

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16256

研究課題名(和文)先天性魚鱗癬の発病および正常化細胞発生による治癒の分子基盤の解明とその新展開

研究課題名(英文)Elucidation of the Molecular Basis of Congenital Ichthyosis Onset and Natural gene therapy

研究代表者

杉山 誉人(SUGIYAMA, Takato)

筑波大学・医学医療系・特別研究員(PD)

研究者番号：70930329

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):ケラチン10遺伝子の変異による先天性魚鱗癬には、臨床像が大きく異なる表皮融解性魚鱗癬とIchthyosis with confetti (IWC)が知られている。さらに、IWCは極めて稀な自然治癒を伴う遺伝性疾患であるが、なぜ同一遺伝子の変異であるにも関わらず、変異の種類により発症する疾患が異なるのか、は明らかになっていない。本研究の結果、野生型ケラチン10のテイル領域は天然変性領域であり相分離を引き起こすが、IWC変異型ケラチン10はこれとは異なる構造体を形成することが明らかになった。IWC変異によりケラチンのテイル領域の物性や柔軟性が変化することにより、IWCを発症することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患には根治的治療法が存在しない、というのが現代の常識である。一方で、IWCという極めて珍しいタイプの魚鱗癬では、revertant mosaicismという現象により、遺伝子変異が自然に治癒することが知られている。このように、「ヒトが元来から備える能力によって、ゲノムを修正し、細胞が遺伝性疾患を治療する」という現象の分子基盤を理解することは、将来的な遺伝性疾患の新たな治療法開発に向けた基盤的研究になりうる。

研究成果の概要(英文):Congenital ichthyosis caused by mutations in the keratin 10 gene includes epidermolytic ichthyosis and Ichthyosis with confetti (IWC), which display significantly different clinical presentations. Additionally, IWC is an extremely rare hereditary disease that causes natural gene therapy, but it remains unclear why different types of diseases develop from mutations in the same gene. In this study, we revealed that the tail region of wild-type keratin 10 is an intrinsically disordered region that induces liquid-liquid phase separation, whereas IWC mutant keratin 10 forms different structures. It is suggested that the IWC mutation significantly alters the physical properties and flexibility of the keratin tail region, leading to the development of IWC.

研究分野：分子生物学

キーワード：ケラチン 相分離 天然変性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) ケラチンは、上皮細胞の主要な中間径線維であり、細胞内に充満することで細胞の形態保持に貢献するタンパク質群である。ケラチンタンパク質は少なくとも 30 以上の種類が知られており、酸性のタイプ I ケラチンと塩基性のタイプ II ケラチンが特定のペアで、互いの中央部に位置する Rod ドメインを介して重合、多量体化することにより、組織や細胞に最適かつ特異的なケラチン線維が完成する。そのため表皮ケラチンに機能喪失変異を生じると、正常な中間径線維が形成されず、表皮の脆弱化あるいは過角化をもたらす疾患群であるケラチン病を発症する。

表皮における最も代表的なケラチン線維として、ケラチン 10 およびケラチン 1 が存在する。これらは分化後の有棘層や顆粒層に特異的に発現し、表皮細胞の形態維持や保護機能を担うため、これらの Rod ドメインにおけるナンセンス変異やミスセンス変異によりタンパク質自身が機能不全に陥ることで表皮融解性魚鱗癬を発症する(図 1)。表皮融解性魚鱗癬は、厚い鱗状の皮膚症状(魚鱗癬症状)を呈するのみならず、細胞骨格形成不全により表皮細胞が失われ皮膚がただれて(びらん症状)しまう遺伝性疾患である。一方で、本研究では、ケラチン 10 およびケラチン 1 の C 末端に位置するテイル領域において +1 フレームシフト変異を生じることにより、Ichthyosis with confetti (IWC) と呼ばれる極めて稀な遺伝性疾患を発症することに着目した。IWC は表皮融解性魚鱗癬と同様に魚鱗癬症状を呈するものの、びらん症状や表皮の脆弱性に関する病理学的所見は認めない。また、IWC の特筆すべき特徴は、加齢と共に病因となる遺伝子変異が修復、消失し、白い紙吹雪(confetti)様の健常皮膚斑が数千箇所も多発し部分的に自然治癒することである。このように、同一遺伝子の変異に由来する表皮融解性魚鱗癬とは全く異なる臨床所見を認める IWC の発症機序は、単純なタンパク質の機能不全という理由付けだけで説明できないにも関わらず、IWC やそれをもたらす変異産物に関する細胞生物学および分子生物学的知見は極めて乏しい。また、独特な自然治癒現象は、復帰変異モザイク(Revertant Mosaicism: RM)と呼ばれるが、変異型タンパク質がどのように細胞内で異常と検知され、それを修復するためにどのような現象が惹起されるのかについて、迫った例はない。

