

った。これは患者病変部の電顕像でトノフィラメントの異常凝集塊がみられなかった結果と一致する。また K14 との二重染色では、K14 と導入蛋白の局在が一致し変異 K5 もケラチンヘテロダイマーに組み込まれていることが確認された。これらの結果は、この変異がケラチン線維形成には大きく影響しないことを示唆している。

EBS は皮疹の分布や電顕所見などから、主として Weber-Cockayne 型、Köbner 型、Dowling-Meara 型の 3 型に分類されるが、最も重症型の DM 型ではケラチンフィラメント構築に関係する α ヘリックス構造の両端の保存された領域に遺伝子変異が集中し、一方軽症の WC 型では α ヘリックス構造の 1B, 2A をつなぐ linker に多く見られる。今回の検討でこれまでに報告の殆どない V2 の変異がケラチンフィラメント形成には影響しないことが示された。

しかし自験例に認められた C 末に近い変動領域である V2 の変異は、我々の 3 例と、2003 年 Sprecher らにより報告された 25 才女性例の 1635delG および堀口の 25 才女性例の 1649delG の計 5 例である。Sprecher の症例においてその臨床像の詳しい記載がないため自験例に見られた遠心性紅斑の有無については不明であるが、堀口例では興味深いことに小斑状の色素沈着を示す mottled pigmentation type (EBS-MP) であった。この EBS-MP は殆どの例で H1 ドメインに P25L 変異を認めているが、メラノサイトでのメラニン輸送に関わるダイニンがこの領域に結合することが最近明らかにされ、ケラチン遺伝子変異と色素異常の関連が注目されている。P25L 変異を認める EBS-MP と自験例を比較すると、変異がケラチン 5 分子の同じ非 α ヘリックス構造領域であること、また水疱形成後にまだらな色素沈着を残している点で共通しており、本症例で今後さらにダイニンなども含めたケラチンアソシエート蛋白との関係を解明する必要がある。す

なわち本症例の病態を解明することが、ケラチン分子の非 α ヘリックス構造領域の機能を明らかにし、さらにケラチン病発症機序の解明につながる可能性を示唆している。

E. 結論

K5 の 1649delG 変異によっておこる遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症の発症メカニズムを解明する目的で変異 K5 を pCMV ベクターを用いて種々の培養ケラチノサイト (HaCaT, DJM-1, NHEK) にトランスフェクションし形態的異常を観察した。wild type に比べ変異 K5 遺伝子を導入した HaCaT, DJM-1 でケラチン凝集塊が多い傾向があったが有意差はなかった。NHEK では凝集塊に差はなかった。これは 1649delG がケラチンフィラメント形成には大きく影響しないことを示唆している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

1. Tomoko Izumi, Yoshiro Ichiki, Chikako Esaki, Yasuo Kitajima: Monitoring of ELISA for Anti-BP180 Antibodies: Clinical and Therapeutic Analysis of Steroid-Treated Patients with Bullous Pemphigoid. *J Dermatol* 31:383-91, 2004.
2. M Nagao-Watanabe, T Fukao, E Matsui, H Kaneko, R Inoue, N Kawamoto, K Kasahara, M Nagai, Y Ichiki, Y Kitajima, N Kondo: Identification of somatic and germline mosaicism for a keratin 5 mutation in epidermolysis bullosa simplex in a family of which the proband was previously regarded

as sporadic case. **Clin Genet** 66:
236-8, 2004.

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

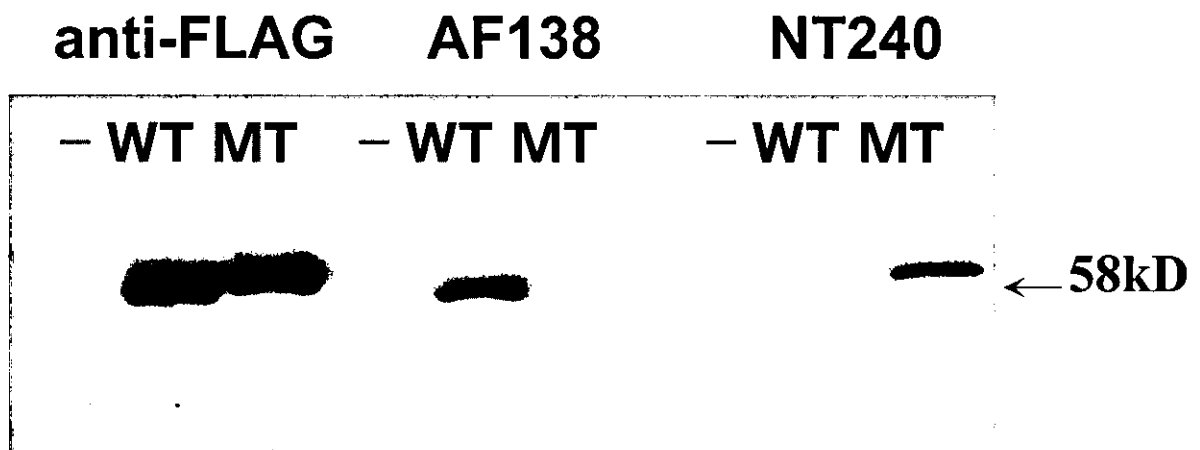


図1 抗FLAG抗体ではWT(58kD),MT(60kD)各々にバンドを認めた。一方正常K5を認識するAF138はWTのみを、また変異K5を認識するNT240はMT K5のみにバンドを認めた。

