

機関番号：10107

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19591294

研究課題名 (和文) 角化異常症の病態解明

研究課題名 (英文) Pathological mechanisms of keratinization abnormalities

研究代表者

山本 明美 (ISHIDA-YAMAMOTO AKEMI)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30241441

研究成果の概要 (和文)：正常ならびに異常角化の機構を研究した。角層デスマゾーム (コルネオデスマゾーム) の部位選択的分解にタイトジャンクションが関与していることを示唆する研究成果が得られた。層板顆粒の輸送や分泌の異常が2つの遺伝性疾患すなわち CEDNIK 症候群と ARC 症候群にみられる魚鱗癬をまねくことを明らかにした。コルネオデスマシンが角層細胞の接着に不可欠な分子であることをみいだした。Rab11 が層板顆粒の輸送に関与していることを示唆する研究成果を得た。

研究成果の概要 (英文)：We have studied mechanisms of normal keratinization and abnormal keratinization. We have found evidences to suggest that tight junctions are involved in spatially distinct degradation of corneodesmosomes and in lamellar granule transportation and secretion. We have revealed that abnormal transportation and/or secretion of lamellar granules could result in ichthyosis in two genetic diseases, CEDNIK syndrome and ARC syndrome. We found that corneodesmosin is crucial for corneocyte adhesion. We have found evidences to suggest that Rab11 may be involved in lamellar granule transportation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 20 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 21 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学・角化細胞

1. 研究開始当初の背景

角化異常症は原因遺伝子が徐々に明らかにされているが、それがどう病態とむすびつのが未解明の疾患が多く残されている。私はこれまで、多くの国際共同研究に参画し、主に免疫電顕法による解析を担当することで多数の角化異常症の原因や病態を解明してきた。今後も角化異常症の病態解明と治療戦略の開発を続けて行く必要がある。

2. 研究の目的

(1) 稀なヒト先天性角化異常症の試料を用い、本症の病態を通常電顕法と免疫電顕法を用いて明らかにする。

(2) 遺伝子改変マウスの角化異常の病態を通常電顕法と免疫電顕法を用いて明らかにする。

(3) 培養角化細胞を用いて、細胞内分子

輸送を障害する薬剤処理がおよぼす角化関連分子への効果を解析し、正常角化のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

角化異常症の病態解明のために正常、あるいは角化異常症のヒトあるいはマウスの皮膚と、培養角化細胞あるいは3次元培養皮膚モデルを免疫電顕法を主体とした研究方法によって解析した。

解析したのは主に細胞内の微小器官であるケラチン線維、デスモゾーム、ギャップジャンクション、層板顆粒、ケラトヒアリン顆粒、辺縁帯、コルネオデスモゾーム、ケラチンパターン、角層細胞間脂質層板構造、リボソーム、小胞体、ゴルジ装置である。

各種の角化関連分子の細胞内局在は2種の免疫電顕法を適宜選択して施行した。すなわちpost-embedding法は多数の抗体を同時に解析するのに適した方法であるので、この方法で抗原性が保たれている抗体をもちいる実験は本法を用いた。ただし、ゴルジ装置、層板顆粒、角層細胞の層構造の保持は本法ではそこなわれやすいので、これを解析する場合は凍結超薄切片法を用いた。また、post-embedding法では抗原性が失われてしまう抗体もこの方法を用いた。またトランスグルタミナーゼによる架橋をうけて抗原性がマスクされているエピトープについては、トリプシン処理を施してから免疫反応を行った。

用いた1次抗体は、デスモグレイン、デスモコリン、コルネオデスモシン、LEKTI、カリクレイン7等である。これら分子の局在は金コロイド粒子を結合させた2次抗体によって可視化した。

4. 研究成果

角化異常症の病態を解明するために行った主な研究成果を文献番号順に列記する。

- (1) 角化症の病態形成機構の理解を助けるために単純化したモデルを提唱した。これは角化症の病態を理解しやすくするものである。ここでは顆粒細胞内の層板顆粒とその輸送系、デスモゾーム（コルネオデスモゾーム）の構成成分、それを分解する酵素であるカリクレイン、およびそのインヒビターである LEKTI の役割を主体に議論している。
- (2) 従来、表皮角層はレンガとモルタルに例えられてきた。ここではレンガは角質細胞、モルタルは角層細胞間脂質である。しかしこのモデルには角層細胞間の接着構造であるコルネオデスモゾームに相当する構造が欠落していた。このために理解しにくかつ

