

## B. 研究方法

ヒト M3 遺伝子を脳組織よりクローニングして発現ベクターを構築し、M3 が発現していないハムスター卵巣 (CHO) 細胞株へ導入して強制発現させた。M3 の発現解析として細胞内ドメイン認識抗体と細胞外ドメイン認識抗体の 2 種類の M3 特異的抗体を用いた蛍光抗体染色では M3 の発現部位である細胞膜が染まり、ウェスタンブロッティングでは M3 と思われる蛋白を特異的に認識した (図 1)。

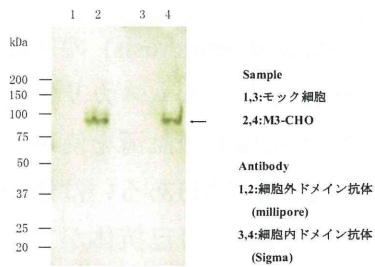


図 1 : M3 特異的抗体によるウェスタンブロット法

両解析とも発現ベクターのみを導入したモック細胞では陰性だった。さらに M3 の機能解析としてレセプター下流の MAPK/Erk カスケードを利用した ppErk 抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、ppErk は M3 のアゴニストであるアセチルコリンで活性化され、アンタゴニストであるアトロピンで活性が抑制された。モック細胞ではいずれも反応しなかった (図 2)。

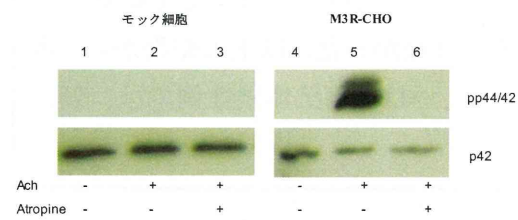


図 2 : MAPカスケードを利用したM3の機能解析

別の機能解析として細胞内カルシウムの変動を検討したところ、M3 陽性細胞はアセチルコリンで細胞内カルシウムが著増し、アトロピンで完全に抑制された。モック細胞では変化がなかった。

(図 3)

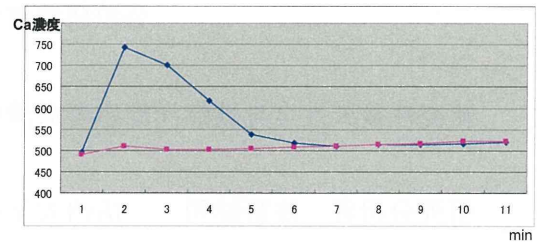


図 3:Ach刺激による細胞内カルシウムの変動

M3 の発現と機能性が確認された M3-CHO 細胞を用いて、AIGA 患者 16 名と健常人コントロール 12 名の血清を使用した蛍光抗体染色を行った。また、pp42/44 のリン酸化シグナルと細胞内カルシウムの変動に対する血清の抑制効果を検討した。

### \*倫理面への配慮

本研究は信州大学医学部倫理委員会 (承認番号 1857,平成 23 年 11 月 8 日) と信州大学医学部遺伝子組み換え実験等安全委員会 (承認番号 11-039,平成 23 年 11 月 25 日) の承認を得ている。

## C. 研究結果

蛍光抗体染色の結果、今回の実験では AIGA1 例のみに M3 結合抗体が検出され (図 4)、他の AIGA15 例は陰性であった。健常人コントロール 12 名の血清は陰性であった。

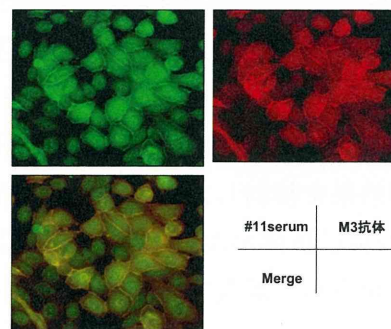


図 4:患者血清(#11)とM3抗体の二重染色

血清をプレインキュベーションした後に Ach 刺激した際のリン酸化 ERK(pp42/44)の量は AIGA 患者血清と健常人血清との差は有意ではなかった。また、同じく、血清をプレインキュベーションした後に Ach 刺激した際の細胞内 Ca 濃度の抑制効果は明らかではなかった。

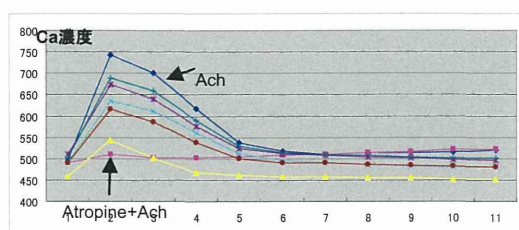


図5:ACh刺激による細胞内カルシウムの変動

#### D. 考察

AIGA の病態機序を基にした分類として発汗神経に障害を有する発汗神経障害 (sudomotor neuropathy)、発汗神経から汗腺への神経伝達に障害を有する特発性純粋発汗不全 (Idiopathic pure sudomotor failure: IPSF)、および汗腺自体の障害による特発性汗腺不全 (Sweat gland failure) の3型が提唱されている。しかしながら、病変部位が発汗神経であるのか、発汗神経と汗腺の接合部にあるのかを、臨床的に鑑別するのは難しい。一方、特発性汗腺不全に属する疾患は、形態学的に汗腺の破壊像を伴っているとされるが、IPSF による無汗症においても軽度の汗腺破壊像を伴う場合があり、組織像のみで判定するのは難しい場合がある。AIGA の多くは、IPSF に属するものと推察され、その原因が汗腺に分布する M3 の機能異常や細胞内情報伝達異常が有力視されている。

近年、ムスカリン受容体に対する自己抗体と疾患の報告が相次いでいる。ムスカリン型受容体の薬理的サブタイプは M1~M5 に分類され、M2 に対する自己抗体が拡張型心筋症で検出され、M1 に対する自己抗体が重症筋無力症で検出されている。また M3 に対する自己抗体はシェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変症などで報告されている。さらに、ノックアウトマウスとの比較より M3 の欠損症と考えられる人体症例がごく最近に報告がされ、この例では発汗異常を認めている。また、発汗異常を伴うコリン性蕁麻疹では、M3 の発現低下が報告されている。これらの報告から、M3 の機能異常と発汗低下には深い関連があり、M3 の機能異常の機序は自己免疫が関わっている可能性を示唆している。

