

(1)。

GPP診療ガイドライン(2001)における診断基準の主要項目は4つからなり、今日まで使用されている(後述)。ただし、ガイドラインで(2001)で検査項目に含まれていた検査項目は特異度・鋭敏度が低いことが確認され、新ガイドラインでは参考項目となった。

北島班になり、「特定疾患医療受給者証」の交付申請時に提出する臨床個人調査票のデータを参照できるようになった。その臨床個人調査票のデータと稀少難治性皮膚疾患研究班・班員施設の症例を元に、診断基準項目、重症度判定基準項目の特異度と鋭敏度が検定された。このような研究成果が加えられ、岩月啓氏先生を中心に「GPP診療ガイドライン(2008)」が作成され(2)、日本皮膚科学会のホームページで公開された。

改訂ガイドラインの特徴

GPPの定義は旧ガイドラインと同じであるが、GPPが全身性炎症性疾患であることを明記し、皮膚ばかりでなく、呼吸器不全、眼症状、二次性アミロイドーシスを合併し、時に生命予後を侵したり、皮膚以外の臓器障害をもたらす可能性があることを強調した。

診断基準に必要な主要項目は、以下の4項目である：1)発熱あるいは全身倦怠感などの全身症状を伴う、2)全身または広範囲の潮紅皮膚面に無菌性膿疱が多発し、時に融合して膿海を形成する、3)病理組織学的にKogoj海綿状膿疱を特徴とする好中球性角層下膿疱を証明する、4)以上の臨床的、組織学的所見を繰り返し生じる。

4項目全てを満たすものを膿疱性乾癬(汎発型)「確実例」と診断し、主要項目の2)と3)を満たす場合を「疑い例」と診断し、「疑い例」では次年度の特定疾患・更新申請時に再評価することとしました(2)。

GPP重症度分類

重症度の判定には、A.皮膚症状の評価とB.

全身症状と検査所見の評価が必要である。A.皮膚症状の評価は紅斑、膿疱、浮腫からなり、スライドに示した皮膚症状の範囲を評価して、それぞれ、0～3点、合計0～9点で評価する。次に、B.全身症状と検査所見として、発熱、白血球数、血清CRP、血清アルブミンを調べ、各項目0～2点、合計0～8点で評価する。AとBの合計点数が、0～6は軽症、7～10であれば中等症、11～17であれば重症と評価する。(2, 3)

次に、治療アルゴリズムを説明する。診断と重症度を評価した後、合併症の有無を評価し、I.心・循環不全、呼吸不全に対する治療、II.皮膚症状に対する治療、III.皮膚外症状(とくに関節症状)に対する治療を検討する。妊婦例や小児例に対する治療も記載した。(2)

わが国では、2010年1月から生物学的製剤であるTNF α 阻害薬(infliximab, adalimumab)が保険適応となった。「GPP診療ガイドライン2008」に生物学的製剤の治療が加えられ、「膿疱性乾癬(汎発型)診療ガイドライン2010:TNF α 阻害薬を組み入れた治療指針(簡略版)」として、日本皮膚科学会誌の2010年120巻4号に掲載された(3)。

D. 考察

「稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班」と日本皮膚科学会の共同で作成された「膿疱性乾癬(汎発型)診療ガイドライン」は、GPPの定義、診断基準、重症度分類、本邦における疫学調査、治療アルゴリズム、ならびに本邦で使用できる薬剤のエビデンスレベル、ならびに関連する論文が記載されており、また、GPPが全身性炎症性疾患であることを明記し、皮膚ばかりでなく、呼吸器不全、眼症状、二次性アミロイドーシスを合併し、時に生命予後を侵したり、皮膚以外の臓器障害をもたらす可能性があることを強調した。

E. 結論

「膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン」を基本として、全国的に標準的な治療が行われることで、GPP治療の改善に繋がることが期待される。また、それらの報告により、よりよいガイドラインの改訂版が作成できると考えられる

参考文献

1. Umezawa Y, Ozawa A, Kawasima T, Shimizu H, Terui T, Tagami H, Ikeda S, Ogawa H, Kawada A, Tezuka T, Igarashi A, Harada S. Therapeutic guidelines for the treatment of generalized pustular psoriasis (GPP) based on a proposed classification of disease severity. *Arch Dermatol Res* 295 (Suppl 1) : S43-54, 2003.
2. 照井 正. 膿疱性乾癬（汎発型）ガイドライン. *日皮会誌*119:2736-2739,2009.12
3. 岩月啓氏、照井 正、小澤 明、小宮根真弓、梅澤慶紀、鳥居秀嗣、中西 元、原 弘之、馬淵智生、青山裕美、北島康雄、日本皮膚科学会. 膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン2010 TNF α 阻害薬を組み入れた治療指針（簡略版）. *日皮会誌*120 : 815-839, 2010.03

F. 健康危険情報

特記すべきことなし.

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Asahina A, Nakagawa H, Etoh T, Ohtsuki M, Terui T, et al. Adalimumab in Japanese patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis : efficacy and safety results from a Phase II/III randomized controlled study. *J Dermatol* 37 (4) : 299-310, 2010.
2. Kitahata Y, Nunomura S, Terui T, Ra C. Prolonged culture of mast cells with

high-glucose medium enhances the Fc epsilon RI-mediated degranulation response and leukotriene C4 production. *Int Arch Allergy Immunol* 152 (Suppl 1) : 22-31, 2010.

3. Torii H, Nakagawa H, Iizuka H, Terui T et al. Infliximab monotherapy in Japanese patients with moderate-to-severe plaque psoriasis and psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Dermatol Sci* 59 (1) : 40-9, 2010. 5.
4. Hayama K, Inadomi T, Fujisawa D, Terui T. A pilot study of medium-dose cyclosporine for the treatment of palmo-plantar pustulosis complicated with pustulotic arthro-osteitis. *Eur J Dermatol* 20 (6) : 758-62, 2010 (Nov-Dec) .
5. 大槻マミ太郎、照井 正、小澤 明、森田明理、佐野栄紀、高橋英俊、小宮根真弓、江藤隆史、鳥居秀嗣、朝比奈昭彦、根本 治、中川秀己、日本皮膚科学会生物学的製剤検討委員会. 乾癬におけるTNF α 阻害薬の使用指針および安全対策マニュアル *日皮会誌* 120 (2) : 163-171, 2010.02
6. 岩月啓氏、照井 正、小澤 明、小宮根真弓、梅澤慶紀、鳥居秀嗣、中西 元、原 弘之、馬淵智生、青山裕美、北島康雄、日本皮膚科学会. 日本皮膚科学会ガイドライン 膿疱性乾癬（汎発型）診療ガイドライン2010 TNF α 阻害薬を組み入れた治療指針（簡略版）. *日皮会誌* 120 (4) : 815-839, 2010.03
7. 照井 正. 病態・治療Q & A 乾癬治療の最前線 膿疱性乾癬と乾癬性紅皮症の治療についてお教えください 臨床のあゆみ 83 : 14, 2010.03
8. 照井 正. 掌蹠膿疱症. 薬局で役立つ皮膚科治療薬 FAQ 編集 : 大谷道輝、宮地良樹. メディカルレビュー社（東京）pp70-71, 2010.3.25.

9. 照井 正. 膿疱性乾癬（汎発型）ガイドラインを読む. What's new in 皮膚科学 2010-2011. 編集：宮地良樹. メディカルレビュー社（東京）pp74-75, 2010.4.15.
10. 照井 正. 進行性多巣性白質脳症(PML)と抗体治療薬. Visual Dermatology 9 (8) : 846, 2010.07
11. 照井 正. レチノイド療法、活性型ビタミンD3療法とその機序. アレルギー・免疫 18 (1) : 83-87, 2011.01

学会発表

1. 照井 正. 教育講演30 乾癬・掌蹠膿疱症の新しい病因論と治療. 膿疱性乾癬（汎発型）ガイドライン. 第109回日本皮膚科学会総会、大阪、2010年4月16-18日.
2. 照井 正. 厚生労働省 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・「膿疱性乾癬」分科会からの報告. 第25回日本乾癬学会総会、宇部、2010年9月3-4日.
3. Terui T. Therapeutic guidelines for generalized pustular psoriasis (GPP) based on unique diagnostic criteria and classification of disease severity 2010. The First Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, September 30 - October 3, 2010.

