

[III]

分 担 研 究 報 告

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

膿疱性乾癬の生体試料収集

研究分担者 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
研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 稀少難治性皮膚疾患克服のための生体試料収集に関する研究班では6疾患（膿疱性乾癬、表皮水疱症、先天性魚鱗癬様紅皮症、神経線維腫症Ⅰ・Ⅱ、色素性乾皮症、結節性硬化症）を研究対象として生体試料の収集を行う。我々は膿疱性乾癬の生体試料収集と臨床情報の実施方法を初年度の研究目標として取り組んだ。臨床情報に関しては稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班と協力してwebサイトからの入力画面の患者情報共有について検討した。生体試料収集では乾癬（膿疱性乾癬、関節症性乾癬、尋常性乾癬）患者血清保存検体を倫理委員会の承認を得て収集してゆく予定である。

研究協力者

大野貴司 岡山大学 皮膚科

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

A. 研究目的

膿疱性乾癬は全身の膿疱、紅斑、発熱など全身症状を伴う乾癬の1型であり、稀少難治性皮膚疾患調査対象疾患である。患者生体試料（DNA、血清など）を収集し保管、臨床症状データと研究者間で共有することは、本疾患の病態解明、新規治療薬の開発の為に重要である。今回生体試料収集研究班の研究として膿疱性乾癬の生体試料収集、データ収集の具体的方法に関して検討を行った。

B. 研究方法

1. 血清の収集と保管

乾癬患者（尋常性、膿疱性、関節症性）外来採血時に同意を得て一般採血の際に血清を保存する。

2. DNA の収集と保管

一般採血時にDNA採取用に5ミリリットル程度の血液を同時に採血しDNA抽出後保管する。

3. 臨床データの保存

膿疱性乾癬に関しては稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班の前向き症例登録調査が行われており、同様の方法で臨床データの収集を検討する。

C. 研究結果

1. 血清試料に関しては倫理委員会の承諾後、患者同意が得られれば血清収集は可能である。教室では他の研究の為に乾癬患者血清を収集した実績があり、今後

本研究に向けて準備を進めていく予定である。

2. 膿疱性乾癬登録画面はすでに稼動しており、今後同様のシステムにより患者データの管理を行う。

3. 遺伝子の収集

血清の収集と同様に患者同意、倫理委員会承認を経て遺伝子の保管を行う。今後保管場所、経費の支出などについても検討してゆく。

E. 結論

稀少難治性皮膚疾患のうち、膿疱性乾癬における生体試料の収集に関する方向性を検討した。

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. 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* 161: 115-120, 2009.
3. Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y: Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infectious Diseases* 200: 1078-1087, 2009.
4. Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Nakamura S, Kameoka J, Kojima H, Abe M, Kinoshita T, Yoshino T, Iwatsuki K, Kagami Y, Tsuzuki T, Kurokawa M, Ito K, Kawa K, Oshimi K for the NK-cell Tumor Study Group: Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms: aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. *Annals of Oncology*, Epub, 2009.
5. Tanaka N, Dainichi T, Ohya B, Yasumoto S, Oono T, Iwatsuki K, Elfert S, Fritsch A, Brunckner-Tuderman L, Hashimoto T: A case of epidermolysis bullosa acquisita with clinical features of Brunsting-Perry pemphigoid showing an excellent response to colchicine. *J Am Acad Dermatol* 61:715-719, 2009.
6. Senoh A, Tokuyama Y, Nakayama Y, Fujii K, Iwatsuki K: Erythema multiforme-like contact reaction due to liquid-formulated 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide: involvement of cytotoxic. *Clin Exp Dermatol* 34:e732-736, 2009.
7. Sugiyama-Fukamatsu H, Suzuki N, Nakanishi G, Iwatsuki K: Epidermolysis bullosa nevus arising in a patient with Dowling-Meara type epidermolysis bullosa simplex with a novel K5 mutation. *J Dermatol* 36: 447-452, 2009.
8. Nakanishi G, Fujii K, Asagoe K, Iwatsuki K: Human papillomavirus genome

integration in multifocal vulvar Bowen's disease and squamous cell carcinoma. Clin Exp Dermatol 34:e965-967, 2009.