今回、ヒトの M3 のクローニングと発現ベクタ

一の構築、さらに CHO 細胞への強制発現によって、機能的な M3 陽性細胞が得られた。この細胞を利用した細胞染色で、AIGA 患者 16 例の血清中 M3 自己抗体の有無を検討した。16 例ともに明らかな末梢神経障害はなく、形態学的に約半数に汗腺への炎症細胞浸潤を認めたが、汗腺の破壊像は認められないため AIGA の中で IPSF に属するものと思われた。今回の実験では、16 例中 1 例のみに、M3 結合抗体が検出された。この例 (症例 11) は 50 歳代と疾患群の中では高齢で、ステロイド反応性も悪かったが、同年代の症例 10 などとは臨床的な差異は気づかれていない。症例 11 で検出された抗体は M3 結合抗体と考えられるが、他の 15 例には検出されなかったため、この抗体が AIGA 発症の主要な原因とは言い難い。しかし、M3 自己抗体が結合抗体ではなく、アセチルコリンの M3 への結合を阻害するような類の抗体であれば、今回の実験系では証明できない可能性がある。このような阻害抗体は重症筋無力症や自律神経節炎でも報告されており、今回の実験で抗体が陰性であった症例でも、M3 自己抗体が病態に関与している可能性は否定できない。今後、AIGA についても細胞内シグナルなどを指標にしたさらなる阻害実験によってその有無を確かめる必要がある。

#### E. 結論

M3 を発現させた培養細胞の系を使用して、AIGA 患者の血清中に M3 に対する自己抗体が存在するかどうかを検討した結果、12 例中 1 例に M3 結合抗体を検出した。M3 自己抗体が病態に関与している AIGA 症例の存在が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 学会論文発表

特発性後天性全身性無汗症患者血清中の抗アセチルコリン受容体抗体検出の検討：伊藤友里花、修士論文、2011

## H. 知的財産権の出願・登録

なし。

## 東京医科歯科大学皮膚科における特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討

研究分担者 佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科 教授

研究協力者 宗次太吉 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 助教

研究協力者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 過去5年間に東京医科歯科大学皮膚科を受診し、AIGAと診断した患者計17名を対象とし、患者因子が治療効果に及ぼす影響を検討した。17名中12名にステロイドパルス療法を施行した。ステロイドパルス療法は12例中6例で有効であった。ステロイドパルスが有効であった群は、コリン性蕁麻疹を伴い、血清IgE値が高い傾向があった。また、パルス療法が有効であった6例中3例で再燃を認めた。今回の検討では、発症早期に治療した方が再燃しにくい傾向が認められた。よってAIGAは、自然軽快例も一定の割合で報告されているが、時期を逸せずステロイドパルス治療を施行する方がよいと考えた。

### A. 研究目的

特発性後天性全身性無汗症(acquired idiopathic generalized anhidrosis: 以下AIGA)は、基礎疾患を有する続発性無汗症や、分節性の無汗を示さない原因不明の全身性無汗症の一群である。本邦の大学病院神経内科と皮膚科に対して行われた疫学調査では、過去5年間のAIGA患者数は145名であり、比較的稀な疾患であると言える。しかし、患者は暑熱環境でうつ熱やコリン性蕁麻疹を生じ難治例も多いことから、職業上の制限やQOLに及ぼす影響は大きい。ステロイドはAIGAの治療の主体となるが、症例数が少なく患者因子による治療効果の検討はまだ十分なされていない。今回我々は、過去5年間に当科で経験したAIGA症例をまとめ、治療効果と再発に関連する患者因子を検討した。

### B. 研究方法

過去5年間に東京医科歯科大学皮膚科を受診し、AIGAと診断した患者を対象とし、患者背景と治療効果について、年齢性別、既往歴、無汗領域、コリン性蕁麻疹の有無、交感神経皮膚反応(sympathetic skin response: 以下SSR)、定量的軸索

反射性発汗試験(以下QSART)、血清IgE値、無汗部位の病理組織所見、治療内容、治療効果、再燃についてそれぞれの症例からデータを抽出した。データをもとに治療効果と再発に関連する患者因子を検討した。

(倫理面への配慮)

AIGAの診断および治療は通常の診療の範囲でなされており、倫理的な問題はない。また、データ抽出に当たっては、症例番号を割り付けて匿名化し、個人を特定する情報は収集していない。

### C. 研究結果

#### I. 定義、診断

AIGAは、明らかな原因なく後天性に全身の無汗ないし減汗を生じ、発汗以外の自律神経症候および神経学的症候を認めないものとした。可能な限りミノール法(当科では和田高垣法の変法で施行)により無汗領域を同定した。また全例で汗腺の組織所見を確認し、最近2年間の症例は発汗に関する交感神経検査を施行した。

#### II. 患者背景

①患者: 男性12名、女性5名の計17名、年齢は12-61歳で、平均33.7歳であった。

- ②既往歴：アレルギー疾患として、小児喘息が1例、アトピー性皮膚炎と気管支喘息が1例あった。また精神的疾患として、強迫性障害が1例、身体表現性障害を有するものが2例あった。
- ③治療前の無汗部位：体幹・四肢に広範に無汗を認める症例が多い。また顔面、腋窩、掌蹠などは発汗は保たれている症例が多かった。
- ④コリン性蕁麻疹の合併：17例中10例でコリン性蕁麻疹の合併を認めた。
- ⑤無汗部位の病理組織像：汗腺の形態異常を認めない症例が多く、他には汗腺周囲に軽度のリンパ球浸潤を伴う症例、分泌部の膨化変性を伴う症例、汗腺の表皮開口部に角栓形成を認めた症例があった。
- ⑥神経学的検査：SSRは正常が9例、無反応が2例、低下が1例であった。無反応であった2例はCVRR(心電図R-R間隔変動係数)、シェロングテスト、ヘッドアップティルト試験を施行し、いずれも正常であった。また、緊張性瞳孔を検査した症例は全例正常であった。
- ⑦QSART：2個の発汗計プローブを用いて軸索反射性発汗(AXR)と直接刺激性発汗(DIR)を並行して測定した。測定した症例はAXR、DIRとも低下もしくはほぼ無反応であった。

### III. 治療経過

AIGA17症例のうち、無治療は2名(うち1名は汗腺の高度萎縮を認めた症例)、経過不明が1例(他院で治療)、未治療が1例、内服治療が1例(塩酸ピロカルピンや塩酸セビメリン)あり、残り12例はステロイドパルス療法を施行した。1回のパルス療法で改善に乏しい症例は、2回目を施行し後療法としてプレドニン30mg/日を投与し、3ヵ月程度かけて漸減中止した。また治療効果の評価は、パルス療法の前後でミノール法の発汗領域が20%以上改善した症例と、治療後ミノール法を施行していない症例は、自覚的な発汗領域の改善を認めた症例を有効とした。再燃については、観察期間中にミノール法あるいは自覚的に発汗領域の減少を認めた症例を再燃ありとした。通院を中断した症例は、通院中の再燃の有無を評価した。

