

- 3 Invited lecture: Bone marrow stem cell therapy for epidermolysis bullosa. IVth international symposium of EB, September 27-29th, 2007, Santiago, Chile.
- 4 Invited lecture: Basal keratinocyte-targeting gene delivery system for in vivo EB gene therapy. IVth international symposium of EB, September 27-29th, 2007, Santiago, Chile.
- 5 Bone marrow is an essential source of keratinocytes in the

grafted skin. 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, July, 3rd, 2007, Seattle, WA, USA.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

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

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 自治医科大学皮膚科 准教授

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、ケラチン遺伝子の変異に加え、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ている。正常ヒト表皮細胞に伸展刺激を加えると、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認められるが、変異ケラチンを持つ表皮細胞ではその正常な反応が妨げられている可能性がある。DNA マイクロアレイにより変異ケラチン導入細胞と正常ケラチン導入細胞とで、伸展刺激に対する反応の違いを検討したところ、変異ケラチン導入細胞では正常ケラチン導入細胞にくらべ、非常に多くの遺伝子発現が影響を受けていることがわかった。変異ケラチン導入細胞では、正常ケラチン導入細胞では認められない、炎症にかかわる分子の発現が多く認められた。また酸化ストレスに対抗するためのミトコンドリア関連遺伝子が多く誘導され、アポトーシス関連遺伝子、DNA 修復関連遺伝子の誘導も多く認められた。一方、正常表皮細胞で誘導が認められた細胞外マトリックスや細胞骨格関連遺伝子の多くが抑制されていた。

共同研究者

花川 靖 愛媛大学医学部皮膚科
佐山浩二 愛媛大学医学部皮膚科
橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科
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

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）は、ケラチン 1 あるいはケラチン 10 の遺伝子異常によ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ことが知られている。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。これまでの我々の検討から、正常表皮細胞に伸展刺激を加えると、多数の細胞骨格関連遺伝子の誘導が認められることが明らかとなっている。変異ケラチンを持つ表皮細胞では、伸展刺激に対する正常な反応が阻害されている可能性が考えられる。変異ケラチン K1 遺伝子導入をした細胞に機械的刺激を加え、DNA アレイにより包括的に遺伝子発現の変化を検討することにより、変異ケラチン K1 がどのように皮疹の形成に関わっているのかを明らかにすることが本研究の目的である。最終的には siRNA や、シグナル伝達阻害剤、デコイ核酸などにより、異常ケラチンの発現を抑えるか、あるいは異常ケラチンにより惹起されるシグナルを阻害する方法を検討し、治療への手がかりを得たいと考えている。

B. 研究方法

1) 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(図1)。

2) 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。

3) 変異ケラチンアデノウィルスベクター、正常ケラチンアデノウィルスベクターを、正常ヒト表皮細胞に導入し、伸展可能なシリコンウェルに播種し、4時間の繰り返し伸展刺激を加えた。これらのサンプルより RNA を抽出し、cDNA を作成、それらを DNA マイクロアレイにかけ、その結果を解析した(図2)。

C. 研究結果

1) 正常表皮細胞に伸展刺激を加え、DNA アレイ解析を行ったところ、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ていた。なかでも、アクチン関連蛋白、Rho-Rac 関連遺伝子が多く誘導された。細胞外マトリックス蛋白や細胞接着因子に分類される遺伝子の誘導も多くあり、これらは TNF α 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。

2) 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、それぞれを伸展可能なシリコンウェルに播種し、繰り返し伸展刺激を加え、4時間後に RNA を抽出して cDNA を作成し、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の差異を検討したところ、正常ケラチン K1 導入細胞では、コントロール細胞に比べ伸展刺激により発現の変化を受ける遺伝子数が少な

く、変異ケラチン K1 導入細胞では、コントロール細胞に比べて伸展刺激により発現の変化を受ける遺伝子数が多かった(図3)。特に、変異ケラチン K1 導入細胞においては、酸化ストレスにより誘導されることが知られている抗酸化分子やミトコンドリア関連遺伝子群、DNA 修復に関連する遺伝子群、炎症に関与する分子の発現誘導が認められた。正常細胞で発現誘導が認められた細胞骨格関連遺伝子群や細胞外マトリックス分子は、むしろ抑制されるものが多かった。また、トランスポーター遺伝子、プロテインキナーゼなどの遺伝子群も、抑制されるものが多く認められた。

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。変異ケラチンを持つ表皮細胞では、伸展刺激に対するこれらの正常な反応が阻害されている可能性がある。まず正常表皮細胞において 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が伸展刺激によって数多く誘導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、アクチン関連蛋白の誘導が顕著であり、また細胞外マトリックスや細胞接着分子の発現誘導が際立っていた。これらは、TNF α や IFN γ による刺激ではほとんど動かない遺伝子群であり、正常表皮細胞に対する機械的伸展刺激による変化として特徴的と考えられる。

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、凝集塊を形成することにより正常なケラチンネットワーク形成が阻害されることが、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。

変異ケラチン K1 導入により、コントロール細胞に比べ、伸展刺激により発現に変化を受ける分子の数が非常に増えることが明らかとなった。正常ケラチン K1 導入細胞では、逆に伸展刺激により発現が変化する分子数は減少した。このことから、正常ケラチン K1 発現により表皮細胞は外的力学的刺激の影響を受けにくくなり、変異ケラチン K1 の存在により表皮細胞は外的力学的刺激の影響をより強く受けようになると考えられる。しかしながら、正常表皮細で認められた細胞骨格関連遺伝子や細胞外マトリックスの誘導が認められないことから、変異ケラチン K1 導入細胞では、伸展刺激に対する正常な反応が起こっていないことが想像される。さらに、酸化ストレスにより誘導されるミトコンドリア関連遺伝子や抗酸化分子が多数誘導されていることから、変異ケラチン K1 細胞では伸展刺激により何らかの酸化ストレスが生じている可能性がある。DNA 修復遺伝子の誘導もあることから、変異ケラチン K1 の存在により、伸展刺激が DNA の損傷を誘導している可能性もある。また、変異ケラチン K1 導入細胞では、伸展刺激により、炎症に関与する分子の発現が誘導されたことから、BCIE において、変異ケラチンが存在することにより、日常生活における力学的刺激により、種々の炎症に関与する分子が発現することによって、BCIE の皮疹が形成される可能性があることが考えられる。

