

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461701

研究課題名(和文) SERPINB7の機能解析に基づく長島型掌蹠角化症の病態解明と治療薬開発

研究課題名(英文) The elucidation of the Nagashima-type palmoplantar keratosis caused by SERPINB7 protease inhibitor deficiency

研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA, Aiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40383731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：長島型掌蹠角化症(NPPK)は幼少時に発症する常染色体劣性遺伝を示す掌蹠角化症である。本研究ではNPPKの原因遺伝子として申請者の研究グループが同定したSERPINB7の皮膚における機能を明らかにし、NPPKの病態解明と治療薬の開発に向けた基盤形成を目指すことを目的とした。

SERPINB7遺伝子解読の結果、新規のミスセンス変異とフレームシフト変異を日本人家系より新たに同定し、それぞれの新規変異が病原性変異であることを明らかにした。NPPKが本邦に多くみられる理由は創始者効果によるものであることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Nagashima-type palmoplantar keratosis (NPPK) was an established autosomal recessive, early-onset palmoplantar keratoderma caused by mutations in the encoding SERPINB7 gene, a member of the serine protease inhibitor superfamily. To gain of more insight of NPPK, we promoted to create a knockout mouse model, selection of protease inhibited the activity of SERPINB7, and genome analysis of NPPK patients.

We identified novel missense mutations of SERPINB7 gene with NPPK. The mutated proteins formed aggregates and mislocalized within corneocytes, possibly resulting in loss of protease inhibitory activity at the proper location. We applied to the haplotype analysis to determine whether the pathogenic mutations were derived from a common ancestor or represented mutations in the genomic region of SERPINB7. In consequence, the founder effect of the mutation and other recurrent mutations might explain why NPPK was so common in the Japanese population but not in Western populations.

研究分野：医歯薬学・皮膚科学

キーワード：皮膚遺伝学 遺伝性角化症 ゲノムシーケンシング

1. 研究開始当初の背景

長島型掌蹠角化症 (NPPK) は幼少時に発症する常染色体劣性遺伝を示す掌蹠角化症で、紅みを伴う非進行性の境界明瞭な軽度の過角化、手背・手首内側・足背・アキレス腱部にまで皮疹が及び、多汗を伴うことが多い、という特徴を示す。欧米では報告されておらず、本邦に特徴的な疾患と考えられている。男女差や季節変動はなく、悪性腫瘍等の関連性はないとされ、緩やかな T 細胞の浸潤が病変部に認められることが報告されているが、原因遺伝子は不明であった。NPPK は特徴的な手足の角化性紅斑や、高率に掌蹠多汗症を伴うため悪臭を生じ、足白癬を合併するなど、患者の QOL に影響を及ぼしており、発症機序の解明、そして治療法の開発が望まれている。

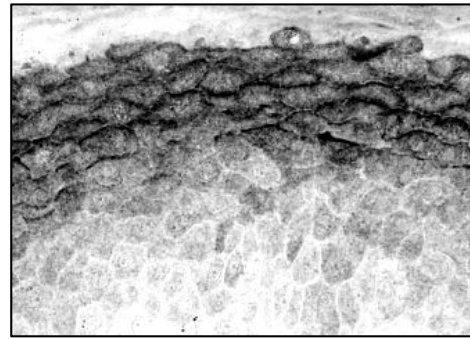
申請者らのグループは、血縁関係のない日本人 NPPK 患者に対して次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析法にて、共通した遺伝子変異としてセリンプロテアーゼインヒビターである *SERPINB7* の機能喪失型変異 (c.455-1G>A、c.218_219del2ins12、c.796C>T) を同定した。更に 10 人の NPPK 患者でも同じ変異を確認した (Kubo *et al.* *Am. J. Hum. Genet.* 2013)。ヒト 1000 人ゲノムプロジェクトデータの 1092 名に対して同定した *SERPINB7* 変異のアレル頻度分布を、解析したところ、c.796C>T は日本人および中国人集団にアレル頻度 2~3% (日本人集団 2/89 名: 2.2%、中国人集団: 6/197 名: 3%) に見つかる頻度の高い変異であった。一方でこの *SERPINB7* 変異はヨーロッパ系およびアフリカ系アメリカ人集団 806 名を解析した同ゲノムプロジェクトのデータからは同定されず、アジア地域で生じて集団に固定した変異であると考えられた。このことから NPPK が本邦に多くみられる理由は創始者効果によるものであり、日本に 1 万人以上、中国に数十万人の NPPK 患者が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では NPPK の原因遺伝子として同定した *SERPINB7* の皮膚における機能を明らかにし、NPPK の病態解明と治療薬の開発に向けた基盤形成を目指すことを目的とした。

