

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

研究協力者 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っている。マイクロサテライトをマーカーとしたゲノムワイドな遺伝的相関解析で絞り込んだ候補領域について、SNPを用いて候補領域をさらに絞り込み、発現している遺伝子の解析を進めている。平成19年度までに、少なくとも4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  
准教授  
馬淵智生 東海大学医学部専門診療学系  
助教  
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  
講師

2次スクリーニングでは、2,065個のマーカーのうち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年度からは、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。

（倫理面への配慮）

本研究は東海大学医学部 医の倫理委員会で承認を得ている。

受付番号 01-11（2001年8月20日承認）

**C. 研究結果**

4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 I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* 遺伝子であると考へた。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。4 個目の遺伝子は HLA class II 領域に存在する *BTNL2* 遺伝子であると考へた。この HLA class II 領域との相関は HLA class I 領域との相関とは独立したものであった。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。

今回絞り込んだ遺伝子の 1 つ、*BTNL2* 遺伝子は免疫グロブリンのスーパーファミリーで T 細胞の活性化に必要な共刺激分子 (costimulatory molecule) として報告されている。乾癬の発症には遺伝的因子のほかに免疫異常も関与しており、乾癬の発症もしくは病態形成に影響を及ぼしているものと推測された。

絞り込んだ候補領域について、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さらなる絞り込み、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、近いうちにさらに複数の感受性遺伝子を同定できると考へている。

今後は、同定した複数の乾癬感受性遺伝子について、膿疱性乾癬では相関を示すか否かを検討する。また、膿疱性乾癬についてもゲノムワイドな遺伝的相関解析に着手し、膿疱性乾癬に特異な疾患感受性遺伝子

の同定を目指す。慢性、難治性である膿疱性乾癬の発症因子の 1 つが解明されれば、根絶的治療の開発が期待できる。

#### 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

該当なし。

#### G. 研究発表 (平成19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** 32:6-13, 2007

日本語論文

1. 馬渕智生、梅澤慶紀、小澤 明. 乾癬. 皮膚病診療 29:801-804, 2007
2. 学会発表
1. 小澤 明: 乾癬関連遺伝子の解析とその展望、第 106 回日本皮膚科学会総会、平成19年 4 月 20-22 日、横浜

2. 梅澤慶紀、馬渕智生、小澤 明、松浦浩徳、岩月啓氏、青山裕子、北島康雄：小児・成人における汎発性膿疱性乾癬の疫学調査、第106回日本皮膚科学会総会、平成19年4月20-22日、横浜
3. 小澤 明：教育セミナーI [乾癬治療の将来] 乾癬治療は遺伝的背景を乗り越えられるか？、第23回日本臨床皮膚科医会総会臨床学術大会、平成19年5月19-20日、広島
4. 小澤 明：乾癬2007、第82回日本皮膚科学会大分地方会特別講演会、平成19年5月19-20日、大分  
 UMEZAWA Yoshinori, AKASAKA Emiko, MABUCHI Tomotaka, MATSUYAMA Takashi, OZAWA Akira, MATSUURA Hironori, IWATSUKI Keiji, and KITAJIMA Yasuo: EPIDEMIOLOGY OF GENERALIZED PUSTULAR PSORIASIS IN JAPAN, The 11<sup>th</sup> Annual Meeting The Korean Society for Psoriasis, 2007.5.19, Seoul, Korea
5. Tomotaka Mabuchi, Akira Oka, Yoshiko Yamasuji, Emiko Akasaka, Akio Kondo, Shiho Tamiya, Yoshinori Umezawa, Takashi Matsuyama, Hidetoshi Inoko, and Akira Ozawa: A whole genome-wide association study of psoriasis within the Japanese population using 26,065 microsatellite markers, The 21<sup>st</sup> World Congress of Dermatology, 2007.10.1-5, Buenos Aires, Argentina

#### 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** 角層バリア機能が破綻すると、表皮角化細胞（EK）の刺激伝達系が活性化され、好中球遊走能に関連する IL-8 や S100A8/A9 が誘導されるが、乾癬でも角層バリア機能異常が報告されている。角層バリア機能には細胞間脂質が重要である。また、膿疱性乾癬の治療に使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。同じステロイド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) は脂質代謝に関連しているが、EK での働きについては明確にされていない。動物実験では LXR agonist で刺激すると培養の分化が誘導されることが報告されている。一方、*in vitro* の実験で、セラミドやその代謝産物である S1P が、それぞれ、細胞の apoptosis や増殖に関連することも明らかにされている。このように皮膚においても、脂質代謝は、角層バリアに関連する角層細胞間脂質の産生や EK の増殖・分化への関与を介して乾癬の病態形成に関わっていることが示唆される。本研究では、ヒト由来の HaCat 細胞を用いて、EK における脂質代謝と EK 分化・誘導との関連について検討した。

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准教授  
槇島 誠 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

binding protein (SREBP) に注目して実験を進める。

**B. 研究方法**

**A. 研究目的**

1) 培養した表皮角化細胞（EK）における核内レセプター、liver X receptor (LXR) を介した脂質代謝と 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。本実験では、肝細胞を初めとする細胞で脂質代謝に関連する、LXR 標的遺伝子産物の一つである転写因子 sterol response element

1. 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。(肝細胞では、コレステロール代謝には SREBP-2 が、脂肪酸代謝には SREBP-1 が関与することが知られている) HaCaT 細胞の分化誘導による、SREBP の変化を観察する。
2. LXR agonist を用いて、分化に伴う SREBP-1c の産生やその後の脂質合成に影響を与えるかを観察する。
3. SREBP-1c の Western-blot：SREBP-1c は precursor として産生され膜上に不活化された状態で存在する。刺激が

加わると2ステップの酵素反応により60~70kDaの mature form となり細胞質から核内に移動して転写活性を発揮する。そのため、遠心法で核を抽出した後に抗 SREBP-1c 抗体を用いて Western-blot を行う。

