F, Beutner EH	A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia	J Am Acad Dermatol	49(4):599-608, 2003
Hisamatsu Y, Nishiyama T, Amano S, Matsui C, Ghohestani R, <u>Hashimoto T</u>	Usefulness of immunoblotting using purified laminin 5 in the diagnosis of anti-laminin 5 cicatricial pemphigoid	J Dermatol Sci	33(2):113-9, 2003
Karlhofer FM, <u>Hashimoto T</u> , Slupetzky K, Kiss M, Liu Y, <u>Amagai M</u> , Pieczkowski F, Foedinger D, Kirnbauer R, Stingl G	230-kDa and 190-kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell-surface and basement membrane zone immune staining pattern	Exp Dermatol	12(5):646-54, 2003
Ohshima Y, Tamada Y, Matsumoto Y, <u>Hashimoto T</u>	Dermatitis herpetiformis Duhring with palmoplantar keratosis	Br J Dermatol	149(6):1300-1302, 2003
Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru C, <u>Hashimoto T</u> , Brocker EB, Butt E, Zillikens D	The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane.	J Invest Dermatol	121(6):1402-1408, 2003
Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, <u>Hashimoto T</u> , Yancey KB	A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy	J Dermatol	31(1):10-5, 2004
Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Nishifuji K, <u>Amagai M</u> , Stanley JR	Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1	J Biol Chem	in press
Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, <u>Amagai M</u> , Nishikawa T	IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model	J Invest Dermatol	in press
Preisz K, Horvath A, Sardy M, Somlai B, Harsing F, <u>Amagai M</u> , <u>Hashimoto T</u> , Nagata Y, Fekete S, Karpati S	Exacerbation of paraneoplastic pemphigus by cyclophosphamide treatment: Detection of novel autoantigens and bronchial autoantibodies	Br J Dermatol	in press
Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, <u>Amagai M</u> , Nishikawa T	A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice	Br J Dermatol	in press

Ohyama M, Ota T, Aoki M, Tsunoda K, Harada R, Koyasu S, Nishikawa T. and <u>Amagai M</u>	Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: An implication for gene therapy	J Invest Dermatol	120:610-615, 2003
Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, and <u>Amagai M</u>	Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3.	J Immunol	170:2170-2178, 2003.
<u>Amagai M</u>	Desmoglein as a target in autoimmunity and infection.	J Am Acad Dermatol	48:244-252, 2003
<u>Amagai M</u>	A mouse with an active disease as a model for pemphigus	Ann Dermatol Venereol	130:1176-1179, 2003.
Hisamatsu Y, Abreu Velez AM, <u>Amagai M</u> , Ogawa MM, Kanzaki T, <u>Hashimoto T</u>	Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques.	J Dermatol Sci	32:33-41, 2003
