

石 研、橋本公二：薬剤性過敏症候群（DIHS）の特徴的な顔面の所見とHHV - 6再活性化との時間的關係。日本皮膚科学会雑誌119:2187-93, 2009

tivity reactions in angiopoietin-related growth factor transgenic mice. 39th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting, Budapest, Hungary, 9/9-12, 2009.

学会発表

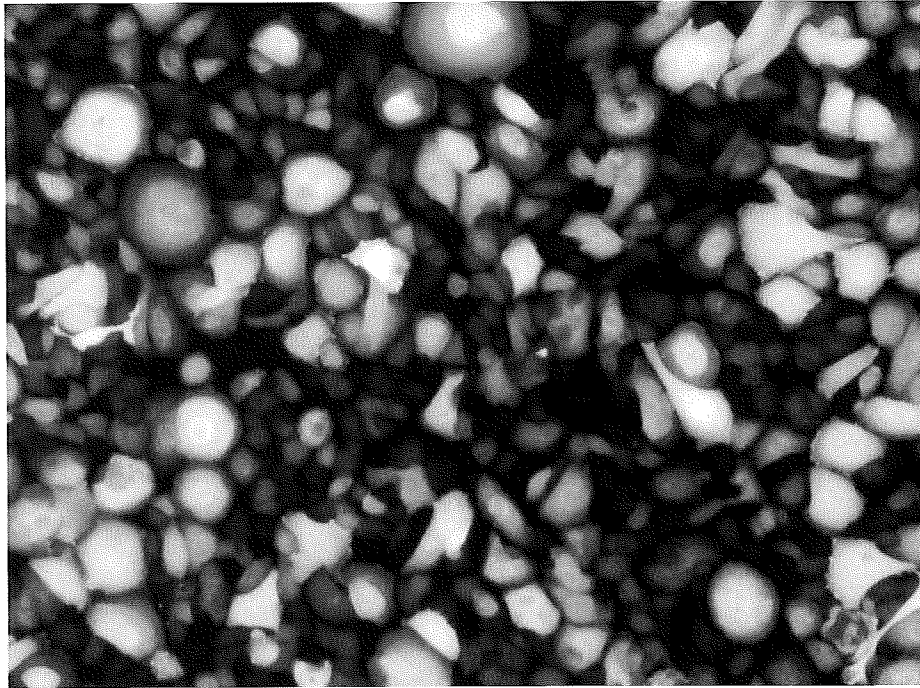
1. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada, 5/6-9, 2009.
2. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K.: Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Budapest, Hungary, 9/10-12, 2009.
3. Shirakata Y, and Hashimoto K.: Development of a new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, Sapporo, 7/10-12, 2009.
4. Hirakawa S, and Hashimoto K.: Lymph node lymphangiogenesis—a new concept in cancer metastasis. Symposium in 7th World Congress on Melanoma and 5th Congress of the European Association of Dermato-Oncology (EADO) , Vienna, Austria, 5/12-16, 2009.
5. Hirakawa S, Sato E, Okazaki H, Shodou M, Oike Y, and Hashimoto K.: Lymphatic hyperpermeability and persistent inflammation induced by cutaneous delayed-type hypersensi-

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

leGFP: MOI=1

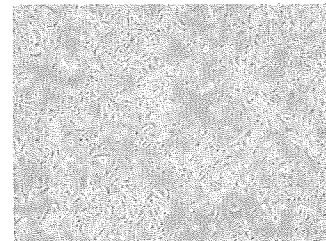
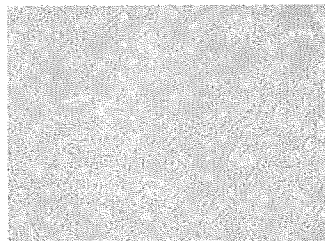
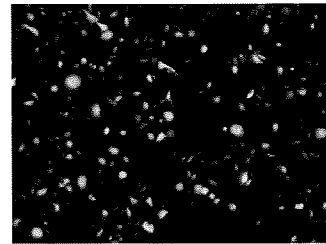
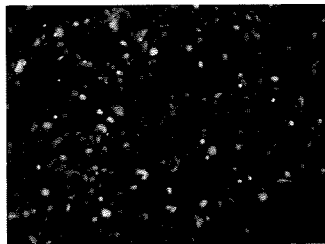
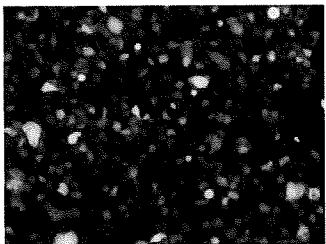
Transfection day 2



day 2

day 7

day 14



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による遺伝子導入角化細胞
を用いた三次元培養皮膚の作製

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三次元培養皮膚への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り遺伝子導入した角化細胞を用いて、三次元培養皮膚が作製可能かについて検討した。遺伝子導入角化細胞を用いた場合でも三次元培養皮膚の作製が可能であり、表皮全層で遺伝子の発現が認められた。

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、培養皮膚を用いたex vivo 遺伝子治療の開発に関しては三次元培養皮膚が完成した後表皮真皮境界部にアデノウイルスベクターを注入することにより遺伝子発現が可能であることを示してきた。同様に超音波+マイクロバブルを用いた遺伝子導入に関しても、三次元培養皮膚に遺伝子導入が可能であることを示したが、遺伝子導入には一時的に表皮真皮を剥離する必要があった。今回レンチウイルスベクターを用いてあらかじめ遺伝子導入した角化細胞を用いて三次元培養皮膚の作製が可能かについて検討し、さらにその導入効率、発現様式について検討した。

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、GFP遺伝子を挿入したレンチウイルスベクターをMOI=1にて感染させた。感染後GFPの発現は蛍光位相差顕微鏡にて確認した。コンフルエントに達した細胞は継代し、凍結保存した。

正常ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養し、5日間静置培養し、レンチウイルスベクターにてGFP遺伝子を導入した角化細胞をゲルの上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、経時的に組織を採取しGFPの発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

レンチウイルスベクターにより遺伝子導入操作を行い凍結保存した角化細胞を用いても空気曝露により重層化し、三次元培養皮膚の作製は可能であった。重層化開始後6日目の三次元培養皮膚では、基底細胞層から角層にいたるまでGFP遺伝子の発現が認められた。GFPの発現量は角層に近くなるにつれて増加した。遺伝子導入角化細胞を10%、非導入角化細胞を90%の割合で三次元培養皮膚を作製し、GFP発現の局在について検討したところ、基底細胞10-20個に1個の割合でGFP陽性細胞が存在した。しかし、基底細胞層での陽性細胞と角層での陽性細胞では位置的に多少のずれが存在した。

