

201231139A

厚生労働省研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋本 隆

平成 25（2013）年 5 月

厚生労働省研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋本 隆

平成 25（2013）年 5 月

目 次

班員構成	1
I 総括研究報告	2
皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究	
研究代表者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
II 分担研究報告	
1. 研究項目：水疱性類天疱瘡とその類縁疾患	12
研究分担者名：橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
2. 研究項目：ヘイリーヘイリー病・ダリエ病	34
研究分担者名：橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授	
3. 研究項目：自己炎症性疾患（中條 - 西村症候群）	54
研究報告：皮膚症状を主体とした遺伝性自己炎症疾患の解析	
研究分担者名：金澤 伸雄 和歌山県立医科大学皮膚科学教室 講師	
4. 研究項目：早老症（コケイン症候群）	64
研究報告：コケイン症候群患者に生じる早老症・発育障害・精神運動発達遅延の病態解明と治療法の探索	
研究分担者名：森脇 真一 大阪医科大学皮膚科学教室 教授	
5. 研究項目：角化症（掌蹠角化症）	
研究報告①：古典型ボーウィンケル症候群の病態について	67
研究報告②：本邦における先天性爪甲肥厚症の実態解明	74
研究分担者名：米田 耕造 香川大学医学部皮膚科学教室 准教授	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	78
IV. 平成 24 年度総会プログラム	96
平成 24 年度 プログラム抄録集	

班員構成

班 員 構 成

研究者名		研究実施場所	職名	主な研究分担
研究代表者	橋本 隆	久留米大学医学部 皮膚科学教室	教授	全研究の総括
研究分担者	橋本 隆	久留米大学医学部 皮膚科学教室	教授	水疱症類天疱瘡とその類縁疾患、ヘイリー・ヘイリー病・ダリエ病
	金澤 伸雄	和歌山県立医科大学 皮膚科学教室	講師	自己炎症性疾患 (中條・西村症候群)
	森脇 真一	大阪医科大学 皮膚科学教室	教授	早老症 (コケイン症候群)
	米田 耕造	香川大学医学部 皮膚科学教室	准教授	角化症 (掌蹠角化症)

[I]

総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成 24 年度総括研究報告書

皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究

研究代表者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

（研究期間：平成 24 年 4 月 1 日から平成 25 年 3 月 31 日（2 年計画の 1 年目））

【研究要旨】

本研究では（エ）研究奨励分野⑩皮膚・結合組織の希少難治性疾患群に関する調査研究の主要な 7 課題の内、東京医科歯科大学皮膚科の横関博雄教授を班長とする発汗異常症・遺伝性色素異常症を除いた 5 課題について水疱性類天疱瘡、ヘイリーヘイリー病・ダリエ病、自己炎症性症候群、早老症、角化症の 5 疾患群に焦点を絞り、H24、25 年度の 2 年間、研究を進める。また、弾力線維性仮性黄色腫に関しては、H25 年度に長崎大学皮膚科の宇谷厚志教授を班長とする研究班が継続しているため、本研究の H25 年度に組み込む予定である。このように本研究と横関博雄教授の研究班の研究を合わせることで、採択条件の全 7 課題の対象疾患を網羅する。

本研究で扱う主要な 5 疾患はいずれも稀な疾患ながら生命予後や QOL の観点で重要な疾患であり、また、分子生物学的・遺伝的研究が急速に進んでいる領域であるため、緊急な研究の推進が必要である。1 年目の H24 年度の研究要旨を以下に述べる。

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患 抗ラミニン γ 1 類天疱瘡の自己抗原の病原性を明らかにするために疾患モデルマウスを作製したが、病原性を証明することができなかった。さらに改良した疾患モデルマウスを作成し、今後さらに検討する。また、腫瘍随伴性天疱瘡において、170kDa 抗原の alpha-2-macroglobulin-like-1 (A2ML1) が腫瘍随伴性天疱瘡の主要な抗原であることが確かめ、その有無によって臨床症状に違いがあることを明らかにした。さらに天疱瘡に対するミゾリビンの治療効果について検討し、副腎皮質ホルモンとミゾリビンを併用することで短期間のうちに症状を軽快させることが可能なことを明らかにした。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 ヘイリーヘイリー病の病変部ケラチノサイトを培養しコントロールと比べ、カルシウム結合タンパク質の遺伝子発現が増強していることを明らかにした。さらに ATP 刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を検討し、コントロールでは細胞内カルシウム濃度が上昇し、患者ケラチノサイトでは上昇しなかったことを明らかにした。ダリエ病については国内 8 症例、ブラジル 5 症例について遺伝子解析を行い、*ATP2A2* 遺伝子に 6 種の新規変異を含む 9 種の変異 (missense 6 種, insertion/deletion 3 種) を同定することができた。

3) 自己炎症性症候群 (中條 - 西村症候群)

中條—西村症候群 (NNS) が疑われるが臨床診断基準を満たさない和歌山の症例について遺伝子検索を行い、*PSMB8* にそれぞれ c. 129T>C (A43A) と c. 145C>A (Q49K) 変異をヘテロに見出したが、後者は健常者にも見出されたことから、前者とともに非機能的な SNP と考えられた。*PSMB8* 変異の地域的偏在を確認する目的で、和歌山県立高等看護学院学生 49 名の遺伝子解析を行った結果、98 アリル中 1 アリルに c. 602G>T (G201V) を認めた。IgA 欠損と難治性疣贅、汎血球減少を呈し、WHIM 症候群が疑われたものの診断がつかなかった 1 症例において、*LIG4* の新規複合ヘテロ変異を見出した。

4) 早老症 (コケイン症候群)

