

孔角化症 (DSAP) における *MVK* 遺伝子の変異など、新規遺伝子変異がエクソーム解析によって次々と見出されている。従って、*PSMB8* をはじめ既知の自己炎症疾患関連遺伝子に変異のない症例検体は、今後新しい変異を見出すための貴重なサンプルとも位置づけられる。今年度はまず、関連が疑われる NNS 様症例 2 例と CAPS 様症例 1 例のエクソーム解析が開始され、特に、前者においては免疫プロテアソーム関連、後者においてはインフラマソーム関連の新たな制御機構の同定に繋がるような変異が同定されることが期待される。

E. 結論

本分担研究により、まず奈良で既に 15 歳となる小児例の存在が確認され、今後も患者が出現しうるだけでなく、正しく診断されていない症例がまだ埋もれている可能性が示唆された。学会や研究会、書籍などでの地道な疾患紹介の重要性が再認識された。一方、アクテムラ®の投与に関しては、投与間隔を調整すれば CRP を陰性化させることが可能であるが、抗炎症効果も限局的であり、CANDLE 症候群での報告と合致するものとなった。欧米で進められている JAK 阻害剤投与の有効性判定の結果も見たうえで、病態を見極める必要がある。続々と報告される新しい遺伝子変異について常に情報をアップデートし、NNS 以外の皮膚症状を主体とする遺伝性自己炎症疾患での新たな候補遺伝子の解析、さらには既知の遺伝子に変異のない症例でのエクソーム解析を進めることによって、各症例の病態の本態に迫り、有効な薬を届けたい。

G. 研究発表

論文発表

1. 金澤伸雄：誤診：アトピー性皮膚炎 3. 本当は「Early-onset sarcoidosis」。皮膚科フォトクリニックシリーズ「誤診されている皮膚疾患」，メディカルレビュー社，東京，pp.48-51, 2013
2. 金澤伸雄：Blau 症候群と若年発症サルコイドーシス。皮膚科臨床アセット 14「肉芽腫性皮膚疾患 サルコイドーシス・他の肉芽腫」，中山書店，東京，pp.132-138, 2013
3. 金澤伸雄：自己炎症疾患に対する抗 IL-1 療法、皮膚科サブスペシャリティーシリー

ズ第 7 巻「1 冊でわかる最新皮膚科治療」，文光堂，東京，pp.176-177, 2013

4. 金澤伸雄：中條-西村症候群の概念・病態。皮膚科臨床アセット 18「紅斑症と痒疹群 フロントガイド」，中山書店，東京，pp.136-141, 2013
5. 金澤伸雄：中條-西村症候群の診断・鑑別診断・治療。皮膚科臨床アセット 18「紅斑症と痒疹群 フロントガイド」，中山書店，東京，pp.142-148, 2013
6. 金澤伸雄：中條-西村症候群。『日本臨床』別冊「神経症候群 II-その他の神経疾患を含めて」，日本臨床社，東京，印刷中
7. 金澤伸雄：中條-西村症候群。自己炎症症候群の臨床。新興医学出版社，印刷中
8. 金澤伸雄：サルコイドーシス。Monthly Book Derma「肉芽腫のすべて」，204: 15-23, 2013
9. 金澤伸雄、有馬和彦、井田弘明、吉浦孝一郎、古川福実：日本で見出された自己炎症疾患—中條—西村症候群—。皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌，7: 158-168, 2013
10. 金澤伸雄：中條—西村症候群。アレルギー・免疫，20: 1456-1462, 2013
11. 有馬和彦、井田弘明、金澤伸雄、吉浦孝一郎：中條—西村症候群の原因遺伝子。感染・免疫・炎症，42: 322-325, 2013
12. 古川福実、金澤伸雄、国本佳代：中條—西村症候群。臨床免疫・アレルギー科，60: 542-547, 2013
13. 荻野篤彦、金澤伸雄、古江増隆：皮膚を編む—小児掌蹠丘疹性皮膚炎（砂かぶれ様皮膚炎）や自己炎症性症候群の臨床と病態。ラジオNIKKEI マルホ皮膚科セミナー特別番組「明日の治療指針」，印刷中
14. 金澤伸雄：中條—西村症候群：和歌山発・プロテアソーム不全による新しい自己炎症疾患。日本臨床皮膚科医会近畿ブロック会誌，印刷中
15. Kanazawa N.: Rare hereditary autoinflammatory disorders. Dermatology Research Advances, NOVA Science Publishers, Inc., in press
16. Kanazawa N, Nakamura T, Mikita N, Furukawa F: A novel *IL36RN* mutation in a Japanese case of early-onset generalized pustular psoriasis. J Dermatol, 40: 749-751, 2013

17. Kunimoto K, Kimura A, Uede K, Okuda M, Aoyagi N, Furukawa F, Kanazawa N: A new infant case of Nakajo-Nishimura syndrome with a genetic mutation in the immunoproteasome subunit: an overlapping entity with JMP and CANDLE syndrome related to *PSMB8* mutations. *Dermatology* 227: 26-30, 2013

18. Kanazawa N, Tchernev G, Kambe N: Monogenic early-onset sarcoidosis is no longer a variant of “idiopathic” sarcoidosis. *J Am Acad Dermatol*, 69: 164-165, 2013

19. Kanazawa N: Comprehensive review of rare hereditary autoinflammatory disorders. *J Genet Disor Genet Rep* 2: 2, 2013

20. Kanazawa N: Hereditary disorders presenting with urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am*, 34:169-179, 2014

学会発表

第20回分子皮膚科学フォーラム、**2013.4.12-13**、東京

金澤伸雄、古川福実、井上千津子、田村志宣、栗澤遼子、高橋健造、森尾友宏、三嶋博之、吉浦孝一郎：WHIM症候群様臨床像を呈する原発性免疫不全症症例におけるエクソーム解析。

第116回日本小児科学会学術集会、**2013.4.19-21**、広島

金澤伸雄：日本で見出された自己炎症疾患：分野別シンポジウム「自己炎症性疾患の基礎と臨床」中條－西村症候群。

第23回日本樹状細胞研究会、**2013.5.17**、京都

金澤伸雄、国本佳代、古川福実、井田弘明：*PSMB8*変異に伴う遺伝性自己炎症疾患である中條－西村症候群におけるHLA-DRの発現異常。

第99回近畿血液学会地方会、**2013.6.22**、大阪

玉置雅治、田村志宣、金澤伸雄、古川福実、三嶋博之、吉浦孝一郎、今井耕輔、森尾友宏：*LIG4*遺伝子に複合ヘテロ変異を認めた原発性免疫不全症の1例。

第28回日本乾癬学会学術大会、**2013.9.6-7**、東京

三木田直哉、国本佳代、上中智香子、金澤伸雄、古川福実、中村智之：*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。

第29回日本臨床皮膚科医会近畿ブロック総会学術大会、**2013.10.6**、和歌山

金澤伸雄：中條－西村症候群：和歌山発・プロテアソーム不全による新しい自己炎症疾患。

第23回日本小児リウマチ学会、**2013.10.11-13**、さいたま

石川智朗、鈴木博、櫻井嘉彦、竹田知広、古川福実、金澤伸雄、平康二：大脳基底核の石灰化を契機に診断された中條－西村症候群の1例。

第64回日本皮膚科学会中部支部学術大会、**2013.11.2-3**、名古屋

金澤伸雄、古川福実、石川智朗、平康二：トシリズマブが奏効した中條－西村症候群の新規小児例。

第65回日本皮膚科学会西部支部学術大会、**2013.11.9-10**、鹿児島。

神戸直智、佐藤貴史、中野倫代、松江弘之、池田啓、西小森隆太、金澤伸雄、武井修治：若年発症サルコイドーシスへの治療介入時の評価項目としての関節エコーの有用性。

第116回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎総会学術大会、**2013.11.29-12.1**、金沢

金澤伸雄：シンポジウム「蕁麻疹・食物アレルギーの臨床所見を読み解く」自己炎症疾患を見逃さないために。

稲葉豊、国本佳代、金澤伸雄、古川福実：*PSMB8* 遺伝子変異による中條－西村症候群における自己抗体の出現。

国際学会

International Investigative Dermatology 2013 Satellite Meeting “Genetic Skin Disease – Discovery and Recovery”, 2013.5.6-7, **Dundee, Scotland**

Kanazawa N, Arima K, Ida H, Yoshiura K-I, Furukawa F: Nakajo-Nishimura syndrome: an autoinflammatory syndrome identified in Japan.

International Investigative Dermatology 2013, 2013.5.8-11, **Edinburgh, Scotland**

Kunimoto K, Furukawa F, Ida H, Kanazawa N: Genetic modification of HLA-DR linked with the *PSMB8* mutation in Nakajo-Nishimura syndrome.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

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：コケイン症候群の病態解明と治療法の探索
～ヒト細胞およびマウスモデルを用いた検討～

研究分担者：森脇 真一 大阪医科大学皮膚科 教授
共同研究者：黒川 晃夫 大阪医科大学皮膚科 講師
牧之段恵里 大阪医科大学皮膚科 助教
大澤 冨野 大阪医科大学皮膚科 大学院生

研究要旨

本邦唯一であるコケイン症候群（CS）の診断センターを本年度も維持した。本年度は9症例（Ⅰ型；5例、Ⅱ型；1例、Ⅲ型；2例）依頼があり、新たにCSⅠ型3例を確定診断し、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だが既知のCS関連遺伝子に変異が同定できなかった。

CS患者への放射線の使用には是非がある。今回、患者細胞を用いて放射線照射後の γ H2AX検出システムにより放射線照射後の二本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では多くの細胞で正常細胞に比べ γ H2AX形成の経時的変化に異常がみられた。この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の病態解明と治療法探索を目的として、CSモデルマウス（XPG-null）を使用してMBP、CC1、Olig2の発現を免疫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。この結果は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。新たなCS治療戦略を立てるためには分子レベルでの解明が今後の重要課題である。

A. 研究目的

研究分担者は15年以上にわたり紫外線性DNA修復の先天性欠損で発症する色素性乾皮症(XP)、コケイン症候群(CS)などの遺伝性光線過敏症の分子細胞診断を行っている。CSは臨床的にⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型、XP/CS complexに分類されるが、その責任遺伝子は前3者はCSAあるいはCSBであり、XP/CS complexはXPB、XPD、XPG遺伝子変異で発症し、臨床的にはCS、細胞学的にはXPの表現型を呈するきわめて稀なタイプである。

研究分担者がこれまで解析した症例数は平成25年12月末までで計448例、XP、CSの新規確定診断症例はそれぞれ136例、6例、XP/CSの新規確定診断症例は3例となった。またXP、CSでは多くの場合表現型・遺伝型関連がみられることも判明している。

今年度もCS患者の患者情報や病態把握を目的としたCS総合診断センターを維持し、前年度実施できなかったCS症例、今年度新規で診断したCS症例を解析した。また、CS患者に対しては、神経症状の定期的評価のためにCTなど放

放射線を用いた検査を頻用するが、これまでの多くの報告、研究ではCS細胞では放射線感受性は正常レベルであるとされてきたが、異常な修復を示す可能性も指摘されている。そこで今回、放射線照射で形成される2本鎖切断後の修復応答を γ -H2AXで評価とするという鋭敏な系を用いて、CS細胞での放射線照射後の修復応答を検討した。

さらに、CSの病態解明と治療法探索を目的として、昨年度に購入し、維持できるようになったCSモデルマウスを用いて、中枢神経組織の免疫組織学的解析を行った。

B. 研究方法

前年度同様、CSの確定診断は全国から紹介され来院する患者皮膚由来の培養線維芽細胞を用いて、各種DNA修復試験(紫外線感受性試験、相補性試験など)、遺伝子解析などを駆使して行った。

放射線感受性についての実験には、XP細胞3系統(すべてXPA群)、CS細胞6系統、XP/CS complex細胞2系統(XPD/CS、XPG/CS各1系統)、正常細胞3系統、AT細胞1系統(放射線高感受性のコントロール)を使用した。チャンバーに播種後、放射線を照射し(超軟X線検査装置、SOFTX)、0~4時間に各細胞を抗 γ -H2AX抗体(05-636: millipore)で蛍光染色し、レーザー顕微鏡(Zeiss LSM500 META)により γ -H2AX陽性のfociをカウントし、照射線照射後の細胞の修復応答を検討した。

CSモデルマウスはXPG null変異をもち臨床的にCSと酷似する(著明な成長阻害、早老、20日程度で死亡など) strainを用いた。ヘテロマウスの雄・雌を交配させ、XPGノックアウトホモマウス(以下KO)、野生型マウス(以下WT)を作製し、生後4日の脳組織を4%PFAにて還流固定し、凍結切片を作製し、抗MBP抗体(ミエリン)、抗CC1抗体(成熟オリゴデンドロサイト)、抗Olig2抗体(オリゴデンドロサイト前駆細胞)を使用して免疫組織学的に検討した(n=3)。

(倫理面への配慮)

本研究の一部(CS患者のDNA修復解析、新規CS患者の遺伝子解析など)は臨床の場での検査のひとつとして保険収載(色素性乾皮症との鑑別として)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。ヒトサンプルを用いる場合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、その際、検体はコード化し、連結可能匿名化して取り扱う。個人情報には十分配慮し、検体の保管も厳重に行う。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、もしくは細胞バンクで購入したものである。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

本年度は9症例(I型;5例、II型;1例、III型;2例)依頼があり、新たにCS I型3例を分子レベルで確定診断(すべてCSA)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 γ H2AX検出システムにより放射線照射後の二本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みられなかったが、CSでは多くの細胞で正常細胞に比べ γ H2AX形成の経時的変化に異常がみられた。この所見はCS細胞での修復応答は責任遺伝子がCSAであってもCSBであっても差異はなく、表現型・遺伝型のパラドックス相関に一致して、ミスセンス変異をもち臨床的に重症患者由来細胞ほど異常が強くなる傾向がみられた。

