

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10252

研究課題名(和文) 長島型掌蹠角化症の変異未同定患者の変異探索と表皮菌叢情報に基づいた治療方法の確立

研究課題名(英文) To Establish a treatment method for the Nagashima-type palmoplantar keratosis based on the fine analysis of genome variation and skin microbiota

研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA, Aiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40383731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：長島型掌蹠角化症(NPPK)変異未同定患者に対し、全ゲノム解読(WGS)を行なった。WGSにより一人あたり約90Gbのゲノム配列を解読し、NPPK患者で共通してSERPINB7が含まれるSERPINクラスター領域にバリエーションが集積するゲノム領域の存在が明らかになった。

またNPPK患者での細菌叢解析では、16S rRNA領域を対象としたqPCR法による細菌量の定量解析法を確立し、NPPK患者60名の趾間の臭気が強いNPPK患者では細菌量も多く、16S rRNA細菌叢解析では、NPPK患者の趾間ではCorynebacterium属の菌叢が突出しており、悪臭の原因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが同定したSERPINB7遺伝子は、長島型掌蹠角化症の原因遺伝子であり、新たな“SERPIN病”の一つである。これまでの変異解析の結果、日本人全体で1万人を超える潜在的な患者数が予想されるが、角化症と認識されていない例もあると推測された。発症機序解明から治療法が確立できれば、患者のQOL改善に大きく貢献する事ができる。

研究成果の概要(英文)：Nagashima-type palmoplantar keratosis (NPPK) was an established autosomal recessive, early-onset palmoplantar keratoderma caused by mutations in the encoding SERPINB7 gene which was a member of the serine protease inhibitor superfamily. Normal form of the SERPINB7 protein was expressed in the stratum granulosum and stratum corneum. We applied to the Whole Genome Analysis to determine the patient who single pathogenic mutation. Candidate allele was derived from a common genomic cluster region Chr.18q21.33 included SERPINB7 gene.

Our skin microbiome studied against 60 NPPK patients targeted for Palm and Plantar region. There were High yield bacteria gDNA amplicon was obtained between the first and second toes by quantitative PCR analysis by 16S rRNA gene specific designed analysis. Those extracted DNA samples were processed and sequenced by Next generation Sequencing, and defined the odors caused from Corynebacterium, one of major skin commensal bacteria in human skin.

研究分野：医歯薬学・皮膚科学

キーワード：皮膚遺伝学 遺伝性角化症 菌叢解析 ゲノムシーケンシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長島型掌蹠角化症 (NPPK) は幼少時に発症する常染色体劣性遺伝を示す掌蹠角化症で、紅みを伴う非進行性の境界明瞭な軽度の過角化、手背・手首内側・足背・アキレス腱部にまで皮疹が及び、多汗を伴うことが多い、という特徴を示す。欧米ではほとんど報告されていないが、香港・中国などで報告されていることから、東アジア地域に特徴的な疾患と考えられている。男女差や季節変動はなく、悪性腫瘍等の関連性はないとされ、緩やかな T 細胞の浸潤が病変部に認められることが報告されているが、原因遺伝子は不明であった。NPPK は特徴的な手足の角化性紅斑や、高率に掌蹠多汗症を伴い、さらに悪臭や足白癬を合併するなど患者の QOL に影響を及ぼしており、発症機序の解明そして治療法の開発が望まれている。

申請者らのグループは、血縁関係のない 3 名の日本人 NPPK 患者に対して次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析法で解析し、共通した遺伝子変異としてセリンプロテアーゼインヒビターである *SERPINB7* の機能喪失型変異 (c.455-1G>A、c.218_219del2ins12、c.796C>T) を同定した (Kubo *et al. Am. J. Hum. Genet.* 2013)。

