

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03679

研究課題名(和文)自己炎症性皮膚疾患における自然治癒機構の解明

研究課題名(英文)Revertant mosaicism in autoinflammatory skin diseases

研究代表者

乃村 俊史(Nomura, Toshifumi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50399911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：毛孔性紅色靴糠疹5型は極めて難治性の遺伝性皮膚疾患であり、根治的な治療法はほとんど存在しない。本研究では、毛孔性紅色靴糠疹5型の患者皮膚に臨床的にも病理学的にも自然治癒した皮膚領域が存在することを発見し、その領域の表皮から病因変異(CARD14遺伝子の機能獲得変異)が消失していることを証明した。さらに、病因変異の消失メカニズムが体細胞レベルでの相同組換えであることを示した。相同組換えはDNA2本鎖切断の際の修復に重要であることが知られており、変異CARD14がDNA2本鎖切断の増加やDNA2本鎖切断時の相同組換え頻度の増加をきたすか検討したが、いずれも認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛孔性紅色靴糠疹5型で自然治癒現象(復帰変異モザイク)が見られることを世界で初めて発見し、論文報告しました。患者さんの皮膚(表皮)から病因となる遺伝子変異(CARD14遺伝子のミスセンス変異)が相同組換えという仕組みにより消失していました。毛孔性紅色靴糠疹5型は極めて難治性の疾患で有効な治療法はほとんど存在しませんが、本研究により患者さんの皮膚細胞(表皮角化細胞)には相同組換えにより遺伝子変異を修復する力があることがわかりましたので、今後その仕組みがさらに解明されれば、新規治療法の開発が強く期待できます。

研究成果の概要(英文)：Pityriasis rubra pilaris type 5 is a refractory autosomal dominant skin disease with few effective treatments. In this study, we for the first time revealed that patients with pityriasis rubra pilaris type 5 have dozens of clinically and histopathologically normalized small skin spots. We then confirmed reversion of the pathogenic mutations only in DNA extracted from epidermis. Whole-genome SNP analysis revealed that homologous recombination is the major mechanism of the mutation reversion. Homologous recombination is utilized when DNA double strand breaks occur. However, mutant CARD14 neither increased DNA double strand breaks nor promoted homologous recombination when DNA double strand breaks occur.

研究分野：皮膚科学

キーワード：毛孔性紅色靴糠疹5型 復帰変異モザイク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患は、遺伝子変異により自己炎症で特徴づけられる多彩な症状を特徴とする疾患であるが、難治性のことが多く、病態のさらなる解明や新規治療法の開発が強く希求されている。そのような中、我々は自己炎症性疾患(自己炎症性角化症)のひとつである毛孔性紅色靴糠疹5型(CARD14-associated papulosquamous eruptionとも呼ばれる)の患者皮膚に正常化したように見える小さな斑状の皮膚領域が存在することに気づいた。遺伝性皮膚疾患の一部(ichthyosis with confettiやロリクリン角皮症、表皮水疱症など)では revertant mosaicism が認められることが知られているため、毛孔性紅色靴糠疹5型でもこの現象がみられるのではないかという仮説を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、自己炎症性皮膚疾患における revertant mosaicism の臨床・病理・分子メカニズムについて詳細を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、自己炎症性皮膚疾患の中でも特に毛孔性紅色靴糠疹5型に絞って、解析を行った。

#### (1) 臨床解析と病理解析、遺伝子解析

毛孔性紅色靴糠疹5型患者を2名リクルートし、病変部と正常化部(revertant skin spot)について臨床像と病理像を解析した。また、末梢血または唾液から抽出したDNAを用いて遺伝子解析(whole-exome解析およびサンガーシーケンス)を行い、CARD14変異解析を行った。正常化部については、表皮と真皮を分離したのちにそれぞれからDNAを抽出し、再度CARD14変異解析を行った。

#### (2) 変異CARD14の病原性解析

同定されたCARD14変異に病原性があるか確認するために、NF- $\kappa$ Bの活性化やその下流のIL-8、CCL20の活性化の有無について検討した。

#### (3) 変異消失機構の解析

先行研究にて、皮膚疾患(ichthyosis with confettiやロリクリン角皮症)で見られる revertant mosaicism の多くは相同組換えにより生じることがわかっているため、まずは体細胞レベルでの相同組換えの有無を調べるべく、CARD14変異が表皮から消失するメカニズムを解析するために、正常化部表皮由来DNAを用いて網羅的一塩基多型アレイ解析(whole-genome oligo-single-nucleotide polymorphism array)を行った。

