HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	長島型掌蹠角化症の原因遺伝子SERPINB7におけるリードスルー作用およびmRNA分解についての研究
Author(s)	大口, 由香
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12985号
Issue Date	2018-03-22
DOI	10.14943/doctoral.k12985
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70260
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2364
File Information	Yuka_Oguchi.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

長島型掌蹠角化症の原因遺伝子 *SERPINB7* におけるリードスルー作用および mRNA 分解についての研究

（Studies on the readthrough and nonsense-mediated mRNA decay of *SERPINB7* nonsense mutant transcripts in Nagashima-type palmoplantar keratosis）

2018 年 3 月

北海道大学

大口　由香

学位論文

長島型掌蹠角化症の原因遺伝子 *SERPINB7* におけるリードスルー作用および mRNA 分解についての研究

（Studies on the readthrough and nonsense-mediated mRNA decay of *SERPINB7* nonsense mutant transcripts in Nagashima-type palmoplantar keratosis）

2018 年 3 月

北海道大学

大口　由香

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　12 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　14 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　51 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・　55 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　56 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　57 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yuka Ohguchi, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Toshinari Miyauchi, Osamu Mizuno, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Kota Ono, WH Irwin McLean, Hiroshi Shimizu
Gentamicin-induced readthrough and nonsense-mediated mRNA decay of *SERPINB7* nonsense mutant transcripts
Journal of Investigative Dermatology, in press

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Yuka Ohguchi, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Toshinari Miyauchi, Osamu Mizuno, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Kota Ono, WH Irwin McLean, Hiroshi Shimizu
Gentamicin-induced restoration of SERPINB7 by readthrough of a prevalent nonsense mutation c.796C>T in Nagashima-type palmoplantar keratosis
The 41st Japanese Society for Investigative Dermatology, 9-11 December, 2016, Sendai, Japan

緒言

長島型掌蹠角化症について

長島型掌蹠角化症（Nagashima-type palmoplantar keratosis、以下NPPKと略）（MIM#615598）は、長島正治によって1977年に初めて報告された遺伝性の掌蹠角化症である[1]。本疾患は常染色体劣性遺伝形式をとり、乳幼児期から手掌、足底のみならず、指趾の背側や、手首、足首、アキレス腱部にも連続しておよぶ角化性紅斑を認める（図1）。NPPK患者ではしばしば、手足以外にも肘や膝に同様の病変を生じることがある。全身的な合併症はないが、掌蹠の多汗と真菌感染の合併を高頻度に認め、悪臭を伴うことも多く[2]、病変部を水に浸すとすぐに白色調となり浸軟する特徴がある[3]。病理組織学的には、過角化、表皮及び顆粒層の肥厚を認める。また、角層の下層のみに不全角化が見られ、真皮上層の血管周囲に軽度のリンパ球浸潤を認めることがある。NPPKの原因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。しかし、2013年に、Kuboらは、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[3,4]。*SERPINB7*遺伝子の変異は、その後、漢民族中国人や韓国人のNPPK患者でも同定された[5,6,7,8,9]。現在までNPPKの原因遺伝子である*SERPINB7*の変異は、c.796C>T、c.218_219del2ins12、c.455-1G>A、c.650_653delCTGT、c.455G>T、c.522_523insT、c.336+2T>G、c.830C>T、c.635delG、c.122_127delTGGTCCの10個が報告されている[5-16]。興味深いことに、これまで日本人、中国人、韓国人において報告された本疾患罹患者の60家系中55家系（91.6%）がナンセンス変異c.796C>Tを有しており、この変異は、東アジアにおける創始者変異と考えられた（図2）。また、*SERPINB7*の変異を1000人ゲノムプロジェクトで検索すると、この変異の保因者が日本人では89人中2人、中国人では197人中8人に見つかった。一方欧米人はこの変異を全く保有していなかった[17]。この結果から、計算上は本疾患の罹患率は日本人では1万人に1.2人、中国人では1万人に3.1人と推測される。また、Human Genetic Variation Database Version 2.3（http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB）で検索すると、日本人では2,412アリル中22アリルにこの変異を認めた[18,19]。

本症は、比較的患者数の多い遺伝性掌蹠角化症ではあるが、現時点で根本的な治療はなく、サリチル酸ワセリンや尿素軟膏などの角質融解剤や、活性型ビタミン D_3 製剤の外用を中心とする対症療法が主体である。本症の病因が明らかとなった今、病因に基づいた新たな治療法の開発が進むことが期待される。我々は、本疾患の患者が高頻度でナンセンス変異 c.796C>T を保有しているため、このナンセンス変異をターゲットとするリードスルー治療が有効と考え、本研究を進めることとした。

図 1. NPPK の臨床像

角化性紅斑は手掌、足底のみではなく、手指背側、手首、アキレス腱部にも連続して認められる。

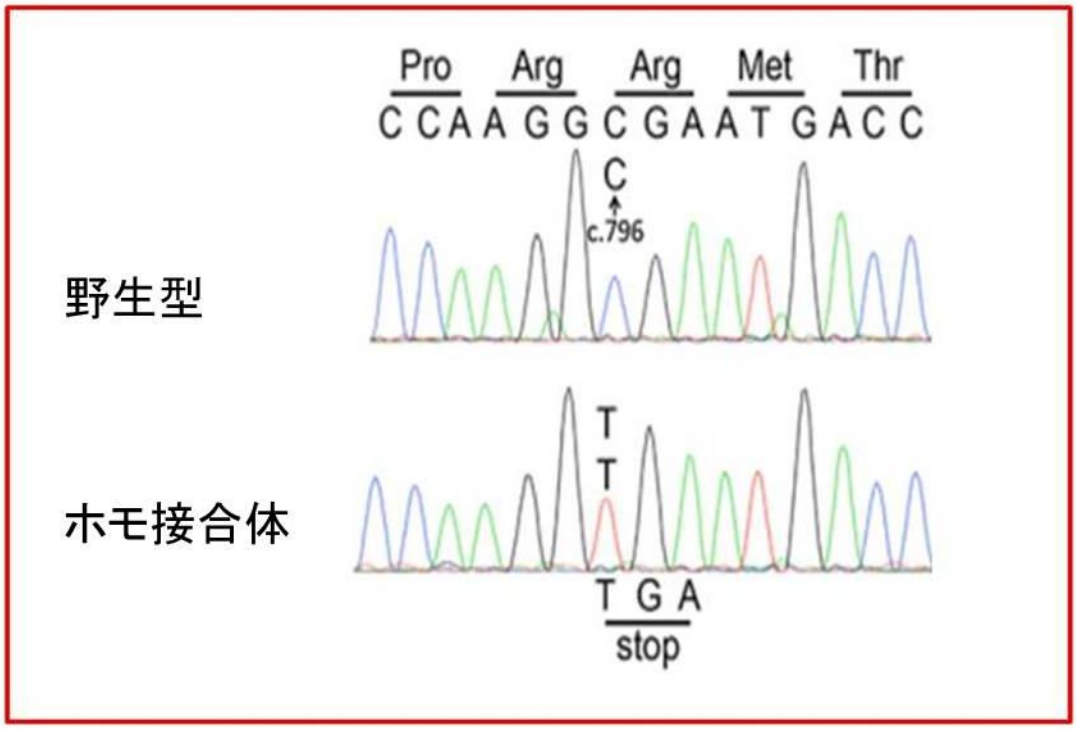


図 2. NPPK 患者の 90%以上が保有する *SERPINB7* の c.796C>T 変異

c.796C>T ホモ接合体では、両方のアリルで c.796 の「C」が「T」に置き換わる。これにより 266 番目のアルギニン残基（Arg）が終止コドン（Ter）を指定するナンセンス変異となる。

SERPINB7 タンパク質について

SERPINB7 はセルピンプロテアーゼインヒビタースーパーファミリー clade B に属し、皮膚に豊富に発現しているタンパク質の 1 つであるが、詳細な機能は未だ不明である [20]。SERPINB7 は掌蹠のみではなく、全身の皮膚の角層および顆粒層に発現する [3]。セルピンタンパク質には共通して reactive center loop（RCL）が存在し、機能的に重要な役割を担っていると考えられている。SERPINB7 タンパク質では RCL はエクソン 8 の 331 番目から 352 番目のアミノ酸残基にコードされる（図 3）。本疾患患者が高頻度に保有するナンセンス変異 c.796C>T では早期終止コドン（premature termination codon、以下 PTC と略）が生じることにより、RCL が欠損するために NPPK の症状が生じると考えられている [4]。

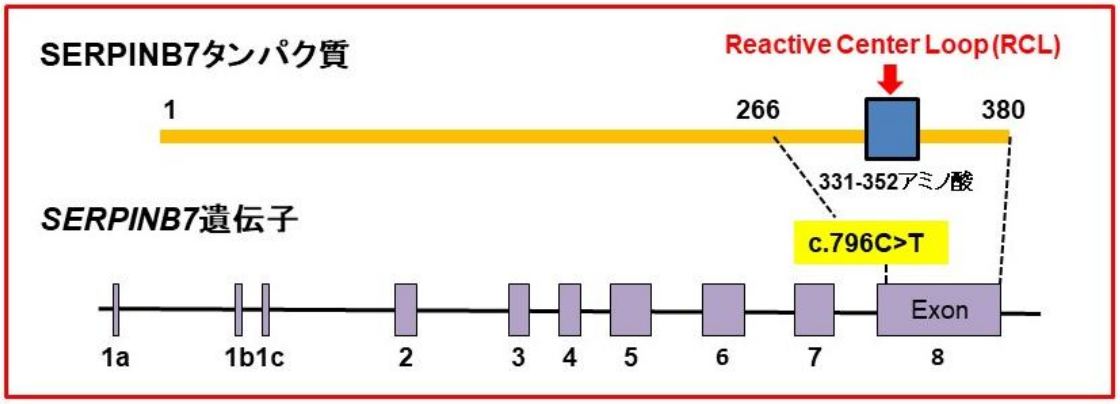


図 3. SERPINB7 タンパク質、*SERPINB7* 遺伝子模式図
SERPINB7 は 8 つのエクソンで構成され、c.796C>T はエクソン 8 に存在する。RCL はエクソン 8 の 331 番目から 352 番目のアミノ酸残基にコードされる。

リードスルー治療について

DNA の遺伝情報が mRNA に転写され、更にリボソームでの翻訳を経て一定のアミノ酸配列をもつタンパク質が合成される。翻訳は開始コドンから始まって、UGA、UAG、UAA の塩基配列でコードされる終止コドンで終了するが、遺伝子変異により開始コドンと通常の終止コドンの間に新たに終止コドンができることがある。このような変異はナンセンス変異と呼ばれている。遺伝性疾患の約 11%はナンセンス変異により発症する[21]。ナンセンス変異により、UGA、UAG、UAA といった PTC が生じると、PTC でリボソームが翻訳を終了することになり、本来よりも短いタンパク質が産生され、細胞毒性を生じる可能性がある。それを防ぐため、nonsense-mediated mRNA decay（以下 NMD と略）という mRNA 分解機構が働き、変異 mRNA の大部分（75-95%）は分解される[22]。リボソームは NMD による mRNA 分解を免れた転写産物のみを翻訳することとなる[22,23]。重要なことに PTC での翻訳の終了は 100%完全ではなく、低い頻度ではあるが PTC においてランダムなアミノ酸を持つアミノアシル tRNA が挿入され、翻訳が継続されることがある[24]。このような、翻訳の際に自然に PTC が読み飛ばされる現象は『リードスルー（readthrough）』と呼ばれる。リードスルー作用を持つ薬剤により目的とする正常長のタンパク質を産生することで、遺伝性疾患を治療できることが期待される（図 4）。現在までにリードスルー作用を持つ薬剤として最も多く報告されているのは、ゲンタマイシンや G418 などのアミノグリコシド系抗生剤である[25,26]。抗生剤以外では、ataluren（Translarna®）の有効性が報告され[27]、いくつかの疾患で臨床治験も実施されているが[28,29]、ataluren が無効であるという報告も散見されている[30,31]。アミノグリコシド系抗生剤のリードスルー治療については、*CFTR* 遺伝子にナンセンス変異を持つ嚢胞性線維症の患者にゲンタマイシンの点鼻治療をして、鼻粘膜上皮細胞の CFTR タンパク質の産生増加が見られた報告[32]やジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つ、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx mice や筋ジストロフィー患者にゲンタマイシンを投与し、ジストロフィンタンパク質産生が増加した報告がある[33,34]。また、癌抑制遺伝子である p53 遺伝子にナンセンス変異を持つ肺癌患者と乳癌患者由来の細胞をゲンタマイシンや G418 で治療し、p53 タンパク質の産生を認めたという報告がされている[35]。このように、様々な疾患でアミノグリコシド系抗生剤のリードスルー効果が検討され、確認されている。皮膚科領域では、1 例報告であるが、常染色体優性遺伝疾患である

Hailey-Hailey 病において、*ATP2C1* 遺伝子にナンセンス変異を保有する患者の病変部にゲンタマイシンを外用し、効果があったと論じられている[36]。また、弾性線維性仮性黄色腫の原因遺伝子である *ABCC6* 遺伝子のナンセンス変異を保有する cDNA のコンストラクトを作成し、HEK293 細胞に過剰発現させて ataluren で治療した報告[37]や、色素性乾皮症[38,39]の患者由来線維芽細胞および劣性栄養型表皮水疱症[40]の患者由来表皮角化細胞へのアミノグリコシド系抗生剤の有効性が報告されている。遺伝性疾患は長期に亘る治療が必要となるが、アミノグリコシド系抗生剤の全身投与には腎障害や聴覚障害の副作用があり、長期に使用できないというジレンマがあった。しかし、局所のみに使用し、全身への副作用を軽減できる外用という方法で治療可能な皮膚疾患においては、リードスルー治療が非常に重要な治療となり得る。

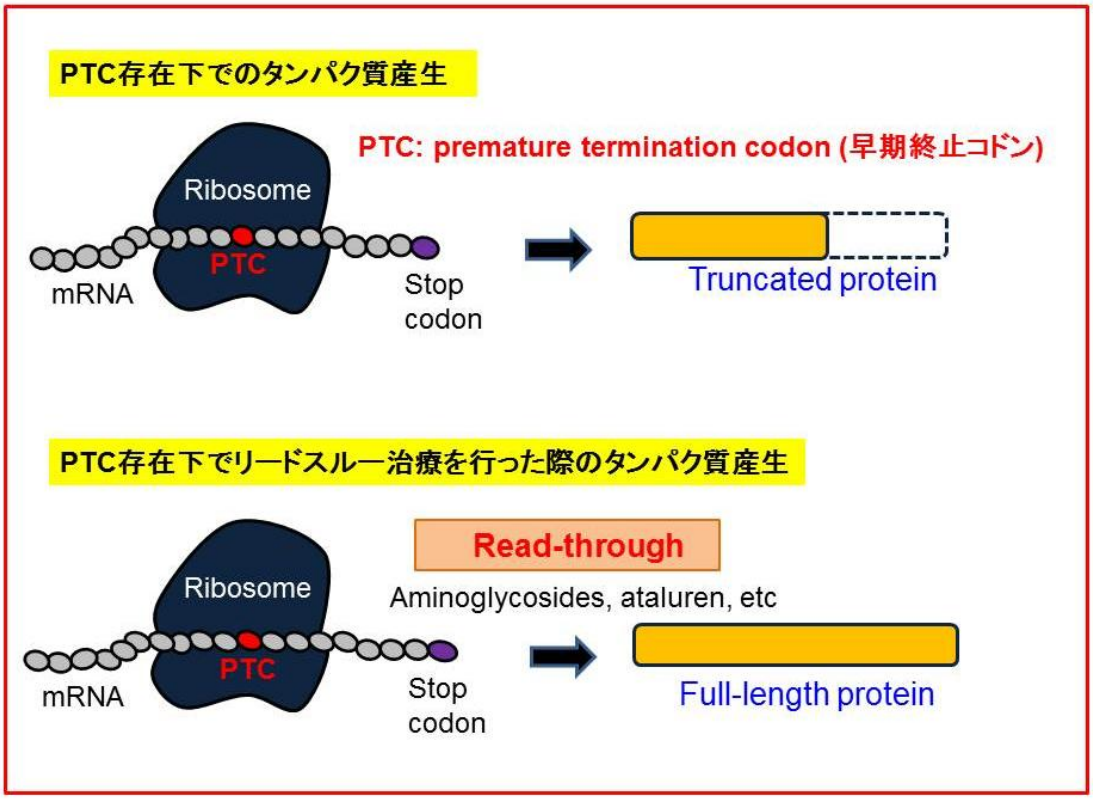


図 4. リードスルー治療の模式図

PTCの存在下ではリボソームは途中で翻訳を終了し、本来よりも短いタンパク質（truncated protein）が産生される。PTC存在下でアミノグリコシドやataluren などのリードスルー薬を加えると、翻訳が続行され、全長タンパク質（full-length protein）が産生される。