申請者らは引き続き、複数の非血縁関係にある関係にある NPPK 患者から同一新規ミスセンス変異 c.830C>T を同定した。c.830C>T 変異が病原性変異であることを明らかにするために、c.830C>T 変異をコンパウンドヘテロ接合で有する患者の足底組織切片を抗 *SERPINB7* 抗体で免疫組織染色した結果、通常の *SERPINB7* タンパクと異なる局在を呈し、表皮顆粒細胞内に変異タンパクが滞留していることが判明した。さらに収集した 100 名を超える患者及び保因者である家族について出身地を確認したところ、九州地方出身者に出現する頻度が高いことが判明した (Shiohama *et al. J. Invest. Derm.* 2016)。

2. 研究の目的

本研究では NPPK の発症機序解明だけでなく、患者の不快感を和らげるための治療への応用を目指すために、以下の 2 点に大きく分け研究を行った。

(1) 変異未同定 NPPK 患者ゲノム解析

SERPINB7 遺伝子のコーディング領域の変異が片アレルのみでしか同定されない NPPK 患者が 1 割程度存在し、これらの NPPK 患者は通常の NPPK と比較し症状が軽減していることを見出していた (未発表)。また、この変異未同定 NPPK 患者に共通した common variant (Minor allele frequency 5%以上の多型) の組み合わせが存在することから、原因変異が *SERPINB7* 領域もしくは近接領域に存在することが予想された (未発表)。

SERPIN 遺伝子ファミリーは複数のゲノム領域で遺伝子クラスターを形成していることから、*SERPIN* ファミリー全遺伝子のゲノム領域を対象としたターゲットリシーケンシングを行い、変異未同定 NPPK の原因変異同定を試みる。また、これまでに蓄積した角質層構造の解析技術と知見に基づき、NPPK、変異未同定 NPPK 及び健常人角質層を比較することにより、*SERPINB7* 変異による角質層の構造変化について解析を行い、発症メカニズム解明を目指した。

(2) 病変部位である掌蹠を中心とした表皮菌叢解析

NPPK は高率に掌蹠多汗症を伴い、さらに悪臭や足白癬を合併することから、細菌および真菌の増殖と角化症および悪臭との関連を明らかにするために、慶應義塾大学病院に来院した NPPK 患者から経時的に表皮微生物叢を採取し、臨床症状と菌叢の相関解析、除菌治療による表皮菌叢の変化、除菌後の環境による表皮菌叢形成の違いを明らかにし、NPPK における表皮細菌および真菌叢が臨床症状との相関に基づいた、症状改善が見込まれる効果的な治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 変異未同定 NPPK 患者ゲノム解析

SERPINB7 遺伝子コーディング領域に変異が 1 アレルしか同定されない NPPK 患者は 1 割程度存在する。もう一方のアレルに存在する変異を同定するために、全 *SERPIN* 遺伝子ファミリーのゲノム領域の解読を行い、解読にはアジレント社 SureSelect 法及び Illumina 社 MiSeq を用いて次世代シーケンシング解読を行った。解読後の配列データはパッケージングソフトウェア SureCall もしくは BWA-GATK プログラムでマッピング解析し、日本人ゲノムが詳細に集積されている Human Genetic Variation Database や、東北メガバンク機構の公開データを活用することで、より詳細なゲノム解析を行った。

(2) 低侵襲な表皮サンプルの採取法、細菌叢解析及び定量解析系の確立

NPPK 患者で炎症が見られる手足の掌蹠、掌蹠の隣接部位で炎症の見られない手背・足背、対照として炎症が見られず皮膚乾燥部位である前腕部、皮脂が多く好脂性細菌が多く存在する顔面部 (眉間) からサンプル採取を行う。NPPK 患者の掌蹠は角質層が健常者よりも厚くなっており、角質層内に含まれる総菌数は健常者よりも相対的に多いことが考えられるため、剥離物のサンプリングを行い、角質層内の微生物叢を評価する。サンプルは適宜、妥当な培地を用いた培養法にて評価を行う。

