

- Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis.
J Invest Dermatol 129: 1302-1305, 2009.
31. Nomura Y, Abe M, Natsuga K, Moriuchi R, Kawasaki H, Mayuzumi M, Yasuoka A, Shimizu H:
 Widespread keratosis follicularis squamosa.
Clin Exp Dermatol 34: 519-520, 2009.
 32. Nomura Y, Akiyama M, Nishie W, Shimizu H:
 Progressive Refractory Ulcer of the Nipple: A Quiz.
Acta Derm Venereol 89: 445-447, 2009.
 33. Nomura Y, Nishie W, Shibaki A, Ibata M, Shimizu H:
 Disseminated cutaneous *Mycobacterium kansasii* infection in an patient infected with the human immunodeficiency virus.
Clin Exp Dermatol 34: 625-626, 2009.
 34. Osawa R, Akiyama M, Yamanaka Y, Ujiie H, Nemoto-Hasebe I, Takeda A, Yanagi T, Shimizu H:
 A novel PTPN11 missense mutation in a patient with LEOPARD syndrome.
Br J Dermatol 161: 1202-1204, 2009.
 35. Qiao H, Shibaki A, Long HA, Wang G, Li Q, Nishie W, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, McMillan JR:
 Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling.
J Invest Dermatol 129: 2288-2295, 2009.
 36. Sakai K, Akiyama M, Yanagi T, McMillan JR, Suzuki T, Tsukamoto K, Sugiyama H, Hatano Y, Hayashitani M, Takamori K, Nakashima K, Shimizu H:
 ABCA12 is a major causative gene for non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma.
J Invest Dermatol 129: 2306-2309, 2009.
 37. Shinkuma S, Abe R, Nishimura M, Natsuga K, Fujita Y, Nomura T, Nishie W, Shimizu H:
 Secondary syphilis mimicking warts in an HIV-positive patient.
Sex Transm Infect 85: 484, 2009.
 38. Shinkuma S, Akiyama M, Torii-Saito N, Natsuga K, Tateishi Y, Ito K, Hirota J, Shimizu Y, Shichinohe T, Shimizu H:
 Pemphigus foliaceus associated with oesophageal cancer.
J Eur Acad Dermatol Venereol 23: 473-474, 2009.
 39. Suzuki K, Yamaguchi Y, Villacorte M, Mihara K, Akiyama M, Shimizu H, Taketo MM, Nakagata N, Tsukiyama T, Yamaguchi TP, Birchmeier W, Kato S, Yamada G:
 Embryonic hair follicle fate change by augmented β -catenin through Shh and Bmp signaling.
Development 136: 367-372, 2009.
 40. Uematsu R, Shinohara Y, Nakagawa H, Kurogochi M, Furukawa J, Miura Y, Akiyama M, Shimizu H, Nishimura S:
 Glycosylation specific for adhesion molecules in epidermis and its receptor revealed by glycoform-focused reverse genomics.
Mol Cell Proteomics 8: 232-244, 2009.
 41. Ujiie H, Akiyama M, Osawa R, Shi-

- da S, Aoyagi S, Shimizu H:
Bloody nipple discharge in an infant.
Arch Dermatol 145: 1068-1069, 2009.
42. Yanagi T, Shimizu T, Kodama K, Nemoto-Hasebe I, Kasai M, Shimizu H:
CD30-positive primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma and definite squamous cell carcinoma.
Clin Exp Dermatol 34: e293-294, 2009.
43. Ando S, Sato-Matsumura K, Kasai M, Nemoto-Hasebe I, Hoshina D, Ohyama B, Hashimoto T, Shimizu H:
Desmoglein1 and bullous pemphigoid 180 ELISA indexes correlating with disease activity in a patient with co-existing pemphigus foliaceus and bullous pemphigoid.
Clinical and Experimental Dermatology, in press.
44. Aoyagi S, Hata H, Homma E, Shimizu H:
Controlling the histological margin for non-melanoma skin cancer conveniently using a double-bladed scalpel.
J Surg Oncol, in press.
45. Iitani MM, Abe R, Yanagi T, Hama-saka A, Tateishi Y, Abe Y, Ito M, Kondo T, Kubota K, Shimizu H:
Aleukemic leukemia cutis with extensive bone involvement.
J Am Acad Dermatol, in press.
46. Inokuma D, Shibaki A, Shimizu H:
Two cases of cutaneous sporotrichosis in continental/ microthermal climate zone: global warming alert?
Clin Exp Dermatol, in press.
47. Kusajima E, Akiyama M, Sato M, Natsuga K, Shimizu H:
Type XVII collagen ELISA indices significantly decreased after bullous pemphigoid remission.
Int J Dermatol, in press.
48. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H:
Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex.
Hum Mutat, in press.
49. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Shibata M, Nishimura M, Hashimoto T, Shimizu H:
Circulating IgA and IgE autoantibodies in antilaminin-332 mucous membrane pemphigoid.
Br J Dermatol, in press.
50. Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto-Ohguchi Y, Aoyagi S, Akiyama M, Kuroyanagi Y, Shimizu H:
Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute.
Acta Derm Venereol, in press.
51. Ujiie H, Kodama K, Akiyama M, Shimizu H:
Hereditary benign telangiectasia: Two families with punctate telangiectasias surrounded by anemic halos.
Arch Dermatol, in press.
52. Ujiie H, Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H:
Successful treatment of nail lichen planus with topical tacrolimus.
Acta Derm Venereol, in press.
53. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H:
A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized

- pathogenic antigen.
J Immunol, in press.
54. Vinzenz O, Gianluca T, Akiyama M, Claudine B-B, Christine B, Emmanuelle B, Philippe C, John JD, Peter E, Judith F, Philip F, Michal G, John H, Hashimoto T, Ingrid H, Hans CH, Daniel H, Alain H, Ishida-Yamamoto A, Withold KJ, Sancy L, Irene L, Juliette M-H, Leonhard M, Fanny M-P, Amy SP, Gabriele R, Matthias S, Shimizu H, Eli S, Maurice vS, Alain T, Jorge RT, Pierre V, Anders V, Mary W, Heiko T:
Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. J Am Acad Dermatol, in press.
55. Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, McMillan JR, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H:
Blockade of autoantibody-initiated tissue damage by using recombinant Fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. Am J Pathol, in press.

