

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：10107
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2016
課題番号：24591620
研究課題名(和文)皮膚バリア障害における角層デスモゾームの異常の解析と治療への応用

研究課題名(英文)Corneodesmosomal abnormality in skin barrier defects

研究代表者
山本 明美 (Ishida-Yamamoto, Akemi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30241441
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎とその関連疾患(尋常性魚鱗癬, Netherton症候群、炎症型ピーリングスキン病)の病態を角層細胞を用いて非侵襲的に解析し、各疾患に特徴的なパターンが得られ、炎症型ピーリングスキン病のスクリーニング検査としても有用性と考えた。
角層細胞の接着分子であるコルネオデスモシンの異常による炎症型ピーリングスキン病の患者の遺伝子解析を行い、遺伝子の完全欠損であることと、これが日本人患者に特有の創始者効果によることを解明した。
アトピー性皮膚炎で角層が肥厚している機序を研究し、細胞を剥離する酵素の分泌が不十分であることと、酵素を阻害する分子の発現が亢進しているためと考えられた。

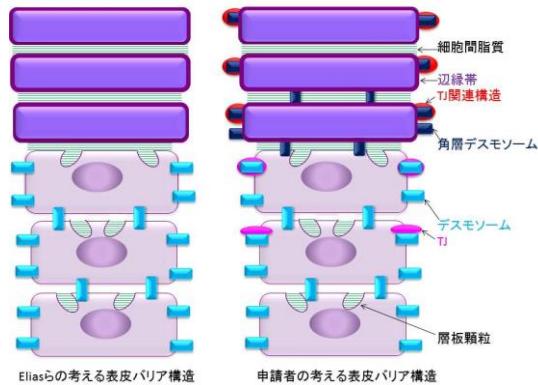
研究成果の概要(英文)：Distribution patterns of desmosomal molecules in atopic dermatitis (AD) and related diseases (ichthyosis vulgaris, Netherton syndrome and the inflammation type peeling skin disease (IPSD)) were non-invasively analyzed. The characteristic pattern was obtained in each disease, and it seems to be a useful screening test for IPSD.
Gene analysis of an IPSD patient revealed a complete loss of the corneodesmosin gene due to a founder effect among Japanese patients.
The mechanism for thick AD stratum corneum was studied and incomplete secretion of a desquamation enzyme (KLK7) and increased expression of its inhibitor (LEKTI) were found.

研究分野：皮膚科学

キーワード：デスモソーム コルネオデスモソーム 魚鱗癬 アトピー性皮膚炎 コルネオデスモシン デスモグレイン LEKTI カリクレイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、Elias らのグループを中心として表皮角層の構造と機能は煉瓦とモルタルに例えて理解されてきた。すなわち角層細胞が煉瓦に、その間を埋める脂質はモルタルに相当するとの考えであった。しかし我々は角層細胞同士の接着に最も重要なはたらきをしているのは角層デスマソーム（コルネオデスマソーム）（以下、CD と略す）と考えており専門家の間でも意見の食い違いがあった（下図）。



(2) 我々のグループは CD 固有の成分であるコルネオデスマシン (CDSN) の欠損マウスが致死的であり、CD の形態異常がおきること、細胞間剥離が顆粒層と角層の境界部でおこることを見いだしていた (Matsumoto M, et al. Proc Natl Acad Sci, USA, 2008)。

2. 研究の目的

(1) CD の形成や分解の仕組みの詳細を明らかにする。

(2) 魚鱗癬やアトピー性皮膚炎 (AD) における角層の剥離機能の異常の病態メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 角層検体採取、角層水分量、経表皮水分蒸散量 (TEWL) 測定

文書による同意を得たのち、AD 患者の皮疹部、治療中で軽度に湿疹病変が残る部位 (AD under treatment)、無疹部 (AD nonlesion)、正常コントロールとして AD の既往のないボランティア (normal control) から、粘着テープを用いて角層検体を採取した。同時に、角層水分量と TEWL も併せて計測した。

