

大きく in vivo 法と ex vivo 法があり、水疱形成の抑制に関しては in vivo 法が適していると思われる。しかし、水疱後のびらん、潰瘍については、欠損している表皮を再生する必要がある。我々はこれまでに栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植、自己三次元培養皮膚移植の有用性を示してきた。しかし、従来の三次元皮膚では基底膜の構成成分の発現が不十分であった。今回の研究において、足場となる材料を使用することにより基底膜の蛋白が十分に発現し、重層化開始から7日後には線状の lamina densa の形成が認められた。これらの結果は、基底膜の形成が不完全な表皮水疱症に対して、新しい三次元皮膚がより有効である可能性を示唆している。また、遺伝子治療と組み合わせることにより、より有効な治療方法となることが予想される。この新しい三次元皮膚が実際に栄養障害型表皮水疱症に対して有効であるかについての検討が必要であると思われる。

#### E. 結論

角化細胞の足場となる材料を用いることにより形態学的に優れた三次元培養皮膚が作製可能であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成17年度)

##### 論文発表

1. Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. **J Dermatol Sci.** in press
2. Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, Tennenbaum T.: The role of protein kinase C {delta} activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. **J Cell Sci.** in press
3. Yoshida, T. Hamada, M. Amagai, K. Hashimoto, R. Uehara, K. Yamaguchi, K. Imamura, E. Okamoto, S. Yasumoto, T. Hashimoto: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci.** 41:21-30, 2006
4. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, Sugai M: Innate defences against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection. **J Pathol.** 208:249-60, 2006
5. Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. **Biochem Biophys Res Commun.** 327:100-5, 2005
6. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol.** 124:939-46, 2005
7. Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S,

- Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. **Br J Dermatol.** 152:1391-2, 2005
8. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, and Hashimoto K: Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. **J Cell Sci.** 118: 2363-2370, 2005
  9. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of  $\beta$ -defensins, LL37, and TLR2. **Eur J Immunol.** 35:1886-1895, 2005
  10. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. **J Dermatol Sci.** 40:105-114, 2005
  11. Tohyama M, Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Nagai H, Takashima A, Hashimoto K: dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 335:505-11, 2005
  12. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K: Induction of keratinocyte migration via trans-activation of the EGF receptor by the antimicrobial peptide LL-37. **J Immunol.** 175:4662-8, 2005
  13. Sekiguchi A, Kashiwagi T, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Hashimoto Y, Kimura H, Tohyama M, Hashimoto K, Iizuka H.: Drug-induced hypersensitivity syndrome due to mexiletine associated with human herpes virus 6 and cytomegalovirus reactivation. **J Dermatol.** 32:278-81, 2005
  14. Shushakova N, Tkachuk N, Dangers M, Tkachuk S, Park JK, Zwirner J, Hashimoto K, Haller H, Dumler I: Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor. **J Cell Sci.** 118:2743-53, 2005
  15. Gu F, Hata R, Ma YJ, Tanaka J, Mitsuda N, Kumon Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nakajima K, Sakanaka M: Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. **J Neurosci Res.** 81:163-71, 2005
  16. Komine M, Kakinuma T, Kagami S, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K: Mechanism of thymus-

and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. **J Invest Dermatol.** 125:491-8, 2005

17. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M.: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. **J Antimicrob Chemother.** 55:888-96, 2005

#### 学会発表

1. Y. Yahata, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, T. Mochizuki, S. Hirakawa and K. Hashimoto: The MyD88-dependent signaling pathway of the *Sporothrix schenckii* antigen-induced TLR2 natural immune response in HDMEC. 35<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting. Sep 22, 2005, Tübingen, Germany.
2. K. Sayama, S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, M. Tohyama, H. Komatsuzawa, S. Higashiyama, M. Sugai, and K. Hashimoto: The innate antimicrobial peptide LL-37 induces keratinocyte migration via HB-EGF-mediated transactivation of EGF Receptor and STAT3 phosphorylation. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
3. X. Dai, K. Sayama, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, M. Tohyama, Y. Yahata, S. Tokumaru, and K. Hashimoto: S TAT5a-PPAR $\gamma$  is a novel differentiation-regulating pathway in human keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
4. Y. Hanakawa, M. Amagai, K. Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, M. Tohyama, K. Sayama, and K. Hashimoto: Differential effects of dominant negative mutants of desmocollin 3a and 3b on cell-cell adhesion of keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
5. S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, K. Kameda, K. Sayama, and K. Hashimoto: Endothelin-induced keratinocyte migration requires Arc activation and EGFR transactivation via the ETB receptor. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
6. J. Kishimoto, Y. Ishimatsu-Tsuji, R. Ehama, T. Soma, S. Suzuki, Y. Shirakata and K. Hashimoto: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
7. M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Y. Hanakawa, X. Dai, Y. Yahata, S. Tokumaru, H. Komatsuzawa, M. Sugai and K. Hashimoto: CCL16, a member of ELR-CXC chemokine, is an endogenous antimicrobial agent

derived from keratinocytes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.

