

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

河野 通浩

秋田大学大学院医学系研究科 皮膚科学・形成外科学講座

(令和2年10月21日掲載決定)

Research on skin hereditary diseases developed from daily medical practice

Michihiro Kono

Department of Dermatology and Plastic Surgery, Akita University Graduate School of Medicine

Key words: whole-exome sequencing, dyschromatosis symmetrica hereditaria, reticulate acropigmentation of Kitamura, five prime untranslated region, germline mosaicism

はじめに

遺伝子の異常による皮膚疾患、遺伝性皮膚疾患は、近年、次々と原因遺伝子が明らかになってきており、特にメンデル遺伝子形式をとる単一遺伝子疾患において著しい。皮膚科の教科書「あたらしい皮膚科学」に掲載されている遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子は、2005年の初版には113個、2011年の第2版には118個であったが、2018年の第3版には195個と、ここ7年間で倍増している。原因遺伝子の解明は「ヒトゲノム計画」の完了によって急速に進んだが、さらに加速したのは得られた全ゲノム配列の利用した解析法である次世代シーケンサーの開発と普及によるところが大きい。

そのなかで、筆者は遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子解明と病態解明、治療法開発を研究テーマとして、これまで研究を行ってきた。また、日常診療において、自らまた他の皮膚科医が遭遇する遺伝性皮膚疾患の確定診断のための遺伝子診断を日本国内はもとより世界中から依頼を受けて行ってきた。

この確定診断のための遺伝子診断により、診断のみではなく、その疾患の新たな病態を明らかにすることができることもある。私が実践してきた「日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究」について時代背景を含めて概説する。

ヒトゲノム計画と次世代シーケンサー

ヒトゲノム計画は1990年より開始された国際プロジェクトで、ヒトの標準的なゲノム配列を解読することを目標として米国を中心に3,000億円を投下、2003年にヒトゲノムの解読を完了した(図1)。これによってヒトの全ゲノムDNA配列が明らかになり、ヒトの遺伝子は2万個ほどあることが明らかになった。ヒトゲノム計画でも用いられたサンガー法は1,000塩基程度の特定領域をPCR法で増幅してから配列を解析するのに対して、次世代シーケンサーは超音波などでDNAを100~300 bp程の長さランダムに断片化して数億分子の単位で並列に配列を読み、それぞれの断片の配列をコンピューターで鋳型配列に当てはめて並び替え、全体の配列を決定している。その鋳型配列は「ヒトゲノム計画」によって決定されたものであり、ヒトゲノム計画完了間もない2007年に次世代シーケンサーが市場に投入された。これによりヒトの全ゲノム(30億塩基)あるいは遺伝子をコードする全領域(全エクソーム、5,000万塩基)を研究室のレベルで解析することができるようになった。それでも当初

Correspondence: Michihiro Kono
Department of Dermatology and Plastic Surgery, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel: 81-18-884-6153
Fax: 81-18-836-2618
E-mail: miro@med.akita-u.ac.jp

*令和2年2月12日 秋田医学会教授就任特別講演

(2)

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

ヒトゲノム計画 (Human genome project)

- 1990年より開始された国際プロジェクト
- 米国を中心に3000億円を投下、ヒトの標準的なゲノム配列を解読することが目標
- 2000年にヒトゲノム概要の解読完了

図1. ヒトゲノム計画

はかなり高価であったが、コスト低下も急速に進んできた。現在では全エクソーム解析が1検体あたり10万円以下で可能になっており、それにより遺伝性疾患の病態解明は著しく発展してきたといえるだろう(図2)。

全エクソーム解析は遺伝子をコードする領域、つまりエクソンの配列のみ解析する。この手法では解析する領域が全ゲノム配列の2%のみであるため、コスト的にメリットが大きく、遺伝性疾患の遺伝子診断において特に多用されている。実際に全エクソーム解析を行うと1人あたり53万個の遺伝子変異および多型が検出される。過去の遺伝子変異の確定においては、明らかになった変異が新規であった場合、自ら健康人に

おいてどのくらいの頻度でその変異がみられるのか調べなければならず、50人~100人ほど解析する必要があった。現在では、次世代シーケンサーによって10万人を超える健康人データに基づくSNPデータベースが整備されており、患者で見つかった変異が、病的な変異なのか多型なのかインターネット上ですぐに判断することができるようになっている。

過去には労働集約的であった遺伝子解析・遺伝子診断は、現在ではかなり効率化されてきた。しかし、SNPデータベース上は頻度が低いが過去に報告がなく病的意義が不明の変異については、とくにミスセンス変異については機能予測によりある程度検討が可能であるが、最終的には、それぞれの疾患の病態や遺伝子の機能に立ち戻って *in vitro* や *in vivo* の機能解析を行う必要があることには変わりはない。

2つの原因遺伝子同定~その1 次世代シーケンス以前~

これまで私は、遺伝性皮膚疾患の中でも、色素異常症を中心に研究を行ってきた。そのなかで、狭義の遺伝性色素異常症と定義される3疾患、遺伝性対側性色素異常症(遠山)(*dyschromatosis symmetrica hereditaria*; DSH)、網状肢端色素沈着症(北村)(*reticulate*

次世代シーケンス

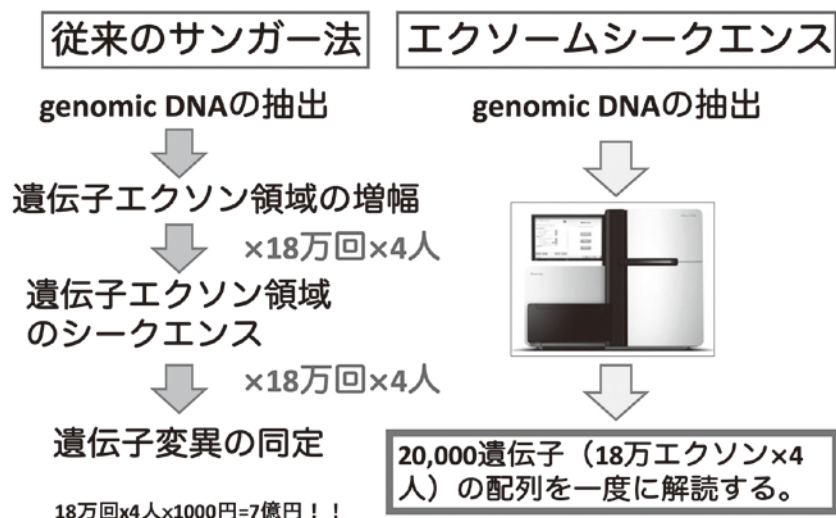


図2. 次世代シーケンス(全エクソームシーケンス)とサンガーシーケンスの比較

acropigmentation of Kitamura ; RAK), 遺伝性汎発性色素異常症(市川・平賀)(dyschromatosis universalis hereditaria ; DUH)のうち, 前者2疾患の原因遺伝子同定に携わることができた. DSHはゲノムプロジェクトの進行と並行して研究を進めたもので, 次世代シーケンス出現以前の手法を用いた研究, そして, RAKは次世代シーケンスが実用化された以降の研究であった. まずはDSHについて述べる.

