

201324076A

厚生労働科学研究費補助金  
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 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 橋本 隆

平成 26（2014）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
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 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 橋本 隆

平成 26（2014）年 3 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	
研究報告①：BP180 C 末端部 ELISA 法の開発と有用性の検討	12
②：ジューリング疱疹状皮膚炎の遺伝子解析研究	27
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	38
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）	51
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	
5. 研究項目：早老症（コケイン症候群）	57
研究報告：コケイン症候群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	
6. 研究項目：角化症（掌蹠角化症）	
研究報告①：	
ロリクリン変異が原因となり生じる掌蹠角化症の病態について	61
研究報告②：	
本邦における先天性爪甲肥厚症の実態解明	69
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	
7. 研究項目：弾性線維性仮性黄色腫	72
研究分担者名：宇谷厚志 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	80
IV. 研究成果の刊行物・別刷	100
V. 平成 25 年度総会プログラム	243
平成 25 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)
	宇谷 厚志	長崎大学大学 皮膚病態学	教授	弾性線維性仮性 黄色腫

[ I ]  
総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成 25 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 6 課題について水疱性類天疱瘡・ジューリング疱疹状皮膚炎、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、弾力線維性仮性黄色腫の 6 疾患群に焦点を絞り、H25 年度の研究を進めた。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した。

本研究で扱った主要な 6 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。

2 年目の H25 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 類天疱瘡疾患についての自己抗原・抗体を同定・検出し、診断法の確立と類天疱瘡の分類を作成する研究の一環として、BP180C 末端部 ELISA 法の開発と有用性の検討を行った。BP180C 末端部-ELISA 法は MMP の診断および病勢の客観的指標として用いることができることを示唆した。ジューリング疱疹状皮膚炎については、病変部皮膚で IgA と eTG が真皮乳頭で colocalize していた。t TG と IgA の colocalization は認められなかった。

2) ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 ヘイリーヘイリー病の培養表皮細胞においていくつかのカルシウム結合蛋白質の遺伝子発現と角化関連遺伝子の発現がコントロールより増強していたことを示した。

ダリエ病 10 例においても、ATP2A2 遺伝子に 9 個の変異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）

発熱・皮疹など炎症症状が持続する成人例に対して 3 週間おきにトシリズマブを半年間投与する臨床研究を行い、筋痛などの自覚症状の軽快を認め継続投与している。さらに、難治性疣贅を主症状とする原発性免疫不全症例のエキソーム解析にて *LIG4* 新規変異を見出したのを契機に、NNS が疑われながら *PSMB8* など既知の関連遺伝子に変異のない 2 症例についてもエキソーム解析を進めている。

4) 早老症（コケイン症候群）

CS モデルマウス（XPG-null）を使用して MBP、CC1、Olig2 の発現を組織学的に検討したところ、大脳皮質でのみオリゴデンドロサイトの分化、ミエリン形成が障害されていた。オリゴデンドロサイトの脳への遊走能には異常はみられなかった。

5) 角化症（掌蹠角化症）

CBO-P11 あるいは JE-11 を PD153035 と組み合わせることによりロリクリンが原因となっている掌蹠角化症のモデル細胞である VL-5 細胞の増殖が顕著に抑制されることを見つけた。

6) 弾性線維性仮性黄色腫

実態調査を継続して行い、現時点で約 170 例の PXE 患者の詳しい臨床データを収集し、皮膚障害、視力障害、虚血性疾患などの情報を収集し、重症度、他臓器障害有病率等を検討した。

## 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

宇谷厚志：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授

### A. 研究目的

本研究では皮膚・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、4課題5疾患（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）に焦点をしぼり、H24、25年度の2年間、研究を進める。また、H25年度より1疾患（弾力線維性仮性黄色腫）を加えた6疾患について研究を進める。この6疾患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、患者数の増加とともに研究の推進が必要である。また検討する5名の班員は、いずれも各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、それぞれの疾患の研究内容・研究目標・特徴・独創性、国内外の他の研究との関連性などを詳細に述べる。

[1]水疱性類天疱瘡とその類縁疾患（久留米大学医学部皮膚科学教室 橋本隆担当）

橋本隆の施設では、類天疱瘡の多くの新しい抗原を同定し（Dainichi, Hashimoto et al: PNAS 2009）、その診断法と新しい分類を提唱している。類天疱瘡の病態と診断法の確立と、有効かつ副作用の少ない治療法の開発を目指す。ジューリング疱疹状皮膚炎の発症に関与する新たな疾患感受性遺伝子や連鎖するHLAアレルを同定することを