①治療内容：ステロイドパルス療法1回が5例、2回が5例、4回が1例、ハーフ1回が1例であった。

②治療効果：ステロイドパルス療法は12例中6例で有効であった。

③再燃：観察期間は6ヵ月～3年6ヵ月であった。パルス療法が有効であった6例中3例で再燃を認め、うち1例はパルス療法を計4回施行した。

### IV. 治療効果に関連する患者因子の検討

AIGAと診断しパルス療法を行った12症例を、有効6例、不変～悪化6例の2群にわけて比較検討した(表1)。ステロイドパルスが有効であった群は、コリン性蕁麻疹を伴い、血清IgE値が高い傾向があった。年齢、発症時年齢、治療までの期間、発汗領域については相関を認めなかった。

再燃について、パルス療法が有効であった6例を、再燃なし3例と、再燃あり3例の2群に分けて比較検討した。今回の集計では発症早期に治療した方が再燃しにくい傾向が認められた(治療開始までの平均期間＝再燃なし8ヵ月：再燃あり66ヵ月)。発症時年齢、血清IgE値、発汗領域については相関を認めなかった。

### D. 考察

過去に報告された100例程度のAIGAの報告のうち半数以上でステロイド治療に関する記載があり、そのほとんどで改善・治癒が得られている。症例を集積した報告によると、集計の方法に差はあるが、ステロイドの有効率を7-9割程度としている報告が多い。自験例ではステロイド有効率は5割であり、他の報告よりも有効率が低く、発汗領域の改善も少なかった。これは症例報告ではステロイドの有効例を報告することが多いのが一因かもしれない。

治療効果に関連する患者因子について詳細に検討した大嶋らの報告によると、13症例中12例にステロイドパルス療法、1例にステロイド内服療法を施行し、有効率は100%であった。よってステロイドの反応性を予測する因子の検討はなされていないが、再燃を認めた症例は、発症年齢が若

く、コリン性蕁麻疹の合併している症例、また発症から治療までの期間が長く、ステロイド治療に抵抗性である症例は無汗の再燃を繰り返しやすい可能性が示唆されている。自験例の解析では、ステロイドパルスが有効であった群は、コリン性蕁麻疹を伴い、血清 IgE 値が高い傾向が認められた。また治療後の再燃については、発症から治療開始までの期間が長い方が再燃しやすい傾向が認められ、この点は大嶋らの報告と一致していた。

自験例の病理組織を検討したところ、汗腺の形態とステロイドの効果に関連は認めなかった。過去に汗腺の変性を認めた症例でもステロイドの有効例があり、このようなことから我々は、無汗部の汗腺が高度に障害されている症例でも、乏汗部に残存する汗腺にステロイドが作用するのではないかと考え、汗腺が高度に障害された 2 例のうち 1 例にパルス療法を施みたが、無効であった。一般に汗腺に形態異常のないものはステロイドの反応は良いと考えらるが、自験例のように汗腺の形態が正常であってもステロイドが無効な症例もあり、必ずしも当てはまらない場合がある。それは、AIGA の汗腺の形態は、同一個体の中でも時間的なスペクトルあるいは部位により差異があり、単一ではないと予想されるため、組織所見とステロイドの治療効果は一定しないものと考えらえる。

AIGA は自然軽快例も一定の割合で報告されているが、今回の検討で、早期に治療した方が再燃しにくい傾向があったことから、時期を逸せずステロイド治療を施行する方がよいと考えている。また今後、ステロイド無効例の病態を解析し治療法を検討していく必要があると考える。

#### E. 結論

・AIGA に対しステロイドパルス療法は有効である。

・AIGA は、発症早期に治療した方が再燃しにくい傾向があったことから、時期を逸せずステロイド治療を施行することが望ましい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 東京医科歯科大学皮膚科で経験した特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討 (投稿中)

##### 2. 学会発表

- 1) 宗次太吉、藤本智子、井上梨紗子、高山かおる、佐藤貴浩、横関博雄：当科で経験した特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討. 第 63 回日本皮膚科学会中部支部総会, 大阪, 2012.10.14
- 2) 宗次太吉、藤本智子、井上梨紗子、高山かおる、佐藤貴浩、横関博雄：当科で経験した特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討. 第 20 回日本発汗学会総会, 奈良, 2012.8.25

#### 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

表 1 治療効果に関連する患者因子の検討 (\* mean±SD)

	有効 6例	不変～悪化 6例
男性比	83%	75%
年齢*	33.8±13.4	35.2±2.6
発症時年齢*	31.0±14.0	29.7±5.7
治療までの期間(月)*	37.0±53.2	70.7±77.8
コリン性蕁麻疹	66%	16%
IgE(IU/ml)*	634±1077	88±110
発汗領域(%)*	28.8±34.7	42±28.4
ステロイドパルス	2回 1例 1回 4例 ハーフ1回 1例	6回 1例 2回 4例 1回 1例
病理	異常なし 4例 角栓形成 1例 軽度リンパ球浸潤 1例	異常なし 1例 軽度萎縮 1例 角栓形成 1例 分泌部の膨化変性 1例 軽度リンパ球浸潤 2例

## 尋常性白斑病変における細胞浸潤パターンの検討および樹状細胞活性化機序の解明

研究分担者 種村 篤 大阪大学医学部皮膚科 助教

**研究要旨** 昨年度の研究報告として、我々は尋常性白斑皮膚に有意にTh17細胞が浸潤していることを見出し、Th17細胞に関連したサイトカインが色素細胞の機能を抑制的に制御することを報告した。今回、Th17細胞だけでなく表皮・真皮樹状細胞に注目しその浸潤パターンをヒト白斑皮膚を用いて検討した。さらに、樹状細胞の形態変化を共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。

### A. 研究目的

尋常性白斑は境界明瞭な脱色素斑を特徴とする後天性色素脱失症である。病因については自己免疫説をはじめ、様々な説が提唱されている。自己免疫が関与する尋常性白斑では主に細胞障害性T細胞による色素細胞の障害が唱えられ久しい。しかし最近の報告で、表皮細胞での色素細胞機能を制御するサイトカインの発現や末梢血中のIL-17/TGF-betaの上昇などが次々報告され、白斑がより包括的な自己免疫疾患の一つである可能性が示唆されている。そこで、我々は多種多様な免疫応答に関与する炎症細胞群の白斑局所における浸潤を観察し、白斑形成への関与を探る手がかりとしたい。

