



Title	CARD14関連遺伝性皮膚疾患における復帰変異モザイク発生機序の解明
Author(s)	宮内, 俊成
Description	配架番号 : 2629
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14519号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14519
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81500
Type	doctoral thesis
File Information	Toshinari_Miyauchi.pdf



学 位 論 文

CARD14 関連遺伝性皮膚疾患における

復帰変異モザイク発生機序の解明

(Elucidation of the mechanism underlying revertant
mosaicism in CARD14-related genetic skin disease)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 内 俊 成

学 位 論 文

CARD14 関連遺伝性皮膚疾患における

復帰変異モザイク発生機序の解明

(Elucidation of the mechanism underlying revertant
mosaicism in CARD14-related genetic skin disease)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 内 俊 成

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	20 頁
結果	62 頁
考察	100 頁
結論	103 頁
謝辞	104 頁
利益相反	105 頁
引用文献	106 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に論文投稿中である。

1. Toshinari Miyauchi, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Jin Teng Peh, Masayuki Aiba, Ken Natsuga, Yasuyuki Fujita, Takuya Takeichi, Taiko Sakamoto, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu, Toshifumi Nomura
Curing genetic skin disease through altered replication stress response
The American Journal of Human Genetics

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Toshinari Miyauchi, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Ken Natsuga, Hiroo Hata, Yasuyuki Fujita, Ken Arita, Wataru Nishie, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu
Novel *CARD14* mutation in pityriasis rubra pilaris type V
The American Society of Human Genetics annual meeting 2018, 16-20th October, 2018, San Diego, USA.
2. Toshinari Miyauchi, Toshifumi Nomura, Hiroshi Shimizu
Mitotic Recombination in Patients with Autosomal Dominant Keratinization Diseases
3R&3C Symposium, 12-16th November, 2018, Kanazawa, Japan.
3. Toshinari Miyauchi, Toshifumi Nomura, Shotaro Suzuki, Masae Takeda, Jin Teng Peh, Ken Natsuga, Yasuyuki Fujita, Wataru Nishie, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu
A case of pityriasis rubra pilaris type V with a heterozygous mutation in *CARD14*
49th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 18-21th September, 2019, Bordeaux, France.
4. 宮内 俊成, 乃村 俊史, 清水 宏
遺伝性皮膚疾患における正常化細胞発生機構の解明
第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 2019年11月9-11日, 奈良, 日本.

要旨

【背景と目的】

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

【対象と方法】

1. CAPE 患者における *revertant mosaicism* の検討
CARD14 遺伝子変異を有する患者 2 名 (Case 1; c.356T>C (p.Met119Thr)、Case 2; c.407A>T (p.Gln136Leu)) において臨床的に正常化した皮膚領域を認めたため、組織学的解析、遺伝子変異解析、遺伝子発現解析、全ゲノム SNP アレイ解析を行い、*revertant mosaicism* の可能性について検討した。また Case 1 に関しては多発する皮膚腫瘍も認めたため、腫瘍に関しても同様の解析を行った。
2. *CARD14* 発現誘導細胞株の作製
テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、野生型と変異型 2 種類の *CARD14* 発現誘導細胞株をそれぞれ作製した。免疫染色、ウェスタンブロッティング、遺伝子発現解析、NF- κ B ルシフェラーゼアッセイ等で細胞株を評価した後、以下の解析に使用した。
3. *CARD14* が DNA 損傷・損傷修復に与える影響の解析

CARD14 発現に伴い、double-strand break (DSB) の指標である γ H2AX が変化するかどうかをウエスタンブロッティングで評価した。また X 線照射 (5 Gy)、エトポシド添加 (10/250 μ M) により DSB を誘導し、その修復反応を解析した。さらに DR-GFP assay を用いてエンドヌクレアーゼ誘導性の DSB 修復も評価した。

4. CARD14 が DNA 複製に与える影響の解析

CARD14 発現に伴い細胞周期や DNA 複製の変化を生じるかどうかを検証するため、フローサイトメトリーによる細胞周期解析や DNA fiber assay による DNA 複製動態の評価を行った。

5. CARD14 が DNA 複製ストレス反応へ与える影響の解析

Hydroxyurea や aphidicolin により複製ストレスを与えた際の γ H2AX 変化を評価した。さらにその状況下での HR 関連因子の活性化をフローサイトメトリーを用いて解析した。

6. CARD14 と break-induced replication (BIR) の関連解析

CARD14 発現に伴い複製ストレス下における崩壊複製フォークの修復経路に変化が生じるかどうかを評価するため、遺伝子発現解析、DNA fiber assay、SCE assay を実施した。

【結果】

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

【考察】

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

【結論】

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

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。

AD	autosomal dominant inheritance
AiKDs	autoinflammatory keratinization diseases
APH	aphidicolin
AR	autosomal recessive inheritance
BIR	break-induced replication
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
CAPE	CARD14-associated papulosquamous eruption
CARD14	caspase recruitment domain-containing protein 14
CASA	Computer Assisted Scoring & Analysis
CBB	coomassie brilliant blue
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20
CldU	5-chloro-2'-deoxyuridin
dHJ	double Holliday junction
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dox	doxycycline
DSB	double-strand break
EdU	5-ethynil-2'-deoxyuridine
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fluc	firefly luciferase
HE	Hematoxylin-Eosin
HR	homologous recombination
HU	hydroxyurea
IdU	5-iodo-2'-deoxyuridine
I κ B α	inhibitor of κ B kinase α
IL8	interleukin-8
IWC- I	ichthyosis with confetti type 1
IWC- II	ichthyosis with confetti type 2
LOH	loss of heterozygosity

Nacalai	Nacalai Tesque
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NHEJ	non-homologous end joining
Nluc	NanoLuc [®]
NT	non-treatment
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PRP	pityriasis rubra pilaris
SCC	squamous cell carcinoma
SCE	sister chromatid exchange
SDSA	synthesis dependent strand annealing
Sigma	Sigma-Aldrich
SNP	single nucleotide polymorphism
Takara	Takara Bio
Thermo	Thermo Fisher Scientific
T _m	melting temperature
XLR	X-linked recessive inheritance

緒言

Revertant mosaicism とヒトの疾患

一般的なヒトの体はおおよそ37.2兆個の細胞で構成されていると推定されているが (Bianconi et al., 2013)、これらは全て単一の受精卵から生じたものであり、この数に達するまでには膨大な数の体細胞分裂を要する。この過程の中で各細胞は内因性、あるいは外因性 (環境要因によるもの) に無数のDNA損傷やDNA複製エラーというイベントに直面し、それぞれの細胞にゲノム・遺伝子レベルの異常が蓄積することになる (De, 2011; Fernández et al., 2016)。例えばヒトの眼瞼皮膚を用いた研究では、老化した露光部皮膚には細胞あたり数千の体細胞変異が存在し、それらの細胞がパッチワーク様に分布していることが示されている (Martincorena et al., 2015)。つまりヒトの体は遺伝的に単一の細胞集団からなるわけではなく、モザイク状に分布した多様な細胞集団から成っていることになり、これが皮膚を含む全ての体細胞組織の自然な状態といえる。

これらの体細胞変異の大部分は目に見える直接的な影響を及ぼさないと考えられるものの、その蓄積は最終的には発癌や組織機能の低下に寄与し得る (Blokzijl et al., 2016; Siudeja et al., 2015)。一方で、この体細胞変異により生殖細胞由来の病原性突然変異が自然に修復され、変異に起因する細胞の機能不全、あるいは疾患特異的な表現型の回復に繋がる可能性もある (Nomura, 2020; Revy et al., 2019)。この病原性変異が消失する「自然治癒現象」は revertant mosaicism (復帰変異モザイク) と呼ばれ、体細胞で病原性突然変異が修復されて正常化細胞が出現した後、自然淘汰によってその細胞が生存し続け、クローン性に増殖することによって新たな表現型として顕在化してくると考えられている (図 1)。

ヒトの疾患における自然復帰現象は 1988 年に *HPRT1* 遺伝子変異で発症する Lesch-Nyhan 症候群の患者で初めて報告された (Yang et al., 1988)。同症候群は X 連鎖劣性遺伝性疾患で、臨床的には精神発達遅滞、舞蹈病アテトーゼ、筋硬直、高尿酸血症、および自傷行為が特徴的であるが、この症例では *HPRT1* 遺伝子変異があるにもかかわらず自傷行為を伴わない正常範囲の知能を示し、臨床像が非典型的であったとされている。その理由として実験的に病原変異領域の大部分または全てを失ったゲノムが関与している可能性が示唆され、自然治癒現象の存在が知られるようになった。

1994 年には重症複合免疫不全症患者において、病原性変異の自然復帰に関するより直接的な証拠が報告された (Hirschhorn et al., 1994)。この患者は *ADA* 遺伝子にスプライスサイト変異とミスセンス変異を複合ヘテロ接合性に有し、幼少期から重症感染症

を繰り返していたが、16歳時点で末梢血細胞におけるスプライスサイト変異の消失が確認され、最終的には治療の必要性がない健康な状態にまで回復したとされている。

皮膚疾患では、1997年に *COL17A* 遺伝子変異によって発症する常染色体劣性遺伝性皮膚疾患である接合部型表皮水疱症で初めて同様の現象が報告され、“revertant mosaicism”という言葉はこの報告の中で初めて使用された (Jonkman et al., 1997)。この患者では臨床的に正常な皮膚がパッチ状に広がって体表面積の10%以上を占めていたとされ、その部位のケラチノサイトでは片側 allele で *COL17A* 遺伝子変異が消失していた。

これらの発見を契機に今日までに原発性免疫不全症、骨髄不全症候群、表皮水疱症、魚鱗癬などを中心に50種類ほどの遺伝性疾患において revertant mosaicism の存在が報告されている (表1)。ただしこれらの疾患の中でも revertant mosaicism の頻度やそれに伴う臨床的な改善の程度は様々である。また変異の消失機序に関しても復帰突然変異 (back mutation)、第二点突然変異 (second site mutation)、相同組換え (homologous recombination, HR)、染色体破砕 (chromothripsis) など多くの機序が報告されている。そして何より、なぜこのような現象が起こる疾患と起こらない疾患があるのか、何が復帰変異の引き金になるのか、などの根本的な疑問は全く解決されていないのが現状である。