#### (4) 変異型CARD14がDNA double-strand break(DSB)に与える影響の解析

相同組換えはDNA損傷の修復過程で生じるため、変異型CARD14がDNA損傷自体を増加させ相同組換えが誘導している可能性がある。そこで、変異型CARD14の発現下でDSBが増加するか検討した。X線照射とエトポシド処理を用いたDSB誘導下でのH2AXをWestern blot法を用いて定量した。

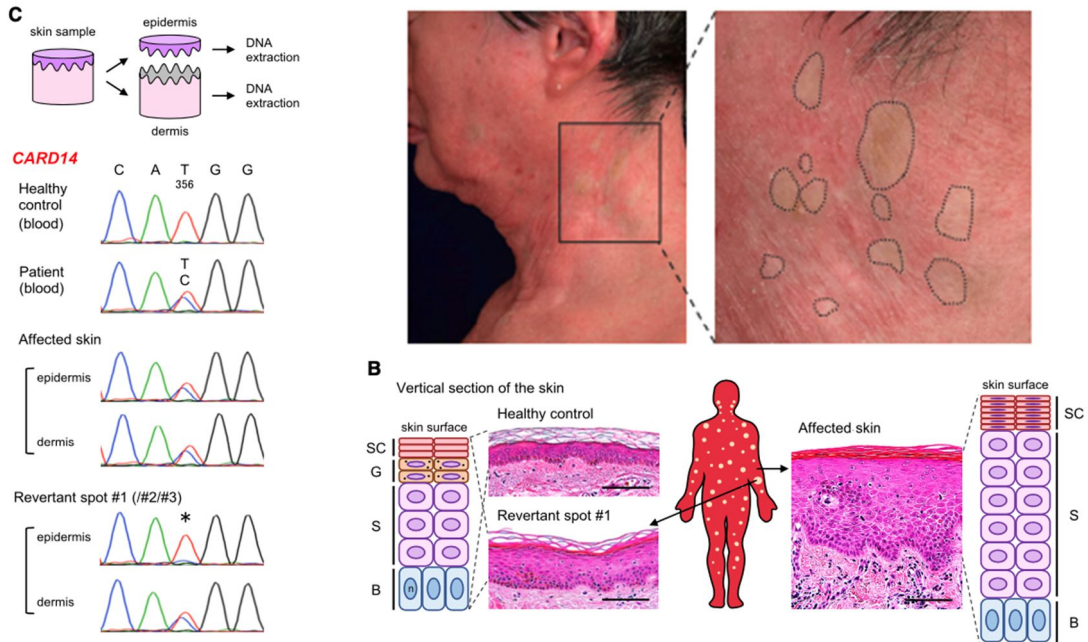
#### (5) 変異型CARD14がDSB修復に与える影響の解析

DSB修復には相同組換えに加えて、non-homologous end joining(NHEJ)が使用され、通常はほとんど後方で修復される。変異型CARD14がDSB修復の際にNHEJではなく相同組換えを誘導する可能性を、I-SceIとEGFPを使ったレポーターアッセイ(相同組換えで修復された場合にのみEGFPが発現する)で検討した。

