

主論文の要旨

Reduced stratum corneum acylceramides in autosomal recessive congenital ichthyosis with a *NIPAL4* mutation

NIPAL4 遺伝子変異による常染色体劣性先天性魚鱗癬患者における
角層脂質および皮膚での遺伝子発現に関する研究

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 皮膚病態学分野

(指導：秋山 真志 教授)

村瀬 友哉

【緒言】

NIPAL4 遺伝子は、NIPA-like domain containing 4 (*NIPAL4*)タンパクをコードする遺伝子であり、常染色体劣性先天性魚鱗癬 (ARCI) の原因遺伝子の一つとして知られている。しかしながら、*NIPAL4* タンパクの生理学的機能および *NIPAL4* 遺伝子変異による ARCI 発症メカニズムは依然として、不明なままである。そこで、私たちは、*NIPAL4* 遺伝子に変異を有する魚鱗癬患者の病変部皮膚角層におけるセラミド組成や皮膚での遺伝子発現が健常人と比較して、どのように変化しているかを詳細に解析することにより、*NIPAL4* タンパクの機能および *NIPAL4* 遺伝子変異による ARCI 発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【対象および方法】

対象患者は、受診時、51 歳の男性で、血族婚の第一子であり、生下時より、ARCI の表現型が認められた。診察所見では、全身性の白色から灰白色の鱗屑を伴う皮膚乾燥と線状の掌蹠角化を認めた (Figure 1, 2)。これらの皮膚症状は、低用量エトレチナート治療によって、良好な効果を認めた (Figure 2)。

患者血液から抽出した DNA を用いて、サンガーシーケンスを行い、魚鱗癬患者の遺伝子変異を同定し、同定した遺伝子変異の病原性解析を、患者病歴、変異部位に関する文献的考察から総合的に行った。

患者の病変部皮膚から採取した皮膚組織と健常人の皮膚組織に対して、超微形態学的、病理組織学的、ならびに、免疫組織学的アプローチを用いて、患者と健常人との差異を解析した。

また、患者と患者の母親、さらに、13 人の健常人コントロールの皮膚から、テープストリッピング法で、角層を採取し、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて、角層内脂質解析を行った。

さらに、患者病変部の皮膚組織と 5 人の健常人コントロール皮膚組織から抽出した RNA を用いて、RNA シーケンスを行い、皮膚における遺伝子発現解析を行った。

【結果】

患者病変部皮膚の病理組織学的所見から、正常な basket weave 構造を失った、密な角層の肥厚を認め、角層細胞間脂質量の減少が示唆される所見であった (Figure 3A, B)。

全エクソーム解析とサンガーシーケンス法によって、患者において *NIPAL4* 遺伝子にホモ接合体で、c.1202delT (p.Val401Glyfs*47)変異を同定した (Figure 3C)。この c.1202T 変異は、新規変異ではあったが、過去に、c.1193dupT (p.Val401Arg*36)という同一アミノ酸部位から始まるフレームシフトを引き起こす重複変異が、ARCI の病因遺伝子変異として報告されている (Bučková et al. Br J Dermatol. 2016)。また、本欠失遺伝子変異によって、フレームシフトがおこり、変異アレル由来の *NIPAL4* タンパクは正常の *NIPAL4* タンパクよりも C 末端が短くなっているか、あるいは、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により変異アレル由来の *NIPAL4* タンパクは産生されないこと

が予想され、この変異により NIPAL4 タンパクの機能を喪失させている可能性があると考えた。以上より、本遺伝子変異も病原性のある変異であると考えた。

NIPAL4 タンパクに対する免疫染色では、患者と健常人の間で、染色パターンや染色強度に明らかな差は認められなかった (Figure 3D)。さらに、患者の皮膚組織から抽出した RNA を用いて施行した定量 RT-PCR では、NIPAL4 mRNA の発現量は、健常人コントロールと同程度であった。免疫染色の結果と遺伝子発現解析の結果より、本フレームシフト変異によって、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構は起こっておらず、変異 NIPAL4 タンパクが患者皮膚組織中に十分量存在している、と推察された。

皮膚生検検体から抽出した mRNA の RNA シークエンス解析を行ったところ、IL-17/TNF α 関連遺伝子 (*IL17C*, *IL36A*, *IL36G*, *S100A7A*, *S100A9*) および乾癬関連遺伝子 (*VNN3*, *LCE3D*, *PLA2G4D*) の有意な発現上昇と脂質関連遺伝子 (*GAL*, *HAO2*, *FABP7*) の有意な発現低下を認めた。一方、分化マーカー遺伝子 (*LOR*, *FLG*, *PPL*) の発現量には有意な差は認めなかった (Table 1)。