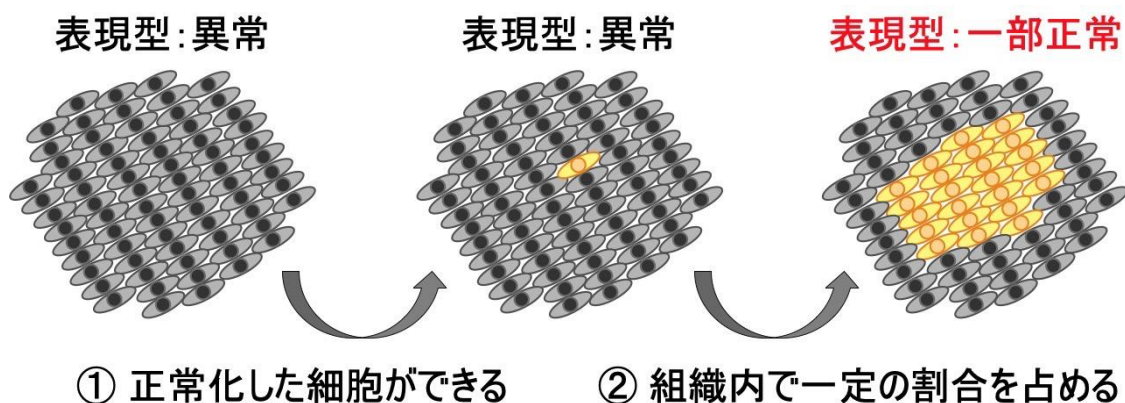


図1. Revertant mosaicism についての模式図

遺伝的に正常化した細胞 (revertant 細胞) が出現した後、それがクローン性に増殖して一定の割合を占めた時に臨床的な改善が顕在化する。

表 1. Revertant mosaicism を生じる疾患

疾患名	遺伝形式	責任遺伝子
魚鱗癬		
Ichthyosis with confetti type 1	AD	<i>KRT10</i>
Ichthyosis with confetti type 2	AD	<i>KRT1</i>
Loricrin keratoderma	AD	<i>LOR</i>
Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome	AD	<i>GJB2</i>
表皮水疱症		
Epidermolysis bullosa simplex, generalized severe	AD	<i>KRT14</i>
Epidermolysis bullosa simplex, autosomal recessive K14	AR	<i>KRT14</i>
Junctional epidermolysis bullosa, generalized intermediate	AR	<i>COL17A1</i>
Junctional epidermolysis bullosa, generalized intermediate	AR	<i>LAMB3</i>
Dominant dystrophic epidermolysis bullosa	AD	<i>COL7A1</i>
Recessive dystrophic epidermolysis bullosa	AR	<i>COL7A1</i>
Kindler syndrome	AR	<i>FERMT1</i>
血液疾患		
Bloom syndrome	AR	<i>BLM</i>
Fanconi anemia, complementation group A	AR	<i>FANCA</i>
Fanconi anemia, complementation group B	XLR	<i>FANCB</i>
Fanconi anemia, complementation group C	AR	<i>FANCC</i>
Fanconi anemia, complementation group D2	AR	<i>FANCD2</i>
Fanconi anemia, complementation group N	AR	<i>PALB2</i>
Fanconi anemia, complementation group T	AR	<i>UBE2T</i>
Shwachman-Diamond syndrome	AR	<i>SBDS</i>
Diamond-Blackfan anemia like condition?	AD	<i>RPL4</i>
Diamond-Blackfan anemia 1	AD	<i>RPS19</i>
Diamond-Blackfan anemia 10	AD	<i>RPS26</i>
Omenn syndrome	AR	<i>RAG1</i>
Omenn syndrome	AR	<i>CARD11</i>
Severe combined immunodeficiency due to ADA deficiency	AR	<i>ADA</i>
Severe combined immunodeficiency (Immunodeficiency 25)	AR	<i>CD247</i>
Severe combined immunodeficiency, X-linked	XLR	<i>IL2RG</i>
Severe combined immunodeficiency, autosomal recessive, T-negative/B-positive type	AR	<i>JAK3</i>
LIG4 syndrome	AR	<i>LIG4</i>
MIRAGE syndrome	AD	<i>SAMD9</i>
Ataxia pancytopenia syndrome	AD	<i>SAMD9L</i>
Leucocyte adhesion deficiency type 1	AR	<i>ITGB2</i>
Wiscott-Aldrich syndrome	XLR	<i>WAS</i>
WHIM syndrome	AD	<i>CXCR4</i>
Hyper-IgE recurrent infection syndrome, autosomal recessive	AR	<i>DOCK8</i>
Platelet-abnormalities with eosinophilia and immune-mediated inflammatory disease	AR	<i>ARPC1B</i>
Bone marrow failure syndrome 4	AR	<i>MYSM1</i>
X-linked lymphoproliferative syndrome type 1	XLR	<i>SH2D1A</i>
Pulmonary fibrosis and/or bone marrow failure, telomere related, 4	AD	<i>PARN</i>
Dyskeratosis congenita, autosomal dominant 1	AD	<i>TERC</i>
Dyskeratosis congenita, autosomal dominant 2	AD	<i>TERT</i>
Dyskeratosis congenita, X-linked	XLR	<i>DKC1</i>
X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency	XLR	<i>IKBK</i>
その他		
Duchenne muscular dystrophy	XLR	<i>DMD</i>
Hereditary tyrosinemia type 1	AR	<i>FAH</i>
Familial amyloidotic polyneuropathy	AD	<i>TTR</i>
Lesch-Nyhan syndrome	XLR	<i>HPRT1</i>

AD, 常染色体優性遺伝; AR, 常染色体劣性遺伝; XLR, X連鎖劣性遺伝

Revertant mosaicism と遺伝性角化症

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、外部からの生物・物理・化学的な刺激から守る、体温を調節する、感覚器として外部からの刺激を感知する、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。皮膚は最外層から順に表皮、真皮、皮下組織という構造に分けられ、表皮はほとんどが角化細胞 (ケラチノサイト) で構成される。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り、皮下組織は脂肪組織が多くを占める組織である (清水宏, 2018)。

表皮を構成するケラチノサイトはその最下層 (基底層) に存在する幹細胞から供給され、基底層よりも上層は分化細胞であり、その分化段階によって下層から順に有棘層、顆粒層、角層と分類される (図 2)。表皮の最も重要な機能は角層を形成することであり、角質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 (清水宏, 2018)。

角質細胞や角質細胞間脂質の構造・合成・輸送・局在に重要なタンパク質は多々あるが、中でもケラチノサイトの細胞骨格を構成するケラチンタンパク質や、角質細胞形成に際してケラチン線維の凝集に必要なフィラグリン、また角質細胞の細胞膜を裏打ちする周辺体構成成分のロリクリンなどが重要である。これらに異常があると、角層形成がうまくいかず、種々の遺伝性角化症になることが知られている (Takeichi and Akiyama, 2016)。

遺伝性角化症のうち、これまでに 4 種類の疾患で revertant mosaicism との関連が報告されている (表 1)。特に *KRT10* 遺伝子のフレームシフト変異で発症する ichthyosis with confetti type 1 (IWC-I) は revertant mosaicism を最も高頻度で生じる疾患の一つで、全身の角化性紅斑の中にスポット状の正常化した皮膚 (revertant spot) が多数出現する。無数に生じる revertant spot 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 *KRT10* が座乗する 17 番染色体において *KRT10* よりも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 (Choate et al., 2010; Nomura et al., 2018)。同様に *KRT1* 遺伝子のフレームシフト変異で生じる IWC type 2 (IWC-II) と *LOR* 遺伝子のフレームシフト変異で発症する lorimer keratoderma (ロリクリン角皮症) でも大規模な LOH を伴う revertant mosaicism が報告されており (Choate et al., 2015; Suzuki et al., 2016, 2019)、これらの疾患 (変異タンパク質) と体細胞における HR の密接な関連が示唆されてい

る。北海道大学皮膚科では上記3種類の疾患全てにおいて revertant mosaicism を経験・解析し、過去に報告している (表2、図3) (Nomura, 2020; Nomura et al., 2018; Suzuki et al., 2016, 2019)。

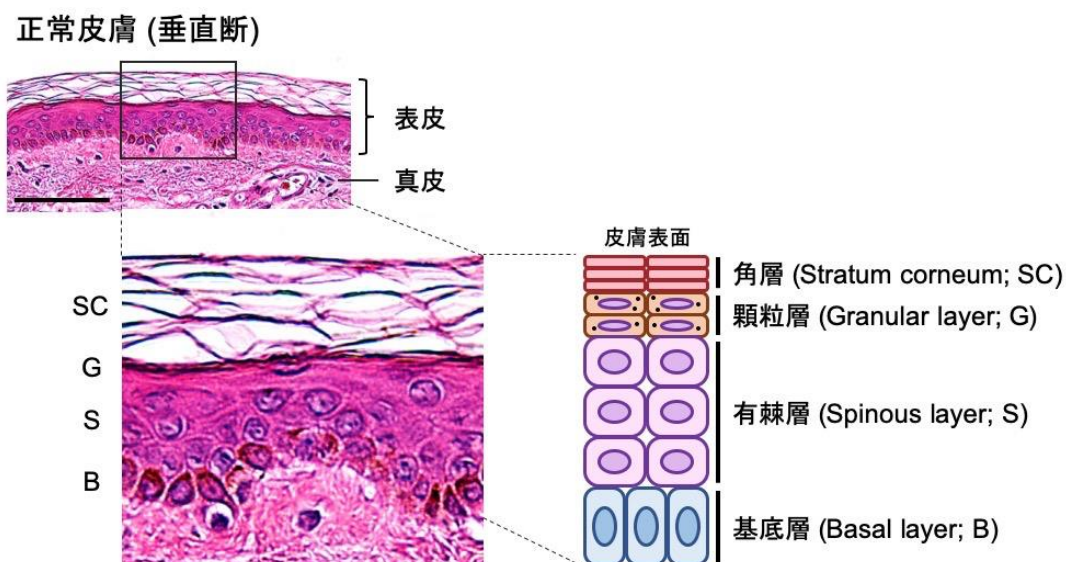


図2. 正常皮膚の構造と HE 染色像 (scale bar = 100 μ m)

