

日本財団補助金による


1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1999年3月14日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 清水 宏 

所属機関名 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

職名 助教授 年齢 43 才

所在地 〒160 新宿区信濃町35

電話 03-3353-1211 内線 2413

1. 研究課題

日本と中国における先天性表皮水疱症患者の遺伝子変異部位の比較検討

2. 研究期間 自 1998 年 4 月 1 日 ~ 至 1999 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 西川 武二 (58才)

所属機関 慶應義塾大学医学部皮膚科 職名 教授

中国側研究者氏名 Xye - Jun Zhu (56才)

所属機関 北京大学医学部皮膚科 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

日本と中国における先天性表皮水疱症患者の
遺伝子変異部位の比較検討

研究代表者

清水 宏
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室
助教授

要旨

表皮水疱症は多くの病型に分類されるが、いずれの病型においても先天的に皮膚が脆弱であり、軽度の機械的刺激で容易に水疱、潰瘍を生ずる。その中でも劣性栄養障害型と Herlitz 致死接合部型は最重症型であり、表皮水疱症の中でも最も予後の悪いタイプである。両者はともに常染色体劣性に遺伝する。本症では先天的に皮膚基底膜の VII 型コラーゲン、あるいは laminin 5 の形成障害が基盤にあることが最近解明された。また一部の患者においてはそれぞれの遺伝子の変異も確認されるに至った。

本研究の目的は、表皮水疱症の最重症型である劣性栄養障害型ならびに Herlitz 型の日本人患者と中国人患者における VII 型コラーゲン、および laminin 5 の遺伝子変異部位を同定をしようとする確実な遺伝子診断法を設定し、日本人、中国人患者における遺伝子変異パターンの異同を明らかにすることであった。

本研究では、実際に劣性栄養障害型ならびに Herlitz 致死型表皮水疱症患者を集積した。患者の皮膚を基質として、VII 型コラーゲン、および laminin 5 に対するモノクローナル抗体を用いてタンパクレベルの異常を確認した。

続いて、個々の劣性栄養障害型、ならびに Herlitz 型表皮水疱症患者から DNA を抽出し、個々の症例における VII 型コラーゲン、あるいは laminin 5 における遺伝子変異部位を DNA レベルで確認した。この結果、中国人表皮水疱症患者においても日本人患者と類似の遺伝子変異パターンが存在することが示唆された。

Key Words

表皮水疱症、ラミニン 5、VII 型コラーゲン、皮膚基底膜、遺伝子診断

目的

本研究の目的は、日本と中国における先天性表皮水疱症患者の遺伝子変異部位を比較検討し、遺伝子変異部位を同定をしよう確実な遺伝子診断法を設定することである。

方法

1) 日中両国での表皮水疱症患者の集積：

表皮水疱症患者を中国全土から集積する。具体的にはこれまでに集積した日本人患者50例に加え、あらたに北京大学を窓口で中国人の表皮水疱症患者を集積する。shave biopsyにて患者皮膚を生検し、凍結生切片を蛍光抗体間接法の基質とする。また患者、および家族から採血を行いDNAを抽出し、遺伝子解析の材料とする。

2) 蛍光抗体法

表皮水疱症患者皮膚を基質として、Herlitz 致死型で特異的に欠損している laminin 5、劣性栄養障害型で特異的に欠損している VII 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体間接法を施行する。

3) 電顕

電顕的に患者皮膚における水疱形成部位を電顕的に同定する。同時に表皮基底膜構成成分であるヘミデスモゾームならびに anchoring fibril の微細形態異常の有無を観察する。

4) PCR ならびに Heteroduplex 法

個々の Herlitz 型表皮水疱症患者、ならびに劣性栄養障害型患者について、1) - 3) までの検索により推定された laminin 5 あるいは VII 型コラーゲン遺伝子における変異部位を PCR ならびに Heteroduplex 法にて推定する。

5) Direct sequencing ならびに制限酵素による遺伝子変異部位の確定

Heteroduplex 法にてダブルバンドがあらわれたエクソン部分に関しては、我々の保有する自動 sequencer にて遺伝子変異部位を検索する。発見された変異部位の確認には、適当な制限酵素、あるいは allele-specific oligonucleotide hybridization 法を用いて行う。

