



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ケラチン1タンパク質C末端ドメインにおける変異とその病原性に関する研究
Author(s)	鈴木, 翔多朗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12558号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12558
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65903
Type	doctoral thesis
File Information	Shotaro_Suzuki.pdf



学 位 論 文

ケラチン 1 タンパク質 C 末端ドメインにおける
変異とその病原性に関する研究

(Studies on the pathogenicity of mutations in
the C-terminal domain of keratin 1)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学
鈴 木 翔 多 朗

学 位 論 文

ケラチン 1 タンパク質 C 末端ドメインにおける
変異とその病原性に関する研究

(Studies on the pathogenicity of mutations in
the C-terminal domain of keratin 1)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学
鈴 木 翔 多 朗

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	17 頁
実験方法	18 頁
実験結果	43 頁
考察	70 頁
総括および結論	75 頁
謝辞	76 頁
引用文献	77 頁

発表論文目録および学会発表目録

1. 発表論文

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shotaro Suzuki, Toshifumi Nomura, Toshinari Miyauchi, Masae Takeda, Hideki Nakamura, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu.

Revertant mosaicism in ichthyosis with confetti caused by a frameshift mutation in *KRT1*.

J Invest Dermatol, 136: 2093-2095, 2016. (Impact factor: 6.915)

2. 学会発表

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Shotaro Suzuki, Toshifumi Nomura, Hiroko Umemoto, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu.

A novel frameshift mutation in the V2 domain of KRT1 causes ichthyosis hystrix Curth-Macklin type and may alter keratin organization.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okinawa, Japan, 2012.12.

鈴木翔多朗, 乃村俊史, 梅本紘子, 中村秀樹, 清水 宏.

Ichthyosis hystrix Curth-Macklin type におけるケラチン 1 の局在異常について.
第 28 回角化症研究会, 東京, 日本, 2013. 07.

Shotaro Suzuki, Toshifumi Nomura, Toshinari Miyauchi, Hideki Nakamura, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu.

Mitotic recombination causes frequent somatic reversion of a dominant *KRT1* mutation in ichthyosis hystrix Curth-Macklin.

The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okayama, Japan, 2015.12.

鈴木翔多朗, 乃村俊史, 宮内俊成, 竹田真依, 中村秀樹, 新熊悟, 藤田靖幸, 秋山真志, 清水宏.

新規ケラチン1遺伝子変異による ichthyosis with confetti の一家系.

第31回角化症研究会, 東京, 日本, 2016. 07.

緒言

表皮について

皮膚は体内と外界の環境を分ける組織であり、水分の喪失や透過を防ぐ機能、体温を調節する機能、外部からの生物・物理・化学的な刺激から守る機能、感覚器として外部からの刺激を感知する機能、さらには免疫器官として外部からの刺激に対して全身で応答する機能など、生体の恒常性維持に多様な役割を果たしている器官である¹。

皮膚を断面で観察すると最外層から順に表皮、真皮、皮下組織という組織に分けられる。表皮はほとんどが角化細胞 (keratinocyte; ケラチノサイト) で構成され、分化段階が異なる層状構造をしており、最終的に最外層のバリアである角層を形成する。真皮は膠原線維や弾性線維、血管、細胞外マトリックスなどの支持組織、また汗腺、脂腺、毛包などの付属器が存在する組織である。皮下組織は脂肪組織が多くを占め、中性脂肪を貯留し、断熱や外力からの防御などに関わっている。

ここで、表皮を構成するケラチノサイトは表皮の最下層 (基底層) をその主な幹細胞のニッチとして分裂を繰り返す²。基底層よりも上層ではケラチノサイトは分化し、分化段階によって下層から順に有棘細胞 (有棘層)、顆粒細胞 (顆粒層)、角層細胞 (角層) となる (図 1)³。表皮の最も重要な機能は最外層の角層を形成することであり、角層細胞はタンパク質や脂質が密に凝集した強固な死細胞で、その周囲の細胞間隙には皮膚で特異的な巨大な脂肪酸鎖を有するセラミドなどの脂質がラメラ構造を形成し、強力な疎水バリアとなっている^{3,4}。実際、これら角層細胞や角層細胞間脂質 (セラミドなど) を合成・輸送・局在するのに重要なタンパク質に異常があると、角層形成がうまくいかず、種々の遺伝性皮膚疾患になることが知られている^{3,5}。

角層の成分は約 60% がケラチンタンパク質で占められており⁶、ケラチンタンパク質は顆粒細胞におけるケラトヒアリン顆粒 (図 1) を構成するフィラグリン (filaggrin, FLG) によって凝集され、同じくケラトヒアリン顆粒のロリクリン (loricrin, LOR) と共に強固な角層細胞の構造形成にきわめて重要な役割を担っている。また、これらのタンパク質は表皮の分化段階特異的な発現が知られており、ケラチンタンパク質については基底細胞では主にケラチン 5 (KRT5) とケラチン 14 (KRT14) が発現し、分化した有棘細胞より上層では主にケラチン 1 (KRT1) とケラチン 10 (KRT10)、顆粒細胞からはケラチン 2 (KRT2) も発現する^{7,8}。また FLG と LOR は主に顆粒細胞で発現し、ケラトヒアリン顆粒の形成とケラチンの凝集に関わる

(図 1)⁸。このように表皮では角層形成に必要な因子が時空間的に制御されて発現することで強固なバリアである角層を形成する。

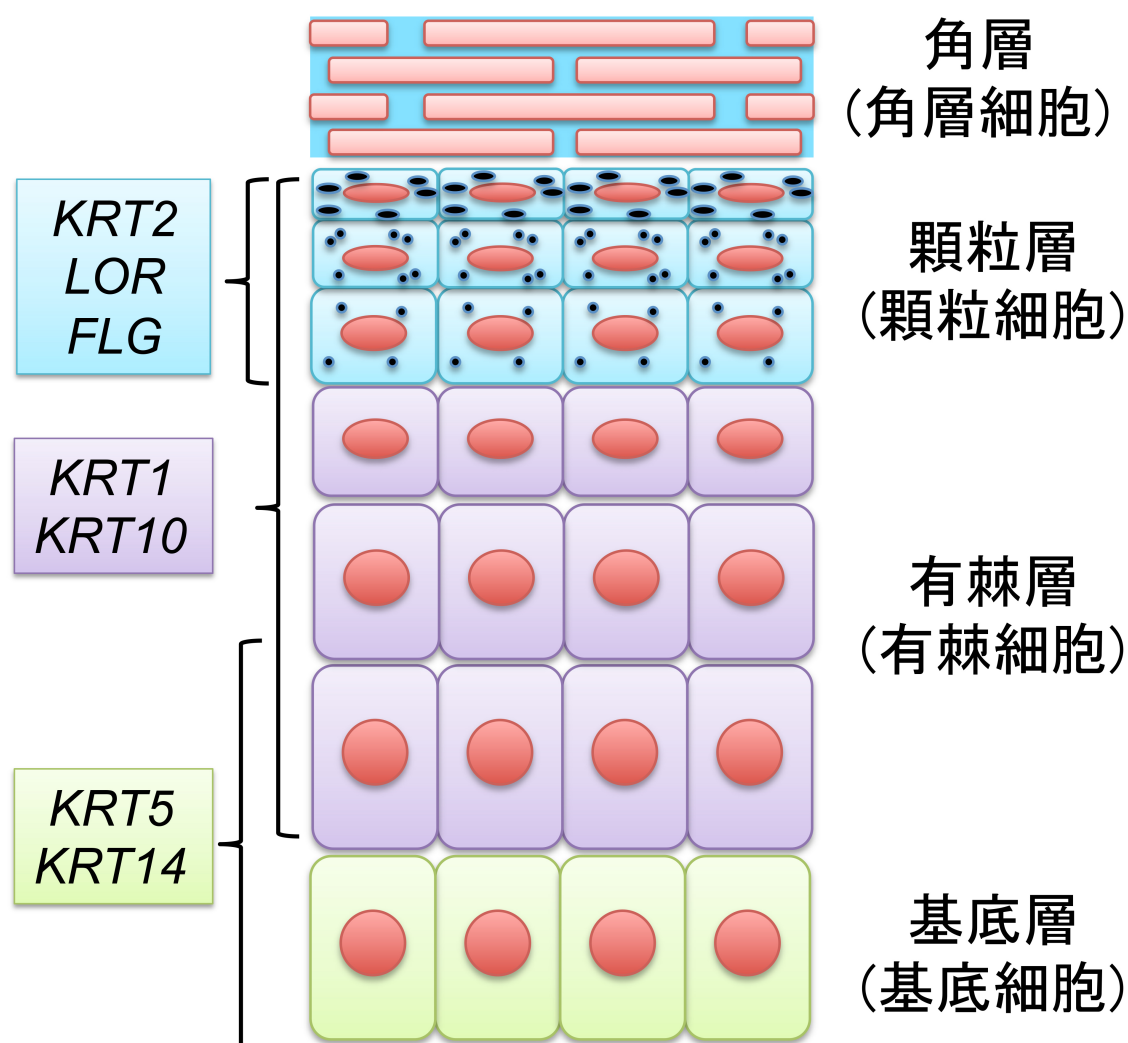


図 1. 表皮の構造の模式図と代表的な遺伝子発現パターン (文献 3, 7, 8 より作成)
 顆粒細胞内に示した黒いドット状の構成成分はケラトヒアリン顆粒を示す。KRT5, ケラチン 5; KRT14, ケラチン 14; KRT1, ケラチン 1; KRT10, ケラチン 10; LOR, ロリクレリン; FLG, フィラグリン。

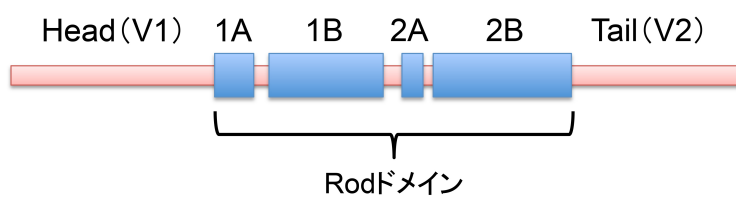
ケラチンについて

ケラチンは皮膚やその他の上皮組織において細胞骨格を形成し、主に細胞や組織の機械的な刺激に対する強さに関わるが、細胞小器官の輸送、細胞や組織の分化、ストレス応答など、生体の多様な機能にも関わっているタンパク質である⁷。

ケラチンは上皮細胞の中間径フィラメントを形成する線維タンパク質としてヒトでは 54 種類知られており (表 1)、その塩基配列の相同性からタイプ I (type I keratin) とタイプ II (type II keratin) に大きく分けられ⁹、ヒトゲノム上でタイプ I は 17 番染色体の q21.2 に、タイプ II は 12 番染色体の q13.13 にクラスターを形成して座乗している (例外としてケラチン 18 はタイプ I だが、12 番染色体 q13.13 に座乗している)。また、これらのケラチンタンパク質はその発現組織と機能から 3 つのグループ、simple、barrier、structural に分けられる⁷。Simple ケラチンは胚や単層の上皮で発現しており、barrier ケラチンは皮膚の表皮のような重層上皮組織の細胞で発現し、細胞骨格として細胞の構造を保っている。また structural ケラチンは毛髪や爪のような硬い組織を構成するケラチンである。

ケラチンタンパク質の構造は他の中間径フィラメントと同様に中央の α ヘリックスに富んだ rod ドメインと N 末端側の head (V1) ドメイン、C 末端側 tail (V2) ドメインに分けられる (図 2)。ケラチンの中間径フィラメント形成はまず、タイプ I とタイプ II が特異的なペアで rod ドメインの α ヘリックス同士でコイルドコイル構造をとり、ヘテロダイマーを形成するところからはじまる¹⁰。これらのヘテロダイマー同士は逆方向に並んでテトラマーを形成し、さらには unit length filament と呼ばれる 60 nm 長の 32 量体を形成する。最終的には unit length filament 同士が末端で連結し、「ロープ様」構造の幅 10 nm の中間径フィラメントを形成する (図 2)。したがって、タイプ I とタイプ II ケラチンの rod ドメインにおける α ヘリックス同士がコイルドコイル構造を形成するかどうか、中間径フィラメント形成に最も重要であると考えられており、特に rod ドメインの N 末端側 (1A)、C 末端側 (2B) は高度に保存されている^{11,12}。実際これらの領域のアミノ酸配列変化が、多くの遺伝疾患の原因となっており、病原変異のホットスポットとされている^{13,14}。

ケラチンタンパク質のドメイン構造



ケラチン線維の形成

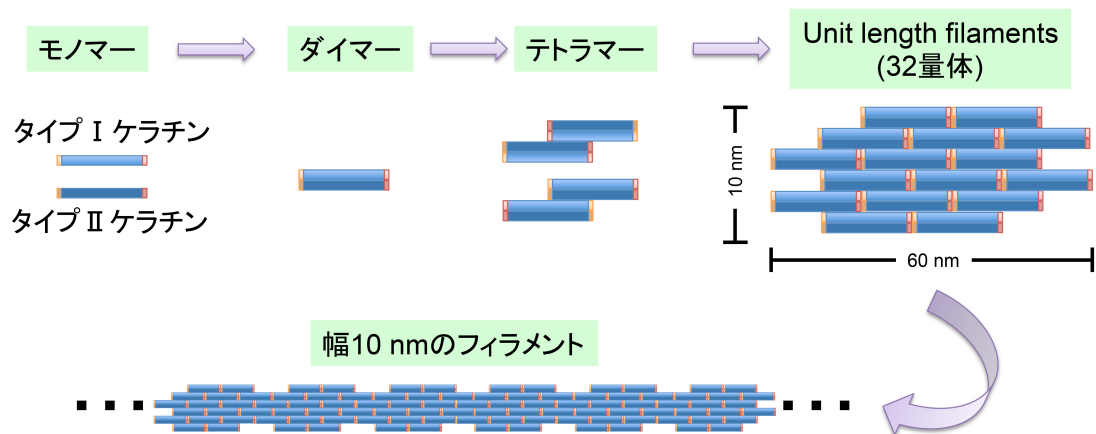


図 2. ケラチンタンパク質のドメイン構造およびケラチン線維の形成の模式図(文献 7 より作成)

表 1. ヒトゲノムにコードされているケラチン遺伝子とその皮膚における発現 (文献 15-19 より作成)

種類	遺伝子名	転写開始点領域**	遺伝子発現量推定値RLE (FANTOM5)*				免疫染色による発現確認 (Human Protein Atlas)**				
			皮膚***	皮膚 (手掌)*4	皮膚*5 (爪周辺)	ケラチノ サイト*6	線維芽 細胞	ケラチノ サイト	ランゲルハ ンス細胞	メラノ サイト	表皮細胞
Type I	Simple	<i>KRT18</i>	chr12:53342625..53342937	29.1	11.7	0.0	168.5	ND	ND	ND	ND
Type I	Simple	<i>KRT20</i>	chr17:39041418..39041606	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	ND	ND	ND
Type I	Barrier	<i>KRT9</i>	chr17:39728258..39728373	0.0	280.5	3406.6	0.0	Low	Low	ND	Low
Type I	Barrier	<i>KRT10</i>	chr17:38978847..38978923	13692.2	1731.8	9326.0	87.9	ND	High	Medium	High
Type I	Barrier	<i>KRT12</i>	chr17:39023151..39023542	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Barrier	<i>KRT13</i>	chr17:39661819..39662141	0.0	0.0	0.0	12.4	ND	ND	ND	ND
Type I	Barrier	<i>KRT14</i>	chr17:39743101..39743251	1322.7	198.7	1656.4	3412.6	ND	Medium	Medium	High
Type I	Barrier	<i>KRT15</i>	chr17:39675096..39678177	1308.2	2.3	15.8	257.7	ND	Medium	ND	Medium
Type I	Barrier	<i>KRT16</i>	chr17:39768940..39769048	203.5	130.9	27230.2	3266.1	ND	ND	ND	Low
Type I	Barrier	<i>KRT17</i>	chr17:39780759..39781128	29.1	9.3	884.6	3496.2	ND	ND	ND	High
Type I	Barrier	<i>KRT19</i>	chr17:39684505..39684609	239.8	81.8	0.0	47.9	ND	ND	ND	Low
Type I	Barrier	<i>KRT23</i>	chr17:39092893..39094049	87.2	11.7	17.4	7.2	Medium	Low	Low	Low
Type I	Barrier	<i>KRT24</i>	chr17:38859945..38860052	0.0	0.0	0.0	0.3	Low	High	ND	High
Type I	Structural	<i>KRT25</i>	chr17:38911535..38911648	14.5	0.0	0.0	0.0	ND	ND	ND	ND
Type I	Structural	<i>KRT26</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT27</i>	chr17:38938756..38938863	21.8	0.0	0.8	0.1	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT28</i>	chr17:38956171..38956279	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT31</i>	chr17:39553794..39553901	50.9	0.0	3.3	0.0	ND	Medium	ND	Medium
Type I	Structural	<i>KRT32</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	ND	ND	ND
Type I	Structural	<i>KRT33A</i>	chr17:39507025..39507127	7.3	0.0	0.0	0.0	ND	Medium	ND	Medium
Type I	Structural	<i>KRT33B</i>	chr17:39526019..39526107	0.0	0.0	0.8	0.0	ND	Medium	ND	Medium
Type I	Structural	<i>KRT34</i>	chr17:39538538..39538816	50.9	0.0	29.9	30.5	ND	Medium	ND	Medium
Type I	Structural	<i>KRT35</i>	chr17:39637272..39637438	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT36</i>	chr17:39646109..39646228	0.0	0.0	0.8	0.0	NA	NA	NA	High
Type I	Structural	<i>KRT37</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	High	High	Medium	High
Type I	Structural	<i>KRT38</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT39</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type I	Structural	<i>KRT40</i>	chr17:39140323..39140658	0.0	0.0	0.0	0.0	Medium	Medium	Medium	High
Type II	Simple	<i>KRT7</i>	chr12:52626182..52627254	138.1	133.2	0.8	1031.4	ND	ND	ND	ND
Type II	Simple	<i>KRT8</i>	chr12:53343566..53343742	7.3	7.0	0.8	24.7	ND	ND	ND	ND
Type II	Barrier	<i>KRT1</i>	chr12:53074144..53074258	7027.8	3131.8	6379.1	10.0	ND	High	High	Low
Type II	Barrier	<i>KRT2</i>	chr12:53045943..53046060	1257.2	7.0	85.5	0.3	ND	High	ND	Low
Type II	Barrier	<i>KRT3</i>	chr12:53189829..53189958	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Barrier	<i>KRT4</i>	chr12:53207837..53207966	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	ND	ND	ND
Type II	Barrier	<i>KRT5</i>	chr12:52914084..52914241	3335.8	2220.3	9149.2	30781.2	ND	High	ND	High
Type II	Barrier	<i>KRT6A</i>	chr12:52886975..52887293	348.8	177.6	10935.9	21409.8	ND	High	High	Low
Type II	Barrier	<i>KRT6B</i>	chr12:52845890..52846000	210.8	21.0	3507.8	3696.7	ND	High	ND	High
Type II	Barrier	<i>KRT6C</i>	chr12:52867533..52867688	0.0	4.7	2696.2	351.1	ND	High	High	Low
Type II	Barrier	<i>KRT76</i>	chr12:53171053..53171238	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	Medium	ND	ND
Type II	Barrier	<i>KRT77</i>	chr12:53097218..53097454	123.5	4.7	0.8	0.0	ND	High	Low	ND
Type II	Barrier	<i>KRT78</i>	chr12:53242443..5324339	29.1	4.7	55.6	0.8	ND	ND	ND	Low
Type II	Barrier	<i>KRT79</i>	chr12:53224137..53228229	123.5	0.0	0.0	3.3	ND	High	ND	Medium
Type II	Barrier	<i>KRT80</i>	chr12:52585430..52586320	101.7	2.3	143.6	10.5	Medium	Medium	Medium	Medium
Type II	Structual	<i>KRT75</i>	chr12:52828088..52828247	79.9	0.0	39.0	2123.2	ND	Medium	ND	Medium
Type II	Structual	<i>KRT71</i>	chr12:52946869..52946998	14.5	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT72</i>	chr12:52995066..52995461	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT73</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT74</i>	chr12:52967568..52967704	7.3	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT81</i>	chr12:52685235..52685374	7.3	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT82</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	Medium	Medium	Low
Type II	Structual	<i>KRT83</i>	chr12:52715079..52715244	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	High	High	High
Type II	Structual	<i>KRT84</i>	chr12:52779364..52779533	0.0	0.0	0.8	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT85</i>	chr12:52761165..52761328	14.5	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
Type II	Structual	<i>KRT86</i>	chr12:52642337..52643174	0.0	0.0	2.3	1.4	—	—	—	—

*文献15, 16を参考にして記載した。RLE, relative log expression。各遺伝子の転写開始点領域**におけるreference配列と同じ向き (各遺伝子と同じstrand)のピークの値を合算して表示した

**文献16において各遺伝子のreference配列における5'非翻訳領域の上流からコード領域までに存在するピーク (転写開始点)を含む領域

***文献16: skin, adult, donor1: CNhs11785 stss

*4文献16: Skin - palm, donor1: CNhs13458 ctss

*5文献16: Fingernail (including nail plate, eponychium and hyponychium), donor2: CNhs13445 ctss

*6文献16: Keratinocyte - epidermal, donor1: CNhs11064 ctss

*文献17, 18, 19で各遺伝子の"TISSUE ATLAS", "SKIN"における"Immunohistochemistry"項目の"Annotated protein expression"の欄に記載した

ND, not detected; NA, not available; —, データベースなし

***いずれかの組織でRLEが1000を超える皮膚において高発現しているケラチン

表皮におけるケラチンと皮膚疾患について

ヒトのさまざまな組織・細胞種を対象とした網羅的なRNA転写解析の結果^{15,16}、さらには網羅的な免疫組織学解析の結果^{17,18}から、表皮では54種類あるケラチンのうち、半分以上のケラチンがmRNA、タンパク質レベルで発現していることがわかっていて (表1)¹⁵⁻¹⁹。ケラチンは表皮基底細胞において全タンパク質重量の17-27%、角層細胞では50%までを占めているので^{20,21}、ケラチノサイトの特性、すなわち角層形成に非常に大きな影響を与える。実際、特に表皮で発現量の多い*12種類 (表1)のケラチンのうち11種類: KRT5、KRT14、KRT1、KRT10、KRT9、KRT2、KRT6A、KRT6B、KRT6C、KRT16、KRT17は表皮の細胞骨格形成に関わるbarrierケラチンであり、種々の非症候性皮膚疾患 (他臓器症状を伴わない皮膚疾患)と関連することが証明されている (表1、表2)²²。その中で代表的な例がKRT5またはKRT14の異常でおこる単純型表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex, EBS: MIM# 131760 など、表2)である²³⁻²⁵。EBSは常染色体優性遺伝性疾患、すなわち変異をヘテロ接合性に有することで発症する。症状は生下時または乳幼児期頃から、全身、特に物理的刺激を受けやすい手、足、肘、膝などに大小の水疱を形成するのが特徴である。病原変異の多くが病原ホットスポットの1Aまたは2Bドメイン近傍のアミノ酸置換を伴うミスセンス変異である²⁶。この変異によりヘテロダイマーの形成やそれ以上の多量体の形成が阻害され、中間径フィラメントの形成不全となり、表皮基底細胞 (KRT5とKRT14が発現している細胞)の機械的強度が低下し、外的刺激により細胞が変性、崩壊し、水疱となる。電子顕微鏡でEBS患者の基底細胞を観察するとケラチン線維が凝集した像 (keratin clumping)が認められ、さらにケラチノサイトで変異タンパク質を過剰発現させるとケラチン線維形成が阻害されることが示されている²⁴。したがって、EBS患者は変異タンパク質によるdominant-negative効果で基底細胞が脆弱になっていると考えられている²⁶。同様に、表皮におけるケラチンが原因の皮膚疾患は、KRT14やKRT10のnull変異がホモ化することで発症する劣性遺伝性皮膚疾患 (それぞれ、劣性遺伝性単純型表皮水疱症: MIM# 601001、劣性表皮融解性魚鱗癬: MIM# 113800、表2)のような一部の例外を除き、変異ケラチンのdominant-negative効果による細胞骨格の形成異常が病因である (表2)²²。例えば、KRT1とKRT10は有棘細胞や顆粒細胞で発現しており、その1Aや2Bドメインにおける変異はそれらの細胞の脆弱性を増大させて表皮の剥離 (びらん)や角層形成異常を引き起こし、表皮融解性魚鱗癬 (epidermolytic ichthyosis, EI: MIM#113800)などの原因となる (表2、図3)^{22,27}。なお、魚鱗癬とは白色から褐色、黒色調の鱗様の角質の堆積をほぼ全身の皮膚に広範囲に認める一連の疾患群のことである。また、掌蹠の有棘細胞や顆粒細胞で特異

的に発現している *KRT9* は、掌蹠のみの有棘層・顆粒層の細胞が脆弱になることで発症する Vörner 型掌蹠角化症 (MIM#144200) の原因遺伝子である(表 2)²²。

このように 1A や 2B ドメインにミスセンス変異をもつケラチンの dominant-negative 効果による細胞骨格形成阻害は、それが発現する細胞において特異的で特徴的な症状を引き起こすが、当然ながら変異の種類や位置、領域 (1A・2B 以外の領域) によってさまざまな程度が存在し、中間径フィラメントのデータベース: Human Intermediate Filament Database ^{28, 29} には表 2 に示したものも含め、40 以上の疾患、400 以上の変異が登録されている。

*表皮での発現量が多いケラチン: FANTOM5 による各遺伝子の 5'末端領域近傍における転写開始点の発現量推定値 (relative log expressin, RLE) の合計が表 2 に示した組織や細胞の少なくともひとつで 1000 以上のもの。

表 2. ケラチンと主な皮膚疾患一覧 (文献 22 を改変して作成)

ケラチンの種類		主な皮膚疾患		MIM
Type I	Type II	英名	和名	
KRT14	KRT5	Epidermolysis bullosa simplex generalized severe	Dowling-Meeara 型単純型表皮水疱症	131760
		Epidermolysis bullosa simplex generalized intermediate	その他の汎発型単純型表皮水疱症	131900
		Epidermolysis bullosa simplex localized	限局型単純型表皮水疱症	131800
KRT14		Recessive epidermolysis bullosa simplex	劣性遺伝性単純型表皮水疱症	601001
		Dermatopathia pigmentosa reticularis	網状色素性皮膚症	125595
		Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome	-	161000
	KRT5	Epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema	表皮水疱症-移動性輪状紅斑	609352
		Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation	色素異常型単純型表皮水疱症	131960
		Dowling-Degos disease	-	179850
KRT10	KRT1	Epidermolytic ichthyosis	表皮融解性魚鱗癬	113800
		Cyclic ichthyosis with epidermolytic hyperkeratosis	周期性-表皮融解性角化症	607602
		Ichthyosis with confetti	-	609165
KRT10		Recessive epidermolytic ichthyosis	劣性表皮融解性魚鱗癬	113800
	KRT1	Diffuse non-epidermolytic palmoplantar keratoderma	-	607654
		Ichthyosis hystrix Curth-Macklin	豪猪皮状魚鱗癬	146590
		Striate palmoplantar keratoderma	線状掌蹠角化症	607654
	KRT2	Superficial epidermolytic ichthyosis	表在性表皮融解性魚鱗癬	146800
KRT9	KRT1	Epidermolytic palmoplantar keratoderma	Vörner 型掌蹠角化症	144200
KRT6A, KRT6B, KRT6C	KRT16, KRT17	Pachyonychia congenita 1/2/3/4	I 型/II 型/III 型/IV 型 先天性爪甲厚硬症	167200/ 167210/ 615726/ 615728
		Focal or diffuse non-epidermolytic palmoplantar keratoderma	限局性またはびまん性掌蹠角化症	615735
		Focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma	限局性掌蹠角化症	613000
	KRT17	Steatocystoma multiplex	多発性脂腺嚢腫	184500
KRT81, KRT83, KRT86		Monilethrix	連珠毛	158000
KRT85		Ectodermal dysplasia hair-nail type	毛髪・爪タイプ外胚葉性形成異常	602032
KRT75		Pseudofolliculitis barbae	鬚毛部仮性毛包炎	612318
KRT71, KRT74		Woolly Hair	羊毛様毛髪	194300