9. 岩月啓氏, 照井 正, 小澤 明, 小宮根真弓, 梅澤慶紀, 中西 元, 原 弘之, 馬淵智生, 青山裕美, 北島康雄. 膿疱性乾癬(汎発型) 診療ガイドライン 2009 年度版.
http://www.dermatol.or.jp/medical/guideline/pdf/nouhou_kansen.pdf
簡易版日皮会誌掲載予定

学会発表

1. Iwatsuki K.: Internaional Society for Cutaneous Lymphomas Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., March 5, 2009.
2. Iwatsuki K.: Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus-associated NK/T lymphoproliferative disorders: Cellular and molecular events. (Symposia) The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, Sapporo, Japan, July 10-12, 2009.
3. Iwatsuki K: Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus infections. 35th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association, Taipei, Taiwan, November 21-22, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし.

引用文献

1. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of

Jun proteins. Nature 2005;437:369-75.

2. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. Phagocyte-specific S100 proteins: A novel group of proinflammatory molecules. Trends Immunol 2003;24:155-8.
3. Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonogawa H, Katagiri C, Hibino T, et al. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. J Cell Biochem 2008;104:453-64.
4. Benoit S, Toksoy A, Ahlmann M, Schmidt M, Sunderkotter C, Foell D, et al. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. Br J Dermatol 2006;155:62-6.

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

研究分担者 石河 晃 慶應義塾大学医学部皮膚科 准教授
研究分担者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科皮膚科学 教授

研究要旨 未だ治療方法が確立されていない表皮水疱症につき病型別遺伝的背景を明確にするため、試料収集の準備を進めた。倫理面への配慮を進めるとともに収集可能な検体につき情報提供を北海道大学並びに慶應大学より行い、26例の候補症例を渉猟した。不足している Dowling-Meara 型も症例があり、組み込める可能性があり、倫理面がクリアされればほぼ目標通りの生体資料収集が可能な見込みである。

研究協力者
伊藤 圭
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学 助教

A. 研究目的

表皮水疱症は原因遺伝子は同定されているものの、個々の症例においては必ずしも遺伝子変異が検出されないものがあり、遺伝子型・表現型相関も全てが解明されたわけではない。また、治療法もまだ確立されていない。病型別遺伝的背景をより明確にし、今後の遺伝子治療へ向けての整備をするために生体試料を収集する。

B. 研究方法

まずは、表皮水疱症遺伝子解析を行っている施設のうち北海道大学と慶應大学の症例について、今後の研究のための資料提供となりうる症例を合計 26 例抜き出し、その病型と遺伝子解析状況を調査し、集計した。

（倫理面への配慮）

実際に資料提供をするとなると倫理面への配慮は不可欠である。現在、研究代表者により統一した倫理審査申請の体制を整備中である。

表 1

患者ID	病型	小病型	検索結果
AK11M	FBS	Weber-Cockayne 型	KRT14 確定
HT25F	EBS	筋ジストロフィー合併型	PLEC1 確定
ET0F	JEB	Herlitz 型	検索中
MT0F	JEB	幽門閉鎖症合併型	検索中
YA0F	JEB	幽門閉鎖症合併型	ITGB4 確定
YA0M	DEB	HS	COL7A1 確定
HS40F	DEB	nHS	検索中
MS0F	DEB	nHS	検索中
JF0M	DEB	不明	COL7A1 確定
CS11M	DEB	優性型	COL7A1 確定
SH0F	DEB	nHS	COL7A1 確定
HY40M	kindler	kindler	KIND1 確定
HK0M	DEB	nHS	検索中
MM0F	EBS	Koebner	検索中
ME59M	DEB	優性型	検索中
KY1M	DEB	未確定	検索中
JH42F	DEB	nHS	COL7A1 確定
EN6M	EBS	Weber-Cockayne 型	KRT5 確定
TK0M	DEB	nHS	COL7A1 確定
NY36F	DEB	nHS	COL7A1 確定
SH29M	JEB	幽門閉鎖症合併型	ITGB4 確定
KI0M	DEB	nHS	COL7A1 確定
KK21F	EBS	Weber-Cockayne 型	KRT5 確定
KD1M	EBS	Weber-Cockayne 型	KRT5 確定
KY0M	DEB	nHS	COL7A1 確定
AS0F	DEB	nHS	COL7A1 確定

C. 研究結果

北大症例 12 例と慶大症例 14 例の集積状況を表 1 に示す。(上段：北大、下段：慶大)

また、病型別に集計したものを表 2 に示す。

表 2

EBS	Weber-Cockayne 型	4
	Koebner	1
	筋ジストロフィー合併型	1
JEB	Herlitz 型	1
	幽門閉鎖症合併型	3
DEB	優性型	2
	HS	1
	nHS	10
	未確定	2
Kindler		1

D. 考察

現時点では倫理審査が未承認であるため、あくまで、これらの検体が候補となる、ということである。今後の倫理審査の進行とともに必要な手続きをとることとする。また、EBS-DM型の検体がないが、北大に2例、慶大に1例症例があり、今後遺伝子解析される方向性にある。JEB-non Herlitz型の検体が無く、今後、症例があった際には登録するよう努力する。

E. 結論

今回北大と慶大の2施設からの情報提供により、表皮水疱症の検体収集は十分可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: 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.* 2009 Sep;129(9):2288-95.