DSHの原因遺伝子同定のプロジェクトは私の大学院生の時の研究テーマであった. 私が大学院に入学した当時(1995年)は前述したヒトゲノム計画がスタートしたばかりであった. 私は1994年に秋田大皮膚科に入局したが, 当時の皮膚科の教授は1993年秋に着任されたばかりの富田靖先生で私は最初の入局者のうちのひとりであった.

入局1年目のフレッシュマンであった私がシュライバーとして臨席していた富田教授の外来に, 当時原因不明で治療法もないDSHの患者さんが受診された.

教授の話をじっと聞いていたその患者さんは, 一通りの説明が終わったところで「この病気で小さい頃は本当にいやな思いをした. 何でも協力するから子供たちのために研究だけでも始めて欲しい」とおっしゃった. 患者さんのその言葉がプロジェクト開始のきっかけとなった.

DSHは1910年に遠山により最初に報告された疾患である^{1,2)}. 浸透率はほぼ100%の常染色体優性遺伝形式を示す疾患である. 日本をはじめとして, 中国・韓国などの東アジアに多い疾患であるが, インド³⁾やヨーロッパ⁴⁾, ヒスパニック⁵⁾などからも報告があり, 黄色人種特有のものではない⁶⁾. DSHの臨床症状は四肢末端, 特に手背および足背に, 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ものである(図3). ときに大腿・上腕まで広がることもあり, また, 顔面の雀卵斑様皮疹も特徴である⁷⁾. 皮疹は幼少時から出現し, 6歳くらいまでに70%が出現するといわれている⁸⁾. 皮疹部の隆起, 陥凹, 萎縮, 乾燥



図3. 遺伝性対側性色素異常症(遠山)の臨床像(文献7より引用, 一部改変)

(4)

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

はなく、掌蹠には皮疹はみられない。特異な合併症はないが、捻転ジストニア・精神発達遅延^{9,10)}の合併例の報告がある。現在でも有効な治療法はない。日焼けにより皮疹の濃淡がはっきりして目立ってしまうので遮光の指導を行う¹¹⁾。また、皮膚のパンチ生検による植皮術で治療を行った報告がある¹²⁾。

さて、DSHのプロジェクトは私が大学院に入学した年に秋田大に着任された宮村佳典先生(現日本ユニシス)と私のふたりで行うことになった。今から思うと、研究室の立ち上げと新しいプロジェクトと何も分からない大学院生の面倒とで、宮村先生も本当に毎日頭の痛いことだらけだったであろう。

当時、原因遺伝子の探索法として、メンデル遺伝形式を示す疾患であるが病態からは候補遺伝子を推測できない場合には、ポジショナルクローニングという方法が行われていた。まずは連鎖解析である。その疾患の大家系の皆さんの協力を得て、患者さんとそのご家族からできるだけ多くゲノムDNAを収集し、ひとりひ

とりの染色体上の目印(当時はマイクロサテライトマーカー)と家系内での病気の遺伝の流れを比較することで、統計的に染色体上の原因遺伝子の位置、つまり遺伝子座位を計算するものである。連鎖解析により遺伝子座位を絞り込んだところで、さらに領域を絞り込むため、その領域に同定されているマイクロサテライトマーカーを用いてハプロタイプ解析を行う。できるだけ多くのマーカーを用いて候補領域を絞り込んだところで、その領域にある遺伝子を候補遺伝子として、サンガーシーケンスにより患者のみに遺伝子変異を認める遺伝子を見つけ出し、それを原因遺伝子とする、という手順である。

この手法で遺伝子を明らかにするには大家系が必要であり、DSHのプロジェクトでは3家系の88人で連鎖解析を行った¹³⁾(図4)。最終的には100人以上のDSH患者さんとそのご家族の診察と採血を宮村先生と私のふたりで全国を飛び回って行った。プロジェクトの途中で名古屋大学皮膚科に移ったが、そのまま研

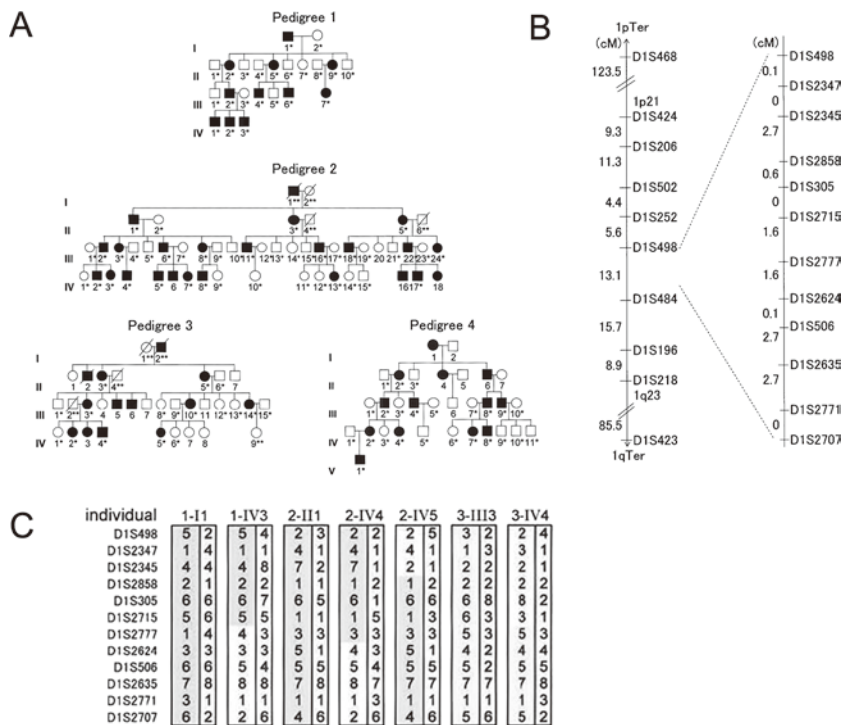


図4. 遺伝性対側性色素異常症(遠山)のポジショナルクローニング(A)患者家系図。(B-C) Pedigree1~3の88人で連鎖解析を行い、D1S502~D1S484までの間に原因遺伝子の座位があることが明らかになり(B)、さらにハプロタイプ解析でD1S2715とD1S2777の間に座位を絞り込んだ(C)。この領域は500 kbpであった。(文献14より引用、一部改変)