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ため、あらかじめ導入した角化細胞を用いて三次元培養皮膚を作製しても完成時にはほとんど遺伝子の発現は見られない。また、三次元培養皮膚に直接導入する場合には表皮真皮境界部に直接注入したり、一時的に表皮真皮を剥離する必要があった。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のため、あらかじめ角化細胞に遺伝子を導入してから三次元培養皮膚の作製が可能である。遺伝子導入三次元皮膚を安定的に作製するには、あらかじめ遺伝子導入した細胞を用いるほうが断然有利である。今回我々はレンチウイルスベクターを用いてあらかじめ遺伝子導入を施した角化細胞を用いても三次元培養皮膚が作製できることを明らかにし、その発現も安定していることを確認した。今後安全性が克服されればレンチウイルスベクター遺伝子導入三次元培養皮膚がex vivo 遺伝子治療の候補となり得ることが期待される。

E. 結 論

レンチウイルスベクターにてあらかじめ遺伝子導入を行った角化細胞を用いて三次元培養皮膚の作製が可能である。

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. 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、村海信司、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、村海信司、石川真奈美、佐藤直樹、宮脇さおり、白石 研、橋本公二：薬剤性過敏症候群（DIHS）の特徴的な顔面の所見とHHV - 6再活性化との時間的關係。日本皮膚科学会雑誌119:2187-93, 2009

学会発表

1. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada, 5/6-9, 2009.
2. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K.: Simple method of

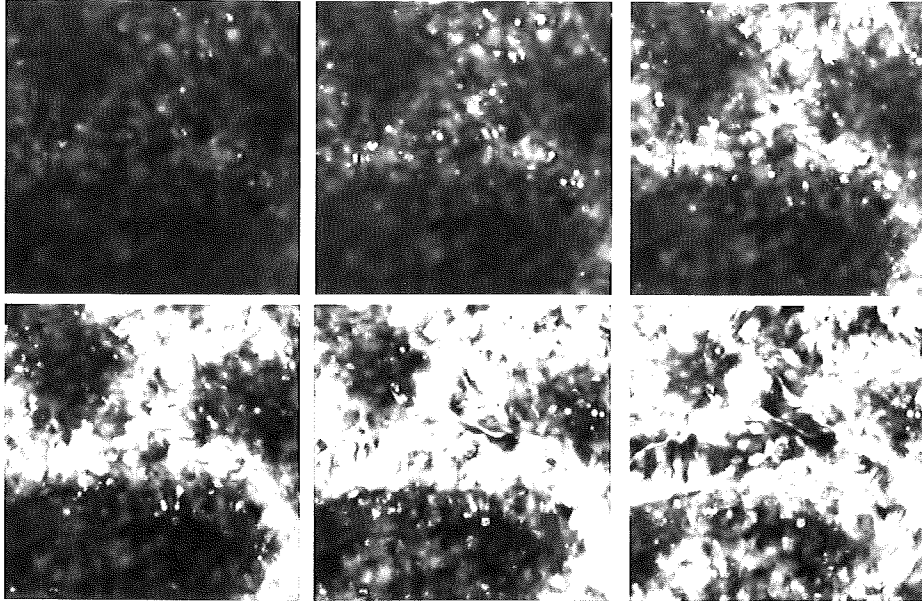
constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Budapest, Hungary, 9/10-12, 2009.

3. Shirakata Y, and Hashimoto K.: Development of a new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, Sapporo, 7/10-12, 2009.
4. Hirakawa S, and Hashimoto K.: Lymph node lymphangiogenesis—a new concept in cancer metastasis. Symposium in 7th World Congress on Melanoma and 5th Congress of the European Association of Dermato-Oncology (EADO) , Vienna, Austria, 5/12-16, 2009.
5. Hirakawa S, Sato E, Okazaki H, Shodou M, Oike Y, and Hashimoto K.: Lymphatic hyperpermeability and persistent inflammation induced by cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in angiopoietin-related growth factor transgenic mice. 39th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting, Budapest, Hungary, 9/9-12, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

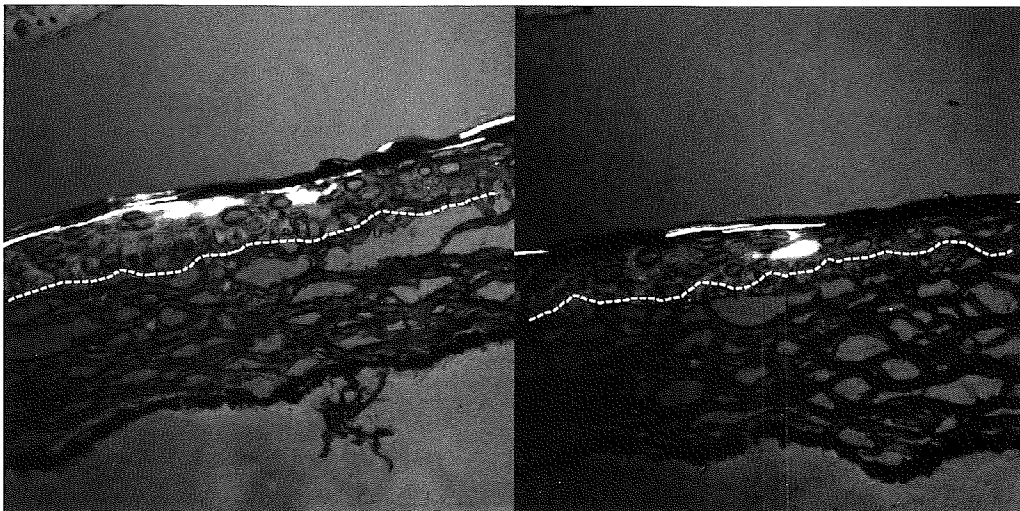
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

GFP(+) cell=100%
Basal side → 10 μ m刻み → Air Lift day 6



Air Lift day 10

GFP(+) cell=10%



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

先天性表皮水疱症の遺伝子治療法開発

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 これまで我々は、表皮基底細胞標的HVJ-Eの構築に成功し、水疱内投与では効率よく基底細胞にVII型コラーゲン遺伝子を導入させることに成功した。さらに標的導入効率を上げるため、HN欠損法の開発と標的分子の結合法の改良、血液中での安定性の確立を行っている。またマウス胎生期循環系への細胞/物質導入法を確立したので、この方法でVII型コラーゲン遺伝子封入基底細胞標的ベクターを導入し、全身皮膚へのVII型コラーゲンの発現の可能性を探る。

