

注意点：

- ・プログラムは報告書に掲載致します。タイトル・抄録を10月31日（水）迄に鈴木民夫宛にお送り下さい。メールに添付文書の形でお送りください。
- ・当日ご持参頂くもの：研究報告書に載せる分担報告書と研究成果に関する刊行物の一覧・別冊またはpdf。（様式は後日お送りします。）

☆ ご不明な点などは鈴木民夫までお問い合わせください。

鈴木 民夫  
山形大学医学部皮膚科学講座  
〒990 - 9585 山形市飯田西 2-2-2  
電話：023-628-5361（医局）  
023-628-5359（教授室）  
FAX：023-628-5364  
E-mail: tamsuz@med.id.yamagata-u.ac.jp

特発性発汗異常症・色素異常症の病態解析と新規治療薬開発に向けた戦略的研究班

## 第2回班会議（色素異常班）

### 議事録

日 時：2012年11月23日（金曜日・勤労感謝の日）

13時30分～15時50分

会 場：長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部  
命北館1Fセミナー室5 （地図を添付してます。）

〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266 番地

出席研究班班員（敬称略）：

種村 篤

河野道浩

川口雅一

大磯直毅

川上民裕

深井和吉

金田真理

錦織千佳子

鈴木民夫

（欠席：片山一朗、山下英俊）

出席研究協力者：

阿部優子（山形大学）、岡村 賢（山形大学）

出席者は計11名

## 【議題】

### 1、 色素班世話人挨拶

→分科会（色素班）世話人の鈴木民夫が開会の挨拶をし、色素細胞学会の前日に同会場である長浜バイオ大学で開催することになったことを説明した。

### 2、 下記計画進行具合報告

#### 1) 全国的な遺伝性色素異常症の発症率、予後、治療・生活指導実態を把握 (アンケート調査)

→皮膚科、眼科にそれぞれ 631 施設に郵送し（合計 1,262 通）

皮膚科から 215 通、眼科から 182 通（合計 397 通）が集まり、現在集計中であると鈴木民夫が報告した。

#### 2) 疾患診断ガイドライン作成（背景、概念、分類、病態、診断基準）

→下記のように分担し年度内にできれば形にすることで合意された。

ただし、結節性硬化症については今後コンセンサス形成に少し時間がかかるため、途中経過のようなものを先ずは作製してもらう。

①眼皮膚白皮症（症候性型も含む）：鈴木民夫

②まだら症：大磯直毅

③ワーデンプルグ症候群：深井和吉

④遺伝性対側性色素異常症：川口雅一

⑤結節性硬化症：金田眞理

#### 3) 実践的な治療と生活指導ガイドラインの作成

#### 4) 疾患別遺伝子診断依頼リストの作成

→3 と 4 は一体として今年度内になんらかの形にしたい。

#### 5) 尋常性白斑のガイドラインの改定・英文化

→ 日本文ガイドライン改訂：今後担当を決めていく。

英文化：大磯先生によって既に英文化されており、投稿直前段階。投稿先は J Dermatol を考えている

### 3、 各個研究（各班員発表）

班員全員の個別研究発表（一人 7 分、発表 5 分、討論 2 分）

→ 抄録にある内容が報告され、活発な意見交換が行われた。

### 4、 その他

→特になし。

## 1. 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—

演者：種村 篤<sup>1</sup>、糸井沙織<sup>1</sup>、壽 順久<sup>1</sup>、金田眞理<sup>1</sup>、鶴田大輔<sup>2</sup>、石井正光<sup>2</sup>、片山一朗<sup>1</sup>

所属：<sup>1</sup>大阪大学皮膚科      <sup>2</sup>大阪市立大学皮膚科

これまで尋常性白斑における色素細胞の消失機序として、HLA 拘束性細胞障害性 T 細胞および抗メラノサイト抗体の存在が重要としているが、これらの関与だけでは全ての現象を説明することは出来ない。我々はメラノサイトに対する免疫機構活性化の一つとして、ランゲルハンス細胞の形態的・機能的変化に注目し、今回白斑局所におけるランゲルハンス細胞を含む様々な浸潤免疫担当細胞を、免疫組織化学染色および電子顕微鏡を用いて観察した。20 名の尋常性白斑病変皮膚を用い、CD1a, CD4, CD8, FoxP3, IL-17A, HLA-DR, CD68, CD163, E-cadherin の免疫染色を行った。さらに、ランゲルハンス細胞およびメラノサイトの消失の有無を電子顕微鏡で健常部と比較したところ、白斑部のランゲルハンス細胞内バーベック顆粒が核周囲に増加し、樹状突起が伸長しており、ランゲルハンス細胞の活性化が示唆された。さらに、基底層近傍に分布する傾向がみられ一部はメラノソームを消失したメラノサイト様細胞に近接するように存在した。免疫染色では、白斑部で CD8 陽性細胞が一部表皮内に浸潤すると同時に、CD4+IL-17A+ の Th17 細胞の浸潤もみられた。