CSモデルマウス(XPG-null)を使用してMBP、CC1、Olig2の発現を免疫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。一方、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。末期には大脳皮質のみならず内包にもミエリン形成障害生じるが脳梁、海馬は異常がないことが確認された。

D. 考察

今年度追加して検討したCS症例において表現型・遺伝型パラドキシカル関連が確認できた。臨床像はCSであるにもかかわらずCSA、CSB、XPB、XPD、XPGいずれにも変異が確認できなかった症例の存在は、未知のCS関連遺伝子の存在を示唆する。

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モデルマウスでみられたオリゴデンドロサイトの分化障害、ミエリン形成障害に関しては、さらなる詳細な分子レベルでの把握が新たな治療戦略を立てるためには重要となる。

E. 結論

本邦唯一であるCS総合診断センターの維持は、CS患者の臨床情報収集、CS早期診断が可能となり患者家族、全国の臨床医に有益である。重症度、診断基準、患者ケアを含めた包括的な診療ガイドラインが完成すれば、CS患者に対する均一、機能的、合理的な対応が可能となるため、至急の策定が望まれる。CSの放射線照射の安全性是非は引き続き検討すべき課題であるが、CS細胞では放射線照射後の修復応答に異常を認めた今回の結果は、今後のCS診療に一石を投じるものである。CSモデルマウスでみられたオリゴデンドロサイトの分化障害、ミエリン形成障害は、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。新たな治療戦略を立てるためにはさらなる分子レベルでの解析が今後必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 25 年度)

論文発表

(英文)

(1)Moriwaki S Hereditary disorders with deficient repair of UV-induced DNA damage Jpn Clin Med, 4:29-35, 2013

(2)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

(3)Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan CC, Tsilou ET, Zein WM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh KS, moto K, Inui H, Moriwaki SI, Emmert S, Iliff NT, Bradford P, Digiovanna JJ, Kraemer KH. Ocular Manifestations of Xeroderma Pigmentosum: Long-Term Follow-up Highlights the Role of DNA Repair in Protection from Sun Damage. Ophthalmology. 120:1324-1336, 2013

(4) Imoto K, Nadem C, Moriwaki S, Nishigori C, Oh KS, Sikandar G. Khan SG, Goldstein AM, K Kraemer KH Ancient origin of a Japanese xeroderma pigmentosum founder mutation J Derm Sci 69:175-176, 2013

(邦文著書)

(1)森脇真一 光線力学療法 光と生命の事典(朝倉書店) 印刷中

(2)森脇真一 こどもの異常な日焼け診断の決め手:色素性乾皮症を疑うべきかの解決法は? 苦手な外来皮膚疾患100の解決法~そのとき達人はどのように苦手皮膚疾患を克服したか?~(メディカルレビュー社) 印刷中

(3)森脇真一 光線力学治療(PDT)の皮膚科への応用 一冊でわかる最新皮膚科治療 皮膚科サブスペシャリティーシリーズ第7巻(文光堂) pp211-pp214、2013

(4)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 p102-105 皮膚科臨床アセット 20 (中山書店)、2013
(5)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 p304-307、2013 (メディカルレビュー社)

(邦文論文)

(1)森脇真一 総説 光線過敏症～確定診断へのアプローチ～ 皮膚科の臨床印刷中
(2)森脇真一 総説 光線過敏を疑う皮膚症状 Visual Dermatology 12:424-427, 2013
(3)森脇真一 皮膚老化～「DNA 修復」からみた考察 日本美容皮膚科学会雑誌 23:117-123, 2013
(4)吉森千夏、落合豊子、松浦大輔、桑原京介、森脇真一 レーザー治療を希望して来院した色素性乾皮症バリエーション 皮膚臨床 55:777-781, 2013
(5)森脇真一 宿主因子(遺伝性疾患、移植患者) 皮膚悪性腫瘍—基礎と臨床の最新研究動向— p441-445, 2013 (日本臨床)
(6)森脇真一 サンスクリーンと子供の肌 小児皮膚科学会雑誌 32:181-182, 2013
(7)森脇真一 光線過敏症～分類と確定診断へのアプローチ～ 日本皮膚科学会雑誌 123:2938-2939, 2013
学会発表
(1)Moriwaki S, Makinodan E, Nakazawa Y, Ogi T Adult onset Cockayne syndrome appears in two cases of UV sensitive syndrome with C229T CSB mutation IID2013 May 2013 (Edinburgh, Scotland)
(2)森脇真一 皮膚科領域の遺伝医療 Part 1 平成 25 年第 4 回京大遺伝合同カンファレンス、ミニレクチャー 平成 25 年 5 月 23 日 (京都)
(3)森脇真一 分子からみた色素性乾皮症、コケイン症候群の病態 シンポジウム「DNA 修復障害と神経変性」 第 55 回日本小児神経学会学術集会 平成 25

年 5 月 30 日 (大分)

(4)森脇真一 教育講演「光線過敏症 UPDATE」 光線過敏症～分類と確定診断へのアプローチ～ 第 112 回日本皮膚科学会総会 平成 25 年 6 月 16 日 (横浜)
(5)森脇真一 太陽紫外線と皮膚がん；最近の話題 スイーツセミナー 第 35 回日本光医学・光生物学会 平成 25 年 7 月 12 日 (浜松)
(6)牧之段恵里、森脇真一、近藤大喜、中沢由華、萩 朋男 色素性乾皮症の極めて稀な病型；XP / CS complex の本邦 3 症例 第 35 回日本光医学・光生物学会 平成 25 年 7 月 12 日 (浜松)
(7)森脇真一 ヒトは太陽紫外線ですべて老化するのか？～分子、細胞からの考察～ モーニングセミナー 第 14 回光老化研究会 平成 25 年 8 月 30 日 (前橋)
(8)桑原晶子、津川尚子、田中清、岡野登志夫、森脇真一 日照機会の乏しい対象者におけるビタミン D 必要量の検討—色素性乾皮症 (XP) 患者を対象とした検討— 第 15 回骨粗鬆症学会 平成 25 年 10 月 11 日 (大阪)
(9)森脇真一 教育講演 小児光線過敏症の Quality Indicator 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 平成 25 年 11 月 3 日 (名古屋)

H. 知的所有権の出願・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：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
Pathophysiology of Palmoplantar Keratoderma due to Loricrin Mutation

研究分担者：米田耕造 香川大学医学部皮膚科 准教授
共同研究者：窪田泰夫 香川大学医学部 教授
森上徹也 香川大学医学部 助教
中井浩三 香川大学医学部 助教
成清富貴子 香川大学医学部

