

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10122

研究課題名(和文) スピラベル法による遺伝性角化異常症の角質の構造異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of abnormal structure of keratin of hereditary hyperkeratosis by spin label method

研究代表者

皆川 智子 (Minakawa, Satoko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20436033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はスピラベル法を角質の機能解析を用いて、炎症性角化症である乾癬患者さんの角質の構造異常を報告してきた。本研究では、遺伝性角化異常のモデルマウスの角質の構造異常をスピラベル法で明らかにするとともに、遺伝性角化異常症患者の電子スピン共鳴(ESR)のスペクトルを検討し、発症機構解明や新規治療法の開発に発展させることが目的である。

我々は遺伝性角化異常症特有のスペクトルを解析するために、1)動物モデルでESR、組織学的・電顕的に検討し、2)遺伝子変異が同定された魚鱗癬患者でESR、組織学的・電顕的に検討した。今後も侵襲の少ない診断法につながるよう症例を積み重ねたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々のグループはスピラベル法を角質の機能解析を用いて、炎症性角化症である乾癬患者において角質の構造異常を報告してきた。本研究では、遺伝性角化異常のモデルマウスの角質の構造異常をスピラベル法で明らかにするとともに、遺伝性角化異常症患者の電子スピン共鳴(ESR)のスペクトルを検討し、発症機構解明や新規治療法の開発に発展させることを目的とした。患者と健常者の角質から得られたスペクトルは波形がやや異なっており、角化症のデータ解析の蓄積は発症機構解明につながり、侵襲の少ない診断法や新規治療法の開発に発展する可能性があり、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated stratum corneum (SC) radicals of the patients with ichthyosis using the electron paramagnetic resonance (EPR). Our group has used spin-labeling for functional analysis of SC, reported structural abnormalities of SC in psoriatic patients. In this study, the spin-label method is used to clarify the structural abnormality of the SC of the model mouse with hereditary keratinization abnormality. We analyzed SC of the patients with ichthyosis by the spectrum of EPR to elucidate the onset mechanism and develop new therapeutic methods.

We investigated SC of animal models by EPR, histology and electron microscopy to analyze the specific spectrum of keratinization abnormality. 2) We examined SC of patients with ichthyosis who have been identified gene mutations by EPR, histologically and electron microscopically. I would like to accumulate cases to elucidate the onset mechanism, diagnostics by less invasive methods and develop new therapeutic methods.

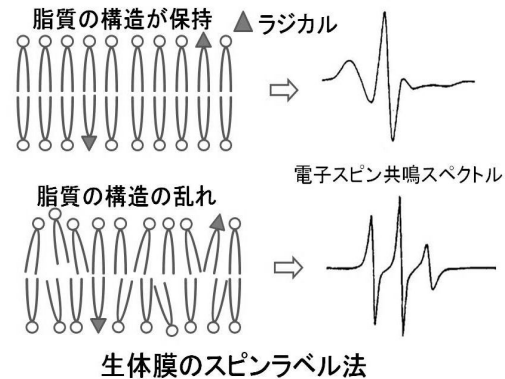
研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝性角化異常症 魚鱗癬 電子顕微鏡 電子スピン共鳴 乾癬 葉状魚鱗癬 表在性表皮融解性魚鱗癬

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層にある角質層の主な機能はバリアー機能や防御機能である。その保持に不可欠であるのが、角質細胞と細胞間脂質である。角質層機能の評価は、組織化学・電顕などからある程度の情報が得られるが、生検が必要となり経時的な検討は難しい。そのため、臨床の間では角質水分量や経皮水分蒸発量 (TEWL) を指標とするが、もちろん角質の構造や機能を直接反映するものではない。

近年、生体膜の構造状態を評価する方法としてスピラベル法が確立している。不対電子をもつのがラジカルであり、電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法にて、極めて低い濃度でも、スペクトルとして検出される。このラジカルで標識した脂質を生体膜に取り込ませ、電子スピン共鳴スペクトルを解析することによって、生体膜の構造状態を把握することが可能になった。これが、生体膜のスピラベル法である (右図)。