究を続けた。連鎖解析、そしてハプロタイプ解析を進めて絞り込んだ500 kbpの領域にある7つの候補遺伝子を見つけたところで、ライバルの出現があり、鈴木民夫准教授（現山形大学皮膚科教授）の研究グループの協力を得て、その7つの遺伝子を一気にサンガーシーケンス（当時大学院生であった鈴木教之先生、稲垣克彦先生、伊藤史朗先生が交代で24時間廻し続けたと聞いている）して、最終的にADARIが原因遺伝子であることが明らかになった¹⁴⁾。本研究は原因遺伝子同定までに8年かかった。

DSHの原因遺伝子であるADARIはadenosine deaminase acting on RNA 1, ADAR1をコードしている。ADAR1はRNA編集酵素の1つで、DNAからRNAへの転写後プロセッシングの過程で、二重鎖RNAもしくはRNAの一部が二重鎖となった部分のアデニン(A)を脱アミノ化することにより、イノシン(I)に変換（編集）する酵素である¹⁵⁾。アデニンからイノシンに変換（A-I editing）され、イノシンは翻訳の過程であたかもグアニンのように振る舞うため、編集がメッセンジャーRNA (mRNA)のコード領域で起こるとアミノ酸置換が生じる。また、スプライシング部位で編集が起こると、通常とは異なるスプライシングが生じる。ADAR1の酵素反応により前述したようなRNA配列が変化して、DNAに直接コードされていない最終遺伝子産物（タンパク質）が生成される¹⁵⁾。ADAR1は皮膚を含めた全身で発現しているが、皮膚での生理的機能については、未だ完全には明らかになっていない。引き続き研究を続け、本疾患の治療法開発を目指している。

2つの原因遺伝子同定 ～その2 次世代シーケンス以後～

DSHの遺伝子同定から9年経った、いつも通りの大学病院での外来で、1人の新患者さんを診察することになった。水仕事が多い職業で手荒れに悩んでいるとのことであった。手を拝見すると確かに亀裂があつて手湿疹としても重症であった。しかし、それだけではなく網状肢端色素沈着症(RAK)の症状もあると気付いた。手湿疹や他部位の皮膚炎の診察を終えた後で、患者さんの目的外ではあつたが、RAKについてもお話をしたところ、以前に他院皮膚科を受診したことがあり、病名はご存知であった。RAKは当時やはり原因不明であり、治療法もない疾患であった。そこで、お願いしてRAKについても診察させていただき、さらに研究のお話をしたところ、協力の快諾をいただいた。

RAKは1943年に北村らによって報告された遺伝性色素異常症である¹⁶⁾。常染色体優性遺伝形式を示す。日本での報告が主であるが、Griffithsの報告から欧米でも報告されるようになった¹⁷⁾。自覚症状はなく、手背、足背を中心にわずかに陥凹した数mmほどの淡～濃褐色の小色素斑が多発し、点状・網目状を呈するのが特徴である¹⁸⁾（図5）。皮疹は左右対称性に分布する。患者は10代前半までに発症しており¹⁹⁾、徐々に肘窩、膝窩、腋窩、頸部や顔面に皮疹が拡大する。中年になるまで皮疹は拡大傾向があり、その後は拡大が止まり、徐々に色素斑は薄くなっていく¹⁸⁾。本疾患は色素沈着のみで脱色素斑は認めない。本疾患のもうひとつの特徴として、掌蹠にも点状の陥凹がある。手掌



図5. 網状肢端色素沈着症（北村）の臨床像（A-B）手背と足背に網目状の色素斑がみられる。（C）肘窩にも色素斑がみられる。（文献18より引用、一部改変）

(6)

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

紋理に沿って点状の断裂，もしくは，独立して陥凹が見られることがある（図1C）．そして，これら手掌の陥凹にも色素沈着を伴うことがある¹⁸⁾．

さて，RAKもDSH同様，どのようにして皮疹が出現するのか，病態が明らかでない疾患であった．ご協力いただいた家系の調査をしてみると，これまでに筆者が経験したRAKの患者家系の中では最も大きな家系であったが，それでもDSHで連鎖解析を行った家系よりもかなり小さく，DSHと同じ手法での遺伝子同定は難しかった．2007年に次世代シーケンサーはすでに上市されており，それをを用いた研究論文が発表されていたが，自分の獲得していた科研費の規模からするとまだまだ大きな金額であったため躊躇もあった．しかし，やはりこの方法でしかできないと考え，秋山真志教授からも「是非やりましょう」と後押しがあり，患者さんをご両親のいわゆる「トリオ」+患者さんのご兄弟で計4人の全エクソームシーケンセスを行った（図6）．

前項でも説明したが，全エクソームシーケンセスは，全ゲノムのうち，全遺伝子のエクソンとその近傍領域の配列のみを解読する．全エキソンのサイズは全ゲノムの約2%であり，機能的にもタンパク質に翻訳される領域であることから重要であり，遺伝性疾患の多くがエクソン領域の変異により引き起こされると推定されているため，その部分の配列を効率よく解読できる

