

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16210

研究課題名（和文）皮膚の時空間的再構築の理解

研究課題名（英文）Spatial-temporal dynamics of genetic remodelling of the skin

研究代表者

石田 雄大 (Ishida, Yoshihiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70890622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：乾癬やアトピー性皮膚炎といった慢性皮膚疾患が皮膚の変異の蓄積にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、乾癬では皮膚がんの遺伝子変異が若いうちから増えることが分かった。一方、アトピー性皮膚炎では、皮膚がんの遺伝子変異がほとんど見つからず、アトピー性皮膚炎では変異を有する細胞が排除されている可能性が示唆された。乾癬・アトピー性皮膚炎ともに疾患そのものは皮膚に変異を作る原因とはならないが、紫外線が原因の変異が多いことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、乾癬やアトピー性皮膚炎などの慢性皮膚疾患が遺伝子変異やクローン拡大にどのように影響するかを解明した。その結果、乾癬では皮膚がんリスクを高める遺伝子変異が多く見つかるとともに、アトピー性皮膚炎では変異が抑えられることが分かった。これにより、乾癬の早期治療が皮膚がん予防に有効である可能性が示唆された。また、皮膚疾患の治療法や予防策の開発に役立つ新たな知見が提供された。

研究成果の概要（英文）：We investigated how chronic skin inflammatory diseases such as psoriasis and atopic dermatitis affect the accumulation of mutations in the skin. The results showed that psoriasis is associated with an increase in the acquisition of driver mutations from a young age. On the other hand, few driver mutations were found in atopic dermatitis, suggesting that cells with driver mutations may be eliminated in this condition. While neither psoriasis nor atopic dermatitis itself generates mutations, many of the mutations are caused by ultraviolet light exposure.

研究分野：皮膚がん

キーワード：乾癬 アトピー性皮膚炎 皮膚がん 紫外線 加齢 遺伝子変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢と共に様々な臓器が体細胞変異を持つ細胞で置き換わっていくことが明らかになってきた。この現象は、正常組織における体細胞変異の蓄積が加齢の自然な過程であることを明らかにした。さらに、正常上皮にドライバー変異を持つクローンの拡大が観察されることから、正常組織におけるクローン選択が発がんの初期段階を反映している可能性が示唆されている。

しかし、皮膚における体細胞変異の全容については、まだ限られた知見しか得られていない。皮膚は、紫外線暴露や炎症性疾患など、多彩な環境因子に暴露されており、それらが体細胞変異の蓄積にどう影響するのか不明である。また、紫外線暴露や皮膚疾患の多くが皮膚がんリスクの上昇と関連しているが、がんになっていない皮膚で遺伝的再構築が起きているのかは不明である。

申請者の施設では、微量 DNA 解析や単細胞由来ケラチノサイト培養の技術を確立したため、微小表皮サンプルや単細胞由来ケラチノサイト培養の DNA 解析が可能となった。これらの技術を併用し、正常皮膚ケラチノサイトの体細胞変異の全容を解析することを通して、環境因子や加齢が表皮の遺伝的再構築に与える影響を解明し、正常組織に加齢とともに体細胞変異が蓄積し、発がんに至る軌跡を明らかにする。それらの知見をもとに、多細胞生物における加齢、発がんの理解を深めることを目指す。

2. 研究の目的

慢性炎症が皮膚の変異ランドスケープ・クローン拡大・選択に与える影響の解明

IL-17 の関与を特徴とする潰瘍性大腸炎では、結腸上皮に IL-17 不応性の変異クローンの拡大が報告されている。慢性炎症が長期に続くことを特徴とするアトピー性皮膚炎・乾癬において特有の選択・クローン拡大が起きている可能性が想定される。本研究は、慢性皮膚炎症性疾患の代表であるアトピー性皮膚炎、乾癬の表皮の変異を解析することをもって、慢性炎症が変異ランドスケープの決定、クローン拡大・選択への影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

単細胞由来コロニーの作成

技術的困難があるため単細胞由来コロニーの解析は断念し、後述するバルク解析に注力することとした。

微小バルクサンプルの作成

同意を得たドナーから得た皮膚生検や手術の余剰皮膚の表皮を分離し、実体顕微鏡下に観察する。0.25/0.5mm バイオプシーパンチナイフを用いて、顕微鏡下に微細サンプルを密に採取する。各微小バルクサンプルから QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, USA) を用いてゲノム DNA を精製する。