8. Y. Shirakata and K. Hashimoto: Successful treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous cultured skin. 7<sup>th</sup> Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, June 4<sup>th</sup>, 2005, Dres-

den, Germany,

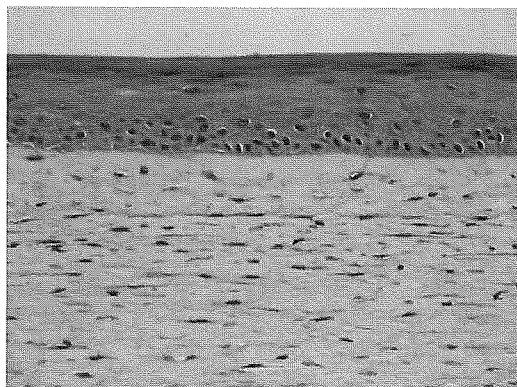
#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

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

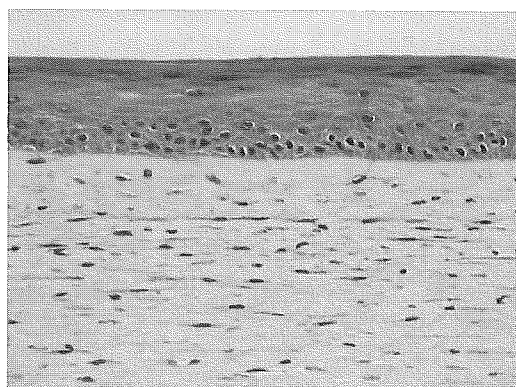
図 新しい三次元皮膚と従来の三次元皮膚のH E所見

従来の三次元培養皮膚は基底細胞が不揃いで、角化細胞の形態が分化しやすい傾向が見られた。新しい三次元培養皮膚は基底細胞がコンパクトであり、その配列は正常皮膚により近いものであった。

新しい三次元皮膚



従来の三次元皮膚



厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植法の確立と遺伝子治療への応用

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

**研究要旨** 遺伝性皮膚疾患に対する有効かつ安全な遺伝子治療法を確立するためには、治療用遺伝子産物に対する拒絶免疫反応を回避しつつ、治療用遺伝子を長期安定的に目的組織で発現させる必要がある。今回我々は、マウス胎仔循環系への低侵襲性細胞移植法を確立し、この方法を利用した胎生期マウスへの外来性遺伝子（GFP 遺伝子）導入骨髄細胞移植により、出生後のマウス各種組織における GFP 発現細胞の長期生着を確認した。

共同研究者  
玉井克人  
大阪大学大学院医学系研究科助教授  
知野剛直  
岐阜大学医学部皮膚科  
北島康雄  
岐阜大学医学部皮膚科教授

#### A. 研究目的

先天性表皮水疱症や先天性魚鱗癬の劣性重症型では原因遺伝子の両アレルにナンセンス変異を持つことが殆どである。そのため、これら重症型遺伝子変異を持つ患者では原因遺伝子産物が先天的に完全欠損していることが多く、欠損蛋白に対する免疫寛容が破綻している可能性が示唆される。遺伝性皮膚疾患に対する遺伝子治療はこれら最重症病型に適応されることが期待されるため、有効かつ安全な遺伝子治療を行うためには治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導しつつ、目的組織における治療用遺伝子発現細胞の長期生存を可能にしなければならない。胎生期に持続発現する抗原に対し、胸腺において中枢性免疫寛容が誘導されることが知られている。今回我々は、マウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を確立し、これを利用して胎生期マウスに遺伝子導入骨髄細胞移植を行うこ

とにより、出生後マウス各種組織において導入遺伝子を発現する骨髄由来細胞が長期生着する可能性について検討した。

#### B. 研究方法

胎生14日目マウス（C57/BL6）に対し、妊娠マウス子宮表面に露出する胎盤由来胎仔循環（卵黄囊静脈）を利用して実体顕微鏡下に10週令同種 GFP トランスジェニックマウス（GFP マウス）由来骨髄細胞（ $5 \times 10^5$  個）を移植し、出生後 6 週令の移植マウス各種組織における GFP 骨髄由来細胞の生着について検討した。

#### C. 研究結果

胎生14日目に GFP 骨髄を移植したマウスでは、出生 6 週目以降においても移植 GFP 骨髄由来細胞が骨髄、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、肺、腸管、および皮膚の各組織に長期生着していることが明らかとなった。

#### D. 考察

胎生期 GFP 骨髄移植により生後長期間 GFP 発現骨髄細胞に対する免疫寛容が成立し、GFP 骨髄由来細胞が皮膚を含む各種組織に生着して維持されることが明らかとなった。胎生期に発現した抗原に対し、

胸腺において中枢性免疫寛容が誘導されることが知られている。本研究においても、胎生期に移植した遺伝子導入骨髄細胞は胸腺に生着していることが確認されており、導入遺伝子産物に対して中枢性免疫寛容が誘導されている可能性が示唆される。また、現在我々は、骨髄幹細胞の表皮細胞への形質転換の可能性を見出しつつある。出生前診断により妊娠早期に胎児遺伝子の両アレルにナンセンス変異の存在が確認された場合、胎児骨髄細胞を採取して治療用遺伝子を導入し、再び胎児循環系に移植することにより、治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容と皮膚での遺伝子発現を同時に維持することが可能になるかもしれない。

## E. 結論

マウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を確立し、これを利用した胎児（仔）骨髄細胞移植によるあらたな遺伝子治療法の可能性を示した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表（平成17年度）

### 1. 論文発表

1. Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. **Adv Genet.** 2005;53:307-32.
2. Humpl T, Zaidi SH, Coe JY, Russell J, Kaneda Y, Massaelli H, Benson LN, Rabinovitch M. Gene transfer of prostaglandin synthase maintains patency of the newborn lamb arterial duct. **Pediatr Res.** 2005;58:976-80. Epub 2005 Sep 23.
3. Kim YD, Park KG, Morishita R, Kaneda Y, Kim SY, Song DK, Kim HS, Nam CW, Lee HC, Lee KU, Park JY, Kim BW, Kim JG, Lee IK. Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter. **Gene Ther.** 2006;13:216-24.
4. Morishita N, Nakagami H, Morishita R, Takeda S, Mishima F, Terazono B, Nishijima S, Kaneda Y, Tanaka N. Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005;334:1121-6.
5. Yamano T, Kaneda Y, Huang S, Hiramatsu SH, Hoon DS. Enhancement of immunity by a DNA melanoma vaccine against TRP2 with CCL21 as an adjuvant. **Mol Ther.** 2006 Jan; 13:194-202. Epub 2005 Aug 22.
6. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K. Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. **J Dermatol Sci.** 2005;40:105-14. Epub 2005 Aug 18.
7. Kimura T, Nakamura H, Koyama S, Ogita K, Tabata C, Tsutsui T, Shimoya K, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y. In vivo gene transfer into the mouse uterus: a powerful tool for investigating implantation physiology. **J Reprod**