コケイン症候群 (CS) と診断した 9 例を分子遺伝学に解析し、4 例で新規変異を確認したところ、CSA、CSB、XPD/CS、XPG/CS において遺伝型・表現型の関連がみられた。また CS が酸化 DNA 損傷の修復系に異常があるという仮説を示すための実験系 (CSA、CSB 遺伝子ノックダウン) を確立し、さらに CS 神経障害の分子機構解明のための CS モデルマウス (XPG- null) を用いた研究の準備を整えた。

5) 角化症 (掌蹠角化症)

エクジソン誘導発現ベクターである pIND ベクターに野生型および変異コネキシン 26 cDNA をサブクローニング後、RXR とエクジソン受容体を恒常的に発現している HaCaT 細胞に、これらのベクターをトランスフェクションし遺伝性掌蹠角化症 [古典型ボーウインケル症候群 (MIM 124500)] のモデル細胞を作製することを試みた。遺伝性掌蹠角化症モデル細胞では、種々のシグナル伝達の変化と炎症性サイトカインの産生亢進が観察された。これらの結果は、古典型ボーウインケル症候群をはじめとする遺伝性掌蹠角化症の病態に深く関与しているものと考えられた。また、9 例の先天性爪甲肥厚症 (Pachyonychia congenita: PC) について遺伝子解析を行ったところ、ほぼ半数が国際的には少数派とされる PC-2 型 (Jackson-Lawler) であり、民族による違いが背景にある可能性も考えられた。

これらいずれの結果も、皮膚・結合組織の希少難治性疾患群についての研究を大きく押し進めるものであり、患者の健康・医療・福祉向上にも寄与することができ、行政および社会への貢献度は高いと思われる。

研究分担者氏名

金澤伸雄

和歌山県立医科大学皮膚科学教室 講師

森脇真一

大阪医科大学皮膚科学教室 教授

米田耕造

香川大学医学部皮膚科学教室 准教授

A: 研究目的

水疱性類天疱瘡、ヘイリーヘイリー病・ダリエ病、自己炎症性症候群、早老症、角化症の 5 疾患群はいずれも生命予後や QOL の観点から重要な皮膚疾患であり、緊急な研究の推進が必要である。5 疾患を検討する 4 名の班員はそれぞれの疾患において我が国の皮膚科のリーダーとして活躍している。以下に各疾患の研究目的を述べる。

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患 (久留米大学皮

膚科 橋本隆担当) 久留米大学皮膚科では自己免疫性水疱症の多くの新しい抗原を同定し (Dainichi, Hashimoto et al: PNAS 2009)、その診断法を研究し新しい分類を提唱している。本研究では、抗ラミニンγ1 類天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、天疱瘡について、自己抗原の病原性や治療における有用性を検討した。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 (久留米大学皮膚科 橋本隆担当) 久留米大学皮膚科では多数症例のヘイリーヘイリー病の遺伝子診断を行っている (Hamada, Hashimoto et al. J Dermatol Sci 2008)。本研究では病変部の培養ケラチノサイトを用いてその特性を調べた。また、本疾患の類縁疾患であると考えられているダリエ病の遺伝子解析研究を同時に行った。

3) 自己炎症性症候群 (和歌山県立医大皮膚科 金澤伸雄担当) 近年、遺伝性自己炎症性疾患の研究が脚光を浴びてきており、特に本研究で扱う中條-中西症候群について、金澤伸雄らがその原因遺伝子を同定し、病因の解析が進んできている (Arima, Kanazawa et al: PNAS 2001)。本研究では、患者の集積と解析によって標準的治療法を確立するとともに、慢性反復性炎症と進行性組織障害性を特徴とする慢性皮膚炎症性疾患の病態解明・治療法開発につなげることを目指す。

4) 早老症 (大阪医科大学皮膚科 森脇真一担当) 大阪医科大学には本邦で唯一のコケイン症候群の診断センターがあり、ほとんどの検体が保存されている。厳重に保管している細胞、評価システムを用い、希少疾患であり、老化に深くかかわると推測されるコケイン症候群関連因子を分子遺伝学的に詳細に検討し、コケイン症候群の病態解明、ひいては内因性老化の機序を探索する。

5) 角化症 (掌蹠角化症) (香川大学皮膚科 米田

耕造担当) 遺伝性掌蹠角化症の古典型ボーウインケル症候群モデル細胞におけるシグナル伝達を、Mock をトランスフェクションした細胞株、野生型 GJB2 をトランスフェクションした細胞株と対比しつつ検討を加える。また、和歌山県立医科大学皮膚科で経験した先天性爪甲肥厚症 PC-1 の母子例について遺伝子解析を行い文献的な検討を行うとともに、全国疫学調査によって最近 5 年間に経験された患者の実態把握を行う。

B: 研究方法

本研究は、主として遺伝関連性皮膚疾患の研究を行うが、かなり異なった領域をカバーしている。そのため、研究代表者が 4 名の班員の異なった施設の研究を総括する。研究代表者の施設、久留米大学皮膚科では類天疱瘡とヘイリーヘイリー病・ダリエ病の研究を、自己炎症性症候群、早老症、角化症に関しては、それぞれ和歌山医科大学、大阪医科大学、香川大学で研究分担者がその施設の研究協力者と研究を進める。その経過を、研究代表者と e-mail や電話で密に連絡を取りながら進め、年に 1-2 回の斑会議で総会を行い、その検討をもとに最終的な目的を達成する。

初年度である本年度は、まず、完全な診断基準を作成し、その原因遺伝子・細胞内シグナル伝達・病因自己抗体・自己抗原解析などの基礎研究を行った。

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患 類天疱瘡の一種の抗ラミニンγ1 類天疱瘡において、抗ラミニンγ1 抗体、特にその C 末端に対する抗体が病原性を持つのかどうか、表皮下水疱を形成するのかどうか、明らかにするために、passive transfer model と active disease model の 2 種類の疾患モ