### B. 研究方法

2007 - 2012年に当科を受診した汎発型白斑患者16例の病理組織を用い、病変部における免疫担当細胞の浸潤を個別に把握するため、CD3, CD4, CD8, Foxp3, IL-17A, HLA-DR, AHR, CD1a, CD11c, CD56, CD123, CD207の免疫組織化学染色を行った。また、Th17細胞関連の代表疾患として知られる尋常性乾癬皮膚との比較も同時に行った。さらに、CD1a陽性ランゲルハンス細胞の分布パターン、白斑病変部・辺縁部・健常部における形態変化に関して共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を用い詳細に観察した。

### C. 研究結果

- 1) CD8陽性細胞は明らかに白斑部および境界部に多く浸潤し、基底層直下に分布していた。しかし、浸潤部位の基底膜障害はみとめなかった。
- 2) 2Th17細胞は健常部より病変部で有意に多く浸潤していた。
- 3) 3制御性T細胞数はいずれも差がみられなかった。
- 4) 表皮ランゲルハンス細胞が基底層直上に主に分布し、数は有意に境界部で多く、白斑部でも明らかに増加していた。
- 5) CD11c陽性樹状細胞は境界部に有意に多くみられた。
- 6) 白斑部でみられた表皮ランゲルハンス細胞の樹状突起数が増加し、かつ伸長していた。
- 7) 真皮樹状細胞数は病変部に有意に多く、主に真皮上層の血管周囲に浸潤していた。
- 8) NK細胞数に差はなかった。
- 9) 白斑では成熟色素細胞が完全に消失されるとされるが、病変部基底膜上にBirbeck顆粒およびプレメラノソームを持たない樹状細胞が局在していた。

これらの結果より、白斑皮膚に於いて細胞障害性T細胞に加え、Th17細胞およびランゲルハンス細胞が白斑部および境界部により多くみられた。さらに、これらのランゲルハンス細胞の活性化を



示唆する樹状突起の伸長がみられ、さらに真皮樹状細胞も増加していた。白斑部では成熟色素細胞に代わり、Birbeck顆粒およびプレメラノソームを持たない樹状細胞がみられた。

今後の研究として、これらの活性化を惹起するサイトカイン環境、特に表皮細胞からの因子を網羅的に検証することで、色素細胞特異的抗原に対する細胞性免疫とは異なる自己免疫性・自己応答性白斑の病態解明を行いたい。さらに、色素細胞に代わり病初期に出現する樹状細胞の正体を明らかにするため、局所免疫環境による色素細胞の変化に着目した研究を予定している。

#### D. 健康危険情報

特になし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, Katayama I. Possible link between STAT3 activation and Th17 cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. *J Dermatol Sci*, 67(3):207-209, 2012.
- 2) Tanemura A, Yajima T, Nakano M, Nishioka M, Itoi S, Kotobuki Y, Higashiyama M, Katayama I. Seven cases of vitiligo complicated by atopic dermatitis: suggestive new spectrum of autoimmune vitiligo. *Eur J Dermatol*, 22(2):279-280, 2012.
- 3) Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25(2):219-230, 2012
- 4) Itoi S, Tanemura A, Nishioka M, Sakimoto K, Imuro E, Katayama I. Evaluation of the clinical safety and efficacy of a newly developed 308-nm excimer lamp for vitiligo vulgaris. *J Dermatol*,

39(6):559-561, 2012.

- 5) Tanemura A, Takahashi A, Ueki Y, Murota H, Yamaguchi Y, Katayama I. Therapeutic comparison between sun irradiation vs. narrowband UVB phototherapy along with concomitant topical tacalcitol for vitiligo vulgaris. *JCDSA*, 2:88-91, 2012.
- 6) 種村 篤, 壽 順久, 片山一朗. 尋常性白斑の病態 update. *Aesthetic Dermatology*, 22:11-17, 2012.
- 7) 種村 篤, 高橋 彩, 上木裕理子, 山中隆嗣, 室田浩之, 片山一朗, 山口裕史. 尋常性白斑に対する活性型ビタミン D3 外用と紫外線照射併用療法の有効性についての検討. *皮膚の科学*, 10(6):485-493, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) Tanemura A, Itoi S, Kotobuki Y, Wataya-Kaneda M, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I: Morphological and Ultrastructural Assessment for Activation of Dendritic Cell in the Lesional Skin in Generalized Vitiligo Vulgaris: Link between Cellular Autoimmune Response and Melanocyte Disappearance. XVII Pan American Society of Pigment Cell Research, Salt Lake City, USA. 2012.9.19-22
- 2) 種村 篤, 糸井沙織, 壽 順久, 金田眞理, 鶴田大輔, 石井正光, 片山一朗. 尋常性白斑局所での樹状細胞を中心とした炎症細胞の免疫組織学および電子顕微鏡での詳細な観察—成熟メラノサイト消失機構の新しい提案—. 第 24 回日本色素細胞学会学術大会, 長浜, 2012.11.24-25

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

## 遺伝性対側性色素異常症患者に認めた*ADARI*非コード領域変異の機能解析

研究分担者 河野通浩 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚科学分野

研究要旨 遺伝性対側性色素異常症（dyschromatosis symmetrica hereditaria; DSH）の遺伝子診断を行うと、原因遺伝子*ADARI*のコード領域もしくはexon-intron境界部に変異が同定できない症例が存在する。今回は*ADARI*遺伝子の非コード領域に認めた1塩基置換についてルシフェラーゼアッセイを用いた変異機能解析を行い、この変異が生物学的に影響しているのか検討する。

### A. 研究目的

遺伝性対側性色素異常症（DSH）患者の中には、典型的な皮疹を持つにも関わらず、原因遺伝子である*ADARI*遺伝子のコード領域もしくはスプライス供与・受容部位に変異が認められない症例がある。これらのうち、5'非翻訳領域（UTR）の変異候補について、DSHの病因となりえるかを検討する。

### B. 研究方法

DSHの遺伝子診断を行った症例の*ADARI*遺伝子のコード領域もしくはスプライス供与・受容部位に変異が認められずに5'非翻訳領域（UTR）にて候補変異を認め症例のうち、翻訳開始点より60bp上流での塩基置換について検討した。患者ヒトゲノムDNAから*ADARI*遺伝子の5'UTR領域配列をPCRにて増幅し、それらの配列をpGL3 Luciferase Reporter VectorのSV40プロモータの下流に導入した。患者のゲノムDNAにはヘテロで変異があるため、野生型と変異型のインサートが導入されたプラスミドがいずれも得られる。シーケンスで配列を確認し、野生型と変異型が得られたら、それぞれを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、野生型と変異型での発現効率を比較する。

