

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791252

研究課題名（和文） 遺伝性対側性色素異常症におけるリボ核酸編集障害とウイルス防御機構破綻の解析

研究課題名（英文） Investigation on failures of RNA editing and immune system against viral infection in dyschromatosis symmetrica hereditaria

研究代表者

林 昌浩 (HAYASHI MASAHIRO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30396569

研究成果の概要（和文）：遺伝性対側性色素異常症（DSH）の病態解明を目的として、①症例の集積、②メラノーマ培養細胞を使ってモデル細胞を作成し、ノックダウン細胞の 18 種類のウイルスに対する感受性の変化を調べた。その結果、①トルコ人症例を含む 43 例の患者試料を得て遺伝子診断した。②パラ・インフルエンザ 4B 型に対する感受性が野生型細胞に比べ、ノックダウン細胞において高くなった。このことは DSH の病態にウイルス感染が関与していることを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：I have investigated pathomechanisms of dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH). I have collected 43 samples of patients with DSH including a Turkish patient and genetically diagnosed them. The results have been reported. And I established the *ADARI*-knockdown melanoma cells, which are model cells for DSH. Then, using the knockdown cells I found some interesting data showing association between virus infection and DSH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、遺伝子変異、ウイルス感染、RNA 編集

## 1. 研究開始当初の背景

DNA から RNA への転写後プロセッシングの過程で、pre-mRNA におけるアデノシンからイノシンへの RNA editing (リボ

核酸編集) は、adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) という酵素によって触媒される。この A-to-I リボ核酸編集は特殊な現象ではなく、広く生物界に認

められ、特に高等真核細胞では核内の pre-mRNA の editing のうち最も広く見られる現象であることが判明してきている。現在、A-to-I リボ核酸編集の推定されている機能としては、①A から I (G) への変換による新しいコドン変化、②RNA スプライスサイト創設による新たな alternative splicing 部位の創設、③イントロン editing への影響、④3' 非翻訳領域の A-to-I リボ核酸編集による mRNA の安定性の変化などが報告されている。またさらに、⑤外来ウイルス防御機構としての RNA サイレンシングに深く関わっていることも報告されてきている。

ところで、我々は2003年に世界に先駆けて、遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の原因遺伝子が、*ADAR1* であることを positional cloning 法にて明らかにした。DSH は、四肢末端、特に手掌および足背に、粟粒大から米粒大の濃淡様々な色素斑と脱色素斑が密に混在する臨床像を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。生後、あるいは幼少時より四肢末端に症状が出現し、10歳ころまでに症状が完成する。DSH は、A-to-I RNA 編集機構障害によって発症することを示した最初の疾患である。その後、いろいろな試みにより DSH の病態解析が試みられたが、*ADAR1* 遺伝子変異と DSH の臨床症状の関係はほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

DSH の病態はいまだに不明であり、皮疹部ではメラノサイトが消失、壊死しており、皮疹がウイルス感染症の好発する手足に好発することから、我々は、*ADAR1* 変異メラノサイトが特定のウイルスに暴露されることにより、ウイルスを不活化できず壊死に陥る可能性を考えている。

私は本疾患の病態解明を最終目標とし、まずは、今後も国内はもとより世界中から症例を集積し遺伝子診断する臨床的アプローチと共に、培養細胞を使用して各種ウイルスの感受性の変化を明らかにするといった基礎研究的の2つの方法によりアプローチする。

## 3. 研究の方法

- (1) 臨床的アプローチとして、DSH の患者、遺伝子変異の集積を行い、遺伝子変異型と臨床症状の関連性を解析した。
- (2) 基礎研究的アプローチとして、培養メラノーマ細胞、メラノサイト等を用いて RNA 干渉を利用して恒常的に *ADAR1* をノックダウンした細胞を樹立した。これは培養細胞レベルの DSH 疾患モデルである。そして、この stable ノックダウン細胞に様々なウイルスを暴露させて、壊死の誘導が起こるかどうかなど細胞動態の変化を観察することにより、ウイルス感受性の変化を調べた。

## 4. 研究成果

- (1) 臨床的アプローチによる解析：症例を日本全国のみならず、海外からも集積した。その結果、トルコ人症例を含む43例の患者試料の集積を行い、うち31名に原因遺伝子である *ADAR1* 遺伝子に存在する病的変異を明らかにした。一方で、12名には変異を認めなかった。これらの症例の臨床症状はいずれも非典型例であり、本疾患の臨床診断の難しさを示唆するものと言える。また、遺伝子変異型と症状についての関連性について解析したところ、変異部位と臨床症状に明らかな相関関係は認められなかった。
- (2) 基礎的研究による解析：論文報告されている siRNA 配列ならびにタカラバイオ社のアルゴリズムによって予想される配列を用いて、一過性にもっとも効率よくノックダウンする配列を決定し、その配列を Si 発現

