

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19670

研究課題名(和文) 栄養障害型表皮水疱症にVII型コラーゲン遺伝子以外の遺伝的要素は関与するか？

研究課題名(英文) Is there any responsible genetic factor other than mutation of COL7A1 underlying pathogenesis of dystrophic epidermolysis bullosa?

研究代表者

赤坂 英二郎 (EIJIRO, AKASAKA)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、栄養障害型表皮水疱症(DEB)の原因遺伝子であるCOL7A1変異を詳細に解析することにより、DEBの未知の発症メカニズムを解明することである。これまで解析したDEB 155家系についてCOL7A1変異の解析を行ったが、遺伝子型と表現型の相関については、いくつかの傾向がみられたが、いまだ不明な点が多い。また同一家系内で表現型が異なる優性型DEB家系について、詳細に検討し英文にて報告した。さらに劣性形DEBについては一方のアリルにしか変異が同定されない患者を20例蓄積し、今後次世代シーケンズを行い、COL7A1以外の遺伝子に変異があるか検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate unknown mechanisms underlying the pathogenesis of dystrophic epidermolysis bullosa (DEB). At first, we have analyzed COL7A1 mutation in 155 Japanese DEB families including 60 dominant DEB and 95 recessive DEB. These results provided us some useful evidences for understanding of pathogenesis of DEB, however the genotype-phenotype relationship remains to be unclear. In addition, we analyzed a Japanese DEB pedigree in which the affected family member showed marked clinical heterogeneity. We have reported the pedigree in English literature. Further, we corrected and investigated 20 recessive DEB patients whose COL7A1 mutations were detected only one allele. These patients going to be subjected to next generation sequencing to search candidate genes other than COL7A1 underlying the pathogenesis of DEB.

研究分野：皮膚科学，水疱症，遺伝性角化症，遺伝性皮膚疾患

キーワード：栄養障害型表皮水疱症 VII型コラーゲン COL7A1

1. 研究開始当初の背景

(1) 栄養障害型表皮水疱症 (以下 DEB) は出生時より軽微な外力により全身の皮膚に水疱, びらん, 瘢痕の形成を繰り返す難治性水疱性皮膚疾患である(図1).



図1: DEBの臨床像

DEBの最重症型では, 出生時より全身にびらん・水疱が多発し, 繰り返す瘢痕形成により手指の棍棒状癒着を生じ, さらに瘢痕部に有棘細胞癌が多発するため生命予後は極めて不良である. DEBの原因遺伝子は真皮表皮境界部の接着因子のひとつであるVII型コラーゲンをコードするCOL7A1遺伝子である. COL7A1変異がどのようにDEBの多彩な臨床像を形成するのか, その詳細なメカニズムは明らかになっていない.

(2) 申請者らはこれまで数多くのDEB患者の遺伝子診断を行ってきた. その結果, 優性型DEB (以下 DDEB) では, 発端者と同じCOL7A1変異を有していても, 症状が非常に軽微な者が存在する家系を経験した(図2). すなわちDEBでは同じCOL7A1変異を有していても, 家族間あるいは家族内で重症度が著しく異なる場合があることが明らかになった.

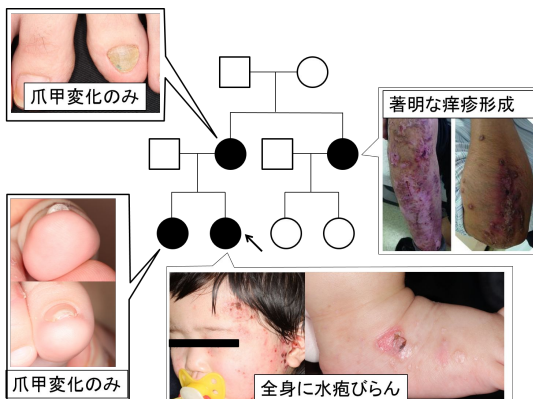


図2: DEBでは同一家系内でも表現型が異なる場合がある.

また, 劣性型DEB (以下 RDEB) では臨床的に明らかなDEBであってもCOL7A1変異が一方のアリルにしか同定されない症例が少なからず存在する. そこで申請者は, **DEBの発症および重症度にはCOL7A1変異に加え, COL7A1以外の遺伝的要素が関与しているのではないかと考えた.** これらを明らかにすることにより, これまで不明であったDEBの病態解明が期待できると考え, 本研究の着想に至った.

2. 研究の目的

本研究ではCOL7A1変異の詳細な解析により, DEBの未知の発症メカニズムを解明するために, 以下を研究の目的とした.

