

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19790797

研究課題名 (和文) 乾癬候補遺伝子としての EVER1 および EVER2 遺伝子多型解析

研究課題名 (英文) Association study of EVER1 and EVER2 genes in psoriasis patients.

研究代表者 大霜 智子 (OSHIMO TOMOKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究医

研究者番号：90448754

研究成果の概要：

乾癬候補遺伝子としてのEVER1およびEVER2遺伝子の一塩基多型 (SNP) について、9つのcSNPにつき相関解析を行った。その結果、EVER1exon16で $P < 0.00104$ 、EVER2exon9で $P < 0.0418$ という結果が得られ、この2つのSNPに関しては乾癬患者とcontrol間で有意差が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：乾癬、ウイルス、SNP

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は、欧米や中国韓国では1～2%に見られる、最もありふれた皮膚疾患です。日本人では頻度は少なくなるものの、近年非常に増えてきた疾患です。食生活などの生活習慣の変化が大きくかかわっているものと考えられますが、一方遺伝的な素因も大きく関わるものと推定されています。ヒトゲノムが明らかになるのと平行して、乾癬の遺伝素因を明らかにしようとする研究がすすめられ、

とくにゲノムスキャンとよばれる方法により、乾癬疾患感受性遺伝子の遺伝子座が明らかになってきました。染色体1q21、3q、4q35、17q25、20pに乾癬疾患感受性遺伝子があるとされています。これらは、アトピー性皮膚炎でのゲノムスキャンとオーバーラップするものが多く(1q21, 17q25, 20p)、単なる偶然とは考えるのは困難で、皮膚炎を起こしやすくする遺伝子はアトピー性皮膚炎と乾癬で共通

したものである可能性が高いとされてきております。

染色体 4q35 の場所には、interferon regulatory factor2 という転写因子が存在し、interferon の発現を negative にコントロールしています。この遺伝子に異常があると interferon の発現の抑えが効かなくなり、免疫のバランスは Th1 に傾くことにより乾癬を発症させやすくなるものと考えられます。私の属している研究室では、この遺伝子と乾癬との関係を数年前より研究しているのを目の当たりにしてきました。現在、この遺伝子と乾癬に関わる論文を執筆中です (Hosomi N et al, in preparation) が、私も多因子遺伝疾患の研究をしたいと思うようになりました。

私たちの研究室では、数年前より疣贅状表皮発育異常症 (EV) の 3 人の兄弟例を経験しました。この家系で連鎖解析を行い、17q25 の場所に multipoint LOD score 3 以上の値を得ましたので、この家系の EV の原因遺伝子は 17q25 にあることがわかりました。その原因遺伝子を調べていく過程で、LAK-4K というタンパクをコードする遺伝子を注目しました。これは EV の連鎖解析により得られた 17q25 の場所に存在し、Natural Killer 細胞に発現していることから、ウィルスの排除に関連するタンパクとして特に注目しました。この遺伝子は当時 8 つのエクソンがデータベース上に存在するとされたので、この遺伝子について患者さんの変異解析を行いました。結局変異は見つかりませんでした。ところが、その 1 年後にパスツール研究所の Orth 教授の研究室から、この LAK-4K が EV の原因遺伝子であるということが Nature Genetics に発表されたのです (Ramos N et al. *Nat Genet.* 2002;32:579)。結局、LAK-4K は EVER1 (TMC6) という 20 のエクソンからなる遺伝子

の後半の部分的なタンパクであることがわかり、この患者さんでは前半部分にスプライス変異があることがわかりました。さらに、EVER1 に隣接して存在する EVER2 (TMC8) という遺伝子も EV の原因遺伝子であることが、同じ論文で発表されました。

疣贅状表皮発育異常症は、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) が皮膚に慢性的に非常に繁殖し、疣贅を皮膚に多発する病気です。HPV には多数の種類がありますが、とくに EV では、EV に特有の HPV 種が繁殖することが知られています。非常に興味のあることに、この EV specific HPV の DNA は尋常性乾癬の表皮から高頻度に検出されることが示されています (Weisborn SJ et al *J Invest Dermatol* 1999;113:122)。乾癬ではないヒトの皮膚からは、このタイプの HPV はほとんど検出されません。したがって、次のような仮説がなりたります。(仮説) 尋常性乾癬の患者さんは、もともと EVER1 または EVER2 が機能低下するような多型、または発現が低下するような発現調節領域の多型がある。そのために、尋常性乾癬の患者皮膚には EV specific HPV が排除できなくなっている。しかし、完全にその機能を失っているわけではないので、ウイルスが増殖して疣贅を形成するところまでには至っていない。皮膚に外来性の HPV が存在するために、それを排除しようとインターフェロンの発現が高くなり、乾癬を発症しやすくなる免疫バランスに傾く。この仮説に対する反論として、次のようなものがあるかもしれません。

(反論) 乾癬は頻度が比較的高いために、この EVER1 または EVER2 の機能に影響するような遺伝子多型がある程度の割合で見られるとすると、その多型がホモ接合体ないし複合ヘテロ接合体になる可能性はかなりの確率で考えられ、その場合重症の EV になる。しかし実際には EV はきわめてまれな疾患で、めっ

たに見られるものではない。またその表現型は特異であるために、診断されずに放置されることもあまりないので、やはりきわめてまれである。したがって、このEVER1またはEVER2遺伝子の機能に関わる多型はあまり存在しないのではないか。しかしながら、この反論には盲点があります。これまでに報告されている、EVの遺伝子変異はナンセンス変異とスプライス変異のみで、ミスセンス変異の報告はありません。つまり、常染色体劣性遺伝のEVはこのEVER1遺伝子が全く機能しなくなったときのみ発症しています。機能を部分的に残す、あるいは低下させる、あるいは発現を低下させるような遺伝子多型が尋常性乾癬に関与している可能性は十分に考えられます。繰り返しになりますが、それは