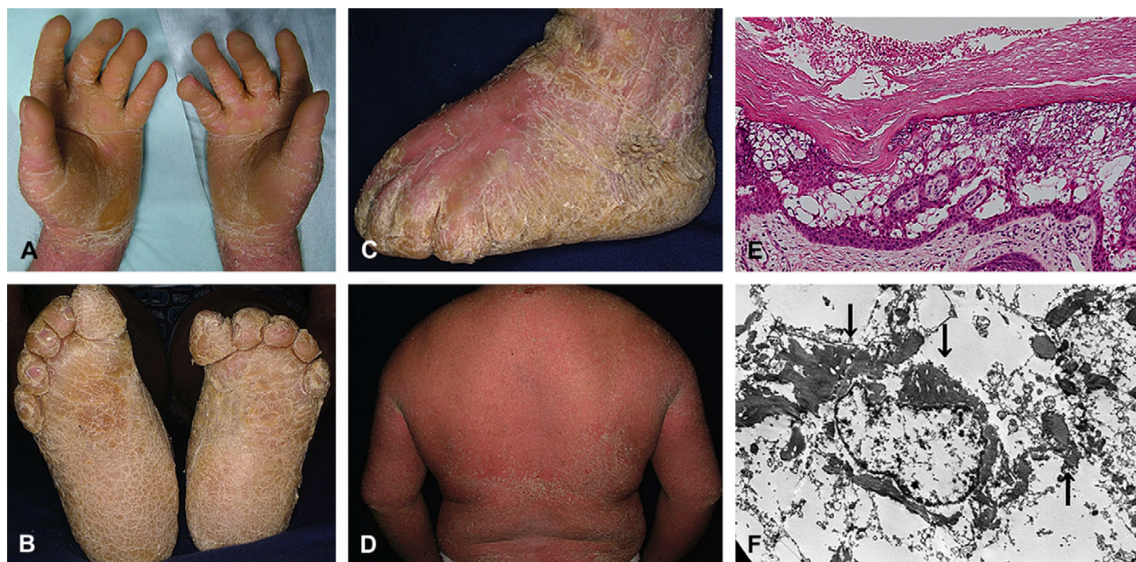


図 3. 表皮融解性魚鱗癬の 1 例 (文献 27 より転載)

KRT12 Bドメイン領域におけるミスセンス変異 c.1457T>G (p.Leu486Arg)による表皮融解性魚鱗癬患者の掌蹠 (A-C)、背中 (D)の臨床像および有棘細胞・顆粒細胞が変性する顆粒変性を示した皮膚断面の組織学像 (E)、ならびに有棘細胞におけるケラチン凝集 (keratin clumping)を示した電子顕微鏡観察像 (F)

KRT1 の V2 ドメインにおける変異について

細胞の機械的強度に関わる細胞骨格の形成にケラチンの rod ドメインが重要な役割を果たしていることはその領域の疾患関連変異から明らかである^{22, 28, 29}。一方で、V1 や V2 ドメインについては rod ドメインと比較すると配列保存性が低く、グリシン残基に富んだ反復配列のため個体間でも配列の多様性が高い。したがって、1A や 2B ドメインの病原性のようにケラチンタンパク質全体でその機能に関して一貫したメカニズムは存在しない。なお、KRT5 の V1 ドメインが線維の伸長や近傍のタンパク質との相互作用に関わることや、KRT5 と KRT14 の V2 ドメインがケラチン線維の安定性に関わる報告がある³⁰。また、KRT1 の V2 ドメインはケラチン線維の形成と LOR との相互作用に重要であるとの報告がされている^{31, 32}。

KRT1 の V2 ドメインは他の多くのケラチン分子の V1 や V2 ドメインと同様にグリシン残基に富み、グリシンループ (glycine loop, GL) と呼ばれる疎水性の構造 (図 4) を形成すると考えられている^{32, 33}。また、表皮上層の主要なタンパク質である KRT1 と KRT10 は他のケラチン分子と比較して V1 や V2 ドメインの疎水性が高く、これにより LOR タンパク質 (分子全体で GL を形成する³²) との相互作用や疎水性の高い角層細胞の形成に貢献していると考えられている^{3, 32, 34}。

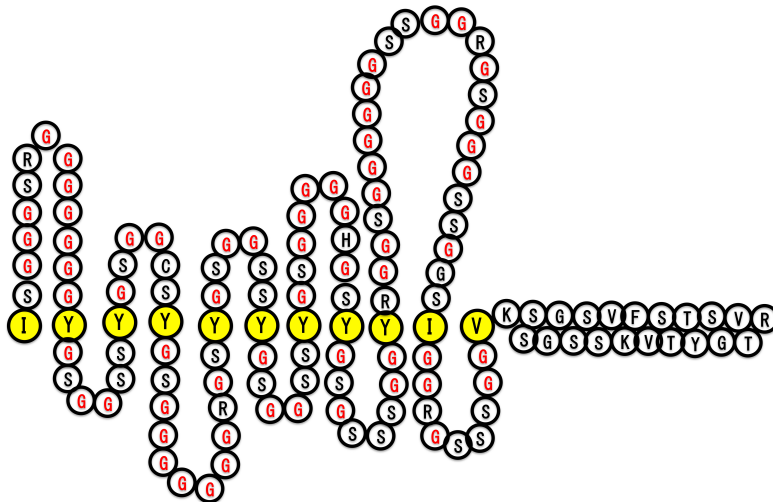


図 4. KRT1 V2ドメインにおけるグリシンループ (GL)構造 (文献 33 より改変して作成)

ここで、表皮の barrier ケラチンで V2 ドメインの病原変異が報告されているものは KRT1、KRT10、KRT5、KRT6A、KRT6B である^{28, 29}。KRT10 ではフレームシフト変異により ichthyosis with confetti (IWC : MIM#609165)³⁵、KRT5 ではフレームシフト変異により EBS-移動性輪状紅斑 (MIM#609352)³⁶ や色素異常型

EBS (MIM#131960)³⁷などのいくつかのEBS、KRT6A、KRT6Bではそれぞれフレームシフト変異とミスセンス変異でⅠ型³⁸、Ⅱ型³⁹先天性爪甲厚硬症の報告がある。一方で、KRT1のV2ドメインにおける病原変異はきわめて多様な重症度の皮膚疾患を引き起こすことが知られており、これまで変異が本研究以外で8種類報告され、いずれもフレームシフト変異である(表3、図5)。8種類の変異のうち4種類が豪猪皮状魚鱗癬 (Ichthyosis hystrix Curth-Macklin, IHCM: MIM#146590)^{31, 33, 34, 40}、1種類が線状掌蹠角化症 (MIM#607654)⁴¹、2種類がEI^{42, 43}、1種類がIWC⁴⁴の患者でそれぞれ病原変異として報告されている。このように、KRT1のV2ドメインにおけるフレームシフト変異は多様な臨床像の原因として報告されているが、この病原性の違いに関してFonsecaら³⁴がGLの数に関して言及している以外、知見はきわめて少ない。本研究ではKRT1のV2ドメインにおける新規の病原変異c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67)を見出し、その病原性に関して細胞を用いた実験により検証を実施した。

表3. 既報告 KRT1 V2ドメインにおける変異が原因の皮膚疾患

変異		正常な GLの数	フレームシフト ペプチドの特徴	重症度	年齢	診断	正常化皮膚 出現の有無	文献
DNA	アミノ酸							
c.1556delG	p.Gly519GlufsTer95	0	アラニンリッチ	重症	54, 34, 33, 15, 4	IHCM	?	31
c.1577delG	p.Gly526AlafsTer88	1	アラニンリッチ	重症	28	IHCM	?	34
c.1609_1610delinsA	p.Gly537IlefsTer77	2	アラニンリッチ	重症	44	IHCM	?	33
c.1628delG	p.Gly543ValfsTer71	3	アラニンリッチ	軽症	— ¹	SPPK	?	41
c.1752dupT	p.Gly585TrpfsTer69	7	アルギニンリッチ	軽症	50	EI	?	43
c.1756_1757insG ²	p.Tyr587LeufsTer67	8	アルギニンリッチ	軽症	17	EI	— ³	42
c.1758_1759insT	p.Tyr587LeufsTer67	8	アルギニンリッチ	軽症	64, 34, 5M	IWC	+ (64, 34) ⁴	新規 (本研究)
c.1860_1861insT ⁵	p.Ser618IlefsTer36	9	— ⁷	軽症	5	IHCM	— ³	40
c.1865_1866insG ⁶	p.Val622CysfsTer30	10 (すべて)	— ⁷	軽症	35, 3-9	IWC	+ (35) ⁴	44

略語: GL, glycine loop (グリシンループ); IHCM, ichthyosis hystrix Curth-Macklin (豪猪皮状魚鱗癬); SPPK, striate palmoplantar keratoderma (線状掌蹠角化症); EI, epidermolytic ichthyosis (表皮融解性魚鱗癬); IWC, ichthyosis with confetti

¹1家系14人の患者を調べた研究

²文献42ではc.1752insGと記載

³文献44より引用

⁴陽性だった患者の年齢

⁵文献40ではc.1861insTと記載

⁶文献44ではc.1866insGと記載

⁷特徴的な配列なし

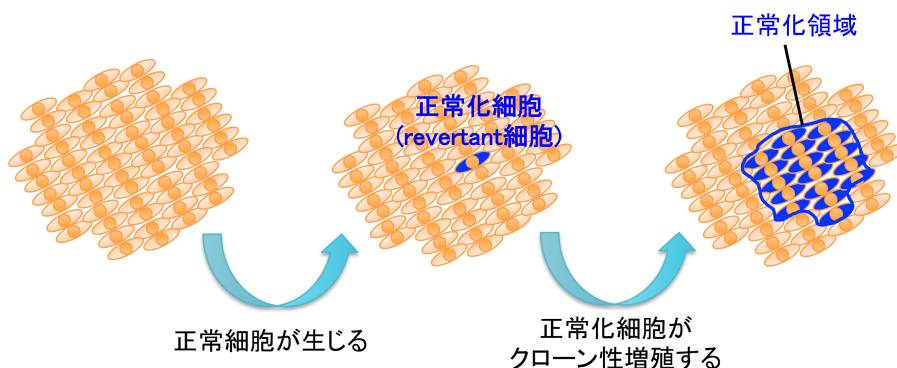
Revertant mosaicism と IWC について

Revertant mosaicism とは、病原変異が消失して生じる自然に治癒した細胞、すなわち revertant 細胞が組織や器官内で生き残り、クローン性増殖を経て、一定の割合を占め、表現型が回復した領域が同一個体内に存在する現象である (図 6a)⁴⁵。病原変異が消失して revertant 細胞が生じるメカニズムは、復帰突然変異 (back mutation)、相同組換え (homologous recombination)、染色体破砕 (chromothripsis)、第二点突然変異 (second-site mutation) などが考えられている (図 6b)^{46, 47}。いずれにしても revertant mosaicism の表現型を示すには、後天的な遺伝子変異または染色体変化により先天的な病原変異が消失し、かつその細胞が効率よく増殖する必要があるため、この現象はきわめて確率が低いものであると考えられている。しかしながら、この現象は、皮膚や血液、肝臓などの疾患で一定数報告されている。例えば、Wiskott-Aldrich syndrome (MIM#301000) や Fanconi anemia (MIM#227650)、non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa (MIM#226650) などでは 10% 以上の患者で revertant mosaicism が認められる⁴⁶。これらの疾患で revertant mosaicism が頻度高く認められる理由は正確なことはわかっておらず、推測の域を出ていないが、ひとつは偶然生じた revertant 細胞の適応度の高さ、すなわち病原変異が消失した細胞がまわりの細胞 (変異を持つ細胞) よりも増殖性が高いことによると考えられている⁴⁶。さらには、Fanconi anemia の遺伝子変異をもつ細胞ではゲノムの安定性が悪く、DNA ダメージが多発していることから、この修復機構のミスによって上述したさまざまな遺伝子または染色体変化 (図 6) が生じ、結果として revertant 細胞が生じる可能性が高いことが報告されている⁴⁸。

ここで、IWC は KRT10 または KRT1 の V2 ドメインにおけるフレイシフト変異によって起こるきわめて稀な常染色体優性遺伝性疾患であり、KRT10 変異によるものは IWC-K10 (IWC- I)、KRT1 変異によるものは IWC-K1 (IWC- II) と呼称されている^{35, 44, 49, 50}。IWC の臨床像は全身の潮紅を主体とした過角化であるが、最大の特徴はスポット状の正常化した皮膚が多数出現することである (図 7)^{35, 44, 49, 50}。また、無数に生じる正常化皮膚領域は調べられている限り、それぞれ別の正常化ケラチノサイトのクローンであり、かつ体細胞の相同組換えのうち単交叉 (single crossover) または遺伝子変換 (gene conversion) により生じ、変異が座乗する染色体領域のセントロメア側を交叉点 (break point) とした loss of heterozygosity (LOH) が認められることが証明されている (図 7)³⁵。このような単一のメカニズムでさらに無数の revertant が生じる疾患は IWC 以外報告がなく、既報告の revertant mosaicism を伴いうる疾患とは異なり、体細胞で相同組換えが生じやすい仕組みが

あると予想されているが、詳細はまったく不明である^{49,50}。なお、IWC-IIは先行研究で1例のみの報告⁴⁴であるが、IWC-Iと比較して正常化皮膚が生じる頻度が圧倒的に低く、臨床的な特徴もIWC-Iと異なる点が多いが不明確な点が多い。また、同じKRT1のV2ドメインにおけるフレームシフト変異による疾患に関わらず、revertant mosaicismが認められる例とそうではない例が報告されている(表3)が、その原因も不明である。本研究ではIWC-II症例の詳細な解析を実施し、revertant mosaicismが多発するメカニズムに関して重要な示唆を得た。

(a)



(b)

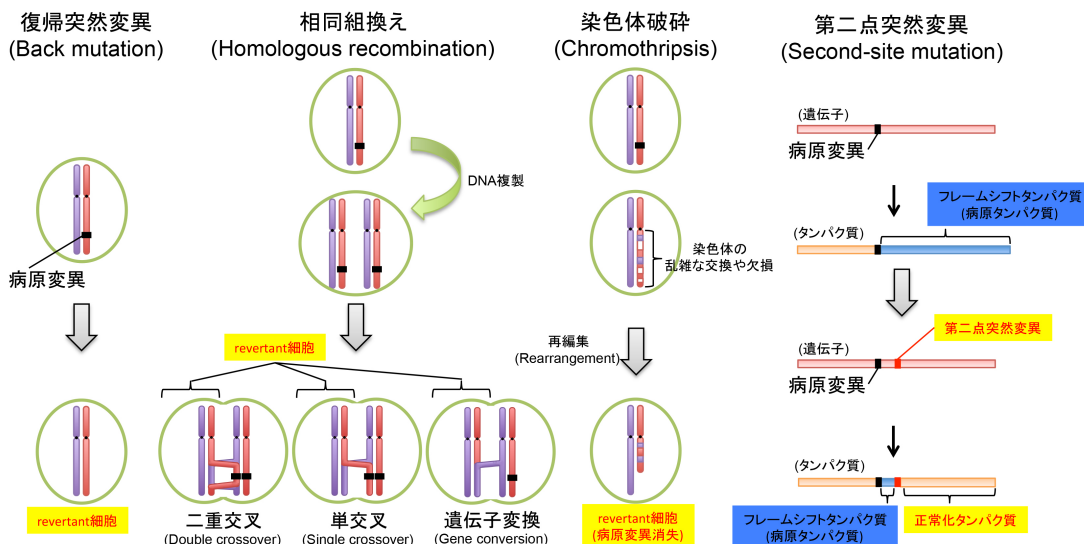


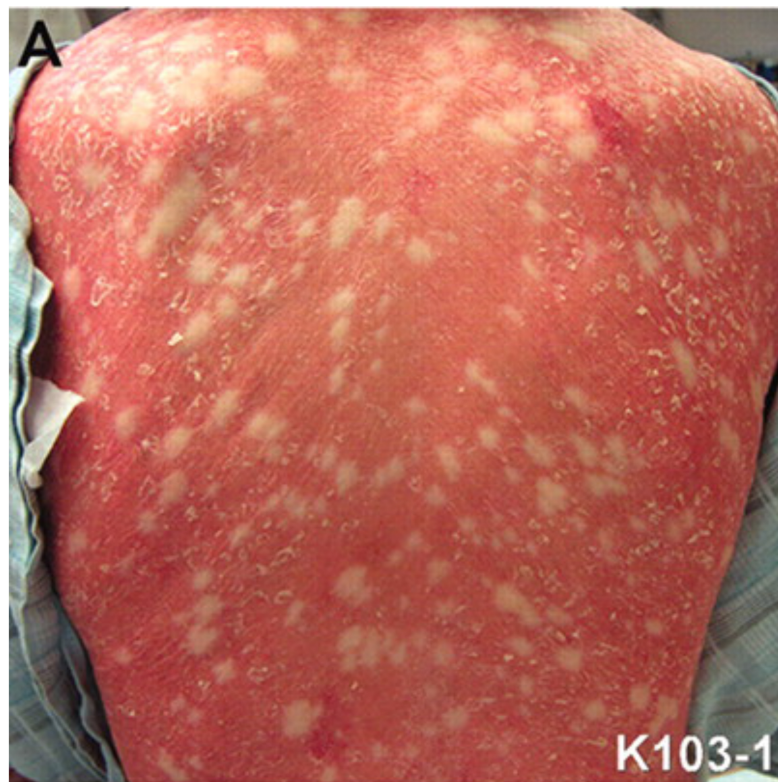
図6. Revertant mosaicism についての模式図 (文献46, 47より作成)

(a) Revertant 細胞が出現してからクローン性増殖を経て、正常化領域を形成するまでの模式図

(b) 遺伝子が正常化するために考えられるメカニズム

複雑化を避けるために、常染色体優性遺伝する疾患: 変異をヘテロ接合性で有する細胞をモデルとした。

(a)



(b)

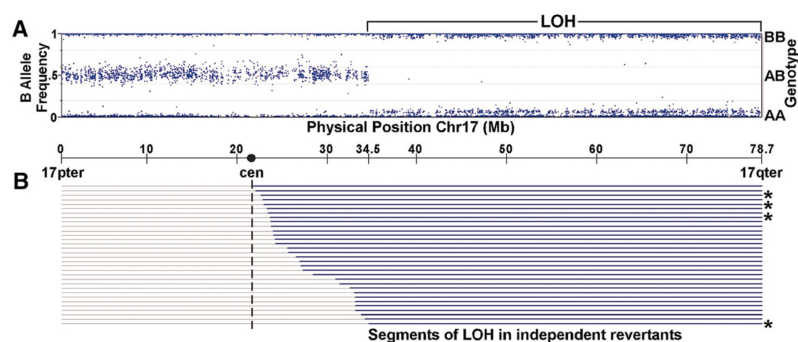


図 7. IWC- I の症例 (文献 35 より転載)

(a) IWC- I の臨床像。激しい潮紅を呈し、かつ白いスポットとして無数の正常化皮膚が認められる。

(b) 正常化皮膚領域のケラチノサイトで認められる loss of heterozygosity (LOH)。高密度の全ゲノム SNP アレイ結果による 17 番染色体の各 SNP の遺伝子型情報をプロットし、LOHを検出している (A)。複数の正常化皮膚領域において、原因遺伝子である *KRT10* が座乗している 17 番染色体上でそれぞれ異なる break point が認められ、すべて *KRT10* よりもセントロメア側である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CMV	cytomegalovirus
EBS	epidermolysis bullosa simplex
EI	epidermolytic ichthyosis
FLG	filaggrin
GFP	green fluorescent protein
GL	glycine loop
IHCM	ichthyosis hystrix Curth-Macklin
IWC	ichthyosis with confetti
IWC- I	ichthyosis with confetti caused by <i>KRT10</i> mutation
IWC- II	ichthyosis with confetti caused by <i>KRT1</i> mutation
KRT1	keratin 1
KRT2	keratin 2
KRT5	keratin 5
KRT10	keratin 10
KRT14	keratin 14
LOH	loss of heterozygosity
LOR	loricrin
RLE	relative log expression
TAAB	TAAB Laboratories Equipment
T _m	melting temperature
Thermo	Thermo Fisher Scientific

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、参加者から書面による同意を得て実施した。臨床検体の取り扱い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. 基本的な実験操作

本研究で用いた基本的な実験操作を記載する。

1-1. カラム精製

QIAquick PCR purification kit (Qiagen)を用いて核酸溶液を脱塩・精製した。最終的な核酸の溶出はキットに付属の Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH8.0)を使用し、溶出量は 50 μ l とした。この操作により核酸溶液の脱塩・精製ができると共に 70 塩基以下の核酸の大半を除去することができる。

1-2. エタノール沈殿

核酸溶液 100 μ l に Quick-PrecipTM Plus Solution (EdgeBioSystems)を 12 μ l 添加し、エタノールを 200 μ l 加え、10 秒間ボルテックスミキサーで混合して室温下、18000 $\times$ g、5 分間遠心し、上清を除去した。続いて、70% (v/v)エタノール溶液を 500 μ l 加え、1 秒間ボルテックスミキサーで混合し、再び室温下、18000 $\times$ g、5 分間遠心し、上清を除去した。最後に微量濃縮遠心機 (DNA プチ Vac, Wakenyaku)で 5 分間、減圧乾燥させ、最終的に 10 μ l の脱イオン水 (UltraPureTM DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific: Thermo)で核酸ペレットを溶解させた。

1-3. プライマー

実験に使用したオリゴ DNA (プライマー)は Sigma-Aldrich 社から購入し、使用時は脱イオン水で 10 μ M に調製してから使用した。

1-4. シーケンス反応

核酸溶液 1 μ l、BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Thermo) 0.6 μ l、5 $\times$ Sequencing Buffer (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo) 1.7 μ l、プライマー 0.1 μ l、脱イオン水 6.2 μ l を PCR プレートに入れ、サーマルサ

イクル: 95°C 1分、(95°C 10秒 → 50°C 5秒 → 60°C 4分)×25 サイクルで反応させた。シーケンス反応に使用したプライマーは実験毎に変更した。

シーケンス反応産物は以下の要領で精製・乾燥させた。シーケンス反応産物に 3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 未調整) 2.5 µl、125 mM EDTA (pH8.0) 2.5 µl、エタノール 25 µl を加え、PCR プレートパラフィルムでシールし、3 回転倒混和した後、すぐにスピンドウンした。遮光下で 15 分間静置後、室温下、3100×*g* で 20 分間遠心した。遠心ローターは PT-745MS (Kubota) を使用し、さらに P-751 用トレイ (Kubota) を用いてプレートを取り出しやすくした。遠心後、パラフィルムを剥がし、プレートを逆さまにしてバケットに入れ、室温下、100×*g*、20 秒間遠心することで上清を除去した。続いて、70% (v/v) エタノール溶液を 100 µl 添加し、そのまま室温下、3100×*g* で 5 分間遠心した後、プレートを逆さまにしてバケットに再度入れ、室温下、100×*g*、2 分間遠心して上清を完全に除去した。

1-5. シーケンシング

精製・乾燥したシーケンス反応産物はホルムアミド (Hi-Di™ Formamide Genetic Analysis Grade, Thermo) 20 µl で溶解し、熱変性 (96°C で 2 分間) 後、急冷し、ABI PRISM® 3130x/Genetic Analyzer (Thermo) で電気泳動、蛍光取得、データ解析を実施した。なお、キャピラリーは 50 cm キャピラリー (3130x/3100 Genetic Analyzer 16-Capillary Array, 50cm, Thermo)、電気泳動の分離用のマトリックスは POP-7™ Polymer for 3130/3130x/Genetic Analyzers (Thermo) を使用した。

1-6. 核酸の制限酵素処理

核酸の制限酵素処理はすべて New England Biolabs 社の酵素を用いて実施した。核酸溶液に制限酵素 0.5 µl、各制限酵素に適切な 10×buffer 5 µl を添加し、脱イオン水で総量 50 µl にした。続いて 37°C 下で 1 時間静置し、制限酵素処理とした。

1-7. アガロースゲルによる電気泳動

核酸溶液の一部をパラフィルム上で 6×loading buffer (Takara Bio) と混合して 0.5×TBE buffer (Tris-Borate-EDTA Buffer Power pH8.3, Takara Bio) で溶解させ作製したアガロースゲル (UltraPure™ Agarose, Thermo) により電気泳動装置 Mupid®-ex (Mupid) を用い、100 V 下で 40 分間泳動し、0.5 µg/ml に希釈したエチジウムブロマイド溶液 (ethidium bromide solution 10 mg/ml, Sigma-Aldrich) に 30 分間浸した後、電気泳動パターン解析装置 BioDoc-It Plus System (UVP) で観察した。

1-8. DNA 断片の分離・精製

DNA 断片をアガロースゲルによる電気泳動によって分離し、SYBR Safe (Thermo) 20,000 倍希釈液で 30 分間染色した後 Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator (Thermo) で目的サイズのバンドを確認してカッターでそのバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて DNA を精製した。最終的な DNA の溶出はキットに付属の Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH8.0) 100 µl で実施し、続いてエタノール沈殿により DNA 溶液を脱塩・濃縮した。

1-9. 大腸菌を用いた DNA 断片のクローニングおよびプラスミド精製

本研究では PCR やプラスミドベクターから得られた DNA 断片は適切な制限酵素で処理した後、目的のベクター断片 (制限酵素処理済み) へ連結し、大腸菌に導入してクローニングした。DNA 断片 4.5 µl、ベクター断片 0.5 µl、2×ligation Mix (Ligation-Convenience Kit, Nippon gene) 5 µl を 0.2 ml 容マイクロチューブへ入れ、タッピングで混合し、16℃下、30 分間静置させた。続いて、氷上で融解させたコンピテントセル (High Efficiency DH5α Competent Cell, GeneMark) 50 µl に反応溶液を全量添加し、氷上で 30 分間静置後、42℃のウォーターバスで 30 秒間加温して氷で急冷した。2 分間の氷上静置後、37℃に加温した SOC medium (GeneMark) を 250 µl 加え、37℃下、220 rpm で 1 時間震盪培養した。ベクターに適した抗生物質を含む LB プレート*に大腸菌の培養液を全量塗布し、37℃下で 16 時間倒置培養した。得られたコロニーはオートクレーブ滅菌済みの爪楊枝でピックアップし、適切な抗生物質を含んだ LB 培地 2 ml に接種後、37℃下、220 rpm で 16 時間震盪培養した。最後に大腸菌液から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミド DNA を精製した。プラスミド DNA の溶出はキットに付属の Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH8.0) 50 µl で実施し、得られたプラスミドはアガロースゲルによる電気泳動およびシーケンシングで目的のものであるかどうか確認し、次の実験に用いた。

*LB プレート: LB 培地 (BD Bacto™ Peptone: BD Bacto™ Yeast Extract: 塩化ナトリウムを 2:1:2 の割合で水により溶解し、121℃下、15 分間オートクレーブ滅菌したもの、BD Biosciences) に BD Bacto™ agar (BD Biosciences) を 1.5% 加え、121℃下、15 分間オートクレーブ滅菌後、70℃まで冷却してからカナマイシン硫酸ナトリウム (Wako) またはアンピシリンナトリウム (Sigma-Aldrich) を 50 µg/ml になるように添加し、10 cm プラスチックシャーレに注ぎ、固化させたもの。

2. 患者検体の取り扱い

2-1. 患者からの検体採取

2-1-1. 血液

血液は文章での同意のもと、患者のゲノム DNA を抽出するために採取した。方法は北海道大学皮膚科の通常診療での方法に準じ、採取した血液は凝固を防ぐ目的で、EDTA 2 カリウムを 0.1% (w/v) 添加するようにし、採血後は 4℃ 下で保管、1 週間以内に DNA を抽出した。

2-1-2. 唾液

唾液は文章での同意のもと、患者のゲノム DNA を抽出するために採取した。方法は採取前に 30 分以上食事を控えてもらった上で、唾液 DNA 抽出キット (Oragene[®]・DNA (OG-500), DNA Genotek) に唾液を 2 ml を入れ、キットに付属の保存液を混合し、室温で保管した。

2-1-3. 皮膚

皮膚は文章での同意のもと、エピネフリン添加 1% キシロカイン (キシロカイン[®] 注射液「1%」エピレナイミン (1:100,000) 含有, AstraZeneca) で局所麻酔し、3 mm から 5 mm のパンチ (デルマパンチ[®], Nipro) で採取した。採取後はただちに、氷冷した生理食塩水 (大塚生食注, Otsuka Pharmaceutical) に浸し、組織学解析用に円形の採取皮膚片の端をメスで切り出し、すぐに 4% ホルムアルデヒド溶液 (マイルドホルム[®] 10N, Wako) に浸した。残りの皮膚は真皮部分をメスで可能な限り除き、真皮と表皮の分離や DNA 抽出、RNA 抽出、電子顕微鏡観察用にそれぞれ切り分け、各実験で異なる処理をした (後述)。