共同研究者

玉井 克人 大阪大学遺伝子治療学

知野 剛直 大阪大学遺伝子治療学

胞への治療用遺伝子導入法を確立することを目的とした。

A. 研究目的

先天性表皮水疱症は基底膜領域接着分子欠損病であり、欠損分子の殆どは表皮基底細胞から本来産生される。それ故、表皮水疱症に対する遺伝子治療法を確立するためには、表皮基底細胞を標的とした高効率遺伝子導入法の開発が不可欠である。さらに、表皮水疱症は全身皮膚が罹患しているため、十分な治療効果を得るためには全身表皮基底細胞に効率よく遺伝子導入可能な方法論の開発が必要である。

今回我々は、遺伝子工学的手法によりHVJ-Eの表面に表皮基底細胞特異的カドヘリンであるデスモグレイン3（Dsg3）の一本鎖抗体を付与し、かつHVJ-E表面のシアル酸レセプターHNをロックダウンすることにより、全身性に投与可能な表皮基底細胞標的HVJ-Eの作製に成功した。一方我々は、マウス胎生期循環系に治療用遺伝子、蛋白、細胞などを投与可能な方法論の開発を進め、羊膜表面の卵黄囊静脈を利用した投与法を確立した。

本研究では、これらの研究成果を発展させて、胎生期循環系を利用した全身表皮基底細胞

B. 研究方法

通常HVJ-Eおよび表皮基底細胞標的HVJ-EにFITC蛍光標識オリゴヌクレオチドを封入した後、C57BL/6マウス胎仔卵黄囊静脈から投与した。投与6時間後に胎仔皮膚を生検し、表皮基底細胞内へのFITCオリゴヌクレオチド導入効率について、表皮基底細胞内緑色蛍光を指標に評価した。

C. 研究結果

FITCオリゴヌクレオチドを封入した表皮基底細胞標的HVJ-Eをマウス胎仔循環に投与した結果、6時間後にはすべての胎仔皮膚切片内において、表皮基底細胞内にFITCの緑色蛍光が確認された。一方通常のHVJ-Eを投与したマウス胎仔皮膚では、表皮内緑色蛍光を観察する効率は低く、基底細胞標的HVJ-Eのおよそ10分の1程度であった。

D. 考察

Dsg3標的HVJ-Eのシアル酸レセプターHNをロックダウンすることにより、表皮基底細胞標的HVJ-Eを循環系に投与して表皮基底細胞に治療用遺伝子を導入することが可能となった。

マウス胎仔循環系に投与して評価した理由は、胎生期に投与した外来性抗原に対して免疫寛容が維持されるため、免疫反応による二次的修飾を憂慮する必要がないこと、少ない投与量で評価が可能であること、さらに生後間もなく死亡する表皮水疱症マウスの胎生期治療が可能であること、などが挙げられる。一方、マウス胎仔循環系へのHVJ-E投与は胎生14~15日での1回投与(投与量100 μ l)に限定され、投与量や投与回数を増加することは困難である。

今後は、栄養障害型表皮水疱症モデルマウス胎仔循環系に、VII型コラーゲン発現ベクターを封入した表皮基底細胞標的HVJ-Eを投与し、基底膜部に対するVII型コラーゲン供給と皮膚病態改善効果、生存率向上について評価する予定である。

E. 結論

先天性表皮水疱症の遺伝子治療法開発に向けて、全身性に投与して表皮基底細胞に遺伝子導入可能なHVJ-E開発に成功した。

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. Matsuda M, Yamamoto T, Matsumura A, Kaneda Y. Highly efficient eradication of intracranial glioblastoma using Eg5 siRNA combined with HVJ envelope. Gene Ther. 2009 Dec;16 (12) :1465-76.

学会発表

1. 金田安史 Development of anti-cancer strategies using HVJ envelope
第15回日本遺伝子治療学会 2009年7月9日(大阪)
2. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史 :
癌治療を目指した高性能免疫賦活化ビ

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)
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

表皮水疱症の骨髄細胞治療法開発

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 これまで我々は、マウス胎仔循環系に骨髄細胞移植を行うことによって、移植細胞に対する免疫寛容誘導とともに、皮膚に骨髄由来線維芽細胞を誘導し、基底膜部に欠損していたVII型コラーゲンを供給して皮膚病態を改善すると共に、生存率向上が得られることを報告した。しかし、胎仔循環系移植法では移植可能な細胞数が限られるため移植骨髄由来細胞のキメラ率は極めて低く、治療効果も限定的であった。今回我々は、新生仔マウス顔面静脈より複数回骨髄細胞移植をすることにより、胎仔移植に比較して移植骨髄細胞のキメラ率向上が可能となることを明らかにした。

共同研究者

玉井 克人 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

栄養障害型表皮水疱症は皮膚基底膜部にVII型コラーゲンが欠損し、基底膜直下に水疱形成する遺伝性水疱性皮膚疾患である。VII型コラーゲンは主に表皮細胞で産生されるが、真皮内線維芽細胞からも産生・供給されることが知られている。我々は、胎生期マウス循環系に直接細胞移植可能な方法論を開発し、この方法を利用してVII型コラーゲン欠損マウス胎生循環中に骨髄細胞を移植することにより、移植骨髄細胞に対する免疫寛容を誘導すると共に、皮膚に移植骨髄細胞由来線維芽細胞を誘導して基底膜部にVII型コラーゲンを供給し得ること、その結果皮膚病態が改善し、生存率向上が得られることを明らかにした。しかし、胎仔循環に導入できる細胞量が技術的に限定されるため、治療効果は限局的であった。

今回我々は、移植骨髄キメラ率を向上させ、治療効果を高める方法論の確立を目的に以下の研究を進めた。

B. 研究方法

新生仔マウス顔面静脈よりGFPトランスジェニック骨髄細胞を移植（400万個/20 μ l/1回、出生直後、3日目、4日目の計3回移植）し、移植骨髄細胞に対する免疫寛容成立の有無と、骨髄内GFP陽性細胞キメラ率を測定し、胎仔循環骨髄移植と比較検討した。