目的とする。

[2]ヘイリーヘイリー病・ダリエ病（久留米大学医学部皮膚科学教室 橋本隆担当）

橋本隆の施設で多くの本疾患の遺伝子診断がなされている（Hamada, Hashimoto et al. J Dermatol Sci 2008）。今回は本疾患の病因解明と新しい治療の開発を目的とする。

[3]自己炎症性症候群（和歌山県立医科大学皮膚科 金澤伸雄担当） 遺伝性自己炎症性疾患の一つである中條-西村症候群はその原因遺伝子が同定され、病因の解析が進んでいる（Arima, Kanazawa et al: PNAS 2011）。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学教室 森脇真一担当） 希少疾患であるが老化に深く関わりと推測されるコケイン症候群（CS）関連因子を分子遺伝学的に詳細に検討し、CSの病態解明、ひいては内因性老化の機序を探索する。本邦で唯一CSの診断センターを維持し、ほとんどの検体を保持している。厳重に保管している細胞、評価システムを使用するため、本研究分担者の施設でのみ検討可能な課題である。

[5]角化症（掌蹠角化症）（香川大学医学部皮膚科学教室 米田耕造担当） 研究の目的は掌蹠角化症の治療を念頭に置いている。現在、有効な治療方法がない掌蹠角化症の治療薬を探索する上で細胞モデルを作製する。

[6]弾力線維性仮性黄色腫（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 宇谷厚志



担当) 実態調査の統計学的検索を集中して行い、その予後、重症度を統計的に解析する。特に、視力障害・虚血性疾患の進展の増悪因子の抽出、また心臓・脳血管障害とその他の皮膚、眼科症状の相関を解析する。*ABCC6* 異常と弾性線維変性石灰化の機序解明を目指す。

## 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、異なった領域をカバーしているため、研究代表者が5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、それぞれ異なった研究協力者体制で進める。自己炎症性疾患、早老症、角化症、弾性線維性仮性黄色腫に関しては、それぞれ和歌山県立医科大学、大阪医科大学、香川大学、長崎大学で、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回の班会議で総会を行い、その検討をもとに最終的な目的を達成する。

2年間の研究期間のうち、初年度は、診断基準(案)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い、2年目は、それぞれの疾患の新しい診断法として、遺伝子診断法・ELISA法・サイトカイン測定法などを完成しその病態を解明する。その結果から、新しい治療法を開発する。

[1]水疱性類天疱瘡とその類縁疾患 類天疱瘡には多くの異なった疾患が含まれ、久留米大学皮膚科には、稀な疾患の血清が多数保存

されている。初年度は、それぞれの疾患について、その自己抗原・抗体を同定・検出し、診断法の確立と類天疱瘡の分類を新しく作成し、ジューリング疱疹状皮膚炎の発症に關与するHLAアレルを同定することを目的とする。2年目は疾患モデルを用いた研究により、それぞれの疾患の病態を解明することを目的とする。現在、類天疱瘡には多彩な抗原・病因・治療法があり、疾患モデルを用いて、その治療効果を確認すると共に、各種の類天疱瘡群に有効かつ副作用の少ない治療法を開発する。

[2]ヘイリー・ヘイリー病・ダリエ病 既に久留米大学皮膚科では、完全な遺伝子診断のシステムを確立しているため、まず、全国の患者検体を渉猟し、それぞれの症例の遺伝子変異を検出する。同時に、今まで行なってきた病因解明研究を、マイクロアレイ法、RNAi法などの最新の手技を用いてさらに大規模に進める。また、多くの薬剤について、read-through機序による新しい治療法の可能性を検討する。

[3]自己炎症性症候群 遺伝性自己炎症性疾患、特に中條-西村症候群の多くの症例は和歌山県立医科大学にて渉猟されており、研究資料・研究フィールドとして適している。本研究では、初年度に遺伝性自己炎症性疾患が疑われる患者検体を臨床情報とともに全国から集め、各種遺伝子変異の検索を行う。可能であれば変異に伴う細胞機能解析を行ない、異常な炎症経路を検索する。変異がなければ、原因遺伝子の単離も試みる。免疫系希少難治性疾患群に関する調査研究とも緊密な連携を諮る。

[4]早老症(コケイン症候群 CS) 研究分担者が日本で唯一保持している希少、貴重な多くのCS検体(現在22系統の患者皮膚由来培

養線維芽細胞)を使用する。分子遺伝学的手法を駆使して全症例の遺伝型を詳細に解析し、各症例の臨床情報(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内因性老化の一因の解明に迫る。同時に研究分担者が確立した鋭敏なアッセイ系「酸化的DNA損傷の修復定量システム」、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in vitroで評価する。

