

Fig. 1. Clinical features of Patient 1 (a, b, c), Patient 2 (d, e, f, g) and Patient 3 (h, i, j, k). Patient XPV18KO (Patient 1) at the age of 11 years (first visit to our hospital) (a), at 14 years of age (b) and at 16 years of age (c). His eyes did not appear red. Patient XPV19KO (Patient 2) at her first visit to our hospital (d, e, f): She had freckles on sun-exposed skin areas, including those regions of skin not covered by a bathing suit, such as her upper back and shoulders. Patient 2 developed basal cell carcinoma at the tip of the nose (g). Patient XPV9KO (Patient 3) displayed very subtle pigmented freckles on sun-exposed areas at her first visit at the age of 13 years (h, i), which increased in number over 1 year. After 14 years of age, she began to practice strict avoidance of sun exposure, which ensured that the extent of her pigmented freckles was limited (j, k). Her eyes did not appear red.

Co, Yokosuka, Japan) sunlamps, and the dose required to cause faint but discernible erythema was determined according to the standard photo-testing methodology (5).

Cell culture

Primary cultured fibroblasts were grown from skin biopsy specimens obtained from the patients. Normal fibroblasts were obtained from a healthy 26-year-old female volunteer

(6). All cell strains were maintained as previously described (6). Skin biopsies were performed after obtaining the written informed consent from the patients or their families.

UVC irradiation

Germicidal lamps emitting predominantly 254 nm light (Toshiba GL10, Toshiba Electric Co) were used as a source of UVC. Fluence rates were measured by UV radiometers

(UV-254, Topcon, Tokyo Kogaku Kikai KK, Tokyo, Japan), as previously described (6).

Post-UV colony formation assay in the presence or absence of caffeine

Cellular sensitivity to UVC was examined by measuring colony-forming ability after UVC irradiation, as previously described (6). Colony-forming ability after UVC irradiation in the absence of caffeine was compared with that in the presence of 1 mM of caffeine.

Semiquantitative detection of POLH protein

POLH levels were assessed using IP followed by Western blotting, as previously described (6).

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from primary fibroblasts using a standard method. Each exon (Exons 1 through 11) of *POLH* and the flanking sequence were amplified from genomic DNA as previously described (6).

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) and direct sequencing of the PCR products

Total RNA was extracted from cultured fibroblasts using TRIzol reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), following the protocol described by the supplier. One microgram of total RNA was reverse transcribed with SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer. The cDNA was amplified using primers RT-E5F: 5'-TTGTGGAAGGAAATGAGAGCA-3' and RT-E8R: 5'-GTTGCCTGGGTTTAAC TGG A-3' encompassing exons 5 through 8, and primers RT-E8F: 5'-TCCAGTTAAACCCAGGCAAC-3' and RT-E11R: 5'-TGCTCAAGAAGCTGGTGATG-3' encompassing exons 8 through 11 of the *POLH* mRNA. The amplified products were purified and directly sequenced with RT-PCR primers.

RESULTS

Normal MED in all three patients

The MED for Patient 1, Patient 2 and Patient 3 were 100 mJ/cm², 150 mJ/cm² and 100 mJ/cm², respectively. None of the patients experienced prolonged erythema, indicating that the MED for all three patients was within the normal range. The MED range for healthy Japanese subjects at our institution is 60–140 mJ/cm².

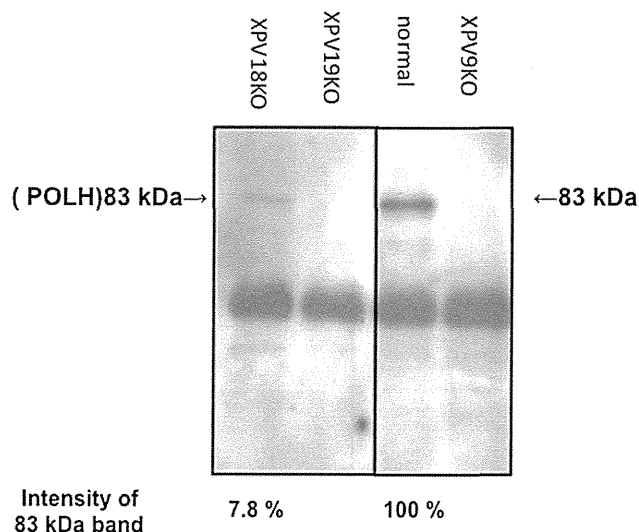


Fig. 2. Detection of POLH protein by immunoprecipitation for Patient XPV18KO. A very faint 83 kD band was detected for Patient XPV18KO (lane a), whereas no band was detected for Patients XPV19KO (lane b) and XPV9KO (lane d). A strong 83 kD band was detected in control cells (lane c).

Reduced POLH protein

Given the clinical features observed in these patients, XP-V or XP-E was suspected. First, the presence of the POLH protein was analyzed using IP. No POLH band was detected for XPV19KO (Patient 2) or XPV9KO (Patient 3). However, a very faint band for POLH was detected for XPV18KO (Patient 1). Semiquantification using densitometry indicated that the expression of POLH for XPV18KO was 7.8% of the normal expression level (Fig. 2).

Caffeine test

Because a small amount of POLH protein was detected for XPV18KO, a caffeine test was performed. Colony-forming ability was calculated as the plating efficiency at each dose relative to a plating efficiency of 100% in non-UV conditions. Each point represented the mean of four samples.

In the post-UV colony-forming assay, XPV18KO displayed normal sensitivity to UV without caffeine but hypersensitivity to UV in the presence of caffeine (Fig. 3). This was strongly suggestive of XPV18KO being a XP-V.

Genetic analysis

Direct sequencing of the genomic DNA of XPV18KO (Patient 1) revealed a heterozygous 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9 (Fig. 4a). To examine whether this

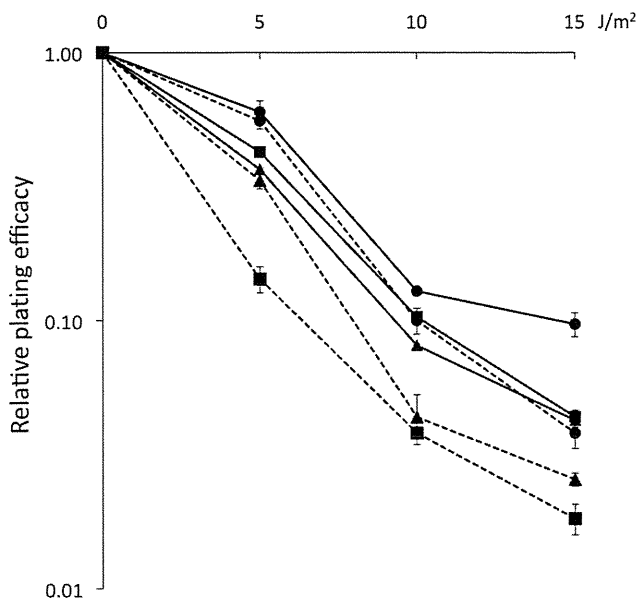


Fig. 3. Caffeine test. Post-UV sensitivity was assayed using colony formation with or without caffeine (1 mM) in the medium. Cells from Patients XPV18KO and XPV19KO were hypersensitive to UV in the presence of caffeine, whereas they showed almost normal sensitivity to UV in the absence of caffeine. Symbols indicate: --■-- Normal without caffeine; —■— Normal with caffeine; --●-- XPV19KO without caffeine; —●— XPV19KO with caffeine; --▲-- XPV18KO without caffeine; —▲— XPV18KO with caffeine. Error bar indicates the standard error of the four samples.

