

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659526

研究課題名(和文) 核酸分解酵素に着目した凍瘡状狼瘡の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis and development of novel therapy of chilblain lupus on the basis of an exonuclease enzyme

研究代表者

秋山 真志 (Akiyama, Masashi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60222551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：自験例の日本人凍瘡状狼瘡の患者のうち、常染色体優性遺伝型式が考えられる家族歴を持つ女性の患者がいた。この患者は1歳に発症し、一年中両手指と鼻部の潰瘍、手指の屈曲拘縮を呈している。この患者について、直接シーケンス法にて、TREX1とSAMHD1の遺伝子変異解析を実施した。その結果、TREX1 c.394C>G(p.Pro132Ala)という新規遺伝子変異を発見した。in vitro 3'末端一本鎖DNA分解実験にてこの変異はTREX1の機能低下をきたすことを明らかにした。このことより、本邦にもTREX1機能低下変異による、家族性凍瘡状狼瘡の患者がいることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A Japanese female patient of chilblain lupus followed by us has family history of chilblain lupus which is considered autosomal dominant trait. The onset of chilblain lupus of the patient was 1 year-old. She shows skin ulcers on the bilateral fingers and nose, and has contraction of finger joints. Direct sequencing of all coding exons and exon-intron boundaries of TREX1 and SAMHD1 was conducted. The patient had a novel heterozygous missense TREX1 c.394C>G (p.Pro132Ala) mutation. in vitro 3 prime single stranded DNA exonuclease assay revealed that TREX1 p.Pro132Ala had dysfunction of enzyme activity. Taken together, we found familial chilblain lupus due to TREX1 dysfunction in Japan for the first time.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：家族性凍瘡状狼瘡 凍瘡状狼瘡 核酸分解酵素 TREX1 遺伝子変異解析 DNA切断実験

## 1. 研究開始当初の背景

凍瘡状狼瘡 (chilblain lupus: CL) とは、円板状ループスエリテマトーデスの1亜型である。指趾・足外縁、耳朵等に、冬期に増悪する高度の角化性紅斑で、中央が陥凹して厚い鱗屑を有し、ときに潰瘍化する。女性が罹患しやすい。全身性エリテマトーデス (SLE) の一皮膚病変として発症することもあるが、時に、SLE がなくても発症する。患者は病変部の疼痛を訴える。治療は対症療法としてカルシウム拮抗薬、抗凝固薬、ステロイドの内服等を行う。完治はせず、断続的慢性的に経過し、重症例は壊疽をきたすことがある。成人発症であるが、幼少時に凍瘡をきたしやすい等の既往がある患者が散見される。病因は家族性の一部以外は不明であった。

家族性凍瘡状狼瘡 (familial chilblain lupus: FCL) は 2006 年に提唱された疾患である。常染色体優性遺伝性疾患 (ヘテロ接合体変異の疾患) である。CL と類似の症状を来す。2007 年と 2011 年に病因遺伝子として、*TREX1* と *SAMHD1* がそれぞれ同定された (Rice G. et. al. Am. J. Hum. Genet. 2007;80:811-815, Ravenscroft J.C. et. al. Am J Med Genet Part A 2011;155:235-237)。*TREX1* は一本鎖 DNA 3' 分解酵素である Three prime exonuclease 1 (*TREX1*) をコードしている。研究開始当初は、*TREX1* の遺伝子変異による本症は 2 家系、*SAMHD1* の遺伝子変異による本症は 1 家系の報告がある。アジアにおいて本症の報告はない。

研究開始当初は、通常の CL において、*TREX1* と *SAMHD1* それぞれの変異が病因に関与しているかどうかについては明らかにされていなかった。

*TREX1* や *SAMHD1* のホモ接合体変異、あるいは複合ヘテロ接合体変異により Aicardi-Goutieres 症候群という小児中枢神経変性疾患を発症する。さらに、SLE 患者の 2% は *TREX1* ヘテロ変異を有しており、*TREX1* は SLE の疾患感受性遺伝子でもある。このような現状を踏まえて当初、申請者は本研究を着想するに到った。