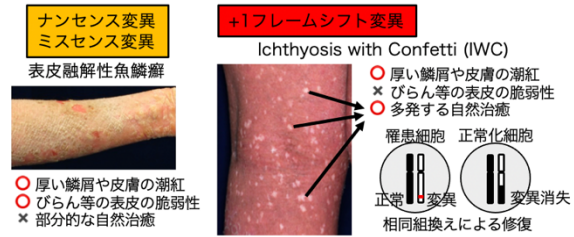


図1. ケラチン10およびケラチン1の変異により発症する遺伝性疾患

(2) 魚鱗癬と同様に皮膚に赤みを認めるものの、その症状が掌蹠に限定されている遺伝性角化症として長島型掌蹠角化症が知られている。日本人の 50 人に 1 人が保因者で罹患率は約 1 万人に 1 人と推定されており、東アジアに多い遺伝病である。その原因遺伝子としてセリンプロテアーゼインヒビターをコードする *SERPINB7* が同定されているが(Kubo *et al.*, *Am J Hum Genet*, 2013)、病原性変異型タンパク質がどのような機能欠損を起こすのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) IWC を引き起こす原因変異はケラチン 10 の C 末端に位置するテイル領域におけるフレームシフト変異(図 2: 青字)やスプライス変異(図 2: 赤字)に起因する。いずれの場合にも、テイル領域のコードン読み枠が +1 フレームシフトすることで、アルギニンに富んだ配列に変化する。申請者は、天然変性度の予測ツールである PONDR により解析することで、野生型ケラチン 10 および IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域はいずれも天然変性度が極めて高いことに着目した。本研究では、天然変性領域のアミノ酸組成の変化によりケラチン 10 の機能や物性がどのように変化し、細胞内でどのような振る舞いをするのかを検討した。

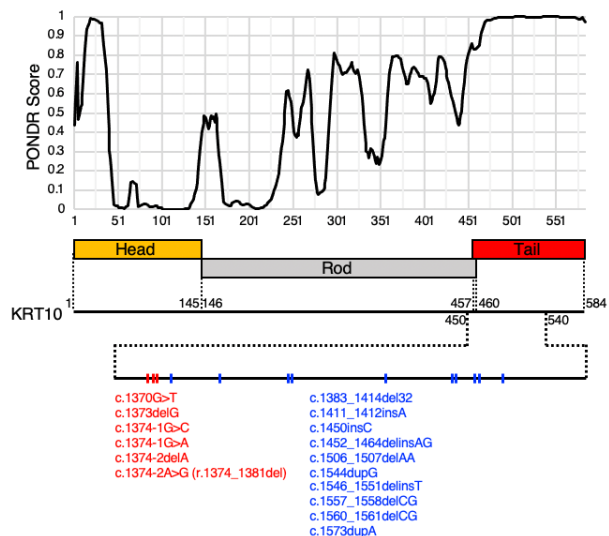


図2. IWCは天然変性度が高いC末端のTailドメインにおけるフレームシフト変異に起因する

(2) *SERPINB7* は *SERPIN* ファミリーの一つでありセリンプロテアーゼインヒビターをコードする。なかでも、*SERPINB* clade は細胞内セリンプロテアーゼインヒビターとして定義され

てきた (Gettins., *Chem Rev*, 2002)。しかしながら近年、いくつかの SERPINB clade に属すタンパク質が体液中から検出されたという報告があり、本研究では SERPINB7 が細胞外分泌タンパク質である可能性について検証する。その上で、野生型 SERPINB7 および病原性変異型 SERPINB7 の活性および性質の違いを解析する。

3. 研究の方法

(1) 天然変性タンパク質は高度に混み合った細胞内を区画化する現象である液-液相分離に関与する可能性が高いことから、野生型および IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域のリコンビナントタンパク質を用いた試験管内液滴形成実験によりその物性変化を検証した。また、細胞内でどのような発現挙動を示すのかについて、多様な変異体を用いたレポーターアッセイにより解析を行った。

(2) SERPINB7 が細胞外分泌タンパク質である可能性を検証するため、細胞抽出液とその培養上清を調整し、ウエスタンブロッティングによる細胞外への分泌活性について検討した。さらに、野生型および病原性変異型 SERPINB7 における細胞外分泌効率を比較した。また、これらの解析の過程で、糖鎖修飾による制御の関与が疑われたために、各 SERPINB7 の糖鎖プロファイルを質量分析により同定した。