### C. 研究結果

- 1) ヒト EK の細胞株である HaCaT の細胞密度を増加させて培養すると、SREBP の発現が亢進する (図 1)。
- 2) LXR agonist は、細胞密度が低い条件、高い条件、何れでも SREBP-1c、ならびに、脂肪酸産生関連酵素の発現を亢進させた。(図 2)。一方、SREBP-2 とコレステロール産生関連酵素は、細胞密度が高い条件では減少傾向にある (図 3)。
- 3) LXR で誘導される転写因子・SREBP-1c は、分化刺激により産生が増強するだけでなく、活性化され核内に移行していることが確認された (図 4)。

### D. 考察

角層バリア破壊が乾癬に類似した遺伝子発現パターンを示すことから、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、脂質センサーである LXR を介して、それぞれ SREBP-1c と SREBP-2 が制御しているが、これまでの報告によると、皮膚では SREBP-1c の発現は少なく、脂質代謝にはおもに 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、皮膚においても脂肪酸代謝には 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変化することを明らかにした。さらに、LXR を介して誘導された SREBP-1c mRNA が実際に翻訳され、産生が増加し、かつ分化刺激により mature form で活性

化型の活性化された SREBP-1c が、核内に移行していることを確認した。さらに分化誘導刺激のある HaCat では、LXR agonist の添加で、脂肪酸産生は増強、コレステロールは低下する傾向がみられた。

正常の皮膚において、角層に近い表皮浅層では分化が誘導されるが、その部位でコレステロールの誘導とともにその代謝産物であるオキシステロールも増加していることが推測される。そのオキシステロールは LXR の natural ligand であり、脂肪酸合成ならびにその顆粒にあるセラミドの産生を増強し、分化の誘導を促進する。一方、オキシステロールはコレステロールの産生を制御すると考えられる。

膿疱性乾癬の表皮は増殖が亢進し、分化誘導が起こらない条件と考えられ、脂肪酸合成は低下し、セラミドを介する分化誘導が起こりにくい環境となっている。このような条件下では、バリアの破壊もあり、好中球遊走因子である IL-8 や S100A8/A9 の産生が亢進し、好中球が集積する。

本研究では、皮膚における脂肪酸代謝には LXR-SREBP-1c 経路が重要であることを明らかにした。本研究は、膿疱性乾癬の分子病態解明や新規治療法の開発へ繋がるものと考えられる。

### 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)

1. 論文発表

## 英語論文

- ① Kusakari Y, Okuyama R, Hashimoto A, Ichinohasama R, Terui T, Tagami H, Aiba S. Recurrent classic Kaposi's sarcoma in a Japanese man: detection of human herpesvirus 8 infection by PCR and immunostaining. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 21:112-3, 2007.
- 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** 26: 4478-88, 2007.

## 日本語論文

なし

### 2. 学会発表

- ① 照井 正. 乾癬、最近の話題 3. 免疫 第106回日本皮膚科学会総会【教育講演】(9月20-22日、横浜)