デルマウスを作製した。腫瘍随伴性天疱瘡については A2ML1 のプラスミドを COS7 細胞にトランスフェクトさせ、20 倍希釈した患者血清と反応させる蛍光抗体法 (COS7 IF) と A2ML1 の cDNA をトランスフェクトさせた COS7 細胞の免疫沈降免疫プロット法 (IP-IB) を用いて検討を行った。ミゾリビンの研究については、天疱瘡 11 症例 (尋常性天疱瘡 8 例、落葉状天疱瘡 3 例) を対象に、プレドニゾンとともにミゾリビンを投与し、効果を判定した。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 ヘイリーヘイリー病については、SPCA1 をコードする *ATP2C1* 遺伝子の missense、nonsense、または splice-site 変異を有する患者から病変部皮膚を採取し、分離培養したケラチノサイトを用いて、RT-PCR 法にて *ATP2C1* mRNA 発現を調べ、ウエスタンブロットで SPCA1 タンパクの発現を調べた。また、fluorescence ratio imaging を用いて、定常状態の細胞内カルシウム濃度と ATP 刺激による変化を調べた。ダリエ病については末梢血からゲノム DNA を抽出し、PCR を用いて *ATP2A2* 遺伝子を断片化して増幅し、サイクルシーケンス法によりサンプルを調整し、自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

3) 自己炎症性症候群 (中條 - 西村症候群)

臨床症状や検査所見から NNS が疑われた症例のゲノム DNA についてダイレクトシーケンス法にて *PSMB8* 遺伝子の全エクソンの変異検索を行った。和歌山県立高等看護学院の生徒 50 名のゲノム DNA についてダイレクトシーケンス法にて c.602G>T 変異を検索した。患者と家族由来不死化 B 細胞と末梢血単核球について、各種抗 HLA-ABC、抗 HLA-DR 抗体 (DAKO、BD、eBioscience) を用いた細胞表面・細胞内染色を行い、フローサイト

メーターにて解析した。一部の細胞は種々の抗体の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。1 例の NNS に 8mg/kg のトシリズマブ (アクテムラ®) を 4 週間に 1 回、約半年間投与し効果を観察した。幼小児期から IgA 欠損がある症例について、新規原発性免疫不全症・遺伝性自己炎症疾患を疑われたため、次世代シーケンサー SOLID5500 を用いてエクソーム解析を行った。

4) 早老症 (コケイン症候群)

患者皮膚由来線維芽細胞を用いて XP・CS 相補性試験により細胞診断を行い、各々の責任遺伝子の変異を DNA シークエンスで同定する。さらにウエスタン法によるタンパク分析も実施する。CSA、CSB 各々の遺伝子をノックダウンし、酸化ストレス後の表現型を正常細胞と比較する。CS モデルマウスとして XPG-null マウスを使用し、病理組織学的な解析を詳細に行い、同時に神経組織を構成する各種細胞の初代培養を試みる。また髄鞘化に関する種々の因子を分子生物学的に検討した。

5) 角化症 (掌蹠角化症)

遺伝性掌蹠角化症の研究に関しては、まず、エクジソン誘導発現ベクターである pIND ベクターに野生型および変異コネキシン 26 cDNA をサブクローニング後、RXR とエクジソン受容体を恒常的に発現している HaCaT 細胞にこれらのベクターをトランスフェクションした。400 mg/ml ゼオシン、2mg/ml ジェネティシンにてセレクションを行い、安定トランスフォーマントを得たのちに Cell Signaling Technology 社の Akt kinase アッセイキットを使用し p44/42 MAP kinase の活性の変化も観察した。また、コンフォーカルレーザー顕微鏡にて内在性コネキシン 26 および誘導された野生型および変異コネキシン 26 の局在を観察した。先天性爪甲肥厚症については、PC-1 が疑われ

る母子の末梢血から単離したゲノムについて、弘前大学皮膚科で *KRT6A* と *KRT16* 遺伝子の変異検査を行った。また、全国疫学調査として全国の大病院と 500 床以上の大病院の皮膚科と小児科 695 施設を対象に調査票を配布し、最近 5 年間に先天性爪甲肥厚症と診断あるいは疑われた症例数の調査を行った。

(倫理面への配慮)

自己炎症性疾患の研究において、患者血液や組織検体を用いた遺伝子、解析研究と分子・細胞機能異常の探索を目的とする臨床・疫学研究に関し、和歌山県立医科大学と研究協力者が属する長崎大学において、必要な倫理委員会の承認を得ている。患者由来 iPSC 細胞の作製・解析に関しても、研究協力者が属する京都大学倫理委員会で承認された内容に従い、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。また、臨床研究としての中條—西村症候群患者へのトシリズマブ投与に関しても、和歌山県立医科大学の所定の倫理委員会承認を得ている。さらに変異遺伝子ノックインマウスの作製・解析については長崎大学にて所定の倫理委員会の承認を得ており、組換え実験・動物実験等の実験に際して所定の手続きを得たうえで、和歌山県立医科大学に導入し解析を行う。(和歌山県立医科大学)

本研究は大阪医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査会において承認されている。研究はその審査会の基準を遵守し、患者あるいは家族の文書による同意を得たあとに施行し、その場合検体は連結可能コード化して取り扱う。個人情報には十分配慮し、検体の保管も厳重に行った。またコントロール細胞など一部の細胞はすでに論文などで発表されており本研究者が長年連結不可能化して保持しているものである。(大阪医科大学)

