

尋常性乾癬患者皮膚真菌叢の次世代高速 DNA シーケン
サーを用いた網羅的解析

Molecular characterization of skin fungal microbiome in
patients with psoriasis

山口大学大学院医学系研究科 情報解析医学系専攻

上皮情報解析医科学講座 博士後期課程

皮膚科学

竹本 朱美

平成 27 年 6 月

目次

第 1 章 緒言	3
1.1 背景	3
1.2 目的	3
第 2 章 方法	4
2.1 対象	4
2.2 採取方法と DNA 抽出	5
2.3 PCR による 26S rRNA 遺伝子増幅	6
2.4 シーケンサー処理および統計学的分析評価	6
2.5 マラセチア属の定量解析	7
第 3 章 結果	7
3.1 皮膚真菌叢の構成評価	7
3.2 定量的 PCR によるマラセチア属の検出率評価	11
第 4 章 考察	13
第 5 章 結語	14
第 6 章 謝辞	15
第 7 章 参考文献	15

第1章 緒言

1.1 背景

ヒト皮膚は外界に接しており、その表層には細菌、真菌やウィルスなど多種多様な微生物が棲息している。皮膚の表層に常在している微生物は抗菌ペプチドを産生したり、バイオフィルムを形成したり、病原菌による侵入を妨げたりすることでヒトの健康を維持するのに重要な役割を担っていることが知られている。またその一方で、これら微生物の多くは皮膚疾患の発症や増悪に関わっていることが知られている¹⁾³⁾。

これまでの多くの研究により、皮膚常在の微生物と健常皮膚あるいは皮膚疾患との関連において、特定の微生物が果たす役割が判明してきた。例えば、マラセチア菌種により脂漏性皮膚炎が発症し⁴⁾⁶⁾、*Propionibacterium acnes*により尋常性痤瘡が⁷⁾⁸⁾、黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎を発症するということが明らかになった⁹⁾¹⁰⁾。近年、研究手技の発達により、数100種の皮膚表層の微生物の同定を一度に行うことが可能となり、皮膚常在菌を網羅的に解析することが主流となっている。微生物がコロニーを形成するには、各部位に特異的な皮膚生理に大きく影響を受ける。つまり湿度、乾燥度、脂漏度が異なる皮膚表層の各部位の微小環境により、非常に多種多様な微生物が生育している¹¹⁾。また特定の疾患群と健常群、疾患の重症度や経過による皮膚菌叢の比較も研究されてきた¹²⁾¹⁵⁾。

乾癬は全人口の約1・2%が罹患している、表皮細胞増殖の亢進と過角化を特徴とする慢性炎症性角化症である¹⁶⁾。乾癬はHLA-Cw6などの特異的な病因や高脂肪酸摂取、薬剤誘発性など様々な環境因子によって誘発または増悪する可能性が示唆されている。滴状乾癬は上気道の連鎖球菌（ β 溶血性A群溶連菌）感染後に発症することが明らかになっている。連鎖球菌から放出された病原スーパー抗原がT細胞受容体の β 鎖可変領域に結合し、T細胞上の表皮向性受容体に結合することで皮膚のリンパ球抗原として表現される。扁桃に感染した連鎖球菌から放出されたスーパー抗原は咽頭のリンパ節の表皮向性T細胞を誘導し、皮膚に局在したT細胞をさらに活性化する¹⁷⁾¹⁸⁾。

また黄色ブドウ球菌などの細菌、マラセチアやカンジダを含む真菌、ヒトパピローマウィルスのようなウィルスなどの微生物もまた乾癬の発症や増悪

に関連があると言われている¹⁷⁾。しかしながら、尋常性乾癬患者における皮膚菌叢も完全には解明されていないのが現状であり、網羅的に解析することは乾癬の病因解明を行う上で非常に重要であると考えられた。

これまでの研究では、乾癬患者における皮膚菌叢解析は各々異なる分子生物学的手法を用いているため、様々な結果の報告となっている。これらの研究ではクローンライブラリー法か次世代シーケンサーにより解析されている¹⁹⁾²⁰⁾。本研究では、次世代高速シーケンサーを用いて乾癬患者の皮膚真菌叢の構造解析を行った。

1.2 目的

本研究では尋常性乾癬病変部の鱗屑を用いて、分子生物学的手法により、乾癬患者における疾患特異的な皮膚真菌叢を特定することを目的とした。またコントロール群として健常者の角層を用いることとした。

第2章 方法

2.1 対象

本研究の対象は、疾患群として以前山口大学医学部附属病院皮膚科外来に受診し、尋常性乾癬と診断された患者12人が参加した。患者内訳は全て男性、年齢は53～78歳（平均±SD, 63.8±10.3歳）であった。疾患の重症度は、皮疹の症状の重症度と面積から算出するPASI(Psoriasis Area and Severity Index)スコアを用いて評価した。また比較対象のため、健常者群として55～75歳（平均±SD, 59.3±11.6歳）の男女12人が参加した（表1）。