(1) この遺伝子が17q25にあり、ゲノムスキャンで得られた乾癬疾患感受性遺伝子部位に一致する

(2) 尋常性乾癬の病変部位にEV-specific HPVが高頻度に分離される

(3) ウィルスを排除しようとする免疫反応は乾癬を増悪させるしたが、いまして、この可能性を追求していくことは、試してみる価値があるテーマであると考えました。

2. 研究の目的

乾癬候補遺伝子としてのEVER1およびEVER2遺伝子多型を解析すること

3. 研究の方法

データベース検索により得られた以下のEVER1遺伝子およびEVER2遺伝子の9つのcSNP (EVER1のcSNP:①rs2748427(exon5) Arg125Trp (heterozygosity N.D.) ②rs12449858 (exon6) Phe153Leu (heterozygosity N.D.) ③rs9895373(exon7) Phe200Ser (heterozygosity N.D.) ④rs8078238(exon8) Ile287Val (heterozygosity N.D.) ⑤rs3818144(exon10) Thr382Th

r(heterozygosity N.D.) ⑥rs2613516(exon16) Thr650Thr (heterozygosity 0.146), EVER2遺伝子のcSNP:①rs7208422 (exon8) Ile306Asn (heterozygosity 0.496) ②rs12452890 (exon9) Glu369Glu (heterozygosity N.D.) ③rs11651675 (exon12) Ile501Val (heterozygosity 0.014))について以下の方法でgenotypingを行った。

(1) 患者ゲノムDNAをtemplateにして、EVER1遺伝子およびEVER2遺伝子の各エクソンをPCR法により増幅した。

(2) 得られたPCR productは、アガロースゲルに流した。ゲルバンドをカットし、gel-purification kit (Amersham)により精製した。これをtemplateにして、SNapShot法により反応を行った。得られたサンプルは、エタノール沈殿を行い、ホルムアミドに溶解して、医局に備え付けの310キャピラリー・シークエンサーに流した。

(3) これを20症例について行い、SNPが見られたサンプルについて、SSCPゲルで判別が可能かどうかを調べた。

(4) 判別が可能であることがわかったため、コントロールサンプルを含めてすべてSSCPによりgenotypingを行った。

次に、得られたコード領域SNPについてのcase-control studyをおこなった。

それぞれのexonについて乾癬患者80症例、コントロール患者100症例の結果を集計し、 χ^2 検定(危険率5%)で有意差の有無を検討した。

4. 研究成果

EVER1exon16で $P < 0.00104$ 、EVER2exon9で $P < 0.0418$ という結果が得られ、この2つのSNPに関しては乾癬患者とcontrol間で有意差があると判断した。EVER1、EVER2ともに乾癬遺伝子として有力な候補遺伝子と考えられる。EVER

1, EVER2ともにHPVの免疫的排除に関わる遺伝子である。乾癬患者さんの病変皮膚からは、HPVが高頻度に検出されることから、皮膚に外来性のHPVが存在するためにそれを排除しようとしてインターフェロンの発現が高くなり、乾癬を発症しやすくなる免疫バランスに傾くと考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1 大霜智子、深井和吉、東禹彦、今井祐記、石井正光
nail-patella 症候群 皮膚病診療
31(3):297-300 2009、査読無し

2 Oshimo T, Fukai K, Higashi N, Kitano T, Imai Y, Shintaku H, Ishii M.
A novel LMX1B nonsense mutation in a family with nail-patella syndrome. J Dermatol Sci. 52(1):57-60.2008,査読有り

[学会発表] (計6件)

1 大霜智子、深井和吉、石井正光、今井祐記、白木邦彦
NF1 との鑑別に近赤外光走査型レーザー検眼鏡による眼底検査が有用であった multiple café-au-lait spots の1例 第411回 日本皮膚科学会大阪地方会 2009年2月14日(大阪市)

2 Kazuyoshi Fukai, Tomoko Oshimo, Nobuhiko Higashi, Toshio Kitano, Yuki Imai, Haruo Shintaku, Masamitsu Ishii
Juvenile glaucoma associated with nail-patella syndrome 58th Annual Meeting American Society of Human Genetics 2008年11月11日~15日 (Philadelphia, Pennsylvania), USA

3 大霜智子、深井和吉、東禹彦、北野利夫、今井祐記、新宅治夫、石井正光
LMX1B 遺伝子に新規ナンセンス変異を認めた nail-patella 症候群の1例 第53回日本人類遺伝学会 2008年9月29日(横浜市)

4 成瀬明子、大霜智子、水野信之、曾和順子、柳原茂人、石井正光、横井俊明、倭和美
極低出生体重児にみられた langerhans cell histiocytosis の1例 第406回日本皮膚科学会大阪地方会 2008年3月29日(大阪市)

5 大霜智子、深井和吉、石井正光、東禹彦、北野利夫、今井祐記、新宅治夫
LMX1B 遺伝子にフレームシフト変異を認めた Nail-Patella 症候群 第400回日本皮膚科学会大阪地方会 2007年12月1日(奈良市)

6 Naoko Hosomi, Kazuyoshi Fukai, Naoki Oiso, Yoshimi Kira, Tomoko Oshimo and Masamitsu Ishii

Analysis of methylation status in the promoter of interferon regulatory factor-2 gene in patients with late-onset psoriasis 57th Annual Meeting American Society of Human Genetics 2007年10月23日~27日 (San Diego, California), USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大霜 智子 (OSHIMO TOMOKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究医
研究者番号：90448754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし