



Title	CARD14関連遺伝性皮膚疾患における復帰変異モザイク発生機序の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	宮内, 俊成
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14519号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81499">http://hdl.handle.net/2115/81499</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2629
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Toshinari_Miyauchi_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 宮内 俊成

### 学位論文題名

CARD14 関連遺伝性皮膚疾患における復帰変異モザイク発生機序の解明  
(Elucidation of the mechanism underlying revertant mosaicism  
in CARD14-related genetic skin disease)

#### 【背景と目的】

遺伝性疾患患者の身体の一部で、病原遺伝子変異が消失し、正常化した細胞や組織が点在する現象を revertant mosaicism (復帰変異モザイク) と呼ぶ。遺伝子変異の消失メカニズムとして、back mutation、second site mutation、homologous recombination (HR) などが知られており、これまでに原発性免疫不全症、骨髄不全症候群、表皮水疱症、魚鱗癬などを中心に 50 種類ほどの遺伝性疾患において revertant mosaicism の存在が報告されている。北海道大学皮膚科でもこれまでに *KRT10/KRT1* 遺伝子変異により発症する ichthyosis with confetti や *LOR* 遺伝子変異により生じる loricin keratoderma といった遺伝性角化症において revertant mosaicism を生じることを報告してきた。これらの疾患では病原変異が体細胞レベルでの HR により消失し、HR を生じた細胞では交叉点からテロメアまでの大規模な loss of heterozygosity (LOH) を認めることが特徴である。これらの先行研究の結果から revertant mosaicism を生じる遺伝性角化症患者の体内では HR を高率に誘発し遺伝子変異を修復する機構が存在すると推察されるが、今日までその機序に迫る報告は全くなかった。本研究では、*CARD14* 遺伝子変異を原因とする CARD14-associated papulosquamous eruption (CAPE) において revertant mosaicism を初めて証明し、さらに変異型 *CARD14* が DNA 損傷・修復や DNA 複製・複製ストレス反応へ与える影響を解析することでこの自然治癒現象を生じる分子機構の解明を目指した。

#### 【対象と方法】

1. CAPE 患者における revertant mosaicism の検討  
*CARD14* 遺伝子変異を有する患者 2 名 (Case 1; c.356T>C (p.Met119Thr)、Case 2; c.407A>T (p.Gln136Leu)) において臨床的に正常化した皮膚領域を認めたため、組織学的解析、遺伝子変異解析、遺伝子発現解析、全ゲノム SNP アレイ解析を行い、revertant mosaicism の可能性について検討した。また Case 1 に関しては多発する皮膚腫瘍も認めたため、腫瘍に関しても同様の解析を行った。
2. *CARD14* 発現誘導細胞株の作製  
テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、野生型と変異型 2 種類の *CARD14* 発現誘導細胞株をそれぞれ作製した。免疫染色、ウエスタンブロッティング、遺伝子発現解析、NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼアッセイ等で細胞株を評価した後、以下の解析に使用した。
3. *CARD14* が DNA 損傷・損傷修復に与える影響の解析  
*CARD14* 発現に伴い、double-strand break (DSB) の指標である  $\gamma$ H2AX が変化するかどうかをウエスタンブロッティングで評価した。また X 線照射 (5 Gy)、エトポシド添加 (10/250  $\mu$ M) により DSB を誘導し、その修復反応を解析した。さらに DR-GFP assay を用い

てエンドヌクレアーゼ誘導性の DSB 修復も評価した。

4. CARD14 が DNA 複製に与える影響の解析  
CARD14 発現に伴い細胞周期や DNA 複製の変化を生じるかどうかを検証するため、フローサイトメトリーによる細胞周期解析や DNA fiber assay による DNA 複製動態の評価を行った。
5. CARD14 が DNA 複製ストレス反応へ与える影響の解析  
Hydroxyurea や aphidicolin により複製ストレスを与えた際の  $\gamma$ H2AX 変化を評価した。さらにその状況下での HR 関連因子の活性化をフローサイトメトリーを用いて解析した。
6. CARD14 と break-induced replication (BIR) の関連解析  
CARD14 発現に伴い複製ストレス下で崩壊複製フォークの修復経路に変化が生じるかどうかを評価するため、遺伝子発現解析、DNA fiber assay、SCE assay を実施した。

### 【結果】

1. 解析した 2 例において revertant mosaicism の存在が証明された。そして遺伝子変異消失の機序は HR に伴う LOH が主体であった。また Case 1 における皮膚腫瘍の解析でも LOH を含む染色体異常が検出された。
2. 野生型 CARD14 は細胞質にびまん性に発現するのに対し、変異型 CARD14 は核周囲に凝集塊を形成した。また後者では NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路が異常活性化しており、それに伴う炎症性ケモカインの高発現も見られた。
3. CARD14 発現に伴う  $\gamma$ H2AX の上昇はなく、X 線照射やエトポシド添加、DR-GFP assay における DNA 損傷応答の変化も認めなかった。
4. CARD14 発現に伴う細胞周期、DNA 複製動態の変化は見られなかった。
5. 長時間に渡り複製ストレスを加えると、変異型 CARD14 発現下では複製フォークの崩壊を示唆する  $\gamma$ H2AX の上昇が観察された。またこの変化は部分的に NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の異常活性化に依存したものであった。そしてこの  $\gamma$ H2AX 上昇時には HR 関連因子も活性化していることが確認された。
6. 変異型 CARD14 発現下では複製ストレス曝露時の複製開始関連遺伝子の発現低下が見られ、DNA fiber assay では new origin firings が減少していた。さらに SCE assay では複製ストレス負荷時の姉妹染色分体交換が減少しており、変異型 CARD14 発現に伴い、交叉型組換えの頻度が低下していることが示唆された。

### 【考察】

本研究により遺伝性角化症の一つである CAPE において revertant mosaicism の存在が初めて証明され、その変異消失機序が HR に伴う LOH が主体であることが示された。変異型 CARD14 の発現は NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の異常活性化を誘導して皮膚症状を形成するだけでなく、DNA 複製ストレス反応を変化させ、停止した複製フォークの安定性に影響を及ぼす可能性が示された。さらに変異型 CARD14 発現下では崩壊複製フォーク近傍における休眠複製開始点の活性化が抑制されるために交叉型組換えによる修復が減少し、一方で BIR により修復される環境が生じていると考えられた。BIR はその変異原性のために一般的に正常細胞では抑制されていると考えられているが、revertant mosaicism における変異消失機序にも関与する可能性が示唆された。

### 【結論】

CAPE における revertant mosaicism では HR を介した LOH が大きく関与していた。本研究により、変異型 CARD14 が複製ストレス反応を変化させ、BIR を促進することで大規模な LOH が誘導されるという新たな知見が得られた。