

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

劣性栄養障害型表皮水疱症患者における遺伝子型－表現型の相互関係の解析

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分野 教授

研究要旨 劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）患者の多くはCOL7A1遺伝子に複合ヘテロ接合変異を有するため、各々のCOL7A1遺伝子変異が、どの様な表現型を呈するか解析することは通常困難である。今回我々は、VII型コラーゲンの発現が完全欠損となるCOL7A1遺伝子変異を片方のアリルに持つ複合ヘテロ接合変異RDEB患者を集積し、対立遺伝子から生じる変異VII型コラーゲンの生理機能の解析を行った。日本人に頻発し、COL7発現の完全欠損をきたす早期終止コドン変異を片方のアリルに持つRDEB患者は12名で、対立遺伝子で生じた変異がナンセンス変異、欠失変異、スプライスサイト変異のいずれかの場合、免疫組織学的検査においてCOL7の発現量と重症度は相関していた。しかし、ミスセンス変異を有する患者では、いずれもCOL7発現量と重症度に相関関係は認めなかった。

共同研究者

西江 渉 北海道大学 皮膚科
新熊 悟 北海道大学 皮膚科

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症（DEB）は表皮直下に存在する係留線維の構成タンパクであるVII型コラーゲン（COL7）に異常を呈する表皮水疱症の一型である。DEBは常染色体優性遺伝形式をとる優性栄養障害型表皮水疱症と常染色体劣性遺伝形式をとる劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）に大別される。RDEB患者の多くはCOL7をコードするCOL7A1遺伝子に複合ヘテロ接合変異を有するため、各々のCOL7A1遺伝子変異が、どの様な表現型を呈するか解析することは通常困難である。

本研究の目的はCOL7の発現が完全欠損となるCOL7A1遺伝子変異を片方のアリルに有する患者を抽出し、その対立遺伝子のみから産生される異常COL7の解析を行うことにより、単一の変異COL7の生物学的機能を解明することである。

B. 研究方法

日本人に頻発し、COL7発現の完全欠損をきたす早期終止コドン変異（c.5818delC、c.6573+1G>C）を片方のアリルに持つRDEB患者12名を対象に免疫組織学的手法を用いて、遺伝子型－表現型の相互関係について解析を行った。

C. 研究結果

早期終止コドン変異（c.5818delC、c.6573+1G>C）を片方のアリルに持つRDEB患者12名中、対立遺伝子にナンセンス変異を有する患者は3名、欠失変異を有する患者は2名、スプライスサイト変異を有する患者は2名、ミスセンス変異を有する患者は5名であった（表1）。

対立遺伝子にナンセンス変異を有する3名の患者は全てE2857Xを認めた。E2857Xでは免疫組織学的検査においてCOL7発現量の軽度の低下を認めたが、3名の患者とも臨床症状は比較的軽症であった（図1）。

対立遺伝子に欠失変異を有する2名の患者ではそれぞれ早期終止コドン変異を誘導するc.1474delG、c.5756delGを認めた。COL7はほ

ぼ欠損し、最重症な臨床症状を呈していた(図2)。

スプライスサイト変異を有する患者2名は、それぞれc.7272G>A、c.8109+2T>Aを認めた。臨床症状は比較的軽症から中等症で、免疫組織学的検査においてCOL7発現量は著明に減少していた(図3)。

ミスセンス変異を有する患者では、ほとんどの症例で、COL7の発現量はほぼ正常ないし軽度低下している程度であったが、R2063WやG2316Rを有する患者の臨床症状は非常に重篤であり、G1815RもしくはG2623Sを有する患者では中等症～重症、R1957Qを有する患者では非常に軽症であった(図4)。

D. 考察

COL7発現の完全欠損をきたす早期終止コドン変異を片方のアリルに持つRDEB患者において、その対立遺伝子に生じた変異がナンセンス変異、欠失変異、スプライスサイト変異のいずれかの場合、免疫組織学的検査におけるCOL7の発現量と臨床重症度は相関していた。一方、対立遺伝子にミスセンス変異を有する患者では、COL7発現量と重症度に相関関係は認めず、ミスセンス変異を有するRDEB患者では重症度は変異によって産生された各々の変異COL7の機能と強い相関関係があると考えられた。

E. 結論

COL7の発現が完全欠損となるCOL7A1遺伝子変異を片方のアリルに有する患者を解析することにより、その対立遺伝子のみから産生される変異COL7の生物学的機能を解明することが可能であった。

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. Ujiie H, Nishie W, Shimizu H: Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin*, in press.
2. Nakamura H, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Sawamura D, Akiyama M, Shimizu H: DNA-based Prenatal Diagnosis of Plectin-deficient Epidermolysis Bullosa Simplex Associated with Pyloric Atresia. *Int J Dermatol*, in press.
3. Kikuchi K, Natsuga K, Shinkuma S, Nishie W, Kajita S, Sato H, Shimizu H: Subepidermal blistering disease with three distinct autoantibodies: anti-BP230, anti-laminin gamma-1, and anti-laminin-332. *J Am Acad Dermatol*, in press.
4. Lin HY, Yanagi T, Akiyama M, Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, Arita K, Shimizu H: Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies against type VII collagen and laminin-332. *Br J Dermatol*, in press.
5. 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 antibody-initiated tissue damage by using recombinant Fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *Am J Pathol* 176: 914-925, 2010.
6. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H: What's new in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 37: 194-204, 2010.
7. 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* 184: 2166-2174, 2010.

8. Shinkuma S, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H : Epidermolysis bullosa in Japan. *Dermatol Clin* 28 : 431-432, xvi, 2010.
9. Shimizu S, Natsuga K, Shinkuma S, Yasui C, Tsuchiya K, Shimizu H : Localized Linear IgA/IgG Bullous Dermatitis. *Acta Derm Venereol* 90 : 621-624, 2010.
10. 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* 90 : 165-169, 2010.
11. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H : A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20 : 74-76, 2010.
12. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Shibata M, Nishimura M, Hashimoto T, Shimizu H : Circulating IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 162 : 513-517, 2010.
13. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H : Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat* 31 : E1687-1698, 2010.
14. Natsuga K, Nishie W, Arita K, Shinkuma S, Nakamura H, Kubota S, Imakado S, Akiyama M, Shimizu H : Complete paternal isodisomy of chromosome 17 in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol* 130 : 2671-2674, 2010.
15. 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* 31 : 308-316, 2010.
16. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao HJ, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long HA, Nishie W, Shimizu H : Human IgG1 Monoclonal Antibody against Human Collagen 17 Non-collagenous 16A Domain Induces Blisters via Complement Activation in Experimental Bullous Pemphigoid Model. *J Immunol* 185 : 7746-7755, 2010.
17. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H : Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 14345-14350, 2010.

