

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21591

研究課題名(和文) Break-induced replicationによる遺伝子変異消失機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying pathogenic mutations in genetic diseases by break-induced replication

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：毛孔性紅色靴糠疹5型は稀な常染色体優性遺伝性皮膚疾患で、CARD14のヘテロ接合性のミスセンス変異により発症する。本研究では、体細胞レベルでの相同組換えにより後天的に表皮角化細胞から遺伝子変異が消失していくメカニズムを解析し、その一端を解明した。具体的には、変異CARD14により複製ストレス応答に変化が生じ、普段は抑制されているbreak-induced replicationという仕組みが作動することで遺伝子変異が消失していくことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、毛孔性紅色靴糠疹5型でなぜ病因遺伝子変異が表皮角化細胞から消失するか解明できたことにより、患者の細胞には自然に遺伝子変異を修復する能力が備わっていることが明らかになりました。このような仕組みをうまくいかせば、現在は対症療法しかなく根治的な治療法がない毛孔性紅色靴糠疹5型はもちろん、他の遺伝性疾患の新規治療法の開発につながることを期待できます。また、遺伝子変異が消失する仕組みとしてbreak-induced replicationが起こっていましたが、人におけるこの現象は未解明な点が多いことから、この分野への貢献も期待できます。

研究成果の概要(英文)：Pityriasis rubra pilaris type 5 is an autosomal dominant skin disorder caused by gain-of-function mutations in CARD14. Interestingly, clinically, histopathologically, and genetically cured small skin spots appear in patients with pityriasis rubra pilaris type 5. In this study, we unveiled the mechanisms underlying the disappearance of such pathogenic mutations from the patients' epidermis. We showed that mutant CARD14 alters replication stress response and break-induced replication is the major mechanism underlying such reversion of the pathogenic mutations in CARD14.

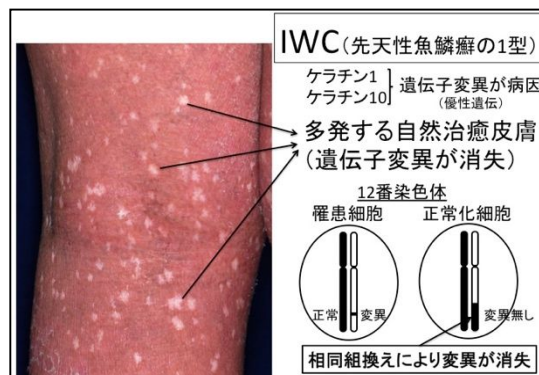
研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝性皮膚疾患 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

遺伝性疾患に対する根治的治療法は、一部の酵素補充療法などを除き存在せず、新規治療法の開発が強く希求されている。そのような中、我々は先行研究において、一部の遺伝性角化症 (ichthyosis with confetti (IWC)、ロリクリン角皮症、毛孔性紅色粧糠疹 5 型) の患者皮膚から後天的に遺伝子変異が消失し、自然治癒することを見出した (右図)。これらの疾患では、約 5-10mm の正常化皮膚が 1 人の患者あたり数十個から数万個認められることや、加齢とともに正常化皮膚が増数することから、**変異タンパク質により相同組換え**



**えが誘発され遺伝子変異が消失する機構が存在することが予想される** (Suzuki, Nomura et al. J Invest Dermatol 2016; Nomura et al. JCI Insight 2018; Suzuki, Nomura et al. Life Sci Alliance 2019)。

相同組換えは、DNA2 本鎖切断 (DNA 損傷) の代表的な修復経路であり、SSA (single-strand annealing) と dHJ (double Holliday junction) SDSA (synthesis-dependent strand annealing) BIR (break-induced replication) の 4 つに大別される。我々は、**上記 3 疾患での変異消失が常に病因変異よりセントロメア側からテロメアまでの長い相同組換えで起こること、すなわち、これらの疾患では 4 種類存在する相同組換えの中で BIR のみによって変異が消失する可能性を見出した。**BIR はヒトでは通常抑制されているが、複製ストレス (複製がスムーズに進行せず DNA が不安定になる状況) による DNA 損傷の修復に働くので、**上記 3 疾患では変異タンパク質が複製ストレス応答を変化させることで BIR を誘導し病因変異が消失する**という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

遺伝性角化症における revertant mosaicism の分子メカニズムを、特に BIR に着目し解明する。

### 3. 研究の方法

遺伝性角化症のうち、ichthyosis with confetti やロリクリン角皮症、毛孔性紅色粧糠疹 5 型を解析対象とし、変異ケラチン 1、変異ケラチン 10、変異ロリクリン、変異 CARD14 を発現する細胞株を作成し、複製ストレス応答に与える影響を解析したが、最も解析が進んでいる毛孔性紅色粧糠疹 5 型について本報告書では記載する。まず、本症の原因である変異型 CARD14 を発現する細胞株を作成し、解析した。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のみ野生型または変異型 (毛孔性紅色粧糠疹 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 を発現することを確認した上で、以下の実験を行った。