(1) これまでにCOL7A1変異解析を行ったDEB症例について, 遺伝子型と表現型について詳細な検討を行う.

DEBは臨床像によりさらにいくつかの亜型に分類される. 各々の亜型ごとに遺伝子型を解析し, 遺伝子型-表現型の相関があるか検討する.

(2) DEBの発症や重症度に関与するCOL7A1以外の遺伝的要素を明らかにする.

COL7A1以外の真皮表皮境界部の接着因子, COL7A1発現に関与する転写因子, VII型コラーゲンの分泌・分解に関与するタンパクの異常がDEBの発症や重症度に関連している可能性がある. これらをコードする遺伝子の変異や多型の有無を明らかにする.

(3) 従来のCOL7A1変異検索でRDEBの変異同定率が100%にならない要因を明らかにする.

COL7A1以外の遺伝子に変異や多型がある可能性, 従来の方法では検索されないCOL7A1のプロモーター領域やイントロン内に変異がある可能性, エクソン単位の欠失の可能性, プライマー結合部位に変異がある可能性, などが考えられる.

3. 研究の方法

(1) DEBにおけるCOL7A1変異の遺伝子型と

表現型の解析

各 DEB 症例の遺伝子型と表現型についての検討する

各亜型ごとに遺伝子型を比較し、亜型特有の変異があるか、遺伝子変異の分布に特徴はあるか、遺伝子型による重症度の違いがあるか、などについて検討する。

DDEB において、家族内あるいは家族間の重症度の違いについて検討する

同一家系内において表現型や重症度の異なる家系を検出する。また複数の家系で共通してみられる COL7A1 変異があれば、その家族間での表現型の違いを検討する。

RDEB において、COL7A1 変異が一方のアリルにしか同定されない患者を集積

一方のアリルに RDEB 特有の COL7A1 変異を有し、臨床的にも明らかに RDEB であるが、もう一方のアリルに COL7A1 変異を検出しない患者を集積し、両アリルに変異を同定しえた RDEB との表現型や重症度の違いについて検討する。

(2)変異 COL7A1 発現量が DEB の重症度に相関するかについての検討

同じ COL7A1 変異を有する重症 DEB 患者と軽症 DEB 患者の皮膚細胞より mRNA を抽出し、変異 COL7A1 mRNA の発現量をリアルタイム PCR により定量する。この発現量の違いが重症度と相関するならば、発現量をコントロールする転写因子の異常が重症度を規定する modifier となっている可能性が示唆される。

(3)次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析による遺伝子変異検索

DDEB について

同一変異を有する患者の中で、重症の表現型を呈する患者のみで遺伝子変化があり、COL7A1 変異を有しながらも軽症な患者では遺伝子変化がない遺伝子を同定する。

RDEB について

次世代シーケンスにおいても、一方のアリルにしか COL7A1 変異が同定されない症例については、COL7A1 以外の遺伝

子について、それらの症例で共通して変異を有する遺伝子を検索する。

DEB 発症に関与する新規遺伝子の同定

同定した遺伝子について、他の DEB 家系や健常者において、変異の有無につき従来の sanger sequence にて検討する。

4. 研究成果

(1)DEB における COL7A1 変異の遺伝子型と表現型の解析

DDEB では表現型は全身型と痒疹型が多かった。DDEB では COL7A1 変異はすべてコラーゲン領域で同定され、変異の 75%はグリシン置換変異であった。特に 39AA ヒンジ領域直後のエクソン 73-74 の領域に多くの変異が集中していた。痒疹型ではエクソン/イントロン 85-87 のスプライシング異常で発症することが多かった。

RDEB では、COL7A1 変異は遺伝子全体に分布しており、重症型では両アリルに早期停止コドンとなる変異を有している傾向があった。また一部の症例では、一方の変異が同じであれば、もう一方の変異がより N 末端側にある方が重症の表現型を呈していた。また一方のアリルにしか変異が同定できない RDEB 患者を 20 例蓄積した。

(2)変異 COL7A1 発現量が DEB の重症度に相関するかについての検討

同じ COL7A1 変異を有する DDEB2 家系を直接診察した。これら 2 家系はいずれも英文で報告した(1,2)。患者の同意が得られず、皮膚細胞からの mRNA 抽出には至っていない。