これまでにヒト *SERPINB7* タンパクの発現を免疫組織化学染色法で検討した結果、*SERPINB7* タンパクは掌蹠の角質層および表皮顆粒層細胞質内のアピカル面に局在しており (図 1)、NPPK の患者の掌蹠ではシグナルが消失していた。このことから、掌蹠を含む *SERPINB7* を欠損した表皮を正常表皮と詳細に比較する事により、NPPK の詳細な病態が明らかになると考えられる。そこで、*SERPINB7* 欠損マウスの表皮状態を解析する。

SERPINB7 は表皮に発現するプロテアーゼに対するインヒビターであると考えられ、*in vitro* 実験でプラスミンのプロテアーゼ活性阻害能を有することも報告されていた (Miyata *et al.* *J Clin Invest.* 2002)。NPPK の病態の分子機構を解明するためには、



(図 1) 抗 *SERPINB7* 抗体による免疫組織染色像
表皮角層および顆粒層細胞質内アピカル面に局在している

SERPINB7 の標的プロテアーゼを同定する事が不可欠である。*SERPIN* タンパク群は標的プロテアーゼの基質となる反応中心ループ構造を外側に配置し、ループがプロテアーゼによる切断を受けると、プロテアーゼの活性中心と *SERPIN* タンパクの間で共有結合性の複合体が形成され単体状態よりも熱安定な構造をとり、プロテアーゼ活性が失活する。この機構を利用して、標的プロテアーゼと結合した *SERPINB7* タンパクを免疫沈降法により分離・精製を行い、標的プロテアーゼの同定を試みた。

SERPINB7 遺伝子のコーディング領域の変異が片アレルのみでしか同定されない NPPK 患者が複数存在するため、*SERPINB7* の非コーディング領域の変異および *SERPIN* ファミリーの他分子の変異を検索し、NPPK 発症機序解明の一助とすることを目指した。

3. 研究の方法

[1] *SERPINB7* 欠損マウスの表現型解析

本課題申請直後、申請者らは *SERPINB7* 遺伝子コンディショナルノックアウト ES 細胞のスクリーニングを終え、本研究課題開始までに *SERPINB7* 欠損マウスの作出を見込んだ。作出した *SERPINB7* 欠損マウスの表現型解析を行い、NPPK の症状との相違の有無について解析を計画した。これまでの解析からヒト *SERPINB7* タンパクは皮膚表皮の角質層と顆粒層の細胞質内において発現が認められることが明らかとなっており、これまで皮膚表皮の解析は主に組織切片を用いて行われているが、皮膚表皮上層の細胞は分厚さが約 5 μ m と非常に薄く、切片での解析には限界があることから、表皮と真皮を分離するディスペルゼ酵素を用い、表皮細胞のみからなるシート状に組織を単離し、ホールマウント状態にて組織を固定して実体顕微鏡下で観察した。

[2] *SERPINB7*-標的プロテアーゼ複合体の抽出と同定

マウス *SERPINB7* プロモーター領域制御下でマーカータンパク質を発現させるトランスジェニックマウスで、*SERPINB7* プロモーターは角化上皮細胞で発現制御を行う (Wang *et*

al. *Genesis*, 2012) ことが報告されていたため、ヒトと同様にマウスでも SERPINB7 タンパクが表皮に発現し、標的プロテアーゼと共有結合性の複合体を形成していると予想された。

そこで、C57BL/6 マウスの足底およびヘアレスマウス (Hos:HR-1) の全身表皮から総タンパク質を抽出し、抗 SERPINB7 抗体を用いた共免疫沈降法により共有結合もしくは相互作用するタンパク質を沈殿させることを試みた。また、同定したプロテアーゼがヒトでも SERPINB7 の標的プロテアーゼであるかを明らかにすることが必要であるが、ヒト皮膚を大量に採取することは容易ではないため、ヒト3次元培養表皮のシステムを用いた。

