

200936194A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

肥大性皮膚骨膜炎における遺伝形式をふまえた
新しい病型分類の
提言と既存治療法の再評価
平成21年度総括・分担研究報告書

平成22年（2010年）3月

研究代表者

新関 寛徳

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

肥大性皮膚骨膜症における遺伝形式をふまえた
新しい病型分類の
提言と既存治療法の再評価
平成21年度総括・分担研究報告書

平成22年（2010年）3月

研究代表者

新関 寛徳

目次

I. 平成21年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
平成21年度総括研究報告	3
新関寛徳 (国立成育医療センター皮膚科)	
III. 分担研究報告	
完全型 pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) における病態の解明 に関する研究	9
梶島健治 (京都大学医学研究科)	
肥厚性皮膚骨膜炎における HPGD 変異検索および生化学的検査	14
奥山虎之 (国立成育医療センター臨床検査部)	
過去21年間の本邦原著論文の集計による臨床亜型に特徴的な症状・所見の検討	19
新関寛徳 (国立成育医療センター皮膚科)	
肥厚性皮膚骨膜炎における関節症状の文献的考察	25
関 敦仁 (国立成育医療センター皮膚科)	
Pachydermoperiostosis 当院症例の報告	30
石河 晃 (慶應義塾大学医学部皮膚科)	
Pachydermoperiostosis における頭部脳回転様皮膚と他症状との相関について	35
石河 晃 (慶應義塾大学医学部皮膚科)	
脳回転状皮膚に対しての手術	41
桑原理充 (奈良県立医科大学皮膚科、形成外科)	
肥厚性皮膚骨膜炎において過去に試みられている治療法の検索	45
種瀬啓士 (川崎市立川崎病院皮膚科)	
IV. 平成21年度研究成果に関する刊行一覧	51
V. 平成21年度第1回班会議プログラム・抄録	55
VI. 研究成果の刊行物・別刷り	65

[I]

平成 2 1 年度構成員名簿

別紙様式

「肥大性皮膚骨膜炎における遺伝形式を踏まえた新しい病型分類の提言と既存治療法の再評価」研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	新関 寛徳	国立成育医療センター第2専門診療部皮膚科	医 長
研 究 分 担 者	奥山 虎之	国立成育医療センター臨床検査部	部 長
	関 敦仁	国立成育医療センター第2専門診療部整形外科	医 長
	石河 晃	慶應義塾大学医学部皮膚科	准 教 授
	桑原理充	奈良県立医科大学医学部皮膚科	講 師
	椛島健治	京都大学大学院医学研究科	准 教 授
研 究 協 力 者	種瀬啓士	川崎市立川崎病院皮膚科	副医長

[II]

總括研究報告

肥大性皮膚骨膜炎における遺伝形式を踏まえた新しい病型分類の提言と既存治療法の再評価

研究代表者 新関寛徳 国立成育医療センター皮膚科医長

研究要旨

Pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) の病型分類について、再検討を行ない、新しい分類に基づき従来使用されていた薬剤の治療効果を再検討することを目的として研究班を結成した。2008年、PDPにおける1亜型について、原因遺伝子 HPGD が報告され、新たな臨床分類が期待されている。初年度は、第一次全国調査の準備として送付資料となるアンケート記入項目を検討した。臨床亜型において特徴のある所見として、不全型と家族歴、関節炎・骨炎、完全型と脂漏、他の皮膚症状が見出され、治療法においても、関節炎、皮膚肥厚とも手術療法が有効な症例があった。3例で遺伝子診断を試みたが HPGD 遺伝子に変異は発見されなかった。しかし、血中・尿中 PGE2 を測定したところ、1例で血中・尿中とも高値の症例が見つかった。

共同研究者

奥山 虎之(国立成育医療センター臨床検査部・部長)

関 敦仁(国立成育医療センター整形外科・医長)

石河 晃(慶應義塾大学医学部皮膚科・准教授)

桑原理充(奈良県立医科大学皮膚科形成外科・講師)

梶島健治(京都大学医学部皮膚科・准教授)

種瀬啓士(川崎市立川崎病院皮膚科・副所長)

2) 完全型 PDP における病態を解明するために皮膚生検にて採取した線維芽細胞の特徴を検討する(梶島)。

完全型 PDP にみられる脳回転様皮膚の形成外科的(整容的)治療法について検討する(桑原)。

3) 不全型 PDP に特徴的な関節症状の特徴を文献的に明らかにし、アンケート調査に反映させる(関)。

4) PDP 症例において HPGD 遺伝子変異を検討する(奥山、新関)。

5) PDP の皮膚症状と最も特徴的な頭部脳回転様皮膚と他の皮膚症状との関連を明らかにし、アンケート調査に反映させる(石河)。

6) PDP の既存治療法についてレビューを行い、アンケート調査に反映させる(種瀬)。

A. 研究目的

当該課題では、pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) の病型分類について、再検討を行ない、新しい分類に基づき従来使用されていた薬剤の治療効果を再検討することを目的とする。2008年、PDPにおける1亜型について、原因遺伝子 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) が同定され、変異アレルは semi-dominant な遺伝形式であることが報告された¹⁾。従って、これまで、常染色体優性、劣性および性染色体伴性遺伝形式と考えられてきた当該疾患の遺伝的異質性に関する仮説の再検討が可能となった。

下記のごとく分担して研究を行った。

1) アンケート調査の事前準備として、当該疾患の認知普及を推進する資料を作成する：文献調査、データベースの HP 公表(新関、関、石河、桑原、種瀬)。

B. 研究方法

1) 文献調査とHPの作成

医中誌 web(version 4.0)により過去21年分の原著論文を検索したところ、39例を収集できた。班員で分担して論文を閲覧し、臨床所見を拾い上げ、表に記入した。臨床亜型ごとに所見の頻度を計算し、完全型、不全型に頻度の多い所見を検索した。39例はキーワード検索機能を付与したデータベースとしてホームページ上に公開した (<http://www.pdp-irp.org/>)。

2) 遺伝子診断と生化学的検査

患者3名よりDNAが得られた。型通りエクソンとその周囲のイントロンを含めて直接塩基配列決定法により変異の検索を行った。

血中、尿中 Prostaglandin E2 濃度は、採取した血清、新鮮尿を一旦-20℃で凍結、保存し、測定前に解凍した。おのおの原液と10倍希釈にて ELISA Kit (Prostaglandin E2 Kit-Monoclonal, Cayman Chemical, USA) により測定した。

3) 整形外科的検討

1) において選択した39例について整形外科的検討を行った。

4) 皮膚科学的検討

同上の39例について皮膚症状同志の関連を検討した。

5) 形成外科的検討

同上の39例において観血療法を行った症例について検討した。

6) 既存治療の検討

同上の39例の治療に関する記載について検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断および生化学的検査の実施に際しては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H17.6.29)、臨床研究に関する倫理指針(H20.7.31)を遵守し、国立成育医療センター倫理審査において承認を受けた。

C. 研究結果

1) 文献調査とHP作成

以下の項目につき、完全型、不全型において比較を行った：年齢（初診時）、性別、家族歴、病名（論文中の記載）、臨床亜型（論文中の記載）、3主徴（clubbed fingers、periostosis、cutis verrucosities gyrate 頭部脳回転様皮膚）、pachydermia（皮膚肥厚）、脂漏・油性光沢・ざ瘡・湿疹、発熱、多汗症、関節症状、貧血、胃・十二指腸潰瘍、低カリウム血症、治療法。以上のうち不全型では、同症の家族歴、関節症状（関節炎、骨炎）の頻度が高かった（いずれも $P<0.005$ ）。完全型では、脂漏・油性光沢・ざ瘡・湿疹の頻度が高

かった。

2) 遺伝子診断と生化学的検査

検索した3例（不全型2例、完全型1例）ではコーディング領域および周辺のイントロン配列に（機能喪失が予想される変異）は見出されなかった。

しかし生化学的検査では、完全型1例で、PGE2は血中3880 ng/ml、尿中68160 ng/mlと高値であった。

3) 整形外科的検討

文献調査に用いた39例の検討で、関節炎・骨炎とみなされる症例は、不全型7/9例に対し、完全型2/15例であった（ $P=0.003$ ）。その中で家族歴のある症例は兄弟例が多く、常染色体劣性遺伝と考えて矛盾しなかった。

4) 皮膚科学的検討

完全型、不全型の区別に用いられる頭部脳回転状皮膚に着目し、その有無と、そのほかの症状との間に相関関係があるかどうか、検討した。その結果、頭部脳回転状皮膚の存在と脂漏・油性光沢・湿疹・痤瘡との間に強い相関が認められた（ $P<0.0005$ ）。

5) 形成外科的検討

同上の30例のうち手術を行った症例は6症例あり、対象部位は前額6例、頬部3例、頭部1例であった。

主な術式は、皺の切除5例、内視鏡的つり上げ術1例、自験例のエキスパンダー1例であった。経過観察中に再発について言及しているもの1例であった。

6) 既存治療法の検討

同上の39例の様々な症状に対する治療法およびそれぞれの予後を照合した。その結果、一部の症例において一定の効果が得られているものがあることが判明した：ヒト胎盤抽出物の長期投与（完全型）、コルヒチン（関節症状）、bisphosphonate投与と滑膜除去術（不全型1症例症状軽快）、tamoxifen citrate投与と滑膜除去術（不全型1症例、症状軽快）。