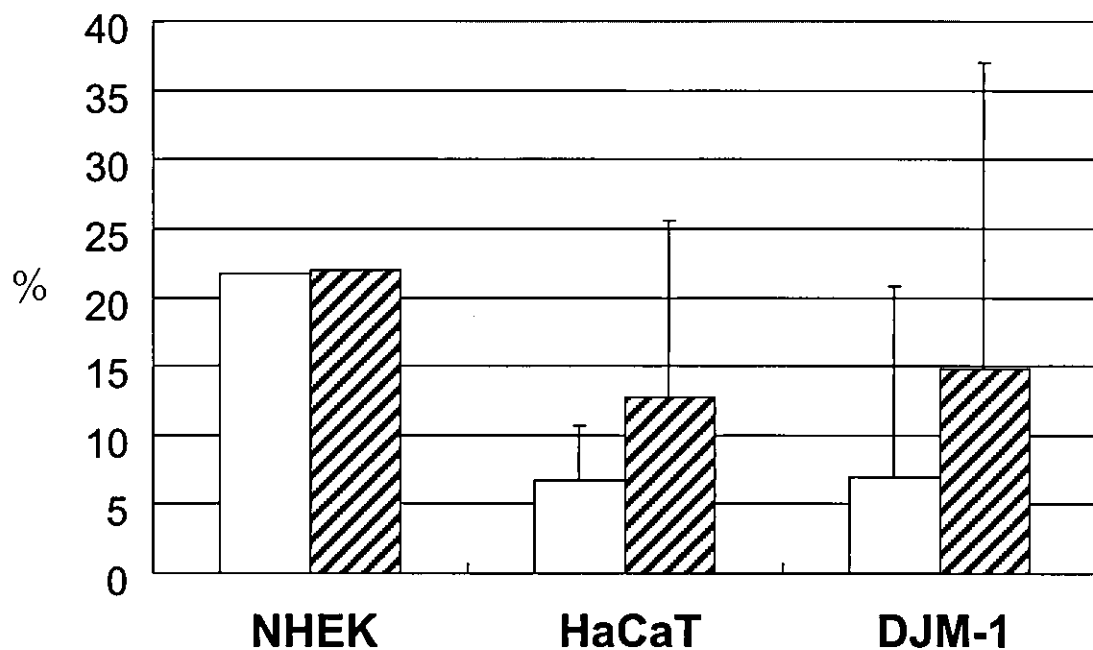


図2 MT K5, WT K5 いずれにおいてもケラチン凝集塊が認められ、NHEK では同等に、HaCaT, DJM-1 ではMT K5 に多い傾向が見られた。

anti FLAG

anti FLAG+anti K14



図3 DJM-1 へのトランスフェクション後に anti FLAG と K14 で二重染色すると、WT, MT ともに導入蛋白と K14 の局在が一致した。

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

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）における表皮層板顆粒系の解析

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 層板顆粒は正常では表皮の顆粒細胞が角層細胞に分化する際に細胞外に分泌されるが、BCIE患者の角層内においては一部の顆粒が分泌されずに残っていることが確認された。また層板顆粒内のタンパク分解酵素（KLK5, KLK7）とそのインヒビター（LEKTI）がどのように発現、分泌されるか、正常表皮をもちいて検討したところ、前者は后者よりかなり遅い段階で発現、分泌されることが示された。以上のことからBCIEにおいてはケラチン線維の異常によって角化細胞の形態変化にともなう層板顆粒の分泌過程が2次的に障害され、特にその後半に分泌されるタンパク分解酵素の供給が不十分となり、角層細胞間のデスモゾームの分解過程が遅延すると推定された。

共同研究者

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
講師

清水宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学
教授

PBS で洗浄した。その後 Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG highly cross-absorbed (Molecular Probes, Eugene, OR), Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) と37°C、30分反応、同時に ToPro 3 (Molecular Probes) もしくは PI による核染色を施し、PBS 洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV500, Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

免疫電顕：Post-embedding 法は無固定の正常皮膚およびBCIE患者皮膚を凍結固定、凍結置換しLowicryl K11M樹脂に包埋し、超薄切片を作成、グルコシルセラミド抗体と反応後、イムノゴールド (Amersham) にて標識し、酢酸ウランにて染色し観察した。凍結超薄切片法はTokuyasu法によって施行し、KLK5, KLK7, LEKTI抗体と反応後、イムノゴールドで標識し、ネガティブ染色を施した後、ポリビニルアルコールに包埋した。

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の病態形成機構、特に角層肥厚の機序を明らかにする。

B. 研究方法

透過電顕：通常の方法により正常人およびBCIE患者の透過電子顕微鏡標本を作成し、観察した。

蛍光抗体法：正常ヒト皮膚生検組織を2%パラフォルムアルデヒド/PBS (pH 7.4) にて4°C、1時間固定後、100mMグリシン/PBSにて同1時間処理、PBSにて洗浄後OCT compoundにて包埋した。6 μmの凍結切片をグルコシルセラミド、KLK5, KLK7, LEKTI抗体と37°C、1時間反応後、

C. 研究結果

正常皮膚では層板顆粒は顆粒細胞の上層から放出されるため、角層細胞内にはみら

れない。しかし、BCIE 患者 2 名の角層細胞内には、分泌されずに残存した層板顆粒と思われる構造が観察された (図1-3)。層板顆粒の分泌不全があることを証明するためにこの顆粒に豊富に含まれるセラミド前駆体であるグルコシルセラミドの免疫染色を施行した。正常表皮の蛍光抗体法では顆粒細胞内の表層側に顆粒状に反応がみられ、また角層も陽性に反応した (図4)。免疫電顕ではグルコシルセラミドは層板顆粒内に含まれ (図5)、顆粒層と角層の間に放出され、角層細胞内には認められない (図6、7)。BCIE 表皮でも層板顆粒内にグルコシルセラミドは見られ、細胞間に放出している像も観察されるが (図8)、角層細胞内にも陽性構造が見られた (図9)。

次に、正常表皮における、デスモゾーム構成成分の分解酵素と考えられている KLK5 (SCCE), KLK7 (SCTE) の発現を、これらのインヒビターとされる LEKTI と共に検討した。その結果、LEKTI は KLK5, KLK7 よりも早く発現しており、角層では前者は消失するが、後者は残っていることがわかった (図10)。また、KLK7 と LEKTI は別々の層板顆粒に含まれ (図11)、前者の方があとから分泌されている像が観察された (図12)。また、KLK5 も LEKTI とは別個に層板顆粒によって運ばれることがわかった (図13)。

D. 考察

BCIE はその遺伝的原因は良く知られた疾患であり、表皮の分化型ケラチンである K1 もしくは K10 の変異による。しかし、この細胞骨格の異常がどのようにして、角層を肥厚させ、患者が外見上最も苦しんでいる魚鱗癬をきたすのかについては、十分に解明されていない。層板顆粒は古くから角化機構に深く関与する細胞内小器官として知られている。過去の文献においても本症において層板顆粒の分泌不全が観察されている (Schmuth et al. *J Invest*

