

表2-1 代表症例 2症例の処置材料の詳細（症例1）

【症例1】

患者：男性。身長 直立不能のため測定できず（推定125cm）、体重 20kg。

病型：劣性栄養障害（Hallopeau-Siemens 型）（重症汎発型）

臨床症状：皮膚潰瘍 体表面積の約30%、手指の棍棒状癒着、食道狭窄、瘢痕性脱毛、高度の貧血、高γグロブリン血症、慢性全身性炎症（CRP、SAA、IL-6高値）、角膜障害がある。

A D L：日常生活はほぼ全介助。

重症度：最重症型

皮膚処置：1日おき

1. 使用品目

1) 浸出液が多い病変（肩、胸、背中）

体幹：深い皮膚潰瘍：ハイドロサイト AD ジェントル*、一部バーシバXC*

浅い皮膚潰瘍：ハイドロサイト薄型*

足の一部：出血部はカルトスタット*

一部：ウルゴチュールを施行（+包帯・ガーゼ#、@）

2) 浸出液が少ない部分

前腕：ソフラチュール^sソフラチュール^s+メロリンガーゼ[@]

* 特定医療材料、 #：在宅皮膚難病指導管理料 \$：保険診療 @：自費購入

2. 医療材料の製品特性（患者の感想）

- ・ハイドロサイトADジェントル：吸収力がよく、痛みなく剥がせる。傷の治りが早い。蒸散がよい反面、浸出液が濃縮されたようになる。
- ・バーシバ：吸収力は非常に良い。固いので動く部位では不快感があり、機械的刺激で新たな皮膚潰瘍を形成することがある。
- ・メロリンガーゼ：浸出液を吸収しても蒸散がよく、皮膚に膿が残らない。

3. その他の衛生材料の自費購入分（約1カ月）

ガーゼ（820枚）、包帯（9cm：12巻、7.5cm：12巻、5cm：4巻）、
マイクロポア（2.5cm：18巻）、オルテックス（幅広：2巻）、脱脂綿：2枚、
ディスポ舌圧子：12本、サラシ：1反

4. 医療費

総額（12月分）：414,930円

（内訳）保険診療分：384,930円（特定医療材料費用、定価で計算）

在宅難治性皮膚疾患指導管理料として提供：約30,000円

上記のほかに、自費購入分あり。

表2-2 代表症例 2症例の処置材料の詳細（症例2）

【症例2】

患者：女性。身長 116 cm、体重 17.5kg。
 病型：劣性栄養障害型（Hallopeau-Siemens 型）（重症汎発型）
 臨床症状：皮膚潰瘍 体表面積の約16%、手指の棍棒状癒着、食道狭窄、稗粒腫形成、貧血、高 γ グロブリン血症、慢性全身性炎症（CRP、SAA、IL-6高値）
 A D L：介助のもと就学
 重症度：重症型
 皮膚処置：毎日

1. 使用品目

1) 浸出液が多い病変（体幹、膝・足関節部）

体幹：バーシバXC*（+包帯・ガーゼ[#]、[@]）

関節部：アクアセルAg*（関節可動部位：リフラップシート^{\$}）（+包帯[#]、[@]）

*特定医療材料、#：在宅皮膚難病指導管理料 \$：保険診療 @：自費購入

2. 医療材料の製品特性（患者の感想）

- ・バーシバXC：アクアセルAgに比べて吸収力がよく、剥がすときの痛みは少ない。傷の治りが早い。
 関節などの可動部には固定しにくいので、そこはリフラップシートを使用。
- ・アクアセルAg：リフラップシートに比べ、潰瘍の治りは早い。
 浸出液を十分に吸収していないと剥がすときに痛みがある。
 抗菌作用のために悪臭がなくなる。柔らかい素材のため関節部にも使いやすい。

3. その他の衛生材料の使用量（約1カ月）

在宅皮膚難病指導管理料（500点）を利用して提供したガーゼ・包帯・絆創膏等の衛生材料提供分：約30,000円／月
 特定医療材料：261,690円／月
 上記以外に自費で購入した衛生材料あり。

4. 医療費

総額（12月分）約30万円／月と推定

（内訳）特定医療材料（保険診療分）261,690円

在宅難治性皮膚疾患指導管理料として提供 約30,000円

自費購入分：約2万円／月（加えてボランティアからの補助あり）

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

ヒト胎生期表皮における先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4、CYP4F22、
lipoxygenase-3の発現パターンの検討と魚鱗癬様紅皮症の病態解明

研究分担者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野 教授

研究要旨 先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3のヒト皮膚における局在と機能は、未だに完全には明らかにされていない。本研究では、これらの分子の発現パターンをヒト胎生期表皮において検討した。CYP4F22のmRNAは、胎生18-20週の時期のヒト胎生期表皮では、成人表皮より強く発現していた。他方、NIPAL4とlipoxygenase-3のmRNAは、胎生期を通じて低いレベルに留まっていた。ヒト胎生期皮膚（23週齢）の免疫染色では、CYP4F22は、顆粒層を中心に表皮上層に発現が見られ、NIPAL4とlipoxygenase-3は、表皮全層に発現していた。ヒト表皮細胞を高Ca²⁺で培養すると、CYP4F22の発現は増強した。これらの所見から、CYP4F22は、発達過程のヒト表皮の角化の開始において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3のヒト皮膚における局在と機能は、未だに完全には明らかにされていない。本研究では、これらの分子の発現パターンをヒト胎生期表皮において検討し、その結果から各病因蛋白の皮膚における機能を明らかにし、さらには、先天性魚鱗癬様紅皮症の病態を解明することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3の発現パターンをa)～c)の方法を用いて、ヒト胎生期表皮、および、ヒト培養表皮細胞において検討した。

a) ヒト胎生期皮膚でのNIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3のmRNAの発現レベルを、RT-PCR法により測定した。

b) ヒト胎生期皮膚でのNIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3の蛋白発現量を、Western blot法と免疫染色で評価した。

c) ヒト培養表皮細胞において、NIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3のmRNAおよび蛋白の発現レベルを、高Ca²⁺条件下と低Ca²⁺条件下とで比較検討した。