久留米大学倫理委員会は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究や遺伝子治療臨床研究の他、人の生命の根幹に係る研究に関する事項を審査する「生命に関する倫理委員会」と、生命に関する倫理委員会において審議するものを除く全ての一般的な研究および医療に係る事項を審査する「医療に関する倫理委員会」の二つの専門委員会を設置している。それぞれの委員会は、医学部教授以外に、医学部看護学科教授、倫理および法律関係の有職者によって構成されている。研究プロトコール、患者への説明文書ならびに同意書の様式等について、ヘルシンキ宣言および我が国の各倫理指針に従い、倫理的および科学的側面から審査される。本研究で実施する研究ならびに臨床試験はすでに倫理委員会により承認済みのものおよび新規に実施計画書が作成され倫理委員会による審査を受けるものからなる。

本研究では、すべての研究は「ヘルシンキ宣言」ならびに「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施される。研究代表者がすべての患者に対して、事前に本研究の意義、目的、方法、予測用方法、遺伝カウンセリングの利用に関する情報などについて記載した文書を交付して、十分な説明を行った上で自由意思に基づく文書による同意(インフォームドコンセプト)を受けてから、試料などの提供を受ける。また、試験開始も、学内に設置された臨床試験監査委員会による監査が実施され、倫理委員会により承認された実施計画書にもとづいた試験が実施されているかチェックされる体制が確立している。

実際には、全ての研究において、採血で得られた患者のゲノム DNA を用いて遺伝子解析を行う。その遺伝子解析結果と臨床データベースに関しては連結可能な状態で匿名化し、用いるコンピュー

タには倫理的・物理的セキュリティを確保する。本研究で知り得た情報は厳重に管理し、対象症例への不利益とならないようにする。また、本研究に含まれるヒト遺伝子解析研究については、その計画を久留米大学生命に関する倫理委員会に申請し、承認（研究番号 59）を受けている。

さらに、患者から得られた血清と皮膚組織を用いて、抗皮膚自己抗体の抗原解析と病態の解明を行う。水疱性類天疱瘡、妊娠性疱疹、抗 BP180 型粘膜類天疱瘡、抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡、眼型粘膜類天疱瘡、抗 p165 粘膜類天疱瘡、基底膜下部型線状 IgA 水疱性皮膚症、線状 IgA/IgG 水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、抗 p200 類天疱瘡などの患者から採血で得た血清を用いるため患者に危害を及ぼすことは全くなく、研究・生命倫理・安全対策に対する取り組みを満足している。また、皮膚の生検も可及的少範囲に狭めて患者の負担を少なくする。

組替え DNA 実験に関しては、久留米大学内の必要な講習を受け、必要な書類を提出して、その承認手続きを受けている。本研究で用いられる多量のモノクロナール抗体の産生には各種の培養技術を用いているが、特に、人権の保護及び法令の遵守への対応を必要としない。さらに、本研究では、個人情報に伴うアンケート調査・インタビュー調査はない。

実験動物に関しては、動物の愛護及び管理に関する法律（平成 11 年 12 月 21 日、法律第 221 号）、実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号）、動物の処分方法に関する指針（平成 7 年 7 月 4 日、総理府告示第 6 号）である基本原則に則った、久留米大学実験動物施設による動物実験計画書の認可制度の承認を受け、動物数の最小限を実施するなどの考慮を

行っている。

C：研究結果

本研究で対象とする 5 疾患群において、以下のような研究結果が出た。

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患 抗ラミニン γ 1 類天疱瘡において患者血清の 70%が、マウスのラミニン γ 1 C 末端の 107 アミノ酸塩基のリコンビナントタンパクに対して免疫プロットで反応した。passive transfer model の蛍光抗体直接法ではマウスのラミニン γ 1 C 末端の 107 アミノ酸塩基のリコンビナントタンパクに対するウサギ IgG が真皮表皮境界部に沈着していた。一方、active disease model の蛍光抗体直接法では真皮表皮境界部に免疫グロブリンの沈着は見られなかった。また、いずれの疾患モデルマウスにおいても水疱形成は認めなかった。

腫瘍随伴性天疱瘡の研究については、A2ML1 をトランスフェクトさせた COS7 細胞が腫瘍随伴性天疱瘡患者血清に認識されること（COS7 IF）と、A2ML1 の cDNA をトランスフェクトさせた COS7 細胞の免疫沈降免疫プロット法（IP-IB）で腫瘍随伴性天疱瘡患者血清中の抗 A2ML1 IgG 抗体が検出されることを確認したうえで、腫瘍随伴性天疱瘡の 58 血清の反応性を調べた。40 血清で COS7 IF もしくは IP-IB が陽性となり、それらの症例では COS7 IF と IP-IB が陰性の症例と比べ、早期発症であり、眼粘膜病変が優位に少ないことが明らかとなった。

ミゾリビンの研究では、天疱瘡患者 11 例にプレドニゾロンとともにミゾリビン 150mg/日を毎朝投与したところ、8 例の尋常性天疱瘡中 3 例、3 例の落葉状天疱瘡中 1 例で完全寛解が得られた。また、2 例の落葉状天疱瘡で部分寛解が得られた。

これら 6 例でプレドニゾロンを減量することができた。Kaplan-Meier 法による分析では 19 ヶ月で 64.3%の完全寛解率が得られた。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 ヘイリーヘイリー病の研究では、患者ケラチノサイトにおいて、表皮に発現する calmodulin-like5 等のカルシウム結合タンパク質の遺伝子発現、および loricrin 等の角化関連遺伝子の発現がコントロールと比較して増強していた。また p.Pro307His、c.1308+1G>A、p.Gln504X という異なる遺伝子変異を持つ患者ケラチノサイトの中で p.Gln504X に変異をもつ患者ケラチノサイトで *ATP2C1*mRNA と *SPCA1* の発現が減少していたが、p.Pro307His と c.1308+1G>A に遺伝子変異を持つ患者ケラチノサイトではコントロールと同等であった。RT-PCR を用いた解析では splice-site 変異によりエクソンスキッピングが引き起こされることが分かった。また、定常状態の細胞内カルシウム濃度はコントロールと比べ変化はなかったが、ATP 刺激に対する反応性は低下していた。

