

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06271

研究課題名(和文)先天性魚鱗癬における自然治癒機構の解明

研究課題名(英文)Revertant mosaicism in congenital ichthyoses

研究代表者

清水 宏(Shimizu, Hiroshi)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：00146672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ichthyosis with confettiでみられる病因遺伝子変異消失の主なメカニズムが相同組換えであることを明らかにした。また、同じく先天性角化症のひとつであるロリクリン角皮症でも病変の一部から遺伝子変異が消失するrevertant mosaicismがみられることを明らかにした。さらに、変異タンパク質を発現する細胞株の解析から、変異タンパク質はDNA二重鎖切断(double strand break; DSB)を増加させないこと、X線照射で誘導したDSBの修復経路には影響を与えないこと、複製ストレスを増加させないこと、複製ストレス応答を変化させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患は、極めて難治性で新規治療法の開発が強く希求されている。遺伝性角化症は稀な疾患ではあるが、変異タンパク質が相同組換えを誘発する機構、すなわち病因遺伝子変異が自然に消失するメカニズムを解明できれば、遺伝性疾患全般の治療に広く応用できる可能性がある。人為的に相同組換えを誘導することで病因変異を消失させることができれば、これまで有効な治療法が存在しなかった疾患に対する新規治療法の開発が期待できるはずである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that homologous recombination underlies reversion of pathogenic mutations in ichthyosis with confetti. We also showed that loricrin keratoderma represents revertant mosaicism. Although the precise mechanisms underlying reversion of mutations remain unclear, we demonstrated that (1) mutant protein does not increase DNA double strand break (DSB), (2) mutant protein does not affect the pathway choice in the repair of DSB induced by X-ray irradiation, (3) mutant protein does not increase replication stress, and (4) mutant protein alters replication stress response.

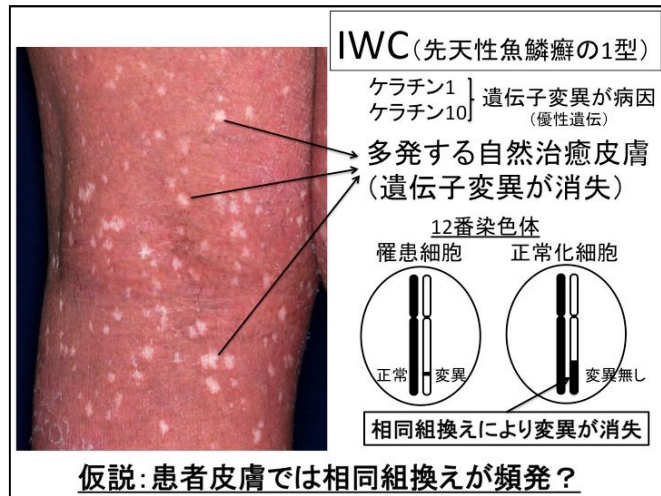
研究分野：皮膚科学

キーワード：先天性魚鱗癬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性疾患に対する根治的治療法は未だ存在せず、新規治療法の開発が希求されている。先天性魚鱗癬の一部(ケラチン1遺伝子またはケラチン10遺伝子の変異により発症する ichthyosis with confetti (IWC))では身体の一部で病因遺伝子変異が消失し「自然治癒」することが知られている(この現象を revertant mosaicism とよぶ)¹⁻³。本疾患では、約 5-10mm の正常化皮膚が 1 人の患者あたり数千個以上認められること、一度生じた正常化皮膚は長期間維持されること、加齢とともに正常化皮膚が増数することから、患者の体内には遺伝子変異を修復する機構が存在し、皮膚の幹細胞レベルで遺伝子変異が消失していることが予想される。先行研究により、約 30 箇所程度の正常化皮膚の解析が行われ、相同組換えで変異が消失していることが報告されているが、患者で無数に見られる正常化皮膚領域のごく一部しか解析されておらず、それらがすべて相同組換えで治癒しているかは不明で、さらにはその機構も不明である。



(2) IWC で認められる自然治癒機構が相同組換えのみで生じているのかこのきわめて重要な自然治癒現象(revertant mosaicism)がほかの先天性角化症でも起こっているのかは不明である。

2. 研究の目的

先天性角化症における体細胞組換え誘発の分子機構はこれまで全く明らかにされていないが、この仕組みが解明されれば、遺伝性疾患を体細胞組換え誘導により治療するという、従来の概念を大きく覆す新しい治療法の開発に繋がる可能性があるため、以下の点の解明を目指した。

(1) IWC における自然治癒機構が相同組換えのみか。

(2) ほかの先天性角化症でも revertant mosaicism が認められるか。

(3) Revertant mosaicism を呈する先天性角化症を引き起こす変異タンパク質が相同組換えを誘発する分子機構は何か。

3. 研究の方法

(1) 相同組換えが抑制された IWC 患者を同定したので、その患者を詳細に観察し、自然治癒領域の有無や数、自然治癒機構の種類を解析した。

(2) ほかの先天性角化症の患者皮膚を臨床的に観察し、自然治癒が疑われる皮膚領域が存在した場合には、ダーモスコピー所見・組織学的所見を確認した。さらに、採取した皮膚検体を表皮と真皮に分離し、それぞれから DNA を抽出し、サンガー法にて遺伝子変異の存在の有無を検討した。変異の消失が確認できた表皮由来 DNA は網羅的 SNP アレイにて相同組換えの有無を検討した。