[5]角化症(掌蹠角化症) 掌蹠角化症の患者に認められる遺伝子変異をもつDNAを誘導性ベクターにサブクローニングする。エクジソン誘導発現の系を用いて細胞モデルを樹立し、症候群の病態の研究を行う。

[6]弾性線維性仮性黄色腫 ABCC6 遺伝子変異の検索と弾性線維性仮性黄色腫の臨床像・自然経過、予後、病因、治療の反応性の解析を行う。皮膚、眼、心血管障害の有病率等の相関を検討し、弾性線維変性の機序解明が期待される。

#### (倫理面への配慮)

#### 久留米大学

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、ヒト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識者によって構成されている。研究プロトコル、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、予測される結果、被験者が被るおそれのある不利益、個人情報保護の方法、試料の保存および使用方法、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ント)を受けてから、試料などの提供を受ける。また、試験開始後も、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論理的・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およ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たしている。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ーナ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。

動物実験に関しては、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）、動物実験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、久留米大学動物実験施設による動物実験計画書の認可制度の承認を受け、動物数を最小限に実施するなどの考慮を行っている。

#### 和歌山県立医科大学

「遺伝子変異を原因とする自己炎症疾患が疑われる患者家系における候補遺伝子変異の検索」和歌山県立医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会 47 番承認

「家族性日本熱（中條-西村症候群）特異的 iPS

細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」和歌山県立医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会 84 番承認

「家族性日本熱（中條-西村症候群）患者における遺伝子変異と臨床症状に関連する細胞機能異常の探索」和歌山県立医科大学倫理委員会 675 番承認

「中條-西村症候群に対するトシリズマブの有用性に関する前向きコホート研究」和歌山県立医科大学倫理委員会 959 番承認

「国際先天性爪甲肥厚症研究登録（IPCR）への参加と遺伝子診断」和歌山県立医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会 101 番承認

#### 大阪医科大学

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。

香川大学 本研究全般を通じて、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省公示第415号）を遵守する。また、ヘルシンキ宣言（2000年改訂）の趣旨を尊重し、医の倫理に十分配慮して行う。疫学調査において、倫理委員会の承認を得た上で、十分な倫理的配慮を図り、かつ提供者の利益を損なわないよう、提供者本人の自由意志による同意の上で行う。さらに倫理委員会で規定された説明を行い、倫理委員会で決められた同意書を用いて了解を得る。

## 長崎大学

登録症例のプライバシーは、氏名を明記せず暗号化し、入力されたコンピュータはインターネットに接続せず、またパスワードで厳重に管理する。

多施設患者登録ならびに遺伝子解析については倫理委員会の審査を受けており、さらに患者より文書で同意を得てから行う。

長崎大学で事前に審査を受けている研究。

1) 弾性線維性仮性黄色腫患者における ABCC6 遺伝子変異の検索 (H22 年 6 月 10 日～H27 年 3 月 31 日、承認番号 100610187)

2) 多施設患者登録システムによる、弾性線維性仮性黄色腫の臨床像・自然経過、予後、病因、治療の反応性の解析 (H22 年 8 月 2 日～H27 年 3 月 31 日、承認番号 100802191)

## C. 研究結果

### [1]水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

#### ①類天疱瘡

・類天疱瘡疾患群の診断システムの開発のため、新しい診断法を開発するとともに未知の抗原の同定のためさまざまな研究を進めた。

・抗 BP180 型粘膜類天疱瘡 (MMP) の標的抗原は BP180C 末端部分であり、その自己抗体の検出には免疫ブロット法のみであったが、本研究では、より少量のサンプルで簡便かつ規格化可能な実験法である ELISA 法を確立することを目的とした。

・抗 BP180 型粘膜類天疱瘡 (MMP) 患者血清中の ELISA 陽性率 (IgG/IgA) は、約 5 割であり、MMP 患者血清中の BP180C 末端部-ELISA (IgA) の結果は、水疱性類天疱瘡 (BP) 患者と比べて有意に高い値を示した。また MMP 患者血清中の BP180NC16a/BP230-ELISA の結果は、BP 患者と比べて有意に低い値を示した。