研究要旨

掌蹠角化症の分子病態は依然不明な点が多い。掌蹠角化症の抜本的治療のためには掌蹠角化症のモデル細胞を作製し、その細胞を用いて治療候補薬をスクリーニングするのが最も効率的である。以前われわれは、変異コネキシン 26 遺伝子が原因となり生じる掌蹠角化症のモデル細胞を作製し、その細胞内シグナル伝達異常を詳細に検討した。今回は変異ロリクリン遺伝子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作製した。いくつか樹立されたモデル細胞群のうち、野生型ロリクリンを発現する細胞株を、WL-1 細胞、変異ロリクリンを発現する細胞株を VL-5 細胞と命名した。培地にエクジソンを添加すると、それぞれ野生型および変異ロリクリンを発現した。野生型ロリクリンは細胞質および核内に発現しており、変異ロリクリンは核小体にその発現が観察された。かつ野生型ロリクリンと変異ロリクリンの発現量は培地中に添加したエクジソン量に依存していた。VL-5 細胞は WL-1 細胞に比較して増殖が亢進していた。VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、EGF 受容体および VEGF 受容体 2 が強くリン酸化されていた。かつ VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、Akt が強くリン酸化されていた。VL-5 細胞の Akt の活性は WL-1 細胞の約 10 倍の活性があった。また、リン酸化された Akt は、VL-5 細胞の核小体に局在していた。VL-5 細胞では、Erk1/2 のリン酸化も見られた。しかし、p38MAP kinase、SAPK/JNK のリン酸化は、野生型ロリクリンを発現する細胞株においても VL-5 細胞でも観察されなかった。CBO-P11 あるいは JE-11 を PD153035 と組み合わせることにより、VL-5 細胞の増殖が顕著に抑制されるので、今後は掌蹠角化症患者皮膚においてこれらの阻害剤が治療薬として使えるかどうか検討を加える予定である。

A. 研究目的 ロリクリン遺伝子に変異が生じることにより生じる掌蹠角化症では、ロリクリン遺伝子に 1 塩基の挿入変異が見つ

かる。この 1 塩基の挿入変異により遺伝子の読み枠がずれ、ロリクリン分子のカルボキシル末端がアルギニンに富む特殊なア

ミノ酸配列に変わる。このアミノ酸配列中に核移行シグナルが現れるため変異ロリクリンは核内に集積する。しかし、この掌蹠角化症において角化異常が生じる分子メカニズムは、なお不明の点が多い。われわれはこの分子メカニズムを検討するため、ロリクリンが原因となり生じる掌蹠角化症モデル細胞を樹立した。今回は、この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、野生型ロリクリン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

野生型ロリクリン [Lor (WT)] および変異ロリクリン [Lor (730 ins G)] の gDNA をほ乳類発現ベクターである pIND/V5-His ベクターに挿入した。

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。

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 mg/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。抗マウスロリクリン抗体は Babco 社より購入し

た。抗ヒト変異ロリクリン抗体は、山本らの方法に準じて、ウサギ抗体を作成した²⁾。抗リン酸化 ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体、抗リン酸化 p38MAP kinase 抗体、抗 p38MAP kinase 抗体、抗リン酸化 SAPK/JNK 抗体、抗 SAPK/JNK 抗体、抗リン酸化 EGF 受容体 (Tyr992) 抗体、抗リン酸化 EGF 受容体 (Tyr1068) 抗体、抗リン酸化 VEGF 受容体 2 (Tyr1175) 抗体、抗 EGF 受容体、抗 VEGF 受容体 2、抗リン酸化 Akt (Thr308) 抗体、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体は Cell Signaling Technology 社より購入した。

e) 免疫プロット法

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。30mg 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。

f) 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、WL-1、VL-5 細胞を RIPA buffer で可溶化した。抗 Akt (1G1) モノクローナル抗体ビーズで免疫沈降を行った。GSK-3 融合蛋白質と 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°C で一晚反応させた。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 /b (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。

g) 蛍光抗体法

カバーガラス上に培養した Mock、WL-1 細胞、VL-5 細胞を -20°C メタノールで固定した。一次抗体として抗 V5 抗体および抗リン酸化 Akt (Ser473) 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、リン酸化 Akt および変異ロリクリンの局在を観察した。

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た。400 mg/ml ゼオシン、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。培地にエクジソンを添加すると、野生型および変異ロリクリンを発現した。野生型ロリクリンは、細胞質および核内に発現していた。対照的に変異ロリクリンは、核小体に発現していた。培地中のエクジソンの濃度を、変化させると、野生型および変異ロリクリンの発現量は (培地のエクジソン濃度依存性に) 増加した。Mock、WL-1 細胞に比較して VL-5 細胞では、上皮成長因子受容体 (EGF 受容体) および 2 型血管内皮細

胞増殖因子受容体 (VEGF 受容体 2) が強くリン酸化されていた。かつ、VL-5 細胞では、Mock、WL-1 細胞に比して Akt が強くリン酸化されていた。VL-5 細胞の Akt の活性は Mock の約 9 倍、WL-1 細胞の約 10 倍の活性があった。コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた観察では、リン酸化 Akt は、VL-5 細胞において核小体に存在し、変異ロリクリンと局在を共にしていた (図 1)。掌蹠角化症モデル細胞である VL-5 細胞において、転写因子 Stat3 が VEGF 遺伝子のプロモーターに結合することが、クロマチン免疫沈降法により判明した。そして転写因子 Stat3 は掌蹠角化症モデル細胞である VL-5 細胞においてのみ活性化していることが分かった。(図 2)。

ロリクリン角皮症の治療薬を見つけるため 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ことを発見した (図 3)。

D. 考察

今回われわれは、エクジソン誘導発現系を用いて、ロリクリンが原因となり生じる掌蹠角化症モデル細胞の樹立を行なうことに成功した。野生型ロリクリンを発現するコントロール細胞株を WL-1 細胞、変異ロリクリンを発現するロリクリン角皮症モデル細胞株を VL-5 細胞と命名した。培地にエクジソンを添加すると、それぞれ野生型および変異ロリクリンを発現した。野生型ロリクリンは細胞質および核内に発現しており、変異ロリクリンは核小体にその発現が観察された。かつ野生型ロリクリンと変異ロリクリンの発現量は培地中に添加したエクジソン量に依存していた。VL-5

細胞は WL-1 細胞に比較して増殖が活発であった。VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、EGF 受容体および VEGF 受容体 2 が強くリン酸化されていた。かつ VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、Akt が強くリン酸化されていた。VL-5 細胞の Akt の活性は WL-1 細胞の約 10 倍の活性があった。また、リン酸化された Akt は、VL-5 細胞の核小体に局在していた。VL-5 細胞では、Erk1/2 のリン酸化も見られた。しかし、p38MAP kinase、SAPK/JNK のリン酸化は、野生型ロリクリンを発現する細胞株においても VL-5 細胞でも生じていなかった。

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角皮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、今後は実際の掌蹠角化症患者皮膚においてこれらの阻害剤が治療として使えるかを調べたいと考えている。

またわれわれは、ロリクリンがプロフィラグリン N 末端蛋白質と相互作用をおよぼすことを証明した。ロリクリンはプロフィラグリン N 末端蛋白質と協調しながら表皮の分化を調節する作用があると想像された。

