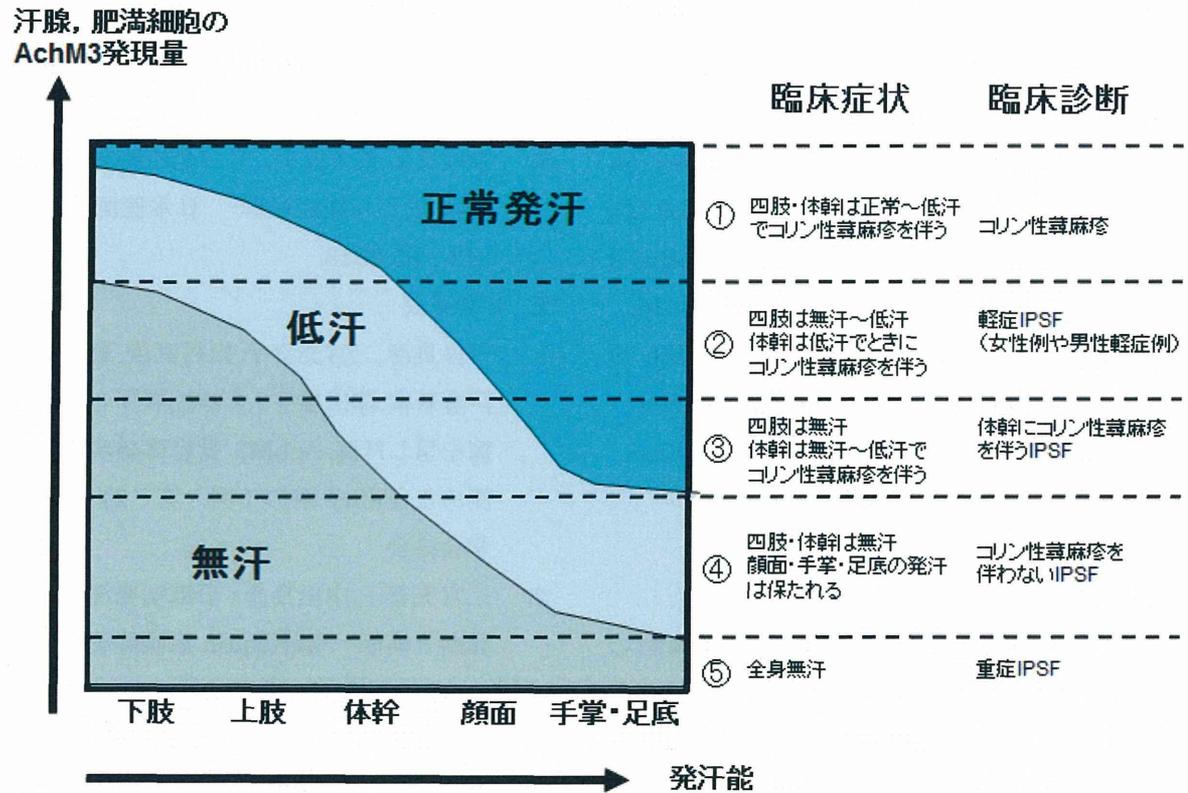


図：汗腺・肥満細胞の AchM3 受容体発現量と身体各部位の発汗能の関係



## 特発性後天性全身性無汗症の汗腺におけるアセチルコリンレセプター(M3)発現低下と M3 自己抗体の検討

研究分担者 佐野健司 信州大学医学部附属病院臨床検査部 講師  
朝比奈正人 千葉大学医学部研究院神経内科学 准教授  
研究協力者 伊藤友里花 信州大学医学部附属病院臨床検査部 大学院生  
藤沼好克 千葉大学医学部研究院神経内科学 大学院生  
片桐 明 千葉大学医学部研究院神経内科学 大学院生  
桑原 聡 千葉大学医学部研究院神経内科学 教授

研究要旨 後天性特発性全身性無汗症(AIGA)の原因検索の一環で、ムスカリニックアセチルコリンレセプターtype 3(M3)の発現解析を行った。13例のAIGAと7例の非AIGAの皮膚生検材料を対象に特異的なM3抗体を使用し、自動免疫染色装置で染色した。その結果、AIGA例では非AIGA例に比較してM3の発現が低下しているものが多かった。M3発現の低下の原因の可能性として重症筋無力症と同様の機序のM3の自己抗体が関与しているかどうかを調べるため、CHO培養細胞にM3遺伝子の全長を強制発現させて、細胞染色により自己抗体の有無を調べた。16例のAIGA血清、12例の健常人血清で1例のAIGAのみ陽性例が得られた。しかし、陽性例1例を含むすべてのAIGA血清で、細胞内カルシウム濃度の変動を抑制させるような機能阻害性のM3自己抗体を有する症例は存在しなかった。従って、M3発現低下の原因は、M3遺伝子のプロモーター活性の変化などの他の要因によるものと思われた。