D. 考察

1) 文献調査とHP作成

今回、第一次全国調査を行う前に文献調査を行った理由は、当該疾患が非常に稀な疾患であり、かつ医師

からの認知が低い疾患に対し、アンケート用紙に記載すべき疾患に関する資料を充実させるのが目的であった。また、合併症が多彩なため、症候ごとに主治医が異なり、ひとつの疾患概念の中で診療がなされていない症例を見逃さないために、臨床亜型と症状との関連を明らかにすることを試みたところ、一定の成果を得た。すなわち不全型と家族歴、関節炎・骨炎との関連、完全型と皮膚症状（脂漏・油性光沢・ざ瘡・湿疹）である。今後の遺伝子診断、臨床亜型の診断に役立つ知見と考えられる。このような作業により、症例によって記載に偏りがあることが改善され、より一層詳細な記録が得られるものと考えられる。

2) 遺伝子診断と生化学的検査

予想に反し、不全型2例から HPGD 遺伝子変異は発見されなかった。さらに驚くべきことに完全型において PGE2 が高値であった。直接塩基配列決定では検出できない大きな欠損や、あるいは機能的に PGE2 分解経路に働く遺伝子が第2の（未知の）原因遺伝子である可能性が考えられた。新しい原因遺伝子の発見が当該研究班においても喫緊の課題である。

3) 整形外科的検討

同上の39例の検討では、当初関節症状に関する記載では、完全型で9/14例、不全型で9/9例に記載があることがわかった。しかし頻度に有意差は5%をわずかに超えており、統計的に有意ではなかった。しかし、関節所見のうち炎症所見に着目したところ、完全型では、痛みのみではっきりと炎症を伴う所見を持つ症例が少ないことがわかった。おそらく完全型では、骨膜肥厚により、関節付近の骨同志がこすれて痛みを生じるが、不全型でみられる滑膜炎など炎症症状とは異なる病態であろう。

4) 皮膚科学的検討

今回の検討により、頭部脳回転状皮膚の形成に脂腺増殖刺激が関与している可能性が示唆されたとともに、Pachydermoperiostosis と肥大性骨関節症は発症原因に若干の差があることが示唆された。

5) 形成外科的検討

桑原らは、頭部、前額部の症状を訴える患者に対して、エキスパンダーを用いた方法を試みた。頭皮の伸展を目的とした手術はエキスパンダーによる

方法が良い適応であるが、PDP 患者の場合、伸展が大変不良であったため、術式の変更を迫られた。最終的に頭部は皺を切除する術式、前額部には皮膚移植を行った。現在のところ、皺を直接切除、縫合する手術の方が、一般的な皮膚伸展を期待した手術、さらにはエキスパンダーを用いた皮膚伸展を利用した手術よりも、効果的であると考えられた。

6) 既存治療の検討

NSAIDsは本疾患の一部の症例で認められるとされるアラキドン酸カスケードの異常¹⁾に直接働きかける治療法という意味で有効性が期待されるが、いずれも単独では効果が得られていない。また、コルヒチンの投与、胎盤抽出物の投与などはごく少数例に対してのみ行われているものであり、当該疾患のすべての症例に有効であるかは不明である。しかし、実際にPGE2高値である症例に投与した報告は未だないので、検討を要する。

E. 結論

文献検索により、完全型、不全型に特徴な所見がいくつか明らかになった。今後、全国調査によりさらに症例数をふやして検討し、PGE2過剰症としての実態も調査が進むことが期待される。

<引用文献>

- 1) Uppal S, et al: Nat Genet 40:789, 2008

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

英語論文

1. Kabashima K, Sakabe JI, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y. 2009. Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. Am J Pathol 176: 721-32, 2009
2. Nemoto-Hasebe I, Ishiko A (他5名): Novel mutation p.Gly59Arg in GJB6 encoding connexin 30 underlies palmoplantar keratoderma with pseudoainhum, knuckle pads and hearing loss. Br J

- Dermatol 161: 452-455, 2009
3. M. Saito, T. Masunaga, Ishiko A: A novel de novo splice-site mutation in the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB): specific exon skipping could be a prognostic factor for DDEB pruriginosa. Clin Exp Dermatol 34: e934-936, 2009
 4. Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Satoru S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Daisuke S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H: Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. Hum Mut 31: 208-316, 2009
 5. Hitoshi Saito, Atsushi Shimizu, Kazuyuki Tsunoda, Masayuki Amagai, Akira Ishiko: Subcellular localization of desmosomal components is different between desmoglein3 knockout mice and pemphigus vulgaris model mice. J Dermatol Sci 55: 108-115, 2009
 6. Tomura M, Honda T, (他 10 名), Kabashima K: Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. J Clin Invest 120:883-93, 2010
 7. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K: Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol (in press)
 8. Moniaga CS, Egawa G, (他 12 名), Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. Am J Pathol (in press)
 9. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S: Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 124:809-18. e2., 2009
 10. Kambe N, Longley BJ, Miyachi Y, Kabashima K: KIT masters mast cells in Kids, too. J Invest Dermatol 130:648-50, 2010
 11. Kato M, Ohshima K, Mizuno M, Kyogoku M, Hashikawa K, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K: Analysis of CXCL9 and CXCR3 expression in a case of intravascular large B-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol 61:888-91, 2009
 12. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y: IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. J Invest Dermatol 129: 705-13, 2009
 13. Nishio D, Nakashima D, Mori T, Kabashima K, Tokura Y: Induction of eosinophil-infiltrating drug photoallergy in mice. J Dermatol Sci 55: 34-9, 2009
 14. Sugita K, Kabashima K*, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y: Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. J Invest Dermatol 130:464-71, 2010
 15. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y: Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. Exp Dermatol 18:1036-43, 2009
 16. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. 2009. Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. Br J Dermatol 162:83-90, 2010

