HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝性掌蹠角化症の2病型；長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症における原因遺伝子とその病態に関する研究
Author(s)	水野, 修
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11689号
Issue Date	2015-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11689
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/58807
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2171
File Information	Osamu_Mizuno.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

遺伝性掌蹠角化症の 2 病型；

長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症における

原因遺伝子とその病態に関する研究

(Studies on the causative genes and pathogenesis

in two forms of palmoplantar keratodermas;

Nagashima-type palmoplantar keratosis

and striate palmoplantar keratoderma)

2015 年 3 月

北海道大学

水野　修

学位論文

遺伝性掌蹠角化症の 2 病型；

長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症における

原因遺伝子とその病態に関する研究

(Studies on the causative genes and pathogenesis

in two forms of palmoplantar keratodermas;

Nagashima-type palmoplantar keratosis

and striate palmoplantar keratoderma)

2015 年 3 月

北海道大学

水野　修

目次

発表論文目録及び学会発表目録・・・・・・・・　1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　10頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　11頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　21頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　37頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・　46頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　47頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　48頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Osamu Mizuno, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Yuka Ohguchi, Yasuyuki Fujita, Wataru Nishie, Kazumitsu Sugiura, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu
Highly prevalent SERPINB7 founder mutation causes pseudodominant inheritance pattern in Nagashima-type palmoplantar keratosis.
Br J Dermatol 171: 847-853, 2014.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 水野　修，乃村俊史，鈴木翔多朗，秋山真志，清水　宏
新規 Dsg1 変異を認めた線状掌蹠角化症の 1 例
第 28 回角化症研究会 2013 年 7 月 27 日　東京

2. 水野　修，乃村俊史，鈴木翔多朗，竹田真依，大口由香，藤田靖幸，西江　渉，杉浦一充，秋山真志，清水　宏
長島型掌蹠角化症 10 家系の解析
第 398 回日本皮膚科学会北海道地方会 2014 年 6 月 7 日～8 日 旭川

3. Osamu Mizuno, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Yuka Ohguchi,Yasuyuki Fujita, Wataru Nishie, Kazumitsu Sugiura, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu
Highly prevalent SERPINB7 founder mutation causes pseudodominant inheritance pattern in Nagashima-type palmoplantar keratosis
44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR)
10-13 September 2014, Copenhagen, Denmark

4. 水野　修，乃村俊史，鈴木翔多朗，竹田真依，大口由香，藤田靖幸，西江　渉，杉浦一充，秋山真志，清水　宏
SERPINB7 変異を認めた長島型掌蹠角化症の 10 家系
第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 2014 年 10 月 4 日～5 日 青森

緒言

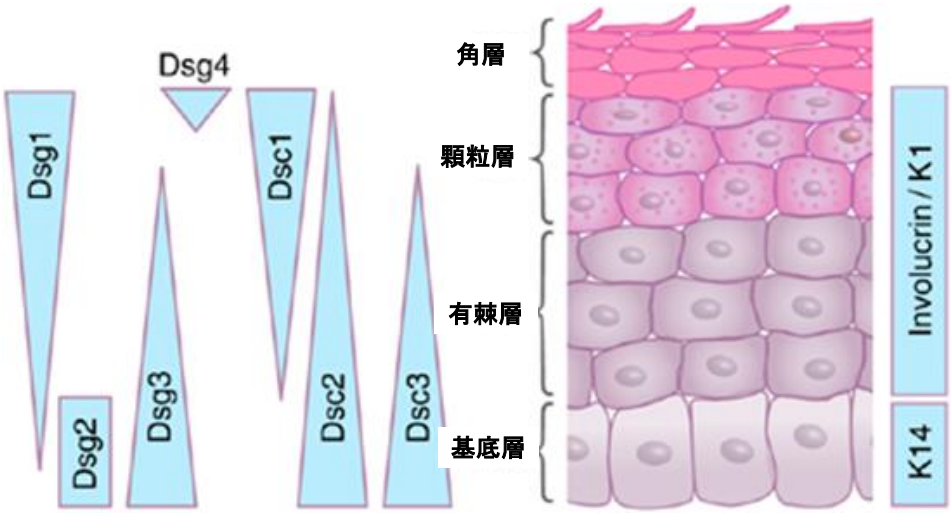
遺伝性掌蹠角化症について

表皮は成熟段階によって異なる形態の角化細胞が層状に配列した 4 層で形成される。その構成細胞の 95%を占める角化細胞は、表皮最下層の基底層で分裂し、成熟に伴い有棘層、顆粒層、角層の順に上方に移行し、分化する（図 1）。しかしながら、角化のメカニズムには不明な点も多い。

角化に異常をきたす疾患を角化症と呼び、遺伝性角化症と後天性角化症とに大別される。そのうち、掌蹠角化症（palmoplantar keratoderma; PPK）は、掌蹠に高度な過角化をきたす遺伝性または後天性の疾患で、遺伝学的にも臨床的にも多様な病態の総称である。

遺伝性掌蹠角化症は常染色体優性遺伝または常染色体劣性遺伝形式をとる稀な遺伝性皮膚疾患であり、臨床症状（過角化のパターン（びまん型、局所型）、掌蹠外への病変波及の有無、重症度、随伴症状の有無）や病理所見（顆粒変性の有無）、遺伝形式、原因遺伝子に基づいて多くの亜型に分類される（表 1）。掌蹠外波及のない代表的な PPK には、びまん型で過角化が掌蹠にとどまり常染色体優性遺伝形式を示し組織学的に顆粒変性を伴わない Unna-Thost 型（nonepidermolytic PPK; MIM #600962）、組織学的に顆粒変性を伴う点が Unna-Thost 型と異なる Vörner 型（epidermolytic PPK; MIM #144200）、局所型で線状の過角化を呈する線状型（striate PPK; SPPK）（MIM #148700）、および局所型で点状に分布する点状型（punctate PPK; PPPK）（MIM #148600）などがある。一方、掌蹠外波及のある代表的な PPK には、重症で進行性の経過をとり、常染色体劣性遺伝で *SLURP1* 変異により発症する Meleda 病（Mal de Meleda）（MIM #248300）、*SLURP1* 変異がなく症状は軽度で非進行性の経過をとる常染色体劣性遺伝の長島型 PPK、長島型 PPK に臨床像が類似し常染色体優性遺伝形式を示す優性メレダ型 PPK などがある。

遺伝性掌蹠角化症の原因遺伝子の一部では病因遺伝子が明らかになっているが、病態の全容は未だに解明されておらず、日本人で最も多い亜型である長島型 PPK の病因はこれまで不明であった。



表皮の構造およびその分化に関与する分子の発現の模式図（図 1）

(Green, K. J. *et al.* 2007)[1] の図を改変

皮膚以外 随伴症状	掌蹠外波及	過角化形式 重症度	病型	原因 遺伝子
なし	なし	びまん性	Unna-Thost (AD) : “nonepidermolytic” Vörner (AD) : “epidermolytic”	? *K9/K1?*
		局所性	Striate/ areata (AD)	*KRT1/DSG1* */DSP*
			Punctate (AD)	*AAGAB*
	あり	局所性 重症	Mal de Meleda (メレダ病) (AR): 進行性 Sybert (AD)	*SLURP-1*
		びまん性 重症~中等症	Greither (AD) : 進行性 Gamboug-Nielsen (AR)	? ?
		びまん性 軽症	“非進行性” 優性メレダ型 (AD) 長島型 (AR)	? *SERPINB7*
あり		随伴症状		
	あり	絞扼輪 聴覚障害	Vohwinkel (AD)	*LOR*
		歯周炎 心筋症・羊毛状毛髪	Papillon-Lefèvre (AR) Naxos (AR)	*CTSC* *JUP*
		代謝異常	Richener-Hanhart (AR)	*TAT*

遺伝性掌蹠角化症の分類（表 1）

AD; autosomal dominant, 常染色体優性、AR; autosomal recessive, 常染色体劣性

長島型掌蹠角化症について

長島型掌蹠角化症（Nagashima-type palmoplantar keratosis; NPPK）（MIM #615598）は、びまん型 PPK の一型で、常染色体劣性遺伝形式を示す独立した疾患概念であり、長島によって 1977 年に初めて報告された[2]。NPPK の臨床的特徴は、掌蹠全体に軽度から中等度の過角化を伴った境界明瞭な紅斑で、とりわけ重要な点は、紅斑と過角化は手掌および足底を超えて連続性に手足の背側面、手関節内側面、足関節およびアキレス腱部までも侵されることである（図 2a，b）[3,4]。興味深いことに、角層の機能異常を反映してか、本症の病変部の皮膚は 10 分間程度の短時間の水に浸すことで容易に水分を含み白くスポンジ状に浸軟する[4]。NPPK 患者では、手足以外にも肘や膝にしばしば病変を生じる。また、掌蹠の多汗と真菌感染の合併も高頻度に認められる[3]。その他、耳介の過角化や足趾爪の変形が NPPK の非典型的病変として報告されている[5,6]。一方、絞扼輪や指端断裂は生じず、また皮膚以外の症状や合併症の報告はない。NPPK は通常乳幼児期に発症し、小児期以降には非進行性の経過を示す[3]。

NPPK のように手背足背に病変部が及ぶタイプには、前述の通り、Meleda 病や Gambourg-Nielsen 型 PPK（MIM #244850）あるいは指端角化症（MIM #248300）などが存在する。それらの PPK とは NPPK は臨床的重症度が低いことで鑑別される[3,4]。NPPK の組織学的な特徴は表皮肥厚、顆粒層肥厚を伴った過角化であり、顆粒変性は認めない。

現在まで、30 症例以上の NPPK が英語及び日本語文献の両方で報告されてきたが、それらいずれもが本邦からの報告であった[3–8]。それゆえ、この疾患の日本人以外の罹患率は知られていない。

NPPK の責任遺伝子はこれまで同定されておらず、病因は不明であった。2013 年に、Kubo らが 13 人の血縁関係のない NPPK 患者について、全エクソン解析（whole-exome sequencing; WES）と Sanger sequencing を組み合わせた解析を行い、*SERPINB7*（RefSeq: NM_001040147.2）の機能喪失変異が NPPK の病因であることを報告した[4]。また、最近、漢民族中国人の血縁関係のない 7 人の NPPK についても *SERPINB7* 変異が同定された[9]。

NPPK の臨床像（当科症例）（図 2a）

（図 2b）

SERPINB7 タンパクについて

SERPINB7 はセルピンスーパーファミリーに属するタンパク質である。セルピン（serpin; serine protease inhibitor）のスーパーファミリーには、その語源の通り serine protease inhibitor が多く含まれる。しかしながら、セルピンの中には、serine protease inhibitor としての機能を有しないものも含まれており、構造的には類似構造を持ちながらも多様な機能を発揮することが知られている[10]。事実、セルピンタンパクは炎症、免疫機能、腫瘍化、血液凝固、認知症および癌転移など多様な事象に関与している [10]。ヒトのセルピンはその構造配列の類似性に基づき clade A から I までの 9 グループに分けられる [10]。

SERPINB7 はセルピンスーパーファミリーの clade B に属し、皮膚に豊富に発現しているタンパクの 1 つであるが [11]、その詳細な機能は未だ不明である。セルピンタンパクには共通して reactive center loop（RCL）が存在し、protease inhibitor としての働きは、この RCL で標的 protease がトラップされて失活させられることによるものと考えられている。

セルピンタンパクの異常で生じる疾患には、大きく２つの機序があると考えられている。一つは、いわゆるセルピン病（serpinopathy）で、異常セルピンタンパクのポリマー化による蓄積と機能異常によるものであり、もう一つは protease 阻害活性が失われることにより制御できない protease の活性化とそれによる組織障害である [4]。ポリマー化による機能異常と protease 阻害活性の失活とを厳密に区別することは困難であるが、例えば、α1 アンチトリプシン欠損症では protease による肺胞組織破壊の結果の肺気腫と異常α1 アンチトリプシンの肝臓への蓄積による肝硬変が生じる。なお、α1 アンチトリプシン欠損症は極端に白色人種に偏っていて東洋人には稀な疾患であることが知られており、人種間の罹患率に大きな違いがある。その他、セルピンタンパクの欠乏あるいは異常により生じる疾患として、アンチトロンビンⅢ異常による血栓症や C1 インヒビターの異常による血管浮腫などが知られている。

線状掌蹠角化症について

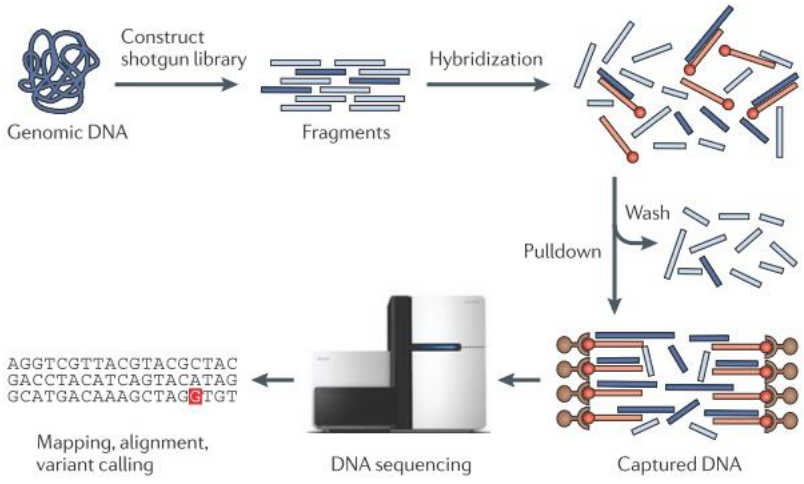
線状掌蹠角化症（SPPK）は常染色体優性遺伝形式をとる稀な遺伝性掌蹠角化症である。臨床症状は局所性の過角化パターンで、手指の指腹と手掌に特徴的な線状の過角化と、足底では荷重部に一致した局所的な過角化を生じる。組織学的所見としては、著明な過角化、表皮の乳頭状変化と肥厚、有棘細胞間隙の開大などがその特徴とされている。

その病因遺伝子として、*Desmoglein 1*（*DSG1*）、 *Desmoplakin*（*DSP*）、*Keratin 1*（*KRT1*） が報告されている[12–16]。しかし、本邦からの症例報告はこれまで 1 例しかなく[17]、本邦症例で原因遺伝子変異を同定した報告はない。細胞間接着分子であるデスモゾームのDSG1およびDSPの異常によるものはそれぞれ SPPK1、SPPK2 とも呼称される。また、ケラチン 1 の異常によるものは SPPK3 とも呼称される。