われわれのグループはこの方法を用いて、ラベルした脂質を角質の脂質に取り込ませることにより、角質の機能を評価する方法を考案し、比較的頻度の多い乾癬における皮膚や爪の角質の構造異常を報告した (Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D. J Dermatol Sci, 2012; Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D. Skin Res Technol 2013)。

さて、その角質の異常がある遺伝性角化症は、全身の皮膚に過角化がみられる魚鱗癬と、掌蹠に病変がみられる掌蹠角化症に大きく分類される。さらに、魚鱗癬は臓器病変の有無によって非症候性と魚鱗癬症候群に、掌蹠角化症も随伴症状の有無によって2群に分かれる (表1)。近年の遺伝性角化異常症解析の進歩は著しく、多くの原因遺伝子が明らかとなり、それに伴いあたらしい疾患名の提唱、従来の疾患名の変更、分類の改変、が精力的に行われている。また、表1に主な疾患と原因遺伝子を記載したが、これ以外のまれな疾患も多数ある。われわれのグループは本症の解析を強力に進め、下線のある疾患について報告を行ってきている (表1)。

表1 主な遺伝性角化異常症と原因遺伝子

<b>I. 魚鱗癬</b>	
1. 非症候性	
遅発性魚鱗癬	
尋常性魚鱗癬	FLG
X連鎖性魚鱗癬	STS
常染色体性劣性魚鱗癬	
道化師様魚鱗癬	ABCA12
葉状魚鱗癬	TGM1, NIPAL4, ALOX12B, ABCA12
先天性魚鱗癬様紅皮症	ALOX12B, ABCA12, TGM1, NIPAL4, CYP4F22
ケラチン症性魚鱗癬	
表皮融解性魚鱗癬	KRT1, KRT10
表在性表皮融解性魚鱗癬	KRT2
2. 魚鱗癬症候群	
ネザートン症候群	SPINK5
シェーグレン・ラルソン症候群	ALDH3A2
KID症候群	GJB2
レフスム症候群	PHYH, PEX7
ドルフマン・シャナリン症候群	CGI-58
<b>II. 1. 掌蹠角化症</b>	
1. 随伴症状のない遺伝性掌蹠角化症	
フェルナー型掌蹠角化症	KRT9
ウンナト・スト型掌蹠角化症	
メダダ病	SLIRP1
長島型掌蹠角化症	SERPINB7
2. 随伴症状を伴う遺伝性掌蹠角化症	
パピオン・ルフェーブル症候群	CTSC
リヒナー・ハンハルト症候群	TAT
オムルステッド症候群	TRPV3
ナクスス病	

### 2. 研究の目的

昨今の遺伝性角化異常症解明の進歩は著しく、多くの原因遺伝子が明らかとなり、それに伴いあたらしい疾患名の提唱、従来の疾患名の変更、分類の改変が、日進月歩に行われ、我々のグループは本症に関連する報告を多数行ってきた。一方、近年我々のグループはスピラベル法を角質の機能解析に用いて、乾癬患者における角質の構造異常を報告した。そこで、遺伝性角化異常症患者やそのモデルマウスの角質の構造異常をスピラベル法で明らかにし、それらの発症機構解明や新規治療法の開発に発展させることが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

我々が開発した角質スピラベル法を用いて、個々の遺伝性角化異常症患者から得られる特有のスペクトルを解析するために、以下の実験を計画した。

#### 1) 動物モデルでの検討

魚鱗癬や掌蹠角化症モデル動物を使用して、角質の水分量やTEWL, 電顕・組織化学, と比較し、本法の有用性を証明する。

#### 2) 魚鱗癬や掌蹠角化症患者での角質の検討

実際に、当科を受診している遺伝性角化異常症患者や当科で遺伝子検索を行った他施設での患者から皮膚サンプルを採取し、電子スピン共鳴のスペクトルを検討する。また、治療効果などの判定に応用可能できるかも調べる。

