74　遺伝性角化症における体細胞復帰変異発生機序の解明	秋山　真志

【目的】我々は、体細胞復帰変異によるモザイク（RSM）を高率に生じる細胞モデル、マウスモデルの作製のために必要な情報を集積するため、実際の患者において起こっている体細胞復帰変異を来すメカニズムを、ゲノムレベルで詳細に解析する必要があると考えた。本研究では、RSM を生じる機序の解明を目的として、RSM を生じていると考えられる症例を収集し、それらの症例において、体細胞復帰変異による健常部皮膚の表皮細胞を対象として、詳細なゲノム解析を行った。

【方法】まず、解析対象となる体細胞復帰変異を有する魚鱗癬症例を収集した。本研究では、これまでに文献上、体細胞復帰変異による健常皮膚斑を有することが報告されている ichthyosis with confetti（IWC）症例についても検索した。患者末梢血中の細胞からゲノム DNA を抽出し、ケラチン遺伝子、*KRT1*、*KRT10* の全コード領域とエクソン―イントロン境界領域を、PCR にて増幅し、サンガー法にてシークエンシングを行なった。また、健常皮膚部での表皮細胞のゲノム DNA の解析も行った。健常皮膚部から皮膚生検を施行し、生検皮膚検体を EDTA 溶液に浸漬することで、表皮と真皮以下とに分け、表皮のみからゲノム DNA を抽出した。表皮から抽出したゲノム DNA を用いて、病因ケラチン遺伝子変異が RSM により消失していることを確認するために、*KRT1* について、サンガー法によるダイレクト・シークエンシングを施行した。さらに、RSM の生じた機序が体細胞での遺伝子組み替えであるか、否かを明らかにするため、*KRT1* の近傍における loss-of-heterozygosity（LOH）の存在を、CytoScan HD（Affymetrix）を用いた SNP array 検索にて解析した。さらに、健常部皮膚表皮細胞での体細胞遺伝子組み替えの範囲を厳密に特定するために、*KRT1* の近傍について、次世代シークエンサーを用いて、全ゲノム・シークエンシングを施行した。

【結果】体細胞復帰変異による健常皮膚斑を有する表皮融解性魚鱗癬、3 症例を集積した。各症例ともに、出生時から広汎に皮膚の潮紅と鱗屑を認め、水疱形成も認められた。症例によって、10 歳代から 30 歳代くらいから複数の健常に見える皮膚が生じて来ていたとのことであった。表皮融解性魚鱗癬の病因としては、*KRT1* に、ヘテロの挿入変異、c.1758_1759insT（p.Tyr587-Leufs*67）、*KRT1* の intron1 から intron5 に至る比較的大きな欠失変異（197 番目のアミノ酸から 375 番目のアミノ酸までの欠失）、ミスセンス変異、c.563A>G（p.Asn188Ser）を認めた。全例で健常部皮膚の表皮細胞では、体細胞復帰変異により病因遺伝子変異は失われていた。SNP array 検索、*KRT1* の近傍の全ゲノム解析の結果、2 症例では *KRT1* の近傍における LOH を認め、RSM を生じた機序は体細胞遺伝子組み換えと考えられた。残りの 1 例では、LOH は見られず、病因変異部の点変異による RSM と考えられた。

体細胞復帰変異によるモザイク症例（50 歳、男性）の臨床像



74. 遺伝性角化症における体細胞復帰変異発生機序の解明

秋山　真志

*名古屋大学 大学院医学系研究科 皮膚病態学分野

Key words：遺伝性角化症，復帰変異，モザイク，表皮融解性魚鱗癬，ichthyosis with confetti

緒　言

表皮融解性魚鱗癬には、年齢を重ねるにつれて、白い紙吹雪様に、比較的小さな健常皮膚斑が多発して来る特殊型 ichthyosis with confetti（IWC）がある。このような症例における散発する健常皮膚斑は、体細胞復帰突然変異によるモザイク現象（revertant somatic mosaicism：RSM）により、病因であるケラチン 1、あるいは、ケラチン 10 の遺伝子変異が消失し、健常細胞に復帰した表皮細胞により構成されていることが知られている［1］。IWC の病因分子、ケラチン 1、10 の変異は IWC 以外にも表皮融解性魚鱗癬の原因としても知られているが［2］、特定の性質をもつ変異のみが IWC を発症するようである［3］。組織学的な解析から、遺伝子変異により病的なペプチドが付加された異常ケラチンが、核内もしくは核周囲に異所性に集積し、その結果、未知の機序を介して相同組換えを生じる、という仮説が提唱されている［4，5］。