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

日本語論文

1. 重松由紀子、新関寛徳、野崎誠、佐々木りか子、堀川玲子、関敦仁、中川温子、土居博美、椛島健治：Pachydermoperiostosis の 1 例、臨床皮膚、掲載決定(2010.03)
 2. 種瀬啓士、若林亜希子、山本晃三、宮川俊一、今西智之：完全型 Pachydermoperiostosis の1例。臨床皮膚 64:241-244, 2010
 3. 石河 晃：皮膚科セミナーウム遺伝子診断「遺伝カウンセリング」日本皮膚科学会雑誌 119: 1219-1224, 2009
 4. 石河 晃：先天性表皮水疱症小児科診療 72: 2089-2095, 2009
 5. 石河 晃：電子顕微鏡による検査法 Derma 151: 109-115, 2009
 6. 石河 晃：小児皮膚診療パーフェクトガイド「魚鱗癬、魚鱗癬様紅皮症、魚鱗癬症候群」Derma (印刷中)
 7. 石河 晃：皮膚疾患 遺伝子診療学—遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望 日本臨床増刊号(印刷中)
 8. 桑原理充：8. 毛細血管拡張性肉芽腫 9. グロムス腫瘍 形成外科医に必要な皮膚腫瘍の診断と治療：122- 123, 2009
2. 学会発表
1. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)
 2. 重松由紀子、新関寛徳、野崎誠、佐々木りか子、堀川玲子、関敦仁、中川温子：Pachydermoperiostosis の 1 例、第 826 回日本皮膚科学会東京地方会、2009.9.12
 3. 山本晃三、種瀬啓士、若林亜希子、宮川俊一、今西智之、Pachydermoperiostosis の 1 例 第 72 回日本皮膚科学会東京支部学術集会 2009.2 東京
 4. 関敦仁、高山真一郎、日下部浩、細見僚、家田友樹、高尾英龍、森澤妥、斎藤治和：Madelung 変形に対する矯正・骨切り術の工夫、第 20 回日本小児整形外科学会、松山、2009. 12. 4
 5. 加茂真理子、清水智子、大山学、石河 晃、天谷雅行、海老原全：IFAP (Ichthyosis follicularis, alopecia and photophobia) 症候群と考えた 1 例 第 33 回日本小児皮膚科学会学術大会 2009.7.4-5 幕張
 6. 大内健嗣、船越建、谷川瑛子、石河 晃：筋ジストロフィー合併型単純型表皮水疱症の 1 例 第 33 回日本小児皮膚科学会学術大会 2009.7.4-5 幕張
 7. 栗原佑一、馬場あゆみ、高江雄二郎、石河 晃、谷川瑛子、東谷迪昭：経皮経管血管形成術を試みた皮膚結節性多発動脈炎(CPN)の 1 例 第 827 回日本皮膚科学会東京地方会 2009.11.14 東京
 8. 角田和之、栗原佑一、大内健嗣、石河 晃：White sponge nevus の 1 例 第 36 回皮膚かたち研究学会学術大会 2009.11.21-22 宮崎
 9. 大内健嗣、河野通良、新関寛徳、佐々木りか子、石河 晃：軽微な症状と部分的な自然軽快を示した CHILD 症候群の 1 例 第 36 回皮膚かたち研究学会学術大会 2009.11.21-22 宮崎
 10. 甲田とも、高江雄二郎、小林彩華、中村善雄、田村舞、谷川瑛子、石河 晃、天谷雅行：ステロイドパルス・大量免疫グロブリン療法が爪甲した高齢者重症尋常性天疱瘡の 1 例 第 73 回日本皮膚科学会東京支部総会 2010.2.20-21 東京
 11. 樋口哲也、吉田正己、石河 晃、中野創、澤村大輔：単純型表皮水疱症の一例 第 109 回日本皮膚科学会総会 2010.4.16-18 大阪
 12. 椛島健治：接触皮膚炎における樹状細胞の最新知見、臨床免疫学会 東京、2009 年
 13. 椛島健治：Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes、日本免疫学会、大阪、2009 年
 14. 椛島健治：Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes、皮膚アレルギー接触皮膚炎学会、京都 2009 年
 15. 桑原理充：当科における上口唇鼻唇溝三角部皮膚欠損再建の経験 第 52 回日本形成外科学会学術集会 4 月、2009

