

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390294
 研究課題名（和文） 色素異常症の病態解明により明らかにするメラニン生成調節機構の研究
 研究課題名（英文） Study on regulatory mechanism of melanin synthesis clarified by elucidation of molecular pathology on pigmentary disorders
 研究代表者
 富田 靖(Yasushi TOMITA)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70108512

研究成果の概要：

- (1) 遺伝性対側性色素異常症の病因となる10の新規 ADAR1 変異遺伝子を同定した。
- (2) 皮膚の色素異常しか知られていなかったにもかかわらず、G1007R の変異遺伝子を持つ DSH 患者においては、脳の石灰化と神経症状を呈することが明らかになった。
- (3) ヒトの DSH と同様に ADAR1 遺伝子変異をヘテロに保持したノックアウトマウス (ADAR1+/-) を作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ADAR1、遺伝性疾患、眼皮膚白皮症、色素異常症、白斑、メラニン、メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

遺伝性対側性色素異常症 *Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria*. (以下 DSH と略す) は、1910 年に東北帝国大学医学部皮膚科の初代教授遠山郁三が初めて報告した優性遺伝性疾患である。本症においては手背、足背に粟粒大から米粒大の色素斑と白斑が混在する。本症患者の7割位は6歳までに発症し、残りの約3割の患者も成人までに発症

する。色素細胞の異常が推定されるものの、その病因および病態は不明で、治療もない。優性遺伝で浸透率100%であるため、患者家系の半分がこの色素異常で悩まされる。

平成6年8月25日に受診したある患者から「家系代々の者がこの色素異常で悩まされている。治療もなく、病因さえ解らないなら、せめて研究だけでも始めて欲しい。」と訴えられた事から、本症の病因遺伝子解明

の研究を始めた。実際に富田 靖、宮村佳典、河野通浩により研究を開始したのは平成7年4月からである。その後、紆余曲折を経て、鈴木民夫と大学院生の稲垣克彦、伊藤史朗、鈴木教之の3名が研究に加わり、平成15年6月に病因遺伝子が二重鎖 RNA 特異的アデノシン脱アミノ酵素(double strand RNA specific adenosinedeaminase DSRAD、adenosinedeaminase acting on RNA1 ADAR1)であることを、世界に先駆けて解明した。この研究の成果は下記の論文として発表した。

(著者) Yoshinori Miyamura, Tamio Suzuki, Michihiko Kono, Katsuhiko Inagaki, Shiro Ito, Noriyuki Suzuki, Yasushi Tomita
(論文題名) Mutations of the RNA-Specific Adenosine Deaminase Gene (DSRAD) Are Involved in Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria.
(掲載雑誌) American Journal of Human Genetics
(巻,頁,発行年) 73:693-699, 2003

ADAR1はRNAの二重鎖部分にあるアデノシン(A)をイノシン(I)に変える結果、その部分のmRNAの遺伝暗号を変更したり、mRNAのスプライスサイトを変える、いわゆるRNA editingに関与する。この酵素の遺伝子がヘテロ接合性に変異を持つとなぜ手背、足背に限局してしかも、メラニン生成の低下と亢進という相反するDSHの皮疹を生ずるのか、その機構は全くを明らかにされていない。

2. 研究の目的

正常メラノサイトのメラニン生成調節の機構や、メラノサイトの分化成熟の過程は、ほとんど解明されていない。たとえば白人と黒人の色の違いはどのような分子レベルの発現調節の違いによるのか、全く知られていない。

ADAR1遺伝子変異によって引き起こされるメラニン生成の“低下”と“亢進”という相反する病態が解明されることにより、未知のメラニン生成の調節機構を明らかしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) DSH患者の臨床症状とADAR1変異遺伝子との相関についてADAR1遺伝子の変異部位によりDSH患者の臨床症状がどのように変わるかを検討する。その為新たなDSH患者のADAR1遺伝子の変異を同定し、その臨床症状と比較検討する。

(2) 形態学的検討

光学顕微鏡、電子顕微鏡による患者の色素斑部と白斑部の色素細胞の分布と細胞内の

器官の検討を行う。

(3) ヒト培養メラノサイトでのADAR1のノックアウト培養新生児メラノサイトにADAR1mRNAに対応するsiRNAを導入し、RNA干渉を起こさせて、ADAR1酵素の発現を抑制し、色素関連遺伝子であるTyrosinase、TRP-1、TRP-2、MITF、MART-1、gp100、MMPなどのmRNAの発現にどのような影響を及ぼすかをreal-time PCRにて検討する。

(4) DSHモデルマウスの作製

ヒトのDSHと同様にADAR1遺伝子変異をヘテロに保持したノックアウトマウス(ADAR1^{+/-})を外注にて作製し、このマウスにおけるメラノサイト内のADAR1 mRNAの発現について検討する。またこのマウスの胎生期のメラノサイトの分化と移動とADAR1遺伝子発現との関係について検討する。