6) DNA 出生前診断への応用と実施

laminin 5、あるいは VII 型コラーゲンの DNA 変異部位が確認された家系については統計解析し、日中両国患者において共通に認められる hot spot mutation 部位を確認する。同時にその部位を同定するための、正確、簡便な遺伝子変異同定法を確立する。さらにもし罹患児出産の既往がある母親が再び妊娠し出生前診断を希望した場合、実施計画がたてられるように検討する。

結果

中国における劣性栄養障害型ならびに Herlitz 致死型表皮水疱症患者を集積した。患者の皮膚を基質として、VII 型コラーゲン、および laminin 5 に対するモノクローナル抗体を用いてタンパクレベルの異常を検索した。その結果、日本人患者と類似のタンパク以上がそれぞれ VII 型コラーゲン、および laminin 5 に見られることが示唆された。

続いて、個々の劣性栄養障害型、ならびに Herlitz 型表皮水疱症患者から DNA を抽出し、個々の症例における VII 型コラーゲン、あるいは laminin 5 における遺伝子変異部位を DNA レベルで確認した。この結果、すくなくとも日本人患者においては、特異的な遺伝子変異が同定された。中国人患者については現在検索中である。

考察

表皮水疱症は、皮膚基底膜抗原をコードする遺伝子の変異により生じ、国の難治性疾患にも指定されている皮膚遺伝病であり、いくつかの病型に分類される。とくに Herlitz 致死型と劣性栄養障害型は最重症型であり、早期に死亡するか、合指症、扁平上皮ガンの発生などにより予後不良な経過をたどる。有効な治療法が無いため、臨床面、社会面においても、安全確実な本症の DNA レベルでの診断、出生前診断法の確立は重要な課題である。申請者らは表皮水疱症の病因、診断法に関する研究を長年続けており、一部の症例においては出生前診断することにもすでに成功している（業績；Shimzu H et al.参照）。一方、最近の免疫学、分子生物学の著しい進歩にともない、表皮水疱症の原因となる遺伝子異常も解明されつつある展開を迎えている。しかし、最近本症における遺伝子変異部位は人種間によりかなりの多様性があることも判明し、欧米の患者と日本人患者ではその hot spot mutation 部位が異なり、正確かつ効率的な DNA 診断法も人種間により差があることが明らかとなった。

本研究の目的は、人種的に比較的近縁な中国、日本両国における表皮水疱症患者を比較対象として、遺伝子変異部位、臨床所見に多様性である本症の遺伝子レベルでの診断、出生前診断を確立させることであった。本研究の遂行には、日本のみならず多数の中国人患者の解析も必要であったため、現在中国における水疱症研究の第一人者である北京大学皮膚科のZhu教授と共同研究を行った。

本研究は、日本と中国という人種的に近縁な両国での表皮水疱症の hot spot mutation を見いだすための基礎データになることが予想される。

参考文献

1. Shimizu H et al. J Am Acad Dermatol 31:429-433, 1994.
2. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 103:104-106, 1994.
3. Shimizu H et al. Prenat Diagn 14:443-450, 1994.
4. Shimizu H et al. J Histochem Cytochem 42:687-692, 1994.
5. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 105:153-159, 1995.
6. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 104:370-373, 1995.
7. Shimizu H et al. Dermatology 192:203-207, 1996.
8. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 106:119-124, 1996.
9. Shimizu H et al. Arch Dermatol 132:919-925, 1996.
10. Shimizu H et al. Acta Dermato-Venereol 77:10-13, 1997.
11. Shimizu H et al. Arch Dermatol Res 289:174-176, 1997.
12. Shimizu H et al. Lab Invest 76:753-763, 1997.
13. Zhu XJ, Niimi Y, Bystryjn JC: Identification of a 160-kD molecule as a component of the basement membrane zone and as a minor bullous pemphigoid antigen. J Invest Dermatol 94:817-821, 1990.
14. Zhu XJ et al. J Clin Dermatol 22:190, 1993.
15. Zhu XJ et al. Chinese J Dermatol 27:157, 1994.
16. Zhu XJ et al. Chinese Med J 108:269, 1995.