E. 結論

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症においては、変異ケラチン K1 の存在と機械的伸展刺激

の相乗作用が皮疹形成に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19年度)

1. 論文発表

英語論文

- 1) Ishiura N, Komine M, Kadono T, Kikuchi K, Tamaki K. A case of milia en plaque successfully treated with oral etretinate. **Br J Dermatol.** 2007 Dec;157(6):1287-9.
- 2) Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Komine M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. The involvement of Gab1 and PI 3-kinase in beta1 integrin signaling in keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007 361(1):224-9.
- 3) Fujita H, Asahina A, Komine M, Tamaki K. ERK inhibitor PD98059 promotes the phenotypic and functional maturation of murine resident Langerhans cells. **J Dermatol.** 2007 34(6):403-6.
- 4) Fujita H, Asahina A, Komine M, Tamaki K. The direct action of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ on purified mouse Langerhans cells. **Cell Immunol.** 2007 245(2):70-9.
- 5) Komine M, Karakawa M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Asahina A, Tamaki K. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? **J Invest Dermatol.** 2007

- 127(8):1915-22.
- 6) Saeki H, Hosono S, Tsunemi Y, Sasaki K, Kadono T, Ihn H, Komine M, Asahina A, Kikuchi K, Tamaki K. Psoriasis vulgaris associated with superior vena cava syndrome due to lung cancer metastasis. **J Dermatol.** 2007 34(5): 356-9.
 - 7) Kikuchi K, Komine M, Takekoshi T, Tamaki K. Serum uric acid levels in patients with vitiligo receiving narrowband ultraviolet B phototherapy. **Clin Exp Dermatol** 32:107-8, 2007
 - 8) Masui Y, Sugaya M, Kagami S, Fujita H, Yano S, Nagao M, Komine M, Saeki H, Ihn H, Kikuchi K, Tamaki K. Sezary syndrome treated with narrowband ultraviolet B: time-course measurement of serum levels of CCL17/CCL27. **Clin Exp Dermatol** 32:57-9, 2007
- 日本語論文
- 1) 小宮根真弓：毛孔性苔癬。総編集山口徹、北原光夫、福井次矢。2008今日の治療指針。pp.887-888、2008年1月、医学書院、東京。
 - 2) 小宮根真弓：ここまでわかった乾癬の病態。WHAT'S NEW IN 皮膚科学 2008-2009。宮地良樹 編 メディカルレビュー社、2007年12月。東京
 - 3) 小宮根真弓：女性と乾癬。P-PAT Letter 第12号。東京地区乾癬患者友の会 P-PAT 編集部 編。2008年1月。東京。
 - 4) 小宮根真弓：ケラチノサイトの生物学ストレスとケラチノサイト。日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X) 117巻13号 Page2420-2421
 - 5) 横倉英人、若旅功二、山田朋子、小宮根真弓、村田哲、大槻マミ太郎：急速に増大する下眼瞼皮下腫瘍を形成した症例。皮膚病診療：29巻12号 Page 1407-1410(2007.12)
 - 6) 福地修、太田有史、石地尚興、本田まりこ、上出良一、中川秀己、小宮根真弓、長谷川友紀：乾癬の臨床評価における Self-Administered PASI の有用性と QOL 指標との関連性。日本皮膚科学会雑誌：117巻12号 Page1969-1976 (2007.11)
 - 7) 小宮根真弓：以前から使われている薬剤の新しい使い方・問題点 マクロライド系抗生物質。皮膚科の臨床：49巻10号 Page1227-1230 (2007.09)
 - 8) 小宮根真弓：ジベルばら色ひこう疹 看護のための最新医学講座第二版第19巻皮膚科疾患 中川秀己編 中山書店 東京2007年9月 pp.125-127
 - 9) 小宮根真弓：毛孔性紅色ひこう疹 看護のための最新医学講座第二版第19巻皮膚科疾患 中川秀己編 中山書店 東京2007年9月 pp.123-125
 - 10) 小宮根真弓：全身にみられる皮疹 内臓悪性腫瘍に伴う皮膚疾患 診断と治療95 (9)：1530-1536、2007.
 - 11) 小宮根真弓：臨床研究から痒みに迫る乾癬はなぜ痒い Visual Dermatology6 (7)：Page710-712、2007.
 - 12) 小宮根真弓、常深祐一郎、佐々木苗胤、玉置邦彦、花川靖、橋本公二、大河内仁志：表皮細胞における変異 ケラチン K1 の作用 角化症研究会記録集21：18-20、2007.
 - 13) 常深祐一郎、嶋津苗胤、服部尚子、白井明、佐伯秀久、小宮根真弓、玉置邦彦：イトラコナゾール 400mg パルス療法開始後肝胆道系酵素値上昇頻度の検討 パルス療法開始前肝胆道系酵素値異常の有無による比較、皮膚科の臨床49(1)：45-47、2007.

学会発表

1. 小宮根真弓、大槻マミ太郎 (自治医大)、唐川 大、多田弥生、佐伯秀久、玉置邦彦：膿疱性乾癬における iNOS 発現。2007年 9 月、第22回日本乾癬学会、伊勢志摩、三重。
2. Mayumi Komine, Masaru Karakawa, Tomonori Takekoshi, Naoki Sakurai, Yosaku Minatani, Hiroshi Mitsui, Yayoi Tada, Hidehisa Saeki, Akihiko Asahina, and Kunihiko Tamaki: Early inflammatory changes in the “perilesional skin” of psoriatic plaques: Is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? 第10回国際ランゲルハンス細胞学会、2007年 9 月、ベルン、スイス。
3. 小宮根真弓、玉置邦彦：マクロライドの角化細胞に対する作用。2007年 6 月、皮膚マクロライド研究会、東京。
4. 小宮根真弓、玉置邦彦：掌せき膿疱症に対するロキシスロマイシンの効果。2007年 6 月、皮膚マクロライド研究会、東京。
5. Mayumi Komine, Masaru Karakawa, Tomonori Takekoshi, Naoki Sakurai, Yosaku Minatani, Hiroshi Mitsui, Yayoi Tada, Hidehisa Saeki, Akihiko Asahina, and Kunihiko Tamaki: Early inflammatory changes in the “perilesional skin” of psoriatic plaques: Is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? 第68回米国研究皮膚科学会、2007年 5 月、ロサンゼルス、アメリカ合衆国。
6. Mayumi Komine, Yasushi Hanakawa, Hitoshi Okochi, Koji Sayama, Koji Hashimoto, Miroslav Blumenberg, Kunihiko Tamaki: The effects of mechanical stretch on normal human epidermal keratinocytes. 第32回日本研究皮膚科学会、2007年 4 月、横浜。
7. 小宮根真弓：ストレスとケラチノサイト 第106回日本皮膚科学会総会教育講演、2007年 4 月、横浜。
8. 小宮根真弓：抗菌剤のさまざまな作用 第106回日本皮膚科学会総会、2007年 4 月、横浜
9. 小宮根真弓：乾癬治療における生物学的製剤の役割、第106回日本皮膚科学会総会、2007年 4 月、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
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし

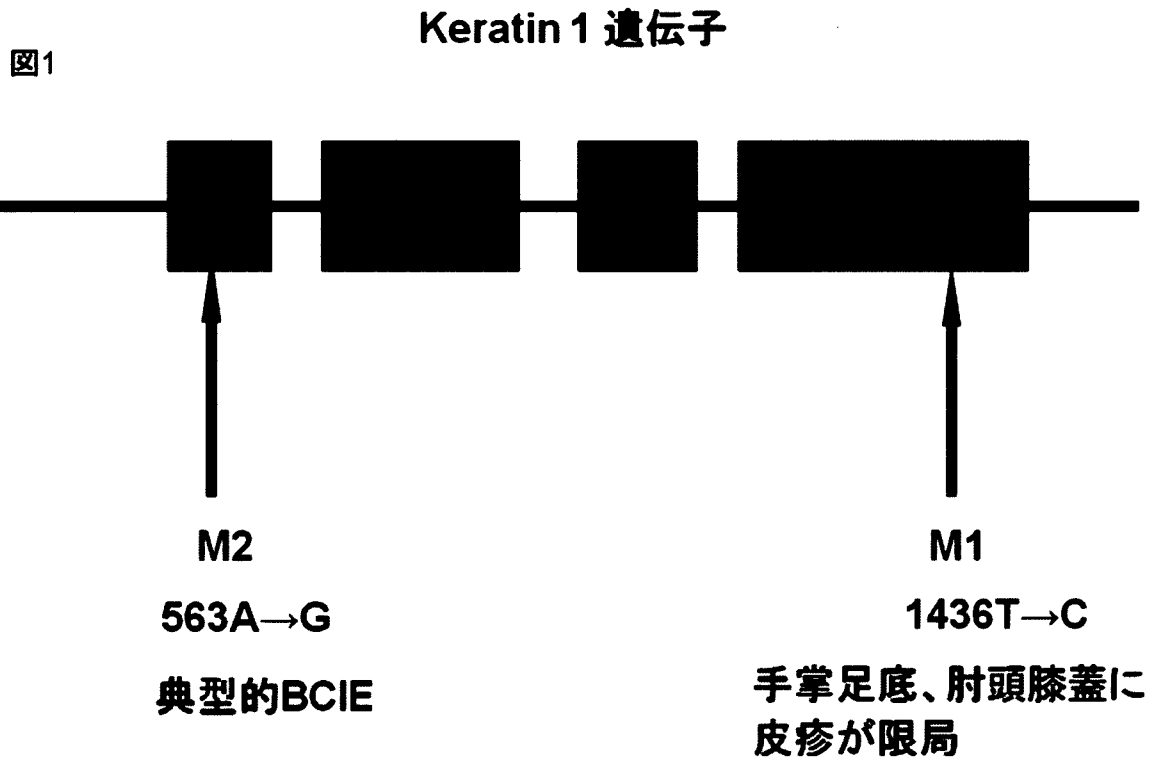


図1 ケラチンK1遺伝子に2種類の変異を作成した。

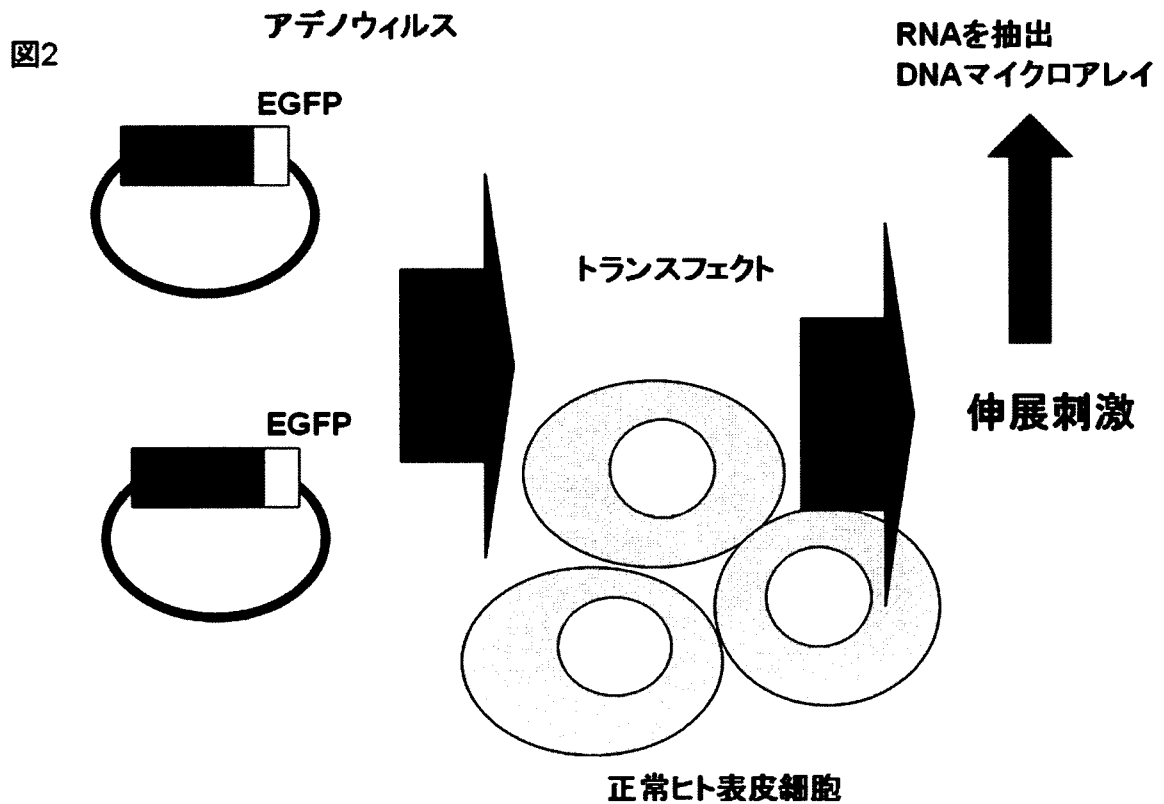


図2 変異ケラチンK1、正常ケラチン K1 アデノウイルスベクターを正常ヒト表皮細胞に導入し、伸展刺激を加えて、遺伝子発現の変化を検討した。

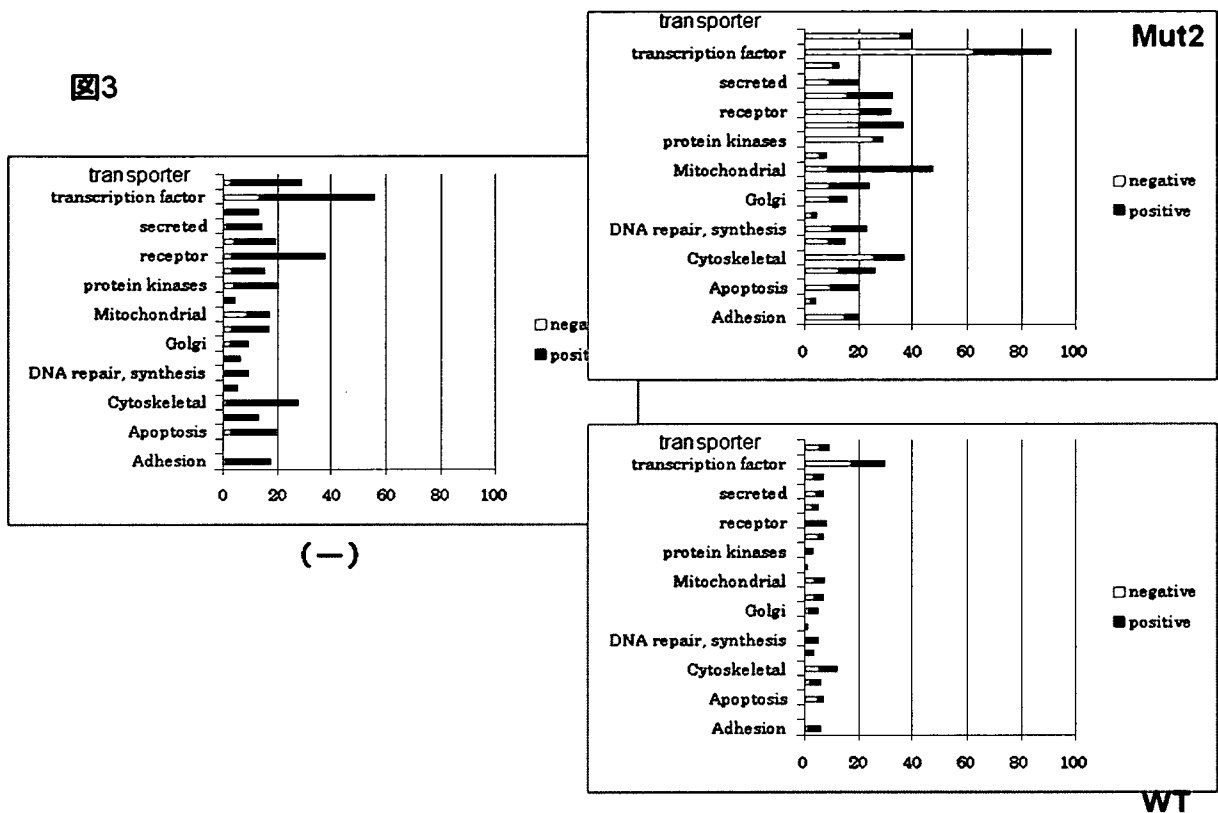


図3 DNA マイクロアレイにより、伸展刺激の有無による遺伝子発現の変化を、コントロール (-)、正常ケラチンK1導入細胞 (WT)、変異ケラチン K1 導入細胞 (M2) について比較検討した。

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）の臨床疫学研究
—追加疫学調査で得られた症例を含めて—

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 BCIEはケラチン1またはケラチン10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・落屑を特徴とする。遺伝子変異と臨床症状との相関解析は患者の予後を推測するうえで重要となる。今回は前回の全国調査で臨床情報が得られたが遺伝子検索について返答の無かった12例に加え、遅れて臨床情報の報告があった5例の、計16例について遺伝子情報あるいは遺伝子検索の可能性について調査を行った。その結果遺伝子情報が得られた3例は、比較的典型的な genotype-phenotype 関係を示す症例であった。今後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。

共同研究者

春名邦隆、黛 暢恭、高木 敦、須賀 康
順天堂大学医学部皮膚科