C. 研究結果

CYP4F22のmRNAは、胎生18-20週の時期のヒト胎生期表皮では、成人表皮より強く発現していた。他方、NIPAL4とlipoxygenase-3のmRNAは、胎生期を通じて低いレベルに留まっていた。ヒト胎生期皮膚（23週齢）の免疫染色では、CYP4F22は、顆粒層を中心に表皮上層に発現が見られ、NIPAL4とlipoxygenase-3は、表皮全層に発現していた。ヒト表皮細胞を高Ca²⁺で培養すると、CYP4F22の発現は増強した（図1）。

D. 考察

先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4、CYP4F22、lipoxygenase-3のヒト皮膚における局在と機能は、未だに完全には明らかにされていない。本研究では、これらの分子の発

現パターンをヒト表皮において検討した。魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白として同定されているCYP4F22、NIPAL4、lipoxygenase-3の発現様式を検討することは、それらの蛋白の皮膚における機能を解明する手がかりとなり、ひいては、魚鱗癬様紅皮膚の病態解明につながるものと期待できる。

E. 結論

今回の研究結果からは、先天性魚鱗癬様紅皮症の病因蛋白CYP4F22は、発達過程のヒト表皮の角化開始において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成23年度)

論文発表

1. Sasaki K, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H. CYP4F22 is highly expressed at the site and onset of keratinization during human skin development. J Dermatol Sci (in press)
2. Fukuda S, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Sakai K, Akiyama M, Shimizu H, Masuda K, Izu K, Teye K, Tsuruta D, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. Novel ATP-binding cassette, subfamily A, member 12 (ABCA12) mutations associated with congenital ichthyosiform erythroderma. Br J Dermatol (in press)
3. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. Br J Dermatol (in press)
4. Kono M, Akiyama M, Kondo T, Suzuki T, Sukanuma M, Wataya-Kaneda M, Lam J, Shibaki A, Tomita Y. Four novel *ADAR1* gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. J Dermatol (in press)
5. Kono M, Akiyama M, Sukanuma M, Sanchez-Valle A, Tomita Y. Dyschromatosis symmetrica hereditaria by ADAR1 mutations and viral encephalitis: a hidden link? Int J Dermatol (in press)
6. Li Q, Frank M, Akiyama M, Shimizu H, Ho S-Y, Thisse C, Thisse B, Sprecher E, Uitto J. Abca12-Mediated Lipid Transport and Snap29-Dependent Trafficking of Lamellar Granules are Critical for Epidermal Morphogenesis in Zebrafish Disease Model of Ichthyosis. Dis Model Mech 4 : 777-785, 2011.
7. Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. LEDGF/DFS70 activates theMK2/IL6/STAT3 pathway in HaCaT. J Dermatol Sci 63 : 203-205, 2011.
8. Natsuga K, Akiyama M, Shimizu H. Malignant skin tumours in inherited ichthyosis patients. Br J Dermatol 165 : 263-268, 2011
9. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Miyamura Y, Sakai K, Tanaka S, Shimizu H. AKT plays an anti-apoptotic role in ABCA12-deficient keratinocytes. J Invest Dermatol 131 : 1942-1945, 2011.
10. Natsuga K, Nishie W, Smith BJ, Shinkuma S, Smith TA, Parry DAD, Oiso N, Kawada A, Yoneda K, Akiyama M, Shimizu H. Consequences of two different amino acid substitutions at the same codon in *KRT14* indicate definitive roles of structural distortion in epidermolysis bullosa simplex pathogenesis. J Invest Dermatol 131 : 1869-1876, 2011.
11. Nakajima K, Uchida Y, Akiyama M,

Morita Y, Shimizu H, Sano S. Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci* 63 : 64-66, 2011.

12. Akiyama M. The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermato-Endocrinology* 3 : 107-112, 2011.
13. Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses. *Nagoya J Med Sci* 73 : 79-90, 2011.
14. Suga H, Tsunemi Y, Sugaya M, Shinkuma S, Akiyama M, Shimizu H, Sato S. Hair shaft abnormalities in localized autosomal recessive hypotrichosis 2 and a review of other non-syndromic human alopecias. *Acta Dermatovenereol* 91 : 486-488, 2011.
15. Osawa R, Akiyama M, Izumi K, Ujiie H,

Sakai K, Nemoto-Hasebe I, Yanagi T, Koizumi H, Shimizu H. Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation. *J Am Acad Dermatol* 2011 ; 64 : 991-993.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし。

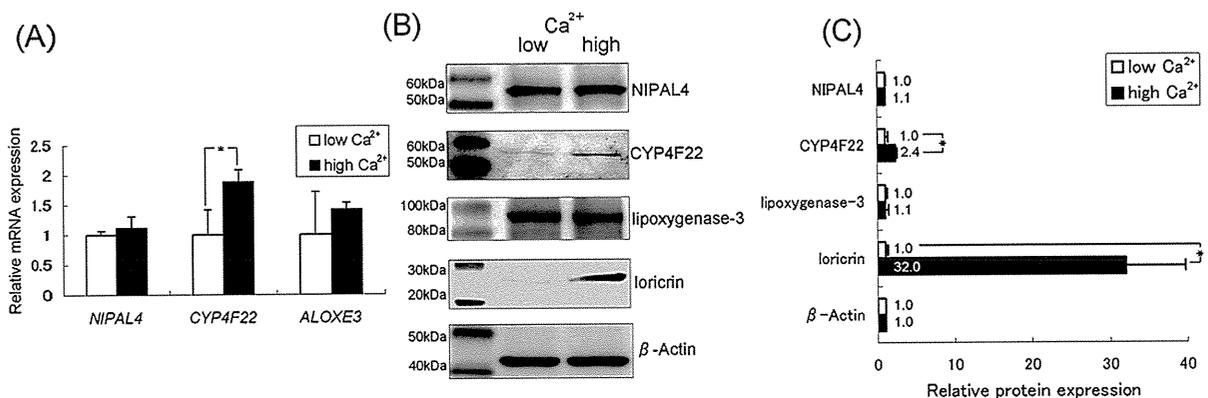


図1 ヒト培養表皮細胞におけるNIPAL4, CYP4F22, ALOXE3のmRNAと蛋白の発現
(A) ヒト培養表皮細胞におけるmRNAの発現。(B,C) Western blotによる蛋白発現とその定量化。