SPPK は細胞間接着分子の異常を基盤に細胞間接合が減弱することで、荷重などの機械的ストレスがその発症の誘因の一部になっている可能性が考えられてきたが、その詳しい発症機序は未だ不明である[18]。

Whole-exome sequenicing を用いた疾患関連遺伝子の同定について

近年、それまで疾患関連遺伝子の同定あるいは遺伝子変異検索の主要な手段として用いられてきたダイレクトシークエンス法に加えて、次世代シークエンシング（next generation sequencing; NGS）という呼ばれる遺伝子塩基配列の解析方法が用いられるようになってきた。NGS には、全ゲノム解析（whole-genome sequencing）と特にエクソンだけを選択的に解析する全エクソン解析（whole-exome sequencing; WES）があり、それらを用いて候補遺伝子の同定が可能になってきた。例えば、Ng らは WES を用いて、Miller 症候群（MIM #263750）の原因遺伝子として *DHODH* を初めて同定した [19,20]。WES では、DNA を非常に小さく断片化し、断片化された DNA のエクソン部分を回収（capture）して、データベースを参照してつなぎ合わせ（assembly, sequencing）、ほぼすべてのエクソンと周辺の領域配列を決定する（mapping）が、これにより変異箇所や種類などの様々な情報を得ることが可能である（図 3）。



WES 解析の模式図（図 3）

（Bamshad, M.J. *et al.* 2011 より引用）[21]

皮膚科領域においても、WES を用いた遺伝性皮膚疾患の責任遺伝子の同定の有効性が注目されてきており、今回我々は、責任遺伝子が未知の遺伝性掌蹠角化症の病因の同定にこの新しい解析方法を用いた。

研究の目的

NPPK は本邦からの症例報告しかなく、その疾患概念は国際的認知に至ってはいなかった。しかし最近、NPPK の病因として *SERPINB7* 変異が同定され、本症は独立した疾患であることが明らかにされた。我々はこの知見を追試するために、NPPK の 9 家系を解析し、病因変異の同定を試みた。更に我々は、臨床型は NPPK に類似するものの遺伝形式的には常染色体優性遺伝を呈する 1 家系について、WES 解析を施行し原因遺伝子の同定を試みた。

また、PPK の稀な臨床型である SPPK は本邦では症例報告はこれまでわずかに 1 例のみであり、本邦症例の変異検索の報告例はなく、世界でも 20 例弱しか変異は同定されていない。これまで細胞骨格に関与する *KRT1*, 細胞間接着に関与する *DSG1* および *DSP* の変異が原因として報告されているが、その発症機序は不明である。我々は SPPK 1 例についても、原因遺伝子を特定するため遺伝子変異検索を行った。

このように多様で掌蹠の著明な過角化を呈し、その発症機序は未だ不明であり疾患分類も完全とは言えない PPK の中で、北大皮膚科で集積されていた症例のうち、2 病型について集中的に調べ、その原因遺伝子と病態、発症機序の一端を明らかにすることで、角化のメカニズムに新しい知見をもたらすことにつながりうると考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

DEPC：diethylpyrocarbonate
DSG1：desmoglein1
DSP：desmoplakin
DTT：dithiothreitol
EGFR：epidermal growth factor receptor
HE：hematoxylin-eosin
PHH3：phosphohistone h3
IVL：involucrin
KRT1: keratin1
PPK：palmoplantar keratoderma
MAF：minor allele frequency
MIM：Mendelian inheritance in man
NPPK：Nagashima-type palmoplantar keratosis
OMIM：online Mendelian inheritance in man
PCR：polymerase chain reaction
PTC：premature termination codon
RCL：reactive center loop
SPPK：striate palmoplantar keratoderma
WES：whole exome sequencing

実験方法

NPPK における原因遺伝子の解析

NPPK 患者の抽出

本研究では、まず始めに互いに血縁関係のない 9 つの日本人家系（家系 1 から 9）から 9 人の NPPK 罹患者および 12 人の非罹患者が集積、検討された。NPPK の診断は、少なくとも 2 人の経験を積んだ皮膚科医が臨床的に行った。診断に必要な臨床所見は、軽度で非進行性の掌蹠のびまん性の紅斑および過角化が連続性に手足の背側に進行していることである。また、4 家系（1,5,6 および 7）の発端者から採取された皮疹部の皮膚サンプルが hematoxylin-eosin（HE）染色に提出され組織学的に検討された。

更に、臨床所見はびまん型の過角化が NPPK に類似するものの、遺伝形式的には常染色体優性遺伝形式のパターンが疑われた 1 家系（家系 10）についても解析した。この家系の発端者の病変部皮膚を採取し組織学的に検討した。

SERPINB7 遺伝子変異検索

Sanger sequencing analysis

遺伝子変異検索を施行するにあたって、全ての患者 13 名およびその家族 14 名、合計 27 名の DNA を、QIAamp DNA Blood Maxi Kit （Qiagen, Germantown, MD, U.S.A.） あるいは Oragene DNA Self-Collection Kit（DNA Genotek, Kanata, Canada）を用いて末梢血あるいは唾液から抽出した。本研究は、ヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会および名古屋大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、全ての参加者あるいはその保護者から書面による同意を得て施行した。

SERPINB7 の全てのエクソンとエクソン - イントロン境界部を、先行研究で用いられたプライマーペアー[4]（表 2）を用いてポリメラーゼ連鎖反応、polymerase chain reaction（PCR）によって増幅した。総量 100ng のゲノム DNA（100ng/μl）を 2μl（200ng）、各種 forward、reverse プライマー（10 μmol/l）をそれぞれ 4μl（40pmol）、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix（Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.）を 25μl 使用し、サーマルサイクラー（icycler, Bio-rad, CA, U.S.A.）を用いて増幅された。PCR 増幅反応は、95℃ 10 分×1 サイクル→（95℃30 秒→56℃30 秒→72℃84 秒）×35 サイクル→72℃ 7 分×1 サイクルで行った。増幅された PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen）を用いて精製し、上記と同様のサーマルサイクラーを使用して、シークエンス反応を行った。シークエンス反応の条件は、96℃2 分×1 サイクル

→（96℃10 秒→50℃5 秒→60℃4 分）×25 サイクルで行った。得られた PCR 産物のエタノール沈殿を行い、ABI PRISM 3100 遺伝子アナライザー（Applied Biosystems）を用いて解析した。

また、互いに血縁関係にない健常コントロール 50 人の DNA も、上記の患者およびその家族からの DNA の採取と同様に、採取された。本研究で同定された、*SERPINB7* の 4 個の変異についてこの正常コントロール 50 人でも同様にその有無を検索した。

プライマー名	配列（5´→3´）	増幅断片長（bp）
SERPINB7ex2-F1	TGATGATTACCTCCAAGGCTG	427
SERPINB7ex2-R1	AGATGTGACACCTTGTGCCTC	
SERPINB7ex3-F1	GGCAATTAGACACATTTATTGGG	280
SERPINB7ex3-R1	TGAACTCCTGGGCTCCAGTC	
SERPINB7ex4-F1	AGATGTATGTGGCCTTGTTTG	339
SERPINB7ex4-R1	GAAAGACACAAGCCTTTGTTCAG	
SERPINB7ex5-F1	TGAACCTTTGAATAAAGCAGTCG	328
SERPINB7ex5-R1	AGGAGGAGCTGTTCCTTGTATG	
SERPINB7ex6-F1	AAAGGGCCTAGAAAGTGCTGGA	373
SERPINB7ex6-R1	CCTGCAAAGGAATACGATTGTGG	
SERPINB7ex7-F1	AAAATCTGCAGGGTCAACTG	377
SERPINB7ex7-R1	TCTCTAGTATCTCAATACCCTGAAATC	
SERPINB7ex8-F1	GAACACAAATATCCAGGAAGCG	570
SERPINB7ex8-R1	GACTTGTGGTGGTTCTTTGATG	
SERPINB7ex8-F2	GTTTAGAGCTGACCACCCATTC	489
SERPINB7ex8-R2	GCAGGGCTTATTTCCTAGATTG	

*SERPINB7*プライマー（表 2）

WES 解析

家系 10 における 4 人の罹患者および 2 人の非罹患者について、WES 解析を施行した。エクソームは SeqCap EZ Human Exome Library v2.0（Roche NimbleGen, Madison, WI, U.S.A.）を用いて回収および濃縮し、HiSeq2000 systems（Illumina, San Diego, CA, U.S.A.）を用いて解析、塩基配列決定した。この家系における疾患責任変異の同定のための、検出された遺伝子変異の抽出および絞り込み手順については結果の章で詳述する。

***SERPINB7*スプライス変異産物の検討**

NPPK で認められた *SERPINB7* の c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A のスプライシング変異がスプライシングにどのような影響を与えるかを検討するため、異常スプライス産物の同定を行った。

c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A 変異を認めた 2 人の患者の手掌皮膚からまず mRNA を抽出した。RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて mRNA を抽出精製した後、SuperScript TMⅢ Reverse Transcriptase（Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.）を用い、cDNA へと逆転写を行った。得られた cDNA を KOD -Plus- Kit （Toyobo, Japan）を用いて PCR で増幅し、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit（Invitrogen）を用いて平滑末端クローニングの後、その塩基配列を確認した。方法を以下に示す。

皮膚からの mRNA 抽出：

採取した皮膚を氷冷した生理食塩水で洗浄し血液を洗い流し、さらに皮下脂肪や真皮成分を取り除いた。Buffer RLT （RNeasy mini kit：Qiagen）が 600 µl 入ったビーズ入りチューブ（ジルコニアビーズ A.2001.HRS, Sarstedt, Nümbrecht, Germany）に切り取った皮膚を入れ、-80℃で凍結させたのち、室温で融解させた。次に、Precellys ® 24 lysis/homogenizer（BertinTechnologies, France）を用いて、5500 rpm, 30sec×2（各破砕過程のインターバルを 30 秒とる）の条件で細胞を破砕し氷上で 10 分間静置した。その後、4℃、14000 rpm の条件で 10 分間遠心し、上清を回収し、RNeasy mini kit（Qiagen）を用いて RNA を抽出、精製した。得られた RNA は滅菌水に溶出させた。

cDNA 用プライマーの作成：

SERPINB7 cDNA 用の forward および reverse プライマーを作成した。

forward；5’- TCTTAGGAGGTAGGAGGCAGG-3’（エクソン 1 中に設定）

reverse；5’- AGAGAGGTCATTCTCAGGCAG-3’（エクソン 7 中に設定）

増幅断片長；806bp

逆転写およびクローニング解析：

c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A それぞれの mRNA の 10µl（1ng/µl）を 50ng/µl Random hexamer 1µl、 10 mM dNTP mix 1µl および DEPC 処理水 1µl（いずれも Invitrogen）で 65℃、5 分の変性後、急冷した。SuperScript TMⅢ Reverse Transcriptase（200 units/µl）1µl、RNase OUT Recombinant RNase inhibitor 1µl、5×First-Strand Buffer 4µl および 0.1M dithiothreitol（DTT）（いずれも Invitrogen）を用い、25℃5 分、50℃60 分、70℃15 分処理し cDNA へと逆転写を行った。逆転写産物を RNaseH（1U/µl）（Invitrogen）で 37℃20 分処理した。cDNA（100ng/µl）を 3µl（300ng）、各種 forward、reverse プライマー（10µmol/l）を各々1.5µl（15pmol）、KOD-Plus-

（Toyobo）1μl、10×PCR Buffer for KOD-Plus- 5μl、2mM dNTPs 5μl、25mM MgSO4 2μl および滅菌水 31μl を使用し、サーマルサイクラー（Veriti® 96-well, Applied Biosystems）を用いて PCR 法により増幅した。PCR 増幅反応条件は、94℃2 分→（94℃15 秒→60℃30 秒→68℃1 分）×35 サイクル→68℃5 分で行った。電気泳動にて PCR 産物が増幅したことを確認した。上記で増幅された cDNA の PCR 産物（インサート断片）を QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen）を用いて精製およびエタノール沈殿を行った。次に、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit（Invitrogen）を用いてライゲーションを行った。ここでは PCR 産物 4μl、ベクターpCRⅡBlunt-TOPO 1μl および Salt solution 1μl（いずれも Invitrogen）を用いた。ライゲーション産物の全量 6μl を E coli HST08 premium Competent cells（Takara, Japan）120μl と混合し、氷上に 30 分間静置した後、42℃のウォーターバスで 40 秒ヒートショックを行い氷上に静置した。SOC 培地（Takara）に混合し、37℃で 1 時間振盪培養後、用意したカナマイシンプレート（50μg/ml）に上記大腸菌を塗布し、37℃16 時間倒置培養した。増殖した大腸菌のコロニーを、c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A のそれぞれのサンプルにつき 12 個採取した。そこから QIAprep®Spin Miniprep kit（Qiagen）を用いてプラスミド DNA を抽出した。0.8%アガロースゲルで *SERPINB7* のそれぞれの変異が挿入されたプラスミド DNA が抽出されていることを確認し、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit（Invitrogen）の foward プライマー；5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' および reverse プライマー；5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' を用いて、サーマルサイクラーを使用してシークエンス反応を行った。条件は、96℃2 分→（96℃10 秒→50℃5 秒→60℃4 分）×25 サイクルで行った。得られた PCR 産物のエタノール沈殿を行い、ABI PRISM 3130 遺伝子アナライザー（Applied Biosystems）を用いて解析した。

SPPK 患者における原因遺伝子の解析

SPPK 患者の抽出

北大皮膚科で集積されていた PPK 患者の臨床写真の精査を行い、臨床的に SPPK と考えられる 1 症例が見いだされたため、経験を積んだ 2 名の皮膚科医が実際に患者を診察し、臨床所見および家系図より常染色体優性遺伝の遺伝形式をとることから診断した。

DSG1, DSP および *KRT1* 遺伝子変異検索

前述の Sanger sequencing analysis で記載した通り、患者の DNA を末梢血から抽出した。以下のプライマー（表 3，4，5）および PCR 条件で同様に PCR を行い、変異の検索を行った。また、ヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、患者から書面による同意を得て施行した。