C. 研究結果

新生仔マウスへの複数回骨髄細胞移植法により、GFP骨髄細胞に対する免疫寛容が成立し、生後2ヶ月目の骨髄内GFP陽性細胞キメラ率は約1.4%であった。一方胎仔循環系への骨髄細胞移植では、胎生15日前後に1回のみしか骨髄細胞移植を施行できず、また1回投与量は100万個/10 μ lが限界であった。また胎仔循環系骨髄細胞移植マウスの生後2ヶ月目における骨髄内GFP陽性細胞キメラ率は0.5%~0.8%であった。

D. 考察

骨髄細胞移植による表皮水疱症の根治的治療を成功させるためには、移植細胞に対する免疫寛容成立が不可欠である。マウスでは生後7日目までに投与した外来抗原に対して胸腺による中枢性免疫寛容誘導が可能なのが

知られている。今回我々は、生直後、3日目、4日目の3回に分けて、マウス顔面静脈より GFPトランスジェニック骨髄細胞を移植し、免疫寛容誘導と共に、1%を超える高い骨髄細胞キメラ率を得ることに成功した。さらに骨髄細胞移植を繰り返すことにより、より高いキメラ率を得ることが可能であると予想される。

一方VII型コラーゲンノックアウトマウスは生後数日以内に死亡するため、生後に骨髄細胞移植をすることは困難である。そこで我々は、胎仔循環系骨髄細胞移植によりVII型コラーゲンノックアウトマウスの生存率を向上させ、少なくとも生後3週間までの生存を得ることを確認している。胎仔循環骨髄移植と生後骨髄移植を組み合わせることにより、表皮水疱症マウスに対するより効果的な骨髄細胞移植治療が可能になると期待する。

一方ヒト表皮水疱症に対する他家骨髄細胞移植を考慮すると、他家細胞に対する免疫寛容誘導には免疫抑制剤の使用が不可避であり、2次感染の可能性を考えると広範囲の皮膚潰瘍が多発する重症例に対する施行は極めて困難である。しかし、ヒト胎児循環系にあらかじめ他家骨髄細胞移植を施行して移植細胞に対する免疫寛容を誘導すれば、出生後に施行する他家骨髄細胞移植における免疫抑制剤の使用を回避でき、安全かつ効率の良い骨髄細胞移植治療が可能になると期待される。

今後、胎仔循環骨髄細胞移植と出生後骨髄細胞移植の組み合わせ移植をVII型コラーゲンノックアウトマウスに施行し、有効性及び安全性を確認する予定である。

E. 結論

表皮水疱症の骨髄細胞治療開発に向けて、出生後の顔面骨髄細胞移植法を検討し、移植細胞に対する免疫寛容誘導と骨髄内生着率向上が得られることが確認された。

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. Nimura, K., Ura, K., Shiratori, H., Schwartz, R., Ikawa, M., Okabe, M. and Kaneda, Y. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 460, 287-291, 2009.

学会発表

1. Chino, T., Tamai, K., Yamazaki, T., Kaneda, Y. Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin disease by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. 第15回日本遺伝子治療学会 2009年7月11日（大阪）

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む） 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

ヒト表皮角化細胞におけるオートファジーのマーカであるLC3の分化特異的な発現と
その局在 -形態学的検討-

研究分担者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（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。オートファジーと皮膚との関連についてはいまだ報告が少ない。今回我々はヒト表皮角化細胞におけるオートファジーのマーカであるLC3の分化特異的な発現とその局在を形態学的に解析した。BCIEをはじめとする角化異常症との関連を引き続き解析する。

共同研究者

春名 邦隆、須賀 康 順天堂大学
浦安病院皮膚科
高木 敦、込山 悦子 順天堂大学
医学部皮膚科

進むとともに増加することを確認した(図2)。つぎに正常ヒト表皮を電顕にて解析した。顆粒層において Autophagic vacuole、およびオートファゴゾーム様構造物を確認した(図3)。

A. 研究目的

前述のごとく、細胞内のタンパク質の生成と分解、特に分解過程の一部は、オートファジーによって制御されており、近年プログラム細胞死やハンチントン病などの神経変性疾患、癌抑制作用に関与していることが報告されている。表皮細胞の角化過程、角化異常症とも関連している可能性を形態学的に検討した。

B. 研究方法

培養ヒト表皮角化細胞、正常ヒト表皮を用いて Autophagic vacuoles を形態学的に解析し、表皮細胞の角化過程との関連について検討した。

C. 研究結果

培養ヒト表皮角化細胞を電顕にて解析した。カルシウムスイッチ後 Day3, Day7 と角化が進むにつれて類円形の Autophagic vacuoles の増加および肥大化が確認できた(図1)。また、Autophagic vacuoles をカウントし、Dayが

D. 考察

ヒト表皮細胞の角化過程とオートファジーの関連についてはこれまでに報告がない。今回の研究からオートファジーと正常表皮角化細胞の角化との関連が形態学的解析からも示唆された。

E. 結論

オートファジーと表皮、特に表皮角化細胞の角化過程にオートファジーが関連することを初めて報告した。

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. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Vu AT, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal

- lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123:179-86
2. Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39:228-35
 3. Ng W, Nishiyama C, Mizoguchi M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Human umbilical cord epithelial cells express Notch ligands Delta1 and Jagged1. *J Dermatol Sci*. 2009; 54:131-4.
 4. Ng W, Ikeda S: Mount Tsukuba and the origin of tacrolimus. *Arch Dermatol*, 2009; 145:284.
 5. Hasegawa T, Masukura T, Hirasawa Y, Otsuki A, tsuchihashi T, Niwa Y, Okuma Y, Ogawa H, Ikeda S: Acne conglobata successfully treated by fractional laser after CO2 laser abrasion of cysts combined with topical tretinoin. *J Dermatol*, 2009; 36:118-119.
 6. Amagai M, Ikeda S, Shimuzu H (他26名): A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*, 2009; 60: 595-603.
 7. Funakushi N, Mayuzumi N, Sugimura R, Ikeda S: Epidermolytic palmoplantar keratoderma with constriction bands on bilateral fifth toes. *Arch Dermatol*, 2009; 145: 609-610.
 8. Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan P, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H: Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J Dermatol Sci*, 2009; 56:37-42.
 9. Fukai T, Nishiyama C, Kanada S, Nakano N, Hara N, Tokura T, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K: Involvement of PU.1 in the transcriptional regulation of TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 388:102-106.
- 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