（倫理面への配慮）

DSH患者の遺伝子診断については、平成18年9月22

日に名古屋大学医学部より承認を受けている。本研究を進めるうえでも、承認を受けた研究計画に沿って行っている。

### C. 研究結果

マウスメラノサイトのNCC-melan5に導入した実験では、野生型に比べて変異型では若干の発現低下が認められた。しかし、この結果だけでは生物学的に有意であるかは言えない。

### D. 考察

ヒトメラノサイトで検討してみると、結果に基づいたアッセイ系の最適化を試みる必要がある。

### E. 結論

5'UTR領域の変異によるDSH発症については現在のところは証明できていない。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kono M et al. Novel *ADARI* mutations including single amino acid deletion in the deaminase domain underly dyschromatosis symmetrica hereditaria in Japanese families. Int J Dermatol (in press)

- 2) Kono M et al. Dyschromatosis symmetrica hereditaria by ADAR1 mutations and viral encephalitis: a hidden link? Int J Dermatol (in press)
  - 3) Kantaputra PN, Chinadet W, Ohazama A, Kono M. Dyschromatosis symmetrica hereditaria with long hair on the forearms, hypo/hyperpigmented hair, and dental anomalies: report of a novel ADAR1 mutation. Am J Med Genet A. 158A(9):2258-65, 2012.
  - 4) Kono M et al. Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type: A case report on the analysis of genotype of an OCA1MP patient. Br J Dermatol 166(4): 896-8, 2012.
  - 5) Kono M et al. Four novel *ADAR1* gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. J Dermatol 39: 819-821, 2012.
2. 学会発表
- 1) Kono M et al. Novel *ADAR1* mutations including single amino acid deletion in the deaminase domain underly dyschromatosis symmetrica hereditaria. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec 7-9, 2012. Naha

#### H. 知的所有権の取得状況

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

## 色素異常症に対する新規治療法の開発

研究分担者 川口雅一 山形大学医学部皮膚科 講師

**研究要旨** チロシナーゼはメラニン合成にとって最も重要な酵素の一つである。この酵素の発現や活性を調節することで、色素異常の治療につながる可能性がある。

我々は diacylglycerol (DAG) と phosphatidic acid (PA) の代謝に関与する diacylglycerol kinase (DGK) がメラニン合成に関与し、チロシナーゼの翻訳後修飾を制御することを明らかにした。本研究を進めることにより、メラニン合成機構を理解するための基盤となる知見が得られ、将来的に色素異常症の治療につながる事が期待される。

また、遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の遺伝子診断を行い、新規遺伝子変異を報告した。さらに培養ヒトメラノサイトにおける RNA 干渉の実験系を確立した。この系を用いてヒトメラノサイトで *ADARI* 遺伝子をノックダウンすることが可能であった。今後の病態解析に有用な手段となりうる。

### A. 研究目的

チロシナーゼはメラニン合成に関与する最も重要な酵素の一つである。この酵素の発現や活性を調節することで、色素異常の治療につながる可能性がある。これまでに、脂質性 2 次メッセンジャーの diacylglycerol (DAG) は培養メラノサイトのメラニン合成を促進し、UVB 照射により細胞内で増加することが知られている。DAG の標的分子の一つである protein kinase C (PKC) の中で、PKC $\beta$  はメラノサイトのチロシナーゼを活性化し、メラニン合成を促進させる。本研究では、DAG の代謝に関与する diacylglycerol kinase (DGK) に注目し、メラニン合成への関与を検討する。

また、遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の遺伝子診断を行い、病態解析のために培養ヒトメラノサイトにおける RNA 干渉の実験系を確立する。

### B. 研究方法

培養正常ヒトメラノサイトやメラノーマ細胞株を用いて DGK isoform の発現を RT-PCR や real-time RT-PCR で検討し、mRNA が発現している isoform については蛋白の発現を確認した。さらに DGK

阻害剤や RNA 干渉を用いた knockdown、あるいはアデノウイルスを用いて過剰発現させ、メラニン量、tyrosinase 活性、および発現を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究におけるヒト由来血液、あるいは唾液の提供者、その家族・血縁者、その他の関係者の人権及び利権の保護の取り扱いについて十分配慮する。本研究における遺伝子診断は山形大学医学部倫理委員会にすでに承認されている。プライバシー保護の確約およびサンプル採集後も本人の要請によりサンプルを破棄できることを文章で説明する。サンプルはコード化し、学会および学術論文発表においても個人を特定できないように配慮する。遺伝子組み換え実験については学内倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

メラノサイトやメラノーマにおける DGK isoform の発現を解析し、いくつかの isoform が発現していることを確認した。また DGK 阻害剤がメラニン量、チロシナーゼ活性、チロシナーゼ蛋白の発現を抑制することを明らかにした。DGK 阻害剤は

チロシナーゼ以外のメラニン合成関連タンパク (TRP-1、DCT、pmel17、MITF)の発現には影響を与えず、チロシナーゼと MITF の mRNA 発現にも影響を与えなかった。Glycosidase digestion を行ったところ、DGK 阻害剤は mature form のチロシナーゼのみ発現を抑制していた。また、DGK 阻害剤によるチロシナーゼタンパクの発現抑制は、プロテアーゼ阻害剤の添加により幾分回避された。またメラノーマの細胞株を用いて、DGK isoform を RNA 干渉により knockdown し、メラニン量に影響を与える DGK isoform を明らかにした。さらにこの DGK isoform をヒトメラノサイトに過剰発現させるとチロシナーゼの発現が増加することを明らかにした。以上のことから DGK はチロシナーゼの翻訳後修飾を調節し、melanogenesis に関する可能性が示された。

また、DSH の遺伝子診断を行い、11 の新規遺伝子変異を報告した。これまでの報告例では、多くの遺伝子変異は deaminase domain 内の変異あるいは、ノンセンスまたはフレームシフトにより deaminase domain が欠失する変異であるが、今回 dsRNA binding domain にミスセンス変異を認めた症例 (A561V)を報告した。さらに培養ヒトメラノサイトにおける RNA 干渉の実験系を確立した。この系を用いてヒトメラノサイトで *ADAR1* 遺伝子をノックダウンすることが可能であった。今後、この系を用いて、DSH の病態解析を行う予定である。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawaguchi M, Hayashi M, Murata I, Hozumi Y, Suzuki N, Ishii Y, Wataya-Kaneda M, Funasaka Y, Kawakami T, Fukai K, Ochiai T, Nishigori C, Mitsuhashi Y, Suzuki T. Eleven novel mutations of the *ADAR1* gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol Sci*. 2012, 66: 244-5.