**Immunol.** 2005;67:13-20. Epub 2005 Aug 18.

8. Mima H, Tomoshige R, Kanamori T, Tabata Y, Yamamoto S, Ito S, Tamai K, Kaneda Y. Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector. **J Gene Med.** 2005;7:888-97

## 2 学会発表

1. 美馬秀俊、金田安史：生体適合性ポリマーを用いた遺伝子導入増強法の開発（平成17年9月14日；第64回日本癌学会学術総会；札幌）
2. 金田安史：遺伝子治療とTranslational research（平成17年6月2日；第22回日本呼吸器外科学会総会；京都）
3. 美馬秀俊、金田安史：Development of polymer-conjugated HVJ envelope vector to enhance the transfection efficiency in vitro and in vivo（平成17年7月30日；第12回日本遺伝子治

療学会；東京）

4. 河地正子、玉井克人、金田安史：表皮細胞高親和性HVJ-Eベクターの開発（平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多）
5. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史：siRNAの利用によるHN低含有HVJウイルス粒子の生産（平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多）

## H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法  
（発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願2005-338449
2. ターゲッティングウイルスおよびその作製方法  
（発明者：河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願2005-339474



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

遺伝子導入骨髄細胞移植による表皮水疱症治療の可能性検討

研究協力者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 助教授

**研究要旨** 表皮水疱症の遺伝子治療を成功させるためには、皮膚基底膜領域で長期安定的に治療用導入遺伝子の発現を維持しなくてはならない。これまで我々は、皮膚創傷治癒過程において表皮細胞をはじめとする皮膚構成細胞が骨髄細胞により再生される可能性を報告してきた。今回我々は、遺伝子導入自家骨髄細胞移植による表皮水疱症治療の可能性を検討した。

共同研究者

金田安史

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学  
教授

山崎尊彦

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学  
研究員

知野剛直

岐阜大学医学部皮膚科

北島康雄

岐阜大学医学部皮膚科教授

**A. 研究目的**

先天性表皮水疱症や先天性魚鱗癬の劣性重症型に対する有効な治療効果を得るためには、欠損遺伝子産物を長期安定的に皮膚基底膜領域に発現させる遺伝子治療法の開発が期待される。この目的を達成するためには、表皮幹細胞を標的とした安定的遺伝子導入が理想であるが、表皮幹細胞の単離法が確立していない現時点では極めて困難である。これまで我々は、骨髄細胞による表皮細胞供給の可能性について研究を進め、骨髄細胞が表皮細胞をはじめとする皮膚構成細胞を供給し得る可能性を明らかにしつつある。今回我々は、外来性遺伝子を導入した骨髄細胞移植マウスを用いて、表皮水疱症モデルマウス皮膚における導入遺伝子の長期発現を検討した。

**B. 研究方法**

致死性放射線照射（10Gy）後に GFP 遺伝子トランスジェニックマウス（GFP マウス）由来骨髄細胞を移植し、生着後 6 週間経過した後に背部皮膚に対して VII 型コラーゲン遺伝子（COL7A1）ノックアウトマウス新生仔皮膚を植皮し、生着皮膚における GFP 骨髄細胞由来表皮細胞の存在と GFP 遺伝子発現維持について検討した。

**C. 研究結果**

GFP 骨髄移植マウス背部皮膚に移植・生着した COL7A1 ノックアウトマウス新生仔皮膚において、剥脱・再生した表皮内および新生毛包組織内に多数の GFP 陽性表皮細胞を認めた。これら GFP 陽性表皮細胞は、植皮後 3 カ月経過した植皮片においても確認し得た。

**D. 考察**

外来性遺伝子導入骨髄細胞移植により、植皮した COL7A1 ノックアウトマウス皮膚に導入遺伝子発現表皮細胞を長期供給可能なことが明らかとなった。実際の表皮水疱症治療への応用を考えた場合、患者由来骨髄細胞採取後治療用遺伝子を導入し、再び患者骨髄内に移植することにより、水疱部皮膚に治療用遺伝子発現表皮細胞を長期安定的に供給できる可能性が示唆される。

今後、骨髓細胞への安全かつ安定的な治療用遺伝子導入法が確立すれば、臨床応用への道が開かれると確信する

## E. 結論

外来性遺伝子導入骨髓細胞移植による表皮水疱症遺伝子治療の可能性が示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表 (平成17年度)

### 1. 論文発表

1. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K. Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. **J Dermatol Sci**. 2005;40:105-14. Epub 2005 Aug 18.
2. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2005;25:2542-7. Epub 2005 Oct 13.
3. Ito M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y. Related Articles, Links Rad51

siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. **J Gene Med**. 2005;7:1044-52.