(3)次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析による遺伝子変異検索

エクソーム解析のために、数名の患者の末梢血 DNA を回収している。しかし同意が得られない患者も多く、実際の解析には至っていない。

(4)今後の展望

本研究課題は平成 28 年度を持って終了と

なるが、以下事項についてはいまだ検討を要するため、今後引き続き研究を進める予定である。

i) **次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析による遺伝子変異検索。**

DDEB については、同一家系内で表現型が異なる家系において、重症の表現型を呈する患者のみで変異がみられる遺伝子を同定する。

RDEB については、明らかに RDEB であるが、一方のアリルにしか変異が同定されない症例について、共通して変異がみられる *COL7A1* 以外の遺伝子を検索する。

ii) ***COL7A1* 以外の候補遺伝子が見つかった場合には、他の DEB 家系や健常者において変異の有無につき従来の sanger sequence にて検討する。**

iii) **新規遺伝子に変異を有するベクター、*COL7A1* 変異を有するベクターを作成し、これらのベクターを培養ヒト角化細胞に形質導入する。**

新規遺伝子変異細胞株、*COL7A1* 変異細胞株、新規遺伝子変異+*COL7A1* 変異細胞株を樹立し、各々について細胞の形態、VII 型コラーゲンの発現および分泌量につき、免疫染色、免疫蛍光、RT-PCR、ウェスタンブロットで解析を行う。

<引用文献>

1. Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D. Epidermolysis bullosa pruriginosa with marked phenotypic heterogeneity caused by a recurrent glycine substitution: Incomplete penetrance or a latent case? *J Dermatol.* 2012 ;39(8):718-719.
2. Akasaka E, Nakano H, Takagi Y, Toyomaki Y, Sawamura D. Multiple Milia as an isolated skin

manifestation of DDEB: Evidence of phenotypic variability. *Pediatr Dermatol.* 2016; 34: e106-e108.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

1. 赤坂英二郎 (4 名中 1 番目).【似たもの同士:目で見える鑑別診断 2016-水疱性病変編】(Part4.)下肢(case 14) 優性栄養障害型表皮水疱症(痒疹型)vs 結節性痒疹(解説/特集). 査読有. *Visual Dermatology*, 2016;15: 715-717.
2. Akasaka E. (5 名中 1 番目). Multiple Milia as an isolated skin manifestation of DDEB: Evidence of phenotypic variability. 査読有. *Pediatr Dermatol.* 2016; 34: e106-e108. doi:10.1111/pde.13047.
3. Akasaka E. (7 名中 1 番目). Elevated levels of circulating immunoglobulin E autoantibodies against BP180 and BP230 in an intractable case of bullous pemphigoid. 査読有. *J Dermatol Sci.* 2016; 84: 110-113. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.07.011.
4. Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E. (5 名中 3 番目). Rubinstein-Taybi syndrome with multiple pilomatricomas: The first case diagnosed by CREBBP mutation analysis. 査読有. *J Dermatol Sci.* 2016; 83: 240-242. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.06.005.
5. Makita E, Akasaka E. (8 名中 2 番目). Squamous cell carcinoma on the lip arising from discoid lupus erythematosus: a case report and review of Japanese patients. 査読有. *Eur J Dermatol.* 2016; 26: 395-396. doi: 10.1684/ejd.2016.2780.