我々は、RSM を高率に生じる細胞モデル、マウスモデルの作製のために必要な情報を集積するため、実際の患者において起こっている現象を、徹底的に解析する必要があると考え、本研究では、RSM を生じていると考えられる症例を収集し、それらの症例についての解析を行った。

方法および結果

1. 体細胞復帰変異皮膚を有する魚鱗癬症例の集積

魚鱗癬患者における体細胞復帰変異を生じるメカニズムを解析するため、解析対象となる体細胞復帰変異を有する魚鱗癬症例を収集した。表皮融解性魚鱗癬自体が希少疾患であるが、IWC は、さらに、非常に稀な疾患である。本研究では、これまでに文献上、体細胞復帰変異による健常皮膚斑を有することが報告されている IWC 症例を検索し、3 症例を集積することが出来た。集積した 3 症例は、67 歳の女性［4］、68 歳の女性［5］、50 歳の男性であった。各症例ともに、出生時から広汎に皮膚の潮紅と鱗屑を認め、水疱形成も認められた。67 歳の女性患者では 30 歳くらいから、68 歳の女性患者では発生時期は不明、50 歳の男性患者では、10 代の後半から、複数の健常に見える皮膚が生じて来ていたとのことであった（図 1）。

2. 魚鱗癬症例における体細胞復帰変異による健常皮膚斑の表現型の解析

次に、今回集積した 3 症例について、それぞれの健常皮膚部分の臨床的表現型の検討を行った。その結果、3 例とも、典型的な表皮融解性魚鱗癬の症状として、ほぼ全身に紅皮症と鱗屑が見られ、その皮疹の中に、67 歳の女性例では、四肢を中心に径 15 mm までの大きさの白色調の健常に見える皮膚の斑が 1,000 個以上認められた。68 歳の女性例では、体幹と四肢に、径 10 mm までの白色調の鱗屑のない、健常に見える斑が、数百個認められた。50 歳の男性例では、白色調で過角化を示さない皮膚が、体幹の外側と四肢を中心に、体表面積の 4 割くらいを占めていた。健常に見える皮膚からの皮膚生検検体では、表皮融解性魚鱗癬に特徴的な表皮細胞の顆粒変性が認められなくなっていた。

*現在の所属：名古屋大学 大学院医学系研究科 皮膚科学分野

3. 体細胞復帰変異皮膚を有する魚鱗癬症例の病因遺伝子変異同定

今回集積した症例について、それぞれの病因分子、遺伝子変異について、集積時に既に、解析が終了していたものも含めてまとめた。以下の解析は、全て、患者から informed consent を取得した上で、名古屋大学医学部の倫理委員会の承認のもと、ヘルシンキ宣言に従い施行された。患者末梢血中の細胞からゲノム DNA を抽出し、ケラチン遺伝子、*KRT1*、*KRT10* の全コード領域とエクソンーイントロン境界領域を、PCR にて増幅し、サンガー法にてシークエンシングを行なった。その結果、67 歳の女性例では、*KRT1* に、ヘテロで挿入変異、c.1758_1759insT (p.Tyr587-Leufs*67) を認めた。68 歳の女性例では、*KRT1* の intron1 から intron5 に至る比較的大きな欠失変異がヘテロで認められた。この欠失の結果、蛋白レベルでは、ケラチン 1 の 1A ドメインの途中から 2A ドメイン C 末端まで（197 番目のアミノ酸から 375 番目のアミノ酸まで）の欠失を生じていた。50 歳の男性例では、*KRT1* に、ヘテロでミスセンス変異、c.563A > G（p.Asn188Ser）を認めた（図 2)。

4. 体細胞復帰変異部位での表皮細胞での病因遺伝子変異解析

体細胞復帰変異が実際にどのようなメカニズムで発生したのかを、解明するため、体細胞復帰変異による健常皮膚部での表皮細胞のゲノム DNA の解析を行った。今回集積した各症例について、集積時に既に、解析が終了していたものについての情報も含めてまとめた。

健常皮膚部から皮膚生検を施行し、生検皮膚検体を EDTA 溶液に浸漬することで、表皮と真皮以下とに分け、表皮のみからゲノム DNA を抽出した。表皮から抽出したゲノム DNA を用いて、病因ケラチン遺伝子変異が RSM により消失していることを確認するために、*KRT1* について、サンガー法によるダイレクト・シークエンシングを施行した。さらに、RSM の生じた機序が体細胞での遺伝子組み替えであるか、否かを明らかにするため、*KRT1* の近傍における loss-of-heterozygosity （LOH）の存在を、CytoScan HD （Affymetrix）を用いた SNP array 検索にて解析した。さらに、健常部皮膚表皮細胞での体細胞遺伝子組み替えの範囲を厳密に特定するために、*KRT1* の近傍について、次世代シークエンサーを用いて、全ゲノム・シークエンシングを施行した。