### 4. 研究成果

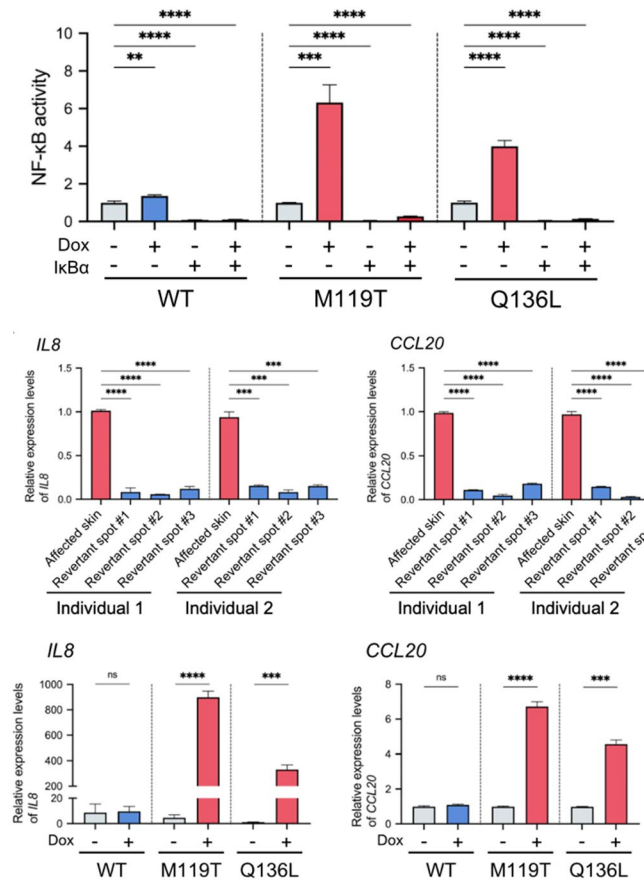
#### (1) 毛孔性紅色靴糠疹5型において世界で初めて revertant mosaicism を同定した

毛孔性紅色靴糠疹5型の患者2名について遺伝子解析を行ったところ、患者1はp.M119Tを、患者2はp.Q136Lをそれぞれヘテロ接合性に保有していた。患者皮膚を詳細に観察したところ、患者1には数十個から数百個の、患者2には数個の緑色または白色で表面が平滑な径1cmまでの斑を認めた。これらの斑のうち合計6か所から皮膚生検を行ったところ、ヘマトキシリンエオジン染色標本ではそのすべてで組織学的な正常化を認めた。表皮から抽出したDNAを用いて変異解析をしたところ、6か所とも病因変異が消失していた。以上から、毛孔性紅色靴糠疹5型でも revertant mosaicism が認められることを確認した。また、正常化した皮膚領域は少なくとも1年以上持続しており、表皮のstem cellレベルでCARD14の病因変異が消失していることが示唆された。



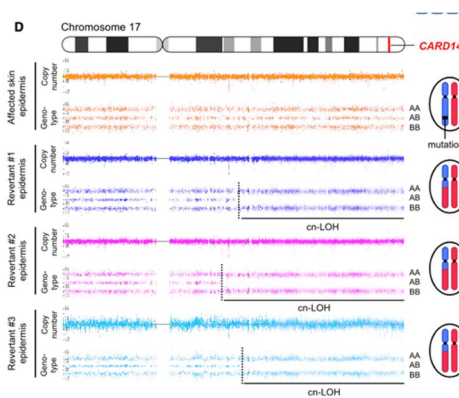
( 2 ) 変異 CARD14 は NF- B 活性を上昇させ IL-8 と CCL20 の発現を亢進させる

患者の罹患部皮膚では revertant skin spot と比べて *IL8* や *CCL20* mRNA の発現が低下していた。さらに、本症の原因である変異型 CARD14 を発現する細胞株を作成した。具体的には、Tet-On 3G 発現誘導システムと U2OS 細胞を用いて細胞株を作成し、ドキシサイクリン添加時にのみ野生型または変異型( 毛孔性紅色秕糠疹 5 型患者で同定されている 2 つのミスセンス変異、M119T と Q136L を導入した ) の CARD14 を発現する細胞株である。この細胞株では野生型 CARD14 を導入した細胞株と比べて、NF- B 活性の上昇と IL-8 と CCL20 の mRNA 発現の亢進が認められた。



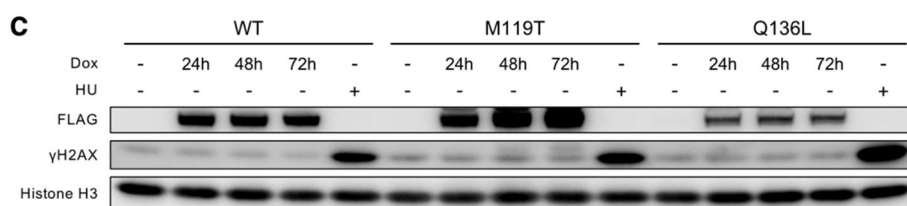
( 3 ) 変異消失機構の大部分は体細胞レベルでの相同組換えである

正常化部表皮由来DNAを用いて網羅的一塩基多型アレイ解析を行ったところ、検査した revertant spot6 か所のうち4か所で、17番染色体長腕の *CARD14* よりセントロメア側からテロメアまでの loss of heterozygosity を認めた。すなわち、毛孔性紅色靴糠疹5型で認められる revertant mosaicism の多くは体細胞レベルでの相同組換えにより生じていることを明らかにした。