H. 知的財産権の出願・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。
3. その他
該当なし。

[III]
分担研究報告

分担課題: 完全型 pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) における病態の解明に関する研究

研究分担者: 梶島 健治 京都大学医学研究科 准教授

研究要旨

完全型 Pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) の発症機序はこれまで不明であったが、今回我々は、完全型 PDP 患者由来の皮膚線維芽細胞を培養することにより、PDP 由来の線維芽細胞の増殖が健常者由来の線維芽細胞に比べて有意に亢進していること、Wnt シグナルの阻害因子である DKK1 の発現が低下していることを見出した。また、線維芽細胞に DKK1 を投与すると細胞増殖が抑制されること、PGE2 を添加すると Wnt シグナルが亢進することも認めた。さらにマウス皮内に DKK1 siRNA を投与すると著明な皮膚の肥厚を認め、Wnt シグナルの亢進が b-catenin 染色と Western blot により明らかになった。不全型 PDP の原因が PGE2 発現の亢進であるとする従来の報告に加え、今回の我々の研究結果は、完全型 PDP では、Wnt シグナルの亢進が原因の一つであることを示唆した。

A. 研究目的

近年 Uppal らにより (Uppal S et al. Nat Genet. 2008 Jun;40(6):789-93)、pachydermoperiostosis (PDP、肥厚性皮膚骨膜炎) の一亜系である不全型 PDP において、15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) 遺伝子異常とそれに伴う PGE2 の上昇が認められることが報告された。しかしながら、完全型の病態発症機序は不明であること、また、不全型と完全型 PDP の表現型の違いが何に起因するかを明らかにすることは重要課題である。そこで、完全型 PDP 患者の皮膚サンプルを用いた機能解析と、不全型と完全型 PDP 患者における PGE2 の違いを検証するために、PGE2 測定システムの確立を本研究の目的とする。

B. 研究方法

Pachydermoperiostosis (PDP) 患者の病理学的所見である膠原線維の増加を参考に、完全型 PDP 患者と正常者より皮膚線維芽細胞を採取し、培養を施行し、細胞増殖、mRNA の発現の違いを cDNA マイクロアレイやリアルタイム PCR により検討した。マイクロアレイで得られた候補因子である Wnt シグナルを阻害因子である Dickkopf-1 (DKK1) を線維芽細胞の培養系に添加し、その効果

を検討した。また、b-catenin レベルを PDP と健常人の間で比較検討した。また、PDP とさらに PGE2 と Wnt シグナルのクロストークを解明するために、線維芽細胞の培養時に PGE2 を添加し、増殖に対する効果を検討した。最後に DKK1 の siRNA をマウス皮膚に投与することにより、DKK1 の皮膚肥厚における in vivo での役割の解明を図った。

C. 研究結果

PDP 患者由来の皮膚線維芽細胞は、健常者由来の皮膚線維芽細胞に比べ、増殖が亢進していた (図 1)。さらに、線維芽細胞の cDNA マイクロアレイやリアルタイム PCR により検討したところ、PDP 患者の皮膚線維芽細胞において Wnt シグナルの阻害因子である DKK-1 の発現低下を確認した。これらの結果から DKK-1 遺伝子の発現低下が PDP 発症に関与していることが示唆された。正常ヒト成人線維芽細胞に siDKK-1 を 96 時間処理した細胞において、DKK-1 の発現低下により b-catenin の発現がやや高まった (図 2)。また、siRNA 処理後、3 週間目より control 処理の耳介に比べて DKK-1 を処理した耳介において有意な肥厚を認めた (図 3)。また、近年原因遺伝子として報告された PGE2 の分解酵素である HPGD の

mutation は我々の症例では認めなかったが、皮膚線維芽細胞への PGE2 の添加は、DKK-1 の発現量が低下させる。以上より、本研究は、PDP の病態形成に DKK-1 の発現減弱による Wnt シグナルの亢進が関係していることを示唆させる。

また、PDP 患者の血清と尿中の PGE2 測定システムの立ち上げは終了し、現在その解析をはじめつつあるところである。

D. 考察

不全型 PDP 患者においては、HPGD に遺伝子変異が認められることが報告されているが、我々の経験した完全型 PDP では、HPGD に変異が認められず、両者には独立したことになるメカニズムが存在する事が示唆される。また、完全型 PDP では DKK1 の発現が減弱し、それに伴う Wnt シグナルの亢進が認められたため、完全型 PDP の原因の一つに Wnt 系の亢進があげられるのではないかと考えられる。

E. 結論

不全型 PDP と異なり、完全型 PDP では、Wnt シグナルの亢進が発症機序の一つであることが示唆される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表（平成 21 年度）