表2. 北海道大学皮膚科で経験した revertant mosaicism を伴う遺伝性角化症

疾患名	遺伝形式	責任遺伝子	染色体	経験症例数
Ichthyosis with confetti type 1	AD	<i>KRT10</i>	17番染色体	2
Ichthyosis with confetti type 2	AD	<i>KRT1</i>	12番染色体	1
Loricrin keratoderma	AD	<i>LOR</i>	1番染色体	2

AD, 常染色体優性遺伝

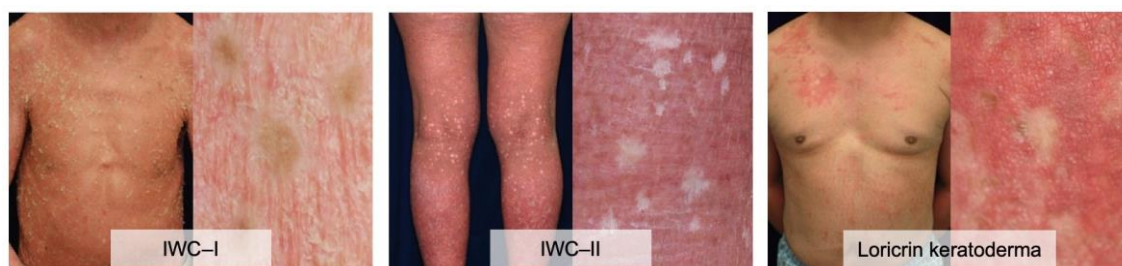


図3. 北海道大学皮膚科で経験した revertant mosaicism を伴う遺伝性角化症の臨床像

自己炎症性角化症としての *CARD14-associated papulosquamous eruption*

炎症性角化症とは表皮と真皮浅層の炎症によって表皮の過角化をきたす疾患群であり、乾癬や扁平苔癬など多くの疾患が含まれる (清水宏, 2018)。一方、近年遺伝的要因により自然免疫系の過剰活性化 (autoinflammation; 自己炎症) を生じることで発症する自己炎症性疾患の概念が提唱され、クリオピリン関連周期熱症候群、家族性地中海熱、tumor necrosis factor 受容体関連周期性症候群などの疾患が知られるようになってきている (Ben-Chetrit et al., 2018; Grateau et al., 2013; Manthiram et al., 2017)。2017 年にこの両方の特徴を有する新規疾患概念として「自己炎症性角化症 (autoinflammatory keratinization diseases: AiKDs)」が提唱され (Akiyama et al., 2017)、現時点では表 3 に示すような疾患がこの概念に含まれるとされている (Akiyama, 2020)。

CARD14 遺伝子がコードしている caspase recruitment domain-containing protein 14 (*CARD14*) はケラチノサイトで主に発現する足場分子であり、BCL10 や MALT1 と結合して *CARD14*-BCL10-MALT1 複合体を形成し、nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル伝達経路 (NF- κ B 経路) や mitogen-activated protein kinase シグナル伝達経路を調節していると考えられている (図 4) (Mellett, 2020; Ruland and Hartjes, 2019)。しかし、自然免疫応答や慢性炎症において *CARD14* がどのように制御され、活性化されるかについては、依然ほとんどわかっていない。2012 年に *CARD14* 遺伝子の機能獲得変異やバリエーションが家族性の乾癬や毛孔性紅色粗糠疹の原因となることが解明され (Fuchs-Telem et al., 2012; Jordan et al., 2012b, 2012a)、これまでの報告症例から限局的な落屑性紅斑を呈するものから全身の紅皮症を呈するものまで様々な臨床像をとることが知られてきている。またその他の所見として眼瞼の外反や掌蹠の過角化、また過角化に伴う手指関節の屈曲拘縮などの症状も挙げられる。表 3 のように臨床的に乾癬に類似するものと毛孔性紅色粗糠疹に類似するものを区別する傾向もあるが、2018 年には症状がオーバーラップする症例も考慮して *CARD14-associated papulosquamous eruption* (CAPE) という概念も提唱された (Craiglow et al., 2018)。いずれにしても図 5 のように *CARD14* 遺伝子の機能獲得変異を背景とした NF- κ B 経路の異常活性化が疾患の本体であり (Akiyama et al., 2017; Mellett, 2020)、その結果ケラチノサイトから放出される炎症性ケモカインと免疫応答のパターン、そしてそれに伴う皮膚の変化は乾癬で知られる炎症経路や皮膚変化に非常に類似すると考えられている。なお、AiKDs も遺伝性角化症に含まれるものであるが、CAPE を含め AiKDs と revertant mosaicism の関連は未だ報告されていない。

表 3. AiKDs に分類される炎症性角化症の一覧

疾患名	日本語病名	原因遺伝子
Pustular psoriasis and related disorders		
Generalized pustular psoriasis	膿疱性乾癬	<i>IL36RN</i> 変異 <i>CARD14</i> バリエント
Impetigo herpetiformis	疱疹状膿痂疹	<i>IL36RN</i> 変異
Acrodermatitis continua	稀留性肢端皮膚炎	<i>IL36RN</i> 変異
Palmoplantar pustular psoriasis (palmoplantar pustulosis)	掌跖膿疱症	<i>CARD14</i> バリエント
Pityriasis rubra pilaris (PRP)		
PRP type V	毛孔性紅色糠疹5型	<i>CARD14</i> 変異
PRP other types		<i>CARD14</i> バリエント
Keratosis lichenoides chronica	-	<i>NLRP1</i> 変異
Hidradenitis suppurativa	化膿性汗腺炎	<i>NCSTN</i> , <i>PSENEN</i> , <i>PSEN1</i> などの変異
Porokeratosis	汗孔角化症	<i>MVK</i> , <i>MVD</i> , <i>PMVK</i> , <i>FDPS</i> の変異

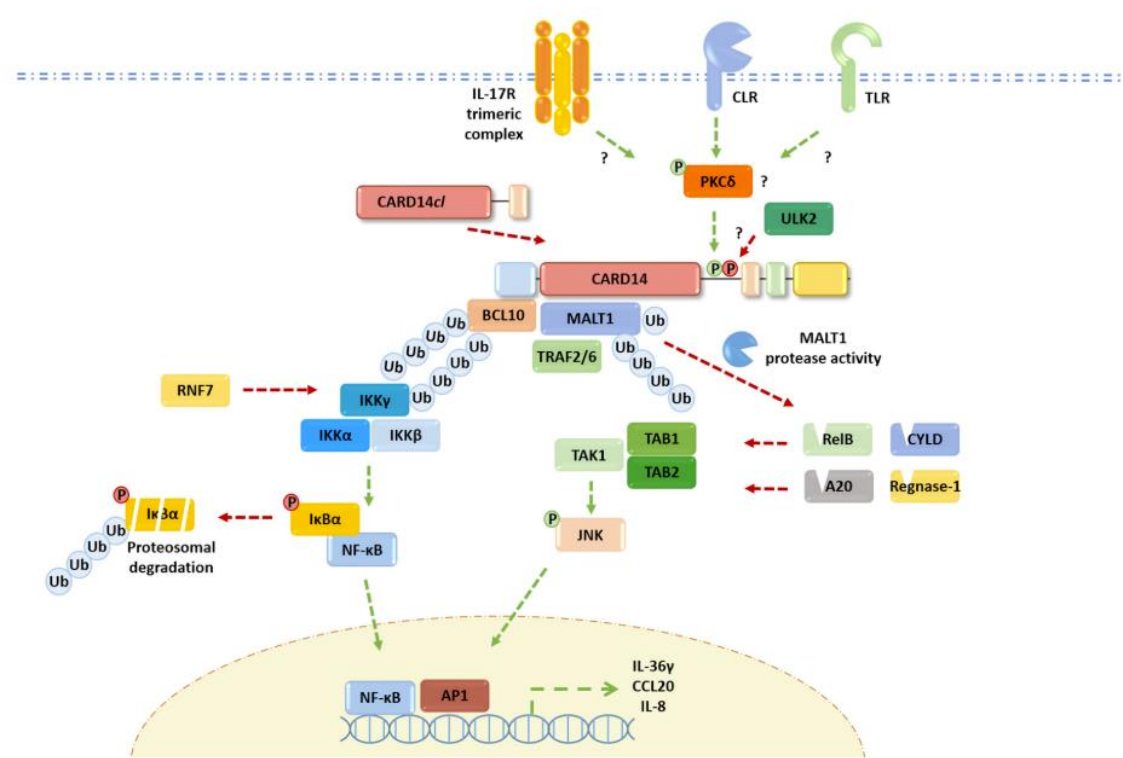


図 4. CARD14 と NF-κB シグナル伝達経路の関連 (Mellett, 2020 より抜粋)