ダリエ病については 10 例において *ATP2A2* 遺伝子に 6 種の新規変異を含む 9 種の変異 (missense 6 種、insertion/deletion 3 種) を同定することができた。新規変異は 824A→T、2092G→A、2300A→G、2327 ins A、1865-1851 del、2541 del C であった。

3) 自己炎症性症候群 (中條 - 西村症候群)

NNS の鑑別を要する 2 症例において *PSMB8* 遺伝子全エクソンの変異検索を行った結果、それぞれ c.129T>C (A43A) と c.145C>A (Q49K) 変異をヘテロに見出した。いずれも非機能的な SNP と考えられた。和歌山県とその近郊の 49 名分のゲノム DNA について *PSMB8* c.602G>T 変異を検索した結果、1 名にヘテロ変異が見出され、当地での変異アリル

頻度は 1/98 と算出された。NNS 患者の HLA-DR は細胞表面に発現しているものの、L243 抗体特異的に認識されないと考えられた。NNS の重症成人例にアクテムラを 7 ヶ月投与したところ、HAQ-DI スコアは投与前の 2.875 が 2.75 になり身体機能の改善が認められた。WHIM (Warts, hypo-γ-globulinemia, infections and myelokathexis) 症候群を疑われた 16 歳症例と母親の *LIG4* 遺伝子に患児特異的な新規ミスセンス変異が見つかった。複合ヘテロ接合の可能性を考えて再検討したところ、母子ともに新規ナンセンス変異を持つことが判明し、かつこれが唯一の複合ヘテロ変異であることが明らかとなった。

4) 早老症 (コケイン症候群)

9 例の新規 CS 患者中、6 例で遺伝子変異を同定した (CSA2 例、CSB2 例、XPD/CS1 例、XPG/CS1 例)。うち 4 例で新規変異を確認した。CSB の 1 例は CS III 型 (軽症、遅発型 CS であり、UV-sensitive syndrome 症例の同様の変異を確認した。XPD/CS では CS の表現型を呈する XPD 遺伝子の変異による G47R が確認でき、N 末側の重要なドメインに変異が確認できた。正常細胞を用いて CS 遺伝子 (CSA、CSB) のノックダウンを行ったところ、酸化ストレス処理後の紫外線感受性が亢進した。CS モデルマウスとして XPG-null マウス中枢神経系を中心に詳細に病理組織学的に検討したところ、大脳皮質、海馬に髄鞘不全を認めた。

5) 角化症 (掌蹠角化症)

遺伝性掌蹠角化症の研究に関しては野生型コネキシン 26 を発現する細胞株 (WC-3、WC-6) と変異コネキシン 26 を発現する細胞 (MC-4、MC-5) の培地にエクジソンを添加すると、野生型および変異コネキシン 26 を発現した。培地中のエクジソンの

濃度を、変化させると、野生型および変異コネキシン 26 の発現量は（培地のエクジソン濃度依存性に）増加した。MC-4 細胞の Akt の活性は Mock の約 7 倍、WC-3 細胞の約 9 倍の活性があり、MC-4 細胞の p44/42 MAP kinase の活性は Mock の約 10 倍、WC-3 細胞の約 8 倍の活性があった。MC-4、MC-5 細胞では、GM-CSF、VEGF、IL-6、CCL-5/RANTES の産生亢進が観察された。先天性爪甲肥厚症については遺伝子解析の結果、母子ともに *KRT16* に c.374A>G (N125S) のヘテロ変異が同定され、PC-1 と確定診断された。疫学調査の結果、PC-1 8 例、PC-2 8 例、疑い 6 例が見つかった。これらの症例は北海道、東京、関西、九州と広く分布しており、明らかな偏りは認められなかった。

D: 考察

本研究で対象とする 5 疾患群において、以下のよう

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

抗ラミニン $\gamma 1$ 類天疱瘡の passive transfer model の蛍光抗体直接法で、マウスのラミニン $\gamma 1$ C 末端の 107 アミノ酸塩基のリコンビナントタンパクに対するウサギ IgG が真皮表皮境界部に沈着していたが、水疱は形成されなかった。

腫瘍随伴性天疱瘡の研究については、A2ML1 のプラスミドを COS7 細胞にトランスフェクトさせ患者血清と反応させる蛍光抗体法 (COS7 IF) と A2ML1 の cDNA をトランスフェクトさせた COS7 細胞の免疫沈降免疫プロット法 (IP-IB) の有用性が、腫瘍随伴性天疱瘡の血清とともにコントロール血清や、他疾患の血清を用いて検討することにより明らかとなった。また、58 血清中 40 血清で陽性所見を得られたため、A2ML1 が腫瘍随伴性天疱瘡

の主要な抗原であることが確かめられた。

ミゾリビンの研究では、天疱瘡に対し副腎皮質ステロイドにミゾリビンを加えることで、3 分の 1 の症例で早期に症状が軽快し、半数以上で有効で副作用が少なく安全性が高いことが明らかとなった。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病

ヘイリーヘイリー病の nonsense 変異患者では nonsense mediated mRNA decay による SPCA1 の発現量の低下が発症に関わる一方、missense、splice-site 変異患者は機能不全をもつ SPCA1 が発症に関わる可能性が考えられた。またヘイリーヘイリー病患者では、ATP による細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出能低下がみられ、さらに SPCA1 の機能異常を有する細胞において、カルシウム濃度の恒常性を保つべき他の遺伝子群や角化に関連する遺伝子群の発現の変化が認められた。カルシウム動態の変化に伴うと考えられる、これらの遺伝子の二次的な変化が、ヘイリーヘイリー病の病態形成に関わる可能性がある。