2-1-4. 表皮または真皮

採取した皮膚から表皮と真皮を分けて採取する必要がある場合は、真皮部分をメスを用いて可能な限り除去した皮膚を 3.8% (v/w) チオシアン酸アンモニウム溶液 (PBS)* が 500 µl 入った 2.0 ml 容マイクロチューブに入れ、室温下で 20 分間静置させた後、実体顕微鏡観察下でピンセットを用いて慎重に表皮と真皮を分離し、それぞれを生理食塩水で 1 回洗浄後すぐに -80℃ で凍結保存した。なお、後に RNA 抽出を実施する場合は、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) に最終濃度が 1% になるように β-メルカプトエタノール (Wako) を添加したもの入れたビーズ入りチューブ (2.0ML 滅菌破碎用チューブ ジルコニアビーズ入り, Sarstedt K.K.) に検体が液体に完全に浸るようにして入れ、-80℃ で保管した。

*3.8%チオシアン酸アンモニウム溶液 (PBS)

Ammonium thiocyanate (Sigma-Aldrich)を 3.8% (w/v)になるように PBS (D-PBS(-) without Ca and Mg, liquid, Nacalai Tesque)に溶解し、121℃下で 15 分間オートクレーブ滅菌して、さらに 0.22 μm のフィルター滅菌した。

2-2. 採取検体を用いた実験サンプルの調製

2-2-1. 血液からのゲノム DNA 抽出

患者血液からのゲノム DNA 抽出は QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen)を用いて実施した。なお、最終的な DNA の溶出は脱イオン水で実施し、NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo)を用いて濃度を測定した後、4℃で 1 ヶ月以内、長期の場合は-80℃で保管した。

2-2-2. 唾液からのゲノム DNA 抽出

保存液に入った唾液を 50℃下で 6 時間反応させた後、反応液 500 μl に prepIT®・L2P (DNA Genotek) 20 μl を添加して 10 秒間ボルテックスミキサーで混合し、10 分間氷上で静置した。室温下で 18000 $\times g$ 、15 分間遠心した上清を回収し、等量のエタノールを加え、10 回転倒混和後、室温で 10 分間静置した。続いて、室温下で 18000 $\times g$ 、2 分間遠心して上清を除去し、再び 70% (v/v)エタノール溶液を 250 μl 加えて、1 秒間ボルテックスミキサーで混合後、室温下で 18000 $\times g$ 、5 分間遠心して上清を除去した。最後に DNA のペレットを室温下で 30 分間風乾して脱イオン水で溶解後、NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo)を用いて濃度を測定した後、4℃で 1 ヶ月以内、長期の場合は-80℃で保管した。

2-2-3. 表皮または真皮からのゲノム DNA 抽出

-80℃で保管した表皮または真皮は解凍せずにそのまま QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いてゲノム DNA を抽出した。なお、RNase H (Qiagen)による RNA 分解処理は必ず実施し、最終的な DNA の溶出はキットに付属した Buffer AE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH9.0)でおこなった。NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo)を用いて濃度を測定した後、4℃で 1 ヶ月以内、長期の場合は-30℃で保管した。

2-2-4. RNA 抽出

グアニジンチオシアン酸塩含有溶液内で-80℃で保管していた検体を室温で融解後、Precellys ® 24 lysis/homogenizer (Bertin Technologies)を用いて 6500 rpm 20

秒間の条件で2回破碎し、室温下、 $18000\times g$ の条件で3分間遠心後、上清を回収した。この後はRNAeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出した。なお、最終的な溶出はキットに付属の DNase/RNase free water 50 μ l で実施した。ここで、真皮部分が残った状態から抽出したサンプルを皮膚 RNA、分離した表皮または真皮から抽出したサンプルを表皮 RNA または真皮 RNA とした。

2-2-5. 電子顕微鏡観察用サンプルの処理

後に電子顕微鏡観察に用いる場合、真皮部分をメスで可能な限り除いた皮膚を5%グルタルアルデヒド溶液*に浸し、4℃下で保管した。この操作は皮膚を採取後、直ちに実施した。

*5%グルタルアルデヒド溶液

0.1 M sodium cacodylate (Wako)、5% (v/v) グルタルアルデヒド (TAAB Laboratories Equipment, TAAB)、pH7.4 (HCl による)

3. 患者皮膚の組織学的解析

3-1. パラフィンプロック作製

4%ホルムアルデヒド溶液に浸した皮膚片は密閉式自動固定包埋装置 (Tissue-Tek VIP6-J0, Sakura) およびティッシュ・テック TEC プラス ディスペンシング・コンソール (TEC-P-DC-J0, Sakura) を用いてパラフィンに包埋し、パラフィンプロックを作製した。なお、ホルムアルデヒドで固定したサンプルの脱水およびパラフィン浸漬までの条件は99.5%メタノール1時間×7漕、キシレン1時間×3漕、パラフィン1時間×3漕であった。

3-2. 皮膚切片の作製

パラフィンに包埋した皮膚はミクロトーム (REM-710, Yamato Kohki Industrial) を用いて厚さ4 μ m の切片を作製し、水面にて伸展させた後、プレパラートに付着させ、乾燥・固着させた。

3-3. 皮膚切片の染色

3-3-1. ヘマトキシリン&エオシン (HE)染色

ヘマトキシリンとエオシンで皮膚組織切片を染色することで、細胞核を紫色、細胞質を赤色に染め分け、細胞や組織の詳細構造を光学顕微鏡で観察できる。染色は自動染色装置 ティッシュ・テック DRS 2000 (Sakura) で実施し、キシレンおよびエタノールへの浸漬でパラフィンを除去した後、ヘマトキシリンおよびエオシンで

染色し、水で洗浄後、エタノールによる脱水、キシレンによる透徹を実施し、非水溶性封入剤マウントクイック (Daido Sangyo)で封入した。観察は光学顕微鏡 (AX70, Olympus)で実施し、画像はデジタルカメラ (DXM1200, Nikon)により取得した。

3-3-2. 免疫染色

患者組織切片を各種抗体で染色し、各タンパク質の組織内や細胞内での局在を明らかにした。

3-3-2-1. 脱パラフィン

実験方法 3-2 で作製した切片を 40℃下、16 時間静置し完全に乾燥させた。次に切片を、キシレン 10 分×2 回、100%エタノール 10 分、100%エタノール 5 分、95%エタノール 5 分、90%エタノール 5 分、80%エタノール 5 分、70%エタノール 5 分の順に浸漬して、パラフィンを完全に除去した。さらに超純水に 10 分間、スターラーで攪拌しながら浸した後、10 分間風乾させた。

3-3-2-2. 賦活化

乾燥させた切片は 95℃に加温した賦活化溶液 (0.1 M sodium citrate, 10 ml/l Tween 20, pH6.0 : HCl による)に浸し、95℃下で 10 分間静置後、室温下で 30 分間冷却した。その後、PBS に浸して 10 分間スターラーで攪拌させた。

3-3-2-3. ブロッキングおよび免疫染色

切片から水分を軽く除き、Super PAP Pen Mini (Daido Sangyo)で切片周辺を囲み土手を作製した。続いて各切片に 10%ヤギ正常血清 (Nichirei Biosciences)を 50 μ l ずつ滴下し、室温下、1 時間、湿潤条件で静置しブロッキングをおこなった。10%ヤギ正常血清を除き、PBS で適切な濃度に希釈した 1 次抗体*を 20 μ l ずつ各切片に滴下して 37℃下、1 時間、湿潤条件で抗原抗体反応させた。次に PBS に浸して 10 分間スターラーでの攪拌を 3 回繰り返し、切片の水分を軽く除いた後、PBS で 1% (v/v)に希釈した 2 次抗体**を 50 μ l ずつ滴下して 37℃下、1 時間、湿潤条件で反応させた。さらに PBS に一度切片を浸した後、水分を軽く除き、PBS で 50 倍希釈した DAPI 溶液 (DAPI solution 1 mg/ml, Dojindo)を 100 μ l ずつ各切片に滴下し、室温下 10 分間静置した。最後に PBS に浸して 10 分間のスターラーでの攪拌を 3 回繰り返し、空気を当てて水分を除いた後、封入剤 PermaFluor (Thermo)で封入し、カバーガラスをのせ、4℃下で 16 時間静置し、固化させた後に観察した。

*1 次抗体：以下の 1 次抗体を記載の希釈濃度で用いた。

- ・抗 KRT1 抗体：Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin 1 (Leica Biosystems, #NCL-CK1), 使用濃度は 20 倍希釈

- ・抗 KRT10 抗体：Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 10 Clone DE-K10 (DAKO, #M70002), 使用濃度は 50 倍希釈

- ・抗 KRT2 抗体：Mab to Cytokeratin 2e (Progen Biotechnik, #65191), 使用濃度は 20 倍希釈

**2 次抗体：以下の 2 次抗体を用いた。

- ・1 次抗体がウサギ抗体の場合：Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (Thermo, #A11008)

- ・1 次抗体がマウス抗体の場合：Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 680 conjugate (Thermo, #A21057)

3-3-2-4. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察

作製した免疫染色標本は Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Microscope (Olympus) で観察および画像取得した。

3-4. 電子顕微鏡観察

3-4-1. ブロック作製

固定したサンプルから 5% グルタルアルデヒドを除き、0.1 M sodium cacodylate (pH7.4 : HCl による) 溶液で満たして、4℃ 下、16 時間、回転ローターで攪拌した。さらに、オスミウム溶液* に交換して、4℃ 下、1 時間静置した後、5% 酢酸ウラン溶液** に交換し、4℃ 下、1 時間静置した。次にサンプルを 70% エタノール 20 分、80% エタノール 10 分、90% エタノール 10 分、95% エタノール 10 分、エタノール 10 分を 3 回の順に浸漬した後、エタノール：酸化プロピレンの 1 : 1 溶液に 20 分間浸漬し、酸化プロピレンに 15 分間 2 回浸漬して完全に脱水した。各溶液に浸している間は室温下、回転ローターで攪拌した。続いて、酸化プロピレン：solution 2*** = 2 : 1、酸化プロピレン：solution 2 = 1 : 1、酸化プロピレン：solution 2 = 1 : 2、solution 2 にそれぞれ順に 1 時間ずつ回転ローターで攪拌しながら浸漬した。最後に、solution 3*4 に 1 時間浸漬し、solution 3 を満たしたゼラチンカプセル (外径 8 mm、深さ 20 mm, Okenshoji, #08-1002) にサンプルを入れ、37℃ 下、16 時間静置後、70℃ 下で 1 週間以上反応させて樹脂を完全に硬化させ、電子顕微鏡観察用のブロックとした。

*オスミウム溶液：2% Osmium (VIII) Oxide Solution (Wako)を 0.1 M sodium cacodylate (pH7.4 : HCl による)で 2 倍希釈したもの。

**5%酢酸ウラン溶液：10% (w/v) uranyl acetate (エタノール溶解)を脱イオン水で 2 倍希釈したもの。

***Solution 2 : EPON 812 RESIN (TAAB) 24 g、DDSA EM (TAAB) 9.5 g、MNA (TAAB) 16.5 g を計量し、スターラーで 5 分間攪拌したもの。

*4Solution 3 : 24.5 g の solution 2 に DMP-30 (TAAB)を 0.5 g 添加し、5 分間スターラーで攪拌後、1 時間、減圧下で気泡を除いたもの。

3-4-2. 超薄切片の作製

作製したブロックからカミソリやガラスナイフを用いてサンプルを露出させ、面出した後、ウルトラミクロトーム (Leica EM UC7, Leica)とダイヤモンドナイフ (ultra 45°, Nisshin EM)を使用して、厚さ 70 nm の超薄切片を作製した。作製した超薄切片は水面に浮かべ、ジクロロエタンで湿らせた綿棒をかざして切片のしわを伸展させた。最後にフォルムバル膜を被膜したグリッド (フォルムバル PVF-C10 STEM Cu100P グリッド仕様、Okenshoji)に切片をのせて一晩乾燥させた。

3-4-3. 電子染色

超薄切片がのったグリッドを 1%酢酸ウラン溶液*に 10 分間浸した後、脱炭酸水 (脱イオン水を沸騰後、室温に戻したもの)で 6 回洗浄した。続いてクエン酸鉛溶液**に 7 分間浸し、脱炭酸水で 6 回洗浄後、乾燥させた。

*1%酢酸ウラン溶液：2% (w/v) uranyl acetate (水溶液)をエタノールで 2 倍希釈したもの。また、使用直前に 0.45 μm のフィルターを通して、ゴミや析出物の混入を防いだ。

**クエン酸鉛溶液：脱イオン水 30 ml にクエン酸鉛 (lead citrate (II) $3\text{H}_2\text{O}$, BDH Chemicals)を 1.4 g を加え、攪拌させた後、1 N NaOH を 8 ml 添加してクエン酸鉛を完全に溶解させた後、脱イオン水で 50 ml までメスアップしたもの。クエン酸鉛が析出するのを防ぐために使用毎に窒素ガスを充填する。また、使用直前に 0.45 μm のフィルターを通して、ゴミや析出物の混入を防いだ。

3-4-4. 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察および写真撮影は Hitachi H-7100 TEM Transmission Electron Microscope (Hitachi High-Technologies)で実施した。

4. *KRT1* および *KRT10* の遺伝子変異探索実験

患者ゲノム DNA の *KRT1* および *KRT10* 領域の配列を調べ、病原変異を探索した。

4-1. PCR によるエクソン領域の増幅

PCR によって *KRT1* および *KRT10* のコード領域のエクソン領域とエクソン・イントロン境界領域をすべて増幅した。使用したプライマーの配列は表 4 に記載した。ゲノム DNA (100 ng/μl) 0.8 μl、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo) 10 μl、GC enhancer (Thermo) 2 μl、forward および reverse プライマーをそれぞれ 1.6 μl、脱イオン水 4 μl を 0.2 ml 容 PCR チューブまたは 0.2 ml 容 PCR プレートに入れ、サーマルサイクル：95℃ 10 分、(95℃ 30 秒 → 56℃ 30 秒 → 72℃ 1 分) × 35 サイクル、72℃ 5 分で反応させ、各領域を増幅させた。

表 4. *KRT1* および *KRT10* の遺伝子変異探索実験に用いたプライマー

目的	遺伝子	プライマー名	配列 (5'→3')	Tm* (°C)	増幅断片長 (bp)	対象エクソン
遺伝子増幅	<i>KRT1</i>	KRT1ex1F3	CCGCTGACTCTAGAAGACCAAGCCCAATTTCTTCC	67	931	1
		KRT1ex1R3	CTTTAGGTCGACCACGAACC	56		
		KRT1ex2F2	CTCCATGGCTATGAGACTCCA	56	1011	2, 3
		KRT1ex3R2	ACCTGTGAGGGGATTCTCCAA	58		
		KRT1ex4F1	CTCACAGGTAATGAGAGGGAC	55	795	4, 5, 6
		KRT1ex6R1	CCATTCCATACAGCTGAGTG	54		
		K1 e7.F 2012	TCGACAATGTCAAGAAGCAG	54	1099	7
		K1 e7.2R 2012	CCCCTCTAAAGATGCCGACT	57		
		KRT1ex8F2	CAGATGGGGAAAGTCTTCA	52	844	8, 9
		KRT1ex9R2	CTGAGATTGCCACTGATCTG	54		
	<i>KRT10</i>	KRT10ex1F-2007	CAATCATAAGCCAAAGATGC	51	830	1
		KRT10ex1R-2007	CATCTGTCTGGATTACATGG	51		
		KRT10ex2-F1	CAACATAAAAGTGCAGAGTGCAT	55	760	2, 3
		KRT10ex3-R1	ATTGGCTACACGAGGACCAT	57		
		KRT10ex4-F1	CCCAGCCAAAAGAGAGTTCA	55	513	4, 5
		KRT10ex5-R1	GCATTGCATATTCTTAGGTGAGC	55		
		KRT10ex6-F1	AGCGTCACCATACTCAACTGAA	57	363	6
		KRT10ex6-R1	TGGCATCTTCTTGGGGTTTA	54		
		KRT10ex7-FT3	CCTGGCAGGGTTTTATTTTT	52	893	7, 8
		KRT10ex7-R New	TTCTTGGTTTCTGATTCAACCAT	54		
シーケンス反応	<i>KRT1</i>	KRT1ex1FT3	GTGGACGTGGTAGTGGCTTT	59	-	1
		KRT1ex1in-R	AAAGCCACTACCACGTCCAC	59		
		K1e1.R2012	CTACTGTGTTTTGACTGCACCAATC	58		

*Tm: melting temperature

：シーケンス反応に用いたプライマー

4-2. Exonuclease によるプライマーの除去およびシーケンシング

PCR 産物 5 μl に脱イオン水 1.5 μl、ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-UP (Affymetrix) を 0.5 μl を 0.2 ml 容 PCR プレートに調製し、37℃ 15 分 → 80℃ 15

分 反応させ、未反応のプライマーを除去した。この反応産物を鋳型にしてシーケンス反応およびシーケンシングを実施した。なお、シーケンス反応に用いたプライマーは表 4 に示した。

4-3. 遺伝子変異の検出

シーケンシングで得られたデータは SnapGene[®] (GSL Biotech)を用いてヒトゲノム (human GRCh38/hg38)と比較した。

5. *FLG* の遺伝子変異探索実験

日本人で報告のある *FLG* (NM_002016)の主なナンセンス変異 10 個⁵¹ :
c.441_442del (p.Gly149GlufsTer4); c.1501C>T (p.Arg501Ter); c.3321del (p.Gly1109GlufsTer13); c.5084C>A (p.Ser1695Ter); c.5101C>T (p.Gln1701Ter); c.5368C>T (p.Gln1790Ter); c.7661C>G (p.Ser2554Ter); c.8666_8667delinsGA (p.Ser2889Ter); c.9887C>A (p.Ser3296Ter); c.12064A>T (p.Lys4022Ter) を調べた。

5-1. PCR によるエキソン領域の増幅

PCR によって上記 10 個の変異の領域を含む 9 ヶ所のゲノム領域を増幅した。使用したプライマーの配列とその対象となる領域は表 5 に記載した。ゲノム DNA (100 ng/μl) 0.5 μl、AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Thermo) 7.5 μl、forward および reverse プライマーをそれぞれ 1 μl、脱イオン水 5 μl を 0.2 ml 容 PCR チューブまたは 0.2 ml 容 PCR プレートに入れ、サーマルサイクル:95℃ 10 分、(95℃ 30 秒 → 56℃ 30 秒 → 72℃ 50 秒)×35 サイクル、72℃ 7 分で反応させ、各領域を増幅させた。

表 5. FLG の遺伝子変異探索実験に用いたプライマー

プライマー名	配列 (5'→3')	Tm* (°C)	増幅断片長** (bp)	対象変異
FIL3F	GCTGATAATGTGATTCTGTCTG	52	383	c.441_442del (p.Gly149GlufsTer4)
HEX-GS441delA-R	ACTAGATTCATGCCTTTTCCC	54		
RPT1.1	GTTTCTTCACGGAAAGGCTGGGCTGA	60	553	c.1501C>T (p.Arg501Ter)
RPT1.2	AACACTGGATCCCTGGTTCCTA	56		
RPT3.1	GTTTCTTGATAGTGAGGGACATTCAGAG	53	646	c.3321del (p.Gly1109GlufsTer13)
RPT3.2	CAGACAACCTCTCGGAGTCG	59		
RPT4.3	GTTTCTTGTCAGACATGGCTCCAGGA	58	488	c.5084C>A (p.Ser1695Ter) c.5101C>T (p.Gln1701Ter)
RPT4.4	CTCCAGTGCTGGGCCCTGTG	63		
RPT4.F2	GTAGTCGGAGACAGTGGAA	54	449	c.5368C>T (p.Gln1790Ter)
FILER	ACATCAGACCTTTCTGGGAC	57		
RPT7.1	GTTTCTTGAGACAGCTCCAGGCACTCAA	58	368	c.7661C>G (p.Ser2554Ter)
RPT7.2	CTGGCTAAACTGGATCCCCA	57		
RPT8.F1	GATGGACGGGGCCAGCACTA	63	879	c.8666_8667delinsGA (p.Ser2889Ter)
RPT8.R4	CTTGGTGGCTCTGCTGATGGGA	60		
FILIF	CTGTTCAAGGAGCAGTCAAGG	57	802	c.9887C>A (p.Ser3296Ter)
FILJR	GCTTCATGGTGATGCGACCA	60		
FLGendF1	CTAGTACCGCTAAGGAACATGG	57	781	c.12064A>T (p.Lys4022Ter)
FLGendR1	TGGCTCCTTCGATATTTCTGA	54		

*Tm: melting temperature, ターゲットのゲノムDNAにアニーリングする部位の値

**増幅断片長はターゲットとなるゲノムDNAの断片長 (bp)である

:シーケンス反応に用いたプライマー

5-2. Exonuclease によるプライマーの除去およびシーケンシング

PCR 産物 2.5 µl に脱イオン水 0.75 µl、ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-UP (Affymetrix)を 0.25 µl を 0.2 ml 容 PCR プレートに調製し、37°C 15 分 → 80°C 15 分 反応させ、未反応のプライマーを除去した。この反応産物を鋳型にしてシーケンス反応およびシーケンシングを実施した。なお、シーケンス反応に用いたプライマーは表 5 に示した。

5-3. 遺伝子変異の検出

シーケンシングで得られたデータは SnapGene® (GSL Biotech)を用いてヒトゲノム (human GRCh38/hg38)と比較した。

6. In vitro ケラチン凝集実験

ケラチンを不死化ケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞 (HaCaT-SF, CLS Cell Lines Service)で過剰発現させ、細胞内で正常な線維構造を形成するかどうかを調べた。

6-1. *KRT1* 完全長 cDNA クローンの取得

KRT1 完全長 cDNA クローンは Origene 社より購入した (*KRT1* (untagged)-Human keratin 1 (*KRT1*), NM_006121.2, OriGene)。ベクター名は pCMV6-XL5-*KRT1*full とした (表 6)。

表 6. 本研究で用いたベクター一覧

ベクター名	プロモーター	発現遺伝子名	変異名 (DNA)	変異名 (アミノ酸)	タグタンパク (連結末端)
pCMV6-XL5- <i>KRT1</i> full	CMV	<i>KRT1</i>	なし	なし	なし
pEGFPC2 <i>KRT1</i>	CMV	<i>KRT1</i>	なし	なし	GFP (N末端)
pEGFP-C2 vector	CMV	<i>GFP</i>	なし	なし	なし
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1758insT	CMV	<i>KRT1</i>	c.1758_1759insT	p.Tyr587LeufsTer67	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1556delG	CMV	<i>KRT1</i>	c.1556delG	p.Gly519GlufsTer95	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1577delG	CMV	<i>KRT1</i>	c.1577delG	p.Gly526AlafsTer88	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1609delGGinsA	CMV	<i>KRT1</i>	c.1609_1610delinsA	p.Gly537IlefsTer77	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1628delG	CMV	<i>KRT1</i>	c.1628delG	p.Gly543ValfsTer71	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1751insG	CMV	<i>KRT1</i>	c.1756_1757insG	p.Tyr587LeufsTer67	GFP (N末端)
pEGFPC2 <i>KRT1</i> -1861insT	CMV	<i>KRT1</i>	c.1860_1861insT	p.Ser618IlefsTer36	GFP (N末端)
pmCherry- <i>KRT1</i>	CMV	<i>KRT1</i>	なし	なし	mCherry (N末端)
pCMV6-XL5- <i>KRT10</i> full	CMV	<i>KRT10</i>	なし	なし	なし
pmCherry- <i>KRT10</i>	CMV	<i>KRT10</i>	なし	なし	mCherry (N末端)
pmCherry-LORwt	CMV	<i>LOR</i>	なし	なし	mCherry (N末端)

6-2. GFP 連結 *KRT1* ベクターの作製

市販の pEGFP-C2 vector (Takara Bio) に *KRT1* の完全長 cDNA を連結させ、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) の C 末端側に *KRT1* が連結したタンパク質 : GFP-*KRT1* を発現するベクター、pEGFPC2*KRT1* を作製した (表 6)。

6-2-1. *KRT1* の増幅および制限酵素処理

10×PCR Buffer for KOD-Plus[®] (Toyobo) 5 µl、2 mM dNTP 5 µl、25 mM MgSO₄ 2 µl、forward プライマー : *KRT1*-Eco-start (5'-TCGAATTCATCATGAGTCGACAG-3') 1.5 µl、reverse プライマー : *KRT1*-polyA-NotSac (5'-CTACCGCGGCCGCCTTTTTTTTTT-3') 1.5 µl、pCMV6-XL5-*KRT1*full (50 ng/µl) 1µl、KOD-Plus[®] (Toyobo) 0.5 µl、脱イオン水 33.5 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、サーマルサイクル : 94℃ 2 分、(94℃ 20 秒 → 48℃ 30 秒 → 68℃ 3 分) × 30 サイクルで反応させ、*KRT1* 遺伝子を増幅させた。この増幅させた *KRT1* 遺伝子の 5' 末端側 (開始コドン直前) には *EcoR* I 認識配列が、3' 末端側 (ポリ A 鎖の下流) には *Not* I・*Sac*II 認識配列が挿入された。続いて、PCR 産物をカラム精製し、*EcoR* I および *Sac*II で切断後、再びカラム精製してさらにエタノール沈殿で濃縮した。

6-2-2. pEGFP-C2 vector の制限酵素処理

市販の pEGFP-C2 vector を 2 µg、*EcoR* I および *Sac* II で切断後、カラム精製し、エタノール沈殿で濃縮した。

6-2-3. *KRT1* 断片の挿入とクローニング

上記 6-2-1 と 6-2-2 で作製した *KRT1* 断片とベクター断片を連結させクローニングしてプラスミド精製し、Cytomegalovirus (CMV) プロモーターによる GFP-*KRT1* 発現ベクター：pEGFPC2*KRT1* を作製した。なお、作製したプラスミドは *KRT1* 部分をすべてシーケンシングし、目的のものかどうかを確認した。使用したプライマーは、CMV-Pro-TATA-F2 (5'-TGTACGGTGGGAGGTC-3')、GFP-3-end F (5'-AAGCGCGATCACATGGTC-3')、*KRT1*-seq1f (5'-ATAAGTGTGGCTAGAGGAGG-3')、*KRT1*-seq2f (5'-TAGAACCCATAATTTAGAGC-3')、*KRT1*-seq3f (5'-AGTACGAGGATATAGCCCAG-3')、*KRT1*-seq4f (5'-AGCAGGATGTCTGGAGAATG-3')、*KRT1*-seq5f (5'-AGTCCTCTGGTGGCAGTTCC-3') であった。

6-2-4. 変異 *KRT1* 発現ベクターの作製

KRT1 遺伝子の完全長 cDNA クローンベクター、pCMV6-XL5-*KRT1*full に変異を導入し、患者に認められた変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67)* と同じ配列を作製して GFP-変異 *KRT1* 発現ベクター：pEGFPC2*KRT1*-1758insT を作製した。

QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent Technologies) を使用し、キットに付属の 10×Buffer 2.5 µl、dNTP mix 0.5 µl、Quik Solution 1.5 µl、Quik Change Lightning Enzyme 0.25 µl、pCMV6-XL5-*KRT1*full ベクター (50 ng/µl) 0.5 µl、forward プライマー：*KRT1*mutation-F (5'-AGCAGCAGTGGGGCTTACAGAGGTGGCTCTGG-3') 1 µl、reverse プライマー：*KRT1*mutation-R (5'-CCAGAGCCACCTCTGTAAGCCCCCACTGCTGCT-3') 1 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、サーマルサイクル：95°C 2 分、(95°C 30 秒 → 60°C 20 秒 → 68°C 4 分)×18 サイクル、68°C 5 分で反応させた。この反応産物に制限酵素 *Dpn* I (Agilent technologies) を 0.5 µl 添加し、37°C 下で 1 時間反応させた。反応産物をカラム精製、エタノール沈殿により濃縮し、これを全量コンピテントセルに導入してクローニング後、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは実験方法 6-2-3 と同じ方法で配列を確認した。このようにして得られた変異 *KRT1* の配列は実験方法 6-2-1、6-2-2 と同様の方法で pEGFP-C2 ベクターに挿入し、pEGFPC2*KRT1*-1758insT を作製した。

*c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) : *KRT1* の開始コドン ATG の”A”を 1 とした時、1758 番目と 1759 番目の間に”T”が挿入される変異。これにより KRT1 タンパク質の 587 番目のアミノ酸：チロシンがロイシンに変化し、読み枠がずれて異なる読み枠 (+1 コドン) のアミノ酸が 66 個続き、ストップコドンになる)

6-2-5. 既報告 KRT1 V2 ドメイン変異配列の作製

表 7 に記載した既報告の V2 ドメイン変異 6 種類 (c.1556delG: p.Gly519GlufsTer95, c.1577delG: p.Gly526AlafsTer88, c.1609_1610delinsA: p.Gly537IlefsTer77, c.1628delG: p.Gly543ValfsTer71, c.1756_1757insG: p.Tyr587LeufsTer67, c.1860_1861insT: p.Ser618IlefsTer36) の配列を上記実験方法 6-2-3 と同様の方法で作製した (表 6)。変異導入に用いたプライマーは表 7 に示した。なお、変異導入の鋳型に用いたプラスミドは pEGFPC2KRT1 とした。

表 7. 作製した既報告 V2 ドメイン変異 KRT1 発現ベクターと使用したプライマー

遺伝子変異	アミノ酸変異	GFP 連結発現ベクター名	Forwardプライマー (5'→3')	Reverseプライマー (5'→3')
c.1556delG	p.Gly519GlufsTer95	pEGFPC2KRT1-1556delG	GGTGGCAGCCGAGAGGTGGCGGCGGT	ACCGCCGCCACCTCTCGGCTGCCACC
c.1577delG	p.Gly526AlafsTer88	pEGFPC2KRT1-1577delG	AGGTGGCGGCGGTGGCTACGCTCTGGAGGTAGCAGCTATG	CATAGCTGCTACCTCCAGAGCGTAGCCACCGCCGCCACCT
c.1609_1610delinsA	p.Gly537IlefsTer77	pEGFPC2KRT1-1609delGGinsA	GGCTCCGAGGTATAGCTATGTTCT	AGAACCATAGCTATACCTCCGGAGCC
c.1628delG	p.Gly543ValfsTer71	pEGFPC2KRT1-1628delG	TAGCTATGTTCTGGAGGTGGCGGCGGCGGCCGTGGCA	TGCCACGGCCGCCGCCGCCACCTCCAGAACCATAGCTA
c.1756_1757insG	p.Tyr587LeufsTer67	pEGFPC2KRT1-1751insG	CGGAAGCAGCAGGTGGGGGTACAG	CTGTAGCCCCACCTGCTGTTCCG
c.1758_1759insT	p.Tyr587LeufsTer67	pEGFPC2KRT1-1758insT	AGCAGCAGTGGGGGCTTACAGAGGTGGCTCTGG	CCAGAGGCCACCTCTGTAAAGCCCCACTGCTGCT
c.1860_1861insT	p.Ser618IlefsTer36	pEGFPC2KRT1-1861insT	GGATCCAGCTCTTGGGGGTGTCAAG	CTTGACACCCCCAAGAGCTGGATCC

6-3. mCherry-KRT1 発現ベクターの作製

pEGFPC2KRT1 ベクターの *GFP* を赤色蛍光タンパク質遺伝子 *mCherry* に交換して、mCherry-KRT1 を発現する pmCherry-KRT1 を作製した。方法はまず、上記方法 6-2-1 と同様に *mCherry* 遺伝子の両末端領域に制限酵素を導入して増幅した。使用したプライマーは CMV-Pro-TATA-F2 (5'-TGTACGGTGGGAGGTC-3') と YFP-del-stop-Eco-R (5'-AGGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3') であり、PCR の鋳型は pRetroQ-mCherry-C1 Vector (Takara Bio) を用いた。続いて、増幅した *mCherry* 配列を *Nhe* I と *Eco* R I で処理し、カラム精製後、エタノール沈殿で濃縮した。また、pEGFPC2KRT1 ベクターを *Nhe* I と *Eco* R I で処理し、切り出されたベクター部分 (*GFP* 配列を除いた領域) を分離・精製した。これらの DNA 断片を連結させてクローニングし、プラスミドを精製して mCherry 連結 KRT1 発現ベクター pmCherry-KRT1 (表 6) を作製した。

6-4. mCherry-KRT10 発現ベクターの作製

pmCherry-KRT1 ベクターの *KRT1* 配列を *KRT10* 配列と入れ替えて mCherry-KRT10 を発現する pmCherry-KRT10 を作製した。*KRT10* 配列は Origene 社から購入したベクター-pCMV6-XL5-KRT10full (KRT10 (untagged)-Human keratin 10 (KRT10), NM_000421.2, OriGene)から得た。方法はまず、pCMV6-XL5-KRT10full (50 ng/μl) 1 μl、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo) 25 μl、GC enhancer (Thermo) 5 μl、forward プライマー : KRT10-Eco-start-F (5′-AGCGAATTCATGTCTGTTTCGATACAGCTCAAGC-3′) 4 μl、reverse プライマー : KRT1-polyA-NotSac (5′-CTACCGCGGCCGCCCTTTTTT TTT-3′) 4 μl、脱イオン水 11 μl を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、サーマルサイクル: 95°C 10 分、(95°C 30 秒 → 60°C 30 秒 → 72°C 2 分) × 35 サイクル、72°C 7 分で反応させ、両末端に制限酵素認識配列を付加した *KRT10* 配列を増幅させ、カラム精製後、*EcoR* I と *Not* I で処理し、再びカラム精製、エタノール沈殿で濃縮した。また、pmCherry-KRT1 ベクターを *EcoR* I と *Not* I で処理し、切り出されたベクター部分 (*KRT1* 配列を除いた領域)を分離・精製した。続いてこれらの DNA 断片を連結させてクローニングし、プラスミドを精製して mCherry 連結 KRT10 発現ベクターpmCherry-KRT10 (表 6)を作製した。作製したプラスミドの KRT10 領域はすべて配列を確認した。使用したプライマーは CMV-Pro-TATA-F2 (5′-TGTACGGTGGGAGGTC-3′)、KRT10-Eco-start-F (5′-AGCGAATTCATGTCT GTTCGATACAGCTCAAGC-3′)、KRT10ex1in-F3 (5′-ACTACAAAACCATCGA TGACC-3′)、KRT10ex5.6in-F (5′-TCCCAACTGGCCTTGAAACA-3′)、KRT10ex4in-R (5′-CAGTGGACACATTTCTGAAGG-3′)、KRT1-polyA-R (5′-CCA CAACTAGAATGCAGTG-3′)であった。

6-5. mCherry-LOR 発現ベクターの作製

pmCherry-KRT10 ベクターの *KRT10* 配列を *LOR* 配列と入れ替えて mCherry-LOR を発現する pmCherry-LOR を作製した。*LOR* 配列は健常人のゲノム DNA から PCR により得た。

6-5-1. *LOR* 配列のクローニング

健常人ゲノム DNA (50 ng/μl) 1 μl、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo) 25 μl、GC enhancer (Thermo) 5 μl、forward プライマー : LOR-ex2F (5′-GCAG CTGCCTCCGTAAGTATC-3′) 4 μl、reverse プライマー : LOR-ex2R (5′-CATT CCTCCCTCTCCTGGTGA-3′) 4 μl、脱イオン水 11 μl を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、サーマルサイクル: 96°C 10 分、(96°C 30 秒 → 56°C 30 秒 → 72°C 1

分)×30 サイクル、72°C 7 分で反応させ、PCR 産物をカラム精製した。次に、精製 PCR 産物 42 µl、10×PCR Buffer for KOD-Plus[®] (Toyobo) 5 µl、25 mM MgSO₄ 2 µl、KOD-Plus[®] (Toyobo) 1 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、95°C 2 分 → 60°C 10 分で反応させ、末端を平滑化した。平滑化した増幅 *LOR* 配列をカラム精製とエタノール沈殿で濃縮した後、Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Thermo)を用いて、ベクターに連結させ、クローニング、プラスミドを精製した。なお、作製したプラスミドはシーケンシングによってすべて配列を確認した。使用したプライマーは LOR-ex2F (5′-GCAGCTGCCTCCGTAAGTATC-3′)、LOR-ex2F3 (5′-CCCAGCCGAGTTACGGAG-3′)、LOR-ex2R2 (5′-CTCCGTAACTCGGCTGGG-3′)、LOR-ex2F4 (5′-TTGGAGGTGTTTTCCAGG-3′)、LOR-ex2F5 (5′-CAGGCGGTCCAGTGCCAG-3′)であった。

6-5-2. pmCherry-LOR の作製

上記実験方法 6-4 と同様の方法で *LOR* クローンプラスミドから *LOR* 配列を増幅し、pmCherry-KRT10 ベクターの *KRT10* 領域と交換して、mCherry 連結 *LOR* 発現ベクター pmCherry-LOR (表 6)を作製した。なお、*LOR* 配列増幅にはプライマー : LOR-Eco-Start-F (5′-GCGGAATTCATGTCTTATCAGAAAAAGCAGCCCAAC-3′) および LOR-Not-end-R (5′-GGGCGGCCGCTAGCCCTCGGGTAGCATCATGAGAGCTC-3′)を用いた。シーケンシングでの配列確認は 6-5-1 と同じプライマーで実施した。

6-6. 発現ベクターの過剰発現実験検討

上記で作製した発現ベクターを HaCaT 細胞および HeLa 細胞 (北海道大学皮膚科で保持していたもの)、AD293 細胞 (Agilent technologies)で過剰発現させ、細胞内でケラチン線維を観察できるかどうか検討した。

6-6-1. 細胞培養条件

細胞培養は CO₂ インキュベーター (MCO-20AIC, Panasonic)で、37°C、5% CO₂、加湿条件下で実施した。培地は DMEM, 4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamine, No Sodium Pyruvate (Gibco)に Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich)を 10%添加したものを使用した。培養は 75 cm² ベントネックフラスコ (Tissue Culture Flask, 250 ml, Canted Neck, Blue Plug Seal Cap, Corning, #353135)を使用し、播種濃度は 0.5×10⁶ とした。細胞を播種後、コンフルエントになるまで培養し、継代を繰り返して細胞を維持した。継代は、まず培地を除き、PBS で洗浄後、1 ml の Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA・4Na, Gibco) を入れ、37°C 下で 10 分間静置した。トリプシン処理後、軽く震盪させて細胞をフラスコから剥離し、培

養培地を 10 ml 入れてトリプシンを不活性化し、室温下、 $200\times g$ で 3 分間遠心後、上清を除去して培養培地 1 ml で細胞を懸濁した。懸濁した細胞は TC10™ 全自動セルカウンター (BioRad) で細胞濃度を測定して、 0.5×10^6 個の細胞を取り、フラスコに播種した。

6-6-2. ベクターのトランスフェクション

コンフルエントになるまで培養した細胞を上記 6-6-1 のように剥離して細胞懸濁液を作製し、CELLview™ cell culture dish (Greiner Bio-One) に 2×10^5 個播種 (培地量は 2.0 ml) 後、24 時間培養した。Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Thermo) 200 μ l とプラスミド 3.0 μ g、Opti-MEM I Reduced-Serum Medium 200 μ l と Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo) 10 μ l をそれぞれ別の 1.5 ml 容チューブに入れ、タッピングで混和後、室温下で 5 分間静置した。次にこれらの溶液を混合して室温下 20 分間静置し、全量を播種後 24 時間培養した細胞に添加した。24 時間後、培地を交換してさらに 24 時間培養した。

6-6-3. 細胞の固定および免疫染色

トランスフェクション後 48 時間で培地を除去して PBS で 2 回洗浄後、氷冷した 3% パラホルムアルデヒド (PBS で希釈したもの) を 1 ml 添加し、4℃ 下で 10 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後、氷冷した 0.2% (v/v) TritonX-100 溶液 (PBS で希釈したもの) を添加して 5 分間静置した。次に PBS で 2 回洗浄し、2% (w/v) bovine serum albumin (Wako, PBS で溶解) を 1 ml 添加して湿潤条件の 37℃ 下で 15 分間ブロッキングした。続いて PBS で 1% (v/v) に希釈した核小体を染色する 1 次抗体 (Anti-Fibrillarin antibody - Nucleolar Marker, Abcam, #ab5821) を 100 μ l、細胞がすべて浸るように添加し、湿潤条件の 37℃ 下で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、PBS で 1% (v/v) に希釈した 2 次抗体 (Cy™ 5-conjugate AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L), Jackson Immuno Research, #111-175-144) を 100 μ l 添加して湿潤条件の 37℃ 下で 30 分間静置した。さらに、PBS で 3 回洗浄後、PBS で 2% に希釈した DAPI 溶液を 100 μ l 添加して室温下で 5 分間静置して核染色を実施した。最後に PBS で 2 回洗浄後、空気を当てて水分を除き、封入剤 PermaFluor を 8 滴加えてカバーガラスを載せ、氷上で保管した。

6-6-4. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察

作製したサンプルは共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, Olympus) で観察し、ケラチンによる細胞骨格が確認できるかどうか検討した。

6-7. GFP-KRT1 安定発現細胞株の作製

HaCaT 細胞に pEGFPC2KRT1 または pEGFPC2KRT1-1758insT をトランスフェクションし、geneticin で選択培養後、シングルセルクローニングし、GFP-KRT1 を安定発現する細胞株 HaCaT-KRT1-wt、HaCaT-KRT1-1758 を作製した。方法は、上記実験方法 6-6-1, 2 と同様の方法で HaCaT 細胞に pEGFPC2KRT1 ベクターをトランスフェクションした。ただし、播種したシャーレは 35 mm シャーレ (Falcon™ Easy-Grip Tissue Culture Dishes, Corning, #353001) を使用した。トランスフェクション後 48 時間培養し、培地に geneticin (G418 二硫酸塩溶液、Sigma-Aldrich) を最終濃度 0.5 µg/ml になるように加え、コンフルエントになるまで 3 日おきに培地交換をしながら培養を続けた。次に、細胞を剥離して 1 個/100 µl になるように細胞懸濁液を培地 (geneticin なし) で希釈し、96 ウェルプレート (Falcon® 96 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Culture Microplate with Lid, Corning, # 353072) に 100 µl/well で播種した。1 週間そのまま培養し、geneticin 添加済みの培地に交換し、さらに 1 週間培養した。続いて顕微鏡観察で 1 コロニーだけのウェルを複数選択し、コンフルエントになるまで培養してそれぞれ細胞株とした。最終的に、上記実験方法 6-6-3 と同じ方法で GFP 蛍光を認めた 1 細胞株を GFP-KRT1 安定発現細胞株 HaCaT-KRT1-wt、HaCaT-KRT1-1758insT とした。

6-8. KRT1 の凝集能定量実験

作製した GFP-KRT1 発現ベクター 8 種類 : pEGFPC2KRT1、pEGFPC2KRT1-1758insT、pEGFPC2KRT1-1556delG、pEGFPC2KRT1-1577delG、pEGFPC2KRT1-1609delGGinsA、pEGFPC2KRT1-1628delG、pEGFPC2KRT1-1751insG、pEGFPC2KRT1-1861insT (表 7) をそれぞれ HaCaT 細胞へトランスフェクションして、KRT1 の細胞骨格が乱れ、凝集塊が生じた細胞数を計数し、各変異体の病原性を推量した。

6-8-1. ベクターのトランスフェクションおよび観察用サンプル作製

ベクターのトランスフェクションは上記実験方法 6-6-2 と同様の方法で実施した。ただし、トランスフェクション後の培養は合計 72 時間 (24 時間後に培地交換し、その後さらに 48 時間培養) とした。トランスフェクション後 72 時間で培地を除去して PBS で 2 回洗浄後、氷冷した 3% パラホルムアルデヒド (PBS で希釈したもの) を 1 ml 添加し、4℃下で 10 分間静置した。PBS で洗浄後、氷冷した 0.2% (v/v) TritonX-100 溶液 (PBS で希釈したもの) を添加して 5 分間静置した。次に PBS で 1 回洗浄し、PBS で 2% に希釈した DAPI 溶液を 100 µl 添加して室温下で 5 分間静置し、核染色を実施した。最後に PBS で 1 回洗浄後、空気を当てて水分を除き、

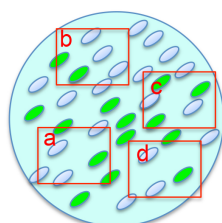
封入剤 PermaFluor を 8 滴加えてカバーグラスを載せ、氷上で保管し、24 時間以内に観察した。

6-8-2. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察および凝集細胞計数

細胞数の計数は、まずシャーレを 40 倍で観察し、1 枚につき GFP 蛍光が認められる細胞が 20 個以上存在する領域を 4 つ選んだ。次に各領域を 100 倍で観察し、GFP 蛍光が認められる細胞（極端に蛍光強度が低い細胞は除く）をチェックした。続いて 400 倍で観察してそれぞれの細胞を詳細に観察し、正常なケラチン線維を形成している細胞とケラチン線維の凝集が認められる細胞をそれぞれ計数した。このとき、蛍光強度が極端に低い細胞や核の形状が異常な細胞・死細胞、分裂期の細胞を除いた（図 8）。この実験を 1 種類のベクターにつき、最低 5 回繰り返し、統計処理（6-8-3）を実施して、各変異体 KRT1 の凝集細胞の割合を定量した。

(a)

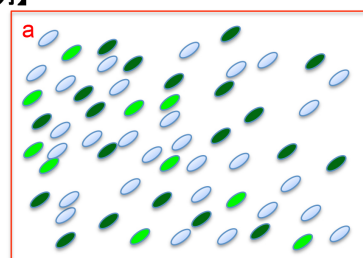
① 低倍率で観察し、GFP蛍光が認められる細胞が20個以上ある視野を探す



● GFP蛍光が認められない細胞
● GFP蛍光が認められる細胞

② それぞれの視野を高倍率にしてGFP発現細胞1つ1つを観察しケラチンの凝集があるかどうか判断し、異常細胞/GFP蛍光細胞をカウントする*

【例】



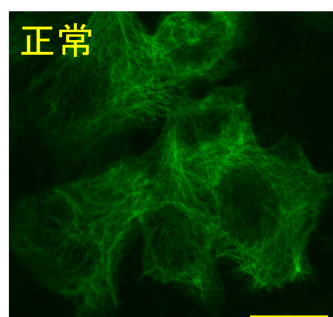
● 正常細胞: 10
● 異常細胞: 20

異常細胞割合
: $20/30 = 66.7\%$

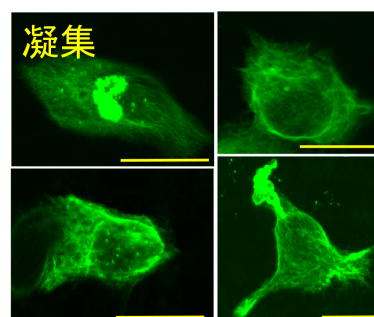
*GFP蛍光があるが
カウントしない細胞

① 蛍光強度の極端に低い細胞
② 核の形が異常な細胞(死細胞)
③ 分裂中などで染色体が出現している細胞

(b)



正常



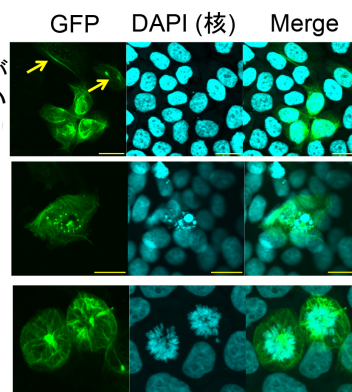
凝集

カウントから除外

蛍光強度が
極端に低い
(矢印)

死細胞

M期



Bar: 20 μ m

図 8. ケラチン凝集細胞の計数方法および細胞観察例

(a) 凝集した KRT1 を持つ細胞を計数する条件および方法の模式図

(b) 観察像の代表例

6-8-3. 統計処理

上記の方法で得られたデータは StatPlus:mac (AnalystSoft)を用いて凝集細胞の割合を Tukey-Kramer test によって比較した。

7. 患者皮膚の mRNA 定量実験

患者皮膚から調製した RNA における *KRT2* の mRNA 量を定量し、患者皮膚が正常に分化しているかどうか検討した。調製した RNA 10 ng、10 mM dNTP mix (Thermo) 1 μ l、50 μ M Random hexamer (Thermo) 1 μ l を 0.2 ml 容 PCR チューブに入れ、脱イオン水を添加して合計 14.3 μ l にした。次に 65°C 下で 5 分間反応後、氷上で 1 分間急冷し、5 $\times$ SSIV Buffer (Thermo) 4 μ l、0.1 M DTT (Thermo) 1 μ l、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (Thermo) 0.5 μ l、SuperScript™ IV RT (200 units/ μ l, Thermo) 0.2 μ l を加えて、23°C 10 分 → 55°C 15 分 → 80°C 10 分で反応させ、cDNA を合成した (逆転写)。続いて、逆転写産物 1 μ l、TaqMAN® Gene Expression Assay for KRT2 (Thermo, #Hs00907210_m1) 0.75 μ l、Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC®/MGB probe, primer limited) (Thermo, #4319413E) 0.75 μ l、TaqMAN® Gene Expression Master Mix (Thermo) 7.5 μ l、脱イオン水 5 μ l を 96 ウェルプレート (MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate, Thermo)に入れてサーマルサイクル: 50°C 2 分、95°C 10 分、(95°C 15 秒 → 60°C 1 分 → 蛍光測定)×40 サイクルで反応させ、*KRT2* の mRNA 量を *18S rRNA* 量で補正する $\Delta\Delta Ct$ 法により比較定量した。なお、サーマルサイクルおよび蛍光検出、データ解析は StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Thermo)で実施した。

8. 全ゲノム SNP アレイ実験

全ゲノム SNP アレイ実験は Affymetrix® CytoScan™ HD Array (Affymetrix) を用いてゲノム全域にわたる SNP をマイクロアレイで検出する実験である。調べる配列はコピー数を特定するための配列、すなわちヒト集団内で高度に保存されている non-polymorphic な配列を 1,953,246 カ所、さらにはヒト集団内である程度の割合で存在する SNP を含む配列を 743,301 カ所である。これにより、患者ゲノムのコピー数異常を検出することができる。コピー数異常とは染色体の全部または一部のコピー数や組成が増減することである。

用いたサンプルは患者の皮疹部位から分離した表皮より抽出したゲノム DNA (afct_epi_gDNA)、患者 revertant 部位 2 カ所からそれぞれ分離した表皮より抽出したゲノム DNA (Rev1_epi_gDNA, Rev2_epi_gDNA)の合計 3 サンプルであった。

8-1. サンプルの品質確認

患者組織の表皮から抽出したゲノム DNA をアガロースゲルにより電気泳動し、品質を確認した。泳動量は1検体当たり 400 ng とした。電気泳動の結果、一本の明瞭なバンドが認められる分解のないゲノム DNA サンプルであることを確認した(図 9)。

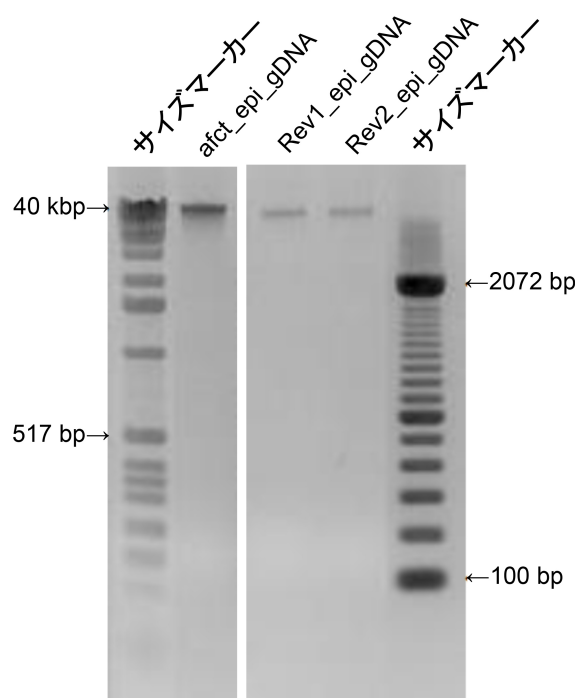


図 9. サンプルの品質確認結果

afct_epi_gDNA, 皮疹部位から分離した表皮より抽出したゲノム DNA;

Rev1_epi_gDNA, 正常化皮膚スポット#1 から分離した表皮より抽出したゲノム DNA;

Rev2_epi_gDNA, 正常化皮膚スポット#2 から分離した表皮より抽出したゲノム DNA

8-2. ゲノム DNA の濃縮

以降の実験では DNA 濃度が 50 ng/μl 以上が必要であるため、それに満たない場合はゲノム DNA 溶液を濃縮した。方法は DNA 600 ng を取り、微量濃縮遠心機を用いて容量が 10 μl になるまで減圧下で遠心した。

8-3. GeneChip 解析

Affymetrix® CytoScan™ HD Array Kit and Reagent Kit Bundle (Affymetrix) を使用して SNP 検出のためのマイクロアレイ (GeneChip) 解析を実施した。

8-3-1. ゲノム DNA 切断および増幅

8-3-1-1. *Nsp* I によるゲノム DNA 断片化

キットに付属の制限酵素 *Nsp* I で 250 ng のゲノム DNA を処理した。条件は 37°C 2 時間 → 65°C 20 分 であった。

8-3-1-2. ライゲーション

キットに付属した *Nsp* I の付着末端をもつアダプター (50 µM Adaptor *Nsp* I) と T4 DNA Ligase を用いて断片化したゲノム DNA の付着末端にアダプターを連結させた。なお、反応条件は 16°C 3 時間 → 70°C 20 分 であった。

8-3-1-3. PCR による断片化ゲノム DNA の増幅

上記ライゲーション産物に脱イオン水を加えて合計 100 µl に調製した。PCR は TITANUM[®] DNA Amplification Kit (Takara Bio) を使用した。脱イオン水 39.5 µl、10×TITANUM[™] Taq PCR Buffer 10 µl、GC-Melt Reagent 20 µl、dNTP Mixture (2.5 mM each) 14 µl、PCR Primer 002 4.5 µl、50×TITANUM[™] Taq DNA Polymerase 2 µl、希釈済みのライゲーション産物 10 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに入れ、サーマルサイクル：94°C 3 分、(94°C 30 秒 → 60°C 45 秒 → 68°C 15 秒)×30 サイクル、68°C 7 分で反応させた。なお、PCR による DNA の増幅は 1 検体につき、4 チューブ分 (合計 400 µl) 作製した。

8-3-2. DNA 精製

PCR 産物をひとつにまとめ、キットに付属の磁性ビーズ・洗浄用 Buffer (Purification Wash Buffer) と MagnaRack[™] (Thermo) を用いて DNA を精製した。なお、最終的な DNA の溶出は 52 µl の Elution Buffer を用いて実施し、47 µl を回収した。回収した DNA は脱イオン水で 10 倍希釈後、NanoDrop[™] 2000c Spectrophotometer (Thermo) を用いて濃度を測定した。

8-3-3. DNA 断片化およびビオチン標識

キットに付属の 10×Fragmentation Buffer 5.5 µl、脱イオン水 4.25 µl、Fragmentation Reagent 0.25 µl、精製 PCR 産物 45 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに入れ、37°C 35 分 → 95°C 15 分 反応させて PCR 産物を断片化した。続いてキットに付属の 5×TdT Buffer 14 µl、30 mM DNA Labeling Reagent 2 µl、TdT 3.5 µl、断片化した PCR 産物 51 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに入れ、37°C 4 時間 → 95°C 15 分 反応させて DNA の末端をビオチン標識した。

8-3-4. ハイブリダイゼーション

アレイチップは Affymetrix[®] CytoScan[™] HD Array (Affymetrix)を用い、ハイブリダイゼーションには GeneChip[®] Hybridization Oven 645 (Affymetrix)を使用した。キットに付属の Hyb Buffer Part 1 165 µl、Hyb Buffer Part 2 15 µl、Hyb Buffer Part 3 7 µl、Hyb Buffer Part 4 1 µl、Oligo Control Reagent 0100 2 µl をよく混合し、上記のビオチン標識したサンプルに加え、さらによく混合して 95°C 10 分 → 49°C 保持で反応させた。このサンプルをアレイチップに入れてシールをした後、“CytoScanHD_Array”の条件で 50°C 下、60rpm で 16 時間ハイブリダイゼーションした。

8-3-5. 洗浄および染色

ハイブリダイゼーションの後、アレイチップを GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix)を用いてプログラム“CytoScanHD_Array_450”により Wash A buffer、Wash B buffer で洗浄、Stain Buffer 1 と Stain Buffer 2 で染色、Affymetrix[®] GeneChip[®] Array Holding Buffer で固定した。

8-3-6. スキャン

アレイ内のプローブにハイブリダイゼーションした DNA の蛍光シグナルを、GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix)を用いて測定した。解析ソフトウェアは GeneChip[®] Command Console[®] (Affymetrix)を用いた。

8-4. データ解析

取得したデータ解析には Chromosome Analysis Suite (Affymetrix)を使用し、コピー数変異および LOH の検出をおこなった。コピー数変異は、ソフトウェアの Segment 設定「Standard (50 marker、400 kbp)」を選択し、50 マーカー以上含まれ、400 kbp 以上のサイズの領域を変異箇所 (Segment) として検出した。その結果として得られた各 Segment の染色体上での位置を表す Karyoview、各 Segment の詳細情報を一覧にした Segment データ、および癌関連遺伝子のデータセット (CytoRegion) である「Cancer genes」との共通領域を抽出した CytoRegion データを出力した。LOH は、Segment 設定「LOH (50 marker、3000 kbp)」を選択し、50 マーカー以上含まれ 3000 kbp 以上のサイズの領域を Segment として検出した。その結果得られた Karyoview データ、Segment データ、CytoRegion データを同様に出力した。

実験結果

1. *KRT1* の V2 ドメインに新規のフレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) をヘテロ接合性に有する患者を見出した

2008 年、北海道大学病院の皮膚科外来に、生下時より全身のドライスキンがあり、近医皮膚科で加療されていた魚鱗癬患者 (56 歳、日本人女性、既往歴は特になし) が当科での精査を希望して来院した。症状は全身がドライスキンで、腹部および四肢は鱗屑を伴う潮紅、掌蹠では強い過角化を認めた (図 10a)。問診上、両親は不明であるが、兄、姉、妹には症状がなく、長男に同様の症状が認められることから、常染色体優性遺伝性の魚鱗癬であることがわかった (図 10b)。下肢の鱗屑を伴う潮紅した皮疹部位から皮膚を採取し、皮膚の断面を HE 染色で観察すると、不全角化を伴う表皮の肥厚とケラトヒアリン顆粒の減少が認められた (図 11)。また、有棘細胞および顆粒細胞において細胞核周囲へ赤色に染まる細胞質成分の異常な局在が認められ、細胞骨格成分の異常が考えられた (図 11)。さらに、有棘細胞や顆粒細胞において空胞化した細胞や二核化細胞も認められた (図 11)。しかしながら、表皮上層の有棘細胞で細胞が脆弱になる EI に特徴的な顆粒変性 (図 4)²⁷ は認められなかった。電子顕微鏡で観察すると、有棘細胞や顆粒細胞でのケラチン線維の凝集は認められなかったが、角層細胞内に異常なケラチンの凝集 (図 12、黄色矢印) が観察され、角層形成不全により角層細胞内のケラチン線維が正常に配列していないことが考えられた。また、光学顕微鏡観察と同様に顆粒細胞において細胞質内に空胞 (図 12、ブロック矢印) が認められた。さらに、顆粒細胞において細胞核周囲の電子密度が低くなり、その周囲をケラチン線維が囲む環状殻 (peripheral shells)^{31, 40} が認められた (図 12、三角形)。以上の観察結果から、EI や IHCM の可能性が考えられ、その原因遺伝子である *KRT1* と *KRT10* の配列を調べた。その結果、この患者は *KRT1* においてデータベースに記載のない新規フレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) をヘテロ接合性で有していることがわかった (図 13)。この変異により *KRT1* C 末端側の 587 番目のチロシン残基がロイシンに変化し、異なる読み枠のペプチドが 66 残基付加することが明らかとなった (図 14)。本来 *KRT1* の C 末端側配列はグリシンに富んだ配列で疎水性が高いが、この場合、アルギニン残基に富み、極性が大きく異なることが予想された (図 14)。また、ケラトヒアリン顆粒が減少していることから、*FLG* に機能喪失変異があることも考えられたため、日本人で報告のある *FLG* 機能喪失変異 10 個⁵¹ を調べ、c.8666_8667delinsGA (p.Ser2889Ter) をヘテロ接合性で有していることを明らかにした (図 13)。

以上により、この時点で本患者は新規フレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) による IHCM であると診断された。なお、本患者は *FLG* の機能喪失変異も有しているため、ケラトヒアリン顆粒の減少のような組織学的な変化だけではなく、臨床像に関しても修飾を受けていると考えられた⁵²。

(a)



(b)

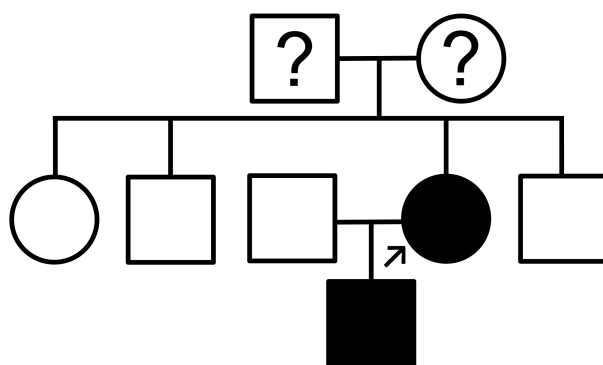


図 10. 初診時の患者の臨床像および家系図

(a) 本患者の臨床像。掌蹠の激しい過角化、腹部はやや軽症の潮紅と過角化、下肢はやや激しい潮紅と鱗屑を伴う過角化が認められる。

(b) 本患者の家系図。矢印は本患者を示す。長男に同じ症状が認められ、常染色体優性遺伝していると考えられる。

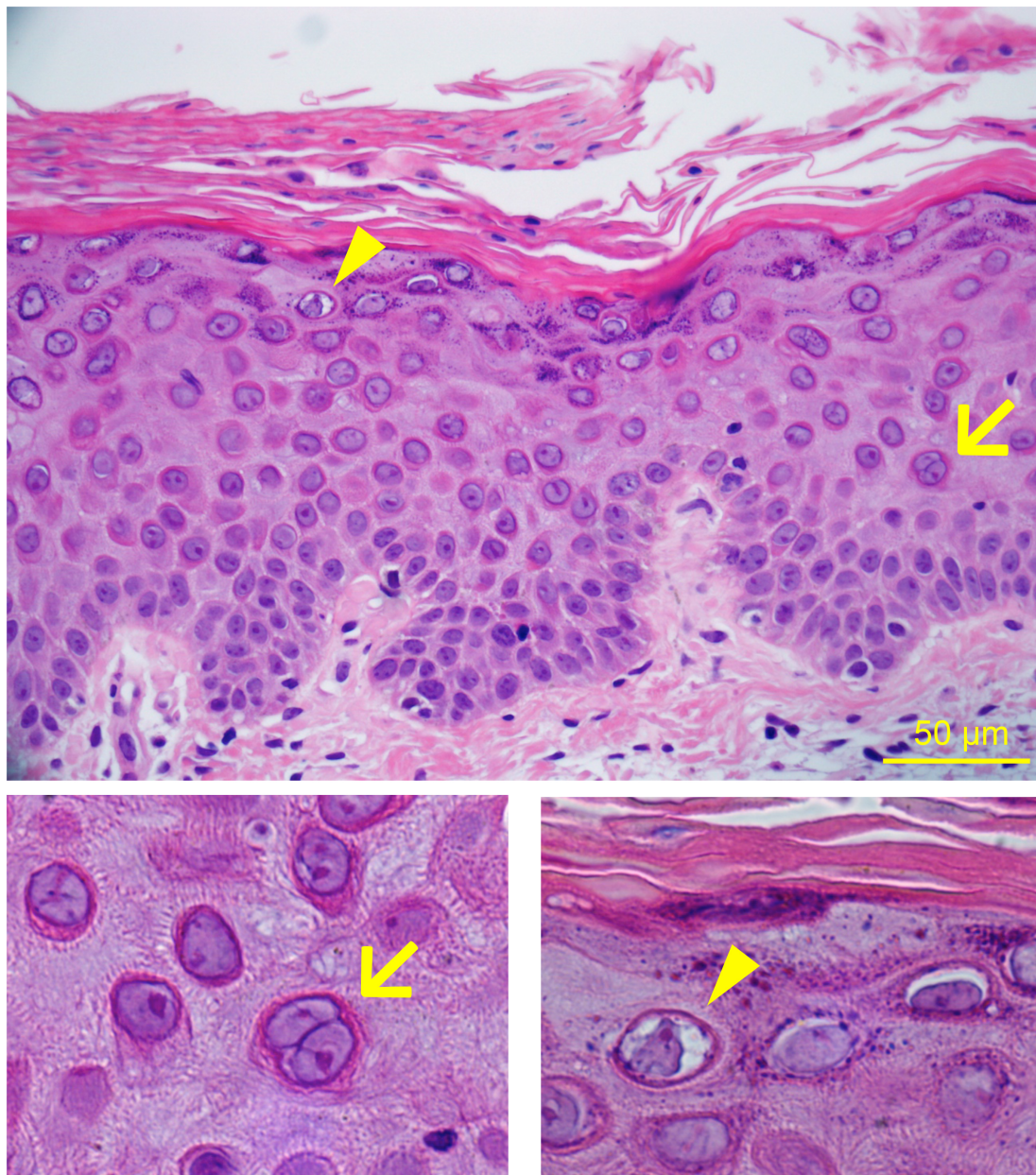


図 11. 患者皮疹部位の皮膚断面 HE 染色光学顕微鏡観察像

表皮は肥厚し、不全角化、ケラトヒアリン顆粒の減少、顆粒細胞および有棘細胞において細胞質成分の細胞核周囲への異常な局在が認められる。矢印は二核化細胞、三角形は空胞化細胞をそれぞれ示し、下にその拡大像を示す。

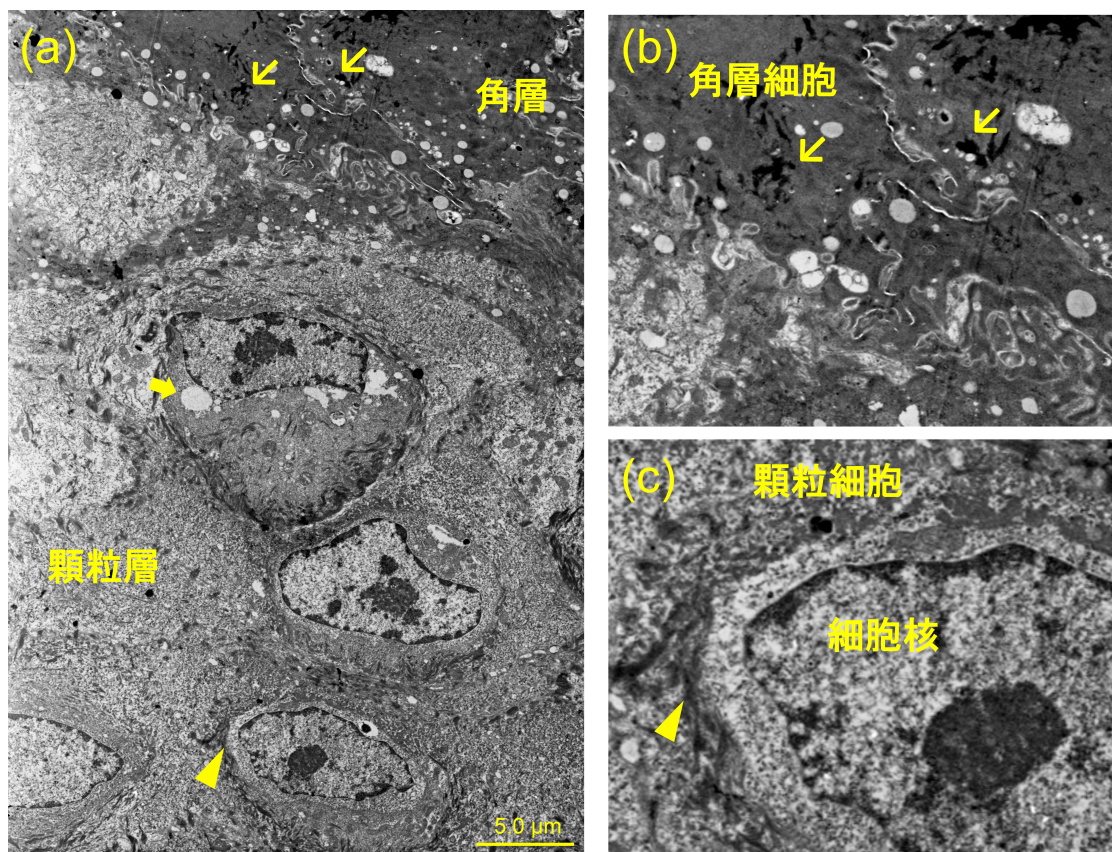


図 12. 患者皮疹部位の皮膚断面電子顕微鏡観察像

(a) 顆粒層と角層の境界付近の弱拡大像。矢印は角層細胞内に残存する異常なケラチン線維、ブロック矢印は顆粒細胞内の空胞、三角形は顆粒細胞の環状殻をそれぞれ示す。

(b) 角層細胞のケラチン線維の凝集を示す強拡大像。

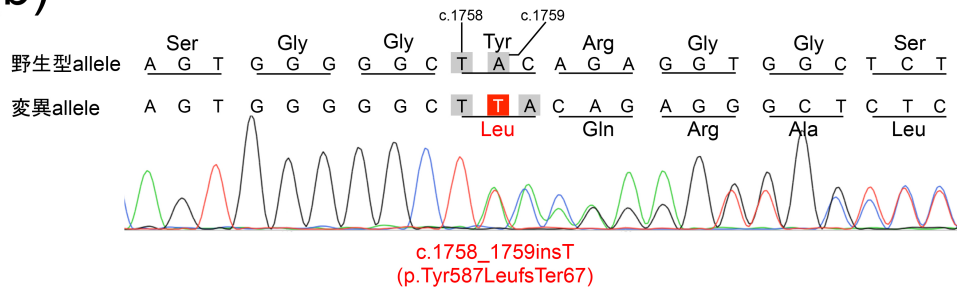
(c) 顆粒細胞における細胞核周囲の電子密度が低い領域と環状核を示す強拡大像。

(a)

KRT1



(b)



(c)

FLG



(d)

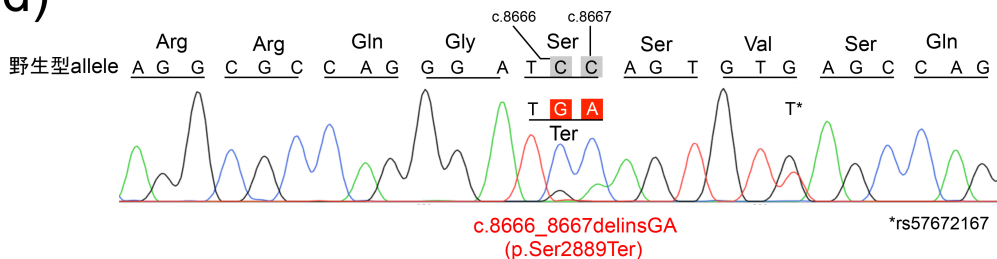


図 13. 患者に認められた *KRT1* 遺伝子変異および *FLG* 遺伝子変異

(a) *KRT1* タンパク質の一次構造の模式図と認められた変異の大まかな位置 (ブロック矢印) (文献 7 より作成)。

(b) *KRT1* 変異 c.1758_1759insT 近傍のシーケンス結果。各ヌクレオチドのシグナルを波形で示している。片方の allele (変異 allele) では c.1758 と c.1759 の間に T が挿入されているが、もう片方の allele (野生型 allele) は正常配列である。

(c) *FLG* タンパク質の一次構造の模式図と認められた変異の大まかな位置 (ブロック矢印) (文献 53 より作成)。数字は *FLG* の繰り返し配列の単位 (リピート) を示している。

(d) *FLG* 変異 c.8666_8667delinsGA 近傍のシーケンス結果。c.8666「C」と c.8667「C」が欠損して「GA」に置き換わっている。これにより片方の allele における 2889 番目のセリン残基 (Ser) は終止コドン (Ter) を指定する。*はヒト集団内に高頻度で保存されている SNP (rs57672167) である。

Wild-type	1	MSRQFSSRSGYRSGGGFSSGSAGI INYQRRTTSSSTRRSGGGGGRFSSCGGGGGSFGAGG	60
Mutant		MSRQFSSRSGYRSGGGFSSGSAGI INYQRRTTSSSTRRSGGGGGRFSSCGGGGGSFGAGG	
Wild-type	61	GFGSRSLVNLGGSKSISISVARGGGRGSGFGGGYGGGGFGGGGFGGGGFGGGGI GGGGFG	120
Mutant		GFGSRSLVNLGGSKSISISVARGGGRGSGFGGGYGGGGFGGGGFGGGGFGGGGI GGGGFG	
Wild-type	121	GFGSGGGGFGGGGFGGGGYGGGYGPPVCGGIGQEV TINQSLLQPLNVEIDPEIQKVKRSRE	180
Mutant		GFGSGGGGFGGGGFGGGGYGGGYGPPVCGGIGQEV TINQSLLQPLNVEIDPEIQKVKRSRE	
Wild-type	181	REQIKSLNNQFASFIDKVRFLEQQNQVLQTKWELLQQVDTSTRTHNLEPYFESFINNLR	240
Mutant		REQIKSLNNQFASFIDKVRFLEQQNQVLQTKWELLQQVDTSTRTHNLEPYFESFINNLR	
Wild-type	241	RVDQLKSDQSRLDSELKNMQDMVEDYRNKYEDEINKRTNAENEFVTIKKDVDGAYMTKVD	300
Mutant		RVDQLKSDQSRLDSELKNMQDMVEDYRNKYEDEINKRTNAENEFVTIKKDVDGAYMTKVD	
Wild-type	301	LQAKLDNLQQEIDFLTALYQAELSQQMTQISETNVILSMDNNRSLDLDSIIAEVKAQYED	360
Mutant		LQAKLDNLQQEIDFLTALYQAELSQQMTQISETNVILSMDNNRSLDLDSIIAEVKAQYED	
Wild-type	361	IAQKSKAEAESLYQSKYEELQITAGRHGDSVRNSKIEISELNRVIQRLRSEIDNVKKQIS	420
Mutant		IAQKSKAEAESLYQSKYEELQITAGRHGDSVRNSKIEISELNRVIQRLRSEIDNVKKQIS	
Wild-type	421	NLQQSISDAEQRGENALKDAKNKLNDELDALQQAKEDLARLLRDYQELMNTKLALDLEIA	480
Mutant		NLQQSISDAEQRGENALKDAKNKLNDELDALQQAKEDLARLLRDYQELMNTKLALDLEIA	
Wild-type	481	TYRTLLEGEESRMSGECAPNVSVSVSTSHTTISGGGSRGGGGGGYGGSSSYGSGGGSYG	540
Mutant		TYRTLLEGEESRMSGECAPNVSVSVSTSHTTISGGGSRGGGGGGYGGSSSYGSGGGSYG	
Wild-type	541	SGGGGGGGGRGSYSGGGSSYSGGGSSYSGGGGGGGHGSYSGSSSSGGYRGGSGGGGGGSSG	600
Mutant		SGGGGGGGGRGSYSGGGSSYSGGGSSYSGGGGGGGHGSYSGSSSSGGLQRWLWRRRRRQLW	
Wild-type	601	GRGSGGGSSGGSIGGRGSSSGVKSSGGSSSVRFVSTTYSVTR	644
Mutant		RPGLWRRELWRLHRRPGIQLWGCQVLWWQFQREVCFYHLFRSNQIKRCPLFH	

図 14. 患者に認められた変異がコードする KRT1 アミノ酸配列

Wild-type, 野生型の KRT1 アミノ酸配列; Mutant, 患者がヘテロ接合性で有している KRT1 のアミノ酸配列。フレームシフトによって新たに生じるペプチドを赤色で示す。587 番目のチロシン (Y) がロイシン (L) になり、66 残基の異なるフレームのペプチドが続く。

2. 本患者には多数の正常化した皮膚領域が多発する

初診時から7年後の2015年に本患者の孫娘も同症状があるとのことで再診した際、臨床像を再度詳しく観察したところ、膝窩を中心に大腿や下腿、前腕にかけて直径1 mmから最大15 mm程度の白いスポット状の皮膚領域が多数(全身で1000個以上)確認された(図15-17)。2008年の初診時の臨床像と比較すると、スポットの数や大きさが7年間で顕著に増加していることがわかった(図16)。問診上、これらの白いスポットは30歳頃から気付きはじめたとのことであった。

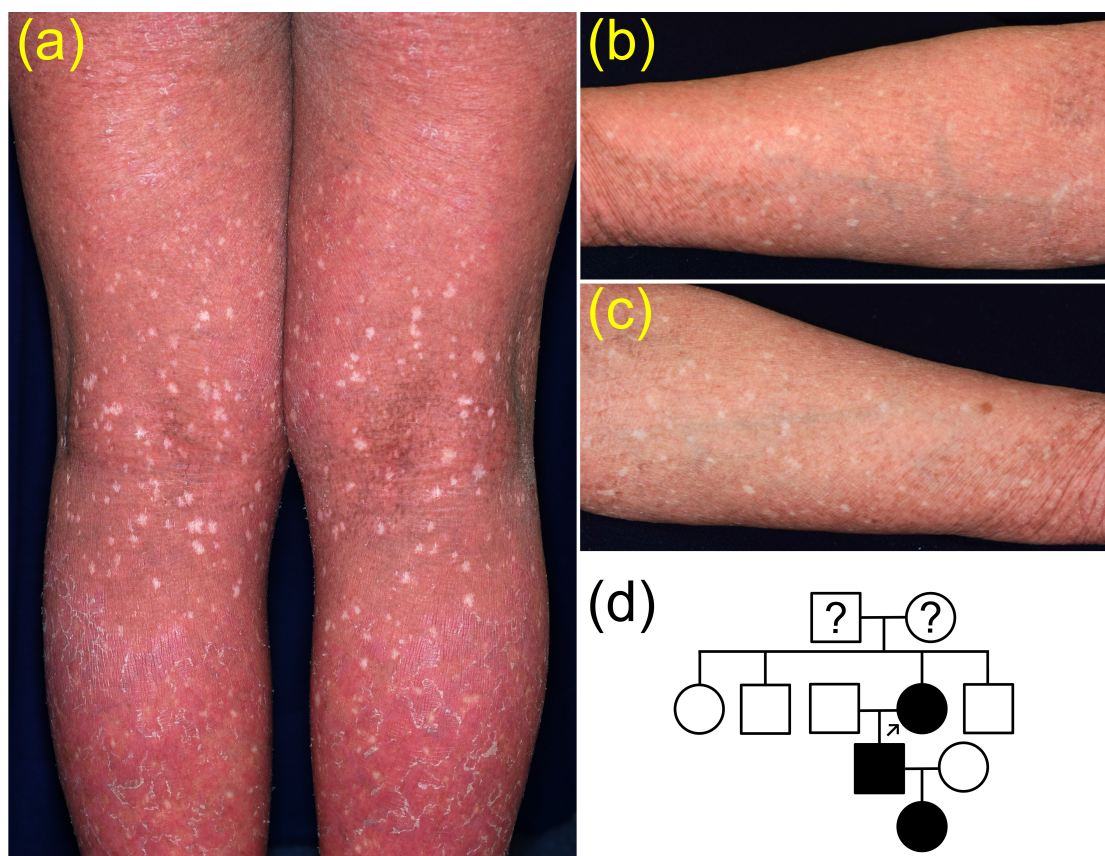


図15. 2015年再診時の臨床像と家系図

- (a) 下肢屈側の臨床像。鱗屑を伴い潮紅した皮膚に白いスポット状の皮膚領域が点在している。
- (b, c) 前腕の臨床像。やや潮紅した皮膚に白いスポット状の皮膚領域が点在している。
- (d) 2015年時点での家系図。患者の息子、孫娘に症状が遺伝しており、常染色体優性遺伝形式をとる。

(a) 2008年 (56歳) (b) 2015年 (64歳)

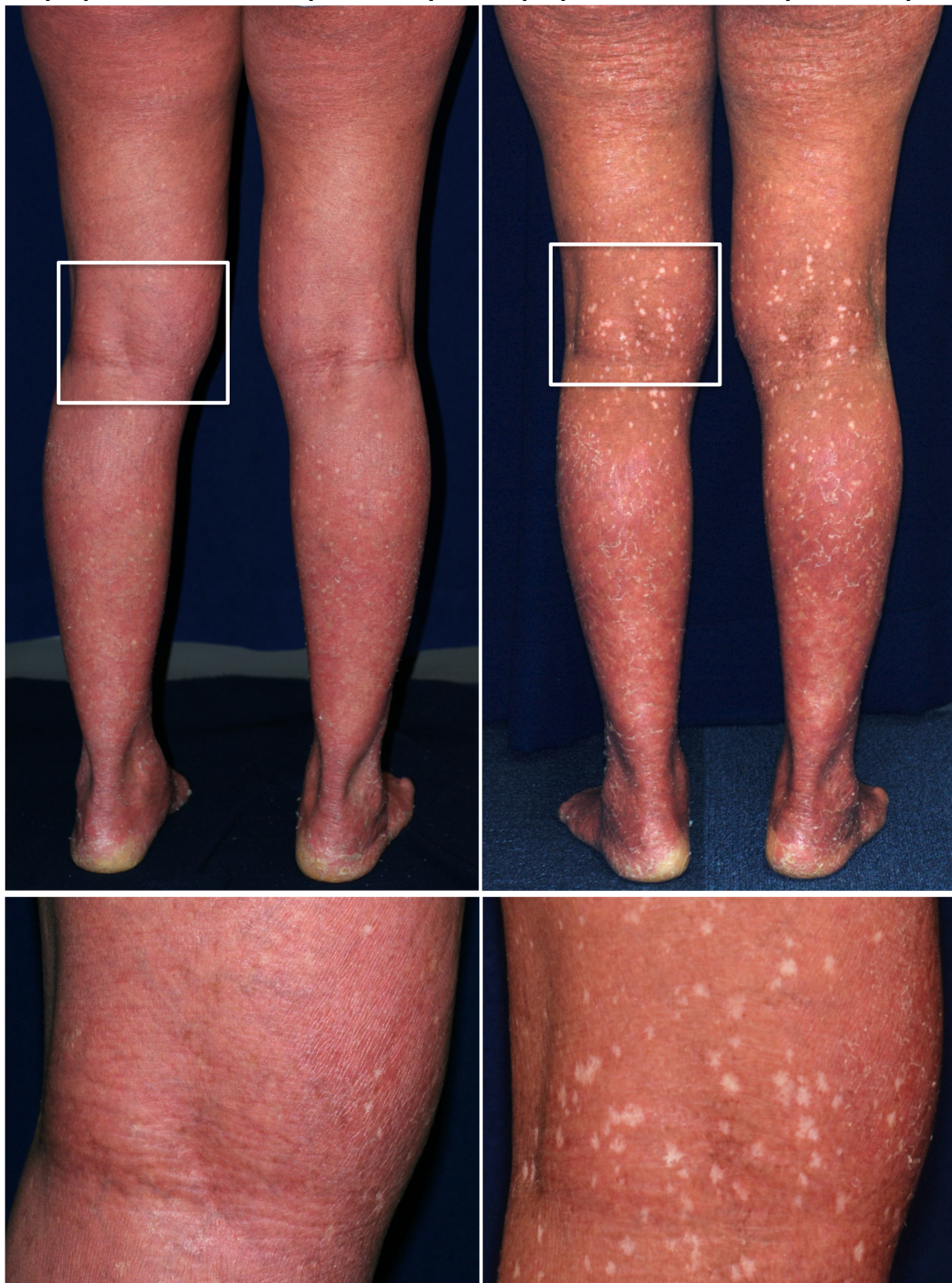


図 16. 2008 年と 2015 年の臨床像比較 (次ページへ続く)

白い枠内の拡大像を下部に示す。

(a) 2008 年の臨床像。

(b) 2015 年の臨床像。2008 年と比較すると顕著に白い皮膚領域が増加している。

(c) 2008年 (56歳)



(d) 2015年 (64歳)



図 16 (続き). 2008 年と 2015 年の臨床像比較

黄色い三角形および点線の円は同じ白い皮膚領域を示す。

(c) 2008 年の臨床像。

(d) 2015 年の臨床像。2008 年と比してこの領域の近傍で白色のスポットが増加していることがわかる。

そこで、白いスポット 3 カ所と皮疹部位 1 カ所 (図 17) を採取し、皮膚断面を HE 染色、KRT1、KRT10、KRT2 の免疫染色により組織学解析を実施した。その結果、皮疹部位ではコンパクトな角層、不全角化、顆粒層非薄化、細胞質成分の核周囲への凝集が認められ (HE 染色)、KRT1 が核周囲へ局在し、ケラチノサイトの最終分化マーカーである KRT2 がほとんど染色されなかった (図 18, 19)。一方、白いスポットではそれらが完全に健常人と同じパターンになっていた (図 18, 19)。なお、この傾向は mRNA レベルでも同様に、皮疹部位で著明に低下していたケラチノサイトの最終分化マーカーである *KRT2* の mRNA 蓄積量が白いスポットでは回復していた (図 20)。以上のことから、患者で認められた白いスポット領域の皮膚は組織学的に正常化していると結論できた。

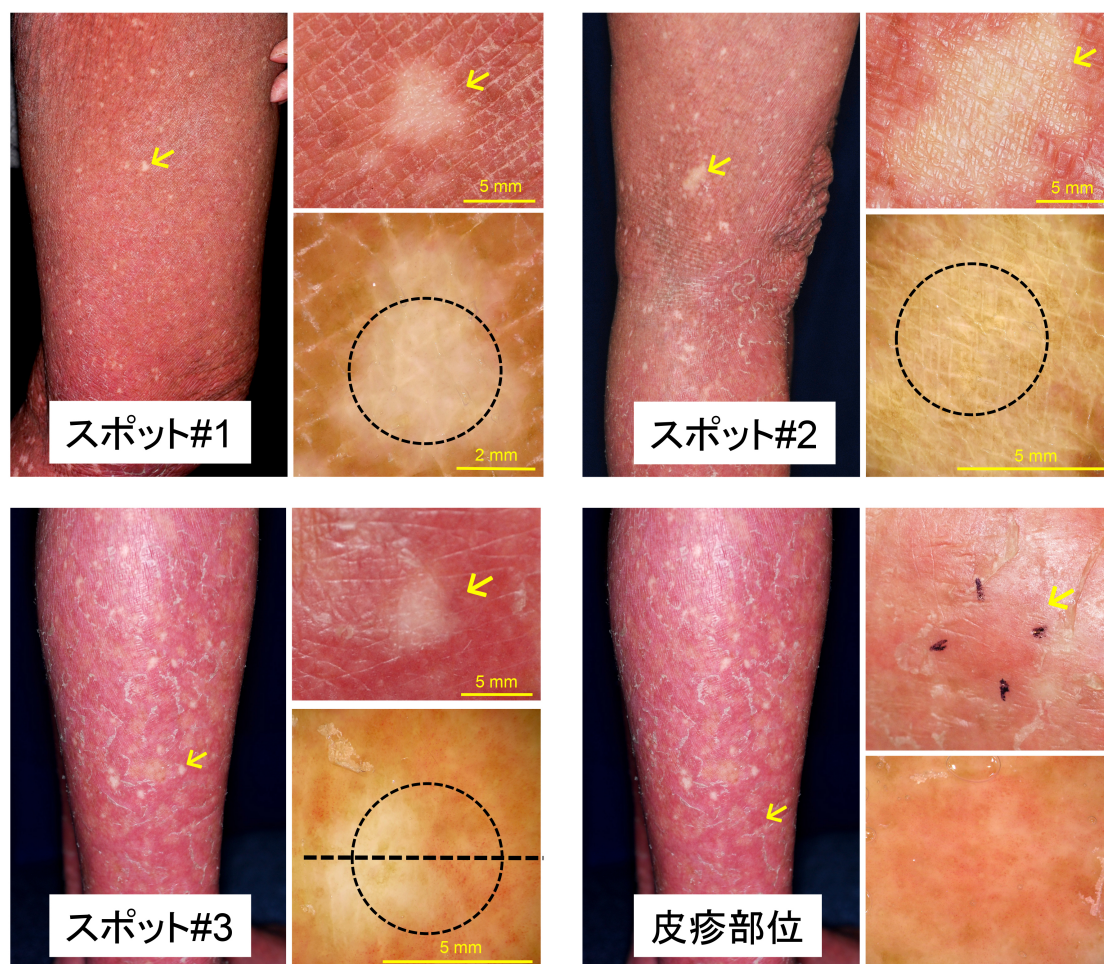


図 17. 採取部位

スポット#1、スポット#2、スポット#3、皮疹部位それぞれの生検部位の拡大写真とダーモスコピー*像。点線の円は生検した範囲、棒点線はスポット#3 の組織学解析の際の切片方向である。なお、スポット#3 のみ皮疹部位と正常化部位の境界部を採取した。

*ダーモスコピー像:ダーモスコプと呼ばれる白色発光ダイオード光と偏光フィルターが付属し、10-30 倍程度の倍率で観察できる拡大レンズを用いて観察した像である。皮膚には超音波検査用のゼリーを塗布し、拡大レンズと皮膚との間を埋め、反射光のない状態にして観察することができる。

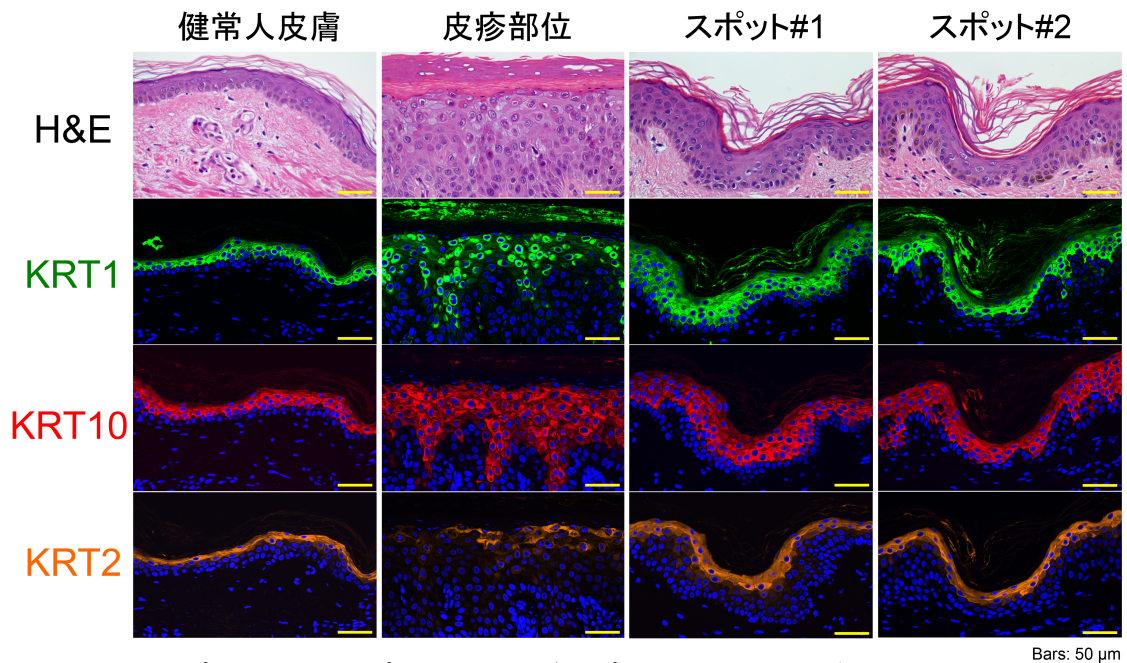


図 18. 白いスポット領域 (スポット#1 およびスポット#2)の組織学像

KRT1を緑色、KRT10を赤色、KRT2を橙色で示す。スポット#1 およびスポット#2 では皮疹部位とは異なり、ほぼ完全に健常人皮膚と同様のパターンを示す。

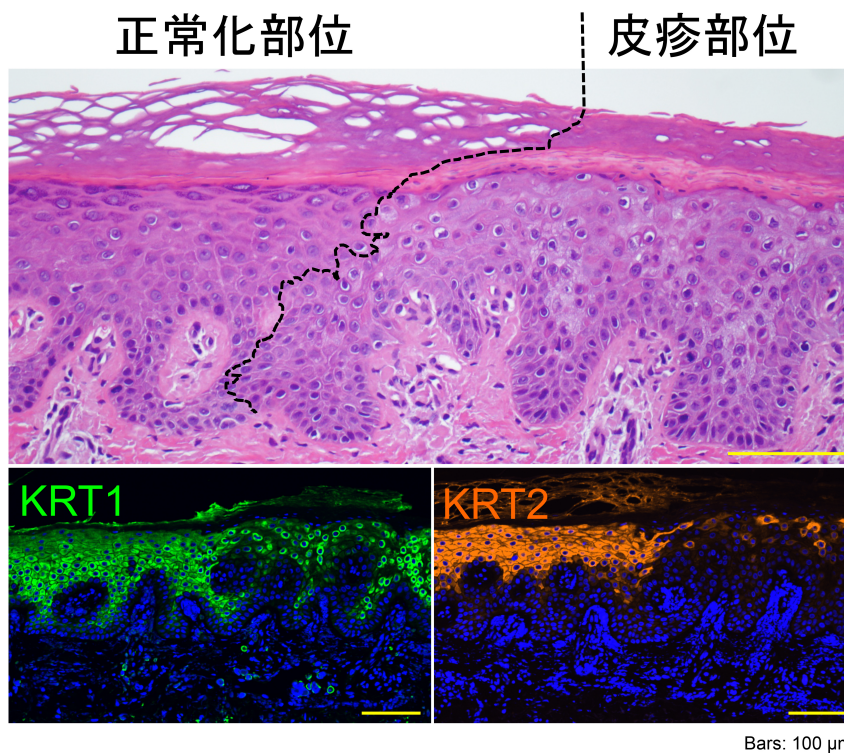


図 19. 白いスポット領域 (スポット#3)の組織学像

KRT1を緑色、KRT2を橙色で示す。正常化部位と皮疹部位の境界が HE 染色、KRT1・KRT2 染色において明瞭に区別できる。

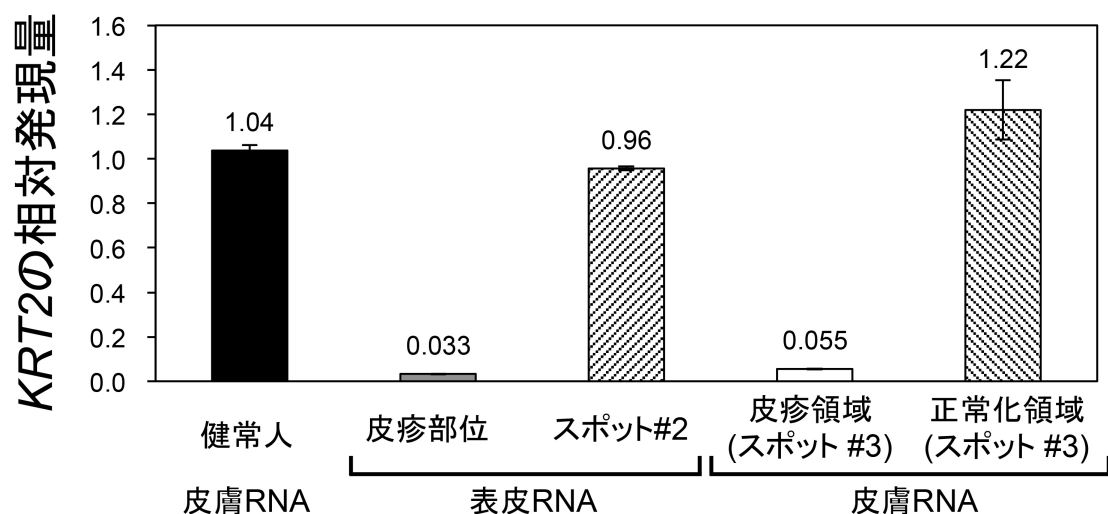


図 20. 患者皮膚組織の *KRT2* mRNA の定量結果

皮疹部位では分化マーカーである *KRT2* がほとんど発現しておらず、正常化皮膚スポット#2、#3 では健常人と同等レベルまで回復している。

3. 白いスポット状の皮膚領域は遺伝子が正常化した **revertant** である

次に、正常化皮膚領域の遺伝子型を調べるために、採取した皮疹部位 1 カ所、正常化皮膚領域 2 カ所 (図 17) の表皮と真皮を分離した上で、それぞれからゲノム DNA を抽出し、*KRT1* の病原遺伝子変異の有無を調べた。その結果、スポット#1 と#2 の表皮のみで遺伝子型が野生型ホモ、すなわち変異の **allele** の消失が確認された (図 21)。したがって、患者に多数認められた正常化皮膚領域はケラチノサイトのゲノム DNA が変化して病原変異が消失した **revertant** であることが証明された。*KRT1* の V2 ドメインのフレームシフト変異で **revertant mosaicism** を伴う場合、Choate ら⁴⁴ は IWC-II (または IWC-K1) と診断しているので、以上の事実から IWC-II と最終診断した。

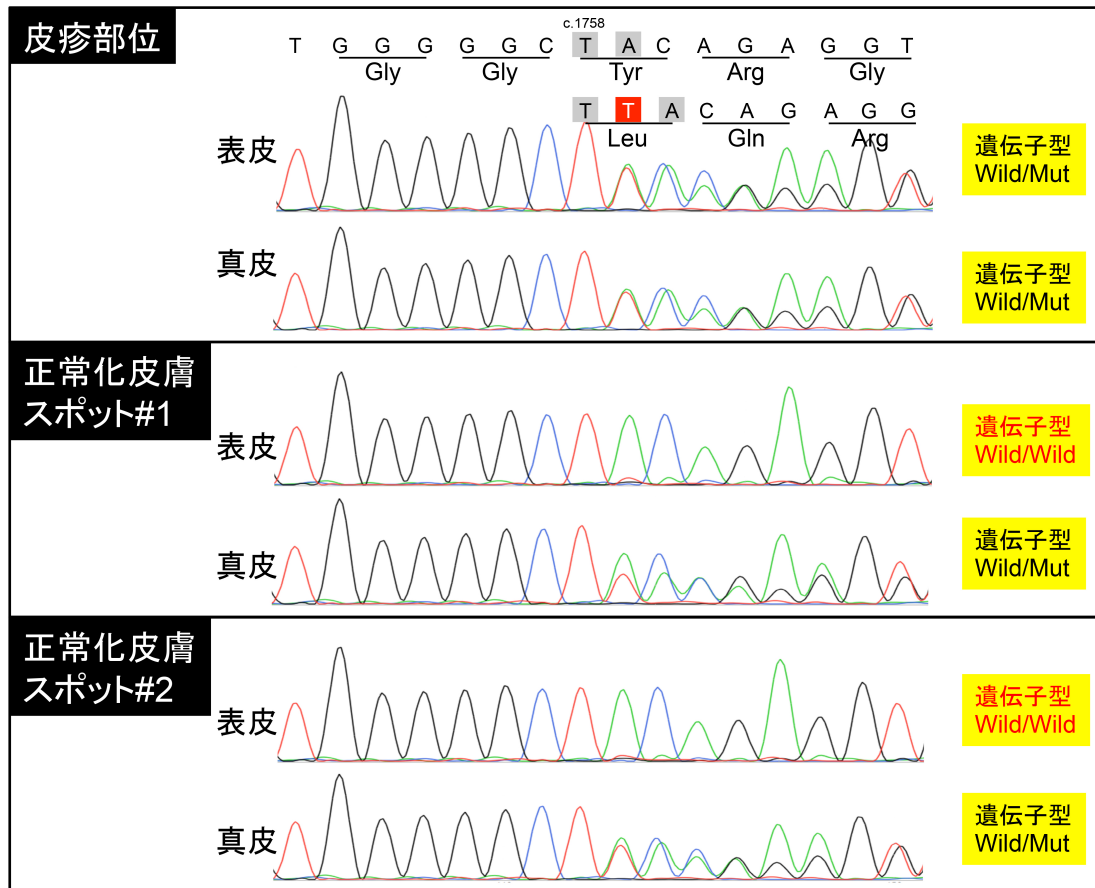


図 21. 皮疹部位および正常化皮膚スポットにおける表皮または真皮の *KRT1* 遺伝子型 Wild, 野生型; Mut, 変異

4. 患者の revertant スポットにおける表皮では 12 番染色体の *KRT1* 領域を含む LOH が認められる

図 21 に示すとおり、本患者の正常化皮膚スポット#1 と#2 の表皮のゲノム DNA からは変異の allele が検出されなかった。この原因を調べるためにゲノム上の広範囲にわたる SNP を調べ、変異の消失が染色体レベルの変化によるものなのか、*KRT1* 領域周辺のみの変化なのか (相同組換えによる変化かどうか)、または変異のみの変化なのか (復帰突然変異・第二点突然変異なのか)、明らかにした。Affymetrix[®] CytoScan[™] HD Array (Affymetrix)を用いて、皮疹部位およびスポット#1、スポット#2 (図 17, 21)の表皮から抽出したゲノム DNA の SNP を 260 万ヶ所以上調べた。その結果、スポット#1 と#2 の両方で、12 番染色体においてコピー数変化のない大規模な LOH が検出された (図 22)。なお、12 番染色体以外の領域については皮疹部位と正常化皮膚スポット部位の遺伝子型に大きな違いは検出されなかった (図 23)。コピー数の異常がなかったため、変異がある *KRT1* 遺伝子が座乗する領域や染色体の欠損が原因である可能性は否定された。さらに、そのコピー数変化のな

い LOH は *KRT1* のセントロメア側に break point があり、それがテロメアまで続いている(図 22)。この結果は、break point の位置よりもテロメア側がすべて一種類の配列になっていること、すなわち break point で片方の相同染色体の配列と組換えが起こり、テロメア側の配列がすべて置き換わり、元の配列を失ったことを示す。よって、この変化は体細胞であるケラチノサイトまたはその幹細胞における相同組換え (single recombination または gene conversion) の結果、生じたことが明らかとなった。ここで、確認された染色体の LOH 領域における break point 近傍に存在する SNP の遺伝子型を表 8 (スポット#1) および表 9 (スポット#2) に詳しく示す。表 8 から、皮疹部位の表皮と正常化皮膚の表皮で遺伝子型が異なるところが break point であるので、chr12: 52,423,996 - 52,521,715 がスポット#1 の break point が存在する領域である。この領域は 12 番染色体のタイプ II ケラチンのクラスターよりもセントロメア側である。同様にスポット#2 の break point が存在する領域は表 9 から chr12: 53,040,411-53,124,962 と推測できる。さらに図 21 から *KRT1* c.1758_1759insT (chr12: 53,069,153 と chr12: 53,069,154 の間に A (センス鎖では T) が挿入される変異) が野生型ホモになっていることから、スポット#2 の break point の領域は chr12: 53,040,411-53,069,154 であると結論できる。以上から、本実験によりスポット#1 およびスポット#2 の 12 番染色体に認められた LOH の break point はいずれも *KRT1* 領域またはそれよりもセントロメア側にあることが明らかとなった。

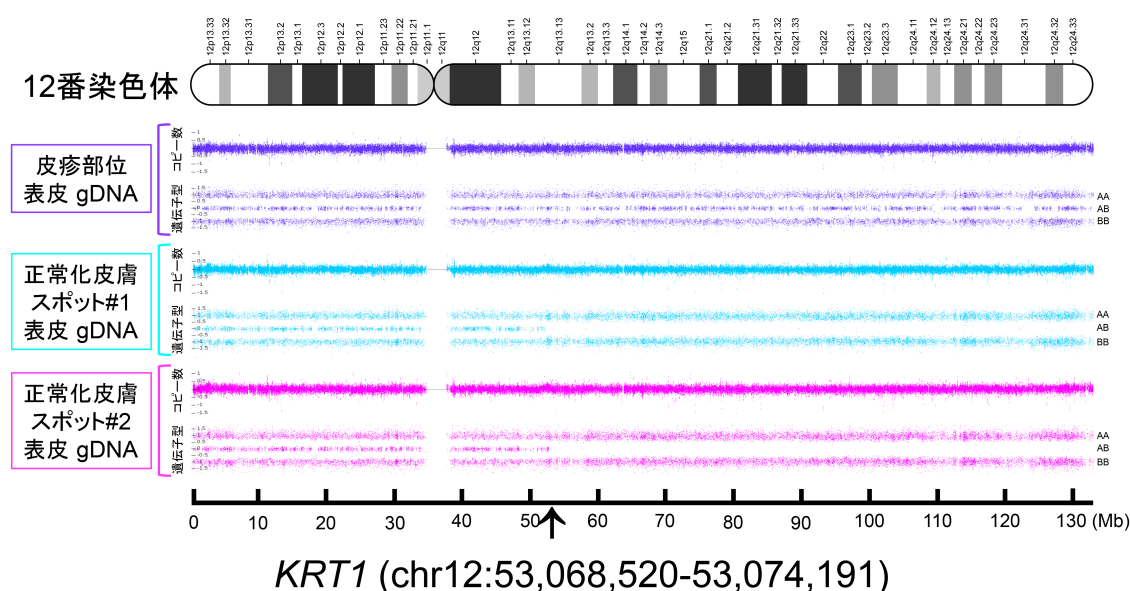


図 22. 表皮由来ゲノム DNA の 12 番染色体における遺伝子型

各サンプルの 12 番染色体における各 SNP 配列のコピー数と遺伝子型を示す。スポット#1 と#2 において *KRT1* 領域近傍を break point とした LOH が認められる。

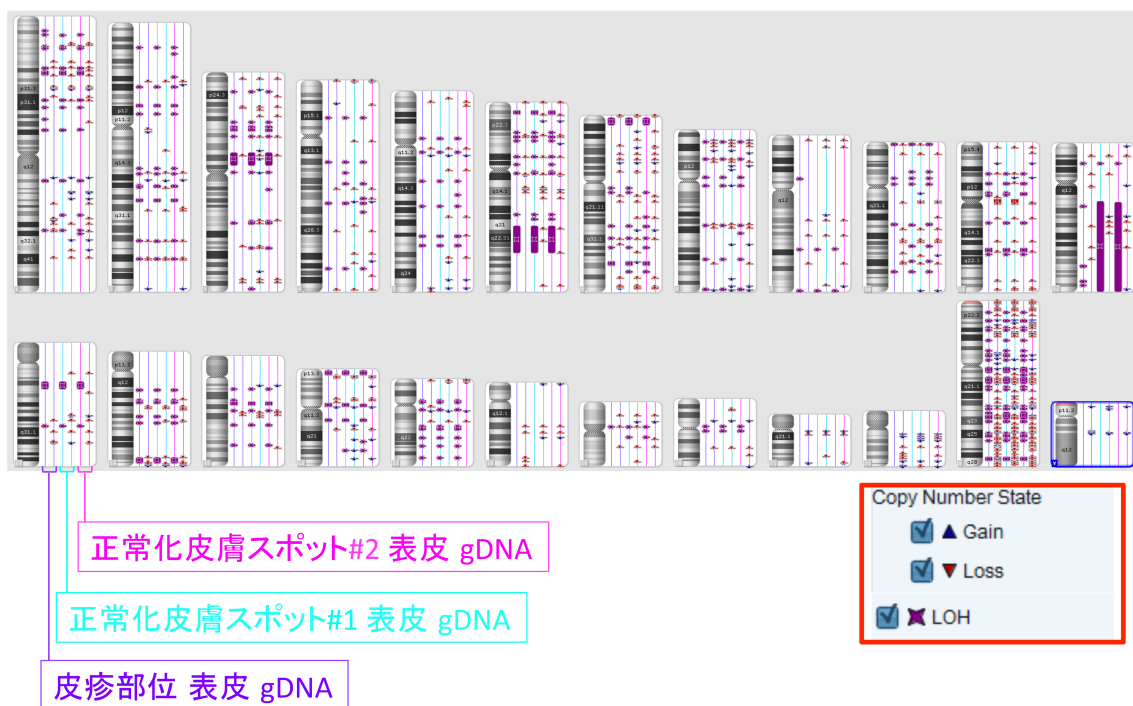


図 23. 表皮由来ゲノム DNA の染色体におけるコピー数異常と LOH

各サンプルにおける染色体全体の検出されたコピー数異常と LOH を示す。12 番染色体以外では正常化皮膚に特異的な異常は認められない。赤枠内に各異常の表示マーカーを示す。

表 8. 正常化皮膚スポット#1 の表皮ゲノム DNA に認められる LOH break point 近傍の遺伝子型

Affymetrix プローブID	遺伝子型		dbSNP rs ID	染色体	染色体位置	座乗する遺伝子
	皮疹部位	スポット #1				
S-3PFIO	AA	AA	rs771998	12	52358195	ACVR1B
S-3YAPY	BB	BB	rs10783486	12	52362786	ACVR1B
S-3SWXL	BB	BB	rs2220805	12	52379854	ACVR1B
S-3FUUC	BB	BB	rs79245486	12	52389599	ACVR1B
S-3GTKZ	BB	BB	rs12830373	12	52396544	ACVR1B - GRASP*
S-3KJTJ	AB	AB	rs1283170	12	52423179	NR4A1
S-4JAVX	AB	AB	rs876734	12	52423996	NR4A1
S-4QSB	AA	AA	rs876733	12	52424070	NR4A1
S-3DBMN	BB	BB	rs2701128	12	52429520	NR4A1
S-4OUWG	BB	BB	rs118082725	12	52445903	NR4A1
S-3TJHN	AA	AA	rs2603745	12	52464773	C12orf44
S-4BBCS	AA	AA	rs7138000	12	52470109	C12orf44
S-3RUDX	AA	AA	rs75631356	12	52478804	C12orf44 - KRT80*
S-3QHYC	BB	BB	rs10467108	12	52479369	C12orf44 - KRT80*
S-3WDID	AA	AA	rs7313454	12	52480182	C12orf44 - KRT80*
S-3NREO	BB	BB	rs1317275	12	52482587	C12orf44 - KRT80*
S-3VMAE	AA	AA	rs6580851	12	52489861	C12orf44 - KRT80*
S-3TIPV	BB	BB	rs2141662	12	52505385	C12orf44 - KRT80*
S-4NEPW	AA	AA	rs11835013	12	52513252	C12orf44 - KRT80*
S-4RNIJ	AA	AA	rs17126306	12	52516351	C12orf44 - KRT80*
S-3LRAX	BB	BB	rs7308871	12	52516509	C12orf44 - KRT80*
S-3XBAZ	AB	AA	rs17703861	12	52521715	C12orf44 - KRT80*
S-3UEQO	AB	AA	rs7966619	12	52532208	C12orf44 - KRT80*
S-3EESI	BB	BB	rs3911501	12	52532818	C12orf44 - KRT80*
S-3FQVW	AB	AA	rs11170013	12	52535647	C12orf44 - KRT80*
S-4ISQZ	AB	AA	rs9669529	12	52570177	KRT80
S-4NRCY	AA	AA	rs17126366	12	52572797	KRT80

*各遺伝子の遺伝子間領域であることを示す

患者がヘテロ接合性の遺伝子型のSNPを示す

表 9. 正常化皮膚スポット#2 の表皮ゲノム DNA に認められる LOH break point 近傍の遺伝子型

Affymetrix プローブID	遺伝子型		dbSNP rs ID	染色体	染色体位置	座位する遺伝子
	皮疹部位	スポット #2				
S-4CKFM	AA	AA	rs7298470	12	53033684	KRT73-KRT2*
S-4CUNB	BB	BB	rs589619	12	53036090	KRT73-KRT2*
S-3MZWM	AB	AB	rs34251161	12	53037350	KRT2
S-3BNTK	AB	AB	rs2232559	12	53040411	KRT2
S-4BOYN	BB	BB	rs7980882	12	53048006	KRT2-KRT1*
S-4FSFW	BB	BB	rs10876317	12	53048921	KRT2-KRT1*
S-4QQAA	AA	AA	rs685382	12	53049579	KRT2-KRT1*
S-3JMII	AA	AA	rs11170222	12	53049835	KRT2-KRT1*
S-4PYSV	BB	BB	rs11542316	12	53049928	KRT2-KRT1*
S-3EUVK	BB	BB	rs591357	12	53050383	KRT2-KRT1*
S-4BATM	AA	AA	rs17117603	12	53050431	KRT2-KRT1*
S-3RBWW	BB	BB	rs11613399	12	53050498	KRT2-KRT1*
S-3WWCJ	AA	AA	rs7485009	12	53056501	KRT2-KRT1*
S-4HSBA	BB	BB	rs1488697	12	53058002	KRT2-KRT1*
S-4JIJT	AA	AA	rs10876321	12	53058051	KRT2-KRT1*
S-3XPZH	AA	AA	rs1994516	12	53058514	KRT2-KRT1*
S-3ZXWP	AA	AA	rs936955	12	53058619	KRT2-KRT1*
S-4EIMR	AA	AA	rs936956	12	53058736	KRT2-KRT1*
S-4NXHL	BB	BB	rs1814640	12	53058792	KRT2-KRT1*
S-4SBPK	AA	AA	rs1873063	12	53059645	KRT2-KRT1*
S-4GPXY	BB	BB	rs7961891	12	53072762	KRT1
S-3HJQP	AA	AA	rs12425650	12	53072911	KRT1
S-3ZEIY	AA	AA	rs2171585	12	53074543	KRT1-KRT77*
S-3BMEQ	AA	AA	rs659010	12	53077325	KRT1-KRT77*
S-4KTOS	AA	AA	rs711345	12	53077858	KRT1-KRT77*
S-4DDYX	AA	AA	rs17118029	12	53080332	KRT1-KRT77*
S-4MRUL	BB	BB	rs1567757	12	53082253	KRT1-KRT77*
S-3MXLN	AA	AA	rs1464042	12	53091326	KRT77
S-3TBPC	BB	BB	rs1567759	12	53091566	KRT77
S-3DXTU	BB	BB	rs1624753	12	53094659	KRT77
S-3IMVR	BB	BB	rs678069	12	53102196	KRT77-KRT76*
S-4DHIH	AA	AA	rs10876324	12	53102733	KRT77-KRT76*
S-4HJPS	BB	BB	rs938177	12	53104942	KRT77-KRT76*
S-3NVBI	BB	BB	rs2684341	12	53106801	KRT77-KRT76*
S-4FSFT	BB	BB	rs17118401	12	53119891	KRT77-KRT76*
S-4QVKK	AA	AA	rs7294445	12	53120636	KRT77-KRT76*
S-3FMVD	AA	AA	rs864344	12	53121995	KRT77-KRT76*
S-4RFTD	BB	BB	rs676255	12	53122550	KRT77-KRT76*
S-4EPII	BB	BB	rs7306527	12	53122958	KRT77-KRT76*
S-3JCOI	BB	BB	rs662843	12	53123240	KRT77-KRT76*
S-4DMRW	AB	BB	rs11170249	12	53124962	KRT77-KRT76*
S-3RNGI	AB	BB	rs11170250	12	53125123	KRT77-KRT76*
S-3DFTR	AA	AA	rs12829851	12	53125145	KRT77-KRT76*

*各遺伝子の遺伝子間領域であることを示す

患者がヘテロ接合性の遺伝子型のSNPを示す

5. 同症の長男 (35 歳) も **revertant mosaicism** を伴うが、孫娘 (7 か月) は魚鱗癬症状のみである

2015 年の再診の際、魚鱗癬症状がある本患者の長男 (35 歳) と孫娘 (7 か月) の診察も実施した。長男の臨床像は本患者とほとんど同じで、全身のドライスキンと体幹、四肢の鱗屑を伴う潮紅、掌蹠の激しい過角化であった (図 24a)。孫娘では、掌蹠や膝を中心に過角化と潮紅が認められた (図 24b)。唾液から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子型を調べたところ、長男、孫娘ともに本患者と同じ遺伝子型：
c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer68) をヘテロ接合性で有していることがわかった (図 25)。また、長男の膝窩には最大で 2 mm 程度の **revertant** スポットが 35 個程度認められた (図 26)。一方で、孫娘には **revertant** スポットを確認することができなかった。

(a) 長男



(b) 孫娘



図 24. 長男および孫娘の臨床像

(a) 長男の臨床像。患者 (図 10) と同様に掌蹠を含む四肢と腹部に過角化が目立ち、皮膚が潮紅している。

(b) 孫娘の臨床像。掌蹠および膝を中心に過角化と潮紅が認められるが、患者や長男と比して軽症である。

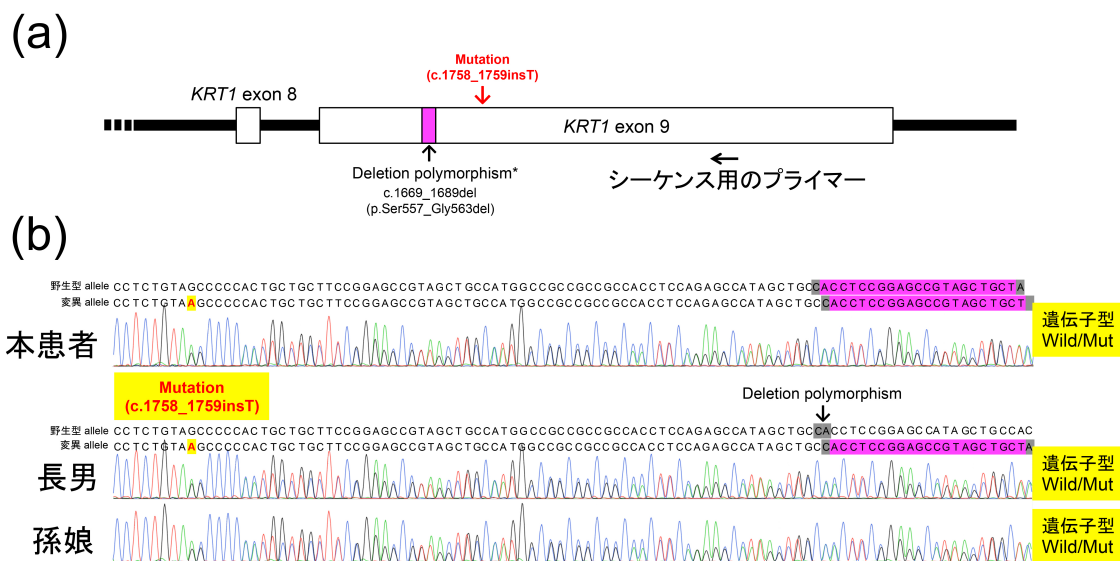


図 25. 本患者の長男および孫娘に認められた *KRT1* 変異

(a) 長男と孫娘に認められた polymorphism および病原変異、さらにはシーケンスに用いたプライマー位置の模式図。

(b) 本患者、長男、孫娘に認められた *KRT1* 変異 c.1758_1759insT 近傍のシーケンス結果とそれぞれの遺伝子型。Wild, 野生型; Mut, 変異



図 26. 長男に認められた revertant スポット

左膝窩に認められた revertant スポットを示す。左右の写真の矢印および三角形はそれぞれ同じスポットを示している。直径 2 mm 以下の revertant スポットが散在している。

6. 変異ケラチンの病原性を調べる実験系の構築

本研究では KRT1 の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異の病原性を調べるために、変異 KRT1 を細胞に過剰発現させ、その細胞内挙動の観察を試みた。なお、先行研究において EBS 患者で認められる変異 KRT14 を細胞内で過剰発現させ、その挙動を解析することで、変異の種類と病原性について相関が得られている^{24, 54}ので、その研究を参考に実験検討を実施した。

6-1. 発現させる細胞種について

HaCaT 細胞、HeLa 細胞、AD293 細胞の 3 種類で pEGFPC2KRT1 をトランスフェクションし、GFP 蛍光を観察することで、野生型 KRT1 タンパク質が細胞骨格を形成するかどうか検討した。その結果、HaCaT 細胞ではほとんどの細胞において GFP-KRT1 が整ったフィラメント状の細胞骨格を形成することがわかった (図 27a)。一方、HeLa 細胞では一部の細胞でフィラメント状の細胞骨格を形成したが、多くの細胞では細胞内で凝集し、AD293 細胞ではほとんどすべての細胞で KRT1 の凝集が認められた (図 27b, c)。以上から、KRT1 の過剰発現による細胞骨格形成能を調べる実験には HaCaT 細胞を用いるのが適切と結論できた。

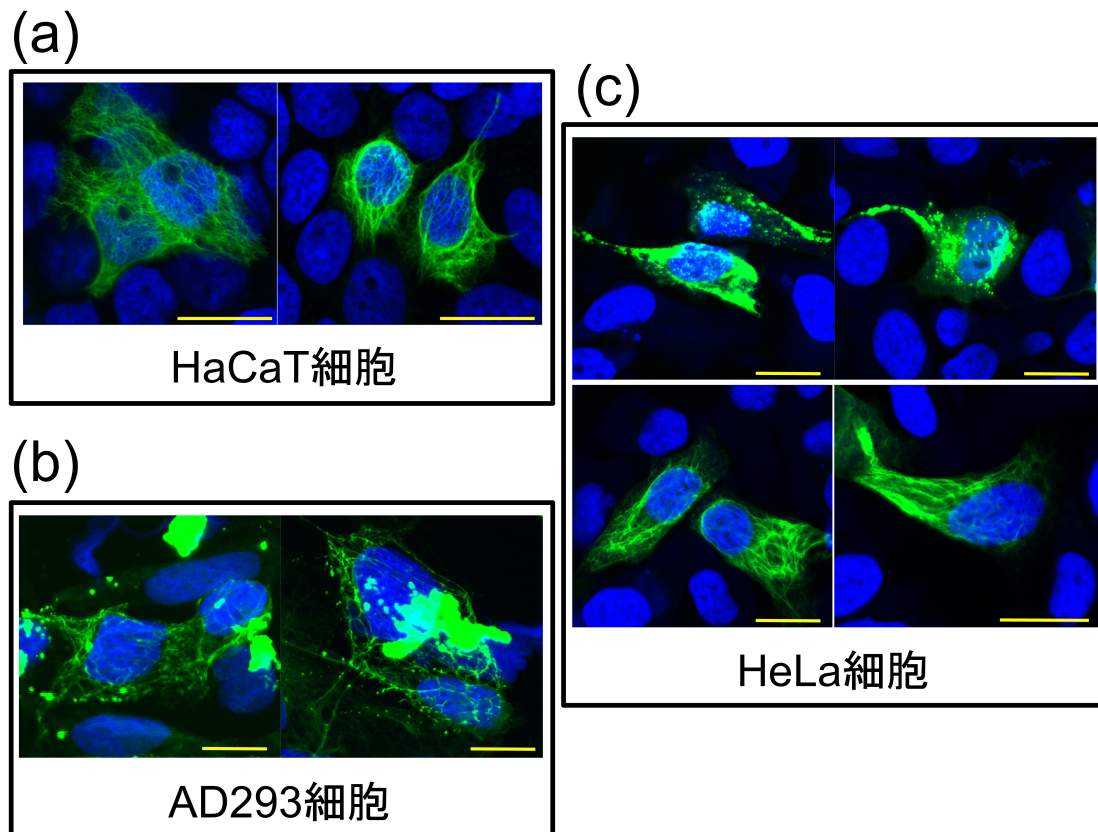


図 27. GFP-KRT1 を過剰発現した HaCaT 細胞、AD293 細胞、HeLa 細胞の蛍光観察像

緑は GFP 蛍光、すなわち KRT1 タンパク質を示し、青は細胞核を示す。

(a) HaCaT 細胞。KRT1 がフィラメント状の正常な細胞骨格を形成している。

(b) AD293 細胞。KRT1 が高度に凝集してほとんど細胞骨格を形成していない。

(c) HeLa 細胞。KRT1 は一部フィラメント状の正常な細胞骨格を形成するが、しない細胞も多数認められた。

6-2. 細胞骨格形成の表現型について

Natsuga ら⁵⁴は重症度の異なる EBS 2 種類の KRT14 病原変異について、重症度の違いと細胞内で過剰発現させたときに凝集塊を形成した細胞の割合に相関があることを示した。本研究において、まずは患者で認められた変異 KRT1

(p.Tyr587LeufsTer67)を HaCaT 細胞で過剰発現させると、凝集塊を形成するかどうか調べた。その結果、図 28 に示したように変異体を発現した HaCaT 細胞では正常なフィラメント状の細胞骨格の他に、核周囲または核内で KRT1 の凝集が確認された。したがって、本研究で見出された新規フレームシフト変異をもつ KRT1 タン

パク質は正常な細胞骨格を形成しつつも、一定の割合で凝集塊を形成する作用があると考えられた。また、この実験方法により変異 KRT1 タンパク質の病原性を「ケラチンの凝集塊が認められた細胞の割合」として検出することが可能であることが示唆された。

さらに、Sprecher ら³¹は KRT1 の V2 ドメインにおける変異はケラチン線維形成だけではなく、LOR との相互作用にも影響を与えることを患者組織の免疫電子顕微鏡観察で示唆したので、本研究でこの表現型について細胞を用いた実験で再現できるかどうか検討した。まずは、GFP-KRT1 を安定発現する細胞株

HaCaT-KRT1-wt に mCherry-LOR を発現するベクター pmCherry-LOR をトランスフェクションし、野生型 KRT1 と LOR が共局在するかどうか調べた。また KRT1 のペアである KRT10 とのヘテロダイマー形成に大きな影響がある可能性も考えられたので、KRT10 (mCherry-KRT10) を HaCaT-KRT1-wt、HaCaT-KRT1-1758 にトランスフェクションする実験も実施した。その結果、この実験系では野生型 KRT1 と LOR が相互作用することを明確に確認できず、この表現型について病原性の違いを検出する実験は困難であることが明らかとなった (図 29)。また、KRT10 は KRT1 と共局在するが、変異 KRT1 との明らかな違いは検出できなかった (図 30)。

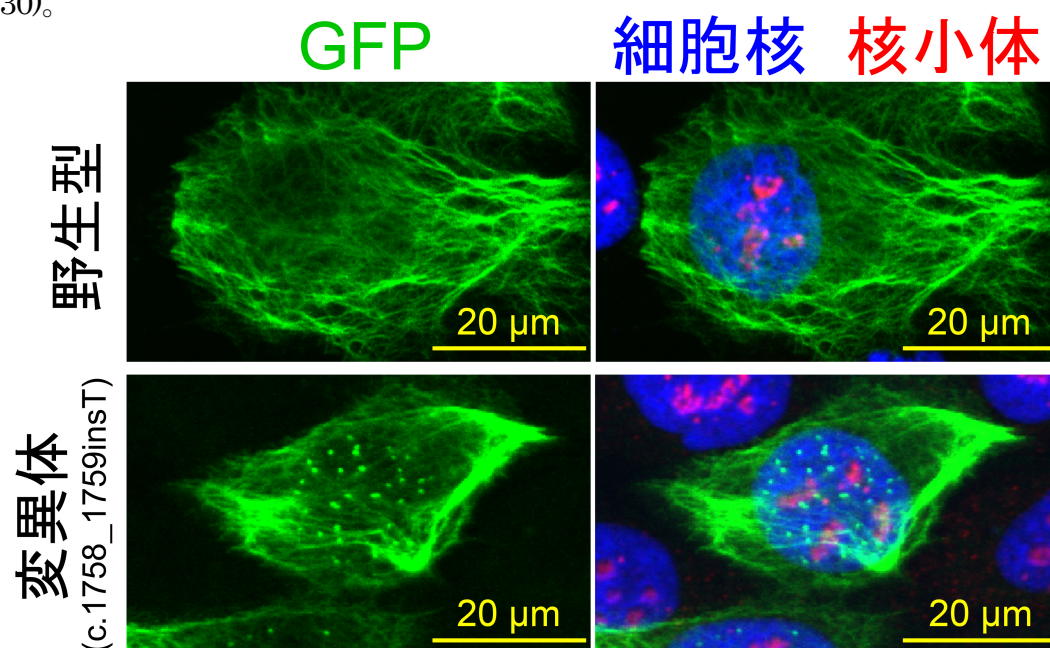


図 28. 変異体 KRT1 が HaCaT 細胞の細胞骨格に与える影響

緑は GFP 蛍光、すなわち KRT1 タンパク質を示し、青は細胞核、赤色は核小体を示す。野生型 KRT1 をトランスフェクションした場合、フィラメント状の整った細胞骨格を形成したが、変異 KRT1 (c.1758_1759insT: p.Tyr587LeufsTer67) の場合、整った細胞骨格のほかに核周囲または核内に凝集体を形成した。

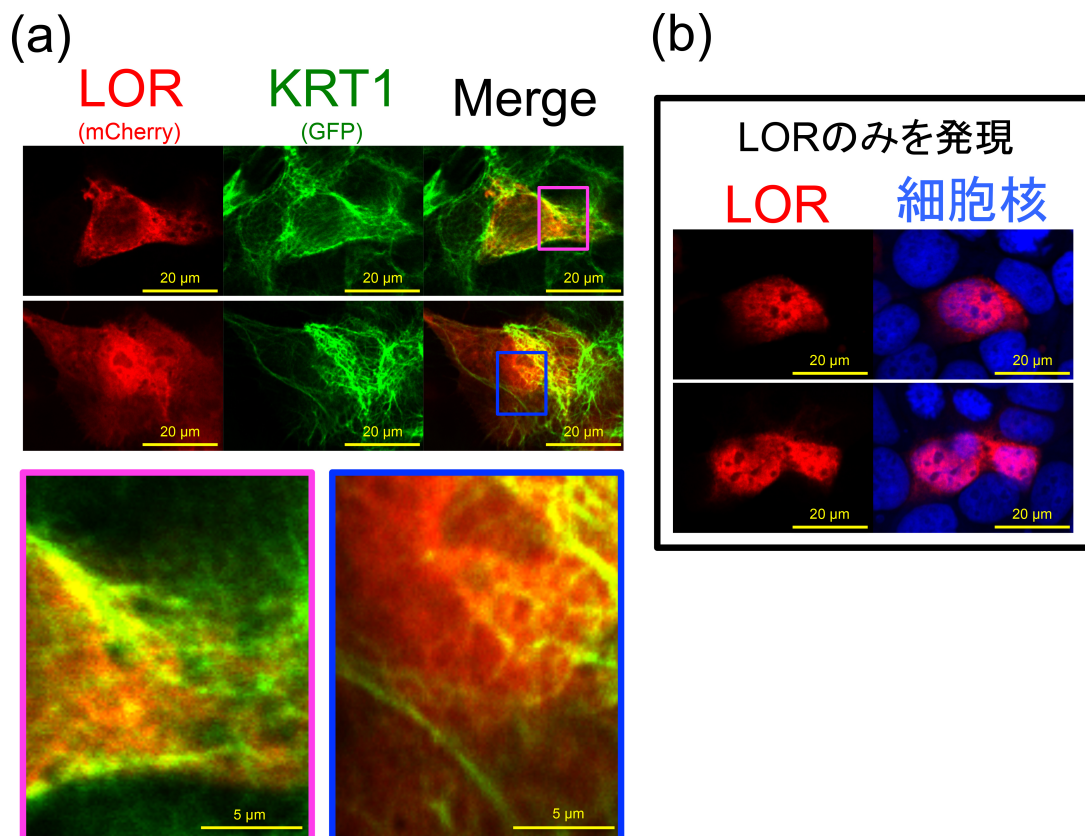


図 29. LOR と KRT1 の共局在に関する検討

(a) GFP 連結野生型 KRT1 を安定発現する細胞に LOR を一過的に発現させた時の代表的な像を 2 つ示す。桃色と青色の枠の拡大像をそれぞれ下に示す。LOR を赤色、GFP (野生型 KRT1 タンパク質) を緑色で示し、共局在した場合、黄色となる。KRT1 と LOR は HaCaT 細胞内で共局在する場合も認められたが、共局在しないところも多く存在する。

(b) HaCaT 細胞に LOR のみを一過的に発現させた時の代表的な像を 2 つ示す。LOR を赤色、細胞核 (DAPI 染色) を青色で示す。LOR は細胞質全体に時にドット状の凝集体を形成して存在し、KRT1 と共発現した場合 (a) と変化がないことがわかる。

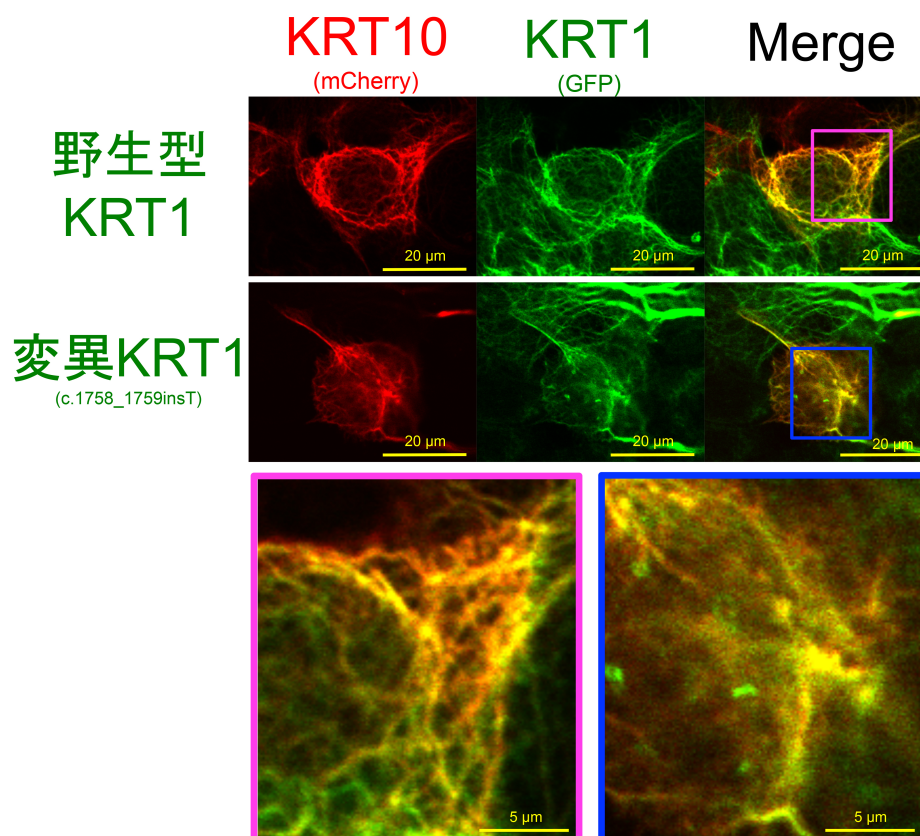


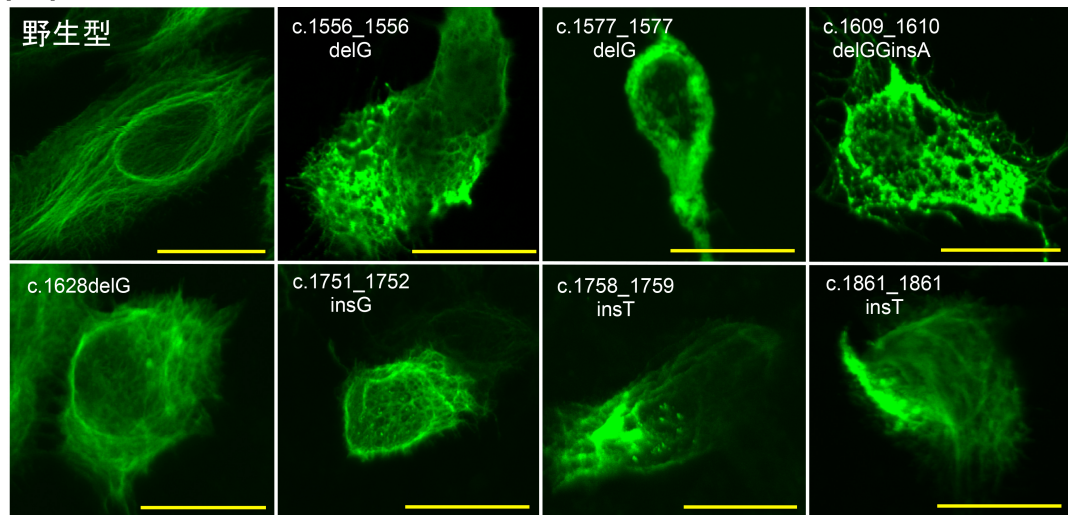
図 30. KRT10 と野生型 KRT1 および変異 KRT1 の共局在に関する検討
 GFP 連結野生型 KRT1 または GFP 連結変異 KRT1 (c.1758_1759insT: p.Tyr587LeufsTer67)を発現する細胞に KRT10 を一過的に発現させた時の代表的な像。桃色と青色の枠の拡大像をそれぞれ下に示す。KRT10を赤色、GFP (KRT1タンパク質)を緑色で示し、共局在した場合、黄色となる。野生型および変異体の KRT1 は KRT10 と高度に共局在することが明らかである。

7. 既報告 KRT1 V2 ドメインフレームシフト変異を有する KRT1 はすべて細胞内で凝集する

上記検討により、変異 KRT1 を HaCaT 細胞で一過的に過剰発現させ、KRT1 の凝集塊ができる細胞の割合を調べることで、各変異の病原性の比較ができると考えられた。そこで、作製したすべての変異 KRT1 (表 7)について凝集塊を形成する細胞の割合を調べた。その結果、野生型 KRT1 と比較してすべての変異体が有意 ($p<0.01$)に凝集塊を形成する細胞の割合が高かった (図 31)。また、いずれの細胞も一定数は正常な細胞骨格を形成した。したがって、今回調べた 7 種類の KRT1 における V2 ドメインの変異はケラチン線維形成を阻害することが明らかとなった。しかしながら、この実験では症状の重症度や revertant mosaicism の有無 (表 3)と凝集塊をつくる細胞の割合の相関は得ることができなかった (図 31b)。

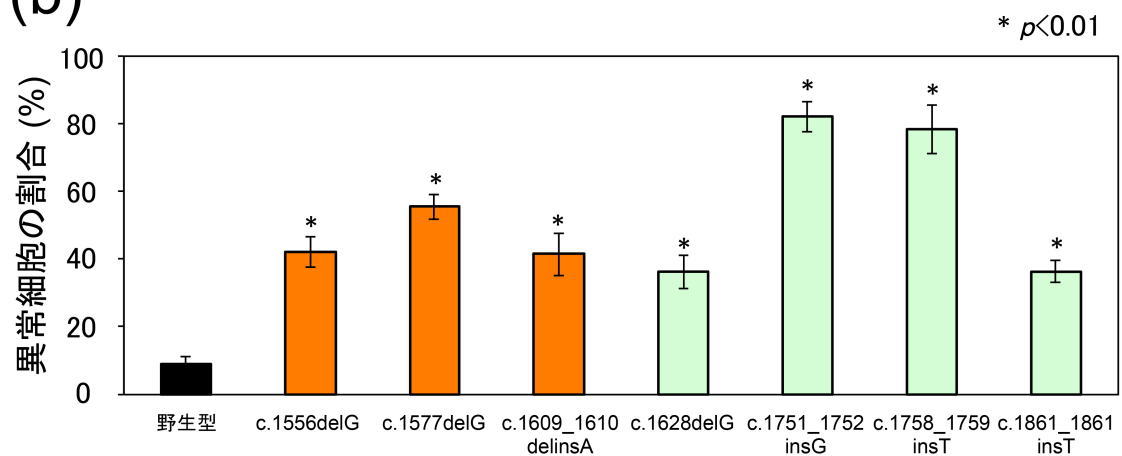
また、形成する凝集体の形について本研究で見出された p.Tyr587LeuTer67 変異タンパク質は細胞核周囲または細胞核内のドット状の凝集が認められ (図 28, 31a)、この凝集体は他の変異体では認めることができなかった (図 31a)。

(a)



Bar: 20 μ m

(b)



* $p < 0.01$

図 31. 既報告 V2ドメイン変異 KRT1 の HaCaT 細胞における細胞骨格形成能比較
(a) 各変異体を一過的に過剰発現させた HaCaT 細胞においてケラチン (GFP) の凝集が認められた代表画像。GFP の蛍光を緑で示し、野生型は秩序立ったフィラメント状の細胞骨格像であったが、各変異体では一部で細胞骨格が乱れた像が得られた。
(b) 凝集が認められた細胞の割合。黒色、野生型; 橙色、重症例の変異; 薄緑色、軽症例の変異である。各数値は少なくとも独立した 5 回の実験の平均でエラーバーは標準誤差である。統計検定 (*) は Tukey-Kramer test で実施した。

