

表 1. 感受性アレル251と末梢血でのSP 5-6 発現頻度 (左図)
 比較として、感受性アレルではないアレル271とSP 5-6 発現頻度 (右図)

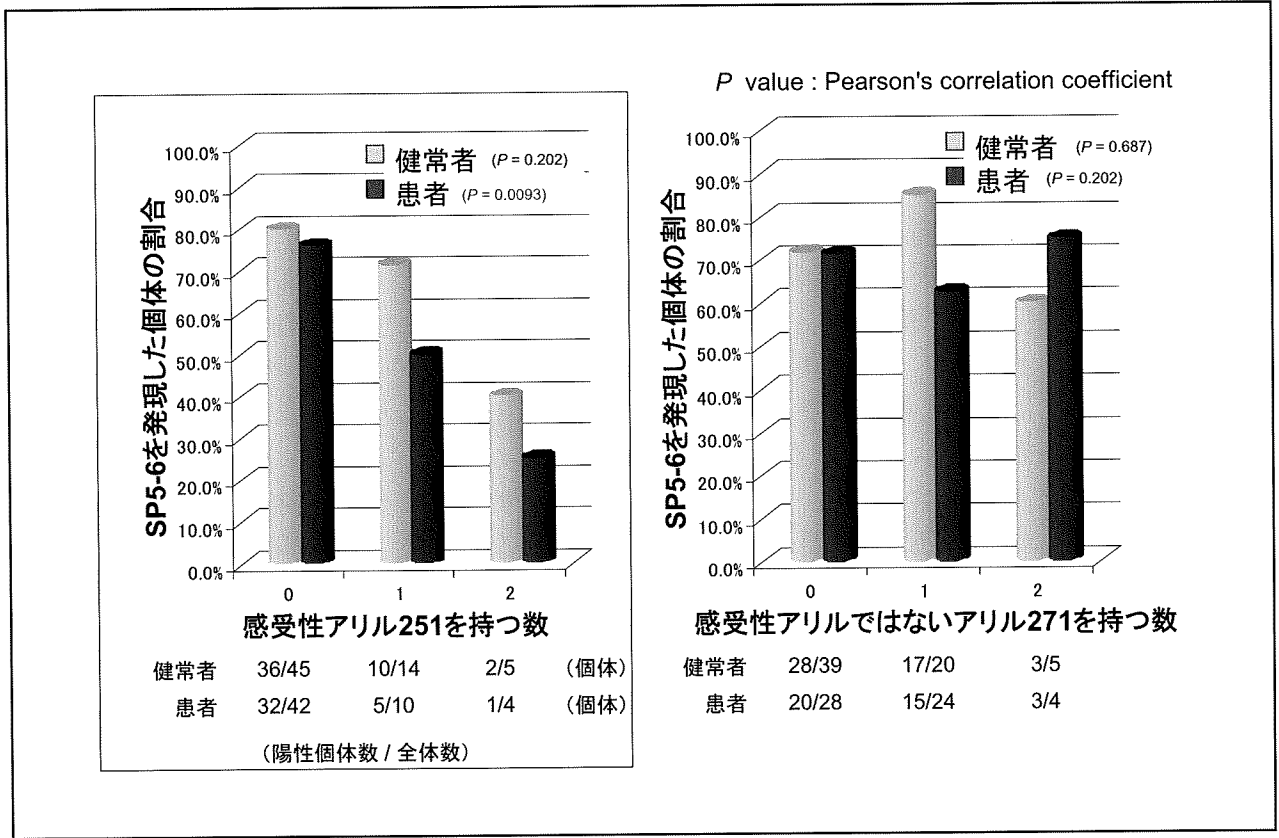
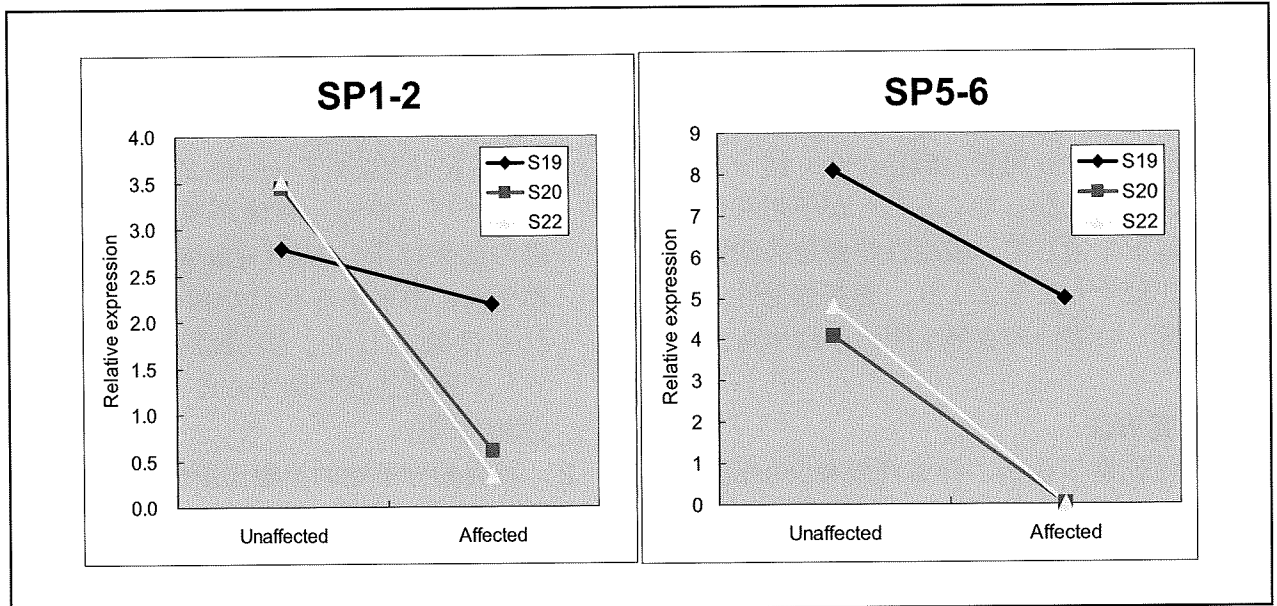


図 1. 乾癬患者皮膚での転写産物発現頻度



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

膿疱性乾癬の薬剤感受性遺伝子解析

研究協力者 武藤正彦 山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨 膿疱性乾癬の治療法開発に供すべく、尋常性乾癬を対照疾患として、疾患感受性関連遺伝子群の網羅的解析（SNP及びシーケンス解析）を行い、これまで解析を進めてきた*HLA*、*HCR*に加え、今年度は特に免疫制御に関わる*IL-12/34p40*、*IL-23R*、*CTLA-4*、*VEGF*の多型解析を実施した。その結果、*IL-12/23p40*には健常者群と異なる頻度SNP多型が存在すること、*IL-23R*に関しては、外国での報告と違い、有意な多型性は観られなかった。*CTLA-4*に関しては、*HLA-DRB1*08*を含む*HLA-DRB1*と連動して解析することで、健常者群との有意差がみられた。*VEGF*に関しては、差がみられなかった。*Steroidogenesis*に関わる*HCR*に関しては、*HLA-Cw*06*とは独立して、両疾患と相関を示すことが判明した。