として，ヒトの遺伝子変異解析では良く使われている手法であった．

このプロジェクトで解析した実際のデータでは，全遺伝子のエクソンとその近傍領域に，1人あたり50万以上の1塩基バリエーション，3万以上の挿入欠失が認められた．そのなかから原因遺伝子を絞り込んでいくため，まずは3人の罹患者にあって1人の非罹患者にはない変異を抽出した．条件に一致する変異は698個認められた．そのうち①新規変異であり，②正常人100人あたり1人以上は持っていない変異は81個であった．この81個の候補変異について，家系内の別の4人にも採血に協力していただいて変異の有無をサンガーシーケンセスにより確認したところ，1人の罹患者にあって3人の非罹患者にはない変異は1つのみであり，それが*ADAM10*のp.Pro139Ser+p.Arg142fsであった¹⁸⁾（図6）．別の4家系でも同様に*ADAM10*に遺伝子変異が認められ，RAKの原因遺伝子は*ADAM10*であることが明らかになった¹⁸⁾．DSHでは100人以上の患者さんとご家族から採血を行い，連鎖解析，ハプロタイプ解析，候補遺伝子のサンガーシーケンセスの解析までで足かけ9年かかったが，RAKでは患者さんと出会ってから1年足らず，8人の採血で遺伝子の同定まで漕ぎ着けたのは自分でも驚いている．

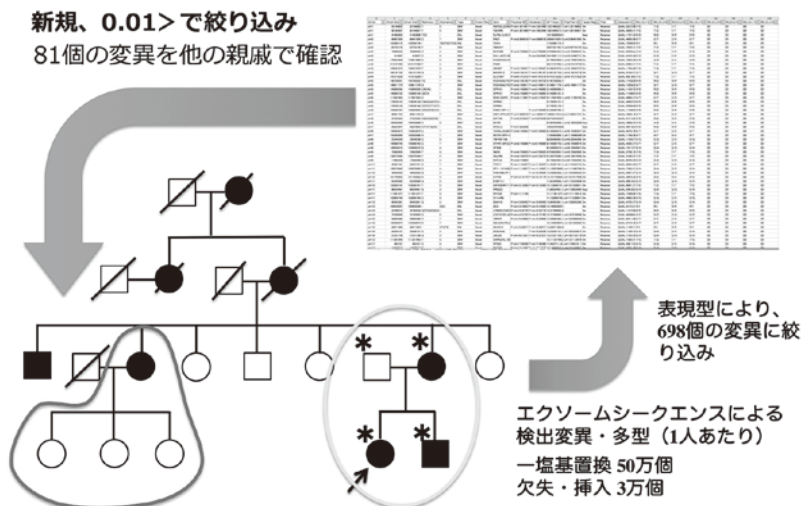


図6. 網状肢端色素沈着症の家系とエクソーム解析による原因遺伝子同定の流れ．家系図の矢印は発端者を示す．本研究では，*が付いている4人のゲノムDNAで次世代シーケンセスを行い，左側の丸で囲まれた4人のゲノムDNAを用いたサンガーシーケンセスでさらに絞り込み，原因遺伝子を同定した．

遺伝性対側性色素異常症の遺伝子診断から ～5'UTR上の変異～

前述した遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の原因遺伝子が同定されてから、これまでに 180 以上の遺伝子変異が同定されている。また、筆者らは遺伝子診断によりこれまで 60 例以上の DSH 家系の確定診断を行ってきた。しかし、典型的な DSH の臨床を示しながら、*ADARI* に遺伝子変異を認めない症例がいくつかあった。この研究のきっかけとなった症例は 20 歳女性で、16 歳ごろから病変が出現したという²⁰⁾。母にもわずかに皮膚症状を認めた。発端者はかなり典型的な皮疹を示しており、臨床的には DSH で間違いないと考えた (図 7)。確定診断のために遺伝子診断を行った。*ADARI* のコード領域に含まれる exon およびその境界領域のダイレクトシークエンスを行ったが変異を認めなかった。しかし、発端者と母の 5' 非翻訳領域 (five prime untranslated region ; 5'UTR) 内に c.-60A>G が

ヘテロ接合性に認められ、発症していない父には認めなかった。これは家系内の疾患の発症と一致していた。しかし、これまでこの変異だけでなく、5'UTR 内の変異で発症した DSH 症例の報告はなく、実際にこの変異が DSH を発症させるのか不明であった (図 8A)。

そこで、本症例の 5'UTR のバリエーション c.-60A>G が疾患発症に関与するかどうか培養細胞を使って検討した。細胞はヒトのメラノーマ細胞である MU89 とヒトの新生児由来のメラノサイトである NHMn-MP を用いた。*ADARI* の 5'UTR の配列をクローニングして pNL1.1.PGK_Vector の PGK プロモータとルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入してレポーター遺伝子を作成した (図 8B)。野生型と変異型のレポーター遺伝子をそれぞれ培養細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより発現解析を行った。MU89 では遺伝子導入 24 時間後で発現活性が 27% 減少した。NHMn-MP では遺伝子導入 24 時間後で発現活性が 43% に減少した。

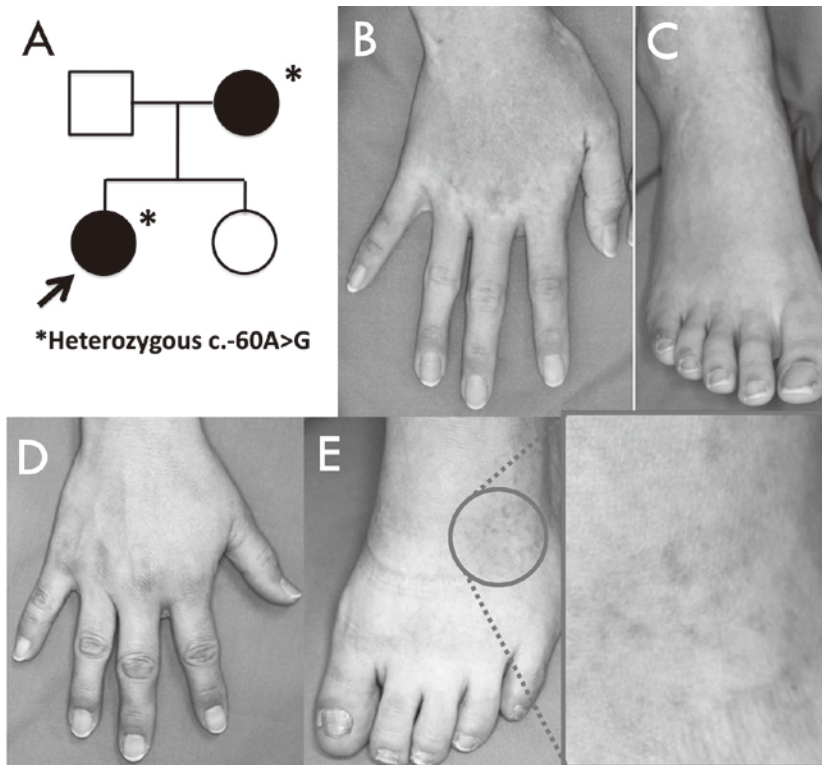


図 7. *ADARI* の 5'UTR に変異を認めた遺伝性対側性色素異常症の症例 (A) 家系図. (B-C) 発端者の臨床像. (D-E) 発端者の母の臨床像. (文献 20 より引用, 一部改変)