また、前述の Sanger sequencing analysis で記載した健常コントロール 50 人の DNA を用いて、本研究で同定された *DSG1* の変異について同様にその有無を検索した。

Exon	プライマー名	配列（5’→3’）	増幅断片長(bp)
5’UT+1	DSG1 1F	CTCCCTTGGTCTTGGATG	128
	DSG1 1R	CAATGGGCACGATTATGAAG	
2	DSG1 2F	GACTCACAAGCCTATGGTTTC	167
	DSG1 2R	GGAAAAATGGATTTGTTATATATTAC	
3	DSG1 3F	ATACCTTTCTTTATTGCTGTC	185
	DSG1 3R	GTTATGCTTTGGAGTTG	
4	DSG1 4F	CACATGCAACAACTCTC	384
	DSG1 4R	GGATGCTCGTGAATTAAGA	
5	DSG1 5F	CATAATGCTCAAAGTAAGAAC	235
	DSG1 5R	GGAAGCCACTACATTAC	
6	DSG1 6F	GAAGACAGTGAAGTCCACATC	333
	DSG1 6R	GTTCCTTTGAGACCAAAAACCCAC	
7	DSG1 7F	TGATATTGCCTGTAATATG	239
	DSG1 7R	ATGTAAGCAGAATTGTT	
8	DSG1 8F	AACATTACAGTATAAGC	356
	DSG1 8R	GCCAAGTTTGTGAAATG	

9	DSG1 9F	GATTTTCTTTCACCTGGAACG	366
	DSG1 9R	GTTCAATATGTAAGGAAAATTAG	
10	DSG1 10F	GCTCCATATTGCTAAGACT	434
	DSG1 10R	GTCTATAATGCCCAGTG	
11	DSG1 11F	CTTCCATTTTGAACGTTATTAC	341
	DSG1 11R	GGGACACATATACATAGG	
12	DSG1 12F	GCACCCAGTGCTAACTC	253
	DSG1 12R	GCGGCCATCTTGGTTCA	
13	DSG1 13F	TAGTATGACTGCAGAAG	184
	DSG1 13R	GACTTCCTACTTAAGCA	
14	DSG1 14F	CACATATTACAAGGCAAGTTG	472
	DSG1 14R	AAGTGCTCAGGTCAGAGCT	
15	DSG1 15aF	TCCTCTTTGGAAATGCTCTGG	314
	DSG1 15aR	GTCCACTAACAACGGGCTCTG	
	DSG1 15bF	TTGATCCTTCTTGGCCACCAC	351
	DSG1 15bR	CTCGCAAGTCAGGCATCTCTA	
	DSG1 15cF	ACGATAACCGACCAGCATCAA	343
	DSG1 15cR	GTGGTGCCACTAATTCCAGTT	
	DSG1 15dF	TAGCCAATGCCCACAATGTCA	365
15+3’ UT	DSG1 15dR	TCTAAACCACAATGACTATGA	

*DSG1*プライマー（表 3）

(Hunt, D. M. *et al*. 2001) [14]

プライマー名	配列（5’→3’）	増幅断片長(bp)
DP e1F	GGTAGCGAGCAGCGACCTC	482
DP e1R	TCAGGACACCCGGTCCTGCT	
DP e2F	AGGGTCTCACAGGAGTGGTT	339
DP e2R	GCGTGTCTCTAAACACTACGTG	
DP e3F	GGTTCATGAATCTCCGTCTG	439
DP e3R	GGAACATTTGTGCTGCCTTC	
DP e4F	CATTTGTAGCTTCTCTATTGACAC	413
DP e4R	CACAGGTTTGGGCTGTTC	
DP e5F	GTAAAGCCGTGATGGTGTG	340
DP e5R	CTAAACATTTCCAGTCTTCTGGG	

DP e6F	CTATGGAGGGATCTGAGG	275
DP e6R	TAGCATCGATGAACAGGTG	
DP e7F	GGGACCACAGGTTTAATC	372
DP e7R	GGCTGAATTGCAAGTGGC	
DP e8F	TTCTTTGGCATTGTTCATTTCC	334
DP e8R	AGTTGGCACGGCTTTAAGTC	
DP e9F	CTGCTTACTAGCTTTCATGC	338
DP e9R	AATCTATGCTACTCTGCACTC	
DP e10F	CCGCTGCCACATACCTAA	412
DP e10R	AATGCTTGCTTGGCTCTGG	
DP e11F	CAATTGATGCAACTGCAGTG	390
DP e11R	CAAAGACATTGACTGTGGTG	
DP e12F	CGCATGTGTTCATCTCTG	360
DP e12R	GGCATCGTGTGTCTAAGC	
DP e13F	CTTTATCAGTGACTGTTGTAGG	370
DP e13R	GACTTGCTTGACGAGACAC	
DP e14F	CCATCTAGTGGGTGGCA	405
DP e14R	CTGGCTATATAGCATTCAGAG	
DP e15F	GCCAGTGTTCTTCGTGCAC	515
DP e15R	GGAAATCCTGCCAGAAGCC	
DP e16F	CATTTCACTGTGTCTATGTG	410
DP e16R	GCTCTCCAAACCACAGAA	
DP e17F	GCTTTGACGTTGTTCTCTTTC	370
DP e17R	TGTCAACCTGTGTGGCCA	
DP e18F	CTTTGCCGCCCAATTTG	418
DP e18R	GAGCATCTGTTACGCCTAAC	
DP e19F	GTGCTGCTATGAACTATTCATG	418
DP e19R	CATCATTTCAAACCTAGGCAC	
DP e20F	GGGACAAGTACATGTAGTAA	313
DP e20R	TGCTATCCTCAGGAAGTG	
DP e21F	AGTCTTTGGAGTGGGCAA	323
DP e21R	GGTAAGGAAGACAGGCAG	
DP e22F	GGAATGACACACTAAAGAAGA	400
DP 22R	TGGAGCATGGAAGTAACC	
DP e23aF	GAAATGAGAATGCACATTGGTC	345

DP e23aR	ATAAGTCAGTCGGGTGATCT	
DP e23bF	GAGCTGGATGGGAAGTCGGC	600
DP e23bR	CTGCATTATCTCAGAGCCAC	
DP e23cF	TCTTGCAGGCCACTGAGCAG	590
DP e23cR	CTGAGTGACTTGTCTCAGCT	
DP e23dF	GGCTCTGAGGTGTCTCAGAG	550
DP e23dR	CCAGCTGCTGGGTCAGGTTG	
DP e23eF	GCTGGAGGAAGAGCTGGAAG	698
DP e23eR	GCATCTATTTAAGCAGAAAGAG	
DP e24aF	CAAGCTCACAGTGTATCCAG	575
DP e24aR	CTGATATCGGGAGCGTTCTG	
DP e24bF	CAGGCGTAAGCTGGAGGATT	560
DP e24bR	ATGGATCATCAAAACCAGTG	
DP e24cF	AGCTCGGGACCTCATTGACT	560
DP e24cR	TGCAGCTTGAACCCTGGAGG	
DP e24dF	CAATGAACTGGAATCTGGTC	700
DP e24dR	CACTCTACGCTTCCTGAGGG	
DP e24eF	GGCTCTGTCTTCTGCCTCTG	610
DP e24eR	TCAACGATGCCCCGCTCTAT	
DP e24fF	AGCCCCATTGCAGCCATCTT	440
DP e24fR	CTCTGTGCGGCGCGGCCATC	
DP e24gF	GTTGACCCGGAAGTGCATGG	511
DP e24gR	CTATCACTCTACTGCAAGCACC	

***DSP*プライマー（表 4)**

（Whittock, N. V. *et al.* 1999）[22]

プライマー名	配列（5’→3’）	増幅断片長（bp）
KRT1ex1F3	CCGCTGACTCTAGAAGACCAAGCCCAATTTCTTCC	797
KRT1ex1R	TTCAAACCTGCGTGTGTTTTGACTGCACCGATCCC	
KRT1ex2F2	CTCCATGGCTATGAGACTCCA	357
KRT1ex2R2	CATGCTGCTTCATGATCTTAGC	
KRT1ex3F2	AGGCAATGCCACCTTTAGTT	503
KRT1ex3R2	ACCTGTGAGGGGATTCTCCAA	
KRT1ex4F1	CTCACAGGTAATGAGAGGGAC	231

KRT1ex4R1	AGATCGTTGTGGGTTCCGGC	
KRT1ex5F	GCCTGAACCCACAACGATTC	360
KRT1ex5R	CACATACATGAGATAACACAGG	
KRT1ex6F1	CCTGTGTTATCTCATGTATGTG	246
KRT1ex6R1	CCATTCCATACAGCTGAGTG	
K1 e7.F 2012	TCGACAATGTCAAGAAGCAG	384
K1 e7.2R 2012	CCCCTCTAAAGATGCCGACT	
KRT1ex8F2	CAGATGGGGAAAGTCTTCA	252
KRT1ex8R2	ACCTCCACTGATGGTGGTGT	
KRT1ex9F2	GTCGATTTCTCAGGGGCATG	702
KRT1ex9R2	CTGAGATTGCCACTGATCTG	

***KRT1*プライマー（表 5）**

PCR 条件

DSG1：94℃5 分→(94℃45 秒、49℃45 秒、72℃60 秒)×30 サイクル→72℃5 分

DSP：97℃3 分→(97℃1 分、56℃1 分、72℃1 分)×40 サイクル→72℃10 分

KRT1：94℃5 分→(94℃30 秒、56℃45 秒、72℃1 分)×35 サイクル→72℃5 分

EGFR 免疫組織染色

SPPK 患者および非罹患者各 1 名の手掌病変部皮膚のパラフィン包埋組織切片を、抗 epidermal growth factor receptor（EGFR）抗体、抗 involucrin（IVL）抗体、抗 Ki-67 抗体および抗 phosphohistone h3（PHH3）抗体を用いて免疫染色し、それらのタンパク質の発現を比較した。

免疫染色に使用した、抗体、染色機材および染色試薬は以下の通りである。

抗体:

抗 EGFR 抗体：CONFIRM™ anti-Epidermal Growth Factor Receptor (3C6) Primary Antibody, （Ventana Medical Systems, AZ, U.S.A.）

抗 IVL 抗体: クローン名　SY5 （Leica biosystems, Nussloch, Germany）

抗 Ki-67 抗体: クローン名　MIB-1（Dako, Denmark）

抗 PHH3 抗体: クローン名　ラビットポリクローナル抗 PHH3 IgG（Upstate Biotechnology, U.S.A.）

染色機材は、抗 EGFR 抗体には、Benchmark XT platform （Ventana）を、抗 involucrin 抗体、抗 Ki-67 抗体および抗 PHH3 抗体には、Autostainer Link 48（Dako）を用いた。

染色試薬は、抗 EGFR 抗体には、iVIEW™ DAB Detection Kit （Ventana）を、

抗 involucrin 抗体、抗 Ki-67 抗体および抗 PHH3 抗体には、EnVision FLEX（Dako）を用いた。

電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察試料作製は以下の手順で行った。

ブロック作製

1. 細切したサンプルを 5%グルタールアルデヒド溶液で固定。
2. 固定したサンプルを 0.1 M cacodylate buffer 中で、4℃下、一晩回転ローターで攪拌。
3. cacodylate buffer を除去後、オスミウム溶液中、4℃下、1 時間静置。
4. オスミウム溶液除去後、1%酢酸ウラン溶液中で 4℃下、1 時間静置。
5. 1%酢酸ウラン溶液を除去後、サンプルの内部の水分をエタノール→酸化プロピレン→エポキシ樹脂の順で置換するため、以下の順で各溶液に浸し規定時間回転ローターで撹拌した。

①70%エタノール 20 分間　② 80%エタノール 10 分間　③90%エタノール 10 分間　④95%エタノール　10 分間　⑤100%エタノール　10 分間　⑥100%エタノール　10 分間　　⑦100%エタノール　10 分間　⑧100%エタノール : 酸化プロピレン＝1 : 1　20 分間　⑨酸化プロピレン　15 分間　⑩ 酸化プロピレン 15 分間　⑪酸化プロピレン : solution 2＝2 : 1　1 時間

6. ゼラチンカプセル（応研商事 : 製品番号 08-1002, Okenshoji, Japan）に包埋し、80℃で 4 日間以上静置し樹脂を硬化させた。

切片作製

1%トルイジンブルーで染色後、目的の切片を探し、ガラスナイフで面出しとトリミングを行い、ダイヤモンドナイフで超薄切片を作製した。フォルムバールで処理したグリットにサンプルをのせ、室温下で一晩乾燥させた。

電子染色

グリットの試料側を、1%酢酸ウラン溶液側にして溶液に浮かべ 10 分間静置した後、脱炭酸水で繰り返し洗浄した。水分を充分に除き、クエン酸鉛溶液にグリットを浮かべ、7 分間静置した。再び脱炭酸水で洗浄した後、濾紙上で充分乾燥させた。

実験結果

日本人 NPPK 家系１から９の臨床所見および特徴について

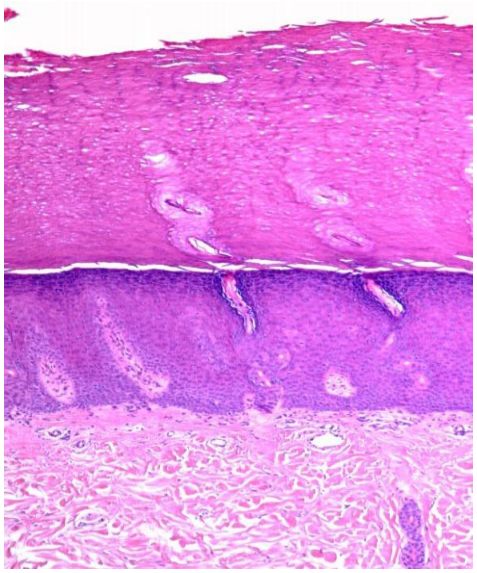
NPPK の日本人９人の罹患者とその家族が解析された。全ての罹患者の掌蹠全体に左右対称性に境界明瞭な過角化または鱗屑を伴う紅斑が認められ、それらは手足の背側、手関節、足関節およびアキレス腱部にまで進展していた（図 4a、 b)。紅斑と過角化の範囲は患者間で差異が認められた。手関節、足関節およびアキレス腱部では、過角化よりむしろ紅斑の方がより著明であった。全ての罹患者は入浴時の掌蹠角質の白色の浸軟しやすさを示していた。一部の罹患者には、肘や膝（図 4c、d）にも紅斑が認められた。掌蹠の多汗はほぼ全ての罹患者において観察された。全ての罹患者は 3 歳までに発症しており、8 人が 10 歳までに、1 人が 20 歳までには非進行性の経過を示していた。家系 1、5、6 および 7 の罹患者は組織学的に検討され、過角化、表皮肥厚、顆粒層肥厚が認められたが、顆粒変性は認められなかった（図 5a)。角層の下層には不全角化が認められた（図 5b)。家系図はいずれも常染色体劣性遺伝形式を示していた（図 7 で変異検索結果とともに示す)。また、罹患者の家系はいずれも近親婚でなかった。罹患者の詳細な臨床所見は考察の章で表 6 において遺伝子型とともに示す。

