

A. 研究目的

中條—西村症候群 (NNS) は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる特異な遺伝性疾患であり、有効な治療法はなく多くの症例が早世するとされている。難治性疾患克服研究事業(研究奨励分野)として3年間行った研究事業「中條—西村症候群の疾患概念の確立と病態解明へのアプローチ」(平成21年度)、「中條—西村症候群の疾患概念の確立と病態解明に基づく特異的治療法の開発」(平成22,23年度)により、疫学的には、現在生存が明らかな患者は、1幼児例を含む関西の12例のみであり、その多くを和歌山県立医科大学皮膚科でフォローしていることが判明し、また病因として、昭和14年の中條、昭和25年の西村らによって「凍瘡を合併せる続発性骨骨膜症」として報告されて以来実に70年ぶりに、原因遺伝子として、検索した全ての患者に、免疫プロテアソーム $\beta 5i$ サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子の c.602G>T (G201V) 変異が同定された。さらに患者由来細胞・組織の解析により、プロテアソーム機能不全によってユビキチン化蛋白質が蓄積することによってストレス応答が高まり、核内にリン酸化 p38 が蓄積することによって IL-6 が過剰産生されることが本態であることが示された (Arima K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。本分担研究においては、これらの研究事業を発展的に継続し、NNS のさらなる病態解明と特異的治療法の開発を進めるとともに、その他の慢性皮膚炎症性疾患の病態解明と治療法開発を目指し、以下の研究が推進された。

B. 研究方法

1) 診断基準を満たさないものの診断がつかず、臨床症状や検査所見から NNS が疑われた和歌山の女

児と沖縄の男児に対し、インフォームドコンセントを得て末梢血から単離したゲノム 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。また、国際自己炎症疾患研究会が運営する自己炎症疾患関連遺伝子変異データベースである INFEVERS の *PSMB8* 変異の管理を金澤と井田で行い、新規登録に対応した。

2) 和歌山県立高等看護学院の生徒 50 名のインフォームドコンセントを得て、卒前実習で採取した血液の分与を受け、単離したゲノム 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。

3) 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。末梢血については抗 CD14、CD19 抗体との二重染色を行ってから FACS で解析した。また細胞の一部はサイトスピンにかけて固定してから抗 HLA-ABC、抗 HLA-DR 抗体 (DAKO) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。患者由来不死化 B 細胞の一部は mRNA を抽出し、HLA-DR について RT-PCR を行った。さらに一部の細胞は抗 HLA-DR 抗体 (DAKO) と抗 EEA1、 γ -adaptin、LAMP1 抗体との細胞内二重染色を行った上でサイトスピンにかけ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4) NNS に対するトシリズマブの有用性に対する前向きコホート研究について和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て (承認番号 959)、顔面、腕と胸部の脂肪筋肉萎縮と関節拘縮とともに腹部肥満が著明な1成人例に 8mg/kg のトシリズマブ (アクテムラ[®]) を4週間に1回、約半年間投与した。

5) 幼小児期から IgA 欠損を指摘されていたがその後難治性疣贅と汎血球減少を呈し和歌山県立医科大学を紹介受診した症例について、当初 WHIM 症

候群を疑って末梢血単核球を SDF-1 で刺激した後の CXCR4 発現の変化をフローサイトメーターで解析し、末梢血から単離したゲノム DNA を用いて CXCR4 遺伝子変異の検索を行ったが診断がつかなかったため、新規原発性免疫不全症・遺伝性自己炎症疾患を疑い、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。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた患者由来試料は、和歌山県立医科大学の臨床研究・遺伝子解析に関する倫理委員会あるいは長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得た計画に基づき、書面にてインフォームドコンセントを得て収集されたものである。

C. 研究結果

1) 結節性紅斑様皮疹を繰り返す和歌山の 4 歳女児と、若年性特発性関節炎が疑われる沖縄の 6 歳男児について、NNS を除外するために *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のみであった。前者はアミノ酸置換を伴わず、後者は健常者 40 名中 7 名にヘテロに、1 名にホモに見出され、いずれも非機能的な SNP と考えられた。一方、国際自己炎症疾患研究会が運営する自己炎症疾患関連遺伝子変異データベースである INFEVERS の中で金澤と井田が管理する *PSMB8* 欄に、イタリアより CANDLE 症候群に関連する新たな変異の登録申請があり、シーケンス番号などをチェックし c.220A>T (T74S) として登録した。これは JMP、CANDLE 症候群に共通に見られる T75M 変異と同様、 $\beta 5i$ の活性中心が変化することでキモトリプシン活性のみが障害されると予想される。

2) インフォームドコンセントを得て和歌山県内各地とその近郊出身の 20-40 歳代の男女の血液から単離しえた 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。

3) NNS 患者由来不死化 B 細胞における HLA の細胞表面発現を FACS で検討したところ、HLA-ABC の発現は問題なく認められたのに対し、HLA-DR の発現は患者特異的に認められなかったことから、次に患者末梢血単核球に含まれる CD14 陽性単球と CD19 陽性 B 細胞の解析を行い、FACS では同様に細胞外に HLA-DR の発現を認めないのに対し、サイトスピン標本を固定して染色すると HLA-DR も HLA-ABC と同様に発現が認められた。患者由来不死化 B 細胞からの RT-PCR にて HLA-DR mRNA の十分な発現も確認され、細胞内輸送の障害によりいずれかの小器官に蓄積していることが予想されたことから、患者由来不死化 B 細胞を固定して HLA-DR と各種小器官のマーカーである EEA1、 γ -adaptin、LAMP1 と二重染色してからサイトスピン標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したが、いずれのマーカーとも共局在せず、むしろ HLA-DR は細胞表面の形質膜にきちんと局在していることが確認された。さらに、当初用いた BD の抗体 (L243) を用いて細胞内染色して FACS で検討すると HLA-DR の発現は認められず、一方、eBioscience の抗体 (LN3) を用いて染色し FACS で検討したところ、細胞表面の HLA-DR 発現を認めたことから、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。

4) 平成 23 年に和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た「NNS に対するトシリズマブの有用性に対する前向きコホート研究」のプロトコルに従い、脂肪筋肉萎縮と関節拘縮、腹部肥満が著明な成人重

症例にアクテムラの投与を行った。当初、増悪する冬季に導入することを予定していたが、10月に発熱を伴う下肺野の肺炎を発症したために投与を延期し、調子のいい夏期に入院してアクテムラ® 8mg/kg (440mg/55kg) の導入を行った。導入時、肺炎については一部の無気肺を残すのみで浸潤影は消失しており、血液検査では白血球 1930/ μ l、血小板 25000/ μ l と低値、また炎症所見としては CRP 0.74mg/dl、SAA 37 μ g/ml、sIL-2R 645U/ml であったが、導入1週間後には炎症所見が CRP 0.05mg/dl、SAA 5 μ g/ml と陰性化して4週間後まで維持した。血小板が 17000/ μ l まで低下したため2回目の投与を1週間延期したところ、臨床的な感染徴候はないながら CRP 1.69mg/dl、SAA 126 μ g/ml と跳ね上がったため、その後は4週間に1回のペースを崩さず投与を継続し、血小板も4回目投与前に 11000/ μ l まで低下した後はやや回復し、明らかな出血傾向はない。12月より CRP 0.07mg/dl、SAA 11 μ g/ml とやや上昇したが、手足の凍瘡様紫紅色斑が出現した以外は特に問題ない。7ヶ月間投与後、自覚的に明らかな改善徴候もないが、食欲や生活意欲も出て表情は明るく、HAQ-DI スコアによる身体機能評価で、投与前の 2.875 が 2.75 と軽度ではあるが改善している。