当初、CL の研究は国内外でほとんど行われておらず、分子レベルにおいて、どうして CL が発症するかということについては、全くといっていいほど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

以下 2 つを目的とした。

(1) 本邦における FCL 患者の *TREX1* と *SAMHD1* の遺伝子変異解析をし、日本人 FCL 病因遺伝子変異を明らかにすること。

(2) 家族性でない、一般の CL において、*TREX1* と *SAMHD1* の遺伝子変異を病因として有する患者が存在するのか、存在する場合、CL 患者の何% が *TREX1* と *SAMHD1* の遺伝子変異を有するのかを検討すること。

## 3. 研究の方法

### (1). FCL と CL における *TREX1* と *SAMHD1* の変異解析

変異解析開始前に、本研究は名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得た。

#### DNA の採取

書類による、インフォームドコンセントの後、FCL 患者の末梢血液 (10~20mL) から DNA を採取した。採取困難の場合、粘膜擦過細胞から DNA を採取した。対照者としては、すでに皮膚科研究室に保管されている日本人健康者 100 人の白血球 DNA を用いた。

#### *TREX1* と *SAMHD1* の PCR による増幅

2 つの遺伝子のエクソイントロン境界を含むエクソン領域を PCR 法にて増幅した。

#### 伝子変異解析

増幅した遺伝子について、DNA 直接シーケンス、制限酵素消化法、heteroduplex 法等にて変異解析をした。

#### 遺伝子多型か否かの確認

新規遺伝子変異が見つかった場合、その変異が遺伝子多型であるか否かを確認するために健康人 100 人において新規遺伝子変異が見つかるか否かを の実験をして検討した。

### (2) 変異 *TREX1* の一本鎖 DNA 分解機能の解析

*TREX1* は一本鎖 DNA 3' 分解酵素である。以下の順で in vitro 一本鎖 DNA 3' 分解実験を施行した。*TREX1* c.394C>G (p.Pro132Ala) が見つかったのでこの変異を例に説明する。

#### *TREX1* と変異 *TREX1* のプラスミドの作成

HeLa cDNA ライブラリーから *TREX1*-cDNA をクローニングして、Halo-tag を N 末端付加したプラスミドに組み替えをした。p.Asp18Asn (既報の FCL の患者で見つかった DNA 分解障害を引き起こす変異) と p.Pro132Ala (新規に見つかった変異) に相当するミスセンス変異を引き起こす 1 塩基変異を作成した。シーケンスを確認した。

#### リコンビナント蛋白質の作成

ウサギ網状細胞抽出液、無細胞系転写翻訳系を用いて、Halo-*TREX1*、Halo-*TREX1*(p.Asp18Asn)

、Halo-*TREX1*(p.Pro132Ala)、Halo タンパク質を作成した。この無細胞系ではリジンにビオチンが付加されるので上記 4 つの全ての合成蛋白質にビオチンが付加される。抗 Halo 抗体を一次抗体に用いたウエスタンブロットにて、タンパク質が合成されたことと、タンパク質量を揃えた。アビジンが塗布されている 96 穴の ELISA プレートに Halo-*TREX1*、Halo-*TREX1*(p.Asp18Asn)、Halo-*TREX1*(p.Pro132Ala)、Halo を同量含んだ溶液を加える。アビジンビオチン結合で 4 つの蛋白質はプレート上に結合する。したがって、プレート上で蛋白質の精製をした。

#### 一本鎖 DNA の作成

5' に蛍光色素 FITC を付加した 30 塩基の一本鎖 DNA を作成した。DNA の配列は 5-ATACGACGGTGACAGTGGTTGTCAGACAGGT-3 とした。

in vitro 一本鎖 DNA 3' 分解実験  
上記一本鎖 DNA 25nM を一本鎖 DNA 分解バッファ中で 96 穴上の Halo-TREX1、Halo-TREX1(p.Asp18Asn)、Halo-TREX1(p.Pro132Ala)、Halo タンパク質で in vitro 一本鎖 DNA 分解実験を施行した。20%尿素含有 SDS ゲルに電気泳動し、蛍光イメージ分析器にて一本鎖 DNA 分解を観察した。