4. Mima H, Tomoshige R, Kanamori T, Tabata Y, Yamamoto S, Ito S, Tamai K, Kaneda Y. Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector. **J Gene Med**. 2005;7:888-97

### 2. 学会発表

1. 河地正子、玉井克人、金田安史：表皮細胞高親和性 HVJ-E ベクターの開発 (平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多)
2. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史：siRNA の利用による HN 低含有 HVJ ウイルス粒子の生産 (平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多)

## H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法  
(発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア (株)、大阪大学) 2005年11月24日出願、特願 2005-338449
2. ターゲティングウイルスおよびその作製方法 (発明者：河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア (株)、大阪大学) 2005年11月24日出願、特願 2005-339474

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

ケラチン病モデル細胞の樹立に関する研究

研究協力者 米田耕造 香川大学医学部皮膚科学講座 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。かつてわれわれは、一時的トランスフェクションの系を用いて、ケラチン病の細胞では、角化細胞内に変異ケラチン凝集塊が生じるとTNF- $\alpha$ 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見つけた。そして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報告してきた。しかしこの系では、トランスフェクションの効率が低いため、上記以上の詳細な解析が困難であった。今回われわれは、この問題を回避する目的で、エクジソン誘導発現系を用いて、ケラチン病モデル細胞の樹立を試みた。

共同研究者

窪田泰夫 香川大学医学部教授

森上徹也 香川大学医学部助手

中井浩三 香川大学医学部助手

His ベクターに挿入した。ケラチン14の125番目のArgがCysに変化した変異[K14 (R125C)]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、われわれが報告したアポトーシス以外何も判明していない。この分子メカニズムを更に詳細に検討するため、まずケラチン病モデル細胞を樹立することを研究目的とした。

**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 pIND/V5-

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)、100units/ml ペニシリン、100 mg/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。DN A トランスフェクションには、Lipofect AMINE plus 試薬 (Invitrogen) を用いた。

c) セレクション

安定トランスフォーマントのセレクションには、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、400ug/ml ゼオシン、2 mg/ml ジェネテイシン、10% FBS を含む培地を用いた。

d) 一次抗体

抗 V5 抗体は Invitrogen 社より購入し

た。抗ヒトサイトケラチン抗体は Dako Cytomation 社より購入した。

#### e) 免疫ブロット法

安定トランスフォーマント細胞を 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  $\mu$ g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。

#### C. 研究結果

エクジソン誘導発現ベクターである pIND ベクターに野生型および変異ケラチン cDNA を挿入後、RXR とエクジソン受容体を恒常的に発現している HaCaT 細胞にこれらのベクターをトランスフェクションした。400  $\mu$ g/mlゼオシン、2 mg/ml ジェネティシンにてセレクションを行い、安定トランスフォーマントを得た。この安定トランスフォーマントは、培地にエクジソンを添加すると、野生型および変異ケラチンを発現した。ケラチンの発現はエクジソンの量に依存していた。

#### D. 考察

今回われわれはエクジソン誘導発現の系を用いて、ケラチン病モデル細胞を樹立することに成功した。今後このモデル細胞を用いてケラチン病の病態形成機序をさらに詳細に解析する予定である。

#### E. 結論

われわれが樹立したケラチン病のモデル細胞はケラチン病の病態を解析する上で大変有益である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (平成18年度)

##### 1. 論文発表

英語論文

1. Kon A, Itagaki K, Yoneda K and Takagaki K: A novel keratin 9 gene mutation (R162P) in a Japanese family with epidermolytic palmoplantar keratoderma. **Arch Dermatol Res** 296:375-378, 2005
2. Sadahira C, Yoneda K and Kubota Y: Elevated levels of serum carcinoembryonic antigen in a patient with eruptive syringoma. **J Am Acad Dermatol** 53:532-533, 2005
3. Osawa M, Demitsu T, Toda S, Yokokura H, Umemoto N, Yamada T, Yoneda K, Kakurai M, Yoshida M and Hashimoto T: A case of mixed bullous disease of epidermolysis bullosa acquisita and linear IgA bullous dermatosis. **Dermatology** 211:146-148, 2005
4. Yoneda K, Kon A, Demitsu T, Inagaki N, Sadahira C and Kubota Y: Tunnel-positive cells in keratin diseases. **J Dermatol Sci** 40:65-67, 2005
5. Yoneda K, Demitsu T, Kon A, Sadahira C, Moriue T, Katsuura J, Matsuoka Y, Takai I, Noda M and Kubota Y: Ubiquitination of molluscum body and its implications for pathophysiology. **Br J Dermatol** 154:786-789, 2006

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（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）の臨床疫学研究  
— genotype phenotype 解析を中心に—

分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授

**研究要旨** 当科において施行し得た BCIE 患者における遺伝子変異同定に加え、2003年から2005年にかけて報告された症例における genotype/phenotype 相関解析を行った。その結果、従来と異なった genotype-phenotype 関係があることが更に明らかとなった。今後は本邦の全国調査において把握され、遺伝子変異の同定が未了例につき、genotype-phenotype の相関解析を進める。

共同研究者

黛 暢恭 順天堂大学医学部皮膚科  
高木 敦 順天堂大学医学部皮膚科  
須賀 康 順天堂大学医学部皮膚科  
小川秀興 順天堂大学医学部皮膚科  
黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学  
松葉 剛 順天堂大学医学部衛生学  
稲葉 裕 順天堂大学医学部衛生学

A. 研究目的

BCIE はケラチン 1（K1）またはケラチン 10（K10）の変異により生じる稀少遺伝性疾患であり、生直後より生じる水疱と全身皮膚の潮紅・鱗屑を特徴とする。本研究班で行った全国疫学調査により、本邦では 55 人（95%信頼区間 35—75 人）の BCIE 患者が、2002 年に全国の医療機関を受診していることが推定された<sup>1)</sup>。その内、個々の症例の臨床情報が得られた 28 例につき、遺伝子検索実施の有無（実施済みであればその結果についても）、また遺伝子検索未施行の場合はその可能性につき、依頼状を送付した。その結果、遺伝子検索拒否 1 例、遺伝子検索中 1 例、検索するも同定出来ず 2 例、当科での検索要請 2 例、既に検索済み 10 例の返答が得られた。その結果、①ほぼ全例の K1, K10 変異症例に全身の紅皮症と水疱形成が見られ、多くは新生児期以降

も水疱を生じる、② K1 変異症例だけでなく、K10 変異症例にも掌蹠角化が生じ得る、③ コロジオン児は、K1, K10 変異症例ともに生じ得る、など従来報告されているものとは異なった genotype-phenotype 関係があることが示された。