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

表皮融解性母斑（epidermolytic nevus）の生検皮膚組織からの抽出DNAを用いた
ケラチン遺伝子変異の同定

研究分担者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野 教授

研究要旨 表皮母斑の一形である表皮融解性母斑の患者は、表皮融解性魚鱗癬の原因であるケラチン1またはケラチン10の遺伝子変異をモザイクで有している。この母斑の病因遺伝子変異が同定された家系は、未だ世界で数家系である。突然変異により発症したと思われる表皮融解性魚鱗癬症例の中には、両親いずれかのモザイク変異による症例が含まれていると考えられる。今回、表皮融解性魚鱗癬の病因解明の一環として、表皮融解性母斑のモザイク変異の同定を目指した。表皮融解性母斑の原因であるモザイク変異が生殖細胞に存在すると、次世代で表皮融解性魚鱗癬を発症する。今回の研究で病因遺伝子変異を同定することで、次世代の患者の発症率の推測、さらには、出生前診断が可能となる。

A. 研究目的

表皮母斑の一形である表皮融解性母斑の患者は、表皮融解性魚鱗癬の原因であるケラチン1またはケラチン10の遺伝子変異（図1, 2）をモザイクで有している。この母斑の病因遺伝子変異が同定された家系は、未だ世界で数家系である。突然変異により発症したと思われる表皮融解性魚鱗癬症例の中には、両親いずれかのモザイク変異による症例が含まれていると考えられる。今回、表皮融解性魚鱗癬の病因解明の一環として、表皮融解性母斑のモザイク変異の同定を目指した。

B. 研究方法

本研究は以下の1～3の方法を用いて施行された。

1. 表皮融解性母斑、および、魚鱗癬様紅皮症の皮膚生検の施行

表皮融解性母斑患者の病変部皮膚、および、魚鱗癬様紅皮症の患者皮膚より生検を施行し、通常のパラフィンブロックを作成した。

2. 皮膚組織からの microdissection 法を用いた DNA 抽出

上記、皮膚組織パラフィンブロックから通常の光顕切片を作成し、microdissection 法により病変部表皮細胞からのDNAの抽出を行った。

3. ケラチン1、ケラチン10の遺伝子変異検索
抽出した患者病変部表皮細胞由来 genomic DNA を用いて、ケラチン1、ケラチン10、並びに、その他の魚鱗癬様紅皮症病因蛋白をコードする遺伝子を増幅し、遺伝子変異検索を行った。

C. 研究結果

表皮融解性母斑患者の病変部皮膚より得られたパラフィン切片からのDNAの抽出により、患者病変部表皮細胞が有するケラチン遺伝子変異の同定が可能であることが示された。

D. 考察

表皮融解性母斑の原因であるケラチンのモザイク変異が生殖細胞に存在すると、次世代で表皮融解性魚鱗癬を発症する。今回の研究で病因遺伝子変異を同定することで、次世代の患者の発症率の推測、さらには、出生前診断が可能となる。この点で、本研究成果は意

義深いものと考えられる。

E. 結論

表皮融解性母斑、および、魚鱗癬様紅皮症患者の病変部皮膚より得られたパラフィン切片からのDNAの抽出により、病因遺伝子変異の同定が可能であることが示された。本研究のこの成果は、今後のretrospectiveな病因遺伝子変異解析を可能とする点において、重要なものと思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成23年度)

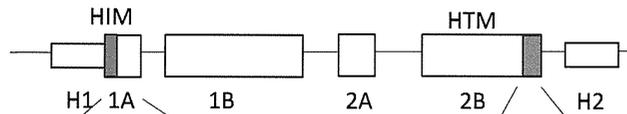
論文発表

1. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br J Dermatol* (in press)
2. Kono M, Akiyama M, Kondo T, Suzuki T, Suganuma M, Wataya-Kaneda M, Lam J, Shibaki A, Tomita Y. Four novel *ADARI* gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol* (in press)
3. Fukuda S, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Sakai K, Akiyama M, Shimizu H, Masuda K, Izu K, Teye K, Tsuruta D, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. Novel ATP-binding cassette, subfamily A, member 12 (*ABCA12*) mutations associated with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* (in press)
4. Kono M, Akiyama M, Suganuma M, Sanchez-Valle A, Tomita Y. Dyschromatosis symmetrica hereditaria by *ADARI* mutations and viral encephalitis: a hidden link? *Int J Dermatol* (in press)
5. Sasaki K, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H. *CYP4F22* is highly expressed at the site and onset of keratinization during human skin development. *J Dermatol Sci* (in press)
6. Osawa R, Akiyama M, Izumi K, Ujiie H, Sakai K, Nemoto-Hasebe I, Yanagi T, Koizumi H, Shimizu H. Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: 991-993.
7. Li Q, Frank M, Akiyama M, Shimizu H, Ho S-Y, Thisse C, Thisse B, Sprecher E, Uitto J. *Abca12*-Mediated Lipid Transport and *Snap29*-Dependent Trafficking of Lamellar Granules are Critical for Epidermal Morphogenesis in Zebrafish Disease Model of Ichthyosis. *Dis Model Mech* 4: 777-785, 2011.
8. Natsuga K, Akiyama M, Shimizu H. Malignant skin tumours in inherited ichthyosis patients. *Br J Dermatol* 165: 263-268, 2011
9. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Miyamura Y, Sakai K, Tanaka S, Shimizu H. *AKT* plays an anti-apoptotic role in *ABCA12*-deficient keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131: 1942-1945, 2011.
10. Natsuga K, Nishie W, Smith BJ, Shinkuma S, Smith TA, Parry DAD, Oiso N, Kawada A, Yoneda K, Akiyama M, Shimizu H. Consequences of two different amino acid substitutions at the same codon in *KRT14* indicate definitive roles of structural distortion in epidermolysis bullosa simplex pathogenesis. *J Invest Dermatol* 131: 1869-1876, 2011.
11. Akiyama M. The roles of *ABCA12* in

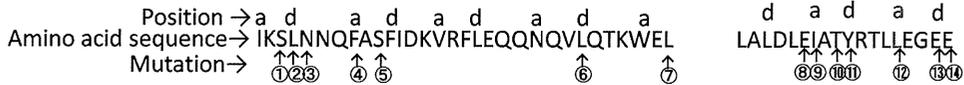
- keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermato-Endocrinology* 3 : 107-112, 2011 (Review article)
12. Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses. *Nagoya J Med Sci* 73 : 79-90, 2011 (Review article)
13. Suga H, Tsunemi Y, Sugaya M, Shinkuma S, Akiyama M, Shimizu H, Sato S. Hair shaft abnormalities in localized autosomal recessive hypotrichosis 2 and a review of other non-syndromic human alopecias. *Acta Dermatovenereol* 91 : 486-488, 2011.
14. 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* 2011 ; 50 : 439-442.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし。