黒沢美智子、松葉 剛、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¹⁾。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。それをまとめると、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、②K1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に加え、多少異なった genotype-phenotype 関係があることが示された。

今回は、臨床情報が得られたが遺伝子検索について返答の無かった12例に加え、遅れて臨床情報の報告があった4例の、計16例について遺伝子情報あるいは遺伝子検索の可能性について調査を行った。

B. 研究方法

上記16例につき、依頼書を作成し、担当医（もし移動があれば現在の主治医宛）に依頼状を送付した。

C. 研究結果

1) 計4例につき返答があり、遺伝子検索拒否1例、遺伝子検索済み3例であった。
2) 遺伝子検索済み3例の遺伝子変異は、K1 Glu 490 Gly、K10 Arg 156 Cysと

Arg 156 His、であった。

3) 変異遺伝子とその臨床症状は、

a) (K1 Glu 490 Gly) 2歳、男、全身性の皮疹。新生児期以降にも全身の水疱形成あり。鱗屑は大型で褐色。掌蹠角化はあり、表面はスムーズ。手指の拘扼と姿勢異常なし。歩行障害あり。コロジオン児でなかった。

b) (K10 Arg 156 Cys) 22歳、女、全身性の皮疹。新生児期以降にも全身の水疱形成あり。鱗屑は細かく褐色。掌蹠角化・手指拘扼・姿勢異常・歩行障害なし。コロジオン児でなかった。

c) (K10 Arg 156 His) 38歳、女、全身性の皮疹。新生児期以降にも全身の水疱形成あり。鱗屑は細かく褐色。掌蹠角化・手指拘扼・姿勢異常・歩行障害なし。コロジオン児でなかった。