- 2) Bilen N, Aktürk AŞ, Kawaguchi M, Salman S, Erçin C, Hozumi Y, Suzuki T. Dyschromatosis symmetrica hereditaria: a case report from Turkey, a new association and a novel gene mutation. *J Dermatol*. 2012, 39: 857-8.
  - 3) Shimanuki M, Takeda K, Kawaguchi M, Suzuki T, Shibahara S. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a marker for the proliferative potential of melanocyte-lineage cells in the human skin. *J Dermatol*. 2012, 39:699-704.
  - 4) Rice GI, Kasher PR, Forte GM, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, Dickerson JE, Bhaskar SS, Zampini M, Briggs TA, Jenkinson EM, Bacino CA, Battini R, Bertini E, Brogan PA, Brueton LA, Carpanelli M, De Laet C, de Lonlay P, Del Toro M, Desguerre I, Fazzi E, Garcia-Cazorla A, Heiberg A, Kawaguchi M, Kumar R, Lin JP, Lourenco CM, Male AM, Marques W Jr, Mignot C, Olivieri I, Orcesi S, Prabhakar P, Rasmussen M, Robinson RA, Rozenberg F, Schmidt JL, Steindl K, Tan TY, van der Merwe WG, Vanderver A, Vassallo G, Wakeling EL, Wassmer E, Whittaker E, Livingston JH, Lebon P, Suzuki T, McLaughlin PJ, Keegan LP, O'Connell MA, Lovell SC, Crow YJ. Mutations in *ADAR1* cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet*. 2012, 23; 44:1243-8.
  - 5) Kawaguchi M, Valencia JC, Namiki T, Suzuki T, Hearing VJ. Diacylglycerol kinase regulates tyrosinase expression and function in human melanocytes. *J Invest Dermatol*. 2012, 132: 2791-9.
2. 学会発表
- 1) 川口雅一, 鈴木民夫, Vincent J. Hearing: Diacylglycerol kinase はメラノサイトの tyrosinase 発現と機能を調節する. 第19回分子皮膚科フォーラム, 青森市, 2012.4.14
  - 2) 川口雅一, Julio C. Valencia, Takeshi Namiki, 鈴木民夫, Vincent J. Hearing: Diacylglycerol

kinase はメラノサイトの tyrosinase 発現と機能を調節する. 第 24 回日本色素細胞学会, 長浜市, 2012.11.24

- 3) Masakazu Kawaguchi, Julio C. Valencia, Takeshi Namiki, Tamio Suzuki, Vincent J. Hearing: Diacylglycerol kinase regulates tyrosinase expression and function in human melanocytes. 第 37 回日本研究皮膚科学会, 那覇市, 2012.12.7

F. 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

## ブラシュコ線に沿う色素異常症の病態解析に関する研究

研究分担者 大磯直毅 近畿大学医学部皮膚科 准教授

研究要旨 ブラシュコ線に沿う疾患は受精後の体細胞遺伝子変異もしくはエピジェネティックな変化によって生じる。原因となる遺伝子が不明な疾患や、致死遺伝子と推定される疾患、悪性腫瘍に伴って生じる疾患の病態を解明できた。

### A. 研究目的

ブラシュコ線に沿う疾患は受精後の体細胞遺伝子変異もしくはエピジェネティックな変化によって生じる。原因となる遺伝子が不明な疾患や、致死遺伝子と推定される疾患、悪性腫瘍に伴って生じる疾患の病態を解明する。

### B. 研究方法

それぞれの症例において、免疫染色などによる病理学的検討、ダーモスコープを用いた形態学的検討を実施した。

（倫理面への配慮）

近畿大学医学部で承認された臨床・組織写真を学術雑誌などで公表する同意書に記載を得た。

### C. 研究結果

家族性Blaschkitis様皮疹を呈した家系において、色素失調症の原因遺伝子*NEMO*がコードするIKK  $\gamma$  の病変部での発現低下と、病変部へ浸潤する炎症細胞の50%の発現低下を明らかにした。

Blaschkitisは*NEMO*遺伝子の機能低下で発症する可能性を示すことができた。

Linear atrophoderma of Moulin (LAM)の亜系症例を解析した。ブラシュコ線に沿って色素沈着と色素脱失、色素斑が多発した症例が色素異常症と角化異常症を併発していることを明らかとした。この疾患は致死遺伝子の体細胞遺伝子

変異で発症すると推定されており、病態の解析は恒常性維持機構解明につながる。

### D. 健康危険情報

特記事項なし

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Oiso N, Kimura M, Tanemura A, Tsuruta D, Ito T, Suzuki T, Katayama I, Kawada A. Blaschkitis-like eruptions with hypodontia and low I $\kappa$ B kinase gamma expression. *J Dermatol* 2012;**39**(11): 941-943.
- 2) Oiso N, Kimura M, Itoh T, Kawada A. Variant of linear atrophoderma of Moulin: Hyper- and hypopigmented linear atrophoderma with aberrant area cutanea and lentiginosis following the lines of Blaschko. *J Dermatol* 2012; **39**(12): 1097-1099.

#### 2. 学会発表

- 1) Oiso N, Kawada A. A variant of linear atrophoderma of Moulin: hyper-and hypopigmented linear atrophoderma with peculiar area cutanea and lentiginosis following Blaschko's lines. The 24th annual meeting of the Japanese Society of Pigment Cell Research. November 24-25, 2012. Nagahama, Shiga, Japan (*Pigment Cell Melanoma Res* **25**(6); 904-922)

F. 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



1. 尋常性白斑の治療に対する基礎と臨床からのアプローチ

2. 遺伝性対側性色素異常症の新しい治療法の確立

研究分担者 川上民裕 聖マリアンナ医科大学皮膚科 准教授

研究要旨

1. 尋常性白斑の治療に対する基礎と臨床からのアプローチ

基礎研究として、マウスとヒトの皮膚色素細胞（メラノサイト）と色素前駆細胞（メラノブラスト）を使用し、活性型ビタミンD3添加での変化を比較、検討する。とくに、チロシナーゼとエンドセリンレセプターなどの色素細胞関連物質を検討する。Alamar blue法では、マウスメラノブラストは、活性型ビタミンD3添加で、 $10^{-9}$ M以上の濃度で細胞増殖を阻害された。メラノサイトは、 $10^{-7}$ M以上で阻害された。