(2) 免疫染色

診断目的で得られた AD lesion 及び normal control 検体はホルマリン固定後包埋した。テープ剥離で得た角層検体は未固定で使用した。一次抗体として抗デスマグレイン (Dsg) 1 抗体、抗デスマコリン (Dsc) 1 抗体、抗 CDSN 抗体、抗 KLK7 抗体、抗 LEKTI 抗体を用いた。二次抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影した。テープ剥離角層の CDSN 免疫染色像を用いて、角質

細胞表面の染色パターンを peripheral, dense diffuse, sparse diffuse, partial diffuse の 4 種に分類し、AD lesion と normal control の染色パターンの比率を百分率で表した。また、テープ剥離検体の Dsg1 免疫染色像から角質細胞の面積を計測した。

(3) 通常電顕及び免疫電顕

文書による同意を得て採取した normal control 及び AD lesion 検体を用い、通常電顕は 'half-strength' Karnovsk 固定液、四酸化オスミウムで、免疫電顕は 2%パラフォルムアルデヒドで固定後包埋した。免疫電顕は一次抗体に抗 KLK7 抗体を用い post-embedding 法で行った。KLK7 の層板顆粒からの分泌を観察するため、最深部の角質細胞を、細胞外、細胞質内、空胞内の 3 か所に分け、角質細胞の一定面積あたりの KLK7 を標識した金コロイドの数を計測した。

(4) Western blotting

診断目的で得られた AD lesion 及び normal control 検体はディスペーゼで表皮を分離した。テープ剥離で得られた角層検体は、テープごとトルエンにつけてテープと粘着剤を除去した。それぞれの検体から抽出した蛋白を電気泳動で分離し、Cdsn、KLK7、LEKTI の発現を確認した。

(5) *in situ* zymography

テープ剥離角層検体に蛍光標識がついたカゼインを反応させ、KLK 阻害剤のあるなしでその角質細胞表面積当たりの輝度を求めた。阻害剤のないものから阻害剤のあるものの輝度を差し引いた差を KLK の活性として比較検討した。

(6) 天然保湿因子計測

テープ剥離角層検体を用い HPLC/MS で角層中のアミノ酸総量、2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA)、urocanic acid (UA) を天然保湿因子として計測、角層中のタンパク総量との比で標準化した。

(7) 遺伝子解析

患者より同意を得た後、末梢血から DNA を採取した。定量的 multiplex PCR short fluorescent fragment 解析、ハプロタイプ解析、ゲノム配列解析を標準的な方法によって行った。

(8) 統計学的解析

AD lesion と normal control 群で、年齢、性別、テープ剥離検体採取時の室温、湿度に有意差がないことを確認し、KLK 活性について Welch の *t* 検定で解析を行った。AD lesion と normal control それぞれの角質細胞で、CDSN が dense diffuse パターンを示す割合を目的変数として、CDSN 分解阻害

に関する説明変数の候補に角層中のアミノ酸総量、PCA、UA、角質細胞表面積、年齢、性別、角層水分量、TEWL、KLK 活性を用いて重回帰分析を行い、 $P<0.05$ を統計学的に有意と判定した。

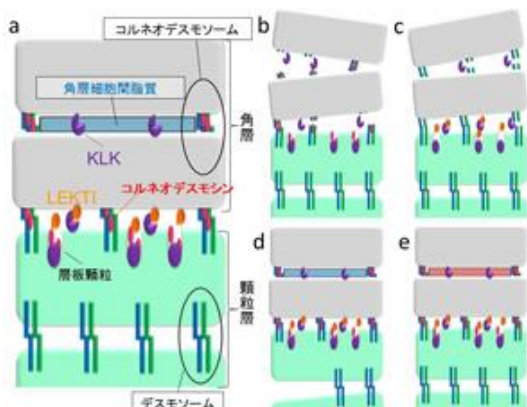
4. 研究成果

(1) AD とその関連疾患（尋常性魚鱗癬、Netherton 症候群、炎症型ピーリングスキン病）の病態の違いを非侵襲的にテープストリップにより剥離した角層細胞をもちいる方法で検討した。剥離細胞上の3種のデスモソーム構成分子の分布、細胞の大きさを比較したところ、疾患ごとに特徴的なパターンがみられ、臨床的有用性が示唆され、さらに炎症型ピーリングスキン病では CDSN の欠損のスクリーニング検査としての有用性を報告した(J Dermatol Sci, 2013 Oct;72:54)。

(2) CD に特有の分子である CDSN の遺伝子異常による疾患である炎症型ピーリングスキン病の日本人患者の遺伝子解析を行い、遺伝子の完全欠損によっていることをつきとめるとともに、本症における表皮剥離は層板顆粒の分泌と同期して生じていることをつきとめ (Exp Dermatol, 2014 Jan;23:60)、さらに他の地域の患者のハプロタイプと比較することにより、この遺伝子欠損パターンは日本人患者に特有の創始者効果であることを発見して報告した (J Dermatol Sci, 2016 May;82:134)。

(3) AD における角層のコルネオデスモソームの分解異常の状態とそのームの主要な分解酵素である KLK7 の分泌不全ならびに、KLK の阻害分子である LEKTI の発現亢進がおきていることを突き止め J Invest Dermatol 誌に報告した (2017 Feb;137:449)。

(4) これまでの我々のこの分野の研究成果とデスモソーム、CD に関する最新の情報と遺伝性皮膚疾患との関係を下図のようになる。これらは総説として G Ital Dermatol Venereol 誌に発表した (2017 Apr;152:148-157)。



正常表皮の顆粒層から角層にかけての構造

(a) の構造と、ネザートン症候群 (b)、炎症型ピーリングスキン病 (c)、SAM 症候群 (d)、魚鱗癬未熟児症候群 (e) における病態のモデル図。

<引用文献>

① Matsumoto M, et al, Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology, Proc Natl Acad Sci USA, 105(18): 2008;6720-4,

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Igawa S, Kishibe M, Minami-Hori M, Honma M, Tsujimura H, Ishikawa J, Fujimura T, Murakami M, Ishida-Yamamoto A, Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis, J Invest Dermatol、査読有、137(2): 2017 ;449-456、DOI: 10.1016/j.jid.2016.10.015
- ② 飯沼 晋、岸部 麻里、本間大、山本 明美、Kallikrein-related peptidases の炎症性皮膚疾患における役割、臨床皮膚科、査読有、71(5 増)、2017; 46-49
- ③ Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Honma M, Desmosomes and corneodesmosomes and their relevance to genetic skin diseases, G Ital Dermatol Venereol、査読有、152(2):2017 ;148-157. DOI: 10.23736/S0392-0488.16.05528-0
- ④ Teye K, Suga Y, Numata S, Soejima M, Ishii N, Krol RP, Ohata C, Matsuda M, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Hamada T, Koda Y, Hashimoto T, J Dermatol Sci、査読有、82(2): 2016;134-7、DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.01.012
- ⑤ 山本 明美、岸部 麻里、本間 大、デスモソーム・コルネオデスモソームと遺伝性角化異常症、日皮会誌、査読有、126 : 2016 ; 2259-2267
- ⑥ 山本 明美、皮膚のタイトジャンクションとは、Cosmetic Stage、11: 2016;61-66
- ⑦ Ishida-Yamamoto A, Igawa S, The biology and regulation of corneodesmosomes, Cell Tissue Res、査読有、360(3): 2015;477-82. DOI:10.1007/s00441-014-2037-z PMID 25407522
- ⑧ Ishida-Yamamoto A, Furio L, Igawa S, Honma M, Tron E, Malan V, Murakami M, Hovnanian A, Inflammatory peeling skin syndrome caused by homozygous genomic deletion in the PSORS1 region

encompassing the CDSN gene、Exp Dermatol、査読有、23(1): 2014;60-3. DOI: 10.1111/exd.12292.

- ⑨山本 明美、角質研究—最前線に異論あり、COSME TECH JAPAN、3: 2013; 133-137
- ⑩山本 明美、井川 哲子、岸部 麻里、皮膚疾患の病態 コルネオデスモソームが異常になる疾患 Netherton 症候群と炎症型 peeling skin 症候群、臨床皮膚科、66: 2012; 59-62

[学会発表] (計 19 件)

- ① Mari Kishibe, Satomi Igawa, Akemi Ishida-Yamamoto, Incomplete secretion of KLK7 and upregulated LEKTI are related to hyperkeratotic stratum corneum in atopic dermatitis、8TH PAN-PACIFIC SKIN BARRIER SYMPOSIUM、2017 年 4 月 26 日、Portland (USA)
- ②山本 明美、小児の皮膚バリア障害、第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 シンポジウム、2017 年 2 月 14 日、横浜市
- ③Ishida-Yamamoto A, Desmosome Pathology in Ichthyosis、Asian Dermatology Congress 2016、2017 年 10 月 15 日、Mumbai (インド)
- ④ Ishida-Yamamoto A, Lamellar granule secretory system in normal and diseased skin、7th annual meeting of pan Asian-Pacific skin barrier research society Kunming 2016、Kunming (中国)
- ⑤ Satomi Igawa, Mari Kishibe, Takashi Shibuya, Nao Saito, Shin Iizuma, Masaru Honma, Akemi Ishida-Yamamoto, The 40th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology、2015 年 11 月 11 日、岡山市
- ⑥山本 明美、フィラグリンとアトピー性皮膚炎、第 39 回日本小児皮膚科学会学術大会、2015 年 7 月 18 日、鹿児島市
- ⑦ Akemi Ishida-Yamamoto、Update on syndromic ichthyosis、23rd World Congress of Dermatology ワークショップ、2015 年 6 月 11 日、Vancouver (カナダ)
- ⑧山本 明美、デスモソーム・コルネオデスモソームと角化症、第 114 回日本皮膚科学会総会学術大会 教育講演、2015 年 5 月 29 日、横浜市
- ⑨山本 明美、Netherton 症候群と類症、第 78 回日本皮膚科学会東部支部総会、2014 年 10 月 4 日、青森市
- ⑩山本明美、機能的視点から見た角層の構造、第 113 回日本皮膚科学会総会、2014 年 5 月 30 日、京都市
- ⑪山本 明美、皮膚バリア構造とアトピー性皮膚炎、環中海皮膚病理組織研究会 特別講演、2013 年 11 月 23 日、米子市
- ⑫山本明美、皮膚剥離酵素とその異常症、第 112 回日本皮膚科学会総会 教育講演、

2013 年 6 月 14 日、横浜市

- ⑬ A. Ishida-Yamamoto, S. Igawa S, M. Kishibe, H. Iizuka, Epidermal lamellar granule secretion starts before the establishment of intercellular permeability barrier、40th Annual Meeting of SSSR-6th Joint Meeting with SCUR、2013 年 5 月 12 日、Sarzburg (オーストリア)
- ⑭ Satomi Igawa, Mari Kishibe, Masako Minami-Hori, Masamoto Murakami, Akemi Ishida-Yamamoto, Hajime Iizuka、Kallikrein 7 is increased, but only partially activated in atopic dermatitis corneocytes、International Investigative Dermatology、2013 年 5 月 8 日、Edinburgh (イギリス)
- ⑮ Igawa Satomi, Iinuma Shin, Kishibe Mari, Minami-Hori Masako, Honma Masaru, Murakami Masamoto, Ishida-Yamamoto Akemi, Iizuka Hajime, A desquamation paradox of atopic dermatitis - Markedly remaining corneodesmosomes despite the increased serine protease activity in vitro、The 37th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology、2012 年 12 月 7 日、沖縄市
- ⑯山本 明美、表皮の細胞間接着構造の基礎電顕でみるときのコツ、第 39 回皮膚かたち研究学会 教育講演、2012 年 7 月 29 日、東京都
- ⑰山本 明美、皮膚バリア構造に関する私見、とくに表皮タイトジャンクションについて、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 7 回教育セミナー 特別講演、2012 年 7 月 26 日、東京都
- ⑱ 山本 明美、角化症を理解するための基礎皮膚科学、第 111 回日本皮膚科学会総会 教育講演、2012 年 6 月 1 日、京都市
- ⑲Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Iizuka H, Tight Junctions form Multilayered Networks in Mammalian Epidermis、39th Annual meeting for Cutaneous Ultrastructure Research、2012 年 5 月 23 日、Lyon (France)

[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

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/dermat/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 明美 (ISHIDA-YAMAMOTO, Akemi)
旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30241441

(4)研究協力者

井川 哲子 (IGAWA, Satomi)

Teye Kwasi (Department of Dermatology,
Kurume University School of Medicine)