(8)

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

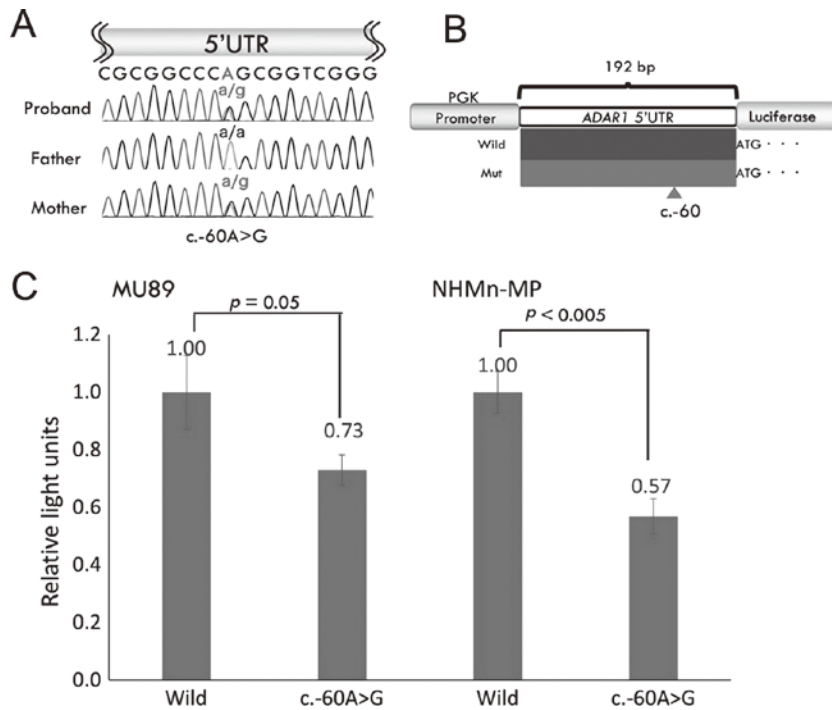


図 8. ADAR1 の 5'UTR 内のバリエント, c.-60A>G の検出とそれによる遺伝子発現への影響. (A) 発端者および両親のゲノム DNA による ADAR1 の 5'UTR のサンガーシーケンス. (B) レポーター遺伝子の模式図. (C) MU89 細胞および NHMn-MP 細胞での c.-60A>G による遺伝子発現への影響. (文献 20 より引用, 一部改変)

この差は統計学的にも有意であった. この結果から, c.-60A>G は ADAR1 の発現において抑制方向へ影響することが明らかになった²⁰⁾ (図 8C).

次に, c.-60A>G による発現低下は転写と翻訳のどちらで影響しているのかを検討するために転写解析および翻訳解析を行なった.

転写解析の結果を示す. ルシフェラーゼアッセイの時に用いたレポーター遺伝子を NHMn-MP に導入し, 24 時間後のレポーター遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR にて半定量的に解析した. バリエントにより 87% と 84% とそれぞれの細胞で mRNA 量の減少傾向は見られたものの有意ではなく, 転写への影響は大きくないものと考えた²⁰⁾.

RNA の翻訳状態を解析する手法の一つにポリソーム解析があり, 本研究での翻訳解析もポリソーム解析によって行った. 翻訳時には mRNA にリボソームが結合するが, 複数のリボソームが結合した状態をポリソームという. 複数のリボソームと結合しポリソーム

を形成した mRNA ほど活発に翻訳されていると考えられている. ショ糖密度勾配遠心によりリボソームの結合数に応じて mRNA を分画する手法をポリソーム解析という. この手法を用いてポリソームを形成した mRNA を回収し, サンガーシーケンスにより, 野生型およびバリエント型のどちらの mRNA がよりポリソームを形成しているか, つまり, 活発に翻訳しているかを検討した. もし, c.-60A>G が翻訳に影響していなければ, どちらも同じように翻訳されるため, バリエント型と野生型のどちらの mRNA も同量ずつ回収され, サンガーシーケンスでは同じ高さでピークがみられるはずである. もし, c.-60A>G が翻訳に抑制的な影響を与えていれば, 変異型の mRNA は少なく回収され, サンガーシーケンスではバリエント型のピークが低くなるはずである. 野生型およびバリエント型のレポーター遺伝子を 1:1 で混じて NHMn-MP に導入して, その細胞溶解液をショ糖 15% ~ 50% の密度勾配の溶液に加えて超遠心を行った. そ

の後、溶液を10個の分画で回収し、吸光度で濃度測定した(図9A)。分画5~7をポリソーム、分画8~10をモノソームとしてRNAを回収し、バリエーション周囲のダイレクトシーケンスを行った(図9B)。ポリソームおよびモノソームのシーケンス波形をそれぞれ示す。この波形の面積を画像解析ソフトウェアであるImage Jで測定した(図9C)。ポリソームではピーク面積がバリエーション型(G)が野生型(A)の49%に減少しており、統計的にも有意であった。モノソームのグラフは、有意な減少を認めなかった。以上によりc.-60A>Gは翻訳に影響していることが明らかになった²⁰⁾。

ADAR1の5'UTRの二次構造を予測ソフト、UNAFoldのTwo-state Foldingにより解析したところ、野生型(G)とバリエーション型(A)で大きく二次構造が変化する可能性があることが明らかになった(図10)²⁰⁾。真核生物の翻訳開始においては、開始コドンであるAUG周囲の配列(Kozak配列)とその二次構造が重要であり、AUGより上流の二次構造がリボソーム結合やスキャンニングの抑制をするかどうかを決めると言われており²¹⁾、本症例においてもこのバリエーション

がmRNAの5'UTRの二次構造を変化させて翻訳に影響したと考える。DSHは、ADAR1のhaploinsufficiencyで発症すると考えられており²²⁾、5'UTRの変異が発現を低下させることによってhaploinsufficiencyと同じような状態になり、DSHを発症させることを示した。