6. Ninomiya Y, Kokunai Y, Tanizaki H, Akasaka E. (6 名中 4 番目). X-linked dominant protoporphyria: The first reported Japanese case. 査読有. J Dermatol. 2016; 43: 41-48. doi: 10.1111/1346-8138.13101.
 7. Akasaka E. (6 名中 1 番目). Diaminodiphenyl Sulfone-Induced Hemolytic Anemia and Alopecia in a Case of Linear IgA Bullous Dermatitis. 査読有. Case Rep Dermatol. 2015; 7: 183-186. doi: 10.1159/000438506.
 8. Akasaka E. (7 名中 1 番目). Superficial epidermolytic ichthyosis caused by a novel KRT2 mutation. 査読有. J Dermatol Sci. 2015; 79: 86-88. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.04.006
 9. Akasaka E. (8 名中 1 番目). Anti-laminin γ 1 pemphigoid associated with ulcerative colitis and psoriasis vulgaris showing autoantibodies to laminin γ 1, type XVII collagen and laminin-332. 査読有. Eur J Dermatol. 2015; 25: 198-199. doi: 10.1684/ejd.2014.2499.
 10. Akasaka E. (8 名中 1 番目). Two Japanese familial cases of punctate palmoplantar keratoderma caused by a novel AAGAB mutation, c.191_194delCAAA. 査読有. J Dermatol Sci. 2015; 78: 156-158. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.004.
- 〔学会発表〕(計 18 件)
1. 赤坂英二郎 (他 3 名): ケラチン 6a 遺伝子に N172del 変異を同定した先天性爪甲硬厚症の孤発例. 日本皮膚科学会 第 79 回沖縄地方会 (2017.1.29; 沖縄県医師会館/ 沖縄県・那覇市)
 2. 赤坂英二郎 (他 5 名): 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子診断における末梢血単核球の型コラーゲン発現についての検討. 第 38 回水疱症研究会 (2016.11.27; ラフレさいたま/ 埼玉県・さいたま市)
 3. 赤坂英二郎 (他 3 名): 多発性毛母腫を契機に診断が確定した筋強直性ジストロフィーの 1 家系例. 日本皮膚科学会青森地方会第 375 回例会 (2016.8.28; ホテルニューキャッスル/ 青森県・弘前市)
 4. 赤坂英二郎 (他 4 名): 長島型掌蹠角化症との鑑別を要した Papillon-Lefèvre 症候群. 第 31 回角化症研究会 (2016.7.30; 海運クラブ/ 東京都)
 5. 赤坂英二郎 (他 4 名): 稗粒腫を初発症状とし家系内で異なる臨床病型を呈した優性栄養障害型表皮水疱症の 1 家系例. 第 115 回日本皮膚科学会総会 (2016.6.3-5; 国立京都国際会館/ 京都府・京都市)
 6. 赤坂英二郎 (他 5 名): 栄養障害型表皮水疱症における末梢血単核球から分離した mRNA を用いた COL7A1 変異検索. 第 23 回分子皮膚科学フォーラム (2016.4.15-16, ホテルグランヴィア大阪/ 大阪府・大阪市)
 7. Akasaka E (他 2 名): Mutational analysis of dystrophic epidermolysis bullosa. 13th International Congress of Human Genetics (2016.4.3-7; Kyoto, Japan)
 8. 赤坂英二郎 (他 8 名): Richner-Hanhart 症候群(高チロシン血症 II 型)の 1 例. 第 373 回日本皮膚科学会岩手地方会 (2016.2.6-7, マリオス 盛岡市民文化ホール/ 岩手県・盛岡市)
 9. Akasaka E (他 7 名): Detection of circulating IgE autoantibody to BP180 and its possible correlation with

disease severity for urticarial erythema. 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology.

(2015.12.11-13; Okayama, Japan).

10. 赤坂英二郎(他 4 名): Richner-Hanhart 症候群の遺伝子診断. 第 29 回表皮細胞研究会 (2015.11.14; ホテルニューオータニ佐賀/ 佐賀県・佐賀市)
11. 赤坂英二郎(他 4 名): 著明な好酸球増多と浮腫性紅斑を示し血漿交換が奏功した水疱性類天疱瘡. 第 37 回水疱症研究会 (2015.9.26-27; コラッセ福島/ 福島県・福島市)
12. 赤坂英二郎(他 4 名): 当科における掌蹠角化症の遺伝子変異検索. 日本皮膚科学会青森地方会第 371 回例会 (2015.8.30; ホテルナクアシティ弘前/ 青森県・弘前市)
13. 赤坂英二郎(他 6 名): 新規ケラチン 2 遺伝子変異により生じた表在性表皮融解性魚鱗癬. 第 30 回角化症研究会 (2015. 08. 01; 経団連ホール/ 東京都)
14. 赤坂英二郎(他 3 名): *FECH* 遺伝子に p.Ile186Thr 変異を有した骨髄性プロトポルフィリン症. 第 37 回日本光医学・光生物学会 (2015.7.17-18; シーガイアコンベンションセンター/ 宮崎県・宮崎市)
15. 赤坂英二郎(他 4 名): 優性栄養障害型表皮水疱症の遺伝カウンセリング ~ G2251E 変異について ~. 第 39 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (2015.6.26-28 三井ガーデンホテル千葉 / 千葉県・千葉市)
16. Akasaka E(他 1 名): Genetics of Porphyrias. 23th World Congress of Dermatology, Photodermatology Day (2015.6.8-13; Vancouver, Canada).
17. 赤坂英二郎(他 5 名): 多発性毛母腫に

おけるベータカテニン遺伝子変異の検討. 第 114 回日本皮膚科学会総会 (2015.5.29-31; パシフィコ横浜/ 神奈川県・横浜市)

18. 赤坂英二郎(他 5 名): beta-catenin mutational analysis in multiple pilomatricomas. 第 22 回分子皮膚科学フォーラム (2015.4.17-18; ホテル日航高知/ 高知県・高知市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1)研究代表者
赤坂 英二郎 (AKASAKA, Eijiro)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30436034
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし