

研究テーマ： ダリエー病/ヘイリーヘイリー病の体内病態の比較研究

フランス国立保健医学研究機構 イマジン研究所
加賀 麻弥

皮膚の Ca ポンプ異常症であるダリエー病 (DD) とヘイリーヘイリー病 (HHD) は 未だ研究・治療法開発の途上にある、非常に稀な遺伝性皮膚疾患である。人種差、男女差は無いと考えられており、有病率は正確に分かっておらず、3-5 万人に 1 人と推測されている。前者は 10-20 代より頸部 や胸背部に角化性小丘疹や局面を、後者は 40-60 代より腋窩や兎径部に難治性の紅斑、びらんを生じ、時に疼痛や悪臭を伴う。責任遺伝子として DD では *ATP2A2*、HHD では *ATP2C1* が、相次いで報告された。前者は小胞体 Ca ポンプ SERCA2、後者はゴルジ体 Ca/Mn ポンプ SPCA1 をコードするが、両疾患は臨床・病理学的に類似点が多い。

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病の体内動態の比較研究

① 患者皮膚組織の免疫組織学的検討

研究者は留学期間中の、2018年6月～2019年5月にイマジン研究所において西欧人 DD、HHD 患者約 60 名分の皮疹部・無疹部計約 120 検体 (パラフィン包埋患者皮膚検体) の免疫組織学的検討を行った。手法は、パラフィン包埋患者皮膚検体を、5 μ m に薄切し、蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8) で撮影し、Fiji にて画像解析を行った。

その結果、DD/HHD とも、症例数として約 20%の、特に臨床的に炎症の強い症例 (表皮肥厚や真皮上層の浸潤細胞が多い皮膚検体) で、真皮上層に IL17a の強い発現が見られた。また、浸潤細胞のプロファイリングも並行して行い、DD では主に肥満細胞と IL17a シグナルの重なるパターンが、HHD では主に好中球と IL17a シグナルが重なるパターンがみられた。これを受けて、研究者は 2019 年科研費を取得し (研究活動スタート支援 19K23869 加賀麻弥) 帰国後の 2020 年 7 月より、順天堂大学において日本人 DD/HHD 患者の皮膚サンプル 24 検体を用い、同様の解析を共同研究として継続した。しかしながら、2019 年 12 月に留学先教授より、私達が実験に使用していた R&D 社の抗 IL17a 抗体 (AF-317-NA) について、特異性に欠陥があるとの論文報告を見出したことを知った (Tamarozzi et al. *Immunol Lett.* 2014)。

私達は、日仏でそれぞれの検体を用い、追加解析を行い、Tamarozzi の報告した通り、この抗体が IL17a ではなく主に好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を染色していることを、最終的に確認した。よって、DD/HHD の一部で IL17a 発現増強との仮説を再検証するため、他社抗 IL17 抗体 (Abcam79056) を使用し、陽性コントロール、正常皮膚コントロールの免疫染色を行った。その結果、共同研究者がフランスで行った染色では正常コントロール、西欧人乾癬皮膚 (陽性コントロール) とも特異的シグナルを欠いており、R&D 社の抗 IL17a 抗体 (AF-317-NA) の染色パターンとは全く異なっていた。また研究者が、日本で行った検証では正常コントロール 4 名分、日本人乾癬皮膚 (陽性コントロール、抗 IL17a 製剤が臨床的に有効だった症例の投与前皮膚) の全てで、真皮浸潤細胞よりも表皮全層の弱陽性シグナルが目立ち、かつ、陽性コントロール皮膚での

シグナル増強は見られなかった。最終的に、Abcam79056 について、表皮の信号は非特異的シグナルであり IL17 を染色していないと判断し、特異性に欠くと結論づけた。(尚、日本での患者では凍結検体を保存しておらず、パラフィン包埋切片のみで検討した。)

実験試薬として市販されている抗 IL17a 抗体について、皮膚での染色特異性について、今後も検討を重ねる必要がある。特に R&D 社の抗 IL17a 抗体 (AF-317-NA) については、この抗体を使用し IL17a producing neutrophil との解釈で論文化されている文献もみられる。乾癬に対する抗 IL17a 抗体製剤の投与は先進国では標準治療となりつつあるが、治療効果の解釈や研究発展のために、引き続き、(実験用) 抗体を用いた皮膚での染色における、特異性の高い試薬・手法を探る必要がある。

