

平成 30 年 4 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19704

研究課題名(和文) 遺伝性色素異常症患者の網羅的原因遺伝子探索およびその機能解析

研究課題名(英文) Exhaustive mutation analysis and functional study of hereditary pigmentation disorders

研究代表者

岡村 賢 (Okamura, Ken)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：40637229

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)：メラニン色素に関わる遺伝子の異常により、皮膚の一部または全部の色が正常人と比べて白くなったり黒くなったりする疾患群を遺伝性色素異常症と呼びます。中には重篤な合併症を伴うタイプもあり、遺伝子解析による確定診断は重要と考えられます。しかし、稀なサブタイプの患者さんの場合、網羅的な遺伝子検査が必要となる場合があります。今回我々は、網羅的な遺伝子解析によりこれまで診断不能であった症例を複数例診断することに成功しました。さらに患者さんの毛髪を用いた形態学的、および生化学的な解析によりその病態に一步迫る成果をあげ、英文誌に報告致しました。

研究成果の概要(英文)：Hereditary pigmentation disorders (HPD) are a group of genetic disorders caused by mutations in genes associated with melanin synthesis or migration of melanocyte. Some of the subtypes are associated with severe complications, indicating that DNA-based diagnosis is very important. However, some patients with rare subtypes of HPD need exhaustive genetic examination. This time, we succeeded in diagnosing such patients using whole-exome sequencing (one of the methods of exhaustive genetic analyses) followed by analyzing their hair samples morphologically and chemically. The analysis of their hair samples provided us the impact of the dysfunctions of the mutated gene products on the maturation of melanosomes and melanin levels and composition. These results have been reported in an English journal.

研究分野：遺伝性色素異常症

キーワード：遺伝性色素異常症 眼皮膚白皮症 アルビノ 遺伝性対側性色素異常症 遺伝性汎発性色素異常症 ワールデンブルグ症候群 エクソーム解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

これまでにメラノソーム内でメラニン合成に直接関わっている分子をはじめ、メラノソームの合成、成熟に必須とされる分子、メラノサイトの発生、分化に関与する分子などが同定され、それらをコードする遺伝子の異常が様々な遺伝性色素異常症をもたらすことが示されている (Tomita and Suzuki. Am J Med Genet C 131C (2004)). さらに最近、**エクソーム解析**により新たな責任遺伝子が複数報告されている (Kono et al. Hum Mol Genet 22 (2013), Wei et al. J Invest Dermatol 133 (2013)). 申請者らはこれまで、遺伝性色素異常症患者の遺伝子解析を行い、臨床症状とともにデータベース化するとともに国際誌に報告してきた (Okamura et al. J Dermatol 40 (2013) & J Dermatol Sci 74 (2014) & J Dermatol Sci 79 (2015) & J Dermatol 42 (2015)). 特に眼皮膚白皮症 (OCA) および遺伝性対側性色素異常症 (DSH) に関してはそれぞれ 160 家系、60 家系以上の解析を行っている。しかし、典型的な臨床症状を有していても既報告の責任遺伝子に変異が見つからない症例を多く経験している (OCA, DSH ではともに約 3 割程度)。

2. 研究の目的

従来の方法で遺伝的な診断が不能であった患者の中から症例を厳選し、**エクソーム解析により網羅的に疾患責任遺伝子を探索**する。新規遺伝子が同定された場合は、*in vitro* で新規遺伝子の機能解析を行うとともに、疾患モデルマウスを確立し、*in vivo* において遺伝子の役割、疾患の病態を解明する。

3. 研究の方法

遺伝性色素異常症患者の遺伝子をエクソーム解析により網羅的に解析する。

従来の方法 (PCR-SSCP and direct sequence 法) で診断のつかなかった症例の中で、臨床診断がほぼ確実である、家系内サンプルが多い (最低でも両親のサンプル)、近親婚がある (遺伝形式が AR の場合)、家系情報が信頼できる、などの条件に合致する症例を優先的に選出し、**エクソーム解析**を行う。エクソーム解析の一次解析 (DNA のライブラリ調整および次世代シーケンサーによる塩基配列データの取得) については外部に委託し、一次解析によって得られた断片的な塩基配列データに対し申請者らで二次解析を行う。エクソームデータの二次解析には以下のソフトを用いて疾患責任遺伝子を絞り込む。

・ Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (ver. : 0.7.5a) :

エクソーム解析によって得られた断片的な塩基配列のリードをヒトゲノムの reference 配列と比較してマッピングおよびアラインメントを行う。

・ Picard (ver. : 1.96) : 過剰に重複したリードを除去する。

・ Genome Analysis Toolkit (GATK) (ver. : 2.6.5) : Indel 周辺の再アラインメントと塩基クオリティスコアの再計算、およびバリエーションの検出を行う。