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

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顆粒球除去療法

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 膿疱性乾癬（GPP）は、時に皮膚のみならず多臓器に障害をもたらす全身炎症性疾患であり、難治である。組織中では活性化した顆粒球が組織障害を起こしていると推察され、今回我々はGPPの2例に対し、これらの除去を目的とした体外循環法である顆粒球除去療法（GCAP：granulocytapheresis）を試行し、その臨床効果を検討したところ、いずれも長期寛解が得られた。

共同研究者

大熊 慶湖、長谷川敏男、込山 悦子
順天堂大学医学部皮膚科

A. 研究目的

GPPは発熱と全身の潮紅、膿疱の寛解増悪を繰り返すことを特徴とし、難治である。従来の治療法が奏効しなかったり、治療法があっても副作用のために施行が困難であったり、症状が重篤であるため早期の治療を迫られている場合があり、従来の治療法に変わる、副作用を最小限に抑え且つ治療効果の得られる方法が常に模索されている。

GCAPは活性化した顆粒球の除去とその細胞機能の制御を目的とした体外循環法であり、GPP 2例に対しこれらを試行し、その臨床効果を検討した。

B. 研究方法

GCAPは以下2例のGPPに対して試行した。

症例1：68歳女

平成18より尋常性乾癬。ビタミンD製剤とステロイド剤を外用し、紫外線療法も適宜併用したが寛解増悪を繰り返し、紅斑周囲に小膿疱が出現するようになった。皮膚生検にて膿疱性乾癬と診断した。シクロスポリン内服150mg/日（3mg/日）より開始したが、腎機能障害および全身倦怠感のため減量したところ増悪し、発熱が続いたため、平成20年7月

GCAPを導入した（図1、A）。

症例2：26歳女

SLEのためベタメタゾン1.2mg/日内服中であつた。平成16年3月紅斑が拡大し皮膚生検にて乾癬性紅皮症と診断した。エトレチナート40mg/日内服を併用したが改善せずベタメタゾン3mg/日に増量した。平成19年7月肝機能障害のためエトレチナートを中止した。紅斑の消退とともにベタメタゾン0.8mg/日減量中、H20年6月発熱を伴い膿疱が出現し皮膚生検にて膿疱性乾癬と診断し、GCAPを試行した（図2、A）。

GCAP1回あたりの治療には原則として1本のアダカラム（JIMRO）を用いた。基本血液流速30ml/min、体外循環時間60分、血液処理量1.8Lに基づき施行し、1週間に1～2回の頻度で最大8回まで施行した。

C. 研究結果

症例1

GCAPは計7回試行した。38度の発熱、全身倦怠感は初回施行後に速やかに改善した。7回施行後、約3ヶ月をかけ紅斑、膿疱、浮腫はほぼ消退した（図1、B）。以後10ヶ月の寛解が得られたが肝硬変の増悪により永眠した。GCAP施行前後の血液学的検査は以下のものであつた。

GCAP前 WBC 3900/ml, Neu.51%, CRP 0.2 mg/dl Alb 2.7g/dl

GCAP 7 回後 WBC 3200/ml, Neu 50%,
CRP0.2mg/dl Alb 2.6g/dl

症例 2

GCAPは計8回試行した。38度の発熱、全身倦怠感は初回施行後に速やかに改善した。8回施行後約3ヶ月で、全身に見られた紅斑、膿疱、浮腫は消退した(図2、B)。以後約2年再燃はみられていない。GCAP施行前後の血液学的検査は以下のものであった。

GCAP 前 WBC 18700/ml, Neu 87.5%,
CRP0.9mg/dl Alb 3.7g/dl

GCAP 8 回後 WBC 9900/ml, Neu.78.8%,
CRP0.2mg/dl, Alb 3.6g/dl

いずれにおいても、体外循環中の重篤な副作用は見られていない。

D. 考察

難治性膿疱性乾癬の2例に対し、GCAP治療を試行しいずれも奏効した。

1例は10ヶ月、1例は2年以上の寛解が得られた。

E. 結論

GCAP治療は難治性膿疱性乾癬の治療の選択肢の1つとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成22年度)

論文発表

1. Takenaka H, Ushio H, Niyonsaba F, Jayawardana ST, Hajime S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K : Synergistic augmentation of inflammatory cytokine productions from murine mast cells by monomeric IgE and toll-like receptor ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 ; 391 : 471-6.
2. Kaga M, Sugita T, Nishikawa A, Wada Y, Hiruma M, Ikeda S : Molecular analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota

from the skin of patients with atopic dermatitis of different severities. *Mycoses.* 2009 Dec 11. [Epub ahead of print]

3. Niwa Y, Potaczek DP, Kanada S, Takagi A, Shimokawa N, Ito T, Mitsuishi K, Okubo Y, Tajima M, Hobo A, Ng W, Tsuboi R, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C : FcepsilonRIalpha gene (FCER1A) promoter polymorphisms and total serum IgE levels in Japanese atopic dermatitis patients. *Int J Immunogenet.* 2010 ; 37 : 139-41.
4. Le TA, Takai T, Vu AT, Kinoshita H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K : Glucocorticoids inhibit double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from keratinocytes in an atopic cytokine milieu more effectively than tacrolimus. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010 ; 153 : 27-34.
5. Ng W, Ikeda S : The literary works of Hansen's disease patients in Japan. *Int J Dermatol.* 2010 Apr ; 49 (4) : 461-3.
6. Yamaki F, Mayuzumi N, Ikeda S, Hashimoto T : Immunoglobulin A antibodies against desmoglein 1, envoplakin, periplakin and BP230 in a patient with atypical bullous pemphigoid. *J Dermatol.* 2010 ; 37 : 255-8.
7. Hasegawa T, Suga Y, Mizuno Y, Haruna K, Ogawa H, Ikeda S : Efficacy of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid using intense pulsed light for Bowen's disease. *J Dermatol.* 2010 ; 37 : 623-8.
8. Vu AT, Baba T, Chen X, Le TA, Kinoshita H, Xie Y, Kamijo S, Hiramatsu K, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T : Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in kerati-

nocytes through the
Toll-like receptor 2-Toll-like receptor
6 pathway *J Allergy Clin Immunol.*
2010 ; 126 : 985-993. 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



A



B

図1. 症例1 両下肢 GCAP施行前 (A), 後 (B)