ダリエ病についてはこれまでに 150 以上の ATP2A2 遺伝子の変異が報告されており、そのうちミスセンス変異が 55%、ノンセンス変異およびフレームシフト変異が 37%、挿入および欠失が 8%となっている。変異部位に特にホットスポットはなく、分子全体に散見するとされる。本研究においてもミスセンス変異が 7 例と最も多く、また変異部分は分子全体に散見され、これまでの報告と同様であった。本研究では 13 例中 3 例 (23%) で ATP2A2 遺伝子の変異を同定できなかった。

3) 自己炎症性症候群 (中條 - 西村症候群)

Q49K ヘテロ変異は以前も NNS ではない別の患者で見出されていた。健常者での検索も行ったところ 40 名中 7 名にヘテロに、1 名にホモに見出され、

やはり機能に影響のない SNP と考えられた。これまでの解析をまとめると、NNS 患者細胞においても HLA-DR はきちんと細胞表面に発現しているが、L243 という特定の抗体クローンでは認識されないような構造変化が存在すると考えられる。NNS の重症患者 1 名にアクテムラ[®]を投与し、明らかな副作用なく半年間継続でき、わずかではあるが有効であったため、より炎症が顕著な症例では著効も期待できると思われる。診断目的でエクソーム解析を行った。患児とその母親のみのゲノムの解析で、遺伝様式も不明であったが、SCID 関連の既知の遺伝子にしぼることで、既知の遺伝子ながらこれまで報告のない新規の変異を同定することができた。今後患者由来細胞を用いた機能解析により、変異が有意なものであることを確認する予定である。

4) 早老症 (コケイン症候群)

CS 患者の分子遺伝学的解析は CS 患者の多彩な臨床症状を予測する上で重要である。また、CS の病態を検討する上で、マウスモデルは有用である。

5) 角化症 (掌蹠角化症)

遺伝性掌蹠角化症の 1 種である古典型ボーウインケル症候群のモデル細胞ではコントロール細胞に比較して種々の Stat (シグナル伝達兼転写活性化因子) がリン酸化されていた。GM-CSF、VEGF、IL-6、CCL-5/RANTES などの産生亢進も観察された。Akt の活性化ならびに p44/42 MAP kinase の活性化も見られたので、Akt あるいは p44/42 MAP kinase の阻害剤が古典型ボーウインケル症候群の治療薬として使用出来る可能性がある。本邦では、先天性爪甲肥厚症は、掌蹠角化症の中ではマイナーな存在であり、一般の皮膚科教科書ではあまり触られていない。しかし、欧米では、その歴史にふさわしく、患者会を中心とした基金をもとに国際

研究登録が行われており、すでに遺伝子変異も確定した患者が 400 名以上登録され、ラパマイシンや siRNA などの先進的な治験が進行しており、いわばケラチンの変異による角化症のプロトタイプの役割を担っている。全国調査を行い、本邦症例をまとめ欧米と比較することにまず意義があり、さらに国際的な研究登録に組み込むことで世界レベルでの遺伝子型 - 表現型の解析に寄与することができる。

E: 結論

本研究で対象とする 5 疾患群において、以下のような結論を得た。

1) 水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

抗ラミニン γ 1 類天疱瘡の 2 種類の疾患モデルマウスにおいて、水疱形成がみられなかったため、ラミニン γ 1 の C 末端に対する抗体に病原性があることを証明ができなかったが、この結果はラミニン γ 1 の C 末端に対する抗体が病原性を持たない、ということの意味するわけではない。今後、哺乳類の皮膚からラミニン γ 1 を抽出して用いるなど実験系の改良を行い、抗ラミニン γ 1 類天疱瘡におけるラミニン γ 1 の抗原性を明らかにしたい。

腫瘍随伴性天疱瘡の研究については、抗 A2ML1 抗体は眼粘膜症状がない場合に検出されやすいなど、役割について不明な点が残るが、N 末端と反応しやすいことが報告されており、プラスミンを活性化させることでケラチノサイトの細胞接着を傷害し、腫瘍随伴性天疱瘡の発症に関与する可能性が考えられる。

ミゾリビンの研究では、半数の尋常性天疱瘡患者でミゾリビンの効果が得られなかったが、より

高いミゾリピン濃度を維持すれば、効果が得られた可能性が考えられた。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病

ヘイリーヘイリー病はカルシウムポンプの異常で起こる疾患であるが、遺伝子異常は多数あり、その違いによって、異なるメカニズムで症状が引き起こされている可能性が示唆された。

ダリエ病では13例中3例(23%)でATP2A2遺伝子の変異を同定できなかった理由として、プロモーター領域やイントロン領域に変異が存在している可能性や、従来のダイレクトシーケンス法では検出できない遺伝子の大規模欠失を生じている可能性が考えられた。

3) 自己炎症性症候群(中條-西村症候群)

本分担研究により、まず和歌山地域での*PSMB8*変異をヘテロに持つ健常者の存在が確認され、今後患者が出現しうることが実感できた。また1症例に無事にアクテムラ®を半年間投与できたことで、他の患者にも投与の道が開けた。さらに原発性免疫不全症・遺伝性自己炎症疾患が疑われるも診断がつかなかった症例のエクソーム解析により*LIGA*の新規変異を同定できたことで、NNSが疑われながら診断のつかない他の症例についても原因究明への道が開けた。NNSは中條、西村以来本邦において多くの臨床家が観察、記載してきた疾患だけに、是非世界でイニシアチブを取って病態解明、治療法の開発を進め、少しでも早く患者さんのもとに有効な薬を届けたい。