この症例の遺伝子診断と得られたバリエーションの機能解析によって、ADAR1の5'UTR上の変異を病的変異として明らかにしたのも初めてであるが、そもそも5'UTR上の遺伝子変異により発症した遺伝性疾患は多くなく、遺伝性出血性末梢血管拡張症(hereditary hemorrhagic telangiectasia; HHT)²³⁾、頭蓋前頭鼻骨症候群(craniofrontonasal syndrome; CFNS)²⁴⁾、レーバー先天黒内障(Leber congenital amaurosis; LCA)において報告されている程度である。HHTおよびCFNSでは5'UTRの変異により新たなAUGが作られ、そこから翻訳が開始されることで通常より長い読み枠になることにより発症している^{25,26)}。レーバー先天黒内障(Leber congenital amaurosis; LCA)は5'UTRの変異による二次構造の違いが病因としている²⁷⁾。1人の患者さんの遺伝子診断から、遺伝病全体でも稀な5'UTR

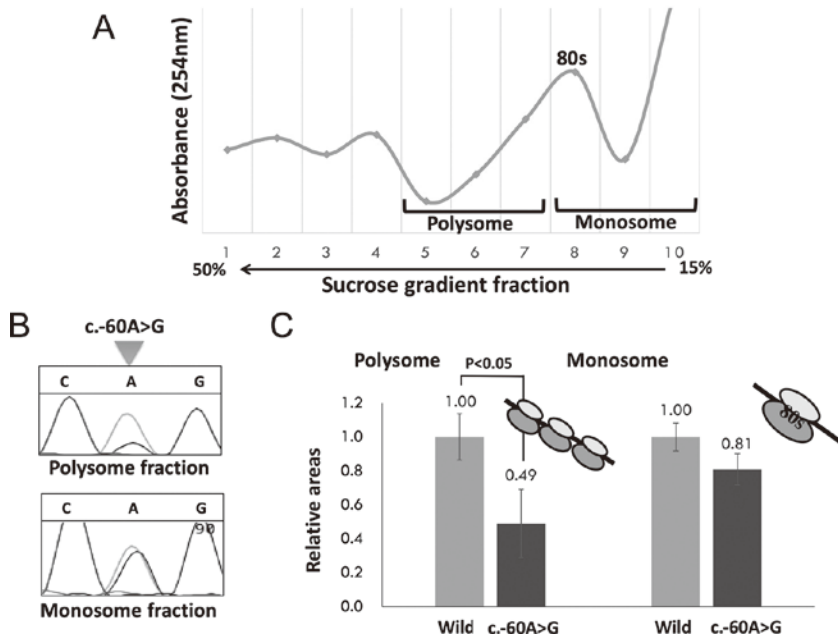


図9. ポリソーム解析によるc.-60A>Gの翻訳への影響。(A) ショ糖密度勾配による分画。(B-C) ポリソーム分画のmRNAのサンガーシーケンスのクロマトグラフ(B)と相対面積の定量(C)。(文献20より引用、一部改変)

(10)

日常診療から展開する皮膚遺伝性疾患の研究

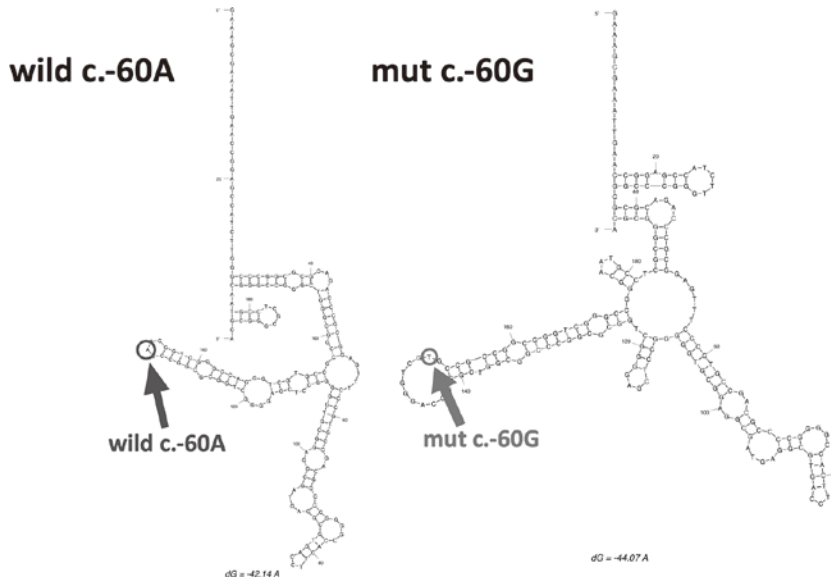


図 10. c.-60A>G の RNA 二次構造への影響。(文献 20 より引用)

上の変異による発症病理の解明を経験できた。

表皮融解性魚鱗癬の遺伝子診断から ～あざは遺伝するのか？～

受精卵から一つの個体へと成長する過程では細胞の分裂と増殖が繰り返されている。ヒトの体は一説によると 37 兆個の細胞からなる²⁸⁾と言われており、分裂の過程で一部の細胞に遺伝子変異を生じることがある。一度生じた遺伝子変異は、その細胞から分裂した細胞へ、そしてさらに分裂した細胞へと受け継がれていく。その結果、1 個体のなかに遺伝子変異を伴う細胞群と遺伝子変異を持たない細胞が混在する状態となり、これを遺伝学的モザイク (genetic mosaicism) という。そして、遺伝子変異を持つ一部の細胞群が皮膚の構成成分の量や質を変化させて周囲の遺伝子変異を持たない正常皮膚とは異なる状態になって目に見えるようになったものが、母斑、いわゆる「あざ」である。一般的な遺伝病の患者さんでは、その患者さんの全ての細胞が同じ遺伝子変異を持つが、母斑の患者さんではモザイクであるため体の一部の細胞 (通常は母斑を形成する細胞) だけが遺伝子変異を持つ。モザイクの遺伝子変異が母斑のみに存在するのであれば母斑として遺伝することはない。しかし、皮膚に母斑を生じさ