deletion causes aberrant splicing, we examined the cDNA sequence of XPV18KO. RT-PCR of the mRNA isolated from XPV18KO using the RT-E8F and RT-E11R primers revealed two bands for XPV18KO, whereas only one band was amplified from a control subject (Fig. 4b). Bands A and B were excised from the gel and sequenced. The size of band A was 413 bp (also present in the control subject), and its sequence was identical to control *POLH* cDNA sequence. The size of band B was 347 bp, which was 66 bp shorter than the control sequence. This indicated skipping of exon 9 because of a 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9 [c.1246_1311del66 (del exon 9)]. Cells from XPV18KO possessed a heterozygous single nucleotide polymorphism (SNP; rs6941583 A > T) in exon 11 (data not shown). In addition, RT-PCR using the RT-E5F and RT-E8R primers revealed two bands (Fig. 4d); one was 357 bp (consistent with control size) and the other was 253 bp (104 bp shorter than control size). Direct sequencing of this smaller amplicon revealed that the entire exon 6 was excluded, causing a frameshift at codon 221 that results in premature termination at codon 223 [c.661_764 del104 (del exon 6)]. Genomic sequencing of DNA from the

patient's parents revealed that his father harbored the 26 bp deletion in intron 9 and SNP rs6941583 A > T, but his mother did not possess either of these mutations. We could not confirm whether his mother had an exon 6 deletion in her cDNA because we could not obtain her fibroblasts. XPV19KO (Patient 2) had the compound heterozygous mutations of G490T and C1066T (Supporting Information Fig. S1a).

DISCUSSION

We presented three cases of school-age children with XP-V that were diagnosed genetically before the development of skin cancer and presented 2–9 years of follow-up of the patients. One case (Patient 3) had already been diagnosed in a previous study, and the other two cases were diagnosed in the present study. We identified a mutation in XPV18KO that has not yet been reported. Although none of the three patients had developed skin cancer at the time of their first visit, the distribution of pigmented freckles, the large variation in the color and shape of pigmentation and the annual but not seasonal increase in the number of these freckles was strongly suggestive of the diagnosis of XP. The MED for all three patients was within the normal range, which was consistent with the lack of severe sunburn. Consequently, all three patients grew up without protection from sunlight. Furthermore, Patient 1 and Patient 2 spent long hours outdoors performing activities (soccer and swimming, respectively). This provides strong evidence to confirm that they had not experienced severe sunburn, as was asserted by both patients and parents. Slight freckling on sun-exposed areas is the only evidence for XP-V diagnosis in childhood before the development of typical clinical features, including prominent freckling, xerotic skin and skin cancers.

From the clinical features, we strongly suspected XP-V, which prompted us to detect *POLH* expression and perform genetic analysis of *POLH*. The *POLH* protein band for XPV18KO was of normal size, but its signal intensity was decreased relative to control levels. As we reported previously in our IP system for *POLH*, the 83 kD band is not detected in most XP-V cases, possibly because of the use of mouse monoclonal antibody (sc-17770) against *POLH*, which recognizes the C-terminal end of *POLH* (amino acids 412–712). A caffeine test showed that the post-UV cellular sensitivity of Patient XPV18KO increased by adding caffeine to the medium, suggesting that Patient XPV18KO has XP-V. If a faint band is detected by the *POLH* IP assay, the caffeine test is a useful method for XP-V diagnosis.

A novel mutation was discovered in Patient XPV18KO, namely a 26 bp deletion at the 5' splice site of intron 9