②ジューリング疱疹状皮膚炎 本邦ジューリング疱疹状皮膚炎患者 21 例について検討した。凍結皮膚が使用可能だった 14 例について、病変部皮膚での eTG、tTG と IgA の局在、colocalization の有無について蛍光抗体直接法を用いて検討したところ、9 例 (64.3%) で IgA と eTG が真皮乳頭で colocalize していた。tTG と IgA の colocalization は認められなかった。また、本邦ジューリング疱疹状皮膚炎患者 21 例について、IgA 抗 eTG 抗体と IgA 抗 tTG 抗体について検討したところ、IgA 抗 eTG 抗体は 9 例 (42.9%) で、IgA 抗 tTG 抗体は 2 例 (9.5%) で陽性であった。蛍光抗体直接法で真皮乳頭での IgA と eTG の colocalization が認められるか IgA 抗 eTG 抗体が陽性であったかのいずれかであったものは、21 例中 15 例 (71.4%) であった。

### [2]ヘイリーヘイリー病・ダリエ病

・24 年度までに 33 例のヘイリーヘイリー病を収集し遺伝子検査を行ったが、本年度は 6 例を追加し、5 個の ATP2C1 変異を同定した。

・基礎研究として、本症の培養表皮細胞においていくつかのカルシウム結合蛋白質の遺伝子発現と角化関連遺伝子の発現がコントロールより増強していたことを示した。さらに、変異の種類と病因分子の発現との関連を調べた。p.Pro307His、c.1308+1G>A、p.Gln504X という異なる変異をもつ培養表皮細胞のうち p.Gln504X では ATP2C1 mRNA と SPCA1 の発現が減少していたが、他はコントロールと同等であった。また、ATP2C1 をノックダウンした HaCaT 細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度はコントロールより高かったが、ATP 刺激に対する反応性には変化がないことを示した。

・ダリエ病 10 例においても、ATP2A2 遺伝子に

9個の変異を同定することができた。

[3]自己炎症性症候群 現存する中條-西村症候群 (NNS) の小児例は和歌山市出身の6歳男児のみであったが、原因不明の炎症性疾患としてトシリズマブにて加療されていた奈良市出身の9歳男児に大脳基底核石灰化が見つかり、遺伝子解析にて本症と判明した。一方、和歌山・大阪南部出身の健常学生50名の解析では *PSMB8* の G201V 変異は見いだされず、昨年分と合わせて1/199のアリル頻度となった。発熱・皮疹など炎症症状が持続する成人例に対して3週間おきにトシリズマブを半年間投与する臨床研究を行い、筋痛などの自覚症状の軽快を認め継続投与している。また、汎発性膿疱性乾癬の若年発症例と長期間無治療の末に有棘細胞癌を発症した症例に新規変異を含む *IL36RN* 変異を見出した。さらに、難治性疣贅を主症状とする原発性免疫不全症例のエキソーム解析にて *LIG4* 新規変異を見出したのを契機に、NNSが疑われながら *PSMB8* など既知の関連遺伝子に変異のない2症例についてもエキソーム解析を進めている。

[4]早老症 (コケイン症候群 CS) コケイン症候群 (CS) 診断センターを H25 年度も維持した。

H25 年度は9症例 (I型; 5、II型; 1、III型; 2) 依頼があり、新たにCS I型3例 (2例は新規変異) を確定診断し、表現型・遺伝型パラドキシカル関連を確認した。2例は現在解析中である。II型疑い症例は最終的にCSではなく、III型症例では表現型はCSだが遺伝子変異が同定できなかった。放射線照射後の $\gamma$ H2AX 検出システムにより放射線照射後の二重差鎖切断の修復応答を解析したところ XP、XP/CS 細胞では正常細胞と差はないが、CSは

多くの細胞で正常細胞に比べ $\gamma$ H2AX 形成に異常がみられた。CS モデルマウス (XPG-null) を使用して MBP、CC1、Olig2 の発現を組織学的に検討したところ、大脳皮質でのみオリゴデンドロサイトの分化、ミエリン形成が障害されていた。オリゴデンドロサイトの脳への遊走能には異常はみられなかった。

[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ロリクリン gDNA を挿入後、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、安定トランスフォーマントを得た。野生型ロリクリンを発現する細胞株として、WL-1 と名付けた細胞株を選んだ。また、変異ロリクリンを発現する細胞として VL-5 と名付けた細胞株を選んだ。ロリクリンが原因となっている掌蹠角化症の治療薬を見つけるために VEGF の作用を抑制する CBO-P11、JE-11、上皮成長因子受容体阻害剤である PD153035 を種々に組み合わせ、VL-5 細胞の増殖が抑制されるかどうかを調べた。CBO-P11 あるいは JE-11 を PD153035 と組み合わせることによりロリクリンが原因となっている掌蹠角化症のモデル細胞である VL-5 細胞の増殖が顕著に抑制されることを見つけた。