[3]プロテアーゼ活性阻害測定実験系構築

標的プロテアーゼ活性評価系を構築するために、プロテアーゼにより切断を受けると発色または蛍光を呈するペプチド基質反応システムを利用した。SERPINB7 タンパクはカイコを用いた大量組換えタンパク発現系を用いて獲得し、さらにタグを付加させることでタグ特異的交換カラムにより精製を行った。プロテアーゼと合成ペプチド基質を混合し、正常および変異型 SERPINB7 タンパク精製物による濃度依存的なプロテアーゼ活性阻害効果を測定した。

[4] 変異未同定 NPPK 患者の解析

これまでの SERPINB7 遺伝子解読の結果、コーディング領域に変異が片アレルに1種類のみしか同定されない NPPK 患者が複数存在した。もう一方のアレルにおける変異を同定するために、更なる NPPK 患者の収集とサンガー法によるシーケンシング解析に加え、NPPK 患者の SERPINB7 遺伝子ゲノム領域のハプロタイプ解析を行った。

さらにヘテロ接合であるが片アレルでの変異未同定患者を絞り込み、全 SERPIN タンパクグループに該当するヒトゲノム領域を解析するために、ターゲットリシーケンシングによる次世代シーケンシング法を実施するために適切なライブラリーの設計および調製を行った。

4. 研究成果

[1] SERPINB7 欠損マウスの表現型解析

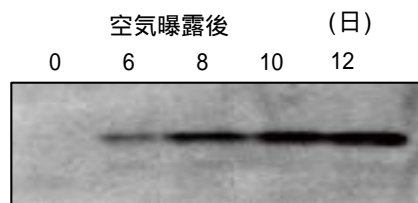
最初に SERPINB7 遺伝子の開始コドンを利用して LacZ 遺伝子と neo 遺伝子が発現されるように改変された遺伝子ノックアウトマウス (Miyata, *et al.*) の凍結胚を個体化した。マウス足底部分をパラフィン固定後薄切し、抗 SERPINB7 抗体を用いた免疫組織染色を行い、対照として野生型 B6N マウスと比較したところ、本マウスでは SERPINB7 タンパクの減失を認めることはできなかった。さらに申請時には ES 細胞を獲得していた遺伝子ノックアウトマウスの null 型個体の獲得ができず、計画の変更を余儀なくされた。

マウスの足底は非常に汗腺の数が少ないことが知られており、申請者らが検討したマ

ウスは遺伝的背景が B6N であり、野生型マウスと汗腺の数は変わらず、SERPINB7 欠損マウスを汗腺の発生に直接影響を与えないことがわかった。また、ヒトと同様の症状や形質を見出すためには、足底における汗腺の数が B6N マウスよりも多い、同じく近交系である FVB/N マウスと比較をし、ノックアウトマウスを FBV/N に戻し交配して、遺伝的背景を揃える必要があると結論した。

[2]SERPINB7-標的プロテアーゼ複合体の抽出と同定

ヒト皮膚を大量に採取することは容易ではないため、ヒト3次元培養表皮のシステムを用いた。この培養表皮は空気曝露により分化誘導でき、分化時に SERPINB7 タンパクが発現することを免疫組織染色及びタンパク抽出液のウェスタンブロット解析にて確認できた (図2)。



(図2)ヒト3次元培養表皮タンパク抽出液の抗 SERPINB7 抗体によるウェスタンブロット解析

次に、C57BL/6 マウスの足底およびヘアレスマウス (Hos:HR-1) の全身表皮から総タンパク質を抽出し、抗 SERPINB7 抗体を用いた共免疫沈降法により共有結合もしくは相互作用するタンパク質を沈殿させることを試みたが、可溶性画分へ SERPINB7 タンパクを溶出することが困難であったため、共免疫沈降法を実施することができなかった。

[3]プロテアーゼ活性阻害測定実験系構築

SERPINB7 タンパクが生体から直接可溶性タンパクを抽出する条件を検討し続けるのは過度の時間を要すると予想されたため、*in vitro*で SERPINB7 タンパクを可溶性発現することで、標的プロテアーゼの評価系を構築する方針に変更した。予備実験において大腸菌タンパク発現系では可溶化を促進するために GST-tag を付加した SERPINB7 タンパクでも不溶性だった知見が得られていたため、カイコを用いた大量組換えタンパク発現系を用いて、可溶性のある His タグ付加 SERPINB7 タンパクが獲得できたため、精製を行った。標的プロテアーゼにより切断を受けると発色または蛍光を呈するペプチド基質を合成するシステムを利用し、この SERPINB7 精製タンパクと合成ペプチド基質を用いて、正常および変異型 SERPINB7 タンパクによる濃度依存的なプロテアーゼ活性阻害効果を測定できた。