学会発表

1. Shimizu H, Akiyama M:
The proposal of a clinical classification approach of ichthyosis. The Second Ichthyosis Consensus Meeting. France, Soreze, 2009/01/23-24
2. Shimizu H:
(Lecture) What's new in ichthyosis. Department of Dermatology, Stanford University. California, USA, 2009/03/03
3. Shimizu H:

What's new in epidermolysis bullosa hereditaria.

The 67th Annual Meeting of AAD.
San Francisco, USA, 2009/03/07

4. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Nishie W, Natsuga K, McMilan J, Nakamura H, Shimizu H:
Bone marrow transplantation restores deficient epidermal basement membrane protein and improves the clinical phenotype in epidermolysis bullosa model mice.

The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. Sapporo, 2009/07/10-12

5. Nomura Y, Abe R, Ota H, Baba K, Hata H, Yamane N, Shimizu H:
A case of disseminated intravascular coagulation associated with Stevens-Johnson syndrome.

The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. Sapporo, 2009/07/10-12

6. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H:
Development of an active bullous pemphigoid mouse model.

The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. Sapporo, 2009/07/10-12

7. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Sakai K, Nishie W, Tanaka S, Shimizu H:
A bca12.+/− harlequin ichthyosis model mouse shows alveolar collapse as well as severe fetal skin barrier defects.

The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Aus-

- tralasian College of Dermatologists. Sapporo, 2009/07/10-12
8. Shimizu H:
Novel animal models for skin diseases: Message from Sapporo. ADA 129th Annual Meeting. Utah, U.S.A., 2009/08/22
 9. McMillan J, Qiao H, Shibaki A, Long H, Wang G, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H:
Collagen XVII in hemidesmosomes is involved in keratinocyte-collagen IV adhesion and p38-MAPK-dependent cell migration and signaling. The 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Budapest, 2009/09
 10. Shimizu H:
Transdifferentiation of bone marrow stem cells into keratinocytes. EB 2009. Vienna, Austria, 2009/09/07
 11. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Nishie W, Nakamura H, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H:
Both hematopoietic and mesenchymal stem cells contribute to the production of basement membrane protein in bone marrow transplantation treatment model mouse. European Society for Dermatologica Research. Budapest, Hungary, 2009/09/10
 12. Long H, Akiyama M, Yanagi T, Shimizu H:
ABCA subfamily member expression in the epidermis is altered by knock-down of ABCA12. European Society for Dermatologica Research. Budapest, Hungary, 2009/09/10
 13. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H:
Plectin expression in epidermolysis bullosa simplex (EBS) with muscular dystrophy vs. in EBS with pyloric atresia. European Society for Dermatologica Research. Budapest, Hungary, 2009/09/10
 14. Shimizu H:
(Lecture) Humanization of autoantigens: Lessons from bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa. Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München Lecture. Munich, Germany, 2009/10/05
 15. Shimizu H:
(JSID Symposium) Atopic dermatitis: Its skin barrier function and filaggrin mutations. The 18th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. Berlin, Germany, 2009/10/07
 16. Shimizu H:
(Plenary Lecture) "Mouse models of human diseases" The 18th Annual Meeting of the European Academy of Dermatology and Venereology. Berlin, Germany, 2009/10/08
 17. Shimizu H:
(Lecture) Lessons from novel mice models of inherited and autoimmune blistering diseases. Department of Dermatology, University of Cologne. Cologne, Germany, 2009/10/12-13
 18. Shimizu H:
(Lecture) Mouse models of blistering diseases and ichthyosis. Department of Dermatology, University of Freiburg. Freiburg, Germany, 2009/10/14

19. Shimizu H:
(Lecture) Bone marrow transplantation therapy for epidermolysis bullosa mouse model EB meeting. Freiburg, Germany, 2009/10/16
20. Shimizu H:
(Symposium) Harlequin Ichthyosis and Lamellar Ichthyosis: Molecular Diagnosis and Prenatal Diagnosis. 11th World Congress of Pediatric Dermatology. Bangkok, Thailand, 2009/11/17-18
21. Shimizu H:
(Symposium) Lessons from a Novel Mouse Model for Epidermolysis Bullosa. 11th World Congress of Pediatric Dermatology. Bangkok, Thailand, 2009/11/17-18
22. Shimizu H:
(Lecture) Great cases from Hokkaido University, Sapporo. Institute of Dermatology, Bangkok. Bangkok, Thailand, 2009/11/20
23. Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Hoshina D, Mae H, Shimizu H:
Development of a rapid immunochromatographic test for the detection of high-level serum ranulyisin in an early stage of SJS and TEN. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Japan, 2009/12/4-6
24. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Natsuga K, Nishie W, Nakamura H, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H:
Stem cell transplantation treatment restores deficient type XVII collagen in junctional epidermolysis bullosa model mice. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Japan, 2009/12/4-6
25. Hoshina D, Abe R, Hata H, Fujita Y, Yoshioka N, Aoyagi T, Shimizu H:
Establishment of a novel experimental model of human angiosarcoma. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Japan, 2009/12/4-6
26. Long HA, Akiyama M, Yanagi T, Shimizu H:
Expression of ABCA subfamily member in the epidermis is affected by knockout of ABCA12. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Japan, 2009/12/4-6
27. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Shinkuma S, Nakamura H, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Leena B-T, Shimizu H:
Presence of plectin rodless isoform is a key predictor of phenotypic severity in plectin deficient epidermolysis bullosa simplex. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Japan, 2009/12/4-6
28. Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean W, Shimizu H:
Novel mutation of FLG, p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese atopic dermatitis patients. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Der-

matology. Fukuoka, Japan,
2009/12/4-6

29. Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, Iseki S, Hara E, Masunaga T, Shimizu H, Nishimura EK:

Genotoxic Stress Induces Hair Graying Through Melanocyte Stem Cell Differentiation in the niche.

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, 2009/12/04-06

30. Niizeki H, Asada H, Amagai M, Oka A, Inoko H, Hashimoto T, Ikeda S, Shimizu H, Kitajima Y, Miyagawa S, Yamamoto S, Aoyama Y, Ichiki Y, Shimizu T, Takahashi H, Kuwana M, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamamoto T, Iwatsuki K, Inaoki M, Fujimoto W, Nakamura K, Kishimoto K, Kaneko F, Kunii T, Aiba S, Terui T:

Genetic variation of DSG3 is associated with pemphigus vulgaris among Japanese.

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, 2009/12/04-06

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む) 該当なし。

I. 引用文献

1. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H.
Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex.
Hum Mutat, in press

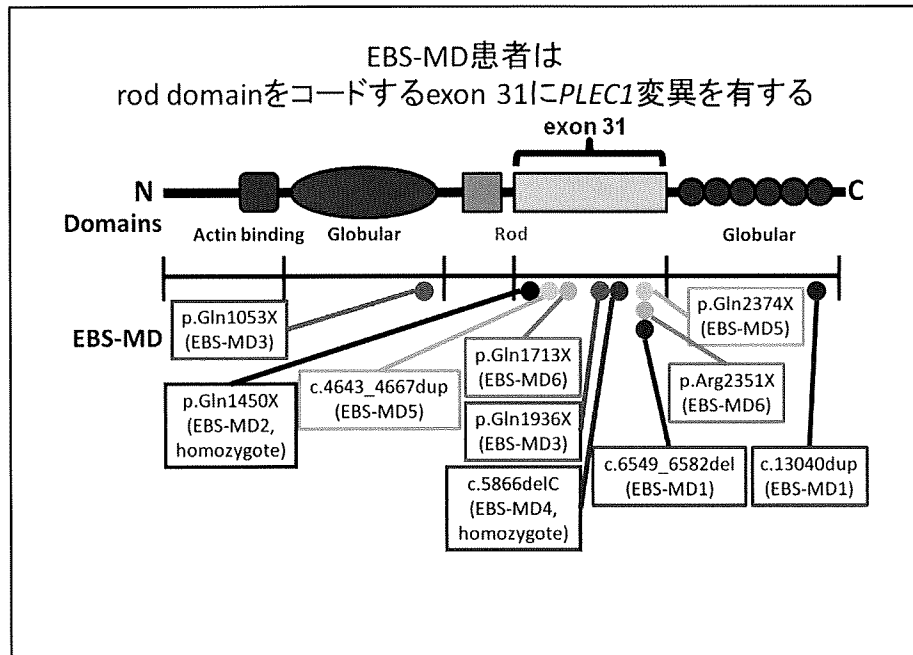


図 1

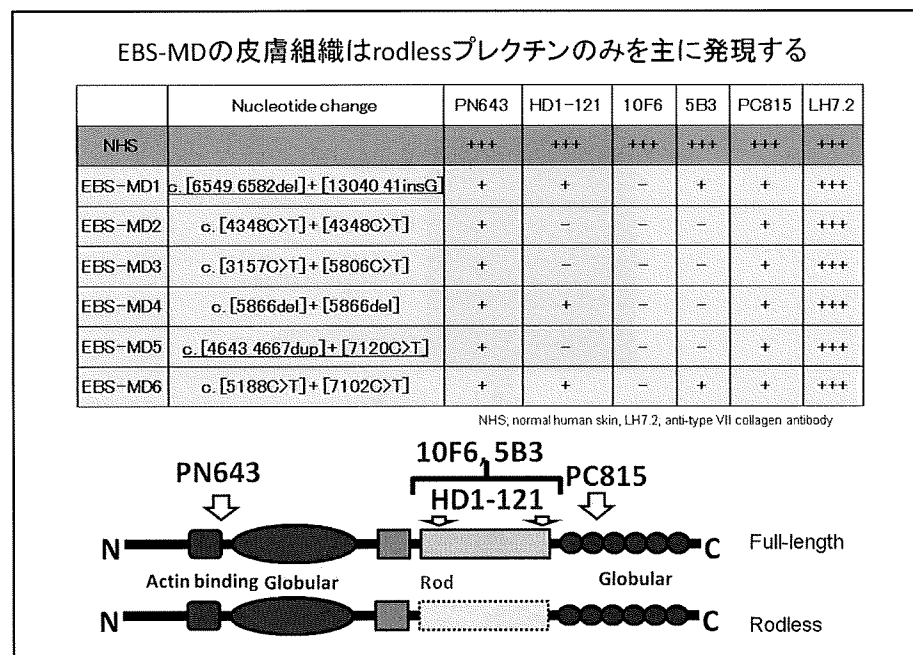


図 2

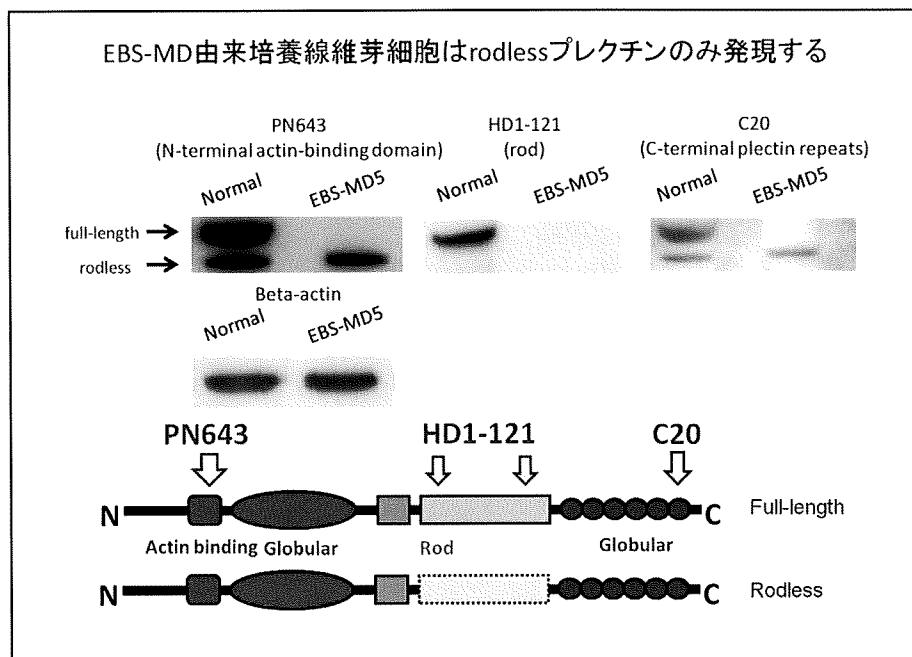


図 3

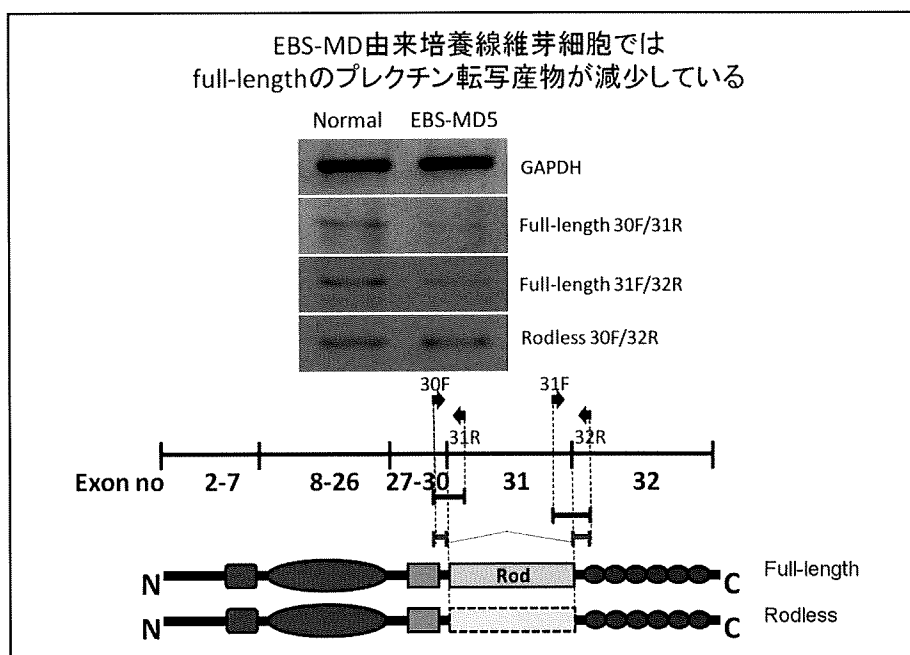


図 4

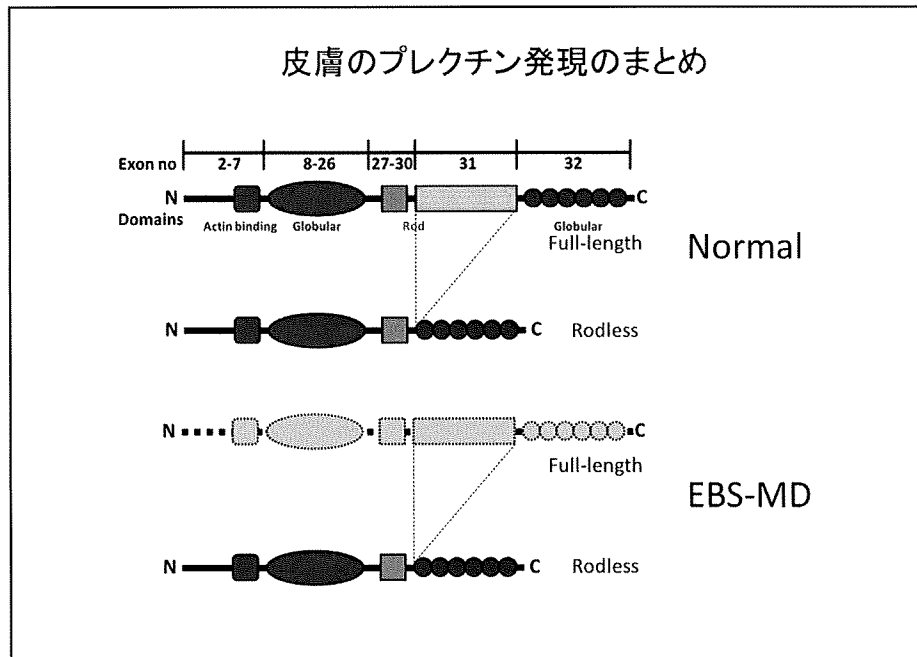


図 5

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病態形成における
matrix metalloproteinase 9の役割についての検討

研究協力者 濱田尚宏 久留米大学医学部皮膚科学教室 講師