・ SnpEff (ver. : 3.4i) : バリエーションのアノテーション (バリエーションと既知遺伝子領域との位置関係、アミノ酸置換の有無、既知かどうかの判定など) を行う。

・ SnpSift (ver. : 3.4i) : データベースとして dbNSFP2.3 を適用し、バリエーションの有害度を判定する。

新規疾患責任遺伝子が発見された場合は、他の診断未確定症例および対し、サンガー法にて当該遺伝子の変異をスクリーニングする。さらに同じバリエーションの有無を健常日本人 100 人以上のサンプルを用いて polymorphism の可能性について検証する。

新規責任遺伝子が発見した場合

A. *In vitro* での解析 (主に正常ヒト培養メラノサイトを用いて行う)

a. 蛍光免疫染色法や western blotting (WB) により当該遺伝子産物の局在や発現を確認する。

b. siRNA により当該遺伝子の発現を knockdown し、メラニン合成に関わる既知の分子の発現を Real-time quantitative RT-PCR (RQ-PCR) および WB により解析する。あるいは、メラノサイトから回収したメラニン量を knockdown の前後で比較することで、当該遺伝子のメラニン合成能への関与を解析する。

B. Knockout マウス (疾患モデルマウス) の確立 (a)、*in vivo* での解析 (b)

a. CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術 (ゲノム上の標的遺伝子の破壊やレポーター遺伝子のノックインなどを可能にする技術 Barragou. Nat Biotechnol 30 (2012)) を用いて knockout マウスを作製する。山形大学では遺伝子実験センターにおいて、CRISPR/Cas9 系を用いた knockout マウスの受託作製を行っている。具体的には、C57BL/6 受精卵において、CRISPR/Cas9 系を用いて、目的遺伝子のタンパク質コード領域を二本鎖切断させ、非相同末端連結による修復を誘導することによりフレームシフト変異が生じることで knockout マウスが作出する。ゲノムシーケンシング解析等により knockout マウスの確立を確認した後、次に表皮にメ

ラノサイトを有する(通常のマウスは表皮にメラノサイトがない)hairless マウス (hairless hk14-SCF Tg mice)と交配し、表皮にメラノサイトを有する knockout hairless マウスを確立する。

- b. 疾患モデルマウスから皮膚組織を採取し、凍結組織およびホルマリン固定パラフィン包埋組織の作成およびメラノサイトの分離培養を行い、メラニン生成に関わる分子を免疫組織学的あるいは mRNA レベル (RQ-PCR), 蛋白レベル (WB)で解析する。

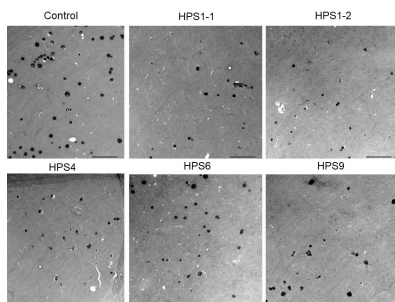
・OCA および HPS の既報告の責任遺伝子に新規変異が見つかり、モデルマウスからの不死化培養メラノサイトが樹立されている場合

- a. 正常ヒト cDNA (wild cDNA)および、患者の cDNA (mutant cDNA)をクローニングし、それぞれ哺乳類発現ベクターに組み込む。
- b. モデルマウスからの不死化培養メラノサイト株に transfection し、安定発現株を得る。
- c. 安定発現株の細胞のメラニン合成量を測定し、mutant cDNA のメラニン合成能を評価する。

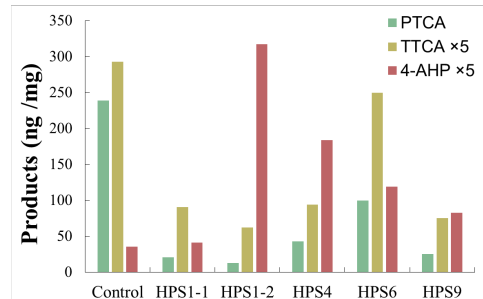
4. 研究成果

臨床的に眼皮膚白皮症 (OCA)、遺伝性対側性色素異常症 (DSH)が疑われ、従来の遺伝子検索で変異が同定されなかった患者 (計 16 名) に対してエクソーム解析を施行した。その結果、Hermansky-Pudlak 症候群 4 型, 6 型, 9 型 (HPS4, 6, 9) の症例をそれぞれ 1 例ずつ遺伝学的に診断することができ、合計で 3 つの novel mutation を発見した。特に HPS9 は世界で第 3 例目, アジアでは初の症例であり、学術的意義は非常に高いと考える。また、DSH 疑い症例 2 例において責任遺伝子である ADAR 遺伝子に既報告の変異を認め、遺伝学的に DSH と診断した。