GCAP導入前に見られた下肢の紅斑、膿疱、浮腫は7回施行後にはほぼ消退している。

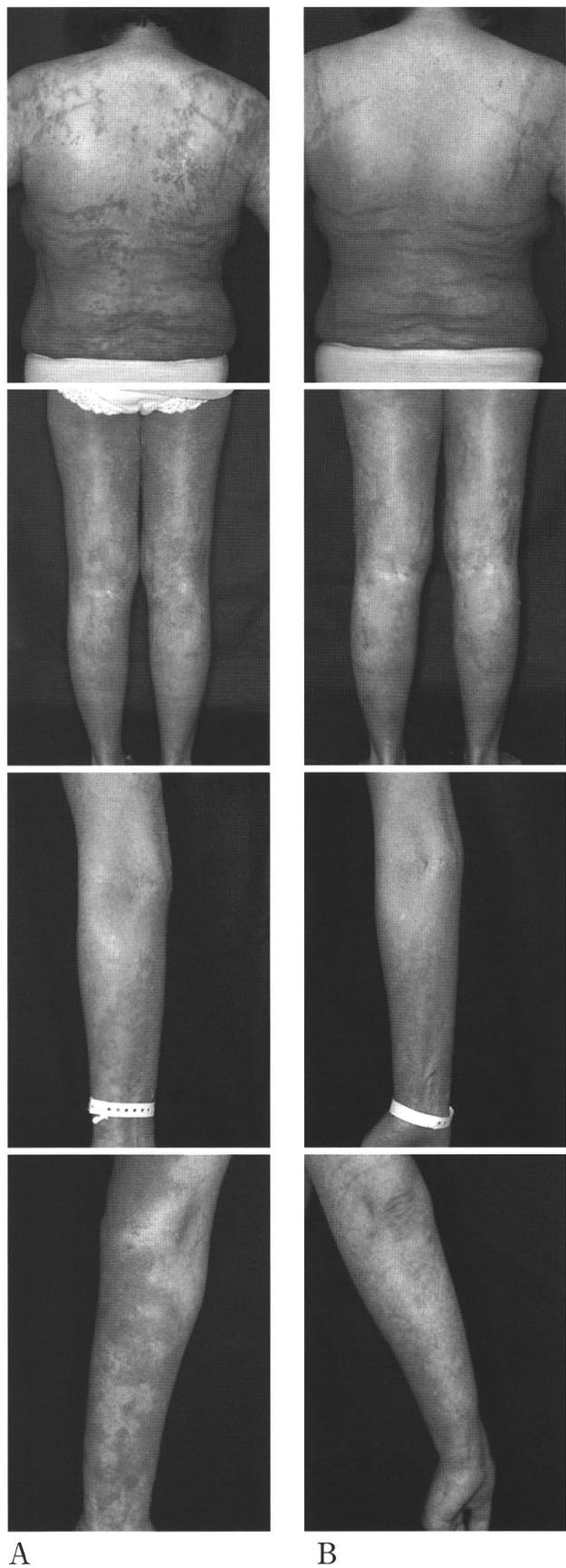


図2. 症例2 躯幹、下肢、両上肢のGCAP施行前 (A)、後 (B) の臨床所見
全身に見られた紅斑、膿疱、浮腫はGCAP 8回施行後に消退した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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 膿疱性乾癬は乾癬の中で特に重い病気であり、難治性の炎症性重篤疾患である。皮膚に炎症性膿疱（菌の存在は検出されない）が現われ、全身症状として高熱や倦怠感を伴う特長を持つ。現在、本病状は、種々乾癬病態の中でも明確な治療手段がなく、その制御には特に困難を要する。従って、膿疱化への病的憎悪過程を辿る炎症機転の機構と本態を明らかにし、初期段階でその憎悪過程を断ち切ることは大きな意義を有する緊急な課題である。

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して努めてきた。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。この問題を解決するため、本年度において我々は、RAGE膜直下シグナル伝達機構の解析を行った。その成果は以下の通りである。

RAGEにリガンドが結合すると、膜直下細胞質領域の391SerがPKC ζ によりリン酸化を受ける。このリン酸化修飾が後の多彩な信号伝達に必須であり、TLR2とTLR4に共通のアダプタータンパク質であるTIRAPとMyD88をリクルートすることで下流に様々なシグナルを伝達できる（TRAMはリクルートされない）。その結果、様々な炎症性サイトカインが誘導される。本成果は、S100タンパク質群をリガンドとするRAGEの膿疱性乾癬における炎症憎悪への役割を理解するための大きな手がかりとなるばかりでなく本疾患の治療対策に貢献することが大いに期待される。

A. 研究目的

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。本年度では、RAGE膜直下細胞質領域からどのように多様なシグナルが伝達されていくのかに関して以下の検討を行うものとする。

- (1) RAGE細胞質領域のリン酸化状態、
- (2) RAGE細胞質領域のリン酸化部位およびリン酸化酵素の同定
- (3) RAGE細胞質領域結合性アダプタータンパク質の同定とその相互作用解析
- (4) RAGE下流信号伝達（炎症性サイトカインの誘導に至る過程）へのアダプタータン

パク質結合の重要性

B. 研究方法

細胞：本研究には以下の細胞を使用した。ヒト胎児腎細胞株 (HEK293、ATCC社) およびその MD 2 /CD14 遺伝子安定発現株 (293-hMD 2-CD14、InvivoGen社)、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、不死化マウス線維芽細胞株 (NIH 3 T 3、ATCC社)、MyD88遺伝子ノックアウト (MyD88 KO) マウス肺線維芽細胞 (MyD88 KOマウスはオリエンタル酵母社から購入)。HUVECは、サプリメントとして 2 % FBS、FGF-B (5 ng/ml)、EGF(10ng/ml)、hydrocortisone (1 mg/ml)、heparin(10mg/ml) を含有する Humedia-EG培地 (Kurabo社) にて培養し、その他の細胞は全て、10 % FBS を含有する DMEM/F12培地 (Gibco社) にて培養した。細胞内タンパク質のリン酸化には、³²P- 標識正リン酸 (ICN社) を用いた。

試薬およびリコンビナントタンパク質：LPS (TLR 4 を刺激) は、Sigma-Aldrich社より、lipoteichoic acid (LTA-SA)、bacterial lipoprotein (Pam 3 CSK 4)、peptidoglycan (PGN-EC)、lipomannan (LM-MS) は、いずれも InvivoGen社より購入した。TLR 2 刺激には、LTA-SA、Pam 3 CSK 4、PGN-EC、LM-MS のミクスチャーを使用した。polymixin B (PMB ; LPS を捕捉) は、Indofine Chemical社より、組み換えヒト TLR 2 細胞外ドメイン (rexTLR 2) と組み換えヒト TLR 4 細胞外ドメイン (rexTLR 4 /MD- 2) は、R & D社より購入した。AGE-BSA (AGE) および LPS-binding protein (LBP) は、Calbiochem社および R & D社よりそれぞれ購入した。ヒト TIRAP および MyD88機能阻害性膜透過ペプチド (TIRAPI、MyD88I) は、Imgenex社より購入した。

ヒト S100A8、S100A9、S100A11、S100A12、HMGB1 に関しては、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。

抗体：Western blot解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (clone 6 E2)、mouse anti-Myc tag (clone9B11)、anti-human IRF-3 ; rabbit anti-human RAGE (Santa Cruz Biotechnolog社)、rabbit anti-human phospho-IRF- 3 (Ser396)、rabbit anti-human p38、rabbit anti-human phospho-p38 (Thr180/Tyr182)、rabbit anti-human SAPK/JNK、mouse anti-human phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)、rabbit anti-human Akt、rabbit anti-human phospho-Akt (Ser473)、rabbit anti-human IKKa、rabbit anti-human IKKa/b (Ser176/180)、rabbit anti-human IRAK 4、rabbit anti-human NFkB (p65)、mouse anti-human cleaved caspase 8 (Asp384) antibodies (Cell Signaling社) ; rabbit anti-His tag、rabbit anti-human MyD88 antibodies (MBL社) ; rabbit anti-human PKCa、rabbit anti-human PKCe、rabbit anti-human PKCz、rabbit anti-human PKCm antibodies (Santa Cruz Biotechnology社) ; rabbit anti-human TIRAP、mouse anti-TRAM antibodies (Abcam社) ; mouse anti-human tubulin antibody (Sigma-Aldrich社)

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 PDNR 1 r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-6 His tag が付加あるいは、N末に 6 His-2 HA 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)。TIRAP および MyD88 (N末に Myc tag、C末に HA tag)、そして PKC アイソフォーム (C末に HA tag) 発現ベクターも上記と同様に作製した。各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正

しいことを確認した。

プラスミドベクターの細胞内導入：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社) 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：細胞に強制発現させたtag付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose (Sigma-Aldrich社)、monoclonal Anti-His tag (clone 2D8)、monoclonal anti-Myc tag (clone 1G4) agaroses (MBL社) を使用した。内因性RAGEの免疫沈降に関しては、Rabbit anti-human RAGE antibody (Santa Cruz Biotechnology社) をビオチン標識 (Biotin Labeling Kit-SH; Dojindo Molecular Technologies社) したものを使用した {streptavidin-agarose (Invitrogen社) によりプルダウン}。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性bufferにより溶出した。