せる遺伝子変異は、病変部皮膚だけでなく、皮膚以外の体のさまざまな細胞にも含まれている可能性がある。しかし、皮膚以外では発現しない遺伝子であれば、その変異があっても他の組織・臓器では変化がみられず、変異があることさえ気付かれない。もしくは詳細に検討すれば変化はみられるかもしれないが、内臓では容易に観察、検査はできない。そして、モザイクの遺伝子変異が生殖細胞に存在する状態を germline mosaicism と呼ぶ。遺伝子変異を有する生殖細胞から生まれた児は、モザイク、つまり母斑ではなく、全身の細胞に遺伝子変異を持つので、全身の病変を生じる (図 11A)。

この現象を *KRT1* または *KRT10* の変異を病因とする表皮融解性魚鱗癬と表皮融解性母斑に当てはめると、以下ようになる。すなわち、*KRT1* または *KRT10* の変異をモザイクで有する患者は、表現型としては表皮融解性母斑となるが、*KRT1* または *KRT10* の遺伝子変異が生殖細胞にも存在する場合は、変異を有する生殖細胞からの子供は全身性の魚鱗癬、つまり表皮融解性魚鱗癬を発症する (図 2)。実際に表皮融解性母斑を持った父から、次世代で、全身性の表皮融解性魚鱗癬を生じた症例を経験した²⁹⁾。これまでに数例しか報告されていなかった³⁰⁻³²⁾。まず、我々は表皮融解性魚鱗癬の子供の唾液検体から抽出したゲノム

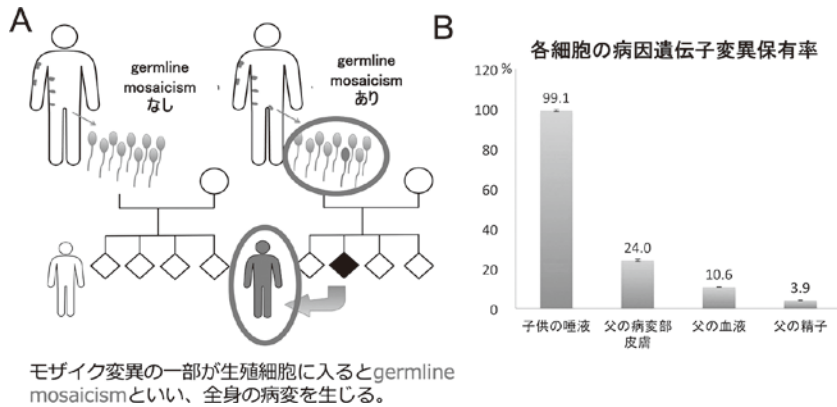


図 11. 表皮融解性母斑の germline mosaicism による次世代への遺伝 (A) Germline mosaicism と遺伝 (B) 表皮融解性母斑患者の各細胞の遺伝子変異保有率 (Nagoya University Research Achievements, Skin Disease Caused by Sperm Cell Transmission of Keratin Mutation, press released on June 16, 2017. <http://en.nagoya-u.ac.jp/research/activities/news/2017/06/skin-disease-caused-by-sperm-cell-transmission-of-keratin-mutation.html> より引用, 一部改変)

DNA から遺伝子診断を行い, 病因となりうる既報告のミスセンス変異を *KRT10* 上に同定した³³⁾. 次に父の表皮融解性母斑の病変部の表皮細胞から抽出したゲノム DNA に母と同じ *KRT10* の変異を確認した. これにより, 父の母斑の細胞にある遺伝子変異は生殖細胞にも混じており, つまり germline mosaicism も伴っており, 次世代に遺伝したことが推測できる. そこで我々は, 次世代シーケンサーを用いた amplicon sequencing によって, この病因遺伝子変異が, 父の血液中や精液中のゲノム DNA にどのくらいの率で含まれているかを詳細に調べた. その結果, 血液中の細胞の 10.6% が遺伝子変異を持ち, また, 精子の 3.9% に遺伝子変異を認めた. この結果から, 次子以降において表皮融解性魚鱗癬の発症する確率は概算値ではあるが約 3.9% と予想することができた²⁹⁾ (図 11B).

この研究により, 表皮融解性母斑の患者から次世代における表皮融解性魚鱗癬の発症率予測に世界で初めて成功した²⁹⁾. DNA 中の遺伝子変異の混在を正確に測定するのに次世代シーケンスは大変有用であった. 本法はモザイク病変を持つ女性患者には用いることができないが, 男性であれば, 表皮融解性母斑に限らず, モザイク病変を有する親から子への全身性疾患発症の可能性の評価を行うことで, より詳しい遺伝カウンセリングが可能になる.

最後に

本稿では筆者がこれまで行ってきた 2 つの新規遺伝子同定と遺伝子診断による 2 つのトピックスを概説した. いずれも日常の診療で患者さんからきっかけをいただいで展開した研究である. 一皮膚科医として, 今後も常に臨床に即した研究を行い, 患者さんの皮膚の健康に貢献していきたい.

文 献

- 1) Toyama, I. (1910) An unknown disorder of hyperpigmentation (in Japanese). *Jpn. J. Dermatol. Urol.*, **10**, 644.
- 2) Toyama, I. (1929) Dyschromatosis symmetrica hereditaria (in Japanese). *Jpn. J. Dermatol. Urol.*, **29**, 95-96.
- 3) Kono, M., Matsumoto, F., Suzuki, Y., et al. (2016) Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria and Aicardi-Goutieres Syndrome 6 Are Phenotypic Variants Caused by ADAR1 Mutations. *J. Invest. Dermatol.*, **136**, 875-878.
- 4) Petre, J., Lasseaux, E., Ged, C., Arveiler, B., Taieb, A. and Morice-Picard, F. (2018) ADAR1 splicing mutation leading to dyschromatosis hereditaria in a Caucasian patient. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **32**, e79-e80.

