

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670526

研究課題名(和文)顔面と陰部に色素斑が多発する遺伝性全身性メラニン色素異常症(仮称)の原因解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of universal inherited melanodyschromatosis

研究代表者

杉浦 一充(SUGIURA, Kazumitsu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335032

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): Universal inherited melanodyschromatosis (UIM) (仮称: 遺伝性全身性メラニン色素異常症)は常染色体優性遺伝形式の極めて稀な遺伝性皮膚疾患である。本研究では本疾患と診断した本邦初の日本人大家系より全エクソームシーケンス法を用いてUIMの病因遺伝子Xを同定した。さらに、病因遺伝子Xのメラニン合成の役割について知るために、メラノサイト細胞株を用いて機能解析を実施した。

研究成果の概要(英文): Universal inherited melanodyschromatosis (UIM), a provisional name of a skin disease, is a rare autosomal dominant disorder. In this study, we identified a causative gene of gene X for UIM by whole exome sequencing method using the first Japanese UIM large family. In addition, we conducted melanin synthesis analysis with a melanoma cell line in order to realize a function of gene X for melanin synthesis.

研究分野: 皮膚科学

キーワード: 遺伝性全身性メラニン色素異常症 常染色体優性遺伝形式 遺伝性皮膚疾患 全エクソームシーケンス 病因遺伝子同定

## 1. 研究開始当初の背景

Universal inherited

melanodyschromatosis (UIM) (仮称：遺伝性全身性メラニン色素異常症)は常染色体優性遺伝形式の極めて稀な遺伝性皮膚疾患である(Rebora A et al. Arch Dermatol 1989)。幼少時から発症し、頬部などの顔面(図1)、陰部、肘、膝、手足などに褐色色素斑が多発する。



図1: 患者V-1、V-2 (一卵性双生児)の頬部褐色色素斑

内蔵病変を合併しない。本症は今までにイタリア人の1つの大家系の症例が報告されていたが、病因遺伝子は同定されていなかった。私たちは家族歴、臨床所見、病理所見、電顕所見より、本疾患患者と診断した本邦初の日本人大家系の患者6人の経過観察をしていた(図2)。

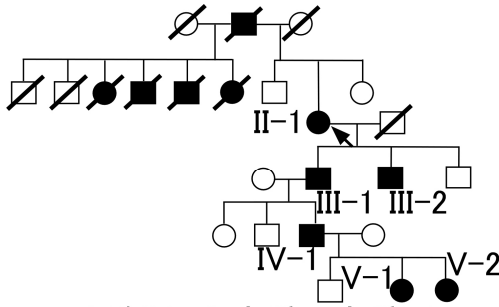


図2: UIMと診断した家系の家系図

私たちは遺伝性皮膚疾患の病因遺伝子変異の解析を精力的に実施し、研究開始当初までに19疾患、60家系において、病因遺伝子を明らかにしてきた(Sugiura K, et al. JID 2012; Sugiura K, et al. Br J Dermatol 2012; Sugiura K, et al. JID 2013(a); Sugiura K, et al. JID 2013(b); Sugiura K, et al. JAMA Dermatol 2013 in press; Sugiura K, et al. JAAD 2013 in press; Kobayashi T, Sugiura K, et al. Br J

Dermatol 2013, etc)。また、全エクソームシーケンス法を用いて網状肢端色素沈着症(北村)の原因遺伝子*ADAM10*を同定し報告した(Kono M, Sugiura K, et al. Hum Mol Genet 2013)。私たちは電顕所見(図3)、

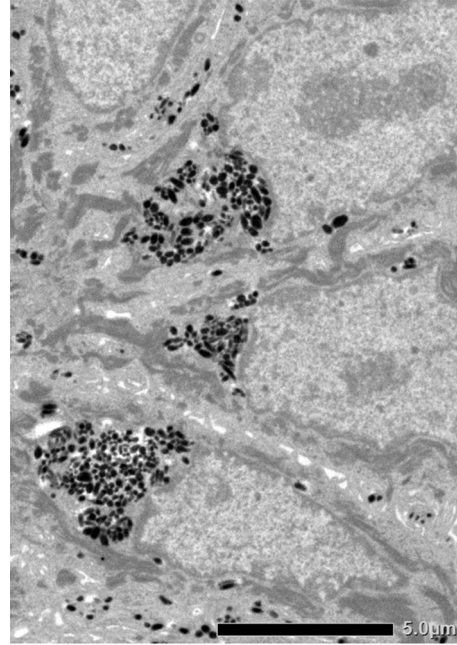


図3: 患者II-1の左手掌の褐色色素斑の電顕所見。メラノサイトにメラノソームが多数存在する。

文献検索などから病因遺伝子はメラノサイトにおいてメラニン合成に関与しているとの仮説をたてていた。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず全エクソームシーケンス法を用いてUIMの病因遺伝子を同定することを目的とした。病因遺伝子X同定後は、この遺伝子がメラノサイトにおいてメラニン合成に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) UIMの原因遺伝子の同定

患者と患者家族健常人から末梢血を採取し、白血球のDNAを抽出した。採血が困難な場合は粘膜擦過細胞を採取しDNAを抽出した。試料は連結可能匿名化した。患者3人と患者家族の健常人1人の全エクソームシーケンス法で解析し候補病因