## 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。

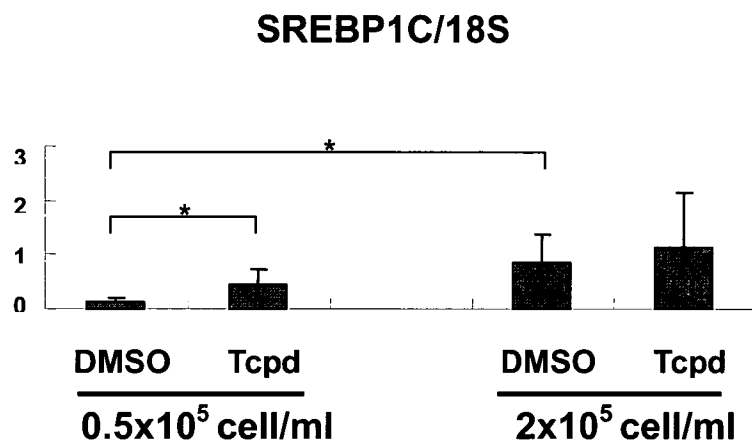


図2 SREBP-1c は脂肪酸合成酵素の発現を増加させる。

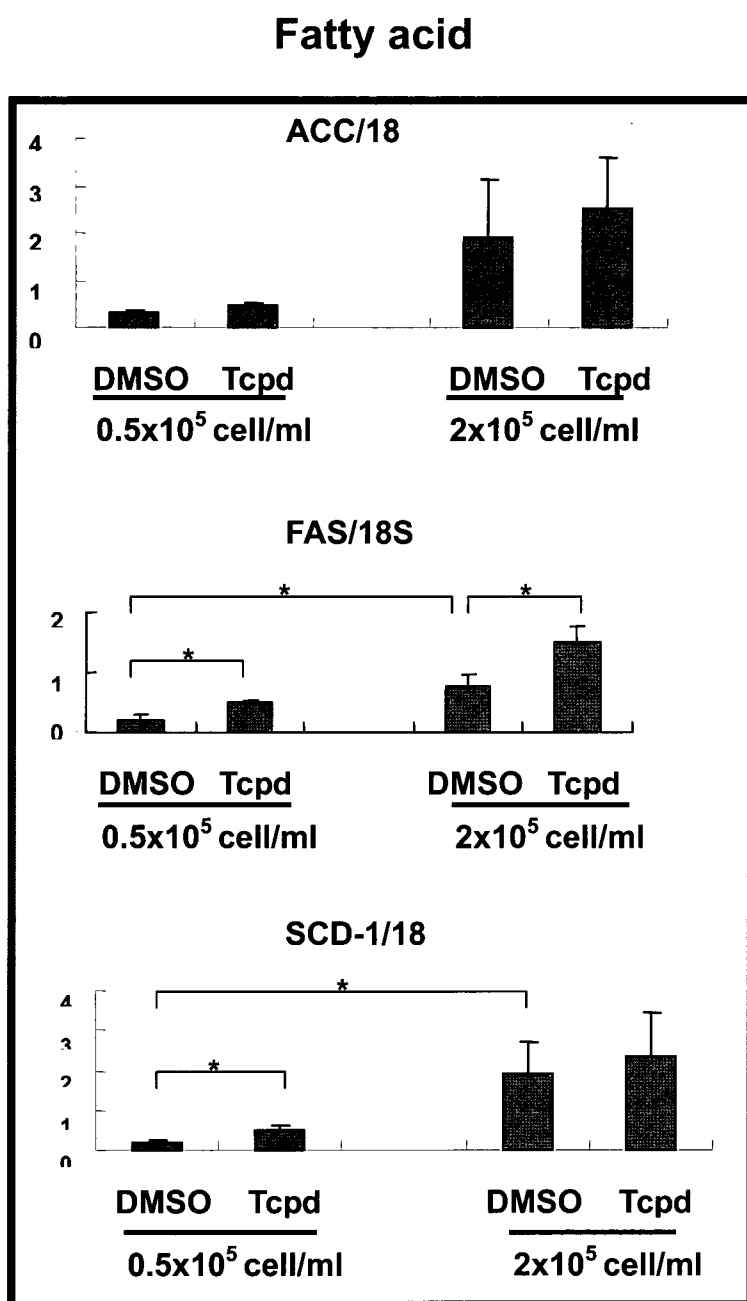




図3 SREBP-2はコレステロール合成酵素の発現を増加させる。

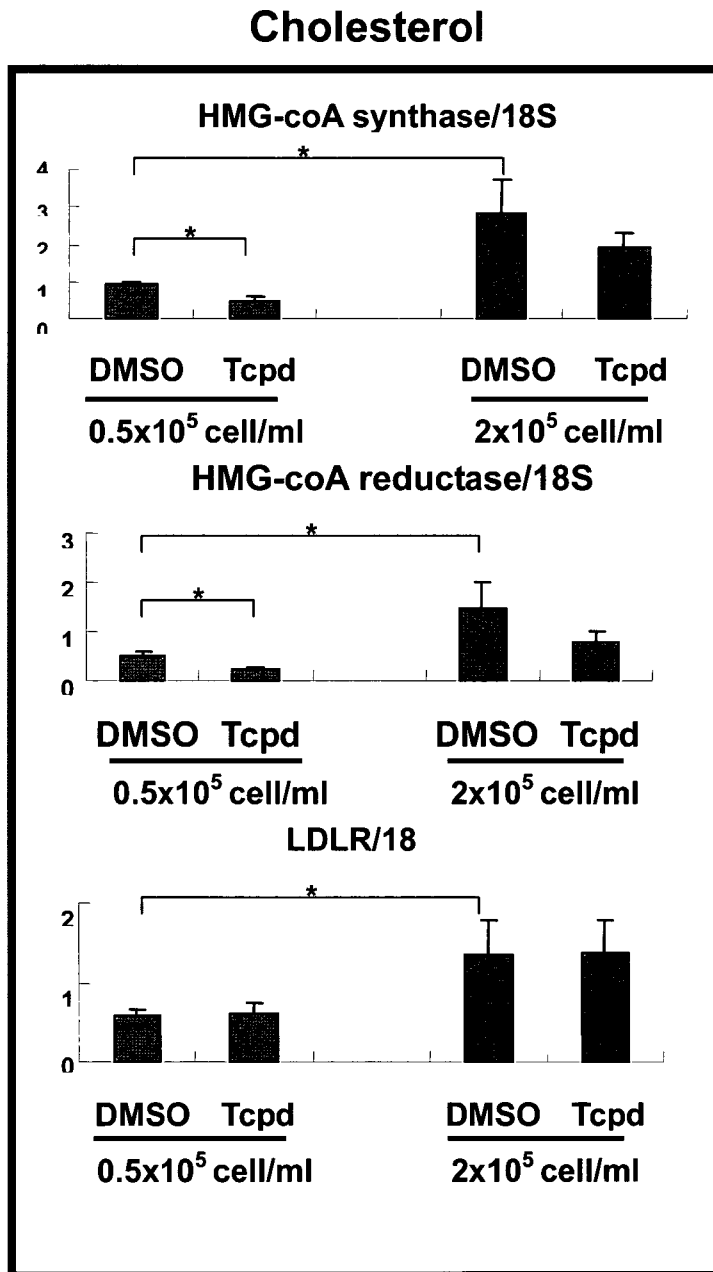
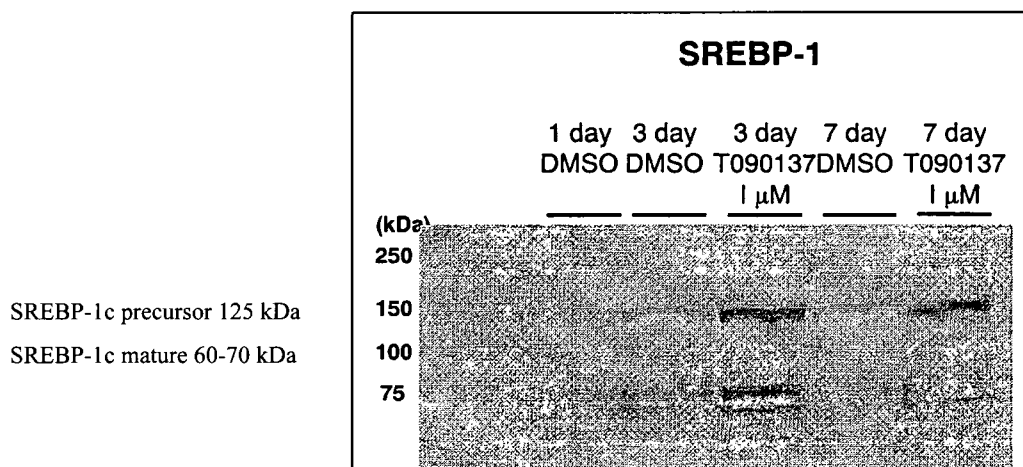


図4 分化刺激と LXR agonist (T090137) による SREBP-1c 産生増強と mature SREBP-1c の核内移行。



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

表皮水疱症原因遺伝子ヒトⅦ型コラーゲントランスジェニックマウス作製

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** 重症型である劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）はⅦ型コラーゲンの遺伝子変異により発症する。RDEB 患者の遺伝子治療を考えた場合、遺伝子導入される標的細胞として、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の2つが挙げられる。今回、マウス表皮角化細胞および真皮線維芽細胞へヒトⅦ型コラーゲン遺伝子をそれぞれ導入し、ヒトⅦ型コラーゲンが強制発現する2系統のトランスジェニックマウスを作製し、マウス表皮真皮境界部におけるヒトⅦ型コラーゲンの発現について検討を行った。

共同研究者

伊藤 圭 北海道大学医学部皮膚科  
西江 渉 北海道大学医学部皮膚科  
澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授

A. 研究目的

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa; EB) は、表皮-真皮境界部を構成する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により発症し、軽微な外力によって皮膚に水疱を形成する遺伝性皮膚疾患である。EB は水疱形成部位により大きく3型に分類されるが、基板直下の真皮最上部に水疱を形成する栄養障害型表皮水疱症 (dystrophic EB; DEB) は、基底膜部に存在する係留線維の構成蛋白であるⅦ型コラーゲンをコードする遺伝子の変異により発症する<sup>(1,2)</sup>。中でもⅦ型コラーゲンが完全に欠損する Hallopeau-Siemens 型 (HS-RDEB) は、全身性の水疱形成、糜爛・潰瘍に加えて、脱毛や口腔・食道の粘膜障害が高頻度に出現し、生涯にわたって反復する水疱形成により、手指の棍棒状癒着や食道狭窄などの多臓器病変、著明な成長障害を示す (図1)。また、繰り返す水疱により、難治性潰瘍部や瘢痕部に皮膚悪性腫瘍 (主に有棘細胞癌) を合併し、若年期に致死的な経過をとるものがある<sup>(3)</sup>。

DEB 発症の原因タンパクであるⅦ型コラーゲンは2944個のアミノ酸からなり、約290kDa の前駆体蛋白質である  $\alpha 1$  (Ⅶ) 鎖が重合した三量体  $[\alpha 1(\text{Ⅶ})]_3$  で、分子中央 Gly-X-Y 繰り返し構造からなるコラーゲン領域により三重らせん構造を形成し、その両端のN末端側に NC-1 ドメイン、C末端側に NC-2 ドメインという非コラーゲン領域を有している<sup>(4,5)</sup>。

このように RDEB の原因となる遺伝子や蛋白分子構造については明らかになってきたが、本症に対する治療は未だ対症療法のみであるのが現状である。遺伝性疾患に対する根本的治療である遺伝子治療も未だ実用には至っていない。一方、培養表皮・培養真皮は、比較的容易に作成が可能で、既に患者からの表皮細胞を培養して潰瘍面に移植する自家培養表皮移植も試みられ、ある程度の効果が報告されている<sup>(6-8)</sup>。従って、正常な遺伝子を導入した培養表皮あるいは培養真皮を移植する治療が、今後 DEB 患者に対する治療法として期待されるが、Ⅶ型コラーゲン遺伝子を表皮細胞あるいは線維芽細胞のどちらに導入するのが適切かについて、in vivo での検討は十分にされていない。

本研究の目的は、表皮角化細胞および真

皮線維芽細胞に正常ヒトVII型コラーゲンを強制発現するトランスジェニックマウス (Tgm) を作製し、遺伝子導入効率と発現蛋白であるヒトVII型コラーゲンおよび係留線維の形成について解析することである。

## B. 研究方法

### 1) 発現ベクターの構築

サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを有し、高レベルで $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する pCMV $\beta$  ベクターを使用した。ヒトVII型コラーゲンが表皮基底細胞で発現するベクターとして、CMV プロモーター部位をヒトケラチン14 (K14) プロモーター (2kb) に置換し、下流の $\beta$ -ガラクトシダーゼ部位へ、ヒトVII型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) cDNA全長 (8.9kb) を挿入した 13.8kb のベクターを作製した (図 2 a)。また、ヒトVII型コラーゲンが真皮で発現するベクターとして、CMV プロモーター部位をマウス I 型コラーゲン (COL1A2) プロモーター (6.4kb) に置換し、下流の $\beta$ -ガラクトシダーゼ部位へ COL7A1 cDNA 全長を挿入した 18.2kb のベクターを作製した (図 2 b)。

### 2) トランスジェニックマウス (Tgm) の作製

表皮発現ベクター、真皮発現ベクターを、それぞれ307個、553個の受精卵雄性前核へ顕微注入した。胚を偽妊娠雌マウスの卵管内に移植しTgmを作製した。

### 3) 導入遺伝子のスクリーニング

離乳後仔マウス (4週齢) の尾を5mm程切断し、DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて genomic DNA を抽出し、PCR 反応を行った。PCR 反応は、それぞれ特異的に結合するようにプライマーを設定した。K14プロモーター Tgm (K14 Tgm) では、K14プロモーター下流に5'プライマー (5'-CATGAGTAAAGCACTCGC-3') とヒト COL7A1

上流に3'プライマー (5'-TAAGAACA CAATGTCAGCGG-3') (図 2 a) を、COL1A2 プロモーター Tgm (COL1 Tgm) では、COL1A2 プロモーターとヒト COL7A1 の間に位置するイントロン部位に5'プライマー (5'-CTCAGTGGATGTTGCCTTT-3') とヒト COL7A1 上流に3'プライマー (5'-TAAGAACA CAATGTCAGCGG-3') (図 2 b) を作成した。

### 4) 免疫組織化学染色

Tgm 皮膚を採取し、OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) にて包埋凍結後、クリオスタット (Thermo, Waltham, MA) にて5 $\mu$ m厚の切片を作成して免疫反応に供した。一次抗体としてマウスVII型コラーゲンに反応せず、ヒトVII型コラーゲン NC-1 ドメインへ特異的に結合する LH7.2 抗体 (Chemicon, Temecula, CA) を使用した<sup>(9)</sup>。10倍希釈の抗体を37 $^{\circ}$ C 1時間反応させ、PBS 洗浄後、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (Jackson, West Grove, PA) を37 $^{\circ}$ C 1時間反応後、封入し共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