5) 難治性多発疣贅と肉芽腫性結節性皮疹に加えて汎血球減少を呈し、和歌山県立医科大学の皮膚科と血液内科を紹介受診した16歳症例について、特徴的な臨床症状と検査所見から何らかの原発性免疫不全症・遺伝性自己炎症疾患、特に当初、骨髓低形成ながら WHIM (Warts, hypo- γ -globulinemia, infections and myelokathexis) 症候群を疑った。末梢血単核球を SDF-1 で刺激した後の CXCR4 の細胞内取込みを FACS で解析したところ、患児で発現が 60% しか下がらず母親の 30% に比べて取込みの低下を認めしたが、CXCR4 遺伝子には有意な変異を認めなかった。B 細胞だけでなく T 細胞も著しく低下

し、増殖能も低下していることから重症複合型免疫不全症 (SCID) を疑い、母親と患児について次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。劣性遺伝と de novo 変異双方の可能性をふまえ、既知の SNP などを除いて 200 を越える変異が抽出されたが、これまでに SCID の原因として報告されている変異遺伝子をすべて検索したところ 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。LIG4 は DNA の再構成や修復にかかわる DNA ligase 4 をコードし、変異により小頭症、重症複合型免疫不全、放射線感受性の易発癌性を特徴とする LIG4 症候群を発症することが知られているが、本症例のような遅発性の免疫不全をきたすような症例の報告はない。

D. 考察

2010 年に行った全国疫学調査以来、診断がつかず NNS を疑われて当方にコンサルトされる症例が時にあるが、臨床診断基準案を満たして PSMB8 変異が検出された例はまだない。今回検索した 2 症例も臨床診断基準案を満たさず、有意な変異も見出されなかった。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もので、今回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 と考えられる。一方、CANDLE 症候群関連変異として T74S の登録があったが、論文などでの発表がなく、患者の臨床像やプロテアソーム酵素活性をはじめとする機能的意義は不明である。遺伝子型と表現型の関連を明らかにするためにも、詳細な解析の発表が待たれる。

一方、和歌山地方の健常者の解析にて NNS 関連

PSMB8 変異を 1/98 アリルに認めたことは、予想されたこととはいえ、単純計算で 1 万人に 1 人発症することになり、驚きに値する。看護学院からは今後も継続的に協力していただける予定であり、解析対象が増えることで実態が明らかになることが期待される。

さて、免疫プロテアソームは通常の（スタンダード）プロテアソームに比べて MHC クラス I に提示されやすいペプチドを生成することでクラス I 提示を促進することが知られており、 $\beta 5i$ ノックアウトマウスや $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ トリプルノックアウトマウスでは MHC クラス I の発現が低下し、CD8 T 細胞の発生分化も影響を受けることが報告されている。NNS においては免疫プロテアソーム複合体の形成が障害され $\beta 5i$ だけでなく $\beta 1i$, $\beta 2i$ の機能も低下することから、MHC クラス I の発現が影響を受けることが予想されたが、HLA-ABC の発現は問題ない代わりに、HLA-DR の発現の異常が認められた。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。L243 は混合リンパ球反応（MLR）を阻害できる抗体であることが報告されており、その構造変化によってクラス II 提示による CD4 細胞の分化、発生に影響がある可能性がある。NNS においては成長に伴って抗核抗体などの自己抗体が見られる症例があるが、あるいはこの現象と関連があるのかもしれない。またこれまで知られていない何らかの免疫不全と関連がある可能性もある。

HLA-DR は小胞体で合成される際にシャペロンとしてのインバリアント鎖と結合するが、ファゴリソソームに移動して CLIP のみを抗原提示部に残してインバリアント鎖を切断し、HLA-DM の助けを借りて CLIP と外来抗原由来ペプチドを入れ替え、

細胞表面に移動して T 細胞受容体に提示する。NNS 患者血球においては、分解されないユビキチン化蛋白質がファゴリソソームに蓄積していることが確認されており、このために HLA-DR と CLIP など関連分子との会合や分解に何らかの修飾が起こっている可能性が考えられる。一方、HLA-DR そのものに構造異常があるとすれば、その遺伝子そのものに変異がある可能性がある。*PSMB8* 遺伝子は *TAP* 遺伝子などとともに MHC クラス II 領域にあることから、NNS 患者特異的な *HLA-DR* 遺伝子にヒッチハイク変異が存在する可能性は否定できない。今後の更なる解析によってそのメカニズムと意義が明らかになることが期待される。

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な印象にあるのは、大きな収穫であった。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。ただ、血小板低値、肺陰影、顔面上肢のやせ・拘縮と腹部の肥満はそのまま持続しており、さらに感染性肺炎を誘発するリスクを考えると、投与継続は慎重に検討すべきである。更に多くの症例に投与して病像や年齢による効果や副作用の違いを検討するとともに、今回経時的に採取した血清について、IL-6 シグナルをブロックすることでその他のサイトカイン、ケモカイン、アディポカインがどのように推移したか検討することで、各シグナルのヒエラルキーが明らかになることが期待される。

欧米では CANDLE 症候群の小児 3 例（3.5-6 歳）に使用し（5-12mg/kg、2 週に 1 回）に使用され、うち 2 例で 6 ヶ月以上継続され、炎症抑制効果はあったものの脂肪萎縮には無効だったと報告されている。さらに昨年の米国リウマチ学会にて、*ex vivo* で有効とされた JAK 阻害薬が NNS 患者に投与され、有効であったと報告された。本邦でも近く乾癬などに対して JAK 阻害薬が保険適応になる予定であり、

これも倫理委員会に諮ったうえで臨床研究として患者に投与することを検討する。

最後に、何らかの原発性免疫不全症・遺伝性自己炎症疾患が疑われながら診断がつかなかった 1 症例について、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ばることで、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。本研究は、これまで NNS が疑われながら *PSMB8* を含め既知の遺伝子に変異が見つからず診断がついていない症例の解析にとってモデルケースになると考えられ、応用が進むことが期待される。