(a) Keratin 1



(b) Heptad repeats in HIM and HTM



(c)

	Mutation	Hydropathy index	Pamloplanter hyperkeratosis
①	S186P	-0.8 → -1.6	ND
②	L187F	3.8 → 2.8	mild
②	L187F	3.8 → 2.8	mild
③	N188S	-3.5 → -0.8	ND
③	N188S	-3.5 → -0.8	severe
③	N188S	-3.5 → -0.8	severe
③	N188K	-3.5 → -3.9	severe
③	N188T	-3.5 → -0.7	ND
④	F191I	2.8 → 4.5	mild
④	F191C	2.8 → 2.5	severe
⑤	S193P	-0.8 → -1.6	severe
⑥	L208P	3.8 → -1.6	severe
⑦	L214P	3.8 → -1.6	mild
⑧	E478K	-3.5 → -3.9	mild
⑧	E478D	-3.5 → -3.5	mild
⑨	I479F	4.5 → 2.8	mild
⑨	I479F	4.5 → 2.8	mild
⑨	I479T	4.5 → -0.7	mild
⑨	I479T	4.5 → -0.7	mild
⑩	T481P	-0.7 → -1.6	severe
⑪	Y482C	-1.3 → 2.5	mild
⑫	L486P	3.8 → -1.6	severe
⑫	L486R	3.8 → -4.5	severe
⑬	E489K	-3.5 → -3.9	mild
⑭	E490Q	-3.5 → -3.5	mild
⑭	E490G	-3.5 → -0.4	mild

ND, not described.

図1 ケラチン1のhelix initiation motif (HIM) とhelix termination motif (HTM) にある病因変異のまとめ

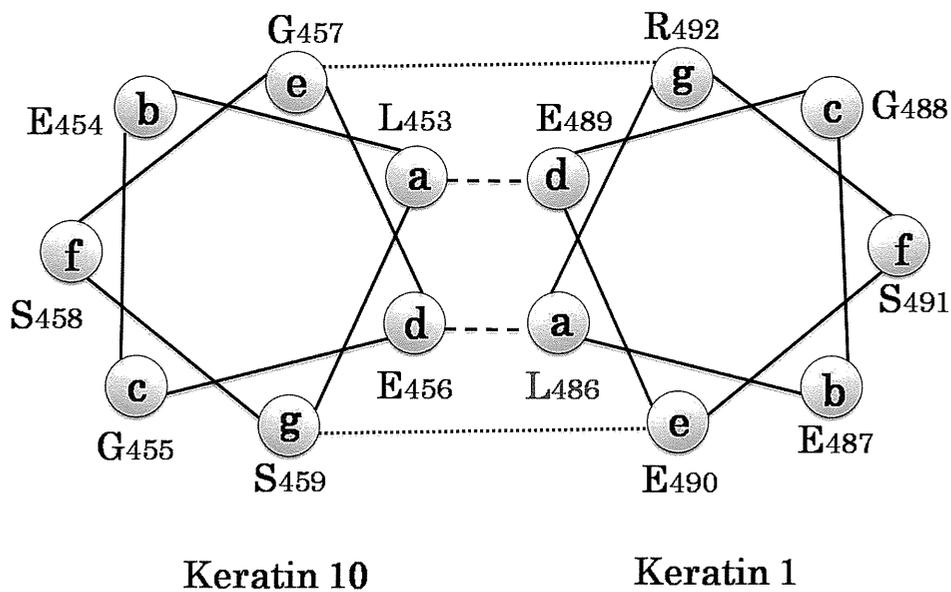


図2 ケラチン1、10のrod domainの最終heptadを構成するアミノ酸の相互関係

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をもちいた魚鱗癬症候群、特にNetherton症候群と
炎症型peeling skin症候群の鑑別

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。ネザートン症候群（NS）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、正確な臨床診断は難しい。特に鑑別が問題となるのは炎症型peeling skin症候群（PSS）である。今回の研究で患者に負担の少ない魚鱗癬のスクリーニング法である粘着テープ剥離角層サンプルを用いたコルネオデスモソーム構成分子の免疫染色がNSとPSSの鑑別に有用であることが分かった。

共同研究者

井川 哲子 旭川医科大学皮膚科
本間 大 旭川医科大学皮膚科

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。NSは非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床像を呈することのある劣性遺伝性疾患で、コルネオデスモソームの分解酵素を阻害するLEKTIの遺伝的欠損による。本症に特徴的な毛髪異常があると診断は比較的容易であるが、これがない症例もあり、正確な診断は遺伝子診断によらなければならないことがある。我々は本研究班の昨年度の研究において粘着テープ剥離角層をもちいたコルネオデスモソーム成分の免疫染色をするとNSに特徴的なパターンを検出できることを報告した。

一方、PSSはNSと同様に全身皮膚の角層が容易に剥奪し、またIgE高値も伴い、臨床的鑑別が難しい劣性遺伝性疾患である。最近本症はコルネオデスモソームの成分であるコルネオデスモシン（CDSN）の遺伝子変異によることが報告された。今回はNSとPSSとの鑑別が粘着テープ剥離角層の免疫染色により可能であるかどうか検証した。

B. 研究方法

対象：①正常人前腕屈側皮膚、②Netherton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）。上腕屈側の比較的健常な皮膚。③PSS患者（10代男児、前腕屈側）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、コルネオデスモソームを構成する蛋白を蛍光抗体法を用いて染色した。具体的にはデスモグレイン1（DSG1）とCDSNの二重染色とデスモコリン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

正常皮膚では角層はシート状に剥がれ、3種のコルネオデスモソーム蛋白は一様に細胞辺縁に染まった(図1)。NSではブロック状に角層が剥がれる傾向があり、細胞の大きさは様々で、コルネオデスモソーム蛋白染色パターンは多様であったが3種類とも陽性であった(図2)。PSSではCDSNの発現が欠損しているのが特徴的であった(図3)。ブロック状に細胞がはがれる点はNSと共通していた。細胞の大きさは比較的均一であった。

