

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月2日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591459

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

澤田 昌樹 (Masaki Sawada)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80467315

研究成果の概要（和文）：

- (1) 遺伝性対側性色素異常症の病因となる8の新規 ADAR1 変異遺伝子を同定した。
- (2) 遺伝子データベースを利用した *in silico* での新規基質遺伝子の探索を行った。
- (3) ADAR1 の p150 アイソフォーム特異的にノックアウトマウスを作成し、ADAR1 p150 isoform +/- は胎生致死になることを明らかにした。また、ADAR1 p150 isoform +/- の表現型を検討した。

研究成果の概要（英文）：

- (1) Eight novel mutations in *ADAR1* which caused in *Dyschromatosis symmetrica hereditaria* were identified.
- (2) Novel substrate gene of ADAR1 was tried identifying *in silico* by using gene database.
- (3) ADAR1 p150 isoform specific knockout mice were constructed and it was investigated that the homozygous mice lead to embryonic lethality. Investigation of phenotype of the heterozygous mice was done.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：色素細胞学

1. 研究開始当初の背景

メラニン生成の研究の歴史は古く、ほとんど解明されたとの印象があるかもしれない。確かに顕微鏡レベルでの病理組織学や電子顕微鏡による色素細胞の研究では、メラノソームの生成や病態が十分観察されている。しかし分子レベルでの理解は全くな

されていない。アミノ酸の一つであるチロシンの代謝産物がポリマー化したものがメラニンであるということくらいは、明らかになっている程度で、黒人と白人の違いをもたらす分子機構さえ全く解らない。

劣性遺伝性疾患の眼皮膚白皮症（以下OCA）がメラニン生成の律速酵素であるチ

ロジナーゼの遺伝子変異により発症することを、本研究代表者は1989年に世界に先駆けて明らかにした(Biochem Biophys Res Commun 164:990,1989)。これをきっかけにOCA患者の遺伝子診断が世界的に始まり、その後チロジナーゼ遺伝子以外にもOCAの病因遺伝子としてP遺伝子、TRP1遺伝子、SCL45A2(MATP)遺伝子、HPS1-8遺伝子、CHS遺伝子、GS1-3遺伝子などが次々と明らかになり、これら病因遺伝子による病型分類がほぼ確立された。つまり非症候性のOCAとしてOCA1型(チロジナーゼ遺伝子関連型)、2型(P遺伝子関連型)、3型(TRP1遺伝子関連型)、4型(SCL45A2遺伝子関連型)まで分類され、症候性OCAとして、Hernansky-Pudlak症候群(以下HPS)1-8型、Chediak-Higashi症候群、Griscelli症候群1-3型まで明らかにされた。

2003年に我々は、世界に先駆けて優性遺伝性疾患の遺伝性対側性色素異常症(以下DSH)が、連鎖解析とポジショナルクローニングにより2重鎖RNA特異的アデノシン脱アミノ化酵素(double-strand RNA adenosine deaminase, DSRAD 以下ADAR1)の遺伝子変異により発症することを明らかにした(Am J Hum Genet 73:693,2003)。ADAR1は現在RNAの研究分野で脚光を浴びているRNA編集酵素の一つであり、この酵素の働きにより、DNAの情報を忠実に伝えるべきRNAが変化を受け、そのまま蛋白合成へ伝えられない、つまりセントラルドグマを否定する事が起こる。この酵素の活性低下が何故DSHを発症させるのかは、極めて興味深い。なおDSHは1910年に東北大学の初代医学部皮膚科教授遠山郁三博士により初めて報告された疾患である。我々はその後もこの疾患の遺伝子変異の研究を続け、総計35の変異遺伝子を報告している(J Invest Dermatol 124:1186,2005. ibid.127:309,2007. J Dermatol 35:395,2008)。

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。

本研究では、病因遺伝子が明らかとなった遺伝性対側性色素異常症、眼皮膚白皮症(OCA)2型(P遺伝子関連型)、OCA3型(TRP1遺伝子関連型)、OCA4型(SCL45A2遺伝子関連型)、HPS1およびHPS4の病態を遺伝子産物のレベルで解明し、それらのことを通じて正常メラノサイトの生存とメラニン生成の調節の機構を明らかにする。つまり本研究では、正常なメラノサイトの分化、細胞調節、メラニン生成調節の機構を、色素産生機構の異常な状態(色素異常症)の解明を通して明らかにしようとするものである。

本研究で対象としている、DSH、HPS1型、OCA1-4型、の病因遺伝子については、2009年度までの研究代表者である富田靖が長年病因遺伝子レベルの研究を続け、世界の研究者をリードしてきた疾患である。DSHはRNA編集酵素ADAR1の低下により胎生期のメラノblastからメラノサイトへの分化異常により発症すると推定している。またHPSはメラノサイト内での膜小器官メラノソーム形成の不全により発症すると考える。尋常性白斑は表皮に定着したメラノサイトの生存が脅かされる状態である。OCA1-4型はメラノソーム内でのメラニン生成不全により発症する。これら4疾患群の病態を研究することは、メラノサイトの分化からメラニン生成、そしてメラノサイトの生存まで、メラノサイトの全てを研究対象としてカバーすることになる。つまり本研究では4疾患群の病因、病態の研究を通して、最終的にはメラノサイトという小宇宙を総合的に理解することにある。

疾患を通して正常な生理機能を明らかにする研究方法は、基礎の研究者にはできない臨床家の研究者の特権である。当教室では長年、前述DSH、HPS、OCAのさまざまな変異を持つ症例の遺伝子を多く保持しており、世界的にみても3つの遺伝性疾患の症例と変異遺伝子を蓄積している研究者なく、これらを駆使して必ずや成果が得られと確信している。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性対側性色素異常症(以下DSH)の病因遺伝子産物ADAR1の基質RNAの同定

すでに明らかにされている染色体遺伝子のDNA塩基配列とこれもすでに報告されているmRNAの塩基配列とをコンピュータを使って比較検討し、A→G部位に変化している遺伝子を検索し、ADAR1酵素の基質候補mRNAを捜す。これを実際のヒト皮膚から得られたmRNAで実際に起こっているかどうかを確認する。これより、ADAR1の基質mRNAを解明する。

(2) DSHモデルマウスの作製

現在ヒトの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^{+/-})の作製をすすめている。このマウスの表現型、特に色素異常について検討する。さらにこれらマウスにメラニン生成に関与するホルモンやサイトカイン、紫外線などの刺激が、メラノサイト内のmRNAの発現にどのような影響を及ぼすかをDNAチップを用い網羅的に解析し、ADAR1の機能を明らかにする。

(3) 眼皮膚白皮症(以下OCA)2-4型やDSHの病因遺伝子産物の機能解析
OCA2型のP蛋白と4型のMATP蛋白はメラノソームでのイオンや糖の膜輸送に関与し、3型のTRP1蛋白はDHICA Oxidaseと言われていたが、Hearingらはいずれもメラノソーム構成蛋白の小胞輸送(メンブレントラフィック)に関与すると考えている。OCA1-4型患者、HPS1型患者、DSH患者および健常人のメラノサイトをP, TRP1, HCL45A2/MATP, ADAR1そしてチロジナーゼに対する抗体を用いてそれら蛋白の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡などを用いて比較検討し、メラノソーム形成のどの段階で機能しているか明らかにする。さらにこれら細胞に対するメラニン生成に関与するホルモンやサイトカイン、紫外線などの刺激による変化も同様な手法により比較検討する。

(4) DSH患者の遺伝子診断

これまでに引き続き、当科を受診するDSH患者および全国からの紹介患者について、遺伝子診断を行う。

4. 研究成果

「遺伝性対側性色素異常症の病因遺伝子産

物ADAR1の基質RNAの同定」については、遺伝子データベースからDNA塩基配列とmRNA配列をそれぞれ得て、コンピュータを使って比較検討し、A-I変換を受けている遺伝子を検索する実験を行った。実際は、イノシンはグアニンとして認識されるためDNA配列ではアデニンがRNA配列上ではグアニンに変化している「A-G」部分を検索する。Genbankから得たmRNA配列データをgenomic DNA上にマップしてくれるインターネット上のサイトにアップロードして、その遺伝子上に何個A-I変換があるかを調べ上げる。今回は、この作業を自動化するコンピュータソフトを作成して、約5万の配列(異なるデータベースの番号が複数リストアップされている遺伝子もあるため、重複があると思われる。)について調べた。結果はデータベース上ではかなりの割合の遺伝子でこのような変化が認められたが、実際に色素細胞からのcDNAで候補部位のシーケンスを検討してみると偽陽性が多く見られ、今後も検証作業が必要である。その原因のひとつは、RNA編集が0%か100%ではなく、数%しかないRNA編集部位も実際にあることが分かっている。そのため、検証する際も、それを見越した検証作業が必要であり、大変な労力が必要となる。もうひとつは、genomic DNA自体にSNPと呼ばれる多型があり、その多型をA-I変換として検出している可能性もある。3年間の研究期間が終了する現在では、次世代シーケンスによって得られた膨大なデータによりSNPのデータベースも充実して来ているため、今後は本研究で得られたデータとそれらのデータベースをリンクさせ、より可能性の高い候補部位を抽出することが可能となっており、現在も研究を続けている。

「DSHモデルマウス」については、p150特異的なADAR1遺伝子変異をヘテロに保持したノックアウトマウスを完成させて、そのマウスの四肢を観察した。p150特異的なノックアウトマウスを作成した理由は、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110kDa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 110Kda 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したためである。本マウスでの結果は、p110 および 150 の両アイソフォームをノックダウンしたマウスで報告されたのと同じく、やはり本疾患に特徴的な皮疹は認めなかった。

「白皮症(OCA)や DSH の病因遺伝子産物の機能解析」については、様々な OCA 患者の遺伝子解析を行った中で、OCA1 の最小色素型の表現型を取る日本人症例の遺伝子診断がすでに済んでいたが、その変異の機能解析を行った。今回、チロシナーゼの野生型のコード配列および OCA1MP 患者で明らかになった 2 つの変異、p.R77Q と p.D383N を持つコード配列をそれぞれ melan-c 細胞に安定導入して、3 つの安定導入株を作成した。過去の報告で活性がないことが示されている p.R77Q に対して、これまで機能解析の報告がない p.D383N にてわずかなチロシナーゼ活性が認められれば、これらを OCA1MP の表現型を示す遺伝子型と考えることができるため、これを証明することを目的とした。実際に測定してみると、野生型のチロシナーゼ遺伝子を導入した細胞ではメラニンは十分得られたが、p.R77Q と p.D383N の細胞株では、いずれも検出限界量以下であったため、p.D383N にわずかなチロシナーゼ活性があることを証明することはできなかった。

「DSH 患者の遺伝子診断」をこの研究期間中を引き続き行った。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 40 種類以上の病因となる DSRAD/ADAR1 遺伝子変異を我々は報告した。本研究期間中に 8 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) は認められなかった。

本研究期間で診断をした症例にはウイルス脳症を合併した小児 DSH 患者の例もあった。この症例の遺伝子変異は新規変異であり、ウイルス感染に対する ADAR1 の発現応答が不十分であることが、ウイルス感染による重篤な障害の発症に関連している可能性が示唆された症例である。

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 17 件)

1. Kono M, Akiyama M et al. (5 人中 1 番目) Dyschromatosis symmetrica hereditaria by ADAR1 mutations and viral encephalitis: a hidden link? Int J Dermatol (in press) (査読有)

2. Kono M et al. (7 人中 1 番目) Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type: A case report on the analysis of genotype of an OCA1MP patient. Br J Dermatol (in press) (査読有)

3. Kono M, Akiyama M et al. (9 人中 1 番目) Four novel ADAR1 gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. J Dermatol (in press) (査読有)

4. Kaibuchi-Noda K, … Kono M et al (11 人中 5 番目). Detection of Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma prior to occurrence of Merkel cell carcinoma. J Am Acad Dermatol (in press) (査読有)

5. Mori M, Sugiura M, Kono M et al (12 人中 3 番目). Clinico-pathologic Analysis of 66 Japanese Thin Melanomas with Metastasis of Sentinel or Regional Lymph Node. J Cutan Pathol (in press) (査読有)

6. 小島知子, 馬淵智生, 梅澤慶紀, 松山孝, 小澤明, 近藤泰輔, 河野通浩, 富田 靖, 鈴木民夫
遺伝子解析より眼皮膚白皮症 4 型と考えられた 1 例。
日本皮膚科学会雑誌 121(2):1707-13, 2011.
(査読有)

7. Akihiro Sakakibara, Michihiro Kamijima, Shinichi Shibata, Satoshi Yasue, Michihiro Kono, Yasushi Tomita.
Dermoscopic evaluation of vascular structures of various skin tumors in Japanese patients.
J Dermatol 37(4): 316-322, 2010. (査読有)

8. Takaaki Matsumoto, Shinichi Shibata, Satoshi Yasue, Akihiro Sakakibara, Kenji Yokota, Masaki Sawada, Michihiro Kono, Katsuhiko Kato, Yoshie Shimoyama, Yasushi Tomita.

Interval sentinel lymph nodes in patients with cutaneous melanoma: A single-institution study in Japan. *J Dermatol* 37(7): 629-634, 2010. (査読有)

9. Ichidai Murata, Masahiro Hayashi, Yutaka Hozumi, Kazuyasu Fujii, Nozomi Kuroki, Yoshihiko Mitsunashi, Naoki Oiso, Kazuyoshi Fukai, Yasuki Mori, Atsushi Utani, Yasushi Tomita, Yasuyuki Fujita, Tamio Suzuki.

Mutation analyses of patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria: Five novel mutations of the ADAR1 gene. *J Dermatol Sci* 58(3):218-220, 2010.

10. 河野通浩

【治療にてこずる皮膚疾患】 尋常性白斑被覆化粧品・医薬部外品
皮膚科の臨床 52(11): 1707-1713, 2010. (査読無)

11. 富田 靖

私の色素細胞と悪性黒色腫に関する研究
皮膚科の臨床 52: 1985-1994, 2010. (査読無)

12. Takayuki Konno, Yuko Abe, Masakazu Kawaguchi, Katrien Storm, Martine Biervliet, Winnie Courtens, Michihiro Kono, Yasushi Tomita, Tamio Suzuki.

Oculocutaneous albinism type IV: A boy of Moroccan descent with a novel mutation in SLC45A2. *Am J Med Genet A* 149A(8): 1773-1776, 2009. (査読有)

13. Ichidai Murata, Yutaka Hozumi, Masakazu Kawaguchi, Yoshiyuki Katagiri, Shinichiro Yasumoto, Yoshiaki Kubo, Wataru Fujimoto, Tatsuya Horikawa, Taisuke Kondo, Michihiro Kono, Yasushi Tomita, Tamio Suzuki.

Four novel mutations of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol Sci* 53(1): 76-77, 2009. (査読有)

14. Hai Zhen Song, Michihiro Kono, Yasushi Tomita.

Establishment of a screening system for chemicals that upregulate a melanoma antigen, Melan-A/MART-1. *Tohoku J Exp Med* 217(3): 231-237, 2009. (査読有)

15. 稲垣克彦、鈴木民夫、富田 靖

SLC45A2 (MATP) 遺伝子に新規変異を認めた眼皮膚白皮症 4 型
皮膚病診療 31 (3): 341-344, 2009. (査読無)

16. 近藤泰輔、鈴木民夫、河野通浩、中澤 満、富田 靖
遺伝子解析により診断された Hermansky-Pudlak 症候群の女兒例
皮膚病診療 31 (3): 333-336, 2009. (査読無)

17. 河野通浩、近藤泰輔、鈴木民夫、鈴木教之、富田 靖
遺伝性対側性色素異常症 病因遺伝子の変異部位は ADAR1 酵素の p150 アイソフォームの欠損を示す
皮膚病診療 31 (3): 309-312, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

1. Michihiro Kono, Taisuke Kondo, Yasushi Tomita, Masashi Akiyama

Two novel ADAR1 mutations in dyschromatosis symmetrica hereditaria suggest haploinsufficiency as pathomechanisms of the disease. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 9-11, 2011, Kyoto, Japan.

2. Michihiro Kono, Taisuke Kondo, Shiro Ito, Tamio Suzuki, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito, Yasushi Tomita

Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type; a case report on the analysis of genotype-phenotype correlation. XXIst International Pigment Cell Conference. September 21-24, 2011, Bordeaux, France.

3. Michihiro Kono, Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Mari Kaneda, Akihiko Shibaki, Amarillis Sanchez-Valle, Hirotaka Akita, Yasushi Tomita

Four novel ADAR1 mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria and a mutation in patient associated with encephalitis. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010 年 12 月 3 日 和歌山

4. Michihiro Kono, Taisuke Kondo, Tamio Suzuki, Mari Kaneda, Sakuhei Fujiwara, Akihiko Shibaki, Amarillis Sanchez-Valle, Hirotaka Akita, Joseph Lam, Yasushi Tomita

Five novel ADAR1 mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria and a known mutation in a patient developing her skin manifestation after viral encephalitis
第23回日本色素細胞学会 2010年11月27日 東京

5. 河野通浩、鈴木民夫、富田 靖
遺伝性対側性色素異常症の病因遺伝子 ADAR1 の分化段階の異なるマウスメラノサイトでの働きの検討
第22回日本色素細胞学会学術大会 2009年12月5日 福岡

6. Michihiro Kono, Tamio Suzuki, Yasushi Tomita
Knockdown of ADAR1 gene expression in cultured melanocytes by siRNA
第34回日本研究皮膚科学会 2009年12月4～6日 福岡

7. 河野通浩、鈴木民夫、富田 靖
遺伝性対側性色素異常症の病因遺伝子 ADAR1 の分化段階の異なるマウスメラノサイトでの働きの検討
第16回分子皮膚科学フォーラム 2009年11月20日 札幌

8. 小島知子、馬淵智生、梅澤慶紀、松山 孝、小澤 明、近藤泰輔、河野通浩、富田 靖、鈴木民夫
遺伝子解析から眼皮膚白皮症4型と考えられた1例
第108回日本皮膚科学会総会 2009年4月24-26日 福岡

〔図書〕(計3件)

1. 富田 靖
眼皮膚白皮症
和田 攻、南 裕子、小峰光博 総編集
看護大辞典第2版 医学書院 東京 2010

2. 富田 靖
メラニンと色素異常
美容皮膚科学 改訂2版
監修：日本美容皮膚科学会
編集：宮地良樹、松永佳世子、古川福実、宇津龍一
南山堂 22-30項 2009年

3. 河野通浩
「遺伝性対側性色素異常症(遠山)」
皮膚科診療カラーアトラス大系 第3巻(色調異常/水疱性疾患・膿疱症)
東京、講談社、2009年4月

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等なし。

6. 研究組織
(1) 研究代表者
(2009年度)
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

(2010-11年度)
澤田昌樹 (Masaki SAWADA)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80467315

(2) 研究分担者
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：60319324

松本高明 (Takaaki MATSUMOTO)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70508944

(2009年度)
澤田昌樹 (Masaki SAWADA)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80467315

(3) 連携研究者 なし