**(4) 変異型 *CARD14* は DSB に影響を与えない**

変異型 *CARD14* の発現下で X 線照射を用いて人為的に DSB を誘導したが、野生型 *CARD14* の発現下と比べて DSB は増加しなかった (H2AX は増加しなかった)。さらにエトポシド処理を用いて同様に DSB を誘導したが H2AX はやはり増加しなかった。これらの結果から変異型 *CARD14* は DSB に影響を与えないと結論づけた。



**(5) 変異型 *CARD14* は DSB 修復の際の相同組換えを増加させなかった**

I-SceI と EGFP を使ったレポーターアッセイを行ったが、変異型 *CARD14* を発現させても相同組換えによる修復は増えなかった。

以上の結果から、毛孔性紅色靴糠疹5型で revertant mosaicism が認められることを世界で初めて証明した。さらに、病因遺伝子変異の消失の大部分は体細胞レベルでの相同組換えにより起こることを見出した。興味深いことに、変異型 *CARD14* は DSB 自体を増やさないことはもちろん、DSB 修復における相同組換えも増やさないことを明らかにした。これらの研究成果は、主に American Journal of Human Genetics 誌にて報告した (Miyachi T, et al. Am J Hum Genet 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murase Chiaki, Takeichi Takuya, Nomura Toshifumi, Ogi Tomoo, Akiyama Masashi	4. 巻 141
2. 論文標題 Hereditary Mucoepithelial Dysplasia and Autosomal-Dominant IFAP Syndrome Is a Clinical Spectrum Due to SREBF1 Variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1596 ~ 1598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.09.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teramura Takashi, Nomura Toshifumi	4. 巻 100
2. 論文標題 Acute skin barrier disruption alters the secretion of lamellar bodies via the multilayered expression of ABCA12	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 50 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.08.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Toshifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Hidradenitis Suppurativa as a Potential Subtype of Autoinflammatory Keratinization Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toshifumi Nomura	4. 巻 97
2. 論文標題 Recombination-induced revertant mosaicism in ichthyosis with confetti and loricrin keratoderma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 94-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2019.12.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi Toshinari, Suzuki Shotaro, Takeda Masae, Peh Jin Teng, Aiba Masayuki, Natsuga Ken, Fujita Yasuyuki, Takeichi Takuya, Sakamoto Taiko, Akiyama Masashi, Shimizu Hiroshi, Nomura Toshifumi	4. 巻 108
2. 論文標題 Altered replication stress response due to CARD14 mutations promotes recombination-induced revertant mosaicism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2021.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Toshifumi, Takeda Masae, Teng Peh Jin, Orita Akihiro, Inamura Emi, Miyachi Toshinari, Suzuki Shotaro, Moriuchi Reine, Shimizu Hiroshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Symmetrical acral keratoderma: A waxing and waning scaly pigmented skin lesions on the acral extremities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e151-e152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 乃村俊史
2. 発表標題 遺伝性角化症における revertant mosaicism
3. 学会等名 第34回角化症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乃村俊史, 鈴木翔多朗, 宮内俊成, 竹田真依, 藤田靖幸, 西江 渉, 秋山真志, 山本明美, 清水 宏
2. 発表標題 Mitotic recombination underlies frequent revertant mosaicism in lorycin keratoderma
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乃村俊史, 鈴木翔多朗, 宮内俊成, 竹田真依, 藤田靖幸, 西江 渉, 秋山真志, 山本明美, 清水 宏
2. 発表標題 体細胞組換えによる revertant mosaicismを認めたロリクリン角皮症の2家系
3. 学会等名 第83回日本皮膚科学会東京・東部合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乃村俊史
2. 発表標題 魚鱗癬診療の基礎と将来展望
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshifumi Nomuraa
2. 発表標題 Revertant mosaicism in inherited disorders of keratinization
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	武市 拓也  (Takeichi Takuya)  (30754931)	名古屋大学・医学系研究科・講師    (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋山 真志  (Akiyama Masashi)  (60222551)	名古屋大学・医学系研究科・教授    (13901)	
研究分担者	清水 宏  (Shimizu Hiroshi)  (00146672)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関