

平成30年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15547

研究課題名(和文) 遠隔エンハンサーとクロマチンドメインTADsの異常による新規遺伝病発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel pathomechanisms due to defects in remote enhancers and chromatin domain TADs in genodermatosis

研究代表者

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60222551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ABCA12にヘテロ接合性のみに変異を認める道化師様魚鱗癬4症例について全エクソームシーケンシング(WES)を行い、3例においてはABCA12のコーディング領域に新規の病原性変異を同定した。残り1例ではWESにてABCA12の病原性変異を同定できなかった。この家系でABCA12のtopologically associating domainの5M塩基長についてゲノム構造を解析したが、明らかな異常は同定されなかった。ABCA12発現低下との関連が疑われる配列のデータについて、公開されているクロマチン修飾、および、Hi-Cデータベースを用いて関連性推定を行ったが、有力な情報は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-exome sequencing in 4 harlequin ichthyosis patients with only heterozygous ABCA12 mutations which was elucidated by Sanger sequencing. We found the other causative ABCA12 mutations in 3 cases, but did not detect any ABCA12 mutation in the other patient. We analyzed the genome structure by sequencing of genomic DNA flanking ABCA12 (approximately 5M bases), including ABCA12 topologically associating domain. However, no causative abnormalities were detected in the ABCA12 topologically associating domain. Furthermore, we investigated the chromatin modification of putative ABCA12 expression-associated regions. But, we detected no significant finding in genomic DNA from the family. We also studied the three-dimensional structure of the putative ABCA12 expression-associated genome regions using Hi-C data bases. However, no causative aberrant three-dimensional genome structures were obtained in genomic DNA from the patient and the family members.

研究分野：医歯薬学

キーワード：皮膚科学 臨床遺伝学 遺伝学 先天性角化異常症 ゲノム構造

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は先に道化師様魚鱗癬 (HI) の原因遺伝子が *ABCA12* で有る事を世界に先駆けて報告し (Akiyama *et al.* J Clin Invest 2005) その後多くの患者において新規変異を同定してきた (Akiyama Hum Mutat 2010)。しかし、一方で遺伝子診断を行った患者の中には、ヘテロ接合性のみ *ABCA12* のコーディング領域の変異が認められる一方、もう片方のアレルが一見正常である為、確定診断がつかない症例を多数経験していた。研究代表者は毛髪から抽出した mRNA を定量する系を作成することで (Takeichi *et al.* J Dermatol Sci 2013)、この様な症例では実際に *ABCA12* の発現が低下していることを確認していた。また、スプライシング変異やエキソスキッピングについても検討し、異常を認めないことから、これら症例では *ABCA12* の転写障害により、HI が発症している事が考えられた。研究代表者は、*ABCA12* 上流の近傍プロモーターの解析を行い、*ABCA12* の発現に必須の因子を同定したが (Shimizu *et al.* Sci Rep 2014)、この因子の変異は我々の調べた HI 患者には認めないことから、*ABCA12* の転写障害を起こす未解明のメカニズムが存在する事が強く疑われている。同様の現象は HI 以外の他の遺伝性疾患でも多数経験しており、このような未知の遺伝学的発生機序は普遍的に存在していると研究代表者は予測していた。

(2) 研究代表者はこれまでに、パンドラ型復帰突然変異 (Ogawa *et al.* PLoS Genet 2014)、擬似的ホモ接合性 (Shibata *et al.* J Dermatol Sci 2015) など、遺伝性疾患の発症に関わる特殊な遺伝学的メカニズムの存在を証明してきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、先天性疾患の原因となる新しい遺伝学的メカニズムの存在を実証し、診断がつかない遺伝性疾患の診断を可能にする事を目的とした。具体的には、遺伝学的に確定診断ができない道化師様魚鱗癬 (HI) の患者を対象とし、クロマチンの位相的会合性ドメイン (topologically associating domains, TAD) を基盤とした遠隔性転写制御配列の変異解析を行うことにより、クロマチン構造の異常、遠隔エンハンサーもしくは TAD 境界形成配列の変化による疾患発生機序の存在について検証を目指した。本研究の成功は、遺伝子診断学に革新をもたらす、実際の臨床に大きく寄与するのみならず、遺伝子治療戦略の開発の上で、新たな研究領域を創成することを意味した。

(2) 本研究では、実際の HI 患者、及び同じ *ABCA12* を原因遺伝子とする先天性魚鱗癬様紅皮症 (CIE) 患者において、*ABCA12* の発現低下を起こしうる、遠隔性転写制御配列の変異の発見を目指した。変異配列の病的意義を、