臨床研究として、難治性の尋常性白斑患者に最新の治療であるエキシマライト照射併用1mmミニグラフト術を試み、その効果を検証する。すでに2人の患者に施行、有効な結果である。

2. 遺伝性対側性色素異常症の新しい治療法の確立

両手背と両足背などに色素斑や色素脱出を認める皮膚症状が特徴的な遺伝性対側性色素異常症は、最近、原因遺伝子が2本鎖RNA特異的 adenosine deaminase 遺伝子(ADAR1)と同定され診断法が確立した。しかし、治療に関する有効なデータは、ほとんど報告されていない。そこで、エキシマランプ照射併用1mmミニグラフト術を用い、その治療の効果を検討する。48歳、男性は、ADAR1遺伝子異常が確認され、遺伝性対側性色素異常症と診断された。本治療を施行し、術後6か月で、植皮部周辺に色素の発現を確認している。

A. 研究目的

1. 尋常性白斑の治療に対する基礎と臨床からのアプローチ

尋常性白斑は、後天性のほぼ完全な脱色素斑で、治療に苦慮することが多い。最近、新たな外用薬として活性型ビタミンD3軟膏が使用されている。一定の評価は得ているが、その作用機序は不明である。残念ながら、軟膏療法は脱色素斑の完全な色素回復に至らないことが実は多く、患者のニーズに充分、応えてはいない。そこで、紫外線療法の最先端医療であるエキシマ照射と外科的療法の最先端医療である1mmミニグラフト術を組み合わせ治療法を施行し、その治療効果を検討していく。

1) 基礎研究

活性型ビタミンD3軟膏は、尋常性白斑への有効性が臨床で示されているが、その作用機序は不明な点が多い。活性型ビタミンD3には、細胞の増殖や分化、アポトーシスを調節する作用が知られている。しかし、皮膚色素細胞（メラノサイト）におけるメラニン色素産生との関係に関しては、ほとんど解明されていない。そこで、基礎的な研究を行い、そのメカニズムを検討していく。

2) 臨床研究

エキシマライト照射は、紫外線療法の最新改善版ともいえる。不要な短波長をカットしたターゲット型照射で、紫外線による発癌といった副作用に対応している。一方、外科的加療の最新改善版ともいえる1mmミニグラフト術は、1mmの皮膚を植皮するため、侵襲が少なく疼痛や出血もほとんどない。そこで、難治性の尋常性白斑患者に両者を組み合わせたエキシマライト照射併用ミニグラフト術を試み、その効果を検証する。

2. 遺伝性対側性色素異常症の新しい治療法の確立

遺伝性対側性色素異常症は常染色体優性遺伝の色素異常症で、両手背と両足背などの四肢遠位部に色素斑や色素脱出を左右対称性に認める皮膚症状が特徴的な疾患である。最近、原因遺伝子が、2本鎖RNA特異的 adenosine deaminase 遺伝子(ADAR1)と同定され診断法が確立した。しかし、治療に関する有効なデータは、ほとんど報告されていない。そこで、尋常性白斑に本研究で施行しているエキシマランプ照射を併用した1mmミニグラフト術を用い、その治療の効果を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 尋常性白斑の治療に対する基礎と臨床からのアプローチ

#### 1) 基礎研究

マウス神経冠初代培養系より確立したNCCmelb4M5細胞(未熟色素細胞株)、NCCmelb4細胞(色素前駆細胞株)、NCCmelan5細胞(成熟色素細胞株)を使用し、活性型ビタミンD3(1,25-Dihydroxyvitamin D3; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)を添加し、その変化を比較、検討する。ついで、放射線医学総合研究所 広部先生より譲渡されたヒト皮膚色素細胞(メラノサイト)と色素前駆細胞(メラノブラスト)を使用する。

色素細胞全体を総括する転写因子Mitfやチロシナーゼ、チロシナーゼ関連蛋白(Trp-1、Dct)、エンドセリン、エンドセリンレセプター、Kit、Kit ligand、DOPAなどの色素細胞関連物質や抗酸化物質(カタラーゼ、ユビキノール、ビタミンEなど)、さらにCD4+およびCD8+エフェクターT細胞の浸潤との関連等を検討する。

#### 2) 臨床研究

術前に、採皮する正常皮膚にエキシマライト照射。白斑部に1mmトレパンパンチで5mmおきに孔をあけ、正常皮膚を植皮。術後は、植皮した部位にエキシマライト照射を、1-2週間に1回照射を行う。白斑の評価は、日本皮膚科学会尋常性白斑診療ガイドラインで提案された6段階評価法(100%、90%、75%、50%、25%、10%)を用いる。

### 2. 遺伝性対側性色素異常症の新しい治療法の確立

まず、遺伝性対側性色素異常症を疑う患者の血液を材料としてADAR1遺伝子のシークエンス検査を行う。そして、診断を確定した後、採皮する正常皮膚にエキシマライト照射。白斑部に1mmトレパンパンチで5mmおきに孔をあけ、正常皮膚を植皮する。術後は、植皮した部位にエキシマライト照射を、1-2週間に1回照射を行う。また、植皮部の皮膚標本におけるさまざまな因子の発現を検討し、ミニグラフト術治療効果との関連を探る。

(倫理面への配慮)

臨床症例に関して、可能な限り匿名化し、個人情報情報を完全に保護した。

## C. 研究結果

### 1. 尋常性白斑の治療に対する基礎と臨床からのアプローチ

#### 1) 基礎研究

Alamar blue法にて、マウスメラノブラスト

(NCCmelb4M5細胞)は、活性型ビタミンD3 $10^{-9}$ M以上の濃度で細胞増殖を阻害された。やや分化の進んだマウスメラノブラスト(NCCmelb4細胞)は、 $10^{-8}$ M以上で阻害された。さらに、マウスメラノサイト(NCCmelan5細胞)は、 $10^{-7}$ M以上で阻害された。この条件を参考として、チロシナーゼ活性や発現を検討中である。

紫外線の照射により、角化細胞(ケラチノサイト)はエンドセリンを産生し、エンドセリンは皮膚表皮内の色素細胞を刺激し、色素細胞で産生されるメラニンの生成が増加する。われわれは、すでに活性型ビタミンD3が色素細胞(メラノサイト)のエンドセリンBレセプター発現を誘導することを証明している。表皮角化細胞は、紫外線等の刺激からエンドセリンを産生し、皮膚表皮内の色素細胞に刺激を与える。ここに、活性型ビタミンD3軟膏を塗布し、局所の色素細胞のエンドセリンBレセプター発現をより誘導させれば、エンドセリンの色素細胞へのレセプターを介した刺激が高まり、色素細胞で産生されるメラニン生成が増加し、皮膚に色素が産生されることが想定される。