NPPK 症例臨床所見（図 4a）

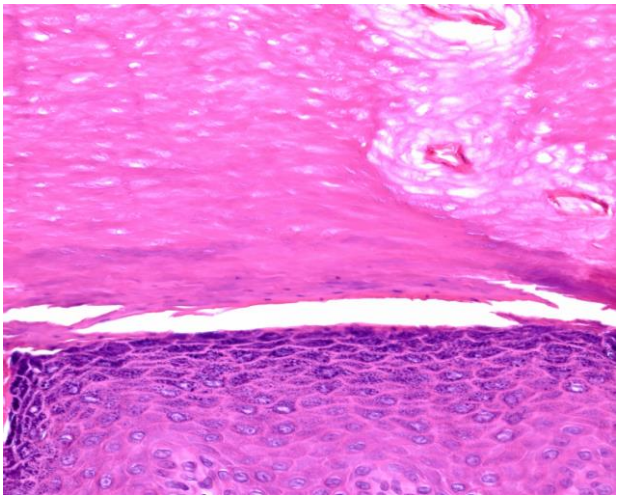
（図 4b）

（図 4c）

（図 4d）



組織所見　弱拡像（図 5a）

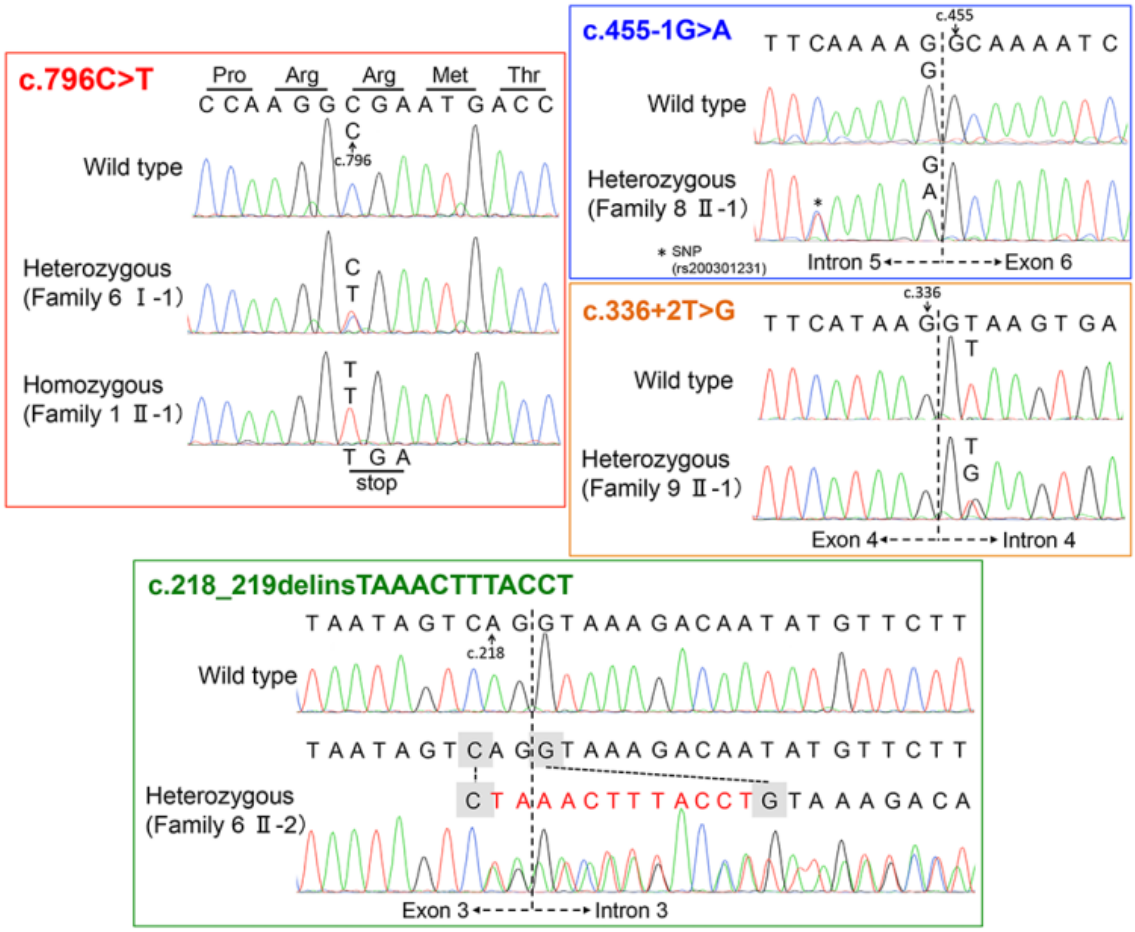


強拡像（図 5b）

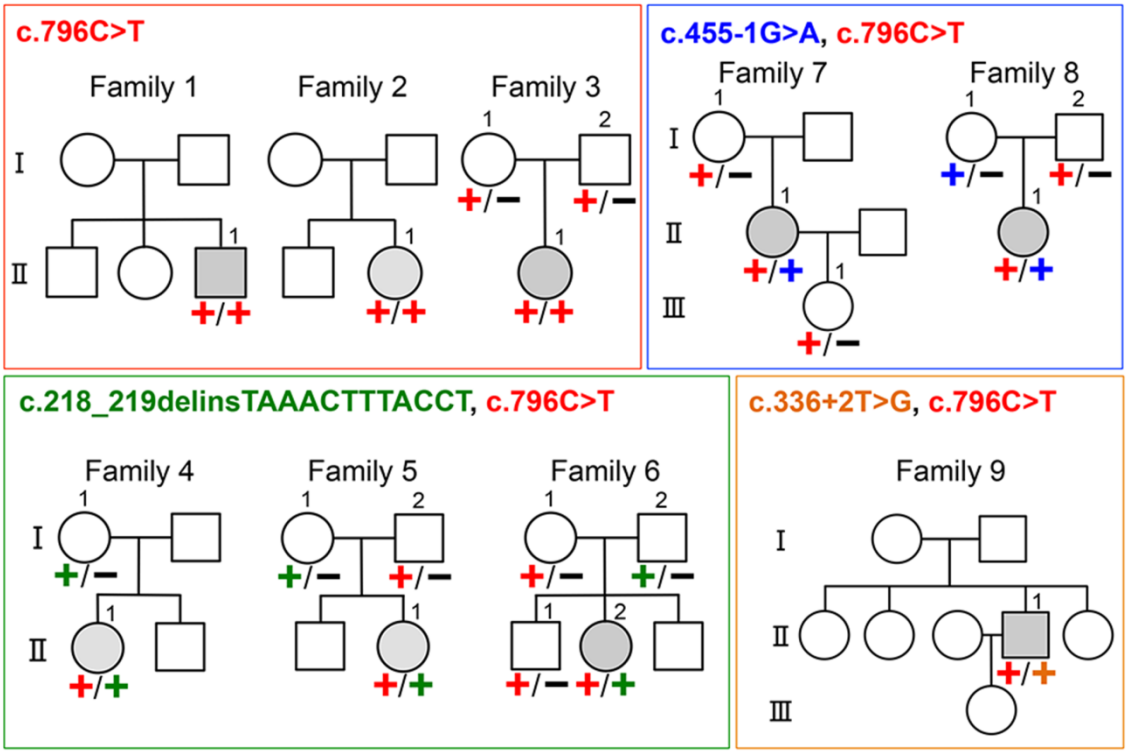
本研究で同定された、*SERPINB7*における

新規変異および既報告変異

*SERPINB7*の変異検索を行った結果、遺伝子内に 1 つの新規変異と 3 つの既報告変異の計 4 つの機能喪失変異が同定された（図 6）。全ての罹患者が*SERPINB7*変異をホモ接合性または複合ヘテロ接合性に有しており、一方、本研究で調べられた非罹患者はいずれも罹患者で同定された変異のうちの 1 つをヘテロ接合性に有していた（図 7）。家系 1 から 3 の罹患者はナンセンス変異、c.796C>T（p.Arg266Ter）についてホモ接合性であった（図 7）。家系 4 から 6 の罹患者は c.796C>T（p.Arg266Ter）と c.218_219delinsTAAATTTACCT（p.?）を複合ヘテロ接合性に有していた（図 7）。家系 7 と 8 の罹患者については、c.796C>T （p.Arg266Ter）と c.455-1G>A（p.?）との複合ヘテロ接合性であった。家系 9 では、罹患者は c.796C>T（p.Arg266Ter）と c.336+2T>G（p.?）との複合ヘテロ接合性であることが判明した。c.336+2T>G（p.?）は NPPK の原因となる変異としてはこれまで未報告のものであり、スプライス供与部位の変異であった。c.336+2T>G（p.?）は、日本人健常コントロール 50 人において保有されていなかった。



同定された 4 個の *SERPINB7* 変異（図 6）



解析された 9 家系と *SERPINB7* 変異（図 7）

- **c.796C>T** (p.Arg266Ter):
  - 9家系のすべての罹患者がホモ接合性またはヘテロ接合性に保有される
  - 3家系はホモ接合性に保有される

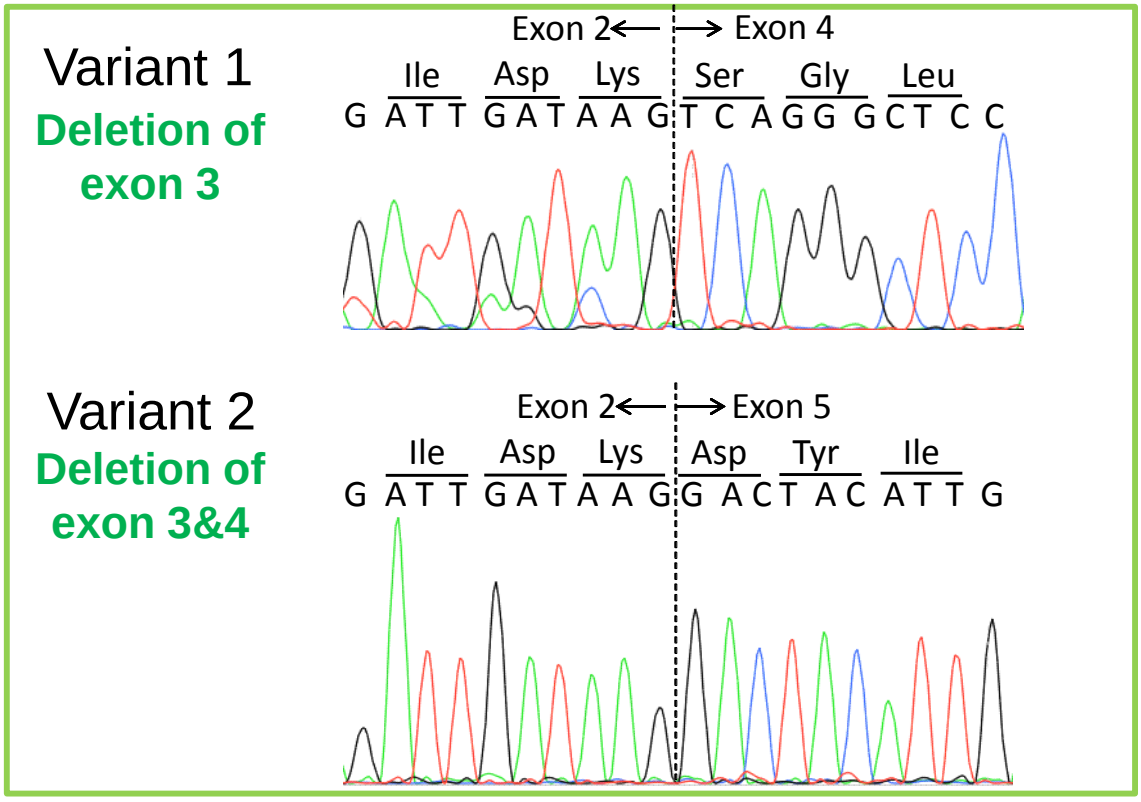
- **c.218_219del2ins12**: 3家系
- **c.455-1G>A**: 2家系
- **c.336+2T>G (新規変異)**: 1家系

