

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790806
 研究課題名 (和文) 先天性角化症における既知遺伝子の変異解析と新規原因遺伝子の同定に関する研究
 研究課題名 (英文) Mutation analyses of inherited keratodermas and gene identification for inherited keratodermas of unknown pathology
 研究代表者
 濱田 尚宏 (TAKAHIRO HAMADA)
 久留米大学・医学部・講師
 研究者番号：40320204

研究成果の概要：先天性角化症や表皮水疱症の患者について PCR 法、DDGE 法、ダイレクトシーケンス法を用いて遺伝子変異解析を行い、いくつかの結果を報告した。一部の疾患においては、臨床的重症度と遺伝子変異の種類・部位との相関についての所見を見出すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：単一遺伝子病、遺伝子変異、genotype-phenotype correlation

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩は、マッピングとポジショナルクローニングという手法を用いて単一遺伝子の異常によって引き起こされる多くの疾患において、その原因遺伝子を明らかにすることを可能にしてきた。皮膚科領域においても水疱性疾患、先天性角化症、色素異常症、母斑症、皮膚形成異常症など数多くの疾患の原因が次々と判明し、我々も皮膚粘膜ヒアリノーシス (lipoid proteinosis) や Kindler 症候群の原因遺伝子を同定することに成功した (Hamada T, et al: Hum Mol Genet 11: 833-840, 2002; Siegel DH, et al: Am J Hum Genet 73: 174-187, 2003)。原因遺伝子が同定されると、国内外の研究機関で

個々の症例について変異解析が行われ、データが蓄積されることにより、遺伝子異常の部位・種類と臨床的重症度との相関が明らかにされてきた。我々の研究室では、患者 DNA を用いた PCR (polymerase chain reaction) 法、ダイレクトシーケンス法により、単純型表皮水疱症や水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、Vörner 型掌蹠角化症などのケラチン遺伝子の異常により生じる一部の先天性皮膚疾患について変異解析を行い、その結果を報告してきた (Hamada T, et al: Br J Dermatol 150: 609-611, 2004; 濱田尚宏, 他: 日皮会誌 114: 1415-1420, 2004; Hamada T, et al: Arch Dermatol Res 296: 577-579, 2005. など)。また、最近では、先天性角化症患者団体の交流会に参加し、多くの患者を診察することに

加えて変異解析を進める準備をしてきた。

2. 研究の目的

(1) 研究目的：本研究では、各種先天性角化症において、i) PCR法、DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法、ダイレクトシーケンス法などを用いて既知遺伝子の変異解析を行い、それらが患者の特定の表現型に及ぼす影響 (genotype-phenotype correlation) を明らかにし、ii) マッピングとポジショナルクローニングを用いて新規原因遺伝子を同定することを目的とした。

(2) 研究の特色：我々は、ケラチン遺伝子変異解析について豊富な経験を既に有していた。また、前記した先天性角化症患者団体との交流により、既に24の患者家族から血液を採取し、ゲノムDNAの抽出を終了していた。このように、既に確立された遺伝子解析法と豊富な検体を用いることで多くの結果を得ることができると予想された。繰り返しになるが、個々の症例において遺伝子変異を解析し、データベースに蓄積していくことは変異の部位・種類と臨床症状の相関を明らかにしていく上で非常に重要である。多くの遺伝性疾患において、出生直後に臨床的予後を推測することは困難である。遺伝子解析により、変異の部位や種類が判明すれば、経過を予測し、症状増悪の予防や治療法も的確に選択できる可能性が高い。また、家族へは児が罹患した稀な疾患に対する正確なインフォームドコンセントを行うこともできる。次の挙児希望がある場合、変異を明らかにしていれば、適応を慎重に考慮しなければならないもののDNAを用いた出生前診断を受けることが可能にもなる。また、遺伝子変異の結果を海外の症例と比較することで、本邦における当該疾患の特性について見出すことができる可能性もある。さらに、24の家系の中には、現在明らかにされている先天性角化症の原因遺伝子以外の新規遺伝子に変異があることも予想された。それらについては、我々が既に経験してきたマッピングとポジショナルクローニングを用いて新規原因遺伝子を同定する準備も整っていた。本研究が成功すれば、標的となる遺伝子の導入や欠失による疾患モデルマウスの作成を試み、当該遺伝子によってコードされるタンパク質の皮膚における機能解析をも進めることが可能になる。将来的にこれらの知見は、患者の遺伝子治療へ進展する可能性を十分秘めている点でも意義の高いものであると確信していた。