Nishifuji K, <u>Amagai M</u> , Ota T, Nishikawa T, Iwasaki T	Cloning of canine desmoglein 3 and immunoreactivity of serum antibodies in human and canine pemphigus vulgaris with its extracellular domains.	J Dermatol Sci	32:181-191, 2003
Ota T, <u>Amagai M</u> , Watanabe M, Nishikawa T	No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel diseases	J Dermatol Sci	32:137-141, 2003
Nishifuji K, <u>Amagai M</u> , Nishikawa T, Iwasaki T	Production of recombinant extracellular domains of canine desmoglein 1 (Dsg1) by baculovirus expression	Vet Immunol Immunopathol	95:177-182, 2003
Parlowsky T, Welzel J, <u>Amagai M</u> , Zillikens D, Wygold T	Neonatal pemphigus vulgaris: IgG4 autoantibodies to desmoglein 3 induce skin blisters in newborns	J Am Acad Dermatol	48:623-625, 2003
Futei Y, <u>Amagai M</u> , <u>Hashimoto T</u> , Nishikawa T	Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus	J Am Acad Dermatol	49:1023-1028, 2003
Nagao K, Ishiko A, Yokoyama T, Tanikawa A, <u>Amagai M</u>	A case of generalized pustular psoriasis treated with topical tacrolimus	Arch Dermatol	139:1219, 2003
Hacker-Foegen MK, Janson M, <u>Amagai M</u> , Fairley JA, Lin MS	Pathogenicity and epitope characteristics of anti-desmoglein-1 from pemphigus foliaceus patients expressing only IgG1 autoantibodies	J Invest Dermatol	121:1373-1378, 2003
天谷雅行	ELISAによる天疱瘡自己抗体価測定法	臨床皮膚科	印刷中, 2004
天谷雅行	水疱性疾患の自己抗体	臨床検査	印刷中, 2004
天谷雅行	炎症性皮膚疾患の動物モデル: 天疱瘡.	アレルギー科	印刷中, 2004
天谷雅行:	ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群: SSSS.	小児科診療	67: 391-395, 2004
天谷雅行	黄色ブドウ球菌毒素 ET の標的分子	Medical Science Digest	29: 254-255, 2003
天谷雅行	最新の臨床検査 - 天疱瘡の新しい血清診断法: Dsg1, Dsg3 ELISA 法-	SRL 宝南	27: 66-72, 2003
天谷雅行	自己免疫水疱症の最新情報	日本医師会雑誌	129: 1425-1429, 2003
天谷雅行	デスマグレインテスト「Dsg3」「Dsg1」について	皮膚病診療	25: 1058-1060, 2003
天谷雅行	デスマグレインを標的とする疾患: 天疱瘡とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群	日本皮膚科学会雑誌	113: 1947-1948, 2003
天谷雅行	自己免疫性水疱症	皮膚臨床	43: 1343-1349, 2003
Tojo M, Kiyosawa H, <u>Iwatsuki K</u> , Nakamura K, Kaneko F	Expression of the GLI2 oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma	Br J Dermatol	148: 892-897, 2003
Akiyama H, Hamada T, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W and <u>Iwatsuki K</u>	Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by Staphylococcus aureus in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus	Br J Dermatol	148: 526-532, 2003
Akiyama H, Morizane S,	Assessment of Streptococcus pyogenes	J Dermatol Sci	32: 193-199, 2003

Yamasaki O, Oono T, <u>Iwatsuki K</u>	microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy		
Oono T, Huh W-K, Shirafuji Y, Akiyama H, <u>Iwatsuki K</u>	Localization of human beta-defensin -2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis	Br J Dermatol	148: 188-190, 2003