PKC ζ の活性化：細胞内PKC ζ の活性化状態は、特異的基質を用いたIn vitroリン酸化酵素反応により行った。細胞抽出液にビオチン化PKC ζ 特異的基質 (biotinylated-PKC ζ -specific substrate; Santa Cruz Biotechnology社) と γ -³²P-ATPを添加し、インキュベーションした後、ビオチン化基質をストレプトアビジンでコートした96穴プレート (streptavidin-coated plate; BD Biosciences社) に捕捉させ、その放射活性を測定した。

siRNA：本研究に使用したsiRNAは以下の通りである。human PKC α ・siRNA (ID No. sl11092)、human PKC ζ ・siRNA (ID No. sl11129)、control siRNA (Silencer Negative control 2 siRNA) は、Ambion社から購入した。Human PKC ϵ siRNA (siGENOME SMART pool M-004653-02-0005)、human PKC μ siRNA (siGENOME SMART pool

M-005028-02-0005)、human RAGE siRNA (siGENOME SMART pool M-003625-02-0005)、mouse TIRAP siRNA (siGENOME SMART pool M-049112-00-0005) は、Thermo Scientific Dharmacon社より購入した。siRNAのトランスフェクションには、Lipofectamin RNAiMAX reagent (Invitrogen社) を使用した。

C. 研究結果

1. リガンド刺激によるRAGE細胞質領域のリン酸化：HEK293細胞にRAGE全長 (wt) および細胞質領域欠損型 (Δ cyt) を一過性に過剰発現させ、RAGEリガンド (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 (図1A)。

2. RAGE細胞質領域のリン酸化酵素の同定：RAGE細胞質領域を強制発現させたHEK293細胞より monoclonal Anti-His tag agaroseにて精製したRAGE細胞質領域を用いて、種々組み換えリン酸化酵素 (活性化型) によるリン酸化反応を検討したところ、PKC α によるRAGE細胞質領域のリン酸化バンドが検出された (図1B)。

PKCは、同じような性質を持ったアイソザイムからなるファミリーを形成している。我々は、さらにどのタイプのPKCがRAGE細胞質領域を強くリン酸化するのか検討した。上記と同様の方法を用いて解析したところPKC ζ に最も強い活性が検出された (図1C)。

各PKC種に特異的なsiRNAを用いてHEK293細胞の内因性PKCをノックダウンしたところ、強制発現させたRAGE (全長) のS100A11刺激によるリン酸化が、PKC ζ siRNAによって消失した (図1D)。また、我々はRAGEの細胞質領域にPKC ζ が特異的に結合していることを明らかにしている (data not shown)。以上の結果から、PKC ζ が、リ

ガンド刺激によるRAGE細胞質領域のリン酸化を引き起こしていることが明らかとなった。

3. RAGEリガンドによるPKC ζ の活性化：次に我々は、PKC ζ が、RAGEのリガンド刺激により活性化されるかどうかの検討を行った。HEK293細胞にRAGE (wt: 全長あるいは Δ cyt: 細胞質領域欠損型) を一過性に強制発現させた後に、種々RAGEリガンド (S100A11、S100A12、HMGB 1、AGE) で細胞を刺激した。その細胞抽出液中のPKC ζ の活性を解析したところ、使用した全てのRAGEリガンド刺激において、酵素活性の顕著な上昇が認められた。この反応は、細胞質領域欠損型では認められなかった (図2A)。

4. PKC ζ によるRAGE細胞質領域のリン酸化部位の同定：RAGE細胞質領域には、4つのリン酸化可能なアミノ酸 (Ser391、Ser399、Ser400、Thr401) が存在する。これらの内、Ser391は、動物種間 (ヒト、マウス、モルモット、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ) で良く保存されている。それぞれのアミノ酸をAla(A) に置換した変異体 (SSST: wt、ASST: Ser391をAla、SAST: Ser399をAla、SSAT: Ser400をAla、SSSA: Thr401をAla) を作成し、組み換えPKC ζ (活性化型) によるIn vitroリン酸化反応を行ったところ、ASST変異体でPKC ζ によるリン酸化が消失した (図2B)。

また、RAGE全長 (SSST: wtとASST: Ser391をAla) をHEK293細胞にトランスフェクションしたところ、S100A11刺激によるRAGE全長 (SSST) のリン酸化がASSTで消失した (図2C)。これらの結果から、Ser391がPKC ζ によるRAGEのリン酸化部位であることが判明した。

5. RAGE細胞質領域へのTIRAP/MyD88の結合：RAGE細胞質領域のリン酸化修飾の生理的意義を検討するため、RAGE細胞質領

域に結合するアダプター様のタンパク質を同定しようと試みた。RAGE細胞質領域プルダウン法による結合タンパク質のLC-MS/MS解析では、残念ながら候補的タンパク質を得ることができなかった。そこで、RAGEと機能的に類似性のある受容体を参考にして、結合性があるだろうと予想される候補タンパク質群をスクリーニングする方法に切り替えた。RAGEの下流で活性化される分子群は、TLR 2やTLR 4のそれと驚くべき程類似していることより、TLR 2/4のアダプタータンパク質であるTIRAP、MyD88、TRAMに着目した。これらタンパク質それぞれをRAGE細胞質領域と共にHEK293細胞に発現させ、両者の結合解析を免疫沈降法により行った。その結果、TIRAPとMyD88がRAGE細胞質領域に結合することが判明した。この時、TRAMは結合しなかった (図3A)。

6. RAGEへのTIRAP/MyD88の結合におけるRAGE細胞質領域のリン酸化修飾の重要性：上記結合がRAGE細胞質領域のリン酸化状態 (Ser391) によって影響を受けるかどうかの検討を行った。RAGE細胞質領域のリン酸化類似変異体 (ESST: Ser391をGluに置換) を新たに作成し、TIRAP、MyD88と共にHEK293細胞に発現させ、RAGE細胞質領域の免疫沈降により結合の変動を解析した。結果として、リン酸化類似体ESSTは、ワイルド体SSSTに比較してTIRAP/MyD88結合の有意な上昇を示した。また、非リン酸化変異体ASSTでは結合が認められなかった (図3B)。

本結合に関して、我々は、大腸菌からの精製組み換えタンパク質を用いた検討からTIRAPが直接RAGE細胞質領域に結合することを見いだしている。一方、MyD88はTIRAPを介して間接的にRAGE細胞質領域に結合する (data not shown)。

次に、RAGE全長へのTIRAP/MyD88結合を、HEK293細胞を用いて検討した。細胞にRAGE (wtあるいは Δ cyt: 細胞質領域欠

損型)を強制発現させ、リガンド刺激による RAGE リン酸化と RAGE への内因性 TIRAP/MyD88 の結合を解析した。図 3 C より、RAGE 全長は、RAGE リガンド (S100A11、S100A12、HMGB 1、AGE) 刺激時に特異的にリン酸化され、TIRAP/MyD88 と結合することが判明した。ネガティブコントロールの GST や TLR 4 のリガンドである LPS、そして TLR 2 のリガンドミクスチャー (TLR 2Ls) では、このような現象は認められなかった。

内因性 RAGE のリン酸化および、TIRAP/MyD88 結合に関しては、HUVEC を用いて検討した。RAGE の分子量は、抗体の H 鎖とほぼ同等の分子量であるので、免疫沈降後の RAGE の検出ができなかったが、RAGE 抗体をビオチン化することでこの問題を解決することができた。細胞抽出液と反応後のビオチン化 RAGE 抗体をストレプトアビジン担体にてプルダウンした後に酸性 buffer で溶出する操作を行うが、ビオチンとアビジン結合が強固なためビオチン化抗体は溶出されてこないのである。この操作により内因性の RAGE を免疫沈降させることが可能になった (data not shown)。本方法より、図 3 C と同様に HUVEC において、内因性 RAGE のリン酸化および、TIRAP/MyD88 結合を解析した。抗体による内因性 RAGE の検出の特異性は、RAGE siRNA の適用により評価した。結果、内因性 RAGE も、RAGE リガンド (S100A11、S100A12、HMGB 1、AGE) 刺激時に特異的にリン酸化され、TIRAP/MyD88 と結合することが確認された (図 4 A)。