E. 結論

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、今後も患者が出現しうることが実感できた。小児例を早期に診断するため、学会や研究会、書籍などでの疾患の紹介がますます重要となる。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 *LIG4* 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。ただ HLA-DR の発現異常については、何故そうなるのか、またどのような意義があるのか、まだ全く不明である。NNS の病態解明に向けて研究が一步進むと同時に先の闇の深さが見えてきた印象である。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 金澤伸雄: 壊疽性膿皮症は自己炎症疾患か? 宮地良樹編、WHAT'S NEW in 皮膚科学 2012-2013、メディカルレビュー社、pp.34-35, 2012
2. 金澤伸雄: 中條—西村症候群. 原寿郎編、小児の発熱 A to Z、診断と治療社、pp.226-228, 2012
3. 金澤伸雄: Blau症候群. 最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 3「サルコイドーシス(改訂第2版)」、長井苑子編、最新医学社、pp.210-218, 2012
4. 金澤伸雄: 中條—西村症候群. 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患、近藤直実・平家俊男編、診断と治療社、pp.100-102, 2012
5. 金澤伸雄: Case 6 中條—西村症候群. 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患、近藤直実・平家俊男編、診断と治療社、pp.210-213, 2012
6. 金澤伸雄: 皮膚—紅斑など皮膚症状から診断へ. 小児内科、44: 85-89, 2012
7. 有馬和彦、井田弘明、金澤伸雄、吉浦孝一郎: プロテアソームの機能障害型遺伝子変異が新規自己炎症疾患である中條—西村症候群を引き起こす. 細胞工学、31: 68-69, 2012
8. 井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎: 中條—西村症候群の原因遺伝子とプロテアソーム機能異常. リウマチ科、47: 654-660, 2012

9. 金澤伸雄 : NOD2 関連疾患. 炎症と免疫, 20: 517-522, 2012

10. 井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎 : プロテアソーム病. 炎症と免疫, 20: 609-614, 2012

11. Kanazawa N: Rare hereditary autoinflammatory disorders: towards an understanding of critical in vivo inflammatory pathways, J Dermatol Sci 66: 183-189, 2012

12. Kanazawa N: Nakajo-Nishimura syndrome: an autoinflammatory disorder showing pernio-like rashes and progressive partial lipodystrophy, Allergol Int 61: 197-206, 2012

13. Tchernev G, Ananiev J, Cardoso JC, Wollina U, Verma SB, Patterson JW, Dourmishev LA, Tronnier M, Okamoto H, Mizuno K, Kanazawa N, Gulubova M, Manolova I, Salaro C: Sarcoidosis and molecular mimicry—important etiopathogenetic aspects: current state and future directions, Wien Klin Wochenschr 124: 227-238, 2012

14. Ikeda T, Kanazawa N, Furukawa F: Hydroxychloroquine administration for Japanese lupus erythematosus in Wakayama: A pilot study, J Dermatol 39:531-535, 2012

15. Kuwahara J, Li HJ, Kanazawa N, Furukawa F: Attempts to induce auricular hematoma in a mouse model of collagen-induced arthritis, Aesthet Dermatol 22: 118-123, 2012

2. 学会発表

国内学会

第 19 回分子皮膚科学フォーラム 2012.4.13-14, 青森

稲葉豊、金澤伸雄、古川福実、櫻根義久、中野創、澤村大輔 : Keratin 16 遺伝子の N125S ヘテロ変異を認めた先天性爪甲肥厚症の母子例.

第 56 回日本リウマチ学会総会・学術大会 2012.4.26-28, 東京

金澤伸雄、井田弘明 : 世界に分布するPSMB8遺伝子変異によるプロテアソーム機能不全症候群 : 脂肪萎縮を伴う新しい自己炎症疾患.

有馬和彦、井田弘明、金澤伸雄、江口勝美 : 自己炎症症候群 中條-西村症候群におけるプロテアソーム機能不全と炎症性ケモカインの解析.

第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5.12-13, 大阪

稲葉豊、金澤伸雄、古川福実 : オープンパッチテストにて診断したアリルイソプロピルアセチル尿素とイブプロフェンによる固定薬疹の一例.

第431回日本皮膚科学会大阪地方会 2012.5.19, 和歌山

李洪錦、桑原次郎、金澤伸雄、古川福実 : 自己免疫性耳血腫マウスモデル作成の試み.

第 111 回日本皮膚科学会総会 2012.6.1-3, 京都

金澤伸雄、李洪錦、中谷友美、木村文子、米井希、上中智香子、山本有紀、古川福実 : 外来異物に対する皮膚反応におけるTRPV1の役割. (ポスター賞)

第37回和歌山県皮膚科医会学術講演会 2012.6.23, 和歌山

金澤伸雄：中條-西村症候群：新しい自己炎症疾患であるプロテアソーム機能不全症の提唱。（和歌山県皮膚科医会医学奨励賞受賞記念講演）

第80回和歌山医学会総会 2012.7.8, 和歌山

国本佳代、金澤伸雄、古川福実：中條-西村症候群：和歌山発・プロテアソーム機能不全による新しい遺伝性自己炎症疾患。

第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2012.7.13-15, 軽井沢

金澤伸雄、稲葉豊、上中智香子、古川福実：レボフロキサシンとアガリクスに対してDLST陽性を認めた多発性固定薬疹の1例。

古川福実、金澤伸雄、島津伸一郎、吉田晃、山田和子、中川武正、榎本雅夫：和歌山県における乳幼児のアレルギー疾患に関する調査（第5報）プロバイオティクスのアトピー性皮膚炎あるいは乳幼児への介入効果。

稲葉豊、金澤伸雄、奥平尚子、田中克典、土井直孝、下松達哉、国本佳代、石黒真理子、岡本勝行、三木田直哉、上中智香子、池田高治、山本有紀、古川福実：和歌山県立医科大学皮膚科における加水分解小麦含有石鹼使用による即時型小麦アレルギーを疑われ受診した症例のまとめ。

第105回近畿皮膚科集談会 2012.7.22, 京都

金澤伸雄、稲葉豊、古川福実、櫻根義久、中野創、澤村大輔：ケラチン16遺伝子のN125Sヘテロ変異を認めた先天性爪甲肥厚症の母子例。

第362回日本皮膚科学会福岡地方会 2012.9.17, 福岡

金澤伸雄、古川福実、井上千津子、田村志宣：難治性疣贅と類上皮細胞肉芽腫からなる多発性皮膚結節を伴った原発性免疫不全症の1例。

第40回日本臨床免疫学会総会 2012.9.27-29, 東京

井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎：中條-西村症候群の分子機序。シンポジウム1「免疫疾患のBench-To-Bedside」

有馬和彦、井田弘明、金澤伸雄、吉浦孝一郎：中條-西村症候群、新規本邦特有の自己炎症症候群におけるサイトカイン産生機序の解析。

第63回日本皮膚科学会中部支部学術大会 2012.10.13-14, 大阪

金澤伸雄：日本で見出された自己炎症疾患：中條-西村症候群。シンポジウム1「自己炎症疾患研究の目指すもの」

石黒真理子、池田高治、金澤伸雄、古川福実、鬼頭由紀子、金林純子、橋爪秀夫、竹本朱美、武藤正彦：皮膚病変を有するループス関連疾患患者のQOLに対する検討—Skindex29とCLASIを用いて—。

第64回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2012.10.27-28, 広島

李洪錦、桑原二郎、金澤伸雄、古川福実：自己免疫性耳血腫マウスモデル作成の試み。

第6回日本免疫不全症研究会 2013.1.26, 東京

金澤伸雄、古川福実、井上千津子、田村志宣：難治性疣贅と類上皮細胞肉芽腫からなる多発性皮膚結節を伴った原発性免疫不全症の1例。

第81回日本皮膚科学会茨城地方会 2013.3.9-10, 茨城

金澤伸雄、国本佳代、古川福実：抗IL-6受容体抗体を投与した中條－西村症候群の1例。

第436回日本皮膚科学会大阪地方会 2013.3.23, 大阪

中村智之、金澤伸雄、三木田直哉、古川福実：*IL36RN* 遺伝子に新しい変異を認めた若年発症汎発性膿疱性乾癬の1例。

稲葉豊、中谷友美、金澤伸雄、古川福実、中野創、澤村大輔、濱田尚宏、橋本隆、米田耕造：本邦における先天性爪甲肥厚症：文献的考察と全国疫学調査のまとめ。

国際学会

The European League against Rheumatism (EULAR) 2012, 2012.6.6-9, Berlin, Germany

Arima K, Kanazawa N, Furukawa F, Ida H, Yoshiura K: Increased expression of inflammatory cytokines and chemokines in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome.