[4] 変異未同定 NPPK 患者の解析

これまでの SERPINB7 遺伝子解読の結果、コーディング領域に変異が片アレルに1種類

のみしか同定されない NPPK 患者が複数存在した。そこで、もう一方のアレルにおける変異を同定するために、まずは *SERPINB7* 遺伝子領域のみをサンガー法にてシーケンシング解析を行い、複数の非血縁関係にある NPPK 患者から新規のミスセンス変異 (c.382C>T, c.830C>T) とフレームシフト変異 (c.635delG) を新たに同定した。これらの変異が病原性変異であることを明らかにするために、これらの変異と既知変異がコンパウンドヘテロ接合で有する患者皮膚組織切片を抗 *SERPINB7* 抗体による免疫組織化学染色法を行い、正常型の *SERPINB7* タンパクの局在とは異なり、表皮顆粒細胞内に変異タンパクが滞留もしくは消失していることを検出し、それぞれの新規変異が病原性変異であることを明らかにした。(Shiohama *et al.*, 2016, Nakajima K. *et al.* 2016, Katsuno M, *et al.* 2017)。特に c.830C>T については収集した 100 名を超える患者および保因者である家族について出身地を確認したところ、この変異を有する NPPK 患者は九州地方出身者に出現する頻度が高いことが判明した。

それでも未だ変異未同定のアレルをもつ患者が存在し、他の *SERPIN* タンパクにおける変異の可能性も考えられた。そこでヒト全 *SERPIN* ファミリー遺伝子のゲノム領域の解読を行うために、ゲノム上における *SERPIN* 型遺伝子群の情報を収集した。*SERPIN* 型遺伝子はゲノム上で 14 の領域に分かれ、複数の *SERPIN* 型遺伝子が連なるクラスター領域を形成していた。これらの領域は合計して約 3.5Mbp に及んでいたため、次世代シーケンシング解読に向けたターゲットリシーケンシング用のライブラリー調製を行った。

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. Adachi A, Komine M, Maekawa T, Murata S, Shiohama A, Kubo A, Ohtsuki M. Multiple Primary Acral Lentiginous Melanoma on the Feet Developing in Lesions of Nagashima-type Palmoplantar Keratoderma. *Acta Derm Venereol.* (accepted) (2017) 査読有
2. Katsuno M, SHIOHAMA A, Aoki S, Kitamura H, Sasaki T, Amagai M, Kubo A. "A novel nonsense mutation in *SERPINB7* and the treatment of foot odor in a patient with Nagashima-type palmoplantar keratosis" *J Dermatol.* (accepted) (2017) 査読有
3. Shiohama A, Sasaki T, Sato S, Sakabe JI, Ito T, Isoda H, Zenke Y, Nakano T, Maeda T, Ishiko A, Kabashima K, Tokura Y, Mitsuhashi Y, Amagai M, Kubo A. Identification and Characterization of a Recessive Missense Mutation

- p.P277L in *SERPINB7* in Nagashima-Type Palmoplantar Keratosis. *J Invest Dermatol.* 136(1):325-8. (2016) 査読有
4. Sakiyama T, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Kosaki K, Amagai M, Kubo A. Case of dominant dystrophic epidermolysis bullosa with amniotic band syndrome. *J Dermatol.* (accepted) (2016) 査読有
 5. Nakajima K, Ishiguro M, Shiohama A, Kubo A, Sano S. Novel frame-shift mutation in *SERPINB7* in a Japanese patient with Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J Dermatol.* (accepted) (2016) 査読有
 6. Kasai H, Sasaki T, Matsuzaki H, Yoshioka T, Nagao K, Amagai M, Ishiko A, Kubo A. Case of non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa with COL17A1 mutation. *J Dermatol.* 42(3):323-5 (2015) 査読有
 7. Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SF, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld J, Link B, Senga T, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, and Heisenberg C, Furutani-Seiki M, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521(7551):217-21 (2015) 査読有
 8. Matsui T.*, and Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int. Immunol.* 27: 269-80 (2015). (*Corresponding author) 査読無
 9. Tanese K, Niizeki H, Seki A, Otsuka A, Kabashima K, Kosaki K, Kuwahara M, Miyakawa S, Miyasaka M, Matsuoka K, Okuyama T, Shiohama A, Sasaki T, Kudoh J, Amagai M, Ishiko A. Pathological characterization of pachydermia in pachydermoperiostosis. *J Dermatol.* 42(7):710-4. (2015) 査読有
 10. Sakabe J, Kabashima-Kubo R, Kubo A, Sasaki T, Tokura Y. A Japanese case of Mal de Meleda with SLURP1 mutation. *J Dermatol.* 41(8):764-5. (2014) 査読有
 11. Sasaki T, Furusyo N, Shiohama A, Takeuchi S, Nakahara T, Uchi H, Hirota T, Tamari M, Shimizu N, Ebihara T, Amagai M, Furue M, Hayashi J, Kudoh J. Filaggrin loss-of-function mutations are not a predisposing factor for atopic dermatitis in an Ishigaki Island under subtropical climate. *J Dermatol Sci.* 76(1):10-5. (2014) 査読有
 12. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Kosaki K, Ogo A, Yamada T, Miyasaka M, Matsuoka K,