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症（DEB）はVII型コラーゲンの異常によって生じる単一遺伝子病である。その臨床症状は多様性に富み、遺伝子変異の部位・種類と臨床的重症度の相関について多くの検討がなされてきた。我々は細胞外マトリックス成分に対する生体内分解酵素であるmatrix metalloproteinase（MMP）群のうちVII型コラーゲンを基質のひとつとすることで知られるMMP9遺伝子のプロモーター領域について、DEB 23症例の塩基配列決定を行った。2症例において同部位の塩基置換を認めた（-209C>T, -202G>A）。また、7症例の病変部皮膚について定量的PCR法を行い、全てにおいてMMP9発現上昇を確認した。DEBの病態形成におけるMMP9の役割や臨床的重症度との関連などについて考察した。

共同研究者

橋本 隆 久留米大学医学部
皮膚科学教室、教授
阿部 俊文 久留米大学医学部
皮膚科学教室、助教
石井 文人 久留米大学医学部
皮膚科学教室、助教

A. 研究目的

DEBにおけるCOL7A1遺伝子の変異は、今日までに300種類以上が報告されている。臨床的重症度と遺伝子変異の種類・部位との相関については多くの検討がなされてきた。しかし、同一の変異を有する患者家族間や同胞間でも多様な皮膚症状を呈することがあり、その病態形成には複雑なメカニズムが関与するものと思われる。最近、MMP1遺伝子のプロモーター領域の多型を有するDEB患者では、同遺伝子の転写・翻訳と組織中のVII型コラーゲン分解が促進されることにより、症状が増悪する可能性を示唆する報告がなされた⁽¹⁾。我々は同じ生体内分解酵素であり、VII型コラーゲンを基質のひとつとするMMP9遺伝子に注目し、23症例のDEBにつ