Dermatol 117: 837, 2001)。今回、我々の症例でもこれが確認された。最近、我々は層板顆粒はゴルジ小体から連続する網状の構造であって、角化細胞の分化に伴う扁平化と同期して細胞外に内容物が放出されるという説を提唱している。我々はまた BCIE においては細胞の扁平化がそこなわれていることも観察している。したがって、本症においては細胞骨格の異常によって分化にともなう細胞の形態変化が異常となり、層板顆粒が放出しきれないものと考えられる。

つぎに、角層細胞同士を連結する構造であるデスモゾームの分解過程について考察する。セリンプロテアーゼ KLK5 と KLK7 は角層のデスモゾームの構成要素であるデスモグレイン1、デスモコリン1、コルネオデスモシンを分解すること、および LEKTI はこの分解酵素活性を阻害することが報告されている (Caubet C, et al. *J Invest Dermatol* 122: 1235-1244, 2004)。KLK5, KLK7 は、顆粒層の最も表層と角質細胞で発現していることが報告されている (Ekholm et al. *J Invest Dermatol* 114, 56-63, 2000)。LEKTI は Netherton 症候群の原因分子であるが、正常表皮の有棘層上層、顆粒層で発現する (Bitoun et al. *Hum Mol Genet* 12:2417-2430, 2003)。LEKTI の正確な細胞内局在はこれまで不明であったが、今回の我々の研究で、この基質である KLK5, KLK7 とともに層板顆粒系によって運ばれることが明らかとなった。また、LEKTI はその基質よりも早く発現、分泌していることが示唆された。以上の結果を総合して考えると、BCIE においては、細胞骨格異常に伴う層板顆粒分泌系の不全により、後期の分泌タンパク KLK5, KLK7 の細胞間への供給が不足し、角層剥離が遅延するという仮説が導かれた。

E. 結論

BCIE においてはケラチン線維の異常に

よって角化細胞の形態変化にともなう層板顆粒の分泌過程が2次的に障害されると考えられた。正常皮膚における層板顆粒内のプロテアーゼとそのインヒビターの発現、分泌の順序を検討したところ、前者は後者より後期に起きていることが示唆された。したがって、BCIEにおいては層板顆粒の分泌系が不十分なため、特にその後半に分泌されるタンパク分解酵素の供給が不足となり、角層細胞間のデスモゾームの分解過程が遅延し、角層が厚くなると推定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, et al. LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. **J Invest Dermatol**, 124:360-366, 2005.
2. Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, et al. Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. **J Invest Dermatol**, 122:1137-1144, 2004.

日本語論文

1. 山本明美. 辺縁帯、ケラチンと層板顆粒に関する最近の知見、細胞、36:488-492, 2004

2. 山本明美. 角化のメカニズムとその異常症、フレグランスジャーナル、9:31-37, 2004

2. 学会発表

1. 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
2. 山本明美. 角化過程の理解と角化異常症、最近の到達点、第103回日本皮膚科学会学術大会(Physician Scientistsに聞く) 2004.4.16, 京都市
3. 山本明美. 高橋英俊、飯塚 一. 表皮層板顆粒はTGNに由来する管状構造をとり、段階的に合成された分泌タンパクを凝集塊として輸送する、第29回日本研究皮膚科学会学術大会 2004.4.14. 京都市
4. 山本明美. Iain Hovnanian, Netherton症候群原因タンパク LEKTIは層板顆粒によって運ばれる、第31回日本電顕皮膚生物学会学術大会 2004.10.8, 鹿児島県牧園町
5. 山本明美. マクロからミクロまで。角化と角化症を解説する。第56回日本皮膚科学会西部支部学術大会(教育講演) 2004.11.7, 久留米市