2: Ito K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Nishie W, Sakai K, Natsuga K, Shinkuma S, Shibaki A, Uitto J, Denton CP, Nakajima O, Akiyama M, Shimizu H. Keratinocyte-/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human COL7A1 mutation. *Am J Pathol.* 2009 Dec;175(6):2508-17.

3: Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Shimizu H. Animal models of epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin.* 2010 Jan;28(1):137-42.

4: 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

5: Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Satoru S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Daisuke S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mut.* in press

6: Shinkuma S, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H. Epidermolysis bullosa in Japan. *Dermatol Clin.* in press

2. 学会発表

1. Ken Natsuga, Wataru Nishie, Satoru Shinkuma,

Masashi Akiyama, Hideki Nakamura, Akari
Nagasaki, Cristina Has, Takeshi Ouchi, Akira
Ishiko, Yoshiaki Hirako, Katsushi Owaribe,
Daisuke Sawamura, Leena Bruckner-Tuderman and
Hiroshi Shimizu: **Plectin expression in**
epidermolysis bullosa simplex (EBS) with
muscular dystrophy vs. in EBS with pyloric
atresia. The 39th annual meetin of the European
Society of Dermatological Research, Budapest,
2009.9.9-12

2. 中村利彦、吉岡寿朗：単純型表皮水疱症
(Dowling-Meara型)の早産一卵性双胎児例
第54回日本未熟児新生児学会2009. 10. 20

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含
む)
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

先天性魚鱗癬様紅皮症 (CIE) の試料収集

研究分担者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 CIEには水疱型、非水疱型、葉状魚鱗癬、道化師様魚鱗癬、魚鱗癬症候群が含まれる。ケラチン1、ケラチン10またはケラチン2eの変異により生じる水疱型については、以前全国調査が行われたが、残りのものについては行われていない。この度は、残りのものについて全国調査を行うべく、診断書と調査票を作成した。本年度に収集した水疱型のDNAに加え、今後DNAを中心とした資料を集積する予定である。

共同研究者

高木 敦

順天堂大学医学部皮膚科

黒沢美智子

順天堂大学医学部衛生学

山本明美

旭川医科大学皮膚科

小宮根真弓

自治医科大学皮膚科

橋本 隆

久留米大学医学部皮膚科

清水 宏

北海道大学医学部皮膚科

山西清文

兵庫医科大学皮膚科

武藤正彦

山口大学医学部皮膚科・班長

R type (ALOX 12B), arachidonate lipoyxygenase 3 (ALOXE3), CYP4F22などが報告されている。CIEには、水疱を伴う群(水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症)、水疱を伴わない群(非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症)、紅斑が無く大型の鱗屑を生じる群(葉状魚鱗癬)、よろい状の非常に硬い皮膚をもつ群(道化師様魚鱗癬)、皮膚以外の症状を持つ群(魚鱗癬症候群)がある。

本研究班で以前行った水疱型の全国疫学調査により、本邦では55人(95%信頼区間35-75人)の患者が、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、② K1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

A. 研究目的

CIEは表皮角化細胞の細胞骨格、角化細胞の細胞膜とその内側の裏打ち構造あるいは角質細胞間脂質構造に関与している、多くのタンパク質の遺伝子の異常(変異)により生じる。それらのタンパク質として、ケラチン1、ケラチン10、ケラチン2e、transglutaminase 1, ATP-binding cassette subfamily A member 12 (ABCA12), ichthyin, arachidonate 12-lipoyxygenase

genotype-phenotype 関係があることが示された。

今回は、残りの病型の全国調査を行うべく、診断書と調査票を作成した。今後全国調査の施行ならびに血液サンプルなどを収集する。これらに加え、本年度に採取した水疱型の DNA サンプルを検討する（一昨年度に本学倫理委員会の承諾を得た研究）。

B. 資料 1、2 参考

C. 今後の方針

2009 年末に一次調査、2010 年早々に 2 次調査を行う。

D. 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、pp192-198, 2005.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表 (平成 21 年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamiyo 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 ummunoglobulin 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.