いて、そのプロモーター領域の塩基配列決定と病変部皮膚組織におけるMMP9発現を定量し、DEBの病態形成における役割について検討した。

B. 研究方法

COL7A1遺伝子変異がすでに明らかにされているDEB 23症例（表1）について、末梢血から抽出したゲノムDNAを使用し、MMP9遺伝子プロモーター領域のダイレクトシーケンシングを行った。また、そのうち7症例においては病変部皮膚から抽出したRNAを用いて定量的PCR法を行い、MMP9発現量を測定した。

C. 研究結果

症例13に-209C>T（転写開始地点を+1とする）、症例20に-202G>Aの塩基置換を認めた。7症例の病変部皮膚組織における定量的PCRでは、全例においてMMP9の発現が正常皮膚組織と比較して上昇していた（図1）。

D. 考察

今回検討したDEB23症例のうち、2例に

において*MMP9*遺伝子プロモーター領域の塩基置換を認めた。データベースを用いた追加検索では、症例20における-202G>Aは転写因子である*Nkx2-5*を結合する部位を新たに形成すると推察された。*Nkx2-5*は心臓の分化における重要な因子のひとつであることが報告されているが⁽²⁾、皮膚の病態においても何らかの役割を担っている可能性がある。また、表2に示すようにDEB病変部における*MMP9*遺伝子の発現解析において、臨床的に爪甲形成不全のみを認める症例9や乳児期に一過性に強い皮膚症状を認めた症例12のような軽症例では*MMP9*の発現がコントロールと比較して上昇しているものの程度は低く、全身皮膚に水疱・びらんを形成し、対立遺伝子の両方に*COL7A1*のナンセンス変異を認め、免疫蛍光抗体法においてはVII型コラーゲンの発現がみられない症例16のような重症例では、*MMP9*遺伝子の有意な発現上昇を認めた。

E. 結論

本研究結果から、DEBの病態における*MMP9*の何らかの関わりが示唆される。今後の追加検討によって、*MMP9*遺伝子プロモーター領域の多型のような遺伝的素因が病態形成に直接関与しているのか、VII型コラーゲンの遺伝的異常に伴う組織障害の結果として*MMP9*発現上昇が引き起こされるのかなどの問題が明らかにされることが期待される。

参考文献

1. Titeux M, Pendaries V, Tonasso L, et al. A frequent functional SNP in the *MMP1* promoter is associated with higher disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat* 2008;29:267-76.
2. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, et al. Mutations in the cardiac transcription factor *NKX2.5* affect diverse cardiac developmental path-

ways. *J Clin Invest* 1999;104:1567-73.

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. Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Takagi A, Yasumoto S, Ikeda S, Hashimoto T. A new c.2541delC mutation in the *ATP2A2* gene in a Japanese patient with Darier's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23 (4) :457-458.
2. Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Abe T, Nagata K, Koro O, Hatano Y, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. A Japanese family with dominant pretibial dystrophic epidermolysis bullosa: Identification of a new glycine substitution in the triple-helical collagenous domain of type VII collagen. *J Dermatol Sci.* 2009;54: 212-214.
3. Hashikawa K, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent *COL7A1* mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn. *J Dermatol Sci.* 2009; 56:66-68.
4. Koga H, Hamada T, Ohyama B, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. An association of idiopathic chronic eosinophilic pneumonia with pemphigoid nodularis: a rare variant of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2009;145:1339-1340.
5. Hashimoto T, Hamada T, Dainich T, Ishii N, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S. How does intramolecular

- epitope spreading occur in BPAG2 (BP180) ? J Invest Dermatol, in press.
6. Hashimoto T, Dainichi T, Ohyama B, Hamada T, Ishii N, Sato N, Tanigawa O, Nakayama J, Amano S, Nishiyama T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S. A case of anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid showing a blister on the bulbar conjunctiva and a unique epitope on the $\alpha 3$ subunit. Br J Dermatol, in press.
7. Nakama T, Hashikawa K, Higuchi M, Ishii N, Miyasato M, Hamada T, Hashimoto T. Pigmentary demarcation lines associated with pregnancy. Clin Exp Dermatol. 2009;34: e573-576.

学会発表

1. Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Ono F, Yasumoto S, Hashimoto T. Eight new ATP2C1 mutations and epigenetic regulation of microRNAs in Hailey-Hailey disease. The 39th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, Budapest, Sep 9-12, 2009
2. Koga H, Ishii N, Dainichi T, Hamada T, Karashima T, Yasumoto S, Hashimoto T. An attempt of mouse animal model for anti-laminin gamma-1 pemphigoid. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Dec 4, 2009.
3. Natsuaki Y, Ishii N, Fukuda S, Hamada T, Ishikawa T, Yasumoto S, Goto M, Fujiwara S, Hashimoto T. Anti-epiplakin autoantibodies in paraneoplastic pemphigus. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Dec 4-6

4. Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Sakaguchi S, Yasumoto S, Hashimoto T. Eight new ATP2C1 mutations and epigenetic regulation of micro RNA in Hailey-Hailey disease. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Dec 5, 2009.
5. Abe T, Hamada T, Ishii N, Koga H, Hashikawa K, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. Clinical and molecular characterization in 24 Japanese patients of dystrophic epidermolysis bullosa: 12 new mutations in COL7A1 gene. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Dec 4-6, 2009.
6. Fukuda S, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Sakai K, Yasumoto S, Akiyama M, Shimizu H, Hashimoto T. Identification of five new mutations in ABCA12 gene of four Japanese cases of non-bullous congenital ichthyiform erythroderma. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Fukuoka, Dec 4-6, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)
該当なし。