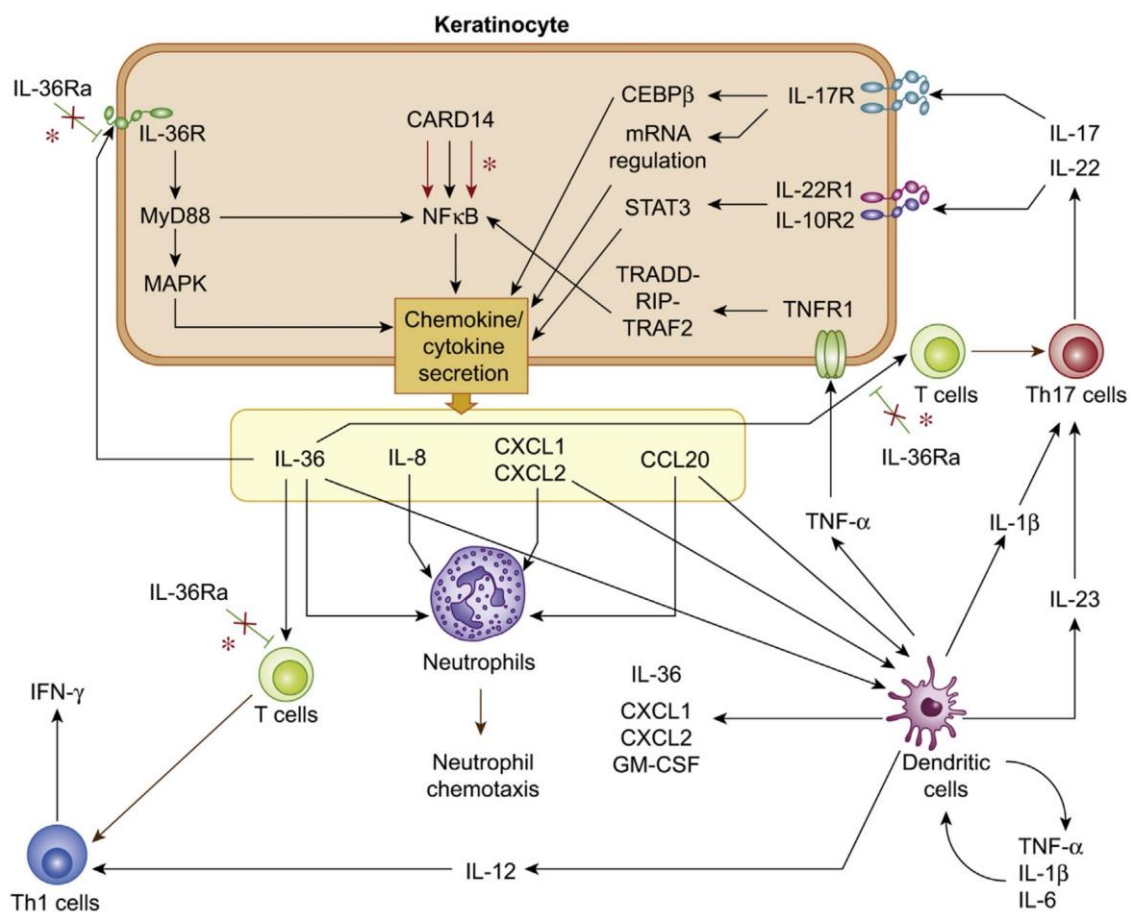


図 5. *CARD14* 変異に伴う NF-κB 経路活性化と自己炎症の経路 (Akiyama et al., 2017 から抜粋)

DNA 損傷と相同組換え

ヒトの DNA は紫外線や放射線、抗癌剤などの外的要因や、生物の代謝によって生じる活性酸素や DNA 複製のエラーなどの内的要因により日常的に様々な損傷を受けており、その頻度は 1 細胞あたり 1 日 50 万回程度発生するとも言われている。DNA 損傷のタイプ也多岐にわたり (Minten and Yu, 2019)、生物はその損傷タイプごとに専用の DNA 修復機能を備えている (図 6)。中でも DNA の 2 本鎖が同時に切断される DNA 二本鎖切断 (double-strand break, DSB) は、生物にとって最も重篤で、細胞死や細胞の癌化に繋がりうる DNA 損傷である (Khanna and Jackson, 2001; Minten and Yu, 2019)。

DSB の修復経路は図 6 にもあるように大きく 2 種類に大別される (Scully et al., 2019)。一つは非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) で切断された断端をそのまま連結させる修復方法である。どの細胞周期段階の細胞でも採用され、非常に迅速に働く修復経路であるが連結させる際に小さな欠損や挿入といった変異が入る可能性がある。もう一つは HR で相同性の高い DNA 配列をテンプレートとして修復する方法である。基本的には細胞周期の S/G2 期に限定して使用される方法で、修復にはやや時間を要するが正確に直すことが可能である (Symington and Gautier, 2011)。

HR の中にも図 7 にあるような複数の副経路があり、それぞれ synthesis dependent strand annealing (SDSA)、double Holliday junction (dHJ)、break-induced replication (BIR) と呼ばれる (Jasin and Rothstein, 2013; Kramara et al., 2018)。各経路の使い分けに関してはまだ不明な点も多いが、一般的には X 線などによる損傷の修復経路としては SDSA がほとんどで、一部で dHJ の形成に至ると考えられている。一方、停止複製フォークの修復 (再開) やクロスリンク損傷修復では dHJ が高頻度になるとされる。BIR は HR の一つではあるものの変異が入りやすい経路であるため、一般的にはあまり選択されない経路と考えられている (Kramara et al., 2018)。

HR のプロセスで DNA 末端の多くは DNA 複製により合成された姉妹染色分体の相同な配列に侵入して DNA 合成が進むと考えられる。一方、テンプレートとしては相同染色体が使用されることもあり、その場合は LOH という結果に至り、発癌やその進行 (Deng et al., 1996)、組織のリモデリング (Kakiuchi et al., 2020; Nanki et al., 2020)、そして上述のようなメンデル型遺伝病における復帰変異 (Nomura, 2020; Revy et al., 2019) に関与する可能性がある。

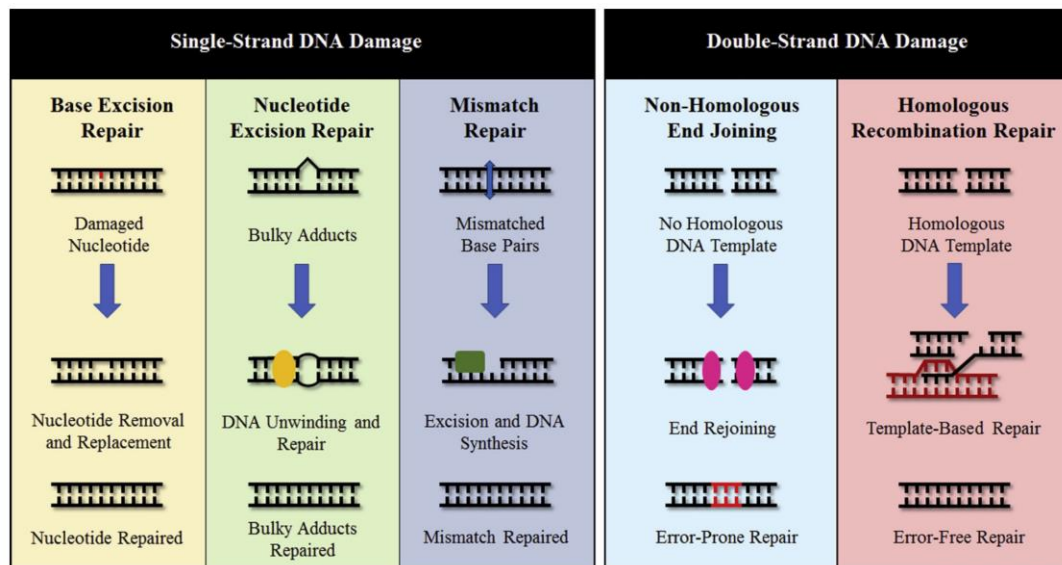


図 6. DNA 損傷の種類と修復経路 (Minten and Yu, 2019 から抜粋)

DNA 損傷は大きく 1 本鎖 DNA の損傷と 2 本鎖 DNA の損傷に分けられ、前者に関する修復経路は損傷の種類により base excision repair (塩基除去修復)、nucleotide excision repair (ヌクレオチド除去修復)、mismatch repair (ミスマッチ修復) 等があり、後者に関する修復経路には NHEJ と HR が挙げられる。

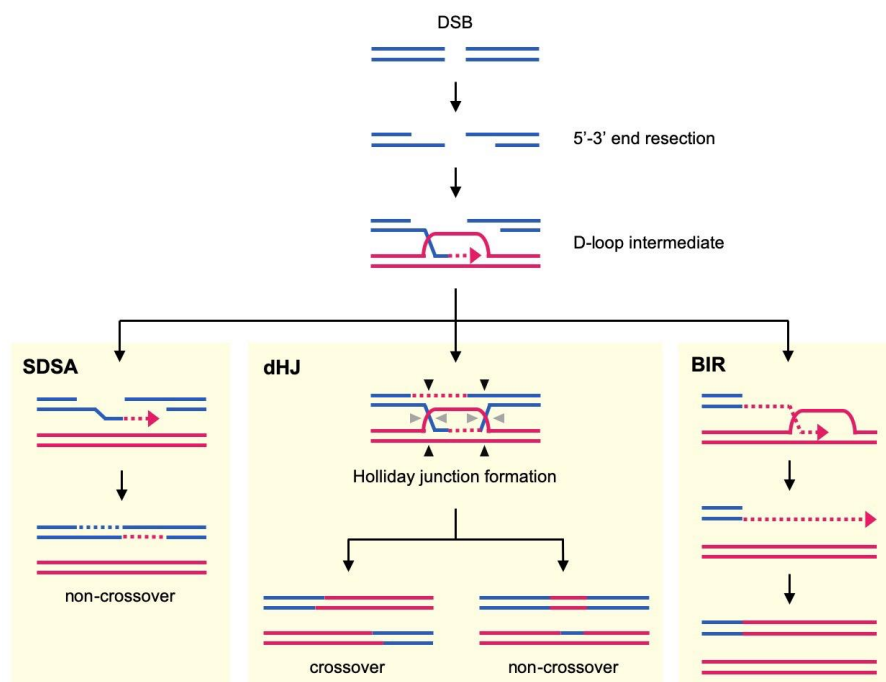


図 7. HR による複数の DSB 修復経路

DNA 複製と相同組換え

生物の基本単位である細胞はそれぞれが核を持ち、ヒトではその核内に染色体 23 対 46 本分のゲノム DNA を有している。増殖細胞ではこのゲノム DNA を正確に 2 倍に複製し、次世代の 2 個の娘細胞に同等に引き継ぐ必要がある。原則として親細胞と娘細胞の染色体数は同数に保たれ、この分裂方式は有糸分裂と呼ばれる。この有糸分裂をするための一連の過程である細胞周期は G1、S、G2、M 期から成り、DNA 複製が行われるのは S 期である。