エクソームシーケンスと体細胞変異の解析

ゲノム DNA から xGen DNA Library Prep Kit EZ ないし cfDNA & FFPE DNA Library Prep Kit (Integrated DNA Technologies) でライブラリーを作成する。エクソームシーケンスに供するライブラリーは xGen Exome Hyb Panel v2, xGen Hybridization and Wash Kit (Integrated DNA Technologies) でエクソームキャプチャーを行う。

DNBSEQ-G400 (MGI) でシーケンスを行う。出力された FASTQ を東京大学医科学研究所のスーパーコンピューター SHIROKANE の Genomon2 (<https://github.com/Genomon-Project>) パイプラインで解析し、体細胞変異のリストを作成する。

変異蓄積速度の推定

単細胞コロニー由来の変異データを用い、年齢を固定効果、ドナーを変量効果とする、混合線形回帰分析で、加齢に伴う単位時間あたりに蓄積する変異の数を計算する。

変異シグネチャー解析

SigProfiler (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/tools/>), MutationalPatterns (<https://doi.org/10.18129/B9.bioc.MutationalPatterns>) を用いて変異シグネチャーを同定し、既存の COSMIC Mutational Signatures への割り付けを行う。

選択の解析

変異リストを疾患ごとに分け、dndscv (<https://github.com/im3sanger/dndscv>) で遺伝子毎の選択の有無を検討する。

4. 研究成果

変異負荷は紫外線によるものが大半である

変異シグネチャー解析では SBS1(加齢), SBS5(加齢), SBS7a/b(紫外線暴露)が検出された。疾患固有の変異シグネチャーは検出されなかった。

露光部正常皮膚では SBS7 が大半であったのに対し、非露光部正常皮膚では SBS7 はほとんど検出されず、SBS1/5 によるものが大半で変異負荷は低かった。興味深いことに、アトピー性皮膚炎・乾癬ともに非露光部のサンプルが大半であるのに SBS7 の比率が高かった。

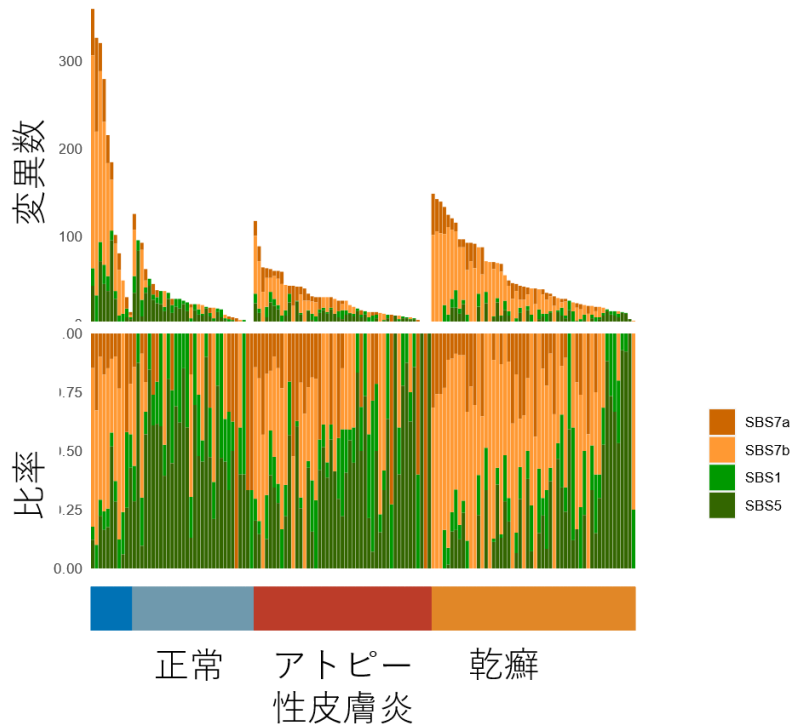


図1 疾患ごとの変異シグネチャー

アトピー性皮膚炎の皮膚では陰性選択がおきている

エクソーム全体の dN/dS 比はアトピー性皮膚炎で 1 未満だった。アトピー性皮膚炎のケラチノサイトでは変異を有するケラチノサイトが排除されている可能性が示唆された。

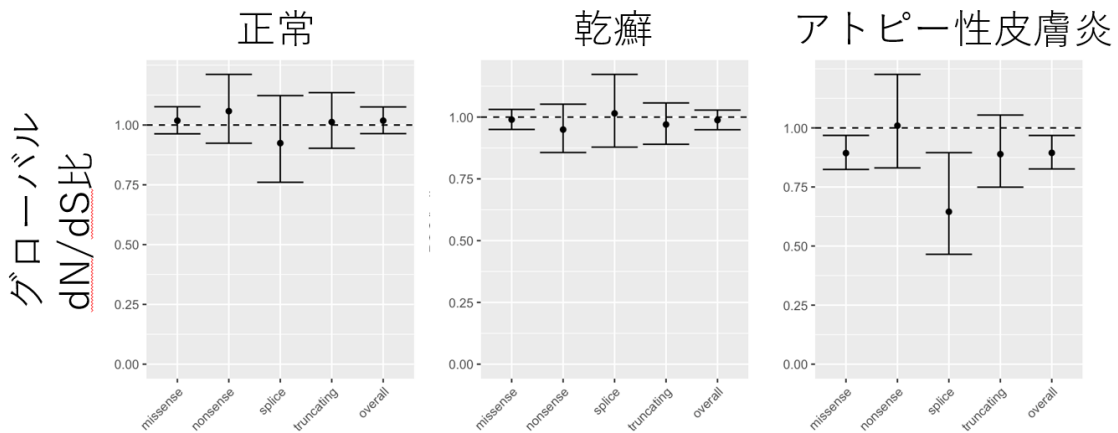


図2 疾患ごとの global dN/dS 比

乾癬ではドライバー負荷が高く、TP53 経路に変異を有するクローンが中年期から増える

dN/dS 解析では、正常皮膚で FAT1, NOTCH1, NOTCH2, TP53 の陽性選択が示された。乾癬ではそれに加え PPM1D の選択が検出

された。アトピー性皮膚炎で有意水準に達する遺伝子は検出されなかった。

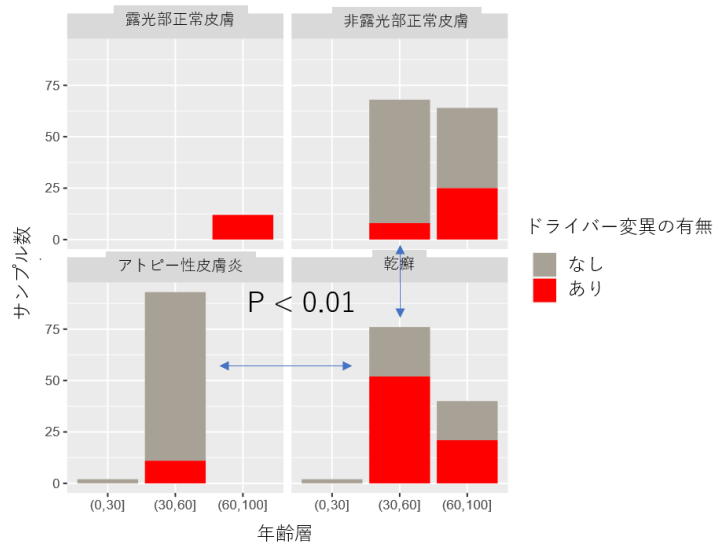


図3 ドライバー変異を有するサンプルの比率

疾患、年齢層でサンプルを分け、ドライバー変異を有するサンプルと有さないサンプルの比率を示す。P値は Fisher 検定によるものである。

乾癬では正常と比べ TP53, PPM1D 変異の頻度が高い。PPM1D は TP53 のネガティブレギュレーターである。したがって、TP53 経路の変異の頻度が高い。乾癬における皮膚がんリスクの上昇と関連があるものと推測される。

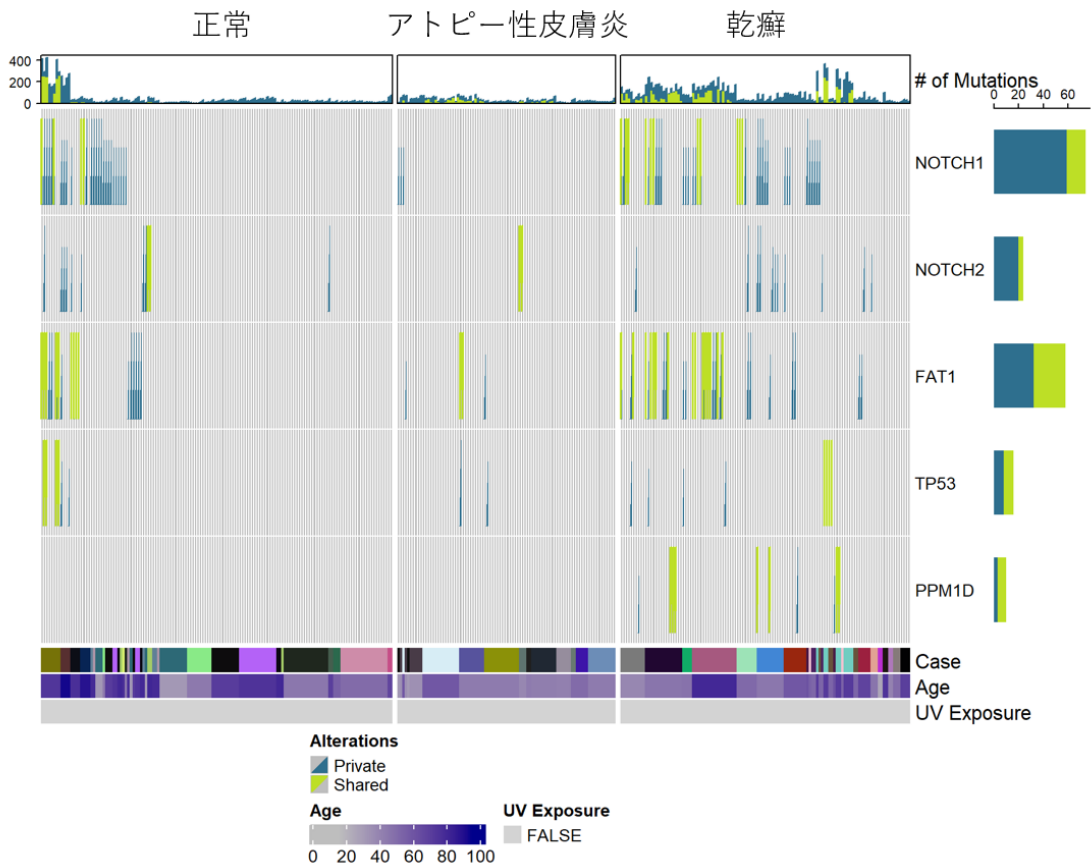


図4 疾患・正常表皮の変異ランドスケープ

各列にサンプル、各行に遺伝子を示す。

乾癬・アトピー性皮膚炎では大きなクローン拡大が起きる

皮膚生検サンプルから稠密にサンプリングし、クローン拡大の程度を推定した。アトピー性皮膚炎、乾癬ともに大きなクローン拡大が観測された。アトピー性皮膚炎ではドライバー変異のないクローン拡大が大半であり、アトピー性皮膚炎の炎症は選択を伴わないことが示された。一方、乾癬のクローン拡大はドライバー変異を伴っており、皮膚がんドライバーを選択するクローン拡大が促進されることが示唆された。

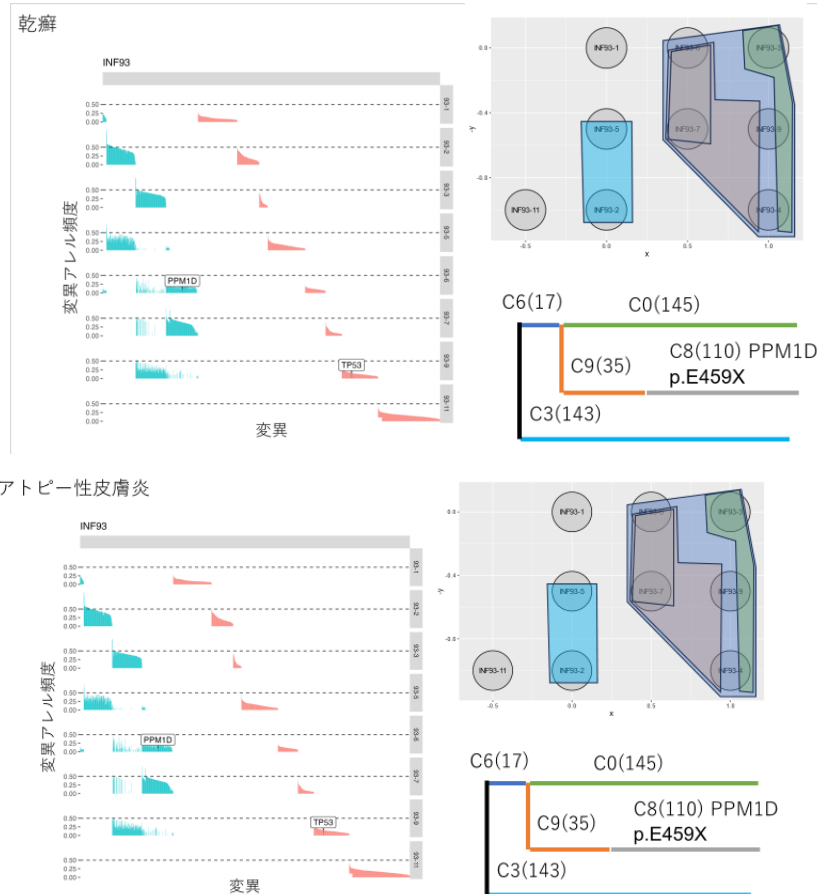


図5 乾癬・アトピー性皮膚炎でのクローン拡大

各疾患の代表的なドナーを示す。左に変異アレル頻度、右上にサンプル図、右下に系統樹を示す。

本研究で、正常皮膚、乾癬、アトピー性皮膚炎では選択、クローン拡大の様式が異なることが明らかになった。乾癬、アトピー性皮膚炎ともに疾患特有の遺伝子変異を持つクローンが選択されることはない。しかし、アトピー性皮膚炎ではドライバー変異がほとんど検出されないのに対し、乾癬では皮膚がんのドライバー変異の頻度が高かった。特に TP53 経路の変異の頻度が高いのは注目に値する。乾癬の早期治療を行うことで皮膚がんの予防ができる可能性が示唆された。一方、アトピー性皮膚炎では陰性選択が示され、Th2 炎症による変異クローンの排除が起きている可能性が示唆された。

変異シグネチャー解析により乾癬、アトピー性皮膚炎ともに疾患固有の変異プロセスは存在しないことが明らかになった。疾患そのもの、あるいは乾癬、アトピー性皮膚炎の治療薬に伴う変異プロセスが存在しないことは安心できる結果である。一方、乾癬、アトピー性皮膚炎ともに紫外線による変異シグネチャーの量が多いことが判明した。これは紫外線治療や患者の行動変容によるものか、あるいは病態そのものが紫外線由来の変異への感受性を高める可能性も考えられ、今後さらなる検討が期待される。

本研究は皮膚において環境暴露・疾患・加齢により異なる選択・変異の蓄積が起こることを明らかにした。疾患の治療や環境因子の予防策により皮膚がんの予防につながる可能性が想起される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fuji Hirotake, Yamada Yosuke, Yamamura Kentaro, Ishida Yoshihiro, Tsujimura Marina, Matsumoto Kazuhisa, Tanaka Satona, Date Hiroshi, Nishikawa Tadaaki, Yoshida Yukihiro, Kashima Junpei, Yatabe Yasushi, Ogawa Seishi, Marx Alexander, Ulbright Thomas M., Haga Hironori	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of vasculogenic mesenchymal tumor in the mediastinum: whole-exome sequencing reveals origin from pre-existing germ cell tumor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-023-03529-2	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 該当する
1. 著者名 Miyawaki Kayo, Komori Takaya, Ishida Yoshihiro, Sakaguchi Yuri, Honjo Hajime, Kudo Masatoshi, Otsuka Atsushi	4. 巻 102
2. 論文標題 Cronkhite-Canada Syndrome Mimicking COVID-19-related Symptoms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Dermato-Venereologica	6. 最初と最後の頁 adv00812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/actadv.v102.3402	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 該当する
1. 著者名 Yonekura Satoru, Komori Takaya, Ishida Yoshihiro, Kogame Toshiaki, Kabashima Kenji	4. 巻 158
2. 論文標題 Treatment With Topical Sirolimus for Recurrent Lymphatic Malformation of the External Urethral Meatus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAMA Dermatology	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamadermatol.2022.2793	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 該当する
1. 著者名 Nakashima Chisa, Doi Hiromi, Nakajima Saeko, Mashimo Tomoji, Oga Toru, Ishida-Yamamoto Akemi, Honda Tetsuya, Ishida Yoshihiro, Otsuka Atsushi, Kabashima Kenji	4. 巻 71
2. 論文標題 Filaggrin-deficient rats generated using zinc-finger nucleases spontaneously exhibit dry scaly skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 545 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.04.001	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 該当する

1. 著者名 Miyake Toshiya, Egawa Gyohei, Chow Zachary, Asahina Ryota, Otsuka Masayuki, Nakajima Saeko, Nomura Takashi, Shibuya Rintaro, Ishida Yoshihiro, Nakamizo Satoshi, Murata Teruasa, Kitoh Akihiko, Kabashima Kenji	4. 巻 77
2. 論文標題 Circadian rhythm affects the magnitude of contact hypersensitivity response in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2748 ~ 2759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15314	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshihiro Ishida
2. 発表標題 Clonal expansion of skin keratinocyte resolved at single-clone level
3. 学会等名 European Society for Dermatological Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023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
---------	---------