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、よりリファインされたロリクリンが原因となっている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、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成 25 年度)

論文発表

英語論文

1. Yoneda K, Nakagawa T, Lawrence OT et al: Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with loricrin in human cultured keratinocytes and epidermis. *J Invest Dermatol* 132: 1206-14, 2012
2. Nakai K, Yoneda K, Moriue T and Kubota Y: A possible link between the vascular dysfunction and skin manifestation in Fabry disease. *Open Access Scientific Reports* 1 doi: 10.4172/scientificreports.221
3. Hosokawa Y, Yoneda K, Nakai K, Moriue J and Kubota Y: Completely thrombosed venous aneurysm in great saphenous vein. *Ann Dermatol* 25: 268-270, 2013
4. Yamada T, Nakamura S, Demitsu T, Nakamura T, Iida E, Yoneda K, Fukuda S and Hashimoto T: Paraneoplastic pemphigus mimicking toxic epidermal necrolysis associated with B-cell lymphoma. *J Dermatol* 40: 286-288, 2013
5. Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Tsukamoto I, Moriue T, Kubota Y and Kosaka H: Dexamethasone induces caveolin-1 in vascular endothelial cells: implications for attenuated responses to VEGF. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C790-800, 2013
6. Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Hashimoto T, Nakai K, Kosaka H and Kubota Y: Sphingosine 1-phosphate attenuates peroxide-induced apoptosis in HaCaT cells

- cultured in vitro. Clin Exp Dermatol 38: 638-645, 2013
7. 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 25: 385-386, 2013
 8. Kubota Y, Nakai K, Munehiro A, Moriue J and Yoneda K: Zosteriform cutaneous metastasis of lung adenocarcinoma. J Clin Exp Dermatol Res in press
 9. Yoneda K, Demitsu T, Kakurai M, Narita T, Nakai K, Kubota Y, Ishii N and Hashimoto T: Detection of apoptotic keratinocytes in a case of bullous pemphigoid developed after graft-versus-host disease. Acta Derm Venereol 2013 Aug 8. doi: 10.2340/00015555-1676. [Epub ahead of print]
 10. Moriue T, Yoneda K, Moriue J, Nakai K and Kubota Y: Multi-branched acquired periungual fibrokeratoma. JAMA Dermatol in press
 11. Yokoi I, Ishikawa E, Koura A, Hosokawa Y, Tamai A, Nakai K, Moriue J, Moriue T, Yoneda K and Kubota Y: Successful treatment of primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with intralesional methotrexate therapy. Acta Derm Venereol 2013 Sep 3. doi: 10.2340/00015555-1692. [Epub ahead of print]
 12. Inaba Y, Kanazawa N, Furukawa F, Sakurane Y, Nakano H, Sawamura D, Yoneda K, Hamada T and Hashimoto T: Pachyonychia congenita in Japan: report of familial cases with a recurrent KRT16 mutation and review of the literature. Eur J Dermatol in press
 13. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue T, Kosaka H, Kubota Y and Inoue S: Deranged epidermal differentiation in *kl/kl* mouse and the effects of β Klotho siRNA on the differentiation of HaCaT cells. Exp Dermatol 2013 Oct 7. doi: 10.1111/exd.12258. [Epub ahead of print]
 14. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue J, Moriue T, Ishikawa E, Inoue S and Kubota Y: Two cases of nevus sebaceous accompanying secondary tumors with β Klotho expression. J Dermatol in press
 15. Nakai K, Yoneda K, Murakami Y, Koura A, Maeda R, Tamai A, Ishikawa E, Yokoi I, Moriue J, Moriue T and Kubota Y: Effects of topical N-acetylcysteine on skin hydration/transdermal water loss in healthy volunteers and atopic dermatitis patients. Ann Dermatol in press

和文著書

1. 米田耕造: Case11 皮脂欠乏性皮膚炎、内科で役立つ 一発診断から迫る皮膚疾患の鑑別診断、出光俊郎編、羊土社、東京、pp102-106, 2013

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし。

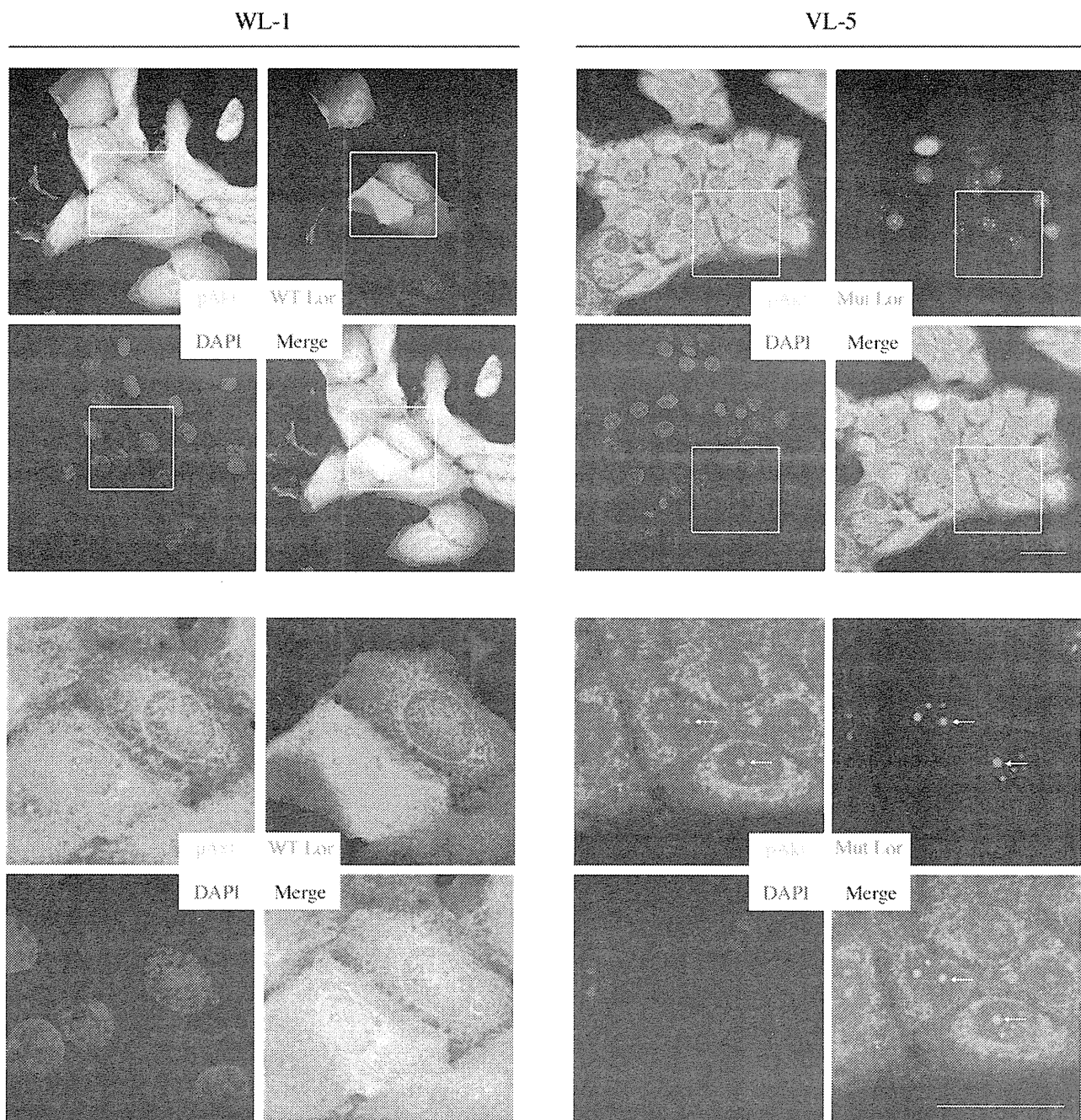
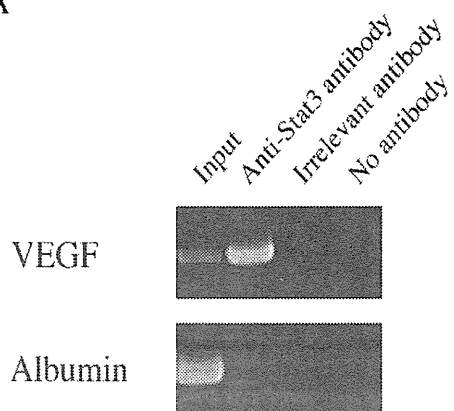