続いて、新たに診断しえた HPS4, 6, 9 の患者、および過去に診断した HPS1 の患者より毛髪サンプルを頂き、電子顕微鏡的・生化学的にメラニンの形態・組成を解析した。電子顕微鏡検査では、全ての HPS 症例においてメラニンの数、サイズ、成熟度は低下しており、その程度は HPS1, HPS4 において特に顕著であった(下図)。



生化学的解析では、total melanin 量は健常コントロールと比較して全例で低下していたが、HPS6 では比較的保たれていた。また、全例でユーメラニン (PTCA) に対してフェオメラニンの比率が若干有意になっており、特にベンゾチアジン骨格のフェオメラニン (4-AHP) は著明に上昇していた (下図)。



HPS1 遺伝子, HPS4 遺伝子は共に BLOC-3 のサブユニットをコードする遺伝子であり、BLOC-3 の機能不全により肺線維症や肉芽腫性大腸炎など致命的な合併症を引き起こされることが知られている。本研究におけるメラニンの形態学的観察、生化学的解析結果は BLOC-3 のメラニン生成、輸送におけるクリティカルな役割を強調するものであった。

さらに、エクソーム解析にて OCA6 疑いの患者を同定した。これはまだ日本人では報告のないサブタイプであり、現在 CRISPR/Cas9 を用いてモデルマウスを作成中である。

一方で、OCA4 型 (OCA4) の原因遺伝子である *SLC45A2* にヘテロ接合性病的変異が一つのみ同定されていた患者 (suspected OCA4: sOCA4) を対象に、遺伝子上流の転写調節領域の塩基配列を調べた。その結果、c. -492_489delAATG (GenBank Accession number: NM_016180) の 4 塩基欠失多型が sOCA4 患者 12 人中 8 人 (66.7%) に認められ、健常日本人 (110 人中 4 人: 3.6%) と比べて有意に高頻度にみられた ($p < 0.0001$)。Variant allele と wild allele をそれぞれルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、それぞれの転写活性を比較したところ、variant allele において有意な転写活性の低下を認めた。ゲルシフトアッセイでは、wild probe でみられた複数のシフトバンドが variant probe において消失ないし減弱した。以上より、*SLC45A2* の上流領域における 4 塩基欠失多型多型 (c. -492_489delAATG) は病的であると結論づけた。

引用文献

1. Okamura K, Abe Y, Araki Y, et al.: Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9. *Pigment Cell Melanoma Res* 2018; 31: 267-276.

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 3 件, 全て査読有)

1. Okamura K, Abe Y, Araki Y, *et al.*:
Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9. *Pigment Cell Melanoma Res* 2018; 31: 267-276.
2. Hemmi A, Okamura K, Tazawa R, Abe Y, Hayashi M, Izumi S, *et al.*:
Waardenburg syndrome type IIE in a Japanese patient caused by a novel non-frame-shift duplication mutation in the SOX10 gene. *J Dermatol* 2018; 45: e110-e111.
3. Okamura K, Hayashi M, Abe Y, *et al.*:
Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes. *J Dermatol Sci* 2017; 85: 131-134.

[学会発表](計 3 件)

Okamura K, *et al.*: A novel variant in the regulatory region of the *SLC45A2* is possibly associated with mild OCA4: The 76th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Portland, April 2017.

Okamura K, *et al.*: Melanin analysis for hair samples from Japanese patients with Hermansky-Pudlak Syndrome type 1, 4, 6, and 9: The XXIII International Pigment Cell Conference, Denver, August 2017.

岡村 賢, 他: *SLC45A2* の転写調節領域における 4塩基欠失多型は眼皮膚白皮症 4型の軽症例と関連する: 第 116 回日本皮膚科学会総会, 仙台, 2017 年 6 月

[図書](計 2 件)

岡村 賢, 鈴木民夫: 押さえておきたい新しい指定難病 眼皮膚白皮症 (疾病番号 164) *Derma* 2017; 257: 57-62.

岡村 賢, 鈴木民夫: 疾患別・知っておきたい皮膚科の検査とその評価法 先天性色素脱失症 皮膚科の臨床 2017; 59: 916-921.

[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

岡村 賢 (OKAMURA, Ken)

山形大学医学部皮膚科学講座・助教

研究者番号: 40637229

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()