→ いずれもが, c.796C>Tとの複合ヘテロ接合性

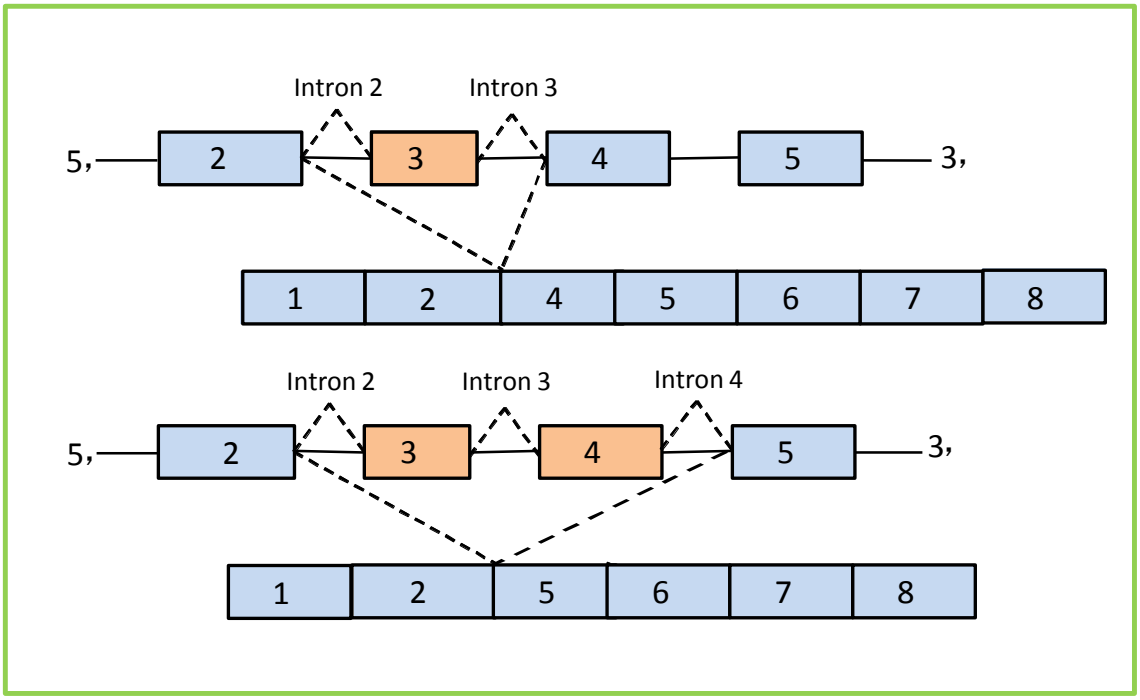
c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A

の異常スプライス産物の同定

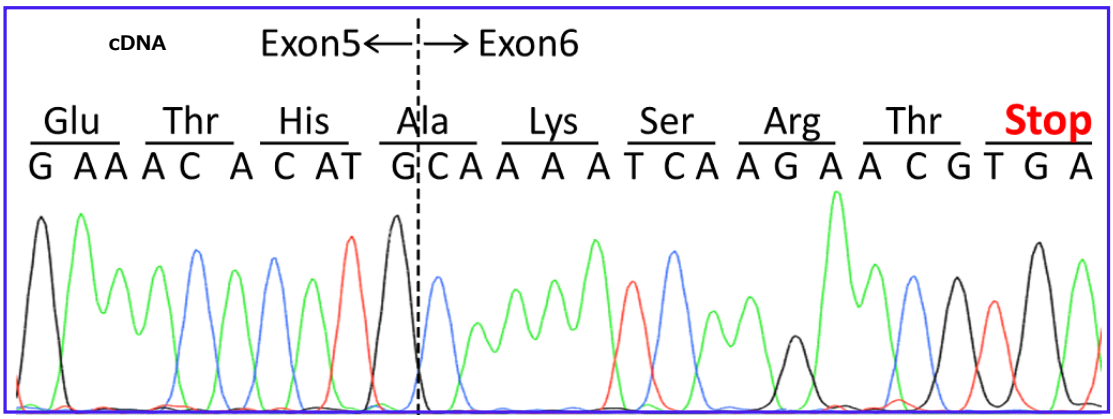
今回 NPPK 患者において同定されたスプライスサイトの 3 つの変異の病原性を示すため、これら変異のうち、c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A について、それぞれの患者の手掌の皮膚（および末梢血）を採取し、抽出した mRNA から cDNA を解析し、変異によって生じる異常スプライス産物を同定した。その結果、エクソン 3 の 3’末端のスプライス供与部位での欠失・挿入変異である c.218_219del2ins12（c.218_219delinsTAAATTTACCT）では、フレームシフトを伴わない、エクソン 3 あるいはエクソン 3 と 4 が欠失（in-frame deletion）する 2 パターンの異常スプライス産物；p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del が生じていた（図 8a、 b）。イントロン 5 の 3’側のスプライス受容部位での 1 塩基置換である c.455-1G>A では、6 コドン下流で premature termination codon（PTC）の p.Gly152AlafsTer6 を生じていた（図 9）。もう 1 つのスプライスサイト変異である c.336+2T>G については、患者が国内の遠隔地に在住しているため、今回は mRNA 抽出のための手掌皮膚の採取を行うことができなかった。



c.218_219del2ins12 は 2 種類の in-frame エクソン欠失を生じた（図 8a）



c.218_219del2ins12 による 2 種類の in-frame エクソン欠失；
p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del（図 8b）



c.455-1G>A は PTC；p.Gly152AlafsTer6 を生じた（図 9）

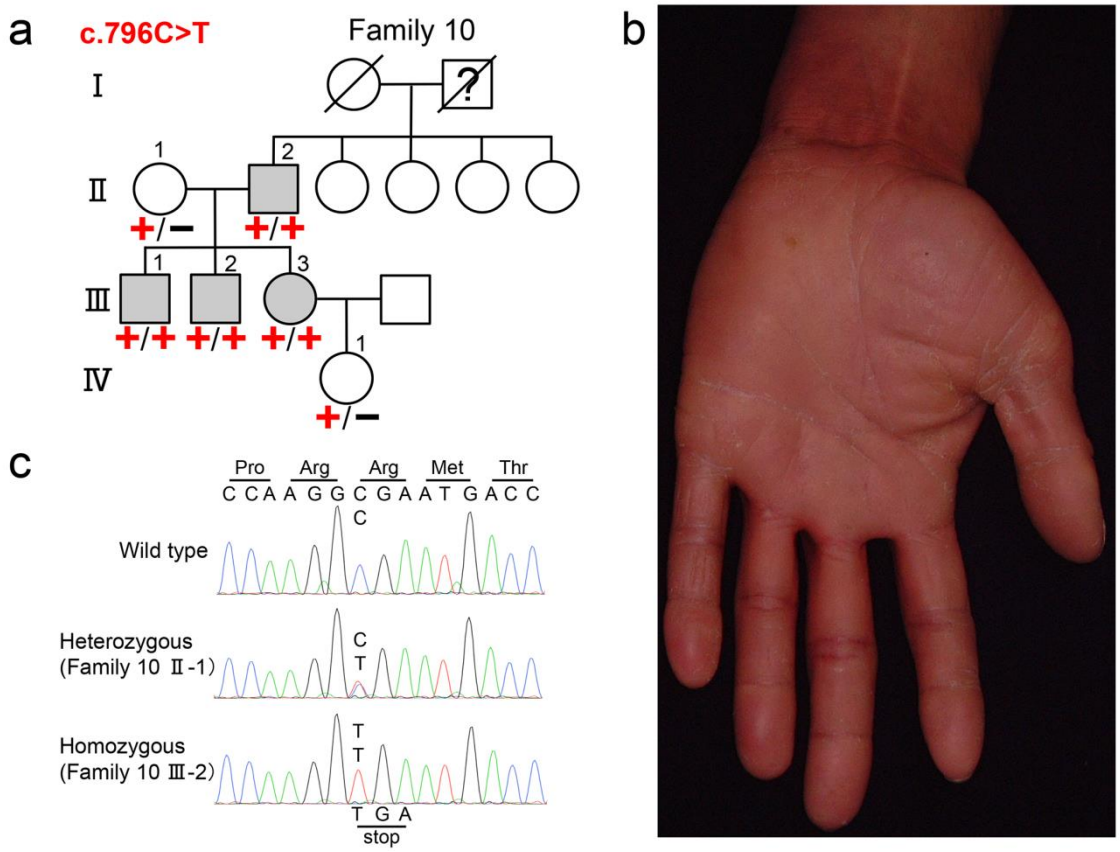
NPPK は偽優性遺伝形式を示しうる

我々は、さらにもう 1 家系（家系 10）の遺伝子解析を行った。この家系では、4 人がびまん型 PPK の症状を呈し、常染色体優性遺伝性の PPK が疑われた（図 10 a）。発端者の兄には生下時からの脳性麻痺があるが、家系内にその他の特別な既往歴はなかった。この家系において全ての罹患者は、掌蹠の境界明瞭な紅斑と肥厚があり、それらは手足の背側、手関節部、足関節部およびアキレス部にまで進展していた（図 10 b）。兄と妹では膝に症状があったが、肘に関してはいずれの罹患者も病変を有していなかった。掌蹠の多汗は発端者と兄に認められた。発端者の左手掌からの皮膚生検では、過角化、表皮肥厚、および軽度の顆粒層肥厚があり、顆粒変性の所見は無かった。更に、発端者は、角層の下層に不全角化の所見を呈していた。これらの所見は NPPK に合致するが、常染色体優性遺伝形式を呈していた。

続いて、罹患者 4 人と非罹患者 2 人について、この家系の PPK の遺伝的原因を同定するために、WES 解析を施行した。その結果、1 サンプルにつき平均 5.06Gb、中間リード depth が 40.7 およびターゲット領域の 88%以上が最低限 15 回以上カバーされる mappable 塩基配列データが得られた。同定された変異の中で、我々は主として、ミスセンス変異やナンセンス変異、スプライスサイト変異、挿入欠失変異といったコード領域内の変異に注目した。得られたこれらの変異の平均個数は 1 サンプルにつき 9,598 であった。浸透率 100%の常染色体優性遺伝形式と想定して、罹患者全員に保有されるが非罹患者には保有されないヘテロ接合性の変異を可能性のある候補として抽出した。更に、dbSNP135 データベースに存在する変異、および 1,000 Genome Project Database から 89 人の日本人においてマイナーアレル保有率（minor allele frequency ; MAF）が 0.01 を超える値の変異を除外した。この抽出手順では、ナンセンス変異、フレームシフト変異およびスプライスサイト変異で条件に当てはまるものは残らなかった。

しかし、驚くべきことに、罹患者全員が *SERPINB7* の c.796C>T（p.Arg266Ter）をホモ接合性に保有していることが判明した（図 10 a）。家系内の非罹患者がともにこの変異についてヘテロ接合性であったことを踏まえると、*SERPINB7* のこのホモ接合性の機能喪失変異が本家系の PPK の原因と考えられた。罹患者および非罹患者全員の、*SERPINB7* における変異保有の有無は Sanger sequencing により確認された（図 10 c）。

これらの結果から、我々は家系 10 の罹患者を NPPK と診断し、遺伝形式が偽優性遺伝を示していたものと判断した。罹患者それぞれの詳細な臨床所見は考察の章で示す表 6 にまとめたとおりである。



偽優性遺伝を示した NPPK 家系の解析結果（図 10）

a：家系図および保有された変異　b：罹患者および非罹患者の c.796C>T 変異
c：臨床所見（Ⅲ-2）

解析された SPPK 患者の臨床的特徴について

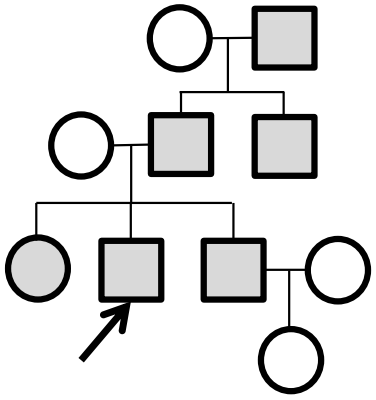
【患者】33 歳、男性

【現病歴】小学生のころから手掌、足底の皮膚が硬いことを自覚していた。剣道をしていた高校生の頃より、特に症状が進み亀裂も生じるようになった。その後、日常生活にも支障をきたすようになり、27 歳時に手掌、足底の過角化を主訴に当科を初診した。

【既往歴】特記すべきことはない。

【家族歴】同様の症状が 3 世代に認められた。その他特記すべきことはない。家系樹は常染色体優性遺伝形式を示している。

【当科受診時現症】掌蹠に過角化を認めた。過角化パターンは手掌、足底の一部に限局した著明な過角化であり、各手指の指腹に沿って特徴的な縦に線状に走行する白色の過角化が認められた。手掌では過角化部分が癒合して不整形な過角化局面を呈していた。関節屈曲部は過角化のため、特に MP 関節では亀裂を生じていた。指腹の線状の過角化の辺縁はやや黄色調で徐々に過角化のない正常皮膚に移行していた。手背への過角化の進展はなく、手背の潮紅は明らかでないが、PIP 関節背側に軽度の過角化がある。爪の肥厚、変形は認めなかった。足底には、土踏まずを避けるように、前足部、踵部および趾尖部の荷重部に一致して著明な過角化局面が形成され、亀裂も認められた。足背への過角化の進展は認めなかった。



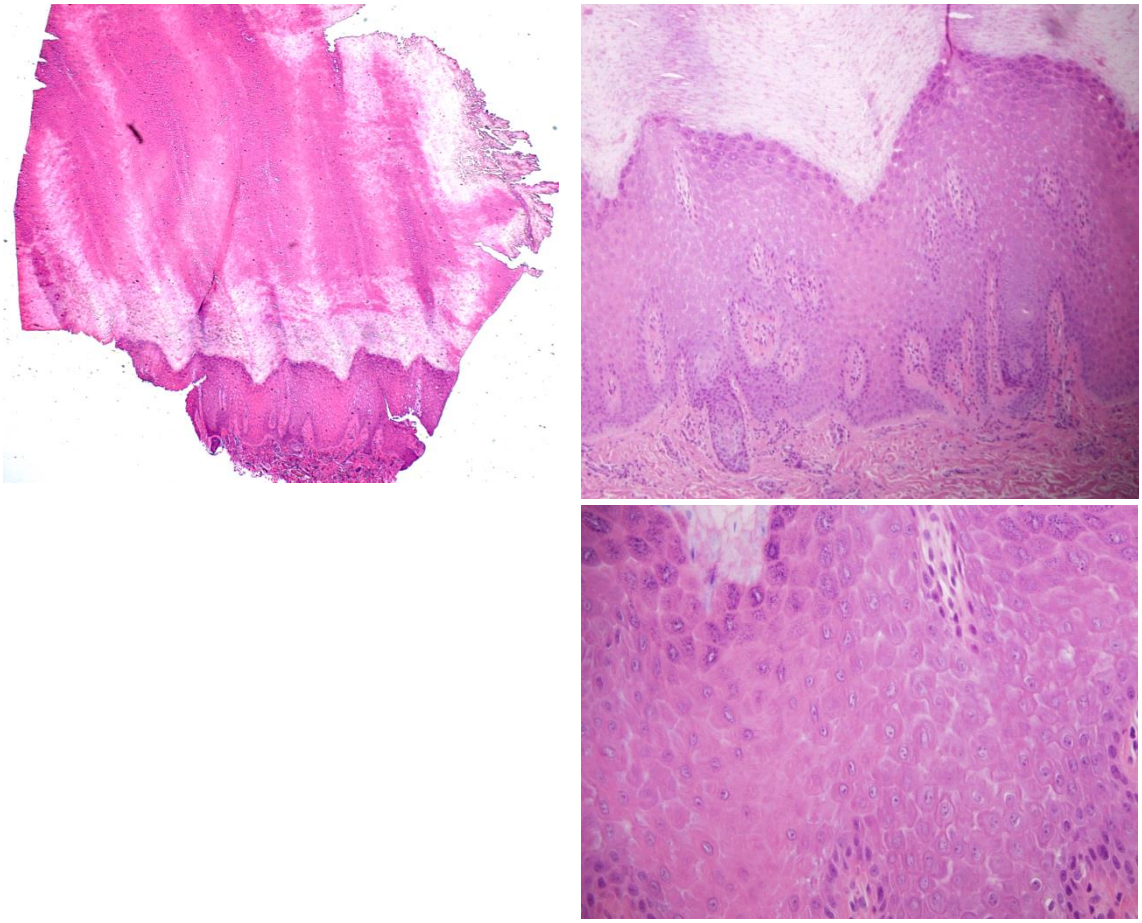
解析された SPPK の家系図（図 11 a）

塗りつぶし：罹患者、　塗りつぶしなし：非罹患者　矢印：発端者

SPPK の臨床写真（図 11 b）

病理組織学的所見

病理組織学的所見としては、HE 染色で著明な過角化が認められた。表皮には乳頭状変化を認め、表皮肥厚を伴っていた。また有棘層上層では有棘細胞がやや類円形を呈し、細胞間隙は若干開大していた（図 12）。

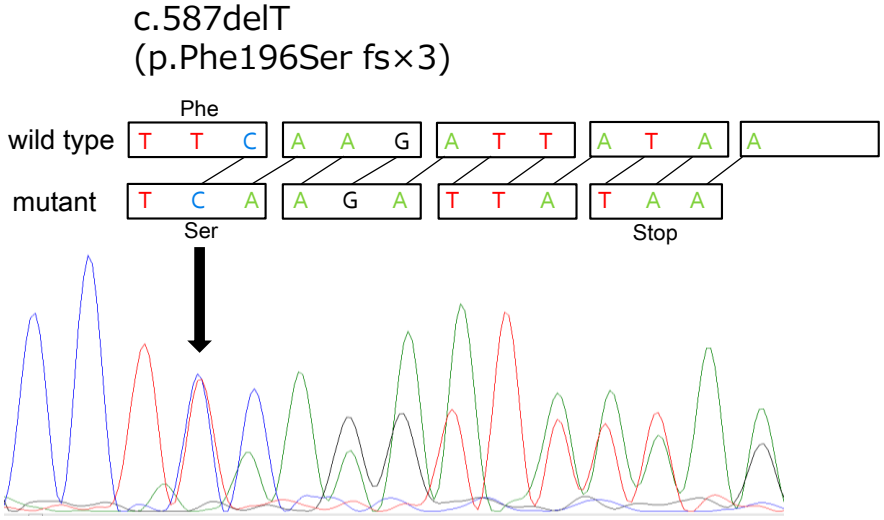


SPPK 患者で認められた病理所見（図 12）

SPPK 患者における *DSG1, KRT1* および *DSP* 遺伝子変異検索結果

線状掌蹠角化症の原因遺伝子として報告のある、*DSG1*、*DSP* および *KRT1* について変異検索を行ったところ、本症例では、*DSG1* のエクソン 6 の、587 番目の塩基 T の欠失によりフレームシフト変異が生じ、その結果、変異から 3 コドン下流に PTC を生じる変異 ; c.587delT（p.Phe196Serfs×3）をヘテロ接合性に同定した(図 13)。保存されている正常人 50 人の DNA での検索を行ったが、同じ変異は存在しなかった。

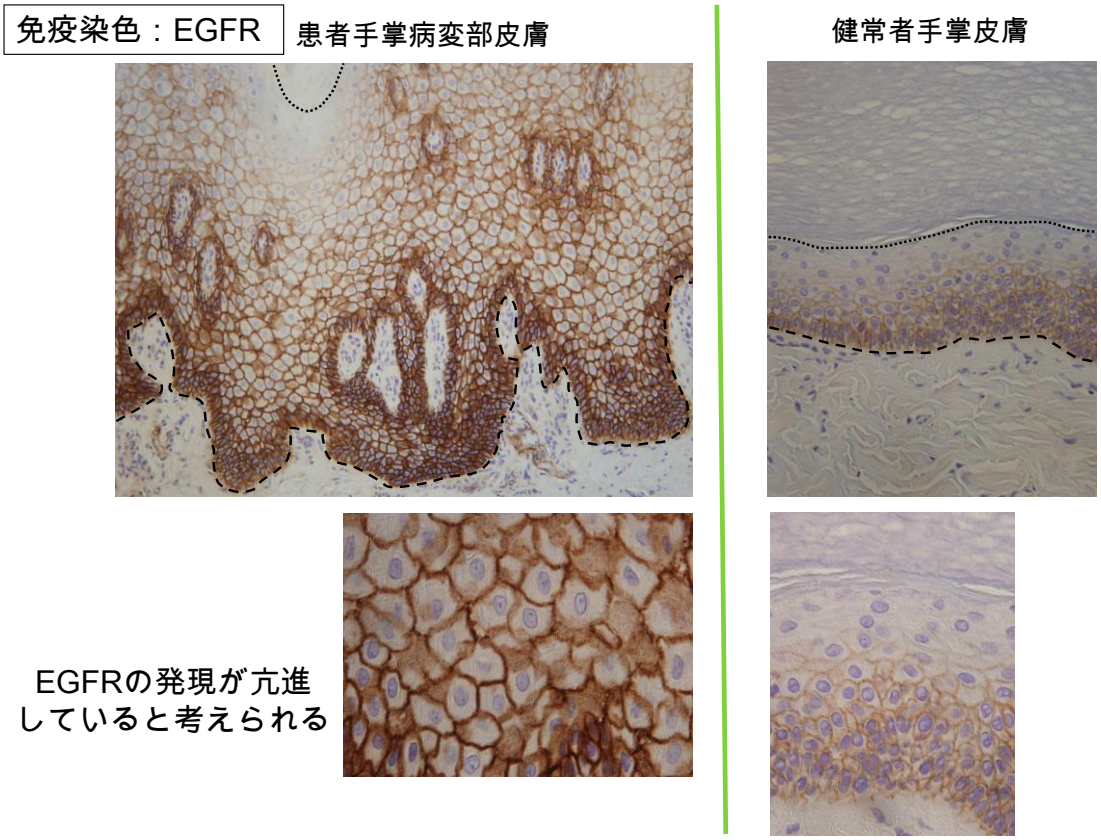
また、患者の *DSP* および *KRT1* のいずれにも変異は見つからなかった。



DSG1 **に早期終止コドンを生じるフレームシフト変異がヘテロ接合性に保有されていた（図 13）**

SPPK 病変部における免疫染色結果

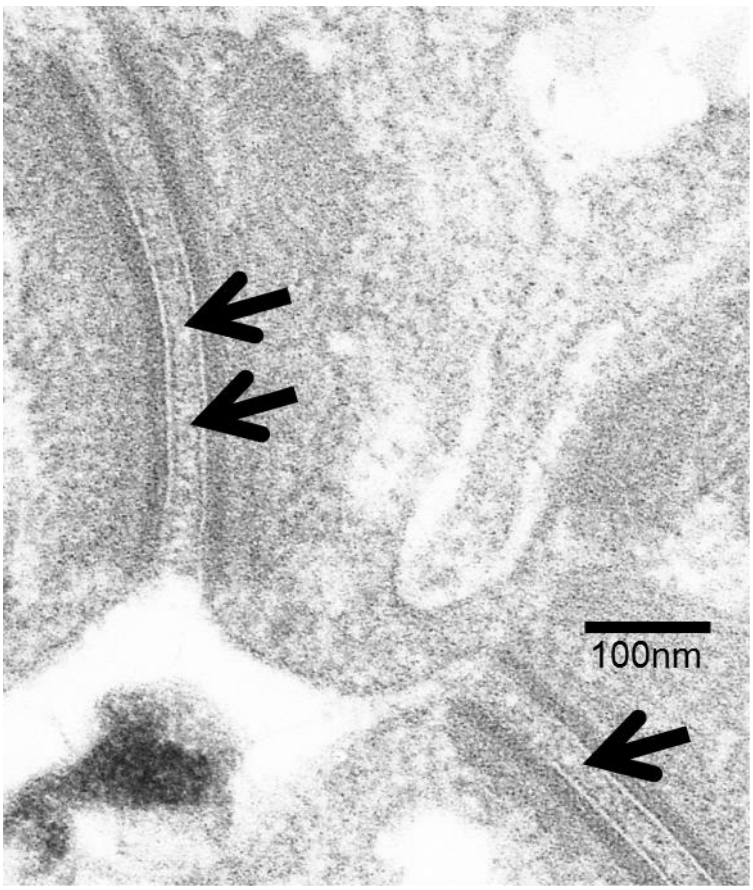
患者手掌の病変部皮膚では、健常者に比して epidermal growth factor receptor（EGFR）が強く染色される像が観察された（図 14）。Involucrin（IVL）、 Ki-67 および phosphohistone h3（PHH3）の染色では健常人との明らかな差異は認められなかった。



SPPK 病変部と健常者の EGFR 染色の比較（図 14）

SPPK 病変部における超微細構造の観察

有棘細胞間の desmosome の desmoglea には、正常ならば存在する mid-line が消失していた（図 15）。



SPPK 病変部の電顕所見

矢印：desmosome の desmoglea で mid-line が消失している（図 15）

考察

長島型 PPK（NPPK）の病因としての *SERPINB7* 変異

本研究では、我々は NPPK10 家系を解析し、*SERPINB7* における機能喪失変異を 4 個同定した。そのうち 3 個は既報告、1 個は未報告の変異であった。既報告の 3 個の変異は、c.796C>T（p.Arg266Ter）と c.218_219delinsTAAATTTACCT および c.455-1G>A であった[4]。変異 c.796C>T（p.Arg266Ter）はナンセンス変異であり、その他の変異についても、c.218_219delinsTAAATTTACCT はスプライス供与部位の、また c.455-1G>A はスプライス受容部位の変異であり、これらは病原性を有するものと強く示唆された。c.218_219delinsTAAATTTACCT の異常スプライス産物は、フレームシフトを伴わない、エクソン 3 の欠失およびエクソン 3 とエクソン 4 のインフレームの欠失（in-frame deletion）；p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del であることが判明した。また、c.455-1G>A による異常スプライス産物が早期終止コドンを生じる p.Gly152AlafsTer6 であることが判明した。

SERPIN タンパクにおいて、エクソン 8 のアミノ酸残基 331-352 にコードされる RCL が、標的タンパクは不明であるものの、その protease 阻害活性を担う重要な部位と考えられてきた[23]。PTC を生じる c.796C>T（p.Arg266Ter）と c.455-1G>A （p.Gly152AlafsTer6）により生成する SERPINB7 タンパクは、RCL を欠損するためその protease 阻害活性を有しないと考えられ、よって RCL の欠損が NPPK の発症の原因となると考えられた[4 23]。

その一方で、本研究で同定された c.218_219delinsTAAATTTACCT の異常スプライス産物は、PTC を生じず、それは in-frame deletion の p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del であった。これらの産物は完全な RCL を含む SERPINB7 タンパクを生成する代りに、いずれもエクソン 3 にコードされるペプチドを欠いている。このことは、SERPINB7 タンパクの RCL が欠損しなくても NPPK の症状を呈しうること、更には、アミノ酸残基 57-73 に相当するエクソン 3 の欠損が NPPK の症状を呈しうることを示していると考えられる。注目すべきは、エクソン 3 はアミノ酸残基 46-62 のヘリックス C とアミノ酸残基 74-89 のヘリックス D とを繋ぐ CD-ループと呼ばれるヘリックス間ループを含んでいることである[24 25]。CD-ループは clade B セルピンの特徴であり、他のタンパクと相互作用する機能を有する。例えば、plasminogen activator inhibitor である SERPINB2 はトランスグルタミナーゼと相互作用することが

知られている [26]。そして本研究の結果からは、NPPK の発症機序や角層形成においては、SERPINB7 の CD-ループが何らかの役割を担っている可能性が示唆されると考えられる。

新規変異の c.336+2T>G のタンパク産物は不明であるが、このスプライス供与部位の変異は異常スプライシングを生じるものと推測される。更に、家系 9 の罹患者が c.796C>T（p.Arg266Ter）と c.336+2T>G（p.?） を複合ヘテロ接合性に保有し、他の家系に比しても同等の臨床的症状を呈していることを踏まえれば、この新規変異も病原性を有する可能性は非常に高いと考えられた。

このように、本研究により、NPPK が臨床的に独立した疾患であり、*SERPINB7* の機能喪失変異によって引き起こされる常染色体劣性遺伝病であることが追試された。なお、今回の研究では明らかな遺伝子型―臨床型相関は認められなかった（図 16、表 6）。今後さらに大きな症例群における解析が行われれば、遺伝子型―臨床型相関の有無は明らかになる可能性がある。

*SERPINB7*変異型と臨床像（図 16）

罹患者	性別/年齢	発症時期	肘・膝への進展	多汗	*SERPINB7*変異
家系1 Ⅱ-1	男/33	1歳	肘・膝	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系2 Ⅱ-1	女/18	出生時	肘・膝	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系3 Ⅱ-1	女/1	生後2ヶ月	膝	-	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系4 Ⅱ-1	女/6	出生時	膝	-	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.218_219delinsTAAACTTTACCT (p.Leu57_Gln73del/p.Leu57_Lys112del)
家系5 Ⅱ-1	女/4	生後3ヶ月	-	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.218_219delinsTAAACTTTACCT (p.Leu57_Gln73del/p.Leu57_Lys112del)
家系6 Ⅱ-2	女/17	出生時	-	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.218_219delinsTAAACTTTACCT (p.Leu57_Gln73del/p.Leu57_Lys112del)
家系7 Ⅱ-1	女/27	幼少時	-	-	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.455-1G>A (p.Gly152AlafsTer6)
家系8 Ⅱ-1	女/3	生後3ヶ月	-	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.455-1G>A (p.Gly152AlafsTer6)
家系9 Ⅱ-1	男/56	3歳	肘・膝	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.336+2T>G (p.?)
家系10 Ⅱ-2	男/73	3歳	-	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系10 Ⅲ-1	男/47	5歳	膝	-	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系10 Ⅲ-2	男/43	5歳	-	+	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)
家系10 Ⅲ-3	女/38	5歳	膝	-	c.796C>T (p.Arg266Ter) c.796C>T (p.Arg266Ter)