患者及び血縁者間の遺伝解析、及びデータベース解析、及び培養細胞を使った、chromatin conformation capture-on-chip 法 (4C 法) により確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究の対象となる道化師様魚鱗癬患者家系の選択

本研究の対象患者を選択するため、臨床的には常染色体劣性の遺伝性疾患である道化師様魚鱗癬と診断されるものの、原因遺伝子の *ABCA12* にヘテロ接合性のみに変異を認め、遺伝子診断の確定しない症例を抽出した。これらの患者では、道化師様魚鱗癬類似の他の先天性魚鱗癬の原因遺伝子にも変異が無く、毛髪由来 RNA で *ABCA12* の発現の低下があることを確認した。これらの条件を満たした患者は、*ABCA12* のエクソン、および、その周辺、もしくは、近傍プロモーターを対象とした配列解析では発見できない変異があることが想定された。このような症例を、本研究での遠隔プロモーターの変異や、ゲノム構造異常解析の対象とした。

(2) データベースの解析による *ABCA12* の TAD と遠隔エンハンサー領域の推定

正常ヒト表皮ケラチノサイトの TAD は、公開されているデータベース (<http://promoter.bx.psu.edu/hi-c/index.html>, Cell. 2014;159:1665-1680) より推定される。この TAD 内のエンハンサー配列と境界決定配列の位置は、公開されているデータベース (<http://genome.ucsc.edu/>) により、H3K27ac、H3K4me1 などのヒストン修飾の集積や DNaseI 感受性の有無等から推定された。

(3) 高密度 SNP マイクロアレイによるクロマチン構造異常の解析

患者及び両親について、*ABCA12* の存在する第 2 染色体のクロマチン構造異常を検出するため、高密度 SNP マイクロアレイ (HumanOmni2.5-8v1.0) を行った。施行は受託業者に委託した。大領域の欠失、重複などが検出されれば、サンガーシーケンシング法により、塩基レベルでの変異配列の同定を行う予定であった。

(4) カスタムキャプチャープローブセットによる *ABCA12* の TAD 領域のゲノムライブラリー作成と次世代シーケンサーによる解析

上記 (1) で推定される、*ABCA12* を含む TAD とその近傍の TAD を含む、約 3 Mb の領域について、enriched targeted resequencing を行った。本研究に必要なカスタムキャプチャープローブセットの作成から次世代シーケンシング、及び変異解析とアノテーションまでを、委託して行った。得られた結果を以降の解析に用いた。

(5) (2)、(3)、(4)のデータの照合、および家族間遺伝形式の解析による病原性変異の検出

(2)、(3)、(4)で得られたデータ、及び既存のデータベースから、病原性を持ちうる遺伝子変異を選別した。具体的にはTAD構造の変化を伴う遺伝子構造の変異の他、H3K27ac、H3K4me1、DNaseI-seq シグナルと転写因子 ChIP-seq 等のデータベース解析の結果を照合して特定されるエンハンサー配列上に存在し、機能低下を起こしうる変異を病的意義のある変異とする。このような変異を対象に、両親を含む血族のゲノムについてサンガーシーケンシングによる確認を行うとともに、遺伝形式からみた妥当性を検討する計画であった。

4. 研究成果

(1) 本研究の対象となる道化師様魚鱗癬患者家系の選択

本研究では、臨床的には常染色体劣性の遺伝性疾患である道化師様魚鱗癬と診断されるものの、原因遺伝子の ABCA12 にヘテロ接合性のみに変異を認めるため、遺伝子診断の確定しない症例を対象とした。これらの患者では、道化師様魚鱗癬類似の他の先天性魚鱗癬の原因遺伝子にも変異が無く、毛髪由来 RNA で ABCA12 の発現の低下があることから、ABCA12 のエクソン、および、その周辺、もしくは、近傍プロモーターを対象とした配列解析では発見できない変異があることが想定された。このような症例で、本研究では、特に遠隔プロモーターの変異や、ゲノム構造異常による疾患発症の可能性について検討した。

当初の対象 4 症例について全エクソームシーケンシングを行い、3 例においては ABCA12 のコーディング領域に新規の病原性変異を同定した。残りの 1 例では全エクソームシーケンシングにて、ABCA12、及び、その他の魚鱗癬病因遺伝子のコーディング領域の病原性変異を同定できなかった。そこで、その 1 例について、以下の研究の対象とした。