### 5) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Tgm (F1) の背部を剃毛後、1 $\times$ 1cm 大の大きさで皮膚を採取し、組織を短冊状に切り、100U/ml 濃度のディスペーゼ<sup>®</sup> (Godo Shusei, Tokyo, Japan) に4 $^{\circ}$ C、8時間浸し、表皮と真皮を剥離した。表皮、真皮それぞれから RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、Super Script<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Grand Island, NY) キットを用いて、2 $\mu$ g の RNA より cDNA を合成した。PCR 反応は合成した cDNA を鋳型とし、表皮側から抽出した cDNA は、5'プライマー (5'-CATGAGTATAAAGCACTCGC-3') と3'プライマー (5'-TAAGAACACAATGTCAGCGG-3')、真皮側か

ら抽出した cDNA は、5'プライマー (5'-GTCTCCTCCCAGCACTGAGT-3') と 3'プライマー (5'-TAAGAACACAATGTCAGCGG-3') を用いた。

#### 6) ウェスタンブロット

Tgm (F1) の背部皮膚を採取し、ディスパーゼ®処理を行い、表皮、真皮に分離後凍結し、Protease inhibitor Cocktail (SIGMA, ST. LOUIS, USA) 含 PBS 中でホモジナイズした。4°C で 15000rpm、20分遠心し、その上清を採取した。Micro BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE, USA) を用いて蛋白量を測定し、表皮、真皮それぞれの総蛋白量が 50 μg になるように調整、5分ボイルの後、5%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に transfer した。一次抗体として 1000倍希釈の LH7.2 を使用し 4°C 8時間反応後、二次抗体として 1000倍希釈の Peroxidase-conjugated AffiniPure F (ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (Jackson, West Grove, PA) を用い、室温 1時間反応後、Photo tope HRP Western Blot Detection system (Cell Signaling, Beverly, MA) で発色した。

#### 7) Tgm皮膚の電子顕微鏡による微細構造の確認

Tgm (F1) より皮膚を採取し、標準的な方法にて透過電子顕微鏡を用いて超微細構造を観察し、係留線維の有無や量を確認した。

#### 8) 免疫電子顕微鏡

Tgm (F1) より皮膚を採取し、約 1mm 角に細切した皮膚を 15% Glycerol 氷晶防止剤処理後、凍結固定装置 CPC (Leica, Cambridge, UK) により -180°C 液化プロパン中で急速凍結固定。続いて、凍結置換装置 AFS (Leica) により -80°C メタノールを経て Lowicryl K11M (Ladd Research Industries, Burlington, VT) に置換し、-60°C で 72時間、室温で 96時間紫外線重合を行った。ウルトラマイクロト-

ム Ultracut (Reichert-Jung, Vienna, Austria) にて 100nm 超薄切片を作成し、post-embedding法の基質とした。5% normal goat serum/5% BSA/0.1% Gelatin/PBS にて 30分反応後、5倍希釈の LH7.2 抗体を 37°C 1時間反応、洗浄後 10nm 金コロイド標識抗マウス IgG (Amersham, Poole, UK) を 37°C 1時間反応。洗浄後、酢酸ウラニル・鉛にて電子染色を行い、透過電子顕微鏡 H7100 (Hitachi, Tokyo, Japan) にて観察した。

### C. 研究結果

#### 1) トランスジェニックマウス (Tgm) の作製

マイクロインジェクション法にて得られた産仔は、K14 プロモーター Tgm (K14 Tgm) は、インジェクション数 307 個の卵中から 60 匹だった。PCR 法にてスクリーニングした結果、60 匹中、導入遺伝子が確認できたのは 9 匹であり、遺伝子導入率は 15% であった (インジェクション総数に対する遺伝子導入率は 2.9%)。そのうち、LH7.2 抗体を用いた免疫組織染色で蛍光発色を確認できたのは 5 匹であった。発現を認めた 5 匹のうち表皮ケラチノサイト細胞質、および線状に基底膜部が強陽性となった Tgm は 2 匹のみで、残る 3 匹は表皮ケラチノサイト細胞質の発現が非常に低いか、基底膜部の線状陽性が部分的にしか認められなかった。

一方、COL1A2 プロモーター Tgm (COL1 Tgm) に関しては、マイクロインジェクション数 553 個の卵中から 65 匹の産仔があり、うち 12 匹で PCR 法により陽性バンドを認めた (遺伝子導入率は 18.5%)。インジェクション総数に対する遺伝子導入率は 2.2%)。そのうち、LH7.2 抗体を用いた免疫組織染色で蛍光発色を確認できたのは 11 匹であった。発現を認めた 11 匹のうち真皮全層、および線状に基底膜部が強陽性となった Tgm は 8 匹で、残る 3 匹は真

皮や基底膜部の陽性所見が部分的にしか認められないか非常に弱いなど発現が低いものであった。

## 2) K14 Tgm (F1) ならびに COL1 Tgm (F1) 皮膚の免疫組織学的解析

K14 Tgm 皮膚を LH7.2 抗体で染色した蛍光抗体法の所見は、正常ヒト皮膚を染色した際と同様、マウス皮膚の表皮-真皮境界部にヒト VII 型コラーゲンの線状沈着を認めた。また、一部の表皮ケラチノサイト細胞質と毛包上皮細胞質にヒト VII 型コラーゲンの顆粒状沈着を認めた (図 3 a, a')。真皮内には特異的反応は認めなかった。COL1 Tgm では、表皮-真皮境界部のほか真皮全層にも広範囲にヒト VII 型コラーゲンの顆粒状沈着を認めた (図 3 b, b')。表皮内および毛包上皮内には特異的反応を認めなかった。

## 3) K14 Tgm (F1) ならびに COL1 Tgm (F1) 皮膚の RT-PCR、ウエスタンブロット解析

RT-PCR 法の結果、K14 Tgm の表皮側および COL1 Tgm の真皮側に強い COL7A1 mRNA の発現を認めた。一方、K14 Tgm の真皮側には弱いながらも、毛包に由来すると考えられる mRNA の発現がみられた。COL1 Tgm の表皮側には発現は認められなかった (図 4 a)。