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。



図1 BCIE 角層細胞内に残存した層板顆粒様構造。通常透過電顕（症例1）



図2 BCIE 角層細胞内に残存した層板顆粒様構造。通常透過電顕（症例2）



図3 BCIE 角層細胞内に残存した層板顆粒様構造。通常透過電顕（症例2）



図4 正常表皮におけるグルコシルセラミドの発現部位を矢印でしめす。核も対比染色している。蛍光抗体法。

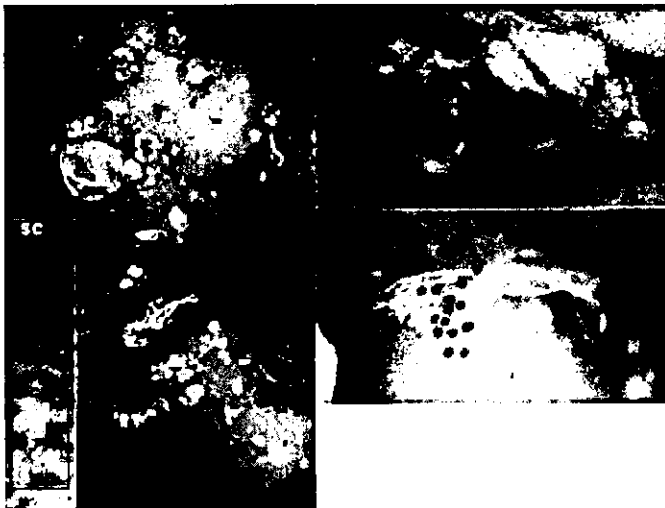


図5 正常表皮におけるグルコシルセラミドの細胞内局在。SC, 角層。d, デスマゾーム。凍結超薄切片法。



図6 正常表皮におけるグルコシルセラミドの細胞内局在。ICS, 表皮細胞間。
凍結超薄切片法。

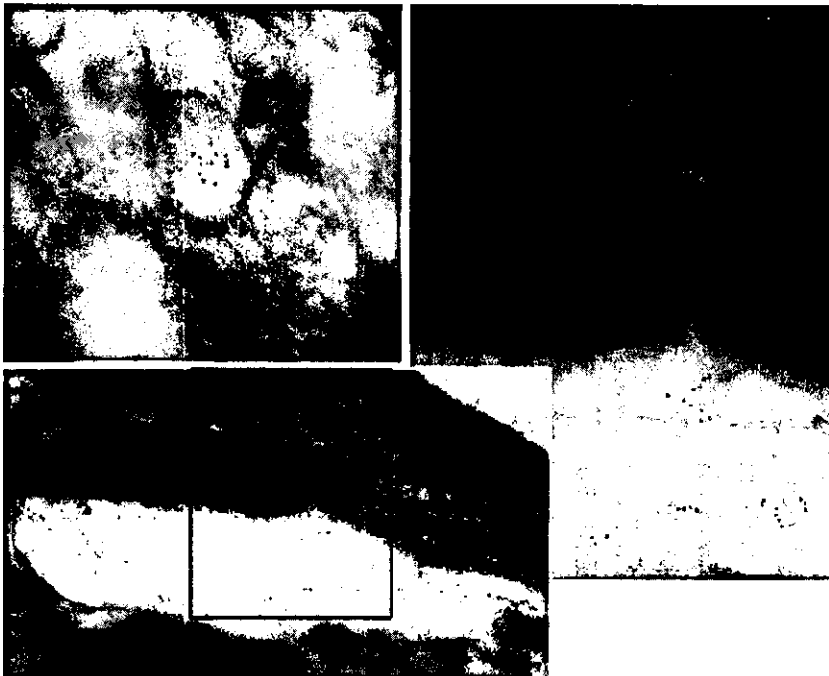


図7 正常表皮におけるグルコシルセラミドの細胞内局在。層板顆粒（左上）
の内部のグルコシルセラミドは顆粒細胞と角層細胞の間で細胞間に放出される
（右上、下）。Post-embedding 法。

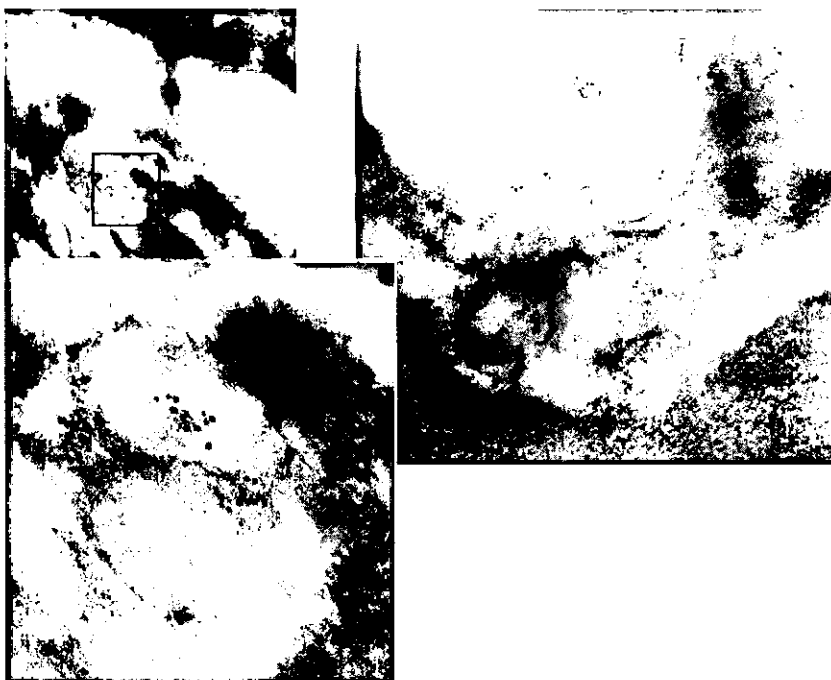


図8 BCIEにおけるグルコシルセラミドの細胞内局在。層板顆粒の内部のグルコシルセラミドは顆粒細胞と角層細胞の間で細胞間に放出される部分もある。Post-embedding 法。



