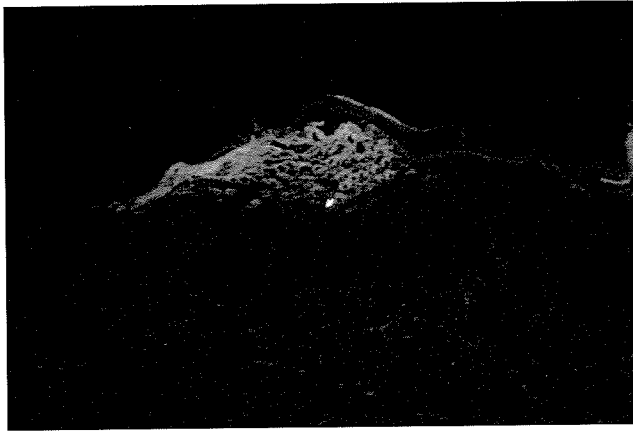
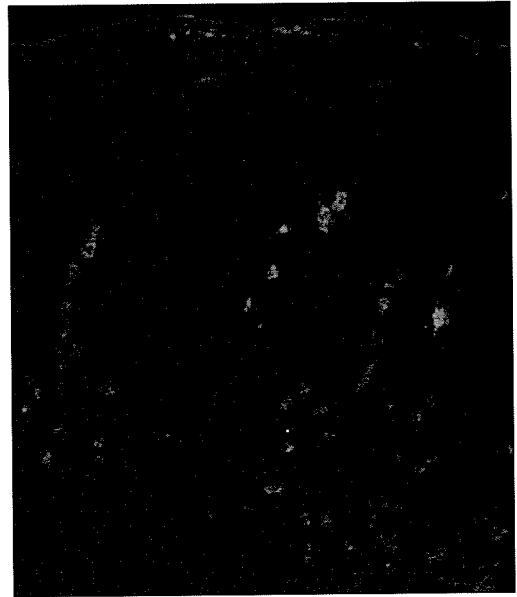


図 3



膿疱性乾癬



尋常性乾癬

図 3 a) 膿疱性乾癬膿疱部では iNOS の強い発現が認められる。b) 尋常性乾癬では、表皮内から真皮上層の樹状細胞に iNOS の発現を認める。

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

ゲノムワイドな遺伝的相関解析による乾癬感受性遺伝子の同定

分担研究者 小澤 明 東海大学医学部専門診療学系（皮膚科学）教授

研究要旨 汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明することを目的とし、その前段階として、尋常性乾癬について解析を行う。平成18年度は、絞り込んだ候補領域について、SNPを用いてさらに絞り込み、発現している遺伝子の解析を進めた。少なくとも3個の候補遺伝子を絞り込み、そのうち2個について発現遺伝子解析を完了した。これらの解析手順・解析結果を踏まえて、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析に応用していく。

共同研究者

梅澤慶紀

東海大学医学部専門診療学系助教授

馬淵智生

東海大学医学部専門診療学系助手

猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学教授

岡 晃

東海大学医学部分子生命科学助手

カーのうち495個に、3次スクリーニングでは、これら495個のうち158個に有意な相関が認められた。平成17年度にはさらに偽陽性を排除するため、1～3次の各集団を対象として、再度、遺伝的相関解析を行い、最終的に有意な相関が認められたマーカーを16個に絞り込んだ。平成18年度は、これらの領域を対象とし、SNPマーカーによる遺伝的相関解析による候補領域の絞り込みと、候補遺伝子の解析を進めている。

A. 研究目的

汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明する。

B. 研究方法

平成14年度より多施設から集めた尋常性乾癬患者群および健康対照群の血液由来のDNAを対象とし、ゲノムワイドに遺伝的相関解析を行っている。

これまでに尋常性乾癬患者437例のうち375例を3群（各125例）に分けて、3回のスクリーニングを行った。平成14年度には1次スクリーニングを行い、全染色体にわたって設定した26,061個のマイクロサテライトマーカーのうち2,065個のマーカーに有意な相関が認められた。平成15、16年度には2次、3次スクリーニングを行った。2次スクリーニングでは、2,065個のマ-

C. 研究結果

3個の乾癬関連遺伝子を絞り込んだ。1個目の遺伝子はGタンパク連結型受容体のスーパーファミリーの1つで、感受性アリルはマイクロサテライト、そのマイクロサテライトは翻訳開始点の5'上流995bpに存在していた。2個目の遺伝子はHLA class II領域(6p21.3)に存在していた。以前われわれが乾癬感受性遺伝子の1つとして報告した新規遺伝子 *SEEK1* 遺伝子であると考えた。3個目の遺伝子はCa非依存性細胞接着分子のスーパーファミリーの1つで、3つの免疫グロブリンドメインで構成されていた。感受性アリルはSNPで、そのSNPは第1イントロンに存在していた。1個目と3個目の遺伝子について発現している組織の特異性を確認した。

また、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析にむけてサンプリングを継続した。

D. 考察

ゲノムワイドな大規模な解析として着手した本研究であるが、マイクロサテライトをマーカーとした遺伝的相関解析は、すべての解析 (Pooled DNA typing での 1 ~ 3 次スクリーニングと Individual typing) をすでに完了している。最終的に16個のマーカーに有意な相関が認められ、これらの領域に、乾癬の疾患感受性遺伝子が存在しているものと確信している。

これらの領域について、SNP をマーカーとした遺伝的相関解析で連鎖不平衡を示す領域の絞り込み、発現遺伝子解析を行っている。現在、同時進行で複数の領域の解析を進めており、今年度中に少なくとも3個の感受性遺伝子を同定できると考えている。

E. 結論

本解析で得られた情報と、これまでに行ったマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング結果とを照らし合わせることによって、より迅速な疾患関連遺伝子の同定を目指す。その手法を生かして、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析を進める。同時に、多施設の協力を得て、汎発性膿疱性乾癬のサンプリングも進める。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

1. T. Mabuchi, A. Oka, M. Iizuka, Y. Umezawa, T. Matsuyama, Y. Kubota, J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui, S. Yasumoto, T. Hashimoto, S. Ikeda, Y.