ウエスタンブロット法の結果は、K14 Tgm の表皮側に強いヒト VII 型コラーゲン蛋白の発現を認めた。COL1 Tgm の真皮側にも発現量は多く、K14 Tgm の真皮側にも毛包および係留線維に由来すると考えられる発現が中等度認められた。COL1 Tgm の表皮側には発現は認めなかった (図 4 b)。NIH Image ソフトウェアによる画像解析による比較では、K14 Tgm 表皮側: K14 Tgm 真皮側: COL1 Tgm 真皮側のヒト VII 型コラーゲン蛋白発現量の比率は、2:0.6:1 であった。

## 4) K14 Tgm (F1) ならびに COL1 Tgm (F1) 皮膚の超微細構造の解析

VII 型コラーゲンは、両端の NC-1 ドメインを基板 (lamina densa) 部に起始し、基板より約 360nm 真皮内に半弧状に存在する<sup>(3)</sup>。透過電子顕微鏡による解析において、Wild type マウス (C57BL/6Cr) および K14 Tgm (data not shown)、COL1 Tgm 皮膚では、表皮-真皮境界部の基板から真皮側に半弧状に存在する係留線維の形成を形態学的に確認した (図 5 a, b)。なお、mouse COL7A1 ノックアウトマウスでは、係留線維の形成は認めなかった (米国 Jefferson 医科大学の Jouni Uitto 教授から供与[13]) (図 5 c)。

## 5) K14 Tgm (F1) ならびに COL1 Tgm (F1) 皮膚の免疫電子顕微鏡解析

ヒト VII 型コラーゲンのみに反応しマウス VII 型コラーゲンに反応しない LH7.2 (NC-1 specific) 抗体による、K14 Tgm 皮膚を基質として行った免疫電子顕微鏡による解析では、基板 (lamina densa) の係留線維基部に金コロイド粒子の沈着を認め、一部は基板上部の透明層 (lamina lucida) や表皮ケラチノサイト内にも認めた。真皮内に特異的な金コロイドは認めなかった。COL1 Tgm 皮膚を基質として行った解析では、基板 (lamina densa) の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認め、また真皮内にも金コロイド粒子の存在を認めた。表皮内には金コロイド粒子を認めなかった。K14 Tgm および COL1 Tgm において、真皮側に向かい半弧状にのびる係留線維がみられ、その基部 (基板; lamina densa) に金コロイド粒子がみられるものも存在した (図 6 a, b)。

Wild type マウス (C57BL/6Cr) 皮膚を基質として行った解析では、表皮・真皮共に金コロイド粒子の存在を認めなかった (図 6 c)。

## D. 考察

表皮基底細胞で VII 型コラーゲン遺伝子を発現する K14 プロモーター Tgm では、表

皮に強い mRNA の発現があり、基底膜部にヒト VII 型コラーゲンの発現が線状にみられた。ウエスタンブロット法でも 290kDa のヒト VII 型コラーゲンタンパクを表皮抽出サンプル内に確認し、免疫電顕で VII 型コラーゲンの N 末端側の NC-1 ドメインを示す金コロイドが基底板 (lamina densa) 部にみられたことから、表皮内で作られたヒト VII 型コラーゲンが表皮内細胞膜を通過し細胞外へ排出され、基底板上で蛋白としての機能を果たし係留線維を形成したことが確認出来た。一方、真皮側にも弱くヒト VII 型コラーゲンの発現が RT-PCR 法とウエスタンブロット法により確認されたが、これはディスパーゼ®処理の際、真皮側に残存した毛包上皮細胞内に発現した VII 型コラーゲンを反映していると思われる。

真皮でヒト VII 型コラーゲン遺伝子を発現する、COL1 プロモーター Tgm では、真皮側において強い mRNA を発現しており、蛍光抗体所見では真皮全層と基底膜部にヒト VII 型コラーゲンの発現を認めた。更にウエスタンブロット法で真皮側のみヒト VII 型コラーゲン蛋白が確認され、免疫電顕で VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインを示す金コロイドが基底板 (lamina densa) 部に認められたことから、真皮内で作られたヒト VII 型コラーゲンが表皮-真皮境界部の基底膜部で係留線維を形成したことが確認できた。

二つの系の Tgm におけるヒト VII 型コラーゲン蛋白発現量をウエスタンブロット法によって解析した結果、真皮線維芽細胞よりも表皮ケラチノサイトでの発現量が約 2 倍多いことが判明した。ヒト生体においても表皮ケラチノサイトの方が真皮線維芽細胞より mRNA の発現量が多いと報告されており<sup>(11, 12)</sup>、本研究からも表皮ケラチノサイトの方が係留線維形成により深く関与しているものと推測した。一方、創傷治癒過程にある皮膚欠損の潰瘍底では、新生した真皮に大量の VII 型コラーゲンが検出され

た報告がある<sup>(13)</sup>。従って、表皮からの蛋白供給が途絶えたり、減少したりするような状況に際しては真皮の線維芽細胞がヒト VII 型コラーゲンを産生すると予想され、本研究からも真皮線維芽細胞が係留線維を形成することが可能であることが示された。

本研究により、実際のマウス生体皮膚において表皮ケラチノサイトもしくは真皮の線維芽細胞、いずれにヒト VII 型コラーゲン遺伝子が導入されても係留線維の形成を認めることが明らかとなった。生体の表皮および線維芽細胞へヒト VII 型コラーゲン遺伝子を導入した際の、実際のタンパク発現量を確認した報告は本研究が初めてである。本研究は将来、DEB 患者の遺伝子治療、あるいは自己の培養細胞へ遺伝子導入などを行う際、その標的とする細胞の選択に非常に役立つと思われる。

## E. 結論

本研究では、DEB の原因遺伝子であるヒト VII 型コラーゲン遺伝子をマウス表皮細胞、線維芽細胞それぞれに導入したところ、いずれの場合でもマウス皮膚にヒト VII 型コラーゲン遺伝子由来の係留線維が形成可能であることが明らかとなった。