今回は、当科で経験した BCIE 患者に加え、2003 年から 2005 年にかけて報告された症例における genotype/phenotype の相関解析を行った。

B. 研究方法

1) 当科患者における解析：症例は 26 歳、男、家族に同症なし。生下時より全身の潮紅、鱗屑と水疱を生じた。成長とともに水疱形成は消退、全身の潮紅と鱗屑が持続した（図 1 a）。新生児期より掌蹠角化が徐々に増悪、10 歳頃には高度となり、指趾変形も生じた（図 1 b）。病理では、いわゆる顆粒変性がみられ（図 1 c）、電顕ではケラチン線維の凝集塊を検出した（図 1 d）。遺伝子検索を行ったところ、K1 の 481 番目の threonine の proline への変異（1441 A to C、2B rod domain）が同定された（図 2）<sup>2)</sup>。なおこれら調査は、全て連結可能匿名化のもと行われ、また当施設の倫理委員会にて了承を得たものである。

2) 2003 年～2005 年報告症例の解析：文

献<sup>3)から9)</sup>に示す報告を通覧した。これらは、PubMed で検出されたものである。

## C. 研究結果

### 1) 変異遺伝子とその臨床症状のまとめ：

#### ①K1に変異が見られた症例

- a) Thr 481 Pro (26歳・男：26M)  
全身の大型の鱗屑、潮紅、小児期の水疱形成、高度の掌蹠角化、指趾変形
- b) 1752insG→Arg と Try が豊富な69aa が生じ、正常より8 aa長い(17M)  
生下時皮疹なし、2歳より掌蹠角化・肘膝足関節部の細かい鱗屑ある局面
- c) Phe 191 Cys (12M)  
全身の高度鱗屑潮紅、高度掌蹠角化
- d) Lys 177 Asn (12F)  
中等度症例、中等度掌蹠角化
- e) intron 1 splice site mutation→22 aa deletion of exon 1 end (16F, 16F, 33?)  
3例とも全身の細かい鱗屑、中等度症状。2例(16F, 16F)では中等度掌蹠角化、1例(33?)では高度掌蹠角化と足関節の大水疱
- f) 12bp deletion→codon 170-3 deletion (26 to 29 aa deletion of H1 domain) (30M)  
顔面、頸部、四肢に細かい鱗屑、高度掌蹠角化
- g) 442 bp deletion (4442-4883) + 214 bp insertion in exon 6→codon 377-418 deletion (41F)  
生下時重症、成長とともに軽快、四肢の鱗屑、高度掌蹠角化
- h) Leu 161 Pro (1Fとfamily)  
全身の潮紅と鱗屑、高度掌蹠角化、成長とともに体幹四肢の細かい鱗屑(母と祖父)

#### i) Ile 479 Thr (family)

中等度掌蹠角化、肘膝の角化性局面、新生児期に一過性の屈曲部の水疱形成と過角化、病理ではごく軽度の顆粒変性

#### j) Leu 187 Phe (3F)

高度の全身潮紅と過角化、新生児期の水疱形成、高度掌蹠角化

#### ②K10に変異が見られた症例

##### a) Leu 453 Pro (6F)

全身の潮紅と高度過角化、掌蹠角化はマイルド

##### b) 6 bp deletion→codon 161-2 deletion (10F)

高度の全身過角化、加齢軽快なし、掌蹠角化なし

##### c) Met 150 Thr (28M, 25Fともに孤発例)

高度体幹四肢の過角化、紅斑色素沈着、水疱形成、掌蹠角化の有無不明

### 2) 今回得られた情報の特徴のまとめ

- a) K1 変異が見られた全症例において、中等度から高度の掌蹠角化が見られた。また K1 の H1/1A ドメイン変異例のみならず、2B ドメイン変異例、exon 1 end の欠損変異例 (intron 1 splice site 変異)、K1 tail frameshift 変異例においても掌蹠角化が見られた。
- b) K1 の 2B ドメイン変異例でも高度の指趾変形を生じる例があった。
- c) K1 変異例では、変異型によっては生下時に症状がない例 (1752insG)、一見掌蹠角化症に見える例 (Ile 479 Thr)、症状がマイルドな例 (intron 1 splice site 変異) など症状が通常とことなる例が見られた。
- d) K10 変異症例では、全身の紅皮症と水疱形成が見られ、多くは新生児期以降も水疱を生じ、掌蹠角化はあってもマイルドであった。

## D. 考察

BCIEでは、現在までに全国レベルで臨床疫学調査が行われた報告は世界的にも無く、臨床疫学調査により genotype phenotype 相関情報を得ることは、今後の治療法開発のためにも大変重要であると考えられる。

今回得られた情報をまとめると、①ほぼ全例のK1, K10変異症例に全身の紅皮症と水疱形成が見られ、多くは新生児期以降も水疱を生じる、②しかし非常にまれな変異例では生後しばらくして症状が出る例もある、③K1変異症例だけでなく、K10変異症例にも掌蹠角化が生じ得るが症状は軽い、④変異パターンにより、一見いわゆる掌蹠角化症に見える例もあるなど、従来報告されているものとは異なった症状を呈する症例があることが示された。今後は更に本邦症例における情報を集積し、遺伝子治療などのより特異的治療法開発に備えたい。