細菌叢解析は既に研究組織者が所属する慶應義塾大学医学部皮膚科学教室にて、年間 1000 サ

サンプル以上を処理可能なハイスループット解析法が確立されていることから、サンプリング方法の検討を中心に方法確立をおこなう。表皮細菌の採取は低侵襲で苦痛を伴わない方法を目指し (a) 小シェーブ生検 (b) スワブ綿棒による擦り取り (c) 医療用テープによるテープストリッピング等にて効率的に検体を採取できる方法を検討し、表皮細菌を情報が得られるに足るサンプル量採取の方法を検討する。予備実験では (b) スワブ綿棒にて、細菌特異的 16S リボソーム RNA 遺伝子領域を対象にした PCR 増幅するための DNA 量を採取することが可能であった。患者から採取する際はストレスが小さいスワブ綿棒による採取を行い、DNA 抽出を行う。得られたサンプルは、16S リボソーム RNA 遺伝子領域を対象にした細菌叢解析と定量 PCR を用いて評価する。

4. 研究成果

申請者らは NPPK 患者の収集を継続して行い、典型的な日本人に多く見られる 3 種の SERPINB7 遺伝子の機能喪失型変異のいずれかが、ホモ接合もしくはそれぞれがコンパウンドヘテロ接合を有する症例の他に、新たな複数のミスセンス変異とコンパウンドヘテロ接合を有していた症例を報告してきた。NPPK は特徴的な手足の角化性紅斑や高率に掌蹠多汗症を伴い、さらに悪臭や足白癬を合併するなど、患者の QOL に影響を及ぼしている。

本研究では NPPK の発症機序解明と、患者の不快感を和らげるための治療法を模索した。申請者らは研究開始当初より、既知の機能喪失型変異を片アレル変異のみを有する症例を認識しており、それらの症例数は徐々に増加傾向にあり、NPPK 患者の 1 割程度となっている。片アレル変異が未同定の NPPK 患者は通常の NPPK 患者と比べて、症状が軽減している知見を得て、変異未同定 NPPK 患者におけるゲノム解析を推進することを計画し、また、治療法を模索する中で、NPPK 患者の紅斑を生じた掌蹠部位の皮膚微生物叢解析を並行して開始し、継続的な観察から除菌治療法の確立につなげることで NPPK 患者の QOL 向上を目指している。

NPPK 患者の細菌叢解析は、診察時に NPPK 患者の角質層から生じる鱗屑を一人ずつ鏡顕観察すると、全員真菌が皮膚に存在することはないという知見を得ている。そのため真菌叢解析に手を広げず、細菌叢解析に特化し、除菌治療による表皮菌叢の変化や除菌後の環境による表皮菌叢形成の違いを、比較評価を行う。

更に SERPINB7 遺伝子コーディング領域に変異が 1 アレルしか同定されない NPPK 変異未同定患者に対し SERPIN ファミリー遺伝子のエキソン領域を対象としたターゲットリシーケンシングの結果、SERPINB7 に変異が 1 アレルしか同定されない事、他の SERPIN ファミリーには共通する変異が存在しないことが明らかになった。

そこでゲノム全体をさらに網羅的に解析するために、NPPK 変異未同定患者およびその血縁者 12 人に対し全ゲノム解読 (WGS) を行なった。WGS により 1 人あたり約 90Gb のゲノム配列を解読し、得られた fastq 形式のゲノム配列は bwa プログラムを用いてヒトゲノム (hs37d5) ヘマッピングを行なった。得られたデータは GATK パイプラインを用いてバリエーションコールを行い、各患者のバリエーション情報を得た。この情報を精査し、SERPINB7 遺伝子コーディング領域に変異が 1 アレルしか同定されないことを確認した後、NPPK 患者で共通して同定されるアミノ酸変異を伴う変異は存在しなかったが、SERPINB7 遺伝子が含まれる SERPIN クラスター領域にバリエーションが集積するゲノム領域の存在が明らかになった。この領域はクラスター遺伝子領域であり、標準ゲノム配列とは SERPIN クラスター構成が異なりうるため、現在対象領域を用いて *de novo* のアセンブリが可能か検討を行なっている。