4. 研究成果

(1-1) 大腸菌を用いた発現系から精製した野生型および IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域のリコンビナントタンパク質を使用した試験管内液滴形成実験の結果、野生型および IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域はいずれも構造体を形成することが明らかになった。そのうち、野生型ケラチン 10 のテイル領域は、1,6-ヘキサンジオールにより溶解される液滴を形成する一方で、IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域は、1,6-ヘキサンジオールに耐性を示す構造体であることが明らかになった。また、特定の条件下において IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域は、構造体の形を大きく変化させることを見出した。これらのことから、テイル領域のフレームシフト変異により野生型および IWC 変異型ケラチン 10 の物性が極めて大きく変化し、IWC 変異型ケラチン 10 が新たな機能を獲得することが IWC における独創的な臨床所見に繋がる可能性が示唆された。

(1-2) 培養細胞に IWC 変異型ケラチン 10 を発現させ、ウエスタンブロッティングを行うと、SDS 耐性の凝集体として検出されることが明らかになった。また、IWC 変異型ケラチン 10 のテイル領域はアルギニンに富んだ配列を含むが、この凝集体形成にどのような配列要素が関与するかを検討した。約 60 種類の欠失変異体等を用いた変異体解析を行った結果、アルギニンリピートのみではなく、そのさらに C 末端に位置する数残基の配列が組み合わさって存在することが構造体形成に重要であることが明らかになった。

(1-3) (1-1)や(1-2)の結果から、IWC 変異型ケラチン 10 はそのテイル領域のアミノ酸組成の変化により、単にケラチン 10 の活性が失われるということではなく、その物性が大きく変化することで野生型ケラチン 10 が有さない新規機能を獲得する可能性が考えられる。今後さらなる解析を進めることで、IWC の発症および自然治癒をもたらす新規の分子基盤を確立し、「ヒト細胞が元来から備える能力により、変異ゲノムが組み換えられ、遺伝子変異が自然に消失する」というユニークな現象を理解することで、新たな遺伝病に対する治療アプローチが誕生する可能性がある。

(2-1) SERPINB7 の C 末端に FLAG タグを付加したプラスミドを培養細胞に発現させ、調整した細胞抽出液とその培養上清をウエスタンブロッティングにより評価した結果、野生型 SERPINB7 は細胞外分泌タンパク質であり糖タンパク質であることが明らかになった。また、表皮由来の不死化角化細胞である HaCaT 細胞においても、内在性の野生型 SERPINB7 が細胞外分泌されることを明らかにした。

(2-2) 病原性を有することで報告されている全ての欠失変異体およびミスセンス変異体、いくつかのナンセンス変異体をクローニングし、同様のレポーターアッセイ系によりそれぞれの細胞外分泌効率を評価した。その結果、1 種のミスセンス変異体を除く、ほぼ全ての病原性変異型 SERPINB7 は細胞外分泌不全に陥ることを明らかにした。また、病原性変異型タンパク質のほとんどは、タンパク質構造不安定性を示すことを見出した。

(2-3) 上記の解析の過程で、分子量が想定と異なる変異体をいくつか発見した。この分子量変化が糖鎖修飾の変化による可能性を考え、質量分析により糖鎖プロファイルの変化を解析した。実際に分子量が想定と異なる変異体では、野生型とは異なる糖鎖プロファイルを示しており、異常糖鎖が修飾されない変異体では細胞外分泌不全が減弱することを見出した。

(2-4) (2-1)から(2-3)の結果により、長島型掌蹠角化症の本態は、病原性変異型 SERPINB7 の細胞外分泌不全にあることが示唆される。細胞外に SERPINB7 が分泌されなくなることで、細胞外に存在する未同定のプロテアーゼ活性が暴走し、表皮細胞外に発現する特定のタンパク質群が過剰に分解されることで、表皮の恒常性が破綻する可能性が考えられる。本研究により、新規治療標的として細胞外に存在するプロテアーゼが新たに浮かび上がってきたことから、今後この責任プロテアーゼの同定や解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sugiyama T, Nobuta R, Nomoto A, Shiraki K, Nomura T
2. 発表標題 Pathogenic frameshift peptides form unique multi-functional droplets in ichthyosis with confetti
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山 誉人、佐々木 克仁、信田 理沙、梅澤 啓太郎、三浦 ゆり、潮田 亮、乃村 俊史
2. 発表標題 病原性変異型SERPINB7の細胞外分泌不全が長島型掌蹠角化症を引き起こす
3. 学会等名 第96回日本生化学会年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------