2nd Eastern Asia Dermatology Congress (EADC), 2012.6.13-15, Beijing, China

Kanazawa N, Kunimoto K, Arima K, Ida H, Yoshiura K-I, Furukawa F: Nakajo-Nishimura syndrome, an autoinflammatory disorder with partial lipodystrophy, is caused by a mutation of the PSMB8 gene encoding an immunoproteasome subunit.

Li HJ, Kaminaka C, Furukawa F, Kanazawa N: Roles of transient receptor potential vanilloid 1 on trichloroacetic acid peeling and hapten-induced contact dermatitis.

The 42nd Annual Meeting of European Society for Investigative Dermatological Research, 2012.9.19-22, Venice, Italy

Yoshimasu T, Kanazawa N, Li HJ, Mikita N, Furukawa F: Involvement of mast cells in the development of lupus-like skin lesions on MRL-lpr/lpr mice.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012.12.7-9, Naha, Japan

Kunimoto K, Furukawa F, Ida H, Kanazawa N: Modified HLA-DR expression on antigen-presenting cells harboring the PSMB8 mutation responsible for Nakajo-Nishimura syndrome.

Li HJ, Furukawa F, Kanazawa N: Analysis of T cells in hapten-induced contact dermatitis on TRPV1-deficient mice.

Yoshimasu T, Kuramoto T, Serikawa T, Toyozawa S, Kanazawa N, Yamamoto Y, Furukawa F: A disorder of pilosebaceous unit of Kyoto Rhino Rat (krh) and its possibility of a model for acne vulgaris

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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：早老症（コケイン症候群）

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 森脇 真一 大阪医科大学皮膚科 教授

研究要旨

研究分担者は平成 10 年よりコケイン症候群（CS）、色素性乾皮症（XP）など紫外線性 DNA 損傷修復の先天異常で発症する遺伝性光線過敏症の診断センターを維持してきた。今回、その過程で 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、また 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 が酸化的 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。プレリミナリーではあるが、CSA、CSB 遺伝子の RNAi により H2O2no 感受性が高まった。さらに CS マウスでは、大脳皮質、海馬などに髄鞘化の低下を認めた。

A. 研究目的

研究分担者は平成 10 年から現在まで 13 年にわたり遺伝性早老症のひとつであるコケイン症候群（Cockayne syndrome ; CS）、CS の類縁疾患である色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum ; XP）など紫外線性 DNA 損傷修復の遺伝的異常で発症する疾患の分子細胞診断を本邦で維持してきた。これまで 400 例以上の症例を解析し 130 例の XP、26 例の CS を新たに確定してきた。重要な DNA 修復システムのひとつであるヌクレオチド除去修復、特に転写共益修復に欠損のある CS では日光過敏に加え、早老症、著明な発育障害、精神運動障害、難聴、視力障害等多彩な症状を伴うきわめて予後不良の疾患であり、各症状の病態は未解明で有効な治療法もない。CS は遺伝学的には CSA、CSB、XPB/CS、XPD/CS、XPG/CS の 5 型に分類される。本研究では過去の診断症例（26 例）、今後も依頼される新規診断症例を分子遺伝学的手法を駆使して詳細に解析し、各症例の臨床所見（老化を含む多彩な CS の症状）の有無や重症度との関連を検討し、表現型・遺伝型関連の解析を通じて CS の病態解明、内因性老化、発育障害、神経障害の解明にせまる。また近年 CS において指摘されている酸化的 DNA 損傷の修復異常を *in vitro* の系で検証し、患者検体を用いて CS 患者の抗酸化剤による治療が可能かどうかを評価する。さらに、CS モデルマウスを用いて、様々な CS の症状の病態の解明、CS 治療法の探索を行う。

B. 研究方法

今回、以下の研究ストラテジーを考え

①CS 患者における表現型・遺伝型関連の評価

②CS 関連各種遺伝子ノックダウンの酸化ストレス感受性への影響

③CS マウスモデルを用いた中枢神経細胞の構造的・機能的解析

各々研究システムを立ち上げ解析を開始した。具体的には

①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。さらにウェスタン法によるタンパク分析も実施する。

②CSA、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。

③CS モデルマウスとして XPG-null マウスを使用する。まず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。また髄鞘化に関わる種々の因子を分子生物学的に検討する。

（倫理面への配慮）

本研究の一部(既知 CS 患者の DNA 修復解析、新規 CS 患者の遺伝子解析、DNA 修復解析)は臨床の場での検査のひとつとして保険収載され、また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すでに承認されている。ヒトのサンプルを用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後に施行し、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。マウス実験においては、大阪医科大学実

験動物委員会での審査を受け、承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

本年度達成できた成果は以下である。

- (1) 9例の新規CS患者 (CSA 3例、CSB 4例、XP合併型 2例) を確認した。
- (2) 上記の中で3例は臨床的、細胞学的にはCSであるにも関わらず遺伝子変異は未検出で、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CSⅢ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)。
- (3) XPD/CSではCSの表現型を呈するXPD遺伝子の変異によるG47Rが確認できた。
- (4) XPG/CSではN末側の重要なドメインに変異が確認でき、非重要部位での変異をもつ皮膚型XPGとは対照的であった。
- (5) CSではC末に変異があるほど重症化しやすい傾向 (遺伝型・表現型のパラドックス現象) がみられた。
- (6) 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。
- (7) 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(著書)

- (1) 森脇真一 誤診：しみ、本当は色素性乾皮) 症誤診されている皮膚疾患 (メディカルレビュー) 印刷中

- (2) 森脇真一 コケイン症候群 「忘れてはならない皮膚科症候群」 皮膚科臨床アセット20 (中山書店) 印刷中

- (3) 森脇真一 発光ダイオード (LED) スキルアップ皮膚レーザー治療 p168-174, 2011 (中外医学社)

- (4) 森脇真一 色素性乾皮症 今日の皮膚疾患治療指針 p585-587, 2012 (医学書院)

- (5) 森脇真一 色素性乾皮症 新領域別症候群シリーズ 別冊日本臨床 19:637-640, 2012 (日本臨床社)

- (6) 森脇真一 思春期に見つかる光線過敏症への対処法は? 思春期皮膚トラブル pp126-130 (診断と治療社)

(原著・総説)

英文

- (1) Imoto K, Nadem C, Moriwaki S, Nishigori C, Oh KS, Sikandar G, Khan SG, Goldstein AM, Kraemer KH Ancient origin of a Japanese xeroderma pigmentosum founder mutation J Derm Sci 69:175-176, 2012