学会発表

1. Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito K, Shimizu H : New insight into genotype-phenotype correlation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a range of COL7A1 missense mutations. 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 2010/9/8-11
2. Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Na-

kamura H, Ito K, Akiyama M, Shimizu H : Distinctive anchoring fibril structures produced by different COL7A1 mutations. 37th Annual meeting of the SOCIETY FOR CUTANEOUS ULTRASTRUCTURE RESEARCH Helsinki, Finland , 2010/9/7-8

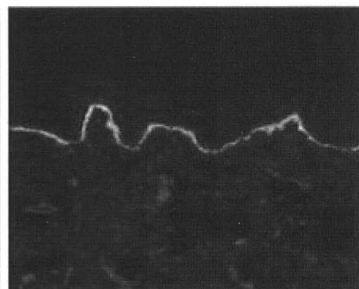
3. 新熊 悟、西江 渉、夏賀 健、伊藤 圭、中村秀樹、清水 宏：劣性栄養障害型表皮水疱症患者における遺伝子型-表現型の相互関係の解析. 日本皮膚科学会第383回北海道地方会、札幌、2010/8/28

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

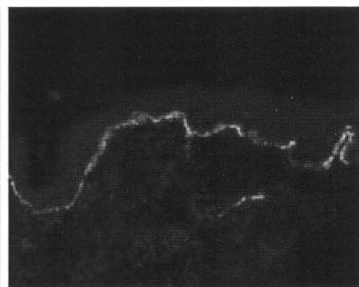
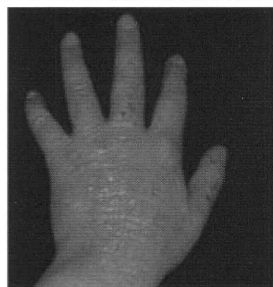
Case No.	Age/Sex	Allele 1	Allele 2	Consequence	Phenotype	IF
<i>Nonsense</i>						
1	17/M	E2857X	c.6573+1G>C	PTC/PTC	Moderate	++
2	9/F	E2857X	c.6573+1G>C	PTC/PTC	Moderate	++
3	43/M	E2857X	c.5818delC	PTC/PTC	Moderate	++
<i>Deletion</i>						
4	0/M	c.1474del8	c.5818delC	PTC/PTC	Most severe	-
5	0/M	c.5756delG	c.6573+1G>C	PTC/PTC	Most severe	-
<i>Splice site</i>						
6	60/F	c.7272G>A	c.6573+1G>C	Spl/PTC	Moderate	+
7	0/F	c.8109+2T>A	c.5818delC	Spl/PTC	Moderate severe	+
<i>Missense</i>						
8	0/M	R2063W	5818delC	Mis/PTC	Most severe	++
9	0/F	G2316R	6573+1G>C	GS/PTC	Most severe	++
10	44/F	G1815R	5818delC	GS/PTC	Moderate severe	++
11	1/M	G2623S	5818delC	GS/PTC	Moderate severe	+
12	5/M	R1957Q	6573+1G>C	Mis/PTC	Mild	+++

表1 劣性栄養障害型表皮水疱症患者12例のまとめ

Case 1
E2857X



Case 2
E2857X



Case 3
E2857X



図1 対立遺伝子にナンセンス変異を有する患者の臨床症状および免疫組織学的検査

Case 4
c.1474del8



Case 5
c.5756delG



図2 対立遺伝子に欠失変異を有する患者の臨床症状および免疫組織学的検査



図3 対立遺伝子にスプライスサイト変異を有する患者の臨床症状および免疫組織学的検査

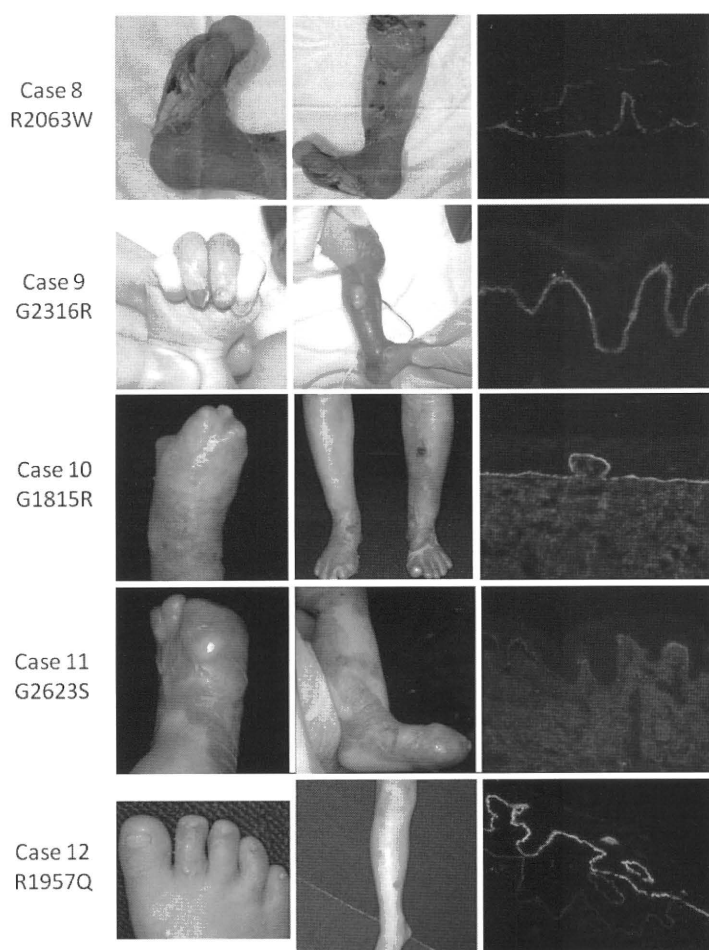


図4 対立遺伝子にミスセンス変異を有する患者の臨床症状および免疫組織学的検査

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研究：現状と今後の展望

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 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
込山 悦子、高木 敦
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関与している。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。さらにAtg7ノックアウトマウスについて検討を加えた。