## E. 結論

BCIEでは従来報告されているものとは異なった genotype-phenotype 関係がある可能性が示された。

## 参考文献

1. 黒沢美智子ほか：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、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、平成16年度研究報告書、pp192-198, 2005.
2. Muramatsu S, et al: A novel threonine to proline mutation in the helix termination motif of keratin 1 in epidermolytic hyperkeratosis with severe palmoplantar hyperkeratosis and contractures of the digits. *Br J Dermatol.* 2005; 152:1087-9.
3. Sprecher E, et al: Epidermolytic hyperkeratosis and epidermolysis bullosa simplex caused by frameshift mutations altering the v2 tail domains of keratin 1 and keratin 5. *J Invest Dermatol.* 2003;120:623-6.
4. Virtanen M, et al: Splice site and deletion mutations in keratin (KRT1 and KRT10) genes: unusual phenotypic alterations in Scandinavian patients with epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1013-20.
5. Klein I, et al: A newborn presenting with congenital blistering. *Int J Dermatol.* 2004;43:295-7.
6. Terron-Kwiatkowski A, et al: Atypical epidermolytic palmoplantar keratoderma presentation associated with a mutation in the keratin 1 gene. *Br J Dermatol.* 2004;150:1096-103.
7. Akiyama M, et al: Disruption of the 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,* 2003;12:638-45.
8. Tal O, et al: Epidermolytic hyperkeratosis type PS-1 caused by aberrant splicing of KRT1. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:64-7.
9. Uezato H, et al: A case of bullous congenital ichthyosiform erythroderma (BCIE) caused by a mutation in the 1A helix initiation motif of keratin 1. *J Dermatol.* 2005;32:801-8.

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表 (平成14—16年度)

### 1. 論文発表

#### 英語論文

1. Sanmano B, et al: Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. **J Dermatol Sci**, 37:29-39, 2005
2. Mayuzumi N, et al: Effects of UVB irradiation, pro-inflammatory cytokines and raised extracellular calcium concentration on the expression of ATP2A2 and ATP2C1. **Br J Dermatol**, 152:697-701, 2005
3. Mayuzumi N, et al: Effects of drugs and anti-cytokine antibodies on the expression of ATP2A2 and ATP2C1 in cultured normal human keratinocytes. **Br J Dermatol**, 152:920-924, 2005
4. Ramos-Castaneda J, et al: Deficiency of ATP2C1, a golgi ion pump, induces secretory pathway defects in ER-associated degradation and sensitivity to ER-stress. **J Biol Chem**, 280:9467-73, 2005.
5. Kawada H, et al: Transcriptional regulation of ATP2C1 gene by Sp1 and YY1. **J Invest Dermatol**, 124:1206-14, 2005
6. Inoue A, et al: Superficial Mucocles of the Soft Palate. **Dermatology**, 210:360-362, 2005
7. Kondo M, et al: A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. **Mycoses**, 48:221-5, 2005
8. Chen X, et al: Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J Dermatol Sci**. 40:123-32, 2005
9. Pongpermdee S, et al: Expression of SPCA1(Hailey-Hailey disease gene product) in acantholytic dermatoses. **J Dermatol Sci**. 40:137-40, 2005
10. Titapiwatanakun B, et al: SCCA2-transfected human keratinocytes show increased secretion of IL-1alpha and IL-6, but not of TNF-alpha. **Arch Dermatol Res**. 8:1-4, 2005

#### 日本語論文

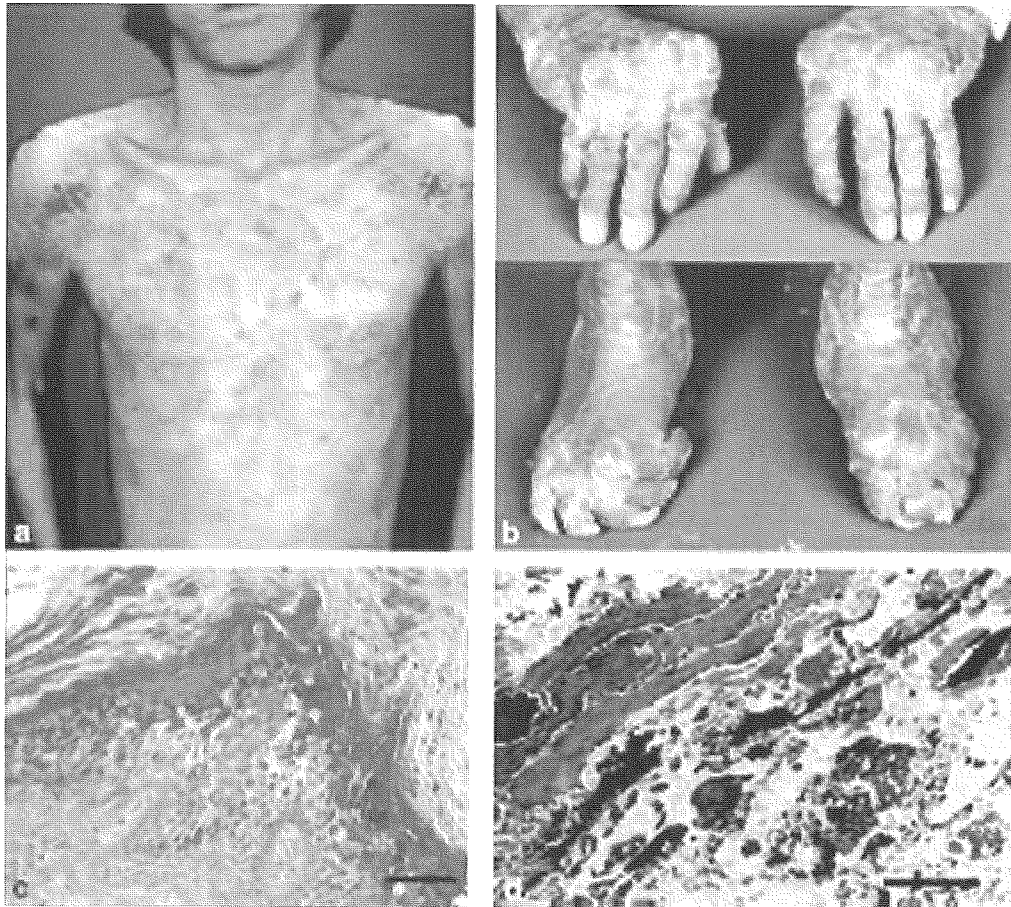
- 1) 水野優起、ほか：ネザートン症候群の  
2 小児例、日皮会誌 115:2259-2262, 2005.