本研究は山口大学医学部附属病院の倫理委員会で承認されており、対象者からはインフォームドコンセントによる書面での同意を得ている。

Psoriatic patients						Healthy controls		
ID	Age	Sex	Age at onset	Disease duration(y)	PASI	ID	Age	Sex
PS 07	58	M	34	24	14.1	HS 01	61	M
PS 08	76	M	65	11	6.8	HS 02	67	F
PS 09	75	M	57	18	19.0	HS 03	70	M
PS 10	63	M	38	25	2.7	HS 04	65	M
PS 11	78	M	73	5	3.4	HS 05	64	F
PS 12	56	M	42	14	4.8	HS 06	60	M
PS 13	54	M	51	3	6.5	HS 07	57	M
PS 14	68	M	59	9	4.6	HS 08	56	F
PS 15	53	M	40	13	7.6	HS 09	55	F
PS 16	77	M	60	17	22.2	HS 10	58	F
PS 17	55	M	40	15	29.2	HS 11	75	M
PS 18	53	M	40	13	25.8	HS 12	69	F

表 1 本研究対象検体の背景

乾癬患者群、健常者群各 12 名、平均年齢は各々 63.8 歳、59.3 歳であった。PS；乾癬患者群、HS；健常者群。

2.2 採取方法と DNA 抽出

検体は乾癬患者群の病変部より鑷子を用いて鱗屑を採取し、健常者群はオプサイト(OpSite transparent dressing, 3cm×7cm; Smith & Nephew Medical, Hull, UK) を貼付して採取した。検体は両群とも体幹から採取した。採取された鱗屑とオプサイトから、杉田らの報告と同様の方法で直接真菌 DNA を抽出した²¹⁾。検体を溶解液 (100 m mol/L Tris-HCl [pH 8.0], 30 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] [pH 8.0], 0.5% sodium dodecylsulfate [SDS]) に入れ、100℃で 15 分間反応させた。その後、phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) および chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v)を用いて懸濁液を抽出した。真菌 DNA はエタノール加酢酸ナ

トリウム(3 mol/L)とエタ沈メイト(Nippon Gene, Toyama, Japan)を用いて沈殿させた。沈殿物は 1X TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 1 mmol/L EDTA [pH 8.0]) を用いて、懸濁し-20°C で凍結保存した。

2.3 PCR による 26S rRNA 遺伝子増幅

前述の検体試料から抽出した 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 可変領域部を PCR 増幅させた。PCR には目的とする真菌を増幅対象としている、シーケンスアダプター配列 A、B を含んだ NL1、NL4 のユニバーサルプライマーを用いた²²⁾。本研究で用いたプライマーを示す (表 2)。

Name	Sequence (5'→3')
B-NL1	cctatcccctgtgtgccttggcagctctcaGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
A-NL4	ccatctcaccctgcgtgtctccgactcagatcagacacgNNNNNGGTCCGTGTTTCAAGA CGG

表 2 ユニバーサルプライマーの塩基配列

小文字は A、B の各アダプター配列。N は各サンプルでの独自のバーコードを示す。

PCR 条件は、初期熱変性を 94°C、1 分、続いてサイクリングを熱変性 94°C、30 秒、アニーリングを 56°C、30 秒間および 72°C、30 秒間、伸長反応を 72°C、10 分間で、計 30 サイクルとした。検体を含まないネガティブコントロールも同様に PCR 反応を行った。各 PCR 増幅産物を精製した後、1 チューブに等モル量の PCR 反応を混合した。精製後の増幅混合物を添付の説明書に従い、次世代高速シーケンサー (Roche 454 FLX instrument ; Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan) にかけた。

2.4 シーケンサー処理および統計分析評価

次世代高速シーケンサーにて得られた、膨大な処理量の D1/D2 サブユニット配列を、QIIME パイプライン (<http://qiime.org>) を用いて処理、解析を行った。シーケンス配列からプライマーおよびバーコード配列を除く前処理を行い、300bp ~ 1000bp の塩基配列を取り出した。その後解析ソフト UCLUST (http://qiime.org/scripts/pick_otus.html) を用いて 97% より高い閾値で類似性を持つ配列同士をクラスタリングし、OTU (Operating Taxonomic Unit) 解析

を行った。各 OTU に属するリード数の中から代表的な配列を選び、RDP classifier version 2.6 (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/jsp>) を用いてデータベース検索を行い、真菌属種名を同定した。乾癬群および健常群の種多様性を比較するため、R パッケージ (<http://cran.r-project.org>) を用いて Shannon の多様度指数 (Shannon diversity index) を算出した。有意検定はスチューデントの t 検定を用いた。また Fast Unifrac (<http://unifrac.colorado.edu>) を用いて検体をクラスター解析し、3-D 主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, 以下 PCoA) を用いて範疇ごとにデータを分類した。