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）。

Atg7はオートファゴソーム形成に必須の

遺伝子であり、これをノックアウトしたマウスはオートファジー機能を失った状態にある。生下時のマウスにはっきりとした形態異常はみられなかった (data not shown)。残念ながら1日しか生存期間がなく、その長期間の観察はかなわなかった。なお、Atg7 ノックアウトマウスは東京都臨床研の田中先生、小松先生の寄与による。

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。

オートファジーノックアウトマウスについては今後、SCID マウスへ移植し、長期間観察することを考えている。

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, Kamiyo 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

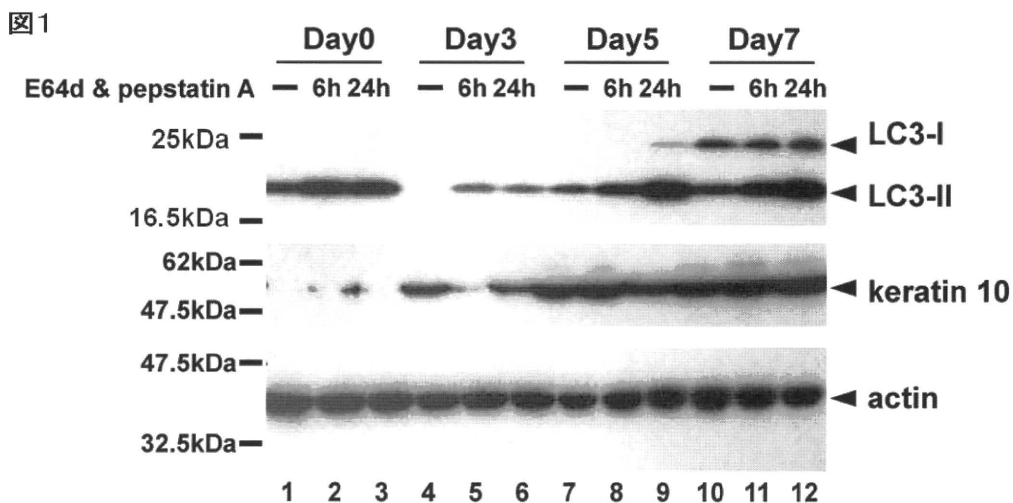


図1. 培養ヒト表皮角化細胞において、角化とともにLC3-IIの発現の増加を認める。

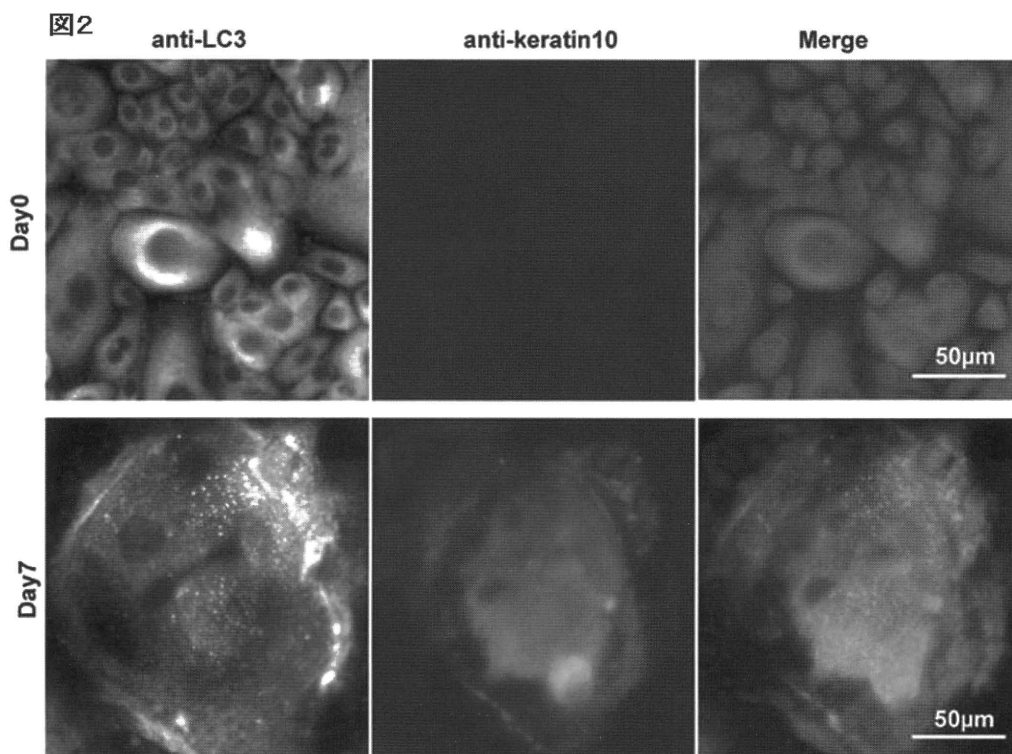


図2. 培養ヒト表皮角化細胞において、Day7ではLC3の強い発現を認める。

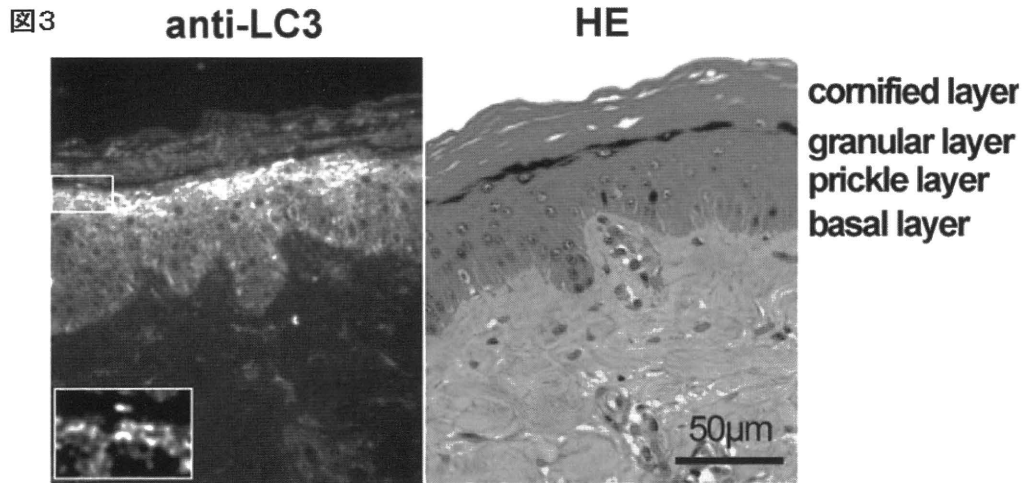


図3. 正常ヒト表皮において、顆粒層でLC3の強い発現を認める

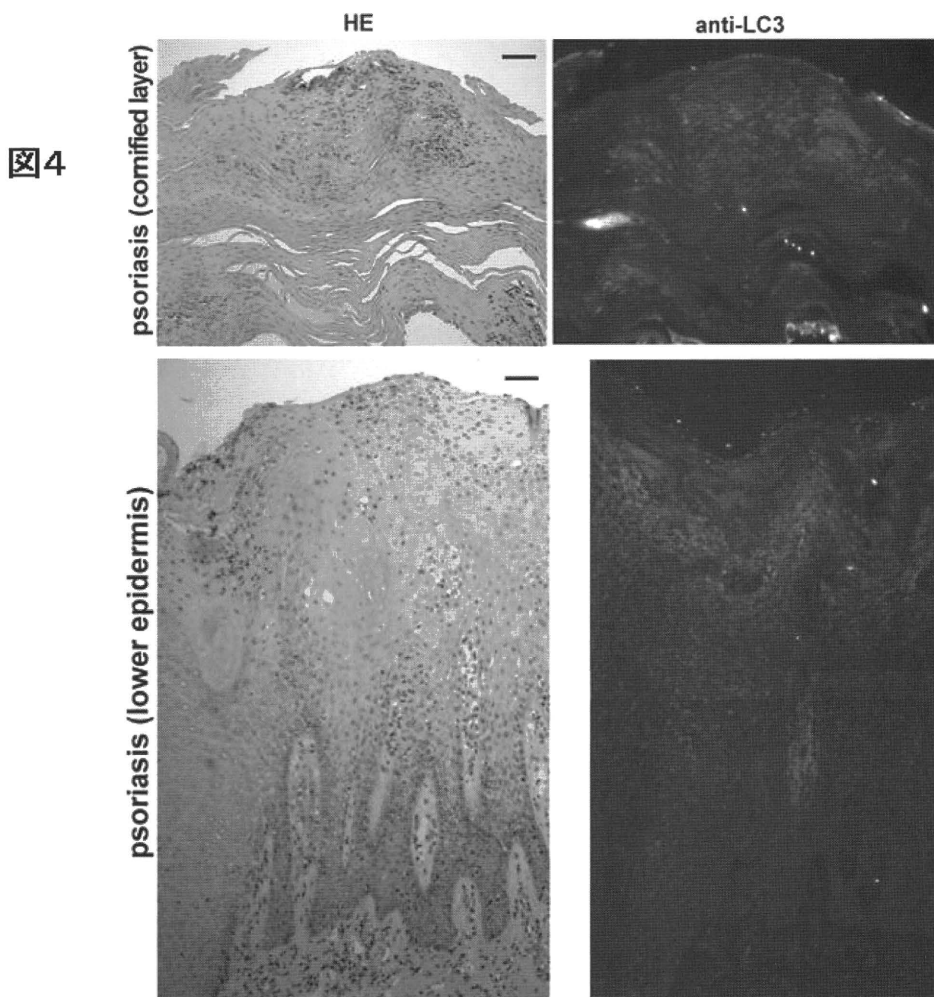


図4. ヒト乾癬患者の表皮において、正常ヒト表皮と比べてLC3発現の減弱を認める。

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

魚鱗癬様紅皮症の角層肥厚機序の解明へむけて
①正常角層の剥離機構の解明

研究分担者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 准教授