DNA 複製は増殖細胞にとって欠かすことのできない細胞周期の一過程であり、複製の適切な制御はゲノムの安定性に必須である。真核生物、特にヒトなどの哺乳類では複製すべきゲノムのサイズが大きいため、ゲノム上に複製が始まる起点 (複製開始点、複製起点) が複数あり、同時多発的に複製を行って一定の時間で複製を完了するシステムを持っている。さらに、休眠複製開始点と呼ばれる予備の複製開始点も備わっており、複製が停止した際に活性化されて複製を継続させるのに役立つとされる (図 8) (Alver et al., 2014)。

DNA 複製ではゲノム上の複製開始点で二本鎖 DNA が一本鎖に分離して、Y 字型の複製フォークが複製開始点の両側に 1 つずつ形成される。複製フォークでは DNA ポリメラーゼや DNA ヘリカーゼなどを含む巨大なタンパク質集合体 (レプリソーム) が DNA 合成を進めるが、この合成は様々な原因により進行が阻害されることが知られている。dNTP の枯渇、DNA 鎖架橋、DNA 高次構造、反復配列、DNA ポリメラーゼの機能不全、RNA-DNA ハイブリット形成、がん遺伝子の活性化、染色体構造などが要因として挙げられ (図 9)、これらを総称して「DNA 複製ストレス」と呼ぶ (Zeman and Cimprich, 2014)。

複製ストレスにより停止した複製フォークが複製を再開させる方法は複数存在するが、その方法の選択は停止した時間とその時の複製フォークの状態に依存すると考えられている (Mizuno et al., 2013; Neelsen and Lopes, 2015; Petermann and Helleday, 2010; Petermann et al., 2010)。複製フォークが停止すると、レプリソームはその原因となった障害が取り除かれるまで S 期チェックポイントにより複製フォークの場所で保護される。停止時間が短時間の場合、障害が取り除かれた後に DNA 合成はすぐに再開される。一方、停止時間が長時間に渡り、レプリソームが複製フォークから離れてしまった場合、あるいはレプリソームが離れた上に DNA 鎖が切断されて複製フォークが崩壊してしまった場合には複製の再開に HR を必要とする。まだ切断されていない場合には複製フォークの後退 (regression) や 逆転 (reversal) といったステップを経てチキンフット構造を形成した後に HR を生じる (Neelsen and Lopes, 2015)。また切断されて DSB 末端が 1 ヶ所生じる場合 (one broken end) は休眠複製開始点からのレス

キューも加わった上で、最終的に HR を生じて複製を再開すると考えられている (Petermann and Helleday, 2010)。実験的に上述のような複数のパターンが考えられているが、実際にはその使い分けや制御のメカニズムは依然不明な点が多い。

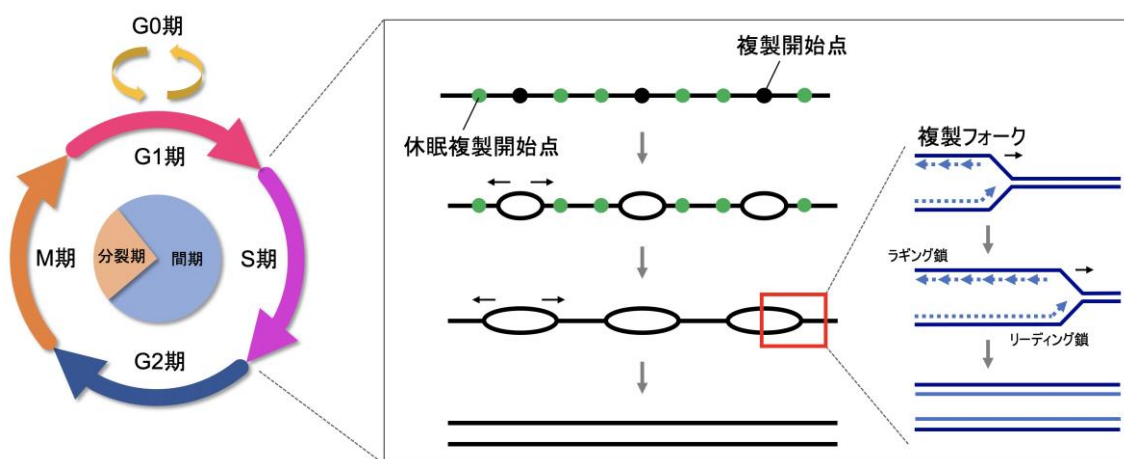


図 8. 細胞周期と S 期における DNA 複製

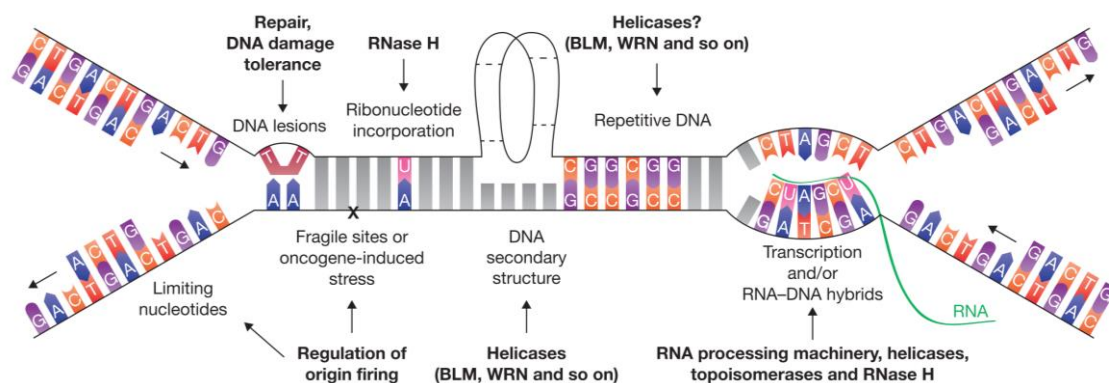


図 9. 種々の DNA 複製ストレス (Zeman and Cimprich, 2014 より抜粋)

本研究の目的

種々の遺伝性疾患が存在するが、そのほとんどで有効な治療がなく、対症療法が主体である。そんな中、**revertant mosaicism** は疾患が体内の一部で自然に治癒する現象であり、その機序の解明は革新的な治療の開発につながる可能性も秘めている。

今回我々は *CARD14* 遺伝子変異で発症する CAPE の 2 症例において **revertant mosaicism** を疑う臨床所見を見出し、その分子生物学的な解析を行うとともに、DNA 損傷・損傷修復や DNA 複製・複製ストレス反応といった観点から変異型 *CARD14* がゲノム DNA へもたらす影響を解析し、変異消失の機序に迫ることを目的とした。

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. 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、あるいは Integrated DNA Technologies 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。

1-2. アガロースゲルによる電気泳動

アガロースゲルはアガロース (Agarose 1200, ピーエイチジャパン) を 0.5 $\times$ TBE buffer (Tris-Borate-EDTA Buffer Power pH8.3, Takara) で溶解させ作製した。ゲル濃度は目的の DNA サイズに合わせ 0.8-2% で調整した。核酸溶液の一部をパラフィルム上で 6 $\times$ loading buffer (Takara) と混合させた後、電気泳動装置 Mupid[®]-ex (Mupid) にセッティングしたアガロースゲルのウェルへ入れ、100 V 下で 40 分間泳動した。0.5 μ g/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) 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。

1-3. 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 $^{\circ}$ C 1 分間、(95 $^{\circ}$ C 10 秒間 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C 5 秒間 $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 4 分間) $\times$ 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 μ l、125 mM EDTA (pH8.0) 2.5 μ l、エタノール 25

μl を加え、PCR プレートに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、パラフィルムのシールを剥がし、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%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。

1-4. 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, 2 分間) 後、急冷し、ABI PRISM® 3130xl 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 (3130xl/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 3130/3130xl Genetic Analyzers (Thermo) を使用した。

1-5. 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 μl とした。

1-6. エタノール沈殿

核酸溶液 100 μl に Quick-Precip™ Plus Solution (Edge BioSystems) 12 μl、エタノール 200 μl を順に加え、10 秒間ボルテックスミキサーで混合して室温下、18000×g、5 分間遠心し、上清を除去した。続いて、70%エタノール溶液を 500 μl 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×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, Waken) で 5 分間、減圧乾燥させ、最終的に 10 μl の脱イオン水 (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo) で核酸ペレットを溶解させた。

1-7. 核酸の制限酵素処理

核酸の制限酵素処理は全て 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。37°C 下で 1 時間静置し、制限酵素処理を行った。

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) 20000 倍希釈液で 30 分間染色した。Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator (Thermo) で目的サイズのバンドを確認したうえで、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°C 下で 30 分間静置した。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°C のウォーターバスで 40 秒間加温して氷で急冷した。2 分間の氷上静置後、37°C に加温した SOC medium (GeneMark) を 250 µl 加え、37°C 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°C 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°C 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 の割合となるよう水で溶解し、121°C 下で 15 分間オートクレーブ滅菌) に BD Bacto™ agar (BD Biosciences) を 1.5% 加え、121°C 下、15 分間オートクレーブ滅菌後、70°C 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) 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。

1-10. ベクターのトランスフェクション

1-10-1. LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent (Thermo) を用いた方法

1-10-1-1. フォワード法

トランスフェクションの 12-24 時間前に 96 ウェルプレートへ細胞を播種して用意した。Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Thermo) 5 μ l と Lipofectamine 3000 Reagent 0.3 μ l、また Opti-MEM I Reduced-Serum Medium 5 μ l、プラスミド DNA 0.2 μ g と P3000 Reagent 4 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でさらに 5 分間静置し、全量を前培養した細胞 (培地量 100 μ l) に添加した。24 時間後に一度培地を交換し、実験内容に合わせてさらに培養を継続した。上記反応系は 96 ウェルプレートの 1 ウェル分に相当し、使用するプレートやウェル数に合わせて適宜用量調整を行った。