図 1. リン酸化 Akt の局在

野生型ロリクリンを強発現しているコントロール細胞では、リン酸化 Akt は細胞質と核に分布し、野生型ロリクリンと共存していた。変異ロリクリン蛋白質を強発現している掌蹠角化症モデル細胞ではリン酸化 Akt は核小体において変異ロリクリン蛋白質と共存していた。

A



B

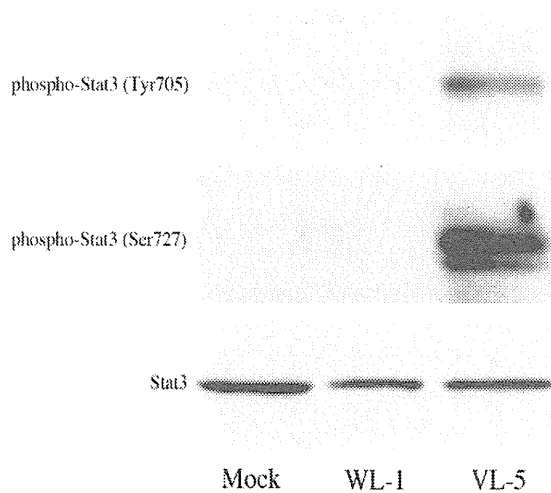


図 2. 掌蹠

角化症モデル細胞における VEGF 遺伝子のプロモーターへの Stat3 の結合ならびにそのリン酸化
 掌蹠角化症モデル細胞である VL-5 細胞において、転写因子 Stat3 が VEGF 遺伝子のプロモーターに
 結合することが、クロマチン免疫沈降法により判明した。そして転写因子 Stat3 は掌蹠角化症モデル
 細胞である VL-5 細胞においてのみ活性化していることが分かった。

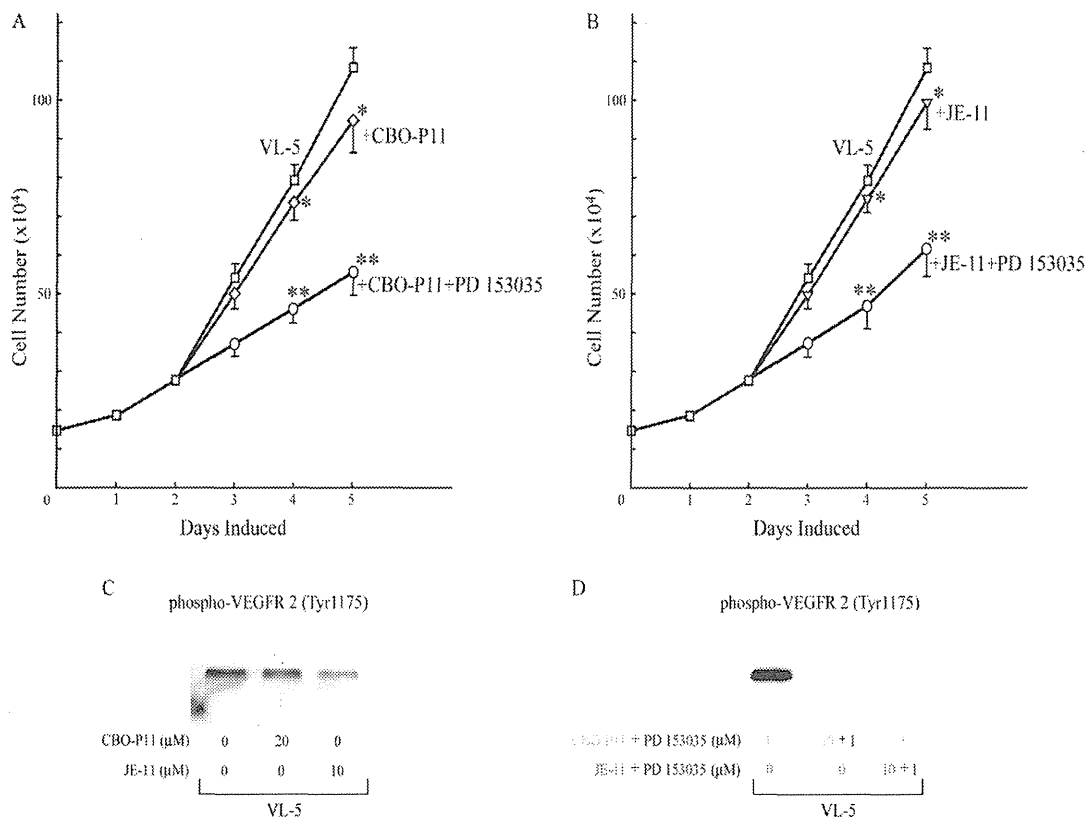


図 3. VEGF 阻害剤の VL-5 細胞におよぼす効果

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ところ、CBO-P11 あるいは JE-11 を PD153035 と組み合わせることにより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ていた。CBO-P11 あるいは JE-11 単独では 2 型血管内皮細胞増殖因子受容体のリン酸化は完全には抑制出来ないが、PD153035 と組み合わせることによりそのリン酸化が完全に抑制されることも分かった。