[6]弾性線維性仮性黄色腫 平成22年、及び平成23年度に採択された「弾性線維性仮性黄色腫 (PXE) の病態把握ならびに診断基準作成」を平成24年度まで行った。平成24年度1年間で約20例、平成25年度は現時点で10例の新規患者登録があった。H25年度は以下の研究結果を得た。

1) 実態調査を継続して行い、現時点で約170例の PXE 患者の詳しい臨床データを収集し、

皮膚障害、視力障害、虚血性疾患などの情報を収集し、重症度、他臓器障害有病率等を検討した。

2) 平成 22 年度以降遺伝子診断を実施し、平成 25 年度は、新たに 10 例の解析を行った。これまでに約 70 例の遺伝子診断を行っている。

3) ABCC6-GFP を発現する 293T 細胞を樹立した。この実験系を用い、遺伝子異常が *ABCC6* の細胞内分布に与える影響を今後解析する予定である。

## D. 考察

### [1]水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

①類天疱瘡 類天疱瘡疾患についての自己抗原・抗体を同定・検出し、診断法の確立と類天疱瘡の分類を作成する研究の一環として、BP180C 末端部 ELISA 法の開発と有用性の検討を行った。BP180C 末端部-ELISA 法は MMP の診断および病勢の客観的指標として用いることができることを示唆した。

②ジューリング疱疹状皮膚炎 欧米のジューリング疱疹状皮膚炎では約 80% の患者が HLA-DQ2 を持ち、残りが HLA-DQ8 を持つことが報告されており、この 2 つのアレルと欧米のジューリング疱疹状皮膚炎の相関が強いことが知られている。これに対し、本邦報告例で HLA が調べられた 31 症例のなかで、この 2 つのアレルを持つものは皆無であった。これより、本邦ジューリング疱疹状皮膚炎患者は、欧米のジューリング疱疹状皮膚炎患者と比べ、異なる発症メカニズムを持つことが予想されたが、欧米症例と同様に、eTG との深い相関が明らかとなった。

[2]ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 nonsense 変異では SPCA1 の発現量の低下が発症に関わ

る一方、missense、splice-site 変異は機能不全をもつ変異 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で引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化がカルシウム結合蛋白質や角化に関連する遺伝子群の発現の変化に関与することが示唆された。これらの所見が本症の病態形成に関わる可能性がある。

ダリエ病の *ATP2A2* 遺伝子変異は当該分子全体に散見され、ホットスポットはないと考えられてきた。本研究においても missense 変異が 7 例と最も多く、また変異は分子全体にみられ、これまでの報告と同様であった。また、本研究では 13 例中 3 例で遺伝子変異を同定できなかった。

[3]自己炎症性症候群 NNS について、現存する小児例が新たに見出されたことで、他にも症例が埋もれている可能性、さらに大脳基底核石灰化が診断の決め手になりうることを周知する重要性が示唆された。トシリズマブ治療は特効薬ではないものの一定の効果を示したことで、ステロイドの副作用を減らす目的で使用されることが示された。最近同定された乾癬関連 *IL36RN* と *CARD14* 変異についても遺伝子解析を開始し、変異による表皮での炎症の遷延化が悪性化につながる可能性が示唆された。さらに、診断不明例でのエキソーム解析を進めることで、新規変異による新規遺伝性自己炎症疾患の同定を目指すとともに、遺伝子解析に基づいた個別医療の可能性を模索しつつある。

[4]早老症(コケイン症候群 CS) CS 診断を実施中、臨床所見、紫外線性 DNA 損傷の修復力が低下するなど明らかに表現型が CS であるにも関わらず CS 責任遺伝子(既知のものは CSA、

CSB、XPB、XPD、XPG の 5 種) に遺伝子変異が同定できない症例の存在は、CS を発症させる未知の遺伝子の存在を推測させる。また CS 細胞における放射線照射後の H2AX の特異な動態は CS 患者に対する放射線を用いた検査の安全性に関する再検討の必要性を示唆する。CS モデルマウスを用いた解析結果は CS 患者から臨床的に得られる CT や MRI 検査の結果と矛盾しないものであったが、その分子機構はまだ未解明である。