研究要旨 魚鱗癬群に属する疾患では角層は厚くなっているが、これは剥離機構が正常と異なっているためと考えられる。この理由を理解するためにまず正常の角層剥離の機構を知ることが必要である。我々は本班の過去の発表で細胞接着構造は細胞中央部分においては角層下層から分解されるが、辺縁部分では上層にいたるまで温存されることを報告した。今回はこの部位による分解過程の差が何によるのかを検討した。Tight junction (TJ) は細胞膜を先端膜と基底側膜に区分することが知られているので、角層のデスモゾーム（コルネオデスモゾーム）の分解過程がTJとの位置関係によって規定される可能性を考えた。ヒト正常皮膚のTJの局在を電顕法と免疫染色によって解析したところ従来は顆粒層のみに存在するとされていたが、角層においても存在することが示唆された。また、TJより中央側のコルネオデスモゾームは角層剥離酵素により分解されやすいことも示唆された。

共同研究者
井川 哲子（旭川医大皮膚科）

A. 研究目的

魚鱗癬群に属する疾患では角層は厚くなっているが、これは剥離機構が正常と異なっているためと考えられる。この理由を理解するためにまず正常の角層剥離の機構を知ることが必要である。我々は本班の過去の発表で細胞接着構造は細胞中央部分においては角層下層から分解されるが、辺縁部分では上層にいたるまで温存されることを報告した。今回はこの部位による分解過程の差が何によるのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

研究方法はG研究発表の論文1に詳述した。

C. 研究結果

研究結果の詳細はG研究発表の論文1に詳述した。主な成果を以下に列記する。

正常皮膚では従来TJは顆粒細胞層にのみ

認められていた。しかし今回の形態的、および免疫電顕的研究により、角層内にもTJ構造が存在することが示された（図1）。また剥離角層を用いた水溶性トレーサーの浸透実験を行ったところ、角層内TJが細胞間物質輸送のバリアとして働くことも示された。また角層剥離酵素もTJ部分より外側には浸透しないことが示唆された。以上の結果から、角層細胞の剥離機構に関する、著者らの新しい解釈を提唱した（図2）。