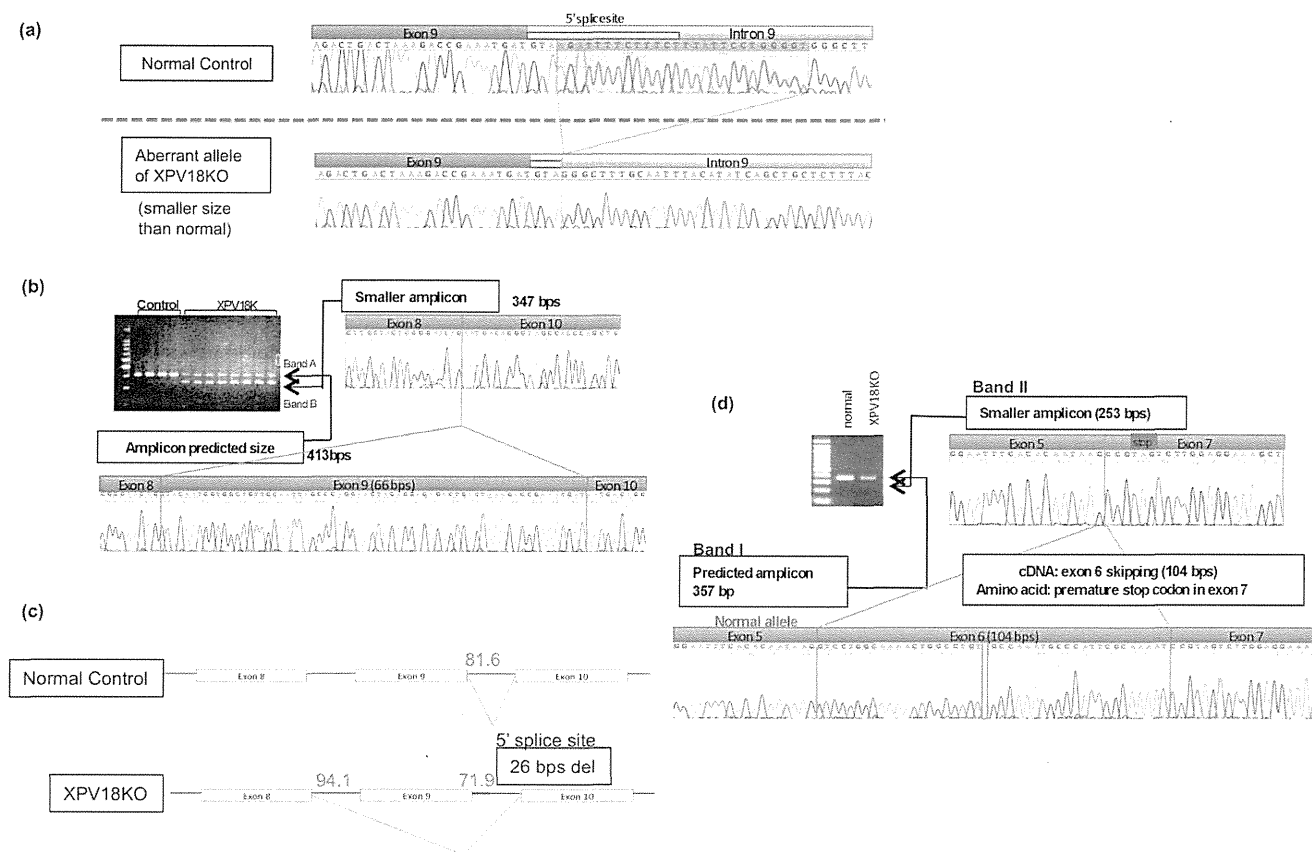


Fig. 4. Genomic and cDNA sequences of *POLH* for Patient XPV18KO. (a) Genomic DNA sequence of Patient XPV18KO reveals a heterozygous 26 bp deletion (AGATTTTCTTTCTTATTCTCTGGGGGGT) at the 5' splice site of intron 9; (b) *POLH* cDNA reverse transcription-PCR (RT-PCR) (exons 8–11) for Patient XPV18KO revealed exon 9 skipping (66 bp) in 1 allele; (c) calculation of Shapiro's splicing probability indicated that intron 8 is a more accessible splice site than the mutated intron 9, resulting in exon 9 skipping; (d) RT-PCR of exons 5–8 revealed that Patient XPV18KO had a deletion of exon 6 in the heterozygous state.

(Fig. 4a), which caused aberrant splicing that resulted in the skipping of exon 9 (Fig. 4b). According to the splicing probability score (7), the mutated splice site in intron 9 would serve as a less accessible donor site than the splice donor site in intron 8 (Fig. 4c). This novel mutation was inherited from the patient's father. The other allele contained a complete deletion of exon 6, which was the same type of mutation reported in two German XP-V patients (8, 9). XPV19KO (Patient 2) harbored compound heterozygous mutations of G490T and C1066T (Supporting Information Fig. S1b), which were exactly the same compound heterozygous mutations as in Patient XPV2TK in our previous study. The former mutation is one of the four founder mutations in Japanese patients with XP-V (5), and the latter mutation is found in both Japanese and European patients with XP-V. Patient 3 had a homozygous single nucleotide deletion (5) that caused a premature termination at codon 584 outside the catalytic domain (Supporting Information Fig. S1b).

The predicted *POLH* protein sequences of the three patients are summarized in Fig. 5. Kraemer reported that in Patient XP3GO, a homozygous deletion of exon 6 was absent for the *POLH* IP band, which implies that the faint band present in Patient XPV18KO may be caused by exon 9 skipping because the predicted protein of this mutated allele possesses 691 amino acids, missing only 22 amino acids in the heterozygous state, and it contains the antigen recognition sites for the monoclonal antibody (sc-17770) against *POLH*.

Though all of the patients were referred to us as school-age children because of an increase in pigmented freckles, their clinical features were very different. Patient 2 developed pigmented freckles at 2 years of age, and her freckle-like pigmentation was already prominent at the age of 11; she developed BCCs at the ages of 12 and 13. In contrast, pigmented freckles were noticed at 4–6 years of age in Patients 1 and 3. Their pigmented freckles were subtle at their first visit, and they had not developed skin cancer by

Predicted POLH protein

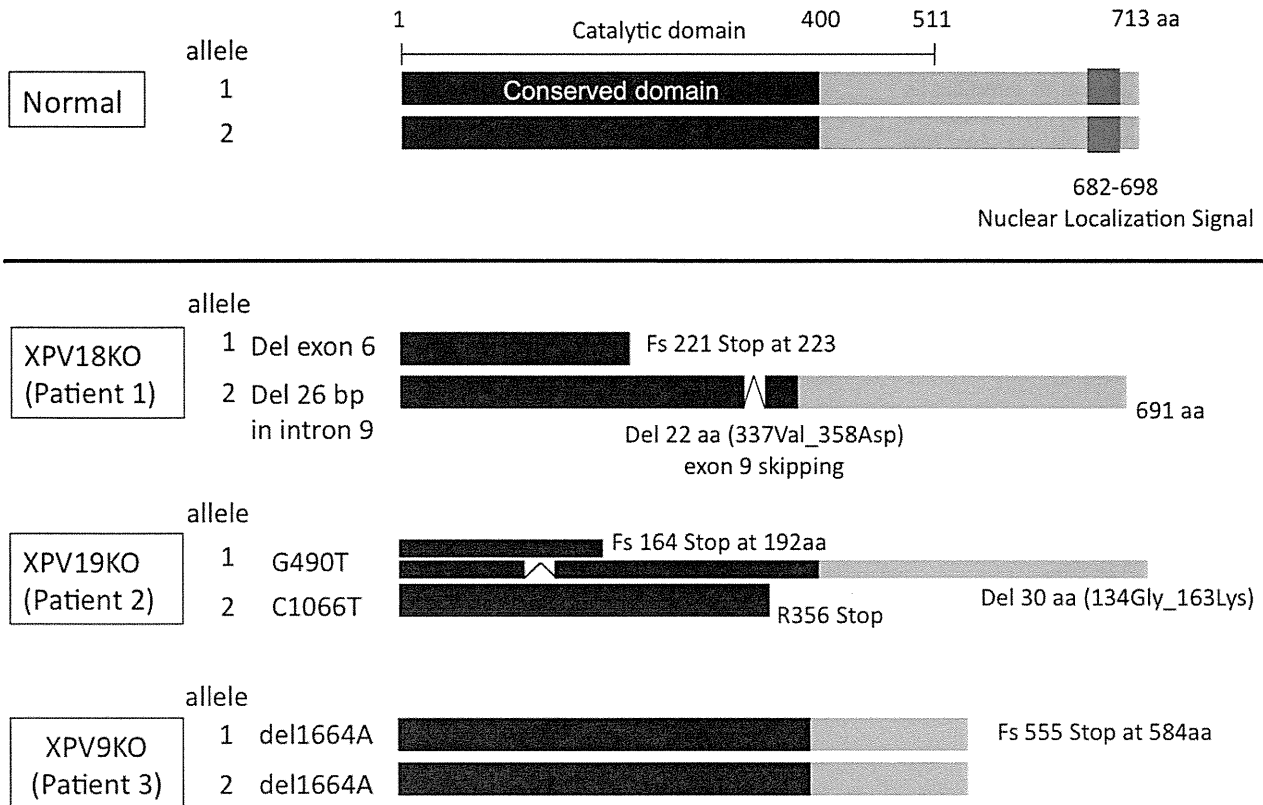


Fig. 5. Predicted POLH protein sequence for each patient.

the ages of 16 and 21, respectively. This difference may be because of the greater cumulative extent of sun exposure for Patient 2 before diagnosis.

XP-V patients rarely experience sunburn. Nonetheless, they develop pigmented freckles that are limited to sun-exposed skin areas. A longer duration is required for school-age children to accept their disease. Patient 1 did not make any effort to avoid sun exposure before a genetic diagnosis was made; this led to a great increase in the number of pigmented freckles over 3 years (Fig. 1b). It is difficult to convince the 16-year-old boy to apply sunscreen although he is conscious of his disease (Fig. 1c). Patient 3 began practicing strict sun protection 1 year after the genetic diagnosis, which prevented an increase in freckle-like pigmentation and the development of skin cancer by the age of 21 (Fig. 1j, k). The early diagnosis of XP-V for school-age children is extremely important because they often spend time outdoors.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully thank Dr Ken Kraemer for his critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Genomic sequence analysis of *POLH* for Patient 2 (XPV19KO) and Patient 3 (XPV9KO). (a) Genomic DNA sequence for Patient XPV19KO revealed compound heterozygous mutations in *POLH*: G490T at the 3' end of exon 4 and C1066T in exon 9. Both mutations are previously reported founder mutations in Japanese patients with XP-V. (b) Patient XPV9KO had del1661A in exon 11 in a homozygous state.