用ベクター (pBAsi-hU6 Neo, タカラバイオ社) に組み込んだプラスミドを作成した。そして、2種類の培養メラノーマ細胞 (MNT-1, MM96E) に導入し、ネオマイシン耐性遺伝子を指標として、複数のsiRNA安定発現メラノーマ細胞を樹立した。そして、まずはADARIの発現量がwild株に比べて約20%にノックダウンさせたMNT-1細胞を用いて下記各種

Virus	Subtype
Influenza virus	C
Parainfluenza virus	1
	2
	3
	4-A
	4-B
hMPV	
RS virus	
Munpus virus	
Coronavirus	
Measles virus	
Adenovirus	3
Enterovirus	Coxsackie virus B3
	Echo3
	CoxA16
	Entero71
Herpes simplex v	
Cytomegalovirus	

ウイルス (計18種類) に関する感受性を調べた。

その結果、少なくとも1種類以上のウイルスに対して、ノックダウン細胞においてコントロール細胞に比べ感受性が高くなる現象が認められた。つまり、ADARIを80%ノックアウトすることにより、ウイルスに対する抵抗性が減弱し、編成・壊死に陥りやすいことが明らかとなった。

現在、他の培養細胞による結果の再現性を確認すると共に、MNT-1細胞のADARIノックダウン率とウイルスに対する感受性の相関関係等について、その詳細を検討中である。今回の結果は、DSH発症に関する病態とウイルス感染の関係を強く示唆するもので

あり、大変興味深い。

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8件)

1. Hayashi M, Suzuki T. Dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol* 40: 336-343 (2013) 査読有 doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01661.x.
2. Hayashi M, Nakano H, Sawamura D, Suzuki T. Case of epidermolytic palmoplantar keratoderma with knuckle pads. *J Dermatol* 39:84-87 (2012) 査読有 doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01226.x.
3. Kawaguchi M, Hayashi M, Murata I, et al. Eleven novel mutations of the ADARI gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol Sci* 66:245-246 (2012) 査読有 doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.01.009.
4. Oiso N, Murata I, Hayashi M, et al. Dermoscopic features of dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol* 38: 91-93 (2011) 査読有 doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01110.x.
5. Hayashi M, Kawaguchi M, Hozumi Y, Nakano H, Sawamura D, Suzuki T: Dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa of elderly onset. *J Dermatol* 38: 173-178 (2011) 査読有 doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00953.x
6. Narita T, Oiso N, Hayashi M, et al. Two children with a mild or moderate piebaldism phenotype and a father with no leukoderma in a family with the same recurrent missense mutation in the kinase domain of KIT. *Euro J Dermatol* 21:446-447 (2011) 査読有 doi: 10.1684/ejd.2011.1350
7. Hayashi M, Suzuki T: A case of subcutaneous lobular capillary hemangioma. *J Dermatol* 38:1003-1006

- (2011) 査読有 doi:  
10.1111/j.1346-8138.2010.01163.x.
8. Yamada M, Hayashi M, Sakai K, et al.  
Oculocutaneous Albinism Type 3: a  
Japanese Girl With Novel Mutations in  
*TYRP1* gene. *J Dermatol Sci* 64:217-222  
(2011) 査読有 doi:  
10.1016/j.jdermsci.2011.09.005

[学会発表] (計3件)

- ① Hereditary hypo-pigmentary  
disorders: T. Suzuki, M. Hayashi,  
22nd World Congress of Dermatology  
(COEX Convention and Exhibition  
Center, Seoul, Korea) 2011, 5, 24-29
- ② A Case of epidermolytic  
palmoplantar keratoderma with  
knuckle pads: Hayashi M, Nakano H,  
Sawamura D, T. Suzuki, 22nd World  
Congress of Dermatology (COEX  
Convention and Exhibition Center,  
Seoul, Korea) 2011, 5, 24-29
- ③ Albinochip: a universal genetic  
diagnosis for all known mutations  
associated to albinism: E. Moltó, A.  
Fernández, C. Phillips, M. Torres,  
O. Maronas, B. Arveiler, F.  
Morice-Picard, A. Taïeb, R. Aquaron,  
V. Schiaffino, M. Hayashi, T. Suzuki,  
M. Martínez, M. J. Trujillo, C.  
Ayuso, Á. Carracedo, L. Montoliu,  
21st International Pigment Cell  
Conference (Palais des Congrès of  
Bordeaux, Bordeaux, France)  
2011, 9, 20-24

[その他]

ホームページ:

[http://minfo2.id.yamagata-u.ac.jp/  
hifuka/index.html](http://minfo2.id.yamagata-u.ac.jp/hifuka/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 昌浩 (HAYASHI MASAHIRO)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 30396569

(2) 研究協力者

穂積 豊 (HOZUMI YUTAKA)  
山形大学・医学部・技術専門員