表 1. 本研究における症例のまとめ

Cases	Inheritance	Sex	Phenotype	Mutation	Location	Proteindomain	Consequences
1	AD	F	DDEB	p.Gly2028Arg	Exon73	THC	GS
2		M	DDEB-Pr	p.Gly2034Arg	Exon73	THC	GS
3		M	DDEB-Pt	p.Gly2058Glu	Exon73	THC	GS
4		F	DDEB-Pt	p.Gly2058Arg	Exon73	THC	GS
5		F	DDEB	p.Gly2064Glu	Exon74	THC	GS
6		M	DDEB-Pr	c.6832-58_6900+43del170	Exon87	THC	Deletion
7		F	DDEB	p.Gln2300Gln	Exon87	THC	Mis
8		M	DDEB	p.Gly2440Glu	Exon95	THC	GS
9		M	DDEB,nailsonly	p.Gly2626Val	Exon106	THC	GS
10		F	DDEB	p.Gly2716Glu	Exon110	THC	GS
11	AR	M	RDEB-sevgen	c.344insG/p.Pro2088Ser	Exons3/75	CMP/THC	PTC/Mis
12		M	RDEB-BDN	c.682+1G>A/p.Gly1910Ser	Intron5/Exon68	CMP/THC	PTC/GS
13		F	RDEB-I	p.Arg236X/Arg236X	Exons6/6	Fn3/Fn3	PTC/PTC
14		M	RDEB-sevgen	p.Arg1772Trp/p.Arg1772Trp	Exons61/61	THC/THC	Mis/Mis
15		F	RDEB-sevgen	p.Arg1933X/p.Arg1933X	Exons70/70	THC/THC	PTC/PTC
16		F	RDEB-sevgen	p.Arg1933X/c.6573+1G>C	Exon70/Intron81	THC/THC	PTC/PTC
17		M	RDEB-sevgen	c.5818delC/p.Arg2008Cys	Exons70/73	AA39/THC	PTC/Mis
18		F	RDEB-sevgen	c.5818delC/c.6216+5G>T	Exon70/Intron74	AA39/THC	PTC/Spl
19		F	RDEB-sevgen	p.Arg2063Trp/p.Arg2063Trp	Exons74/74	THC/THC	Mis/Mis
20		M	RDEB-O	c.6216+5G>T/p.Glu2857X	Intron74/Exon116	THC/Acidic	Spl/PTC
21		M	RDEB-sevgen	c.6573+1G>C	Intron81/?	THC/?	PTC/?
22		F	RDEB-O	p.Gly2431Trp/?	Exon95/?	THC/?	GS/?
23		M	RDEB-sevgen	c.7380+2T>C/c.7380+2T>C	Intron96/Intron96	THC/THC	PTC/PTC

AA39, 39 amino acid 'hinge' region; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; CMP, cartilage matrix protein; DDEB, dominant dystrophic epidermolysis bullosa; DDEB-Pr, DDEB pruriginosa; DDEB-Pt, DDEB pretibial; Fn3, fibronectin III-like domains; GS, Glycine substitution mutation; Mis, Missense mutation; PTC, Premature termination codon mutation; RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa; RDEB-BDN, RDEB bullous dermolysis of the newborn; RDEB-I, RDEB inversa; RDEB-O, RDEB generalized other; RDEB-sev gen, RDEB severe generalized; Spl, Splice site mutation; THC, triple helical collagenous domain.

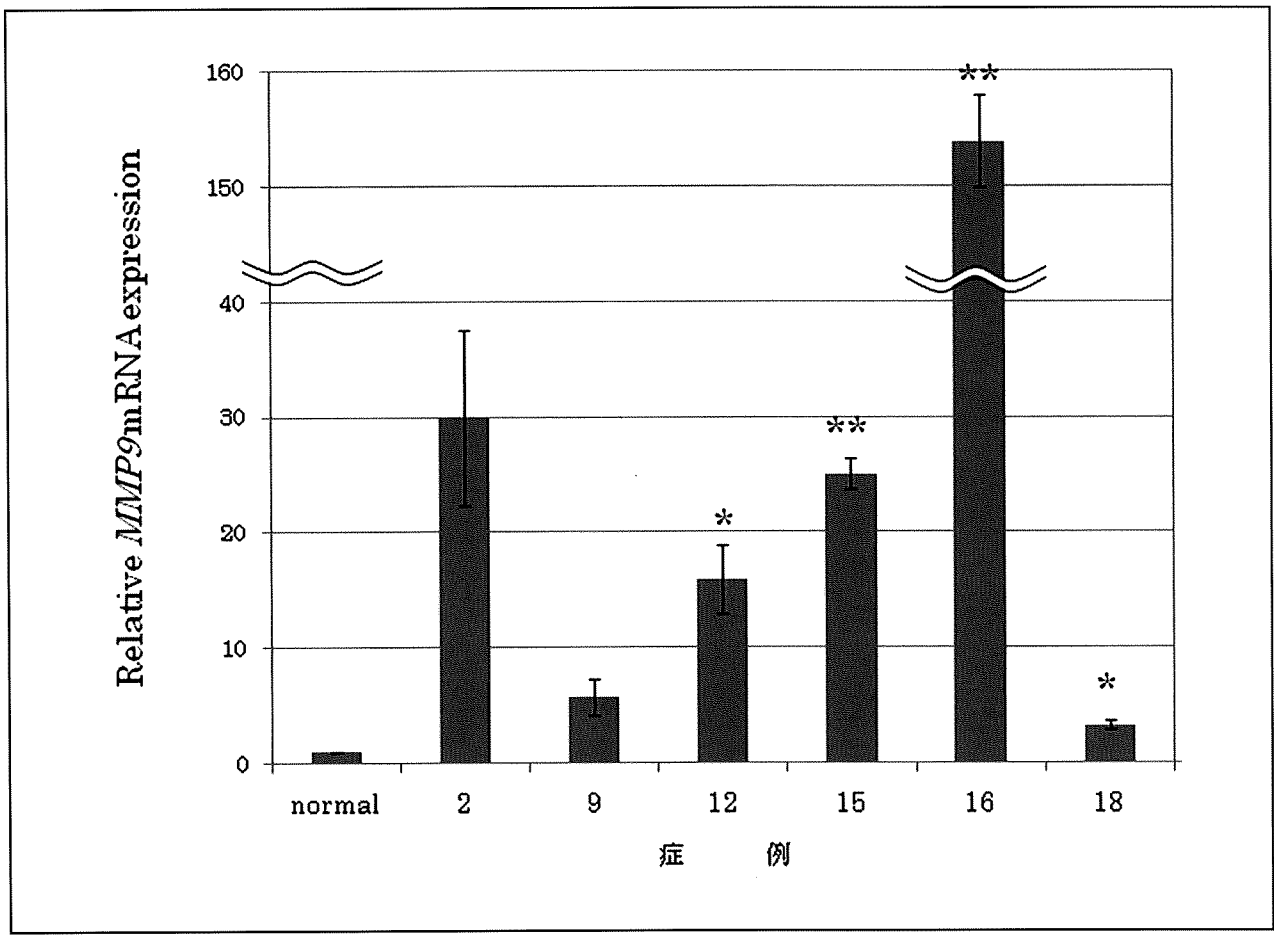


図1. 栄養障害型表皮水疱症7症例におけるMMP9遺伝子発現。
 4症例において、コントロールと比較して遺伝子発現が有意に上昇していた (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