2.5 マラセチア属の定量解析

M. globosa、*M. restricta* の主要 2 菌種を含む全マラセチア属の DNA は、杉田ら²¹⁾ の方法と同様に属特異的もしくは種特異的なプライマーと TaqMan プローブを用いて定量解析した。

第 3 章 結果

3.1 皮膚真菌叢の構成評価

皮膚科領域の疾患に及ぼす微生物の役割を理解するために、皮膚菌叢を更に詳細に評価することとした。

本研究では、12 人の乾癬患者と同じく 12 人の健常者の皮膚真菌叢を次世代高速シーケンサーを用いて評価した。26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域を、ユニバーサルプライマー (その領域に設計した種特異的プライマー) を用いて PCR で増幅した後、次世代高速シーケンサー (Roche 454 FLX instrument ; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) にかけて。結果、300~1000bp の長さの塩基配列を持つ総計 317806 リードのシーケンス結果が得られた (表 3)。リード数は、乾癬患者群と健常者群で有意な差は認められなかった (乾癬患者群; 13157±1990、健常者群; 13326±1909)。全検体からは 2 つの門 (Ascomycota、Basidiomycota)、142 属が得られた。そのうち、26 属が酵母様真菌で、116 属が糸状菌であった (表 4)。

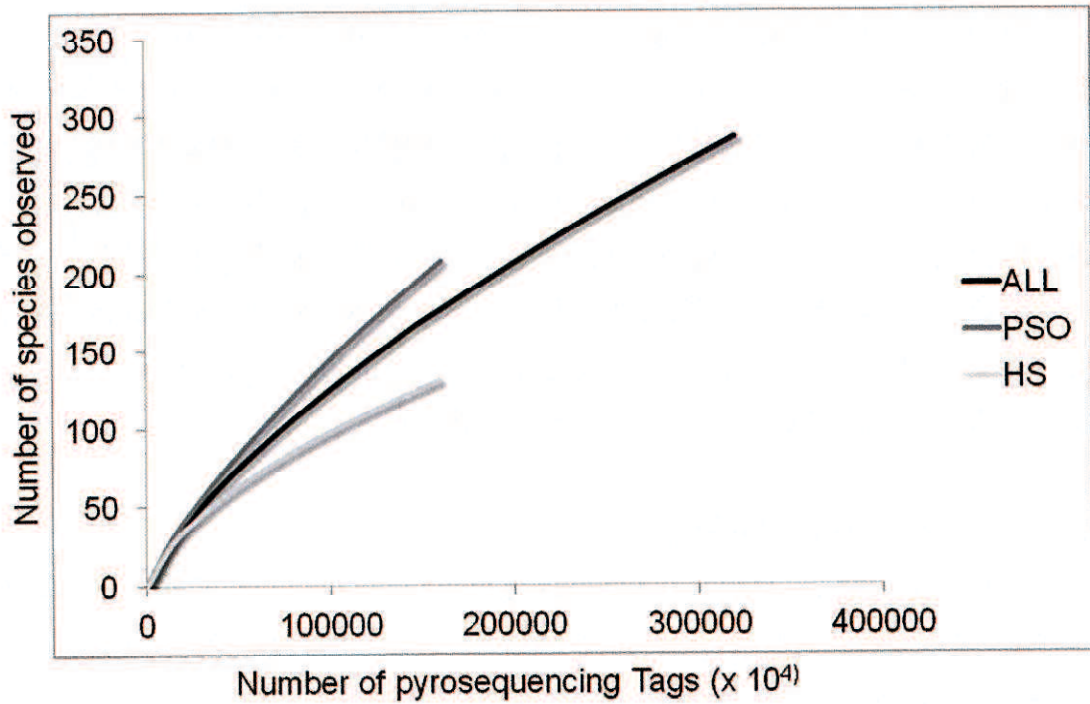


表 8 各検体群のリード数と菌種数

300~1000bp の長さの塩基配列を持つ総数 317806 リードのシーケンス結果が得られた。

リード数は、乾癬患者群と健常者群で差はなかった（乾癬患者群; 13157±1990、健常者群;

13326±1909）。(ALL;全検体、PSO;乾癬患者群、HS;健常者群)