### A.研究目的

特発性後天性全身性無汗症(AIGA)の原因は現在のところ同定されていない。AIGAでは、発汗以外に自律神経異常を認めないことや、汗腺に明らかな器質的変化を認めないこと、さらに、アセチルコリン皮内テストで無汗を示すなどの特徴から、AIGAの病因としてアセチルコリンの受容体であるムスカリニックアセチルコリンレセプターtype 3(M3)及びその下流のシグナル伝達異常の可能性が示唆されている。(Neurology, 2004,

63:1476-1480) そのため、M3の発現がAIGAで減少していないかを調べるため、AIGAと非AIGA患者皮膚生検材料を使用して、M3免疫染色を行った。免疫染色の結果はM3発現がAIGA患者で低下していたため、M3の自己抗体がM3発現の低下の可能性のあるものと考え、培養細胞によるM3強制発現の系を構築して患者血清での自己抗体の有無を検討した。

### B.研究方法

13 例の AIGA の皮膚生検材料と 7 例の非 AIGA(色素性母斑など)の皮膚生検材料に対して、M3 特異的な抗体(sigma)を使用して、M3 の免疫染色を行った。定量的な評価を行う上で染色条件を揃えるために、内因性ペルオキシダーゼ阻害から発色までの工程を自動で行う自動免疫染色装置 (VentanaBenchMark ULTRA) を使用した。一方、ヒト M3 遺伝子の全長を脳組織よりクローニングして発現ベクターに組み込み、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(Sigma)と細胞外ドメイン認識抗体(Millipore)の 2 種類の M3 特異的な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)。

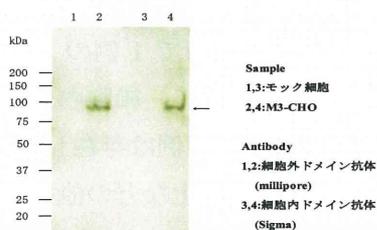


図 1 : M3 特異的な抗体によるウェスタンブロット法

両抗体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 蛋白のリン酸化を調べた。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)。

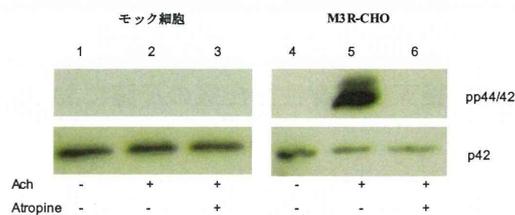


図 2 : MAPカスケードを利用したM3の機能解析

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)

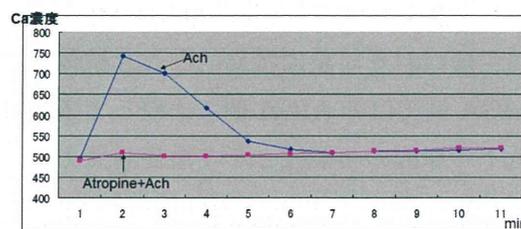


図 3 : Ach刺激による細胞内カルシウムの変動

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、ppErk 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)

患者由来の組織を使用するため、ヘルシンキ宣言を理解するとともに、臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省及び経済産業省)、遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針 (厚生労働省)、ヒト遺伝子解析遵守事項 (信州大学医学部) の各種倫理指針を遵守し、患

者のインフォームドコンセントを得て、信州大学医学部医倫理委員会に事前に承諾を得た上で実施をはかっている。生検組織・血清材料を用いた臨床研究内容は、信州大学の倫理審査委員会により承認されている(研究代表者佐野 健司、No.1857、11月8日2011年承認、遺伝子解析:研究代表者佐野 健司、No.11-039、11月25日2011年)。

### C.研究結果

M3発現の強さを陰性から1+, 2+, 3+の4段階に半定量的の評価を行ったところ、非 AIGA では表 1 の示す様に 2+が主体を占め、3+と1+がそれぞれ 1 人であるのに対して、AIGA 例では陰性あるいは 1+に留まっていた。