- (2) Moriwaki S Hereditary disorders with deficient repair of UV-induced DNA damage Jpn Clin Med, in press

- (3) Kokunai Y, Tsuji M, Yuko Ito Y, Kurokawa T, Otsuki K, Moriwaki S Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human skin tumor, Medical Molecular Morphology, in press

- (4) Moriwaki S, Yamashita Y, Nakamura S, Fujita D, Kohyama J, Takigawa M, Ohmichi H Prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum group A in Japan J Dermatol 39:516-9, 2012

- (5) Moriwaki S, Takigawa M, Igarashi N, Nagai Y, Amano H, Ishikawa O, Khan SG, Kraemer KH Xeroderma pigmentosum complementation group G patient with a novel homozygous mutation and no neurological abnormalities, Exp Dermatol 21:304-7, 2012

- (6) Moriwaki S, Takahashi Y, Shimizu H, Inoue M, Sugiyama Y, Inoue S Decreased repair of singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum group A cells determined by plasmid host cell reactivation J Derm Sci 66:516-9, 2012

邦文

- (1) 森脇真一 色素性乾皮症～確定診断へのプロセス～「色素異常症の診断と治療」 日本皮膚科学会雑誌 122:3131-3133, 2012

- (2) 森脇真一 色素性乾皮症～最近の知見～「母斑症・遺伝性疾患最前線; 診断、治療と対応」 日本皮膚科学会雑誌 122:3196-3198, 2012

- (3) 森脇真一 光環境とライフスタイル「太陽紫外線環境と皮膚」 日本皮膚科学会雑誌 122:3248-3251, 2012

(4) 森脇真一 紫外線を用いた皮膚病治療 皮膚科
セミナリウム 日本皮膚科学会雑誌
122:3733-3738, 2012

(5) 森脇真一 遺伝性早老症の病態、診断と治療 難
病と在宅ケア 17:25-28, 2012

(6) 森脇真一 DNA 修復機構と色素性乾皮症
Monthly Book Derma 191:15-24, 2012

(7) 森脇真一 光線過敏症の診断と患者ケア 第 22
回太陽紫外線防御研究委員会シンポジウム報告書
22:39-41, 2012

2. 学会発表

(1) 横田日高、吉田善紀、森脇真一、宮地良樹、山
中伸弥 iPS 細胞を用いた色素性乾皮症の神経変性
の病態モデル作成 分子皮膚科フォーラム 平成24
年4月13日 (弘前)

(2) 森脇真一 色素性乾皮症～確定診断へのプロ
セス 教育講演 「色素異常症の診断と治療」 第
111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1日

(3) 森脇真一 色素性乾皮症～最近の知見 教育
講演 母斑・遺伝性疾患最前線；診断、治療と対
応 第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1
日

(4) 森脇真一 光環境とライフスタイル 教育講
演 「太陽紫外線環境と皮膚」 第111回日本皮膚
科学会総会 平成24年6月2日

(5) 森脇真一 光線による皮膚疾患；知っておくべ
き最近の知見 第23回 Niigata Dermatology Con
ference 平成24年6月23日 (新潟)

(6) 森脇真一 光環境と皮膚～色素性乾皮症と向
き合って 特別講演 第434回日本皮膚科学会
北陸地方会 平成24年6月24日 (金沢)

(7) 森脇真一、清水博子、黒川晃夫、寺木祐一 色素
性乾皮症G群～本邦第4例目の報告例 (XPG/CS
complex?) 第34回日本光医学・光生物学会平成24
年7月28日 (神戸)

(8) 森脇真一 その他の光治療 (LEDなど) 教育
講演 2 第30回日本美容皮膚科学会 平成24年8
月19日 (名古屋)

(9) 森脇真一 太陽紫外線環境に生きる～色素性
乾皮症から学んだこと～ 特別講演 山形地方会

平成24年9月9日 (山形)

(10) 森脇真一 知っておくべき光線過敏症～その
診断と患者ケア～ 秋田県皮膚科談話会 平成24
年9月15日 (秋田)

(11) 森脇真一、牧之段恵里 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～これまでの解析と今後
の展望～ 皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の
網羅的研究班 (厚生労働省) 平成24年度第1回班
会議 平成24年10月12日 (大阪)

(12) 大谷稔男、高尾真理子、藤井弓子、二宮伸介、
多田廣司、森脇真一 ECC症候群と考えられた
1例 第63回日本皮膚科学会中部支部学術大会
平成24年10月14日 (大阪)

(13) 森脇真一 色素性乾皮症の臨床経過と紫外線
対策の基本 シンポジウム 第2回 X P 全国大会
平成24年11月24日 (愛知)

(14) 牧之段恵里、森脇真一 色素性乾皮症の極め
て稀な病型；XP / CS complex の本邦3症例 厚
生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
「神経皮膚症候群に関する調査研究」班 平成24
年12月7日 (東京)

(15) Kokunai Y, Tsuji M, Ito Y, Kurokawa T,
Otsuki Y, Moriwaki S Immunohistochemical
analysis of O6-methylguanine-DNA
methyltransferase in human melanoma in
comparison with skin squamous cell carcinoma.
The 37th annual meeting of the Japanese Society
for Investigative Dermatology 2012. 12. 9 (Naha)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
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：角化症（掌蹠角化症）
研究報告①：古典型ボーウインケル症候群の病態について

研究分担者 米田耕造 香川大学医学部准教授

研究要旨

かつて我々は変異ロリクリン遺伝子を角化細胞株細胞の一種である HaCaT 細胞にトランスフェクションして安定トランスフォーマントを得ることにより、ロリクリン角皮症のモデル細胞を作製することに成功した。本研究では、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。この疾患モデル細胞の培地にエクジソンを添加すると、変異コネキシン 26 を発現した。コントロール細胞では、野生型コネキシン 26 は細胞質および細胞膜に発現していた。変異コネキシン 26 も、細胞質および細胞膜に発現していた。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。コントロール細胞と比較して遺伝性掌蹠角化症モデル細胞では、Stat1、Stat2、Stat3、Stat5、eNOS、eIF4E、mTOR が強くリン酸化されていた。かつ、Akt が強くリン酸化されていた。遺伝性掌蹠角化症モデル細胞の Akt の活性は Mock の約 7 倍、コントロール細胞の約 9 倍の活性があった。遺伝性掌蹠角化症モデル細胞では p44/42 MAP kinase が強くリン酸化されていた。遺伝性掌蹠角化症モデル細胞の p44/42 MAP kinase の活性は Mock の約 10 倍、コントロール細胞の約 8 倍の活性があった。遺伝性掌蹠角化症モデル細胞では、GM-CSF、VEGF、IL-6、CCL-5/RANTES の産生亢進が観察された。これらの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。

共同研究者

窪田泰夫 香川大学医学部皮膚科教授
成清富貴子 香川大学医学部皮膚科

A. 研究目的

古典型ボーウインケル症候群 (MIM 124500) は、GJB2 遺伝子にミスセンス変異が生じることが原因で発症する。このミスセンス変異によりコネキシン 26 (D66H) が生成される。この変異はドミナントネガティブ変異であるが、角化異常が生じる過程の分子メカニズムについては、詳細は不明である。この分子メカニズムを検討するため、変異 GJB2 遺伝子をトランスフェクションすることにより古典型ボーウインケル症候群モデル細胞を樹立した。今回は、こ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た。