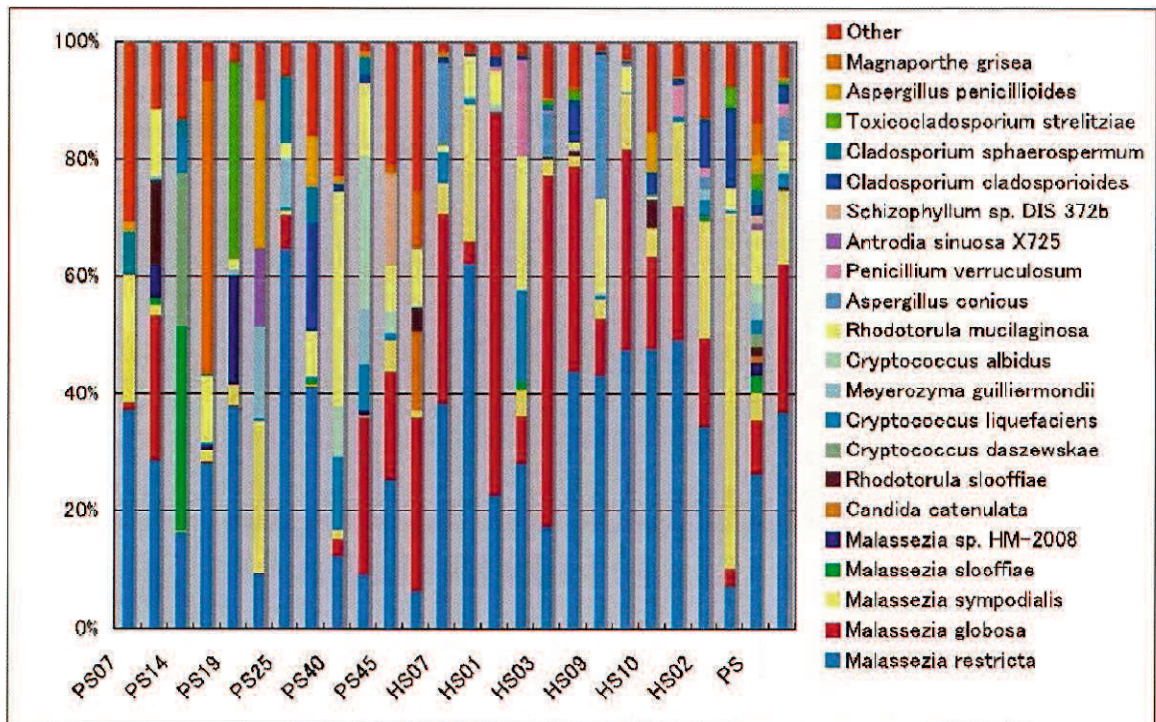


表 4 乾癬患者群および健常者群の真菌叢分布

全 24 検体の真菌叢からは 142 属が得られた。そのうち 26 属がマラセチア属を含む酵母様真菌で、116 属が糸状菌であった。PS；乾癬患者群、HS；健常者群。

解析の結果、両群ともに最も多く認められたのはマラセチア属であった。加えて、乾癬患者群に比較し健常者群のマラセチア属の検出率が高かった（乾癬患者群 25.3-72.4%；中央値 46.9±14.0%、健常者群 43.1-91.3%；中央値 76.0±14.6%）（図 1）。またマラセチア属以外の菌種の検出率は、乾癬患者群で 3.1-68.0%（27.7±19.5%）、健常者群で 2.2-39.4%（9.8±10.3%）であった。このうち、両群ともに主要構成菌種は糸状菌と判明した（乾癬患者群 3.9-55.1%；中央値 25.4±17.7%、健常者群 1.6-25.9%；中央値 14.2±8.1%）。今回の解析結果では、乾癬患者群および健常者群各々に特異的な真菌は検出されなかった。アスペルギルス属やクラドスポリウム属は糸状菌の中で最も多く検出され、クリプトコッカス属やロドトルラ属は酵母様真菌の中で両群において最も多かった。これらのうち、ロドトルラ属は両群間でマラセチア属に次いで 2 番目に多く検出された（乾癬患者群 10.9±10.8%、健常者群 5.7±6.9%）（図 2）。

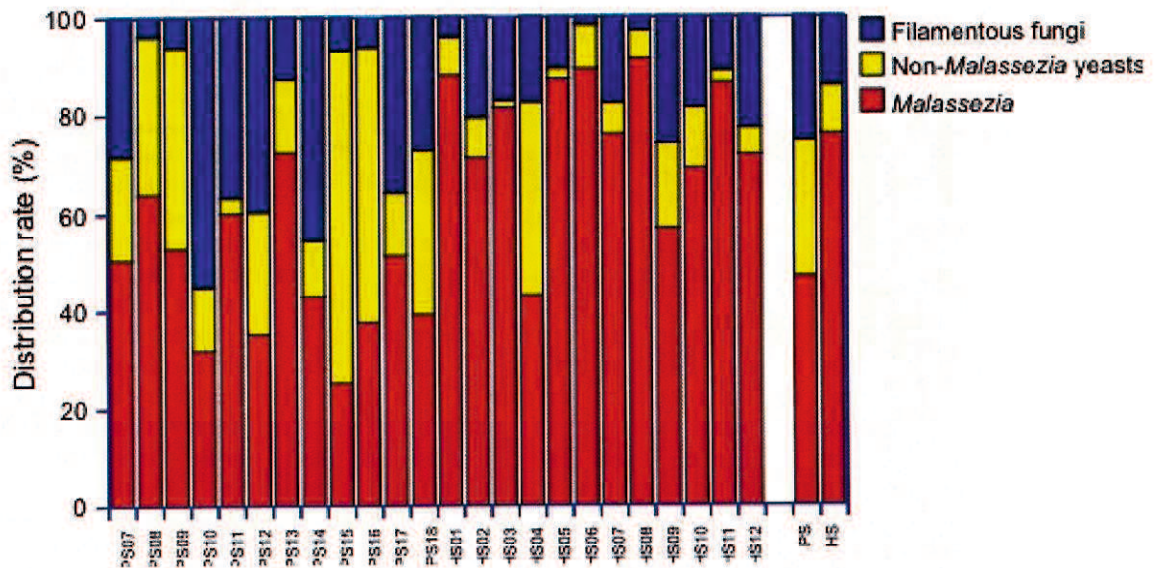


図1 乾癬患者群および健常者群の真菌分布比率

マラセチア属、非マラセチア属および糸状菌に分類しグループ化したグラフを示す。

右端の2本の棒グラフは各々乾癬患者群と健常者群の平均値を現している。PS; 乾癬患者群、HS; 健常者群。

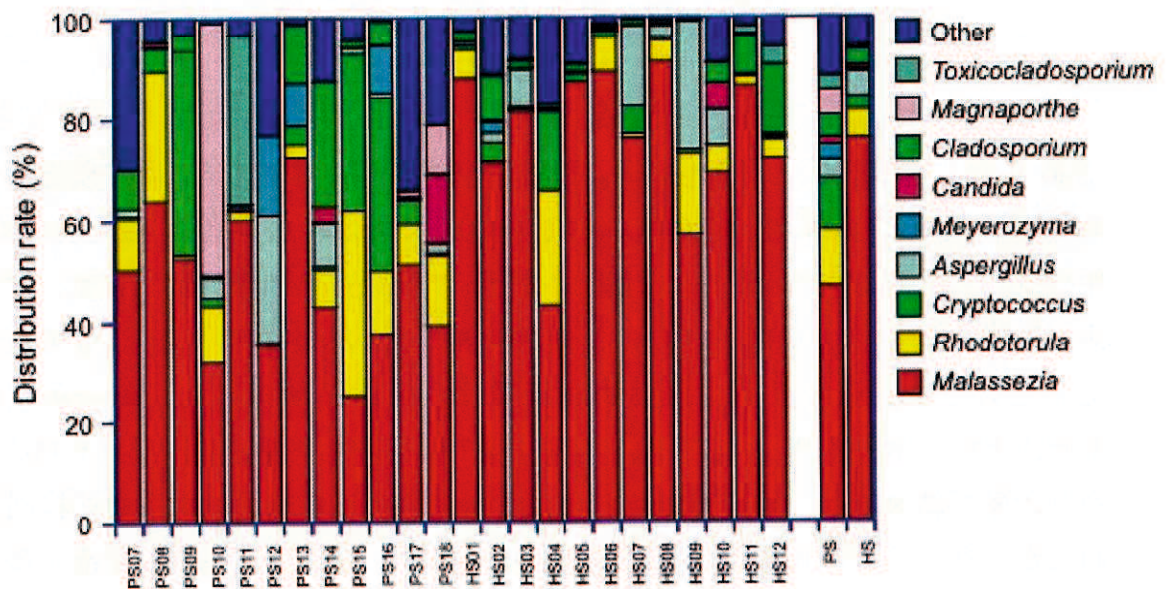


図2 1%以上を占めた真菌属の分布比率

グループ化したグラフを示す。

右端の2本の棒グラフは各々乾癬患者群と健常者群の平均値を現している。

次に、Shannon の多様度指数を用いてサンプル間での多様性を計算した。多様度指数とは、種多様性の要素には種の豊富さと均等度があるが、その両者を考慮した指数のことである。ここでは、乾癬患者群は健常者群に比較して真菌種の多様性が非常に高いことが示された ($p < 0.05$) (図 3)。また PCoA は、視覚的に検体間での多様性を評価したり、検体間の相互関係を解析したりする際に用いられる統計学的解析法のひとつである。PCoA 上での検体間の距離が近いほど、その 2 者は類似度が高いといえる。今回の分析の結果、両群の母集団は有意差 ($p < 0.05$) をもって独立して分かれていた (図 4)。

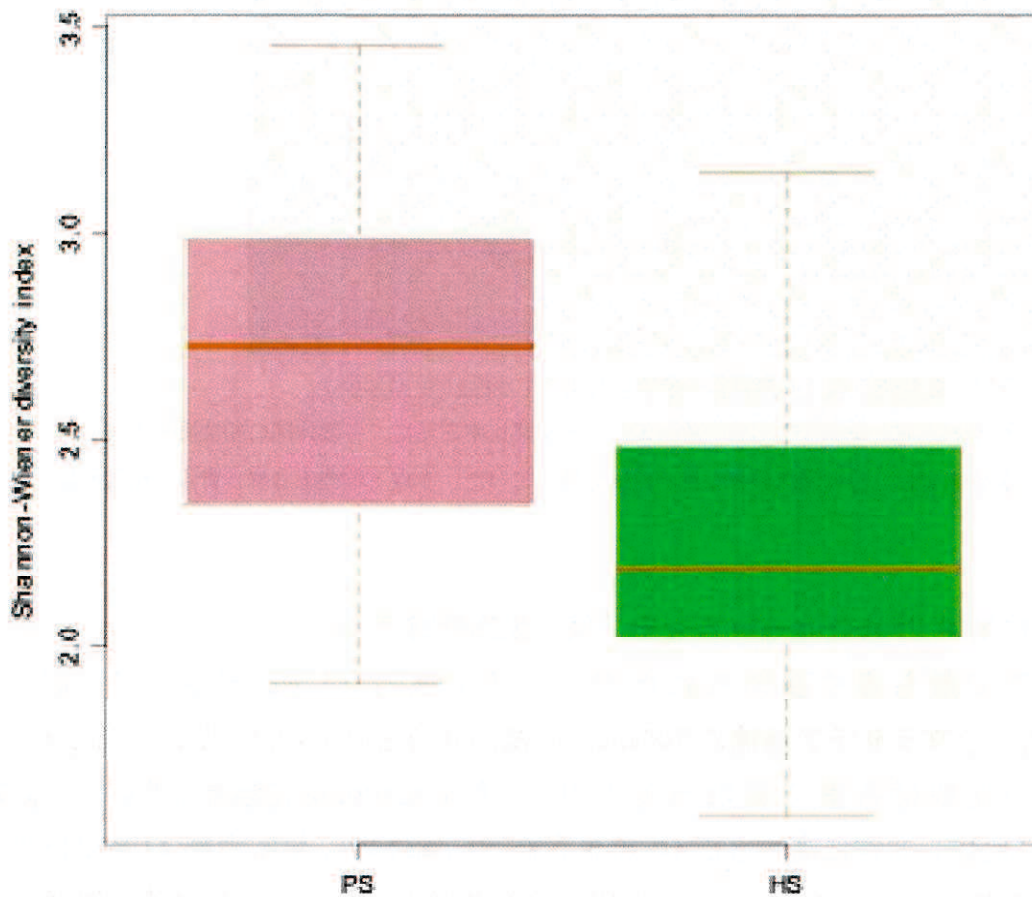


図 3. 乾癬患者群と健常者群における Shannon の多様度指数 (Wilcoxon rank sum test, $P < 0.05$)
乾癬患者群 (PS) と健常者群 (HS) の種の多様性を示したものの。PS 群は HS 群と比較して非常に高い多様性を示していることが明らかとなった。

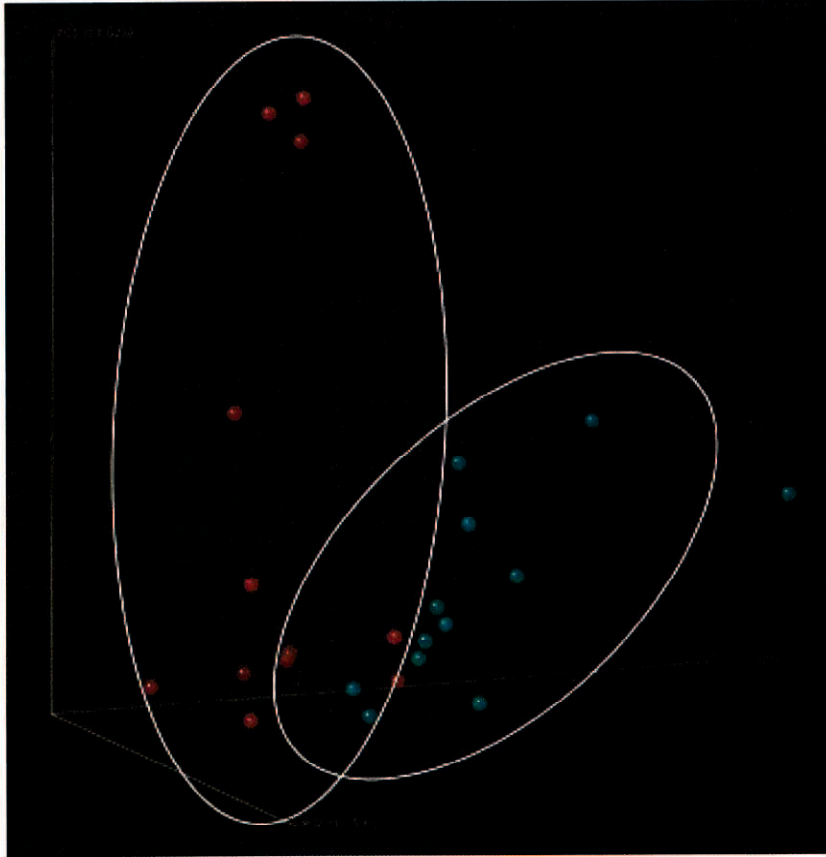


図 4. 各個体における真菌種の分布に対する主座標分析 (PCoA)