Nonsense-mediated mRNA decay について

遺伝子発現の正確性を保つため、生物にはいくつかの遺伝子発現制御機構が存在する。ナンセンス変異によりPTCが生じる場合には、本来よりも短いタンパク質が産生され、細胞毒性を生じる可能性があるため、PTCを有する変異mRNAを認識し、急速に分解するNMDというmRNAの品質管理機構が遺伝子発現の重要な役割を担っている。DNA情報が転写されて合成されたmRNA前駆体からタンパク質をコードしないイントロン配列が除かれ、エクソン配列が連結するスプライシングという過程によりmRNAは成熟する。スプライシングの間に前駆体mRNAには、エクソンとエクソンの連結部の20－24塩基上流に目印としてエクソンージャンクション複合体（exon junction complex、以下EJCと略）が結合する[41,42]。EJCは主にeukaryotic translation initiation factor 4A3（eIF4A3）、cancer susceptibility candidate 3（CASC3）、RNA-binding motif protein 8A（RBM8A）、mago-nashi homolog（MAGOH）の4つのタンパク質から構成される。mRNAが適切なスプライシングを受けた場合、EJCはpioneer roundと呼ばれる最初の翻訳の際に外れるためmRNAは分解されない。しかし終止コドンよりも下流にEJCが残っている場合はこの終止コドンはPTCとして認識される[43]。最後のエクソン連結部の50－55塩基よりも上流にこのようなPTCが存在するmRNAでは、up-frameshift protein 2（UPF2）、up-frameshift protein 3（UPF3）といったNMDに関連する因子やsuppressor with morphogenic effect on genitalia 1（SMG1）、up-frameshift protein 1（UPF1）、eukaryotic release factor 1（eRF1）、eukaryotic release factor 3（eRF3）から構成されるSURF複合体がリクルートされる（図5）。EJCとSURF複合体の相互作用により、SMG1によるUPF1のリン酸化が促進されることにより変異mRNAの分解、つまりNMDが誘導される。これらはEJC依存性のNMDモデルである[44]（図6）。*SERPINB7*遺伝子のc.796C>T変異は最後のエクソンにあり、この変異より下流にEJCが存在しないため、変異mRNAはEJC依存性NMDによる分解を受けないという仮説を立てた。

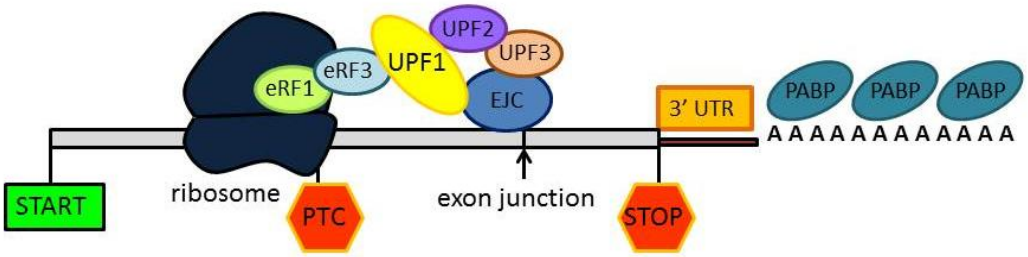


図 5. EJC-依存性 NMD モデルに関与する因子

EJC: exon junction complex、UPF1: up-frameshift protein 1、UPF2: up-frameshift protein 2、UPF3: up-frameshift protein 3、eRF1: eukaryotic release factor 1、eRF3: eukaryotic release factor 3

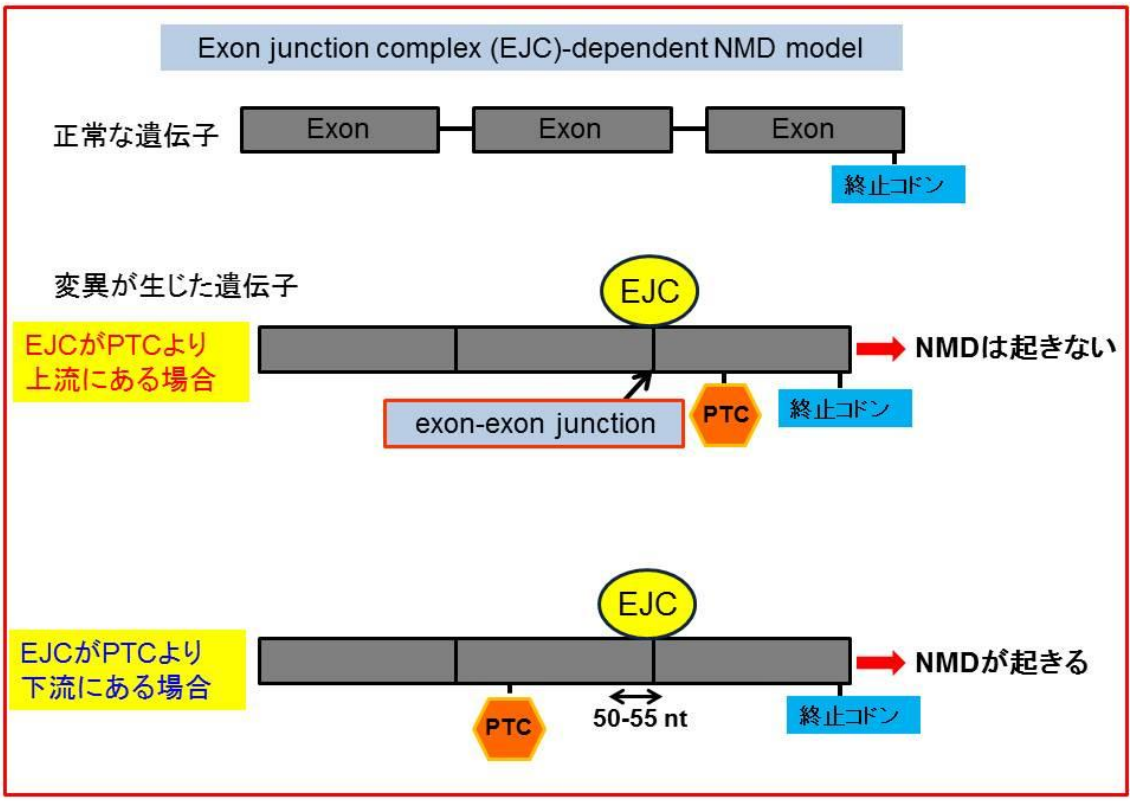


図 6. EJC 依存性 NMD モデル

変異が生じた遺伝子では、EJC が PTC よりも上流にある場合、NMD は起きないが、EJC が PTC よりも下流にある場合、NMD が起きて変異 mRNA が分解される。

リードスルー治療に適した遺伝性疾患について

リードスルー治療の効率はいくつかの条件により異なる。1）終止コドンの種類、2）終止コドンの次の塩基（+4 ポジション）の種類、3）変異 mRNA 量、により影響されることが先行研究により明らかとなっている[45]。終止コドンの種類については、リードスルー効率は UGA>UAG>UAA の順に高い[46,47]。更に、終止コドンが UGA の場合、+4 ポジションが C>A>U、G の順にリードスルーは起こりやすい[47]。重要なことに、NMD によってリードスルーの材料となる変異 mRNA が分解され減少すると、リードスルーによるタンパク質産生量は低下する[24,48]。PTC が最後のエクソンに存在する場合は下流に EJC が存在しないため、NMD による mRNA 分解を受けないとされており、理論上はリードスルーの材料となる mRNA が豊富に存在するため産生されるタンパク質が増加すると考えられる。また、遺伝形式の違いによるリードスルー治療の有効性を考えると、常染色体優性遺伝性疾患ではタンパク質が 50%産生されても発症してしまう。一方、常染色体劣性遺伝性疾患では、基本的にタンパク質がほぼ産生されないために発症しており、少量のタンパク質が産生されれば症状の改善につながると推測される。実際、常染色体劣性遺伝性疾患である McArdle 病では正常な機能を持つタンパク質が少量でも産生されることにより臨床症状が改善すると報告されている[49]。従って、UGA のナンセンス変異を最後のエクソンに持つ常染色体劣性遺伝性疾患が、理論上はリードスルー治療に非常に適した疾患であると予想される。NPPK は常染色体劣性遺伝性疾患であり、患者の 90%以上が *SERPINB7* 遺伝子に、UGA の配列で+4 ポジションが A であるナンセンス変異 c.796C>T を有している。また、このナンセンス変異は最後のエクソンに存在するため、変異 mRNA が NMD による分解を受けず、変異 mRNA が豊富に存在することが予想される。更に、SERPINB7 は表皮の角層、顆粒層といった表層に発現するタンパク質であるため、外用での治療効果が期待できる。これらの理由から、本疾患はリードスルー治療のターゲットとして最適であると考えた。

本研究の目的

我々は先に述べた理由により、NPPK がリードスルー治療のターゲットとして、非常に適していると考えた。本研究は *SERPINB7* 遺伝子にナンセンス変異 c.796C>T を大部分の患者が保有する本疾患において、ゲンタマイシンによるリードスルー治療の有効性を検討することを目的とする。

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。

CASC3: cancer susceptibility candidate 3
cDNA: complementary DNA
CMV: cytomegalovirus
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
DTT: dithiothreitol
eIF4A3: eukaryotic translation initiation factor 4A3
EJC: exon junction complex
eRF1: eukaryotic release factor 1
eRF3: eukaryotic release factor 3
FBS: fetal bovine serum
FLuc: firefly luciferase
HRP: horseradish-peroxidase
KC: keratinocyte
MAGOH: mago-nashi homolog
MIM: Mendelian inheritance in man
mRNA: messenger RNA
NHEK: normal human epidermal keratinocyte
NMD: nonsense-mediated mRNA decay
NPPK: Nagashima-type palmoplantar keratosis
ODT: occlusive dressing technique
PABPC1: poly (A)-binding protein cytoplasmic 1
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PTC: premature termination codon
qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction
RBM8A: RNA-binding motif protein 8A
RCL: reactive center loop
SEM: standard error of the mean
siRNA: small interfering RNA
SMG1: suppressor with morphogenic effect on genitalia 1
TBS: Tris buffered saline

UPF1: up-frameshift protein 1
UPF2: up-frameshift protein 2
UPF3: up-frameshift protein 3
UTR: untranslated region
VAS: visual analogue scale
WES: whole-exome sequencing

実験方法

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の承認を得た上で、参加者およびその保護者全てから書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いおよび臨床研究に関しては、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した。

1. 各種試料の作成

Ⅰ. 皮膚の採取

皮膚採取施行時には文章での同意を得た。皮膚はキシロカイン®注射液 1% エピレナイミン（1:100000）含有（AstraZeneca）で局所麻酔し、3 mm から 5 mm のデルマパンチ®（Nipro）で切除した際は 4-0 NYLON（CROWNJUN）で表皮縫合し、15 番メスで切除した際は 4-0 PDS®Ⅱ（ETHICON）で真皮縫合した後、4-0 NYLON で表皮縫合した。採取した皮膚は RNA 抽出、初代培養にそれぞれ使用した。

Ⅱ. 表皮角化細胞の初代培養

c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する患者の下腹部から採取した皮膚を使用した。Phosphate buffered saline（PBS）（Nacalai tesque）で洗浄後に脂肪を除去し、ディスパーゼⅠ（Wako）2 ml に浸し、一晩 4°C で静置した。表皮を攝子で剥離し、眼科剪刀で細かく刻み、3 ml の 0.25% Trypsin-EDTA（ThermoFisher Scientific）に浸し、37°C で 10 分静置した。パスツールで十分にピペッティングを行い、10% fetal bovine serum（FBS）（Sigma-Aldrich）含有 PBS を 7 ml 加え、1500rpm、5 分間遠心した。上清を除き、ペレットに PBS を 5 ml 加え、1500 rpm、5 分間遠心した。上清を除き、ペレットに CnT-PR（Cellntec advanced cell systems）を 10 ml 加えてピペッティングし、10 cm シャーレに播種し培養した。以下、*SERPINB7* に c.796C>T 変異を保有する患者から採取した表皮角化細胞を c.796C>T keratinocyte（以下 c.796C>T KC）と記す。本研究では健常人表皮角化細胞 normal human epidermal keratinocyte（以下 NHEK と略す）は Lonza より購入し、CnT-PR で培養した。

Ⅲ．コンストラクトの作成

SERPINB7 cDNA の合成

① 皮膚からの RNA 抽出

健常人の前腕より採取した皮膚を氷冷した生理食塩水で洗浄し、真皮成分や皮下脂肪を除去した。RNeasy Mini Kit（Qiagen）に付属する Buffer RLT（グアニジンチオシアン酸塩含有溶液）に最終濃度 1%になるよう β-メルカプトエタノール（Wako）を調整し、添加した。この溶液 600 μl と検体をジルコニアビーズ（Sarstedt K.K.）に入れて、－80°C で凍結させた後、室温で融解させた。Precellys® 24 lysis/homogenizer（Bertin Technologies）で、6500 rpm、20 秒×2 サイクルの条件で細胞を十分に破砕し、14000 rpm、3 分間遠心後、上清を回収した。RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて RNA を抽出し、DNase/RNase free water に溶出させた。

② cDNA への逆転写

上記で抽出した RNA 2 ng、50 μM Random hexamer 1 μl、10 mM dNTP mix 1 μl（いずれも ThermoFisher Scientific）を 0.2 ml polymerase chain reaction（以下 PCR と略）チューブに加え、滅菌水を加えて合計 9 μl になるよう調整した。65°C 5 分で反応後、氷上で 1 分間急冷した。SuperScript™ Ⅲ Reverse Transcriptase（200 units/μl）1 μl、RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 1 μl 、5×First-Strand Buffer 4 μl および 0.1 M dithiothreitol（DTT）1 μl（いずれも ThermoFisher Scientific）を混合し、25°C 5 分、50°C 60 分、70°C 15 分反応させた。RNase H（1 U/μl）（ThermoFisher Scientific）を 1 μl 加えて 37°C で 20 分反応させ、cDNA へ逆転写した。

③ *SERPINB7* の増幅および 3′ UTR とポリ A 配列を含む *SERPINB7* cDNA の作成

SERPINB7 cDNA の 5′側を KOD-Plus（Toyobo）と forward プライマー（5′-GAACTGAAGCCCAGCTGTGAA-3′）、reverse プライマー（5′-GACTTGTGGTGGTTCTTTGATG-3′）を用いて PCR によって増幅した。上記で作成した cDNA 1 μl（100 ng）、10×PCR Buffer for KOD-Plus 5 μl、2 mM dNTPs 5 μl、25 mM $MgSO_4$ 2 μl、forward、reverse プライマー（10 μmol/l）をそれぞれ 1.5 μl、KOD-Plus 1 μl および滅菌水 33 μl を混合し、サーマルサイクラー（icycler、Bio-rad）を用いて増幅した。PCR 増幅反応は、94°C 2 分×1 サイクル→（94°C 15 秒→60°C 30 秒→68°C 100 秒）

×35 サイクル→68°C 7 分×1 サイクルで行った。増幅された PCR 産物を QIA quick PCR Purification Kit（Qiagen）を用いて精製した。得られた PCR 産物を 0.8%アガロースゲルで 40 分間泳動し、Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator（ThermoFisher Scientific）で目的のバンドを確認し、フラグメントを切り出した。これらの産物はエタノール沈殿後、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit（ThermoFisher Scientific）でライゲーションし、E. coli HST08 Premium Competent Cells（Takara Bio）を用いてトランスフォーメーションした後、QIAprep® Spin Miniprep Kit（Qiagen）を用いてプラスミドを精製した。このプラスミドを pCR®-Blunt Ⅱ TOPO® ベクター（ThermoFisher Scientific）にクローニングした。3′ UTR とポリ A 配列を含む *SERPINB7* cDNA の領域は AmpliTaq Gold® 360 Master Mix（ThermoFisher Scientific）と forward プライマー（5′-TGGAAATTATGGAGAGTGCTCAACTG-3′）、reverse プライマー（5′-CCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3′）を用いて PCR によって増幅した。合成した *SERPINB7* cDNA の配列は BigDye Terminator version 3.1（ThermoFisher Scientific）と ABI PRISM 3130*xl* 遺伝子アナライザー（ThermoFisher Scientific）で解析した。作製したプラスミドを wild-type *SERPINB7* cDNA とする。

***SERPINB7* 発現ベクターの作製**

上記で作成した wild-type *SERPINB7* cDNA を p3×FLAG-Myc-CMV™-23 Expression Vector（Sigma-Aldrich）に挿入し、*SERPINB7* cDNA の N 末端側に FLAG が連結した、Cytomegalovirus（CMV）プロモーターによる *SERPINB7* 発現ベクターを作製した。このベクターを p3×FLAG-*SERPINB7* wild-type と呼称する（図 7）。このベクターの *SERPINB7* 内に KOD-Plus-Mutagenesis Kit（Toyobo）を用いて、c.796C>T の遺伝子変異を導入した。このベクターを p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T と呼称する（図 7）。Mutagenesis には forward プライマー（5′-TGAATGACCTCTAAGTATGTTGAGG-3′）と reverse プライマー（5′-CCTTGGATTGGTCCATTCCATTAG-3′）を用いた。

Firefly luciferase（以下 FLuc）発現ベクターの作製

後述する変異 *SERPINB7* cDNA の AD293 細胞への過剰発現治療実験において、トランスフェクション効率のコントロールとして、FLuc を用いた。pGL4.20［luc2/Puro］vector（Promega）から firefly luciferase（*luc2*）の領域を取り出し、pNL1.1［Nluc/PGK］vector（Promega）の *Nluc* 遺伝子の領域と交換して挿入し、FLuc 発現ベクター（以下 FLuc ベクター）を作製した。前述した p3×FLAG-*SERPINB7* wild-type、p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T および FLuc ベクターの模式図を図 7 に示す。