図9 BCIEにおけるグルコシルセラミドの細胞内局在。層板顆粒の内部のグルコシルセラミドが角層細胞の内部にとり残された像。Post-embedding 法。

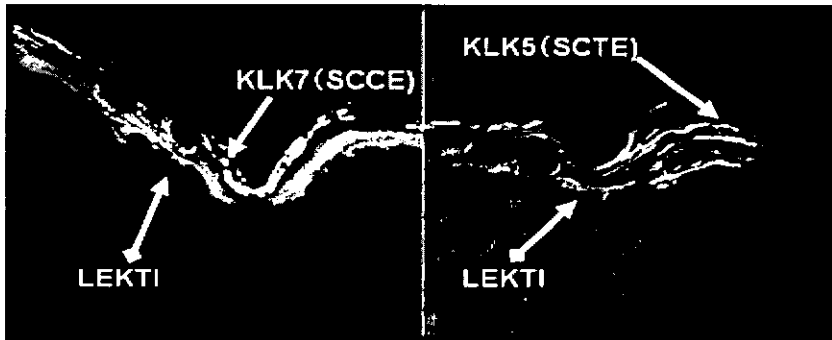


図10 正常表皮においてKLK5, KLK7はそのインヒビターであるLEKTIより遅れて発現することが示された。蛍光抗体法。

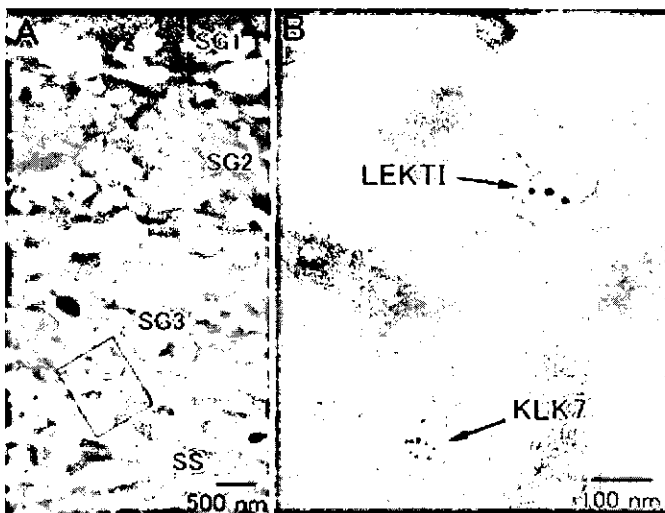


図11 正常表皮においてKLK7はそのインヒビターであるLEKTIとは独立して層板顆粒に含まれる。凍結超薄切片法による免疫電顕。

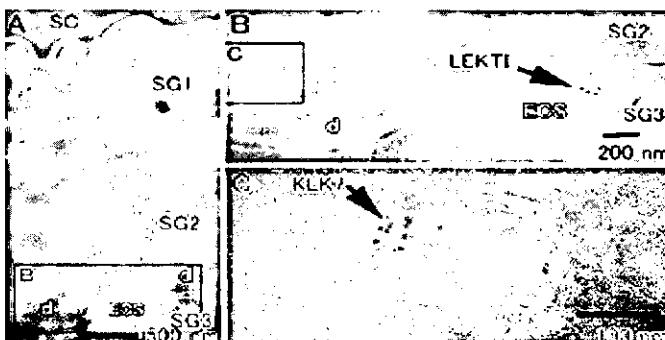


図12 正常表皮においてKLK7はそのインヒビターであるLEKTIよりおくれて分泌される。凍結超薄切片法による免疫電顕

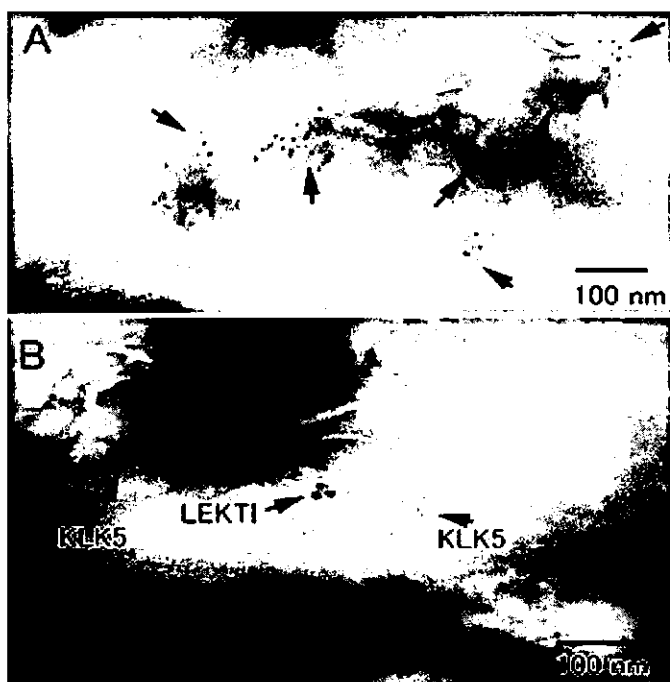


図 13 正常表皮において KLK5 はそのインヒビターである LEKTI とは分離して層板顆粒により運ばれる。凍結超薄切片法による免疫電顕

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

表皮細胞における機械的刺激の作用：
先天性魚鱗癬様紅皮症への応用を考える

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 機械的刺激は、皮膚疾患における皮疹の形成に重要な役割を担っていると考えられる。培養正常ヒト表皮細胞に対し伸展刺激を加えることによる表皮細胞の遺伝子発現の変化およびシグナル伝達についての検討を行った。持続伸展刺激により、EGF 受容体、ERK、カルシウムチャンネルなどが活性化し、表皮細胞に増殖シグナルが生じることが明らかとなった。また繰り返しの伸展・収縮刺激を加えた実験では、細胞骨格蛋白や細胞外マトリックス、細胞接着に関係する分子に発現の変化が認められ、今後先天性魚鱗癬様紅皮症などの遺伝子疾患での皮膚症状発現のメカニズムの解明に応用したいと考えている。

共同研究者
矢野正一郎
東京大学医学部附属病院皮膚科
大河内仁志
国立国際医療センター研究所細胞組織再生
医学研究部
Miroslav Blumenberg
New York University Medical Center

我々は、表皮細胞に与えられる機械的刺激により、どのような変化が表皮細胞に生じるのか、またそのメカニズムについて明らかにしたいと考え、本研究を行った。将来的には、先天性魚鱗癬様紅皮症などの遺伝子異常をもつ発現ベクターを表皮細胞に強制発現させることにより、これらの遺伝子疾患での皮膚症状の発現機序についての検討を行いたいと考えている。

A. 研究目的

表皮は、人を構成する組織の一番外側にあつて、常に外的環境の影響を受けている。外的環境因子として、熱、光、化学物質などがあるが、機械的刺激も重要な外的刺激因子である。先天性魚鱗癬様紅皮症や Pachyonychia congenita の一部の症例で成長に伴い手掌足底の特に外力の加わる部位に過角化が生じること、先天性表皮水疱症の一部の患者で成長に伴い皮疹が軽快することなどは、成長に伴う表皮への機械的刺激により皮膚症状に変化が生じている可能性が考えられる。機械的刺激は、しばしば皮膚に影響を及ぼしていると考えられるが、機械的刺激が表皮に与える影響については、ほとんど研究が行われていない。今

B. 研究方法

1) 抗体と試薬

anti phospho-ERK1/2, anti phospho-Akt (Ser 473), anti Akt は Cell Signaling (Beverly, USA) から、anti PCNA, anti ERK2, anti EGFR, anti phosphotyrosine (PY-20), anti mouse IgG HRP conjugated, anti rabbit IgG HRP conjugate は Santa Cruz (Santa Cruz, USA) から、anti phospho-EGFR antibody は Calbiochem (San Diego, CA) から購入した。抗ケラチン 6 抗体は Progen (Heidelberg, Germany)、抗ケラチン 10 抗体は Monosan (Uden, the Netherlands) より購入、試薬については MEK inhibitor

U0126 は Promega (Madison, USA) より、PI-3 kinase inhibitor wortmannin, EGFR kinase inhibitor AG1478, negative control SB202474 は Calbiochem より購入した。

2) 表皮角化細胞の培養

正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHK) のプライマリーカルチャーは岩城硝子より購入し、KBM (keratinocyte basal medium) にヒドロコチゾン、インスリン、甲状腺ホルモン、ウシ下垂体抽出物 (BPE) と EGF を加えた KGM (keratinocyte growth medium、keratinocyte-SFM、GIBCO) で培養した。表皮細胞が70-80% コンフルエントになったところで、トリプシン処理し、底面積比1:4で、継代培養した。3-4回継代したものを実験に用いた。

HaCaT 細胞は Deutsches Kresforschungszentrum, Fusenig 教授より許可を得、昭和大学黒木登志夫先生より供与されたものを、10%ウシ血清 (FBS) を加えた MEM (modified Eagle's medium) で培養し、70-80% コンフルエントになったところで、トリプシン処理し、底面積比1:10で、継代培養した。