ゲノム解析に基づく病因解析からみると、膿疱性乾癬は、尋常性乾癬とかなりの部分で重なるが、好中球機能に関わる*LMIR1*のSNP多型に明らかに違いがみられる、など両疾患は異なる病因により構成される疾患である可能性が示唆される。

共同研究者

田中 朱美 山口大学大学院医学系研究科
皮膚科学分野

A. 研究目的

膿疱性乾癬の治療は、尋常性乾癬の治療と比べると、やはり両者の病態が全く同一とはいえず、当然異なってくることが予想される。ゲノム解析を通じて、膿疱性乾癬と尋常性乾癬とを比較することにより、薬剤感受性（疾患感受性）の違いの有無を明らかにする。

B. 研究方法

膿疱性乾癬7症例、尋常性乾癬180症例について、*HLA*多型解析及び疾患感受性候補遺伝子群（*CTLA-4*、*VEGF*、*HCR*、*IL-12/23p40*、*IL-23R*）のSNP解析を行った。

（倫理面への配慮）

山口大学において、本研究について倫理委員会で承認を得た。患者からインフォームド・コンセント及び文書にて同意を得た。

C. 研究結果

1. 乾癬の代表的治療薬のひとつであるビタミンD₃代謝への寄与が示唆されている *a-helix coiled-coil rod homologue* (*HCR*) のSNP解析結果から、㊦尋常性乾癬では、*HCR-386* T-HCR-404* T-HCR-1802* T-HCR-2406* G*ハプロタイプ（推定）頻度が増加しており、その効果は主に*HLA-Cw*06*との連鎖不平衡に由来するものであったが、㊧これとは独立して、*HLA-2406* G*が独立して両疾患と相関することが判明した（投稿予定）。
2. 特異的分子標的治療法開発のための遺伝子多型解析として、*IL-12/23p40* (rs3212227) 及びそのレセプター*IL-23R* (rs11209026) を取りあげ、そのSNP解析から、㊦*IL-12/23p40*では、C/C型遺伝子の頻度が、既報告と同様に、尋常性乾癬患者群で有意に減少しており ($p < 0.002$)、有意差はないものの、膿疱性

患者群でも同様の傾向を示した。④ *IL-23R* の変異は、両疾患及び正常者群の全ての集団内で観られなかった。

3. 抗原提示細胞上の CD80/CD86 分子と相互作用する T 細胞上の CD28 と競合する CTLA-4 分子を支配する *CTLA-4* の SNP (rs231775) 解析では、疾患全体と正常者群との比較をしたとき、有意差は認められなかったが、尋常性乾癬において、*HLA-DRB1*08* の存在下で検討し直すと、遺伝子型が (G/G+G/A) のとき *HLA-DRB1*08* との正の相関が認められた ($p < 0.04$)。膿疱性乾癬でも、有意差は認められなかったが、同様の傾向を示した。

D. 考察

T 細胞を介した免疫制御に関わる複数の機能分子 (*IL-12/23p40*, *CTLA-4*) の SNP 多型が尋常性乾癬同様、膿疱性乾癬でも認められたことから、生物製剤への治療効果を予想する際の足がかりを得ることが出来た。これまでの研究成果のまとめを図 1 に仮説として提唱する。

今後、症例数を増やし、実際の臨床データと比較検討することで、効率の良い治療指針作成への一助となることが期待される。

E. 結論

SNP 解析の結果から、膿疱性乾癬と尋常性乾癬との間だけでなく、膿疱性乾癬自体にも疾患感受性に異質性が存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成21年度)

論文発表

1. Furukawa F, Muto M, Ishikawa O. Ethnic differences in immunogenetic Features and photosensitivity of

cutaneous lupus erythematosus. Arch. Dermatol. Res.,301:111-115,2009.

2. 武藤正彦 : ヒト主要組織適合抗原系 (human leukocyte antigen system A: HLA) の遺伝学的研究. 時間学研究, 3:59-63,2009.
3. Furukawa F, Yamamoto Y, Kanazawa N, Muto M. Race differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus from the aspect of Japanese studies. Annuals of the New York Academy of Sciences, 1173:552-556, 2009.
4. 竹本朱美、山口道也、萩谷ゆみ子、武藤正彦 : c-kit 解析を行った小児肥満細胞症の 2 例. 西日本皮膚、71:483-486,2009.
5. Nakamura Y, Abe Y, Ichimiya M, Muto M. Case of atypical fibroxanthoma presenting immunoactivity against CD 10 and CD 99. J. Dermatol., in press.

学会発表

1. 武藤正彦、飯塚一、板見智、小澤明、川久保洋、佐伯秀久、島田眞路、深井和吉、真鍋求、三橋善比古. 日本乾癬学会遺伝子解析プロジェクトの成果、第24回日本乾癬学会シンポジウム、9.3-4, 2009. 東京.
2. Muto M, Nemoto K, Nakamura Y, Deguchi H, Hagiya Y, Okuda M, Tanaka A: Genetic studies in psoriasis: Insight into understanding of its pathogenesis. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, July 10th-12th, 2009. Sapporo.
3. 武藤正彦. 多様性に富む HLA システムの乾癬研究への応用. 第24回角化

症研究会（特別講演）. 8.8. 2009.
東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

I. 引用文献

1. Rajan P, Nair, Philip E. Stuart, Ioana Nistor, Ravi Hiremagalore, Nicholas V.C. Chia, Stefan Jenilich, Michael Weichen-thal, Gonçalo R. Abecasis, Henry W. Lim, Enno Christophers, John J. Voor-hees, James T. Elder. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum Genet.*, 78:827-851,2006.
2. Łuszczek W., Kubicka W., Jasek M., Barant E., Cisto. M., Nockowski P, Łuczywo-Rudy M, Wiśniewski A, Nowak I, Kuśnierczyk P. CTLA-4gene polymorphisms and natural soluble CTLA-4 protein in psoriasis vulgaris. *Int. J. Immunogenet.* 33:217-224, 2006.
3. Research Snippets:Quantitative analysis of Malassezia in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 127:2492, 2007.

表1. 膿疱性乾癬 (GPP) 患者におけるHLAおよび各種遺伝子のSNP解析のまとめ

No.	HLA-C		HCR				Runx 1	LMIR	CTLA -4	IL12B		IL23R		VEGF	
	Allele1	Allele2	384	386	404	1802	2406	rs734232	rs1878967*	rs231775	rs6887695	rs3212227	rs12131065	rs11209026	rs2010963
T-11	Cw*07	Cw*08	G/G	C/C	C/C	G/G	G/C	A/G	A/G	G/A	C/G	C/A	A/G	G/G	C/G
P-41	Cw*01	Cw*07	A/G	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G	A/A	A/A	G/G	A/A	A/G	G/G	C/G
P-81	Cw*03	Cw*07	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G	A/A	G/A	G/G	A/A	G/G	G/G	G/G
P-126	Cw*03	Cw*14	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	A/G	A/G	G/G	G/G	A/A	A/G	G/G	C/G
P-178	Cw*03	Cw*04	G/G	C/C	C/C	G/G	G/C	A/A	A/G	A/A	C/G	C/A	G/G	G/G	G/G
P-181	Cw*07	Cw*07	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	A/G	A/G	G/G	C/G	C/A	A/G	G/G	C/G
P-191	Cw*01	Cw*07	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G	A/G	G/G	G/G	C/A	G/G	G/G	C/C

*:p<0.015(by Fisher)

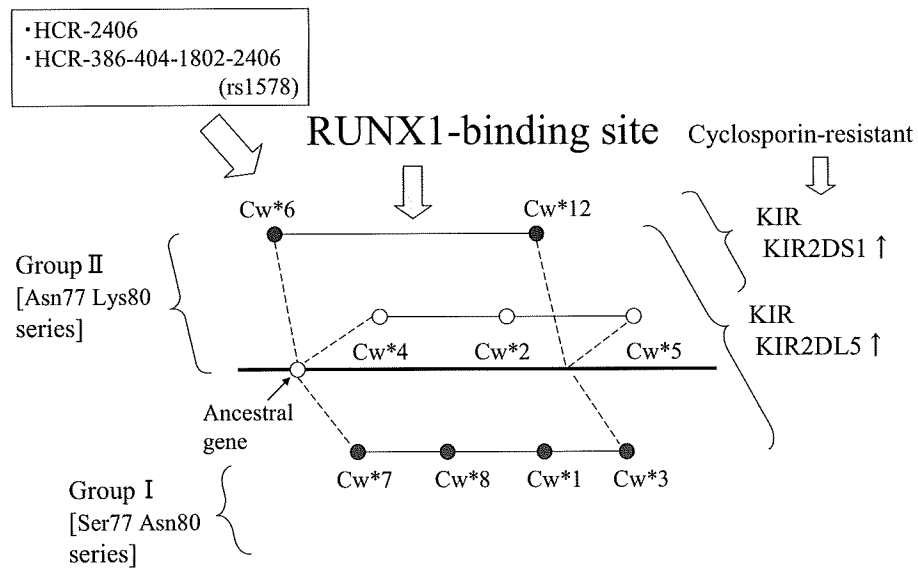


図1. HLA-C 遺伝子を中心に据えた関連各種遺伝子との相互作用の仮説

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

膿疱性乾癬の炎症増悪機構と制御に関する研究

研究協力者 山西清文 兵庫医科大学皮膚科学 主任教授

研究要旨 膿疱性乾癬ではさまざまなサイトカイン、ケモカインに加え、局所に浸潤した炎症細胞などから産生されるプロテアーゼによって protease-activated receptor 2 (PAR2) の活性化が生じると推測される。本研究において、角化細胞における PAR2 活性化が TNF- α による IL-8 産生を増強することを見いだした。PAR2 の活性化を介する炎症増幅機構は新たな治療薬開発のターゲットとして期待される。

共同研究者

津田 達也 兵庫医科大学皮膚科学

石川 千香 兵庫医科大学皮膚科学

た。PAR2 のノックダウンには PAR2 特異的 siRNA をトランスフェクションした。

(倫理面への配慮)

該当無し

A. 研究目的

膿疱性乾癬では IL-8 などのケモカインの産生誘導が好中球などの炎症細胞の表皮内浸潤を誘発し、膿疱形成に深く関わると推測されている。表皮の角化細胞は、さまざまな刺激や炎症性サイトカインによって局所の皮膚炎の増悪を生じるが、皮膚の炎症に際し、浸潤する好中球が産生するエラスターゼや肥満細胞のトリプターゼ、角化細胞が産生するカリクレイン関連ペプチダーゼなどのセリンプロテアーゼは角化細胞の protease-activated receptor 2 (PAR2) の活性化を引き起こすことが知られている。

TNF- α は膿疱性乾癬治療標的分子の一つであるが、本研究では角化細胞における TNF- α による IL-8 産生誘導、および、PAR2 の活性化が TNF- α の作用に及ぼす影響を検討した。また、炎症抑制効果が知られているテトラサイクリン系薬剤が、このシステムに及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

対象として培養ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を用い、IL-8 濃度の測定には ELISA を用い

C. 研究結果

PAR2 はセリンプロテアーゼによって N 末端が限定分解されると、露出したペプチド配列 (SLIGKV) が受容体自らを活性化し、シグナルを下流に伝達する。このアミノ酸配列を持つ合成ペプチド SLIGKV-NH₂ は PAR-2 のアゴニストとして働くことが知られている。100 μ M のアゴニストペプチド SLIGKV-NH₂ を NHEK に作用させると、48 時間後には培地中 IL-8 濃度の上昇が観察された。NHEK にアゴニストペプチドとともに 100 ng/ml の TNF- α を作用させると、相乗的な IL-8 の産生増加が見られ、この効果は 100 nM PAR2 特異的 siRNA のトランスフェクションにより有意に抑制された (図1)。一方、IFN- γ では、このような IL-8 の相乗的な産生増加は見られなかった。10 μ M のテトラサイクリン (TET)、ドキシサイクリン (DOX)、ミノサイクリン (MIN) の存在下にアゴニストペプチドと TNF- α を作用させた場合、相乗的な IL-8 産生増加は有意に抑制された (図2)。

D. 考察

本研究によって、角化細胞におけるPAR2の活性化がTNF- α によって誘発されるIL-8産生の増強に関わることが示唆された。TNF- α 阻害薬は膿疱性乾癬の治療に有用な薬剤であるが、TNF- α の作用を増幅するPAR2の活性化を抑制する薬剤の開発も、炎症増幅の制御の観点からは有用と考えられ、今後の開発が望まれる。また、テトラサイクリン系薬剤がPAR2の活性化によるTNF- α 誘導性IL-8産生を抑制する効果を持つことが判明した。今後、より強力な抗炎症作用をもつテトラサイクリン誘導体の開発が期待される。

E. 結論

表皮におけるPAR2の活性化はTNF- α によるIL-8産生を増強し、膿疱性乾癬を代表とする皮膚炎の病態に関わることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

論文発表

1. Fujimoto T, Tsuda T, Yamamoto M, Tarutani M, Natsuaki M, Minami S, Ito T, Kozuka T, Yamanishi K. Cutaneous malignant fibrous histiocytoma (undifferentiated pleomorphic sarcoma) arising in a chronic scalp ulcer of a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 23 (2) :202-3, 2009
2. Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H, Nakagawa N, Yamanishi K. Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes.