Matsumoto, H. Sueki, M. Iijima, J.K. Kulski and A. Ozawa: Fine mapping of psoriasis-susceptibility locus within the HLA class II region by using microsatellite markers in an association study of Japanese cases and controls. Tokai J Exp Clin Med 32: in press, 2007

日本語論文

1. 梅澤慶紀、馬淵智生、小澤 明. 汎発性膿疱性乾癬. Visual Dermatology 5:974-975, 2006

日本語著書

なし

2. 学会発表

1. T. Mabuchi, A. Oka, Y. Umezawa, T. Matsuyama, Y. Kubota, J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui, S. Yasumoto, T. Hashimoto, S. Ikeda, Y. Matsumoto, H. Sueki, M. Iijima, H. Inoko and A. Ozawa: Fine mapping of psoriasis-susceptibility locus within the HLA class II region by using microsatellite markers in an association study of Japanese cases and controls, 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 平成18年5月3-7日, Philadelphia, USA
2. T. Mabuchi, A. Oka, Y. Umezawa, T. Matsuyama, Y. Kubota, J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui, S. Yasumoto, T. Hashimoto, S. Ikeda, Y. Matsumoto, H. Sueki, M. Iijima, H. Inoko and A. Ozawa: Genome-wide association study of psoriasis using polymorphic microsatellite markers, The 10th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, The Korean Society for Psoriasis, 平成18年5月

- 12—13日, Seoul, Korea
3. T. Mabuchi, A. Oka, Y. Umezawa, T. Matsuyama, Y. Kubota, J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui, S. Yasumoto, T. Hashimoto, S. Ikeda, Y. Matsumoto, H. Sueki, M. Iijima, H. Inoko and A. Ozawa: Genome-wide association study of psoriasis using polymorphic microsatellite markers, 日本研究皮膚科学会第31回年次学術大会、平成18年5月31日—6月2日、京都
 4. 岩月啓氏、松浦浩徳、梅澤慶紀、馬渕智生、小澤 明、北島康雄：発性膿疱性乾癬の現状について、第105回日本皮膚科学会総会・学術大会、平成18年6月2—4日、京都
 5. 梅澤慶紀、馬渕智生、小澤 明、松浦浩徳、小宮根真弓、照井 正、岩月啓氏、青山裕美、北島康雄：小児汎発性膿疱性乾癬の疫学解析、第21回日本乾癬学会学術大会、平成18年9月29—30日、高知
 6. 岩月啓氏、中西 元、松浦浩徳、小澤 明、梅澤慶紀、馬渕智生、照井 正、小宮根真弓、北島康雄：発性膿疱性乾癬の診断・重症度判定指針の鋭敏度・特異度の再検討、第21回日本乾癬学会学術大会、平成18年9月29—30日、高知
 7. 松浦浩徳、中西 元、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤 明、市來善郎、北島康雄、高橋英俊、飯塚一：発性膿疱性乾癬における健康問題 QOL、第21回日本乾癬学会学術大会、平成18年9月29—30日、高知
 8. A. Ozawa: Gene analysis in psoriasis. Up to date-, 第58回韓国皮膚科学会総会、平成18年10月21—22日、ソウル、韓国
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
特記すべき事項なし
 2. 実用新案登録
特記すべき事項なし
 3. その他
特記すべき事項なし

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

膿疱性乾癬の病因と治療
—脂質代謝に関する解析—

研究協力者 照井 正 日本大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 尋常性乾癬や膿疱性乾癬の治療に汎用されているステロイドやレチノイド、活性型ビタミン D3 は核内レセプターを介して治療効果を発揮する。それらと同じファミリーに属する核内レセプターの一つである liver X receptor (LXR) は脂質代謝に重要な働きをしており、LXR agonist で刺激すると培養表皮角化細胞 (EK) の分化が誘導されることが報告されている。一方、脂質が重要な働きをする皮膚バリア機能が乾癬で異常であること、また、in vitro の実験で、セラミドやその代謝産物が細胞の増殖や apoptosis に関連することも明らかにされている。本研究の結果、LXR を刺激すると HaCaT 細胞の分化の誘導と共に脂肪酸代謝に関連する酵素の mRNA が亢進することが分かった。また、HaCaT 細胞は SREBP-1c を発現しており、脂肪酸合成酵素の誘導と相関し、一方で、SREBP-2 の発現量はコレステロール合成酵素の発現量に平行した。SREBP の発現は分化と連動していること、その制御により EK の増殖や分化をコントロールできる可能性があること、乾癬の治療標的となり得ることを示唆すると考える。

共同研究者
横山 愛
日本大学医学部皮膚科大学院
原 弘之
日本大学医学部皮膚科助教授
槇島 眞
日本大学医学部生化学教授
青山裕美
岐阜大学医学部皮膚病態学講師

る細胞内シグナルと核内レセプターとの相互作用を解明することを目的とする。
今年度は、1) について検討した。

A. 研究目的

1) 培養表皮角化細胞における核内レセプター、liver X receptor (LXR) を介した脂質代謝と表皮角化細胞 (EK) 分化の関連性を明らかにする。2) 乾癬および膿疱性乾癬病変における LXR などの核内レセプター、および、それらの標的遺伝子の発現を分子レベルで検討し、乾癬の分子病態における核内レセプターの役割および分子薬理機構、さらに、乾癬の病態と関連す

B. 研究方法

1. 核内レセプター、コファクター、標的遺伝子の発現：HaCaT 細胞を用いて、LXR に対する標的遺伝子の mRNA の発現を解析する。
2. 脂質生合成関連酵素の発現量：コレステロールと脂肪酸に関与する酵素 (acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS)、saturated CoA desaturase (SCD)) の mRNA をリアルタイム PCR で測定する。HaCaT 細胞の分化誘導の有無による変化を観察する。

C. 研究結果

- 1) ヒト EK の不死化細胞株である

HaCaT の細胞密度を増加させると、SREBP-1c の発現が亢進する。細胞密度が低い条件ではLXR リガンドは、SREBP-1c の発現を亢進させるが、細胞密度が高い条件では変化がない(図1)。2) SREBP-1c の変化は脂肪酸合成に関与する酵素である acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), saturated CoA desaturase (SCD) の mRNA の発現量と相関する(図2)。3) SREBP-2はコレステロール合成酵素の発現と相関する(図3)。

D. 考察

角層バリア破壊が乾癬に類似した遺伝子発現を誘導することから、角層バリア機能を司る角層細胞間脂質の代謝が乾癬発症に関与することが示唆されている。肝臓での脂肪酸・コレステロール代謝は、それぞれSREBP-1c と SREBP-2 が制御しているが、皮膚では、SREBP-1c の発現は少なく、SREBP-2 が関与していると報告されてきた(Eliasら)。しかし、今回の HaCaT 細胞を用いた実験の結果から、皮膚でも脂肪酸代謝には SREBP-1c が関与していること、さらに、その発現が分化と関連していることを明らかになった。