1) 国内

学会発表

1. 梶島健治
「接触皮膚炎における樹状細胞の最新知見」
臨床免疫学会 東京、2009 年
2. 梶島健治
「Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes」日本免疫学会 大阪、2009 年
3. 梶島健治

「Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes」
皮膚アレルギー接触皮膚炎学会 京都
2009 年

2) 海外

論文発表

1. Kabashima K*, Sakabe JI, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y. 2009. Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol* (in press)
2. Tomura M, Honda T, (他 10 名), Kabashima K*. Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. *J Clin Invest* (in press)
3. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K*. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
4. Moniaga CS, Egawa G, (他 12 名), Kabashima K*. Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. *Am J Pathol* (in press)
5. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
6. Kambe N, Longley BJ, Miyachi Y, Kabashima K. KIT masters mast cells in Kids, too. *J Invest Dermatol* (in press)
7. Kato M, Ohshima K, Mizuno M, Kyogoku M, Hashikawa K, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K*. 2009. Analysis of CXCL9 and CXCR3 expression in a case of intravascular large B-cell lymphoma. *J Am*

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

Acad Dermatol (in press)

8. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y. 2009. IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. *J Invest Dermatol* 129: 705-13

9. Nishio D, Nakashima D, Mori T, Kabashima K, Tokura Y. 2009. Induction of eosinophil-infiltrating drug photoallergy in mice. *J Dermatol Sci* 55: 34-9

10. Sugita K, Kabashima K*, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y. 2009. Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol* (in press)

11. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. 2009. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol* (in press)

12. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. 2009. Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* (in press)