[5]角化症 (掌蹠角化症) 今回我々は、エクジソン誘導発現系を用いて、ロリクリンが原因となっている掌蹠角化症の、よりリファインされたモデル細胞を樹立した。CBO-P11 あるいは JE-11 を PD153035 と組み合わせることにより、このリファインされた掌蹠角化症モデル細胞である VL-5 細胞の増殖が顕著に抑制されるので、今後は実際の患者皮膚においてこれらの阻害剤が治療薬として使用できるかどうかを調べたい。

[6]弾性線維性仮性黄色腫 実態調査の統計学的解析を継続して行い、PXE が脳梗塞、虚血性心疾患のリスクファクターであることが判明した。さらに視力障害、心臓・脳血管障害と皮膚の相関を解析し、発症・進展予防に役立つ因子を見出すことが今後の課題である。

*ABCC6* 異常と弾性線維変性石灰化との因果関係は、いまだ明確にされていない。また本邦患者の遺伝子変異は、少数の共通した変異に収束してきている。また遺伝子変異の種類と臨床症状に相関は見られない。

## E. 結論

### [1]水疱性類天疱瘡とその類縁疾患

①類天疱瘡 類天疱瘡疾患群の診断システム

の開発のため、新しい診断法を開発するとともに未知の抗原の同定のためさまざまな研究を進めた。今回の研究では、類天疱瘡群疾患の自己抗原の cDNA を単離しリコンビナント蛋白を作成し、これらの自己抗原に反応する自己抗体を検出する ELISA 法を開発した。さらに多数の患者血清を用いて、その診断への有用性を確認し、診断システムの確立に向かう予定である。

②ジューリング疱疹状皮膚炎 以上より、発症メカニズムに関しては、欧米症例と本邦症例であまり大きな違いがないことが判明した。しかし、臨床像については欧米症例でグルテン過敏性腸症 (セリアック病) の合併が必発であり、治療としてグルテン除去食が必ず行われているのに対し、本邦のジューリング疱疹状皮膚炎では、グルテン過敏性腸症の合併は極めて稀であり、試験的に行われたグルテン除去食が奏功した例はほとんどないなど、異なる点が多い。遺伝学的背景は病気の発症メカニズムではなく、臨床像、特に腸症有無に大きく関与していることが推測された。

[2]ヘイリーヘイリー病・ダリエ病 本症はカルシウムポンプの異常で起こる疾患であるが、種々の遺伝子変異により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。病態の詳細は未だ明らかにされていないが、当研究室の遺伝性皮膚疾患研究に対する豊富な経験と他施設との連携をもとに、今後も本研究を継続する。将来に予測される成果は、細胞のカルシウム動態の解明や本症の新規治療法開発などを含み、学術的・国際的・社会的に重要な意義を持つと思われる。

[3]自己炎症性症候群 本研究により、NNS の国際的な認知度が増したが、*PSMB8* 変異疾患を

包括するものというよりは、本邦独自の変異に基づく病態という位置づけが確立しつつある。他の *PSMB8* 変異疾患の研究の動向を見据えつつも独自の視点で解析を進め、*PSMB8* 変異疾患を包括する概念を確立し、治療に応用されることが求められる。乾癬関連 *IL36RN* 変異による表皮での炎症の遷延化が悪性化につながる可能性など新たな仮説の検証も進めており、エキソーム解析によって今後見出されるであろう新規疾患や変異の提唱と合わせ、新たな治療法の開発が待たれる。

[4]早老症（コケイン症候群 CS） 昨年度から遺伝子変異を同定した CS 患者では過去の報告通り CSA、CSB ともに表現型・遺伝型にパラドックス関連を認めた。また我々解析がした症例を含めて本邦 CS 患者では CSA、CSB 遺伝子変異の部位、種類に hot spot（創始者効果）はみられない。また診療上 CS 患者に対する過度の放射線検査は慎むべきかもしれない。CS モデルマウスの中枢神経組織の解析結果は、組織学的に画像所見と合致する結果が得られたが、分子レベルでの検討は今後の課題である。

[5]角化症（掌蹠角化症） 今回われわれはエクジソン誘導発現の系を用いて、掌蹠角化症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は、種々のシグナル伝達の変化が観察され、この変化は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、いくつかの掌蹠角化症治療候補薬剤を見つけることができた。

[6]弾性線維性仮性黄色 皮膚科、眼科、循環器科医師が臨床疫学調査の結果を専門医の立場から検討し、結果の統計学的解析をふまえ、それに遺伝子診断も加えた診断基準を作成した。このことで、稀少難病である弾性線維性仮性黄色腫の診断に多いに貢献していると言える。本研究の遺伝子診断は、エクソン欠損同定方法を導入した結果、その感度は H25 年で特に向上している。最後に *ABCC6* 分子異常から弾性線維変性・石灰化に至る経路はいまだ解明できていない。今回樹立した *ABCC6*-GFP 発現細胞を用いての分子の細胞内分布障害の検討は、分子異常の病態に新たな視点を与えるもので、治療に結びつくものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