3. 研究の方法

(1) 平成19年度：先天性角化症の患者団体に属

する24の家系から血液を採取し、ゲノムDNAの抽出は既に完了していた。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、葉状魚鱗癬、道化師様魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、Netherton症候群、Peeling skin syndrome、Hailey-Hailey病などが含まれ、ケラチン1/10、トランスグルタミナーゼ1、*ABCA12*、*SPINK5*、トランスグルタミナーゼ5、*ATP2C1*など当該疾患の原因遺伝子をターゲットとしたPCR法を用いてDNAを断片化して増幅した。*ABCA12*は53、*SPINK5*は32のエクソンを有しており、このように比較的大きなエクソンをもつ遺伝子について変異を簡便かつ安価に検出する方法としては、従来からSSCP (single strand conformational polymorphism) 法やCSGE (conformation sensitive gel electrophoresis) 法などが用いられてきた。これらは、得られた検体における遺伝子変異のうち、1~数塩基の欠失、挿入あるいは塩基置換を明らかにする方法であるが、特異性の高い検出法ではあるものの感度は70~80%とされている。そこで本研究では代替としてDGGE法による検索を行った。本法では変性剤である尿素とホルムアミドの濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルを使用するが、DNA断片は変性剤濃度が上昇すると低い T_m (melting temperature) 値を持つ配列が部分的に解離する。泳動開始直後、検体は塩基対が完全に二重らせんを形成しているが、下方へ向かい変性剤濃度が上昇すると、断片内の最も低い T_m 値をもつドメインが1本鎖に解離し、移動スピードが遅くなる。これを利用し、わずかな塩基配列の違いを検出する。DGGE法による遺伝子変異の検出率は最大99%と報告されており (Grompe M, et al: Nature Genetics, 5: 111-117, 1993)、SSCP法やCSGE法と比較して効率よく変異を明らかにできる可能性が高い。変異の存在が疑われた検体については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、遺伝子変異を検出した。可能な限り多くの検体において遺伝子変異を同定し、それらを臨床症状と併せて検討することで、遺伝子異常の部位・種類と臨床的重症度との相関について考察した。

(2) 平成20年度：非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症についてはトランスグルタミナーゼ1や*ABCA12*以外の遺伝子変異により発症する場面があることが示唆されており、複数の研究グループから、2q33-q35 (Parmentier L, et al: Hum Mol Genet, 5: 555-559, 1996)、3p21/19p12-q12 (Fischer J, et al: Am J Hum Genet, 66: 904-913, 2000)、19p13.1-p13.2 (Virolainen E, et al: Am J Hum Genet, 66: 1132-1137, 2000) に原因遺伝子がマッピングされている。本研究でも、ケラチン1/10、

トランスグルタミナーゼ1、*ABCA12*、*SPINK5*、トランスグルタミナーゼ5などにおいて遺伝子変異を同定できなかった先天性角化症についてはマッピングとポジショナルクローニングを用いて新規原因遺伝子の同定を試みることを考えた。特に近親婚の両親を有する常染色体劣性遺伝の家系を優先して検索することとした。ヒトゲノム上に数十～数百kbp 毎に出現するマイクロサテライト多型に基づき作製された高頻度マイクロサテライト多型マーカーを用いて解析を行った。これらのマーカーはヒトゲノム上におよそ5センチモルガンの間隔で配置されており、未知の単一遺伝子病の遺伝子座位を決定するのに非常に有用である。マーカーはマイクロサテライト多型を含む領域を増幅するためのプライマーであり、サンプルDNAをテンプレートとしたPCR法に使用される。得られたPCR生成物は自動シークエンサーを用いて泳動され、続くコンピュータ解析によりサンプルの遺伝子型が決定される。近親婚の両親を有する常染色体劣性の家系において、原因遺伝子の存在する遺伝子座と連鎖するマイクロサテライト多型では次のような結果が高く予想される。両親は対立遺伝子のうち一方の遺伝子型を共有し、患者は同一の遺伝子型のホモ接合子である。正常者はヘテロ接合子（キャリアー）であるか、それ以外の両親由来の2つの異なる遺伝子型を有している。マイクロサテライト多型マーカーは全人口のおよそ70%が様々な遺伝子型のヘテロ接合子を有していることが明らかとなっており、これを背景にして患者が特定のホモ接合子を有するマーカーを探索することは非常に有用である。このようにして全てのマーカーについて疾患表現型とマイクロサテライト多型の連鎖を解析した。

4. 研究成果

先天性角化症や表皮水疱症の患者についてPCR法、DGGE法、ダイレクトシークエンス法を用いて遺伝子変異解析を行った結果を報告した。劣性栄養障害型表皮水疱症の日本人患者における*COL7A1* 遺伝子変異 (Hamada T, et al: J Dermatol Sci 50: 147-150, 2008.) やアトピー性皮膚炎を合併した尋常性魚鱗癬の日本人家系におけるフィラグリン遺伝子変異 (Hamada T, et al: J Invest Dermatol 128: 1323-1325, 2008. 図1)、日本と韓国から収集したHailey-Hailey病患者における*ATP2C1* 遺伝子変異 (Hamada T, et al: J Dermatol Sci 51: 31-36, 2008) などを報告した (表1)。