学会発表

1. What's new in immunology of metal allergy
K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)

2. 実用新案登録

該当無し

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

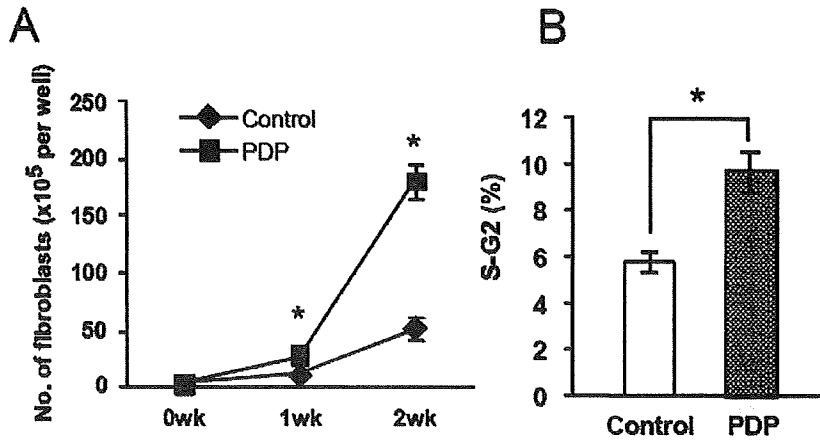


図1 線維芽細胞の増殖：PDP患者由来の皮膚線維芽細胞は健常者由来の皮膚線維芽細胞に比べて細胞数、S-G2期の細胞の割合が有意に高かった。

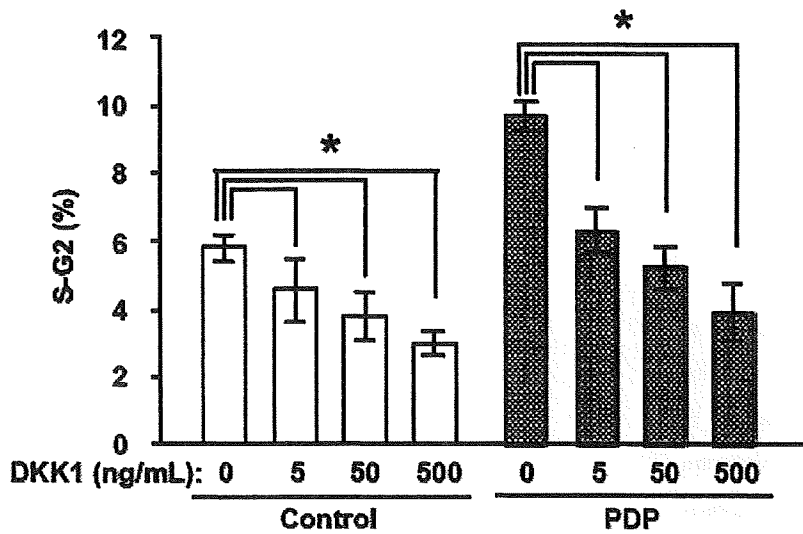


図2 DKK1による線維芽細胞の増殖への影響：DKK1添加により皮膚線維芽細胞のS-G2期の細胞の割合が有意に減弱した。

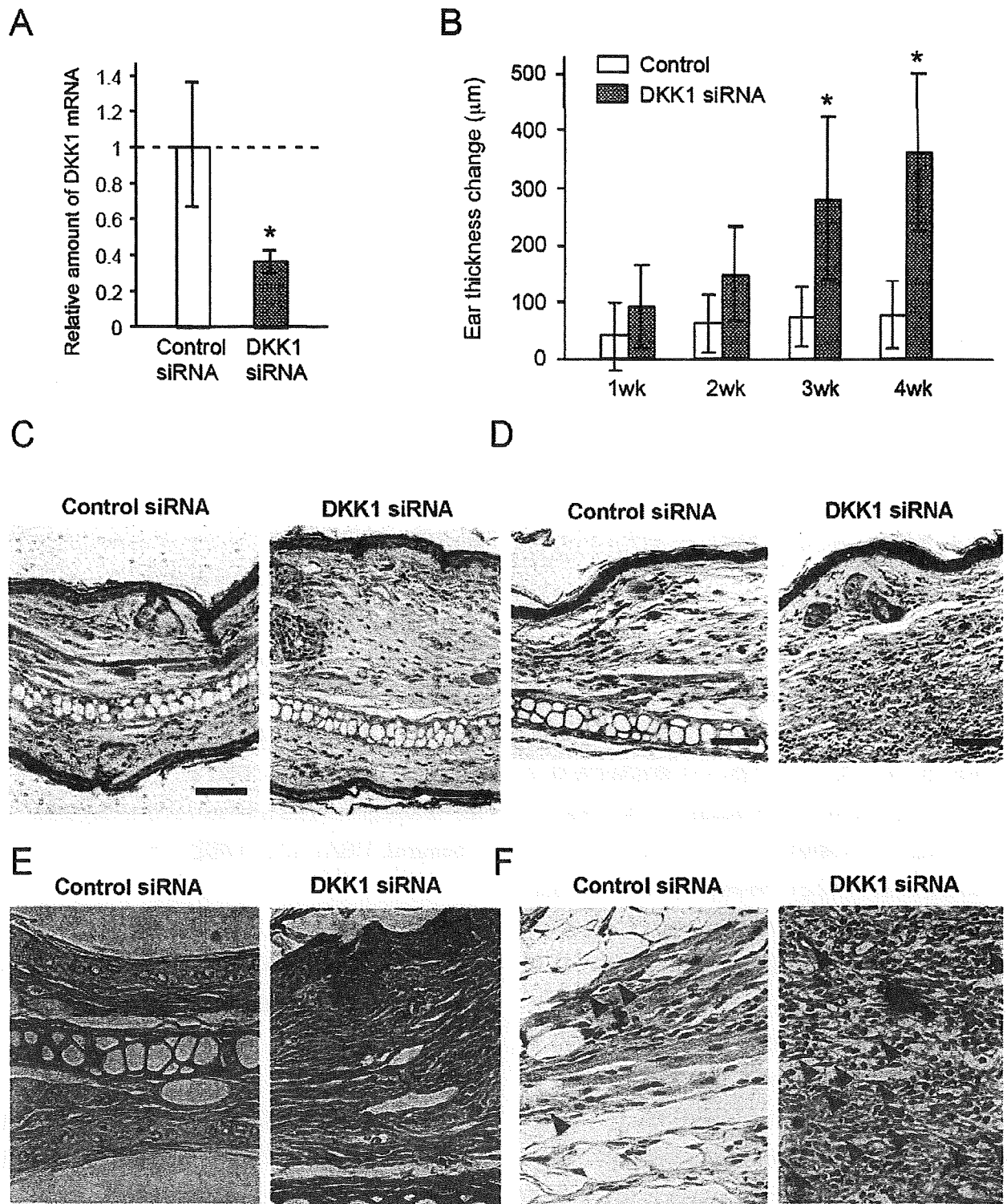


図3 DKK1siRNAによるマウス耳介への影響: DKK1 siRNA 皮内により皮膚の DKK1 mRNA は減弱し(A)、耳介の厚さは DKK1 siRNA 投与により増大した(B)。HE 染色においても真皮の肥厚が確認され(C)、さらに、b-catenin 染色(D)、Elastica van Gieson 染色(E)、PNCA 染色(F)も施行した。

肥厚性皮膚骨膜炎における HPGD 変異検索および生化学的検査

研究分担者 奥山 虎之 国立成育医療センター臨床検査部 部長

研究要旨

肥厚性皮膚骨膜炎3例（完全型1例、不全型2例）において HPGD 変異検索を行った。HPGD 遺伝子コーディング領域とその周辺のイントロンには単一塩基多型 (SNP) は存在するが、明らかな機能障害を引き起こすことが予想される変異は見出されなかった。HPGD の基質であるプロスタグランジン E2 (PGE2) を測定したところ 1 例において血中・尿中とも高値を示した。

共同研究者

開山 麻美 (国立成育医療センター臨床検査部)

新関 寛徳 (国立成育医療センター皮膚科)