1-10-1-2. リバース法

1-10-1-1 と同じ反応系・手順でプラスミドコンプレックスを用意し、同時に適量の細胞溶液 (培地量 100 μ l) も用意した。プラスミドコンプレックスと細胞溶液を混和し、96 ウェルプレートへ細胞を播種して培養を開始した。1-10-1-1 と同様、使用するプレートやウェル数に合わせて適宜用量調整を行った。

1-10-2. XfectTM Transfection Reagent (Clontech) を用いた方法

トランスフェクションの 12-24 時間前に 24 ウェルプレートへ細胞を播種して用意した。1.5 ml 容チューブ内に用意した Xfect Reaction Buffer 25 μ l にプラスミド DNA 1 μ g を加え、5 秒間ボルテックスした後、Xfect Polymer を 0.3 μ l 加え、さらに 10 秒間ボルテックスした。室温で 10 分間静置した後、全量を前培養した細胞 (培地量 250 μ l) に添加した。24 時間後に一度培地を交換し、実験内容に合わせてさらに培養を継続した。上記反応系は 24 ウェルプレートの 1 ウェル分に相当し、使用するプレートやウェル数に合わせて適宜用量調整を行った。

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

血液は文書での同意のもと、患者のゲノム DNA を抽出するために採取した。血液凝固を防ぐため EDTA 2 カリウム入り採血管を使用し、採血後は 4°C 下で保管、1 週間以内に DNA を抽出した。

2-1-2. 唾液

唾液は文書での同意のもと、患者のゲノム DNA を抽出するために採取した。採取前に 30 分以上食事を控えてもらったうえで、唾液 DNA 抽出キット (Oragene®・DISCOVER, 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

皮膚は文書での同意のもと、1%キシロカインで局所麻酔し、3 mm から 5 mm のパンチ (デルマパンチ®, Nipro) で採取した。採取した皮膚検体は生理食塩水で洗浄後、病理組織学検査用、DNA 抽出用、RNA 抽出用にメスで分割した (図 10)。

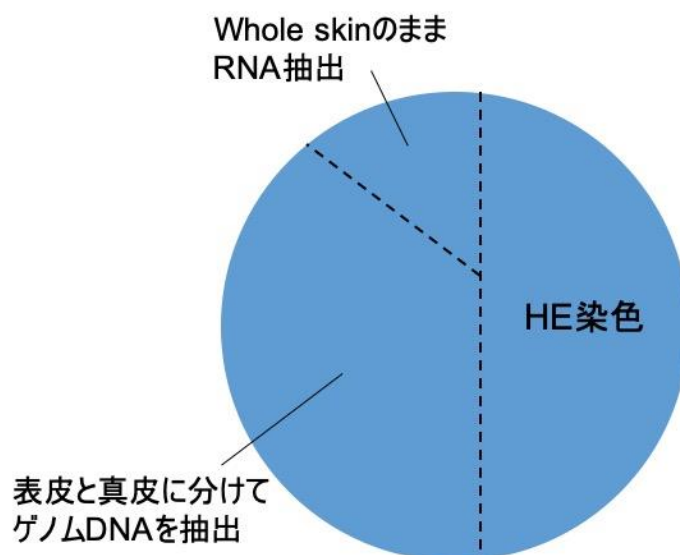


図 10. 皮膚検体の分割図

2-1-3-1. 病理組織学検査用サンプル

分割後すぐに 10%中性緩衝ホルマリン (Muto) に浸し、室温で保管した。

2-1-3-2. DNA 抽出用サンプル

表皮と真皮に分けて保存する必要があるため、皮下脂肪と余分な真皮成分をメスで除去したうえで 3.8%チオシアン酸アンモニウム溶液 (PBS)* が 500 μ l 入った 2.0 ml 容マイクロチューブに入れた (Clemmensen et al., 2009)。室温下で 20 分間静置後、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、QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) に付属する Buffer ATL 180 μ l を入れた 2.0 ml 容マイクロチューブに入れて -80°C で凍結保存した。

*3.8%チオシアン酸アンモニウム溶液 (PBS)

Ammonium thiocyanate (Sigma) を 3.8%になるように phosphate buffered saline (PBS, Nacalai) に溶解し、121℃下で 15 分間オートクレーブ滅菌して、さらにフィルター滅菌 (0.22 μm) した。

2-1-3-3. RNA 抽出用サンプル

RNeasy Mini Kit (Qiagen) に付属する Buffer RLT (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) 600 μl を入れたビーズ入りチューブ (2.0ML 滅菌破砕用チューブ ジルコニアビーズ入り, Sarstedt) に検体が完全に浸るように入れ、 -80°C で保管した。

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°C (長期間使用しない場合は -80°C) 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°C 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%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 分間風乾したのちに脱イオン水で溶解した。NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer を用いて濃度を測定した後、 4°C (長期間使用しない場合は -80°C) で保管した。

2-2-3. 表皮または真皮からのゲノム DNA 抽出

QIAamp DNA Micro Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。なお、RNase A (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の Buffer AE で行った。NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer を用いて濃度を測定した後、 4°C (長期間使用しない場合は -80°C) で保管した。

2-2-4. RNA 抽出

-80°C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、14000 rpm で 3 分間遠心後、上清を 1.5 ml 容チューブへ回収した。この後は RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、最終的な溶出はキットに付属の DNase/RNase free water 50 µl で行った。なお、本研究では表皮と真皮の両成分を含む皮膚検体から RNA を抽出した。

3. 患者皮膚の病理組織学的解析

3-1. パラフィンプロック作製

ホルマリン液に浸して保管した皮膚サンプル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、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 槽、キシレン 1 時間×3 槽、パラフィン 1 時間×3 槽とした。

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 µm の切片を作製し、プレパラートに付着させ、乾燥・固着させた。

3-3. 皮膚切片のヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色

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ジンで染色し、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 (BX50, Olympus) で実施し、画像はデジタルカメラ (DP73, Olympus) により取得した。

4. サンガー法による *CARD14* 変異解析

4-1. PCR によるエキソン領域の増幅

PCR によって *CARD14* のコード領域のエキソン領域とエキソン・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) 0.5 µl、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo) 7.5 µl、GC enhancer (Thermo) 1.5 µl、forward および reverse プライマーをそれぞれ 1.2 µl、脱イオン水 3.1 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：96℃ 10 分間、(96℃ 30 秒間 → 60℃ 30 秒間 → 72℃ 1 分間) ×35 サイクル、72℃ 5 分間で反応させ、各領域を増幅させた。

表 4. *CARD14* の遺伝子変異検索に用いたプライマー

プライマー名	ターゲット	配列(5'→3')	Tm* (°C)	増幅断片長 (bp)
変異解析用プライマー				
CARD14ex2-F1	exon 2	TAAAACGGTGTCAACCCTGGC	59	380
CARD14ex2-R1		AAGACAGAGGCAGACAGTGG	58	
CARD14ex3-F1	exon 3	TTGGTAGCTGGGTTCTGCCC	60	232
CARD14ex3-R1		CCTGAGGTTCTAGAAAGTGC	56	
CARD14ex4_F1	exon 4	CTGCCCCACCTATTACCTCCC	58	466
CARD14ex4_R1		TTCCAGGGAGATGGACCAGC	59	
CARD14ex5-F1	exon 5	TCAGGGGAGAAGCTGTTTCC	56	298
CARD14ex5-R1		CCTGTCAGAAACCCACAGC	59	
CARD14ex6-F1	exon 6	TTCTCGGGATTCTGCTTGCC	58	253
CARD14ex6-R1		TCCGCACCCCTGAGACAAGC	63	
CARD14ex7-F1	exon 7	TTCTAAGGCCAGACCCTCAG	56	265
CARD14ex7-R1		ACGAGACTGTCCCCGGAACC	62	
CARD14ex8-F1	exon 8	CTCTCCTTCTCTAGCTGAGG	55	285
CARD14ex8-R1		AGCTCTGTCCCACTGTCACC	60	
CARD14ex9-F1	exon 9	AACTCCACGGGCCTCAAAGC	62	258
CARD14ex9-R1		TTCGTCTGACAGAGAGGCC	59	
CARD14ex10-F1	exon 10, 11	AAGGGAGGAGTCTCAGGGTG	60	599
CARD14ex11-R1		CGGCTTTCTCATCAGCTCCC	59	
CARD14ex12-F1	exon 12, 13	CAAGATCTGTGAAGAAGGGG	54	673
CARD14ex13-R1		TGAAGTCTGCCTGGGTCACC	60	
CARD14ex14-F1	exon 14	CAGCGCCTTCTGTCTTCTGG	61	270
CARD14ex14-R1		AACCACCAGGGACTTAAGGG	59	
CARD14ex15-F1	exon 15	CTGCAACCTTCCTCGCAGAG	61	366
CARD14ex15-R1		TGGGTGCCATTTCCCTGTGG	60	
CARD14ex16-F1	exon 16, 17	TCTCCCCTGCTCGGCTCTCC	63	675
CARD14ex17-R1		GACCAACTAGCAGCAGCTCC	58	
CARD14ex18-F1	exon 18, 19	TGCAGTGAGCAAAGCAGACC	59	785
CARD14ex19-R1		ATCCCCCTCCTCTGCATTCC	60	
CARD14ex20-F1	exon 20	CGTTGGCTCCCTTTGCTTCC	60	272
CARD14ex20-R1		AGAGCACACTCCAGAGGCAC	61	
CARD14ex21-F1	exon 21	ATCACTACCCTAGCCAGGGC	60	353
CARD14ex21-R1		TGGGCTGAGGAACAGGACTG	59	
イントロン3のSNP検索用プライマー				
CARD14ex3-F1	exon 3/	TTGGTAGCTGGGTTCTGCCC	60	886
CARD14ex3-R2	intron 3	CCTCCTCGGTAGCTGAAATG	57	