Antimicrob Agents Chemother. 53 (5) :1760-5, 2009

3. 吉見宣子、樽谷勝仁、津田達也、平野 愛、伊藤善啓、大山文悟、橋本隆、山西清文. 妊婦に生じた線状IgA水疱性皮膚症. *臨床皮膚科* 3 (12):932-935,2009

学会発表

1. Yamanishi K, Stratum corneum and homeostasis of the cutaneous barrier. The 1st international symposium of deimination and skin biology. 2009.4.
2. 山本雅章、津田達也、小西弘江、石川千香、山西清文. 急性腎障害を合併したケラチン10の新規ミスセンス変異をもつ水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症. 第108回日本皮膚科学会総会・学術大会 2009.4.
3. Imai Y, Tsuda T, Yamanishi K. Lichen planus-like dermatoses distributed along the lines of Blaschko. The 4th Joint meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, 2009.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

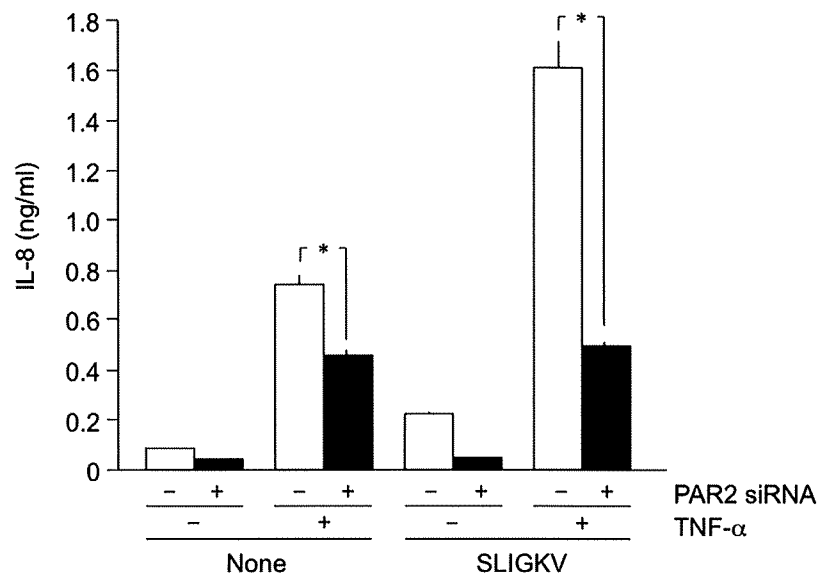


図1. PAR2アゴニストペプチドによるTNF- α 誘導性IL-8産生の増強 (* p < 0.001)

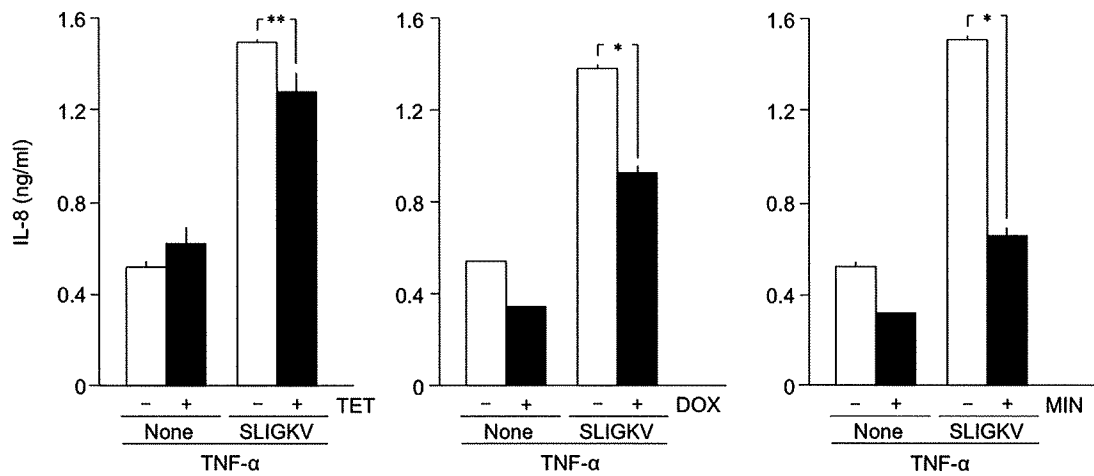


図2. IL-8産生誘導に及ぼすテトラサイクリン系薬剤の効果 (* p < 0.001 ; ** p < 0.01)

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

膿疱性乾癬の病態解明とその対策に向けて
-多機能受容体RAGEの信号伝達経路の解析

研究分担者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野 教授
研究協力者 阪口政清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野 准教授

研究要旨 乾癬病態には、皮膚組織内での炎症性環境とそれに伴う表皮角化細胞の増殖、分化異常が疾患起始因子として深く関わっている。この乾癬発症、特に膿疱化する乾癬に関わる炎症機転の機構と本態を明らかにすることが我々の課題である。我々は本課題において、乾癬発症患部で過剰発現するS100タンパク質群に着目し、本疾患におけるS100タンパク質群の役割を明らかにしようと努めてきた。その結果、S100タンパク質群の受容体RAGEを介したシグナル伝達制御の破綻（RAGEのS100タンパク質群による過剰な活性化）が、表皮角化細胞の増殖異常を誘発する可能性を見いだした。RAGEは、多様なS100タンパク質に結合して各々に特異的な情報を細胞内に伝達する機能を持つと考えられているが、その作動機構は未だ不明である。今回我々は、RAGEシグナル伝達機構を解析し、RAGE細胞質領域に結合する候補タンパク質を新に同定した。このことはS100タンパク質群をリガンドとするRAGEの作動機構解明へ向けた大きな手がかりである。

A. 研究目的

我々は以前に、S100タンパク質群の受容体RAGEを介したシグナル伝達制御の破綻が、表皮角化細胞の増殖異常を誘発する可能性を見だし報告した。この知見を基に、本研究では、乾癬病態におけるS100タンパク質-RAGEシグナルの役割を明らかにする。

受容体RAGEは、多様なS100タンパク質に結合して各々に特異的な情報を細胞内に伝達するが、その作動機構は未だ不明である。今回我々は、RAGE細胞質領域からどのようにシグナルが伝達されていくのかに関して、RAGE細胞質領域結合タンパク質の同定を試みた。

B. 研究方法

細胞：ヒト胎児腎細胞株（HEK293）はATCC社より購入した。HEK293はGibco社のDMEM/F12培地にそれぞれ最終濃度が10%となるように牛胎児血清（FBS）を加え

て培養した。

リコンビナントタンパク質の調製：ヒトS100A1-A16、S100B、S100P、S100G、S100Z、HMGB1をGST融合タンパク質として大腸菌で産生させ、グルタチオン共有結合担体によるアフィニティークロマトグラフィーで精製の後、GSTを切断・除去した。
哺乳動物発現コンストラクト：CMVイントロンプロモーター（CMVi）を導入したPDNR1rベクター（プロモーターレスドナーベクター；Clontech社）を構築し、CMViの下流にヒトRAGE（C末にMyc-HA-Flag-6His tagが付加）をコードするcDNAを挿入した（全長、細胞質領域欠損型、細胞質領域発現コンストラクト）。各挿入cDNAの塩基配列はDNAシーケンサーにより正しいことを確認した。

トランスフェクション：高純度精製発現コンストラクトの細胞へのトランスフェクションはFuGENE-HD（Roche, Basel, Swiss）

トランスフェクション試薬を用いて行った。36時間後に細胞を回収した。

免疫沈降：HEK293細胞にRAGE全長、細胞質領域欠損型、細胞質領域発現コンストラクトをトランスフェクトし、36時間後に細胞を回収した。各細胞抽出液を調製し、それぞれにMBL社の抗6His tag抗体共有結合担体を添加し、4℃で3時間振盪混和した。その後、5000rpm、1分間の遠心分離を行い、沈降してきた担体結合タンパク質を酸性bufferにより溶出した。

C. 研究結果

1. 大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の大量調製とRAGEとの結合評価：S100A1-A16、S100B、S100P、S100G、S100Z、HMGB1原核細胞発現用コンストラクトを用いて大腸菌（菌株BL21；Stratagene社）をトランスフォームさせ、その後、1Lの大量培養を3度繰り返すことでいずれもGST fusionタンパク質として約10mgの高容量を回収するに至った。更に各半量を、GSTを除去した形で調整してストックした（いずれも高純度であることを確認）。このことより、長期に渡って同じロットのタンパク質の使用が可能となった。

上記調製S100タンパク質に関して、RAGEとの結合能をGST pull down法にて評価した（RAGE細胞外領域タンパク質（R&D社）と調製GST-S100タンパク質とを混合）。結果としてS100A3、A8、A14、A15、Gを除く全てのS100タンパク質が、RAGEに結合する事が判明した。

2. RAGE細胞質領域結合タンパク質の発現：HEK293細胞にRAGE細胞質領域を一過性に過剰発現させたところ、発現細胞において顕著なDNA合成の低下とアポトーシスが認められた。またこの発現は、リン酸化酵素Aktの活性阻害（図1）

と転写因子NFkB、AP-1（炎症生サイトカインの誘導に必須）の活性阻害（図2）を引き起こした。これは、RAGE細胞質領域のみの過剰発現が、内因性RAGEに対してドミナントネガティブ効果を生み出していることを意味する。すなわち、RAGE細胞質領域からAkt、NFkB、AP-1の活性化をもたらすシグナルが確かに発せられているのである。

3. RAGE細胞質領域結合タンパク質の解析：HEK293細胞に過剰発現させたRAGE細胞質領域を6His tag抗体共有結合担体によるプルダウンによって回収し、結合タンパク質を高感度質量分析計にて解析した。また同時に、結合の可能性のあるタンパク質群（我々の推測）に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、二つの候補となる結合タンパク質A、Bを同定する事ができた（図3）。

4. RAGE細胞質領域のリン酸化と候補結合タンパク質の結合：HEK293細胞にRAGE全長を一過性に過剰発現させ、S100A11、S100A12、HMGB1でそれぞれ刺激した。その後、細胞抽出液を調製し、免疫沈降によりRAGE全長を回収したところ、RAGEの細胞質領域が刺激に応じてリン酸化を受けることが判明した。RAGE細胞質領域がリン酸化修飾を受ける事で、結合タンパク質A、Bの結合能が上昇した（図4）。

D. 考察

RAGEの細胞質領域は酸性アミノ酸に富んだ非常に短いペプチド鎖から構成されている（41個のアミノ酸で構成）。それ自体、リン酸化酵素活性を示さないため、どのように下流にシグナルが伝達されるかは全く不明であった。我々は今回、細胞質領域を高効率に哺乳細胞に発現させる系を構築して新規な結合タ

ンパク質を同定する事に成功した。このタンパク質は、Akt、NFkB、AP-1にシグナルを伝える機能を持つ事が我々の最近の研究より判明しつつあり、RAGEの作動原理の理解に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

今回の研究より、我々は、RAGE細胞質領域結合性新規タンパク質を同定するに至った。この発見は、RAGEの作動原理の理解につながり、乾癬発症、特に膿疱化する乾癬に関わる炎症機転の機構解明に大きく貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成21年度)

論文発表

1. Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H, REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 16: 65-72, 2009.
2. Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH, Kumon H, Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. *Int J Oncol.* 34: 657-663, 2009.
3. Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Ochiai K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of IL-7. *J Biol Chem.* 284: 14236-44, 2009.
4. Hardjo M, Miyazaki M, Sakaguchi M, Masaka T, Ibrahim S, Kataoka K, Huh NH, Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow. *Cell Transplant.* 18: 89-99, 2009.
5. Tanimoto R, Sakaguchi M, Abarzua F, Kataoka K, Kurose K, Murata H, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Down-regulation of BiP/GRP78 sensitizes resistant prostate cancer cells to gene-therapeutic overexpression of REIC/Dkk3. *Int J Cancer.* 2009 [In press]
6. Chen J, Watanabe M, Huang P, Sakaguchi M, Ochiai K, Nasu Y, Ouchida M, Huh NH, Shimizu K, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H: REIC/Dkk-3 stable transfection reduces the malignant phenotype of mouse prostate cancer RM9 cells. *Int J Mol Med.* 24: 789-794, 2009.

学会発表

1. Masakiyo Sakaguchi, Ken Kataoka, Hitoshi Murata, and Nam-ho Huh; Promoter-based improvement of gene expression in cancer therapeutic adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3、横浜、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日。
2. Masakiyo Sakaguchi, Ken Kataoka, Fernando Abarzua, Ryuta Tanimoto, Masami Watanabe, Hitoshi Murata, Swe Swe Than, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, and Nam-ho Huh; Normal human fibroblasts mis-targetedly infected with adenovirus REIC have a tumor-suppressive ability in vivo、

横浜、第32回日本分子生物学会、2009
年12月12日.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を 含む）