表 1: M3発現比較結果

No.	AIGA	非AIGA	No.
1	1+	1+	1
2	1+	2+	2
3	-	2+	3
4	-	3+	4
5	1+	2+	5
6	-	2+	6
7	1+	2+	7
8	1+		
9	1+		
10	-		
11	1+		
12	1+		
13	1+		

DABの発色の強さに応じて  
~3+まで4段階に半定量的に判定

代表的な例を非 AIGA と AIGA を並べて提示する。図 4 は左が 12 才男性の非 AIGA 例で、2+の M3 発現を汗腺に認めるのに対して、右は 42 才男性の AIGA 例で、1+の発現を示している。

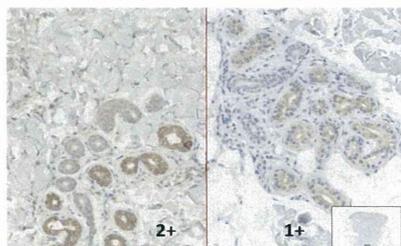


図 4

また図 5 は、11 才の女性の非 AIGA 例で 2+の M3 発現を示すのに対して、右は 49 才男性

の AIGA 例で陰性と判断される。

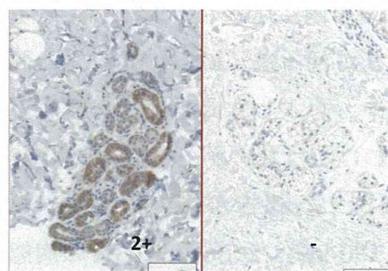


図 5

次に M3 を強制発現させた CHO 細胞の蛍光抗体染色の結果では、AIGA1 例のみに M3 結合抗体が検出され(図 6)、他の AIGA15 例は陰性であった。健常人コントロール 12 名の血清はすべて陰性であった。

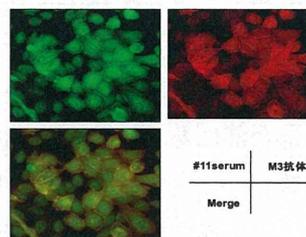


図6:患者血清(例11)とM3抗体の二重染色

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カルシウム濃度の抑制効果は明らかではなかった(図 7)。

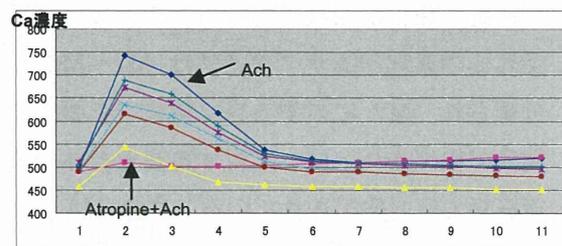


図7:Ach刺激による細胞内カルシウムの変動

### D.考察

染色条件を出来る限り一定にして免疫染色

を行った結果、皮膚汗腺の M3 発現は AIGA 例では、非 AIGA 例に比較して低下しているものが多いことが判った。M3 の発現量の評価は難しいため、必ずしも完全な統一見解が得られているわけではないが、AIGA での M3 発現低下を支持する報告が多い (J Invest Derma, 2010,130:2684-2686)。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 sudomotorfailure: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 (Neurology, 2004, 63:1476-1480)。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 (Scand J Immunol, 2003, 59:261-266)。さらに、M3 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 (Neurology, 2011,76:451-455)。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ーの構築、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 例の血清中の 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。また、症例 11 の M3 自己抗体を含めてすべての抗体で、下流のシグナルのリン酸化や細胞内カルシウム変動を有意に阻害する血清は検出できなかったことから、M3 自己抗体が AIGA の主原因である可能性は低いものと考えられた。しかし、AIGA における M3 の発現低下という現象は存在しているため、M3 のプロモーター活性を低下させるような変化、たとえば、M3 プロモーターのメチル化やコリン性蕁麻疹で局所的に高濃度になると考えられる肥満細胞由来のヒスタミンなど

の生理活性物質の影響があるのではないかと  
思われる。今後、M3 プロモーター領域の活  
性調節機構の解明が必要と思われる。

### E.結論

特発性後天性全身性無汗症(AIGA)の発症原  
因の候補分子であるムスカリニックアセチル  
コリンレセプターtype 3(M3)の発現は、AIGA  
例で相対的に低下しているものが多く、AIGA  
の病因の可能性を示唆している。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、16 例中 1 例に M3  
結合抗体を検出した。しかし、機能阻害実験  
によって M3 自己抗体が AIGA の主要原因にな  
っている可能性は低いものと考えられ、M3  
発現の低下原因を M3 プロモーターの解析に  
求める必要があると考えられる。