#### 2) 臨床研究

既存のさまざまな治療に難治性であった尋常性白斑患者2人(31歳、男性の両下腿の脱色素斑; 24歳、男性の下顎の脱色素斑)に対して、エキシマライト照射併用1mmミニグラフト術を施行した。すでに術後、半年が経過し、色素斑の出現に成功している。今後は、症例数を増やしていく。

### 2. 遺伝性対側性色素異常症の新しい治療法の確立

遺伝性対側性色素異常症患者(48歳、男性、2歳6か月から両手背、両足背に脱色素斑と色素斑の混在)は遺伝子検査にてADAR1 geneにc.3203G>T, p.G1068Vの変異を認め、確定診断された。エキシマライト照射併用1mmミニグラフト術を右手背の上1/3で施行した。採皮は正常下腹部から。術後、6か月で、植皮部周辺に色素の発現を確認している。今後は、範囲をまず右手背2/3に広げ、施行予定である。

## D. 健康危険情報

該当なし

## E. 研究発表(平成24年度)

### 1. 論文発表

1) Kawakami T, Soma Y. Tyrosinase-related protein1 in mouse melanocytes at early embryonic stage.

Journal of Dermatological Science 2012; 67:  
194-196

- 2) 中川恵子、芳賀恒夫、布施恵理、川上民裕、相馬良直。14 トリソミーが見出された Linear and Whorled Nevoid Hypermelanosis の 1 例。皮膚科の臨床 2012; 54 巻 7 号 999-1002

2. 学会発表

- 1) 土井里沙子、芳賀恒夫、竹内そら、島田恵子、川上民裕、相馬良直、泉 裕乃。ダーモスコピーが術前評価に有用であった悪性黒色腫 in situ の 1 例。日本皮膚科学会雑誌 2012 ; 122 巻 1 号 132

F. 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

## アミノグリコシドによるナンセンス変異リードスルー効果による白皮症治療にむけての基礎実験

研究分担者 深井和吉 大阪市立大学医学部皮膚科 准教授

**研究要旨** 白皮症についての研究は病態解析のみで、治療にむけての取り組みはなされていない。今回、白皮症の治療にむけ基礎的な実験を行うこととした。白皮症の治療戦略としては、①酵素補充、②ケミカルシャペロン、③リードスルー治療の3つが考えられる。今回はリードスルー治療にむけて検討することとした。日本人OCA1のチロシナーゼ変異として一番頻度が高いものはP310incCの54%であり、次にR77Qで20%、その次がR278Xナンセンス変異であり9%となっている。このR278については幸いこのコドンのミスセンス変異の報告がなく、違うアミノ酸が置換されたとしても酵素としての機能は保たれる可能性が高い。リードスルー効果の高い薬剤としてすでに、アミノグリコシドは翻訳を止めないように働くことが知られている。今回、日本人OCA1にもっとも頻度が高いR278X変異について、アミノグリコシドによる治療が可能かどうかについての基礎実験を行うこととした。チロシナーゼのwild type tyrosinase cDNAとR278X変異導入 tyrosinase cDNAをレンチウイルスベクターでHepG3またはNIH 3T3細胞に感染させた。ベクターにヒグロマイシン耐性遺伝子を導入し、感染した細胞のみヒグロマイシンにてセレクションし、野生型およびR278Xチロシナーゼを定常的に発現する、HepG3とNIH 3T3細胞株を作成した。この細胞株にゲンタシン800 $\mu$ g/mlおよび200 $\mu$ g/mlの濃度にて24時間培養し、抗FLAG抗体によるウェスタンブロット解析を行った。いずれの細胞株においてもゲンタシン、G418ともに、R278Xのナンセンス変異リードスルー効果は認められなかった。今回の実験では、アミノグリコシドによるチロシナーゼ遺伝子R278Xナンセンス変異のリードスルー効果は認められなかった。今後他の薬剤について検討するとともに、リポーターアッセイのシステムを構築し、リードスルー効果を簡易に定量し、薬剤のスクリーニングを行える方向で検討していきたい。

### A.研究目的

これまでに、白皮症に対する治療にむけての実験ないし取り組みはなされてこなかった。白皮症の治療にむけての戦略としては、①酵素補充、②ケミカルシャペロン、③リードスルー治療の3つが考えられる。酵素補充治療は、血液脳関門により視力回復が見込めない。またケミカルシャペロンについては、適当な化学物質の候補の絞り込みが困難である。したがって、今回はリードスルー治療にむけて検討することとした。日本人OCA1のチロシナーゼ変異として一番頻度が高いものはP310incCの54%であり、次にR77Qで20%、その次がR278Xナンセンス変異であり9%となっている。このR278については幸いこのコドンのミスセンス変異の報告がなく、違うアミノ酸が置換されたとしても酵素としての機能は保たれる可能性が高い。リードスルー効果の高い薬剤としてすでに、アミノグリコシドは翻訳を止めないように働くことが知られている。今回、日本人OCA1にもっとも頻度が高いR278X変異について、アミノグリコシドによる治療が可能かどうかについての基礎実験を行うこととした。

### B.研究方法・結果

チロシナーゼのwild type tyrosinase cDNAとR278X変異導入 tyrosinase cDNAをレンチウイルスベクターで、melan-c細胞に定常的に一定に発現させすべく感染させたところ、melan-c細胞は残念ながら、レンチウイルスベクターの毒性によりすべて死亡してしまい、この実験系では使えないことがわかった。そこで、HepG3、NIH3T3、293T細胞にチロシナーゼ野生型cDNAを組み込んだウイルスを感染させ、L-DOPA添加させたところ、HepG3とNIH3T3細胞では、肉眼的に明らかにメラニンの合成が行われていた。一方293T細胞では、まったく黒くならなかった。したがって、HepG3またはNIH 3T3細胞を使用することとした。ベクターにヒグロマイシン耐性遺伝子を導入し、感染した細胞のみヒグロマイシンにてセレクションし、野生型およびR278Xチロシナーゼを定常的に発現する、HepG3とNIH 3T3細胞株を作成した。この細胞株にゲンタシン800 $\mu$ g/mlおよび200 $\mu$ g/mlの濃度にて24時間培養し、抗FLAG抗体によるウェスタンブロット解析を行った。いずれの細胞株においてもゲンタシン、G418ともに、R278Xのナンセンス変異リードスルー効果は認められなかった。