### 2. 学会発表

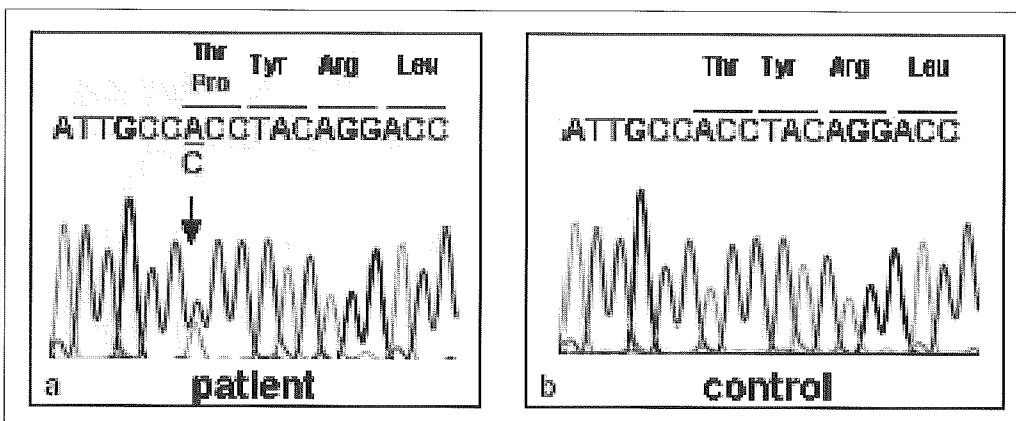
## H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

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





☒ 1



☒ 2

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

先天性魚鱗癬様紅皮症における皮疹形成機序と治療に関する研究

分担研究者 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** 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症は、ケラチン K1 あるいはケラチン K10 遺伝子の異常により発症することが知られているが、その皮疹の形成メカニズムについては、未知の部分が多い。我々は、機械的刺激がこの疾患における皮疹の形成に深く関与しているのではないかと考えた。まず、正常ヒト表皮角化細胞に伸展刺激を加えた時の MAP キナーゼのリン酸化、およびそのシグナル伝達について検討したところ、伸展刺激により ERK、p38 が活性化し、ERK のリン酸化には EGF 受容体とカルシウムチャンネルが関与することが明らかとなった。次に、DNA マイクロアレイを用いて、伸展刺激により発現の変動する遺伝子群について検討した結果、細胞骨格関連遺伝子群、特に Rho Cdc42 関連遺伝子およびアクチン関連蛋白遺伝子群の発現誘導が特徴的と考えられた。さらに、正常ヒト表皮角化細胞に正常および変異ケラチン K1 を強制発現させ伸展刺激を加えたところ、変異ケラチン K1 導入細胞ではケラチン K1 線維が波状の異常な形状をとることが明らかとなった。

共同研究者  
花川 靖  
愛媛大学医学部皮膚科  
佐々木苗胤  
東京大学医学部附属病院皮膚科  
常深祐一郎  
東京大学医学部附属病院皮膚科  
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  
再生医療研究部  
Miroslav Blumenberg  
Department of Dermatology  
New York University Medical Center  
玉置邦彦  
東京大学医学部附属病院皮膚科

り生じる遺伝性疾患である。変異の部位によって、臨床症状に違いがある。ケラチンは中間径フィラメントに属する細胞骨格蛋白のひとつであり、表皮細胞の形状を維持し、外界からの機械的刺激に対して細胞を守る働きがあると考えられる。変異ケラチンでは、その正常機能が阻害されていると考えられる。先天性魚鱗癬様紅皮症におけるケラチン K1 遺伝子異常が、病変形成にどのように関わっているのか、また機械的刺激は病変形成にどの程度関与しているのかについて、遺伝子導入をした細胞に機械的刺激を加えることにより、その形態変化、産生されるサイトカイン、シグナル伝達機構について検討する。最終的には siRNA などにより異常ケラチンの発現を抑える方法を検討し、siRNA が治療に応用できるか否かについて検討することが目的である。

**A. 研究目的**

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症は、ケラチン 1 あるいはケラチン 10 の遺伝子異常によ

**B. 研究方法**

1) 正常ヒト表皮角化細胞に機械的刺激

を加えることにより、どのような変化が生じるのかを、ウェスタンブロット法、DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。

## 2) 変異ケラチンベクターの作成

ATCC より購入したヒトケラチン 1 遺伝子を、まず GFP ベクターにサブクローニングし典型的な重症先天性魚鱗癬様紅皮症を生じることが報告されている、1 A ドメインの変異を作成した。さらに、軽症の先天性魚鱗癬様紅皮症を生じることが報告されている、2 B ドメインの変異を作成した。

## 3) 変異ケラチン遺伝子の導入

正常ケラチン K1 および変異ケラチン K1 を Fugene6 を用いて正常ヒト表皮角化細胞に導入し、ケラチンフィラメントの形状について、蛍光顕微鏡で観察した。

4) これらの GFP 発現ベクターを、アデノウィルスに導入し、アデノウィルスベクターを作成した。

## C. 研究結果

1) 機械的刺激により、ERK、p38MAPキナーゼが活性化するが、JNK は活性化しない。

正常ヒト表皮角化細胞を伸展可能なシリコンウェルに播種し、一分間に1回の伸展刺激を繰り返し行った。伸展刺激開始後、5分、10分、15分、30分、60分、120分に、Lysis buffer にて細胞を回収し、その上清を用いてウェスタンブロットを行った。抗リン酸化ERK、抗リン酸化 p38 抗体を用いたブロットにて、時間依存的に ERK がリン酸化した (図 1)。P38 のリン酸化は非常に弱いながらも、認められた (図 2)。抗リン酸化 JNK を用いたブロットでは、伸展刺激による JNK のリン酸化は認められなかった (図 3)。