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。

今回遺伝子情報が得られた3例における genotype-phenotype 関係は比較的典型的であった。しかし以前の全国調査の結果と合わせてまとめると、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、従来の報告より genotype-phenotype 関係に多様性があることが示された。今後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. 結語

BCIEでは、従来の報告より genotype-phenotype 関係に多様性がある可能性が示された。

F. 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、pp.192-198, 2005.

G. 健康危険情報

なし。

H. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

- 1) Jayawardana ST, Ushio H, Niyonsaba F, Gondokaryono SP, Takenaka H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Monomeric IgE and lipopolysaccharide synergistically prevent mast-cell apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007 Oct 30; [Epub ahead of print]
- 2) Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Muramatsu S, Mizuno Y, Haruna K, Ikeda S, Kuroyanagi Y, Ogawa H: Intractable venous leg ulcer treated successfully with allogeneic cultured dermal substitute. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.** 2007 Oct 19;1-3 [Epub ahead of print]
- 3) Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neu-

- trophils. **Br J Dermatol.** 2007 Oct 4; [Epub ahead of print]
- 4) Ng W, Nishiyama C, Mizoguchi M, Nakano N, Suga Y, Ikeda S, Itoh S, Kinoshita K, Okumura K, Ogawa H: Human umbilical cord epithelial cells express Notch1: Implications for its epidermal-like differentiation. **J Dermatol Sci.** 2007 Sep 10; [Epub ahead of print]
 - 5) Okuma K, Mitsuishi K, Hasegawa T, Tsuchihashi H, Ogawa H, Ikeda S: A Case Report of Steroid and Immunosuppressant-resistant Pyoderma Gangrenosum Successfully Treated by Granulocytapheresis. **Ther Apher Dial.** 2007 Oct;11(5): 387-90.
 - 6) Hasegawa T, Matsukura T, Suga Y, Muramatsu S, Mizuno Y, Tsuchihashi H, Haruna K, Ogawa H, Ikeda S: Case of acne conglobata successfully treated by CO(2) laser combined with topical tretinoin therapy. **J Dermatol.** 2007 Aug;34(8):583-5.
 - 7) Jiang J, Kuhara T, Ueki R, Zheng Y, Suto H, Ikeda S, Ogawa H: Inhibitory effects of paroxetine on the development of atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. **J Dermatol Sci.** 2007 Sep;47(3):244-7.
 - 8) Takagi A, Nishiyama C, Maeda K, Tokura T, Kawada H, Kanada S, Niwa Y, Nakano N, Mayuzumi N, Nishiyama M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Role of Sp1 in Transcription of Human ATP2A2 Gene in Keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 2007 Jun 28; [Epub ahead of print]
 - 9) Hasegawa T, Suga Y, Ikejima A, Muramatsu S, Mizuno Y, Tsuchihashi H, Haruna K, Ogawa H, Ikeda S: Suction blister grafting with CO(2) laser resurfacing of the graft recipient site for vitiligo. **J Dermatol.** 2007 Jul;34(7):490-2.
 - 10) Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana ST, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. **J Leukoc Biol.** 2007 Sep; 82(3):657-65.
 - 11) Hasegawa T, Sumiyoshi K, Tsuchihashi H, Ikeda S, Nakao A, Ogawa H: FK506 inhibits the enhancing effects of TGF-beta on wound healing in a rabbit dermal ulcer model. **J Dermatol Sci.** 2007 Jul;47(1):37-40.
 - 12) Hasegawa T, Mizoguchi M, Haruna K, Mizuno Y, Muramatsu S, Suga Y, Ogawa H, Ikeda S: Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases. **J Dermatol.** 2007 May;34(5): 328-32.
 - 13) Ng W, Kikuchi Y, Chen X, Hira K, Ogawa H, Ikeda S: Pseudocysts of the auricle in a young adult with facial and ear atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol.** 2007 May;56(5):858-61.
 - 14) Haruna K, Suga Y, Mizuno Y, Kourou K, Muramatsu S, Hasegawa T, Inoue A, Ogawa H, Ikeda S, Lakhmiri M, Seto A: A Moroccan patient with Sjogren-Larsson syndrome. **J Dermatol.** 2007 Feb;34(2):153-5.

- 15) Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Matsumoto K, Saito H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. **Eur J Immunol.** 2007 Feb;37(2):434-44.
- 16) Tsuchihashi H, Hasegawa T, Sumiyoshi K, Ogawa H, Ikeda S, Ando T, Nakao A, Okumura K: TWEAK inhibits TGF-beta-induced contraction of normal and keloid fibroblast-embedded collagen gel. **J Dermatol Sci.** 2007 Mar;45(3):216-8.
- 17) Haruna K, Suga Y, Mizuno Y, Hasegawa T, Kourou K, Matsuba S, Muramatsu S, Ikeda S: R156C mutation of keratin 10 causes mild form of epidermolytic hyperkeratosis. **J Dermatol.** 2007 Aug;34(8):545-8.
- 18) Kohroh K, Suga Y, Mizuno Y, Ishii N, Hashimoto T, Ikeda S: Case of localized bullous pemphigoid with unique clinical manifestations in the lower legs. **J Dermatol.** 2007 Jul;34(7):482-5.
- I. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

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における過角化機構の解析。Rab11 と層板顆粒の関係

分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科

研究要旨 我々はこれまで水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）において層板顆粒の分泌不全があること、層板顆粒分子の発現や極性に異常がみられることを報告してきた。しかし層板顆粒の輸送システムについては不明な点が多い。今回はリサイクリングエンドソームに存在する GTP 結合タンパクである Rab11 が層板顆粒輸送に関係する可能性について検討した。正常表皮において Rab11 は有棘層中層から顆粒層にかけて発現し、細胞内の表層側に強く局在していた。核周囲においては TGN46 と共存していた。また各種層板顆粒分子とも顆粒層において共存しており、免疫電顕によってこれらを含む層板顆粒の周囲に Rab11 が局在しており、層板顆粒の輸送に関与することが示唆された。BCIE においては Rab11 が強発現していた。本症における層板顆粒の細胞内輸送の異常は Rab11 の異常とも関係しているのかもしれない。