(2) 非家族性 CL コホートにおける *TREX1* と *SAMHD1* の変異保有率の検討

(1)と同様の方法で非家族性 CL 患者における *TREX1* と *SAMHD1* 変異を検索し、保有率を検討した。非家族性 CL は 10 症例を収集し検討した。

#### 4. 研究成果

(1) FCL と CL における *TREX1* と *SAMHD1* の変異解析

FCL の日本人の患者 1 例で、*TREX1* と *SAMHD1* の遺伝子解析にて、*TREX1* c.394C>G (p.Pro132Ala)ヘテロ接合体変異という新規遺伝子変異を発見した。この変異は健常人 100 人では見つからなかった。さらに、*TREX1* の 132 番目のプロリンは哺乳類において種を越えて保存されているアミノ酸であることを確認した。

さらに CL の患者 10 例にても遺伝子変異解析を実施したが、*TREX1* と *SAMHD1* の変異は検出されなかった。

(2)変異 *TREX1* の一本鎖 DNA 分解機能の解析  
Halo-TREX1(p.Pro132Ala)によって作成したリコンビナントタンパク質は、Halo-TREX1(p.Asp18Asn)によって作成された機能変異コントロールであるリコンビナントタンパク質とくらべて軽度ではあったが、Halo-TREX1 によって作成されたりコンビナントタンパク質と比べ一本鎖 DNA 3' 分解機能が低下することを証明した。したがって、*TREX1* c.394C>G (p.Pro132Ala)は FCL を引き起こす病的変異であると結論付けた。

以上の結果から、本邦においても *TREX1* の遺伝子変異による FCL が存在することを明らかにした。さらに、今までの文献をレビューして、*TREX1* 変異のパターンと、SLE、Aicardi-Goutieres 症候群 FCL の患者の凍瘡状狼瘡の変異型臨床型相関について検討した。その結果、*TREX1* のヘテロ接合体ミスセンス変異では、*TREX1* の DNA 分解における重要なアミノ酸あるいはその近傍のアミノ酸の変異では、例外なく凍瘡状狼瘡を来すが、それ以外のヘテロ接合体ミスセンス変異では、凍瘡状狼瘡を来さないという事実を見出した。以上の成果について論文発表をした (Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ito Y, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Severe chilblain lupus is associated with heterozygous missense mutations of

catalytic amino acids or their adjacent mutations in the exonuclease domains of 3' exonuclease 1. J Invest Dermatol 2012;132:2855-7. )

#### 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 6 3 件)

1. Yasuda K, Sugiura K, Takeichi T, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Nuclear envelope localization of Ran-binding-protein 2 and Ran-GTPase-activating protein 1 in psoriatic epidermal keratinocytes. Exp Dermatol 2014;23:119-24. (査読有)
2. Shibata A, Ogawa Y, Sugiura K, Muro Y, Abe R, Suzuki T, Akiyama M. High survival rate of harlequin ichthyosis in Japan. J Am Acad Dermatol 2014;70:387-8.
3. Sugiura K, Shoda Y, Akiyama M. Generalized Pustular Psoriasis Triggered by Amoxicillin in Monozygotic Twins with Compound Heterozygous IL36RN Mutations: Comment on the Article by Navarini et al. J Invest Dermatol 2014;134:578-9. (査読有)
4. Tanahashi K, Sugiura K, Kono M, Takama H, Hamajima N, Akiyama M. Highly prevalent LIPH founder mutations causing autosomal recessive woolly hair/ hypotrichosis in Japan and the genotype/phenotype correlations. PLoS One 2014;9:e89261. (査読有)
5. Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T, Tsuda K, Nishida E, Togawa Y, Nakajima K, Sakakibara A, Kawachi S, Shimizu M, Ito Y, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Muro Y, Ishida-Yamamoto A, Sano S, Matsue H, Morita A, Mizutani H, Iizuka H, Muto M, Akiyama M. The Majority of Generalized Pustular Psoriasis without Psoriasis Vulgaris Is Caused by Deficiency of Interleukin-36 Receptor Antagonist. J Invest Dermatol 2013;133:2514-21. (査読有)
6. Sugiura K, Matsumoto T, Muro Y, Akiyama M. Unilaterally dominant eosinophilic fasciitis after influenza vaccination. J Am Acad Dermatol 2013;69:e269-270. (査読有)
7. Kobayashi T, Sugiura K, Takeichi T, Akiyama M. The novel CTSC homozygous nonsense mutation p.Lys106X in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome with all permanent teeth remaining at over 40 years of age. Br

