



Title	長島型掌蹠角化症の原因遺伝子SERPINB7におけるリードスルー作用およびmRNA分解についての研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大口, 由香
Description	配架番号 : 2364
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12985号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70259
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Oguchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 大口 由香

学 位 論 文 題 名

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

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

【背景と目的】

遺伝性疾患の約 11%はナンセンス変異により発症する。ナンセンス変異により早期終止コドン (premature termination codon、PTC) が生じるとリボソームが翻訳を中止し、本来よりも短いタンパク質が産生され、細胞毒性を生じる可能性がある。PTC を読み飛ばす現象を『リードスルー』と呼び、リードスルー作用を持つ薬剤により目的とする正常長のタンパク質を産生することで、遺伝性疾患を治療できることが期待されている。現在までにリードスルー作用を持つ薬剤としてゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生剤や ataluren が報告されている。長島型掌蹠角化症 (Nagashima-type palmoplantar keratosis、NPPK) は *SERPINB7* 遺伝子の変異により発症するが、注目すべきことに、患者の 92%がナンセンス変異 c.796C>T を保有している。NPPK は、1) 常染色体劣性遺伝性疾患であり少量のタンパク質発現で治療効果が期待できる、2) c.796C>T 変異は最後のエクソンに存在するため、exon junction complex (EJC) 依存性 nonsense-mediated mRNA decay (NMD) による分解を受けず、患者細胞には変異 mRNA が豊富に存在する、3) c.796C>T 変異は最もリードスルーされやすい UGA 終止コドンを生じる、4) *SERPINB7* は表皮の角層、顆粒層といった表層に発現するタンパク質であるため、外用治療も可能である、といった点から、リードスルー治療のターゲットとして最適な疾患であると考えた。本研究ではゲンタマイシンによる NPPK のリードスルー治療の有効性について *in vitro* の実験および NPPK 患者へのゲンタマイシン外用治療の自主臨床研究を実施し検討した。また、リードスルーの効率には変異 mRNA 量が大きく影響するため、患者皮膚における *SERPINB7* mRNA 発現量を解析し、c.796C>T 変異における NMD について検討した。

【対象と方法】

- 1) 変異 *SERPINB7* cDNA を用いたリードスルー活性の検討
c.796C>T 変異を有する *SERPINB7* cDNA を AD293 細胞に過剰発現させ、ゲンタマイシン (39 μ g/ml-10000 μ g/ml) および ataluren (1.56 μ g/ml-100 μ g/ml) で治療し、*SERPINB7* タンパク質の発現をウェスタンブロッティングで解析した。
- 2) NPPK 患者細胞を用いたリードスルー活性の検討
c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する患者の皮膚から不死化表皮角化細胞を樹立し、ゲンタマイシン (10000 μ g/ml、15000 μ g/ml) で治療して *SERPINB7* タンパク質の発現をウェスタンブロッティングで解析した。
- 3) NPPK 患者に対するゲンタマイシン外用によるリードスルー治療の検討
c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する患者 3 名、ヘテロ接合性に保有する患者 2 名を被

験者としてエントリーした。同一患者の左右の手掌、手背の病変部位にゲンタシン® 軟膏 0.1%と白色ワセリンを無作為に割付け、1日2回4週間外用した。過角化、紅斑について評価者による診察および visual analogue scale (VAS) により評価した。

4) c.796C>T 変異における NMD の検討

健常人と c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する NPPK 患者の手掌の皮膚における *SERPINB7* mRNA 発現量を quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) を用いて解析した。患者由来不死化表皮角化細胞のシクロヘキサミド治療や NMD の重要な因子である *UPF1* 遺伝子のノックダウンを行い、変異 mRNA 発現量を qRT-PCR で解析した。

5) c.796C>T 変異におけるタンパク質分解の検討

c.796C>T 変異を有する *SERPINB7* cDNA を過剰発現させた HaCaT 細胞と患者由来不死化表皮角化細胞に 26S プロテアソーム阻害作用を有する MG132 を添加し、*SERPINB7* タンパク質の発現をウェスタンブロッティングで解析した。

【結果および考察】

1) *SERPINB7* cDNA において、ゲンタマイシン 312μg/ml-10000μg/ml の治療では full-length *SERPINB7* タンパク質の産生増加を認めた。一方、ataluren は全ての濃度で full-length *SERPINB7* タンパク質の産生を増加させなかった。

2) 患者由来不死化表皮角化細胞ではゲンタマイシン 10000μg/ml、15000μg/ml の治療で *SERPINB7* タンパク質の産生増加を認めた。

3) c.796C>T 変異をホモ接合性に保有する被験者 2 名においてゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側で過角化の改善を認めた。また VAS はゲンタシン® 軟膏 0.1%外用側で 5 名中 4 名が低下しており、有意差を持って VAS の改善を認めた (P 値=0.034)。一方、紅斑は両方の外用で評価者と VAS のいずれも全被験者で不変と評価された。

1) - 3) の結果より、NPPK の新規の治療として、リードスルー治療が有効であることが示唆された。患者細胞において高濃度のゲンタマイシン治療で *SERPINB7* タンパク質が産生されたことから、ゲンタマイシン外用濃度、外用期間、外用方法を改善することで、更に治療の有効性が高まると考えた。本研究で得られた知見により、外用でのリードスルー治療が他の遺伝性皮膚疾患にとっても有効な治療となる可能性を示した。

4) 患者皮膚では *SERPINB7* mRNA 発現量が健常人と比較し 47%低下していた

(P=0.00069)。患者細胞をシクロヘキサミドで治療すると *SERPINB7* mRNA 量が増加したことより、翻訳が関与する変異 mRNA の分解が起きていることが示唆された。また *UPF1* 遺伝子をノックダウンすると *SERPINB7* mRNA 発現量は有意に増加した (*UPF1* siRNA#1 P=0.00157、*UPF1* siRNA#2 P=0.00022)。これらより、c.796C>T 変異では下流に EJC が存在しないにも関わらず NMD が起きており、EJC 非依存性の NMD 機構が働いている可能性があることが示唆された。

5) MG132 添加により、truncated *SERPINB7* タンパク質の発現増加を認めた。c.796C>T 変異細胞において産生される truncated *SERPINB7* タンパク質が 26S プロテアソームを介するタンパク質分解を受けていることが示唆された。

【結論】

1) *SERPINB7* 遺伝子の c.796C>T 変異に対し、ゲンタマイシンがリードスルー作用を有することを明らかにし、外用によるリードスルー治療が NPPK の有用な治療となることを示した。

2) c.796C>T 変異において *SERPINB7* mRNA がヒト疾患では報告が少ない EJC 非依存性 NMD により分解されており、同時に truncated *SERPINB7* タンパク質が 26S プロテアソームを介する分解により調整されていることを示した。