細胞密度が高い、より分化する方向にある条件では、より分化マーカーのインボルクリンの発現が増強している条件では、LXR リガンドの脂肪酸合成能に対する影響はなかった。しかし、細胞密度が低い場合、すなわち分化がまだ進行せず、細胞増殖が盛んな条件で LXR リガンド刺激すると分化が誘導されると共に、脂肪酸代謝が亢進することが明らかとなった。

E. 結論

分化が誘導されていない、増殖のより盛んな細胞にある HaCaT 細胞に対して、LXR リガンドが分化を促進し、細胞増殖を抑制する用に働くことから、LXR やSREBP-1c に関連するシグナル経路に関連する分子が乾

癬や膿疱性乾癬の治療標的となることが推察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成17年度)

16. 論文発表

英語論文

- ① Numata Y, Terui T, Okuyama R, Hirasawa N, Sugiura Y, Miyoshi I, Watanabe T, Kuramasu A, Tagami H, Ohtsu H. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol.* 126:1403-1409, 2006.
- ② Okuyama R, Ogawa E, Nagoshi H, Yabuki M, Kurihara A, Terui T, Aiba S, Obinata M, Tagami H, Ikawa S. p53 homologue, p51/p63, maintains the immaturity of keratinocyte stem cells by inhibiting Notch1 activity. *Oncogene.* 2007 Jan 22; [Epub ahead of print]

日本語論文

1. 升田貴子、照井 正. 乾癬の病態(前編) —炎症・免疫学的側面から—. *西日皮膚* 68:395-402, 2006.
2. 清水秀直、照井 正. 乾癬の病態(中編) —乾癬における好中球の役割—. *西日皮膚* 68:527-531, 2006.
3. 須田たかね、照井 正. 乾癬の病態(後編) —乾癬の治療—. *西日皮膚* 68:656-664, 2006.
4. 照井 正. 掌蹠膿疱症. *皮膚疾患最新の治療 2007-2008*. 編集: 瀧川雅浩, 渡辺晋一. 121, 2006.
5. 坂本久美子、原 弘之、照井 正. シクロスポリン—エトレチナート併用療

法にて軽快した汎発性膿疱性乾癬の1例. 臨床皮膚科 60:1211-1214, 2006.

17. 学会発表

- ① 照井 正. 乾癬治療における Neoral の位置づけ 1. 乾癬治療におけるネオラルのメリット—QOL 評価とステロイド外用による副作用の観察を通して—. 第21回日本乾癬学会学術大会 (イーブニングセミナー) 2006.9.29, 高知市
- ② 岩月啓氏、中西 元、松浦浩徳、小澤 明、梅澤慶紀、馬淵智生、照井 正、小宮根真弓、北島康雄. 膿疱性乾癬の診断・重症度判定基準の鋭敏度・特異度の再検討. 第21回日本乾癬学会学術

大会 2006.9.29, 高知市

- ③ 梅澤慶紀、馬淵智生、小澤 明、松浦浩徳、小宮根真弓、照井 正、岩月啓氏、青山裕美、北島康雄. 小児の汎発性膿疱性乾癬の疫学調査. 第21回日本乾癬学会学術大会 2006.9.29, 高知市

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 7. 特許取得
なし。
- 8. 実用新案登録
なし。
- 9. その他
なし。