D. 考察

正常皮膚の角層では細胞接着が細胞辺縁部分ではTJに守られているため分解を受けにくいことが示唆された。これにより角層は多層化して物理的に強固なバリアとなることができると考えられる。一方、水分バリアとしては角層細胞間脂質層が重要な働きをしているが、これも細胞辺縁での接着構造に囲まれてシート状に非細胞辺縁部分に脂質層が形成されることで説明される。

多くの魚鱗癬様紅皮症では水分バリアの低

下を補うために角層が代償性に肥厚すると考えられている。逆にいうと水分バリアを他の方法で補うことができれば角層の肥厚が避けられると推察される。

E. 結論

正常皮膚の角層の剥離機序を解明することにより、魚鱗癬様紅皮症の角層肥厚の機序の解明とその解消への手がかりが得られた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Igawa S, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Takahashi H, Iizuka H, Ishida-Yamamoto A. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol*, 20 : 53-57, 2011
2. Murakami M, Ohtake T, Horibe Y, Ishida-Yamamoto A, Morhenn VB, Gallo RL, Iizuka H. Acrosyringium is the main site of the vesicle/pustule formation in palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*, 130 : 2010-2016, 2010
3. Kuroda S, Kurasawa M, Mizukoshi K, Maeda T, Yamamoto T, Oba A, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A. Perturbation of lamellar granule secretion by sodium caprate implicates epidermal tight junctions in lamellar granule function. *J Dermatol Sci*, 59 : 107-114, 2010
4. Fuchs-Telem D, Stewart H, Rapaport D, Nousbeck J, Gat A, Gini M, Lugassy Y, Emmert S, Eckl K, Hennies HC, Sarig O, Goldsher D, Meilik B, Ishida-Yamamoto A, Horowitz M, Sprecher E. CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br J Dermatol*, 2010 Nov 12.doi : 10.1111/j.1365-2133.2010.10133.x. [Epub ahead of print]
5. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT, Chen M, Riddle MJ, Osborn MJ, Lund T, Dolan M, Blazar BR, Tolar J. Bone Marrow Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *New England Journal of Medicine*, 363 : 629-39, 2010
6. Oji V, Tadini G, Akiyama M, Bardou CB, Bodemer C, Bourrat E, Coudiere P, Digiovanna JJ, Elias P, Fischer J, Fleckman P, Gina M, Harper J, Hashimoto T, Hausser I, Hennies HC, Hohl D, Hovnanian A, Ishida-Yamamoto A, Jacyk WK, Leachman S, Leigh I, Mazereeuw-Hautier J, Milstone L, Morice-Picard F, Paller AS, Richard G, Schmuth M, Shimizu H, Sprecher E, Van Steensel M, Taieb A, Toro JR, Vabres P, Vahlquist A, Williams M, Traupe. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses : Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J Am Acad Dermatol*, 63 : 607-41, 2010
7. Tsuruta D, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Imanishi H, Mizuno N, Sowa J, Kobayashi H, Ishii M, Kurokawa I, Shimizu H. Three-base deletion mutation c.120_122delGTT in ATP 2 A 2 leads to the unique phenotype of comedonal Darier disease. *Br J Dermatol*, 162 : 687-689, 2010
8. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation. *Medical Molecular Morphology*, in press.
9. 山本明美. フィラグリンとは. *皮膚アレルギーフロンティア*, 8 ; 1 : 13-17, 2010

10. 山本明美. 遺伝性角化症. MB Derma, 163 : 13-23, 2010
11. 山本明美、井川哲子、岸部麻里. 皮膚疾患の病態 新しい角層モデル. 臨床皮膚科, 64 : 36-39, 2010

学会発表

1. 山本明美. 皮膚病理へのいざない<その2> 2. 角化異常症. 第109回日本皮膚科学会総会 教育講演, 2010、4、16-17、大阪国際会議場、大阪府

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし。

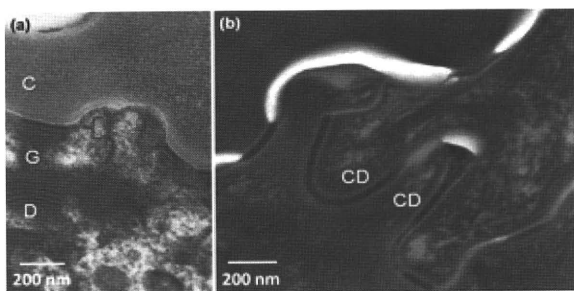


図1 正常ヒト皮膚の顆粒層 (a) と角層 (b) における TJ 構造。
 C, cornified cell. G, granular cel. CD, corneodesmosome.

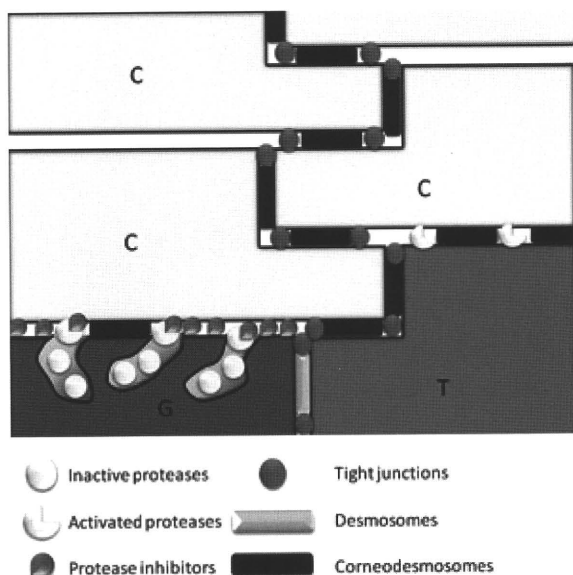


図2 正常皮膚の角層剥離機序の新仮説。角層の剥離酵素は顆粒細胞の尖端膜側から分泌される。はじめはそれらの inhibitor が結合することによって活性化が抑えられている。やがてその結合が外れて活性化されると、コルネオデスモゾームを分解し始める。しかし細胞縁のコルネオデスモゾームは TJ によりシールドされているため剥離酵素の作用がおよばず、角層細胞は周囲の細胞と縁でのみ接着を維持しながら堆積することが可能となる。コルネオデスモゾームが分解された非縁部分は細胞間脂質が層状に広がって水分バリアが形成される。
 C, cornified cell. G, granular cell. T, transitional cell.