2) 機械的伸展刺激による ERK のリン酸化は EGF 受容体のリン酸化およびカルシウムチャンネルに依存している。

伸展刺激30分前に、EGF 受容体リン酸化阻害剤である AG1478、カルシウムチャンネル阻害剤である Gadolinium を加え、伸展刺激を与え、上記のとおり細胞を回収し、ウェスタンブロットを行った。EGF 受容体阻害剤である AG1478 は、ERK のリン酸化レベルを全体的に引き下げたが、伸展刺激によるリン酸化は保たれていたが、カルシウムチャンネルブロッカーである Gadolinium は ERK リン酸化を抑制した (図 1)。AG1478、Gadolinium はともに P38 のリン酸化は抑制しなかった (図 2)。

3) 機械的刺激により、細胞骨格に関連する蛋白が多数誘導された。なかでも、アクチン関連蛋白、細胞外マトリックス蛋白、細胞接着因子に分類される遺伝子の誘導が多くあり、これらは TNF  $\alpha$  などのサイトカインによる刺激では誘導を受けないことから、機械的刺激に特徴的な変化と考えられた (図 4a、b)。

4) 正常ケラチン K1 および変異ケラチン K1 を正常ヒト表皮角化細胞に導入し、蛍光顕微鏡で GFP の蛍光を観察した。無刺激状態では、正常ケラチン K1、変異ケラチン K1 を導入した細胞で差異は認められなかったが、正常ケラチン K1、変異ケラチン K1 を導入した細胞に、24時間の繰り返し機械的伸展刺激を加えたところ、正常ケラチン K1 ではフィラメントは流れるような繊維状に分布していたが、変異ケラチン K1 を導入した細胞では、フィラメントは波打った形状を示した (図 5)。

## D. 考察

機械的刺激に対して細胞は、細胞骨格、細胞接着装置などの可塑性により対応すると考えられる。細胞接着は、インテグリンなどの細胞接着因子と細胞外基質との関係により規定され、また細胞骨格のリン酸化と脱リン酸化や、細胞骨格と接着装置の接

続の可塑性が細胞全体の可塑性を生んでいると考えられている。機械的刺激は、心筋細胞や血管平滑筋細胞に対し、増殖促進シグナルを発生させる。表皮角化細胞においても、これまでの検討により、伸展刺激により BrdU の取り込みが増加することがわかっている。今回、繰り返し伸展刺激による正常ヒト表皮角化細胞における MAP キナーゼの活性化を検討したところ、ERK、p38 が活性化し、JNK は活性化しなかった。また、ERK の活性化は EGF 受容体リン酸化阻害剤により全体のリン酸化レベルは低下したが、伸展刺激による活性化の誘導は残った。またカルシウムチャンネルブロッカーである Gadolinium は、機械的刺激による ERK の活性化を抑制した。p38 の活性化については、EGF 受容体阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカーともに抑制しなかった。これらのことから、機械的刺激による ERK の活性化には EGF 受容体、カルシウムチャンネルが深く関与しているが、p38 活性化には関与していない可能性が示唆された。

DNA マイクロアレイを用い、機械的刺激によって発現が制御される遺伝子群についての検討を行ったところ、細胞骨格に関連する遺伝子群の発現が数多く制御されていることが明らかとなった。この他に、多数の転写因子も制御を受けていたが、個々の転写因子の働きに関しては、未だ解析中である。細胞骨格蛋白の中でも、特に Rho, Rac, cdc42分子関連蛋白、アクチン関連蛋白、細胞外マトリックス、細胞接着分子の発現誘導が際立っていた。これらは、TNF $\alpha$  や IFN $\gamma$  による刺激ではほとんど動かない遺伝子群であり、機械的伸展刺激による変化として特徴的と考えられる。今後、これらの分子の誘導に、MAP キナーゼ等のシグナル伝達分子がどのように関与しているか等、発現メカニズムについての検討を行っていきたいと考えている。

変異ケラチンの存在は、既存のケラチン

ネットワークに対するドミナントネガティブ効果により、正常のケラチンネットワーク構造を保てなくし、凝集塊を形成する作用があることが、特に先天性表皮水疱症の病因遺伝子であるケラチンK14において報告されている。今回、培養正常ヒト表皮角化細胞に変異ケラチンK1を導入したが、無刺激の状態では、凝集塊の形成は認められなかった。これに繰り返し伸展刺激を加えることにより、正常ケラチンK1を導入した細胞では弧状にのびる線維状の構造が保たれていたが、変異ケラチンK1を導入した細胞では、ケラチンフィラメントが細かく折れ曲がり、波打った形状をとっていた。培養表皮角化細胞には、主にケラチンK14とK5のペアが発現しており、ケラチンK1を強制発現しても、かなりの量のケラチンK14とK5が存在していると考えられる。変異K1の発現によって凝集塊が見られないのは、既存のK14、K5の存在によるのかもしれない。繰り返し伸展刺激により変異ケラチンK1を導入した細胞では線維構造に変化が認められた。この形態変化は、変異ケラチンK1による先天性水疱型魚鱗癬様紅皮症の皮疹の形成メカニズムに深く関連していると考えられる。このような変化がどのような分子メカニズムにより生じるのかについては、今後の検討課題としたい。

## E. 結論

先天性水疱型魚鱗癬様紅皮症の皮疹形成に関して、機械的伸展刺激が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表（平成17年度）

### 1. 論文発表

英語論文

1. Kagami S, Saeki H, Komine M,