ランゲルハンス細胞の活性化・分布の変化—細胞障害性 T 細胞・Th17 細胞の浸潤が相互に関連しながら特に汎発型尋常性白斑の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆し、新しい病因論を提唱したい。

## 2. 遺伝性対側性色素異常症患者に認めた ADAR1 遺伝子 5' UTR 上の 1 塩基置換の機能解析

名古屋大学皮膚科 河野通浩

遺伝性対側性色素異常症 (dyschromatosis symmetrica hereditaria; DSH) は四肢末端に色素斑と脱色素斑を混在する皮疹を呈する常染色体優性遺伝の疾患である。原因遺伝子は二重鎖 RNA のアデノシンをイノシンに変換する RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA1 (*ADAR1*) 遺伝子であることが明らかになっている。本疾患の確定診断のために遺伝子診断を行うと、*ADAR1* 遺伝子のコード領域もしくは exon-intron 境界部に遺伝子変異が同定できない症例が少なからず認められる。今回はそれらの症例のうち、*ADAR1* 遺伝子の 5' UTR 領域に 1 塩基置換を認めた症例について、ルシフェラーゼアッセイを用いた変異機能解析を行ったので報告する。

### 3. Diacylglycerol kinase 阻害剤は melanogenesis を抑制する

川口雅一 (山形大学皮膚科)

Diacylglycerol (DAG)や phosphatidic acid (PA)は脂質性セカンドメッセンジャーであり、様々な分子の活性を調節し細胞機能に関与する。DAGはメラノサイトのメラニン合成を促進し、紫外線照射により増加することが知られているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。我々は、DAGをPAに変換する酵素である diacylglycerol kinase (DGK) に焦点を当て、メラノサイトにおける機能解析を行っている。メラノサイトにおける DGK の発現および低濃度の DGK 阻害剤の melanogenesis への関与については第 24 回日本色素細胞学会で発表予定である。

今回、高濃度 DGK 阻害剤がメラニン量、tyrosinase 活性、メラニン合成関連タンパクの発現を抑制し、MITF の mRNA 発現も制御することを明らかにした。今後、この阻害剤がどのように melanogenesis を抑制するかを検討する予定である。

#### 4. 色素異常症の病態解明

大磯直毅：近畿大学医学部皮膚科学

##### 1. Erythema dyschromicum perstans (ashy dermatosis)の病態解析

Erythema dyschromicum perstans (EDP)は、体幹四肢に前駆症状なく紅暈に囲まれた大小灰白～灰青色斑が多発する疾患である。慢性に経過し組織学的に基底層液状変性と苔癬反応、組織学的色素失調をともなう。3症例について検討した。

小児 EDP 症例[1]：成人の EDP は Hispanic に生じやすく、慢性に経過して自然消退しにくい。小児の EDP は Caucasian に生じやすく、自然消退する傾向にある。小児 EDP 症例の電子顕微鏡所見でメラノサイトおよび表皮角化細胞内に未熟、小型、形態異常をともなうメラノソームの存在を同定した。

Annular lichenoid dermatitis of youth (ALDY)様病変部と EDP が併存する症例[2]：ALDY 様病変部は組織学的色素失調がないのに対して、EDP 病変部では組織学的色素失調を認めた。他の組織学的特徴はほぼ合致していた。両者はオーバーラップする類縁疾患の可能性はある。

ブラシュコ線に沿う病変部を呈した EDP 症例[3]：過去にも同様の所見を呈した症例があり、遺伝的素因が発症に関与する可能性がある。

##### 2. Blaschkitis 様病変部と IκB kinase gamma 発現低下との相関[4]

Blaschkolinear dermatoses は blaschkitis と線状苔癬を包括化する疾患概念である。Blaschkitis は片側性もしくは両側性にブラシュコ線に沿って紅斑性丘疹や小水疱が一過性もしくは再帰性に生じる疾患である。家族歴と歯牙欠損のある 10 歳女児症例において、病変部組織を I·B kinase gamma (IKK- $\cdot$ ) で染色した。病変部表皮と真皮への浸潤細胞のおよそ半数に著明な発現低下を認めた。