乾癬患者群と健常者群の各個体が示した真菌叢比率を元に、各個体間の相関関係を表した。乾癬患者群と健常者群の分布は明確に分離していた。赤点；乾癬患者群、青点；健常者群

3.2 定量的 PCR によるマラセチア属の検出率評価

両群で最も多く認められたマラセチア属は *M. restricta*、*M. globosa* であり、全マラセチア菌種の 70%以上の検出率を占めていた。しかしながら、2 菌種の比率は各群で異なっており、*M. restricta* は乾癬患者群の方が健常者群に比較し非常に高かった (乾癬患者群 $59.7 \pm 24.2\%$ 、健常者群 $41.8 \pm 21.6\%$ 、各 $p < 0.05$)。一方 *M. globosa* の比率は健常者群の方が高かった (乾癬患者群 $14.5 \pm 19.6\%$ 、健常者群 $25.3 \pm 23.2\%$) (図 5)。

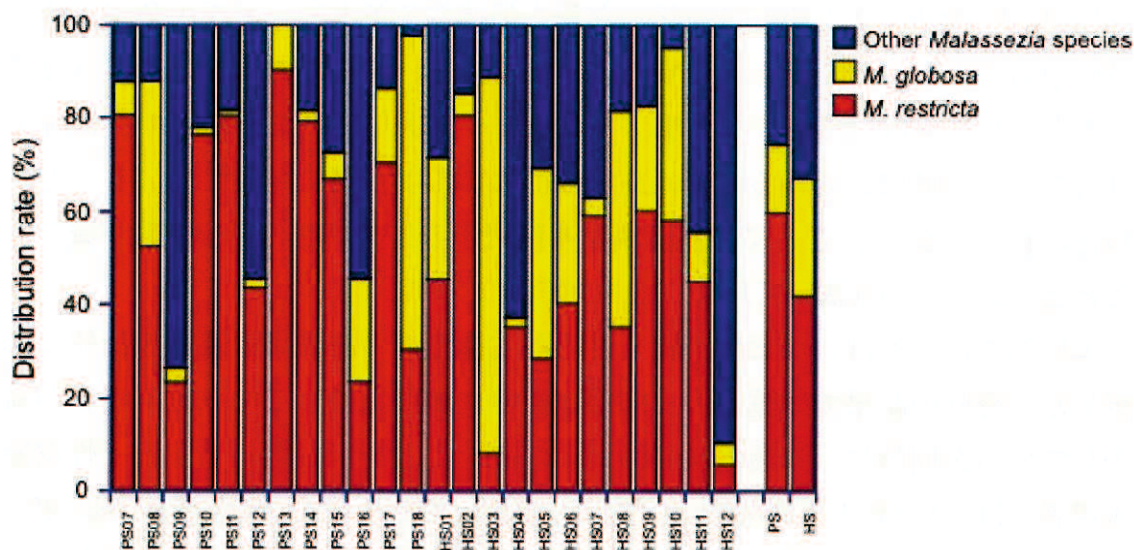


図 5. 乾癬患者群と健常者群における *M. restricta* および *M. globosa* の比率

乾癬患者群 (PS) と健常者群 (HS) の *M. restricta* および *M. globosa* が全マラセチア菌種に占める割合を示している。右の 2 本のグラフは各々 PS 群、HS 群の平均を示す。

第 4 章 考察

今回の研究は、乾癬患者の皮膚真菌叢を次世代高速シーケンサーを用いて包括的に解析した初めての報告である。過去に報告された論文に、皮膚に常在するマラセチア属の菌叢を、培養を介さずに分子レベルで検出する方法を用いたものがある。Paulino ら²³⁾は rRNA クローンライブラリーを用いて、乾癬患者と健常人の皮膚のマラセチア菌叢を解析した。両群ともに *M. restricta* が最も主要な構成菌種で、*M. globosa*、*M. sympodialis* がこれに続く。また何種かの不明なマラセチア菌種の表現型の検出も両群から検出されている。検出された菌種は後にリアルタイム PCR を用いて確認、同定されている²⁴⁾。高畑ら²⁵⁾もまた *M. restricta* が日本人の乾癬患者の皮膚に最も多く常在していることを報告した。これらの研究結果では、本研究の結果と同様、PASI スコアとマラセチア属の菌叢占有率は相関がみられなかった。

今回の研究結果で示したものは異なり、これらの研究はマラセチアの菌叢にのみ焦点を充てているが、マラセチア菌種が乾癬の皮疹増悪に関連があることを示唆している文献も散見される²⁶⁾。マラセチアは表皮ケラチノサイトで