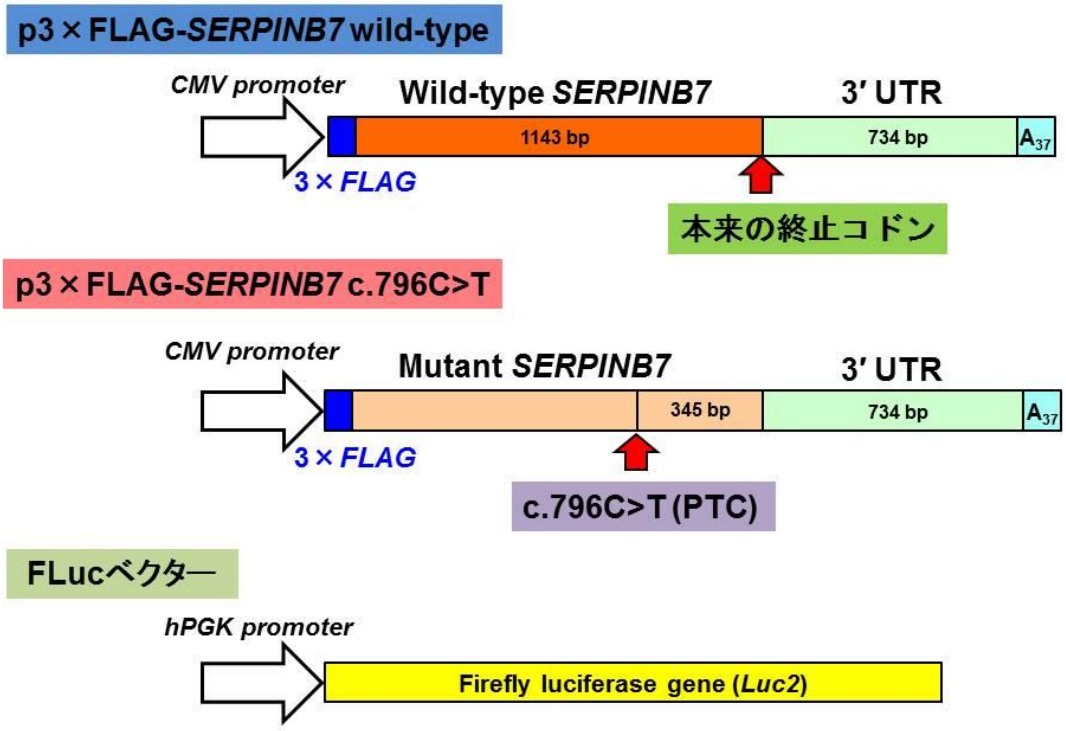


図 7. p3×FLAG-*SERPINB7* wild-type、p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T および FLuc ベクターの模式図

p3×FLAG-*SERPINB7* wild-type と p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T は N 末端に FLAG が連結し、3′ UTR とポリ A 配列を含む。

④ NHEK および c.796C>T KC の不死化

レンチウイルスを用いた形質転換

表皮角化細胞の不死化は、細胞にヒトパピローマウイルス 16 の E6/E7 タンパク質（HPV16 E6/E7）をレンチウイルスを用いて感染させて樹立した。HPV16 E6/E7 の目的遺伝子配列（Takara Bio）（図 8）を pLVSIN-EF1α Pur vector（Takara Bio）にクローニングした。このベクターと lentiviral packaging DNA mix（Lenti-X HTX Packaging System、Takara Bio）を TransIT® transfection reagent（Takara Bio）を用いて Lenti-X™ 293T cell（Takara Bio）にトランスフェクションした。このウイルスベクターを含む培養上清を回収し、フィルター濾過した。NHEK、c.796C>T KC はそれぞれ CnT-PR（Cellntec advanced cell systems）に播種し、6 日間培養した。その後、ウイルスベクターを含む上清と 0.8 μg/μl のポリブレンを含む培地に交換した。24 時間培養後、培地交換して更に 48 時間培養し、puromycin（ThermoFisher Scientific）0.75 μg/ml を含む培地に交換後、培養を継続して目的遺伝子導入細胞の選択を行った。CELLBANKER®1（Takara Bio）を用いて細胞数 1×10^6 で凍結細胞ストックを作製し、－80°C で保存した。NHEK を不死化した細胞を不死化 NHEK、c.796C>T KC を不死化した細胞を不死化 c.796C>T KC と呼称する。本研究では 10 回以上継代した不死化 NHEK と 32 回以上継代した不死化 c.796C>T KC を使用した。

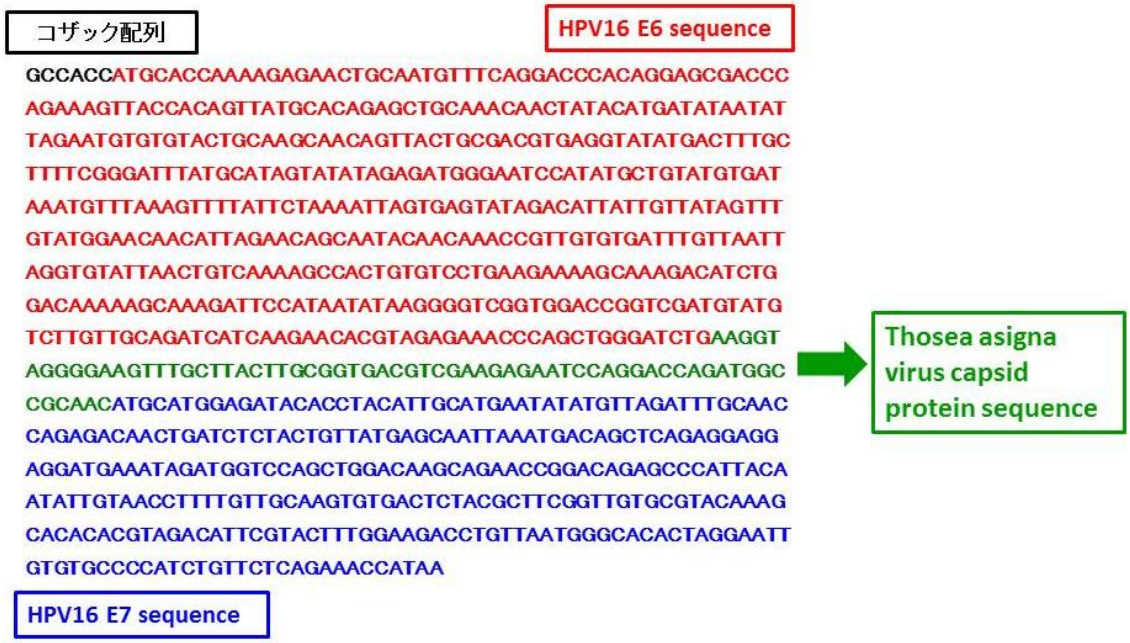


図 8. 表皮角化細胞の不死化に用いた HPV E6/E7 の塩基配列

2. NPPK 患者の *SERPINB7* 遺伝子変異検索

後述する自主臨床研究に参加した NPPK 患者 5 名のうち被験者 2 以外の 4 名は Mizuno ら[13]にて既に解析されていたため、被験者 2 について解析した。患者末梢血からゲノム DNA を QIAamp DNA Blood Maxi Kit（Qiagen）を用いて抽出した。*SERPINB7* の全てのエクソン領域とエクソン－イントロン境界領域を PCR によって増幅した。ゲノム DNA（100 ng/μl）を 2 μl、forward、reverse プライマー（10 μmol/l）（表 1）をそれぞれ 4 μl、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix（ThermoFisher Scientific）25 μl を 0.2 ml PCR チューブに入れて、サーマルサイクラー（icycler、Bio-rad）を用いて増幅した。PCR 増幅反応は、95°C 10 分→（95°C 30 秒→56°C 30 秒→72°C 84 秒）×35 サイクル→72°C 7 分で行った。増幅された PCR 産物を ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-UP（Affymetrix）を用いて精製し、96°C 2 分→（96°C 10 秒→50°C 5 秒→60°C 4 分）×25 サイクルの条件でシークエンス反応を行った。精製後の PCR 産物のエタノール沈殿を行い、ABI PRISM 3130*xl* 遺伝子アナライザー（ThermoFisher Scientific）で解析した。

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	

表 1. *SERPINB7* 遺伝子変異検索に用いたプライマー配列

3. 変異 *SERPINB7* cDNA を用いたリードスルー活性の検討

c.796C>T 変異を *SERPINB7* cDNA コンストラクト内に作成し、AD293 細胞（Agilent Technologies）に過剰発現させて、ゲンタマイシン及び ataluren で治療し、SERPINB7 タンパク質の発現をウェスタンブロッティングで解析した。トランスフェクション効率のコントロールとして FLuc を用いた。本実験の概要の模式図を示す（図 9）。

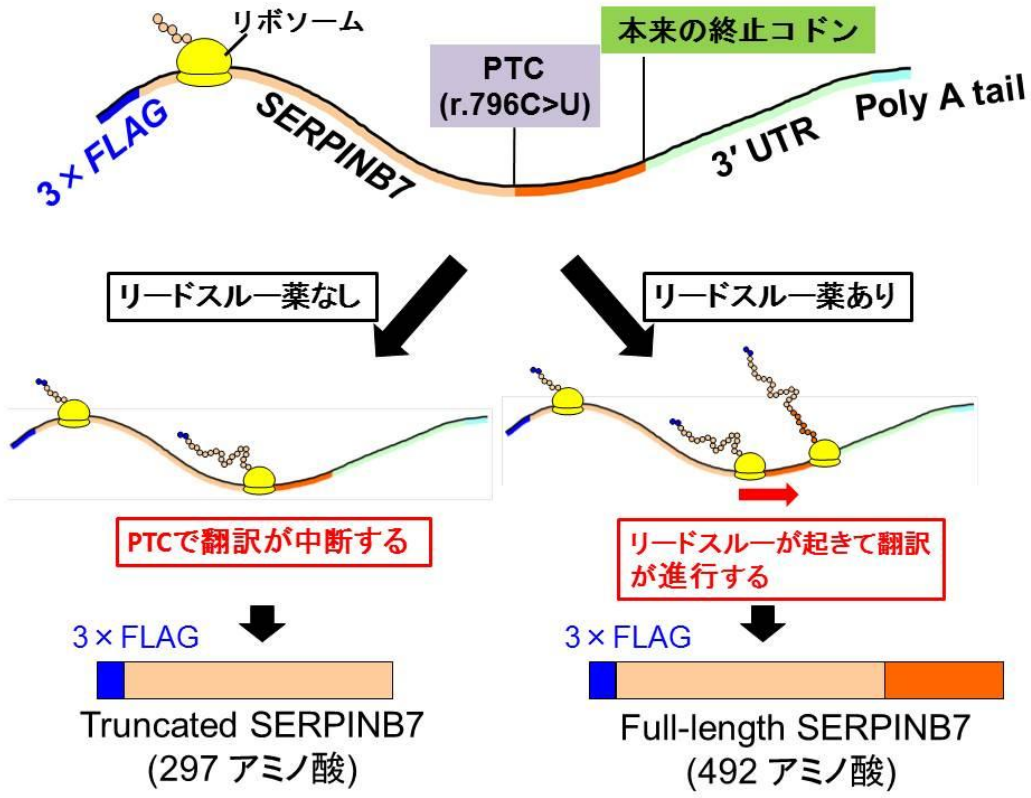


図 9. 変異 *SERPINB7* cDNA におけるリードスルー薬の有無によるタンパク質産生について

c.796C>T の変異をもつ *SERPINB7* cDNA では PTC で翻訳が中止され、297 アミノ酸の truncated SERPINB7 タンパク質が産生される。しかしゲンタマイシンや ataluren で治療した際にリードスルーが起きて通常の翻訳が進行された場合には 492 アミノ酸の full-length SERPINB7 タンパク質が産生される。

① Reverse transfection による過剰発現実験

AD293 細胞を 10% FBS を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（Nacalai tesque）で培養し、p3×FLAG -*SERPINB7* c.796C>T と FLuc ベクターを同時にトランスフェクションした。

1. Opti-MEM I Reduced-Serum Medium（ThermoFisher Scientific）30 µl/ウェルと p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T ベクター、FLuc ベクター各 600 ng/ウェル、P3000 Reagent（ThermoFisher Scientific）2.4 µl/ウェルを併せて混合した。
2. Opti-MEM I Reduced-Serum Medium（ThermoFisher Scientific）30 µl/ウェル、Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent（ThermoFisher Scientific）3.6 µl/ウェルを混合した。
3. 1 と 2 を混合し、数回転倒混和した後、5 分間室温で静置した。
4. AD293 細胞をトリプシンで剥離し、抗生物質を含まない DMEM に懸濁し、TC10™ Automated Cell Counter（Bio-Rad）で細胞濃度を計測し、細胞の濃度が 2×10^5/ml になるよう調整した。
5. 細胞懸濁液 600 µl に 3 で調整した溶液を添加し、24 ウェルプレートに播種し、37°C、CO_2 5%の条件で培養した。

② AD293 細胞の治療

トランスフェクションしてから 24 時間後、細胞を Gentamicin Sulfate Solution（Wako）、G418（Sigma-Aldrich）、ataluren（Selleckchem）で治療した。Gentamicin Sulfate Solution は DMEM で希釈し、39 µg/ml-10000 µg/ml で治療した。G418 も DMEM で希釈し、100 µg/ml で治療した。ataluren も DMEM で希釈したが、試薬自体が dimethyl sulfoxide（DMSO）に溶解しているため、DMSO の濃度を 0.5%に統一するように Culture Sure DMSO（Wako）を加え、1.56 µM-100 µM の濃度で治療した。それぞれ 60 時間治療した後、セルライセートを回収した。

③ セルライセートの回収

各薬剤を加えて 60 時間後、培地を除去し、NuPAGE® LDS Sample Buffer（4×）（ThermoFisher Scientific）、NuPAGE® Sample Reducing Agent（10×）（ThermoFisher Scientific）を水で希釈して作成したサンプルバッファーを各ウェルに 100 µl ずつ添加して全量回収した。Ultrasonic liquid professor Q125（Qsonica）でソニケーション後、4°C、14000 rpm、10 分間遠心した。

④ ウェスタンブロッティング

試料を 4-12% NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 1.0 mm、12well（ThermoFisher Scientific）の各ウェルに挿入し泳動した。泳動完了後、ゲルを超純水に浸し、更に 20%エタノール水溶液に 5 分間浸して震盪させた。iBlot® 2 Dry Blotting System（ThermoFisher Scientific）を用いて、P0、10 分間の条件で iBlot® 2 PVDF Regular Stacks（ThermoFisher Scientific）に転写した。5%スキムミルクに浸し、室温下で 1 時間ブロッキングした後、 Tris Buffered Saline（TBS）で洗浄した。1 次抗体を室温で 1 時間震盪し反応させ、TBS に Tween® 20（Sigma-Aldrich）を 0.5%の濃度になるよう添加した試薬（以下 TBST）で十分に洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBST で十分に洗浄した。FLAG-SERPINB7 を検出する 1 次抗体は抗 FLAG M2 抗体（F3165、Sigma-Aldrich）を、FLuc を検出する 1 次抗体は抗 FLuc 抗体（ab16466、Abcam）を用いた。1 次抗体は Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 1（Toyobo）で 1:1000 に希釈した。2 次抗体は Peroxidase-Affini Pure goat anti-mouse IgG（H+L）（115-035-003、Jackson）を使い、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 2（Toyobo）で 1:2000 に希釈した。2 次抗体と反応させた後、メンブレンを ECL Western Blotting Detection Reagents（GE Healthcare）で反応させ、ImageQuant LAS 4000（Fujifilm）を用いてシグナルを検出した。

4. NPPK 患者細胞を用いたリードスルー活性の検討

不死化 c.796C>T KC をゲンタマイシンで治療し、SERPINB7 タンパク質が産生されるかを検討した。

① NHEK を用いた SERPINB7 タンパク質の特定

NHEK および不死化 c.796C>T KC のウェスタンブロッティングを実施した。*SERPINB7* の N 末端を認識する抗 SERPINB7 抗体（ab127752、Abcam）を使用した。非特異バンドが多く見られたため、初めに NHEK を用いて *SERPINB7* を siRNA 処理して SERPINB7 タンパク質のバンドを特定した。

1. si*SERPINB7* として使用した Stealth RNAi™ pre-designed siRNAs（HSS112792、ThermoFisher Scientific）を 0.07 µl/ウェルと Opti-MEM 25 µl/ウェルを混合し、数回転倒混和した。コントロールとして Stealth RNAi™ siRNA Negative Control siRNA（12935-300、ThermoFisher Scientific）を用いた。
2. 上記の混合液にそれぞれ Lipofectamine™ RNAi MAX Transfection Reagent（ThermoFisher Scientific）0.25 µl/ウェルを添加し、転倒混和後、20 分間室温で静置した。
3. CnT-PR（Cellntec advanced cell systems）で培養した NHEK をトリプシンで剥離し、CnT-PRD（Cellntec advanced cell systems）に懸濁し、TC10™ Automated Cell Counter で細胞濃度を計測し、細胞の濃度が 2×10^5/ml になるよう調整した。
4. 細胞懸濁液 1250µl/ウェルに 2 で調整した溶液を添加し、12 ウェルプレートの各ウェルに分けて播種し、37°C、CO_2 5%の条件で培養した。
5. 24 時間後、1.2 mM $CaCl_2$ に調整した CnT-PRD 培地に交換した。
6. 更に 72 時間培養し、各ウェルを PBS で洗浄し、NuPAGE® LDS Sample Buffer（4×）（ThermoFisher Scientific）、NuPAGE® Sample Reducing Agent（10×）（ThermoFisher Scientific）を水で希釈して作成したサンプルバッファーを加えた。軽く震盪させ回収した後、ソニケーションし、4°C、14000 rpm、10 分間遠心した。このサンプルをウェスタンブロッティングに用いた。

② 不死化 c.796C>T KC の治療

不死化 c.796C>T KC を TC10™ Automated Cell Counter を用いて、細胞濃度を計測し、6 ウェルプレートに 3×10^5/ml 個ずつ、CnT-PRD（Cellntec advanced cell systems）に播種して培養した。播種 24 時間後、$CaCl_2$ 1.2 mM 添加 CnT-PRD に交換した。24 時間後、Gentamicin Sulfate Solution（Wako）10000 μg/ml、15000 μg/ml、G418（Sigma-Aldrih）400 μg/ml で治療した。各薬剤は 1.2 mM $CaCl_2$ に調整した CnT-PRD で希釈した。48 時間治療後、セルライセートを回収した。

③ ウェスタンブロッティング

前述した実験と同様の方法でライセートを回収し、ウェスタンブロッティングを施行した。1 次抗体は抗 SERPINB7 抗体（ab127752、Abcam）を使用し、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 1（Toyobo）で 1:1000 に希釈した。2 次抗体は horseradish-peroxidase（HRP）-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody（MBS176703、MyBiosource）を使用し、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 2（Toyobo）で 1:2000 に希釈した。2 次抗体と反応させた後、メンブレンを 20X LumiGLO® Reagent と 20X Peroxide（CST）で反応させ、Image Quant LAS 4000（Fujifilm）でシグナルを検出した。SERPINB7 を検出したメンブレンは Restore™ Western Blot Stripping Buffer（ThermoFisher Scientific）を用いて、抗体をストリッピングした。内部コントロールとして、抗 β-actin 抗体（AC-15）（AM4302、ThermoFisher Scientific）を 1:1000 に希釈し反応させた。2 次抗体は Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG（H+L）（115-035-003、Jackson）を 1:4000 に希釈し反応させた。20X LumiGLO® Reagent と 20X Peroxide で反応させ、ImageQuant LAS 4000 でシグナルを検出した。

5. NPPK 患者に対するゲンタマイシン外用によるリードスルー治療の検討

北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け、『長島型掌蹠角化症に対するアミノグリコシド系抗生物質製剤外用によるリードスルー治療の研究』の自主臨床研究を実施した（承認番号 014-0427）。UMIN 臨床試験登録システム（UMIN-CTR: http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm）に登録した（UMIN ID 000018677）。

1. 研究のデザイン

無作為化、プラセボ対照、一部盲検試験（評価者盲検）。

2. 対象患者および適格性の基準

北海道大学病院皮膚科に通院中のNPPK患者を対象とし、下記の基準を全て満たす患者を被験者とした。

1）同意取得時において年齢が1歳以上の患者
2）NPPKの原因遺伝子が同定されており、c.796C>Tの遺伝子変異をホモ接合性あるいはヘテロ接合性に保有する患者
3）両手に過角化、紅斑の症状を有する患者
4）本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人あるいは代諾者の自由意思による文書同意が得られた患者

3. 被験者のエントリー

2.の基準を満たすNPPK患者5名（c.796C>T変異をホモ接合性に保有する患者3名、c.796C>T変異をヘテロ接合性に保有する患者2名）を本研究にエントリーした。

4. 外用試験の方法

被験者は片方の手掌、手背の過角化、紅斑を伴う病変部位にゲンタシン® 軟膏 0.1%（MSD）を外用し、コントロールとして反対側の手掌、手背の過角化、紅斑を伴う病変部位に白色ワセリン（Pfizer）を外用した。白色ワセリン外用部位にゲンタシン® 軟膏 0.1%が塗布されないように、白色ワセリンから先に外用した。外用薬と外用側の割り当ては、効果を評価する研究責任者はわからない状態とし、被験者はわかる状態とした。外用薬と外用側の割り当ては研究責任者以外の研究担当者が被験者を登録した順に無作為に割り付けて管理した（図 10）。各被験者は第 2 指の先端から第 1 関節に乗る量を 1 回分として、1 日 2 回（朝、夕）4 週間外用した。試験開始前から使用していた外用剤は中止とした。ただし抗真菌外用薬の使用は症状に応じ

て継続とした。外用剤による刺激感等の副作用で外用を継続できなくなった場合、その部位については終了することとした。試験薬の外用により皮膚症状が明らかに増悪し、継続不可能であれば中止し、皮膚症状の重症度に合った適切な外用薬を外用することとした。被験者情報および各試験薬の外用部位の割り当てを表 2 に示す。

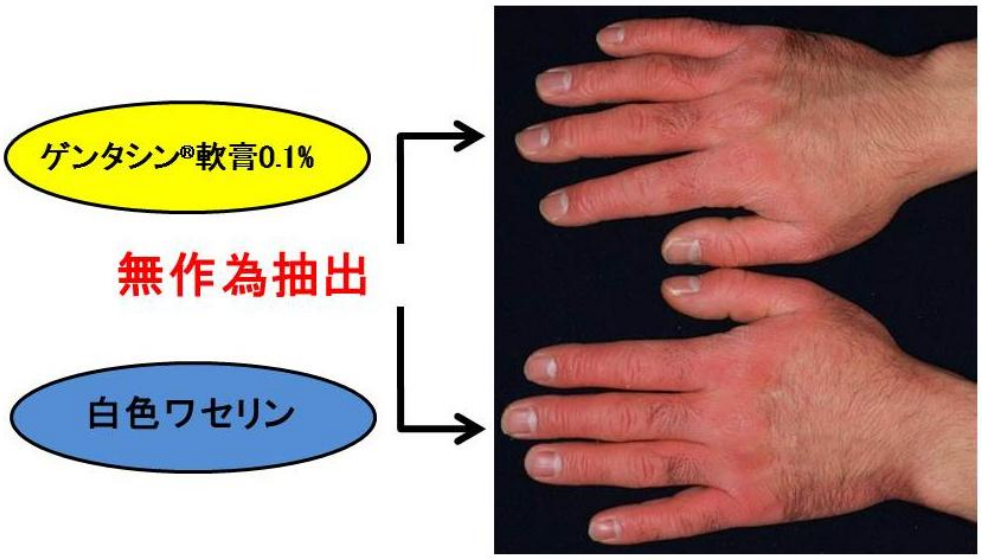


図 10. 試験薬外用部位の割り付け

左右の手にゲンタシン® 軟膏 0.1%と白色ワセリンを無作為に割り付けて手掌、手背の過角化、紅斑を伴う病変部位に外用した。

被験者	年齢	性別	*SERPINB7* 変異		左手	右手
1	28	男	c.796C>T	c.796C>T	ゲンタシン® 軟膏 0.1%	白色 ワセリン
2	29	男	c.796C>T	c.796C>T	ゲンタシン® 軟膏 0.1%	白色 ワセリン
3	6	女	c.796C>T	c.455-1G>A	白色 ワセリン	ゲンタシン® 軟膏 0.1%
4	40	女	c.796C>T	c.455-1G>A	白色 ワセリン	ゲンタシン® 軟膏 0.1%
5	46	男	c.796C>T	c.796C>T	ゲンタシン® 軟膏 0.1%	白色 ワセリン

表 2. 被験者情報および各試験薬の外用部位の割り当て

5. 評価項目

1. 皮膚科専門医による治療前後の臨床改善度の評価

試験開始時、4週間後に研究担当者が診察し、研究責任者1名が症状の変化を『改善』・『不変』・『悪化』の3段階で評価した。この際、研究責任者には被験者がどちらの手にどの外用剤を外用したかわからないようにした。試験薬外用による病変の評価は、視診、触診及び臨床写真の比較により行った。皮膚の紅斑（赤み）が試験薬外用前よりも軽快している場合を、『改善』、変わらない場合を『不変』、赤みが強くなった場合を『悪化』とした。皮膚の過角化は視診、触診で鱗屑、皮膚の硬さを評価した。鱗屑の減少、皮膚の硬化の改善を認めた場合を『改善』、それらが治療前と変わらない場合を『不変』、鱗屑の増加、皮膚の硬化の増強を認めた場合を『悪化』と評価した。治療前後の臨床写真はCASMATCH（ベアーメディック）とAdobe Photoshop Element 9（Adobe Systems）を併用し、色調を補正して比較した。

2. 被験者による皮膚の改善度の評価

試験薬外用開始前と外用 4 週間後に被験者が過角化、紅斑の症状について visual analogue scale（VAS）を用いて評価した。「症状がない」を 0、「非常に悪い」を 100 mm とした時に、症状がどの程度かを長さで示し、その値を結果とした。

6. NPPK 患者皮膚における *SERPINB7* mRNA 発現量の検討

健常人 3 名と c.796C>T 変異をホモ接合性に有する NPPK 患者 5 名の手掌の皮膚における *SERPINB7* mRNA 発現量を quantitative real-time polymerase chain reaction（以下 qRT-PCR と略）を用いて解析した。

① 皮膚からの RNA 抽出

皮膚は手掌より採取し、前述した「Ⅲ.コンストラクトの作成-①皮膚からの RNA 抽出」と同様の方法で皮膚から RNA 抽出した。

② cDNA への逆転写

RNA 100 ng、50 μM Random hexamer 1 μl、10 mM dNTP mix 1 μl（いずれも ThermoFisher Scientific）を 0.2 ml PCR チューブに加え、滅菌水を加えて合計 14.25 μl になるよう調整した。65°C 5 分間反応後、氷上で 1 分間急冷した。

SuperScript™ Ⅳ Reverse Transcriptase（200 units/μl）0.25 μl、RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 0.5 μl、5×SS Ⅳ Buffer 4 μl および 0.1 M DTT 1 μl（いずれも ThermoFisher Scientific）を混合し、23°C 10 分、55°C 15 分、80°C 10 分処理後 16°C で保持して cDNA へ逆転写した。

③ qRT-PCR

逆転写産物 1 μl、各種 forward、reverse プライマー（10 μmol/l）0.2 μl、SYBER® Select Master Mix（ThermoFisher Scientific）7.5 μl および滅菌水 4 μl を混合し、96 ウェルプレート（MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate）（ThermoFisher Scientific）に入れて、StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム（ThermoFisher Scientific）で解析した。反応条件は 50°C 2 分、95°C 2 分、（95°C 15 秒→58°C 15 秒→72°C 1 分）×40 サイクルで行った。各サンプルにつき technical replicate を 3 とし、*SERPINB7* の mRNA 量を *18S rRNA* の mRNA 量で補正した。*SERPINB7* のプライマーは forward（5′-ATTTCATTGTCTTTCTTCCCACG-3′）、reverse（5′-CTTACCAGTTGAGCACTCTCC-3′）を使用し、*18S rRNA* のプライマーは forward（5′-GCAATTATTCCCCATGAACG-3′）、reverse（5′-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3′）を用いた。

7. c.796C>T を持つ変異 *SERPINB7* mRNA に対する NMD の検討

1. 不死化 c.796C>T KC のシクロヘキサミド治療による *SERPINB7* mRNA 量の検討

SERPINB7 の c.796C>T 変異における NMD について検討するため、翻訳を阻害するシクロヘキサミドで治療し、qRT-PCR を行い *SERPINB7* mRNA 量を解析した。

① 不死化 c.796C>T KC の治療

96 ウェルプレートに NHEK および c.796C>T KC を播種し、CnT-PRD（Cellntec advanced cell systems）で 24 時間培養した。$CaCl_2$ 1.2 mM となるよう添加した CnT-PRD に交換し、24 時間培養した。シクロヘキサミド（Abcam）で 0.016 μM、0.08 μM、0.4 μM、2 μM、10 μM、50 μM、100 μM、200 μM、400 μM の濃度で 24 時間治療した。

② RNA 抽出および cDNA 合成

不死化 c.796C>T KC からの RNA 抽出と cDNA 合成には SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR（Toyobo）を用いた。SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR 内の Lysis Solution と gDNA Remover を混合して Lysis Buffer を作成し、また Stop Solution と RNase Inhibitor を混合して Stop Buffer を作成した。上記のように治療した各ウェルから培地を除去後、PBS を 100 μl ずつ加えた。各ウェルから PBS を除去し、上記の Lysis Buffer を加えて、30 秒震盪させた後、室温下で 5 分間静置した。次に各ウェルに Stop Buffer を加えて、30 秒震盪させた後、氷上で 5 分間静置した。SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR 内の 5×RT Master Mix と Nuclease-free Water を混合し、これらを各ウェルに加えた。37°C 15 分、50°C 5 分、98°C 5 分処理後 16°C で保持して cDNA へ逆転写した。

③ qRT-PCR

本実験の qRT-PCR には SYBER® Fast qPCR Mix（Takara Bio）を用いた。各サンプルにつき technical replicate を 3 とし、*SERPINB7* の mRNA 量を *18S rRNA* の mRNA 量で補正した。*SERPINB7* のプライマーは forward（5′-ATTTCATTGTCTTTCTTCCCACG-3′）、reverse（5′-CTTACCAGTTGAGCACTCTCC-3′）を使用し、*18S rRNA* のプライマーは forward（5′-GCAATTATTCCCCATGAACG-3′）、reverse（5′-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3′）を用いた。

2. *UPF1* ノックダウン処理による *SERPINB7* mRNA 発現の検討

NMD の重要な因子である *UPF1* 遺伝子を、不死化 NHEK と不死化 c.796C>T KC でノックダウンし、qRT-PCR を行い *SERPINB7* mRNA 量を解析した。

①不死化 NHEK と不死化 c.796C>T KC の *UPF1* siRNA 処理

1. 2 種類の si*UPF1* を準備し、いずれも Silencer® select siRNAs（ThermoFisher Scientific）を使用した（si*UPF1*#1: s11928）、（si*UPF1*#2: s11926）。コントロールとして Silencer® Select Negative Control siRNA（4390843、ThermoFisher Scientific）を用いた。si*UPF1* 0.3 μl/ウェルと Opti-MEM 100 μl/ウェルを混合し、数回転倒混和した。
2. 上記の混合液にそれぞれ Lipofectamine™ RNAi MAX Transfection Reagent（ThermoFisher Scientific）0.25 μl/ウェルを添加し、転倒混和後、20 分間室温で静置した。
3. 不死化 NHEK および不死化 c.796C>T KC をトリプシンで剥離し、CnT-PRD に懸濁し、TC10™ Automated Cell Counter で細胞濃度を計測し、細胞の濃度が 2×10^5/ml になるよう調整した。
4. 細胞懸濁液 400 μl/ウェルに 2 で調整した溶液を添加し、96 ウェルプレートの各ウェルに 125 μl ずつ播種し、37°C、CO_2 5%の条件で培養した。
5. 24 時間後、1.2 mM $CaCl_2$ に調整した CnT-PRD に交換した。

②RNA 抽出および cDNA 合成

不死化 NHEK と不死化 c.796C>T KC からの RNA 抽出および cDNA 合成は前述した不死化 c.796C>T KC のシクロヘキサミド治療の際と同様の方法で行った。

③qRT-PCR

本実験の qRT-PCR には SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ（Takara Bio）を用いた。各サンプルにつき technical replicate を 3 とし、*SERPINB7* の mRNA 量を *18S rRNA* の mRNA 量で補正した。*SERPINB7* のプライマーは forward（5′-ATTTCATTGTCTTTCTTCCCACG-3′）、reverse（5′-CTTACCAGTTGAGCACTCTCC-3′）を使用し、*UPF1* のプライマーは forward（5′-CCCAAGACTGACTCTGACATG-3′）、reverse（5′-CAGCTCAATGGCGATCTCATC-3′）を使用し、*18S rRNA* のプライマーは forward（5′-GCAATTATTCCCCATGAACG-3′）、reverse

（5′-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3′）を用いて、それぞれの mRNA 量を測定した。

8. プロテアソームによる truncated SERPINB7 タンパク質分解の検討

1. *SERPINB7* cDNA 過剰発現における truncated SERPINB7 タンパク質の分解

①Reverse transfection による過剰発現実験

HaCaT 細胞（CLS Cell Lines Service）を 10% FBS を加えた DMEM で培養し、p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T と FLuc ベクターを同時にトランスフェクションした。p3×FLAG-*SERPINB7* wild-type も同様にトランスフェクションした。