邦文論文

なし

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

(資料1)

非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (Non-Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma, NBCIE) 診断の手引き (平成20年7月)

(厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業、稀少難治性皮膚疾患に関する研究班版)

1) 概念

常染色体劣性遺伝性疾患。出生時から全身の皮膚にびまん性の潮紅と鱗屑を認める。眼瞼外反、掌蹠角化、指趾拘縮を来すことがある。組織学的には、角質増殖や不全角化が見られる。Transglutaminase 1, ichthyin, arachidonate 12-lipoxygenase R type (ALOX12B), arachidonate lipoxygenase 3 (ALOXE3), ATP-binding cassette subfamily A member 12 (ABCA12), CYP4F22 などの変異が報告されている。

2) 診断の手引き

- a) 生下時にはしばしばコロジオン児の状態を呈する
- b) 生下時より生じる全身性びまん性潮紅
- c) 生後まもなく皮膚は乾燥し、眼瞼外反・口唇の突出開口などを生じる
- d) 鱗屑は全身にみられる。
- e) 掌蹠の角化、亀裂、手指拘縮がみられることがある
- f) 組織学的には、光顕では著明な過角化を認め、不全角化がみられる例もある。

3) 亜型ないし近縁疾患

①葉状魚鱗癬

全身の潮紅は明らかでなく、粗大・暗褐色・板状の鱗屑を伴う

②道化師様魚鱗癬

出生時には全身が厚い板状の角質に覆われ、重篤な眼瞼外反、口唇突出開口、耳介変形が見られる。

4) 鑑別診断—以下の疾患を除外出来ること。

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、魚鱗癬症候群、
紅斑角皮症

5) 診断

2) の診断の手引きの b) d) f) を満たし、かつ 4) の疾患を除外出来るものを NBCIE と診断する。その後亜型ないし近縁疾患は、3) の項目につき診断する。

重症先天性魚鱗癬を伴う魚鱗癬症候群一覧（平成20年7月）

（厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業、稀少難治性皮膚疾患に関する研究班版）

1) Netherton 症候群

- a) 曲折線状魚鱗癬または魚鱗癬様紅皮症様の皮疹
- b) 結節性裂毛
- c) アトピー素因

2) Sjogren-Larsson 症候群

- a) 先天性魚鱗癬
- b) 四肢痙性麻痺
- c) 精神遅滞

3) Rud 症候群

- a) 先天性魚鱗癬
- b) てんかん
- c) 精神遅滞
- d) 性腺機能低下
- e) その他

4) Refsum 症候群

- a) 魚鱗癬
- b) 色素性網膜炎
- c) 末梢神経炎
- d) 小脳失調
- e) その他

5) KID 症候群

- a) 乳頭腫状角化（顔面、頭部、掌蹠、肘膝）
- b) 聴覚障害
- c) 角膜炎

6) Dorfman-Chanarin 症候群

- a) 魚鱗癬
- b) 血球、肝、筋肉、眼、耳、中枢神経などへの neutral lipid 沈着
- c) 肝障害
- d) 精神発達障害

7) その他

(資料2)

非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、魚鱗癬症候群

有病者数全国一次調査用紙

記載医師御氏名 _____

記載年月日 2010年__月__日

非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症	1.なし	2.あり 男__例 女__例
葉状魚鱗癬	1.なし	2.あり 男__例 女__例
道化師様魚鱗癬	1.なし	2.あり 男__例 女__例
魚鱗癬症候群	1.なし	2.あり(疾患名:) 男__例 女__例
その他	1.なし	2.あり(疾患名:) 男__例 女__例

記入上の注意事項

1. 2005年～09年の5年間(05年1月1日～2009年12月31日)に貴診療科を受診した上記疾患の患者数につき、診断手引きを参考にご記入ください。
2. 全国有病患者数の推計を行いますので、該当する患者のない場合でも「1.なし」に○をつけ、御返送下さい。
3. 後日第二次調査を行う予定しております。御協力戴ければ幸いです。
4. 御住所、貴施設名、貴診療科名等に誤りが御座いましたら、御手数ですが御訂正を御願い致します。