図とその説明

図1 細胞密度の増加と LXRリガンド (Tcpd) 添加で SREBP-1c の発現が増加する。

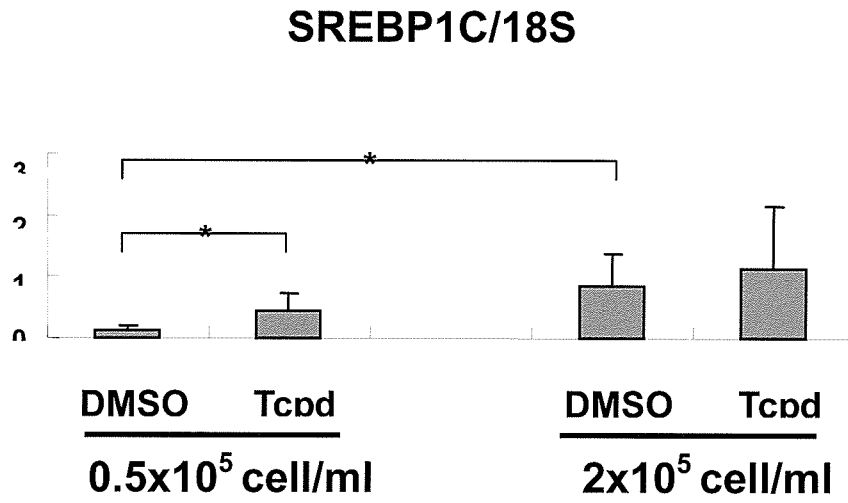


図2 SREBP-1c は脂肪酸合成酵素の発現を増加させる。

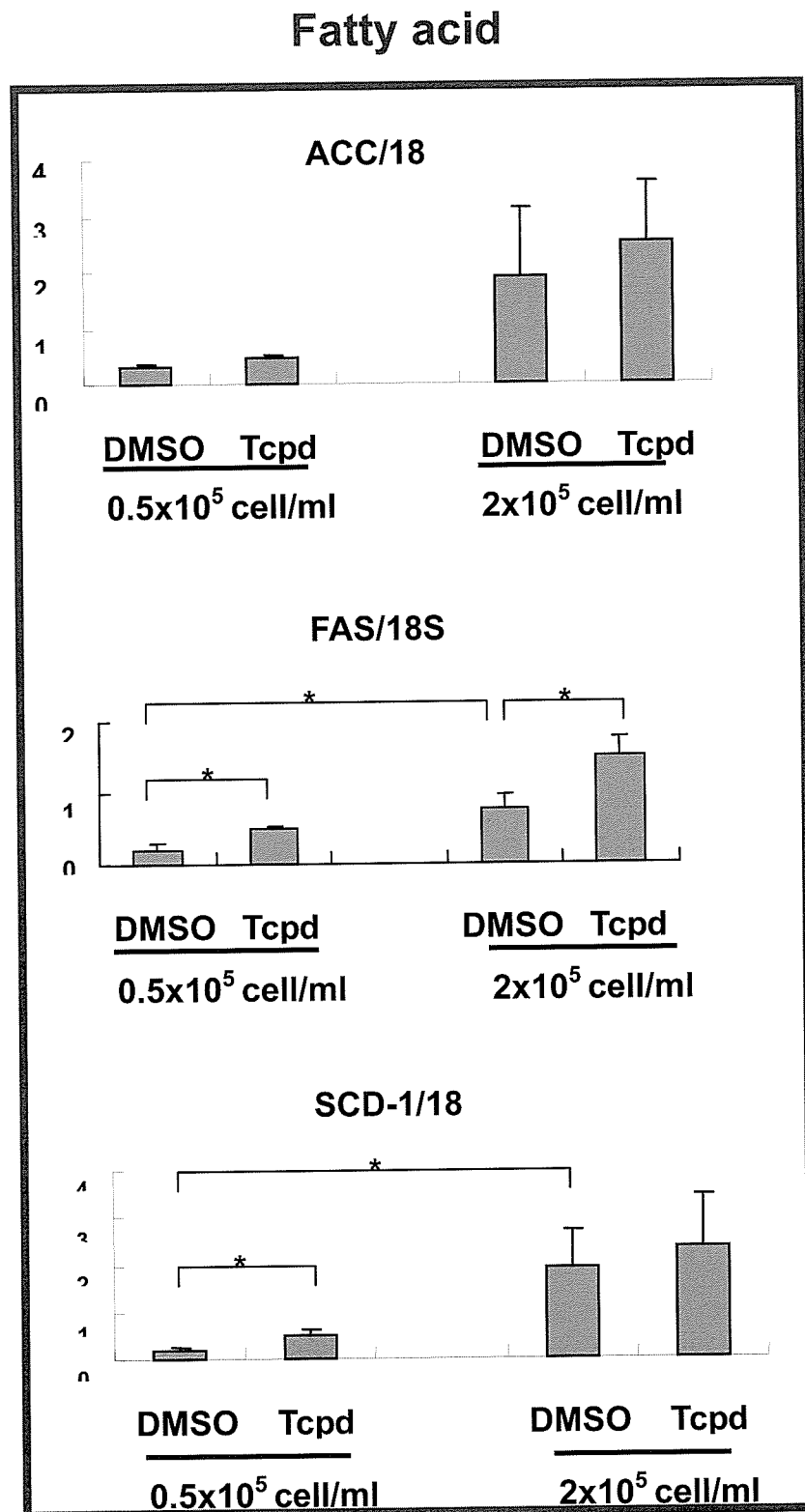
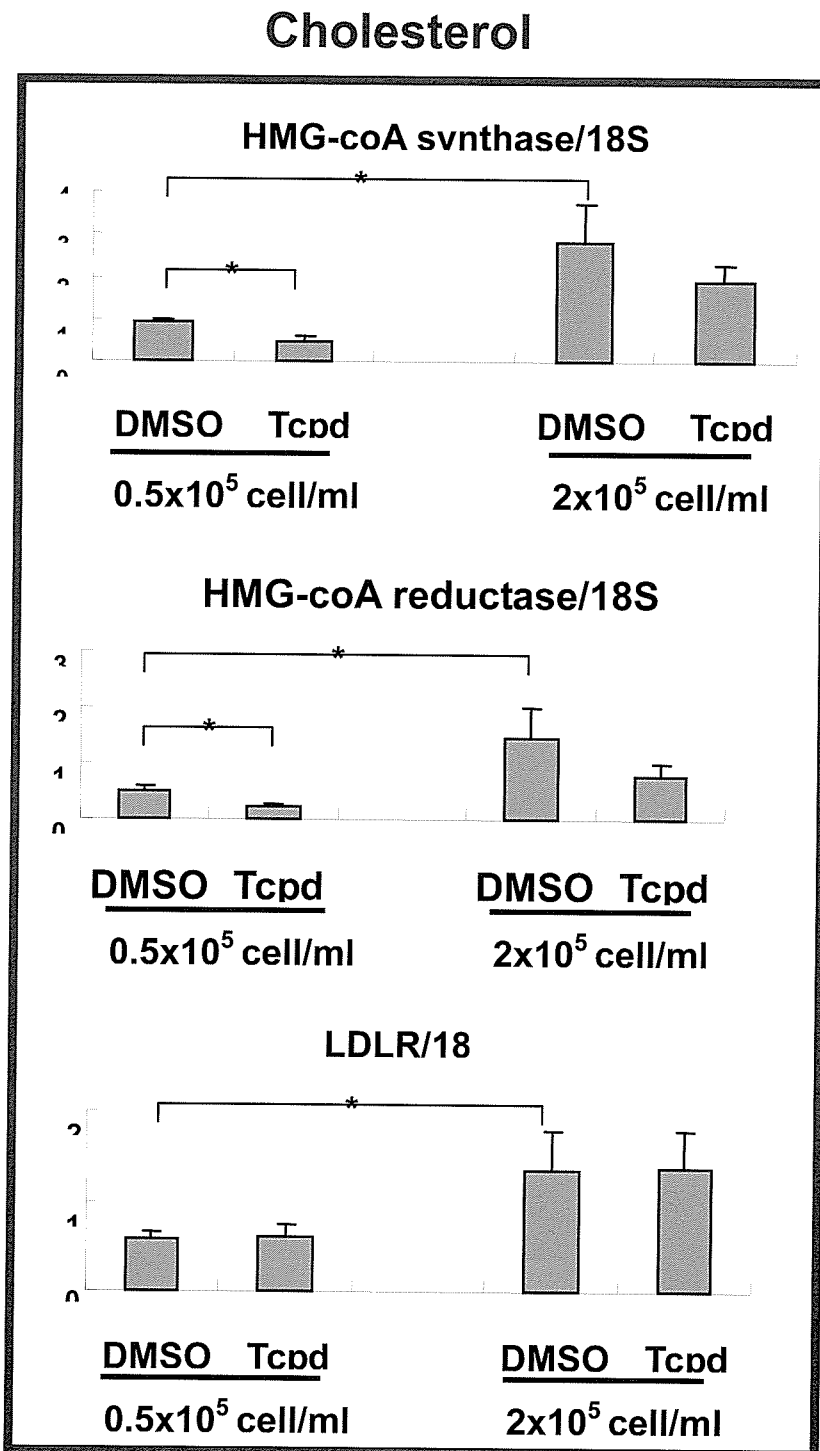