##### 3. Linear atrophoderma of Moulin 亜型：表皮構造異常とメラニン分布異常[5]

Linear atrophoderma of Moulin (LAM)はブラシュコ線に沿った無症候性でしばしば色素沈着をともなった萎縮性病変である。自験例はダーモスコピーで皮野の構造異常、組織学的に不規則な棘突起延長と不均一なメラニン顆粒の分布を認めた。表皮の構築をつかさどる遺伝子の後天的異常により LAM が発症しうる可能性を示唆した。

#### 文献

1. Oiso N, Tsuruta D, Imanishi H, Kobayashi H, Kawada A. Erythema dyschromicum perstans in a Japanese child. *Pediatr Dermatol* 2012; 29: 637-640.
2. Oiso N, Kawada A. Erythema dyschromicum perstans showing an ash-colored hyperpigmented lesion and an adjacent incompletely hypopigmented lesion surrounded by an erythematous border: a boundary spectrum to annular lichenoid dermatitis of youth? *Eur J Dermatol* in press.
3. Oiso N, Kawada A. Erythema dyschromicum perstans with both a macular lesion and a linear lesion following the line of Blaschko. *J Dermatol* in press.
4. Oiso N, Kimura M, Tanemura A, Tsuruta D, Itou T, Suzuki T, Katayama I, Kawada A.

Blaschkitis-like eruptions with hypodontia and low I $\kappa$ B kinase gamma expression. *J Dermatol* in press.

5. Oiso N, Kimura M, Itoh T, Kawada A. 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* in press.

## 5. 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

聖マリアンナ医科大学皮膚科 川上 民裕

### 1. 基礎研究

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活性型ビタミンD3との関係

#### 背景

活性型ビタミンD3は、細胞の増殖や分化、アポトーシスに関する複数の遺伝子を調節する作用がある。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。

#### 目的

メラノサイトとメラノブラストに、活性型ビタミンD3（1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; 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。

#### 方法

ヒトメラノサイトとヒトメラノブラスト、マウスメラノサイトとマウスメラノブラストを使用し、活性型ビタミンD3を添加・培養、チロシナーゼ活性や発現を検討する。

#### 結果

Alamar blue法にて、マウスメラノブラスト（melb4M5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した。やや分化の進んだマウスメラノブラスト（melb4細胞）は、 $10^{-8}$ M以上で阻害した。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。

### 2. 臨床研究

尋常性白斑の新規治療、エキシマライト照射併用ミニグラフト術の成績

#### 背景

エキシマライト照射は、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。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。

#### 目的

尋常性白斑患者にエキシマライト照射併用ミニグラフト術を試みる。

#### 方法

術前に、採取する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%）を使用。

#### 結果

尋常性白斑患者3人に施行し、色素斑を出現させることに成功している。遺伝性対側性色素異常症患者1人にも、エキシマライト照射併用ミニグラフト術を施行し、色素斑を出現させることに成功している。



## 6. 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

深井和吉（大阪市立大学皮膚科）

（背景）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。

（方法と結果）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NIH3T3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NIH3T3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。

（考察）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。

## 7. 結節性硬化症の白斑の特徴

<sup>1</sup>金田眞理、<sup>1</sup>田中まり、<sup>2</sup>鶴田大輔、<sup>1</sup>種村篤、<sup>1</sup>壽順久、片山一朗

<sup>1</sup>大阪大学大学院医学研究科皮膚科学      <sup>2</sup>大阪市立大学医学部皮膚科

結節性硬化症の皮膚症状の一つとして白斑はよく知られた症状で、診断基準の大症状の1つでもある。しかしながら、その機序については未だに不明な点が多い。そこで我々は、本白斑の機序について検討を行うことを目的とした。

我々は前回までに、結節性硬化症の患者由来白斑部を電顕、光顕を用いて組織学的に検討し、TSCの白斑部ではメラノサイトは正常に認められるが、メラノサイト内のメラノソームの産生に異常があり、しかも同一病変内にメラノソームの産生が全くないものから正常に近いものまで種々の程度のメラノソームの形成異常を呈するメラノサイトが混在することを報告した。今回は9例の結節性硬化症の患者由来白斑について同様の組織学的変化が認められるかを検討した。その結果、前回の現症はいずれの患者に於いても認められた。

さらに本白斑の組織をTCD8、CD16、など数種のサイトカインに対する抗体で染め、本小白斑の病態について考察を試みた。

## 8. *HPS1* 遺伝子に新規突然変異が同定された Hermansky-Pudlak 症候群の1例

竹内聖二<sup>1</sup>、阿部優子<sup>2</sup>、河野誠司<sup>3</sup>、穂積豊<sup>2</sup>、鈴木民夫<sup>2</sup>、錦織千佳子<sup>1</sup>