REFERENCES

1. Masutani C, Kusumoto R, Yamada A *et al.* The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 1999; **399**: 700–704.
2. Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ *et al.* Molecular analysis of mutations in DNA polymerase η in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 815–820.
3. Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S *et al.* Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res* 2006; **601**: 171–178.
4. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M *et al.* Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* 2008; **7**: 744–750.
5. Masaki T, Ono R, Tanioka M *et al.* Four types of possible founder mutations are responsible for 87% of Japanese patients with Xeroderma pigmentosum variant type. *J Dermatol Sci* 2008; **52**: 144–148.
6. Tanioka M, Masaki T, Ono R *et al.* Molecular analysis of DNA polymerase η gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 1745–1751.
7. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 7155–7174.
8. Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G. Molecular genetics of xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol* 2003; **12**: 529–536.
9. Inui H, Oh KS, Nadem C *et al.* Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2055–2068.

光線過敏症検査

Key
Words

・光線過敏症
・最少紅斑量
・光パッチテスト
・誘発テスト
・作用波長

佐藤純子*・上出良一*

光線過敏症の診断では、まず光線が関与した病態であるかを皮膚症状、病歴における光線曝露との相関から推察する。問診では、発症年齢、光感作物質(薬剤、化粧品)の摂取・接触、症状発現季節、耐性化(hardening)現象の有無、日光曝露から症状発現までの時間、皮疹の持続時間、窓ガラス越しの光線で発現するか、日焼け止めの効果、家族歴、既往歴(膠原病・肝疾患・神経症状等)が重要である。特に、露出部と光線曝露部とは異なることを念頭に、光線曝露量に応じた皮膚症状があるかを、非露光部には症状がないことも確認しつつ詳細に視診を行う。そのうえで皮膚症状の特徴、好発年齢、光感作物質との接触・摂取歴を考慮して疑われる疾患を想定しつつ鑑別を進める。光線テストでどのような波長に過敏症を示すのか、すなわち作用波長を知ることが診断のみならず、光線防御のうえでも重要である。紫外線領域ではUVB、UVAの最少紅斑量測定が必要である。

1 光線過敏症の分類と診断手順

光線過敏症の病因は多彩であり、遺伝性、アレルギー性、毒性など多岐にわたる。さらに光線により増悪する疾患もある。光線過敏症の鑑別診断を行う際には、まず症状、経過から徹底的に光線過敏症を除外し、除外しきれないときに初めて光線過敏症を疑う。光線過敏症は年齢別に好発疾患があるので、個々の光線過敏症の臨床的特徴をあてはめて、臨床診断を下し、それを確定するために必要な検査を行うというのがもっとも確実な診断手順である¹⁾。光線過敏症の範疇に入る疾患であることが程度把握されたら、光線テストで過敏性の有無、作用波長の決定、内服照射誘発テストなどを行い、また光アレルギー検出のため光パッチテストを行い、さらに必要であれば遺伝子検査なども行い確定診断に至る²⁾。以下、光線過敏症の検査として行う頻度の高い最少紅斑量の測定と、光パッチテストについて手技を概説し、さらに個別の疾患で必要となる諸検査を各疾患の好発年齢別に述べる。

2 よく行われる光線過敏症の検査

1) 光線テスト—最少紅斑量(minimal erythema dose; MED)

i. 測定機器

UVB、UVAのMEDの測定が必要である。光源としては蛍光灯が簡便でよい。UVB領域はSEランプ、UVA領域はBLまたはBLBランプを用いる〔Dermaray M-DMR 100型(クリニカル・カルサブライ、販売終了)、デルマレイ 320型(テルモ・クリニカルサブライ)〕。その放射照度(照射率)をモニターするため蛍光灯のスペクトラム特性に合わせた紫外線強度計〔デルマレイ UVメーター(テルモ・クリニカルサブライ)〕で測定する。Narrow band UVBのTL100W/01TL101ランプは311 nmにのみピークをもつため、光線テストには不適當である。Broad band UVBを放射するSEランプが装着されている照射装置がなくなりつつあるので、新型への更新時に廃棄しないよう注意が必要である。蛍光灯はその特性上、点灯直後は出力が安定しな

* Jyunko SATO & Ryoichi KAMIDE, 東京慈恵会医科大学附属第三病院皮膚科

● 別刷請求先 ● 佐藤純子: 東京慈恵会医科大学附属第三病院皮膚科(〒201-8601 東京都狛江市和泉本町 4-11-1)

い。堀尾らの M-DMR 100 型を用いた詳細な検討によれば、照射率が安定するまでに点灯後 20 分を要したという³⁾。照射に際しては照射野の中心部を使用するのが当然であるが、中心より半径 15 cm 以内であればほぼ均一な照射が得られる。UVA 蛍光ランプは無視できない量の UVB を含んでいるため、厚さ 5 mm のガラス板をフィルター代りに用いれば、照射率は約 30% 減弱するが、UVB はほぼ完全に除去できる。紫外線強度計も 1 年に 1 回は校正しておく。

太陽光線に類似したスペクトラムをもつキセノンランプを光源としたソーラーシミュレータ(バイオソーラーシミュレータ、WACOM)が市販されている。干渉フィルターとシャープカットフィルターの組合せにより太陽光類似、UVB、UVA、可視光線を照射できる。モノクロメーターがあればさらに詳しく作用波長の検討ができるが、高価で保守も容易ではない。

ii. 測定方法

背部に段階的に時間を変えて照射する。コントローラーがついた電動式のメドオート 2 (テルモ・クリニカルサプライ)を用いるのが簡便である。24 時間後に判別しうる紅斑を示した最少の照射量を MED とする。MED の値は時間で表すのではなく、照射量 (mJ/cm^2 や J/m^2) で記載する。MED 測定は作用波長の決定、光パッチテストに際しての照射量の決定にも必要な情報である。

生じる紅斑は色素性乾皮症ではサンバーン反応であるが、光線過敏型薬疹、慢性光線性皮膚炎、多形日光疹などでは紅斑の機序は個々の疾患独自のもの、サンバーン反応以下の照射で生じている。そのため厳密な立場を取る場合には、後者の場合、最少反応量 (minimal response dose : MRD) とすべきという意見もある。しかし、一般的には機序は何であれ、紅斑を生じた最少量を MED とすることが多い。