## 参考文献

- (1) Christiano AM, Ryyanen M, Uitto J. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly→Ser substitution in the triple-helical domain of type VII collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**:3549-3553.
- (2) Christiano AM, Greenspan DS, Hoffman GG, Zhang X, Tamai Y, Lin AN, Dietz HC, Hovnanian A, Uitto J. A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet*

- 1993; 4: 62-66.
- (3) Shimizu H, McGrath J, Christiano AM, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. *J Invest Dermatol* 1996;**106**: 119-124.
- (4) Christiano AM, Greenspan DS, Lee S, Uitto J. Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20256-20262.
- (5) Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L, Nishikawa T. Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Lab Invest* 1997; **76**: 753-763.
- (6) Eisenberg M, Llewellyn DM, Moran K, Kerr A. Successful engraftment of cultured human epidermal allograft in a child with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Med J Aust* 1987; **147**:520-521.
- (7) McGrath JA, Schofield OMV, Ishida-Yamamoto A, O'Grady A, Mayou BJ, Navsaria H, Leigh IM, Eady RA. Cultured keratinocyte allografts and wound healing in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 1993; **29**:407-419.
- (8) Eisenberg M, Llewellyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *Br J Plast Surg* 1998; **51**:608-613.
- (9) Heagerty AH, Kennedy AR, Gunner DB, Eady RA. Rapid prenatal diagnosis and exclusion of epidermolysis bullosa using novel antibody probes. *J Invest Dermatol* 1986; **86**:603-605.
- (10) Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF, Uitto J. Targeted inactivation of the type VII collagen gene (Col7a1) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Cell Sci* 1999; **112**:3641-3648.
- (11) Ryyanen J, Sollberg S, Parente MG, Chung LC, Christiano AM, Uitto J. Type VII collagen gene expression by cultured human cells and in fetal skin, abundant mRNA and protein levels in epidermal keratinocytes. *J Clin Invest* 1992; **89**:163-168.
- (12) 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* 2006; **126**:766-772.
- (13) Woodley DT, Peterson HD, Herzog SR, Stricklin GP, Burgeson RE, Briggaman RA, Crounce DJ, O'Keefe EJ. Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *JAMA* 1998; **259**:2566-2571.



## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表 (平成19年度)

### 1. 論文発表

#### 英語論文

1. Abe R, Hirayama T, Shimizu H: Disseminated subcutaneous nodules alone as manifestations of Churg-Strauss syndrome. **Int J Dermatol** in press.
2. Abe R, Murase S, Nomura Y, Natsuga K, Tateishi Y, Tomita Y, Tsuji-Abe Y, Matsumura T, Shimizu H: A case of acquired perforating dermatosis manifesting as elastosis perforans serpiginosa and perforating folliculitis. **Clin Exp Dermatol** in press.
3. Akiyama M, Sakai K, Ogawa M, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H: Novel duplication mutation in the patatin domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. **Muscle Nerve** 36(6):856-9, 2007.
4. Aoyagi S, Akiyama M, Mashiko M, Shibaki A, Shimizu H: Extensive proliferative nodules in a case of giant congenital naevus. **Clin Exp Dermatol** 33(2):125-7, 2008.
5. Natsuga K, Akiyama M, Kato N, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Nishimura M, Hata H, Abe M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Onozuka T, Aoyagi S, Kodama K, Ujiie H, Tomita Y, Shimizu H: Novel ABCA12 Mutations Identified in Two Cases of Non-Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma Associated with Multiple Skin Malignant Neoplasia. **J Invest Dermatol** 127(11):2669-73, 2007.
6. Olsz EB, Roh J, Yee CL, Arita K, Akiyama M, Shimizu H, Vogel JC, Yancey KB: Human Bullous Pemphigoid Antigen 2 Transgenic Skin Elicits Specific IgG in Wild-Type Mice. **J Invest Dermatol** in press.
7. Shinkuma S, Nishie W, Shibaki A, Sawamura D, Ito K, Tsuji-Abe Y, Natsuga K, Chan P, Amagai M, Shimizu H: Cutaneous type pemphigus vulgaris with skin manifestations similar to the classical mucocutaneous type: a case report and review of the literature. **Clin Exp Dermatol** in press.
8. Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Yanagi T, McMillan J, Higashi A, Shimizu H: Congenital ichthyosiform erythroderma mimicking ichthyosis bullosa of Simens. **Br J Dermatol** in press.
9. Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: Histone deacetylase inhibitors preferentially augment transient transgene expression in human dermal fibroblasts. **Br J Dermatol** 157(4):662-9, 2007.
10. Abe M, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Nagasaki A, Nomura Y, Kawasaki H, Isogai R, Shimizu H: ITGB4 missense mutation in a transmembrane domain causes non-lethal variant of junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. **J Dermatol Sci** 47:165-7, 2007.
11. Akiyama M, Sakai K, Arita K, Nomura Y, Ito K, Kodama K,