### F.研究発表

#### 1.論文発表

1. 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
2. Investigation of antimuscarinic  
receptor autoantibodies in patients  
with acquired idiopathic generalized  
anhidrosis.Asahina M, Sano K,  
Fujinuma Y, Kuwabara S. Intern Med.  
2013;52(24):2733-7.
3. 特発性後天性全身性無汗症(AIGA)の自  
己抗体の検討 佐野健司、朝比奈正人、  
藤沼好克、桑原 聡：発汗学 2014 in  
press

#### 2.学会発表

1. 特発性後天性全身性無汗症(AIGA)の自  
己抗体の検討 佐野健司、朝比奈正人、  
藤沼好克、桑原 聡 第 21 回日本発汗

学会総会、2013, 8,30-31, 松本

### G.知的所有権の取得状況

特にありません。

- 1) 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
- 2) 進行性尋常性白斑に対するステロイドミニパルス療法の治療効果

研究分担者 種村 篤 大阪大学医学部皮膚科 助教

#### 研究要旨

- 1) 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、表皮ランゲルハンス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。
- 2) 病変が拡大する進行性尋常性白斑症例に対するステロイド全身投与の有用性を検討した。

#### A. 研究目的

1) 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。

2) 次に、尋常性白斑診療ガイドラインで提示されている治療法は、外用療法・紫外線療法・皮膚移植術などに限られており、難治である。その中で、ステロイドの全身投与の有効性に関する報告が少なく、その位置付けが確立していないため、進行する症例に対する有効性を検討した。

#### B. 研究方法

1) 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。

#### （倫理面への配慮）

本研究におけるヒト皮膚組織の提供者、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。免疫染色・電子顕微鏡での組織検討は、診断目的に採取した皮膚組織の余剰分を用い行った。また、得られたデータは匿名化し、学会および学術論文発表においても個人を特定で

きないように配慮した。

2) 治療抵抗性の進行性汎発型白斑の6症例に対し、ステロイドミニパルス療法を行い、その治療効果を白斑の縮小を観察および色彩計を用いた色調変化を定量した。なお、ミニパルス療法は、重篤な合併症を有しない成人症例を対象とし、1日メチルプレドニゾン500mgを3日間点滴投与、1-1.5ヶ月の間隔で3クール施行するプロトコールとした。Lab値を色調変化のパラメータとし、極力季節による紫外線暴露の影響が少ない病変を選択し、研究期間中固定し治療前後で測定・比較した。

### C. 研究結果

#### 1)

- 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) Th17細胞は健常部より病変部で有意に多く浸潤していた。
- 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しているとされるが、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。

#### 2)

1) 6例全ての症例が治療を完遂した。6例中4例に病状の進行停止がみられた一方、2例では進行した。進行が停止した症例で病変の再発は出現していない。

2) 進行が停止した症例では、白斑の境界が不明瞭化し、スコア化していないものの治療に対して十分な満足が得られた。

3) 色素再生率を定量することは出来なかったが、紫外線療法後に得られる毛孔型より辺縁型色素再生が大部分であった。

4) 分光測色計でのデルタL値 (L値は白さを意味し、デルタL値は“白斑部L値-健常部L値”を表す) が、進行停止例で縮小傾向がみられた。a値の変化と病勢には相関がなかった。

今回の研究で、進行性の汎発型白斑に対し早期の全身ステロイドによる治療介入が今後の治療アルゴリズムに含有される可能性が示唆された。

### 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, Iimuro 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.
8. Hashimoto N, Tanemura A, Yamada M, Itoi S, Katayama I. Hepatitis C-related mix type vitiligo in a patient with Ivemark syndrome. *J Dermatol* 2014, Epub ahead of print (co-1<sup>st</sup> author).
9. Itoi S, Tanemura A, Kotobuki Y, Wataya-Kaneda M, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Coexistence of Langerhans cells activation and immune cells infiltration in progressive nonsegmental vitiligo. *J Dermatol Sci*, 73(1):83-85, 2014. (co-1<sup>st</sup> author).
10. Oiso N, Tanemura A, Kotobuki Y, Kimura M, Katayama I, Kawada A. Role of macrophage infiltration in successful repigmentation in a new periphery-spreading vitiligo lesion in a male Japanese patient. *J Dermatol* 2013, Epub ahead of print.