その結果、全症例において、健常部皮膚斑の表皮では、上記 3 で同定していた病因ケラチン変異が消失していることが確認できた。さらに、67 歳の女性例と 68 歳の女性例では、SNP 解析により、健常部皮膚斑の表皮細胞のゲノム DNA には、*KRT1* の近傍に LOH が存在することがわかり、健常部皮膚での病因ケラチン変異の喪失は、体細胞遺伝子組み替えよることが解明された。50 歳の男性例では、SNP 解析、および、全ゲノム解析にても、健常部の表皮細胞のゲノム DNA には、*KRT1* 近傍に LOH が認められず、健常部皮膚での病因ケラチン変異の喪失は、点変異による RSM であることが解明された。

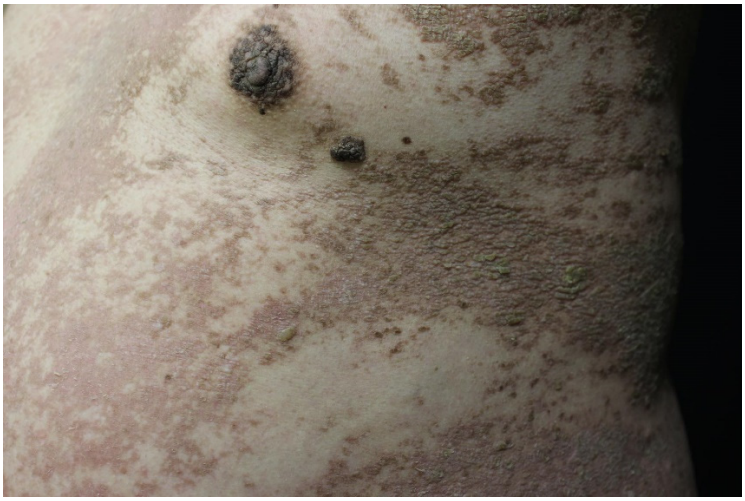


図 1. 体細胞復帰変異によるモザイク症例（50 歳、男性）の臨床像
過角化を示す魚鱗癬病変部と体細胞復帰変異による健常部皮膚の混在している。

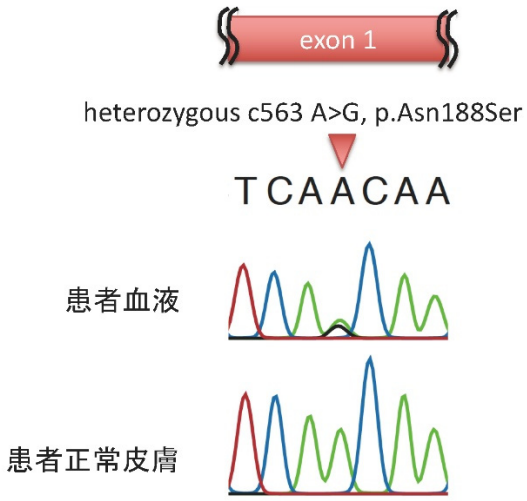


図 2. 体細胞復帰変異によるモザイク症例（50 歳、男性）の病因遺伝子変異
KRT1 のエクソン 1 に、ヘテロでミスセンス変異、c.563A>G（p.Asn188Ser）を認めた。

考　察

本研究の対象である魚鱗癬の一病型、IWC における RSM は、mitotic recombination の発生頻度を調節する未知のメカニズムが細胞内に存在することを示している［6, 7］。その存在意義は不明であるが、病的遺伝子存在下での個体の健全性を担保している可能性や、発癌に関わる可能性が想定される。

今回の我々の研究から、表皮融解性魚鱗癬患者に生じる健常部皮膚斑は、表皮細胞における病因ケラチン遺伝子変異の RSM による喪失によることが、確認された。さらに、それらの RSM を生じるメカニズムには、体細胞遺伝子組み替えによる場合と点変異による場合があることが明らかになった。我々は現在、IWC のモデル細胞系とモデル動物系の作製を行なっているが、今回の研究の結果から、IWC のモデル細胞系とモデル動物系の解析においては、RSM を生じるメカニズムとして、体細胞遺伝子組み替えによる場合と点変異による場合の両方を想定して、実験系を構築する必要があることが明らかになった。

