

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25年 6月 5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：21591460

研究課題名(和文) メラノサイトが表皮分布するモデルマウスによる遺伝性対側性色素異常症の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of DSH with the model mouse that melanocyte is distributed in epidermis

研究代表者

河野 通浩 (KONO MICHHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60319324

研究成果の概要(和文)：

(1) ADAR1 の p150 アイソフォーム特異的なノックアウトマウス (p150-Adar1-KO マウス) を作成し、ADAR1 p150 isoform +/- の表現型を検討した。

(2) SCF-トランスジェニック(Tg)マウスと p150-Adar1-KO マウスの交配を行い、メラノサイトが表皮に存在する SCF-Tg/p150-Adar1-KO マウスの作製を行った。そのヘテロマウスの表現型を検討した。

(3) 遺伝性対側性色素異常症の病因となる8個の新規 ADAR1 変異遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：

(1) ADAR1 p150 isoform specific knockout mice were constructed and the investigation of phenotype of the heterozygous mice was done.

(2) The SCF-transgenic (Tg) mouse and p150-Adar1-KO mouse were crossbred and the SCF-Tg/p150-Adar1-KO mouse that melanocyte was present in the epidermis was manufactured as a candidate of DSH model mouse. The phenotype of the mouse was examined.

(3) Eight novel mutations in *ADAR1* which caused in Dyschromatosis symmetrica hereditaria were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

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

より二重鎖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)。しかし、この遺伝子の異常がどのようにして、本症の特徴的な「手背および足背のみに小色素斑および小脱色素斑の混在する」像をとるのかは未だ不明である。原因遺伝子として同定された *ADAR1* 遺伝子は RNA 編集酵素の *ADAR1* をコードする。この酵素は、DNA から RNA への転写後プロセッシングの過程で、二重鎖 RNA においてアデノシン→イノシン変換 (A-I 変換) を生じる。イノシンは翻訳の過程ではグアノシンとして扱われるので、遺伝子情報に変化が起こる。この編集によって、蛋白のアミノ酸変化、オルタネイティブ・スプライシング、RNA の安定性の変化が生じるといわれている。現在までのところ、散発的に *ADAR1* によって編集を受ける基質遺伝子が報告されているだけで、どのような遺伝子群がどのような編集を受けるかの全容は明らかになっていない。

さて、臨床面では、我々は継続的にこの疾患の遺伝子診断を行っている。(Kono M et al. J Dermatol (in press), Kono M et al. Int J Dermatol (in press)) 本研究期間中も名古屋大学医学部附属病院を受診される、もしくは全国から依頼を受けた症例の遺伝子診断を引き続き施行する。

2. 研究の目的

本研究では発症病理を明らかにするために、DSH モデルマウスを確立することを目的とした。しかしながら、これまでの報告では *ADAR1* ノックアウトマウスは、null マウスにおいて胎児致死を起こし、ヘテロマウスにおいては明らかな皮疹はないとされていた (Wang et al, 2004. 西倉,2005)。

DSHの原因遺伝子 *ADAR1* には2つの isoform がある。Exon1 が A と B の2つあり、ひとつは恒常的に発現する exon1B を含んだ p110-*ADAR1*(short form-*ADAR1*、分子量 110KDa)であり、もうひとつはインターフェロン誘導性のプロモーターを持つ exon1A を含んだ p150-*ADAR1*(long form-*ADAR1*、分子量 150KDa)である。DSH 患者の遺伝子解析の結果、p150-*ADAR1* でのみコードされる部分の変異が報告されている (Suzuki et al. J Invest Dermatol, 2007)。つまり、DSH の病態形成には特に p150-*ADAR1* が関与していると考えられる。

今回は p150-*ADAR1* を特異的にノックアウ

トしたマウスを作成する。これにより p110 の働きは維持されるため、致死でなくなるはずである。

前述のように、p150-*ADAR1* はインターフェロン誘導性であるので、「いつ」「どのようにして」p150-*ADAR1* が発現され、「どんな基質に対して」RNA 編集を行うのかを明らかにすることが必要である。この p150 と p110 では表のような違いが明らかになっているが、詳細な機能の違いはまだ分かっていない。

ADAR1のisoform

	P150	p110
分子量	アミノ酸1226個	アミノ酸931個
発現組織	全組織	全組織
細胞内分布	細胞質 > 核	細胞質 << 核
発現パターン	IFN induced	Constitutive
誘導	Interferon	特になし
エクソン1	1A	1B or 1C

p150 特異的 *ADAR1* ノックアウトマウスにおいても、皮疹は一見明らかでないことが考えられる。それは以下の2つの条件が大きく作用しているのではないかと考えた。1つは、マウスのメラノサイトは毛嚢にしか存在せず、表皮にはないので、ヒトのように細かい「まだら」の皮疹を示すことができないのではないかということである。これを解決するために、メラノサイトが表皮基底層に存在するようになった SCF-トランスジェニック (Tg) マウスとの交配を行い、SCF-Tg/p150-*Adar1*-KO マウスの作製をはじめに行う。完成後、肉眼的な皮疹の確認と、これまでにヒトの DSH 患者で報告された病理組織学的所見がこのマウス皮膚で認められるかを確認することを目的とした。もう1つは p150 は IFN 誘導性であるため、発症のきっかけとなる IFN 誘導があると考えられる。これはウイルス感染による誘導が考えられるが、どの時期にどのくらいの期間誘導があると発症してくるのかを確認することを目的とした。この誘導のタイミングが分かれば、DSH 発症をコントロールすることができる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) p150-*Adar1*-KO 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^{+/-}) を作製する。p150-Adar1 遺伝子について null になった場合に、胎生致死にならず、生存できるかどうかを確認する。また、ヘテロ (Adar1^{+/-}) およびホモ (Adar1^{-/-}) での KO したマウスを臨床的、病理組織学的に皮疹を認めるかどうか確認する。

(2) DSH モデルマウスの作製

メラノサイトが表皮基底層に存在するようになる SCF-トランスジェニック(Tg)マウスと (1) の p150-Adar1-KO マウスの交配を行って SCF-Tg/p150-Adar1-KO マウスの作製を行う。これを DSH モデルマウスとして (3) の解析を行う。

(3) DSH モデルマウスの解析と病態開始時期の検討

DSH モデルマウスの、ヘテロ (Adar1^{+/-}) での KO したマウスを臨床的、病理組織学的に皮疹を認めるかどうか確認する。特徴が認められたら、それがどの時期から認められるかを検討する。胎生期から出生後にかけて、経時的に皮疹の有無を病理組織学的なものを含めて検討して皮疹の発症時期を決定する。また、皮疹の形成にウイルス感染が関連するかどうかを検討するため、薬剤の全身投与や実際にウイルス感染を行い、p150-ADAR1 を誘導させて皮疹の発症に影響を与えるか検討する。

(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. 研究成果の項の図は遺伝子診断を行った症例を示す。)

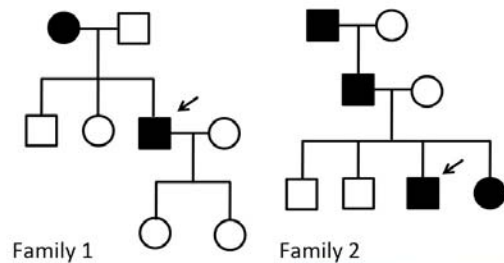
4. 研究成果

「DSH モデルマウス」については、まず p150-Adar1-KO マウスのヘテロマウスを完成させて、そのマウスの四肢を観察した。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。続いて、SCF-Tg マウスと p150-Adar1-KO マウスの交配を行って SCF-Tg/p150-Adar1-KO マウスの作製を行い、詳細に観察したが、野生型マウスとの差異は認められなかった。

現在、より詳細な検討をするため、経時的な病理組織学的な検討と p150-Adar1 誘導によって SCF-Tg/p150-Adar1-KO マウスに皮疹が発症するかを引き続き検討している。

「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。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 14 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, 2013. (査読有)

2. 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, 2013 (査読有)

3. 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. 166(4):896-8, 2012 (査読有)

4. 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. 39(9):819-21. 2012 (査読有)

5. 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. 65(5):e152-4. 2011 (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. 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)

10. 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)

11. 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)

12. 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)

13. 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)

14. 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 I 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 1 件)

1. 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)、182 ページ、東京、講談社、2009 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 通浩 (Michihiro KONO)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 6 0 3 1 9 3 2 4

(2) 研究分担者

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 : 8 0 4 6 7 3 1 5

(3) 連携研究者

なし