発明の名称：遺伝子発現を上昇させるシステム及び該システムを保持したベクター

特許権者：岡山大学法人 岡山大学

発明者：阪口政清、公文裕巳、許南浩、渡邊
昌実

出願年月日：平成21年10月23日

特許出願中

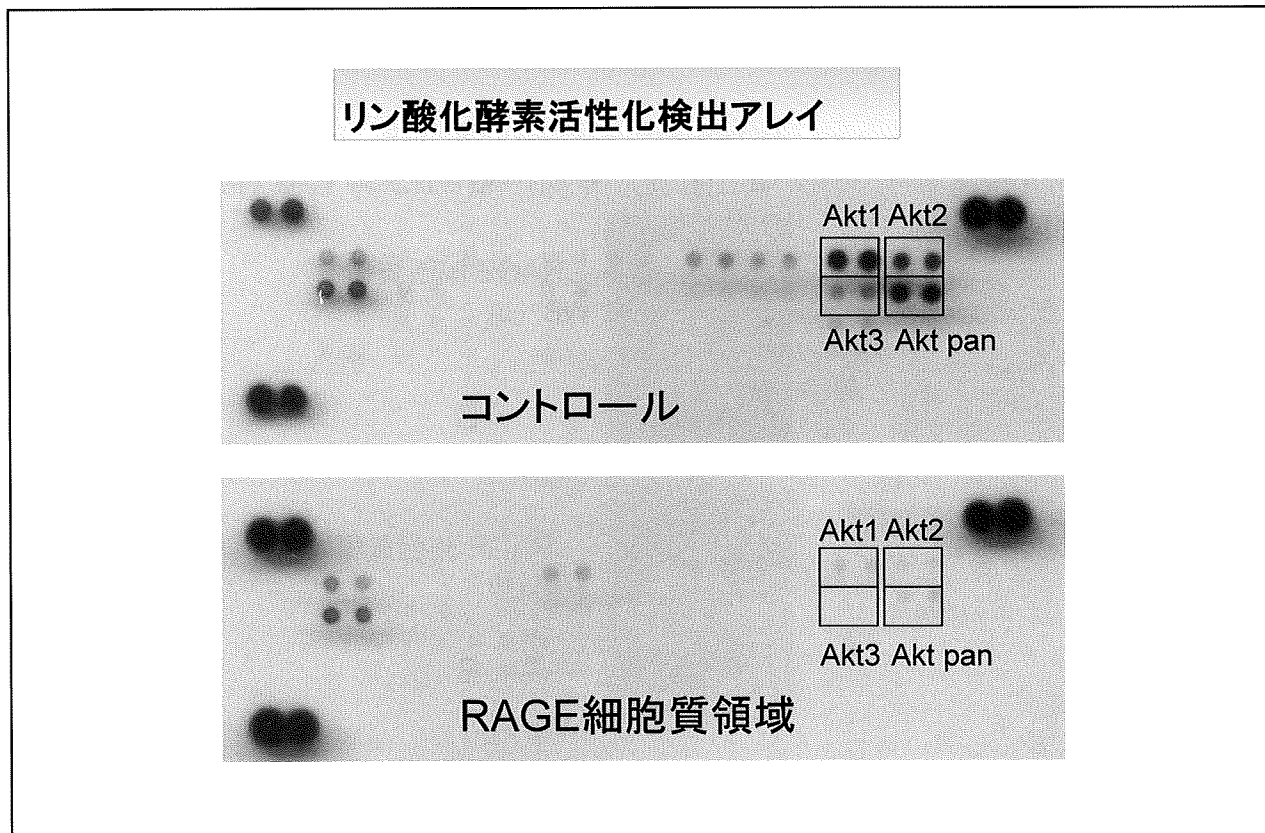


図 1. RAGE細胞質領域による Akt のリン酸化阻害

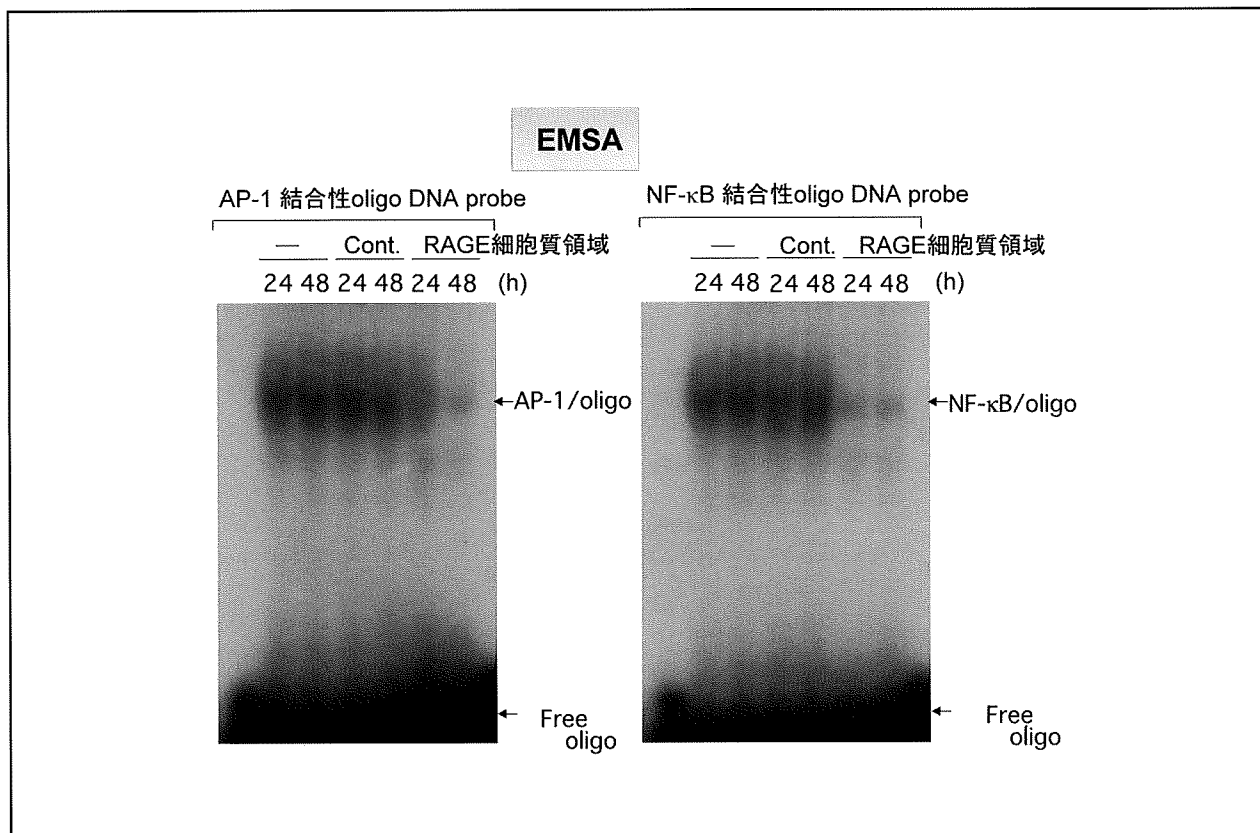


図 2. RAGE細胞質領域による NF- κ B、AP-1活性の阻害

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

膿疱性乾癬における樹状細胞と表皮細胞の相互作用の可能性について

研究分担者 小宮根真弓 自治医科大学医学部皮膚科学 准教授

研究要旨 乾癬局面周囲の健常皮膚において、リンパ球の浸潤なしに、すでに炎症性変化が生じていること、とくに炎症性樹状細胞が存在することを以前報告した。今回、樹状細胞が直接表皮細胞に炎症性変化を生じる可能性について、不死化した表皮角化細胞である HaCaT 細胞と、単球由来の細胞株である THP-1 細胞を樹状細胞様に分化させた細胞を共培養することにより検討し、TPA により樹状細胞様に分化させた THP-1 細胞は、表皮細胞に作用して NF κ B 活性化、CTACK 産生、ケラチン K6、K16 産生を増加させることを示した。

共同研究者

唐川 大 東京大皮膚科
大槻マミ太郎 自治医大皮膚科
玉置 邦彦 東京大皮膚科

A. 研究目的

膿疱性乾癬は、尋常性乾癬とは異なる側面を多数持つが、類縁疾患と考えられているように、類似の病態を示す部分も多い。尋常性乾癬局面周辺部の健常皮膚において、Tリンパ球がほとんど存在しない部分においても炎症性樹状細胞が表皮真皮境界部に存在しており、その部分の表皮にはケラチン K6、K16 の発現や転写因子である C/EBP β の発現など、すでに炎症性変化が生じていることを以前報告している。今回、樹状細胞が直接表皮に作用して、何らかの炎症性変化を生じる可能性について、正常ヒト表皮角化細胞と樹状細胞様に分化させた THP-1 細胞をトランスウェルを用いて共培養することにより検討した。