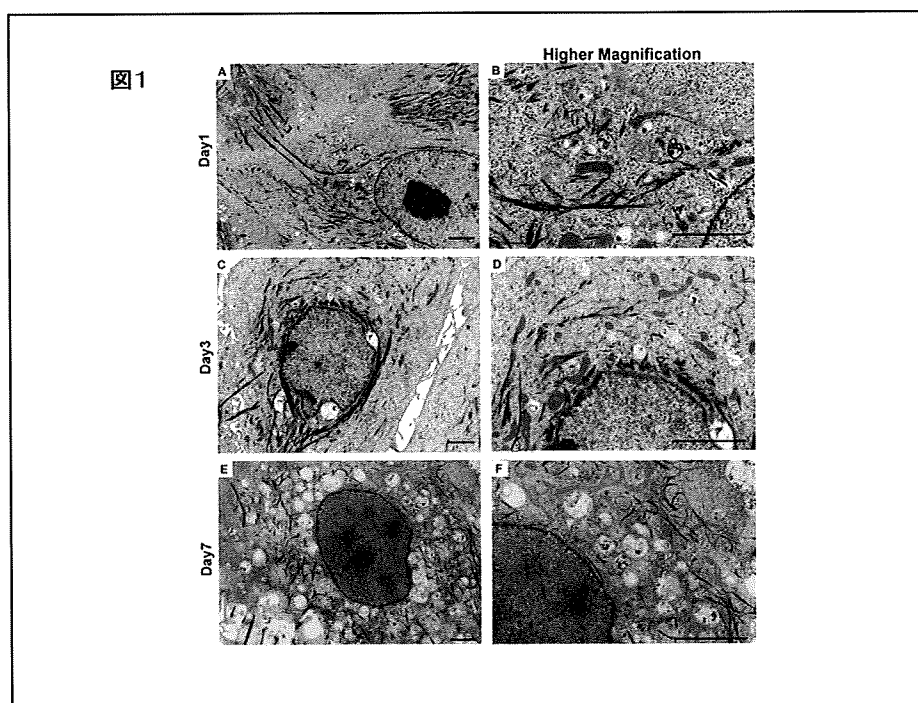


図1. 正常ヒト表皮において、Dayが進むとともに Autophagic vacuoles の増加を認める。

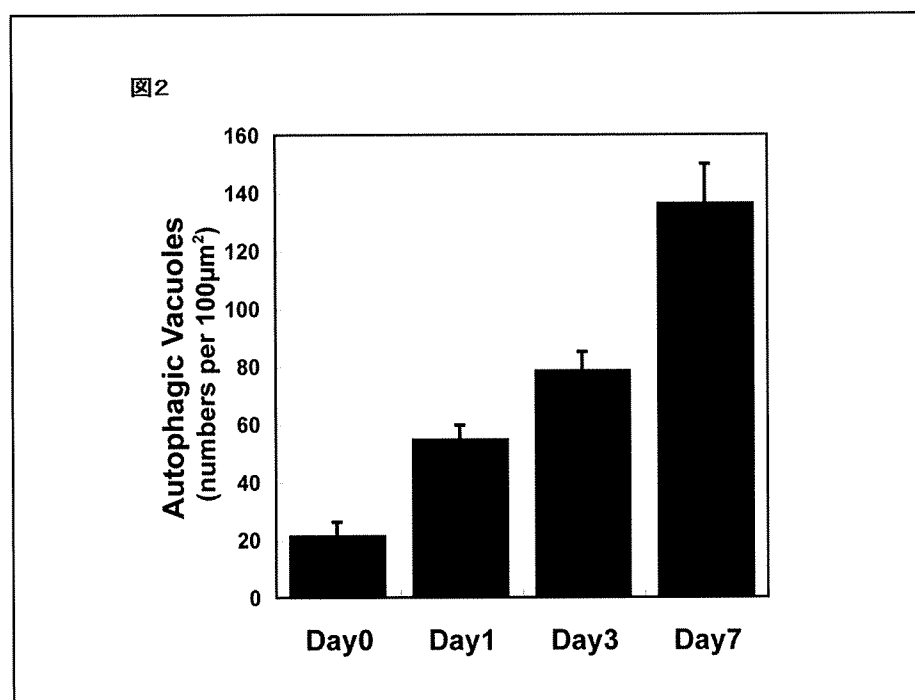


図2. Autophagic vacuoles の増加。

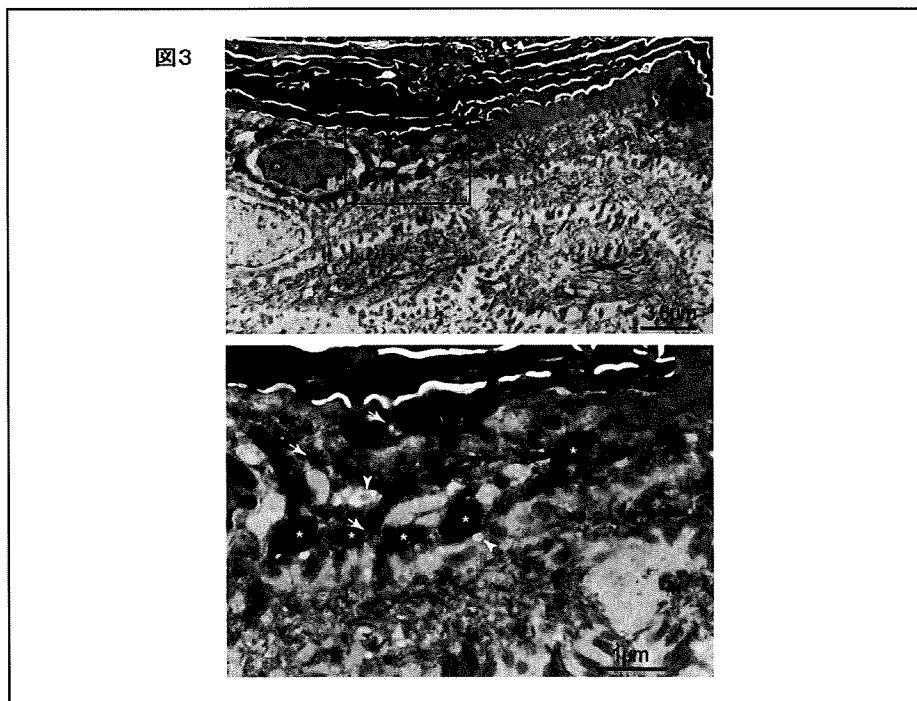


図3. 正常ヒト表皮において、顆粒層で Autophagic vacuoles を認める。

星印： ケラトヒアリン顆粒

矢印： オートファゴゾーム様構造物

矢頭： Autophagic vacuoles

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

ヒト表皮角化細胞におけるオートファジーのマーカーであるLC3の分化特異的な発現と
その局在 - 生化学的検討 -

研究分担者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（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。オートファジーと皮膚との関連についてはいまだ報告が少ない。今回我々はヒト表皮角化細胞におけるオートファジーのマーカーであるLC3の分化特異的な発現とその局在を生化学的に解析した。BCIEをはじめとする角化異常症との関連が示唆された。