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

神経線維腫症

研究分担者 大塚 藤男 筑波大学大学院人間総合科学研究科
皮膚病態医学分野 教授

研究要旨 神経線維腫症 1 型 (NF-1) はまれな常染色体優性遺伝疾患であり、全身に多発する神経線維腫 (NF) や神経堤腫瘍が特徴である。近年遺伝子レベルでの研究が進み、その病因遺伝子が解明されたが、臨床現場での治療に反映されているとは言い難く、今後もその発生および神経線維腫増殖制御のさらなる解明が必要である。本腫瘍の増殖には遺伝子以外にホルモンや増殖因子が関与していると考えられるが、現在まで NF 増殖を促進する因子に関してはあまり検索されていない。このような背景からこの種の研究を行うにあたり、患者から得られた NF の生体試料は必要不可欠であり、その母集団が多いほど質の高い研究が可能である。そこで、将来的に NF-1 関連各種の分子生物学的研究を遂行するにあたり、その基盤整備として同意が得られた NF-1 患者から NF の生体試料（組織、培養細胞、および遺伝子解析を目的とした凍結標本）を採取し、将来的に国内の各研究者から医薬基盤研究所生物資源部難病研究資源バンクを通じて生体試料の提供依頼に対応できるように保存の整備を進めており、本年度は上記生体試料の 5 検体が保存された。

研究協力者

中村泰大

筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻皮膚病態医学分野 講師

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF-1) はカフェオレ斑、多発する皮膚神経線維腫 (NF) や中枢神経腫瘍が特徴であることは周知であるが、増殖制御因子として何らかのホルモンや成長因子が増殖の促進ないし抑制に関与すると考えられる。このような機序を解明することは NF-1 患者の quality of life の改善に

大きく寄与すると考えられる。この種の実験系において生体試料は必要不可欠であり、その数が多数であればあるほど得られたデータの信憑性は高く、いわゆる質の高い研究となる。そこで、将来的に NF-1 関連各種の分子生物学的実験を遂行するにあたり、その基盤整備として同意が得られた NF-1 患者から NF の生体試料（組織、培養細胞、および遺伝子解析を目的とした凍結標本）を採取し、将来的に医薬基盤研究所生物資源部難病研究資源バンクからの提供依頼に対応できるように保存の整備を進めることを目的とする。

B. 研究方法

生体試料の処理およびその保存

原則として、切除して得られた生体試料は半割し、半分は診断材料として HE 染色およびその他の免疫染色のために、ホルマリン固定後パラフィン包埋とする。

残り半分の生体試料の一部（5×5mm 片程度）を遺伝子解析等の研究に使用できるようマイクロチューブ内に生標本として凍結保存する。

それ以外の試料は細切してトリプシン、コラゲナーゼ処理して single cell suspension を回収してウシ血清含有メディアウム下でシャーレにて培養し、継代を 1～2 回行ったのち（図 1）、培養細胞を凍結保存する。

保存については、原則として患者のプライバシー保護のため原則として個々の試料を通し番号で名付けることとする。保存期間は保管スペース整備の関係上、現段階で正確に定めることは困難であるため、可及的長期間保存することを目標とする。

（倫理面への配慮）

患者より採取した生体試料の保存、培養細胞の樹立およびその将来的使用に関しては、「筑波大学医の倫理特別委員会」に諮り、「筑波大学附属病院における病理・細胞診標本の取り扱いに関する同意書」にて標本の研究使用の同意が得られた患者の生体試料のみ保存対象とした。

C. 研究結果

稀少疾患であるため本年度は合計 5 試料の採取・保存となった。なお神経線維腫症 2 型における発生腫瘍である神経鞘腫の生体試料採取はなかった。

D. 考察

本研究班の分科会（神経線維腫症）における生体試料の収集に関しては、主として神経線維腫症 I 型における皮膚神経線維腫、皮下蔓状神経線維腫およびさらに頻度の少ない神経線維腫症 II 型における神経鞘腫が対象となると思われる。当科での目標生体試料採取数に関しては神経線維腫症 I 型および II 型は年間を通じてそれぞれ約 10～15 例、約 1～2 例の新規患者が当科を受診するため、神経線維腫 10 例および神経鞘腫 2 例程度が妥当であると考えられる。

今後さらなる生体試料の採取保存数を増やす必要があるが、現時点で神経皮膚症候群に関する調査研究班全体としての研究計画は白紙の段階であるため、まずは当施設（筑波大学人間総合科学研究科皮膚科）において、神経線維腫および神経鞘腫の生体試料収集につき整備・計画し、必要に応じて神経皮膚症候群研究班に所属する施設が中心となり本研究班による整備・計画のもとに生体試料収集につき、標準化することが理想と考えられる。