4) 早老症(コケイン症候群)

CS細胞はヌクレオチド除去修復のみならず酸化的DNA損傷の修復の機能が低下している可能性が高い。この所見と脳神経症状、早老様症状との関連はまだ不明であり、次年度以降の検討課題である。またCSモデルマウスの解析も詳細に行い、CS

に発現する諸症状の病態を解明し、ひいてはCS治療法の探索につなげたい。

5) 角化症(掌蹠角化症)

古典型ボーウインケル症候群のモデル細胞において、種々のシグナル伝達の変化が観察され、この変化は古典型ボーウインケル症候群の病態に深く関与しているものと考えられた。本研究により、本邦におけるPCの実態の一端が明らかとなりつつある。今後、全国調査結果で見出された症例については、二次調査による詳細な症状の集積と遺伝子検索を進め、可能な限りIPCRRへの登録を行う。さらに、これまで老化などとして放置してきた爪甲肥厚症や多発性嚢腫症などの患者についても、遺伝子解析を進める必要がある。

F:健康危険情報(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

特になし。

G:研究発表

1. 論文発表

各分担報告書の該当箇所を参照。

2. 学会発表(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

各分担報告書の該当箇所を参照。

H:知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

[Ⅱ]

分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成 24 年度分担研究報告書

皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究

研究項目：水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

研究分担者名：	橋本 隆	久留米大学医学部皮膚科学教室	教授
研究協力者名：	古村 南夫	久留米大学医学部皮膚科学教室	准教授
	大畑 千佳	久留米大学医学部皮膚科学教室	准教授
	石井 文人	久留米大学医学部皮膚科学教室	講師
	古賀 浩嗣	久留米大学医学部皮膚科学教室	助教
	大山 文吾	久留米大学医学部皮膚科学教室	助教
	夏秋 洋平	久留米大学医学部皮膚科学教室	助教
	土坂 享成	久留米大学医学部皮膚科学教室	特別研究員

研究要旨

久留米大学皮膚科では多くの自己免疫性水疱症で新しい抗原を同定し、その診断法を研究し新しい分類を提唱している。今後は、その病態と完全な診断法を確立することを目指す。さらに重症あるいは軽症の各種の類天疱瘡群に有効かつ副作用の少ない治療法の開発を目指す。

以上のような目的のために、本年度は抗ラミニン γ 1 類天疱瘡の自己抗原として、2009 年に我々が同定したラミニン γ 1 が抗原性を持つのかどうか明らかにするための研究を行った。抗ラミニン γ 1 類天疱瘡は当初、真皮の 200kDa タンパクに対する自己抗体を持つ水疱症として報告された稀な疾患であり、臨床的には類天疱瘡、線状 IgA 水疱症、疱疹状皮膚炎などに類似した症状を呈する。split skin の蛍光抗体間接法で真皮側に IgG の沈着を認め、真皮抽出液を用いた免疫ブロットで 200kDa のタンパクと反応する。この 200kDa タンパクがラミニン γ 1 である。そこで、本研究では、抗ラミニン γ 1 抗体を用いた passive transfer model と active disease model の 2 種類の疾患モデルマウスを作製し、病原性を調べた。しかし、これらの疾患モデルマウスでは、抗ラミニン γ 1 類天疱瘡で見られるような水疱形成は生じず、疾患モデルマウスを改良し検討していくことが必要であると考えられた。

また、デスモプラキン I、デスモプラキン II、BP230、ペリプラキン、エンボプラキン、デスモグレイン 1、デスモグレイン 3 など多種類の自己抗原が報告されている腫瘍随伴性天疱瘡において、170kDa 抗原の alpha-2-macroglobulin-like-1 (A2ML1) が腫瘍随伴性天疱瘡の主要な抗原であることが確かめ、腫瘍随伴性天疱瘡の 58 血清を用いて、抗 A2ML1 抗体の有無と臨床データの相関を調べた。その結果、抗 A2ML1 抗体陽性群では、陰性群に比べ、より早期発症であり、眼粘膜病変が優位に少ないことが明らかとなった。

さらに天疱瘡に対するミゾリビンの治療効果について検討し、副腎皮質ホルモン治療が第一選択となる天疱瘡において、ミゾリビンを併用することで短期間のうちに症状を軽快させることが可能なことを明らかにした。

抗ラミニン γ 1 類天疱瘡の自己抗原の病原性についての研究では明らかな結果は出なかったが、より改良した疾患モデルマウスを作成するなど、さらなる研究へと発展していく礎を築くことができた。このことは学術的に大きな意義がある。また、腫瘍随伴性天疱瘡において、既存の多様な自己抗原に加えて、A2ML1 も自己抗原であることを明らかにできたこと、さらに、抗 A2ML1 抗体の有無によって、臨床的な特徴が異なることを明らかにできたことでも大きな学術的意義を示せた。ミゾリビンの研究ではミゾリビンを副腎皮質ホルモンと併用するという新しい使い方の有用性を示せたことで、今後の天疱瘡治療へ大きな貢献を果たし、学術的・社会的意義もきわめて高い結果を得ることができたと考える。

A. 研究目的

類天疱瘡の一種の p200 類天疱瘡は真皮表皮境界部の 200kDa タンパクに対する自己抗体が検出される表皮下水疱症であるが、自己抗原は長く未知であった。2009 年に我々が、p200 類天疱瘡の患者血清がラミニン γ 1 と反応することを明らかにし (Dainichi, Hashimoto et al: PNAS 2009)、抗ラミニン γ 1 類天疱瘡という疾患名を提唱した。本研究の目的の一つはその抗ラミニン γ 1 類天疱瘡において、抗ラミニン γ 1 抗体、特にその C 末端に対する抗体が病原性を持つのかどうか、表皮下水疱を形成するのかどうか、明らかにすることである。