- McMillan JR, Kobayashi K, Sawamura D, Shimizu H: A novel GJB2 mutation p.Asn54His in a patient with palmoplantar keratoderma, sensorineural hearing loss and knuckle pads. **J Invest Dermatol** 127:1540-3, 2007.
12. Akiyama M, Sakai K, Sato T, McMillan JR, Goto M, Sawamura D, Shimizu H: Compound heterozygous ABCA12 mutations including a novel nonsense mutation underlie harlequin ichthyosis. **Dermatology** 215:155-9, 2007.
  13. Akiyama M, Titeux M, Sakai K, McMillan JR, 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** 127:568-73, 2007.
  14. Arita K, Jacyk WK, Wessagowit V, van Rensburg EJ, Chaplin T, Mein CA, Akiyama M, Shimizu H, Happle R, McGrath JA: 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** 127:490-3, 2007.
  15. Chen KR, Sakamoto M, Ikemoto K, Abe R, Shimizu H: Granulomatous arteritis in cutaneous lesions of Churg-Strauss syndrome. **J Cutan Pathol** 34:330-7, 2007.
  16. Hoshina D, Akiyama M, Hamasaka K, Shimizu H: An infantile case of pityriasis lichenoides et varioformis acuta. **Br J Dermatol** 157:194-6, 2007.
  17. Hoshina D, Akiyama M, Hata H, Aoyagi S, Sato-Matsumura KC, Shimizu H: Eccrine porocarcinoma and Bowen's disease arising in a seborrheic keratosis. **Clin Exp Dermatol** 32:54-6, 2007.
  18. Hoshina D, Sawamura D, Nomura T, Tanimura S, Abe M, Onozuka T, Kodama K, Akiyama M, Shimizu H: Epidermolysis bullosa acquisita associated with psoriasis vulgaris. **Clin Exp Dermatol** 32:516-8, 2007.
  19. Hoshina D, Shibaki A, Aoyagi S, Kimura K, Shimizu H: Giant dermatofibroma: a rare variant of dermatofibroma preferentially developing on the lower limbs. **Clin Exp Dermatol** 32:132-134, 2007.
  20. Ito H, Akiyama M, Nakagawa H, Uematsu R, Deguchi K, McMillan JR, Nishimura S, Shimizu H: N-Linked neutral oligosaccharides in the stratum corneum of normal and ichthyotic skin. **Arch Dermatol Res** 298:403-7, 2007.
  21. McMillan JR, Akiyama M, Rouan F, Mellerio JE, Lane EB, Leigh IM, Owaribe K, Wiche G, Fujii N, Uitto J, Eady RA, Shimizu H: Plectin defects in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. **Muscle Nerve** 35:24-35, 2007.
  22. McMillan JR, Akiyama M, Tanaka M, Yamamoto S, Goto M, Abe R, Sawamura D, Shimomura M, Shimizu H: Small-diameter porous poly (epsilon-caprolactone) films enhance adhesion and growth of human cultured epidermal kera-

- tinocyte and dermal fibroblast cells. **Tissue Eng** 13:789-98, 2007.
23. Moriuchi R, Shibaki A, Yasukawa K, Onozuka T, Sato T, Kaneda M, Iguchi A, Kobayashi R, Shimizu H: Neonatal vesiculopustular eruption of the face: a sign of trisomy 21-associated transient myeloproliferative disorder. **Br J Dermatol** 156:1373-4, 2007.
  24. Motoda N, Akiyama M, Aoyagi S, Sawamura D, Shimizu H: Low-grade myxofibrosarcoma invaded into the underlying skeletal muscle. **J Dermatol** 34:561-4, 2007.
  25. Natsuga K, Abe R, Ujiie H, Shibaki A, Sawamura D, Nishio M, Fujimoto K, Koike T, Shimizu H: Non-Hodgkin lymphoma preceded by recalcitrant eczema. **Eur J Haematol** 79:369-370, 2007.
  26. Natsuga K, Sawamura D, Homma E, Nomura T, Abe M, Muramatsu R, Mochizuki T, Koike T, Shimizu H: Amicrobial pustulosis associated with IgA nephropathy and Sjogren's syndrome. **J Am Acad Dermatol** 57:523-6, 2007.
  27. Nemoto I, Shimizu T, Fujita Y, Tateishi Y, Tsuji-Abe Y, Shimizu H: Tumour-like muscular sarcoïdosis. **Clin Exp Dermatol** 32:298-300, 2007.
  28. Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olsz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H: Humanization of autoantigen. **Nat Med** 13:378-83, 2007.
  29. Nomura T, Sandilands A, Akiyama M, Liao H, Evans AT, Sakai K, Ota M, Sugiura H, Yamamoto K, Sato H, Palmer CN, Smith FJ, McLean WH, Shimizu H: Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 119:434-40, 2007.
  30. Sawamura D, Goto M, Sakai K, Nakamura H, McMillan JR, Akiyama M, Shirado O, Oyama N, Satoh M, Kaneko F, Takahashi T, Konno H, Shimizu H: Possible involvement of exon 31 alternative splicing in phenotype and severity of epidermolysis bullosa caused by mutations in PLEC1. **J Invest Dermatol** 127:1537-40, 2007.
  31. Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Goto M, Nomura Y, Ando S, Abe M, Sawamura D, Shimizu H: Keratin 1 gene mutation detected in epidermal nevus with epidermolytic hyperkeratosis. **J Invest Dermatol** 127:1371-4, 2007.
  32. Yamanaka Y, Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, Goto M, McMillan JR, Ota M, Sawamura D, Shimizu H: Expression of the keratinocyte lipid transporter ABCA12 in developing and reconstituted human epidermis. **Am J Pathol** 171:43-52, 2007.
  33. Yamane N, Sawamura D, Nishie W, Abe M, Kodama K, Adachi K, Nakamura H, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H: Anti-p200 pemphigoid in a 17-year-old girl successfully treated with systemic corticosteroid and dapsone. **Br J Dermatol** 156:1075-8, 2007.
  34. Yaosaka M, Abe R, Ujiie H, Abe Y, Shimizu H: Unilateral perior-

bital oedema due to sarcoid infiltration of the eyelid: an unusual presentation of sarcoidosis with facial nerve palsy and parotid gland enlargement. **Br J Dermatol** 157: 200-202, 2007.

35. Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H: Histone deacetylase inhibitors preferentially augment transient transgene expression in human dermal fibroblasts. **Br J Dermatol** 157:662-9, 2007.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 11. 特許取得

1. 特願2007—73696「ポリペプチドを有効成分とする自己免疫疾性皮膚疾患治療

薬」発明者：清水宏、芝木晃彦、王剛

2. 特願2007—73693「ポリペプチドを有効成分とする自己免疫疾性皮膚疾患治療

薬」発明者：清水宏、澤村大輔、西江渉

3. 特願2007—202319「XVⅡ型コラーゲンに関する異所分化抑制剤」発明者：清

水宏、西江渉、谷村心太郎、西村栄美、田所優子、澤村大輔

4. 特願2007—218702「XVⅡ型コラーゲンに関する脱毛抑制剤及び毛髪の脱色素

化抑制剤」発明者：清水宏、西江渉、谷村心太郎、西村栄美、澤村大輔

#### 実用新案登録

特になし

#### その他

特になし