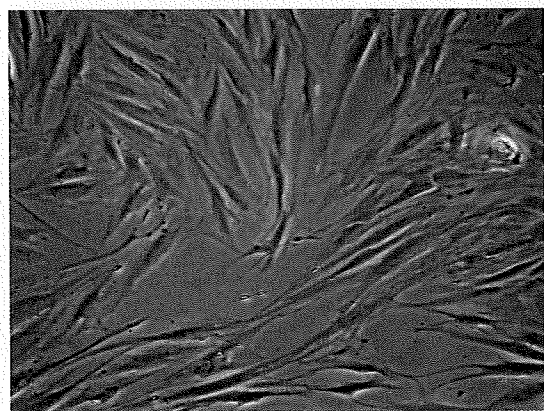


図 1 1 回継代後の神経線維腫培養細胞

E. 結論

本生体試料の単一施設での採取保存数は年間 10 例程度に留まるため、さらなる採取

保存数増加を目指して、今後多施設での生体試料収集について整備・計画する必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato H, Nakamura Y, Takahashi T, Otsuka F: Schwannoma with unusual clinical and histological appearance. Eur J Dermatol, 18:351-352,2008.

Nakamura Y, Takahashi T, Sato H, Xu X, Kawachi Y, Otsuka F: Tumor necrosis factor-alpha augments mitogenic activity of human neurofibroma cells via the MEK/ERK pathway (投稿中) .

大塚藤男：レックリングハウゼン病の外科治療と問題点. 日本医事新報, 4394:95-96, 2008.

大塚藤男：皮膚科セミナリウム：その他の神経皮膚症候群. 日本皮膚科学会雑誌, 118:911-917, 2008.

2. 学会発表

中村泰大, 石塚洋典, 里見久恵, 石井良征, 川内康弘, 大塚藤男：頭部びまん性神経線維腫切除時における止血の工夫：第1回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 (2009年11月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

引用文献

Takahashi T, Irie RF, Nishinaka Y, Hoon DS: 707-AP peptide recognized by human antibody induces human leukocyte antigen A2-restricted cytotoxic T lymphocyte killing of melanoma. Clin Cancer Res, 3:1363-1370, 1997.

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

色素性乾皮症の生体試料収集

研究分担者 錦織 千佳子 神戸大学大学院医学研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨 色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：XP）患者の生体試料を新たに3例収集した。また、今迄に倫理委員会において承認され、インフォームドコンセントを既に取得した色素性乾皮症患者の細胞を用いて read through による治療の可能性を実験的に検討した。

共同研究者

長野 徹

神戸大学大学院医学皮膚科学分野

A. 研究目的

色素性乾皮症患者の生体試料収集

B. 研究方法

- 1) 採血による DNA を抽出した。
- 2) 皮膚線維芽細胞の樹立し、それを凍結保存した。
- 3) 既に樹立した XPA 細胞である XP2OS（イントロン3のスプライス変異）と XP12RO（エクソン5, コドン207のナンセンス変異）の2系統を用いて、ゲンタマイシン処理による“read through”効果を XPA 蛋白の発現でみた。
- 4) 上記二細胞において、機能の回復をみるためにコロニー形成態を行ない、生存率をみた。

（倫理面への配慮）

神戸大学医学研究科遺伝子倫理委員会にて既

に承認を得ている。

C. 研究結果

- ① 新たに生体試料を3名より得た。
- ② 生体試料を用いて、遺伝子の変異部位によりゲンタマイシンを用いた“read through”による治療効果に差がみられることが分かった。エクソン5にナンセンスコドンを持つ細胞 XP12RO では、ゲンタマイシン処理により蛋白発現が戻り、コロニー形成でみた生存率の上昇がみられたが、イントロン3にスプライス変異をもつ細胞 XP2OS ではコロニー形成で未処理群と比べて大きな差がみられなかった。

D. 考察

XPの治療を考える上で、変異のタイプにより治療法が異なることが示された。ナンセンス変異にはread through治療を進め、スプライス異常にはエクソンスキッピングなど、他の治療を試みる必要があることが示された。

E. 結論

XP の生体材料を用いて、遺伝子の変異のタイプにより治療戦略が異なることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sreevidya CS, Fukunaga A, Khaskhely NM, Masaki T, Ono R, Nishigori C, Ullrich SE : Agents that Reverse UV-Induced Immune Suppression and Photocarcinogenesis Affect DNA Repair. *J Invest Dermatol*, 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
- Oka M, Sakaguchi M, Okada T, Nagai H, Ozaki M, Yoshioka T, Inoue H, Mukaida N, Kikkawa U, Nishigori C : Signal transducer and activator of transcription 3 upregulates interleukin-8 expression at the level of transcription in human melanoma cells. *Exp Dermatol*, 2009 Sep 16. [Epub ahead of print]
- Oka M, Sumita N, Sakaguchi M, Iwasaki T, Bito T, Kageshita T, Sato K, Fukami Y, Nishigori C : 12-O-tetradecanoylphorbol -13-acetate inhibits melanoma growth by inactivation of STAT3 through protein kinase C-activated tyrosine phosphatase(s). *J Biol Chem* 284 : 30416-30423, 2009.
- Fukunaga A, Horikawa T, Ogura K,

Taguchi K, Yu X, Funasaka Y, Takeda M, Nakamura H, Yodoi J, Nishigori C : Thioredoxin suppresses the contact hypersensitivity response by inhibiting leukocyte recruitment during the elicitation phase. *Antioxid Redox Signal* 11 : 1227-1235, 2009.

2. 学会発表

- 小野竜輔、正木太朗、谷岡未樹、西谷奈生、神部直智、清水彩子、松江弘之、錦織千佳子 : 色素性乾皮症バリエーション群の小児の2例。第31回日本光医学・光生物学会, 2009.7.24-25, 大阪
- 錦織千佳子、正木太朗、小野竜輔、谷岡未樹、船坂陽子、長野徹、森脇真一 : Four types of founder mutations are found in Japanese patients with xeroderma pigmentosum variant type. 第68回日本癌学会学術総会, 2009/10/1-3, 横浜
- Bito T, Sumita N, Masaki T, Ueda M, Ono R, Tokura Y, Nishigori C : UVB and UVC induce Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. 日本研究皮膚科学会第34回年次学術大会・総会, 2009.12.4-6, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
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

皮膚疾患病態解析を目的とする生体試料の収集と保存

研究分担者 山西 清文 兵庫医科大学皮膚科学 主任教授

研究要旨 皮膚生体試料の簡便な保存処理法について検討し、系統的に検体を管理・保管するシステムを構築した。得られたサンプルは匿名化して連結可能保存した。適切に保存管理された皮膚生体試料は、網羅的解析等への供与を通じて皮膚疾患病態解明への貢献が期待される。

共同研究者

津田達也 兵庫医科大学皮膚科学

今井康友 兵庫医科大学皮膚科学

A. 研究目的

皮膚疾患研究を目的とする生体試料の収集は、日常診療において時間的、物理的、人的制約のなかで、系統的で安定な検体の長期保存と品質管理が求められる。炎症性皮膚疾患に関しては、皮膚の免疫を司る免疫担当細胞の表面マーカーの同定や、末梢血単核球からのサイトカイン産生能、血清中の各種サイトカイン、ケモカインの測定が病態解析に有用である。一方、皮膚組織においては、表面マーカーをもつ細胞の局在、組織抽出液中のサイトカイン、ケモカインの網羅的発現解析が必要となる。そのため、これらの検体は適切な状態での保管・管理が不可欠である。本研究の目的は皮膚疾患の病態解析を行うに際し、研究基盤となる臨床検体を適切に収集・管理する方法とシステムを構築することにある。

B. 研究方法

本研究の意義を説明し、同意の得られた研究協力者から、末梢血あるいは皮膚組織を採取した。組織サンプルは一旦 RNA 保存液 RNAlater に浸漬し、24 時間 4°C 保存のうちに細切し proteinase K で溶解後、核酸をグラスファイバーフリースに結合させて洗浄、蒸留水で溶出し、DNase 処理後、再度精製し、全 RNA を調製した。Oligo (dT)₂₀ プライマーと逆転写酵素を用いて RT-PCR を行い、その産物を鋳型としてサイクルシーケンシング反応を行った。また生検組織の一部は生食中に 4°C で数時間から 24 時間保存した後に OCT compound に包埋し、凍結切片を作製した。末梢血はプロテインアレイ、ELISA によるサイトカイン解析に供した。サンプルの保管管理には PC を用い、連結可能匿名化した印字は LABXPRT 社のラベリングシステムプリンター、ラベルは XSL-108-461, X-124-490 などを用いた。