*T_m: melting temperature

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 2.5 μ l に脱イオン水 1.5 μ l、ExoSAP-IT[®] For PCR Product Clean-UP (Affymetrix) を 0.5 μ l を 0.2 ml 容 PCR プレートに調製し、37°C 15 分間 → 80°C 15 分間で反応させ、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、シーケンス反応には表 4 のプライマーを全て使用した。

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. 全ゲノム SNP アレイ解析

全ゲノム SNP アレイ解析は Affymetrix[®] CytoScan[™] HD Array (Affymetrix) を用いてゲノム全域にわたる single nucleotide polymorphism (SNP) をマイクロアレイで検出する実験 (網羅的コピー数変異解析) である。調べる配列は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体または一部のコピー数や組成が増減することを指す。本研究で用いたサンプルを表 5 に示す。いずれも患者皮膚検体から分離した表皮由来ゲノム DNA を解析に使用した。

表 5. 全ゲノム SNP アレイ解析を行ったサンプル一覧

サンプル名	ゲノムDNA 濃度 (ng/ μ l)	臨床所見	部位
症例 1			
Case1_affect_epi_gDNA	25	病変皮膚	左前腕
Case1_Rev1_epi_gDNA	15.2	正常化皮膚スポット	左前腕
Case1_Rev2_epi_gDNA	33.79	正常化皮膚スポット	左前胸部
Case1_Rev3_epi_gDNA	320.3	正常化皮膚スポット	右頸部
Case1_SCC1_epi_gDNA	60.2	小結節	左頸部
Case1_SCC2_epi_gDNA	19.3	小結節	右後頸部
症例 2			
Case2_affect_epi_gDNA	108.6	病変皮膚	左大腿
Case2_Rev1_epi_gDNA	51.8	正常化皮膚スポット	左大腿
Case2_Rev2_epi_gDNA	24.2	正常化皮膚スポット	左大腿
Case2_Rev3_epi_gDNA	38.3	正常化皮膚スポット	左下腿

5-1. 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 80-100 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 11)。

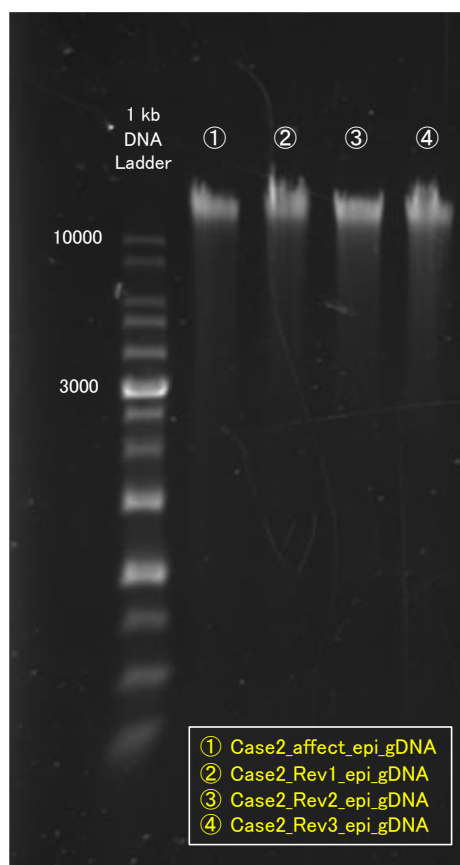


図 11. アガロースゲルによる電気泳動画像 (症例 2 から採取した 4 サンプル)

Case2_affect_epi_gDNA は病変皮膚の表皮から抽出したゲノム DNA、Case2_Rev1_epi_gDNA、Case2_Rev2_epi_gDNA、Case2_Rev3_epi_gDNA は正常化皮膚スポット (revertant spot #1/ #2/ #3) の表皮から抽出したゲノム DNA を指し、いずれのサンプルも 80 ng/lane で電気泳動を実施した。

5-2. 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 量が 250 ng となる液量を取り、微量濃縮遠心機を用いて容量が 5 μl になるまで減圧下で遠心した。

5-3. 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。

5-3-1. ゲノム DNA 切断および増幅

5-3-1-1. *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 分間とした。

5-3-1-2. ライゲーション

キットに付属の *Nsp* I を用いてゲノム DNA を断片化し、アダプター (50 μM Adaptor *Nsp* I) とのライゲーション反応を行った。なお、反応条件は 16°C 3 時間 → 70°C 20 分間とした。

5-3-1-3. 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) 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 分間、(94°C 30 秒間 → 60°C 45 秒間 → 68°C 15 秒間) × 30 サイクル、68°C 7 分間で反応させた。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。

5-3-2. 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 を用いて濃度を測定した。

5-3-3. 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 分間 → 95°C 15 分間 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 分間 反応させて DNA の末端をビオチン標識した。

5-3-4. 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 分間 → 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、60 rpm で 16 時間ハイブリダイゼーションした。

5-3-5. 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。

5-3-6. 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。

5-4. 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 の検出を行った。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。

6. 実験用ベクター

6-1. 本研究で用いたベクター

本研究では実験内容に合わせ下記ベクターを使用した (表 6)。CARD14 一過性発現実験用の p3FLAG-CARD14wt、p3FLAG-CARD14_M119T、p3FLAG-CARD14_Q136L、CARD14 発現細胞株の作製用の pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14wt、pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14_M119T、pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14_Q136L、NF- κ B ルシフェラーゼレポーターアッセイ用の pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]はいずれも北海道大学皮膚科で以前に作製し、保管されていたベクターを使用した。その他、pCMV-Tet3G、pTRE3G-Luc は Clontech 社 (Tet-On[®] 3G Inducible Expression System に付属)、pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]は Promega 社、pCMV4-3 HA/I κ B-alpha、pDRGFP、pCBASceI は Addgene 社、pEGFP-C2 はタカラバイオ社から購入したものを使用した。

表 6. 本研究で使用したベクターの一覧

ベクター	プロモーター	発現タンパク	変異情報	保管・購入先情報
CARD14一過性発現実験				
p3FLAG-CARD14wt	CMV	CARD14	なし	北海道大学皮膚科保管
p3FLAG-CARD14_M119T	CMV	CARD14	c.356T>C (p.Met119Thr)	北海道大学皮膚科保管
p3FLAG-CARD14_Q136L	CMV	CARD14	c.407A>T (p.Gln136Leu)	北海道大学皮膚科保管
CARD14発現誘導細胞株の樹立				
pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14wt	TRE3G	CARD14	なし	北海道大学皮膚科保管
pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14_M119T	TRE3G	CARD14	c.356T>C (p.Met119Thr)	北海道大学皮膚科保管
pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14_Q136L	TRE3G	CARD14	c.407A>T (p.Gln136Leu)	北海道大学皮膚科保管
pCMV-Tet3G	CMV	Tet-On 3G	なし	Clontech
pTRE3G-Luc	TRE3G	Fluc	なし	Clontech
pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]	hPGK	Fluc	なし	北海道大学皮膚科保管
NF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイ				
pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]	minP	Nluc	なし	Promega
pCMV4-3 HA/I κ B-alpha	CMV	I κ B α	なし	Addgene
pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]	hPGK	Fluc	なし	北海道大学皮膚科保管
DR-GFP assay				
pDRGFP	CAG	EGFP	I-Sce siteあり	Addgene
pDRGFPwt	CAG	EGFP	なし	本研究で作製
pCBASceI	CAG	SCEI	なし	Addgene
pEGFP-C2	CMV	EGFP	なし	Takara

6-2. pDRGFPwt ベクターの作製

DR-GFP assay (詳細は後述) において enhanced green fluorescent protein (EGFP) 発現のコントロールベクターとして使用する目的で pDRGFP と pEGFP-C2 を元に pDRGFPwt を作製した。

6-2-1. EGFP の増幅および制限酵素処理

AmpliTaq Gold® 360 Master Mix 25 µl、GC enhancer 5 µl、forward プライマー :
EGFP_Bam_start_F (5'-AATGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAG-3') 4 µl、reverse
プライマー : EGFP_Not_end_R (5'-
CTGGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3') 4 µl、pEGFP-C2 (100
ng/µl) 1 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 分間、(96°C 30 秒間 → 60°C 30 秒間 → 72°C 1 分間) × 35 サイクル、72°C
7 分間で反応させ *EGFP* を増幅させた。この増幅で *EGFP* の 5'末端側には *Bam*HI 認
識配列、3'末端側には *Not*I 認識配列が挿入された。続いて、PCR 産物をカラム精製
し、*Bam*HI および *Not*I 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 (【*Bam*HI-*EGFP*-*Not*I (インサート_1)】)。

6-2-2. pDRGFP の制限酵素処理

購入した pDRGFP (8646 bp) 5 µg を *Apa*I および *Not*I で切断後、切り出された 2 種
類の断片 (6750 bp と 1896 bp) を分離・精製した。6750 bp の断片は *EGFP* 配列を取
り除いた領域であり、この精製産物を【pDRGFP-*Apa*I-*Not*I (ベクター)】とした。一
方、1896 bp の断片は、その精製産物全量を *Bam*HI でさらに切断し、1155 bp と 741
bp の断片に切り出した上で、1155 bp の断片のみ精製した (【*Apa*I-NLS-*Bam*HI (イン
サート_2)】)。