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

各分担報告書の該当箇所を参照。

#### 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。



[ II ]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成 25 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

研究報告①：BP180 C 末端部 ELISA 法の開発と有用性の検討

研究分担者：橋本 隆	久留米大学皮膚科学教室	教授
共同研究者：古村 南夫	久留米大学皮膚科学教室	准教授
大畑 千佳	久留米大学皮膚科学教室	准教授
辛島 正志	久留米大学皮膚科学教室	講師
濱田 尚宏	久留米大学皮膚科学教室	講師
石井 文人	久留米大学皮膚科学教室	講師
古賀 浩嗣	久留米大学皮膚科学教室	助教
Teye Kwesi	久留米大学皮膚科学教室	特別研究員
安河内 篤	久留米大学皮膚科学教室	特別研究員

研究要旨

類天疱瘡群のひとつである粘膜類天疱瘡（mucous membrane pemphigoid 以下 MMP）は粘膜のみもしくは粘膜優位に病変を生じる自己免疫性水疱症である。大多数（70-80%）は BP180 に反応する IgG および IgA 抗体を示す抗 BP180 型 MMP であり、水疱性類天疱瘡の自己抗体が BP180 NC16a 部位に示すのに対して、抗 BP180 型 MMP の抗体は BP180 の C 末端部位に多く反応することが示されている。本研究では、同疾患との関連性が指摘されている BP180 C 末端部領域に着目し、同抗原タンパクを用いて、より簡便かつ定量化可能な MMP の新規診断法の開発を行い、的確な治療を行うための足がかりを目的とする。BP180 C 末端部領域のリコンビナント蛋白を作製、ELISA 法を開発し、多数の MMP 患者血清を用いてその有用性を検討した。

A. 研究目的

類天疱瘡疾患群の診断システムの開発のため、新しい診断法を開発するとともに未知の抗原の同定のためさまざまな研究を進めた。

格化可能な実験法である ELISA 法を確立す

抗 BP180 型粘膜類天疱瘡（MMP）の標的抗原は BP180 C 末端部分であり、その自己抗体の検出には免疫ブロット法のみであったが、本研究では、より少量のサンプルで簡便かつ規

## B. 研究方法

大腸菌発現系を用いて BP180 C 末端部リコンビナントタンパクを作製し図 1 に示すように、BP180 の細胞外領域で NC16a 部分を含まない部分(1193 番目のアミノ酸から 1497 番目まで)の C 末端側部分を作製した。

ELISA については、抗原濃度は 2 $\mu$ g/ml とし、患者血清は 100 倍希釈、各 2 次抗体は、抗 IgG 抗体は 8000 倍希釈、抗 IgA 抗体は 4000 倍希釈し用いた。

## C. 研究結果

抗 BP180 型 MMP 患者血清中の ELISA 陽性率 (IgG/IgA) は、約 5 割であり (図 2)、MMP 患者血清中の BP180C 端部-ELISA (IgA) の結果は、水疱性類天疱瘡 (BP) 患者と比べて有意に高い値を示した。また MMP 患者血清中の BP180NC16a/BP230-ELISA の結果は、BP 患者と比べて有意に低い値を示した。

## D. 考察

類天疱瘡疾患についての自己抗原・抗体を同定・検出し、診断法の確立と類天疱瘡の分類を作成する研究の一環として、BP180C 末端部 ELISA 法の開発と有用性の検討を行った。BP180C 末端部-ELISA 法は MMP の診断および病勢の客観的指標として用いることができることを示唆した。

## E. 結論

MMP の診断に有用である ELISA 法の開発を行い、その有用性を示した。類天疱瘡群の自己免疫性水疱症も天疱瘡と同様の自己免疫的機序によって発症し非常に難治である。この

ため、種々の類天疱瘡群疾患の正確な診断は適切な治療の選択に大いに役立つものである。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表 (平成 25 年度)