（倫理面への配慮）

兵庫医科大学倫理委員会の承認の下に、生体試料の研究利用について文書による説明と同意を得た。研究等の対象となる個人

の人権擁護については、研究協力者の自発的同意と協力により行い、どの段階でも同意を撤回でき、拒否による不利益はないこと、個人情報については保護され、第三者に漏洩されないことを説明した。個人情報管理分担管理者の指示により、個人を特定できる個人情報は連結可能匿名化して保存した。生体試料収集に際し、採血量、生検組織の大きさについては最小限にとどめ、苦痛軽減に配慮した。

C. 研究結果

生検直後の組織を RNeasy (ABI 社) に浸漬し、4°C で一晩保存後全 RNA を抽出した場合、18S, 28S rRNA のバンドの分解はほとんどなく、液体窒素で急速に凍結した場合と差は認められなかった。これらの全 RNA をもとに作製した cDNA をそれぞれ鋳型として PCR によって部分 TGM1 cDNA の増幅、特異的プライマーを用いた部分塩基配列の解析を実施した。その結果、RNeasy を用いて得られた RNA から十分遺伝子配列解析が可能であった。

皮膚生検組織を 0.9% NaCl 溶液に入れて 4°C で一旦保存し、24 時間以内に OCT compound (Tissue Tek 社) に包埋し冷凍保存したサンプルと、生検直後に凍結したサンプルからそれぞれ凍結切片を作製し、マウスインボルクリン抗体、Cy3 あるいは FITC ラベル抗マウス IgG 抗体を反応させて共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果、蛍光の局在、蛍光の程度にほとんど差は認められなかった。

末梢血中のサイトカイン解析として 13 検体を収集し、血中 YKL-40 や各種サイトカ

イン濃度を測定した。その結果、対照と比較して膿疱性乾癬患者において血中 YKL-40 の増加が認められた (図 1)。

D. 考察

RNA 保存液 RNeasy を用いた皮膚組織 RNA の安定化については、Florell らの皮膚腫瘍組織への応用の報告が最初である¹⁾。この報告ではマイクロアレイへの応用が示されているが、実際に皮膚で発現する個々の遺伝子の逆転写および塩基配列同定への応用については明確ではなかった。今回の研究によって RNeasy を用いて保存した組織からの RNA は、RT-PCR、皮膚疾患の遺伝子診断にも用いることができると推測される。

4°C の生理的食塩水中に保存した生検組織の蛍光抗体所見については、生検直後に液体窒素で凍結したサンプルと比較してもほとんど差はなく、さまざまな制約のある施設でもサンプルの取り扱いが容易であり、Vodegel らが報告しているような水疱症の診断だけでなく²⁾、難病の原因タンパクの局在や発現を観察するために有用と思われる。

血中サイトカインなど疾患間の比較検討を実施する際に、大量のサンプルを正確に取り扱うことが不可欠で、サンプルの識別保管を厳重に実施する必要があるが、今回導入した LABXPRT 社のラベリングシステムはサンプルの連結可能匿名化に際してバーコード管理も可能であり、ハイスループットな検体の管理に適していると思われる。これまでに測定した YKL-40 については有意に膿疱性乾癬患者で上昇する傾向が観察された。YKL-40 は、最近喘息における疾患マーカーとしても注目されるようになり³⁾、皮膚疾患における新しい炎症マ

カーとしての有用性についても引き続き詳細な検討が必要である。

E. 結論

皮膚からの生体試料成分の簡便かつ効果的な保存・整理法の開発は、さまざまな制約のある臨床現場でのサンプル収集と解析を容易にし、その系統的保存は、今後の皮膚疾患病態解析に寄与すると期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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 63(12):932-935, 2009

2. 学会発表

Yamanishi K, Stratum corneum and homeostasis of the cutaneous barrier. The 1st international symposium of deimination and skin biology. 2009. 4.

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.

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

引用文献

1) Florell SR, Coffin CM, Holden JA, Zimmermann JW, Gerwels JW, Summers BK, Jones DA, Leachman SA. Preservation of RNA for Functional Genomic Studies: A Multidisciplinary Tumor Bank Protocol. *Mod Pathol* 14(2):116-128, 2001

2) Vodegel RM, de Jong MC, Meijer HJ, Weytingh MB, Pas HH, Jonkman MF.