共同研究者

春名 邦隆、須賀 康 順天堂大学
浦安病院皮膚科
高木 敦、込山 悦子 順天堂大学
医学部皮膚科

A. 研究目的

細胞内のタンパク質は常に生成と分解を繰り返している。特に分解過程は、細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防ぐ目的や、過剰にタンパク質が合成された場合や栄養環境が悪化した場合にタンパク質のリサイクルを行い、生体の恒常性維持に常に参与している。

このような細胞内タンパク質分解機構のひとつであるオートファジーが近年、プログラム細胞死やハンチントン病などの神経変性疾患、癌抑制作用に関与していることが報告されたことから、表皮細胞の角化過程、角化異常症とも関連している可能性を検討した。

B. 研究方法

培養ヒト表皮角化細胞、正常ヒト表皮、ヒト乾癬患者の表皮を用いてLC3の発現を生化学的に解析し、表皮細胞の角化過程との角化異常症（乾癬）との関連について検討した。

C. 研究結果

オートファジーが機能しているマーカーとなるLC3タンパクを、抗LC3抗体を用いてWestern blot法にて培養ヒト表皮角化細胞で同定した（図1）。すなわち、未分化な表皮細胞ではsoluble cytozolic formであるLC3-Iがmembrane-bound formと比較して発現が低値であったが、カルシウム添加により分化させた表皮細胞内では経時的にLC3-IIの発現が上昇しており、特に角化マーカーの発現が最大となるカルシウム添加7日目でLC3-IIも最大となった。次に抗LC3抗体を用いて免疫染色を行った。Day7ではDay0と比べLC3が増加していることが確認できた（図2）。

次に正常ヒト表皮の免疫組織染色においてLC3タンパクが顆粒層に一致して局在することがわかった（図3）。オートファジーが顆粒層において様々なオルガネラの分解や表皮細胞の脱核（プログラム細胞死）と関連していることを示唆していた。

一方、角化過程の異常により、インボルクリンを始めとした細胞内タンパクの分解や表皮細胞の脱核が阻害されることが知られている角化異常症（乾癬）においては、LC3の顆粒層における局在は著明に減少していた（図4）。

D. 考 察

ヒト表皮細胞の角化過程とオートファジーの関連についてはこれまでに報告がない。今回の研究からオートファジーと正常表皮角化細胞の角化との関連が生化学的解析により示唆された。また乾癬ではオートファジーが減弱しており、角化異常とオートファジーの機能不全の関連が示唆された。

E. 結 論

オートファジーと表皮、特に表皮角化細胞の角化過程にオートファジーが関連することを初めて報告した。

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. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Vu AT, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:179-86
2. Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:228-35
3. Ng W, Nishiyama C, Mizoguchi M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Human umbilical cord epithelial cells express Notch ligands Delta1 and Jagged1. *J Dermatol Sci*. 2009;54:131-4.
4. Ng W, Ikeda S: Mount Tsukuba and the origin of tacrolimus. *Arch Dermatol*, 2009;145:284.

5. Hasegawa T, Masukura T, Hirasawa Y, Otsuki A, Tsuchihashi T, Niwa Y, Okuma Y, Ogawa H, Ikeda S: Acne conglobata successfully treated by fractional laser after CO2 laser abrasion of cysts combined with topical tretinoin. *J Dermatol*, 2009;36:118-119.
6. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H (他26名): A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*, 2009;60:595-603.
7. Funakushi N, Mayuzumi N, Sugimura R, Ikeda S: Epidermolytic palmoplantar keratoderma with constriction bands on bilateral fifth toes. *Arch Dermatol*, 2009;145:609-610.
8. Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan P, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H: Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J Dermatol Sci*, 2009;56:37-42.
9. Fukai T, Nishiyama C, Kanada S, Nakano N, Hara N, Tokura T, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K: Involvement of PU.1 in the transcriptional regulation of TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun*, 2009;388:102-106.