- J Dermatol 2013;169:948-50. (査読有)
8. Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. What autoantibody tests should become widely available to help scleroderma diagnosis and management? *Arthritis Res Ther* 2013;15:116. (査読有)
  9. Kono M, Sugiura K, Sukanuma M, Hayashi M, Takama H, Suzuki T, Matsunaga K, Tomita Y, Akiyama M. Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. *Hum Mol Genet* 2013;22:3524-33. (査読有)
  10. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M. Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking the Elov11 gene responsible for very long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol* 2013;33:2787-96. (査読有)
  11. Sugiura K, Suga Y, Akiyama M. Very mild lamellar ichthyosis with compound heterozygous TGM1 mutations including the novel missense mutation p.Leu693Phe. *J Dermatol Sci* 2013;72:197-9. (査読有)
  12. Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, Kosho T, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci* 2013;72:193-5. (査読有)
  13. Igawa S, Kishibe M, Honma M, Murakami M, Mizuno Y, Suga Y, Seishima M, Ohguchi Y, Akiyama M. Hirose K, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Aberrant distribution patterns of corneodesmosomal components of tape-stripped corneocytes in atopic dermatitis and related skin conditions (ichthyosis vulgaris, Netherton syndrome and peeling skin syndrome type B). *J Dermatol Sci* 2013;72:54-60. (査読有)
  14. Takama H, Sugiura K, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Possible roles of barrier-to-autointegration factor 1 in regulation of keratinocyte differentiation and proliferation. *J Dermatol Sci* 2013;71:100-6. (査読有)
  15. Sugiura K, Teranishi M, Matsumoto Y, Akiyama M. Clouston syndrome with heterozygous GJB6 mutation p.Ala88Val and GJB2 variant p.Val271Ile revealing mild sensorineural hearing loss and photophobia. *JAMA Dermatol* 2013;149:1350-1. (査読有)
  16. Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ito Y, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Severe chilblain lupus is associated with heterozygous missense mutations of catalytic amino acids or their adjacent mutations in the exonuclease domains of 3' exonuclease 1. *J Invest Dermatol* 2012;132:2855-7. (査読有)
- 〔学会発表〕(計21件)
1. 秋山真志 表皮細胞の分化に対する脂肪滴の影響 第86回日本生化学大会 2013年9月11日 横浜市、パシフィコ横浜
  2. 杉浦一充、武市拓也、棚橋華奈、古庄知己、宇原久、奥山隆平、秋山真志. 地中海沿岸地域以外で認められた、CYP4F22遺伝子変異による葉状魚鱗癬. 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成25年度第1回総会 2013年7月19日 東京都千代田区、KKRホテル東京
  3. 秋山真志 新規レジストリーとコホート調査の現状と今後の予定、展望. 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成25年度第1回総会 2013年7月19日、東京都千代田区、KKRホテル東京
  4. 秋山真志 皮膚疾患とバリア機能障害：最近の動向 第112回日本皮膚科学会総会 2013年6月6日 横浜市、パシフィコ横浜
  5. 秋山真志 アトピー性皮膚炎の発症機序はどこまで解明されているか？ 第29回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 2013年4月7日 名古屋市、ナゴヤキャッスル
  6. 秋山真志 わかりやすい皮膚遺伝性疾患 遺伝性角化症とアトピー性皮膚炎 第111回日本皮膚科学会総会 2012年6月3日 京都市、京都国際会館
  7. 秋山真志 角化症診療のカットニング・エッジ 角化症の出生前診断 up-to-date 第111回日本皮膚科学会総会 2012年6月1日 京都市、京都国際会館
- 〔その他〕
- ホームページ等  
名古屋大学医学部皮膚科ホームページ  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
秋山真志 (AKIYAMA MASASHI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：60222551
  - (2)研究分担者なし
  - (3)連携研究者なし