表 2. 各症例の検査所見と MMP9 遺伝子発現のまとめ

Case	9	2	12	16
Phenotype	DDEB, nails only	DDEB-Pr	RDEB-BDN	RDEB-sev gen
Mutations	p.Gly2626Val	p.Gly2034Arg	c.682+1G>A/p.Gly1910Ser	p.Arg1933X/c.6573+1G>C
Antigenic alterations	Granular staining within basal and suprabasal keratinocytes; reduced staining along DEJ	Granular staining within basal and suprabasal keratinocytes; reduced staining along DEJ	Granular staining within basal and suprabasal keratinocytes; reduced staining along DEJ	Absent
Ultrastructural findings	Decreased numbers of AFs	Decreased numbers of AFs	Electron-dense stellate bodies within basal layer; reduced Afs	Rudimentary AFs
Relative MMP9 mRNA expression level	5.69	29.96	15.91	152.76

DEJ, dermal-epidermal junction; AFs, anchoring fibrils.

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

難治性皮膚疾患に対する骨髄幹細胞移植治療実現のための基礎研究

研究分担者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 准教授

研究要旨 これまで我々は、表皮水疱症マウスモデルの剥離表皮再生に骨髄由来細胞が寄与していることを見出し、骨髄幹細胞移植が表皮水疱症の根治的治療法となる可能性を報告してきた。しかし、表皮細胞再生に寄与する骨髄細胞の性質、剥離表皮への骨髄細胞動員メカニズム、骨髄細胞から表皮細胞への分化メカニズムなど、未だ不明な点が多い。今回我々は、骨髄由来表皮細胞を供給する骨髄内起源を探索したので報告する。

共同研究者

金田 安史 大阪大学遺伝子治療学
知野 剛直 大阪大学遺伝子治療学

A. 研究目的

これまで我々は、骨髄内に表皮細胞を供給し得る細胞集団が存在し、表皮水疱症の剥離表皮の再生に寄与し得ることを明らかにしてきた。しかし、その骨髄内起源は不明なままであり、それ故骨髄由来表皮細胞の性質に関する詳細な情報は無く、表皮水疱症を始めとする皮膚難病治療における、骨髄細胞移植の安全性、妥当性を科学的に評価することは困難なままである。

今回我々は、骨髄由来表皮細胞の表皮内起源を同定し、その性質を明らかにすることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

骨髄表皮前駆細胞動員因子を含むマウス新生仔皮膚抽出液を充填したシリコンチューブをGFPトランスジェニック骨髄細胞移植マウス皮下に移植し、一週間後に取り出してチューブ内に集積した細胞の表面マーカーを調べた結果、PDGFR α 陽性細胞が極めて多数（20%前後）存在することを見出した。そこで、PDGFR α 遺伝子プロモーター下流にヒストンH2BとGFPの融合遺伝子をノック

インしたPDGFR α -H2BGFPマウスから骨髄細胞を採取、培養し、PDGFR α 陽性（GFP陽性）細胞の細胞表面マーカーを検索すると共に、ケラチン5陽性細胞への分化能について検討した。

C. 研究結果

PDGFR α -H2BGFPマウス骨髄細胞から採取したGFP陽性骨髄細胞の細胞表面マーカーについて、フローサイトメトリーにより検討した結果、lineage-negative/c-kit-negativeであることが明らかとなった。さらに、このGFP陽性/PDGFR α 陽性骨髄細胞は、新生仔皮膚抽出液を添加した培養系において、ケラチン5陽性細胞へと分化することが免疫染色により確認された。

D. 考察

近年PDGFR α は骨髄間葉系幹細胞のマーカーであること、さらにその一部は胎生期外胚葉神経堤由来であることが報告された。一方今回我々は、PDGFR α 陽性骨髄細胞は、骨髄内においてLin⁻/c-kit⁻であることを初めて明らかにした。即ち、骨髄内においてPDGFR α 陽性細胞は造血幹細胞（lin⁻/c-kit⁺）や造血系細胞（lin⁺）と明確に区別されることが明らかとなった。

さらに、これらlin⁻/PDGFR α ⁺/c-kit⁻マ

ウス骨髄細胞は、新生仔マウス皮膚抽出液を添加した培養によりケラチン5を発現することから、外胚葉由来である可能性が示唆される。これらPDGFR α 陽性骨髄細胞のより詳細な性質を知ることにより、骨髄細胞を利用した、安全かつ高効率な難治性皮膚疾患治療法開発が可能になると期待する。

E. 結 論

PDGFR α 陽性骨髄細胞による難治性皮膚疾患治療の可能性が示された。

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. Hayashi H, Nakagami H, Takami Y, Koriyama H, Mori M, Tamai K, Sun J, Nagao K, Morishita R, Kaneda Y. FHL-2 Suppresses VEGF-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activation via Interaction With Sphingosine Kinase-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29 (6) :909-14.
2. Tamai K, Kaneda Y, Uitto J. Molecular therapies for heritable blistering diseases, *Trends Mol Med.* 2009 Jul;15 (7) :285-92.
3. Hashikawa K, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent COL7A1 mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn. *J Dermatol Sci.* 2009 Oct;56 (1) :66-8.
4. Kimura Y, Miyazaki N, Hayashi N, Otsuru S, Tamai K, Kaneda Y, Tabata Y. Controlled release of bone mor-

phogenetic protein-2 enhances recruitment of osteogenic progenitor cells for *de novo* generation of bone tissue.

Tissue Eng Part A. 2009 Nov 3. [Epub ahead of print]

学会発表

1. 玉井克人、教育講演：表皮水疱症の病態・診断・治療、第108回日本皮膚科学会総会・学術大会、2009年4月24日、博多市
2. 玉井克人、教育講演：表皮水疱症の患者さんから学んだこと、第25回日本臨床皮膚科医会総会、2009年5月8日、高知市
3. 玉井克人、教育講演：動き出した遺伝性皮膚難病の根治的治療法開発、神奈川県皮膚科医会第130回例会、2009年6月25日、横浜市
4. 玉井克人、シンポジウム：骨髄由来幹細胞による皮膚再生メカニズム、第73回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2009年9月26日、山梨市
5. 玉井克人、シンポジウム：骨髄由来多能性幹細胞動員因子を利用した非瘢痕性機能的皮膚組織再生誘導医療の開発、第61回日本皮膚科学会西部支部学術大会、別府市

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 発明名称：損傷組織の機能的再生促進医薬出願番号：PCT出願：2009年4月30日 (PCT/JP2009/058519)
2. 発明名称：末梢循環への骨髄由来多能性幹細胞動員薬 PCT出願：2009年4月30日 (PCT/JP2009/058515)
3. 発明名称：生体内機能的細胞の高効率採取法 PCT出願：2009年4月30日 (PCT/JP2009/058525)
4. 発明名称：骨髄間葉系および/または多能性幹細胞の血中動員による組織再生

促進剤特願：2009-247143出願日：2009
年10月28日

5. 発明名称：埋め込み式生体内物質採取
デバイス出願番号：特願2009-248107出
願日：2009年10月28日

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

レンチウイルスベクターを用いた角化細胞への遺伝子導入法

研究分担者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学 教授

研究要旨 我々はこれまでに表皮水疱症に対する遺伝子再生医療の基礎的研究として様々な遺伝子導入法を開発してきた。しかしながら、アデノウイルスベクターや超音波+マイクロバブルによる遺伝子導入では一過性の発現と導入効率の低さが問題であった。一方レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターは導入効率が高く、長期間の遺伝子発現が可能である。そこで今回はレンチウイルスベクターによる角化細胞への遺伝子導入について検討した。マーカーとしてはGFPを用い、MOI=1にて遺伝子を導入したところ、ほとんど全ての角化細胞でGFPの発現が認められた。遺伝子発現期間は最低でも14日は持続していた。

A. 研究目的

表皮水疱症の遺伝子再生医療の大きな柱の一つは遺伝子導入法の確立であり、もう一つは培養皮膚である。これまでの研究成果により、培養表皮シート、三次元皮膚移植法を確立した。一方遺伝子導入法についてはアデノウイルスベクターや超音波+マイクロバブルによる遺伝子導入では一過性の発現と導入効率の低さが問題であった。培養皮膚を用いた *ex vivo* 遺伝子治療の開発には長期間遺伝子発現可能な導入法を開発する必要がある。そこで今回レンチウイルスベクターを用いてどの程度角化細胞に遺伝子導入可能かについて検討した。

B. 研究方法

愛媛大学にて保存してあった正常ヒト皮膚角化細胞を無血清培養法にて培養した。レンチウイルスベクターはSIN-CMV, packaging, VSV-G+REVの3つの因子を293T細胞にco-transfectionし、培養上清を超速心することにより作製した。マーカーとしてはGFPを用い、MOI=1にて感染させた。感染後GFPの発現を蛍光位相差顕微鏡にて観察した。また、細胞を継代し、遺伝子発現期間について検討した。

C. 研究結果

遺伝子導入2日目には全ての角化細胞でGFPの発現が認められた。継代2日目には細胞は約40-50%のコンフルエンスで、この時点でも全ての細胞でGFPの発現が認められた。細胞はさらに順調に増殖し、5日目にはコンフルエントに達したためさらに継代を行った。継代2回目のさらに2日後でもGFPはほとんど全ての角化細胞で発現が認められた。角化細胞の増殖に対する影響は継代2回目の細胞まででは抑制効果は見られなかった。遺伝子導入から最低でも2週間はGFPの発現が認められ、細胞障害性は認めなかった。

D. 考察

表皮水疱症に対する培養皮膚を用いた *ex vivo* 遺伝子導入法を確立するためには安全かつ安定した遺伝子導入法を確立する必要がある。アデノウイルスベクター、超音波+マイクロバブルを用いた遺伝子導入では安全ではあるが発現が一過性であり、細胞の増殖に伴い発現が低下してくる。一方レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターは長期間の遺伝子発現が可能であり、角化細胞に対しても高い導入効率、長期間の遺伝子発現が確

認できた。今後安全性が克服されればex vivo 遺伝子治療の開発に有効な遺伝子導入法であることが期待される。

E. 結 論

レンチウイルスベクターを用いた角化細胞への遺伝子導入について検討し、導入効率の高さと長期間の遺伝子発現について確認した。

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. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S.: Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 2009 116:685-90.
2. Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 123:971-2
3. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.: Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. *Mol Vis*. 2009 15:937-48
4. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K.: IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol*. 2009;39:2279-88

5. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K.: Living Skin Equivalents Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J Dermatol Sci*. 2009 56:188-95
6. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.: Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-Induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. *Am J Pathol*. 2009 175:2235-48
7. 相原道子、狩野葉子、飯島正文、池澤善郎、塩原哲夫、森田栄伸、木下茂、相原雄幸、白方裕司、藤山幹子、北見 周、渡辺秀晃、外園千恵、桃島健治、小豆澤宏明、浅田秀夫、橋本公二：Stevens-Johnson症候群および中毒性表皮壊死症（TEN）の治療指針。－平成20年度厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）重症多形滲出性紅斑に関する調査研究班による治療指針 2009の解説－。日本皮膚科学会雑誌；119：2157-2163, 2009.
8. 藤山幹子、橋本公二：薬剤性過敏症症候群とHHV-6の再活性化について。ウイルス；59：23-30, 2009.
9. 石川真奈美、白方裕司、村上信司、藤山幹子、谷本圭子、浦部由佳里、佐藤直樹、宮脇さおり、岡崎秀規、平川聡史、徳丸晶、花川靖、佐山浩二、橋本公二：大量ガンマグロブリン静注療法が奏功した難治性尋常性天疱瘡の1例。西日本皮膚科71：561-65, 2009
10. 岡崎秀規、藤山幹子、村上信司、石川真奈美、佐藤直樹、宮脇さおり、白