B. 研究方法

a) プラスミド作製

野生型コネキシン 26 [GJB2 (WT)] および変異コネキシン 26 [GJB2, pAsp66His] の cDNA をほ乳類発現ベクターである pIND/V5-His ベクターにサブ

クローニングした。

b) 細胞培養とトランスフェクション

ヒト表皮細胞由来である HaCaT 細胞を DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、100 units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、10%FBS を含む培地中で培養した。HaCaT 細胞はトランスフェクションの前日に継代した。DNA トランスフェクションには、LipofectAMINE plus 試薬 (Invitrogen) を用いた。PI3 kinase の阻害剤である wortmannin、LY294002 は、Cell Signaling Technology 社より購入した。MEK1 の阻害剤である PD98059 も、Cell Signaling Technology 社より購入した。

c) セレクション

安定トランスフォーマントのセレクションには、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、400 µg/ml ゼオシン、2mg/ml ジェネテイシン、10%FBS を含む培地を用いた。

d) 一次抗体

抗 V5 抗体は Invitrogen 社より購入した。抗コネ

キシシ 26 抗体は Abcam 社より購入した。抗リン酸化 p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) 抗体、抗 p44/42 MAP kinase 抗体、抗リン酸化 Akt (Thr308) 抗体、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Stat1 (Tyr701) 抗体、抗リン酸化 Stat2 (Tyr690) 抗体、抗リン酸化 Stat3 (Tyr705) 抗体、抗リン酸化 Stat5 (Tyr694) 抗体、抗リン酸化 eNOS (Ser1177) 抗体、抗リン酸化 eIF4E (Ser209) 抗体、抗リン酸化 mTOR (Ser2481) 抗体は Cell Signaling Technology 社より購入した。また Akt Kinase Assay Kit ならびに p44/42 MAP Kinase Assay Kit は Cell Signaling Technology 社より購入した。GM-CSF、VEGF、IL-6、CCL-5/RANTES の ELISA Kit は、R&D Systems 社より購入した。

e) 免疫ブロット法

安定トランスフォーマント細胞を Laemmli buffer に溶解し、氷上で 30 分静置した。15000 回転で 1 分間遠心後、上清を回収した。蛋白濃度は Bradford 法を用いて測定した。30 μ g の量の蛋白質を SDS-PAGE に展開し、その後、蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を、上記の一次抗体で、室温で 2 時間反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用して目的とする蛋白質を検出した。

e) Akt kinase アッセイ

Cell Signaling Technology 社の Akt kinase アッセイキットを使用した。Mock、WC-3、MC-4 細胞を RIPA buffer で可溶化した。抗リン酸化 Akt (Ser473) (D9E) モノクローナル抗体ビーズで免疫沈降を行った。GSK-3 フェージン蛋白と ATP を加え、kinase 反応を行った。3X SDS Sample Buffer を添加して、kinase 反応を終息させ、SDS-PAGE に展開し、その後、(リン酸化された) 蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜は、抗リン酸化 GSK-3 α / β (Ser21/9) 抗体を一次抗体に使用して、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用してリン酸化 GSK-3 α / β (Ser21/9) を検出した。フィルム上に得られたバンド (シグナル) の濃度をデンシトメトリーを用いて定量化した。PI3 kinase の阻害剤である wortmannin、LY294002 を培地に添加して、Akt kinase の活性の変化も観察した。

f) p44/42 MAP kinase アッセイ

Cell Signaling Technology 社の Akt kinase アッセイキットを使用した。Mock、WC-3、MC-4 細胞を RIPA buffer で可溶化した。抗リン酸化 p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) モノクローナル抗体ビーズで免疫沈降を行った。ELK-1 フェージン蛋白と ATP を加え、kinase 反応を行った。3X SDS Sample Buffer を添加して、kinase 反応を終息させ、

SDS-PAGE に展開し、その後、(リン酸化された) 蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜は、抗リン酸化 Elk-1 (Ser383) 抗体を一次抗体に使用して、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用してリン酸化 Elk-1 (Ser383) を検出した。フィルム上に得られたバンド (シグナル) の濃度をデンシトメトリーを用いて定量化した。MEK1 の阻害剤である PD98059 を培地に添加して、p44/42 MAP kinase の活性の変化も観察した。

g) 蛍光抗体法

カバーガラス上に培養した Mock、WC-3 細胞、MC-4 細胞を -20 $^{\circ}$ C メタノールで固定した。一次抗体として抗 V5 抗体および抗コネキシン 26 抗体を使用した。その後、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Dako)、ビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (SIGMA)、Cy3 標識ストレプトアビジン (SIGMA) を反応させて、その後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。

C. 研究結果

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 ゼオニン、2mg/ml ジェネテイ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。これらの安定トランスフォーマントから代表的なものを選び、解析を行った。野生型コネキシン 26 を発現する細胞株として WC-3、WC-6 と名付けた細胞株を選んだ。また、変異コネキシン 26 を発現する細胞として MC-4、MC-5 と名付けた細胞株を選んだ。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。野生型コネキシン 26 は、細胞質および細胞膜に発現していた。変異コネキシン 26 も、細胞質および細胞膜に発現していた。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。Mock、WC-3、WC-6 細胞に比較して MC-4、MC-5 細胞では、Stat1、Stat2、Stat3、Stat5、eNOS、eIF4E、mTOR が強くリン酸化されていた (図 1)。かつ、MC-4、MC-5 細胞では、Mock、WC-3、WC-6 細胞に比して Akt が強くリン酸化されていた。MC-4 細胞の Akt の活性は Mock の約 7 倍、WC-3 細胞の約 9 倍の活性があった。Mock、WC-3 細胞に比して MC-4 細胞では p44/42 MAP kinase が強くリン酸化されていた。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 (図 2、図 3)。

D. 考察

以前われわれは変異ロリクリン遺伝子を角化細胞角皮症のモデル細胞を作製することに成功した。このモデル細胞では2型 VEGF 受容体の活性化が観察された。Stat3 のリン酸化も観察され、Stat3 が VEGF 遺伝子のプロモーターの結合することも分かった。

今回同様の手法を用いて遺伝性掌蹠角化症の1種である古典型ポーウインケル症候群のモデル細胞を作製した。このモデル細胞ではコントロール細胞と比較して種々の 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。多くのサイトカインのシグナル伝達は Jak-Stat 経路を介して行われるので、これらのサイトカインの産生亢進には Stat のリン酸化が関与していると考えられた。

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 の阻害剤が古典型ポ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。

E. 結論

今回われわれはエクジソン誘導発現の系を用いて、古典型ポーウインケル症候群 (MIM 124500) モデル細胞を樹立することに成功した。こ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、この変化は古典型ポ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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Munehiro A, Murakami Y, Shirahige Y, Nakai K, Moriue T, Matsunaka H, Yoneda K and Kubota Y: Combination effects of cosmetic moisturisers in the topical treatment of acne vulgaris. **J Dermatol Treat** 23: 172-176, 2012
2. Kameda T, Dobashi H, Yoneda K, Susaki K, Kuno T, Murao K and Ishida T: A case of Degos disease successfully treated with corticosteroid combined with cyclophosphamide. **Rheumatol Int** 32: 2169-2173, 2012
3. Yoneda K, Nakai K, Moriue T, Ishikawa E, Demitsu T, Ohkusu K and Kubota Y:

Scedosporium apiospermum skin infection mimicking tuberous xanthoma. **J Dermatol** 39: 316-318, 2012

4. Yoneda K, Moriue J, Nakai K, Demitsu T, Moriue T, Yokoi I, Munehiro A, Dobashi H and Kubota Y: Numerous mucin nodules in a patient with seropositive wide spread discoid lupus erythematosus. **Ann Dermatol** 24: 112-114, 2012
5. Yoneda K, Presland RB, Demitsu T, Shimizu T and Kubota Y: The profilaggrin N-terminal domain is absent in pityriasis rotunda. **Br J Dermatol** 166: 227-229, 2012
6. Yoneda K, Demitsu T and Kubota Y: Juvenile xanthogranuloma with lichenoid appearance. **J Dermatol** 39: 462-465, 2012
7. Yoneda K, Nakagawa T, Lawrence OT, Huard J, Demitsu T, Kubota Y and Presland RB: Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with loricrin in human cultured keratinocytes and epidermis. **J Invest Dermatol** 132: 1206-1214, 2012
8. Kubota Y, Munehiro A, Shirahige Y, Nakai K, Katsuura J, Moriue T, Murakami Y, Matsunaka H and Yoneda K: Effect of sequential application of topical adapalene and clindamycin phosphate in the treatment of Japanese patients with acne vulgaris. **J Dermatol Treat** 23: 37-45, 2012
9. Wakatabi K, Kakurai M, Yamada T, Umemoto N, Demitsu T and Yoneda K: Inflammatory disseminated superficial prokeratosis with an unusual clinical feature of the pruritic, erythematous papules preceding annular brownish pigmentation. **J Dermatol** 39: 946-948, 2012

10. Demitsu T, Yamada T, Umemoto N, Narita T, Kakurai M and Yoneda K: Cutaneous Mycobacterium marinum infection mimicking felon in a patient with psoriatic arthritis treated with infliximab. **J Dermatol** 39: 970-971, 2012
 11. Ishikawa E, Yoneda K, Nakai K, Moriue J, Yokoi I, Munehiro A and Kubota Y: Primary cutaneous cryptococcosis in a patient with CREST syndrome. **Eur J Dermatol** 22: 421-422, 2012
 12. Munehiro A, Yoneda K, Koura A, Nakai K and Kubota Y: Macular lymphocytic arteritis in a patient with rheumatoid arthritis. **Eur J Dermatol** 22: 427-428, 2012
 13. Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Nakai K, Kosaka H and Kubota Y: Sphingosine 1-phosphate attenuates H₂O₂-induced apoptosis in HaCaT cells cultured in vitro. **Clin Exp Dermatol** in press
 14. Moriue T, Yoneda K, Moriue J, Nakai K, Yokoi I, Fujita N, Munehiro A, Maeda R and Kubota Y: Pinch and ligation method: a new non-surgical approach to viral warts. **J Dermatol** 39: 1108-1109, 2012
 15. Moriue J, Yoneda K, Nakai K, Hosokawa Y, Moriue T, and Kubota Y: A survey of the factors associated with concerns about oral antihistamine use in Japanese pruritic skin disease patients. **J Dermatol Treat** 2012 Jul 25. [Epub ahead of print]
 16. Yoneda K, Matsuoka-Shirahige Y, Demitsu T and Kubota Y: Pustular psoriasis precipitated by cytomegalovirus infection. **Br J Dermatol** 167: 1186-1189, 2012
 17. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriue T, Presland RB, Fallon PG, Kabashima K, Kosaka H and Kubota Y: Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies. **Am J Pathol** 181: 969-977, 2012
 18. Hosokawa Y, Yoneda K, Nakai K, Moriue J and Kubota Y: Complete thrombosed venous aneurysm in great saphenous vein. **Ann Dermatol** in press
 19. Moriue J, Yoneda K, Moriue T, Nakai K, Katsuki N, Haba R, Ikeda M and Kubota Y: Primary dermal melanoma latent for more than 10 years. **Ann Dermatol** in press
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