図3 SREBP-2はコレステロール合成酵素の発現を増加させる。



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

栄養障害型表皮水疱症のエクソンスキップ誘導による新規遺伝子治療

分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症は重篤な遺伝性皮膚疾患の1つであり、原因遺伝子はVII型コラーゲン遺伝子であることは既に同定されている。VII型コラーゲン遺伝子がコードしているVII型コラーゲンは、表皮と真皮の境界部にあたる基底膜に存在する。そのため、栄養障害型表皮水疱症は、生後まもなくから軽微な外的機械刺激により皮膚に容易に水疱をきたし、びらん、潰瘍を形成する。現在、本症の有効な治療法は見つかっておらず、新しい治療法の開発が期待されている。

栄養障害型表皮水疱症は、常染色体性劣性遺伝を示し、両方のalleleに早期終止コドン変異を有すると、全くVII型コラーゲンの発現が認められず、症状が重篤化する。そこで、この早期終止コドン変異を有するエクソンのスキッピングを誘導し、flameを保たせ、タンパクの翻訳を継続させる新規治療法を開発した。今回、日本人の栄養障害型表皮水疱症患者に多く認められるVII型コラーゲン遺伝子の5818delCの変異を有するエクソン70のスキップを誘導させるために、変異を有するエクソンにアンチオリゴヌクレオチド(AONs)を作成、変異を有するエクソンのスキッピングにより、タンパクを発現させるシステムを確立させた。

研究協力者

澤村大輔、後藤真希 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野

A. 研究目的

全くVII型コラーゲンの発現が認められない栄養障害型表皮水疱症患者で5818delCの変異を有するエクソン70に、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AONs)を作成、患者細胞に導入、エクソン70のスキップの誘導およびVII型コラーゲンの発現の検討を行う。VII型コラーゲン遺伝子のエクソン70は48bpと3の倍数であるため、このエクソンを単一にスキップされることが可能であれば、タンパクの翻訳の継続が予想される。さらに、スキップされることにより出来たエクソン70欠損VII型コラーゲンが正常のVII型コラーゲンと同等の機能を有するか否かを確認することにある。

B. 方法

5818delCの変異を有する患者表皮細胞に、この変異alleleに特異的に反応するAONsを作成し、患者表皮細胞に導入、エクソンスキップ誘導をmRNAレベルで確認した。さらに、AONs導入後、VII型コラーゲンの発現を免疫染色にて観察した。

次に、エクソンスキップ誘導により翻訳されたVII型コラーゲン(エクソン70欠損VII型コラーゲン)が、正常なVII型コラーゲンと同等な機能を有するか否かを確認するため、migration assayとadhesion assayで検討を行った。

また、生体においてエクソンスキップが誘導されるか確認するため、無免疫動物に患者細胞を移植し、AONsを局注、エクソンスキップ誘導の有無をmRNAで確認し、VII型コラーゲンの発現を免疫染色にて検討した。

C. 研究結果

5818delC の変異を有する全く VII 型コラーゲンの発現がない患者表皮細胞において、この変異に特異的な AONs 導入によりエクソンスキップが誘導され (図 1 A)、患者表皮細胞の約 6.2% に VII 型コラーゲンの発現を認めた (図 1 B)。

さらに、エクソン 70 欠損 VII 型コラーゲンと正常 VII 型コラーゲンを migration assay と adhesion assay を蛋白の機能を比較検討した結果、いずれの assay においても、同等の機能を有することが確認された (図 2)。

また、生体において、患者細胞を無免疫動物に移植し構築した皮膚に AONs を局注すると、エクソンスキップの誘導が mRNA で確認され (図 3 A)、蛍光抗体所見により、基底膜に VII 型コラーゲン沈着を認めた (図 3 B)。

D. 考察

今回の研究は、AONs を用いた単一エクソンのスキップによる遺伝子治療の可能性を示した。さらに、単一エクソンスキップにより形成された VII 型コラーゲンは、正常な VII 型コラーゲンの機能と同等の機能を有し障害することがないことも示唆される。実際、スプライスサイト変異を有し、エクソンスキップ誘導される患者においては、臨床症状が重症化しないことも報告されている。

しかし、AONs を用いた栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療は、AONs の導入効率が悪いこと、AONs の持続効果が短いこと、エクソンスキップにより作られた VII 型コラーゲンは完全な VII 型コラーゲンではないことなど問題点は上げられるが、このような問題点が解決されると、栄養障害型表皮水疱症の有効な治療法となることが考えられる。

E. 結論

今回、AONs を用いたエクソンスキップ誘導による栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療は有効な治療法であ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 (平成 17 年度)

論文発表 英語論文

- 1) Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Jung SY, Kim SC, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean: genetic studies in 19 cases. **Br J Dermatol** 155:313-317, 2006.
- 2) Akiyama M, Sakai K, Wolff G, Hausser I, McMillan J, Sawamura D, Shimizu H: A novel ABCA12 mutation 3270delT causes harlequin ichthyosis. **Br J Dermatol** in press.
- 3) Akiyama M, Titeux M, Sakai K, McMillan J, Tonasso L, Calvas P, Jossic F, Hovnanian A, Shimizu H: DNA-based prenatal diagnosis of harlequin ichthyosis and characterization of ABCA12 mutation consequences. **J Invest Dermatol** in press.
- 4) McMillan J, Akiyama M, Rouan F, Mellerio J, Lane E, Leigh I, Owaribe K, Wiche G, Fujii N, Uitto J, Eady R, Shimizu H: Plectin defects in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. **Muscle Nerve** in press.
- 5) Arita K, Jacyk W, Wessagowit V, Rensburg E, Chaplin T, Mein C, Akiyama M, Shimizu H, Happle R, McGrath J: The south african