1. Opti-MEM I Reduced-Serum Medium（ThermoFisher Scientific）30 μl/ウェルと p3×FLAG-*SERPINB7* c.796C>T ベクター、FLuc ベクター各 600 ng/ウェル、P3000 Reagent（ThermoFisher Scientific）2.4 μl/ウェルを混合した。
2. Opti-MEM I Reduced-Serum Medium（ThermoFisher Scientific）30 μl/ウェル、Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent（ThermoFisher Scientific）3.6 μl/ウェルを混合した。
3. 1 と 2 を混合し、数回転倒混和した後、5 分間室温で静置した。
4. HaCaT 細胞をトリプシンで剥離し、抗生物質を含まない DMEM に懸濁し、TC10™ Automated Cell Counter（Bio-Rad）で細胞濃度を計測し、細胞の濃度が 4×10^5/ml になるよう調整した。
5. 細胞懸濁液 600 μl に 3 で調整した溶液を添加し、24 ウェルプレートに播種し、37°C、CO_2 5%の条件で培養した。

②MG132 を用いた治療

トランスフェクションしてから 24 時間後、DMEM に交換し、さらに 24 時間培養した。26S プロテアソーム阻害作用を有する MG132（Cell Signaling Technology）50 μM で 6 時間治療した後セルライセートを回収した。コントロールとして MG132 で未治療のサンプルも作成した。

③ウェスタンブロッティング

前述した実験と同様の方法でライセートを回収し、ウェスタンブロッティングを施行した。FLAG-SERPINB7 を検出する 1 次抗体は抗 FLAG M2 抗

体（F3165、Sigma-Aldrich）を使用し、FLuc を検出する 1 次抗体は抗 FLuc 抗体（ab16466、Abcam）を用いた。1 次抗体は Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 1（Toyobo）で 1:1000 に希釈した。2 次抗体は Peroxidase-Affini Pure goat anti-mouse IgG（H+L）（115-035-003、Jackson）を使用し、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 2（Toyobo）で 1:4000 に希釈した。内部コントロールとして、抗 β-actin 抗体（AC-15）（AM4302、ThermoFisher Scientific）でも 1:1000 に希釈し反応させた。2 次抗体は Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG（H+L）（115-035-003、Jackson）を 1:4000 に希釈し反応させた。2 次抗体と反応させた後、メンブレンを SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate（ThermoFisher Scientific）で反応させ、ImageQuant LAS 4000（Fujifilm）を用いてシグナルを検出した。

2. 不死化 c.796C>T KC における truncated SERPINB7 タンパク質の分解
①MG132 を用いた治療

不死化 c.796C>T KC を 12 ウェルプレートに播種して、CnT-PRD（Cellntec advanced cell systems）で培養した。播種 24 時間後、$CaCl_2$ 1.2 mM 添加 CnT-PRD に交換した。24 時間後、MG132 10 μM、50 μM、100 μM、150 μM、200 μM で治療した。各薬剤は 1.2 mM $CaCl_2$ に調整した CnT-PRD で希釈した。12 時間治療後、セルライセートを回収した。

②ウェスタンブロッティング

前述した実験と同様の方法でライセートを回収し、ウェスタンブロッティングを施行した。1 次抗体は抗 SERPINB7 抗体（ab127752、Abcam）を使用し、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 1（Toyobo）で 1:1000 に希釈した。2 次抗体は horseradish-peroxidase（HRP）-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody（MBS176703、MyBiosource）を使用し、Can Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 2（Toyobo）で 1:2000 に希釈した。2 次抗体と反応させた後、メンブレンを 20X LumiGLO® Reagent と 20X Peroxide（CST）で反応させ、Image Quant LAS 4000（Fujifilm）でシグナルを検出した。SERPINB7 を検出したメンブレンは Restore™ Western Blot Stripping Buffer（ThermoFisher Scientific）を用いて、抗体をストリッピングした後、内部コントロールとして、抗 β-actin 抗体（AC-15）（AM4302、ThermoFisher Scientific）を 1:1000 に希釈し反応させた。2 次抗体は

Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG（H+L）、（115-035-003、Jackson）を 1:4000 に希釈し反応させた。別のコントロールとして、これらのサンプルを泳動したゲルを Coomassie Brilliant Blue（ThermoFisher Scientific）に浸し、染色して Image Quant LAS 4000（Fujifilm）で撮影した。

9. 本研究における統計学的解析

統計学的解析にはアドインソフト Statcel 3 を用いた。解析結果は平均±標準誤差で示した。臨床研究の VAS スコアの P 値は paired *t-test* で解析し、また各 mRNA 定量実験の P 値は Student's unpaired two-tailed *t-test* で解析した。P 値<0.05 を有意差ありとみなした。

実験結果

1. ゲンタマイシンは *SERPINB7* cDNA において c.796C>T 変異のリードスルーを促進し、SERPINB7 タンパク質産生を増加させた

ゲンタマイシンは 312 μg/ml から 5000 μg/ml の間では濃度依存性に full-length SERPINB7 タンパク質の産生増加を認めた。10000 μg/ml の濃度では full-length SERPINB7 タンパク質の産生増加を認めたが、5000 μg/ml と比較すると若干発現が低下していた。陽性コントロールである G418 の治療では、full-length SERPINB7 タンパク質の産生が最も増加していた。一方、FLuc タンパク質はどの濃度でも同様の発現を示した（図 11）。これらの結果により、ゲンタマイシンが SERPINB7 cDNA において c.796C>T 変異に対し、リードスルー活性があることを示した。

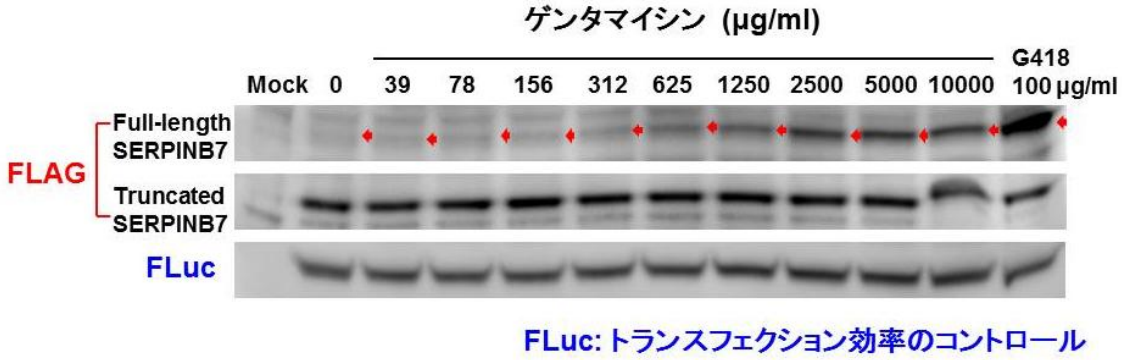


図 11. ゲンタマイシン治療による SERPINB7 タンパク質の発現
⬅：full-length SERPINB7
ゲンタマイシン 312 μg/ml から 5000 μg/ml の間では濃度依存性に full-length SERPINB7 タンパク質の産生増加を認めた。10000 μg/ml では full-length SERPINB7 タンパク質の産生を認めたが、5000 μg/ml と比較すると発現が低下していた。

2. Ataluren は *SERPINB7* cDNA において c.796C>T 変異のリードスルーを促進しなかった

Ataluren は 0.39-100 μM の全ての濃度で full-length SERPINB7 タンパク質の産生を増加させず、SERPINB7 cDNA において c.796C>T 変異に対するリードスルー活性を示さなかった。一方、ataluren の治療により FLuc タンパク質の増加を認めた（図 12）。

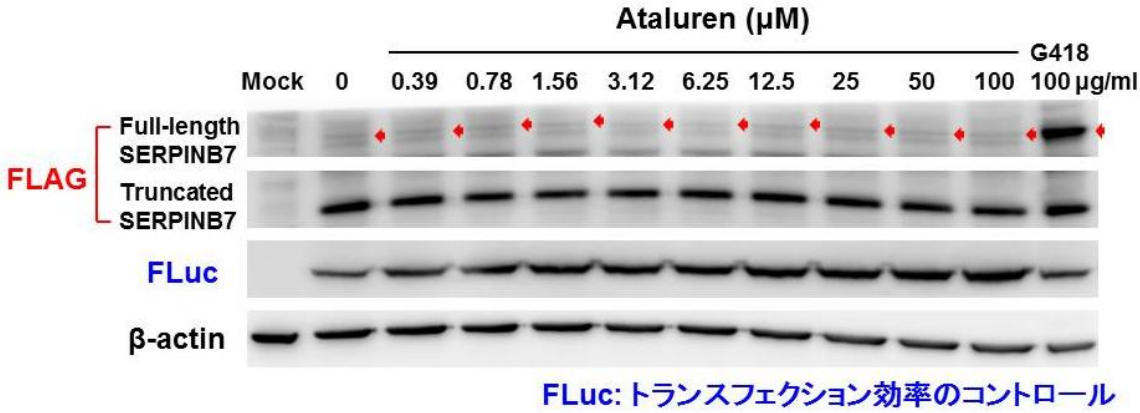


図 12. Ataluren 治療による SERPINB7 タンパク質の発現

⬅ ：full-length SERPINB7

Ataluren は 0.39-100 μM の全ての濃度で full-length SERPINB7 タンパク質の産生を増加させなかった。一方、ataluren の治療により FLuc タンパク質の増加を認めた。

3. ゲンタマイシンは患者由来表皮角化細胞においても c.796C>T 変異のリードスルーを促進し、SERPINB7 タンパク質を産生した

NPPK 患者細胞を用いたリードスルー活性の検討

SERPINB7 タンパク質の検出には SERPINB7 の N 末端を認識する抗体を使用したが、非特異と思われるバンドが多く検出された。そこで、まず初めに NHEK の *SERPINB7* 遺伝子をノックダウンし、SERPINB7 特異的なバンドを確定した（図 13a）。不死化 c.796C>T KC をゲンタマイシン 10000 µg/ml、15000 µg/ml と G418 400 µg/ml で治療したところ、SERPINB7 タンパク質の産生が増加したため、患者由来表皮角化細胞においてもゲンタマイシンが c.796C>T に対してリードスルー活性を有することが示された（図 13b）。

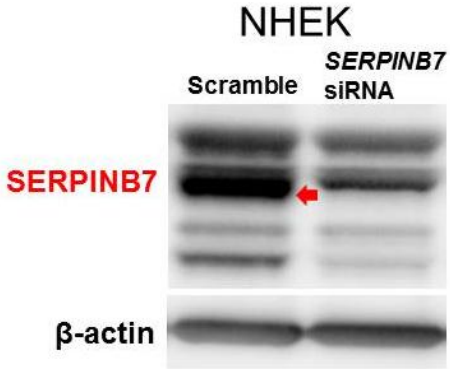


図 13a. NHEK における SERPINB7 タンパク質の同定

⬅ ：SERPINB7 特異的バンド

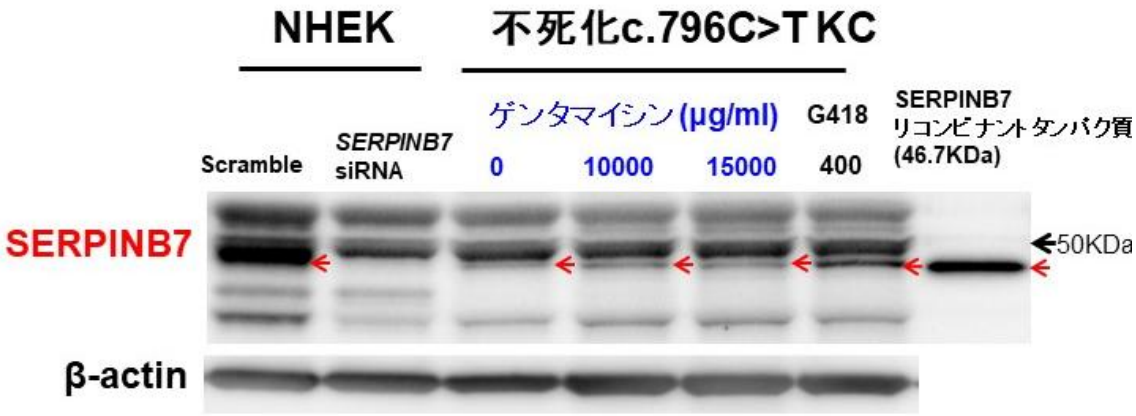


図 13b. 不死化 c.796C>T KC におけるゲンタマイシン治療による SERPINB7 タンパク質の発現　　←: SERPINB7

不死化 c.796C>T KC をゲンタマイシン 10000 µg/ml、15000 µg/ml で治療したところ、SERPINB7 タンパク質の産生が増加した。

4. ゲンタマイシン外用治療により、過角化の改善が見られた NPPK 患者に対するゲンタマイシン外用によるリードスルー治療の検討

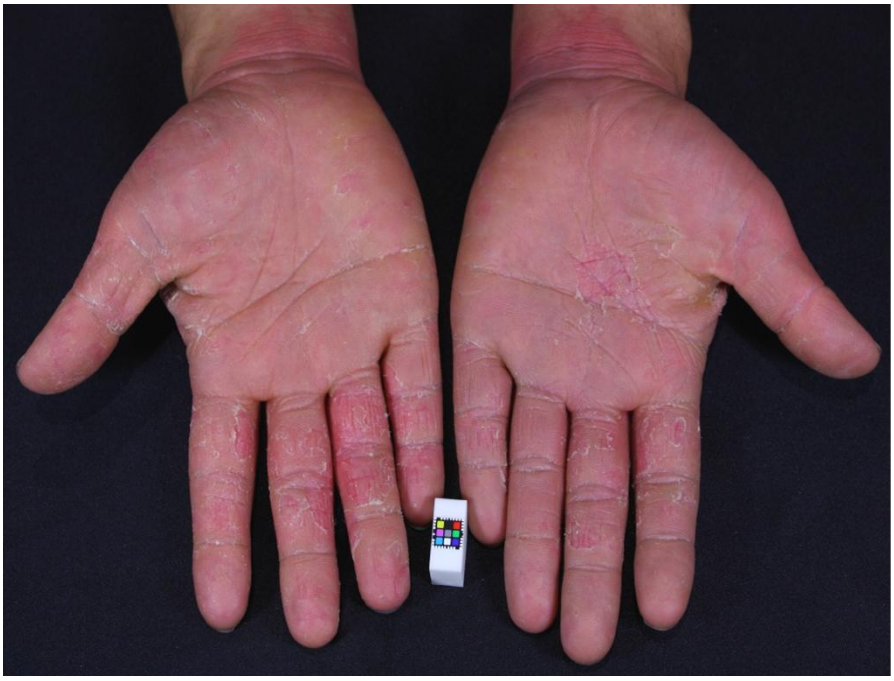
1. 皮膚科専門医による治療前後の臨床改善度の評価

皮膚の過角化は c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する被験者 1 と被験者 5 の 2 名において白色ワセリン外用側では『不変』であったが、ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側で病変部の過角化が減少し、『改善』の評価であった。被験者 1、被験者 5 の治療前後の臨床像を示す（図 14、図 15）。他の 3 名はゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側、白色ワセリン外用側の両方で『不変』であった。被験者 2、3、4 の治療前後の臨床像を示す（図 16-18）。皮膚の紅斑は 5 名の被験者全てにおいてゲンタシン® 軟膏 0.1%側、白色ワセリン外用側ともに『不変』であった。各被験者の評価者による改善度の結果は表 3、4 にまとめた。

治療前

白色ワセリン　　ゲンタシン® 軟膏0.1%

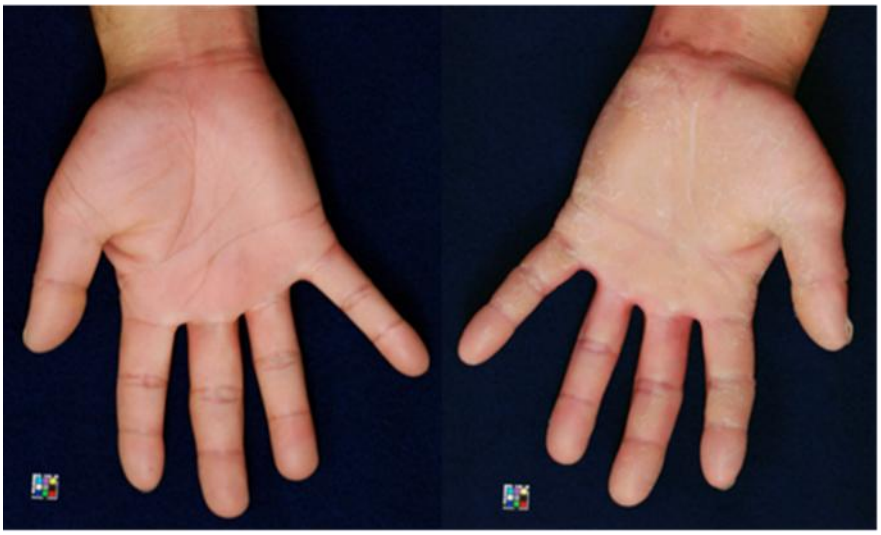
治療後



白色ワセリン　　ゲンタシン® 軟膏0.1%

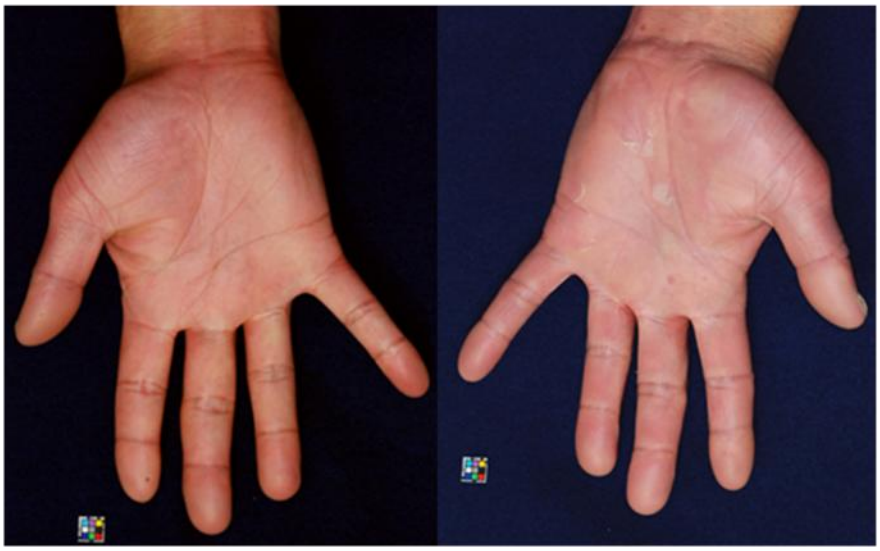
図 14. 被験者 1 の治療前後の臨床像と手指の拡大像
ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側で病変部の過角化の改善を認めた。