Katagiri Y, Mitsuhashi Y, Kondo S, Kanazawa C, <u>Iwatsuki K</u> , Tsunoda T	Hydroa vacciniforme-like eruptions in a patient with chronic active EB virus infection	J Dermatol	30: 400-404, 2003
Kawakami Y, Nishibu A, Kikuchi S, Ohtsuka M, Nakamura K, Nozawa Y, Abe M, <u>Iwatsuki K</u> , Kaneko F	Multicentric Castleman's disease associated with inherited epidermolysis bollosa	J Dermatol	3: 689-693, 2003
Kunisada M, Adachi A, Matsumoto S, Ogawa Y, Horikawa T, <u>Iwatsuki K</u>	Nasal-type natural killer cell lymphoma preceded by benign panniculitis arising in an asymptomatic HTLV-1 carrier.	Int J Dermatol	42: 710-714, 2003
瀧川雅浩, 川島 真, 古江増隆, 飯塚一, 伊藤雅章, 中川秀己, 塩原哲夫, 島田眞路, 竹原和彦, 宮地良樹, 古川福実, 岩月啓氏, 橋本公二, 片山一朗	アトピー性皮膚炎の診療に対する医師の認識についてのアンケート調査 (第3報)	臨床皮膚科	57:343-352, 2003
高橋祥子, 藤井一恭, 辻 和英, 岩月啓氏	シックハウス症候群・皮膚科学の見地から	アレルギー・免疫	10: 1585-1594, 2003
安藤典子, 小川陽一, 水谷三記子, 北嶋敏之, 島田眞路, 柳 光章, 寺本輝代, 岩月啓氏	鼻腔内浸潤を伴った blastic NK cell lymphoma の1例	Skin Cancer	18:66-69, 2003
瀬津名美子, 浅越健治, 原 香津恵, 荒田次郎, 岩月啓氏	骨破壊を伴い再発した仙骨部の verrucous carcinoma・局所浸潤についての免疫組織学的考察	Skin Cancer	18: 174-178, 2003
鈴木大介, 山本剛伸, 木村恵美子, 牧野英一, 秋山尚範, 岩月啓氏, 小野公義, 山田 琢	Blastic NK cell lymphoma の1例	Skin Cancer	18: 222, 2003
大塚幹夫, 岸本和裕, 紺野嘉直, 今泉桂, 佐藤正隆, 金子史男, 北條 洋, 阿部正文, 岩月啓氏.	Marginal zone B-cell lymphoma (MZL)と angioimmunoblastic T cell lymphoma(AILD)の組織像を示した composite lymphoma ?	Skin Cancer	18: 224, 2003
森寶 真, 山田 潤, 山本剛伸, 大野貴司, 岩月啓氏	平滑筋母斑の1例	皮膚科の臨床	45: 988-989, 2003
笹木慶子, 山本剛伸, 濱田利久, 藤本亘, 岩月啓氏, 荒田次郎	Erythrodermic actinic reticuloid・セザリー症候群との鑑別を中心に	西日本皮膚科	65:15-19, 2003
岩月啓氏	種痘様水疱	Visual Dermatol	2: 434-435, 2003
岩月啓氏	紅皮症型光線性類細網症	Visual Dermatol	2: 456-457, 2003
岩月啓氏	EB ウイルス感染症と皮膚疾患 (上)	日本醫時新報	4135: 33-36, 2003
岩月啓氏	EB ウイルス感染症と皮膚疾患 (下)	日本醫時新報	4136: 33-36, 2003
岩月啓氏	蚊刺過敏症、種痘様水疱症とリンパ腫	毎日ライフ	10: 39-42, 2003
岩月啓氏	EB ウイルス感染症	MB Derma	78:49-60, 2003
岩月啓氏	いわゆるシックハウス症候群と皮膚・粘膜症状	Aesthet Dermatol	13: 146-153, 2003
東條理子, 岩月啓氏	光線性類細網症と薬剤誘発性偽リンパ腫	MB Derma	71:69-78, 2003
山本剛伸, 岩月啓氏	EB ウイルスと皮膚悪性リンパ腫	Medicina	40:18-1021, 2003
秋山尚範, 岩月啓氏	トキシックショック症候群	救急医学	27: 552-554, 2003
秋山尚範, 岩月啓氏	伝染性膿痂疹、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、猩紅熱	小児科診療	66:増刊 201-208, 2003
秋山尚範, 岩月啓氏	外用副腎皮質ホルモン薬	外科治療	88:969-972, 2003
秋山尚範, 大野貴司, 岩月啓氏	MRSA 感染症の対処法	MB Derma	76:67-73, 2003
秋山尚範, 岩月啓氏	皮膚の劇症型感染症	MB Derma	78:別冊 1-10, 2003
秋山尚範, 岩月啓氏	伝染性膿痂疹	皮膚科の臨床	45:1475-1481, 2003
松浦浩徳, 岩月啓氏	中毒疹・薬疹	救急医学	27: 582-583, 2003
山崎 修, 岩月啓氏	細菌感染	MB Derma	75:55-60, 200
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
Arita K, Akiyama M, Sakai T, Shimizu H	Severely hyperkeratotic erythroderma associated with Hogkin's disease-Dose high serum G-CSF contribute to the formation of skin lesions?	J Am Acad Dermatol	in press
Arita K, Akiyama M, Tsuji Y,	Squamous cell carcinoma in a patient with	Br J Dermatol	in press