### 論文発表

1. Aoi J, Makino K, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Jinnin M, Inoue Y, Koga H, Hashimoto T, Ihn H: Case of paraneoplastic pemphigus with follicular lymphoma treated with rituximab. *J Dermatol* 40(4):285-286, 2013.
2. Arai R, Okuda H, Tsuruta D, Koga H, Teye K, Ishii N, Ohata C, Hashimoto T: IgA pemphigus with non-pustular erythematous lesions and IgA antibodies to desmocollins 1 and 2. *Eur J Dermatol*, 2013. Jun 24. [Epub ahead of print]
3. Asahina A, Koga H, Suzuki Y, Hashimoto T: IgA pemphigus associated with diffuse large B-cell lymphoma showing unique reactivity with desmocollins: unusual clinical and histopathological features. *Br J Dermatol* 168(1):224-226, 2013.
4. Fukuchi O, Suko A, Matsuzaki H, Baba H, Yoshida H, Takeuchi T, Odawara S, Fukuda S, Hashimoto T: Anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid with autoantibodies to alpha3, beta3 and gamma2 subunits of laminin-332 as well as to BP230 and periplakin associated with adenocarcinoma from an unknown primary site. *J Dermatol* 40(1):61-62, 2013.
5. T, Akin MA, Sarici D, Hallac K, Kurtoglu S, Hashimoto T: Guaiazulene: a new treatment option for recalcitrant diaper dermatitis in NICU

- patients. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26(2):197-200, 2013.
6. Hamada T, Tsuruta D, Fukuda S, Ishii N, Teye K, Numata S, Dainichi T, Karashima T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T: How do keratinizing disorders and blistering disorders overlap? *Exp Dermatol* 22(2):83-87, 2013.
  7. Haneda T, Imai Y, Koga H, Hashimoto T, Yamanishi K: Case of subepidermal bullous dermatosis with immunoglobulin G autoantibodies against various basement membrane zone proteins. *J Dermatol* 40(4):283-285, 2013.
  8. Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima Y, Hashimoto T, Jones JC, Tsuruta D: Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. *Am J Pathol* 182(3):828-840, 2013.
  9. Imamura K, Tsuruta D, Tsuchisaka A, Mori T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T: Anaphylaxis caused by ingestion of jellyfish. *Eur J Dermatol*, 2013. Jun 24. [Epub ahead of print]
  10. Kanwar AJ, Tsuruta D, Vinay K, Koga H, Ishii N, Dainichi T, Hashimoto T: Efficacy and safety of rituximab treatment in Indian pemphigus patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27(1):e17-23, 2013.
  11. Kim J, Teye K, Koga H, Yeoh SC, Wakefield D, Hashimoto T, Murrell DF: Successful single-cycle rituximab treatment in a patient with pemphigus vulgaris and squamous cell carcinoma of the tongue and IgG antibodies to desmogleins. *J Am Acad Dermatol* 69(1):e26-27, 2013.
  12. Koga H, Ishii N, Dainichi T, Tsuruta D, Hamada T, Ohata C, Karashima T, Furumura M, Hashimoto T: An attempt to develop mouse model for anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol Sci* 70(2):108-115, 2013.
  13. Koga H, Tsuruta D, Ohyama B, Ishii N, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T: Desmoglein 3, its pathogenicity and a possibility for therapeutic target in pemphigus vulgaris. *Expert Opin Ther Targets* 17(3):293-306, 2013.
  14. Miyashima S, Honda M, Hashimoto K, Tatematsu K, Hashimoto T, Sato-Nara K, Okada K, Nakajima K. A comprehensive expression analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 gene family during embryogenesis reveals a conserved role in meristem specification and a non-cell-autonomous function. *Plant Cell Physiol*. 54(3):375-84. 2013
  15. Komorowski L, Muller R, Vorobyev A, Probst C, Recke A, Jonkman MF, Hashimoto T, Kim SC, Groves R, Ludwig RJ, Zillikens D, Stocker W, Schmidt E: Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 68(3):e89-95, 2013.
  16. Kurashige Y, Minemura T, Nagatani T, Koga H, Hashimoto T: Acute blistering disease presenting IgG autoantibodies against NC16A and COOH-terminal domains of BP180 and laminin-332, with characteristic distribution of eruptions. *Eur J Dermatol* 23(1):109-110, 2013.
  17. Majima Y, Yagi H, Tateishi C, Groth S, Schmidt E, Zillikens D, Koga H, Hashimoto T, Tokura Y: A successful treatment with ustekinumab in a case of antilaminin-gamma1 pemphigoid associated with psoriasis. *Br J Dermatol* 168(6):1367-1369, 2013.
  18. Maruta Y, Ohata C, Ishii N, Koga H, Ohyama B, Dainichi T, Hamada T, Furumura M, Tsuruta D, Nakama T, Hashimoto T: Linear IgA bullous dermatosis with a prurigo nodularis-like