7. RAGE 下流信号伝達における TIRAP/MyD88 の役割: RAGE の下流では Akt、p38、IKKa/b、等のリン酸化酵素が活性化されると共に NFkB 転写因子の活性化による炎症性サイトカイン誘導が惹起されることが既に報告されている。我々は、RAGE の下流におけるこれら因子の活性化への TIRAP/MyD88 の必要性を検討しようと試みた。まず、HU-

VEC を RAGE リガンドで刺激すると確かに Akt、p38、IKKa/b、NFkB の活性化が誘導され、これは、siRNA を用いた RAGE の発現抑制操作により顕著に現弱することより、これらの反応は RAGE 依存性であることが確認できた (図 4 B)。

次に、この系を用いて TIRAP/MyD88 の機能抑制下での反応を検討した。TIRAP、MyD88 の機能を特異的に抑制するため、膜透過性の機能阻害ペプチド (TIRAP I pep.、MyD I pep.) を使用した。図 5 は、その結果を示したものである。TIRAP I pep. および MyD I pep. の処理細胞 (HUVEC) では、RAGE リガンド (AGE) 刺激による内因性 RAGE のリン酸化が誘導されるものの、TIRAP、MyD88 の結合が消失していた (図 5 A)。この時、Akt、p38、IKKa/b、NFkB の活性化もほぼ完全に抑制された (図 5 B)。同様の結果が、MyD^{-/-}マウス肺プライマリー線維芽細胞および、TIRAP siRNA 処理マウス NIH 3 T 3 線維芽細胞株で観察された (data not shown)。

RAGE 下流信号伝達による炎症性サイトカイン誘導への TIRAP/MyD88 の重要性に関しては、サイトカイン検出アレイを用いた解析を行った (HUVEC 使用)。図 6 A に示しているように、RAGE リガンド (AGE) 刺激により様々な増殖因子およびサイトカインが誘導されるが、これらの誘導は、MyD I pep. の共存下で全て顕著に抑制された。これらの内、代表的炎症性サイトカインである IL-6 に関しては、Northern Blot 法により、その誘導と抑制に関して確認を行った (図 6 B)。以上の結果から、RAGE の細胞質領域への TIRAP、MyD88 の結合が、RAGE 下流信号伝達 (Akt、p38、IKKa/b、NFkB の活性化と炎症性サイトカイン誘導) に必須であることが明らかとなった。

D. 考察

1. RAGE の膜直下信号伝達: 本研究より我々は、RAGE にリガンドが結合すると、膜直下

細胞質領域の391Ser（動物種間で良く保存）がPKC ζ によりリン酸化を受けること、このリン酸化修飾が後の多彩な信号伝達に必須であり、TLR 2とTLR 4に共通のアダプタータンパク質であるTIRAPとMyD88をリクルートすることで下流に様々なシグナルを伝達できること、その結果、多様な炎症性サイトカインの誘導につながることを明らかにすることができた（図7）。

このように、TIRAPは、多様なRAGE信号伝達に中心的役割を担っていることが判明したが、この分子は、TLR 4のアダプター分子でもある。では、RAGEとTLR 4との下流信号伝達の違いはどのようなようであろうか？我々は、TRAMがRAGEに非結合性であることを見いだした。RAGEではTRAM-TRIFを介するIFN誘導が起こらないのはこのためである（data not shown）。

また我々は、RAGEとTLR 4の同時活性化における予備的検討も行った（data not shown）。両者に結合能を持つHMGB 1およびS100A 8/A 9での刺激を行ったところ、各受容体の単独刺激に対して顕著なNF κ B活性化の増強が惹起された。RAGEとTLR 4のS100A 8/A 9による同時活性化による過剰な炎症反応が、乾癬発症患部での膿疱形成に関わっているかもしれない。

2. PKC ζ の活性化：PKC ζ は、atypical PKC (aPKC) サブファミリーに属するジアシルグリセロールおよびカルシウムに非感受性のプロテインキナーゼCである。RAGEの下流では、どのような因子がPKC ζ を活性化しているのだろうか？PKC ζ の活性化因子として低分子GTPaseであるrasが知られている。実際にRAGEをリガンドで刺激するとrasの一過性の活性化がみられることが知られており、RAGEの下流におけるPKC ζ の活性化誘導にはrasが関与するものと考えられる。しかし、rasがRAGEの膜直下でどのように活性化されるのかは不明であり、現在解析中である。

3. RAGEの膜直下信号伝達の阻害剤：RAGE阻害法では、1) リガンド吸着剤としてRAGE細胞外領域組み換えタンパク質、2) RAGE細胞外領域結合性中和抗体、3) RAGEのリガンドに対する中和抗体、等が現在考えられているが、未だ実用化に至っていない。その理由は、1) では、血中安定性の問題、2) では、それ自身が逆にリガンドになりうること、3) では、RAGEには多種多様なリガンドが存在するため、全てに対するものを作製して評価するには大変な困難を要すること、等が指摘されているからである。これらのことより、我々の見いだしたRAGE信号伝達に関して、その機序の有効な特異的阻害剤が見つければ、その意義は非常に大きいものと考えられる。

RAGEからの信号伝達には、TIRAP結合が必須である。従って、TIRAPのRAGEへの結合阻害法の確立が、将来的に本病態に関するひとつの有効な治療手段となるかもしれない。我々は独自に、RAGEの細胞質領域へのTIRAP結合には、TIRAPのTIRドメイン内BB-loop配列が必須であることを発見している。この配列類似の化合物は、decoyとしてRAGE信号を抑制してくれるはずであり、乾癬膿疱化の治療薬剤の一つとして期待が持てる。

E. 結論

RAGEは、当初、糖化産物の受容体として同定されたが、その後S100タンパク質群にも結合して、炎症病態に深く関わっているとされている。しかし、その本体の作動機構に関しては謎であったため、炎症病態に分子レベルでどのような役割を担っているのか曖昧にしか理解されていなかった。

我々は、本年度の研究より、今まで謎であったRAGE信号伝達の多様性の本体を明らかにすることに成功し、RAGEの炎症に果たす役割への理解を深めることができた。すなわち、RAGEにリガンドが結合すると、細胞質領域がリン酸化され、後の信号伝達経路に必

須であるTLR 2とTLR 4に共通のアダプタータンパク質、TIRAPとMyD88をリクルートすることで下流に様々なシグナルを伝達できるのである。その結果、多様な炎症性サイトカインが誘導されるのである。

本研究成果は、乾癬の膿疱化に関わるRAGEの機能および役割のより深い理解につながる可能性を秘めている。得られた知見は、難治性乾癬膿疱化の治療対策に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22年度)

論文発表

1. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami JI, Yamada H, Kataoka K, Huh NH : A new cytosolic pathway from a Parkinson's disease-associated kinase, BRPK/PINK 1 : activation of AKT via MTORC2. *J Biol Chem*. 2010. (In Press)
2. Sakaguchi M, Huh NH : S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes. *Amino Acids*. 2010. (In Press)
3. Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh NH, Tsuda T, Yamanishi K, Komine M, Iwatsuki K : Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *J Am Acad Dermatol*. 2010. (In Press)
4. Kataoka K, Sakaguchi M, Peng li K, Taketa C, Yamamoto K, Dui G, Funahashi H, Murata H, Huh NH : Internalization of REIC/Dkk-3 protein by induced pluripotent stem cell-derived embryoid bodies and extra-embryonic tissues. *Int J Mol Med* 26 : 853-859, 2010.
5. Zhang K, Watanabe M, Kashiwakura Y, Aili S, Edamura K, Huang P, Yamaguchi K, Nasu Y, Kobayashi Y, Sakaguchi M, Ochiai K, Yamada H, Takei K, Ueki H, Huh NH, Li M, Kaku H, Na Y, Kumon H : Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development. *Int J Oncol* 37 : 1495-1501, 2010.
6. Yamamoto K, Sakaguchi M, Medina RJ, Niida A, Sakaguchi Y, Miyazaki M, Kataoka K, Huh NH : Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. *Biochem Biophys Res Commun*. 400 : 175-80, 2010.
7. 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*. 126 : 1562-1569, 2010.