- “Bathing Suit Ichthyosis” is a form of lamellar ichthyosis caused by a homozygous missense mutation, p.R315L, in transglutaminase 1. **J Invest Dermatol** in press.
- 6) Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shimizu H: Compound heterozygous mutations including a de novo missense mutation in ABCA12 led to a case of harlequin ichthyosis with moderate clinical severity. **J Invest Dermatol** 126:1518-1523, 2006.
 - 7) Arita K, Akiyama M, Aizawa T, Umetsu Y, Segawa I, Goto M, Sawamura D, Demura M, Kawano K, Shimizu H: A Novel N14Y Mutation in Connexin26 in Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome: Analyses of Altered Gap Junctional Communication and Molecular Structure of N Terminus of Mutated Connexin26. **Am J Pathol** 169:416-423, 2006.
 - 8) Goto M, Sawamura D, Ito K, Abe M, Nishie W, Sakai K, Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H: Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. **J Invest Dermatol**. 126:766-772, 2006.
 - 9) Goto M, Sawamura D, Nishie W, Sakai K, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Targeted Skipping of a Single Exon Harboring a Premature Termination Codon Mutation: Implications and Potential for Gene Correction Therapy for Selective Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patients. **J Invest Dermatol** 126:2614-2620, 2006.
 - 10) Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Adachi K, Okuyama T, Nakata Y, Shimizu H, Matsuura H, Oono T, Iwamatsu H, Kono M, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene and their phenotypes. **Pigment Cell Res** 19:451-453, 2006.
 - 11) McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H: Colocalization of multiple laminin isoforms predominantly beneath hemidesmosomes in the upper lamina densa of the epidermal basement membrane. **J Histochem Cytochem** 54:109-118, 2006.
 - 12) Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Kida M, Ariga T, Sakiyama Y, Tomizawa K, Mitsui H, Tamaki K, Shimizu H: Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta. **Int J Mol Med** 18:333-337, 2006.
 - 13) Ota M, Sawamura D, Yokota K, Ueda M, Horiguchi Y, Kodama K, Goto M, Shimizu H: A unique monoclonal antibody 29A stains the cytoplasm of amniotic epithelia and cutaneous basement membrane. **J Dermatol Sci.** 42:23-29. Epub 2005 Dec 2020., 2006.
 - 14) Onozuka T, Sawamura D, Goto M, Yokota K, Shimizu H: Possible role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of Darier’s disease. **J Dermatol Sci.** 41:217-220, 2006.
 - 15) Sakai K, Akiyama M, Watanabe T,

- Sanayama K, Sugita K, Takahashi M, Suehiro K, Yorifuji K, Shibaki A, Shimizu H: Novel ALDH3A2 Heterozygous Mutations in a Japanese Family with Sjogren-Larsson Syndrome. **J Invest Dermatol** 126:2545-2547, 2006.
- 16) Sawamura D, Mochitomi Y, Kanzaki T, Nakamura H, Shimizu H: Glycine substitution mutations by different amino acids at the same codon in COL7A1 cause different modes of dystrophic epidermolysis bullosa inheritance. **Br J Dermatol** 155:834-837, 2006.
- 17) Sawamura D, Nizeki H, Miyagawa S, Shinkuma S, Shimizu H: A novel indel COL7A1 mutation 8068del17insGA causes dominant dystrophic epidermolysis bullosa. **Br J Dermatol** 154:995-997, 2006.
- 18) Sawamura D, Sato-Matsumura K, Shibata S, Tashiro A, Furue M, Goto M, Sakai K, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H: COL7A1 mutation G2037E causes epidermal retention of type VII collagen. **J Hum Genet** 24:24, 2006.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
13. 特許取得
○なし。
14. 実用新案登録
○なし。
15. その他
○なし。

図とその説明

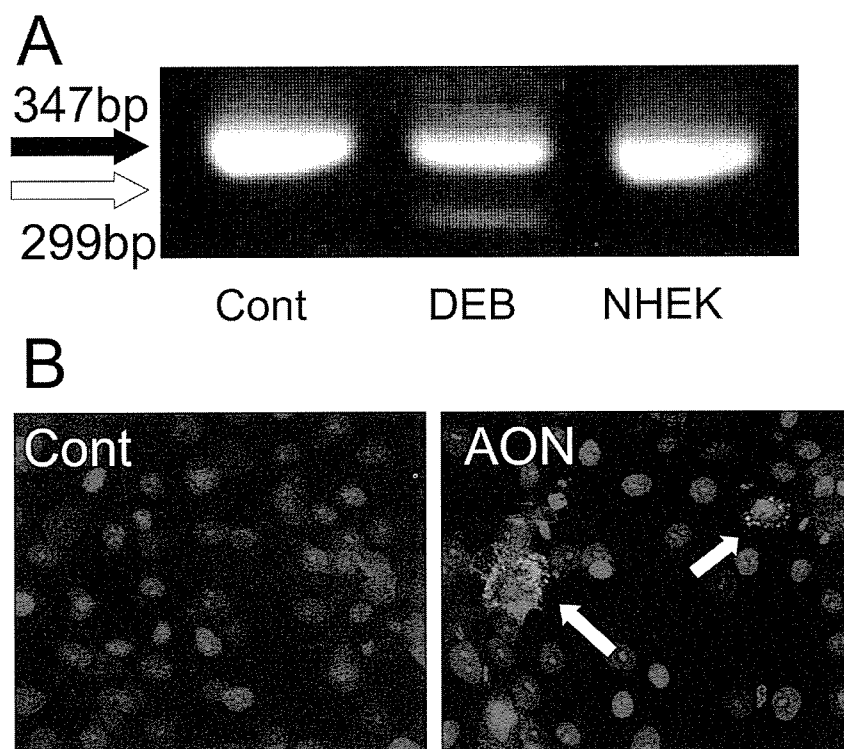


図1 A:患者表皮細胞と正常ヒト表皮細胞における AONs 導入によるエクソンスキップ誘導の有無。299bp のバンドがエクソンスキップ誘導 (+)。B:AONs 導入による患者表皮細胞での蛍光抗体所見による VII 型コラーゲン発現の検討。