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
3. 種村 篤、楊 伶俐、金田眞理、深井和吉、鶴田大輔、片山一朗. ロドデノール含有化粧品使用后白斑における炎症性変化からの病態検討. 第 25 回日本色素細胞学会学術大会, 大阪, 2013.11.16-17

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と網状肢端色素沈着症の病態解析

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 (1) 遺伝性対側性色素異常症の原因遺伝子*ADARI*の変異スクリーニングを行うと、*ADARI*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認められる。今回は*ADARI*遺伝子の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。病因となる変異とは断定するに至らなかった。

(2) 網状肢端色素沈着症はこれまで原因不明であったが、次世代シーケンスにより原因遺伝子を*ADAM10*と同定した。本疾患の病態に*ADAM10*がどのように関わっているかを明らかにするため、皮膚での*ADAM10*の働きについて検討した。現在までに新知見は得られていない。

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

#### A. 研究目的

遺伝性対側性色素異常（*dyschromatosis symmetrica hereditaria*; DSH）は遺伝子診断により確定診断を行っているが、典型的な皮疹を持つ患者にもかかわらず、*ADARI*遺伝子の通常の遺伝子診断で検索する、*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。1症例で見つかった5'非翻訳領域（UTR）の変異候補について、*ADARI*遺伝子変異となりえるかを検討する。

#### B. 研究方法

名古屋大学皮膚科で遺伝子診断を行ったDSH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、5'非翻訳領域（UTR）にて候補変異を認めた症例のうち、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。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

NCC-melan5に導入した実験では病的変異と特定するには至らなかった。

#### D. 考察

アッセイ系の最適化とヒトメラノサイトでの検討が必要である。

## 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。

## 網状肢端色素沈着症の病態解析

### A. 研究目的

網状肢端色素沈着症（reticulate acropigmentation of Kitamura, RAK）は原因不明の遺伝性色素異常症の1つである。本疾患家系の患者および家族の協力を得て、次世代シーケンシングにより原因遺伝子を*ADAM10*と同定した。そこで、*ADAM10*が本疾患の特徴的な皮疹の形成にどのように関与しているかを明らかにするため、培養細胞および遺伝子改変マウスを用いて、皮膚における*ADAM10*の働きを検討する。

### B. 研究方法

*ADAM10*が皮膚を構成する細胞の色素細胞、角化細胞、線維芽細胞のそれぞれにどのように働いているかを検討する。*ADAM10*のsiRNAを用いて細胞内の*ADAM10*の発現抑制を行い、細胞形態やそれぞれの細胞機能に関与する遺伝子発現の変化を検討する。また、*ADAM10*ノックアウトマウスは胎生致死であることが報告されている。Cre-loxシステムを用いたコンディショナルノックアウトマウスを用いて、皮疹の出現が再現できるかどうか、また、マウス皮膚における*ADAM10*の働きを検討する。

（倫理面への配慮）

ARK患者の遺伝子診断および遺伝子改変マウスを用いた研究については名古屋大学医学部よりそれぞれ承認を受けている。

## C. 研究結果

ヒト角化細胞にsiRNAを導入して形態学的変化の検討を試みた。siRNAによる遺伝子抑制効果が乏しく、条件検討中である。また、マウスの実験は遺伝子改変マウスを入手し、交配の段階である。

## E. 結論

現在までの実験では*ADAM10*の皮膚での影響の新規知見は得られなかった。

## 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 *ADAR1* mutations including single amino acid deletion in the deaminase domain underlying dyschromatosis symmetrica hereditaria in Japanese families. Int J Dermatol (in press)
2. Sawada M, Yokota K, Matsumoto T, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Kono M, Akiyama M. Proposed classification of longitudinal melanonychia based on clinical and dermoscopic criteria. Int J Dermatol (in press)
3. Kono M et al. Dyschromatosis symmetrica hereditaria by *ADAR1* mutations and viral encephalitis: a hidden link? Int J Dermatol 52:1582-4, 2013.
4. Kono M et al. Whole-exome sequencing identifies *ADAM10* mutations as a cause of reticulate acropigmentation of

- Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. *Hum Mol Genet* 22: 3524-33, 2013.
5. Mori M, Sugiura M, Kono M et al. Clinico-pathologic Analysis of 66 Japanese Thin Melanomas with Metastasis of Sentinel or Regional Lymph Node. *J Cutan Pathol* 40: 1027-34, 2013.
6. 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.
7. Kono Met 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.
8. 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（全国規模以上）
1. 河野通浩ら.網状肢端色素沈着症は ADAM10 遺伝子変異によって発症する. 第 25 回日本色素細胞学会学術大会. 2013 年 11 月 16-17 日.吹田市.
2. 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
3. 著書
1. Kono M, Akiyama M. Dyschromatosis symmetrica hereditaria and RNA editing enzyme. In: Naoki Oiso, eds. *Current Genetics in Dermatology*. Rijeka, Croatia: InTech, 2013: 105-20.
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
発明の名称：フィラグリン遺伝子変異検出法及びその用途（出願番号：特願2013-222829、出願日：平成25年10月26日）
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 メラニンメラノサイトの細胞内小器官の1つであるメラノソーム内で作られ、近隣のケラチノサイトに受け渡される。メラニン合成に必要な蛋白は、メラノサイト内で粗面小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどを経てメラノソームに輸送される。これらのメラニン合成反応にかかわる分子や、メラノサイト内でのシグナル伝達や膜輸送に関わる分子、あるいはメラノサイトの発生や分化に関与する分子の異常などによって色素異常症が生じる。

現時点では、遺伝性色素異常症の有効な治療法はほとんどない。本研究では新規治療法を開発するために既存の薬剤を用いて研究を行い、diacylglycerol kinase (DGK)がメラニン合成に関与すること、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 阻害剤がメラノソーム形成を抑制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、将来的に治療につながることを期待される。

#### A. 研究目的

##### ①色素異常の分子機構

メラニンメラノサイトの細胞内小器官の1つであるメラノソーム内で作られ、近隣のケラチノサイトに受け渡される。メラニン合成に必要な蛋白は、メラノサイト内で粗面小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどを経てメラノソームに輸送される。これらのメラニン合成反応にかかわる分子や、メラノサイト内でのシグナル伝達や膜輸送に関わる分子、あるいはメラノサイトの発生や分化に関与する分子の異常などによって色素異常症が生じる。

現時点では、遺伝性色素異常症の有効な治療法はほとんどない。本研究では新規治療法を開発するために現存する薬剤を用いて研究を行ない、メラニン合成に影響を与えるか検

討した。

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)  $\beta$ 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ことが知られている。

ADAMs (a disintegrin and metalloprotease)は細胞膜上の増殖因子、受容体、接着分子のシェディングやインテグリンなどへの結合により、細胞の接着、運動、増殖に関与する多機能分子である。ADAM17はTNF- $\alpha$ 、TNF receptor、KIT ligand (KITL)やその受容体KITのシェディングに関与する。ADAM17のノッ

クアウトマウスでは毛の色素異常を呈し、また *ADAMI7* は東アジア人の皮膚の色調を決定する遺伝子の一つである可能性が報告されている。*ADAM10* は *CD44*、*E-cadherin*、*N-cadherin* などのシェディングに関与しており、最近、網状肢端色素沈着症の原因遺伝子であると報告された。

本研究では、*DAG* の代謝に関与する *diacylglycerol kinase (DGK)* と *ADAM* に着目し、両阻害剤のメラニン合成に対する効果を検討した。

②遺伝性対側性色素異常症 (*DSH*) の遺伝子診断と病態解析

*DSH* 症例の遺伝子診断を行い、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病態を解析した。

## 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、メラニン量、チロシナーゼ活性、およびメラニン合成関連分子の発現などに対する効果を検討した。また、*RNA* 干渉により同様に検討を行った。

(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* 阻害剤は低濃度ではチロシナーゼ蛋白の発現のみを抑制しメラニン量を減少させるが、高濃度では *MITF* の発現を抑制し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*) の発現にも影響を与え、メラノサイトの細胞増殖を抑制した。

*ADAM* 阻害剤はヒトメラノサイトのメラニン量を低下させ、マウス *B16F10 cell* において  $\alpha$  *MSH* 誘導性のメラニン合成を抑制した。電子顕微鏡で観察したところ、阻害剤で処理した細胞では *stage II*、*III* のメラノソーム数が減少していた。このことから *ADAM* 阻害剤はメラノソーム形成に関与する可能性が示唆され、現在、*siRNA* による *knockdown* 実験や機能解析を行なっている。