遺伝子を絞り込んだ。対象遺伝子はイルミナ TruSeq エクソーム濃縮キット等を用いて濃縮された白血球内で mRNA として転写される全ての遺伝子とした。絞り込んだ候補病因遺伝子(候補変異部位)全てについて、全エクソームシーケンス法を行わなかった患者 3 人と患者家族健常人 5 人の DNA を用いて病因遺伝子 X が 1 つに絞り込まれた。候補遺伝子のコードするタンパク質に対する抗体は市販されていたため、皮膚組織の免疫組織化学を実施し、皮膚、特にメラノサイトへの局在を確認した。健常人 100 人の遺伝子と比較して候補遺伝子に見出された変異が稀少であることを確認した。ここまでで、UIM の病因遺伝子 X を確定した。

## (2) 遺伝子 X のメラニン合成への関与とその役割を明らかにした。

病因遺伝子 X はリン酸化酵素をコードしていた。このリン酸化酵素と近似のリン酸化酵素の先行研究に照らし合わせると、本症の病因遺伝子 X の変異は

gain-of-function 変異であることが予測された。恒常的に野生型 X と変異型 X を過剰発現する細胞株を構築した。つまり野生型病因遺伝子 X cDNA と変異型病因遺伝子 X cDNA をネオマイシン耐性のプラスミドに組み替えた。cDNA はヒトメラノサイト培養細胞の cDNA ライブラリーから PCR で増幅した。

無色素性のメラノーマ由来細胞株 A375 と SK-MEL28 それぞれに上記プラスミド(野生型と変異型それぞれ)をトランスフェクションし、G418 にて選択し、合計 4 つの過剰発現株を構築した。野生型 X と変異型 X のメラニン産生能の比較をした。つまり野生型 X 変異型 X を過剰発現する細胞株 2 種 (A375 と SK-MEL28 )を用いて、培養上清、細胞抽出液におけるメラニンの量を ELISA

キット(CUSABIO MELANIN ELISA KIT)を用いて野生型と変異型をそれぞれの細胞株において比較検討した。さらに c-kit kinase の活性化を c-kit リン酸化特異抗体を用いた Western blotting 法などにて比較検討した。c-kit kinase は受容体型チロシンリン酸化酵素であり、メラノサイトにおいて、メラニン産生に重要な働きをする。さらに、恒常的に野生型遺伝子 X を欠損する細胞株を用いたメラニン産生能の検討をした。遺伝子 X mRNA をノックダウンするプラスミドに組み込んだ shRNA 3 種(市販されている)を A375 と SK-MEL28 に恒常的に発現させて、恒常的に野生型 UIMSH3 を欠損する細胞株を構築し、mock プラスミドを組み込んだ細胞株と比較検討する。遺伝子 X を欠損させることにより、メラニン産生量の変化と c-kit kinase の活性化の変化を比較した。

## 4 . 研究成果

UIM の病因遺伝子 X を同定した。病因遺伝子 X は、メラノサイトにおいてメラニン合成に関与しているかを明らかにした。

## 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 8 件)

Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 23;112:7707-12. 査読有  
Shimizu Y, Ogawa Y, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M. A palindromic motif in the -2084 to

-2078 upstream region is essential for *ABCA12* promoter function in cultured human keratinocytes. *Sci Rep* 2014;4:6737. 査読有

Muro Y, Nakashima R, Hosono Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. Autoantibodies to DNA mismatch repair enzymes in

polymyositis/dermatomyositis and other autoimmune diseases: a possible marker of favorable prognosis. *Arthritis Rheumatol*, 2014;66:3457-3462. 査読有

Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Is the measurement of anti-PM-1

antibodies at least as important as that of other scleroderma-specific antibodies? *Arthritis Rheumatol* 2014;66:3248. 査読有

Sugiura K, Oiso N, Iinuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Kawada A, Iizuka H, Akiyama M. *IL36RN* Mutations Underlie Impetigo

Herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2014;134:2472-4. 査読有

Sugiura K, Muro Y, Akiyama M.

Solitary organizing pneumonia in systemic sclerosis mimicking lung adenocarcinoma. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2648. 査読有

Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K, Akiyama M.

Revertant Mutation Releases Confined Lethal Mutation, Opening Pandora's Box: A Novel Genetic Pathogenesis.

*PLoS Genet* 2014;10(5):e1004276. 査読有

Sugiura K, Muto M, Akiyama M. *CARD14* c.526G>C (p.Asp176His) is a Significant Risk Factor for

Generalized Pustular Psoriasis with Psoriasis Vulgaris in the Japanese Cohort. *J Invest Dermatol* 2014 ;134:1755-7. 査読有

[学会発表](計4件)

Genetic background of pustular psoriasis 杉浦一充 日本研究皮膚科学会第40回年次学術大会・総会 2015年12月13日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

膿疱症 up-to-date 杉浦一充 平成27年度生涯教育講演会第274回 日本皮膚科学会東海地方会 2015年12月6日 大正製薬名古屋支店(愛知県名古屋市)

先天性縮毛症・乏毛症 杉浦一充 第20回日本臨床毛髪学会学術集会 2015年12月5日 高知市総合あんしんセンター(高知県高知市)

膿疱性乾癬とAGEPの関係 教育講演 杉浦一充 第114回日本皮膚科学会総会 2015年5月30日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 関節症乾癬モデル動物及び膿疱性乾癬モデル動物

発明者: 秋山真志、杉浦一充、柴田章貴  
権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-181223

出願年月日: 2015年9月14日

国内外の別: 国内

名称: インターロイキン36受容体アンタゴニスト欠損症の治療薬

発明者: 秋山真志、杉浦一充、柴田章貴  
権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-254560

出願年月日: 2015年12月25日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70335032

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
越川 直彦 (KOSHIKAWA, Naohiko)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：70334282