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：本邦における先天性爪甲肥厚症の実態解明

研究分担者：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医学部皮膚科 講師
稲葉 豊 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 大学院生
中谷 友美 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 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、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（PC）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。今年度は、前年度に実施した全国疫学調査で PC あるいは疑い患者ありとの回答を得た 12 施設に対し、二次調査として国際研究登録（IPCRR）に準じた説明同意書と質問票、回答用紙を送付し、臨床情報と遺伝子情報の収集を開始した。遺伝子解析未実施の患者の同意が得られれば、その変異検索も行い、本邦症例における遺伝子型と表現型の相関を検討し、その独自性の有無を明らかにするとともに、IPCRR 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、従来より爪甲の硬化・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、出生歯、多汗を伴うが白板症がなく、後に多発性毛包囊腫を生じてくる PC-2 型（Jackson-Lawler: OMIM#167210）に大

別されてきた。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型と表現型の相関が検討され報告されている。PC-1 が *KRT6A* と *KRT16*、PC-2 が *KRT6B* と *KRT17* の変異によるとされるが、発症初期など臨床的にはっきりと区別できない症例もあり、最近ではむしろ遺伝子型から PC-6a、PC-16、PC-6b、PC-17 と分けられる傾向にある。さらに、変異した異常ケラ

チンの発現を抑制する目的でラパマイシンや siRNA を用いた治験が進行している。このような欧米での研究の進展と対照的に、本邦では散発的な症例報告があるのみで、系統的に症例をまとめた解析はなされていない。そこで本研究では、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、先天性爪甲肥厚症に絞って本邦における実態解明を目指す。今年度は、前年度に実施した全国一次調査で PC あるいは疑い患者ありとの回答を得た 12 施設に対し、二次調査を開始した。

B. 研究方法

全国の大学病院と 500 床以上の大病院の皮膚科と小児科 695 施設を対象に行った全国一次調査で PC あるいは疑い患者ありとの回答を得た 12 施設に対し、中央研究施設である和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た内容に基づいて、IPCRR に準じた説明同意書と質問票、回答用紙一式を送付した。

(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・遺伝子解析研究に関する倫理委員会あるいは弘前大学医学部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

回答用紙の返信待ちであり、調査結果の解析はできていない。

D. 考察

本疾患は、Jadassohn-Lewandowski との疾患名が物語るように歴史的に重要なものであるが、逆に彼らが名付けた先天性爪甲肥厚症という

疾患名のためか、本邦で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れられていない。実際、自験例の母親は小児期に某大学病院皮膚科を受診したが、カミソリで削るしかないと言われたという。一方、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的な役割を担っている。

これまで 1 国レベルで本疾患患者をまとめた報告はなく、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し、欧米での患者登録や治験事業にいつでも参加できるような体制の基礎ができる。

文献的検索では、本邦症例では臨床的に PC-2 が多いなど IPCRR とは異なる特徴が見出されているが、症例が少ないことによるバイアスなのか、遺伝子型が明らかになっていないためか、あるいは民族の違いによるものか、二次調査によって明らかになることが期待される。ただ、今回の調査でも全国で 20 名ほどと症例数が少なく、畑仕事や老化に伴うものと自己判断して病院に来ない症例や、通常の胼胝や爪白癬などとして処理される症例などが多数存在すると予想され、症例の掘り起こしが重要と考えられる。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囊腫症などの患者についても、遺伝子解析を検討すべきかもしれない。

E. 結論

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、全国一次調査結果で見出された症例についての二次調査

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 への登録を行うことにより、本邦症例における遺伝子型と表現型の独自性の有無を明らかにするとともに、海外で進行しているラパマイシンや siRNA を用いた治療への参加、あるいはその成果の導入に備えたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Inaba Y, Kanazawa N, Furukawa F, Sakurane Y, Nakano H, Sawamura D, Yoneda K, Hamada T, Hashimoto T: Pachyonychia congenita in Japan: report of familial cases with a recurrent *KRT16* mutation. *Eur J Dermatol*, in press

学会発表

国内学会

第 37 回日本小児皮膚科学会学術大会
2013.7.14-15, 東京

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: Keratin16 遺伝子の N125S 変異を認めた先天性爪甲肥厚症の母子例の報告と本邦報告例・全国疫学調査のまとめ。

国際学会

International Investigative Dermatology 2013, 2013.5.8-11, Edinburgh, Scotland

Kanazawa N, Inaba Y, Nakatani Y, Furukawa F, Nakano H, Sawamura D, Hamada T, Hashimoto T, Yoneda K: Pachyonychia congenita in Japan: a report of familial cases and results of the national surveillance.

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：弾性線維性仮性黄色腫

研究分担者：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
研究協力者：谷岡未樹	京都大学大学院医学研究科 皮膚生命科学講座 講師
萩 朋男	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医学 准教授
山本洋介	京都大学大学院医学研究科 医療疫学 特定講師
田村 寛	京都大学大学院医学研究科 医療情報企画部 講師
佐々木隆子	大分大学医学部 マトリックス医学講座 助教

研究要旨

弾性線維性仮性黄色腫（Pseudoxanthoma elasticum：PXE）は弾性線維に変性・石灰化が生じ、皮膚変色・変形、視力障害、虚血症状などを引き起こす。本邦の患者実態調査継続とそれに基づき作成した診断基準の評価、ならびに遺伝子診断の精度向上を目標に研究を行った。

A. 研究目的

- 1) 患者実態調査結果の統計学的検討を終了し、平成24年度中に診断基準素案を当該学会（皮膚科ならびに眼科）に提出する目的は達成した。平成25年度においては実態調査の統計学的検索を集中して行い、特に虚血性疾患の進展の増悪因子の抽出、また心臓・脳血管障害と皮膚症状の相関を解析する。
- 2) 新規患者の遺伝子解析を引き続き行う。
- 3) 患者培養線維芽細胞を用いてABCC6異常と弾性線維変性石灰化を結びつけるシステムを平成25年度終了時まで構築する。

B. 研究方法

統計学的解析

個人調査票で得られた情報、すなわち臓器別疾患症状、有病率、重症度等を統計学的に詳細に検討し、診断基準、検査指針作成に有用な因子の抽出に努める。平成25年度現在で167例の患者に対する統計検討を行った。

遺伝子診断

早期例、軽症例の登録は本疾患の症状の進行などを観察するのに重要である。同意の得られた症例に対して、患者のABCC6の全31 Exonのdirect sequenceを行なう。ならびに、MLPA 変異検出方法により、エクソン欠損を同定する。

ABCC6 変異に伴う膜局在の異常

ナンセンス変異を有していないミスセンス変異症例も同様な臨床症状を呈していることが本研究で判明した。そこでミスセンス変異がABCC6分子の細胞内局在に与える影響を検討する。方法は、ミスセンス変異ABCC6-GFPタンパク質を293Tに発現させ、蛍光顕微鏡で観察し細胞内分布の相違の有無を検討する。

（倫理面への配慮）

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している。

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うけ、さらに患者より文書で同意を得てから行っている。

長崎大学で事前に審査を受けている研

究は以下の通りである。

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 (平成 22 年 6 月 10 日～平成 27 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患者の臨床像、自然経過、予後、病因、治療の反応性の解析 (平成 22 年 8 月 2 日～平成 27 年 3 月 31 日、承認番号 100802191)