治療前



白色ワセリン　　ゲンタシン® 軟膏0.1%

治療後



白色ワセリン　　ゲンタシン® 軟膏0.1%

図 15. 被験者 5 の治療前後の臨床像

各試験薬を 3 週間外用し、開始後 4 週間後に撮影した臨床写真。著明な過角化を認め、皮膚の硬さが目立っていたが、ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用後は過角化は改善した。

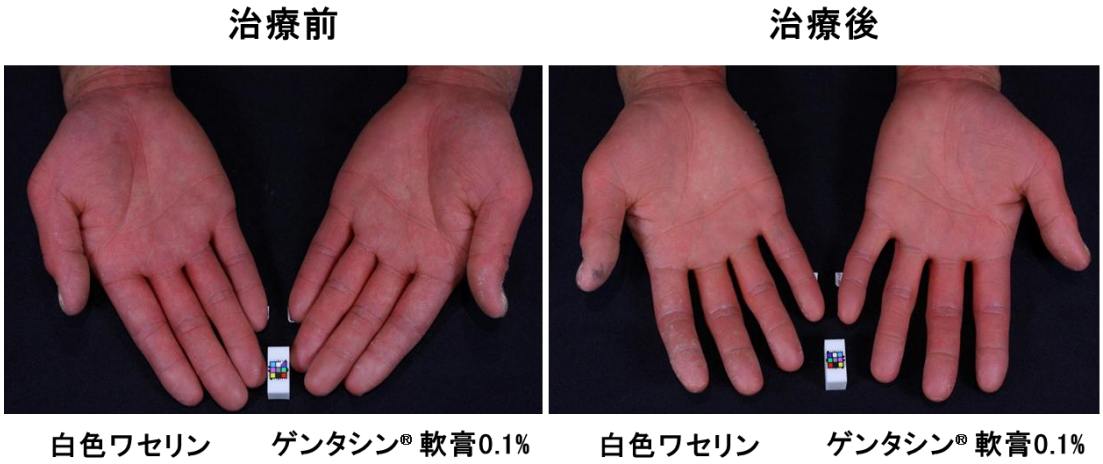


図 16. 被験者 2 の治療前後の臨床像

図 17. 被験者 3 の治療前後の臨床像

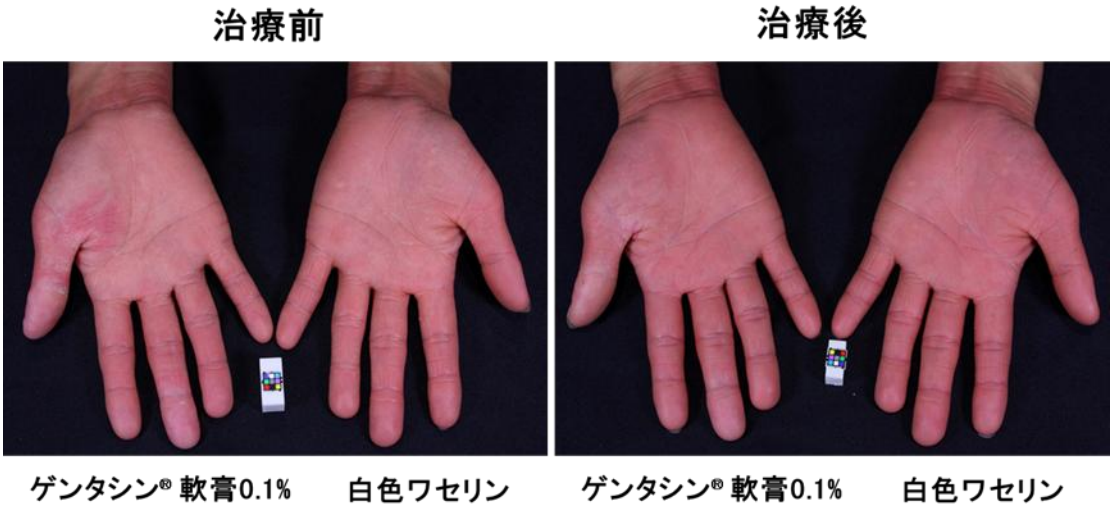


図 18. 被験者 4 の治療前後の臨床像

2. 被験者による皮膚の改善度の評価

試験薬外用開始前と外用 4 週間後に被験者が過角化、紅斑について VAS を用いて評価した。過角化は、5 名の被験者のうち、4 名の被験者でゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側の VAS の低下を示し、有意差をもって VAS の改善を認めた（図 19）（mean±SEM; 19±3.31 vs 3±2、P 値＝0.034）。紅斑はゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側と白色ワセリン外用側の両者とも治療前後で VAS は不変であった。各被験者の治療前後の過角化と紅斑の VAS の値をそれぞれ表 3、表 4 に示した。

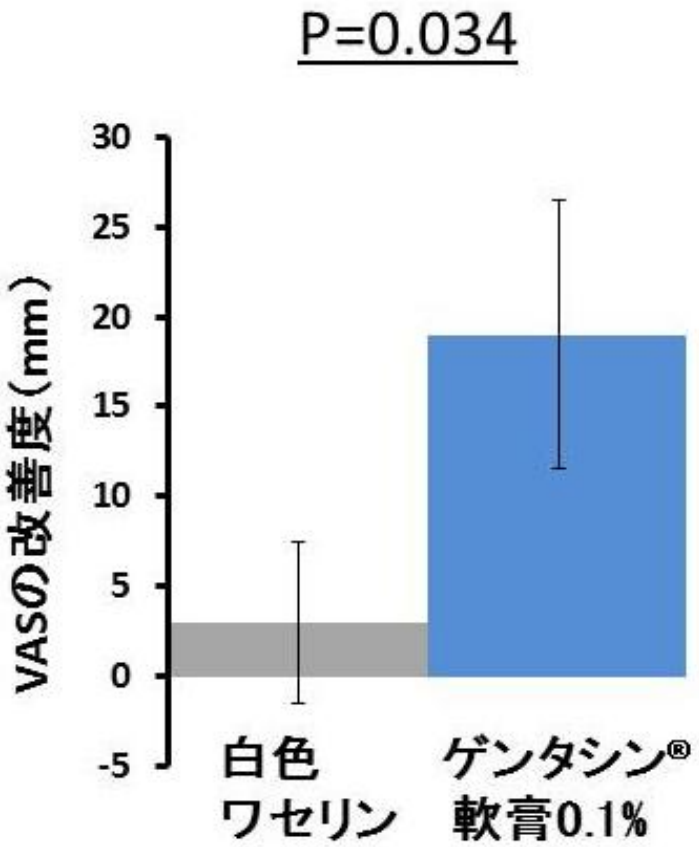


図 19. 過角化の VAS の改善度

ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側において有意差をもって VAS の改善を認めた。（mean±SEM; 19±3.31 vs 3±2、P 値＝0.034）

被験者	白色ワセリン外用側			ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側		
	被験者の VAS 評価		評価者による改善度	被験者の VAS 評価		評価者による改善度
	治療前	治療後		治療前	治療後	
1	70	70	不変	70	50	改善
2	80	80	不変	80	60	不変
3	50	40	不変	50	40	不変
4	40	35	不変	40	25	不変
5	20	20	不変	80	50	改善

表 3. 過角化の臨床的改善度と各被験者の VAS スコア

被験者	白色ワセリン外用側			ゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側		
	被験者の VAS 評価		評価者による改善度	被験者の VAS 評価		評価者による改善度
	治療前	治療後		治療前	治療後	
1	60	60	不変	60	60	不変
2	70	70	不変	70	70	不変
3	80	80	不変	80	80	不変
4	100	100	不変	100	100	不変
5	80	80	不変	80	80	不変

表 4. 紅斑の臨床的改善度と各被験者の VAS スコア

本研究に参加した 5 名のうち、被験者 5 が外用開始 2 週間後からゲンタシン® 軟膏 0.1%外用部位に瘙痒を伴う紅斑、丘疹が出現したため、3 週間で外用を中止した。後日ゲンタシン® 軟膏 0.1%のパッチテストを施行したが陰性であり、同様に外用していた手掌には皮疹は出現しなかったため、ゲンタシン® 軟膏 0.1%の接触性皮膚炎ではなく急性湿疹と診断した。

5. NPPK 患者の皮膚では *SERPINB7* mRNA 量が低下していた

患者皮膚の *SERPINB7* mRNA の検討

当初我々は、c.796C>T の変異が最後のエクソンに存在するため、変異 mRNA は NMD による分解を受けないと仮定した。リードスルー治療の効率には mRNA 量が重要となるため、健常人 3 名と c.796C>T 変異をホモ接合性に有する NPPK 患者 5 名の皮膚の *SERPINB7* mRNA 発現を qRT-PCR を用いて解析した。NPPK 患者の皮膚では健常人と比較し、*SERPINB7* mRNA 発現量は 47%低下していた（P=0.00069）（図 20）。この結果により変異 *SERPINB7* mRNA の分解が起きていると推測された。

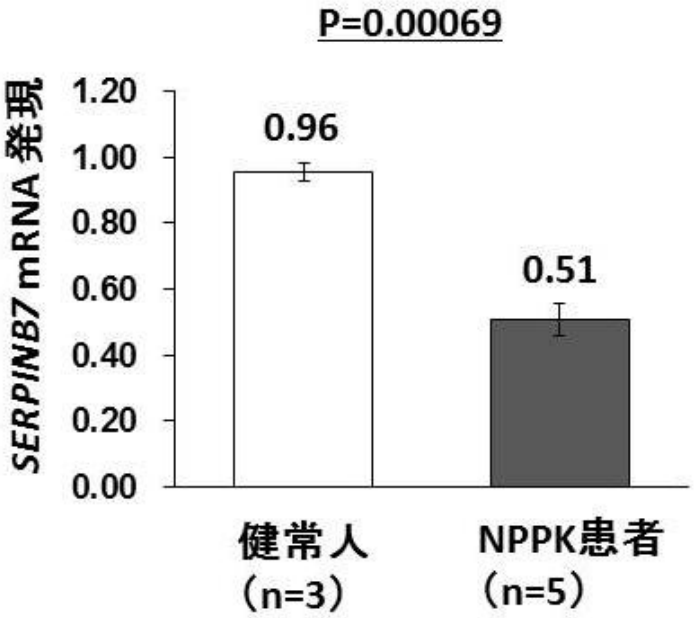


図 20. NPPK 患者皮膚の *SERPINB7* mRNA の発現

NPPK 患者の皮膚では健常人と比較し、*SERPINB7* mRNA 発現量が有意に低下していた（P=0.00069）。

6. *SERPINB7*遺伝子のc.796C>T変異ではEJC非依存性のNMD機構が働いている可能性があることが示唆された

c.796C>T 変異における NMD の検討

1. 不死化 c.796C>T KC のシクロヘキサミド治療による *SERPINB7* mRNA 量の検討

NPPK 患者の皮膚において *SERPINB7* mRNA 発現量が低下していることを示したが、この過程に翻訳が関与する mRNA 分解が関わっているかを検討するため、翻訳阻害作用を持つシクロヘキサミドで不死化 c.796C>T KC と不死化 NHEK を治療し、qRT-PCR で変異 *SERPINB7* mRNA 発現量を測定した。不死化 c.796C>T KC では 2 μM 以上の濃度で *SERPINB7* mRNA 量の著明な増加を認めた（図 21）。この結果により *SERPINB7* では翻訳が関与する変異 mRNA の分解が起きていることが示唆された。

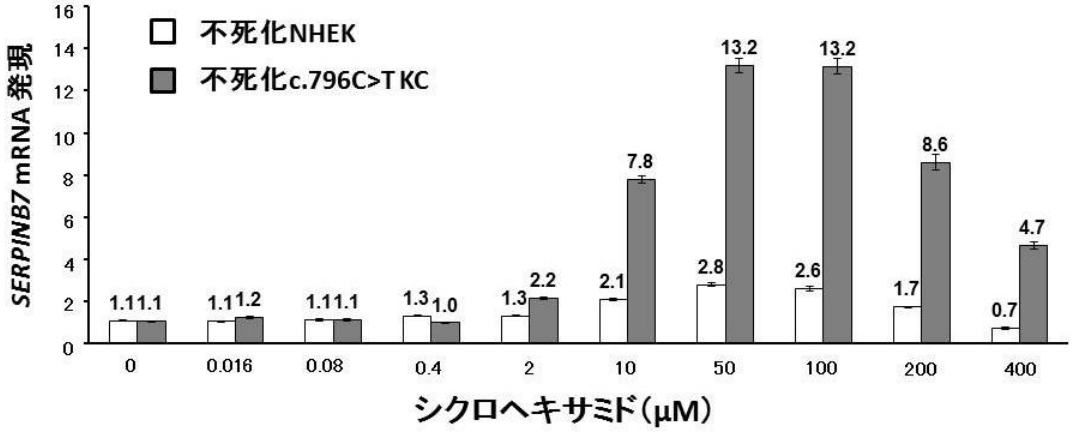


図 21. シクロヘキサミド治療による *SERPINB7* mRNA 量

シクロヘキサミド 2 μM 以上の濃度で治療すると、不死化 NHEK と比べて不死化 c.796C>T KC の *SERPINB7* mRNA 量が著明に増加していた。

2. *UPF1* ノックダウン処理による *SERPINB7* mRNA 発現の検討

更に *SERPINB7* で変異 mRNA の NMD が起きている確証を得るため、不死化 c.796C>T KC を用いて、NMD の重要な因子である *UPF1* 遺伝子を 2 種類の siRNA（siRNA#1、siRNA#2）でノックダウンし（図 22）、qRT-PCR で変異 *SERPINB7* mRNA の発現量を測定した。両方の siRNA において *SERPINB7* mRNA 発現量は有意差を持って増加を認めた（siRNA#1 P=0.00157、siRNA#2 P=0.00022）。一方、不死化 NHEK の *UPF1* 遺伝子をノックダウンした場合には、*SERPINB7* mRNA 発現量の増加は見られなかった（図 23）。これらのことから、*SERPINB7* 遺伝子の c.796C>T 変異では下流に EJC が存在しないにも関わらず NMD が起きており、EJC 非依存性の NMD 機構が働いている可能性があることが示唆された。

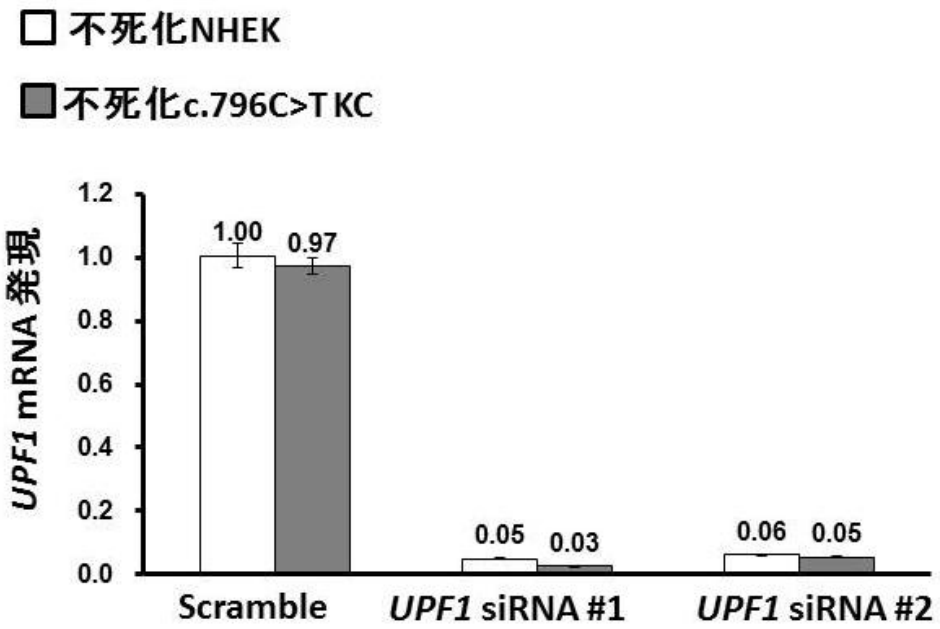


図 22. *UPF1* ノックダウン処理による *UPF1* mRNA 量

UPF1 遺伝子が siRNA#1 と siRNA#2 のいずれを用いてもノックダウンされていることを示している。

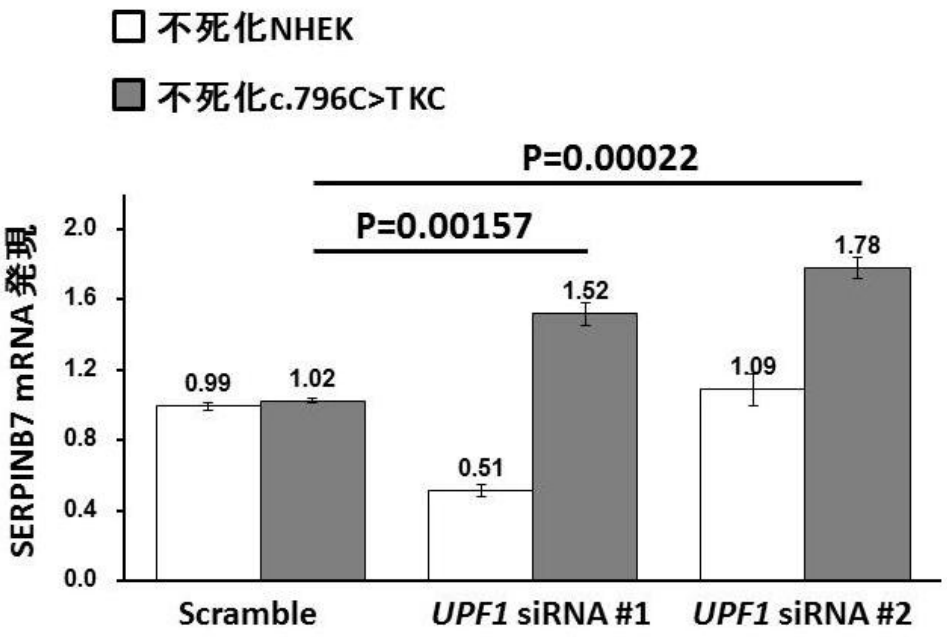


図 23. *UPF1* ノックダウン処理による *SERPINB7* mRNA 量

不死化 c.796C>T KC において *UPF1* 遺伝子を siRNA#1 と siRNA#2 でノックダウンすると、両方で *SERPINB7* mRNA 発現量は有意差を持って増加した（siRNA#1 P=0.00157、siRNA#2 P=0.00022）。一方、不死化 NHEK では *UPF1* 遺伝子をノックダウンしても *SERPINB7* mRNA 発現量は増加しなかった。

7. Truncated SERPINB7 タンパク質は 26S プロテアソームを介するタンパク質分解により調整されていることが示唆された

プロテアソームによる truncated SERPINB7 タンパク質分解の検討

1. *SERPINB7* cDNA 過剰発現における truncated SERPINB7 タンパク質の分解

HaCaT 細胞に c.796C>T を保有する *SERPINB7* cDNA と wild-type *SERPINB7* cDNA を過剰発現させてウェスタンブロッティングでタンパク質量を比較した（図 24）。その結果、full-length SERPINB7 タンパク質よりも truncated SERPINB7 タンパク質が著明に減少していた。前述の通り、*SERPINB7* 遺伝子の c.796C>T 変異では EJC 非依存性の NMD が起きており、そのため変異を保有する細胞ではタンパク質量が減少することが推測されるが、この他に更にプロテアソームが関与するタンパク質分解が起きているのではないかと推測した。そこで我々は HaCaT 細胞に *SERPINB7* cDNA を過剰発現させ、26S プロテアソームを阻害する MG132 50 μM を添加し、SERPINB7 タンパク質量について検討した。c.796C>T を保有する cDNA では MG132 で治療した際、truncated SERPINB7 タンパク質の増加を認めた。

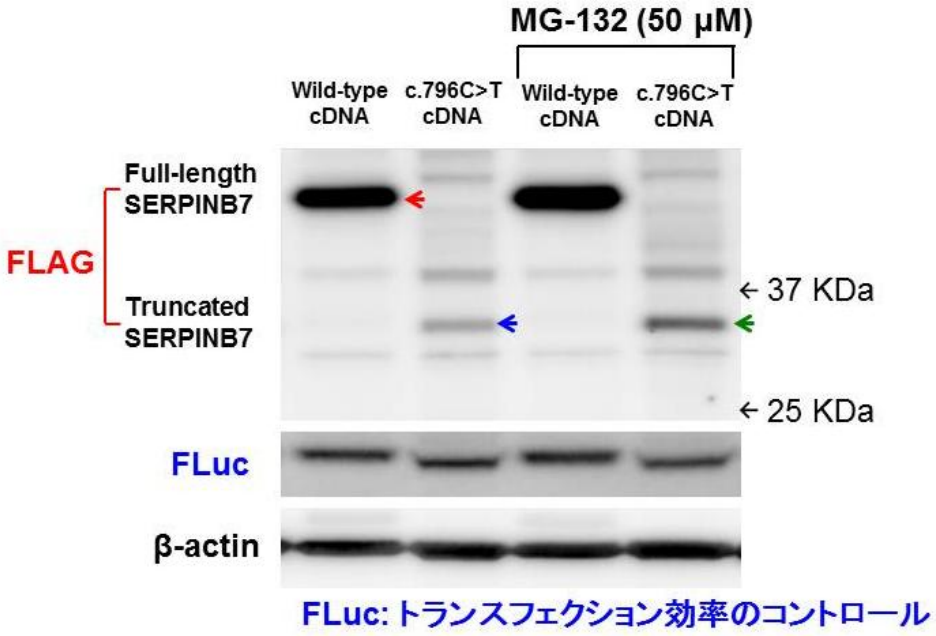


図 24. *SERPINB7* cDNA 過剰発現における truncated SERPINB7 タンパク質の分解

Full-length SERPINB7 タンパク質（赤矢印）と比較し、truncated SERPINB7 タンパク質（青矢印）が著明に減少していた。MG132 で治療すると、truncated SERPINB7 タンパク質（緑矢印）の増加を認めた。

2. 不死化 c.796C>T KC における truncated SERPINB7 タンパク質の分解

同様に不死化 c.796C>T KC を 0-200 μM の MG132 で治療すると、濃度依存性に truncated SERPINB7 タンパク質の増加を認めた（図 25）。c.796C>T 変異細胞において産生される truncated SERPINB7 タンパク質が 26S プロテアソームを介するタンパク質分解を受けていることが示唆された。

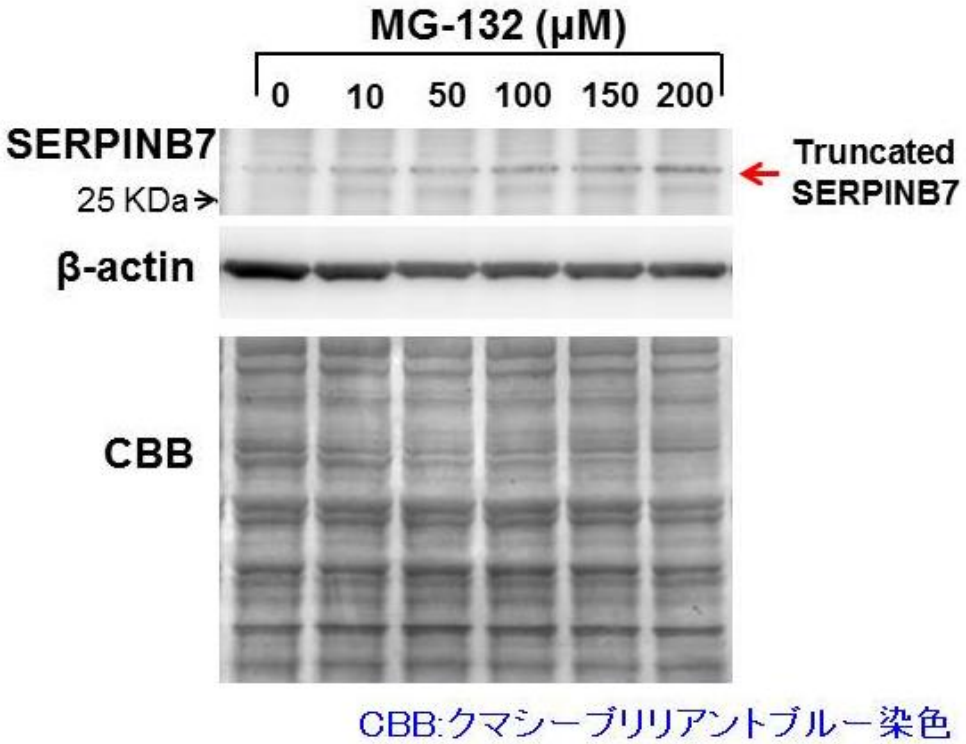


図 25. 不死化 c.796C>T KC における truncated SERPINB7 タンパク質の分解

不死化 c.796C>T KC を 0-200 μM の MG132 で治療すると、濃度依存性に truncated SERPINB7 タンパク質（赤矢印）は増加した。コントロールとしてゲルの CBB 染色も示した。

考察

本研究ではゲンタマイシンが *SERPINB7* 遺伝子の c.796C>T 変異に対して、リードスルー作用を有することを *SERPINB7* cDNA 及び NPPK 患者由来不死化表皮角化細胞を治療して示した。更に、NPPK 患者へのゲンタマイシン外用の自主臨床研究を実施し、過角化の症状が改善することを示した。過去には常染色体優性遺伝性疾患である Hailey-Hailey 病において、ゲンタマイシンを外用し、病変部の症状が改善したことで、外用でのリードスルー治療の有効性を報告した論文があるが、これは *ATP2C1* 遺伝子に UGA のナンセンス変異をヘテロ接合性に保有する Hailey-Hailey 病患者 1 名に対して、非対照、非盲検、非ランダム化で実施された研究であった [36]。我々は、常染色体劣性遺伝性疾患である NPPK に対して、対照を置き、試験薬と外用部位の割り当てをランダム化し、評価者を盲検化してリードスルー治療の臨床研究を実施した。今回の臨床研究では、過角化は c.796C>T の変異をホモ接合性に有する患者 2 名で改善と評価され、また 4 名の被験者で VAS が改善していた。患者由来不死化表皮角化細胞の治療実験にて高濃度のゲンタマイシンで治療した際に SERPINB7 タンパク質が産生されていたことからも、外用するゲンタマイシンの濃度を上げ、外用期間を延長し、更に密封療法（occlusive dressing technique; ODT）などの外用方法を工夫することにより、症状を更に改善させることができるのではないかと考えた。一方、紅斑は、評価者と VAS の評価の両方において、全ての被験者で不変という結果であり、紅斑の改善にはより多くの SERPINB7 タンパク質産生が必要であると推測している。ごく最近、Ⅶ型コラーゲンをコードする *COL7A1* 遺伝子に PTC を有する劣性栄養型表皮水疱症の患者 5 名の病変部をゲンタマイシンの外用または皮内注射で治療し、Ⅶ型コラーゲンが著明に増加したという臨床研究が報告された [50]。NPPK と同様、常染色体劣性遺伝性疾患に対するゲンタマイシン外用のリードスルー治療の成果であり、今後他の遺伝性皮膚疾患への外用治療が非常に期待できる。

SERPINB7 cDNA を用いた実験系において c.796C>T 変異はゲンタマイシンの治療で濃度依存性に SERPINB7 タンパク質の産生を認めたが、ataluren の治療では SERPINB7 タンパク質の産生を全く示さなかった。ataluren は 2007 年に Welch らが 800000 個の化合物を用いてドラッグスクリーニングを実施し、PTC124 という名称で報告したリードスルー薬である [27]。本薬剤はルシフェラーゼ遺伝子内に UGA のナンセンス変異を作製したコンストラクトを HEK293 細胞に安定発現させ、各化合物で治療し、ル

シフェラーゼアッセイを行い発見された。しかし、その後の研究により、ataluren がリードスルー作用により、ルシフェラーゼの発光を増強するのではなく、ルシフェラーゼを安定化させることにより、見かけ上発光を増強する作用があることが判明した[51,52]。これまで ataluren のリードスルー効果については *in vitro*、*in vivo* の多くの研究が報告されている[29,53]が ataluren がリードスルー作用を示さなかったと報告している研究も散見される[30,31]。本研究でも、*SERPINB7* の c.796C>T 変異には ataluren は効果が無いことが明らかとなった。

本研究では、c.796C>T 変異を持つ *SERPINB7* mRNA の NMD についても検討し、非常に興味深い知見が得られた。当初我々は、c.796C>T は最後のエクソンに存在するため、理論上は EJC 依存性の NMD による mRNA 分解は起きないという仮説を立てた。しかし、NPPK 患者と健常人の皮膚の *SERPINB7* mRNA の発現レベルを比較したところ、NPPK 患者皮膚での発現が低下していたことから、mRNA 分解が起きていると考え、研究を進めた。翻訳を阻害することで NMD を抑制するシクロヘキサミドで NPPK 患者由来不死化表皮角化細胞を治療すると *SERPINB7* mRNA の発現が増加しており、また NMD の重要な因子である *UPF1* をノックダウンすることで *SERPINB7* mRNA の発現量が増加したことから、NMD が起きていることを確認した。c.796C>T は最後のエクソンに存在し、これより下流には EJC が存在しないため、c.796C>T においては EJC 非依存性の NMD が働いている可能性があることが示唆された。ヒト疾患では、X 型コラーゲンをコードする *COL10A1* を原因遺伝子とする Schmid metaphyseal chondrodysplasia（MIM#156500）における EJC 非依存性 NMD の報告がされている[54]。その中で患者が *COL10A1* の最後のエクソンに保有する p.Tyr632Ter、p.Trp651Ter、p.Tyr663Ter の 3 つの特異的なナンセンス変異に関する NMD について言及されている。この論文での報告同様、*SERPINB7* の c.796C>T で見られる NMD は通常よりも長い 3′ UTR を持つことが関与していると推測した。通常、終止コドンは翻訳終結因子である eRF3 と poly (A)-binding protein cytoplasmic 1（PABPC1）の相互作用により認識される。しかし PTC が存在することで通常よりも 3′ UTR が長くなる場合、eRF3 と PABPC1 の相互作用が減弱し、その結果 NMD の重要な因子である UPF1 が eRF3 と結合し速やかに mRNA が分解される。この NMD モデルは faux 3′ UTR モデルと呼ばれている[44,55]（図 26）。*SERPINB7* の 3′ UTR は 741bp であるが、通常の終止コドンと異なり c.796C>T の存在下では 342bp の 3′ UTR 延長が見られ、合計で 1083bp と長くなるため NMD

が起きたのではないかと推測した。調べ得た限り、Schmid metaphyseal chondrodysplasia 以外にヒト疾患での EJC 非依存性 NMD は報告されておらず、本研究で得られた知見は EJC 非依存性 NMD の機序解明の一助となることが期待される。

また、本研究では *SERPINB7* cDNA を過剰発現させた HaCaT 細胞と NPPK 患者由来不死化表皮角化細胞を 26S プロテアソーム阻害剤である MG132 で処理したところ、truncated SERPINB7 タンパク質が増加しており、truncated SERPINB7 タンパク質が 26S プロテアソームによる分解を受けていることを確認した。酵母では、このような faux 3′ UTR が関与する mRNA において、UPF1 によってプロテアソームがリボソームにリクルートされて異常なタンパク質の分解を促進することを示した報告があり、UPF1 が変異 mRNA と異常なタンパク質の両方の分解に関与し、変異 mRNA からの異常タンパク質の産生を抑制する役割を担っていることが明らかとなっている[56-58]。我々の結果と合わせると c.796C>T 変異では faux 3′ UTR を介して変異 mRNA と変異タンパク質の分解が起きている可能性があることが示された。

本研究により、現在まで根治的な治療がなかった NPPK において外用によるリードスルー治療の効果の可能性が示唆された。しかし、ゲンタマイシン外用治療での症状の改善効果は現時点では十分とは言えない。ゲンタマイシンを構成する成分の中で特にゲンタマイシン B1 がリードスルー活性を持つことが明らかとなってきており[59]、今後、更に副作用が少なくリードスルー効果の高い薬剤を使用し、なおかつ表皮角化細胞の NMD を選択的に阻害することのできるような薬剤を組み合わせることで、NPPK のリードスルー治療効果を高めることができると考える。また、外用でのリードスルー治療は NPPK のみではなく現時点で根治的治療法の無い、他の遺伝性皮膚疾患にとっても治療の選択肢となることを示した。