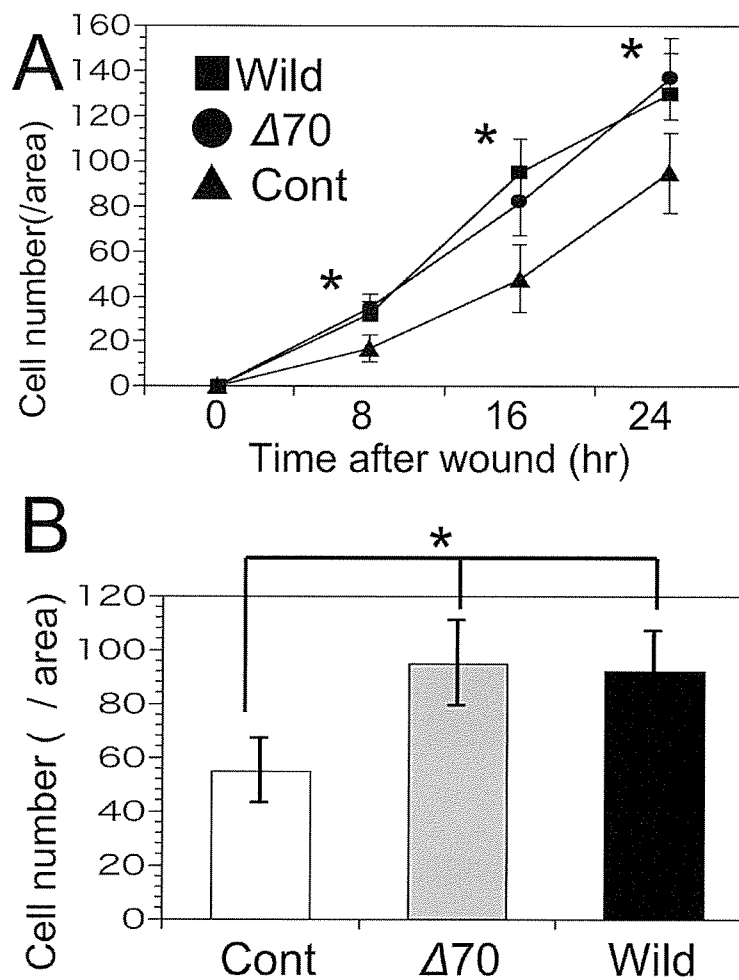


図2 A: migration assay の結果。B: adhesion assay の結果。Wild;VII 型コラーゲン、 $\Delta 70$; エクソン70欠損 VII 型コラーゲン、Cont;コントロール。VII 型コラーゲンとエクソン70欠損VII型コラーゲンでは同等の機能を有した。

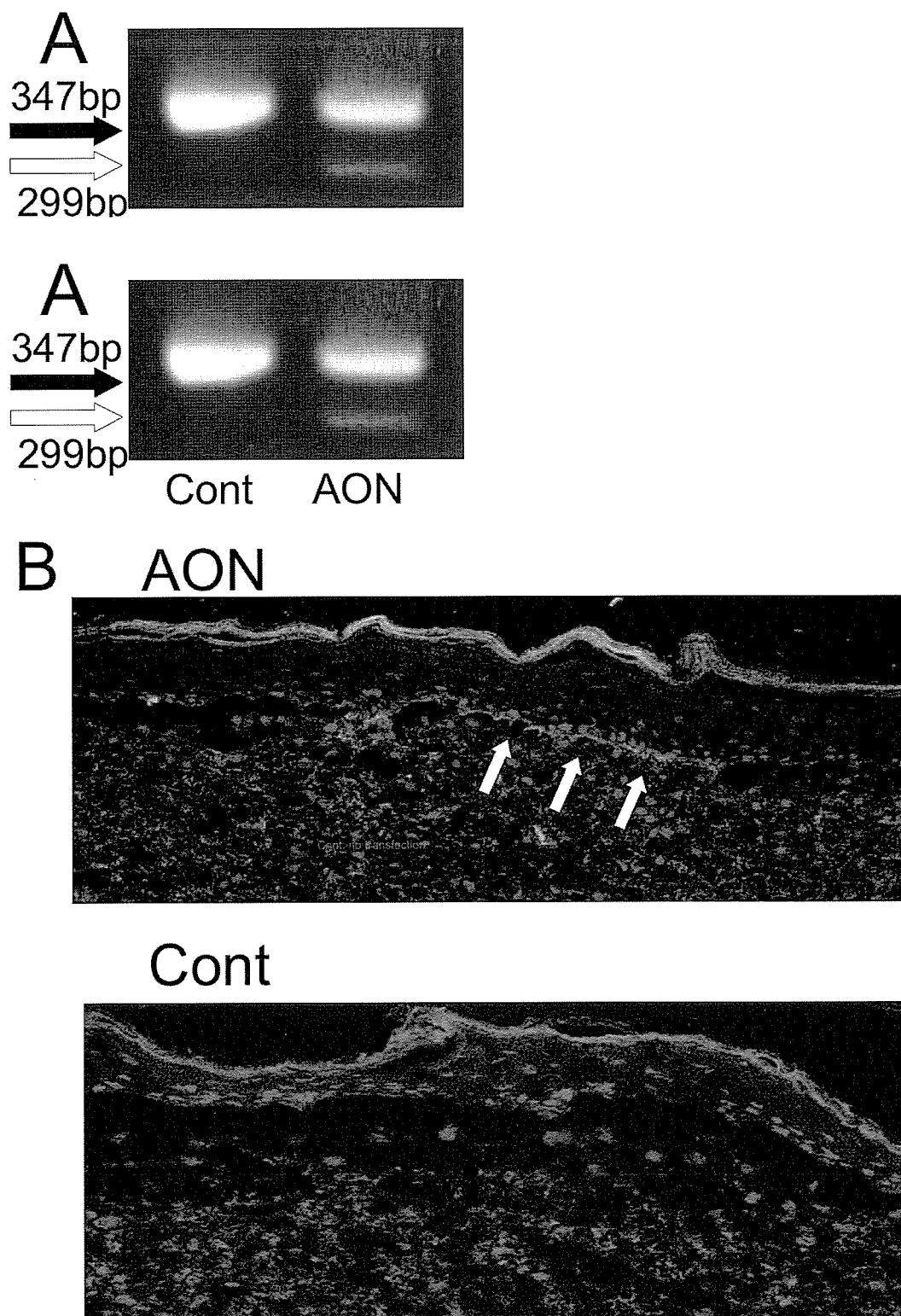


図3 A: 患者細胞を無免疫動物に移植し、構築された皮膚に AONs 導入した部位のエクソンスキップ誘導の有無。299bp のバンドがエクソンスキップ誘導 (+)。B: 蛍光抗体所見。AONs 導入により基底膜に VII 型コラーゲンの沈着を認める。

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

日本と韓国における単純型表皮水疱症変異の傾向
－19例の遺伝子検索－

分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

研究要旨 単純型表皮水疱症（EBS）は機械的水疱を生じる遺伝性皮膚疾患で表現型の重症度により三つの亜系に分類され、ケラチン5遺伝子あるいはケラチン14遺伝子のどちらかに変異を認める。変異部位と表現型の重症度には相関があるとされる。最近イスラエルにおけるEBS患者の表現型と変異型の相関はヨーロッパやアメリカでみられるそれと異なる傾向があることが報告され、EBSの変異には地域や人種間の差があることが示唆されている。今回我々は日本と韓国におけるEBSの変異の特徴を得るために日本人17家系と韓国人2家系のEBS患者について変異検索を行った。結果6人のケラチン5遺伝子に新しい変異を確認した。8人の変異は既報告であった。5人の家族歴のないケブネル型EBS患者には変異が検出されなかった。表現型と変異型の相関は欧米のそれと同じであったが、検出された変異はケラチン5遺伝子が11人（78%）でケラチン14遺伝子は3人（21%）であった。欧米ではこの比率はほぼ同じであり、更なる症例の蓄積が必要であるがケラチン5の変異率が高いのは日本と韓国におけるEBSの特徴である可能性がある。