これらの細胞はすべて、37°C、5% CO₂ 下のインキュベーター内で培養した。

3) シリコン製培養皿上での細胞培養

伸縮可能なシリコン製の培養皿 (内空部分 4 × 2 × 1 cm、底面積 8 cm²、太陽興業社製) をオートクレーブした後、その底面をタイプ I コラーゲン (Sigma) にてコーティングし (0.02mg/個)、その後 NHK ないし HaCaT を 1 × 10⁵ cells/cm² の密度にて播種し、37°C、5% CO₂ 下にて培養した。シリコンを伸展させるためにはステンレス製のチャンバー (東和科学、東京) にシリコン培養皿を装着して引き伸ばして固定する、という方法で +10、+20、+30% の長軸方向の伸展を持続的に可能とした。伸展前と +20% 伸展後の状態とを図 1 に示した。

4) BrdU アッセイ

正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞に 20% の持続伸展刺激を加え 24 時間培養した。最後の 3 時間を 100 μM の BrdU でパルスし、スクレーパーを用いて細胞を PBS に回収したものを 96 ウェルプレートに播種して遠心した。乾いた 96 ウェルプレートの BrdU 取り込みを Cell Proliferation ELISA, with a BrdU colorimetric system (Roche, Mannheim, Germany) を用いて測定した。

5) ウェスタンブロット法

NHK および HaCaT 細胞からの蛋白抽出およびウェスタンブロットは、以下のように行った。リン酸化 ERK、リン酸化 EGF、リン酸化 Akt の検出には、Lysis buffer として RIPA buffer (20mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM β-glycerophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin) を用いた。

抽出した蛋白はサンプルバッファー [50 mM Tris (pH 7.4)/0.14% sodium dodecyl sulfate (SDS)/1% b-mercaptoethanol (vol/vol)] 中で煮沸し、12.5% SDS polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。PVDF 膜 (Immobilon-P) に転写した後、膜はブロッキングバッファー [5% BSA in 25mM Tris/0.02% KCl/0.8% NaCl (pH 7.4)] で 4°C 2-8 時間インキュベーションし、抗ヒトケラチンモノクローナル抗体、あるいは抗リン酸化 ERK、抗リン酸化 Akt、抗リン酸化 EGFR と 4°C 16 時間インキュベーションした。膜は洗浄後、二次抗体と 1 時間反応させ、化学蛍光抗体法にて発色させた。PVDF 膜はストリッピングバッファーにてストリッピング後、抗 ERK、抗 AKT、抗 EGFR 抗体とともに 4°C 16 時間インキュベートして上記と同様に再度ウェスタンブロットを行った。

6) DNA マイクロアレイ

表皮細胞を4時間、16時間、24時間、48時間にわたり、1分間に1回の反復伸展・収縮刺激後、その間刺激しない表皮細胞と同時に、キアゲン社のRNA抽出キットにてRNAを抽出し、Affymetrix社のDNAマイクロアレイチップを用いて、ストレッチの有無による遺伝子発現の差異を検討した。

C. 研究結果

1) 表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、BrdU取り込みが促進する。

表皮細胞を20%、24時間伸展することにより、BrdU取り込みは、正常ヒト表皮細胞で 2.2 ± 0.4 倍、HaCaT細胞で 2.0 ± 0.5 倍に上昇し、これは統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。また、このBrdU取り込みの上昇は、MEK1/2阻害剤であるU0126 ($10 \mu\text{M}$)、PI3Kinase阻害剤であるWortmannin ($1 \mu\text{M}$)、EGF受容体阻害剤であるAG1478 (200nM)、カルシウムチャネル阻害剤であるGadolinium ($150 \mu\text{M}$)にて抑制された (図2)。

2) 表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERKがリン酸化する。

表皮細胞に伸展刺激を加え、1分後、2分後、5分後、15分後、30分後、60分後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法にてリン酸化ERKを検出したところ、伸展刺激により2分後よりERKのリン酸化が認められ、5分後、15分後にピークとなり、30分後、60分後と次第に減少していくのが確認された (図3 a)。さらに、表皮細胞に伸展刺激を加える1時間前に、MEK1/2阻害剤であるU0126、およびPI3K阻害剤であるWortmanninを加え、伸展後、ERKのリン酸化を検出したところ、伸展刺激によるERKのリン酸化はU0126、Wortmanninによって阻害された。一方、陽性コントロールとして用いたEGF刺激

によるERKリン酸化は、U0126により抑制されたが、Wortmanninによっては抑制されなかった (図3 b)。

伸展刺激1時間前よりEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478を加え、伸展刺激によるERKリン酸化は、AG1478により濃度依存的に抑制された (図3 d)。

3) 伸展刺激によりEGF受容体がリン酸化する。

EGF受容体におけるチロシンリン酸化の有無を、いくつかのチロシン残基特異的抗体を用いて検討した。その結果、図4に示すように、伸展刺激によりTyr845のリン酸化が時間依存的に認められた。Try992、Try1045、Try1068のリン酸化は認められなかった。さらにこのEGF受容体のリン酸化を免疫沈降法により確認した (図4)。

4) 伸展刺激はケラチンK6の発現を誘導し、ケラチンK10の発現を抑制する。

EGF受容体の活性化により、増殖型ケラチンのひとつであるケラチンK6の発現が増加することはすでに報告されている。伸展刺激はEGF受容体の活性化をもたらすことから、その下流でケラチンK6発現誘導が生じているか否かを、ウェスタンブロット法にて検討した。その結果、伸展刺激を加えた細胞において、ケラチンK6発現が亢進し、ケラチンK10発現が抑制されていることが明らかとなった。このK6発現誘導およびK10発現抑制は、U0126によって抑制された (図5)。

5) DNAマイクロアレイによる伸展刺激の遺伝子発現に対する作用

以上の実験は持続伸展刺激を加えた時に見られるシグナル伝達の変化を見たものであるが、実際には皮膚には繰り返し伸展・収縮刺激が加わっていると考えられるため、1分間に1回の周期で繰り返し伸展・収縮