*DSH* 症例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、*non-sense* または *frameshift* により *deaminase domain* が欠失する変異であるが、今回 *dsRNA binding domain* に *missense* 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 *ADARI* 遺伝子をノックダウンすることが可能であった。

## 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.
  6. Kawaguchi M, Suzuki T. Gene expression and in situ localization of ADAM17 during skin wound healing. *Int J Dermatol*. 2013 Jul 8. doi: 10.1111/ijd.12119.
  7. Kawaguchi M, Suzuki T. ADAM17 is involved in the regulation of chemokine expression in keratinocytes. *Int J Dermatol*. 2013 Jun 20. doi: 10.1111/ijd.12090.
  8. 川口雅一, 鈴木民夫. 遺伝性色素異常症のスキルアップ「診断のポイントと最新の知見」. *MB Derma* 203, 79-84, 2013
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24回日本色素細胞学会, 那覇市, 2012.12.7

4. Masakazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Tamio Suzuki: ADAM protease inhibitor regulates chemokine expression in human keratinocytes, and modulates melanogenesis in human melanocytes. International Investigative Dermatology, Edinburgh, Scotland, 2013.5.8-11
5. 川口雅一: 色素沈着のメカニズム. 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演, 横浜市, 2013.6.14
6. 川口雅一、穂積 豊、鈴木民夫: ADAM プロテアーゼ阻害剤はヒトメラノサイトの melanogenesis を調節する. 第25回日本色素細胞学会学術大会, 大阪市, 2013. 11.16

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

さまざまな遺伝性・母斑性・多因子性色素異常症の病態解明

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 色素異常症にはさまざまな遺伝性・母斑性・多因子性の疾患が存在する。その多くは難治性であり、いまだ病態が解明されていない疾患が数多い。病態を解明し、新規治療法の開発が求められている。われわれは、希少なさまざまな遺伝性・母斑性・多因子性色素異常症を症例ごとに基礎研究的手法を用いて病態を解析した。本研究で解明された結果は今後の難治性色素異常症の治療法開発の基盤になりうる。

A. 研究目的

色素異常をきたすマウスモデルは800種類以上知られている。すなわち、マウスでは色素に関連する遺伝子は800以上存在する。一方で、ヒトにおいて、さまざまな遺伝性・母斑性・多因子性色素異常症が知られているが、800以上もの疾患は知られていない。色素異常症を理解するために、まだまだ病態解明が必須であることを意味する。われわれは、さまざまな遺伝性・母斑性・多因子性色素異常症の病態を症例ごとに解析し、その結果を積み重ねることで、疾患ごとの病態解明を試みた。対象疾患として、遺伝性色素母斑・cutis tricolor・linear atrophoderma of Moulin、多因子性として尋常性白斑・erythema discromicum perstans・idiopathic eruptive macular pigmentation とした。

本研究での研究成果を基盤とし、尋常性白斑の本邦・国際斑会議に参加し、診断基準と診療ガイドライン策定に関与した。さらに、新規知見を含めた概説を作成し、近年の研究

成果の普及に努めた。

B. 研究方法

皮膚生検標本を用いて免疫染色・蛍光染色による病理学的検討ならびに電子顕微鏡を用いた検討を実施した。末梢血からゲノムDNAを抽出し、遺伝子解析を実施した。

（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。

遺伝子解析は近畿大学医学部遺伝子倫理委員会で承認された方法で実施し、患者もしくは親権者からの同意書に記載を得た。

C. 研究結果

（1）遺伝性色素異常症

まだら症

完全色素脱失部の色素再生は、エクリン汗管に存在する幹細胞から分化するメラノサイトに由来する可能性を示した。今後はこの分化

機構を解明していくことで、治療法開発に結びつく。

## (2) 母斑性色素異常症

### 色素性母斑

足底の色素性母斑と悪性黒色腫はダーモスコピーを用いることで鑑別しやすい。色素性母斑は平行皮溝パターン、悪性黒色腫は平行皮丘パターンをとる。平行皮丘パターンを示した足底色素性母斑の病理組織学的特徴を解析した。

### cutis tricolor

一側に色素脱失性の母斑疾患と反対側に色素増強型の母斑疾患を有する症例は cutis tricolor とされる。染色体異常で発症する。胎生初期で生じると、発育異常や精神遅滞を併発し、胎生のやや遅く生じると皮膚病変のみとなる。本邦でも cutis tricolor の症例があることを示した。