A. 研究目的

BCIE は K1/K10 の変異による角化異常症である。我々はこれまでこの研究班において、本症では分化に伴う細胞の扁平化がそこなわれていること、層板顆粒の分泌が不完全であること、いくつかの層板顆粒分子の細胞内での発現の減弱や極性をもった分布がそこなわれていることなどを報告してきた。しかし層板顆粒の細胞内輸送や分泌の機構はほとんど解明されていない。

今回我々は、正常皮膚において Rab11 と層板顆粒の関係を免疫組織化学法によって検討した。さらに BCIE おける Rab11 の発現の免疫組織学的研究をおこなった。

B. 研究方法

1. 材料

正常皮膚と限局型 BCIE 患者生検皮膚組織。

2. 1 次抗体

マウスモノクローナル抗体として次の分子に対するものを使用した。

Rab11 (BD Biosciences Pharmingen)

LEKTI (Zymed)

cathepsin D (Oncogene)

ポリクローナル抗体として次のものを用いた。

rabbit anti-Rab11 (Zymed),

rabbit anti-Cdsn (Dpt. Dermatology, Asahikawa Medical College)

rabbit anti-glucosylceramides (Glyco-biotech)

sheep anti-TGN46 (Serotec)

3. 方法

蛍光抗体法

正常皮膚組織を 2% paraformaldehyde /PBS により 4℃において 1 時間固定したものをを用いて定法により染色し、共焦点顕微鏡 Fluoview FV500 (Olympus) にて観察した。

包埋後免疫電顕法

凍結固定、凍結置換させた正常皮膚を Lowicryl K11M 樹脂 (Chemische Werke Lowi) に包埋し、免疫染色後、金コロイドで標識した。

凍結超薄切片法

Tokuyasu 法をもちい、標本は 1.5% ポリヴィニルアルコール、1.5% 酢酸ウランによる陰性染色をほどこした。

C. 研究結果

ヒト正常表皮における Rab11 の発現様式を蛍光抗体法により検討したところ、表皮有棘層から顆粒層にかけて、細胞質内で、表層に強い極性を示して局在していた (図 1 左)。また、トランスゴルジネットワークのマーカである TGN46 との関係性を 2 重染色によって調べたところ、両者は表皮中層から上層の核周囲で共存していた (図 1 中、右)。

さらに免疫電顕法によって Rab11 と TGN46 の局在を比較すると、両者は核近傍の TGN 領域の膜上で共存していた (図 2)。

次に Rab11 と層板顆粒分子の局在を比較した。Rab11 は LEKTI、コルネオデスモシン (CDSN)、カテプシン D (CathD)、およびグルコシルセラミド (GlcCer) の 4 つの層板顆粒分子と、表皮上層において共存していた (図 3)。続いて Rab11 とこれらの層板顆粒分子の関係を免疫電顕法にて検討したところ、層板顆粒分子を含む tubulo-vesicular structures をふちどるように Rab11 が局在していた (図 4)。

BCIE では表皮の中層から上層にかけて Rab11 の強い発現がみとめられた (図 5)。

D. 考察

Rab タンパクは Ras GTPase スーパーファミリーに属する。細胞質内において、輸送小胞の形成、輸送、結合を調節している。哺乳類では 60 種以上の分子種が存在する。GTP 結合型と GDP 結合型の切り替えが分子スイッチとして働くとされており、GTP 結合型のときエフェクタータンパクを活性化し、小胞と標的膜の癒合をつかさどる SNARE 分子の集合を調節する。

Rab タンパクのひとつである Rab11 は

リサイクリングエンドソームと細胞膜の間でのリサイクリング過程の調節や、TGN からの分泌タンパクの細胞外分泌を調節する作用があるとされている (Chen et al., 1998; van IJzendoorn et al., 2003; Wilcke et al., 2000)。表皮においては核の上部に点状のパターンで発現することが知られている (Goldenring et al., 1996)。

今回の研究結果では表皮角化細胞において Rab11 が TGN 周囲から、層板顆粒の周囲にかけて局在していることが分かった。他の細胞では Rab11 は主にリサイクリングエンドソームに局在するとされている。これまで、角化細胞においてはリサイクリングエンドソームに相当する細胞内小器官は同定されていなかった。このことは層板顆粒が同器官に相当する可能性を示唆するものである。BCIE においては層板顆粒の分泌不全が認められるが、今回観察された細胞質内での強い Rab11 の発現は分泌されずに停滞している層板顆粒周囲の Rab11 分子の存在を示唆している。

E. 結論

Rab11 は表皮において TGN から細胞膜までの層板顆粒の輸送に関与しているかもしれない。BCIE における Rab11 の強い発現は層板顆粒の分泌不全と関係があるかもしれない。

参考文献

- (1) Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Takahashi H, Iizuka H. Rab11 is associated with epidermal lamellar granules. *J Invest Dermatol.* 127 (9):2166-70. 2007

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Takahashi H, Iizuka H. Rab11 is associated with epidermal lamellar granules. **J Invest Dermatol.** 127 (9):2166-70, 2007
2. Magnúsdóttir E, Kalachikov S, Mizukoshi K, Savitsky D, Ishida-Yamamoto A, Panteleyev AA, Calame K. Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. **Proc Natl Acad Sci USA.** 104(38): 14988-93, 2007
3. Zeeuwen PL, Ishida-Yamamoto A, van Vlijmen-Willems IM, Cheng T, Bergers M, Iizuka H, Schalkwijk J. Colocalization of cystatin M/E and cathepsin V in lamellar granules and corneodesmosomes suggests a functional role in epidermal differentiation. **J Invest Dermatol.** 127(1):120-8, 2007
4. Basel-Vanagaite L, Attia R, Ishida-Yamamoto A, Rainshtein L, Ben Amitai D, Lurie R, Pasmanik-Chor M, Indelman M, Zvulunov A, Saban S, Magal N, Sprecher E, Shohat M. Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in ST14, encoding type II transmembrane serine protease matriptase. **Am J Hum Genet.** 80(3):467-77, 2007

日本語論文

- (ア) 山本明美：免疫組織染色・蛍光抗体法所見の読み方 **Visual Dermatology:** 6(8), 834-839, 2007
- (イ) 山本明美：Cornified cell envelope **日本皮膚科学会雑誌**：117:137-141, 2007