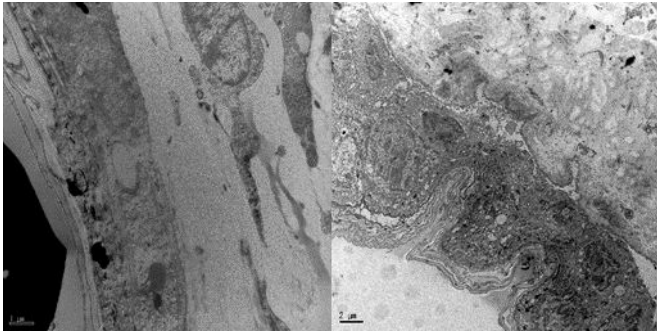
#### 3) 魚鱗癬や掌蹠角化症患者の赤血球や白血球での検討

遺伝性掌蹠角化症患者の赤血球や白血球を採取し、電子スピン共鳴のスペクトルを検討する。

#### 4. 研究成果

平成 28 年度

- 1) マウスにおける角層の電子スピン共鳴の測定法の確立  
我々は当院の動物実験施設でマウスの検体を得て電子顕微鏡で観察した。またホルマリン固定後パラフィン包埋した。検体のスペクトルを ESR で検討した。
- 2) マウスにおける角層水分量や TEWL との比較  
角層を採取し、5 - DSA でラベルし、電子スピン共鳴スペクトルを取り、角質水分量、TEWL を測定、組織学的、電子顕微鏡的にその部の皮膚を観察した。



平成 29 年度

- 3) 掌蹠角化症、魚鱗癬のモデルマウスでの検討  
掌蹠角化症のモデルマウスとして、われわれの教室ではカテプシン C 遺伝子欠損マウス (Papillon-Lefevre Syndrome の原因遺伝子) を有している。組織学的な異常はあるが、表現型に乏しいため、購入可能なノックアウトマウスを購入し、交配飼育したが、掌蹠角化症を有する KRT9 遺伝子のノックアウトマウスや自然発生した spontaneous harlequin ichthyosis (ichq) mouse (シスタチン M/E 遺伝子の欠損) の皮膚や爪甲から角層を採取することはできなかった。

平成 30 年度

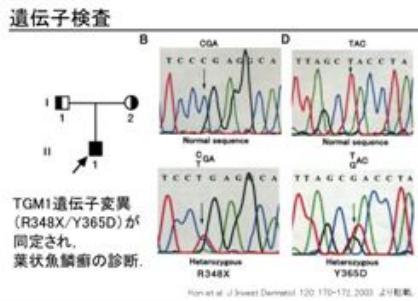
- 4) 遺伝性角化異常患者で皮膚サンプルでの検討  
a) 弘前大学医学部附属病院皮膚科外来に通院中の遺伝性角化異常患者さんのご協力を得て、皮膚サンプルの検討を行った。さらに、他施設の患者で遺伝子解析を当科で行った患者について、皮膚・血液のサンプルを供与いただくため、皮膚かたち研究会や米国皮膚科学会で研究者たちに協力をもとめた。  
b) 葉状魚鱗癬と表在性表皮融解性魚鱗癬の患者さんにご協力いただき、臨床状態を検討し、電子顕微鏡による観察を行い、ESR のスペクトルを計測した。



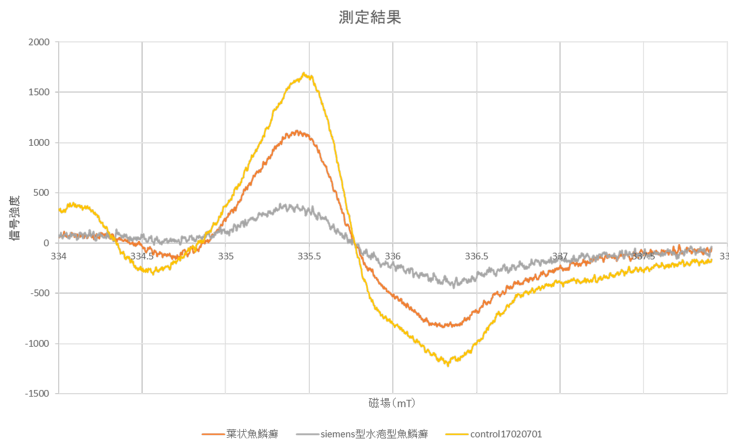
Fig. Clinical and laboratory findings. a, b: Physical examination shows large thick brown hyperkeratotic scales on the entire body with marked ectropion, mild palmoplantar keratoderma, and mild erythema, typical of the LI phenotype c: Skin biopsy on the eighth day of his life reveals a thickened stratum corneum (SC) without parakeratosis. There was only one layer of the granular degeneration in the epidermis. d: There was a decrease in expression of the Transglutaminase-1 staining. e: Immunohistochemical staining is negative for keratin. f-i: The lipid droplets and corneodesmosome are observed in the patient with LI. j-l: Physical examination reveals dark to light gray hyperkeratosis covering the extremities, superficial denuded areas, and hypopigmented spots. m, n: Skin biopsy specimen obtained from the right ankle of the patient reveals marked hyperkeratosis and vacuolated keratinocytes with large keratohyalin granules in the upper spinous layer and granular layer. o: The tonofilaments in the prickly layer formed clumps in the cells.

引用文献 より

- c) 弘前大学医学部附属病院皮膚科外来に通院中で遺伝子解析を行った患者様から同意を頂き、皮膚サンプルを採取した。また、臨床状態、角質水分量・TEWL、ESRのスペクトルを健常者と比較検討した。他施設通院中で当科において遺伝子解析を行った患者様についても皮膚のサンプル供与をお願いしたが、検体郵送などの点から実現は難しかった。尚、治療前の患者様はおられなかったが、サンプルを提供いただいた患者様の治療中の状態、臨床経過を観察し、治療効果との関連なども併せて検討した。
- d) 遺伝性角化異常患者で遺伝子変異を検索した。



- e) 健常人の皮膚サンプルでも 5 - DSA でラベルし、電子スピン共鳴スペクトルを計測した。
- f) 葉状魚鱗癬と Superficial epidermolytic ichthyosis の患者様と健常人から提供された皮膚サンプルから得られた電子スピン共鳴スペクトルの波形を比較検討した。



The spectral patterns of

Case 1 and Case 2 are similar to those of previous controls, except for the intensity.

#### 5) 遺伝性角化異常患者で血液サンプルでの検討

当科通院中で遺伝子解析を行った患者様の赤血球や白血球を採取し、5 - DSA でラベルし、電子スピン共鳴スペクトル解析を試みたが有意なスペクトルを得られず、皮膚サンプルで得られた結果との比較ができず、疾患ごとの有用性の検討は今のところ難しい現状である。

本研究の学術的な特色は、スピンラベル法という皮膚科領域で新しい方法を、遺伝性角化異常症の鑑別診断を可能とするため、各遺伝性角化異常症での角質のスペクトルを検討したことである。疾患特異的なスペクトルが得られれば、遠隔地の患者様も角質サンプルで簡単に診断に至る可能性がある。角化異常症の原因遺伝子でもケラチンやフィラグリンのように表皮に限局して発現するものもあれば、パピヨン・ルフェール症候群のカテプシンCのよ

うに、全身の臓器に発現するものもある。角化異常症では、原因遺伝子の異常から角化異常にいたる発症機構が不明の疾患も多く、スペクトルを解析することにより、ある程度グループ分けが可能になり、発症機構を解明する手がかりとなる可能性もある。今後も角化症のESRのデータを蓄積し、侵襲の少ない診断法につながるよう症例を積み重ねたい。

#### <引用文献>

Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakagawa K, Kaneko T, Akasaka E, Nomura K, Sawamura D. Two cases of ichthyosis and their EPR analyses of stratum corneum. *J Cutan Immunol Allergy*. 査読有, 2019; 1: 1-3. doi: 10.1002/cia2.12057.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17件)

Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakagawa K, Kaneko T, Akasaka E, Nomura K, Sawamura D. Two cases of ichthyosis and their EPR analyses of stratum corneum. *J Cutan Immunol Allergy*. 査読有, 2019; 1: 1-3. doi: 10.1002/cia2.12057.

Nakagawa K, Minakawa S, Itabashi C, Sawamura D. Investigation of Paraffin-Embedded Basal Cell Carcinoma using Electron Paramagnetic Resonance. *Anal Sci*. 査読有, 2019; 35: 265-269. doi: 10.2116/analsci.18P367.

Minakawa S, Matsuzaki Y, Terui K, Kayaba H, Sawamura D. Tuberculous granuloma developed 9 years after bacillus Calmette-Guérin vaccination in a patient with immunodeficiency. *J Dermatol*. 査読有, 2018; 45: e293-295. doi: 10.1111/1346-8138.14468

Matsuzaki Y, Takahashi M, Minakawa S, Jin K, Nakano H, Sawamura D. Cutaneous collagenous vasculopathy induced by the vascular endothelial growth factor receptor inhibitor axitinib. *Int J Dermatol*. 査読有, 2018; 57: e167-e169. doi: 10.1111/ijd.14243.

Matsuzaki Y, Minakawa S, Sagara C, Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D. Spontaneous remission of methotrexate-associated lymphoproliferative disorder with Epstein-Barr virus type II latency. *Eur J Dermatol*. 査読有, 2018; 28: 693-694. doi: 10.1684/ejd.2018.3372.

Minakawa S, Nakajima K, Kaneko T, Matsuzaki Y, Takahata T, Itabashi C, Kayaba H, Sawamura D. Thymus and activation-regulated chemokine elevation and lymphocytosis in a case of diffuse large B-cell lymphoma. *J Cutan Immunol Allergy*. 査読有, 2018; 1: 41-43. doi: 10.1002/cia2.12005

Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D. Melanin Radicals in Paraffin-embedded Melanoma Investigated Using Surface-type Dielectric Resonator for X-band EPR. *Anal Sci*. 査読有, 2018; 34: 837-840. doi: 10.2116/analsci.18P055.

Matsuzaki Y, Rokunohe A, Minakawa S, Nomura K, Nakano H, Ito E, Sawamura D. Incontinentia pigmenti in a male (XY) infant with long-term follow up over 8 years. *J Dermatol*. 査読有, 2018; 45: 100-103. doi: 10.1111/1346-8138.14002.

Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Yamada M, Kayaba H, Sawamura D. Psoriasis Area and Severity Index is closely related to serum C-reactive protein level and neutrophil to lymphocyte ratio in Japanese patients. *J Dermatol*. 査読有, 2017; 44: e236-237. doi: 10.1111/1346-8138.13942

Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D, Hara H. Characterization of Melanin Radicals in Paraffin-embedded Malignant Melanoma and Nevus Pigmentosus Using X-band EPR and EPR Imaging. *Anal Sci*. 査読有, 2017; 33: 1357-1361. doi: 10.2116/analsci.33.1357.

Matsuzaki Y, Yokoyama S, Rokunohe A, Minakawa S, Nakano H, Sawamura D. Successful treatment of Kyrle disease with narrowband ultraviolet B. *J Dermatol*. 査読有, 2017; 44: 721-722. doi: 10.1111/1346-8138.13525.

Minakawa S, Nakajima K, Mikami K, Sawamura D. Pancreatic panniculitis as a clue to diagnose acute exacerbation of chronic panniculitis. *Dermatologica Sinica*. 査読有, 2017; 35: 108-109. doi: 10.1016/j.dsi.2016.10.003

Matsuzaki Y, Jin K, Rokunohe A, Minakawa S, Nakano H, Sawamura D. Annular leukocytoclastic vasculitis associated with essential mixed cryoglobulinemia. *Eur J Dermatol*. 査読有, 2016; 26: 186-187. doi: 10.1684/ejd.