学会発表

1. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH ; TIRAP, an adaptor protein for TLR- 2 /-4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding、神戸、第33回日本分子生物学会、2010年12月7日

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

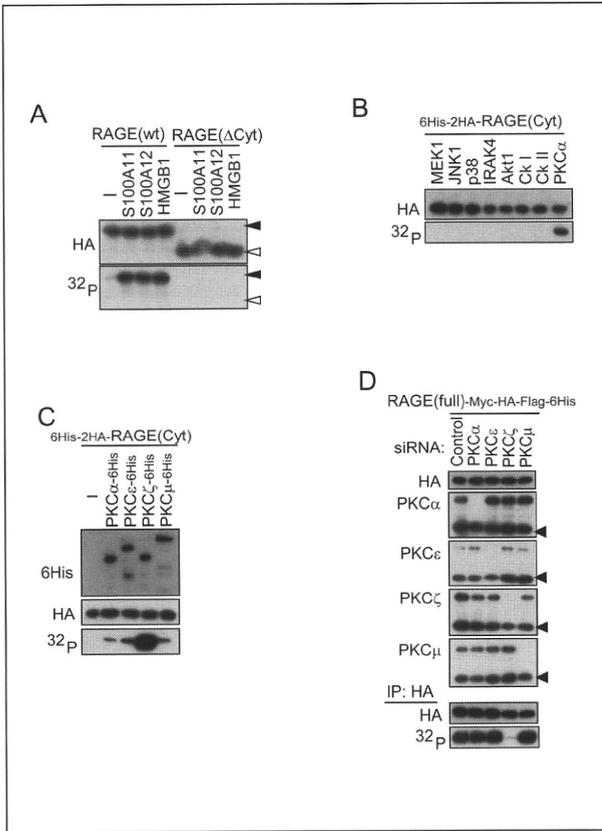


图 1

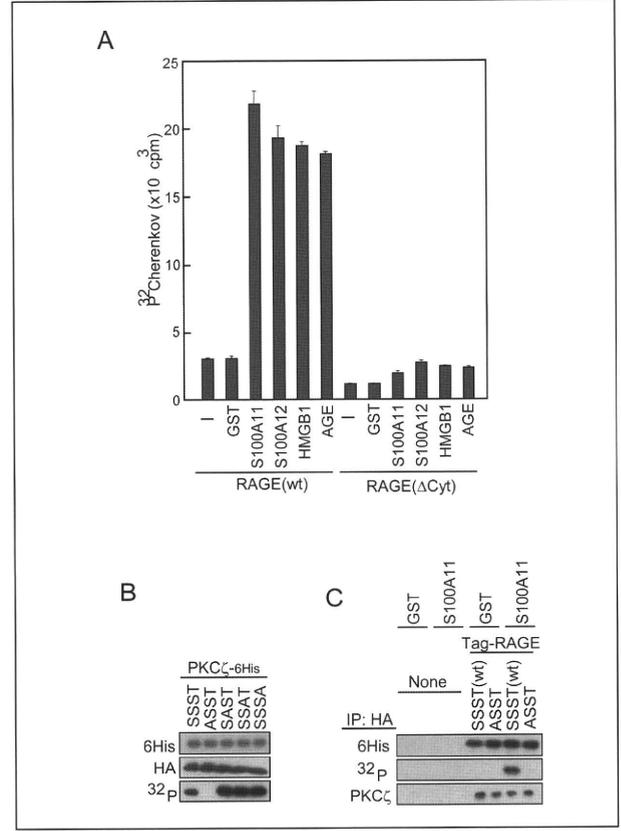


图 2

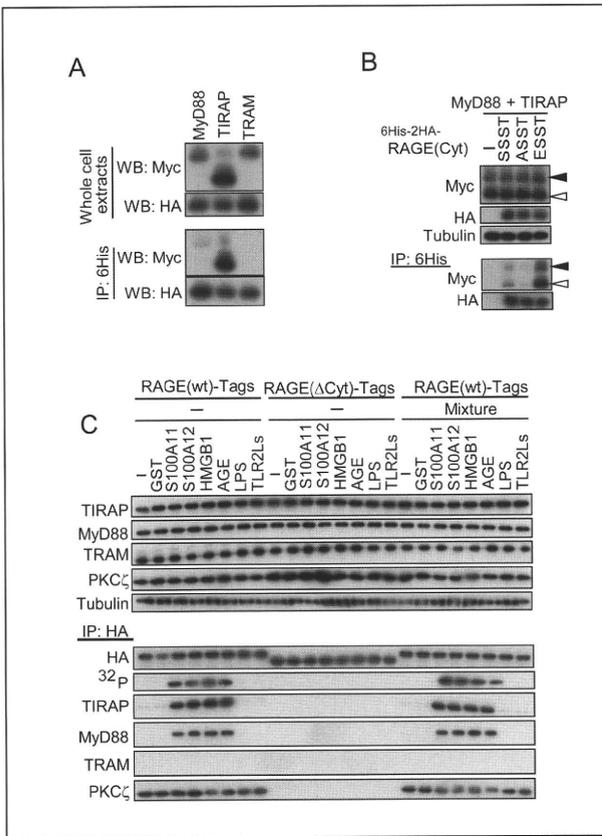


图 3

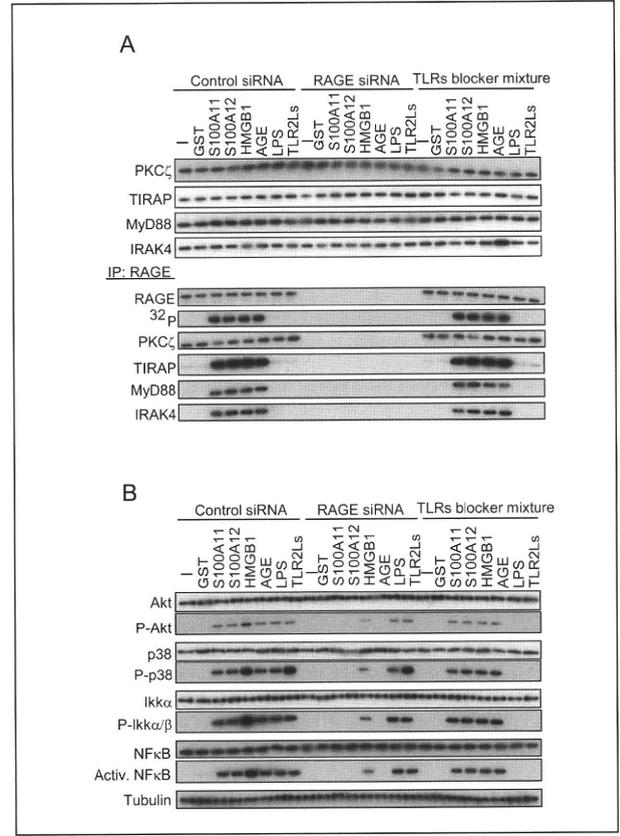


图 4

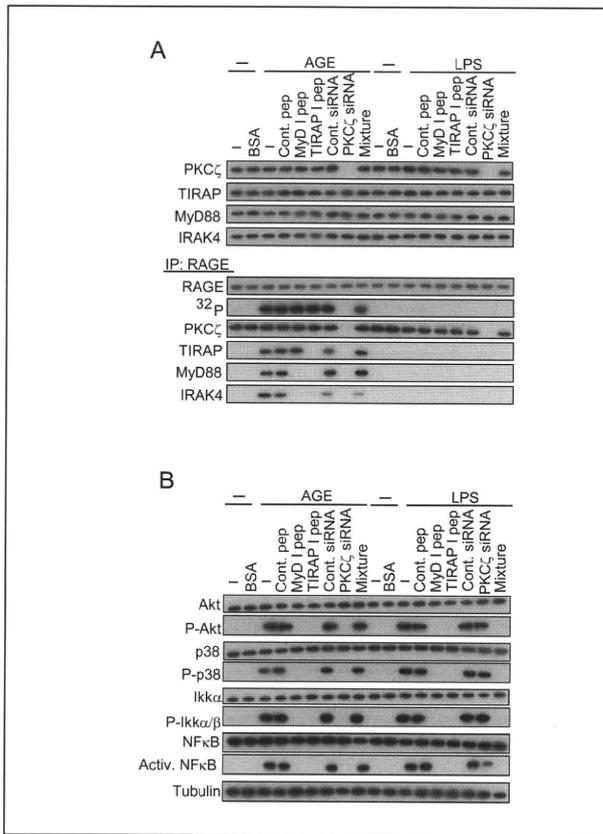


図 5

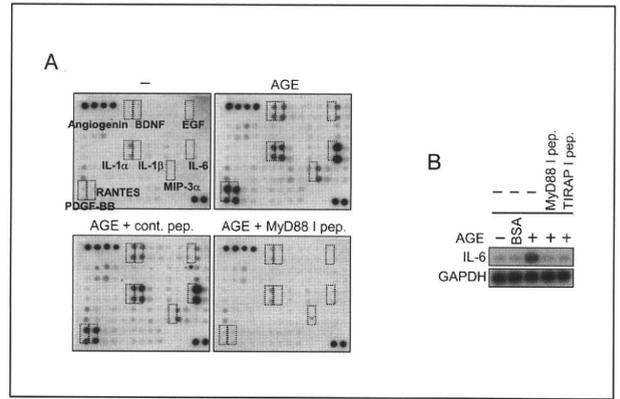


図 6

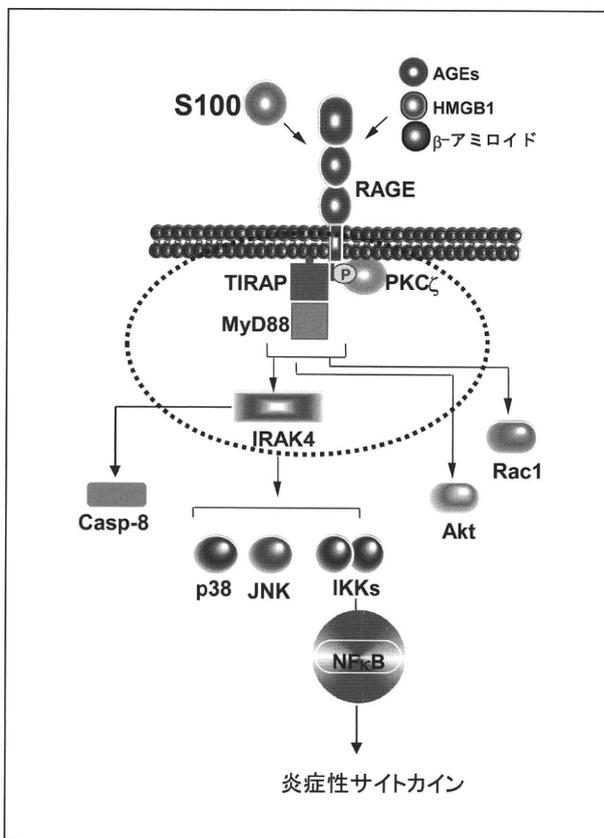


図 7

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（汎発型）の機序解析－脂質代謝とビタミンD3

研究分担者 照井 正 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野皮膚科学 教授

研究要旨 昨年度までの研究で、乾癬病変部では角層バリア機能が低下し、それにセラミドとフィラグリンの低下が関与していることを明らかにした。セラミドの産生に重要な酵素である serine palmytoyl transferase (SPT) と elongase of very long fatty acid (ELOVL) の誘導に活性型ビタミンD3が関係することから、活性型ビタミンD3がセラミドを介して角層バリア機能を制御している可能性が示唆されている。

本研究では、表皮細胞における CYP27B1（活性化ビタミンD3合成酵素）と CYP24（(活性化ビタミンD3の代謝酵素)）の役割を明確する目的で、CYP27B1とCYP24の発現ベクターを作成した。

共同研究者
葉山 惟大 日本大学 皮膚科

A. 研究目的

活性型ビタミンD3はケラチノサイトの増殖を抑制し、角化を誘導するため外用活性型ビタミンD3が乾癬の治療に使われている。また、皮膚でのビタミンD3産生を誘導する紫外線療法が乾癬に有効である。しかし、ケラチノサイト自身が産生する活性型ビタミンD3（1）の役割は、まだ、不明な点が多い。

これまでの研究で乾癬病変部の角層バリア機能がアトピー性皮膚炎と同様に低下していることが分かった（2, 3）。