C・D. 研究結果・考察

患者調査の動向

平成 25 年度の新たな登録を加えて 167 例の患者を解析した。類似した臨床型をとる疾患症例 10 例近くの問い合わせを受けたが、このような症例は、いずれも診断基準に従って鑑別除外できた。

全国調査

まず平成 22～23 年度に、調査票による病態把握のため全国腫瘍医療機関 (大学及び公立病院の 2,037 の診療科長) 患者の有無を問うハガキを郵送し、1,095 通の返事があり、270 名近くの患者が本邦で少なくとも一度は医療機関を受診していることが判明した。続いて詳しい調査票を送付することで詳細な臨床記録を作成できた症例は、平成 23 年度で 141 例、平成 24 年度までで 162 例となった。平成 25 年度までで、167 例となった。

診断基準

PXE の症状はいずれの臓器でも軽症から重症と多様性に富むことが特徴であり、また早期例、軽症例は診断困難な場合もある。PXE の症状・検査所見から診断基準に必要な項目を抽出し、診断基準を決定するために皮膚科・循環器科・眼科医師が協力して調査項目の作成を行った。平成 23 年度までに集計された 141 例の調査データを基に診断基準を作成し、眼科ならびに皮膚科学会雑誌に平成 24 年度に掲載された。この診断基準は、簡略に述べると以下のごとくである。

「皮疹あり、もしくは組織検査で異常あり」、加えて「眼の症状があるもの」を確診例としている。皮膚、眼のどちらか一方は疑い例であり、その中でも遺伝子検査で変

異が証明されれば確診例とするというものである。明確な記載のないもの・不明例を除くと、平成 25 年度までの信頼しうるデータは 132 例になった。

確診例:「皮疹あり、もしくは組織検査で異常あり」、加えて「眼の症状があるもの」、合計で 118 例であった。

一方、疑い例:皮膚(臨床もしくは組織)、眼のどちらか一方の所見のみは、1)皮膚のみ 10 例、2)眼のみが 4 例であった。

眼の症状、特徴は、PXE に極めて特異的な網膜色素線条を含むため他疾患は考えにくい、少数の例外的疾患は診断基準に入れたので、注意深く除外すべきものである。

この 14 例のうち遺伝子診断が 8 例に施行され、変異が同定され確診例になったものが 5 例であった。すなわち、総計で 132 例のうち、123 例の確診例、9 例の疑い例となった。この診断基準を用いれば 123/132 例(93%)の高い確率での確定診断が可能となった。

各臓器別

1. 皮膚病変:

年齢は 10～20 歳代に大きなピークがあり、6 割以上の患者がここで皮疹に気付く(図 1)。発生部位は頸部が 9 割(134/148=90.5%)、腋窩が 7 割(102/148=68.9%)と最も皮疹が後発する部分である。しかし臍、鼠径部、肘、膝、口腔粘膜部位も 2～5 割の頻度であり、全身の好発部位を詳細に時間をかけて診ることが診断の第一歩と考えられた(図 2)。

2. 眼病変:

眼症状の発生は、40～60 歳代にピークが来る(図 3)。眼科所見の記載がある症例に限ってみると、網膜色素線条が 9 割(120/134=89.6%)、網膜オレンジ皮様外観は 75%(53/71=74.6%)の患者に特異的に認められる所見であり、診断基準にも含めた。さらに眼底出血が 57%(49/86=57.0%)、脈絡膜新生血管は 67%(60/90=66.7%)もの患者に認められ、重篤な視力予後が見込まれる(図 4)。皮膚科や内科で PXE が疑われた症例の眼科受診促進が急務と考えられた。

3. 循環器領域:

160例中17例に虚血性心疾患を認めた(図5)。このことは平成20年の厚生労働省の患者調査から計算した50歳以上の虚血性心疾患有病率が1,000人あたり14人と考えると極めて高率であることが分かる。脳梗塞は記載のある症例112例中15例で認められ(図6)、平成20年の厚生労働省の患者調査から計算した50歳以上での有病率は1,000人あたり38人であるから、それに比して本症患者での脳梗塞の割合は極めて高率であることが判明した。しかし同時に、若年発症、びまん性の病変、全周生の石灰化を認める割合は、本疾患による血管障害と考えられるが、中高年での発症で、上記の特徴を欠く場合は、通常の粥状動脈硬化によるものとの鑑別は困難であった。

4. 消化管病変

消化管梗塞はないものの、出血は6例に認められた(表1)。

統計学的検討

これまで口腔粘膜疹ならびに皮疹の分布・広がり度をスコア化し、そのスコア(満点で6点)と循環器疾患、その他の症状との相関を見た。調査の結果、皮疹スコアが高い患者、口腔粘膜疹がある患者は循環器疾患・異常で統計学的に有意に高い有病率を示すことが明らかになったが、本年度も同様の傾向であった。すなわち、より広範囲に広がった皮疹、口腔粘膜疹を有する患者には、より積極的な検査を進め、循環器科の異常を早期に発見すべきと考えられる。

遺伝子診断

平成25年度で全ExonのDNAシーケンスに70例の登録が済んでいる。その内訳は、2例で変異無し、18例でモノアレリック変異、その他でバイアレリック変異を同定した。1年前の報告では54例の登録であり、遺伝子診断は堅調に進んでいると考える。欧米と同じく日本においても遺伝子-臨床重症度、臨床型の相関は無い結果となった。モノアレリック変異を1つでも有する患者は陽性と考え得ると判断すると同定率は、1年前の62%から82%に急上昇した。その理由として、Exon deletionが存在する可能

性を想定して行ったMLPA法によりexon deletionを12例に認めたためである。全く変異のない2例に関してはABCC6以外の遺伝子によるPXEが存在する可能性が考えられるため、現在さらにこれらに対して改善策を検討中である。

発症機序解析

ABCC6遺伝子産物は、膜に局在する物質輸送タンパク質であるとされる。

ミスセンス変異ABCC6-GFPの分布を野生型ABCC6-GFPと比較検討し、膜に到達できない分子である場合は、このミスソーティングを改善することが、治療に繋がるかを検討する。

E. 結論

1. 全国からの紹介症例の登録を継続し、臨床データバンクを構築しえた。
2. 長崎大学皮膚科において、遺伝子診断を行い、診断に役立っている。
3. 本年度の登録を加えても、患者は眼科、循環器疾患の有病率が非常に高いため、複数科での定期的観察が必要である。
4. 根本的発症機序が不明なため、効果的治療が見いだせない。この点が今後の重大な課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tanioka M, Utani A, Tamura H, Yoshimura N, Kashiwagi N, Kondo E, Konishi I, Miyachi Y: Calcification of the placenta in a woman with pseudoxanthoma elasticum with a mutation of the ABCC6 gene. *J Dermatol* 2014, in press
2. 宇谷厚志: 【展望】真皮マトリックス異常による全身疾患 -弾性線維性仮性黄色腫-。皮膚病診療 2013, 35(9): 827-832.
3. Yagi Y, Muroga E, Naitoh M, Isogai Z, Matsui S, Ikehara S, Suzuki S, Miyachi