(3) 先天性角化症で認められる遺伝子変異を導入したベクターを作成し、Tet-On システムを用いて変異タンパク質を発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、変異タンパク質が、DNA 二重鎖切断 (DNA double strand break; DSB) 頻度、X 線照射時の DSB 修復経路、複製ストレス頻度、複製ストレス反応、に与える影響をそれぞれ解析した。

4. 研究成果

(1) 相同組換えが抑制された IWC 患者では、revertant spot が著減しており、通常であれば数千個認められるのに対し、約 60 個しか認めなかった。この患者は IWC の原因遺伝子が存在する 17 番染色体にヘテロ接合性の逆位を持っていた。通常であれば、17 番染色体のセントロメアから原因遺伝子までの 15.7kbp の間で相同組換えが起これば変異が正常化するのに対し、この患者では逆位の切断端から原因遺伝子までの 4.2kbp しか変異が正常化するチャンスがないために、revertant spot の数が減少していることが明らかになった。実際、この仮説の通り、その患者の正常化表皮ではこの 4.2kbp の間に生じた相同組換えにより病因変異が消失していた。以上の結果から、IWC で見られる revertant mosaicism の発生機構の少なくとも過半数が相同組換えであることが示された⁴。

(2) IWC とは別の魚鱗癬であるロリクリン角皮症の患者でも、臨床的・組織学的に正常化した皮膚領域が多発することを発見し、それらの部位の表皮から病因遺伝子変異が消失することを明らかにした。また、網羅的 SNP アレイにより、その変異消失機構が相同組換えであることを明らかにした(6 カ所解析し、すべて相同組換えで治癒していた)。興味深いことに、それらの revertant spot は何年も消失することなく存在しており、表皮幹細胞レベルで相同組換えにより病因変異が消失していることが明らかになった⁵。

(3) 変異タンパク質は直接的に DSB を増加させることはなく、X 線照射による DSB の修復経路に変化を生じさせることはなかった。また、変異タンパク質は複製ストレスを増加させなかったが、複製ストレス反応を変化させることを見出した。

<引用文献>

1. Choate KA, et al. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. *Science* 330: 94-97, 2010.
2. Choate KA, et al. Frequent somatic reversion of KRT1 mutations in ichthyosis with confetti. *J Clin Invest* 125: 1703-1707, 2015.
3. Suzuki S, et al. Revertant mosaicism in ichthyosis with confetti caused by a frameshift mutation in KRT1. *J Invest Dermatol* 136: 2093-2095, 2016.
4. Nomura T, et al. Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor somatic recombination phenotypes. *JCI Insight* 3: e97595, 2018.
5. Suzuki S, et al. *Life Sci Alliance* 2: e201800284, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nomura Toshifumi, Suzuki Shotaro, Miyauchi Toshinari, Takeda Masae, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nishie Wataru, Akiyama Masashi, Shimizu Hiroshi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 JCI Insight | 6. 最初と最後の頁 e97595 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.97595 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Shotaro, Nomura Toshifumi, Miyauchi Toshinari, Takeda Masae, Fujita Yasuyuki, Nishie Wataru, Akiyama Masashi, Ishida-Yamamoto Akemi, Shimizu Hiroshi | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Life Science Alliance | 6. 最初と最後の頁 e201800284 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201800284 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nomura Toshifumi | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 Recombination-induced revertant mosaicism in ichthyosis with confetti and loricrin keratoderma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science | 6. 最初と最後の頁 94-100 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2019.12.013 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件／うち国際学会 2件）

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 乃村俊史 |
| 2. 発表標題 皮膚バリア異常とアトピー性皮膚炎、魚鱗癬。 |
| 3. 学会等名 第82回日本皮膚科学会東部支部学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 乃村俊史, 鈴木翔多朗, 宮内俊成, 竹田真依, 藤田靖幸, 西江渉, 秋山真志, 清水宏 |
| 2. 発表標題 診断に難渋した先天性魚鱗癬の1例 |
| 3. 学会等名 第32回角化症研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H |
| 2. 発表標題 Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor |
| 3. 学会等名 The 47th Annual European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 乃村俊史 |
| 2. 発表標題 魚鱗癬と掌蹠角化症：症例から見えてきたこと |
| 3. 学会等名 群馬皮膚科セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 乃村俊史、清水宏 |
| 2. 発表標題 Ichthyosis with confettiの一例 |
| 3. 学会等名 第466回日本皮膚科学会大阪地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 乃村俊史 |
| 2. 発表標題 遺伝性角化症における revertant mosaicism |
| 3. 学会等名 第34回角化症研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 乃村俊史，鈴木翔多朗，宮内俊成，竹田真依，藤田靖幸，西江 渉，秋山真志，山本明美，清水 宏 |
| 2. 発表標題 Mitotic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 乃村俊史，鈴木翔多朗，宮内俊成，竹田真依，藤田靖幸，西江 渉，秋山真志，山本明美，清水 宏 |
| 2. 発表標題 体細胞組換えによる revertant mosaicismを認めたロリクリン角皮症の2家系 |
| 3. 学会等名 第83回日本皮膚科学会東京・東部合同学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nomura Toshifumi |
| 2. 発表標題 Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma. |
| 3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|--------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 乃村 俊史 (Nomura Toshifumi) (50399911) | 北海道大学・大学病院・講師 (10101) | |