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病の体内動態の比較研究

② 患者皮膚組織の RNA シーケンス解析

研究者は留学期間中の 2018 年 6 月～2019 年 5 月に、イマジン研究所において西欧人 DD、HHD 患者計 43 名分の皮疹部・無疹部皮膚組織 (計 86 検体) とコントロール用正常皮膚 23 検体より、RNA 抽出を行った。凍結皮膚組織を手動的に破碎し、抽出した RNA について、質/量とも問題のないことを確認した。研究者の帰国後 2019 年 5 月末にイマジン研究所 Genomic platform 部門において、RNA シーケンスを施行する手筈を整え帰国した。その後、ヨーロッパでの COVID-19 大流行によるロックダウン、研究所の一時閉鎖、研究予算の不足などが発生し、残念ながらイマジン研究所でのこの解析研究は完了していない。DD/HHD の大規模 RNA シーケンス計画は前例がなく、また稀少疾患において 86 も貴重な皮膚検体があることは価値があり、新しい治療標的を見出せると確信している。研究計画が継続され論文として発信されるよう、今後も働きかけを行う。

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病症例の遺伝子変異解析

③ 限局性ダリエー病 (体細胞変異) の 8 症例

研究者は留学先研究室の Sabine Duchatelet が変異解析を行った限局性ダリエー病症例と、自身が留学期間中に教授外来陪席で経験し、実際に血液、表皮・真皮細胞、唾液等より抽出した DNA で次世代シーケンサーを用い変異解析を行った症例を合わせ、計 8 症例としてまとめる事となった。8 症例の全てで変異が同定され、未報告の変異も含まれる。2019 年 8 月までに草案をまとめ、既に投稿準備が整っているが、COVID-19 大流行によるイマジン研究所一時閉鎖の影響等をうけ、投稿の最終確認中である。

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病症例の遺伝子変異解析

④ 特異かつ重篤な限局性ダリエー病の 1 症例

研究者は留学先研究室の Hovnanian 教授外来を訪れる、多くの DD/HHD 患者の診察に同席した。その中で、非常にユニークな臨床像を呈するフランス人女性 DD 患者を経験した。臨床的には汎発性で皮疹面積が広く、進行性の経過を辿っていた。患者末梢血由来 DNA、正常部皮膚 (表皮・真皮を分けて)、皮疹部皮膚 (表皮・真皮を分けて) から次世代シーケンサーを用い遺伝子解析を行った結果、表皮細胞由来 DNA と末梢血由来 DNA の一部に変異を同定し、遺伝的にモザイクであった。古典型 DD よりも重篤な、

限局性ダリエー病 (Mosaic Darier) と結論づけた。本症例についても 2019 年 8 月までに独立した論文として草案をまとめ、既に投稿準備が整っているが、③と同様に最終確認中である。

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病症例の遺伝子変異解析

⑤ 変異同定に至らなかったダリエー病の 1 症例

研究者は 2019 年 5 月の渡航に向け、留学先で行う可能性がある DD/HHD 遺伝子変異の解析に備え、順天堂大学皮膚科で以前から施行されてきた Sanger 法による同疾患の遺伝子変異解析の手法の見直しを行った。具体的には、最新の遺伝情報に基づいた exon 領域の再確認と、一部のプライマーを再設計し、PCR 設定を修正することにより、*ATP2A2/ATP2C1* 遺伝子の全エクソンを効率よく解読することが可能となった。研究者が経験し留学先との共同研究として解析した臨床症例の、報告論文を添付する。(添付資料 1)

ダリエー病/ヘイリーヘイリー病症例の遺伝子変異解析

⑥ 新規変異を同定したヘイリーヘイリー病の 1 症例

研究者は留学期間中の 2018 年 6 月～2019 年 5 月に、15-20 名程度の西欧人 DD/HHD 患者の診察に同席し、その多くで研究用検体の採取、遺伝子変異解析を行った。この経験を通し、既に病理組織診断や家族歴から、診断が確定されている患者にも、研究の必要性や、研究の進捗状況を説明することにより、遺伝子解析や臨床検体 (患者 DNA や皮膚細胞等) の提供に同意してもらい、積極的に解析・検体保存し、未来の研究計画や患者治療につなげる事を学んだ。この経験を踏まえ、帰国後の 2019 年 7 月より、順天堂大学においても、既に臨床像と家族歴から DD/HHD との診断及び加療がなされている入院/通院患者に研究の重要性を伝え、同意を得て、留学先との共同研究として Sanger 法により末梢血由来 DNA 解析を行っている。その中で未報告の新規変異を同定した。診断後の患者についても、患者の臨床経過の記録と変異情報を紐づけ、個々の症例を積極的に解析・発信し臨床と基礎研究とを繋ぐことを、今後も続けたい。(添付資料 2)

※渡航中の研究実績について、Alain Hovnanian 教授より発行された support letter を添付する。留学期間が 2018 年 3 月から 2019 年 3 月と記載されているが、実際は 2018 年 6 月から 2019 年 5 月である。(添付資料 3)