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

粘着テープ剥離角層サンプルの免疫染色による非水疱型魚鱗癬様紅皮症の鑑別診断

研究分担者 山本明美 旭川医科大学皮膚科 准教授

研究要旨 魚鱗癬群に属する疾患には様々な臨床型があり、鑑別診断はときに困難である。特定の施設による遺伝子診断が必要なこともしばしばある。ネザートン症候群は非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床像を呈することもあり、本症に特徴的な毛髪異常が見つからない場合、正確な診断は難しい。今回我々は、患者に負担の少ない魚鱗癬のスクリーニング法として粘着テープ剥離角層サンプルを用いた免疫染色の有用性を検討した。方法として、すでに遺伝子診断により診断が確定しているネザートン症候群の患者1名の角層を粘着テープにより剥離し、細胞間接着分子の発現と局在を蛍光抗体法により検討した。その結果、ネザートン症候群では正常人、尋常性魚鱗癬、アトピー性皮膚炎と比較して染色パターンの不均一性が特徴的であった。

共同研究者
井川 哲子（旭川医大皮膚科）

A. 研究目的

魚鱗癬群に属する疾患には様々な臨床型があり、鑑別診断はときに困難である。特定の施設による遺伝子診断が必要なこともしばしばある。ネザートン症候群は非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床像を呈することもあり、本症に特徴的な毛髪異常が見つからない場合、正確な診断は難しい。今回我々は患者に与える侵襲が少なく、かつ特別な研究装置や技術がなくても施行可能な魚鱗癬の鑑別診断に有用な方法を検討する。

B. 研究方法

対象：①Netherton症候群の20代女性患者（詳細は既報告：Ishida-Yamamoto, et al. J Invest Dermatol, 124；360-366, 2005）。右上腕内側の比較的健常な皮膚。②比較対象として正常皮膚（20代女性，右上腕内側）、アトピー性皮膚炎（34歳女性，右上腕内側：無疹部）、尋常性魚鱗癬（34歳女性，右前腕内側）を用いた。

方法：Naoeらの方法（Naoe Y, et al. J Dermatol Sci, 2010；57：192-198）に準じ、NICHIBAN両面テープで角層を1回剥がし、コルネオデスモゾームを構成する蛋白を蛍光抗体法を用いて染色した。具体的にはデスマグレイン1（Dsg1）とコルネオデスモシン（Cdsn）の二重染色とデスマコリン1（Dsc1）の単染色を施行し、染色パターンと角層細胞の剥離パターンを比較した。

使用した1次抗体：ウサギポリクローナルCdsn抗体（Descargues P, et al. J Invest Dermatol, 2006；126：1622-1632）、マウスモノクローナルDSG1抗体（Dsg-1-P23, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany）、ヤギポリクローナルDSC1抗体（L-15, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）。

使用した2次抗体：highly cross-absorbed Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG（Molecular Probes Eugene, OR）、Cy3-labeled goat anti-rabbit IgG（Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK）、Alexa-Fluor 546 donkey anti-goat IgG（Molecular Probes）。

C. 研究結果

Netherton症候群とその他の皮膚では異なる剥離様式とコルネオデスモゾーム蛋白の染色性が見られた。すなわちNetherton症候群ではブロック状に角層が剥がれる傾向があった。また、Netherton症候群では多様なコルネオデスモゾーム蛋白染色パターンを呈したが(図1)、正常皮膚や他の疾患では基本的には主に各細胞の辺縁に分布していた(図2)。

D. 考察

Netherton症候群では、角層がシート状ではなく、厚みをもったブロック状に剥がれ、細胞間の接着が低下している状況を反映していると考えられた。コルネオデスモゾーム構成蛋白の染色パターンは、Netherton症候群では多彩であったことから、コルネオデスモゾームの規則的な分解過程の消失が示唆された。

今後は研究に協力いただける症例があれば、Netherton症候群との鑑別がむずかしい非水疱型魚鱗癬様紅皮症での解析を行いたい。

E. 結論

魚鱗癬様紅皮症を呈する疾患の患者負担の少ない診断、病態解明の方法として、角層を粘着テープで剥離し、剥離様式やコルネオデスモゾーム成分の分布を調べる方法は有用であるかもしれない。これは今後、症例を増やして確認する必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成22年度)

論文発表

1. Igawa S, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Takahashi H, Iizuka H, Ishida-Yamamoto A. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol*, 20 : 53-57, 2011
2. Murakami M, Ohtake T, Horibe Y, Ishida-Yamamoto A, Morhenn VB, Gallo RL, Iizuka H. Acrosyringium is the main site of the vesicle/pustule formation in palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*, 130 : 2010-2016, 2010
3. Kuroda S, Kurasawa M, Mizukoshi K, Maeda T, Yamamoto T, Oba A, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A. Perturbation of lamellar granule secretion by sodium caprate implicates epidermal tight junctions in lamellar granule function. *J Dermatol Sci*, 59 : 107-114, 2010
4. Fuchs-Telem D, Stewart H, Rapaport D, Nousbeck J, Gat A, Gini M, Lugasys Y, Emmert S, Eckl K, Hennies HC, Sarig O, Goldsher D, Meilik B, Ishida-Yamamoto A, Horowitz M, Sprecher E. CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br J Dermatol*, 2010 Nov 12.doi : 10.1111/j.1365-2133.2010.10133.x. [Epub ahead of print]
5. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT, Chen M, Riddle MJ, Osborn MJ, Lund T, Dolan M, Blazar BR, Tolar J. Bone Marrow Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *New England Journal of Medicine*, 363 : 629-39, 2010
6. Oji V, Tadini G, Akiyama M, Bardoni CB, Bodemer C, Bourrat E, Coudiere P, Digiovanna JJ, Elias P, Fischer J, Fleckman P, Gina M, Harper J, Hashimoto T, Hausser I, Hennies HC, Hohl D, Hovnanian A, Ishida-Yamamoto A, Jacyk WK, Leachman S, Leigh I, Mazereeuw-Hautier J, Milstone L, Morice-Picard F, Paller AS, Richard G, Schmuth M, Shimizu H, Sprecher E, Van Steensel M, Taieb A, Toro