2) 内服照射試験

光線過敏型薬疹で行う。常用量 1 回分あるいはそれより少量を内服後、1～2 時間後に MED を

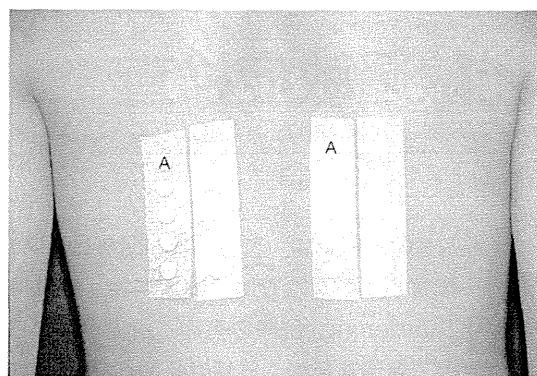


図 1 光パッチテストにおける試料貼布

測定のために通常 UVA 照射を行い、24 時間後に MED 低下をみれば陽性とする。薬剤によっては数日間内服後に照射しないと、異常を検出できない場合がある。

3) 可視光線テスト

可視光線に対して過敏性を示すことがある日光蕁麻疹、慢性光線性皮膚炎で検査する必要がある。光源としてはソーラーシミュレータ、スライドプロジェクタ(ハロゲンランプが光源で、これも最近使われなくなっており、1 台確保しておくとうい)が用いられる。後者では背部から 30～50 cm 離して照射する。可視光線領域の作用波長は何種類かのシャープカットフィルター (HOYA、東芝)を用いれば 10 nm 刻みでさらに詳しく調べることができる。

4) 光パッチテスト

光パッチテストは光接触皮膚炎、光線過敏型薬疹、慢性光線性皮膚炎、多形日光疹などで、光アレルギー、接触アレルギーなどの関与を知るために行われる。手技はヨーロッパで標準化されたものが推奨されている⁴⁾⁵⁾。背部両側に左右が対になるようフィンチャンバー[®]で試料を貼布し(図 1)、1～2 日後に剥がして接触アレルギーの有無を確認する。試料の貼付は 2 日間行うほうが 1 日の貼付よりも偽陰性反応が少ない⁶⁾。片側は非照射部位として遮光性のあるテープでカバーし、対

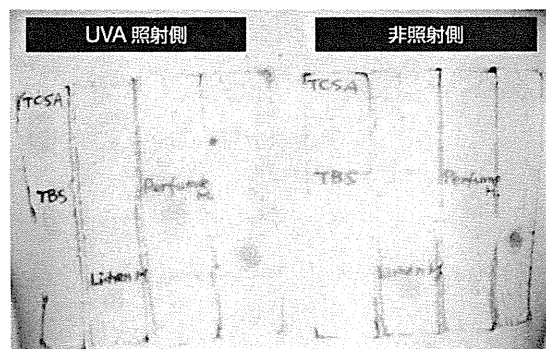


図2 光パッチテストの結果
UVA照射2日後。TCSA、TBSが光パッチテスト陽性。香料ミックス (Perfume M)、ライケンミックス (Lichen M) は接触皮膚炎。
TCSA: tetrachlorosalicylanilide
TBS: tribromosalicylanilide

表1 光パッチテストの結果判定

| 試料 | UVA 照射側 | 非照射側 | 判定 |
|----|---------|------|----------------------------------|
| A | + | + | 接触アレルギー / masked photopatch test |
| B | + | - | 光接触アレルギー |
| C | ++ | + | 接触アレルギー + 光接触アレルギー |

側にUVAを 5 J/cm^2 照射する(ただし、UVA-MEDが 5 J/cm^2 以上の場合)。MEDが低い場合はそれ以下とする。作用波長がUVB領域の試料もありうるが、ほとんどの場合UVA照射のみで検出される⁷⁾。背部は不用意な光線曝露を避けるため、外出時は厚めの上着を着用してもらい、照射2日後に光接触アレルギーの有無をICDR基準で判定する(図2)。非照射部位が陰性で照射側のみ陽性的場合、光パッチテスト陽性とし、臨床像との関連を吟味する。照射、非照射にかかわらず陽性的場合は接触アレルギー、両者陽性であるが、照射側の反応が強い場合は、接触アレルギーと光接触アレルギーが共存していると解釈する。なお、非照射側が不要に日光曝露を受けると偽陽性反応を示すことがあるので、遮光に留意する(masked photopatch test)(表1)。UVA-MEDが極端に低下しているときは、照射野全体に紅斑が生じることがある。照射量をMED以下になるよう少なくして再度検査するか、全体的な紅斑の中で貼布部位のみ強い皮膚反応を示していれば、光アレル

ギー反応の可能性が高い。なお、至適濃度が未知の薬剤などの場合、光毒性反応を否定するため、照射30分後に照射部位の観察をしておく。

3 光線過敏を起こす疾患と検査

1) 小児期に好発する光線過敏症

a) 色素性乾皮症

色素性乾皮症は紫外線によって生じたDNA損傷の修復機構の異常により発症する高発癌性光線過敏症であるとともに神経変性をきたすこともある。常染色体劣性遺伝形式をとる。現在A群～G群まで7つの除去修復欠損群と、除去修復は正常であるが複製後修復に異常があるバリエーション(V)群の8型が知られている。本邦ではA群とV群が多い。A群は乳幼児期から激しいサンバーンを繰り返した後、顔面などの露光部に雀斑が多発する。A群では著明なMEDの低下がみられ、照射後反応のピークが3日後くらいまで遷延することが多いため、最低3日間は毎日判定する(図3)。バリエーションではMEDは正常で異常なサンバーン反応は生じない。それ以外の中間型(B～G群)はA群よりは弱いですが、MED低下を示す。

確定診断には生検皮膚から線維芽細胞を培養して行う紫外線致死感受性や不定期DNA合成能、相補性テストが必要となるが、最近ではDNA診断も行われる。紫外線照射後のDNA修復傷害をみるために不定期DNA合成能(unscheduled DNA synthesis: UDS)を測定する。色素性乾皮症A.B.C.D.F.G群では低下がみられるが、E群とバリエーションでは保たれている。バリエーションでは複製DNA合成能の回復(recovery of replicative DNA synthesis: RDS)が低下しており、それはカフェインの添加でさらに顕著となる。各相補性群の診断には従来レファレンスとなる細胞を用意しておき、被検患者細胞と融合させてUDSを測定し、別群同士では相補してUDSは回復するが、同群の細胞同士では相補しないためUDSが回復しないということで決定していた。最近では各群の原因遺伝子がクローニングされたため、紫外線