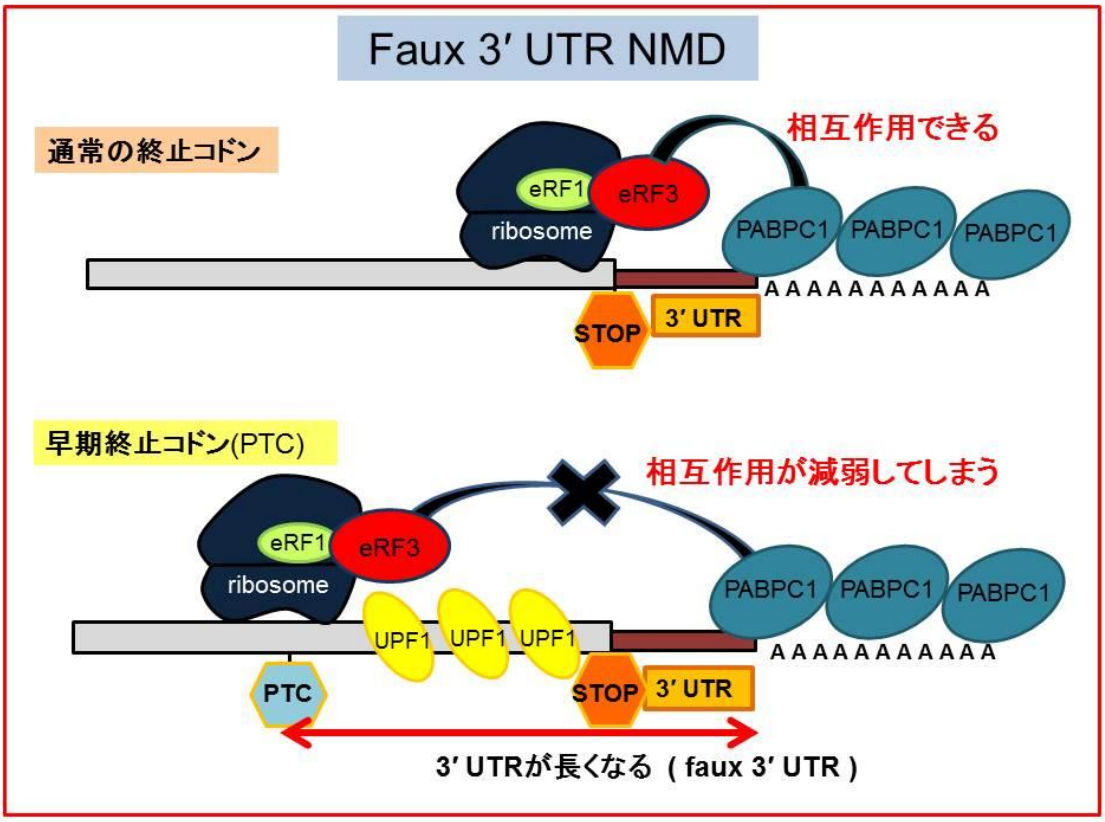


図 26. faux 3′ UTR NMD モデル

UPF1: up-frameshift protein 1、eRF1: eukaryotic release factor 1、eRF3: eukaryotic release factor 3、PABPC1: poly (A)-binding protein cytoplasmic 1

通常の終止コドンでは eRF3 と PABPC1 の相互作用が可能であり、終止コドンとして認識される。一方、PTC の場合、通常よりも 3′ UTR が長くなるため、eRF3 と PABPC1 の相互作用が減弱し、NMD の重要な因子である UPF1 が eRF3 と結合して速やかに mRNA が分解される。

総括および結論

本研究では以下の新知見を得た。

・NPPK の原因遺伝子である *SERPINB7* 遺伝子の c.796C>T 変異に対し、ゲンタマイシンがリードスルー作用を有することを *SERPINB7* cDNA 及び NPPK 患者由来不死化表皮角化細胞の治療実験で示した。
・NPPK 患者をゲンタマイシン外用により治療し、リードスルー治療の有効性を示した。
・c.796C>T をホモ接合性に保有する NPPK 患者皮膚および NPPK 患者由来不死化表皮角化細胞において、*SERPINB7* mRNA が EJC 非依存性 NMD により分解されていることを示した。
・Truncated SERPINB7 タンパク質がプロテアソームによる分解を受けていることを示した。

本研究では、NPPK に対する新規の治療として、リードスルー治療の有効性について *in vitro* 及び *in vivo* の両方で検討した。c.796C>T 変異を有する *SERPINB7* cDNA を AD293 細胞に過剰発現させた系では、ゲンタマイシン治療により SERPINB7 タンパク質が濃度依存性に産生されることを確認した。また、患者由来不死化表皮角化細胞でもゲンタマイシン治療にて SERPINB7 タンパク質が産生されることを示した。ゲンタマイシン外用の効果を検討する自主臨床研究では、盲検化された評価者による判定および被験者による VAS の評価の両方で過角化の症状の改善を認めた。ゲンタマイシン外用濃度、外用期間、外用方法などに検討を加えることで、更にリードスルー効果を上げられると考えられるため、外用条件を改良し、被験者数を増やしてゲンタマイシン外用治療の臨床研究を実施することが今後の課題と考える。さらに、*SERPINB7* の c.796C>T 変異における NMD およびタンパク質分解の機構についても検討したところ、ヒト疾患では報告の少ない EJC 非依存性 NMD により c.796C>T を持つ変異 mRNA が分解されていることが判明した。リードスルー薬と NMD を抑制する薬剤と同時に治療することで、リードスルー効率が更に上昇すると考えられる。*SERPINB7* の c.796C>T 変異は NPPK 患者の大多数が保有するナンセンス変異であり、リードスルー治療が本疾患の重要な治療となる可能性が強く示唆された。

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院皮膚科学教室　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病院皮膚科　乃村俊史講師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の患者様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院皮膚科学教室の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Nagashima, M. Palmoplantar keratoses. In, *Handbook of Human Genetics* (Ochiai, K., Miura, O., eds.), Igaku Shoin, Tokyo, 1977, pp.23-27.
2. 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).
3. Kubo, A., Shiohama, A., Sasaki, T., Nakabayashi, K., Kawasaki, H., Atsugi, T., Sato, S., Shimizu, A., Mikami, S., Tanizaki, H., Uchiyama, M., Maeda T., Ito, T., Sakabe, J., Heike, T., Okuyama, T., Kosaki, R., Kosaki, K., Kudoh, J., Hata, K., Umezawa, A., Tokura, Y., Ishiko, A., Niizeki, H., Kabashima, K., Mitsuhashi, Y. & Amagai, M. 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).
4. Kubo, A. Nagashima-type palmoplantar keratosis: a common Asian type caused by SERPINB7 protease inhibitor deficiency. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2076-2079 (2014).
5. Li, C. X., Zhang, S. Q., Wen, J., Chen, P. J., Liu, Q. X., Han, K., Zeng, K. & Zhang, X. B. A sporadic case of Nagashima-type palmoplantar keratosis caused by gene mutation in SERPINB7. *Clin. Exp. Dermatol.* **41**, 811-813 (2016).
6. On, H. R., Lee, S. E., Nomura, T., Miyauchi, T., Suzuki, S., Shimizu, H. & Kim, S. C. Identification of SERPINB7 mutations in Korean patients with Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J. Dermatol.* **44**, 840-841 (2017).
7. Qiu, M. & Zou, X. B. Progressive Nagashima-type palmoplantar keratosis in a Chinese patient with recurrent c.796C>T mutation in SERPINB7. *Indian J. Dermatol. Venereal. Leprol.* **83**, 136 (2017).
8. Yin, J., Xu, G., Wang, H., Zhao, J., Duo, L., Cao, X., Tang, Z., Lin, Z. & Yang, Y. New and recurrent SERPINB7 mutations in seven Chinese patients with Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2269-2272 (2014).

9. Zhang, J., Zhang, G., Ni, C., Cheng, R., Liang, J., Li, M. & Yao, Z. Nagashima-type palmoplantar keratosis in a Chinese Han population. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4049-4054 (2016).
10. Hashimoto, T., Teye, K., Numata, S., Suga, Y., Hamada, T. & Ishii, N. Detection of SERPINB7 mutation can distinguish Nagashima-type palmoplantar keratoderma from other keratodermas with palmoplantar lesions. *Clin. Exp. Dermatol.* **42**, 342-345 (2017).
11. Hida, T., Okura, M., Kamiya, T. & Yamashita, T. Nagashima-type palmoplantar keratosis caused by compound heterozygous mutations in SERPINB7. *Eur. J. Dermatol.* **25**, 202-203 (2015).
12. Miyauchi, T., Nomura, T., Suzuki, S., Ohguchi, Y., Yamaguchi, Y., Shinkuma, S., Natsuga, K., Fujita, Y. & Shimizu, H. Extensive Erythema and Hyperkeratosis on the Extremities and Lumbar Area as an Unusual Manifestation of Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Acta Derm. Venereol.* **96**, 856-858 (2016).
13. Mizuno, O., Nomura, T., Suzuki, S., Takeda, M., Ohguchi, Y. Fujita, Y., Nishie, W., Sugiura, K., Akiyama, M. & Shimizu, H. Highly prevalent SERPINB7 founder mutation causes pseudodominant inheritance pattern in Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Br. J. Dermatol.* **171**, 847-853 (2014).
14. 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.* **44**, 841-843 (2016).
15. Shiohama, A., Sasaki, T., Sato, S., Sakabe, J., 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**, 325-328 (2016).
16. Suzuki, S., Nomura, T., Mizuno, O., Fujita, Y. & Shimizu, H. Identification of previously unknown SERPINB7 splice variants in patients with Nagashima-type palmoplantar keratosis reveals

the importance of the CD-loop of SERPINB7. *Br. J. Dermatol.* **173**, 1288-1290 (2015).

17. The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**, 56-65 (2012).
18. Higasa, K., Miyake, N., Yoshimura, J., Okamura, K., Niihori, T., Saitsu, H., Doi, K., Shimizu, M., Nakabayashi, K., Aoki, Y., Tsurusaki, Y., Morishita, S., Kawaguchi, T., Migita, O., Nakayama, K., Nakashima, M., Mitsui, J., Narahara, M., Hayashi, K., Funayama, R., Yamaguchi, D., Ishiura, H., Ko, W. Y., Hata, K., Nagashima, T., Yamada, R., Matsubara, Y., Umezawa, A., Tsuji, S., Matsumoto, N. & Matsuda, F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* **61**, 547-553 (2016).
19. Narahara, M., Higasa, K., Nakamura, S., Tabara, Y., Kawaguchi, T., Ishii, M., Matsubara, K., Matsuda, F. & Yamada, R. Large-scale East-Asian eQTL mapping reveals novel candidate genes for LD mapping and the genomic landscape of transcriptional effects of sequence variants. *PLoS One* **9**, e100924 (2014).
20. Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* **102**, 4751-4804 (2002).
21. Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N. & Chuzhanova, N. A. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* **29**, 1037-1047 (2008).
22. Kuzmiak, H. A. & Maquat, L. E. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends. Mol. Med.* **12**, 306-316 (2006).
23. Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **13**, 700-712 (2012).
24. Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J. P. & Namy, O. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* **18**, 679-688 (2012).

25. Bordeira-Carrico, R., Pego, A. P., Santos, M. & Oliveira, C. Cancer syndromes and therapy by stop-codon readthrough. *Trends Mol. Med.* **18**, 667-678 (2012).

26. Lee, H. L. & Dougherty, J. P. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacol. Ther.* **136**, 227-266 (2012).

27. Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S.,Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y. C., Corson, D., Turpoff, A. A., Campbell, J. A., Conn, M. M., Khan, A., Almstead, N. G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N.,Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A. A., Colacino, J. M., Babiak, J., Ju, W. D., Hirawat, S., Northcutt, V. J., Miller, L. L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S. W. & Sweeney, H. L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**, 87-91 (2007).

28. Finkel, R. S., Flanigan, K. M., Wong, B., Bonnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H. L., Reha, A., Northcutt, V. J., Elfring, G., Barth, J. & Peltz, S. W. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* **8**, e81302 (2013).

29. Peltz, S. W., Morsy, M., Welch, E. M. & Jacobson, A. Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. *Annu. Rev. Med.* **64**, 407-425 (2013).

30. Kerem, E., Konstan, M. W., De Boeck, K., Accurso, F. J., Sermet-Gaudelus, I., Wilschanski, M., Elborn, J. S., Melotti, P., Bronsveld, I., Fajac, I., Malfroot, A., Rosenbluth, D. B., Walker, P. A., McColley, S. A., Knoop, C., Quattrucci, S., Rietschel, Zeitlin, P. L., Barth, J., Elfring, G. L., Welch, E. M., Branstrom, A., Spiegel, R. J., Peltz, S. W., Ajayi, T. & Rowe, S. M. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**, 539-547 (2014).

31. McElroy, S. P., Nomura, T., Torrie, L. S., Warbrick, E., Gartner, U.,Wood, G. & McLean, W. H. A lack of premature termination

codon read-through efficacy of PTC124 (Ataluren) in a diverse array of reporter assays. *PLoS Biol.* **11**, e1001593 (2013).

32. Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., Kerem, B. & Kerem, E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1433-1441 (2003).
33. Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. & Sweeney, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 375-381 (1999).
34. Malik, V., Rodino-Klapac, L. R., Viollet, L. & Mendell, J. R. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **3**, 379-389 (2010).
35. Floquet, C., Deforges, J., Rousset, J. P. & Bidou, L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3350-3362 (2011).
36. Kellermayer, R., Szigeti, R., Keeling, K. M., Bedekovics, T. & Bedwell, D. M. Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 229-231 (2006).
37. Zhou, Y., Jiang, Q., Takahagi, S., Shao, C. & Uitto, J. Premature termination codon read-through in the ABCC6 gene: potential treatment for pseudoxanthoma elasticum. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2672-2677 (2013).
38. Kuschal, C., DiGiovanna, J. J., Khan, S. G., Gatti, R. A. & Kraemer, K. H. Repair of UV photolesions in xeroderma pigmentosum group C cells induced by translational readthrough of premature termination codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **10**, 19483-19488 (2013).
39. Kuschal, C., Khan, S. G., Enk, B., DiGiovanna, J. J. & Kraemer, K. H. Readthrough of stop codons by use of aminoglycosides in cells from xeroderma pigmentosum group C patients. *Exp. Dermatol.* **24**, 296-297 (2015).

40. Cogan, J., Weinstein, J., Wang, X., Hou, Y., Martin, S., South, A. P., Woodley, D. T. & Chen, M. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Ther.* **22**, 1741-1752 (2014).
41. Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. & Moore, M. J. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **19**, 6860-6869 (2000).
42. Shoemaker, C. J. & Green, R. Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 594-601 (2012).
43. Maquat, L. E., Tarn, W. Y. & Isken, O. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* **142**, 368-374 (2010).
44. Kurosaki, T. & Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J. Cell. Sci.* **129**, 461-467 (2016).
45. Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z. & Zietkiewicz, E. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes--The impact of RNA sequence. *RNA Biol.* **12**, 950-958 (2015).
46. Loughran, G., Chou, M. Y., Ivanov, I. P., Jungreis, I., Kellis, M., Kiran, A. M., Baranov, P. V. & Atkins, J. F. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8928-8938 (2014).
47. Manuvakhova, M., Keeling, K. & Bedwell, D. M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* **6**, 1044-1055 (2000).
48. Linde, L., Boelz, S., Nissim-Rafinia, M., Oren, Y. S., Wilschanski, M., Yaacov, Y., Virgilis, D., Neu-Yilik, G., Kulozik, A. E., Kerem, E. & Kerem, B. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J. Clin. Invest.* **117**, 683-692 (2007).
49. Haller, R. G. & Vissing, J. Spontaneous "second wind" and glucose-induced second "second wind" in McArdle disease: oxidative mechanisms. *Arch. Neurol.* **59**, 1395-1402 (2002).

50. Woodley, D. T., Cogan, J., Hou, Y., Lyu, C., Marinkovich, M. P., Keene, D. & Chen, M. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J. Clin. Invest.* **127**, 3028-3038 (2017).
51. Auld, D. S., Thorne, N., Maguire, W. F. & Inglese, J. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3585-3590 (2009).
52. Auld, D. S., Lovell, S., Thorne, N., Lea, W. A., Maloney, D. J., Shen, M., Rai, G., Battaile, K. P., Thomas, C. J., Simeonov, A., Hanzlik, R. P. & Inglese, J. Molecular basis for the high-affinity binding and stabilization of firefly luciferase by PTC124. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4878-4883 (2010).
53. Roy, B., Friesen, W. J., Tomizawa, Y., Leszyk, J. D., Zhuo, J., Johnson, B., Dakka, J., Trotta, C. R., Xue, X., Mutyam, V., Keeling, K. M., Mobley, J. A., Rowe, S. M., Bedwell, D. M., Welch, E. M. & Jacobson, A. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 12508-12513 (2016).
54. Fang, Y., Bateman, J. F., Mercer, J. F. & Lamande, S. R. Nonsense-mediated mRNA decay of collagen –emerging complexity in RNA surveillance mechanisms. *J. Cell. Sci.* **126**, 2551-2560 (2013).
55. Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S. & Jacobson, A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**, 112-118 (2004).
56. Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO Rep.* **10**, 1265-1271 (2009).
57. Kuroha, K., Ando, K., Nakagawa, R. & Inada, T. The Upf factor complex interacts with aberrant products derived from mRNAs containing a premature termination codon and facilitates their

proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* **288**, 28630-28640 (2013).

58. Sugiyama, T., Nobuta, R., Ando, K., Matsuki, Y. & Inada, T. Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **488**, 122-128 (2017).

59. Baradaran-Heravi, A., Niesser, J., Balgi, A. D., Choi, K., Zimmerman, C., South, A. P., Anderson, H. J., Strynadka, N. C., Bally, M. B. & Roberge, M. Gentamicin B1 is a minor gentamicin component with major nonsense mutation suppression activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3479-3484 (2017).