- JR, Vabres P, Vahlquist A, Williams M, Traupe. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses : Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J Am Acad Dermatol*, 63 : 607-41, 2010
7. Tsuruta D, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Imanishi H, Mizuno N, Sowa J, Kobayashi H, Ishii M, Kurokawa I, Shimizu H. Three-base deletion mutation c.120_122delGTT in ATP2A2 leads to the unique phenotype of comedonal Darier disease. *Br J Dermatol*, 162 : 687-689, 2010
 8. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation. *Medical Molecular Morphology*, in press.
 9. 山本明美. フィラグリンとは. *皮膚アレルギーフロンティア*, 8 ; 1 : 13-17, 2010
 10. 山本明美. 遺伝性角化症. *MB Derma*, 163 : 13-23, 2010
 11. 山本明美, 井川哲子, 岸部麻里. 皮膚疾患の病態 新しい角層モデル. *臨床皮膚科*, 64 : 36-39, 2010

学会発表

1. 山本明美. 皮膚病理へのいざないくその2 > 2. 角化異常症. 第109回日本皮膚科学会総会 教育講演, 2010、4、16-17、大阪国際会議場、大阪府

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

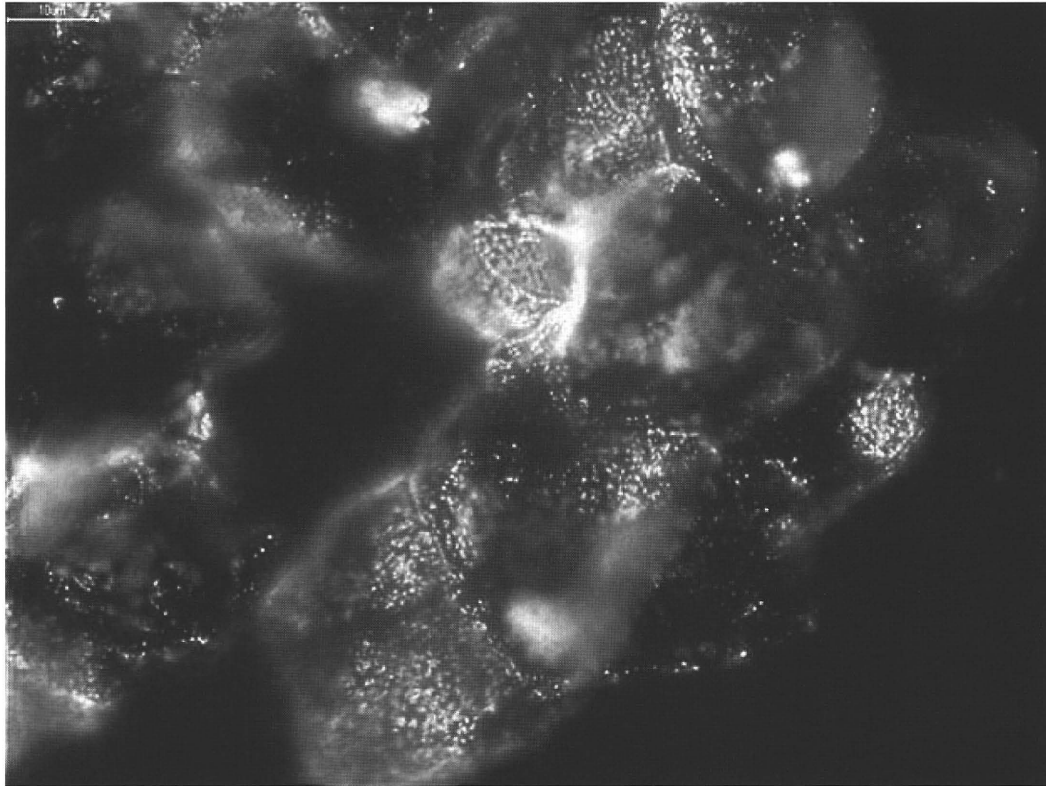


図1 Netherton症候群の角層のデスモグレイン1の分布

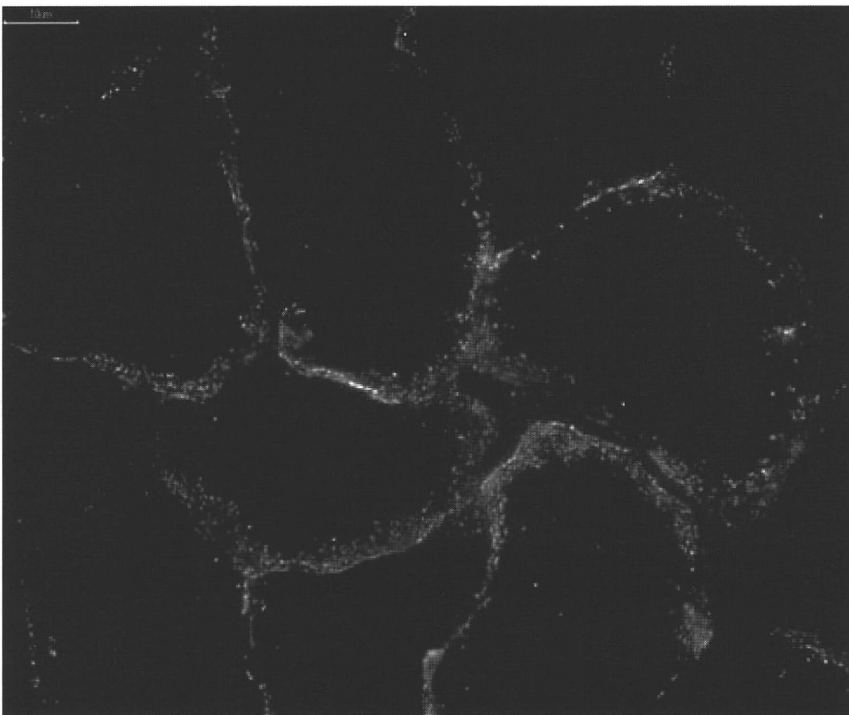


図2 正常皮膚の角層のデスモグレイン1の分布

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

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の皮疹形成におけるケラチンK1変異の関与
機械的刺激によるIL-33の発現誘導について