(2) データベースの解析による ABCA12 の TAD と遠隔エンハンサー領域の推定

公開されている正常ヒト表皮ケラチノサイトの TAD のデータベース (<http://promoter.bx.psu.edu/hi-c/index.html>、Cell. 2014;159:1665-1680)より、表皮ケラチノサイトにおける ABCA12 遺伝子の TAD が推定された。公開されているデータベース (<http://genome.ucsc.edu/>) により、H3K27ac、H3K4me1 などのヒストン修飾の集積や DNaseI 感受性の有無等から、この TAD 内のエンハンサー配列と境界決定配列の位置は推定された。

(3) 高密度 SNP マイクロアレイによるクロマチン構造異常の解析

(1)の結果、選択された患者及びその両親において、ABCA12 遺伝子の存在する第 2 染色体のクロマチン構造異常を検出するため、高密度 SNP マイクロアレイ(HumanOmni2.5-8v1.0)を行ったが、大領域の欠失、重複などは、検出されなかった。

(3) ABCA12 の TAD 領域のゲノムライブラリー作成と次世代シーケンサーによる解析

(1)で選択された患者、および、その父母の ABCA12 の近傍の 5M 塩基長について、配列解析を行った。ABCA12 の表皮ケラチノサイトにおける topologically associating domain はおよそ 3M 塩基長に及ぶことが知られている。ゲノム構造を解析するために、得られた配列について、転座、重複、反転等のゲノム構造の変化、および、遠隔部位の配列欠失について、分析を施行したが、明らかな転座、重複、反転等のゲノム構造の変化、および、遠隔部位の配列欠失は発見されなかった。個々の解析から得られた、ABCA12 発現低下との関連が疑われる配列のデータについて、公開されているクロマチン修飾、および、Hi-C データベースを用いて、ABCA12 の発現低下との関連性について推定を行った。しかし、ABCA12 の発現低下との関連性に有意なエビデンスの得られるものは、同定できなかった。

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 4 件)

Takeichi T, Torreló A, Lee JYW, Ohno Y, Lozano ML, Kihara A, Liu L, Yasuda Y, Ishikawa J, Murase T, Rodrigo AB, Fernández-Crehuet P, Toi Y, Mellerio J, Rivera J, Vicente V, Kelsell DP, Nishimura Y, Okuno Y, Kojima D, Ogawa Y, Sugiura K, Simpson MA, McLean WHI, Akiyama M, McGrath JA.

Biallelic mutations in *KDSR* disrupt ceramide synthesis and result in a spectrum of keratinization disorders associated with thrombocytopenia. 査読有 *J Invest Dermatol* 137 (11): 2344-2353, 2017.

doi: 10.1016/j.jid.2017.06.028.

Akiyama M.

Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. 査読有 *J Dermatol Sci* 88(1): 3-9, 2017.

doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.002.

機関リポジトリ公開:

https://nagoya.repo.nii.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=25095

Takeichi T, Nomura T, Takama H, Kono M,

Sugiura K, Watanabe D, Shimizu H, Simpson MA, McGrath JA, **Akiyama M**.
Deficient stratum corneum intercellular lipid in a Japanese patient with lamellar ichthyosis by a homozygous deletion mutation in *SDR9C7*. 査読有
Br J Dermatol 177 (3): e62-e64, 2017.
doi: 10.1111/bjd.15315.
機関リポジトリ公開:
https://nagoya.repo.nii.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=25033

Takeichi T, Okuno Y, Saito C, Kojima D, Kono M, Morita A, Sugiura K, **Akiyama M**.
Congenital ichthyosis and recurrent eczema associated with a novel *ALOXE3* mutation. 査読有
Acta Dermato-Venereol 97 (4): 532-533, 2017.
doi: 10.2340/00015555-2549.

〔学会発表〕(計4件)

秋山真志

教育講演：拡大する角化症の臨床：新規疾患概念：自己炎症性角化症 (autoinflammatory keratinization diseases).
第116回日本皮膚科学会総会、2017年6月2日、仙台市(仙台国際センター)

秋山真志

教育講演：皮膚のバリア機能を担う分子と構造(かたち)
第43回皮膚かたち研究学会学術大会、2016年6月19日、東京都(ヒューリックホール)

秋山真志

シンポジウム1 皮膚難病克服への挑戦：魚鱗癬・魚鱗癬症候群の病態解明と克服への挑戦
第67回日本皮膚科学会 中部支部学術大会、2016年10月22日、大阪府(大阪国際会議場)

秋山真志

先天性魚鱗癬の病態解明
平成28年度愛知県難病教育講演会、2016年11月2日、愛知県医師会館、名古屋市

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科皮膚科学分野のホームページ
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)
名古屋大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60222551