たいくつかの角化症の病態を我々の新しい角化機構モデルで説明した。

- (3) CEDNIK 症候群は SNAP29 の変異による疾患で、神経症状に魚鱗癬をともなう。我々は本症の世界で 2 番目の家系を報告した。さらに本症の *in vitro* モデルとして 3 次元培養皮膚で SNAP29 発現を低下させることで本症に特徴的な層板顆粒分子の分泌異常と角層肥厚を再現できることを報告した。
- (4) 正常皮膚では角層は組織標本で網の目状を呈するが、角化異常症においてはこれが形態的に異常となる。しかし正常角化で網の目状となる理由はこれまで不明であった。我々はこれが角層細胞間の接着構造の部位選択的な分解機構によると考え、細胞の辺縁においてはタイトジャンクションによって接着構造分解酵素の働きがさまたげられているためであることを示唆する研究結果を報告した。これは従来顆粒層にしか認められていなかったタイトジャンクションが角層に存在し、しかもバリア機能をもつことを証明することによりなした。
- (5) 3 次元培養皮膚を用いて、タイトジャンクションを障害する sodium caprate 処理により層板顆粒の分泌が低下することを報告した。このことから正常角化に必要な層板顆粒が正しく分泌されるためにはタイトジャンクションが重要な働きをしていると考えた。
- (6) 角化症の分類に関するコンセンサス会議に参加し、その成果をこれまで国際的に認められた分類のなかった角化症の国際分類として発表し、いくつかの病型についてはより病態を反映した新名称を提唱した。
- (7) これまで全く原因が不明であった comedonal Darier disease の原因が小胞体に局在するカルシウムポンプの遺伝子 *ATP2A2* であることを報告した。
- (8) 新規の遺伝性疾患 macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis (MACS syndrome と命名) の原因が細胞内小胞輸送の調節に関与すると推定される遺伝子 *RIN2* であることを報告した。
- (9) ヒト皮膚の層板顆粒の成分のプロテオミクス解析をはじめておこなった。983 個のタンパクを同定し、このうち新規の層板顆粒関連分子として細胞内小器官と微小管の相互作用に関与する CLIP-170 を同定した。この分子の層板顆粒の細胞内輸送における役割が示唆された。
- (10) 頭髪異常、神経学的異常、内分泌障害をともなう新規の常染色体劣性遺伝性疾患がリボソーム合成に関与する核小体分子 RBM28 の発現低下によることを発見した。患者の線維芽細胞ではリボソームの減少と粗面小胞体の内腔の

拡大がみられ、本症の病態が解明された。

- (11) コルネオデスモシンは表皮と毛のみで発現するタンパクであるが、その機能はよくわかっていなかった。この分子のノックアウトマウスを作製したところ、致死的であり、表皮角層間の接着の障害が生じていた。このことから本分子が生存に不可欠な細胞間接着機能をになっていることが明らかとなった。また発毛の異常もみとめられ、本分子の毛発生における機能も示唆された。
- (12) ARC 症候群は細胞内の物質輸送に関与する分子 VPS33B による遺伝性疾患であるが、ほぼ魚鱗癬が必発である。我々は今回、患者皮膚を初めて電顕的に研究したところ、層板顆粒の細胞外分泌障害が顕著であり、VPS33B の皮膚における機能を明らかにすることができた。
- (13) Naegeli-Franceschetti-Jadassohn 症候群ではクラチン 14 分子の発現低下によって、角化細胞が TNF- α 刺激に対し、アポトーシスを起こしやすくなっていることを報告した。
- (14) リンパ球の成熟に関与することが知られている転写抑制因子である Blimp-1 を表皮特異的に欠損させたところ、顆粒層から角層への分化が遅延することが示され、本転写因子の角化への関与が始めて示唆された。
- (15) 魚鱗癬の異常となる層板顆粒の輸送機構を明らかにする目的で、小胞輸送を調節する Rab11 分子と層板顆粒の局在を比較したところ、Rab11 が TGN から層板顆粒にかけて存在し、細胞内での顆粒の輸送に関与していることが示唆された。

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 15 件)

- ① Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process, *Medical Molecular Morphology*, 査読有, in press
- ② Ishida-Yamamoto A, et al. (3 名中 1 番目) Order and disorder in corneocyte adhesion, *J Dermatol*, 査読有, in press
- ③ Fuchs-Telem, D, Ishida-Yamamoto A, et al. (16 名中 14 番目) CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br J Dermatol*, 査

読有, 2011, 164: 53-57

- ④ Igawa S, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Takahashi H, Iizuka H, Ishida-Yamamoto H. Tight Junctions in the Stratum Corneum Explain Spatial Differences in Corneodesmosome Degradation. *Exp Dermatol*, 査読有, 2011, 20: 53-57
- ⑤ 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*. 査読有, 2010, 59(2):107-114
- ⑥ Oji V, Ishida-Yamamoto A, et al. (37 人中 19 番目) Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol*. 査読有, 2011, 63: 607-641
- ⑦ Tsuruta D, Ishida-Yamamoto A, et al. (10 人中 3 番目) Three-base deletion mutation c.120_122delGTT in ATP2A2 leads to the unique phenotype of comedonal Darier disease. *Br J Dermatol*. 査読有, 2010: 162(3):687-9
- ⑧ Basel-Vanagaite L, Ishida-Yamamoto A, Sprecher E. (21 人中 20 番目) RIN2 deficiency results in macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis: MACS syndrome. *Am J Hum Genet*. 査読有, 2009;85(2):254-63
- ⑨ Raymond AA, Ishida-Yamamoto A, et al. (8 人中 4 番目) Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion. *Mol Cell Proteomics*. 査読有, 2008;7(11): 2151-75
- ⑩ Nousbeck J, Spiegel R, Ishida-Yamamoto A, et al. (16 人中 3 番目) Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *Am J Hum Genet*. 査読有, 2008;82(5):1114-21
- ⑪ Matsumoto M, Ishida-Yamamoto A, et al. (19 人中 8 番目) Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有, 2008; 105(18): 6720-4
- ⑫ Hershkovitz D, Mandel