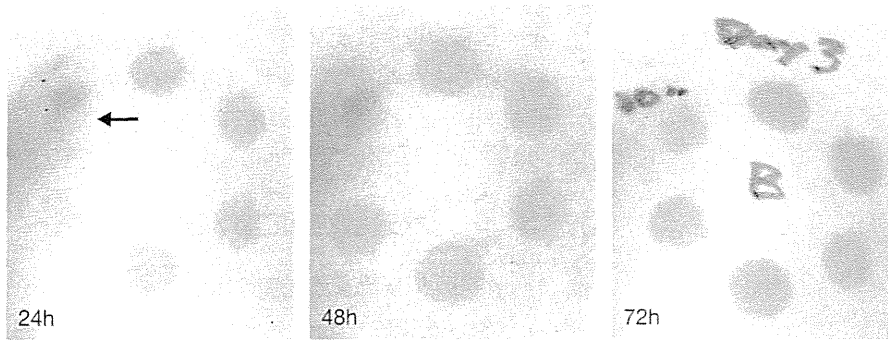


図3 最少紅斑量 (MED) 測定の結果

色素性乾皮症 A 群。MED の値はきわめて低下しているとともに、さらに日を遡うごとに MED の値が低下している。

照射したレポータープラスミドの宿主細胞回復能を指標にする方法が使われるようになってきている⁸。A 群では人種ごとに変異のホットスポットが限定されるので、PCR-RFLP 法で簡便で迅速に診断できるようになった。現在、これらの検査は遺伝学的検査 (4000 点) として保険取載されており、神戸大学医学部皮膚科 (錦織千佳子教授)、大阪医科大学皮膚科 (森脇真一教授) などの専門施設で検査可能である。

b) 骨髄性プロトポルフィリン

ヘム代謝系の FECH 遺伝子異常により、プロトポルフィリンノーゲンⅨからヘムへの転換が行われず、生体にプロトポルフィリンⅨが蓄積しておこる疾患である。本来優性遺伝であるが浸透率が低く無症候キャリアが多い。これは対立遺伝子上に特定の遺伝子多型を有する場合にのみ酵素活性が 30% 以下に低下し、発症するためである。臨床症状として、可視光線の曝露でヒリヒリした灼熱感と発赤、浮腫を生じ、高度な場合は水疱、血疱、びらん、痂皮を生じる。疑った場合には、まず赤血球中のプロトポルフィリンを測定する。蛍光顕微鏡があれば、希釈した新鮮赤血球を観察し、赤色蛍光 (fluorocyte) の有無をみる。プロトポルフィリンは脂溶性で肝臓から胆汁とともに排泄されるため、糞便中のプロトポルフィリンも高値であるが、糞便のポルフィリン体測定は国内では行われておらず、検査会社に依頼してアメリカへ送付することになる。一方、尿には排泄されないた

め尿中のポルフィリン体は正常範囲内である。

露光部皮膚の病理組織像では、真皮上層の血管周囲に PAS 陽性物質の沈着をみる。遺伝子診断は弘前大学皮膚科 (中野創先生) に依頼すれば、保険取載されていないが可能である。患児および家族の遺伝子診断は確定診断のためだけではなく、症状の現れていない同胞の早期診断にも有用である⁹。

c) 種痘様水疱症

日光照射後に紅斑、ついで中心の陥凹した水疱を生じた後に痂皮を形成、萎縮性瘢痕を残して治癒する疾患である。小児期に自然治癒する軽症型から、EB ウイルスの潜伏感染が関与する症例、悪性リンパ腫を併発する重症型がある。

光線テストでは UVB、UVA の大量 (2 ~ 3 MED) 1 回照射、あるいは少量 (1 ~ 2 MED) の 3 日間連続反復照射により発疹が誘発されるかをみる。UVA に過敏性を示すことが多い。少量照射で浮腫性紅斑を生じた後に壊死に陥る症例、反復照射で紅斑反応を示す症例、あるいは反応を誘発できない症例まで多様である。

EB ウイルスの関与については抗体価のパターンに異常はないか調べる。異常に高い抗体価と低い EBNA (EB virus nuclear antigen) がみられる。さらに末梢白血球あるいは水疱の痂皮などを材料に、EB ウイルスの DNA 量の測定を行う (岡山大学皮膚科、岩月啓氏教授に依頼)¹⁰。皮膚生検では皮下組織に達する高度なリンパ球浸潤がみ



図4 多形日光疹の誘発試験
UVA、UVBの反復照射で湿疹性の反応が生じた。

られ、組織中のEBER (EB virus-encoded small RNAs) 陽性細胞の浸潤を確認する。

2) 青年期に好発する光線過敏症

a) 多形日光疹

原因不明の遅延型光アレルギー性疾患である。誘発試験は一定の方法は確立されていないが、UVBの大量(2～3MED)1回照射、あるいは、UVB、UVAの少量(1～2MED)の3日連続の反復照射により、臨床症状と同様の皮疹が再現されるかを見る(図4)。大量のUVBの1回照射より、紅斑量のUVA反復照射や、サンバーン量以下であってもソーラーシミュレータを光源とした太陽光類似の照射で誘発されやすいという¹¹⁾。MED以上の照射をすれば当然24時間をピークにサンバーンによる紅斑が生じるが、2～5日後に臨床と同一の丘疹などの皮疹が誘発されたか確認する。可能であれば、再現された皮疹の皮膚生検を行い、サンバーン反応と組織学的に鑑別する。MEDが低下している例もある。また、日光曝露を繰り返すうちに耐性が得られるようになる

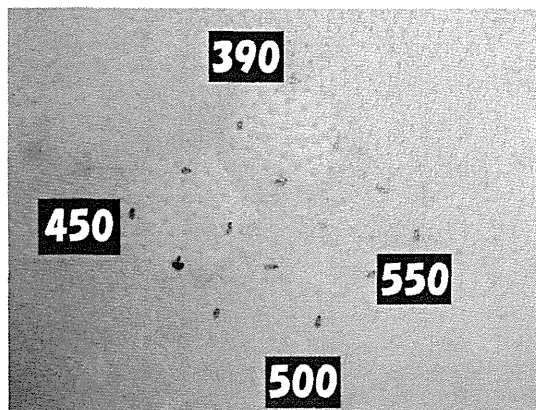


図5 日光蕁麻疹の可視光線による誘発試験
シャープカットフィルターで数字の波長以下を遮断。作用波長は450～500nmの間にある。

(hardening現象)こともあり、真夏には改善することを問診で確認することも診断に有用である。

b) 光接触皮膚炎

原因物質と接触した部位に光線照射が加わって皮膚炎を生じる。外用薬(ケトプロフェン、ジブカイン)、植物(キク科)、化粧品、香料、サンスクリーン成分などが原因となるが、最近ではケトプロフェン湿布薬によるものが多い¹²⁾。光アレルギー性が多いが、時に香料による光毒性反応もある。光パッチテストは光アレルギー性接触性皮膚炎において診断的価値をもつ。手技は前述した。

c) 日光蕁麻疹

原因不明の即時型光アレルギー性疾患である。UVA、UVB、可視光線によって照射中または照射直後にかゆみを伴う紅斑、膨疹が生じ、遮光により1時間以内に消失する。原因となる波長を作用波長(action spectrum)とよび、日本人では400～500nmの可視光線が60%を占める¹³⁾。時に可視光線から紫外線領域の広汎な波長に過敏性を示すこともある。誘発試験はスライドプロジェクタによる可視光線照射では、熱の影響を避けるため40～50cm離して背部に1～15分照射する。紫外線領域は20cm離してUVA(BLあるいはBLB蛍光管)で10～20分、UVB(SE蛍光管)照射で1分程度照射し、膨疹が誘発されるか確認する。膨疹が生じる最少の照射量を最少膨疹量