B. 研究方法

1) 不死化した表皮角化細胞である HaCaT 細胞は、N.Fusenig 氏より許可を得、黒木登志夫先生より供与していただいたものを使用した。THP-1 細胞は ATCC

より購入したものを使用し、THP-1 にて樹状細胞様に分化させて実験に用いた (Yoshida, et al., 2003)。Transwell[®] システムを用い、HaCaT 細胞と THP-1 細胞が接着、非接着の条件で各々共培養した。

表皮細胞特異的に発現を認める CTACK/CCL27 は培養上清中の濃度を ELISA にて測定した。CTACK/CCL27、MIP3 α /CCL20、IP-10/CXCL10、ケラチン K6、K16、K17 はリアルタイム PCR にてメッセンジャー RNA を測定した。NF κ B 活性は、NF κ B 結合部位をもつルシフェラーゼベクターを HaCaT 細胞に導入し、THP-1 と共培養したのちに回収してルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

C. 研究結果

- 1) 培養上清中 CTACK/CCL27 濃度は、HaCaT 細胞と THP-1 細胞の接触により産生が増加したが、非接触の状態では増加しなかった (図 1)。リアルタイム PCR によるメッセンジャー RNA レベルの検討でも同様の結果であった。
- 2) MIP3 α /CCL20、IP-10/CXCL10 のメッセンジャー RNA レベルは、THP-1 細胞との共培養により誘導され、非接着、接

着ともに誘導された。

- 3) ケラチンK6、K16はメッセンジャーレベルでTHP-1細胞との接着により誘導されたが、非接着では誘導されなかった。ケラチンK17はTHP-1細胞との接着、非接着ともに誘導されなかった。
- 4) NF κ B活性は、THP-1細胞との接着、非接着にかかわらず、共培養により誘導された。

D. 考察

樹状細胞は、尋常性乾癬、膿疱性乾癬の病態に深く関与している。今回、樹状細胞様に分化させたTHP-1細胞が不死化した表皮細胞であるHaCaT細胞に直接作用していくつかの炎症性ケモカインや炎症性ケラチン、NF κ B活性化を誘導したことは、in vivoにおいても、炎症性樹状細胞が直接表皮細胞に作用して炎症性変化を生じさせる可能性があることを示唆している。これが事実であれば、T細胞が関与する以前に、乾癬病変部形成のごく初期に表皮真皮境界部に存在すると考えられる炎症性樹状細胞が直接表皮細胞に働いて、ケラチンK6、K16やCTACK/CCL27を表皮細胞に誘導し、これらの変化が乾癬病変形成のごく初期にその後のT細胞浸潤を引き起こすきっかけを作っている可能性が考慮される。特にCTACK/CCL27は、上皮細胞特異的に発現が見られるケモカインであり、皮膚へのTリンパ球浸潤に必須であるとされており、初期の乾癬皮疹形成に関与している可能性がある。

今後、正常ヒト表皮角化細胞と、末梢血単球から誘導した樹状細胞を用いて、同様の実験を行いたい。

E. 結論

樹状細胞が、表皮細胞に直接作用して、炎症性変化を生じる可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成21年度）

論文発表

- 1) Komine M. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment : keratinocytes in atopic dermatitis - their pathogenic involvement. J Pharmacol Sci. 2009 Jul ; 110(3) : 260-4.
- 2) Shibata S, Saeki H, Tada Y, Karakawa M, Komine M., Tamaki K. Serum high molecular weight adiponectin levels are decreased in psoriasis patients. J Dermatol Sci. 2009 Apr 21.
- 3) Takatsuka Y, Komine M., Fujita E, Koike Y, Yamada T, Murata S, Ohtsuki M. Erythroderma associated with leukocytosis in premalignant myeloproliferative disorder. Int J Dermatol. 2009 Mar ; 48(3) : 324-6.
- 4) Futaki K, Komine M., Hosoda S, Hirashima M, Yokokura H, Yamada T, Murata S, Matsuyama Y, Nagashima T, Nara H, Minota S, Ohtsuki M. Pyoderma gangrenosum associated with Takayasu's arteritis without typical symptoms. Eur J Dermatol. 2009 May 1 ; 19(3) : 266-267.
- 5) 小宮根真弓 : derm@tology TIP-DC(解説) 皮膚アレルギーフロンティア(1348-7280) 7巻3号 Page198(2009.11)
- 6) 高塚由佳(自治医科大学 皮膚科)、小宮根真弓、大槻マミ太郎: アトピー性皮膚炎を伴った尋常性魚鱗癬(解説/特集) Visual Dermatology 8巻11号 Page1150-1152(2009.10)
- 7) 小宮根真弓 : 表皮細胞の角化と皮膚

疾患(解説/抄録あり) 日本皮膚科学
会雑誌(0021-499X)119巻11号

Page2151-2156(2009.10)

8) 小宮根真弓: 皮膚科セミナーウム
炎症性角化症 乾癬の病態と治療2008、
日本皮膚科学会雑誌 119巻5号
Page863-871(2009.04)

9) 南谷洋策(東京大学 皮膚科学教室)、
小宮根真弓、桜井直樹、竹腰知紀、三
井浩、多田弥生、佐伯秀久、玉置邦彦:
腎障害を伴った汎発性膿疱性乾癬、
日本皮膚科学会雑誌 119巻1号
Page39-47(2009.01)

10) 小宮根真弓: 新しい検査法と診断法
TARCの読み方: 臨床皮膚科
(0021-4973)63巻5号
Page59-63(2009.04)

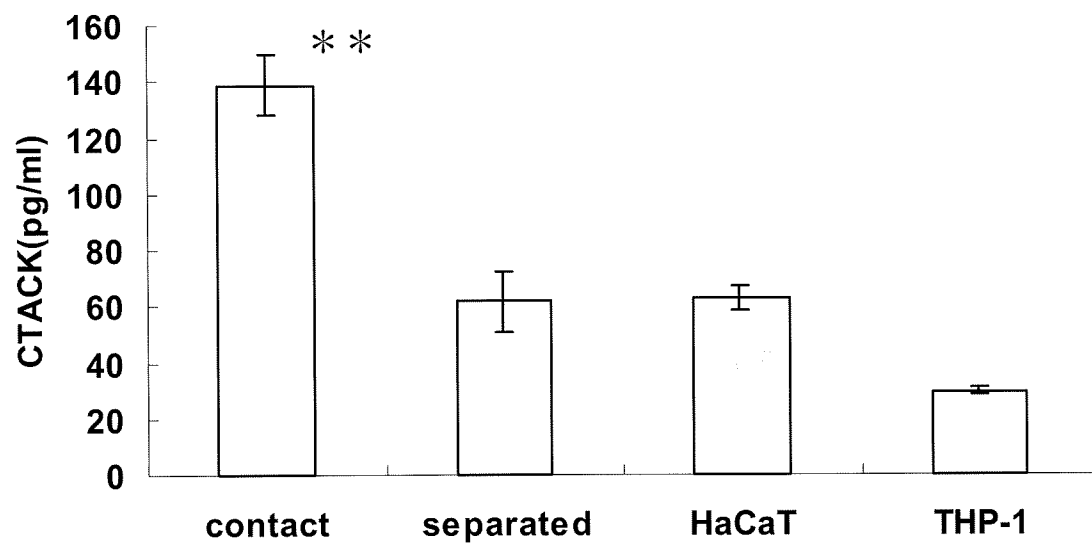
学会発表

- 1) Masaru Karakawa, Mayumi Komine, Kunihiro Tamaki and Mamitaro Ohtsuki. THP-1 cells induce inflammatory reaction in epidermal keratinocytes via contact-dependent and independent ways. The 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Budapest, Hungary, September 2009.
- 2) 小宮根真弓、唐川 大、玉置邦彦、大槻マミ太郎. アダリムマブ投与中の尋常性乾癬の悪化: アダリムマブのDLSTが陽性であった症例. 第39回日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会総会. 2009年12月、京都.