4. 研究成果

(1) DSH患者の臨床症状とADAR1変異遺伝子との相関について

2003年に病因遺伝子を明らかにして以来、日本人DSH患者において30種類の病因となるDSRAD/ADAR1遺伝子変異を我々は報告した。本研究期間中に10の新規ADAR1変異遺伝子を同定した。日本人患者家系毎に変異はほとんど異なること、sporadicな患者も多いことから、本症では創始者効果(founder effect)は認められない。

ADAR1遺伝子には転写開始部位が2箇所存在することから、150KDaと120KDaの2つの酵素型があり、前者はインターフェロンで誘導され細胞質に局在し、後者は恒常的に発現していて核に局在することが既に知られていた。患者の遺伝子変異部位の検討から120KDa型は産生されるが150KDa型は産生されない患者が存在することから、本症の発症には150KDa型が関与していると判断された。

約40もの変異遺伝子の部位による皮膚症状の差や特徴も見当たらなかった。ただしG1007Rの変異遺伝子を持つ異なる2家系の3患者においては、皮膚症状による差はなかったが、脳の石灰化と神経症状を呈することが明らかになった。

(2) 形態学的検討

電子顕微鏡と免疫組織染色による観察では、白斑部の色素細胞は減少し、しかも細胞内の膜器官の崩壊し、メラノソームはほとんど認めない。色素斑部の色素細胞内では小さく未熟なメラノソームがまばらに散在する

所見を得た。

(3) ヒト培養メラノサイトでの siRNA による ADAR1 のノックアウト

① 正常メラノサイトにおける ADAR1 のノックアウトの影響について

培養新生児メラノサイトに、ADAR1 に対する siRNA を導入し、ADAR1 の遺伝子発現の抑制を real-time PCR にて検討したところ、48 時間まで対照の 10-30% にまで ADAR1 が低下した。その時の色素関連の遺伝子、具体的には tyrosinase, MART, MATP, KIT, SCF(KIT-ligand), MITF-A, MITF-M の遺伝子の発現はほとんど変化なかった。

また ADAR1 をノックアウトした培養メラノサイトではコントロールの細胞と比較して、明らかな形態学的な変化が、電子顕微鏡により観察されなかった。しかしながらメラノソームの数は、ADAR1 抑制メラノサイトで有意に減少していた。これらの結果から、培養正常メラノサイトでの ADAR1 は、メラニン生成に関与する遺伝子の発現には直接影響を及ぼさないが、膜器官メラノソームの生成には関与しているようである。

次に前述の実験系について、マイクロアレイを用いて、遺伝子発現を包括的にみたところ、2 倍以上の増加を見た遺伝子は 41 個あり、そのうちリアルタイム PCR にて増加が確認できた遺伝子は 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1)、myxovirus (influenza virus) resistance 1 (MX1)、ISG15 ubiquitin-like modifier (ISG15)、ubiquitin specific peptidase 18 (USP18) の 4 個であった。興味あることは、この 4 種の mRNA はいずれも、インターフェロンで誘導されるものである。一方半分以下の減少を示した遺伝子は 43 個で、そのうちリアルタイム PCR でも発現の減少が確認できた mRNA はなかった。

② 正常メラノサイトにおける ADAR1-p110 及び p150 遺伝子の導入

現在 ADAR1 蛋白は 150kD と 110kD の 2 種類の蛋白が mRNA の splice site の違いにより生成される事が知られている。110kD-ADAR1 は恒常的に発現しており、一方 150kD-ADAR1 は恒常的に発現せずインターフェロン誘導性である。すでに我々は DSH 患者の ADAR1 遺伝子変異部位の検討から、DSH の発症には 150kD-ADAR1 が関与している事が示した。前述の実験での ADAR1 に対する siRNA の抑制では p110 と p150 の両方の ADAR1 が抑制されているはずである。とすると前述の実験結果でみられた 4 種の増加したインターフェロン誘導性の mRNA は、p110 と p150 のいずれの ADAR1 の影響を受

けているのであろうか？これを明らかにするために次のよう実験を行った。

培養新生児メラノサイトに、ADAR1-p110 と p150 の cDNA をトランスフェクションし、ISG15、USP18、MX1 の 3 種のインターフェロン誘導性の mRNA の増減をリアルタイム PCR において検討したところ、いずれも増加を示し、しかも、その増加の程度は ADAR1-p110 と -p150 と同じであった。前述の実験で、ADAR1 に対する siRNA をトランスフェクションし、ADAR1 遺伝子の発現を抑制したら、4 種のインターフェロン誘導性の mRNA が増加したのに、今度は ADAR1 の遺伝子を強制発現させても抑制と同様に増加を示し、結果の解釈が困難となった。そこでこの培養メラノサイトが IFN で生理的に反応するか否かをチェックする意味で、IFN α と IFN β を培地に添加して ISG15 の遺伝子発現をみたところ、いずれの場合も 40-50 倍の増加を示した。つまりこのメラノサイトは IFN には正常な反応を示す。

ところで、細胞に siRNA などを導入すると非特異的な IFN 反応が引き起こされることが知られており、それを検出するキットさえ販売されている。ADAR1 に対する siRNA を導入しても、ADAR1 の cDNA を導入しても同じような IFN 誘導性遺伝子の発現増加をみたので、非特異的な IFN 応答を見ていた可能性があり、さらなる検討が必要である。

(4) DSH モデルマウスの作製

研究協力者である岐阜大学大学院 國貞隆弘教授の研究協力により ADAR1+/- の ES 細胞を作製し、それを外注業者によって妊娠マウスに移植し、キメラマウスを作成し、それを用いてヒトの DSH と同様に ADAR1 遺伝子変異をヘテロに保持したノックアウトマウス (ADAR1+/-) を作成した。

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 6 件)

1) Michihiro Kono, Yasushi Tomita, Tamio Suzuki (他 9 名 11 番目).

Four novel mutations of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. J Dermatol Sci 53:76-77, 2009. (査読有)

2) Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Shiro Ito, Michihiro Kono, Tamiko Negoro, Yasushi Tomita.

Dyschromatosis symmetrica hereditaria

associated with neurological disorders.
J Dermatol 35: 661-665, 2008. (査読有)

3) Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Yoshihiko Mitsuhashi, Shiro Ito, Michihiro Kono, Mayumi Komine, Hirotaka Akita, Yasushi Tomita.

Six novel mutations of the ADAR1 gene in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria: Histological observation and comparison of genotypes and clinical phenotypes.
J Dermatol 35: 395-406, 2008. (査読有)

4) Tamio Suzuki, Yasushi Tomita.
Oculocutaneous albinism types 2 and 4 in the Japanese population.
J Dermatol Sci 51: 1-9, 2008. (査読有)

5) Tamio Suzuki, Michihiro Kono, Yasushi Tomita (他9名12番目).
Ten novel mutations of the ADAR1 gene in Japanese patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria.
J Invest Dermatol 127: 309-311, 2007. (査読有)

6) Kazuhisa Maeda, Yasushi Tomita.
Mechanism of the inhibitory effect of tranexamic acid on melanogenesis in cultured human melanocytes in the presence of keratinocyte-conditioned medium.
J Health Sci 53: 389-396, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1) Yasushi Tomita, Taisuke Kondo, Michihiro Kono, Tamio Suzuki
Oculocutaneous albinism and dyschromatosis symmetrica hereditaria.
The 20th International Pigment Cell Conference 2008年5月9日 札幌市 (査読無)

2) Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Shiro Ito, Michihiro Kono, Tamiko Negoro, Yasutomu Ito, Yasushi Tomita.
Dyschromatosis symmetrica hereditaria associated with neurological disorders.
The 20th International Pigment Cell Conference 2008年5月9日 札幌市 (査読無)

3) Michihiro Kono, Hai Zheng Song, Yasushi Tomita.

Aphidicolin as a possible modulating agent for melanoma antigen expression in melanoma immunity.
International Investigative Dermatology 2008. 5月6日. 京都市 (査読有)

4) Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Michihiro Kono, Yasushi Tomita (他5名).
Dyschromatosis symmetrica hereditaria: Gene and morphological.
International Investigative Dermatology 2008. 5月6日. 京都市 (査読有)

5) Yasushi Tomita,
Recent progress of molecular genetics on congenital pigment disorders.
The 21th World Congress of Dermatology 2007年10月2日 ブエノスアイレス、アルゼンチン (査読無)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 悪性黒色腫抗原の発現上昇剤およびその用途。

発明者: 河野通浩、富田 靖

権利者:

出願人: 国立大学法人名古屋大学

種類: 国際出願

整理番号: P O 7 0 8 6 P

出願番号通知: PCT/JP2008/71469

出願年月日: 2 0 0 7 年 1 1 月 2 8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 靖 (Yasushi TOMITA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 7 0 1 0 8 5 1 2

(2) 研究分担者

室 慶直 (Yoshinao MURO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 8 0 2 7 0 9 9 0

河野 通浩 (Michihiro KONO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 6 0 3 1 9 3 2 4

(3)連携研究者

鈴木 民夫 (Tamio SUZUKI)
山形大学・医学部 教授
研究者番号：30206502

(4)研究協力者

國貞 隆弘 (Takahiro KUNISADA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30205108

近藤泰輔 (Taisuke KONDO)

名古屋大学・大学院医学系研究・大学院生