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

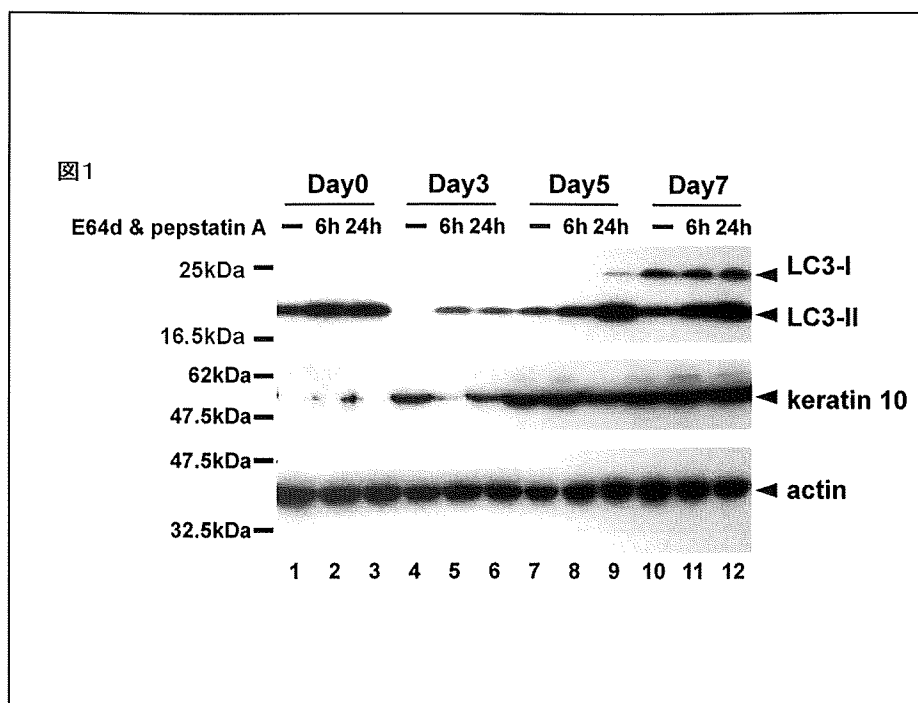


図1. 培養ヒト表皮角化細胞において、角化とともにLC3- IIの発現の増加を認める。

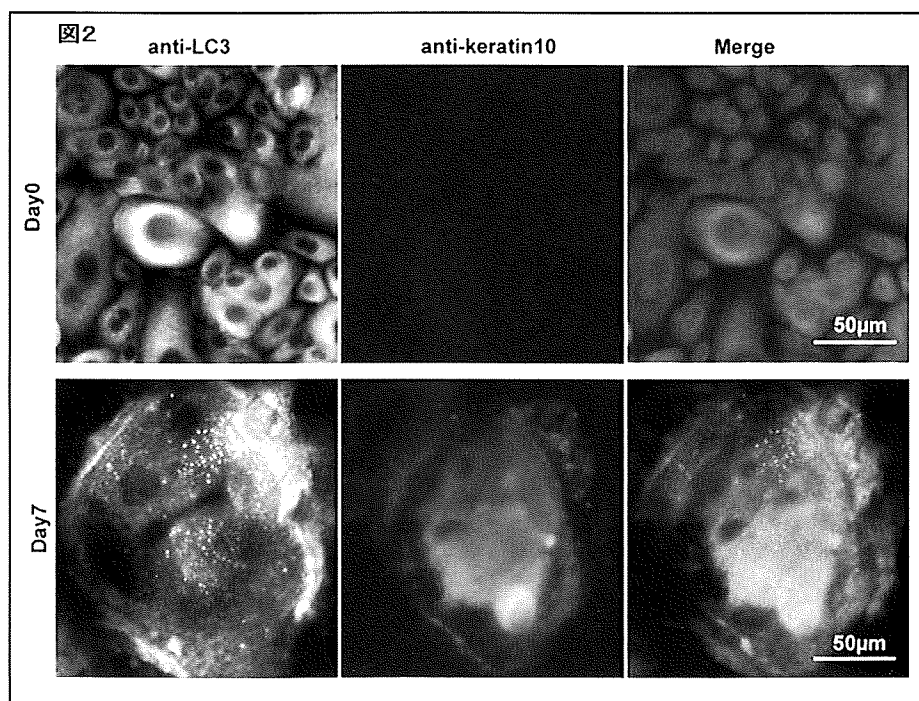


図2. 培養ヒト表皮角化細胞において、Day7ではLC3の強い発現を認める。

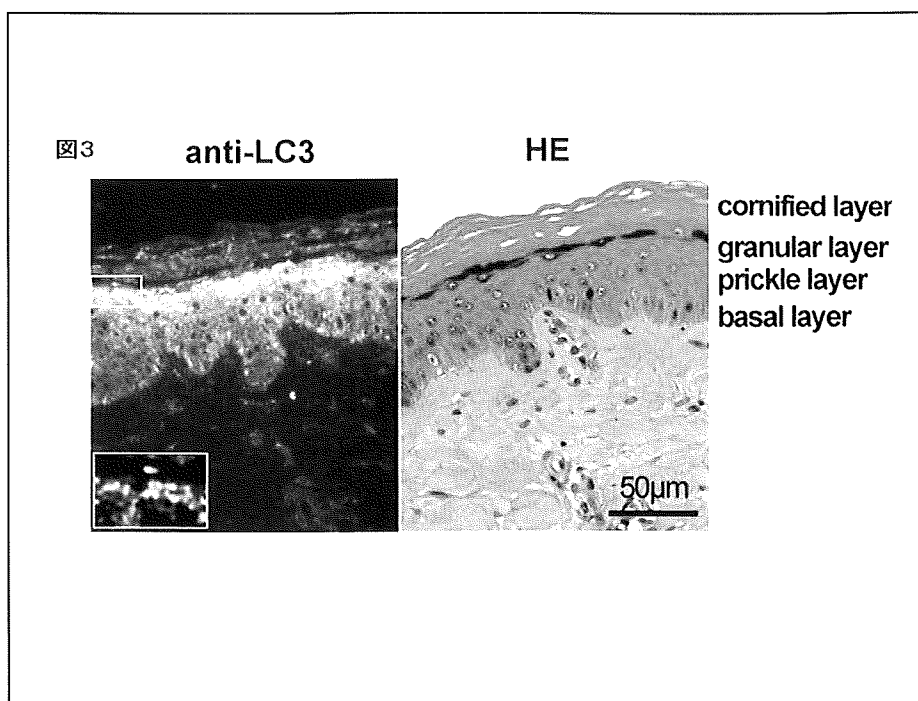


図3. 正常ヒト表皮において、顆粒層でLC3の強い発現を認める

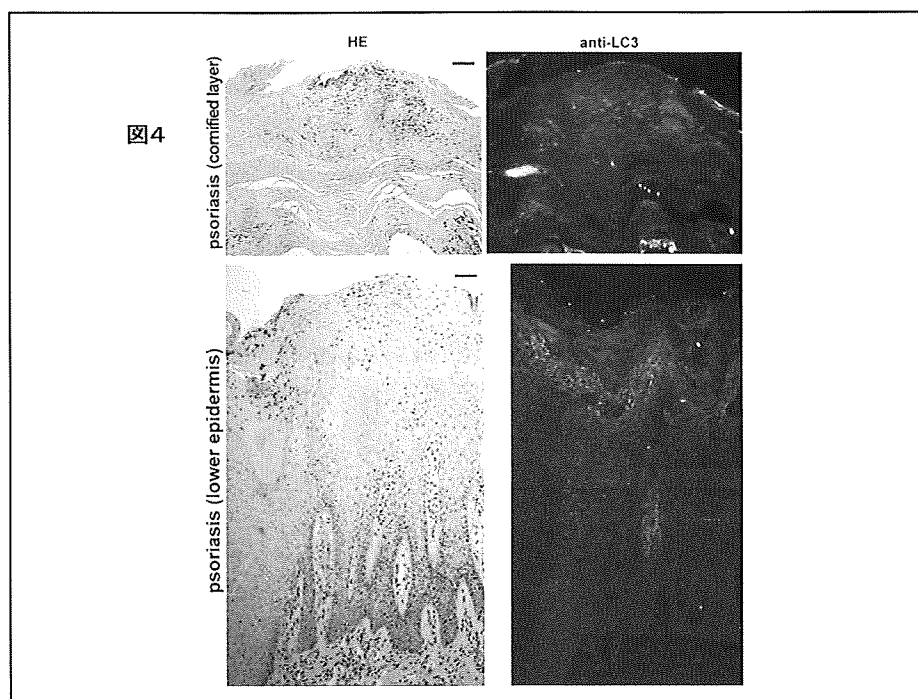


図4. ヒト乾癬患者の表皮において、正常ヒト表皮と比べてLC3発現の減弱を認める。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

角層細胞間接着構造の変化の免疫電顕的検討

研究分担者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学講座 准教授

研究要旨 先天性魚鱗癬様紅皮症（CIE）においては角層が著しく肥厚している。角層肥厚の機序を知るためには、まず正常の角層剥離機構の解明が必須である。角層の細胞間同志の接着構造はコルネオデスマゾームであり、この分解により角層は剥離する。コルネオデスマゾーム分解過程を明らかにするために、その主たる細胞外成分であるコルネオデスマシン（CDSN）とデスマグレイン1（DSG1）の局在を免疫電顕法を用いて角層の最深部5層について検討した。CDSN、DSG1の標識はともに2層目の上面中央部分から減少しはじめた。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。コルネオデスマゾームの分解過程は辺縁部分と中央部分で明らかに異なることが分かり、その複雑な制御機構が示唆された。

共同研究者

岸部 麻里 旭川医科大学皮膚科学講座

井川 哲子 旭川医科大学皮膚科学講座

A. 研究目的

先天性魚鱗癬様紅皮症（CIE）は極めて重篤な角化異常症であり、患者皮膚は著しい角質肥厚を呈し、精神的、社会的ハンディキャップが大きい。本研究は有効な治療法の開発のため、CIEの異常な角質形成機序を解明することが目的である。そのためにまず正常の角層剥離機序を明らかにする。

B. 研究方法

正常ヒト背部の皮膚を凍結固定、凍結置換し、Lowicryl HM20樹脂に包埋したものを薄切し、免疫電顕用の標本とした。用いた1次抗体はCDSNの中央部分に対するラビットポリクローナル抗体(Descargues et al.,2005) および、DSG1の細胞外ドメインに対するマウスモノクローナル抗体(Dsg-1-P23, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) である。2次抗体は5-nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)、および5-nm gold-con-

jugated goat anti-mouse IgG (Amersham Bioscience) である。

免疫電顕写真は倍率20,000倍で撮影し、モニタージュ写真を合成した。角層細胞の最深部の1層目から5層目までの細胞のうち、切片上の細胞の幅が10 μ m以上の細胞を解析対象とした。それぞれの細胞の表面を上下にわけ、それをさらに中央2分の1と辺縁2分の1にわけて、各領域におけるコルネオデスマゾーム上の免疫標識の密度を計測した(図1,2)。各層あたり、6ないし7個の細胞を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト皮膚を用いた研究は旭川医大倫理委員会の承認のもとに行われた。

C. 研究結果

CDSNの標識は2層目の上面中央部分から減少しはじめた(図1)。DSG1の標識も2層目の上面中央部分から減少しはじめた(図2)。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。

D. 考 察

今回解析した二つのコルネオデスモゾーム成分の分布密度は、ともに角層2層目の上面中央から急速に減少していき、辺縁では密度の減少はゆるやかであった。

今回の解析では電顕標本上の断面が幅 $10\mu\text{m}$ 以上の細胞を対象としたが、今後はさらに対象を幅 $20\mu\text{m}$ 以上の細胞にしぼって、より細胞の中央断面の状態を明らかにしていく予定である。

E. 結 論

コルネオデスモソームの分解過程は辺縁部分と中央部分で明らかに異なり、その複雑な制御機構が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Tolar J, Ishida-Yamamoto A, Riddle M, McElmurry RT, Osborn M, Xia L, Lund T, Slattery C, Uitto J, Christiano AM, Wagner JE, Blazar BR. Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood*. 113;1167-1174, 2009
2. Ishida-Yamamoto A. Inherited Keratinocyte Diseases (Ichthyosis and Related Disorders), *Therapy of Skin Diseases*, Krieger T, Bickers DR, Miyachi Y, ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp561-573, 2010
3. 山本明美 遺伝性掌蹠角化症. 皮膚疾患診療実践ガイド、第2版、文光堂、東京、pp488-491, 2009
4. 山本明美 先天性魚鱗癬様紅皮症. 皮膚疾患診療実践ガイド、第2版、文光堂、東京、pp 487-488, 2009
5. 山本明美 ロリクリン角皮症. *Visual Dermatology* 8 (11) 1188-1189, 2009

6. 山本明美 魚鱗癬・先天性魚鱗癬様紅皮症. *からだの科学* 262: 60-63, 2009
7. 山本明美. 水疱型・非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床病型と本邦におけるガイドライン作成状況. *日皮会誌* 119;2517-2518, 2009

学会発表

1. Ishida-Yamamoto A. The Japanese experience on ichthyosis ultrastructure. *Ichthyosis Consensus Conference*. Soreze, France. 2009, 1, 23-24,
2. 山本明美. 水疱型・非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床病型と本邦におけるガイドライン作成状況. 第108回日本皮膚科学会総会 教育講演4 遺伝性水疱症・遺伝性角化症. 福岡国際会議場、福岡市2009, 4, 24
3. A Ishida-Yamamoto, S Igawa, M Kishibe, Hajime Iizuka. Corneodesmosin-degradation occurs from the upper central surface area of cornified cells. *36th Society for Cutaneous Ultrastructure Research*. Florence, Italy 2009, 6, 11-13
4. A Ishida-Yamamoto. A new model for sorting out ichthyosis. *The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists*. Sapporo, Japan 2009, 7, 10
5. A Ishida-Yamamoto. Lamellar body trafficking in the epidermal barrier and disease. *Gordon Research Conferences, Barrier Function of Mammalian Skin, Molecular, Biophysical & Biomechanical Understanding of Skin Barrier Formation, Function & Disease*. Waterville Valley, NH, USA. 2009, 8, 9-14
6. 山本明美、岸部麻里. わかりやすくなった角化異常の機序と形態変化の関