#### (1) 変異型 CARD14 が複製ストレスに与える影響の解析

FACS を用いた細胞周期の解析  
DNA ファイバー解析

#### (2) 変異型 CARD14 が複製ストレス応答に与える影響の解析

ヒドロキシウレアを添加し複製ストレスを与えた状態で、H2AX を western blot 法にて定量し、DNA double-strand break (DSB) について評価した。同様の実験を、同じく複製ストレスを誘導することが知られているアフィディコリンを用いて実施した。

#### (3) 変異型 CARD14 が複製ストレス応答を変化させる機序の解析

変異型 CARD14 は NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化させるので、RNAi により NFKB1、NFKB2、RELA、RELB、REL をノックダウンした状況下で、(2) と同様にヒドロキシウレアを添加し複製ストレスを与えた状態で、H2AX を western blot 法にて定量した。

#### (4) 変異型 CARD14 が相同組換えに与える影響の解析

RPA2 や BRCA1 といった相同組換えのマーカーの発現を FACS を用いて定量した。

#### (5) 変異型 CARD14 が BIR に与える影響の解析

複製ストレスにより崩壊した fork の相同組換えによる修復は、SDSA、dHJ、BIR のいずれかの機構によって行われる。このうち、SDSA と dHJ は dormant origin firing を必要とするため、変異 CARD14 発現下で複製時の origin firing に関連する遺伝子群 (ORC1、MCM10、GINS1、GINS2) の発現を定量した。

DNA ファイバー解析を用いて、変異 CARD14 発現下での new origin firing を定量した。

#### 4. 研究成果

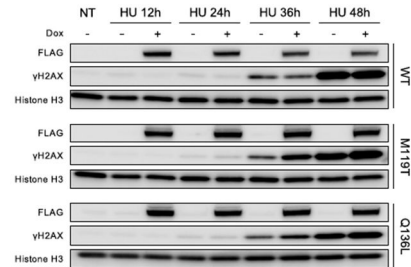
##### (1) 変異型 CARD14 は複製ストレスを増加させなかった

野生型、変異型 CARD14 の発現下で細胞周期は変化しなかった。

野生型、変異型 CARD14 の発現下で fork スピードや stalled fork 頻度には有意差は見られなかった。

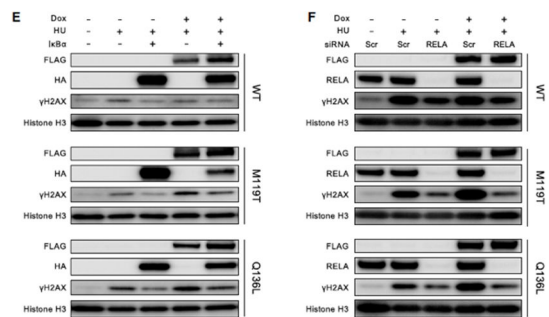
##### (2) 変異型 CARD14 は複製ストレス応答を変化させた

ヒドロキシウレアおよびアフィディコリン投与により、変異型 CARD14 発現下で H2AX は有意に増加しており、DSB が増加することがわかった (右図)。



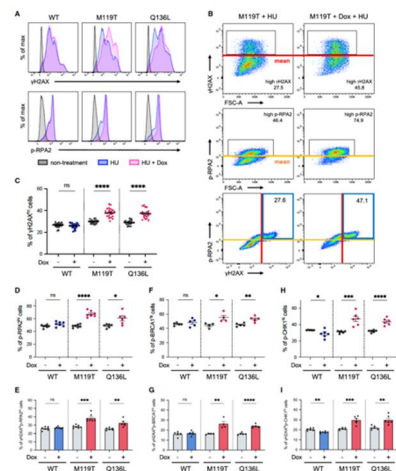
##### (3) 変異型 CARD14 による複製ストレス応答の変化は NF- B シグナル経路に一部依存していた

RELA のノックダウン下でヒドロキシウレアによる複製ストレスを与えたところ、変異型 CARD14 発現下での H2AX の増加が部分的に抑制された (右図)。



##### (4) 変異型 CARD14 により相同組換えが活性化された

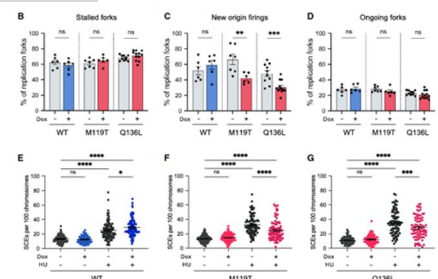
変異型 CARD14 発現下では野生型と比べて RPA2 や BRCA1 の発現が増加していた (右図)。



##### (5) 変異 CARD14 は複製ストレス応答において BIR を増加させた

変異 CARD14 発現下では *ORC1*, *MCM10*, *GINS1*, *GINS2* の発現は野生型発現時と比べて有意に低下していた。

変異 CARD14 発現下では DNA ファイバー解析にて new origin firing が野生型発現時と比べて有意に減少していた (右図)。



以上の結果から、毛孔性紅色粧糠疹 5 型では変異型 CARD14 が複製ストレス応答を変化させ、一部は NF- B 依存性に BIR による相同組換えが促進していることが明らかになった。Revertant mosaicism の分子メカニズムについてはこれが初めての報告であり、大きな成果が得られたと考えている。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4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

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 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 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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshifumi Nomura
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

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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------