を繰り返す刺激を表皮細胞に加え、その際の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法にて検討した。DNA マイクロアレイ法は、同時に多数の遺伝子発現調節を検討するのに大変優れた方法である。今回、Affymetrix 社の DNA チップを用いて、12000個の遺伝子について、伸展刺激による発現調節の有無を検討した。ここではその一部を示す (図 8)。基底細胞に発現の認められるラミニン 5 の 3 つの構成分子 (laminin alpha 3、beta 3、gamma 2)、Bullous pemphigoid antigen 1、Integrin alpha 6 の発現が伸展刺激により誘導され、分化した表皮細胞に発現の認められる Filaggrin、Loricrin、Keratin 1、Keratin 9 の発現は抑制されていた。これらのうち Filaggrin、Integrin alpha 6、Keratin 6a、Keratin 1、BPAG1 について、Real time PCR にて検討したところ、マイクロアレイの結果に平行な結果を得た (図 9)。このうち、ラミニンの 3 つの構成分子についてウェスタンブロットにて蛋白レベルでの発現を検討したところ、図 10 に示すように、alpha 3、beta 3 の発現は伸展刺激により誘導されたが、gamma 2 の発現にはあまり変化が認められなかった。

D. 考察

皮膚は体表を多い、外界からの機械的刺激を最も直接に受ける可能性が高い臓器であるが、皮膚に対する機械的刺激についての検討は、現在のところあまり行われていない。今回我々は、皮膚、特に表皮細胞に対して、伸展という機械的刺激が加えられたときに、どのような変化が引き起こされるかを解明するために、実験を行った。今回は、伸展可能なシリコンチャンバーに表皮細胞を播種して伸展刺激を加えた。この方法は、小室らの報告 1) に準じたものである。創傷治癒過程の表皮細胞や、表皮内腫瘍周囲の表皮細胞には、伸展刺激が加わ

っていると考えられる。また、搔破によっても、表皮細胞に伸展刺激が加わると考えられる。

伸展刺激により、まず表皮細胞に増殖シグナルが生じることは、ティッシュエクспанダーによって皮膚が伸展拡大することや、表皮内腫瘍の周辺部皮膚に増殖性変化を伴うことをよく説明できる。さらに、先天性表皮水疱症や先天性魚鱗癬様紅皮症の一部で手掌や足底など外力の加わりやすい部位に特に過角化を生じる場合があるが、その際にも、同様のメカニズムが関与している可能性がある。伸展刺激により EGF 受容体の活性化を生じることは、血管平滑筋細胞 2) や、血管内皮細胞 3) など、他の細胞における機械的刺激の受容と平行な結果である。今回我々の実験により、伸展刺激が表皮細胞に加わることにより、EGF 受容体がリン酸化していることが確認された。ドイツのグループ 4) は、同様の伸展刺激システムを用いて表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERK がリン酸化し、そのリン酸化は $\beta 1$ インテグリン中和抗体により抑制されることを示している。 $\beta 1$ インテグリンおよび EGF 受容体はともに細胞膜状にあり、ともに伸展刺激にかかわることから、これらが細胞膜上でなんらかの相互作用を引き起こしている可能性が考えられる。伸展刺激がどのようにしてこれらの分子を刺激するのか、あるいは $\beta 1$ インテグリンと EGF 受容体がどのように相互作用を起こすのかは不明であり、今後の検討課題である。

今回、DNA マイクロアレイによって、ラミニン 5、BPAG1、インテグリン alpha 6 などの基底細胞に発現する分子が誘導され、フィラグリン、K1、K9 といった分化した表皮細胞に発現する分子が抑制されることが明らかとなった。これらのことから、伸展刺激は、表皮細胞に増殖促進シグナルを生じるのみならず、その分化過程にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

今後、このシステムを用い、先天性魚鱗癬様紅皮症や先天性表皮水疱症に認められる変異をもつケラチンなどの遺伝子をトランスフェクトすることにより、これらの疾患での皮疹発症のメカニズムについて検討したいと考えている。

E. 結論

表皮細胞に対する機械的刺激は、表皮細胞に増殖刺激をもたらすことにより、皮膚疾患における皮疹の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

参考文献

- 1) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y, : Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation, *J Biol Chem*, 266, 1265-1268, 1991.
 - 2) Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y, : Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 278, H521-H529, 2000.
 - 3) Tseng H, Peterson TE, Berk BC, : Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells, *Circ Res.*, 77, 869-878, 1995.
 - 4) Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S, Guschel M, Muller J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R: Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol* 114, 408-412, 2000.
 - 5) 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.* 122, 783-90, 2004.
- #### G. 研究発表 (平成16年度)
1. 論文発表
 - 1) Komine M, Tamaki K. Kimura's disease with prolonged history and prominent vascular involvement. *Acta Dermato-Venereol.* (in press)
 - 2) Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. The -431 C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients. *Exp Dermatol.* 2004 Nov;13(11):715-9.
 - 3) 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.* 2004 Mar;122(3):783-90.
 2. 学会発表
 - 1) 小宮根真弓：第5回皮膚免疫を考える会：表皮細胞に対する機械的刺激の作用、1月31日、小倉、北九州
 - 2) 小宮根真弓：第67回日本皮膚科学会東京支部総会：乾癬の治療；光線療法と局所療法、2月14、15日、東京

- 3) 小宮根真弓：第29回日本研究皮膚科学会：The role of signaling molecules in the melanization processes in three-dimensional epidermal models containing melanocytes. 4月14～16日、京都
- 4) 小宮根真弓：第2回皮膚マクロライド研究会：細胞内シグナル伝達に対するロキシスロマイシンの影響、4月24日、東京
- 5) 小宮根真弓：第65回米国研究皮膚科学会：Inhibition of NFκB, EGFR and ERK pathways affects the melanization processes in the three-dimensional epidermal models containing melanocytes. 4月28日～5月1日、プロビデンス、アメリカ合衆国
- 6) 小宮根真弓：第25回日本炎症・再生学会：表皮ケラチノサイトにおける機械的伸展刺激の作用、7月13、14日、東京
- 7) 小宮根真弓：角化症研究会：表皮細胞に対する機械的刺激の作用、8月7日、東京
- 8) 小宮根真弓：第19回日本乾癬学会：乾癬局面周辺部の免疫組織学的検討、9月3、4日、山形
- 9) 小宮根真弓：第7回皮膚免疫アレルギー懇話会：HaCaT ケラチノサイトからの TARC/CCL17 産生におけるシグナル伝達機構、10月23日、東京
- 10) 小宮根真弓：第18回日本色素細胞学会：The analysis of signaling molecules in melanization process utilizing three-dimensional epidermal models containing melanocytes. 11月27、28日、熊本
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし。