近年、我々は腫瘍随伴性天疱瘡の 170kDa 抗原が A2ML1 であることを見出した。腫瘍随伴性天疱瘡にはデスモプラキン I、デスモプラキン II、BP230、ペリプラキン、エンボプラキン、デスモグレイン 1、デスモグレイン 3 など多種類の自己抗原があり、症例によって異なる自己抗原に対する抗体が検出されることが分かっている。本研究のもう一つの目的は、腫瘍随伴性天疱瘡血清で A2ML1 に対する自己抗体がどれくらいの頻度で検出されるのか、また、A2ML1 に対する自己抗体が病原性を持つのかどうかを明らかにすることである。

ミゾリビンは近年開発された免疫抑制剤であり、効果に比べ副作用が相対的に少ないことが特徴である。尋常性天疱瘡や落葉状天疱瘡などの副腎皮質ホルモンによる治療が第一選択となる自己免疫性水疱症で、副腎皮質ホルモンと併用することにより、治療効果を増すかどうかを検討することが本研究の 3 番目の目的である。

B. 研究方法

抗ラミニン γ 1 類天疱瘡において、抗ラミニン γ 1 抗体、特にその C 末端に対する抗体が病原性を持つのかどうか、表皮下水疱を形成するのかどうか、明らかにするために、passive transfer model と active disease model の 2 種類の疾患モデルマウスを作製した。passive transfer model はマウスのラミニン γ 1 C 末端の 107 アミノ酸塩基のリコンビナントタンパクに対するウサギ IgG を静注することで、また、active disease model はマウスのラミニン γ 1 C 末端の 107 アミノ酸塩基のリコンビナントタンパクを直接免疫することで作製した。次に、免疫ブロットにて患者血清がこのリコンビナントタンパクと反応するかどうか検討した。さらに、蛍光抗体直接法で、真皮表皮境界部に抗体の沈着があるかどうかを検討した。

腫瘍随伴性天疱瘡の研究については、腫瘍随伴性天疱瘡の 58 血清を用いて、抗 A2ML1 抗体の有無と臨床データの相関を調べた。抗 A2ML1 抗体の検出にはヒトの A2ML1 の cDNA を真核細胞のベクターに発現させて、A2ML1 のプラスミドを COS7 細胞にトランスフェクトさせ、20 倍希釈した患者血清と反応させる蛍光抗体法 (COS7 IF) と A2ML1 の cDNA をトランスフェクトさせた COS7 細胞の免疫沈降免疫ブロット法 (IP-IB) を用いた。

ミゾリビンの研究については、天疱瘡 11 症例 (尋常性天疱瘡 8 例、落葉状天疱瘡 3 例) を対象に、プレドニゾンとともにミゾリビンを投与し、効果を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、すべての研究は「ヘルシンキ宣言」ならびに「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施される。研究代表者がすべての患者に対して、事前に本研究の意義、目的、方法、予測用方法、遺伝カウンセリングの利用に関する情報などについて記載した文書を交付して、十分な説明を行った上で自由意思に基づく文書による同意 (インフォームドコンセプト) を受けてから、試料などの提供を受ける。また、試験開始も、学内に設置された臨床試験監査委員会による監査が実施され、倫理委員会により承認された実施計画書にもとづいた試験が実施されているかチェックされる体制が確立している。

実際には、全ての研究において、採血で得られた患者のゲノム DNA を用いて遺伝子解析を行う。その遺伝子解析結果と臨床データベースに関しては連結可能な状態で匿名化し、用いるコンピュータには倫理的・物理的セキュリティを確保する。本研究で知り得た情報は厳重に管理し、対象症例への不利益とならないようにする。また、本研究に含まれるヒト遺伝子解析研究については、その

計画を久留米大学生命に関する倫理委員会に申請し、承認 (研究番号 59) を受けている。

さらに、患者から得られた血清と皮膚組織を用いて、抗皮膚自己抗体の抗原解析と病態の解明を行う。水疱性類天疱瘡、妊娠性疱疹、抗 BP180 型粘膜類天疱瘡、抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡、眼型粘膜類天疱瘡、抗 p165 粘膜類天疱瘡、基底膜下部型線状 IgA 水疱性皮膚症、線状 IgA/IgG 水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、抗 p200 類天疱瘡などの患者から採血で得た血清を用いるため患者に危害を及ぼすことは全くなく、研究・生命倫理・安全対策に対する取り組みを満足している。また、皮膚の生検も可及的少範囲に狭めて患者の負担を少なくする。

組替え DNA 実験に関しては、久留米大学内の必要な講習を受け、必要な書類を提出して、その承認手続きを受けている。本研究で用いられる多量のモノクロナール抗体の産生には各種の培養技術を用いているが、特に、人権の保護及び法令の遵守への対応を必要としない。さらに、本研究では、個人情報を伴うアンケート調査・インタビュー調査はない。

実験動物に関しては、動物の愛護及び管理に関する法律 (平成 11 年 12 月 21 日、法律第 221 号)、実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)、動物の処分方法に関する指針 (平成 7 年 7 月 4 日、総理府告示第 6 号) である基本原則に則った、久留米大学実験動物施設による動物実験計画書の認可制度の承認を受け、動物数の最小限を実施するなどの考慮を行っている。

自己炎症性疾患の研究において、患者血液や組織検体を用いた遺伝子、解析研究と分子・細胞機能異常の探索を目的とする臨床・疫学研究に関し、和歌山県立医科大学と研究協力者が属する長崎大