- 5) Kono, M., Akiyama, M., Suganuma, M., Tomita, Y. and Sanchez-Valle, A. (2013) Dyschromatosis symmetrica hereditaria by ADAR1 mutations and viral encephalitis: a hidden link? *Int. J. Dermatol.*, **52**, 1582-1584.
- 6) Kono, M. and Akiyama, M. (2019) Dyschromatosis symmetrica hereditaria and reticulate acropigmentation of Kitamura: An update. *J. Dermatol. Sci.*, **93**, 75-81.
- 7) Kobayashi, T., Kono, M., Suganuma, M., Akita, H., Takai, A., Tsustui, K., Inasaka, Y., Takeichi, T., Muro, Y. and Akiyama, M. (2018) Analysis of genotype/phenotype correlations in Japanese patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Nagoya J. Med. Sci.*, **80**, 267-277.
- 8) Oyama, M., Shimizu, H., Ohata, Y., Tajima, S. and Nishikawa, T. (1999) Dyschromatosis symmetrica hereditaria (reticulate acropigmentation of Dohi): report of a Japanese family with the condition and a literature review of 185 cases. *Br. J. Dermatol.*, **140**, 491-496.
- 9) Kondo, T., Suzuki, T., Ito, S., Kono, M., Negoro, T. and Tomita, Y. (2008) Dyschromatosis symmetrica hereditaria associated with neurological disorders. *J. Dermatol.*, **35**, 662-666.
- 10) Tojo, K., Sekijima, Y., Suzuki, T., Suzuki, N., Tomita, Y., Yoshida, K., Hashimoto, T. and Ikeda, S. (2006) Dystonia, mental deterioration, and dyschromatosis symmetrica hereditaria in a family with ADAR1 mutation. *Mov. Disord.*, **21**, 1510-1513.
- 11) Kono, M., Okamoto, T., Takeichi, T., Muro, Y. and Akiyama, M. (2018) Dyschromatosis symmetrica hereditaria may be successfully controlled by topical sunscreen. *Eur. J. Dermatol.*, **28**, 840-841.
- 12) Kawakami, T., Otaguchi, R., Kyoya, M., Soma, Y. and Suzuki, T. (2013) Patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria treated with miniature punch grafting, followed by excimer light therapy. *J. Dermatol.*, **40**, 771-772.
- 13) Kono, M., Miyamura, Y., Matsunaga, J. and Tomita, Y. (2000) Exclusion of linkage between dyschromatosis symmetrica hereditaria and chromosome 9. *J. Dermatol. Sci.*, **22**, 88-95.
- 14) Miyamura, Y., Suzuki, T., Kono, M., Inagaki, K., Ito, S., Suzuki, N. and Tomita, Y. (2003) Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 693-699.
- 15) Bass, B.L. and Weintraub, H. (1988) An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell*, **55**, 1089-1098.
- 16) Kitamura, K., Akamatsu, S. and Hirokawa, K. (1953) [A special form of acropigmentation: acropigmentation reticularis]. *Hautarzt.*, **4**, 152-156.
- 17) Griffiths, W.A. (1976) Reticulate acropigmentation of Kitamura. *Br. J. Dermatol.*, **95**, 437-443.
- 18) Kono, M., Sugiura, K., Suganuma, M., Hayashi, M., Takama, H., Suzuki, T., Matsunaga, K., Tomita, Y. and Akiyama, M. (2013) 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.*, **22**, 3524-3533.
- 19) Kono, M., Suganuma, M., Takama, H., *et al.* (2015) Dowling-Degos disease with mutations in POFUT1 is clinicopathologically distinct from reticulate acropigmentation of Kitamura. *Br. J. Dermatol.*, **173**, 584-586.
- 20) Suganuma, M., Kono, M., Yamanaka, M. and Akiyama, M. (2020) Pathogenesis of a variant in the 5' untranslated region of ADAR1 in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Pigment Cell Melanoma Res*, **33**, 591-600.
- 21) Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867-19870.
- 22) Kono, M., Suganuma, M., Dutta, A., Ghosh, S., Takeichi, T., Muro, Y. and Akiyama, M. (2018) Bilateral striatal necrosis and dyschromatosis symmetrica hereditaria: A-I editing efficiency of ADAR1 mutants and phenotype expression. *Br. J. Dermatol.*, **179**, 509-511.
- 23) Ruiz-Llorente, L., McDonald, J., Wooderchak-Donahue, W., Briggs, E., Chesnutt, M., Bayrak-Toydemir, P. and Bernabeu, C. (2019) Characterization of a family mutation in the 5' untranslated region of the endoglin gene causative of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Hum. Genet.*, **64**, 333-339.
- 24) Twigg, S.R., Babbs, C., van den Elzen, M.E., *et al.* (2013) Cellular interference in craniofrontonasal syndrome: males mosaic for mutations in the X-linked EFN1 gene are more severely affected

- than true hemizygotes. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 1654-1662.
- 25) Barbosa, C., Peixeiro, I. and Romao, L. (2013) Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet.*, **9**, e1003529.
- 26) Calvo, S.E., Pagliarini, D.J. and Mootha, V.K. (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 7507-7512.
- 27) Coppieters, F., Todeschini, A.L., Fujimaki, T., *et al.* (2015) Hidden Genetic Variation in LCA9-Associated Congenital Blindness Explained by 5'UTR Mutations and Copy-Number Variations of NMNAT1. *Hum. Mutat.*, **36**, 1188-1196.
- 28) Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., *et al.* (2013) An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.*, **40**, 463-471.
- 29) Kono, M., Suga, Y., Akashi, T., Ito, Y., Takeichi, T., Muro, Y. and Akiyama, M. (2017) A Child with Epidermolytic Ichthyosis from a Parent with Epidermolytic Nevus : Risk Evaluation of Transmission from Mosaic to Germline. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 2024-2026.
- 30) Nazzaro, V., Ermacora, E., Santucci, B. and Caputo, R. (1990) Epidermolytic hyperkeratosis : generalized form in children from parents with systematized linear form. *Br. J. Dermatol.*, **122**, 417-422.
- 31) Paller, A.S., Syder, A.J., Chan, Y.M., Yu, Q.C., Hutton, E., Tadini, G. and Fuchs, E. (1994) Genetic and clinical mosaicism in a type of epidermal nevus. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1408-1415.
- 32) Chassaing, N., Kanitakis, J., Sportich, S., Cordier-Alex, M.P., Titeux, M., Calvas, P., Claudy, A., Berbis, P. and Hovnanian, A. (2006) Generalized epidermolytic hyperkeratosis in two unrelated children from parents with localized linear form, and prenatal diagnosis. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 2715-2717.
- 33) Rothnagel, J.A., Fisher, M.P., Axtell, S.M., Pittelkow, M.R., Anton-Lamprecht, I., Huber, M., Hohl, D. and Roop, D.R. (1993) A mutational hot spot in keratin 10 (KRT 10) in patients with epidermolytic hyperkeratosis. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 2147-2150.