アトピー性皮膚炎と異なるのは抗菌バリアで、アトピー性皮膚炎では cathelicidine と defensin の産生が正常より低下しているのに対して、乾癬では何れも産生が著明に増強している点である。1 MED を越える UVB は角層バリア機能を破壊するが、1/2 MED の UVB はむしろそれを増強することが示された。1/2 MED の UVB は、1 α -hydroxylase mRNA の発現を上昇させ、活性型ビタミンD3の産生を増加させる（2）。さらに、角層細胞間脂質の主要な酵素である SPT（セ

ラミド）や FAS（脂肪酸）の mRNA 発現を増加させる（2）。

これまで、ケラチノサイトに添加したビタミンD3の影響をみる実験が行われてきた。ケラチノサイト内で産生するビタミンD3の細胞増殖と分化に及ぼす役割について調べるのが目的である。その第一歩として、活性型ビタミンD3の産生と代謝に重要な酵素である Cyp27B1 と Cyp24A1 の発現プラスミドの作成を試みた。

B. 研究方法

実験1：発現プラスミドの作成

1) 合成した遺伝子 (Cyp27b1, Cyp24a1) を制限酵素 BamH I でベクターから取り出し、平滑化と脱リン酸処理をする。2) CAG プロモーターを有する発現ベクター (pCAGGS) をクローニングサイト内の制限酵素 (EcoR I) で切断し、平滑化と脱リン酸処理をする。3) 上記で調製した各 DNA 断片を Ligation する。Ligation 産物で E. coli (DH5 *a* など) を形質転換する。LB (+ Amp) プレートに生えてきたコロニーを LB (+ Amp) 培地で培養し、プラスミド DNA を調製。4) 連結方向の確認する：制限酵素の切断パターンの違い

を利用して目的遺伝子が所定の方向に挿入されている発現プラスミドを選択する。

実験2：作成したプラスミドの発現確認

得られた発現プラスミドを用いて、動物細胞 (NIH 3 T 3、ヒト由来のHK293) に Lipofectamine を使ってトランスフェクションし、RT-PCR と western blot 法 (WB) を用いて mRNA 及び蛋白レベルでの発現を確認する。

C. 研究結果

実験1

Cyp27b1, Cyp24a 1 遺伝子を合成し、制限酵素 BamH I でベクターから取り出し、平滑化と脱リン酸処理を行った。CAG プロモーターを有する発現ベクター (pCAGGS) をクローニングサイト内の制限酵素 (EcoR I) で切断し、平滑化と脱リン酸処理を行った。

調製した各 DNA 断片を ligation した後、E. coli (DH5 *a* など) を形質転換した。LB (+ Amp) 培地プレートに生えてきたコロニーを分離培養し、各プラスミド DNA を調製した。