テープストリッピングによる脂質解析では、前腕から採取した角層内総セラミド量は健常人と比較し、ほぼ同じであったが、患者の上腕角層内総セラミド量は健常人と比較して減少していた (Figure 4A)。患者の前腕、上腕いずれにおいても、CER[NS]は有意に増加しており、一方、CER[AH]、CER[AP]、CER[EOH]、CER[EOP]は減少していた (Figure 4B)。さらに、上腕では、CER[NH]、CER[NP]、CER[EOS]も健常人と比較して減少していた (Figure 4B)。さらに、前腕、上腕ともに、炭素数 32-52 の CER[NS]が増加していた一方で、炭素鎖長 66-72 のアシルセラミドは減少していた (Figure 2C)。経ロエトレチナート治療後、CER[EOH]と CER[EOP]量は増加し、健常人のセラミド量に近づいていた (Figure 4B)。さらに、上腕では、CER[NH]と CER[NP]も治療によって増加し、一方、前腕では、治療後、CER[NS]が減少していた (Figure 4B)。炭素数 32-45 の CER[NS]の比率が低下し、炭素数 46-54 の CER[NS]の比率が上昇していた。炭素数 66-70 の CER[EOH]と CER[EOP]の量は、前腕、上腕、いずれにおいても増加していた (Figure 5)。これらの結果は、治療によって、脂肪酸の伸長反応が改善している可能性を示唆している。

【考察】

Fischer (2009)は、ARCI 患者の約 16%に NIPAL4 遺伝子変異がみられると報告しているが、日本やアジア地域において魚鱗癬の病因となる NIPAL4 遺伝子変異の保有率は極めて低いと考えられる。ARCI の原因遺伝子の多くは、アシルセラミドやタンパク結合型セラミドの形成に関与していると報告されている。本研究の脂質解析の結果から、患者角層内では、有棘層上層や顆粒層で生成されるアシルセラミド (CER[EOH]、CER[EOP]、CER[EOS]) 量が減少していた。経ロエトレチナート治療後、炭素鎖の短い脂肪酸をもつ CER[NS]の割合が低下し、炭素鎖の長い脂肪酸をもつ CER[NS]の割合が上昇していた。これらの変化は、脂肪酸伸長酵素 (ELOVL1、ELOVL4) の活性が改善したことによって生じた可能性が考えられる。

IL-36 サイトカインはケラチノサイトにおける炎症反応を強力に促進し、表皮細胞の分化を阻害することが報告されている (Henry et al. Cell Rep. 2016)。本患者から得られた皮膚検体を用いた遺伝子発現解析では、*IL36A* や *IL36G* の mRNA の発現が亢進しており、過去の定量 RT-PCR 解析の結果と一致する結果であった。さらに、IL-36 γ サイトカインのタンパク発現は、健常コントロールと比較して、本患者の皮膚において上昇していた。したがって、IL-36 γ サイトカインの発現亢進が本 ARCI 患者の表現型の形成に関わっている可能性が考えられる。また、Malik ら (2019) は、IL-36 ファミリーサイトカインと IL36 サイトカイン受容体の mRNA 発現と、タンパク発現の上昇が、様々な魚鱗癬の臨床的重症度および経皮的水分喪失量と有意に相関することを報告している。また、ARCI 患者において、IL-17/TNF- α 関連遺伝子や乾癬関連遺伝子の有意な発現亢進が認められることも報告されている。

エトレチナート内服にて皮膚症状は著明に改善しており、患者角層内の CER[EOH] と CER[EOP]量も改善していたが、今回の研究では、CER[EOS]量の上昇は認められなかった。我々は、エトレチナートが患者の表皮ケラチノサイトの正常分化を誘導することにより、結果的に、角層内セラミド量が増加したのではないかと推測した。CER[EOS]だけでなく、CER[EOH]や CER[EOP]も角層のバリア機能と強く相関することが報告されており、私たちの研究結果は、CER[EOH]と CER[EOP]量の増加が、本 *NIPAL4* 変異患者でのエトレチナート内服による皮膚症状改善と関連している可能性を示唆している。

【結語】

本患者皮膚の mRNA 発現プロファイルでは、IL-17C と IL-36 ファミリーサイトカインの遺伝子発現の亢進が本 *NIPAL4* 遺伝子変異による ARCI の表現型形成に関与している可能性が示唆された。さらにセラミド解析では角層内のアシルセラミド、CER[EOS]、CER[EOH]、CER[EOP]の減少が *NIPAL4* 遺伝子変異による ARCI の皮膚症状と関係していることが示唆された。さらに、エトレチナート治療による皮膚症状の改善は、角層内 CER[EOH]、CER[EOP]量の改善が関係している可能性があるかと推察された。