D. 考察

NSとPSS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病態が共通していると考えられた。コルネオデスモソーム構成蛋白の染色パターンではPSSにおいてはCDSNのみが欠損するという疾患特異性がみられ、鑑別診断に有用性が高いと思われた。

今後は研究に協力いただける症例があれば、症例を増やして解析を行いたい。

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ソーム成分の分布を調べる方法は有用である。今後、症例を増やしてさらに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23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. 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*, 164 : 610-616, 2011

3. Bergboer JG, Tjabringa GS, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Jansen PA, Thuret JY, Narita M, Ishida-Yamamoto A, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. Psoriasis risk genes of the late cornified envelope-3 group are distinctly expressed compared with genes of other LCE groups. *Am J Pathol*, 178 : 1470-1477, 2011

4. Mizukoshi K, Matsumoto K, Hirose R, Fujita T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Effect of serine palmitoyltransferase inhibitor, ISP-1, on the stratum corneum of intact mouse skin. *Biol Pharm Bull*, 34 : 1383-1389, 2011

5. Nousbeck J, Ishida-Yamamoto A, Bidder M, Fuchs D, Eckl K, Hennies HC, Sagiv N, Gat A, Gini M, Filip I, Matz H, Goldberg I, Enk CD, Sarig O, Meilik B, Aberdam D, Gilhar A, Sprecher E. IGFBP7 as a potential therapeutic target in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 131 : 1767-1770, 2011

6. Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein-Related Peptidase 8-Dependent Skin Wound Healing is Associated with Upregulation of Kallikrein-Related Peptidase 6 and PAR2. *J Invest Dermatol*, in press.

7. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Medical Molecular Morphology*, 44 : 1-6, 2011
8. Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Order and disorder in corneocyte adhesion. *J Dermatol*, 38 : 645-654m 2011
9. 山本明美、井川哲子. 皮膚バリア機能にとって何が重要か. *皮膚の科学*, 10 : suppl 16 : 1-4, 2011
10. 山本明美、井川哲子. Peeling skin 症候群とアトピー性皮膚炎. *Visual Dermatol*, 10 : 1278-1279, 2011

学会発表

1. 山本明美、井川哲子、岸部麻里. 角層におけるタイトジャンクションの存在とその意義. 第26回角化症研究会、東京商工会議所国際会議場、東京都、2011年7月30日
2. 山本明美. 角層は語る. 皮膚科電顕研究の系譜. 第432回日本皮膚科学会北陸地方会特別講演、ホテルフジタ福井、福井市、2011年12月11日

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

健康人

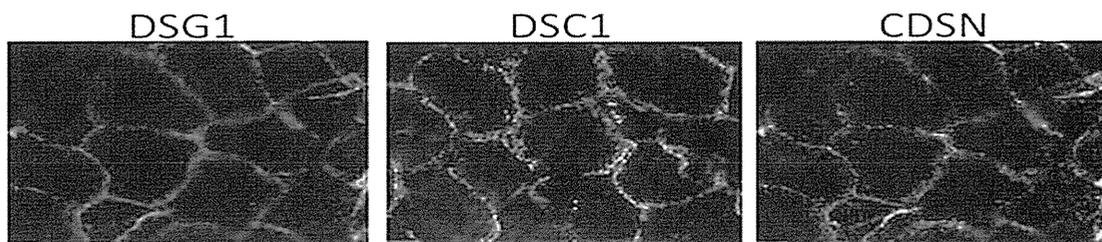


図1 健康人の粘着テープ剥離角層。細胞はシート状に剥がれ、3種のコルネオデスモソームの蛋白はいずれも細胞の辺縁に陽性。

Netherton症候群

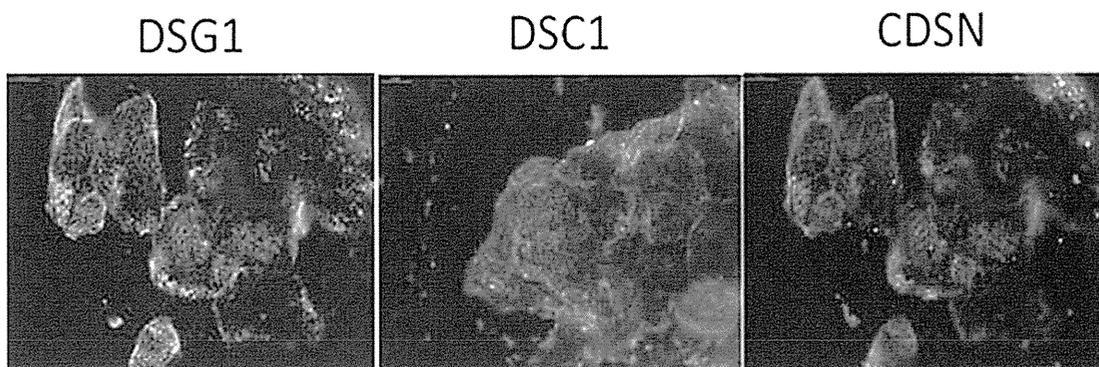


図2 NS患者の粘着テープ剥離角層。細胞はブロック状にはがれ、大きさはまちまちで、3種のコルネオデスモソームの蛋白はいずれも陽性であるが、染まりかたは多彩である。

炎症型のpeeling skin 症候群 (Type B)

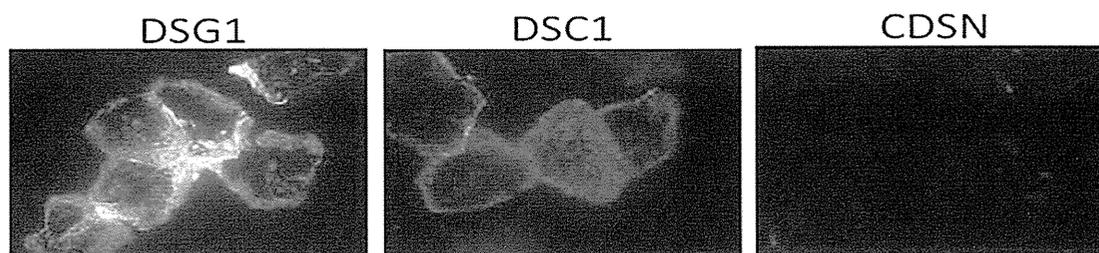


図3 PSS患者の粘着テープ剥離角層。細胞はブロック状にはがれ、大きさは比較的均一である。3種のコルネオデスモソームの蛋白のうちCDSNのみが染まらない。

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

Inside-outside皮膚バリア構造の電子顕微鏡レベルでの新しい可視化方法

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 魚鱗癬様紅皮症ではバリア機能が障害されている。Inside-outsideバリア機能を見る方法として経表皮水分蒸散量の測定や真皮内に注入したトレーサーの浸透部位を蛍光色素で可視化する方法などがあるが、一長一短がある。今回我々は真皮内に注入したトレーサーEZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotinの浸透範囲を電顕レベルで可視化し、同時に免疫電顕法を施行できる方法を開発した。今後の魚鱗癬でのバリア機能解析に有用と思われる。