解析した NPPK 患者の遺伝子型と臨床型のまとめ（表 6）

*SERPINB7*変異保有率について

注目すべき点として、発端者 30 人中 29 人（これまでの報告の 20 人中 19 人[4 9]および本研究の 10 人中 10 人）が、*SERPINB7*の変異 c.796C>T（p.Arg266Ter）を保有していたことがあげられる。その 29 人のうちで、13 人が c.796C>T（p.Arg266Ter）のホモ接合性であり、16 人がこの変異に加えて他の 1 個の機能喪失変異との複合ヘテロ接合性であった。なお、Yin らの報告では、発端者の 1 人は、c.522_523insT をホモ接合性に保有していた[9]。

1000 Genomes Browser Version3.0.2 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/)によれば、ナンセンス変異 c.796C>T（p.Arg266Ter）は東京における日本人 89 人中 2 人が、北京における漢民族中国人 97 人中 4 人が、そして南部漢民族中国人 100 人中 2 人がヘテロ接合性に保有されており（表 7）[4]、よって既に rsSNP 番号がこの変異に対して割り振られている（rs142859678）。このように、変異 c.796C>T（p.Arg266Ter）は、日本人と漢民族中国人における創始者変異と考えられた。

	Japanese in Tokyo	Han Chinese in Beijing	Southern Han Chinese
Prevalence of c.796C>T	2/89 individuals	4/97 individuals	2/100 individuals
Minor allele frequency	0.011	0.015	
Estimated prevalence rates of NPPK	1.2/10,000	2.3/10,000	

c.796C>T のマイナーアレル保有率および推定される NPPK 罹患率（表 7）

同様に、北京の漢民族中国人 97 人のうち 1 人に、スプライス供与部位変異の c.336+2T>G（p.?）（rs201433665）がヘテロ接合性に保有されていた [4]。変異 c.218_219delinsTAAATTTACCT （ p.Leu57_Gln73del お よ び p.Leu57_Lys112del）と c.455-1G>A（p.Gly152AlafsTer6） は、1000 Genome Project Database にはなかった。その一方で、このデータベース上には、他の人種にはこれら 4 個の変異のいずれも存在していなかった [4]。日本人における機能喪失アレルの頻度をまとめると 0.011、漢民族中国人のそれは 0.018 となり、NPPK の罹患率は、それぞれ 1.2/10,000 と 2.3/10,000 となり（表 7）、NPPK はおそらく日本と中国においては最も頻度の高い PPK の病型であることが推測された。このように日本人や中国人では変異の保有頻度が高いために、NPPK の家系は、常染色体劣性遺伝形式が常染色体優性遺伝形式と見える偽優性遺伝形式を呈しうる。実際、本研究の家系 10 は偽優性遺伝形式を呈していた。NPPK において偽優性遺伝が生じた例は報告がなかったため、本研究の家系 10 は当初 NPPK と診断することができなかった。我々が知る限りでは、2 つの日本人家系の NPPK が常染色体優性遺伝形式を示したと報告されている [8]。遺伝子型は解析されていないが、これらの家系は偽優性を呈していた可能性が高いと考えられる。このように、我々は、NPPK が偽優性遺伝をとりうることを初めて示したが、これは NPPK の正確な遺伝子検査および遺伝子相談につながるものと考える。

SERPINB7 の機能について

SERPINB7 は、元来、腎関連タンパクとして同定された[27]。IgA 腎症や糖尿病性腎症の患者において SERPINB7 の糸球体での発現が上昇することが報告されている[28 29]。マウスでヒトの SERPINB7 を過剰発現させるとメサンギウム細胞が増殖することも明らかになっている[30]。更に、マウスでは Serpinb7 はエストロゲンの影響下で子宮上皮細胞に発現しており、雌性生殖サイクルにおけるダイナミックな構造的および生理学的変化での役割を担っている[31]。
しかし、SERPINB7 を喪失することでこれらの臓器の機能的破綻が生じるかは不明である。特に、我々の調べえた NPPK 症例においては、腎臓および子宮の異常はおろか月経による NPPK 症状の増悪すら認められず、SERPINB7 の発現減弱は腎臓や子宮に重大な障害を及ぼさないことが示唆される。

最近の研究によれば、SERPINB7 は全身の皮膚、特に顆粒層に豊富に発現しているため[4,11,32]、表皮の生体恒常性維持に寄与していると推測される。事実、SERPINB7 の喪失により、生体内では皮膚の水分透過性が亢進することが示されており[4]、それ故、この細胞内セルピンは表皮のバリア機能に役割を担っている可能性がある。さらに、本研究で皮膚生検を施行した患者は全て、角層の下層に錯角化が認められ、これは SERPINB7 が角層形成に何らかの役割を担っていることを示唆するものと考えられる。しかし、SERPINB7 は掌蹠だけでなく全身の皮膚に発現しているが、NPPK において病変部が掌蹠および手背足背あるいは肘膝伸側に限られる理由や、SERPINB7 の表皮の生理機能における役割と標的 protease の阻害との関係は未だ明らかになっておらず、今後の研究により解明されることが期待される。

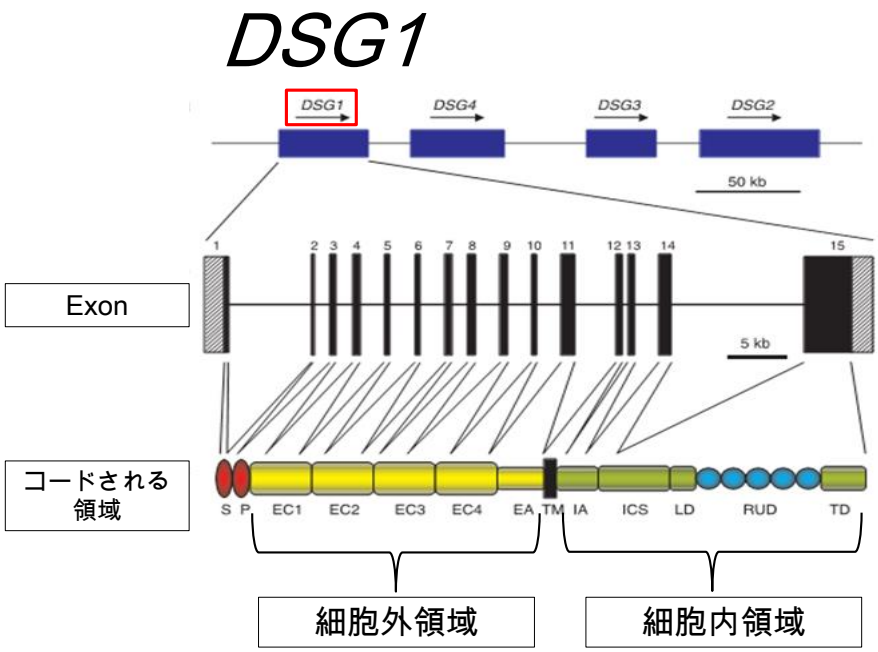
しかしながら、皮膚が外部環境からのバリア機能を果たしている臓器であり常に炎症を生じる外部要因から身体を防御している臓器であることや、セルピン群が protease 阻害活性を有し炎症に対して防御的に作用するタンパク群であることを考慮すると、SERPINB7 の異常により、protease 活性と protease 阻害活性のバランスを保つホメオスタシスの障害が生じ、その結果として NPPK の症状である過角化や潮紅などの皮膚の変化を呈する可能性があると考えた。
更なる研究により、SERPINB7 の機能が明らかになれば角化のメカニズムの解明にもつながると考えられ、本症に対するより疾患特異的かつ効果的な治療が開発されることが期待される。

線状 PPK（SPPK）の原因としての *DSG1* 変異

SPPK の病因遺伝子として *DSG1*、*DSP*、*KRT1* の 3 つが知られており、これまで、*DSG1* の 17 例、*DSP* の 4 例および *KRT1* の 1 例で変異の報告がある[12 13 14 15 16]。本研究において、我々は本邦 2 例目の線状掌蹠角化症の症例について *DSG1* 変異を同定したが、これは本邦では初の変異報告である。我々の患者は、c.587delT（p.Phe196SerfsTer3）の変異をヘテロ接合性に保有していた。これにより、エクソン 6 の 587 番目の塩基 T が欠失しフレームシフト変異が生じる結果、3 コドン下流に PTC を生じている（図 13）。

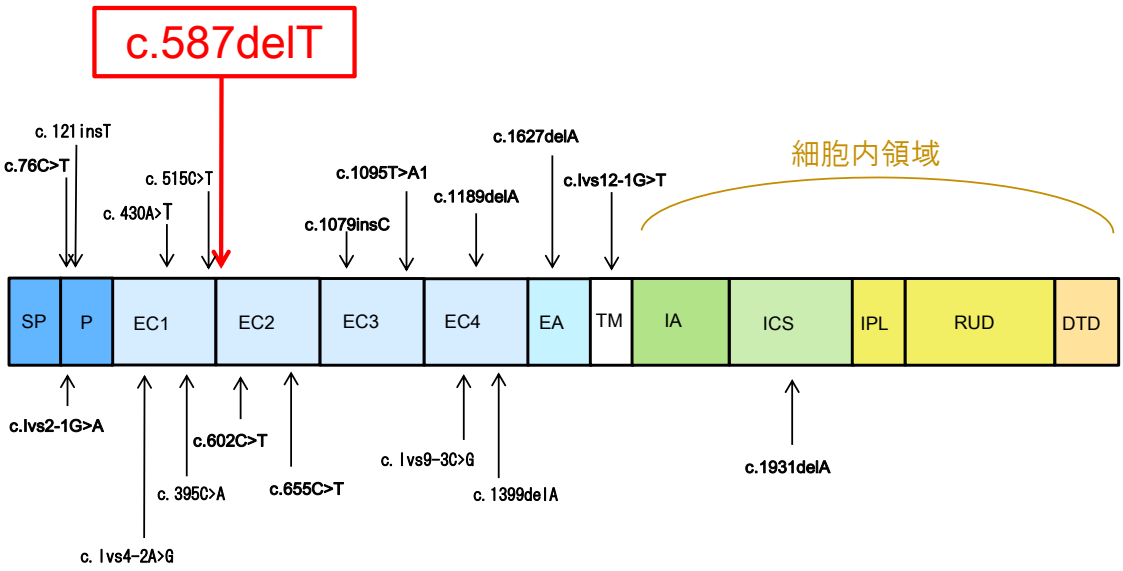
DSG1 は、表皮細胞間の接着に重要なデスモソームを形成する膜貫通型糖タンパクの一つである。デスモソームは中間径線維の細胞骨格を介し細胞と細胞を結合する働きがあるが、これは 3 つの family すなわち、cadherin family、armadillo family および plakin family から構成されている。cadherin family の代表は desmoglein（DSG1～4）と desmocollin（DSC1～3）であり、armadillo family では plakoglobin（PG）および plakophilin（PKP）である。そして、plakin family の代表は desmoplakin（DSP）である。

DSG1 遺伝子は、15 個のエクソンからなる。DSG1 タンパクは細胞外領域の 4 つの cadherin repeat が細胞外接着を担っており、エクソン 2 からエクソン 11 までが細胞外領域をコードしている。それぞれのエクソンとそれに対応する DSG1 タンパクのコード領域は（図 17）に示すとおりである。



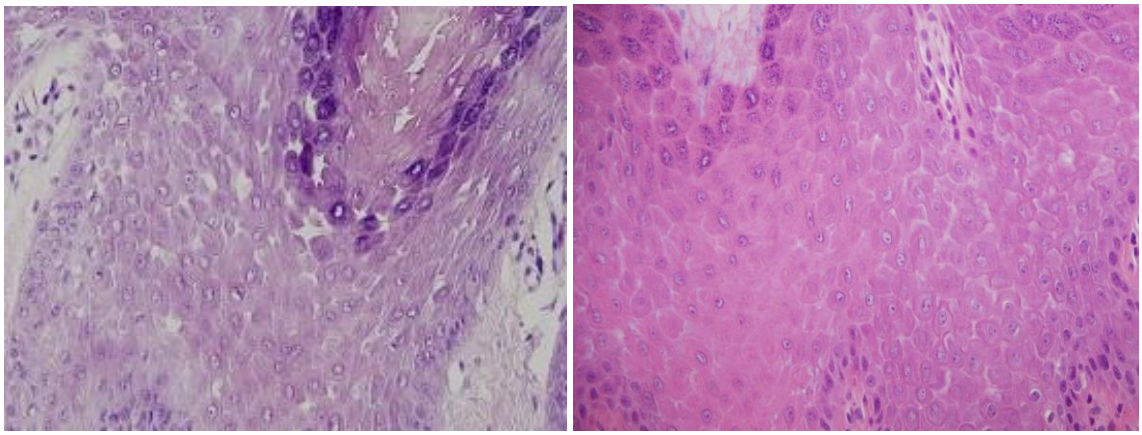
DSG1 のエクソンとそれに対応する DSG1 タンパクのコード領域（図 17）

DSG1 変異を伴う SPPK では 17 例の報告があり、既報告の *DSG1* の変異と本症例の新規変異の部位を示す（図 18)。変異報告の多くは細胞間接着に直接関わると考えられる細胞外領域にあり、本症例も細胞外領域の変異であった（図 18)。



***DSG1* の既報告変異と本症例で同定した新規変異 c.587delT の部位（図 18）**

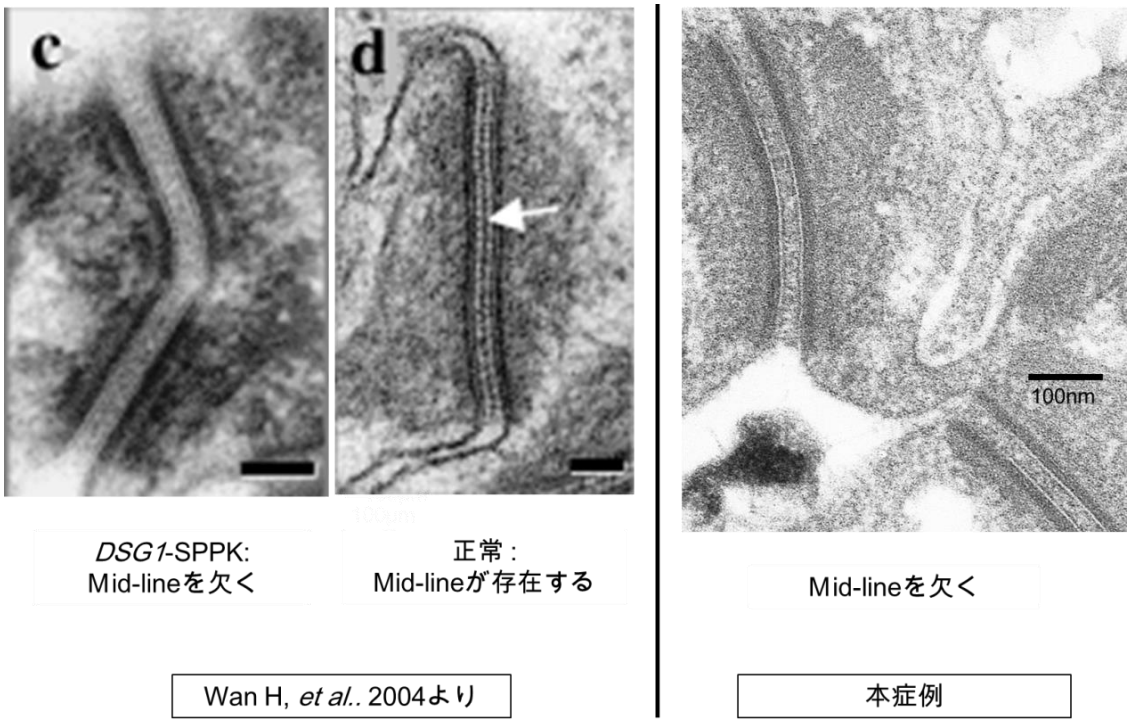
Bergman らは、*DSG*1 変異による線状掌蹠角化症の組織像で、有棘層上層での細胞間隙の開大の所見を報告しており、本症例においても類似する所見が認められた（図 19)。これは接着分子異常を示唆する所見であるとされている [33]。



（Bergman, R. *et al.* 2010 より）[33]　　（本症例）

既報告の *DSG1* 変異による SPPK の HE 所見の比較（図 19）

Wan らは正常皮膚の desmosome には認められる desmoglea の mid-line が、*DSG1*変異による掌蹠角化症の desmosome には欠けていることを報告している[16] 。 本症例の電子顕微鏡による超微細構造の観察でも同様の、mid-line を欠く所見が認められた。HE および電子顕微鏡観察所見から、細胞間接着能の異常が SPPK 患者には存在することが本症例でも示唆された。（図 20）

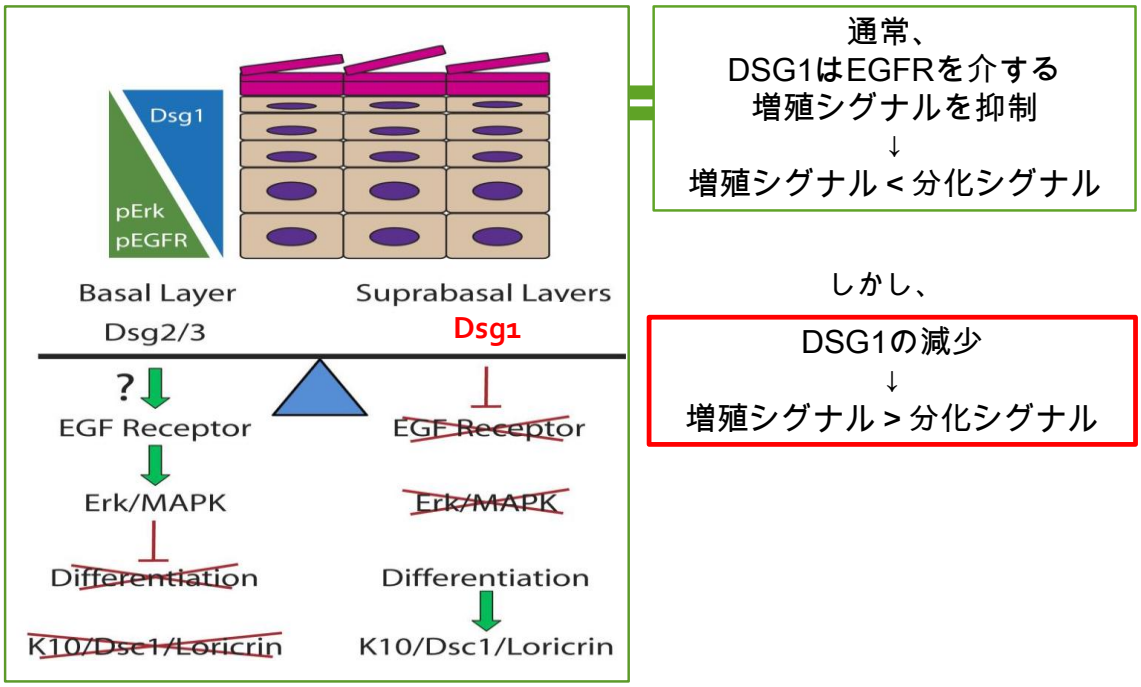


既報告の *DSG1* 変異による SPPK の電子顕微鏡像と本症例の比較（図 20）

DSG1 の変異による線状 PPK では、主に、変異により haploinsufficiency（ハプロ不全；1 対の相同染色体の一方の遺伝子の不活性化で起こる表現型の変異）の機序で、細胞間接着分子である DSG1 が減少することで細胞間接着の障害を生じ、それが主に機械的刺激を受ける部位に過角化を生じるこの疾患の発症に関与していると考えられている。また、DSG1 の細胞外領域の変異は細胞間接着の異常を生じる可能性があると考えられ、SPPK の発症機序には DSG1 の細胞間接着機能の異常と機械的刺激が関与するという仮説が成り立つと考えうる。

一方で、非常に興味深いことに、DSG1 は表皮形態形成における増殖と分化に関わるシグナル伝達系への働きに関与している可能性も示唆されている[34]。それによると、（図 21）のように、基底層より上層に発現している DSG1 は、

通常、EGFR と MAP キナーゼを介する増殖シグナルに抑制的に関与している。しかし、DSG1 が減少すると、EGFR シグナルが亢進することになり、結果としてケラチノサイトの増殖シグナルが分化シグナルに対して優位になることで、過角化が生じるとしている。



EGFR, Erk/MAPK を介する増殖と分化のバランス（図 21）

DSG1 はケラチノサイトの分化と増殖のバランスに影響している可能性がある（Getsios, S. *et al.* 2009）[34] の図を改変

実際我々の症例で、増殖系のマーカーである EGFR の染色を行い、健常者の手掌との比較したところ、患者の病変部では基底層から有棘層全層に強く染色されており、正常皮膚に比して EGFR の発現が亢進している可能性が考えられた（図 15）。このことから、DSG1 は細胞間接着機能以外にも、正常な表皮形態形成におけるシグナル伝達に関与し、角化メカニズムのホメオスタシスに関与している可能性があると示唆された。しかし、EGFR の免疫染色結果のみでは EGFR 発現の定量的解析ができているとは言えないため、更なる研究としては、EGFR および p-EGFR の定量が必要と考えられる。

総括および結論

本研究は、遺伝性掌蹠角化症の 2 病型の原因遺伝子とその病態について解析したものである。

一病型は長島型掌蹠角化症（NPPK）であり、合計 10 家系の解析を行った。NPPK と診断した 9 家系の解析で、1 つの新規変異と 3 つの既報告の変異を含む合計 4 つの *SERPINB7* 変異を同定した。そのうちの 2 つのスプライスサイト変異では、異常スプライス産物を同定し、それらの変異の病原性が 2 つの機序すなわち、SERPINB7 の RCL 構造の欠如および CD-ループ構造の異常にある可能性を示した。当初常染色体優性遺伝形式で異なる病型と考えられた 1 家系については whole-exome sequencing（WES）解析の手法を用いて解析し、やはり、*SERPINB7* 変異があることが示された。その結果この家系が偽優性遺伝を示していたことが判明し、NPPK と診断することができた。NPPK では *SERPINB7* 変異の潜在的保有率の高さから、偽優性遺伝形式を生じることがある可能性が示された。本研究により *SERPINB7* 変異が NPPK の病因であることが改めて確認された。

次に他の稀な病型である線状掌蹠角化症（SPPK）の症例を解析し、*DSG1* 変異を本邦で初めて同定した。さらに免疫染色および超微細構造を含む病理組織学的観察から、細胞間接着分子の 1 つである DSG1 の異常が、細胞間接着の障害を引き起こすのみならず、角化細胞の増殖と分化に影響している可能性を示唆する結果を得た。

このように、遺伝性掌蹠角化症の 2 病型の原因遺伝子、すなわち NPPK における *SERPINB7* 変異および SPPK における *DSG1* 変異を解析した結果から、それら遺伝子にコードされるいずれのタンパクも正常角化メカニズムにおけるホメオスタシスに大きく関与している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野　清水　宏教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野　乃村俊史助教に心より深謝いたします。そして本研究にご協力いただきました長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症の患者様およびそのご家族に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

1 Green, K. J. & Simpson, C. L. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2499-2515 (2007).

2 Nagashima, M. in *Handbook of Human Genetics* (ed Ochiai, K., Miura, O.) 23-27 (Igaku Shoin, 1977).

3 Kabashima, K., Sakabe, J., Yamada, Y. & Tokura, Y. "Nagashima-type" keratosis as a novel entity in the palmoplantar keratoderma category. *Arch. Dermatol.* **144**, 375-379 (2008).

4 Kubo, A. *et al.* Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 945-956 (2013).

5 Nakamizo, S., Katoh, N., Miyachi, Y. & Kabashima, K. Atypical nail dystrophy in a possible case of Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J. Dermatol.* **39**, 470-471 (2012).

6 Nonomura, Y., Otsuka, A., Miyachi, Y. & Kabashima, K. Suspected Nagashima-type palmoplantar keratosis with atypical hyperkeratotic lesions on the ears. *Eur. J. Dermatol.* **22**, 392-393 (2012).

7 Isoda, H., Kabashima, K. & Tokura, Y. 'Nagashima-type' keratosis palmoplantaris in two siblings. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **23**, 737-738 (2009).

8 Nakamizo, S., Takahashi, K., Miyachi, Y. & Kabashima, K. A familial case of Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Eur. J. Dermatol.* **20**, 507-508 (2010).

9 Yin, J. *et al.* New and recurrent SERPINB7 mutations in seven Chinese patients with Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2269-2272 (2014).

10 Heit, C. *et al.* Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Hum. Genomics* **7**, 22 (2013).

11 Gerber, P. A. *et al.* Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins. *PloS one* **8**, e63949 (2013).

12 Rickman, L. *et al.* N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum. Mol.*

Genet. **8**, 971-976 (1999).

13 Armstrong, D. K. *et al.* Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 143-148 (1999).

14 Hunt, D. M. *et al.* Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Euro. J. Hum. Genet.* **9**, 197-203 (2001).

15 Whittock, N. V. *et al.* Frameshift mutation in the V2 domain of human keratin 1 results in striate palmoplantar keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 838-844 (2002).

16 Wan, H. *et al.* Striate palmoplantar keratoderma arising from desmoplakin and desmoglein 1 mutations is associated with contrasting perturbations of desmosomes and the keratin filament network. *Br. J. Dermatol.* **150**, 878-891 (2004).

17 Kawai, K., Fukushige, T., Sakanoue, M. & Kanekura, T. Striate palmoplantar keratoderma. *J. Dermatol.* **37**, 854-856. (2010).

18 Judge MR, M. W., Munro CS. in *Rook's Textbook of Dermatology* (Wiley-Blackwell, 2010).

19 Ng, S. B. *et al.* Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.* **42**, 30-35 (2009)

20 Ng, S. B. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* **461**, 272-276 (2009).

21 Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* **12,** 745-55 (2011).

22 Whittock, N. V. *et al.* Striate palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 940-946 (1999).

23 Kubo, A. Nagashima-type palmoplantar keratosis: a common Asian type caused by SERPINB7 protease inhibitor deficiency. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2076-2079 (2014).

24 Remold-O'Donnell, E. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS lett.* **315**, 105-108 (1993).

25 Silverman, G. A. *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**, 33293-33296 (2001).

26 Jensen, P. H. *et al.* A unique interhelical insertion in plasminogen activator inhibitor-2 contains three glutamines, Gln83, Gln84, Gln86, essential for transglutaminase-mediated cross-linking. *J. Biol. Chem.* **269**, 15394-15398 (1994).

27 Miyata, T. *et al.* A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin upregulated in IgA nephropathy. *J. Clin. Invest.* **102**, 828-836 (1998).

28 Inagi, R. *et al.* Specific tissue distribution of megsin, a novel serpin, in the glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 1098-1106 (2001).

29 Suzuki, D. *et al.* Expression of megsin mRNA, a novel mesangium-predominant gene, in the renal tissues of various glomerular diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 2606-2613 (1999).

30 Miyata, T. *et al.* Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. *J. Clin. Invest.* **109**, 585-593 (2002).

31 Zhang, X., Hoang, E. & Nothnick, W. B. Estrogen-induced uterine abnormalities in TIMP-1 deficient mice are associated with elevated plasmin activity and reduced expression of the novel uterine plasmin protease inhibitor serpinb7. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 160-172 (2009).

32 Wang, Y., Guo, Q., Casey, A., Lin, C. & Chen, F. A new tool for conditional gene manipulation in a subset of keratin-expressing epithelia. *Genesis* **50**, 899-907 (2012).

33 Bergman, R. *et al.* Disadhesion of epidermal keratinocytes: a histologic clue to palmoplantar keratodermas caused by DSG1 mutations. *J. Am. Acad. Dermatol.* **62**, 107-113 (2010).

34 Getsios, S. *et al.* Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J. Cell Biol.* **185**, 1243-1258 (2009).