### linear atrophoderma of Moulin

linear atrophoderma of Moulin は小児期もしくは思春期に生じるブラシュコ線に沿って発症する萎縮した皮膚と色素沈着を特徴とする。近年、色素脱失型も報告されている。色素沈着斑をとまなう色素脱失型を経験し、ダーモスコピーと病理組織学的に検討した。表皮・真皮の構築異常とメラノサイト分布とケラチノサイトへのメラニン供給異常を明らかにした。

## (3) 多因子性色素異常症

### 尋常性白斑：ケブネル現象について

尋常性白斑はケブネル現象を生じることが知られているが、乾癬と比べてその発症初期の臨床的特徴は知られていない。われわれは猫に腕を繰り返して引っかかかれている患者の初期病変をダーモスコピーで解析し、創部の深さとケブネル現象発生との関連性を明らかにし

た。

尋常性白斑：速やかな色素再生とともに治癒した undetermined / unclassified vitiligo 組織学的に検討した。発症初期の病変部真皮へのマクロファージの著明な浸潤が、色素再生と免疫寛容を誘導に重要である可能性を示唆できた。色素再生機構解明は治療戦略開発に向けて、重要な所見を得たと考えている。

### erythema discromicum perstans (EDP)

小児例では電子顕微鏡を用いて解析した結果、幼弱で未熟なメラノソームがメラノサイトからケラチノサイトへ転送される所見とメラノサイトとケラチノサイトの接着がかなり未熟になっていることを明らかにした。

EDP と annular lichenoid dermatitis of youth (ALDY) を併発している症例を病理組織学的に検討し、両者がオーバーラップする疾患であることを示した。

ブラシュコ線に沿う EDP 症例を提示し、EDP 発症に遺伝的素因が関与しうることを示した。

### idiopathic eruptive macular pigmentation (IEMP)

クリスマスツリー状に分布する IEMP 症例を報告した。EDP はブラシュコ線に沿い、遺伝的影響が大きい可能性があり、IEMP は環境的影響が大きい可能性を示した。

EDP と IEMP は鑑別困難な症例があり、分布の違いが診断に役立つ可能性を示した。

## D. 健康危険情報

特記事項なし

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Makino T, Yanagihara M, Oiso N,

- Mizawa M, Shimizu T. Repigmentation of the epidermis around the acrosyringium in piebald skin: an ultrastructural examination. *Br J Dermatol* 2013; 168(4): 910-912.
2. Oiso N, Kawada A. Acral melanocytic nevus of the sole with the parallel ridge pattern. *Eur J Dermatol*, in press.
  3. Oiso N, Matsuda H, Kawada A. Cutis tricolor of pure cutaneous trait as leukoderma and nevus spilus. *J Dermatol* 2013; 40(6): 490-491.
  4. 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.
  5. Oiso N, Kawada A. House cat scratch-induced linear vitiligo as Köbner phenomena. *J Dermatol* 2012; 39(9): 798-799.
  6. Oiso N\*, Tanemura A\* (\*co-first authors), Kotobuki Y, Kimura M, Katayama I, Kawada A. Role of macrophage infiltration in successful repigmentation in a new periphery-spreading vitiligo lesion in a male Japanese patient. *J Dermatol* 2013; 40(11): 915-918.
  7. Oiso N, Tsuruta D, Imanishi H, Kobayashi H, Kawada A. Erythema dyschroicum perstans in a Japanese child. *Pediatr Dermatol* 2012; 29(5): 637-640.
  8. Oiso N, Kawada A. Erythema dyschroicum 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* 2012; 22(6): 793-794.
  9. Oiso N, Kawada A. Erythema dyschroicum perstans with both a macular lesion and a linear lesion following the line of Blaschko. *J Dermatol* 2013; 40(2): 127-128.
  10. Oiso N, Kawada A. Idiopathic eruptive macular pigmentation following a Christmas tree pattern. *J Dermatol* 2013; 40(11): 934-935.
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)
  2. 大磯直毅. 教育講演 臨床医にとっての研究 基礎研究の手技を用いた色素異常症の病態解析、第 112 回日本皮膚科学会総会 平成 25 年 6 月 14 - 16 日、横浜市
  3. 大磯直毅. 教育講演 わかりやすい色素異常症 尋常性白斑研究と臨床的意義、第