A. 研究目的

一般に魚鱗癬様紅皮症に属する疾患では皮膚のバリア機能が低下している。皮膚バリアには原理的にoutside-insideとinside-outsideのバリアがある。後者のバリア機能を見る方法として経表皮水分蒸散量の測定や真皮内に注入したトレーサーの浸透部位を蛍光色素で可視化する方法などがある。一方、この主たるバリア構造であるTJを可視化する方法としてはTJ構成分子の局在を蛍光抗体法でみる方法が多用されているが、TJ構成分子はTJのみに局在するわけではないので、正確ではない。より確かなTJの同定は電子顕微鏡法である。電顕的に確かなTJが機能的バリアとして働いているかどうかは硝酸ランタン浸透試験で知ることができるが、この場合は他分子の局在を同時に可視化することができない。これらの欠点を補うために、今回の研究は真皮内に注入したトレーサーの浸透範囲を電顕レベルで可視化し、同時に免疫電顕法を施行できる方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

正常ヒト肘部皮膚の手術材料の真皮内に10 mg/mlに調整したEZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Bioctchnology)を100 μ l注入し、1.2 mMのカルシウム濃度の培養液

(CnT-02-3DP1, CellnTEC)をメンブランの下層に入れたCell Culture Insert (Becton Dickinson)上で37°Cで30分間CO₂インキュベーター内に静置した。その後、2%パラホルムアルデヒドで4°C、1時間固定し、免疫電顕用にLowicryl K11M樹脂に包埋した。樹脂包埋標本からウルトラミクロトームにて超薄切片を作成し、EM Streptavidin/Gold, 10 nm (1:200, Electron Microscopy Sciences)を室温で15分間反応させたのちHQ Silver[®] Enhancement Kit (Nanoprobes)により4分30秒増感し、Occludin抗体(1:50, Zymed)と37°C、1時間反応させ、5 nm immunogold (1:10, Amersham Bioscience)にて37°C、1時間標識した。

C. 研究結果

表皮角化細胞間の分子の透過性の指標として、真皮内に注入したビオチン化トレーサーの部位を電子顕微鏡レベルで可視化することができた(図1、2)。さらに同時に施行したoccludin抗体の局在も明瞭に示すことができた。微細構造の保存もよく、TJ構造がoccludin陽性部位に明瞭に認められた。

D. 考察

従来、細胞間の分子の透過性を見るには、トレーサーであるEZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-

Biotin を真皮内に注入しこれを蛍光顕微鏡で検出する方法が用いられてきた。今回我々はこれを電子顕微鏡レベルで可視化することに成功した。この方法は免疫電顕法を同時に施行することが可能で、実際に今回 occludin 抗体の局在を示すことができた。

トレーサー浸透実験と併用できる抗体の種類は、原理的には2%パラフォルム固定、Lowicryl K11M樹脂包埋標本で保持される抗原に対するものであれば動物種をとわず使用可能であり、様々な用途に応用できると考えられる。本研究班の目的である魚鱗癬様紅皮症において異常となるさまざまな表皮分化関連分子の局在と細胞間浸透性の変化を同時に比較できる本法は有用性が大きいと思われる。

E. 結論

今回我々は真皮内に注入したトレーサーの浸透範囲を電顕レベルで可視化し、同時に免疫電顕法を施行できる方法を開発した。今後の魚鱗癬でのバリア機能解析に有用と思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成23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. 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*, 164 : 610-616, 2011
3. Bergboer JG, Tjabringa GS, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Jansen PA, Thuret JY, Narita M, Ishida-Yamamoto A, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. Psoriasis risk genes of the late cornified envelope-3 group are distinctly expressed compared with genes of other LCE groups. *Am J Pathol*, 178 : 1470-1477, 2011
4. Mizukoshi K, Matsumoto K, Hirose R, Fujita T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Effect of serine palmitoyltransferase inhibitor, ISP-1, on the stratum corneum of intact mouse skin. *Biol Pharm Bull*, 34 : 1383-1389, 2011
5. Nousbeck J, Ishida-Yamamoto A, Bidder M, Fuchs D, Eckl K, Hennies HC, Sagiv N, Gat A, Gini M, Filip I, Matz H, Goldberg I, Enk CD, Sarig O, Meilik B, Aberdam D, Gilhar A, Sprecher E. IGFBP7 as a potential therapeutic target in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 131 : 1767-1770, 2011
6. Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein-Related Peptidase 8-Dependent Skin Wound Healing is Associated with Upregulation of Kallikrein-Related Peptidase 6 and PAR2. *J Invest Dermatol*, in press.
7. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Medical Molecular Morphology*, 44 : 1-6, 2011
8. Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Order and disorder in corneocyte adhesion. *J Dermatol*, 38 : 645-654m 2011
9. 山本明美、井川哲子. 皮膚バリア機能にとって何が重要か. *皮膚の科学*, 10 :