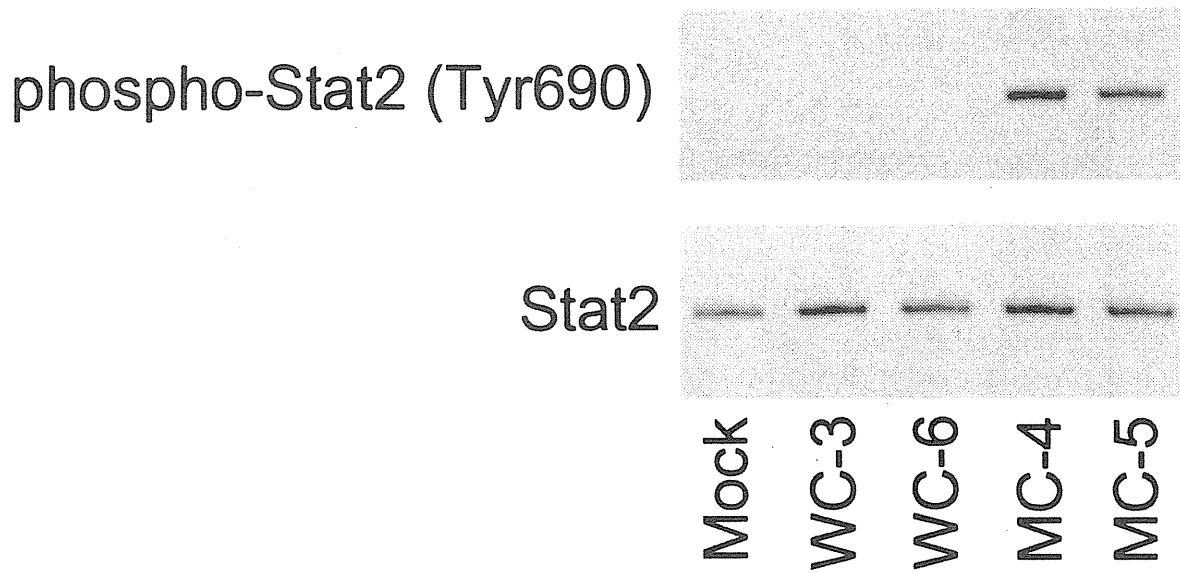


図2. MC-4、MC-5細胞におけるStat2のリン酸化

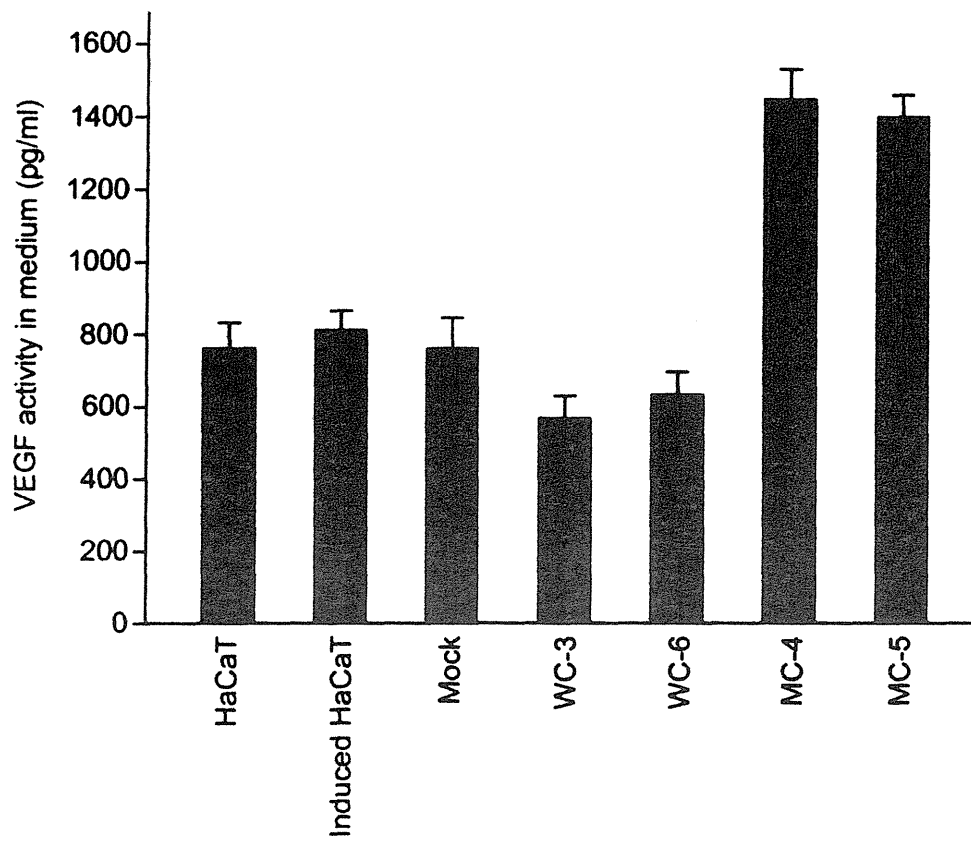


図 2. MC-4、MC-5 細胞における VEGF の産生亢進

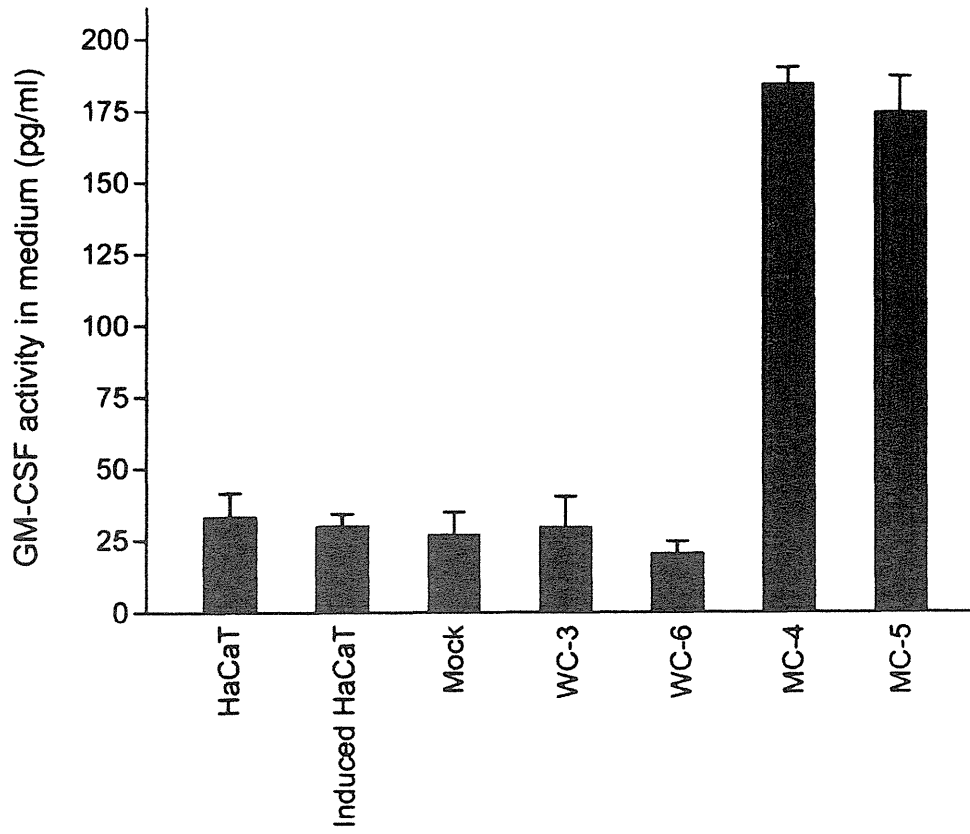


図 3. MC-4、MC-5 細胞における GM-CSF の産生亢進

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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：角化症（掌蹠角化症）

研究報告②：本邦における先天性爪甲肥厚症の実態解明

分担研究者：米田 耕造 香川大学医学部皮膚科 准教授
研究協力者：金澤 伸雄 和歌山県立医科大学皮膚科 講師
稲葉 豊 和歌山県立医科大学皮膚科 大学院生
中谷 友美 和歌山県立医科大学皮膚科 研究補助員
濱田 尚宏 久留米大学医学部皮膚科 講師
橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科 教授

研究要旨

本研究は、和歌山県立医科大学皮膚科で先天性爪甲肥厚症の母子例を経験したのを契機に、香川大学皮膚科が分担する掌蹠角化症の解明の一環として、先天性爪甲肥厚症を対象を絞り、和歌山県立医科大学皮膚科が中心となって本邦における同疾患の実態解明を目指すものである。本年度は、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を把握した。文献的には1985年以来これまでに21例が報告されているが、そのうち遺伝子解析がなされたものは自験例を含め9例にとどまった。興味深いことに、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、嚢腫様病変による診断、報告の容易さだけでなく、民族による違いが背景にある可能性も考えられた。全国疫学調査では未報告例を含め、PC-1型（Jadassohn-Rewandowski）8例、PC-2型8例、疑い例6例が見出され、やはりPC-2型が多く認められた。今後は全国調査で得られた患者について、臨床症状の詳細を調査し未検討の患者の遺伝子変異の検索を行ったうえで、国際研究登録（IPCR）に登録し、海外で進行しているラパマイシンやsiRNAを用いた治験への参加、あるいはその成果の導入に備える。

A. 研究目的

先天性爪甲肥厚症（厚硬爪甲症ともいう）（Pachyonychia congenita: PC）は、爪甲の肥厚と種々の外胚葉系の異常を認める常染色体優性遺伝疾患で、爪甲の硬化・肥厚、掌蹠の角化、口腔粘膜の白板症、多汗、四肢の角化性丘疹を伴うPC-1型（Jadassohn-Lewandowski: OMIM#167200）と、爪甲

の硬化・肥厚、出生齒、多汗を伴うが、白板症がなく、後に多発性毛包嚢腫を生じてくるPC-2型（Jackson-Lawler: OMIM#167210）に分けられる。本疾患は1904年に最初に報告され、1995年にMcLeanらによってケラチン（KRT）遺伝子の変異が同定されて以来、欧米を中心とした国際研究登録によってこれまでに400人を越える患者の遺伝子