1) 神戸大学大学院医学研究科皮膚科学      2) 山形大学医学部皮膚科学

3) 神戸大学大学院臨床検査学分野

Hermansky-Pudlak 症候群は先天性眼皮膚白皮症と血小板機能低下に基づく出血傾向を臨床的特徴とした常染色体劣性遺伝疾患である。これまで、ヒトでは9つの遺伝子がこの症候群の原因遺伝子として同定されており、その遺伝子産物は細胞内小器官の形成やその機能に関わる因子であることが明らかになっている。今回、我々は、*HPS1* 遺伝子に新規突然変異が認められた Hermansky-Pudlak 症候群の1例を報告する。症例は2歳女性。生来、皮膚、毛髪の色素脱出を認め、先天性の眼皮膚白皮症と診断されていた。家族歴にて眼皮膚白皮症や出血傾向を示す人はいない。初診時の問診では、これまで、打撲後の皮下出血等の明らかな出血傾向を示す症状やエピソードは気づかれていなかった。出血時間も4分と正常であった。遺伝子診断の過程で非症候性眼白皮症は否定的であったため、再度皮膚を観察したところ、下腿に淡褐青色斑を認めた。そこで、血小板凝集能の精査を行なったところ、1次凝集には正常であったが、storage-pool に異常をもつ疾患に特徴的な2次凝集能の低下を認めた。山形大学で行なわれた遺伝子解析の結果、*HPS1* 遺伝子について一方のアリルの遺伝子変異は322番目のコドンにあたる部位にシトシンが挿入されたフレームシフト変異であり、もう1つは596番目のコドンをグリシンからバリンに変える、ミスセンス変異を認めた。後者は今までに報告のない新規遺伝子変異であった。

## 9. 眼白子症 (Ocular albinism) について

山下英俊 (山形大学医学部眼科 ) \*鈴木民夫が代読

眼白皮症について、一般的な情報提供と生活指導についての注意点が報告された。

## 10. 健常人の皮膚色決定因子の解明と色素異常症の病態解析

鈴木民夫、阿部優子、岡村 賢、川口雅一 (山形大学医学部皮膚科学講座)

### 1. 遺伝性対側性色素異常症 (DSH) :

最近の報告により、DSHの原因遺伝子であるADAR1はインターフェロン1型 (IFN) のシグナル伝達を抑制し、IFNシグナルが過剰に細胞内に入ることによる組織にとって有害な反応を抑制する機能があることが知られている。また、色素斑と脱色素斑が混在するDSHの特徴的な臨床症状形成には、遺伝子変異は必要条件ではあるが、その他の因子も関係していることが予想されてきた。また、DSH患者においては末梢血中のIFN関連遺伝子の発現が健常人に比べ優位に上昇していることが明らかになった。

そこで、その他の因子はウイルスではないかとの仮説を立て、それを実証するために培養メラノーマ細胞 (MNT-1, MM96等) を使ってstable knockdown cellsの確立し、モデル細胞を樹立した。そして、そのモデル細胞における各種ウイルス感受性を調べたところ、ある種のウイルスがADAR1をknockdownした細胞で感受性が増加して、容易に死亡することが明らかになった。

### 2. 蒙古斑関連遺伝子の同定と機能解析

同一家系内に蒙古斑がある子供とない子供がいると言われるモンゴル西部に位置するタリアラン村に住むKhotonと呼ばれる民族を訪ね、目的の家系を1家系見つけ、遺伝子を採集してきた。

今後、解析を行い、蒙古斑形成遺伝子を明らかにする。

### 3. 健常日本人の皮膚色決定遺伝子の検索 :

これまでに456名の日本人女性 (23-65歳、 $33.9 \pm 10.7$ ) におけるメラニン合成関連遺伝子 (*TYR*, *OCA2*, *SLC45A2*, *MC1R*) のバリエーションと皮膚色 (メラニン・インデックス) の相関関係を調べたところ、*OCA2*の2つのバリエーション、*OCA2* A481T ( $p = 6.18 \times 10^{-8}$ ) と*OCA2* H615R ( $p = 5.72 \times 10^{-6}$ ) に強い関連性が認められ、T387M in *OCA2*, D125Y in *TYR*, およびT500P in *SLC45A2*においても関連性が認められた。そして、それら5つのバリエーションにより日本人女性の皮膚色約11%が説明できるという結果を得た。

これらの結果を踏まえ、新たに山形大学医学部G-COEに参加して新しい集団 (1,000人予定) における皮膚色の違いに関連した遺伝子をさらに明らかにするために GWASを利用して検索する。現在、1073人の皮膚色計測を終了し、今後解析に入る予定である。