Kaneko T, Rokunohe D, Takiyoshi N, Minakawa S, Nakano H, Sawamura D. Usefulness of ultrasonography in the diagnosis of ischemic fasciitis. *Clin Exp Dermatol*. 査読有, 2016; 41: 502-505. doi: 10.1111/ced.12834.

Minakawa S, Kaneko T, Hagiwara C, Takahata T, Sawamura D. A diagnostically challenging case of tuberculous lymphadenitis. *Dermatologica Sinica*. 査読有, 2016; 34: 217-218. doi: 10.1016/j.dsi.2016.05.003

Minakawa S, Tanaka H, Kaneko T, Matsuzaki Y, Kono M, Akiyama M, Minegishi Y, Sawamura

D. Hyper-IgE syndrome with a novel mutation of the STAT3 gene. Clin Exp Dermatol. 査読有, 2016; 41: 687-689. doi: 10.1111/ced.12865.

Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D, Hara H. Skin surface imaging of psoriasis vulgaris by using an electron paramagnetic resonance spin probe. J Dermatol Sci. 査読有, 2016; 81: 71-73. 10.1016/j.jdermsci.2015.10.006

〔学会発表〕(計 9件)

Minakawa S, Matsuzaki Y, Terui K, Kayaba H, Sawamura D, A case of tuberculous granuloma resulting from BCG vaccination in a patient with immunodeficiency. The 2019 Annual Meeting of the American Academy of Dermatology, Washington, D.C. 2019.

Minakawa S, Nakajima K, Kaneko T, Matsuzaki Y, Nakano H, Takahata T, Itabashi C, Kayaba H, Sawamura D, Thymus and activation-regulated chemokine levels accurately reflect disease activity in a case of CD5 positive diffuse large B-cell lymphoma with peripheral eosinophilia. The 2018 Annual Meeting of the American Academy of Dermatology, San Diego, CA. 2018.

Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Nakano H, Yamada M, Kayaba H, Sawamura D, Serum C-reactive protein level will become early indicator in patient with psoriasis of lower Psoriasis Area and Severity Index (PASI). The American Academy of Dermatology 75th Annual Meeting, Orlando, FL. 2017.

皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中野 創, 澤村大輔, 山邊佑樹, 齋藤紀先, 萱場広之. 当科通院中の乾癬患者における PASI と DLQI に影響を与える因子の検討. 日本皮膚科学会東北六県合同地方会学術大会第 382 例会, 2018 年.

皆川智子, 松崎康司, 赤坂英二郎, 金子高英, 今 淳, 中野 創, 澤村大輔, 中川公一, 野村和夫, 松木哲文, 遺伝性角化異常症 2 例のスピンラベル法による角質解析. 日本皮膚科学会青森地方会第 383 回例会, 2018 年.

皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中野 創, 澤村大輔, 齋藤紀先, 萱場広之, 当科通院中の乾癬患者における PASI スコアと DLQI の相関性についての検討. 第 32 回日本乾癬学会学術大会, 2017 年.

皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中川公一, 今 淳, 中野 創, 野村和夫, Bijan Ahvazi, Peter M. Steinert, 澤村大輔, 葉状魚鱗癬の 1 例. 第 44 回皮膚かたち研究学会学術大会, 2017 年.

中川公一, 皆川智子, 澤村大輔, 原 英之, 皮膚乾癬の 2 次元電子スピン共鳴(ESR)イメージング法による研究. 第 116 回日本皮膚科学会総会, 2017 年.

皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中野 創, 澤村大輔, 山田真博, 齋藤紀先, 萱場広之, 当科通院中の乾癬患者における臨床検査的検討. 日本皮膚科学会青森地方会第 376 回例会, 2016 年.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000089\\_ja.html](http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000089_ja.html)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 澤村 大輔

ローマ字氏名: (SAWAMURA, Daisuke)

所属研究機関名: 弘前大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号: 60196334

(2)研究協力者

なし