制限酵素の切断パターンの違いを利用して目的遺伝子が所定の方向に挿入されているかどうかを確認した。Cyp27b 1 遺伝子では、所定方向なら 2.4 kb + 3.9 kb、逆方向なら 2.5 kb + 3.8 kb になることが想定されるが、図 1 に示すように所定の方向に連結されたクローンが 4 つ (No.3、4、10、15) 得られた。その中から No.3 の発現プラスミドを選択した。No.3 の発現プラスミドのインサート DNA についてシーケンス解析し、正しい配列であることを確認した。

Cyp24a 1 遺伝子では所定方向なら 2.7 kb + 3.6 kb、逆方向なら 2.2 kb + 4.1 kb となることが想定されるが、所定の方向に連結されたクローンが 6 つ (No.4、6、9、12、14、15) 得られた。その中から No.4 の発現プラスミドを選択した。No.4 の発現プラスミドについてインサート DNA についてシーケンス解析し、正しい配列であることを確認した (図

1)。

実験2

1) 一過性発現確認 (RT-PCR)

NIH 3 T 3 細胞へ遺伝子導入し、72 時間後の細胞を回収した。CYP24a 1 および CYP27b 1 の発現を確認するため RT-PCR を施行し、mRNA レベルでは両者の遺伝子発現が確認された (図 2)。

2) 一過性発現確認 (WB)

HK 293 細胞に遺伝子導入後、24、48、72、96 時間後に培養上清および細胞をサンプリングし、それぞれお WB で発現を確認した。その結果、Cyp27b1, Cyp24a 1 共に所定サイズ (56kD、59kD) に強いバンドが確認された (図 3)。

D. 考察

今回の実験で Cyp27b1, Cyp24a 1 の発現プラスミドを作製し、導入した細胞で Cyp27b1, Cyp24a 1 の増幅を RT-PCR と WB で確認した。

E. 結論

今後、これらの発現プラスミドを用いて、ケラチノサイトの増殖・分化に内因性の活性型ビタミン D 3 がどのように働いているのかを検討したい。

参考文献

1. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zugel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR 2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 117 : 803-11, 2007.
2. Hong SP, Kim MJ, Jung MY, Jeon H, Goo J, Ahn SK, Lee SH, Elias PM, Choi EH. Biopositive effects of low-dose UVB on epidermis : coordinate upregu-

lation of antimicrobial peptides and permeability barrier reinforcement. *J Invest Dermatol* 128 : 2880-7, 2008.

3. Egawa M, Kunizawa N, Hirao T, Yamamoto T, Sakamoto K, Terui T, Tagami H. In vivo characterization of the structure and components of lesional psoriatic skin from the observation with Raman spectroscopy and optical coherence tomography : A pilot study. *J Dermatol Sci*. 57 : 66-69, 2009.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし.

G. 研究発表 (平成22年度)

論文発表

1. Asahina A, Nakagawa H, Etoh T, Ohtsuki M, Terui T, et al. Adalimumab in Japanese patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis : efficacy and safety results from a Phase II/III randomized controlled study. *J Dermatol* 37 (4) : 299-310, 2010.
2. Kitahata Y, Nunomura S, Terui T, Ra C. Prolonged culture of mast cells with high-glucose medium enhances the Fc epsilon RI-mediated degranulation response and leukotriene C4 production. *Int Arch Allergy Immunol* 152 (Suppl 1) : 22-31, 2010.
3. Torii H, Nakagawa H, Iizuka H, Terui T et al. Infliximab monotherapy in Japanese patients with moderate-to-severe plaque psoriasis and psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Dermatol Sci* 59 (1) : 40-9, 2010. 5.
4. Hayama K, Inadomi T, Fujisawa D, Terui T. A pilot study of medium-dose cyclosporine for the treatment of palmo-plantar pustulosis complicated with

pustulotic arthro-osteitis. *Eur J Dermatol* 20 (6) : 758-62, 2010 (Nov-Dec).

5. 大槻マミ太郎、照井 正、小澤 明、森田明理、佐野栄紀、高橋英俊、小宮根真弓、江藤隆史、鳥居秀嗣、朝比奈昭彦、根本 治、中川秀己、日本皮膚科学会生物学的製剤検討委員会. 乾癬におけるTNF α 阻害薬の使用指針および安全対策マニュアル 日皮会誌 120 (2) : 163-171, 2010.02
6. 岩月啓氏、照井 正、小澤 明、小宮根真弓、梅澤慶紀、鳥居秀嗣、中西 元、原 弘之、馬淵智生、青山裕美、北島康雄、日本皮膚科学会. 日本皮膚科学会ガイドライン 膿疱性乾癬 (汎発型) 診療ガイドライン2010 TNF α 阻害薬を組み入れた治療指針 (簡略版). ¥日皮会誌 120 (4) : 815-839, 2010.03
7. 照井 正. 病態・治療Q & A 乾癬治療の最前線 膿疱性乾癬と乾癬性紅皮症の治療についてお教えてください 臨床のあゆみ 83 : 14, 2010.03
8. 照井 正. 掌蹠膿疱症. 薬局で役立つ皮膚科治療薬 FAQ 編集 : 大谷道輝、宮地良樹. メディカルレビュー社(東京) pp70-71, 2010.3.25.
9. 照井 正. 膿疱性乾癬 (汎発型) ガイドラインを読む. What's new in 皮膚科学 2010-2011. 編集 : 宮地良樹. メディカルレビュー社 (東京) pp74-75, 2010.4.15.
10. 照井 正. 進行性多巣性白質脳症(PML)と抗体治療薬. *Visual Dermatology* 9 (8) : 846, 2010.07
11. 照井 正. レチノイド療法、活性型ビタミンD3療法とその機序. *アレルギー・免疫* 18 (1) : 83-87, 2011.01

学会発表

1. 照井 正. 教育講演30 乾癬・掌蹠膿疱症の新しい病因論と治療. 膿疱性乾癬 (汎発型) ガイドライン. 第109回日本皮膚

科学会総会、大阪、2010年4月16～18日。

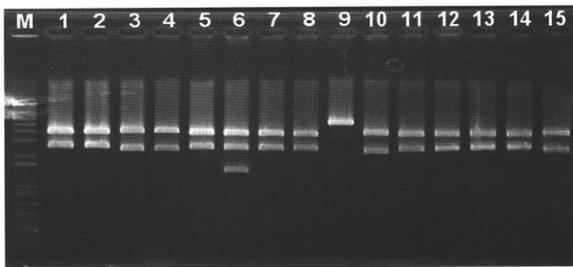
2. 照井 正. 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業・稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班・「膿疱性乾癬」分科会からの報告. 第25回日本乾癬学会総会、宇部、2010年9月3～4日.
3. Terui T. Therapeutic guidelines for generalized pustular psoriasis (GPP) based on unique diagnostic criteria and classification of disease severity 2010.

The First Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, September 30 ~ October 3, 2010.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し

Cyp27b1



Cyp24a1

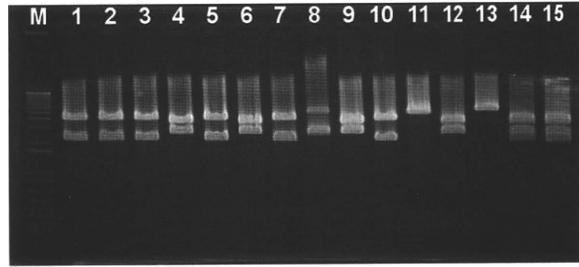


図1. 作成した発現プラスミドの確認と選択

Cyp27b1: 所定方向なら2.4 kb + 3.9 kb、逆方向なら2.5 kb + 3.8 kbとなる。所定の方向に連結されたクローンが4つ（No.3、4、10、15）得られた。No.3の発現プラスミドを選択した。

Cyp24a1: 所定方向なら2.7 kb + 3.6 kb、逆方向なら2.2 kb + 4.1 kbとなる。所定の方向に連結されたクローンが6つ（No.4、6、9、12、14、15）得られた。No.4の発現プラスミドを選択した。