研究協力者

安川香菜、澤村大輔、後藤真希 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科病学分野

A. 研究目的

EBSにおいては、ケラチン5あるいはケラチン14遺伝子の変異部位と表現型の重症度に相関がみられる。最近、EBSの変異には地域や人種間に差があることが指摘されている。我々は、日本人17家系と韓国人2家系のEBS患者について変異検索を行ない、日本と韓国のEBS変異の特徴を調べた。

B. 方法

臨床症状および皮膚生検における免疫蛍光抗体法、電顕的検索にてEBSの診断を行った。ならびに患者の末梢血単核球から抽出したgenomic DNAを用いてケラチン5と14遺伝子の変異検索をダイレクトシ

ークエンス法を用いて施行した。

（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、血縁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

患者と変異（表）：EBS患者のうちわけは日本人17家系のうちEBS-WCは3例、EBS-Kは8例、EBS-DMは5例、EBS-MPは1例であった。EBS-WCの2変異とEBS-Kの2変異が新しい変異であった。

EBS-DM は5例とも報告された変異であったが、家族歴のない EBS-K 例には変異が検出されなかった。検出された14変異のうちケラチン5の変異が11例(78%)ケラチン14の変異が3例(21%)であった。

本研究では家族歴のない日本人 EBS-K の5例に変異を検出しなかった。EBS の変異検出率は85-90%と報告されており、本研究はそれより低い検出率となった(73%)。

D. 考察

変異部位と表現型の相関をみるために既報告の変異と本研究で検出された変異をケラチン分子上にプロットした(図1)。EBS-DM ではケラチン分子の重合に必要とされるロッド領域の両端に変異が生じていた(赤)。EBS-K、EBS-WC ではロッドをつなぐリンカー部やロッドの中央部に変異がみられた(緑、青)。これらは今まで報告されてきた EBS の表現型と変異部位の相関と一致するものであった。

次に本研究にて新たに検出された変異について検討した(図2)。変異が生じて変化したアミノ酸(143番目のバリン、158番目のアスパラギン酸、186番目のバリン、191番目のグリシン、352番目アルギニン)は他のケラチン分子内でも保存されており、進化上重要な位置をしめるアミノ酸であることが推測された。

本研究では EBS の変異検出率が従来報告されている率より低い傾向があった。これが日本人 EBS の特徴であるか否かはもっと症例数を増やした検討が必要である。しかし、検出された変異はケラチン5の方がケラチン14より多く、検出率はほぼ同じとする従来の報告と異なっておりこれは日本人、韓国人 EBS の特徴なのかもしれない。

E. 結論

今回、日本と韓国における EBS の変異

結果を報告した。表現型と変異の相関は欧米と同じであったが、検出率が低いこと、ケラチン5の変異が多いことが日本と韓国の特徴であるか否かはさらに症例数を増やした検討の必用があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(平成17年度)

論文発表 英語論文

- 19) Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Jung SY, Kim SC, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean: genetic studies in 19 cases. **Br J Dermatol** 155:313-317, 2006.
- 20) Akiyama M, Sakai K, Wolff G, Hausser I, McMillan J, Sawamura D, Shimizu H: A novel ABCA12 mutation 3270delT causes harlequin ichthyosis. **Br J Dermatol** in press.
- 21) Akiyama M, Titeux M, Sakai K, McMillan J, Tonasso L, Calvas P, Jossic F, Hovnanian A, Shimizu H: DNA-based prenatal diagnosis of harlequin ichthyosis and characterization of ABCA12 mutation consequences. **J Invest Dermatol** in press.
- 22) McMillan J, Akiyama M, Rouan F, Mellerio J, Lane E, Leigh I, Owaribe K, Wiche G, Fujii N, Uitto J, Eady R, Shimizu H: Plectin defects in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. **Muscle Nerve** in press.
- 23) Arita K, Jacyk W, Wessagowit V, Rensburg E, Chaplin T, Mein C, Akiyama M, Shimizu H, Happle R, McGrath J: The south african

- “Bathing Suit Ichthyosis” is a form of lamellar ichthyosis caused by a homozygous missense mutation, p.R315L, in transglutaminase 1. **J Invest Dermatol** in press.
- 24) Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shimizu H: Compound heterozygous mutations including a de novo missense mutation in ABCA12 led to a case of harlequin ichthyosis with moderate clinical severity. **J Invest Dermatol** 126:1518-1523, 2006.
- 25) Arita K, Akiyama M, Aizawa T, Umetsu Y, Segawa I, Goto M, Sawamura D, Demura M, Kawano K, Shimizu H: A Novel N14Y Mutation in Connexin26 in Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome: Analyses of Altered Gap Junctional Communication and Molecular Structure of N Terminus of Mutated Connexin26. **Am J Pathol** 169:416-423, 2006.
- 26) Goto M, Sawamura D, Ito K, Abe M, Nishie W, Sakai K, Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H: Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. **J Invest Dermatol**. 126:766-772, 2006.
- 27) Goto M, Sawamura D, Nishie W, Sakai K, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H: Targeted Skipping of a Single Exon Harboring a Premature Termination Codon Mutation: Implications and Potential for Gene Correction Therapy for Selective Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patients. **J Invest Dermatol** 126:2614-2620, 2006.
- 28) Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Adachi K, Okuyama T, Nakata Y, Shimizu H, Matsuura H, Oono T, Iwamatsu H, Kono M, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene and their phenotypes. **Pigment Cell Res** 19:451-453, 2006.
- 29) McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H: Colocalization of multiple laminin isoforms predominantly beneath hemidesmosomes in the upper lamina densa of the epidermal basement membrane. **J Histochem Cytochem** 54:109-118, 2006.
- 30) Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Kida M, Ariga T, Sakiyama Y, Tomizawa K, Mitsui H, Tamaki K, Shimizu H: Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta. **Int J Mol Med** 18:333-337, 2006.
- 31) Ota M, Sawamura D, Yokota K, Ueda M, Horiguchi Y, Kodama K, Goto M, Shimizu H: A unique monoclonal antibody 29A stains the cytoplasm of amniotic epithelia and cutaneous basement membrane. **J Dermatol Sci**. 42:23-29. Epub 2005 Dec 2020., 2006.
- 32) Onozuka T, Sawamura D, Goto M, Yokota K, Shimizu H: Possible role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of Darier’s disease. **J Dermatol Sci**. 41:217-220, 2006.
- 33) Sakai K, Akiyama M, Watanabe T,