研究分担者 小宮根真弓 自治医科大学皮膚科学 准教授

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）においてケラチンK1遺伝子変異がどのように皮疹形成に関与しているのかを探るため、正常人表皮角化細胞に野生型ケラチンK1および変異ケラチンK1を導入して機械的刺激を加え、これまでに機械的刺激によって、プロスタグランジンE2、IL-8、IL-18などのマスト細胞活性化因子が産生誘導されること、変異ケラチン導入細胞では正常ケラチン導入細胞にくらべ炎症性サイトカインの産生が高いという結果が得られた。今回、機械的伸展刺激によってIL-33が誘導されることが分かったので報告する。

共同研究者

唐川 大 東京大 皮膚科

Jitlada Meephansan 自治医大 皮膚科

大槻マミ太郎 自治医大 皮膚科

玉置 邦彦 東京大 皮膚科

花川 靖 愛媛大 皮膚科

橋本 公二 愛媛大 皮膚科

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）は、ケラチン1あるいはケラチン10の遺伝子異常により生じる遺伝性疾患である。変異の部位によって、臨床症状に違いがあることが知られている。ケラチンは中間径フィラメントに属する細胞骨格蛋白のひとつであり、表皮細胞の形状を維持し、外界からの機械的刺激に対して細胞を守る働きがあると考えられる。昨年度までにDNAアレイによる包括的な遺伝子発現、リアルタイムPCR、ウェスタンブロットなどにより、変異ケラチン導入細胞においては表皮細胞が伸展刺激に対して脆弱になっており、いくつかの炎症サイトカイン産生が亢進していることを見出した。今年度は、機械的伸展刺激によってIL-1 β 、IL-18などととも Danger signalの一つと考えら

れているIL-33が誘導されるか否かを検討した。

B. 研究方法

- 1) 表皮細胞は、正常培養ヒト表皮角化細胞（クラボウ）を用いた。
- 2) 表皮細胞を伸展可能なシリコンウェルに播種し、機械的伸展刺激を24時間、1分間に1サイクルの速度で与えた。
- 3) 24時間後に細胞および培養上清を回収した。
- 4) リアルタイムPCRに用いたプラオマーはアプライドバイオシステムズから購入した。ELISAはR & Dsystemより購入したELISAキットを用いた。
- 5) ウェスタンブロットは、R & DsystemのELISAキットに用いられている抗体を用いた。

C. 研究結果

- 1) IL-33に機械的伸展刺激を加えることにより、IL-33がmRNAレベルで誘導された。
- 2) 上清のELISAを行ったところ、IL-33は検出できなかった。
- 3) 細胞を回収して蛋白を抽出し、ELISA

を行ったところ、機械的伸展刺激によって、蛋白レベルでも誘導が認められた。

4) 細胞を回収して蛋白を抽出し、ウェスタンブロットを施行したところ、機械的伸展刺激によって、33kDaのバンドが誘導された。

5) ERK阻害剤であるPD98059によってIL-33のmRNAレベルでの誘導は抑制されたが、心筋細胞では機械的伸展刺激の受容体との報告があるアンジオテンシン受容体阻害剤によっては抑制されなかった。

D. 考察

今回は、ケラチンK1の変異は導入していないが、正常ヒト表皮角化細胞において、機械的伸展刺激によってIL-33のmRNA発現が誘導された。IL-33は上清中には検出できなかったが、細胞抽出液中では、ELISAおよびウェスタンブロットにて蛋白レベルでの誘導が認められた。また、この誘導はERK依存的事であることが示唆された。

IL-33は、上皮細胞や血管内皮細胞において通常核に存在すると報告され、侵襲的な刺激を受けた細胞から放出されて、Danger signalの一つとして働くことが示唆されている。

表皮細胞においても、機械的刺激という一つの外的刺激によって細胞内での産生が誘導されることは、さらに強い刺激、あるいは変異ケラチンの発現といった、細胞にストレスが加わる状況によって細胞が壊死に陥った際には、細胞外に放出されて、生理的作用を発現する可能性があると考えられた。

E. 結論

IL-33は、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の皮疹形成における表皮にて、外的刺激に対する“Alarmin”として、炎症の惹起に参与する可能性がある。

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. Masaru Karakawa, Mayumi Komine, Tomonori Takekoshi, Naoki Sakurai, Yosaku Minatani, Yayoi Tada, Hidehisa Saeki, Kunihiko Tamaki Duration of remission period of narrowband ultraviolet B therapy on psoriasis vulgaris. J Dermatol, accepted
2. Takekoshi T, Tada Y, Watanabe T, Sugaya M, Hoashi T, Komine M, Kawashima T, Shimizu T, Hau CS, Asahina A, Yokomizo T, Sato S, Tamaki K. Identification of a novel marker for dendritic cell maturation, mouse transmembrane protein 123. J Biol Chem. 2010 ; 285 (41) : 31876-84.
3. Nakajima A, Matsuki T, Komine M, Asahina A, Horai R, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y. TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in Il1rn-/- mice. J Immunol. 2010 ; 185 (3) : 1887-93.
4. Karakawa M, Komine M, Tamaki K, Ohtsuki M. Roxithromycin downregulates production of CTACK/CCL27 and MIP-3alpha/CCL20 from epidermal keratinocytes. Arch Dermatol Res. 2010 ; 302 (10) : 763-7.

学会発表

1. Jitlada Meephanan, Mayumi Komine, Hidetoshi Tsuda, Mamitaro Ohtsuki. Calcipotriol reduced induction of MMP-9 and MMP-13 in human squamous cell carcinoma cell line. The 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological research, Helsinki, Finland 2010.
2. Jitlada Meephanan, Mayumi Komine,