椛島健治 (京都大学医学部皮膚科)

土居博美 (京都大学医学部皮膚科)

A. 研究目的

Pachydermoperiostosis (肥厚性皮膚骨膜炎、PDP) は原因不明の遺伝性疾患である。その遺伝形式は常染色体劣性、優性、X 染色体劣性など様々な遺伝形式の症例があるとされて久しい。3 主徴のうち頭部脳回転様皮膚を欠く不全型の症例では、骨関節症状主体の病変から、「原発性肥大性骨関節症」(primary hypertrophic osteoarthropathy, PHO) という呼称が用いられ、2 次性肥大性骨関節症と区別される。2008 年、Uppal ら¹⁾が PHO の血族結婚家系より HPGD 遺伝子に変異を見出した。現在まで5か所の変異が知られている(図1)。HPGD はプロスタグランジン E2 分解酵素をコードしており、その機能障害により血中尿中に大量の PGE2 が残存する。今回我々は完全型、不全型を問わず日本人症例における HPGD 遺伝子変異例を同定するために遺伝子診断システムを確立した。日本人 PDP 症例における HPGD 遺伝子変異例の頻度を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

19、21、41 歳の男性より協力が得られた。症例は型通り 3 主徴の有無により診断し、頭部脳回転様皮膚を含むすべての症状を有する症例を完全型、皮膚肥厚はあるが、

頭部脳回転様皮膚が見られない症例を不全型と診断した。遺伝子診断への協力については文書を用いた説明により同意をいただいた。

血液5ミリを採取後 DNA 抽出した (QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAGEN)。表 1 のごとく各エクソンごとにプライマーを設定し、PCR 法にて増幅後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてラベルし ABI3100 Genetic Analyzer にて塩基配列を決定した。

血中、尿中プロスタグランジン E2 (PGE2) 濃度は、採取した血清、新鮮尿を一旦-20℃で凍結、保存し、測定前に解凍した。おのおの原液と 10 倍希釈にて ELISA Kit (Prostaglandin E2 Kit-Monoclonal, Cayman Chemical, USA) により測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針にのっとり遺伝子診断実施に関して倫理審査による承認を得た。

C. 研究結果

1) 遺伝子診断: 完全型 1 例、不全型 2 例について遺伝子診断を実施した。いずれも症例からも明らかな変異はみつからなかった。いくつかの SNP はみいだされた。

2) 生化学的検査(表 2): 1 例で高値を示した。

D. 考察

変異がみつからなかった理由としては主に2つの可能性が考えられた。

1つは、遺伝子診断に用いた方法がサンガー法である

ために、1組のプライマーで増幅する範囲よりも長い範囲の欠失があった場合に、正常配列と判断されてしまう可能性である。この可能性はマルチプル PCR や CGH array により検証する必要がある。もう 1 つの可能性は、症例が HPGD 変異を伴う臨床型ではなかった可能性がある。3 症例はいずれも関節症状に乏しいタイプであり、HPGD 変異が発見された PHO とは異なっている。Kabashima らも日本人完全型 PDP において HPGD 遺伝子変異を見出さず、皮膚肥厚には、PGE2 産生過剰以外のメカニズムが存在することを報告している²⁾。アレル(または変異の位置)により多少臨床症状に多様性がありうるので一概には言えないが、HPGD 変異症例の発見には、関節症状のはっきりした症例のサンプリングが望まれる。

念のため行った PGE2 濃度測定は、予想外にも高値の症例が見出された。しかも PGE2 の関与が予想されていた不全型ではなく、完全型症例であった。HPGD 以外の PGE2 分解経路に関与する遺伝子などが候補として考えられる。今後も症例を集積して原因遺伝子発見に期待したい。

E. 結論

HPGD 遺伝子エクソン(コーディング領域)およびイントロンの一部の塩基配列を行った。PDP 患者3例では明らかに変異はみいださなかった。

<引用文献>

- 1) Uppal S, Diggle CP, Carr IM, Fishwick CW, Ahmed M, Ibrahim GH, Helliwell PS, Latos-Bieleńska A, Phillips SE, Markham AF, Bennett CP, Bonthron DT. Mutations in 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase cause

primary hypertrophic osteoarthropathy. *Nat Genet.* 2008 ; 40(6):789-93.

- 2) Kabashima K, Sakabe JI, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y. Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 2010; 176(2):721-32.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

重松由紀子、新関寛徳、野崎誠、佐々木りか子、堀川玲子、関敦仁、中川温子、土居博美、椛島健治：Pachydermoperiostosis の 1 例、臨床皮膚、掲載決定 (2010.03)

2. 学会発表

重松由紀子、新関寛徳、野崎誠、佐々木りか子、堀川玲子、関敦仁、中川温子：Pachydermoperiostosis の 1 例、第 826 回日本皮膚科学会東京地方会、2009.9.12

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし。

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他