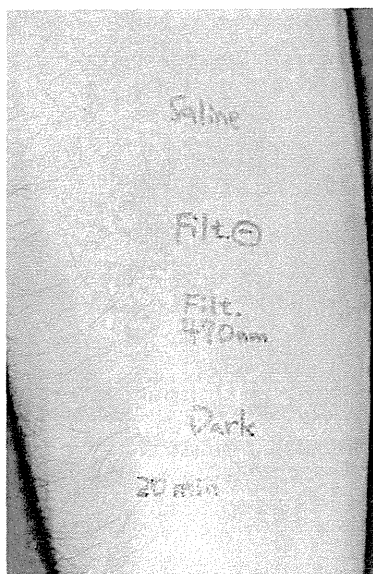


図6 日光蕁麻疹の自己血清 *in vitro* 照射皮内テスト

非照射血清では陰性であるが、作用波長の可視光線を照射した自己血清は膨疹を形成し、陽性。

(minimal urticarial dose : MUD) とよぶ(図5)。作用波長より長波長の光線を前照射、あるいは後照射することで、膨疹形成が抑制あるいは増強されることがあり、それぞれ抑制波長または増強波長とよばれる¹³⁾。

照射血清皮内テストは、患者血清に *in vitro* で作用波長の光を照射した後、患者に皮内注射し15～20分後に膨疹を形成するかみる(図6)。検査した70%以上の症例で陽性となる¹³⁾。これは光のエネルギーにより血清中の何らかの因子から抗原が形成されて、I型アレルギー機序により発症する症例が多いためである。

d) 光線過敏型薬疹

内服薬剤によって起こる光線過敏症である。原因となる薬剤は時代とともに変遷するが、かなり限定される¹⁴⁾。ほとんどの場合、作用波長はUVAである。内服中、あるいはいったん中止してMED(あるいはMRD)が正常化したのを確認後、常用量を1回再投与して血中濃度が上昇する約2時間後にUVAを照射し、翌日MED低下がみられれば原因薬と考える。陰性の場合には数日間投与して再検討する。最近、しばしば経験するヒドロクロロチアジドによる光線過敏型薬疹¹⁵⁾では、常用量を内服中のみMED低下を示すため、内服中止前(初診時)にMED測定を行ったほう

が、内服中止後に1回内服して測定するより陽性反応を得やすい(図2)。

内服薬など全身的に投与された薬剤が原因で光アレルギーを生じた患者でも、光パッチテストで原因薬を確定できる場合もある。ただし投与経路が同一でないため、偽陰性となる可能性もある。貼布した原因薬剤の経皮吸収が悪い場合や、原因薬剤がプロドラッグ(体内で代謝を受けて活性化される薬剤)である場合などが考えられる。

e) 全身性エリテマトーデス

全身性エリテマトーデスの約30%に光線過敏がみられる。作用波長はUVBが主である。紫外線曝露により皮膚の誘発や、強い日焼け反応が2週間以上も続く異常反応がみられることがある。多くの場合、問診のみで光線過敏の有無が決められているが、人工光源で皮膚の誘発も可能である。通常、UVBに対するMEDは正常範囲内であるが、SEランプによる比較的大量あるいは反復照射で、肉眼的、組織学的、免疫組織学的にエリテマトーデスの皮膚と同一の反応を誘発することができ、遅延性に反応を示すため、照射部を1～3週間後まで適宜追跡する。さらに、生検して蛍光抗体直接法で免疫グロブリンや補体の沈着を調べると確実である。光線過敏の機序として、表皮基底層がUVB照射されるとアポトーシスに陥り、細胞内のSS-A抗原が凝縮され、表皮細胞表面に移動する。抗SS-A抗体がこれと結合し、抗体依存性細胞傷害機序により、基底層の液状変性や炎症細胞浸潤が起こる¹⁶⁾。

3) 中高年に好発する光線過敏症

a) 晩発性皮膚ポルフィリン症

晩発性皮膚ポルフィリン症はヘム代謝経路において肝臓のウロポルフィリンノーゲンデカルボキシラーゼの活性が低下することにより、組織内にウロポルフィリンが蓄積し光線過敏症の症状を呈する。アルコールの長期間大量摂取やC型肝炎、薬物、透析、HIV感染などが誘発因子となる。骨髄性プロトポルフィリン症と異なり、強い急性の紅斑、浮腫は生じないが、露光部の色素沈着、

色素脱失、多毛、軽微な外力による小水疱、びらんなど皮膚脆弱が主症状である。一般検査では血清鉄値、フェリチン値の上昇がみられる。確定診断は尿中ウロポルフィリン、コプロポルフィリンの定量によりなされる。

b) 慢性光線性皮膚炎

露光部を主体に持続性の浸潤性丘疹。局面を伴う湿疹性変化(丘疹、痒疹、苔癬化)を呈する遅延型光アレルギー性疾患である。皮疹はしばしば被覆部にも拡大し、さらには紅皮症状態に進展することもある。UVB、UVA またはその両者に対する強い光過敏性がみられ、可視光線領域にまで光線過敏性を示す例もある¹⁷⁾。特にUVB-MEDの低下が診断上重要である。長期間にわたって低線量の光線に遅延型過敏性を示すことが特徴であり、1/2～1/3 MEDの反復照射試験で皮疹の誘発が可能である。時にリンパ腫様に隆起した皮疹を示すため、病理組織学的にリンパ腫との鑑別が必要である。生検で稠密なリンパ球の帯状浸潤に加え、異型リンパ球や多核の巨細胞を認めることもあるが、リンパ腫を続発することはほとんどない。

c) ペラグラ

ビタミンB群の一種であるニコチン酸の欠乏症である。極端なアルコール依存症を伴うことが多く、露光部や外力を受ける部位の褐色調の強い紅斑、落屑(dermatitis)のほかに、精神・神経症状(dementia)、消化器症状(diarrhea)の3Dを特徴とするが、光線過敏症状だけのことも多い。

確定診断には血清中のニコチン酸の減少を証明するが、ニコチン酸の投与が著効を呈することも診断の一助となる。

d) 皮膚筋炎

約45%に光線過敏症が生じる。顔面、前胸部に多い。作用波長はUVBと考えられているが、MEDの低下はみられないことが多い。MEDが低下する場合、遅延性に反応を示すことがあるので、MED判定は1～3週間まで適宜追跡する。

4 おわりに

露出部の発疹を訴えて受診する患者は日常診療でかなり多い。大多数は顔面の接触皮膚炎、脂漏性皮膚炎、アトピー性皮膚炎などで、光線との関連はさほど問題とならない。しかし、時に、日光曝露で顔面がピリピリする、眼が痛む、外に出られないなど、光線過敏を執拗に訴える患者もいる。大抵は前医で紫外線アレルギーかもしれないという説明を受けている。しかし、問診、視診でも光線過敏症として合理的に説明がつかないことが多い。このような時はまず検査ありきではなく、患者の心理・社会的背景やストレスなどを傾聴的に問診することで、それらとの関連を見出せることもある。説明しても患者の納得が得られないときは、身体表現性障害という診断に至る例もある。いずれにしても光線過敏症の検査を進めるにあたっては、十分診断を絞り込んでから行うことが肝要である。