我々は、引き続き、IWC において特異的に RSM が発生する分子的機序を明らかにする研究を行なって行くが。この研究では、CRPISPR-Cas9 技術を用いて、2 つのアレルの片方に Krt1-EGFP 融合遺伝子を、もう片方に IWC 病因遺伝子変異と monomeric RFP（mRFP）との融合遺伝子をノックインした不死化ヒト皮膚表皮細胞、および、IWC モデルマウスを作製する予定である。これらの系は、RSM 発生を容易に検知できる系であり、これらを用いて、RSM の発生を制御する薬物、手法の探索を計画している。

皮膚表皮細胞は、細胞医薬の臨床応用対象として、特別な有用性を持つ。すなわち、現在でも尋常性白斑に対して行われるように、病変表皮を切削して新たな表皮シートを移植することが可能であり、遺伝子治療で常に問題になる発癌リスクについても、皮膚においては移植部の観察と異常所見の早期検出が特に容易であり、また万一がん化した際の治療も容易かつ根治的である。本研究の延長線上にある今後行う研究によって、RSM が制御できるようになれば、治療応用は加速度的に進むことが期待される。RSM は時に自然発生的に遺伝性疾患の症状を改善するため、natural gene therapy とも呼称される。復帰突然変異を起こした体細胞は、患者本人の細胞であり、免疫的拒絶反応が認められない為、細胞医薬として、正に理想的である。将来的には、RSM の発生を人為的に制御し、既存の組織工学や iPS 技術と組み合わせる事で、これ迄にない利点を持った新しい細胞/組織医薬が実現する事が期待される。また、RSM の発生を調節するシステムの解明は、細胞生物学的にも、相同組換えの発生頻度を調節する未知の細胞内機構という全く新しい概念を提示する。この概念は複製、修復、組換え等の既存の学問領域を結び、新しい研究領域を創出する可能性を秘めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の清水宏教授、乃村俊史講師、鈴木翔多朗先生、ならびに、St. John's Institute of Dermatology、King's College London の John A. McGrath 教授である。

文　献

1） Choate KA, Lu Y, Zhou J, Choi M, Elias PM, Farhi A, Nelson-Williams C, Crumrine D, Williams ML, Nopper AJ, Bree A, Milstone LM, Lifton RP. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. Science. 2010 Oct 1;330(6000):94-7. doi: 10.1126/science.1192280. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20798280

2） Oji V, Tadini G, Akiyama M, Blanchet Bardon C, Bodemer C, Bourrat E, Coudiere P, DiGiovanna JJ, Elias P, Fischer J, Fleckman P, Gina M, Harper J, Hashimoto T, Hausser I, Hennies HC, Hohl D, Hovnanian A, Ishida-Yamamoto A, Jacyk WK, Leachman S, Leigh I, Mazereeuw-Hautier J, Milstone L, Morice-Picard F, Paller AS, Richard G, Schmuth M, Shimizu H, Sprecher E, Van Steensel M, Taïeb A, Toro JR, Vabres P, Vahlquist A, Williams M, Traupe H. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. J Am Acad Dermatol. 2010 Oct;63(4):607-41. doi: 10.1016/j.jaad.2009.11.020. Review. PMID: 20643494

3） Choate KA, Lu Y, Zhou J, Elias PM, Zaidi S, Paller AS, Farhi A, Nelson-Williams C, Crumrine D, Milstone LM, Lifton RP. Frequent somatic reversion of KRT1 mutations in ichthyosis with confetti. J Clin Invest. 2015 Apr;125(4):1703-7. doi: 10.1172/JCI64415. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25774499

4） Suzuki S, Nomura T, Miyauchi T, Takeda M, Nakamura H, Shinkuma S, Fujita Y, Akiyama M, Shimizu H. Revertant Mosaicism in Ichthyosis with Confetti Caused by a Frameshift Mutation in KRT1. J Invest Dermatol. 2016 Oct;136(10):2093-2095. doi: 10.1016/j.jid.2016.05.109. Epub 2016 Jun 7. No abstract available. PMID: 27283508

5） Takeichi T, Liu L, Abdul-Wahab A, McMillan JR, Stone KL, Akiyama M, Simpson MA, Parsons M, Mellerio JE, McGrath JA. Large Intragenic KRT1 Deletion Underlying Atypical Autosomal Dominant Keratinopathic Ichthyosis. J Invest Dermatol. 2016 Oct;136(10):2095-2098. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.016. Epub 2016 Jun 25. No abstract available. PMID: 27349861

6） Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Shinkuma S, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes. JCI Insight. 2018 Mar 22;3(6). pii: 97595. doi: 10.1172/jci.insight.97595. PMID: 29563344

7） Suzuki S, Nomura T, Miyauchi T, Takeda M, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Shimizu H. Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma. Life Sci Alliance. 2019 Feb 4;2(1). pii: e201800284. doi: 10.26508/lsa.201800284. Print 2019 Feb. PMID: 30718378