日本語著書

1. 山本明美：毛孔性苔癬、顔面毛包性紅斑黒皮症。皮膚疾患最新の治療 2007-2008。瀧川雅浩、渡辺晋一編集 南江堂、東京、pp.138, 2007
2. 学会発表
 1. 山本明美：層板顆粒の輸送と角化症。第71回日本皮膚科学会東部支部学術退会、シンポジウム4 角化症と皮膚バリア障害。2007, 9, 22-23、札幌市
 2. Akemi Ishida-Yamamoto Distinct intracellular transport of different epidermal lamellar body molecules **Fist World Conference on Ichthyosis.** 2007. 8. 31-2007. 9. 2, Münster, Germany
 3. 山本明美：正常ヒト表皮における Rab 11 の発現と層板顆粒との関連。第22回角化症研究会。2007.8.4、東京都
 4. Ishida-Yamamoto A, Kaneta K, Kishibe M, Iizuka H A recycling endosome marker Rab11 is associated with epidermal lamellar granules. 34th annual meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research 2007, 6, 14-16, Praha, Czech Republic
 5. 山本明美：分子と形態から解明する新しい角化異常症。第26回分子病理学研究会湘南シンポジウム、特別講演 2007, 6, 8-9、葉山町湘南国際村

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

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

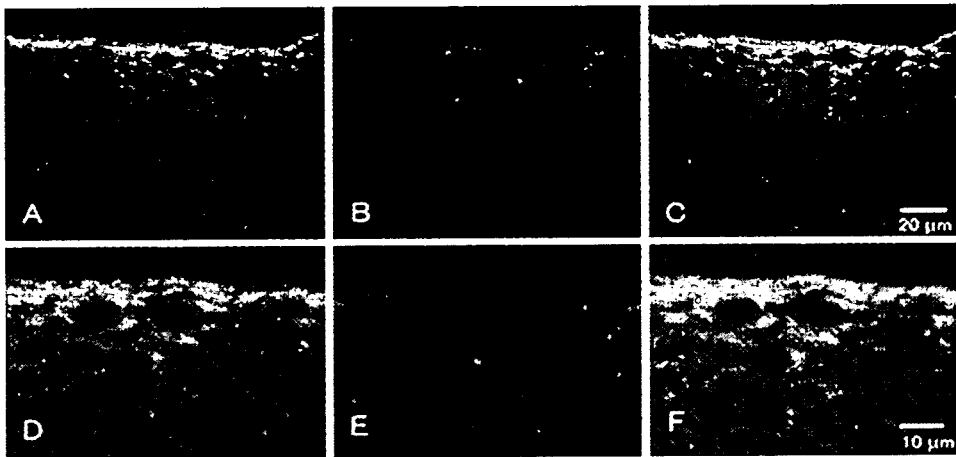


図1 正常皮膚における Rab11 (A、D、緑) と TGN46 (B、E、赤) の局在。蛍光抗体法。融合像を C、F に示す。

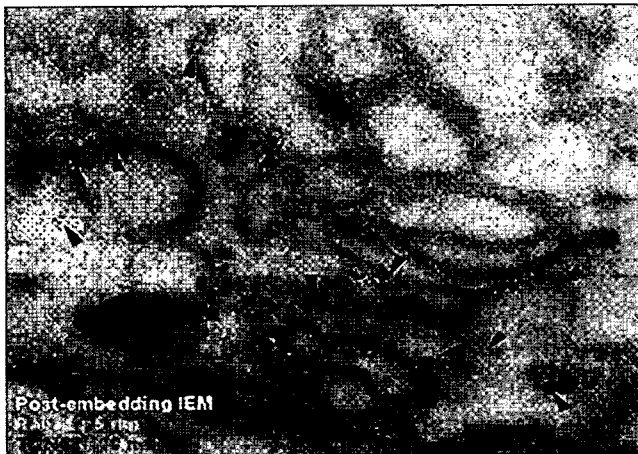


図2 Rab11 (5nm gold、緑円) と TGN46 (10nm gold、矢尻) の局在。正常表皮角化細胞。包埋後免疫電顕法。

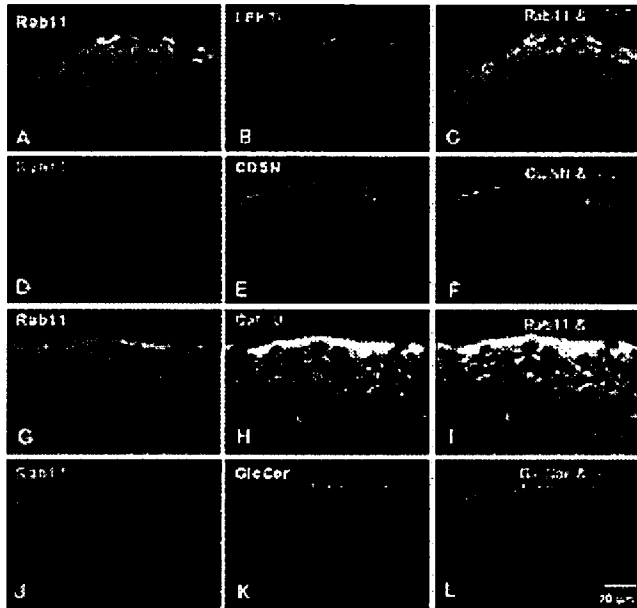


図3 Rab11 (A、D、G、J) と層板顆粒分子 (B, LEKTI, E, CDSN, H, CathD, K, GlcCer) の発現。正常皮膚。右端の列は左と中央の列の融合図。蛍光抗体法。

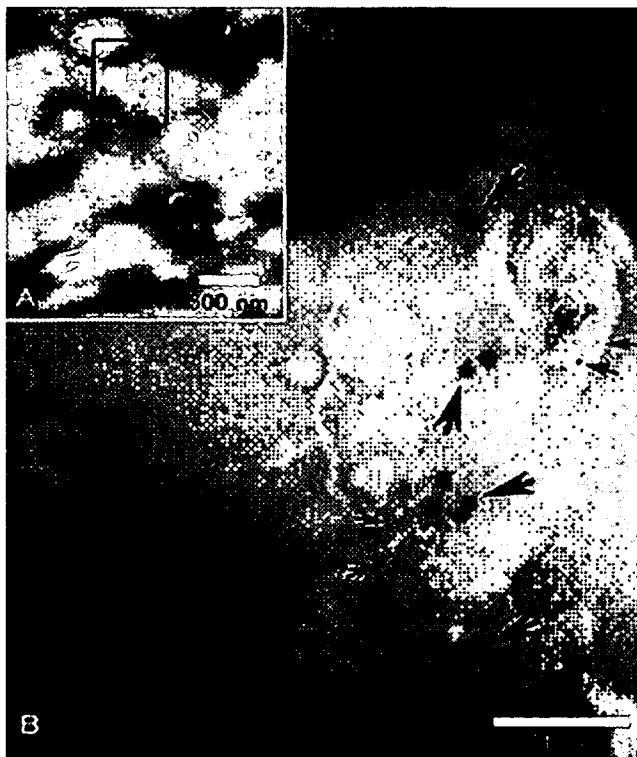


図4 Rab11 (5nm gold、小矢印) とグルコシルセラミド (10nm gold、大矢印) の局在。凍結超薄切片法による免疫電顕。



図5 BCIE 限局型皮疹における Rab11 の発現。免疫組織化学法。

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における過角化機構の解析
層板顆粒の輸送異常による角質肥厚