また NPPK 患者での細菌叢解析では、16SrRNA 領域を対象とした qPCR 法による細菌量の定量解析法を確立し、実際の NPPK 患者 60 名の足部指間から採取した細菌叢解析を行った。臭気が強い NPPK 患者では細菌量も多く、16SrRNA 細菌叢解析では、NPPK 患者の趾間では *Corynebacterium* 属の菌叢が突出しており、この菌は腋臭症でも増殖が知られていることから、悪臭の原因と考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Yamauchi Aiko, Kubo Akiharu, Ono Noriko, Shiohama Aiko, Tsuruta Daisuke, Fukai Kazuyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Three cases of Nagashima-type palmoplantar keratosis associated with atopic dermatitis: A diagnostic pitfall	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e112 ~ e113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umegaki Aro N., Ono N., Tanaka R., Sasaki T., Fujita H., Shiohama A., Aoki S., Amagai M., Kubo A.	4. 巻 182
2. 論文標題 A nonepidermolytic keratinocytic epidermal naevus associated with a postzygotic mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1303 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.18729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Akiharu, Sasaki Takashi, Suzuki Hisato, Shiohama Aiko, Aoki Satomi, Sato Showbu, Fujita Harumi, Ono Noriko, Umegaki-Arao Noriko, Kawai Tomoko, Nakabayashi Kazuhiko, Hata Kenichiro, Yamada Daisuke, Matsubara Yoichi, Kosaki Kenjiro, Amagai Masayuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Clonal Expansion of Second-Hit Cells with Somatic Recombinations or C>T Transitions Form Porokeratosis in MVD or MVK Mutant Heterozygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2458 ~ 2466.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.05.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takashi Sasaki, Aiko Shiohama, Keigo Matsuda, Takuji Yamada, Hiroshi Kawasaki, Akiharu Kubo, Masayuki Amagai
2. 発表標題 Tmem79 deficient mice sequentially develop dermatitis associated with S.aureus non-dominant and dominant dysbioses.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Funiyo Yasuda-Sekiguchi, Aiko Shiohama, Hiroshi Kawasaki, Tamotsu Ebihara, Akiharu Kubo, Masayuki Amagai, Takashi Sasaki
2. 発表標題 Three genetic variants in TLR1, TIRAP and PSAPL1 are enriched in a specific subgroup of adult atopic dermatitis showing persistent skin manifestation on the face and neck area.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小幡 祥子、川崎 洋、本多 皓、安田文世、塩濱愛子、佐々木貴史、川上英良、天谷雅行、海老原 全
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎患者に対する次亜塩素酸ナトリウム含有浴 (Bleach bath) 療法が皮膚細菌叢及び臨床症状へ与える影響の検討
3. 学会等名 第38回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kubo A, Sasaki T, Suzuki H, Shiohama A, Aoki S, Kawai T, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K, Amagai M.
2. 発表標題 Postnatal somatic recombinations and C>T transition mutations are two major triggers of disseminated superficial actinic porokeratosis in MVD or MVK mutant heterozygotes.
3. 学会等名 49th Annual ESDR Meeting, Bordeaux, FRANCE (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長島型掌蹠角化症 - 疾患の発見から原因遺伝子の解明へ -
http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201406.html
 生まれつきの皮膚症状 (先天性の皮膚疾患)
<http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/000806.html>
 汗孔角化症の発症メカニズムを解明 ~ 日本人の400人に1人が発症素因を持つことが明らかに ~
http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/202001.html

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	佐々木 貴史 (SASAKI Takashi) (70306843)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究分担者	久保 亮治 (KUBO Akiharu) (70335256)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究協力者	小野 紀子 (ONO Noriko)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	