TGF- β 、HSP70、インテグリン鎖の発現を促進することで、表皮の角化細胞の過剰増殖や不全角化を引き起こすといわれている。さらにこれらのサイトカインやタンパク質は全て、マラセチアがコロニー形成していない乾癬の皮疹部よりもコロニー形成している乾癬の皮疹部においてより高く発現していることが報告されている²⁷⁾。さらに、抗真菌薬を使用するとマラセチアの菌数が減少するとともに皮疹が軽快していくことも知られている。

本研究で、我々はマラセチア属を含めた乾癬患者の皮膚真菌叢を包括的に解析した。今回の結果では乾癬の皮疹部は健常皮膚に比較してマラセチア属が減少していると同時に、真菌の多様性がより高いことを示した。アトピー性皮膚炎患者では、マラセチアの菌量は健常人の皮膚よりも少なく(疾患群 68.7 \pm 3.2%、健常群 79.2 \pm 4.2%)、真菌叢も健常群に比較して高い多様性がみとめられた。また同様の結果が脂漏性皮膚炎患者でも得られた (Dr. A.Tanaka, pers. comm., 2014)。これらのデータからマラセチア関連疾患患者の皮膚真菌叢は、各種皮膚疾患の別に関わらずマラセチア属が減少し、菌叢の多様性が高くなっているという点で類似していることが示唆される。

真菌叢解析の他に、乾癬患者の細菌叢解析に関して二つの文献報告があり²⁰⁾²¹⁾、ともに乾癬患者群と健常群の細菌叢に差がみられたことが報告されている。Firmicutes 門と Proteobacteria 門に属する細菌は患者群、健常群ともに共通してみられるが、その占める割合は各々の文献で異なっている。

今回の真菌叢に関する検討結果から、乾癬患者の方が健常者に比較して菌叢が多様性に富むことが判明した。乾癬患者における菌叢の多様性はどのようなメカニズムで形成されてきたのかを今後研究することにより、従来の乾癬治療とは視点の異なる新しい治療法の開発への道を拓くことが期待される。

第5章 結語

マラセチア属は乾癬患者群、健常群ともに最も多くみられる菌種であるが、真菌叢は乾癬患者群の方が健常群よりもより多様化していた。乾癬患者の皮膚真菌叢と疾患との関連は未だ確立してはいないが、本研究では乾癬患者の真菌叢は健常群の真菌叢とは独立していることが示された。

第6章 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野、武藤正彦教授に感謝致します。また、実験のご指導を頂きました明治薬科大学微生物学教室、杉田隆教授に感謝申し上げます。

第7章 参考文献

1. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 244–253.
2. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* 2008; 158: 442–455.
3. Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1974–1980.
4. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 345–351.
5. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 106–141.
6. Hay RJ. *Malassezia*, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview. *Br J Dermatol* 2011; 165(Suppl 2): 2–8.
7. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2012; 68: 474–485.
8. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. *Lancet* 2012; 379: 361–372.
9. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011; 242: 233–246.
10. Kong HH, Oh J, Deming C et al. Temporal shifts in the skin microbiome

- associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012; 22: 850–859.
11. Grice EA, Kong HH, Conlan S et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 2009; 324: 1190–1192.
 12. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11971–11975.
 13. Zhang E, Tanaka T, Tajima M et al. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2011; 55: 625–632.
 14. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS ONE* 2012; 7: e37818.
 15. Park HK, Ha MH, Park SG et al. Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. *PLoS ONE* 2012; 7: e32847.
 16. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 377–385.
 17. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 2007; 25: 606–615.
 18. Munz OH, Sela S, Baker BS et al. Evidence for the presence of bacteria in the blood of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 2010; 302: 495–498.
 19. Gao Z, Tseng CH, Strober BE et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS ONE* 2008; 3: e2719.
 20. Fahl_en A, Engstrand L, Baker BS et al. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 2012; 304: 15–22.
 21. Sugita T, Suto H, Unno T et al. Molecular analysis of *Malassezia*

- microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3486–3490.
22. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1216–1223.
23. Paulino LC, Tseng CH, Strober BE, Blaser MJ. Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2933–2941.
24. Paulino LC, Tseng CH, Blaser MJ. Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR. *FEMS Yeast Res* 2008; 8: 460–471.
25. Takahata Y, Sugita T, Hiruma M, Muto M. Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of patients with psoriasis using a real-time polymerase chain reaction assay. *Br J Dermatol* 2007; 157: 670–673.
26. Rudramurthy SM, Honnavar P, Chakrabarti A, et al. Association of *Malassezia* species with psoriatic lesions. *Mycoses* 2014; 57: 483–488.
27. Baroni A, Paoletti I, Ruocco E et al. Possible role of *Malassezia furfur* in psoriasis: modulation of TGF- β 1, integrin, and HSP70 expression in human keratinocytes and in the skin of psoriasisaffected patients. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 35–42.