分担研究者 山本明美 旭川医科大学皮膚科

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）は分化型ケラチンである K1 もしくは K10 の遺伝子異常による遺伝性疾患である。本症における角質肥厚の原因のひとつとして層板顆粒の分泌不全が指摘されてきた。層板顆粒の輸送や分泌に一次的な異常があるとどのような表現型がもたらされるかはこれまで知られていなかった。今回我々は層板顆粒の分泌が1次的に侵されている角化症、すなわち CEDNIK 症候群と ARC 症候群を報告する。この2疾患は BCIE と角質肥厚という点において共通していたが、その程度は BCIE よりも軽く、この理由として後者では層板顆粒分泌障害以外の要因が著しい角質肥厚に寄与していると考えられた。

A. 研究目的

BCIE は表皮角化細胞が分化に伴って発現するケラチンである K1 /K10 の遺伝子変異による角化異常症である。我々はこれまでこの研究班において、本症では層板顆粒の分泌が不完全であることを報告してきた。

角化症において共通してみられる角質肥厚の機序を知ることは有効な治療法を開発する上で重要である。今回、我々は BCIE における角質肥厚の原因の一つと考えている層板顆粒の分泌不全がどのような表現形に寄与しているのかを知るために、層板顆粒の分泌が一次的に侵されている疾患について研究した。

B. 研究方法

1. 材料

正常皮膚と SNAP29 遺伝子の変異によることが判明した新規の疾患である cerebral dysgenesis-neuropathy-ichthyosis-keratoderma (CEDNIK) 症候群と、VPS 33B 遺伝子の変異を確認した arthrogyposis, renal dysfunction and cholestasis (ARC) 症候群患者の角質肥厚部位

の生検皮膚組織。

2. 1次抗体

グルコシルセラミド (Glycobiotech)、KLK5 (Santa Cruz Biotechnology) および KLK7 (Tanimoto et al. 1999) に対する抗体を用いた。

3. 観察方法

透過電顕法

定法により行った。

凍結超薄切片法

Tokuyasu 法をもちい、標本は 1.5% ポリヴィニルアルコール、1.5% 酢酸ウランによる陰性染色をほどこした。

C. 研究結果

CEDNIK 患者の皮疹部表皮の有棘細胞内には小数の正常に近い層板顆粒の他に、多数の異常な小胞が観察された (図1)。さらに角層にも異常な細胞内小胞がみられた (図2)。層板顆粒分子であるグルコシルセラミドや KLK 5、KLK7 に対する抗体を用いた免疫電顕を施行したところ、これらの角層内の異常顆粒が分泌不全におちいった層板顆粒であることが証明された (図3)。

つぎに ARC 症候群の表皮を観察したところ、有棘層、顆粒層の細胞内の層板顆粒に明らかな異常は見られなかったが、角質細胞内には分泌されずに残存する層板顆粒が観察された (図 4)。

D. 考察

CEDNIK 症候群は我々が発見した新規の皮膚神経症候群である。劣性遺伝性に発症が観察された 2 家系において、原因が SNARE タンパクの一つである SNAP29 遺伝子に変異があり、SNAP29 分子が発現していないことによると分かった (参考文献 1)。SNARE タンパクは細胞内の小胞と標的膜の癒合に関与する一群の分子である。CEDNIK 症候群患者では全身の魚鱗癬と掌蹠角化症が見られるが、角質肥厚は BCIE よりは軽度である。

SNAP29 は広範に発現しているが、主として細胞内の膜に局在している。表皮における機能は不明であったが、今回の研究で、層板顆粒の成熟と分泌に必須なタンパクであることが示された。また、この障害が CEDNIK 症候群における角質肥厚の機序と考えられた。

ARC 症候群は稀な、常染色体劣性遺伝性の通常致死的な代謝異常症である。最近、本症の原因は VPS33B 遺伝子の変異によることが分かった。本症においては神経学的異常に加え、魚鱗癬がほぼ必発する。白色葉状の鱗屑が頭部、体幹、四肢にみられるが、顔面と掌蹠はおかされない。本研究で使用した症例は D234H というミスセンス変異のホモ接合体であった (参考文献 2)。VPS33B 分子は SNARE タンパクが仲介する小胞と標的膜の融合過程を調節すると考えられている。

表皮における VPS33B の機能はこれまで不明であったが、今回の観察結果から、層板顆粒の分泌に関与することが示された。これにより本症において観察される魚鱗癬がおこっているものと推定される。

E. 結論

細胞内の小胞輸送に関与する分子の異常である CEDNIK 症候群と ARC 症候群で、角質肥厚と層板顆粒の分泌異常がみられたことから、層板顆粒の分泌不全は角質の肥厚をまねくと考えられる。しかし、CEDNIK 症候群と ARC 症候群で観察される角質の肥厚は BCIE よりも軽症であり、後者においてはさらに別の細胞生物学的要因が表現形の重篤化に寄与していると推定された。

参考文献

- (1) Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, Rapaport D, Goldsher D, Indelman M, Topaz O, Chefetz I, Keren H, O'Brien TJ, Bercovich D, Shalev S, Geiger D, Bergman R, Horowitz M, Mandel H. A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am J Hum Genet.* 77:242-51, 2005
- (2) Hershkovitz D, Mandel H, Ishida-Yamamoto A, Chefetz I, Hino B, Luder A, Indelman M, Bergman R, Sprecher E. Defective lamellar granule secretion in arthrogyposis, renal dysfunction and cholestasis (ARC) syndrome caused by a mutation in VPS33b. *Arch Dermatol.* in press

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成18年度)

1. 論文発表
英語論文