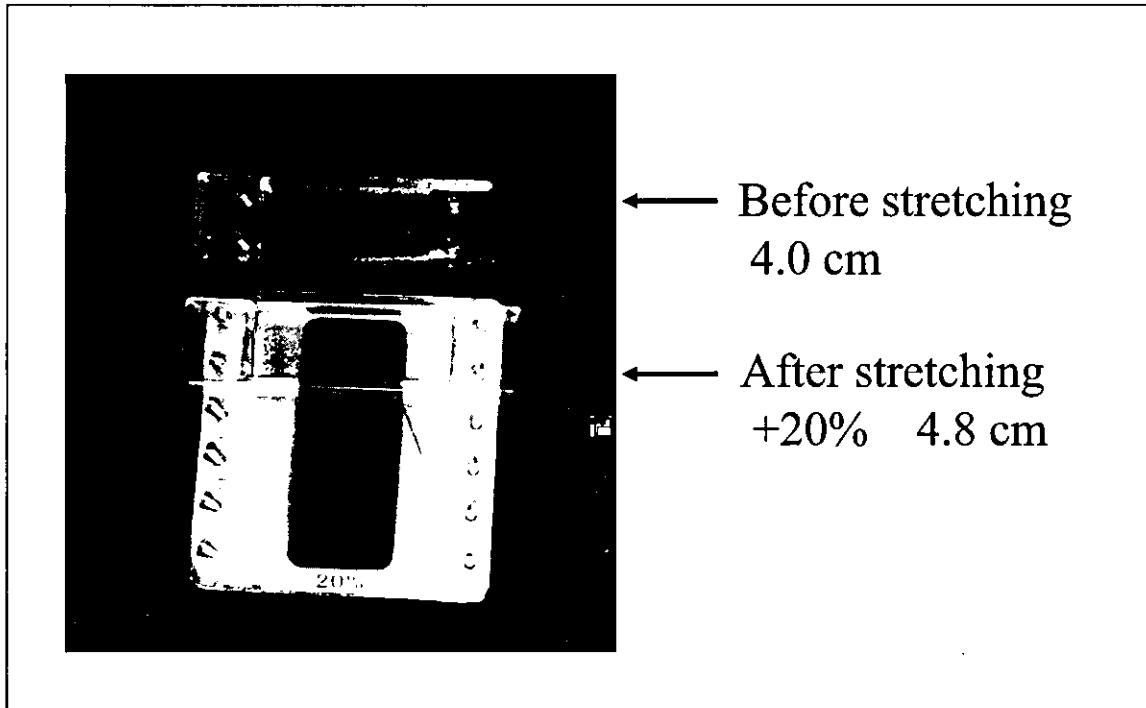


Figure 1

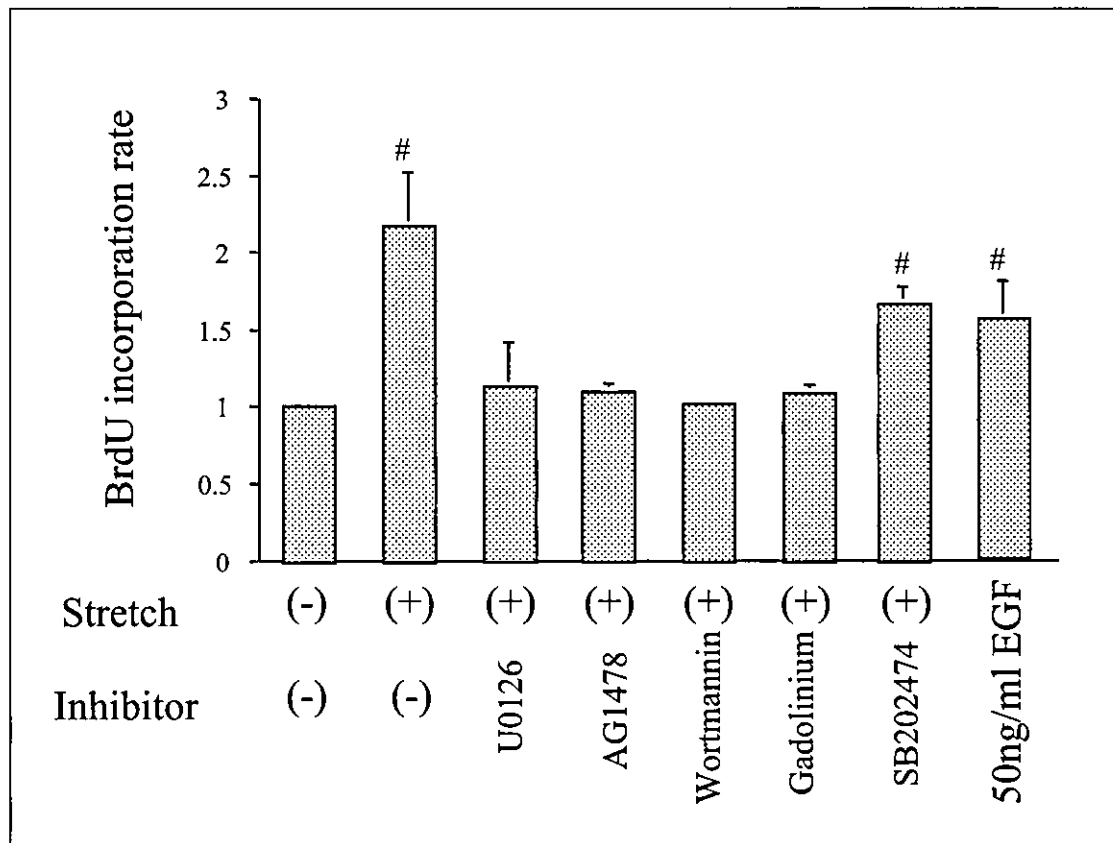


Figure 2