- H, Ishida-Yamamoto A, et al. (9人中3番目) Defective lamellar granule secretion in arthrogryposis, renal dysfunction, and cholestasis syndrome caused by a mutation in VPS33B. Arch Dermatol. 査読有, 2008; 144(3): 334-40
- ⑬ Lugassy J, Ishida-Yamamoto A, et al. (15人中7番目) KRT14 haploinsufficiency results in increased susceptibility of keratinocytes to TNF-alpha-induced apoptosis and causes Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome. J Invest Dermatol. 査読有, 2008;128(6):1517-24
- ⑭ Magnusdottir E, Kalachikov S, Mizukoshi K, Savitsky D, Ishida-Yamamoto A, Panteleyev AA, Calame K. Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 2007; 104: 14988-14993
- ⑮ Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Takahashi H, Iizuka H. Rab11 is associated with epidermal lamellar granules, J Invest Dermatol. 査読有, 2007; 127: 2166-2170
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 山本 明美, 角化異常症、第 109 回日本皮膚科学会総会、2010、4、16-17、大阪国際会議場、大阪市
- ② 山本 明美, 角化細胞の分化と皮膚バリアの構築、第 61 回日本皮膚科学科西部支部学術大会、ワークショップ 2、2009、10、25、B-Con Plaza別府国際コンベンションセンター、別府市
- ③ 山本 明美, 岸部 麻里, わかりやすくなった角化異常の機序と形態変化の関連、第 41 回日本臨床分子形態学会、シンポジウム 2、皮膚疾患解明の分子形態的アプローチ、2009、9、4、神戸国際会議場、神戸市
- ④ Akemi Ishida-Yamamoto, Lamellar body trafficking in the epidermal barrier and disease, Gordon Research Conferences, Barrier Function of Mammalian Skin, Molecular, Biophysical & Biomechanical Understanding of Skin Barrier Formation, Functin & Disease, 2009, 8, 9-14, Waterville Valley, NH, USA
- ⑤ Akemi Ishida-Yamamoto, A new model for sorting out ichthyosis, The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, 2009, 7, 10, Sapporo, Japan
- ⑥ Akemi Ishida-Yamamoto, Satomi Igawa, Mari Kishibe, Hajime Iizuka, Corneodesmosin-degradation occurs from the upper central surface area of cornified cells, 36th Society for Cutaneous Ultrastructure Research, 2009, 6, 11-13, Florence, Italy
- ⑦ 山本 明美, 水疱型・非水疱型魚鱗癬様紅皮症の臨床病型と本邦におけるガイドライン作成状況、第 108 回日本皮膚科学会総会 教育講演 4 遺伝性水疱症・遺伝性角化症、2009、4、24、福岡国際会議場、福岡市
- ⑧ Ishida-Yamamoto A, The Japanese experience on ichthyosis Ultrastructure, Ichthyosis Consensus Conference, 2009, 1, 23-24, Soreze, France
- ⑨ 山本 明美, Eli Sprecher, ARC症候群における魚鱗癬の病態形成機構の電顕的検討、第 23 回角化症研究会、2008、8、2、東京商工会議所、東京都
- ⑩ A Ishida-Yamamoto, Lamellar granules and ichthyosis, 5th Joint Meeting of SSSR and SCUR, Invited Lecture, 2008, 5, 17-19, Otsu, Japan
- ⑪ 山本 明美, 層板顆粒の輸送と角化症、第 7 1 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、シンポジウム 4 角化症と皮膚バリア障害、2007、9、22-23、札幌市
- ⑫ Akemi Ishida-Yamamoto, Distinct intracellular transport of different epidermal lamellar body molecules, Fist World Conference on Ichthyosis, 2007. 8. 31 - 2007. 9. 2, Munster, Germany
- ⑬ 山本 明美, 正常ヒト表皮における Rab11 の発現と層板顆粒との関連、第 22 回角化症研究会、2007. 8. 4、東京都
- ⑭ Ishida-Yamamoto A, Kaneta K, Kishibe M, Iizuka H, A recycling endosome marker Rab11 is associated with epidermal lamellar granules, 34th annual meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research, 2007, 6, 14-16, Praha, Czech Republic
- ⑮ 山本 明美, 分子と形態から解明する新しい角化異常症、第 26 回分子病理学研究会湘南シンポジウム、特別講演、2007、6、8-9、葉山町湘南国際村
- [図書] (計 9 件)
- ① Ishida-Yamamoto A, Inherited Keratinocyte Diseases (Ichthyosis and Related Disorders) Therapy of Skin Diseases, Springer-Verlag, 2010, pp561-573

- ②山本 明美、遺伝性掌蹠角化症、皮膚疾患診療実践ガイド、第2版、文光堂、東京、2009, pp488-491
- ③山本 明美、先天性魚鱗癬様紅皮症、皮膚疾患診療実践ガイド、第2版、文光堂、東京、2009, pp487-488
- ④山本 明美、小児に角質肥厚や落屑をみたら？、小児の皮膚トラブルFAQ、診断と治療社、東京、2008, pp230-232
- ⑤山本 明美、ロリクリン角皮症、皮膚病臨床カラーアトラス大系 2、講談社、東京、2008, pp76
- ⑥山本 明美、保湿をめぐるディベート、スキンケアを科学する、南江堂、東京、2008, pp216-220
- ⑦岸部 麻里、山本 明美、角層を知る、皮膚科診療最前線シリーズ スキンケア最前線、メディカルビュー社、東京、2008, pp20-21
- ⑧山本 明美、掌蹠の角化を診たら何を考える？、In What's New in 皮膚科学、宮地良樹編、メディカルレビュー社、東京、2007, pp60-61
- ⑨山本 明美、毛孔性苔癬、顔面毛包性紅斑黒皮症、皮膚疾患最新の治療 2007-2008. 瀧川雅浩、渡辺晋一、編、南江堂、東京、2007, pp138

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/bureau/ikaku/kennkyuugyouseki/c09hihuka.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・准教授

研究者番号：30241441

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：