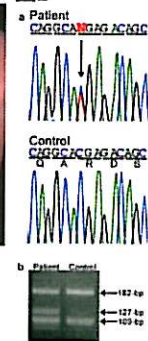
図1



アトピー性皮膚炎を合併した尋常性魚鱗癬の日本人家系 (図1: 臨床像、図2: 遺伝子変異解析の結果)

Hamada T, et al: J Invest Dermatol 128: 1323-1325, 2008

図2



COL7A1 と *ATP2C1* 遺伝子変異においては、患者と正常コントロールの mRNA 発現様式を詳細に検討することにより、各疾患の臨床的重症度と遺伝子変異の種類・部位との相関 (genotype-phenotype correlation) について考察した。

表1 Hailey-Hailey 病患者における遺伝子変異解析の結果

症例	国籍	性別	年齢	家族史	発症時期	病変部位	重症度	変異		
								<i>ATP2C1</i>	mRNAレベル	<i>hSPCA1</i> の位置
1	日本	男	57	なし	50代	顔面	中等症	c.358G>1G>G (intron 5)	in-frame exon 5 skipping	M2
2	日本	男	42	なし	20代	顔面、背部、四肢	重症	p.Arg153X (exon 7)	PTC in exon 7	Actuator
3	日本	男	47	なし	30代	顔面、四肢、紅腫	重症	c.520G>C (exon 7)	PTC in exon 6	Actuator
4	韓国	女	62	有	40代	顔面、四肢	中等症	c.681dup5 (exon 6)	PTC in exon 6	Actuator
5	日本	男	44	有	20代	顔面、四肢、紅腫	中等症	c.885+1G>T (intron 11)	novel cryptic donor splice site 5-bp upstream PTC in exon 12	M4
6	日本	男	58	なし	40代	顔面、四肢、紅腫	中等症	c.885delC (exon 12)	PTC in exon 12	M4
7	韓国	女	55	なし	20代	顔面、四肢、紅腫	重症	c.1570>27C (intron 17)	out-of-frame exon 17 skipping, PTC in exon 18	Nucleotide
8	日本	女	52	なし	40代	顔面、四肢、紅腫	重症	ND		

Hamada T, et al: J Dermatol Sci 51: 31-36, 2008 を改題し引用。

Hailey-Hailey 病患者における遺伝子変異解析については、各地から追加収集した17症例について、14の新規*ATP2C1* 変異を含む15の変異を検出した。先天性角化症患者団体との交流で得られた複数の重症型魚鱗癬家系のゲノムDNAについても*ABCA12* 遺伝子変異解析を進め、5つの新規変異を見出した。両者は現在、論文準備中である。我々の研究室で以前から行っている単純型表皮水疱症のケラチン5/14 遺伝子変異についての検討も引き続き行っている。病因不明の先天性角化症の家系について行ったマッピングとポジショナルクローニングにおいては、有意な結果を得ることはできなかった。

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10件)

- ① 古賀浩嗣, 濱田尚宏, 安元慎一郎, 橋本隆, 錦織千佳子: PCR法と*ATP2C1* による

- 制限酵素消化で診断したA群色素性乾皮症. 皮膚病診療. 31:317-320, 2009. (査読有)
- ② 濱田尚宏: Hailey-Hailey 病とカルシウムポンプ. 日皮会誌. 119:315-320, 2009. (査読無)
- ③ Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Abe T, Nagata K, Koro O, Hatano Y, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. A Japanese family with dominant pretibial dystrophic epidermolysis bullosa: Identification of a new glycine substitution in the triple-helical collagenous domain of type VII collagen. *J Dermatol Sci* 54:212-214, 2009. (査読有)
- ④ 金子 栄, 森田栄伸, 小笹正三郎, 山田義貴, 濱田尚宏, 河野優子, 橋本 隆: 単純型表皮水疱症 (Kobner 型). 皮膚病診療 31:187-190, 2009. (査読有)
- ⑤ 濱田尚宏: Verner 型掌蹠角化症. *MB Derma*. 142:49-54, 2008. (査読無)
- ⑥ Hamada T, Fukuda S, Sakaguchi S, Yasumoto S, Kim SC, Hashimoto T. Molecular and clinical characterization in Japanese and Korean patients with Hailey-Hailey disease: six new mutations in the *ATP2C1* gene. *J Dermatol Sci* 51:31-6, 2008. (査読有)
- ⑦ Ishii N, Hamada T, Yasumoto S, Hashimoto T. A case of epidermolytic hyperkeratosis with no facial involvement associated with mutation in keratin 10. *Clin Exp Dermatol* 33:353-4, 2008. (査読有)
- ⑧ Hamada T, Sandilands A, Fukuda S, Sakaguchi S, Ohyama B, Yasumoto S, McLean WH, Hashimoto T. *De novo* occurrence of the filaggrin mutation p.R501X with prevalent mutation c.3321delA in a Japanese family with ichthyosis vulgaris complicated by atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 128:1323-5, 2008. (査読有)
- ⑨ Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Sakaguchi S, Ishikawa T, Abe T, Yasumoto S, Hashimoto T, Nakano H, Sawamura D. Genotype-phenotype correlation in non-Hailey-Hailey recessive dystrophic epidermolysis bullosa: The splice site mutation c.6216+5G>T in the *COL7A1* gene results in aberrant and normal splicings. *J Dermatol Sci* 50:147-150, 2008. (査読有)
- ⑩ Chan I, Liu L, Hamada T, Sethuraman G, McGrath JA. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol* 16:881-90, 2007. (査読有)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 福田俊平、濱田尚宏、坂井香織、秋山真志、清水 宏、橋本 隆: Autosomal recessive congenital ichthyoses 患者における *ABCA12* 遺伝子変異の検討. 第 15 回分子皮膚科学フォーラム. 2008 年 11 月 14-15 日、京都府京都市.
- ② 辻 貴子、上田明弘、坂口幸子、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本 隆、高旗博昭、中野 創、澤村大輔: ケラチン 5 遺伝子にスプライスサイト変異を認めた単純型表皮水疱症の 1 例. 第 30 回水疱症研究会. 2008 年 10 月 26 日、東京都渋谷区.
- ③ 西田隆明、瀬戸山充、成田博美、濱田尚宏、橋本 隆、中野 創、澤村大輔: 先天性表皮水疱症の 1 例. 第 72 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2008 年 9 月 20 - 21 日、秋田県秋田市.
- ④ 福田俊平、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本隆: Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia (IFAP) syndrome の 1 例. 第 23 回角化症研究会. 2008 年 8 月 2 日、東京都千代田区.
- ⑤ 夏秋洋平、小野文武、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本 隆: 点状掌蹠角化症の親子例. 日本皮膚科学会第 345 会福岡地方会. 2008 年 7 月 13 日、福岡県久留米市.
- ⑥ 古賀浩嗣、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本隆、錦織千佳子: A 群色素性乾皮症の 1 例. 第 32 回日本小児皮膚科学会学術大会. 2008 年 6 月 28-29 日、東京都千代田区.
- ⑦ 濱田尚宏: 先天性皮膚疾患の遺伝子診断. 第 59 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2007 年 10 月 27-28 日、宮崎県宮崎市.
- ⑧ 吉村和弘、福田俊平、石井文人、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本 隆、市川竜太郎、古江増隆: Peeling skin syndrome の 1 例. 第 71 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2007 年 9 月 22-23 日、北海道札幌市.
- ⑨ 濱田尚宏、坂口幸子、福田俊平、Muhammad Siddique、橋本 隆: 当科における Hailey-Hailey 病の *ATP2C1* 遺伝子変異解析. 第 14 回分子皮膚科学フォーラム. 2007 年 9 月 14-15 日、愛媛県松山市.
- ⑩ 橋本 隆、濱田尚宏、坂口幸子、安元慎一郎、中野 創、澤村大輔: 劣性栄養障害型先天性表皮水疱症の 1 例. 第 50 回日本皮膚科学会高知地方会例会. 2007 年 9 月 2 日、高知県香南市.
- ⑪ 福田俊平、濱田尚宏、坂口幸子、安元慎

一郎、Aileen Sandilands、Irwin McLean、
橋本 隆：フィラグリン遺伝子変異を同
定した尋常性魚鱗癬の1例。第22回角
化症研究会。2007年8月4日、東京都千
代田区。

- ⑫ Hamada T, Sakaguchi S, Ohyama B,
Yasumoto S, Hashimoto T. The common
filaggrin mutation R501X in a Japanese
family with ichthyosis vulgaris. The
society of Investigative Dermatology
2007. May 9-12, Los Angeles, USA.

[図書] (計1件)

- ① Hamada T. Lipoid proteinosis. In:
Ruggieri M, Pascual-Castroviejo I,
Rocco CD, eds. Neurocutaneous
Disorders: Phakomatoses &
Hamartoneoplastic Syndromes. New
York: Springer, 907-914, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/derm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 尚宏 (HAMADA TAKAHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40320204