- Hirakiyama A, Okuyama T, Matsuda M, Nakabayashi K, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The complete type of pachydermoperiostosis: A novel nonsense mutation p.E141* of the SLC02A1 gene. *J Dermatol Sci.* 75(3):193-5. (2014)査読有
13. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. *Br J Dermatol.* 170(5):1187-9 (2014)査読有
14. Kubo A. Nagashima-type palmoplantar keratosis: a common Asian type caused by SERPINB7 protease inhibitor deficiency. *J Invest Dermatol.* 134(8):2076-9 (2014). 査読無
15. 仁木真理子, 広瀬憲志, 塩濱愛子, 久保亮治. 長島型掌蹠角化症 遺伝子解析も含めて. *皮膚病診療:Vol.36 (No.8);* p.749. (2014)査読無
16. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 天谷雅行: 皮膚バリア異常を示す自然発症皮膚炎マウスモデル. *Jpn. J. Clin. Immunol.,* 37(3)160-5 (2014)査読無
17. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 134(4):824-30. (2014)査読有
- [学会発表](計4件)
1. 久保亮治, 塩濱愛子, 佐々木貴史, 天谷雅行 長島型掌蹠角化症の遺伝子変異解析、第115回日本皮膚科学会総会、2016/06/03、国立京都国際会館(京都市)
2. 久保亮治, 塩濱愛子, 佐々木貴史, 坂部純一, 伊藤泰介, 磯田英華, 善家由香理, 中野敏明, 前田龍郎, 清島真理子, 石河晃, 梶島健治, 戸倉新樹, 天谷雅行 長島型掌蹠角化症: SERPINB7 新規ミスセンス変異 p.P277L の解析、第373回日本皮膚科学会岩手地方会学術大会: 赤坂俊英教授退任記念学会、2016/02/06、マリオス盛岡市民文化ホール(岩手県盛岡市)
3. 久保亮治, 塩濱愛子, 佐々木貴史, 中林一彦, 奥山虎之, 小崎健次郎, 工藤純,

秦健一郎, 梅澤明弘, 戸倉新樹, 石河晃, 新関寛徳, 梶島健治, 三橋善比古, 天谷雅行 長島型掌蹠角化症の原因遺伝子 SERPINB7 の同定と患者30例の変異解析、第113回日本皮膚科学会総会 2014/05/30、国立京都国際会館(京都市)

4. A Kubo, A Shiohama, T Sasaki, K Nakabayashi, J Kudoh, K Hata, A Umezawa, Y Tokura, A Ishiko, H Niizeki, K Kabashima, Y Mitsunashi and M Amagai. Mutations in *SERPINB7*, encoding a serine protease inhibitor, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 73rd Annual Meeting, 2014/05/07-10. Albuquerque, New Mexico, U.S.A.

[図書](計0件)

[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

慶應義塾大学病院 医療・健康情報サイト KOMPAS、長島型掌蹠角化症-疾患の発見から原因遺伝子の解明へ- 久保亮治

http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201406.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA, Aiko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 40383731

(2) 研究分担者

佐々木 貴史 (SASAKI, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 70306843

久保 亮治 (KUBO, Akiharu)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 70335256

(3) 連携研究者

松井 毅 (MATSUI, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・

統合生命医化学研究センター・

副チームリーダー

研究者番号: 10452442

(4) 研究協力者

なし