suppl 16 : 1-4, 2011

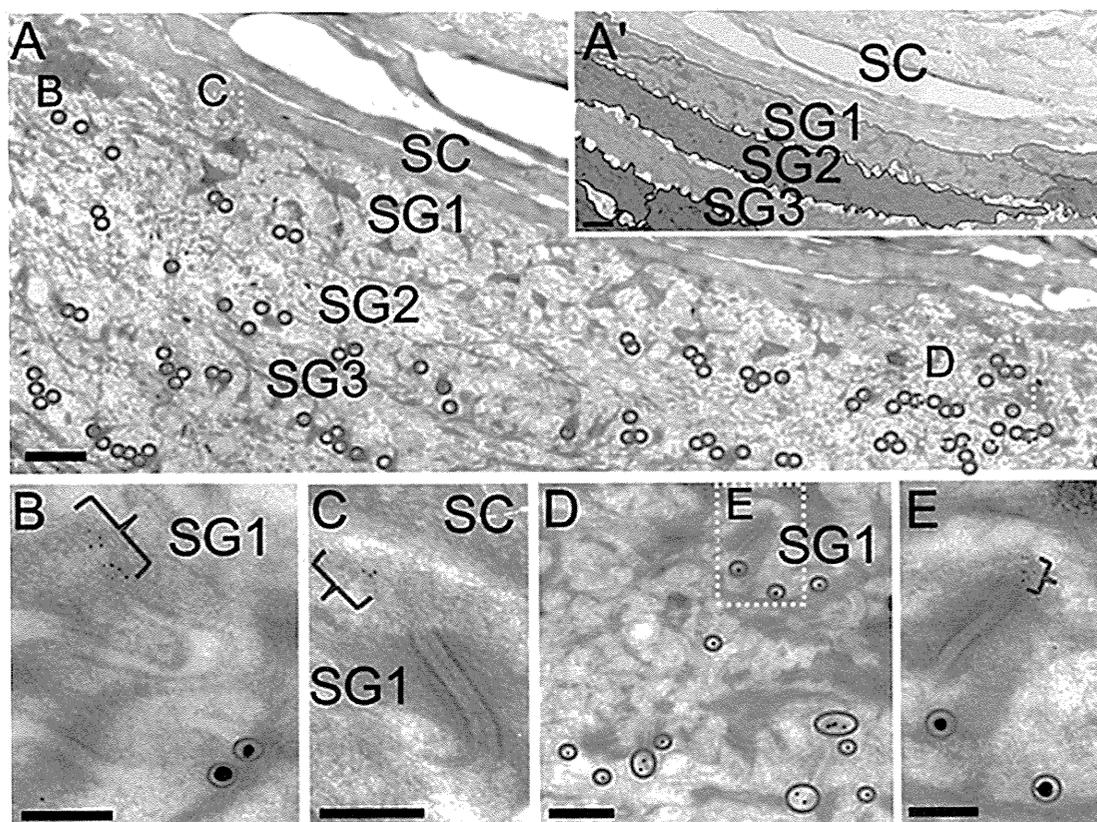
10. 山本明美、井川哲子. Peeling skin 症候群とアトピー性皮膚炎. *Visual Dermatol*, 10 : 1278-1279, 2011

2. 山本明美. 角層は語る. 皮膚科電顕研究の系譜. 第432回日本皮膚科学会北陸地方会特別講演、ホテルフジタ福井、福井市、2011年12月11日

学会発表

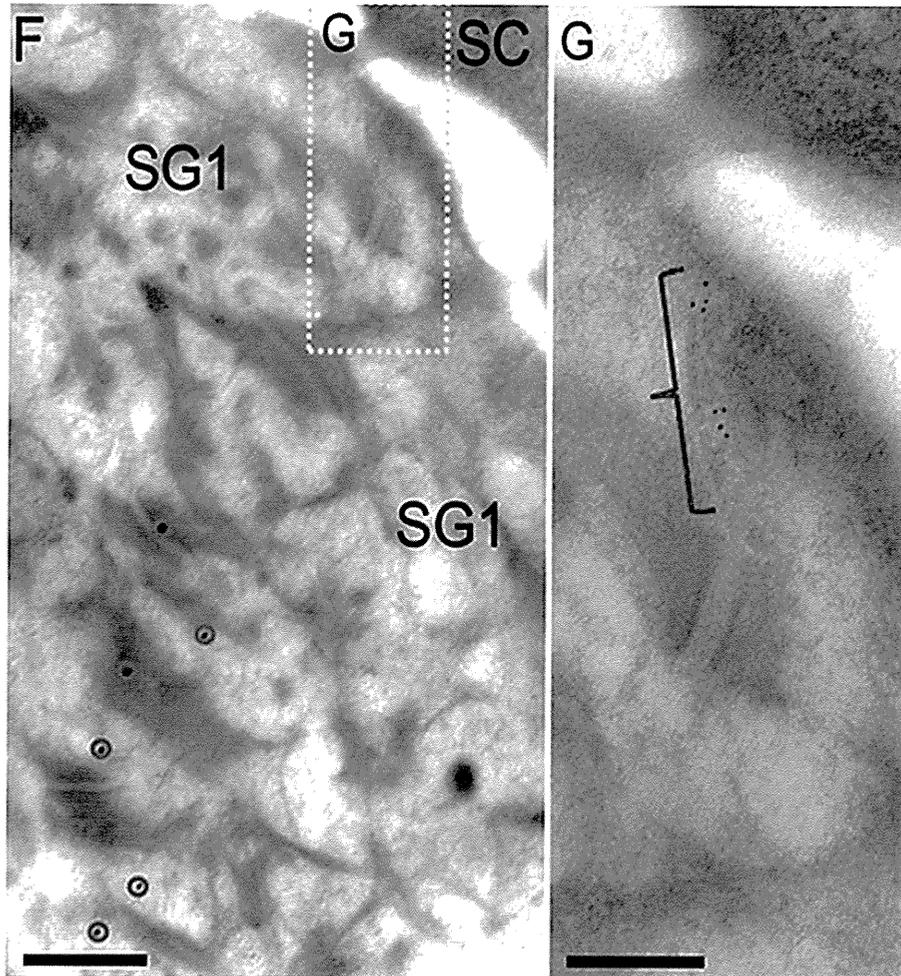
1. 山本明美、井川哲子、岸部麻里. 角層におけるタイトジャンクションの存在とその意義. 第26回角化症研究会、東京商工会議所国際会議場、東京都、2011年7月30日

- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし



大きな標識: EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin
5 nm: Occludin

図1 真皮内に注入したビオチン化トレーサーがoccludin陽性のTJを有する顆粒層の最表層 (SG1) のレベルまで細胞間に浸透している。A'はAと同じ視野の各細胞層を異なる色調によって明示したもの。B, C, DはそれぞれAの一部を拡大したもの。Eは図Dの一部を拡大したもの。Occludin陽性のTJ部分を片括弧で示している。SC, SGはそれぞれ角層、顆粒層を示し、数字は表層から何層目かを示す。Bars = 2 μ m (A, A'), 200 nm (B, C, E), 500 nm (D) .



大きな標識: EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin
 5 nm: Occludin

図2 真皮内に注入したビオチン化トレーサーがSG1の occludin 陽性の TJ レベルまで細胞間に浸透しているがそれより上方には検出されない。Gは図Fの一部の拡大。Occludin 陽性の TJ 部分を片括弧で示している。Bars = 200 nm (G), 500 nm (F).

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機序についての検討
表皮細胞におけるIL-33の発現について

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）における機械的刺激の関与を
探るため、これまでに表皮細胞に機械的刺激を加えることにより、プロスタグラン
ディンE₂、IL-8、IL-18、IL-33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、機械的刺激により誘導されるサイトカイン
の一つで、表皮細胞において発現が認められるIL-33のsplice variantについて検討
した。

共同研究者

津田 英利 自治医科大学皮膚科

唐川 大 東京大学皮膚科

Jitlada Meephansan 自治医大皮膚科

富永 眞一 自治医科大学病態生化学

大槻マミ太郎 自治医科大学皮膚科

いて検討を加えていたところ、報告されてい
る分子量以外の分子量をもつIL-33のバンド
がいくつか検出されたため、これまでに報告
されていないIL-33のsplice variantの存在を
推測し、今回は、表皮細胞において発現する
IL-33のsplice variantについて検討した。

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。これま
でに機械的伸展刺激によってIL-1 β 、IL-18
などとともにDanger signalの一つと考えら
れているIL-33が誘導されることが明らかと
なった。表皮細胞におけるIL-33の発現につ

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。有棘細胞癌の細胞
株であるDJM細胞は、自治医科大学皮膚
科学教室で確立したものをを用いた。Ha-
CaT細胞は、N. Fusenig先生の許可を得、
黒木登志夫先生より供与していただいたも
のをを用いた。
- 2) PCRに用いたsplice variant特異的プラ
イマーは、以下のとおりである。1；
exon3 deletion (5'-CAAGCTGGGAAG-
TAGAAAGCAC-3'), 410 bp, 2；exon3,
4 deletion (5'-CAAGCT-
GGGAAGAATTTTCACC-3'), 280 bp, 3；
exon 3, 4, 5 deletion (5'-CAAGCT-
GGGAATAAGGTGTTAC-3'), 150 bp,
4；exon 4 deletion (5'-CTGAAAACAG-
GAATTTTCACC-3'), 280 bp, 5；exon 4,
5 deletion (5'-CTGAAAACAGATA-

AGGTGTTACTG-3'), 150 bp, 6; exon 5 deletion (5'-AGTATCACAGATAAGGTGTTACTG-3'), 150bp.

リアルタイムPCRに用いたプライマーはアプライドバイオシステムズから購入した。

C. 研究結果

- 1) 正常ヒト表皮細胞には、33kDaの pro-form IL-33、20kDaの mature form IL-33 以外に、約25kDaのIL-33のバンドがウェスタンブロット法にて検出された。
- 2) 正常ヒト表皮細胞からRNAを抽出しPCRにてIL-33検出を試みたところ、Full lengthのIL-33と、それより小さいサイズのIL-33のバンドが複数確認された。これらのバンドから、核酸を抽出してシーケンスしたところ、いくつかの新しいIL-33の splice variantが検出された。
- 3) 正常ヒト表皮細胞には少なくとも7種類の splice variantが発現していることが確認された。癌化した表皮細胞株であるDJM細胞や、不死化した表皮細胞であるHaCaT細胞では、いくつかの splice variantの発現レベルが正常細胞と比較して低かった。

D. 考察

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、壊死に陥った細胞や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報告されている。

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、その機能を発現する可能性があると考えられる。今回、正常ヒト表皮細胞、DJM細胞、HaCaT細胞でIL-33の splice variantの発現パターンに差が認められたことから、IL-33の splice variant

の発現が、細胞の癌化や細胞増殖に関与している可能性も示唆される。

E. 結論

表皮細胞に発現するIL-33には新しい splice variantが存在することが明らかとなった。今後、変異ケラチンを導入した表皮細胞におけるIL-33の発現およびIL-33splice variantの発現パターンを観察したい。またそれぞれの splice variantの発現ベクターを作成してその局在や機能を明らかにし、BCIEの病態への関与について検討したいと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Hosoda S, Suzuki M, Komine M, Murata S, Hashimoto T, Ohtsuki M. A Case of IgG/IgA Pemphigus Presenting Malar Rash-like Erythema. *Acta Derm Venereol.* 2011 Nov 24.
2. Meephansan J, Komine M, Tsuda H, Tominaga S, Ohtsuki M. Ultraviolet B irradiation induces the expression of IL-33 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2012 Jan; 65(1): 72-4.
3. Takatsuka Y, Komine M, Ohtsuki M. Pemphigoid gestationis with a complete hydatidiform mole. *J Dermatol.* 2011 Sep 28. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01315.x.
4. Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Yoshio T, Ohto-Ozaki H, Tamemoto H, Komine M, Sekiya H, Tominaga SI, Minota S. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients

with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor : possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. Rheumatol Int. 2011 Mar 24.

5. Tatsuta A, Komine M, Taguchi Y, Yokokura H, Koike Y, Murata S, Fukushima N, Ohtsuki M. Case of huge Buschke-Lowenstein tumor. J Dermatol. 2011 Jul ; 38(7) : 730-2.
6. Karakawa M, Komine M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Tada Y, Saeki H, Tamaki K. Duration of remission period of narrowband ultraviolet B therapy on psoriasis vulgaris. J Dermatol. 2011 Jul ; 38(7) : 655-60.
7. Fujimoto S, Komine M, Karakawa M, Uratsuji H, Kagami S, Tada Y, Saeki H, Ohtsuki M, Tamaki K. Histamine differentially regulates the production of Th1 and Th2 chemokines by keratinocytes through histamine H1 receptor. Cytokine. 2011 May ; 54(2) : 191-9.

学会発表

1. Meephansan J, Komine M, Tsuda H, Yano S, Tominaga S, Ohtsuki M. IL-33 is produced by normal human keratinocytes with environmental and inflammatory stimuli : a novel "alarmin" in the skin. 2011 society for Investigative Dermatology Annual Meeting, May, 2011, Phoenix, Arizona, USA.

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