考察

KRT1 変異と IWC-II

本研究において、我々は IWC 患者に新規 *KRT1* 変異 c.1758_1759insT (p.Try587LeufsTer67) を同定した。*KRT1* 変異により発症する IWC-II の報告はこれまで 1 家系しかなく⁴⁴、本家系が世界で 2 家系目の報告となる。興味深いことにこれら 2 家系は臨床病理学的に多くの共通点を有していた。臨床的には、いずれの家系も *KRT10* 変異による IWC-I で認められる眼瞼外反、小耳症、耳介形成異常、乳頭形成不全、低身長を認めず⁵⁵、魚鱗癬自体も IWC-I より軽症であった。病理学的にも、IWC-I では不全角化を伴う過角化、表皮角化細胞の核周囲の高度の空胞化、顆粒層の菲薄化が特徴であるが⁵⁵、IWC-II の 2 家系では核周囲の空胞化は IWC-I よりも軽度であり、IWC-I と IWC-II は臨床病理学的にそれぞれ異なる特徴を持つことが確認された。なお、IWC-II の最初の報告例では不全角化を認めず、顆粒層の肥厚（粗大化したケラトヒアリン顆粒）を認めたのに対し⁴⁴、本症例では不全角化と顆粒層の菲薄化が認められたが、本症例は *FLG* にナンセンス変異 c.8666_8667delinsGA (p.Ser2889Ter) を有しており、顆粒層の菲薄化はこの変異の存在により説明できると考えた⁵¹⁻⁵³。不全角化については、IWC-II の今後の症例の蓄積により明らかになるものと考ええる。

本患者でも過去の IWC の報告例と同様、臨床病理学的に治癒した部位が多発しており、解析した 2 カ所の正常化皮膚では、いずれも *KRT1* が座乗する 12 番染色体長腕の変異よりもセントロメア側からテロメアまで相同組換えが起こり体細胞レベルで遺伝子変異が消失していることを確認した。IWC はこれまでに報告されている疾患の中で唯一、体細胞における相同組換えという単一のメカニズムで revertant mosaicism が多発する疾患であり、我々の研究結果もこれを裏付けるものであった。

さらに我々は、IWC-I と IWC-II では revertant 部位の出現する時期に大きな差異があることを見出した。すなわち、IWC-II では revertant スポットは生下時や幼少期・青年期にはきわめて少なく、20-30 代で初めてその存在に気づかれ、高齢になってから増加するのに対し、IWC-I では生下時または乳幼児期に revertant スポットが多発する⁵⁵。また、両者の間には revertant 部位の数と大きさにも違いがあり、IWC-II では IWC-I と比べ revertant 部位のサイズがより小さく、数もより少ない。これらの所見は、変異 *KRT1* と比して変異 *KRT10* のほうが体細胞での相同組換えの頻度や正常化ケラチノサイトの疾患ケラチノサイトに対する相対的な増殖

能に与える影響が大きい可能性を示唆している。この点は今後、各変異と revertant mosaicism の関係を実験的に検証する際に、重要な知見となると考えられる。

Revertant 細胞の出現メカニズム

IWC で認められる *KRT1* 変異または *KRT10* 変異は遺伝子の終止コドンから数十〜数百塩基上流に生じるフレームシフト変異で、変異タンパク質の多くはアルギニンを多数含み、核移行シグナルを生じる。一方、*KRT1* または *KRT10* の rod ドメイン変異により発症する EI では revertant mosaicism はこれまで報告されていない^{28,29}。これらの事実は、C 末端側のフレームシフト変異が体細胞での相同組換えに直接関与している可能性を強く示唆している。自験例で同定したフレームシフト変異も、アルギニンに富んだフレームを指定する変異で、変異タンパク質の一部は核内または核周囲に異常局在していた。しかしながら、IWC-I のうち 2 例ではアラニンに富んだフレームを指定する変異(図 32)でも revertant mosaicism が多発し^{43,56}、IWC-II のうち 1 例では特定のアミノ酸に富んだフレームを指定しない変異であったことから、必ずしもアルギニンに富んだペプチドである必要はないことがわかる。そして興味深いことに、免疫染色を実施された IWC-I の 1 例では核内に、IWC-II の 1 例では核周囲にそれぞれ変異タンパク質が異常局在することが報告されている。すなわち、これら IWC を引き起こす変異のペプチドで共通するモチーフはアミノ酸配列の比較からは見出せず、タンパク質の一次構造から相同組換えを引き起こす効果を推察するのは困難であるが、C 末端側のフレームシフト変異により変異タンパク質の一部が核内または核周囲に異常局在することが相同組換えの誘導と revertant 細胞の出現に重要である可能性が示唆された。事実、*KRT1* や *KRT10* と同様に中間径フィラメントを構成する *KRT17* は細胞骨格として細胞に強度を与えるだけでなく、その一部が核内に移行することで、細胞周期を G1 期から S 期へ進行させることがわかっており⁵⁷、核内に異常蓄積した *KRT1* や *KRT10* も同様に細胞骨格以外の作用をしている可能性がある。

野生型	NTEYQQLLDIKIRLENIQTYSLLLEGEGSSGGGGRGGGSFGGGYGGGSSGGGSSGGHGGHGGSSGGGYGGGSSGGG
Ser458Argfs	NTEYQQLLDIKIRLENIQTYSLLLEGEGFRRRRTRRRKFRRLRRKLRRKLRRPRRRPRRQFRRLRRKLRRR
Ser525Lysfs	NTEYQQLLDIKIRLENIQTYSLLLEGEGSSGGGGRGGGSFGGGYGGGSSGGGSSGGHGGHGGSSGGGYGGGSSGGG
Gly515Alafs	NTEYQQLLDIKIRLENIQTYSLLLEGEGSSGGGGRGGGSFGGGYGGGSSGGGSSGGHGGHGGSSGGGYGGGSSGGG
野生型	SSGGGYGGGSSSGHGGSSSGGYGGGSSGGGGGGYGGGSSGGGSSGGGYGGGSSSGGHKSSSSGSGVGESSSKGPRY---
Ser458Argfs	KLRRRLRGRKLQRRPRRQFQRRLRWQFRRRRRLRGRQLRRRQQLRRRIRRQLQRRPQVLLFRVRGRVFI-----
Ser525Lysfs	SSGGGYGGGSSSGHGGKFQRRLRWQFRRRRRLRGRQLRRRQQLRRRIRRQLQRRPQVLLFRVRGRVFI-----
Gly515Alafs	SSGGGYGAEPAAATAAVPAAATVVAVPAAAAATGAAAPAAAAAPAADTAAAPAEATSPPLPGPWASLHLRDQDTNK
野生型	-----
Ser458Argfs	-----
Ser525Lysfs	-----
Gly515Alafs	TRVIKTIIEEVAPDGRVLSSMVESETKKHYY

図 32. IWC- I を引き起こす変異 KRT10 タンパク質の V2 ドメインにおけるアミノ酸配列 (文献 55, 56 より作成)

赤色はアルギニンに富んだペプチドを指定するもので、複数報告のある KRT10 の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異の中で最も 5'末端側のもの (Ser458Argfs)と最も 3'末端側 (Ser525Lysfs)を示した。青色で示したものはアラニンに富んだフレームを指定する変異のもので、黒字は野生型 KRT10 のアミノ酸配列である。

一方で、変異タンパク質はもとのグリシンに富んだ配列と比較すると親水性が極めて高いにも関わらず、*in vitro* の実験では一定の割合で正常な細胞骨格を形成し、細胞骨格形成能はある程度確認できた。しかし、このように形成された細胞骨格は全体の極性が変化していると考えられ、細胞骨格と相互作用している細胞内物質の局在に影響していると予想される⁷。また、体細胞における相同組換えにより変異が座乗する染色体が大規模に消失するには、理論上 DNA 複製と細胞分裂の過程を経る必要がある (図 6)、この際に細胞内ではダイナミックな細胞骨格成分の再分配がおこる⁷。したがって、本来とは大きく異なる極性の細胞骨格成分により、この過程に異常をきたす可能性がある。極性が変化した細胞骨格が DNA 複製や有糸分裂に及ぼす影響については不明な点も多いが、今後の研究の展開が強く期待される。

患者の revertant スポットが長期間維持されることから(本研究の患者では最低でも 7 年間維持されていた)、revertant 細胞の由来は表皮の幹細胞であることが予想される。表皮の幹細胞は基底細胞の一部と皮膚の付属器 (毛包や脂腺、汗腺など)に存在する幹細胞が主体である考えられている^{2, 58}。IWC で認められる revertant スポットは毛包や汗腺に一致していないこと^{35, 55}(図 17)から、付属器に存在する幹細胞が変化して生じた結果である可能性は低いと考えられる。したがって、現状では基底細胞の一部の幹細胞で生じた revertant 細胞がクローン性増殖の結果、

revertant スポットを形成すると予想される。基底細胞では KRT10 や KRT1 が少量ではあるが発現していることが知られており、核内または核周囲に移行した少量の変異タンパク質が相同組換え頻度を増加させていることが予想されるが、この点に関しては今後さらに検証が必要である。

KRT1 の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異と皮膚疾患

本研究で解析した患者は四肢を中心とした潮紅と鱗屑を伴う過角化、さらには掌蹠の激しい過角化を特徴とした臨床で、かつ revertant mosaicism を伴っていた。この臨床的特徴は Choate ら⁴⁴の症例とほぼ一致し、彼らの診断結果に倣い、自験例は IWC-II と診断した。

KRT1 の V2 ドメインのフレームシフト変異は、本研究で同定した変異も含めこれまで 9 種類報告されている(表 3)。これら V2 ドメインの変異は多彩な皮膚症状を引き起こすため、IHCM⁴⁰、線状掌蹠角化症⁴¹、EI^{42, 43}、IWC-II⁴⁴といった様々な診断名が付与されてきた。このうち EI は、KRT1 V2 ドメインのフレームシフト変異で EI の最大の特徴である顆粒変性を生じた報告例がないことから、不適当と考えられる。従って、KRT1 の V2 ドメインにおける既報告のフレームシフト変異が原因の皮膚疾患の診断名については、掌蹠に限局した病変であれば掌蹠角化症、掌蹠の過角化に加え掌蹠外にも魚鱗癬の症状があれば IHCM、IHCM の症状に加えて revertant mosaicism を認める場合には IWC-II と診断するのが現時点では妥当と考えられる（しかし、IWC-II という疾患名は本症が比較的高齢で revertant mosaicism を生じるため幼小児期には診断できないという欠点を含有している）。今後、変異による発症機序が完全に解明されれば、より病因に基づいた疾患分類が可能になるはずであり、今後の研究の発展が期待される。なお、ケラチンの異常で生じる魚鱗癬をまとめて keratinopathic ichthyosis とする分類法も提唱されている⁵⁹ので、本症例も含め大分類として keratinopathic ichthyosis と呼称することも可能であるが、臨床像や発症メカニズムに即した病型の分類が重要と考え、本研究では keratinopathic ichthyosis という分類は用いていない。

KRT1 の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異と臨床的重症度

KRT1 の V2 ドメインにおける変異は、上述のとおりこれまで 9 種類報告されており(表 3)、本研究では c.1752dupT (p.Gly585TrpfsTer69)と c.1865_1866insG (p.Val622CysfsTer30)を除くすべての変異について変異 KRT1 cDNA を作製し、細胞骨格形成能を検討した。結果、これらの変異 KRT1 タンパク質はすべて正常な細胞骨格に加えて異常凝集塊を形成し病原性を有することを明らかにした。しかしな

がら、各変異が引き起こす臨床的重症度と細胞骨格形成阻害能の間には明らかな相関を見出せなかった。このことは、これらの変異は細胞骨格形成以外にも影響し、それが重症度に関して重要であることを示唆している。そこで、本研究では変異 KRT1 と KRT10 や LOR との相互作用について免疫染色にて観察したが、野生型との違いを検出することができなかった。また、変異間でのアミノ酸組成の違いと重症度の違いにも明らかな相関は認めなかった。

Fonseca ら³⁴は重症度が GL の数の違いにより規定される可能性について論じており、重症例の場合、保持される GL の数は 2 個以下である (表 3)。GL は V1 および V2 ドメインにおける主要な構造と考えられており³²、他のケラチンや LOR などの角層を形成するタンパク質との相互作用に影響することが示唆されている^{3, 31-34}が、これ以外にもその極めて高い疎水性により角層細胞自体のバリア機能に関わっていることが推察される。すなわち、GL の消失数が多いほど、最終的な角層細胞のアミノ酸組成が親水性になり、バリア機能が著しく低下することが予想されるため、本研究で検証できた細胞骨格形成阻害作用に加えて、症状を修飾している可能性がある。この点については、患者皮膚の解析や *in vitro* での角層モデルを用いた詳細な細胞生物学的、分子生物学的実験が必要である。また、V2 ドメインはリン酸化や SUMO 化などの翻訳後修飾のターゲットになっている^{7, 60}ことから、フレームシフト変異によるアミノ酸組成自体の変化に加えて、翻訳後修飾の変化がタンパク質の性質や細胞内のシグナル伝達に影響している可能性も考えられる。

総括および結論

本研究により以下の新知見を得た。

- 1) *KRT1* の新規フレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) は病原性をもち、**revertant mosaicism** を伴う魚鱗癬、IWC-II の原因となる。
- 2) IWC-II は IWC-I とは臨床病理学的に異なり、**revertant** 細胞の出現は青年期以降で、高齢になってから急激に増加しはじめる。
- 3) *KRT1* の V2 ドメインがフレームシフト変異したタンパク質は細胞内で細胞骨格の凝集を引き起こして細胞骨格形成を阻害するが、各変異がおこす症状の重症度や **revertant mosaicism** の有無とは相関がなく、これらの違いは細胞骨格形成能とは異なる V2 ドメインの機能により生じていると考えられた。

また、rod ドメインの変異による EI では **revertant mosaicism** が認められない事実から、IWC における **revertant mosaicism** の出現は変異タンパク質が引き起こしていることが考えられた。よって、変異タンパク質によって体細胞における相同組換えが誘発されていることが予想され、その能力は変異 *KRT1* タンパク質よりも変異 *KRT10* タンパク質のほうが高いことが予想された。さらに、変異タンパク質は通常とは極性の大きく異なる細胞骨格を形成しうることから、細胞分裂やゲノム複製に影響を与え、体細胞における相同組換えと関係していると予想された。したがって、本研究によりこれまでにない新しい展開、すなわち、中間径フィラメントの成分とゲノム DNA の一次配列や染色体構造の維持機構に関する新しい研究分野の道を開くことができた。

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の清水宏教授に、そして研究計画の立案から論文作成までの研究者として必要なことすべてを直接御指導いただきました北海道大学病院皮膚科の乃村俊史講師に心より感謝いたします。そして本研究にご協力いただきました魚鱗癬患者の皆様、そして健常人ボランティアの皆様に深く御礼申し上げます。最後に、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野のすべての教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. 清水宏. あたらしい皮膚科学 第2版, 1-3 (2011).
2. Lim, X., Tan, S.H., Koh, W.L.C., Chau, R.M.W., Yan, K.S., Kuo, C.J., van Amerongen, R., Klein, A.M. & Nusse, R. Interfollicular Epidermal Stem Cells Self-Renew via Autocrine Wnt Signaling. *Science* 342, 1226-1230 (2013).
3. Wickett, R.R. & Visscher, M.O. Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* 34, S98-S110 (2006).
4. Rabionet, M., Gorgas, K. & Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1841, 422-434 (2014).
5. Takeichi, T. & Akiyama, M. Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J. Dermatol.* 43, 242-251 (2016).
6. Steinert, P.M. The extraction and characterization of bovine epidermal alpha-keratin. *Biochem. J.* 149, 39-48 (1975).
7. Haines, R.L. & Lane, E.B. Keratins and disease at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 3923-3928 (2012).
8. Yoneda, K., Nakagawa, T., Lawrence, O.T., Huard, J., Demitsu, T., Kubota, Y. & Presland, R.B. Interaction of the Profilaggrin N-Terminal Domain with Loricrin in Human Cultured Keratinocytes and Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1206-1214 (2012).
9. Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A. & Wright, M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell Biol.* 174, 169-174 (2006).
10. Hatzfeld, M. & Weber, K. The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J. Cell Biol.* 110, 1199-1210 (1990).
11. Lee, C.H., Kim, M.S., Chung, B.M., Leahy, D.J. & Coulombe, P.A. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 707-715 (2012).
12. Bunick, C.G. & Milstone, L.M. The X-Ray Crystal Structure of the Keratin 1-Keratin 10 Helix 2B Heterodimer Reveals Molecular Surface Properties and Biochemical Insights into Human Skin Disease. *J. Invest. Dermatol.*

- (2016).
13. Ma, L., Yamada, S., Wirtz, D. & Coulombe, P.A. A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks. *Nat. Cell Biol.* **3**, 503-506 (2001).
 14. Uitto, J., Richard, G. & McGrath, J.A. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp. Cell Res.* 313, 1995-2009 (2007).
 14. Knöbel, M., O'Toole, E.A. & Smith, F.J.D. Keratins and skin disease. *Cell Tissue Res.* 360, 583-589 (2015).
 15. Forrest, A.R. *et al.* A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* **507**, 462-470 (2014).
 16. FANTOM5 human promoterome view UPDATE Feb-16-2015 pages [<http://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/gLyphs/#config=b-IMGb5lG53ntH8qgNeChB;loc=hg19::chr19:36307745..36428760+>] Accessed 02 November 2016.
 17. Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyarto, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Ponten, F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
 18. THE HUMAN PROTEIN ATLAS [<http://www.proteinatlas.org/>] Accessed 02 November 2016.
 19. THE HUMAN PROTEIN ATLAS, ASSAYS & ANNOTATION, Immunohistochemistry – tissues, Annotation [<http://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation>] Accessed 07 November 2016.
 20. Feng, X., Zhang, H., Margolick, J.B. & Coulombe, P.A. Keratin intracellular concentration revisited: implications for keratin function in surface epithelia. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 850-853 (2013).
 21. Loschke, F., Seltmann, K., Bouameur, J.E. & Magin, T.M. Regulation of keratin network organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **32**, 56-64 (2015).
 22. Knöbel, M., O'Toole, E.A. & Smith, F.J.D. Keratins and skin disease. *Cell Tissue Res.* **360**, 583-589 (2015).
 23. Bonifas, J.M., Rothman, A.L. & Epstein, E.H., Jr. Epidermolysis bullosa

- simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254, 1202-1205 (1991).
24. Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S. & Fuchs, E. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66, 1301-1311 (1991).
 25. Lane, E.B., Rugg, E.L., Navsaria, H., Leigh, I.M., Heagerty, A.H., Ishida-Yamamoto, A. & Eady, R.A. A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356, 244-246 (1992).
 26. Natsuga, K. Epidermolysis Bullosa Simplex (INTECH Open Access Publisher, 2013).
 27. Osawa, R., Akiyama, M., Izumi, K., Ujiie, H., Sakai, K., Nemoto-Hasebe, I., Yanagi, T., Koizumi, H. & Shimizu, H. Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 64, 991-993 (2011).
 28. Szeverenyi, I., Cassidy, A.J., Chung, C.W., Lee, B.T., Common, J.E., Ogg, S.C., Chen, H., Sim, S.Y., Goh, W.L., Ng, K.W., Simpson, J.A., Chee, L.L., Eng, G.H., Li, B., Lunny, D.P., Chuon, D., Venkatesh, A., Khoo, K.H., McLean, W.H., Lim, Y.P. & Lane, E.B. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum. Mutat.* 29, 351-360 (2008).
 29. Human Intermediate Filament Database [<http://www.interfil.org/index.php>] Accessed 07 November 2016.
 30. Wilson, A.K., Coulombe, P.A. & Fuchs, E. The roles of K5 and K14 head, tail, and R/K L L E G E domains in keratin filament assembly in vitro. *J. Cell Biol.* 119, 401-414 (1992).
 31. Sprecher, E., Ishida-Yamamoto, A., Becker, O.M., Marekov, L., Miller, C.J., Steinert, P.M., Neldner, K. & Richard, G. Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. *J. Invest. Dermatol.* 116, 511-519 (2001).
 32. Steinert, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P., Gan, S.Q., Haynes, S.R. & Steven, A.C. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 130-139 (1991).
 33. Richardson, E.S., Lee, J.B., Hyde, P.H. & Richard, G. A novel mutation and

- large size polymorphism affecting the V2 domain of keratin 1 in an African-American family with severe, diffuse palmoplantar keratoderma of the ichthyosis hystrix Curth-Macklin type. *J. Invest. Dermatol.* 126, 79-84 (2006).
34. Fonseca, D.J., Rojas, R.F., Vergara, J.I., Rios, X., Uribe, C., Chavez, L., Velandia, F., Vargas, C.I., Restrepo, C.M. & Laissue, P. A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *Br. J. Dermatol.* 168, 456-458 (2013).
 35. Choate, K.A., Lu, Y., Zhou, J., Choi, M., Elias, P.M., Farhi, A., Nelson-Williams, C., Crumrine, D., Williams, M.L., Nopper, A.J., Bree, A., Milstone, L.M. & Lifton, R.P. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in *KRT10*. *Science* 330, 94-97 (2010).
 36. Gu, L.H., Kim, S.C., Ichiki, Y., Park, J., Nagai, M. & Kitajima, Y. A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *J. Invest. Dermatol.* 121, 482-485 (2003).
 37. Horiguchi, Y., Sawamura, D., Mori, R., Nakamura, H., Takahashi, K. & Shimizu, H. Clinical heterogeneity of 1649delG mutation in the tail domain of keratin 5: a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 125, 83-85 (2005).
 38. Wilson, N.J., Leachman, S.A., Hansen, C.D., McMullan, A.C., Milstone, L.M., Schwartz, M.E., McLean, W.H., Hull, P.R. & Smith, F.J. A large mutational study in pachyonychia congenita. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1018-1024 (2011).
 39. Guo, K., Xiao, S., Geng, S., Feng, Y., Zhang, D., Zhou, P. & Zhang, Y. Delayed-onset pachyonychia congenita caused by a novel mutation in the V2 domain of keratin 6b. *J. Dermatol.* 41, 108-109 (2014).
 40. Kubo, Y., Urano, Y., Matsuda, R., Ishigami, T., Murao, K., Arase, S. & Ishida-Yamamoto, A. Ichthyosis hystrix, curth-macklin type: A new sporadic case with a novel mutation of keratin 1. *Arch. Dermatol.* 147, 999-1001 (2011).
 41. Whittock, N.V., Smith, F.J., Wan, H., Mallipeddi, R., Griffiths, W.A., Dopping-Hepenstal, P., Ashton, G.H., Eady, R.A., McLean, W.H. & McGrath, J.A. Frameshift mutation in the V2 domain of human keratin 1 results in striate palmoplantar keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* 118, 838-844 (2002).

42. Sprecher, E., Yosipovitch, G., Bergman, R., Ciubutaro, D., Indelman, M., Pfendner, E., Goh, L.C., Miller, C.J., Uitto, J. & Richard, G. Epidermolytic hyperkeratosis and epidermolysis bullosa simplex caused by frameshift mutations altering the v2 tail domains of keratin 1 and keratin 5. *J. Invest. Dermatol.* 120, 623-626 (2003).
43. Hotz, A., Oji, V., Bourrat, E., Jonca, N., Mazereeuw-Hautier, J., Betz, R.C., Blume-Peytavi, U., Stieler, K., Morice-Picard, F., Schonbuchner, I., Markus, S., Schlipf, N. & Fischer, J. Expanding the Clinical and Genetic Spectrum of KRT1, KRT2 and KRT10 Mutations in Keratinopathic Ichthyosis. *Acta Derm. Venereol.* 96, 473-478 (2016).
44. Choate, K.A., Lu, Y., Zhou, J., Elias, P.M., Zaidi, S., Paller, A.S., Farhi, A., Nelson-Williams, C., Crumrine, D., Milstone, L.M. & Lifton, R.P. Frequent somatic reversion of *KRT1* mutations in ichthyosis with confetti. *J. Clin. Invest.* 125, 1703-1707 (2015).
45. Jonkman, M.F. & Pasmooij, A.M. Revertant mosaicism-patchwork in the skin. *N. Engl. J. Med.* 360, 1680-1682 (2009).
46. Lai-Cheong, J.E., McGrath, J.A. & Uitto, J. Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. *Trends Mol. Med.* 17, 140-148 (2011).
47. McDermott, D.H., Gao, J.L., Liu, Q., Siwicki, M., Martens, C., Jacobs, P., Velez, D., Yim, E., Bryke, C.R., Hsu, N., Dai, Z., Marquesen, M.M., Stregevsy, E., Kwatema, N., Theobald, N., Long Priel, D.A., Pittaluga, S., Raffeld, M.A., Calvo, K.R., Maric, I., Desmond, R., Holmes, K.L., Kuhns, D.B., Balabanian, K., Bachelier, F., Porcella, S.F., Malech, H.L. & Murphy, P.M. Chromothriptic cure of WHIM syndrome. *Cell* 160, 686-699 (2015).
48. Kalb, R., Neveling, K., Nanda, I., Schindler, D. & Hoehn, H. Fanconi anemia: causes and consequences of genetic instability. *Genome Dyn.* 1, 218-242 (2006).
49. Spoerri, I., Brena, M., De Mesmaeker, J., Schlipf, N., Fischer, J., Tadini, G., Itin, P.H. & Burger, B. The phenotypic and genotypic spectra of ichthyosis with confetti plus novel genetic variation in the 3' end of KRT10: from disease to a syndrome. *JAMA Dermatol.* 151, 64-69 (2015).
50. Lim, Y.H. & Choate, K.A. Expanding the Mutation Spectrum of Ichthyosis with Confetti. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1941-1943 (2016).
51. Kono, M., Nomura, T., Ohguchi, Y., Mizuno, O., Suzuki, S., Tsujiuchi, H., Hamajima, N., McLean, W.H., Shimizu, H. & Akiyama, M. Comprehensive

- screening for a complete set of Japanese-population-specific filaggrin gene mutations. *Allergy* **69**, 537-540 (2014).
52. Liao, H., Waters, A.J., Goudie, D.R., Aitken, D.A., Graham, G., Smith, F.J., Lewis-Jones, S. & McLean, W.H. Filaggrin mutations are genetic modifying factors exacerbating X-linked ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2795-2798 (2007).
 53. McGrath, J.A. & Uitto, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol. Med.* **14**, 20-27 (2008).
 54. Natsuga, K., Nishie, W., Smith, B.J., Shinkuma, S., Smith, T.A., Parry, D.A., Oiso, N., Kawada, A., Yoneda, K., Akiyama, M. & Shimizu, H. Consequences of two different amino-acid substitutions at the same codon in KRT14 indicate definitive roles of structural distortion in epidermolysis bullosa simplex pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1869-1876 (2011).
 55. Guerra, L., Diociaiuti, A., El Hachem, M., Castiglia, D. & Zambruno, G. Ichthyosis with confetti: clinics, molecular genetics and management. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 115 (2015).
 56. Lim, Y.H., Qiu, J., Saraceni, C., Burrall, B.A. & Choate, K.A. Genetic Reversion via Mitotic Recombination in Ichthyosis with Confetti due to a KRT10 Polyalanine Frameshift Mutation. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1725-1728 (2016).
 57. Hobbs, R.P., Jacob, J.T. & Coulombe, P.A. Keratins Are Going Nuclear. *Dev. Cell* **38**, 227-233 (2016).
 58. Xie, J., Yao, B., Han, Y., Huang, S. & Fu, X. Skin appendage-derived stem cells: cell biology and potential for wound repair. *Burns Trauma* **4**, 38 (2016).
 59. Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Blanchet Bardon, C., Bodemer, C., Bourrat, E., Coudiere, P., DiGiovanna, J.J., Elias, P., Fischer, J., Fleckman, P., Gina, M., Harper, J., Hashimoto, T., Hausser, I., Hennies, H.C., Hohl, D., Hovnanian, A., Ishida-Yamamoto, A., Jacyk, W.K., Leachman, S., Leigh, I., Mazereeuw-Hautier, J., Milstone, L., Morice-Picard, F., Paller, A.S., Richard, G., Schmuth, M., Shimizu, H., Sprecher, E., Van Steensel, M., Taieb, A., Toro, J.R., Vabres, P., Vahlquist, A., Williams, M. & Traupe, H. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J. Am. Acad. Dermatol.* **63**, 607-641 (2010).
 60. Snider, N.T. & Omary, M.B. Post-translational modifications of intermediate

filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 163-177 (2014).