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

图 1.



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

膿疱性乾癬における血清S100A 8/A 9 蛋白の意義

研究代表者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨 カルシウム結合性S100A 8/A 9 蛋白は、乾癬における炎症メディエーターとして重要である。われわれは乾癬における血清S100A 8/A 9 蛋白レベルを測定し、病型、臨床症状、活動性との比較を行った。血清S100A 8/A 9 は、健常人やアトピー性皮膚炎と比較するといずれのタイプの乾癬においても有意に上昇しており、とくに膿疱性乾癬と関節症性乾癬で顕著に上昇していた（膿疱性乾癬;1282.1ng/ml +1724.6 SD、関節症性乾癬; 1812.2ng/ml+1403.5SD）。血清S100A 8/A 9 の高値は、皮膚症状の重症度よりも関節症状の有無に大きく依存していた。S100A 8 蛋白は病変部表皮角化細胞と炎症細胞の両方に発現していたが、S100A 9 蛋白は主に炎症細胞とくに好中球が発現していた。関節症性乾癬では、末梢血単球のS100A 8 とS100A 9 mRNA の発現がともに亢進していた。いずれのタイプの乾癬においてもS100A 8/A 9 レベルが上昇していたが、膿疱性および関節症性乾癬では著明に亢進しており、皮疹の重症度よりも、関節症状と末梢血単球活性化との関連が示唆された。

共同研究者

青地 聖子 岡山大学 皮膚科
辻 和英 岡山大学 皮膚科
大野 貴司 岡山大学 皮膚科
許 南浩 岡山大学 細胞生物
阪口 政清 岡山大学 細胞生物

試料の残りを保存して用いた。関節症性乾癬と膿疱性乾癬の皮膚生検は、診断目的にて採取された保存試料を切り出して用いた。新鮮末梢血採取は、本人の同意のもとに4 mlの追加採血を実施した。

血清S100A 8/A 9 測定は、ELISA法（Immunodiagnostik AG, Bensheim, Germany）を用い、組織における発現は抗S100A 8抗体（FL-83;Santa Cruz Biotechnology, CA）と抗S100A 9抗体（H-90, Santa Cruz Biotechnology, CA）を用いた。

A. 研究目的

乾癬の病態にS100A 8/A 9 が関与し、表皮細胞増殖と炎症反応を結ぶ重要なメディエーターとして注目されている[1-4]。われわれは膿疱性乾癬の重症度を反映する可能性のある血清S100A 8/A 9 を測定し、病型による違い、皮疹の重症度について検討した。

S100A 8/A 9 mRNA の定量は、S100A 8 cDNA は、5'-ATG CCG TCT ACA GGG ATG-3' (sense) と5'-TGC CAC GCC CAT CTT TAT-3' (antisense) を用いて増幅し、S100A9 は 5'-GAA CCA GGG GGA ATT CAA-3' (sense) と5'-CAG CTG CTT GTC TGC ATT TG-3' (antisense) で増幅し real-time PCR法で解析した。

B. 研究方法

尋常性乾癬30名、関節症性乾癬16名、膿疱性乾癬24名、健常人21名とアトピー性皮膚炎患者14名の血清を用いた。

これらの血清は、インフォームド・コンセントのもとに、一般検査目的で採取した血清

C. 研究結果

1. 乾癬病変部におけるS100A 8/A 9の発現

すべての乾癬病変において表皮角化細胞の細胞質内と浸潤細胞、特に好中球にS100A 8とS100A 9蛋白の発現が認められた。S100A 9は表皮角化細胞よりも、好中球の発現が顕著であった。正常表皮でのこれらの発現はわずかであった。

2. 血清S100A 8/A 9蛋白レベル

すべての病型の乾癬において血清S100A 8/A 9は健常人やアトピー性皮膚炎と比べて増加していた。なかでも、膿疱性乾癬と関節症性乾癬では著明に増加していた（膿疱性乾癬:平均 1282.1 ng/ml \pm 1724.6, 関節症性乾癬:1812.2 \pm 1403. 5, 尋常性乾癬: 482. 2 \pm 440. 6, アトピー性皮膚炎: 270. 5 \pm 167. 4, 健常人: 187. 5 \pm 92. 1)。

3. 臨床症状との関連

血清S100A 8/A 9レベルは、乾癬を病型ごとに分けて、皮疹の面積 (BSA) と比較すると10%未満の軽症群とそれ以上の重症群と比較しても明らかな差は認められなかった（尋常性乾癬 <10% BSA; mean 717. 94ng/ml \pm 520. 89, \geq 10% BSA; 693. 84 \pm 548. 93, 関節症性乾癬 <10% BSA; 1233. 94 \pm 875. 78, \geq 10% BSA; 1890. 18 \pm 1655.21)。

しかし、関節症状を罹患関節10未満と10以上で分けると、明らかに罹患関節の多いグループがS100A 8/A 9レベルが高かった（罹患関節10未満;830. 99 ng/ml \pm 463. 87, 10以上;2314. 50 \pm 1469. 75)。

4. 末梢単球活性化

S100A 8およびA 9 mRNAは、尋常性乾癬や健常人に比べて、関節症性乾癬の末梢血単球において2倍程度の高発現が認められた

D. 考察

血清S100A 8/A 9レベルは、乾癬ではいずれの病型においても高いレベルであった。病型別に見ると尋常性乾癬よりも、膿疱性乾癬および関節症性乾癬で著明な増加が認められた。病変部皮膚においては表皮角化細胞と浸潤細胞の両方に発現がみとめられた。尋常性乾癬におけるS100A 8/A 9レベルの上昇は以前の結果 [4] を追認するものであったが、皮疹の重症度との相関はみられず、むしろ全身症状である炎症性変化や関節症状によって大きく左右されていた。

E. 結論

血清S100A 8/A 9レベルは乾癬患者で上昇がみられるが、とくに膿疱性乾癬や関節症性乾癬では上昇が顕著であり、活動性指標として有用である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成21年度)

論文発表

1. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Kaytayama I, Horiguchi Y, Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Frue M, Hashimoto T, Ihn H, Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K: A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 60: 595-603, 2009.
2. Morizane S, Setsu N, Yamamoto T, Hamada T, Nakanishi G, Asagoe K, Iwatsuki K: Ichthyosiform eruptions in association with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Brit J Dermatol*