文献

- 1) 上出良一：皮膚臨床, 51 : 1380-1391, 2009
- 2) 上出良一：Derma, 96 : 1-12, 2005
- 3) 堀尾 武ほか：日皮会誌, 105 : 1845-1849, 1995
- 4) Bruynzeel DP et al : J Eur Acad Dermatol Venereol, 18 : 679-682, 2004
- 5) Group BP : Br J Dermatol, 136 : 371-376, 1997
- 6) Batchelor RJ, Wilkinson SM : Contact Dermatitis, 54 : 75-78, 2006
- 7) Pollock B, Wilkinson SM : Contact Dermatitis, 44 : 270-272, 2001
- 8) 森脇真一：Visual Dermatol, 10 : 448-451, 2011
- 9) 中野 創：日皮会誌, 119 : 1225-1230, 2009
- 10) Iwatsuki K et al : Arch Dermatol, 142 : 587-595, 2006
- 11) van de Pas CB et al : Arch Dermatol, 140 : 286-292, 2004
- 12) 高山かおるほか：日皮会誌, 119 : 1757-1793, 2009

- 13) Uetsu N et al : Br J Dermatol, **142** : 32-38, 2000
- 14) 上出良一 : 日皮会誌, **120** : 1165-1170, 2010
- 15) 須甲礼奈, 上出良一 : 臨皮, **65** : 15-19, 2011
- 16) 古川福実 et al : MB Derma, **96** : 59-65, 2005
- 17) Hawk JL, Magnus IA : Br J Dermatol, **101** (Suppl 17) : 24, 1979



Early Release Paper

Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia

by Kiriko Kaneko, Kazumichi Furuyama, Tohru Fujiwara, Ryoji Kobayashi, Hiroyuki Ishida, Hideo Harigae, and Shigeki Shibahara

Haematologica 2013 [Epub ahead of print]

*Citation: Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, and Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. Haematologica. 2013; 98:xxx
doi:10.3324/haematol.2013.085449*

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Haematologica (pISSN: 0390-6078, eISSN: 1592-8721, NLM ID: 0417435, www.haematologica.org) publishes peer-reviewed papers across all areas of experimental and clinical hematology. The journal is owned by the Ferrata Storti Foundation, a non-profit organization, and serves the scientific community with strict adherence to the principles of open access publishing (www.doaj.org). In addition, the journal makes every paper published immediately available in PubMed Central (PMC), the US National Institutes of Health (NIH) free digital archive of biomedical and life sciences journal literature.

Support Haematologica and Open Access Publishing by becoming a member of the European Hematology Association (EHA) and enjoying the benefits of this membership, which include free participation in the online CME program

Official Organ of the European Hematology Association
Published by the Ferrata Storti Foundation, Pavia, Italy
www.haematologica.org

**Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its
loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia**

Running heads: Disruption of GATA binding element causes CSA

Kiriko Kaneko^{1, 2}, Kazumichi Furuyama^{1*}, Tohru Fujiwara³, Ryoji Kobayashi⁴,
Hiroyuki Ishida⁵, Hideo Harigae³ and Shigeki Shibahara¹

¹Department of Molecular Biology and Applied Physiology, ²Department of
Endocrinology and Applied Medical Science, ³Department of Hematology and
Rheumatology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Miyagi
980-8575, Japan, ⁴ Department of Pediatrics, Sapporo Hokuyu Hospital, Sapporo,
003-0006, Japan, ⁵Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine,
Graduate School of Medical Science, Kyoto, 602-8566, Japan

Correspondence

Kazumichi Furuyama, M.D., Ph.D., Department of Molecular Biology and Applied
Physiology, Tohoku University School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku,
Sendai, 980-8575 Japan. E-mail: furuyama@med.tohoku.ac.jp

Abstract

Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) is the rate-limiting enzyme for heme biosynthesis in erythroid cells, and a missense mutation of ALAS2 gene is associated with congenital sideroblastic anemia. However, the responsible gene remains unclear in about 40% of these patients. Here, we identify the novel erythroid-specific enhancer of 130 base pairs (bp) in the first intron of ALAS2 gene. The newly identified enhancer contains a cis-acting element that is bound by the erythroid-specific transcription factor GATA1, as confirmed by chromatin immunoprecipitation analysis in vivo and by electrophoretic mobility shift assay in vitro. The promoter activity assay in K562 human erythroleukemia cells revealed that the presence of this 130-bp region increased the promoter activity of ALAS2 gene by 10~15-fold. Importantly, two mutations, each of which disrupts the GATA-binding site in the enhancer, were identified in unrelated male patients with congenital sideroblastic anemia, and the lower expression level of ALAS2 mRNA in bone marrow erythroblasts was confirmed in one of these patients. Moreover, GATA1 failed to bind to each mutant sequence at the GATA-binding site, and each mutation abolished the enhancer function on ALAS2 promoter activity in

K562 cells. Thus, a mutation at the GATA-binding site in this enhancer may cause congenital sideroblastic anemia. These results suggest that the newly identified intronic enhancer is essential for expression of ALAS2 gene in erythroid cells. We propose that the 130-bp enhancer region located in the first intron of ALAS2 gene should be examined in patients with congenital sideroblastic anemia, in whom responsible gene remains unknown.

Key words: GATA1, ALAS2 (erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase),

erythroid-specific enhancer, congenital sideroblastic anemia

Introduction

ALAS2 gene encodes erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS-E, EC 2.3.1.37), which is the rate-limiting enzyme of heme biosynthetic pathway in erythroid cells.¹ It has been reported that human ALAS2 gene is mapped on X chromosome,² and the loss-of-function mutation of ALAS2 gene causes X-linked sideroblastic anemia (XLSA),^{3,4} which is the most common genetic form of congenital sideroblastic anemia (CSA). Moreover, a missense mutation of ALAS2 gene was identified in a patient with non-familial CSA (nfCSA),⁵ in which no family history of sideroblastic anemia was identified. In addition to the ALAS2 gene, several genes were recently identified as causative genes for CSA, including SLC25A38,⁶ GLRX5,⁷ ABCB7,⁸ PUS1,⁹ and SLC19A2,¹⁰ but the cause of sideroblastic anemia still remains undefined in more than 40% of patients with CSA.¹¹

GATA1 transcription factor regulates the expression of several erythroid-specific genes, such as erythropoietin receptor gene,^{12,13} α - and β -globin genes,^{14,15} ALAS2 gene¹⁶ and GATA1 gene itself,¹⁷ during erythroid differentiation.^{18,19} The ablation of Gata1 gene in mice resulted in embryonic lethality because of anemia,²⁰

suggesting that GATA1 is essential for the erythroid differentiation in vivo. It has been reported that GATA1 regulates transcription of human ALAS2 gene through the proximal promoter region¹⁶ and the erythroid-specific enhancer located in eighth intron of ALAS2 gene.²¹ However, Fujiwara et al. demonstrated that GATA1 protein bound to ALAS2 gene only in the middle of its first intron, where no regulatory region was identified to date, by genome-wide analysis of K562 human erythroleukemia cells using chromatin immunoprecipitation followed by next-generation sequencing (ChIP-seq).²²

In the present study, we have identified the novel erythroid-specific enhancer region in the first intron of ALAS2 gene. Moreover, we describe two mutations in the newly identified enhancer of ALAS2 gene: a T-to-C transition, which changes GATA to GGTA at the GATA element in the antisense strand, in a pedigree with XLSA and one proband of nfCSA, and a 35-bp deletion including the above-mentioned GATA element in a proband of nfCSA.