6-2-3. 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

上述のように作製した 3 断片 (【pDRGFP-*Apa*I-*Not*I (ベクター)】、【*Bam*HI-*EGFP*-
*Not*I (インサート_1)】、*Apa*I-NLS-*Bam*HI (インサート_2)】) を連結し、大腸菌に導入
してクローニングした。方法は 1-9. に準じて行ったが、インサートが 2 種類あるため
反応系はベクター 0.5 µl、インサート_1 1.5 µl、インサート_2 3 µl、2×ligation Mix 5 µl
に調整した。抽出したプラスミド DNA 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確認し、次の実験に用いた。なお、シーケンシ
ングで使用したプライマーは *Chicken_pro_TATA_F* (5'-CGGCAGCCAATCAGAG-3')、
pDRGFP_seq_F1 (5'-CTCCTCCGGGCTGTAATTAG-3')、pDRGFP_seq_F2 (5'-
GCTGGTTATTGTGCTGTCTC-3')、pDRGFP_seq_R1 (5'-
GTGTTCTGCTGGTAGTGGTC-3')、pDRGFP_seq_R2 (5'-
AGCTTCAGATTAAACGCTTAC-3')であった。

7. 細胞培養

7-1. 使用する細胞株

細胞実験にはヒト骨肉腫細胞株である U2OS 細胞 (ATCC) とヒト表皮角化細胞株で

ある HaCaT 細胞 (CLS Cell Lines Service) を使用した。前者は DNA 損傷や細胞周期等の実験系でよく使用されている細胞株であり、本研究でも採用した。

7-2. 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、加湿条件で実施した。

培地は DMEM, 4.5g/L, Glucose, L-Glutamine, without Sodium Pyruvate (Nacalai) に Fetal Bovine Serum (Sigma) を 10%、Antibiotic Antimycotic Solution 100× (Sigma) を 1% 添加したものを使用した。薬剤セレクションを要する細胞株の培地には G418 二硫酸塩 (Sigma) や puromycin (Gibco)、あるいは両者を添加して使用した (詳細は後述)。

細胞を維持するための培養は 100 mm×20 mm セルカルチャーディッシュ (10 cm ディッシュ) (Falcon® 100 mm TC-treated Cell Culture Dish, Corning) を使用した。継代時の細胞播種量は 0.5×10⁶ 個/dish とし、コンフルエントになった時点で次の継代を行った。

継代はまず培地を除き、PBS で洗浄後、Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA・4Na, Gibco) 1 ml を入れ、37°C 下で 8 分間静置した。トリプシン処理後、軽く震盪させて細胞をディッシュから剥離し、培養培地を 10 ml 入れてトリプシンを不活性化させた。室温下、200×g で 3 分間遠心後、上清を除去し培養培地 3 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、0.5×10⁶ 個を次のディッシュに播種した。

上述のように細胞を維持・継代し、実験内容に合わせて適宜下記ディッシュ、プレート、スライドへ細胞を播種して実験用サンプルを用意した。

- 6 cm ディッシュ: Falcon® 60 mm TC-treated Cell Culture Dish (Corning)
- 6 ウェルプレート: Falcon® 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Corning)
- 12 ウェルプレート: Falcon® 12-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Corning)
- 24 ウェルプレート: Falcon® 24-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Corning)
- 96 ウェルプレート: Falcon® 96-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Corning)
- 96 ウェルプレート (白色): Falcon® 96-well White Flat Bottom TC-treated Microtest Assay Microplate (Corning)
- 8 ウェルチャンバースライド: Nunc™ Lab-Tek™ 8-well Chamber Slide w/ removable wells (Thermo)

- 35 mm ディッシュ: μ -Dish 35mm high (高ウェル壁) 2ml 未コーティング (日本ジェネティクス)

7-3. 細胞への X 線照射と薬剤刺激

本研究では DNA 損傷や DNA 複製阻害への反応を見るために X 線照射や薬剤処理に伴う細胞の変化を観察した。

7-3-1. X 線照射

24 ウェルプレートで培養中の細胞へ MBR-1520R-3 (HITACHI) を使用して X 線照射 (5 Gy) を行った。この時、培地量は 1 ml としてプレートカバーは外し、機器の設定は【管電圧 150 kV, 管電流 20 mA, 焦点テーブル面距離 350 mm, フィルター 1 mm AL (アルミニウム板)】とした。照射後、すぐにプレートカバーをセットし、サンプル回収のタイミングまでインキュベーターで培養を継続した。

7-3-2. エトポシド

24 ウェルプレートで培養中の細胞へエトポシド (Sigma) を加えて DNA 損傷を誘導した。過去の文献 (Tamaro et al., 2013) を参考に、終濃度が 10 μ M、あるいは 250 μ M になるように添加して必要時間培養を継続した。

7-3-3. ヒドロキシウレアとアフィディコリン

24 ウェルプレート (ウエスタンブロッティング用サンプル調製)、あるいは 6 ウェルプレート (フローサイトメトリー用サンプル調製) で培養中の細胞へ複製ストレス因子としてヒドロキシウレア (Hydroxyurea, HU, Sigma)、あるいはアフィディコリン (Aphidicolin, APH, Sigma) を添加し、DNA 複製を停止させた。実験に際し、前者は終濃度 2 mM、後者は 2 μ g/mL になるように添加して必要時間培養を継続した。

8. 蛍光免疫染色による CARD14 の局在評価

変異に伴い細胞内での局在が変化するかどうか U2OS 細胞、HaCaT 細胞を用いて検証した。なお、免疫染色で使用した抗体は以下の通りである (表 7)。

表 7. 免疫染色に使用した抗体一覧

ターゲット	宿主	メーカー	製品番号	希釈倍率
1次抗体				
FLAG	mouse	Sigma-Aldrich	F3165	1:1000
2次抗体				
Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG	goat	Thermo Fisher Scientific	A11001	1:100
Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG	goat	Thermo Fisher Scientific	A21244	1:100
F-アクチン染色				
Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin	-	Thermo Fisher Scientific	A12379	1:40

8-1. U2OS 細胞における CARD14 発現

U2OS 細胞の染色はコラーゲンコート*した 8 ウェルチャンバースライドを用いて実施した。まず細胞を 0.8×10^5 個/well で播種し、24 時間後に 1-10-2 の方法で p3FLAG-CARD14wt、p3FLAG-CARD14_M119T、p3FLAG-CARD14_Q136L をトランスフェクションしてさらに 24 時間培養した。培養後、培地を除去して氷冷した PBS で 2 回洗浄し、氷冷した 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA, Wako) を 400 μ l 添加後、4°C 下で 10 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後、氷冷した 0.5% TritonX-100 溶液 (PBS) (Sigma) を 400 μ l 添加して 10 分間静置した。さらに PBS で 2 回洗浄後、3% bovine serum albumin (BSA, Wako) (PBS) で 1% に希釈した DAPI 溶液 (1 mg/ml, Sigma) を 400 μ l 添加し、37°C 下で 30 分間遮光静置し、ブロッキング・核染色を行った。PBS で 1 回洗浄後、チャンバーを取り外し、3% BSA で希釈した抗 FLAG 抗体 (1 次抗体) を 60 μ l 加え湿潤条件で 37°C 下、1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、3% BSA で希釈した 2 次抗体液を 60 μ l 加え湿潤条件で 37°C 下、30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、軽く水分を取り除き封入剤 PermaFluor (Thermo) を滴下し、カバーガラスをのせて、4°C 下で固化させた。作製した免疫染色標本は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000, Olympus) で観察および画像取得した。

U2OS 細胞での染色は実験内容に合わせ、35 mm ディッシュでも実施した。この場合細胞を 2×10^5 個/well で播種して準備し、以降は上記と同様の方法を取った。蛍光観察はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE) で実施し、画像取得した。

*コラーゲンコート

0.1% コラーゲン (Collagen from calf skin, Sigma) を滅菌水で 10 倍希釈した溶液 (0.01% コラーゲン溶液, 0.1 μ g/ μ l) を 6~10 μ g/cm² になるよう滅菌水とともに滴下し 4°C 下で一晩静置した。アスピレーターを用いてコラーゲン溶液を除去し、クリーンベンチ内で一晩風乾した。風乾後、パラフィルムできつく密閉し、-30°C で保管した。PBS で 3 回洗浄してから使用するようにした。

8-2. HaCaT 細胞における CARD14 発現

HaCaT 細胞の染色は 35 mm ディッシュを用いて実施した。まず細胞を 1×10^6 個/dish で播種し、12 時間後に 1-10-1-1.の方法で p3FLAG-CARD14wt/ M119T/ Q136L をトランスフェクションし、さらに 24 時間培養した。以降は 8-1.と同様の方法で染色を実施した。作製した免疫染色標本はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE) で観察および画像取得した。

8-3. F-アクチン染色

CARD14 の局在を観察する際、一部の実験では F-アクチンの染色も同時に行い、細胞形態と併せて観察した (35 mm ディッシュを使用)。F-アクチンの染色には表 7 中の Phalloidin を使用し、8-1.に記載した行程中の 1 次抗体反応と 2 次抗体反応の間で実施した。1 次抗体液を PBS で洗浄後、3% BSA で希釈した Phalloidin 溶液を 150 μ l 加え湿潤条件で 37°C 下、20 分間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄して 2 次抗体反応へ進んだ。

9. 実験用細胞株の作製

9-1. Tet-On 3G 安定発現細胞株の作製

Tet-On[®] 3G Inducible Expression System を用いて、ドキシサイクリン (doxycycline, Dox, Clontech) 存在下でのみ CARD14 を高レベルに発現する U2OS 細胞株を作製することとし、まずは Tet-On 調節ベクターである pCMV-Tet3G を遺伝子導入して Tet-On 3G を安定発現する U2OS 細胞株を作製した。

9-1-1. トランスフェクションと薬剤セレクション

まず U2OS 細胞を 24 ウェルプレートに 3×10^5 個播種 (培地量は 250 μ l) し、1-10-2.の方法を用いて pCMV-Tet3G をトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後に培地に G418 を終濃度 250 μ g/ml になるよう加え、コンフルエントになるまで 48 時間おきに培地交換しながら培養を続けた。

9-1-2. 限界希釈法によるシングルセルクローン化

コンフルエントになった時点で細胞を剥離して 1 個/100 μ l になるように細胞懸濁液を培地 (G418 なし) で希釈し、96 ウェルプレートに 100 μ l/well ずつ播種した。1 週間培養を継続した時点で G418 含有培地へ培地交換し、さらに 1 週間培養した。続いて顕微鏡観察で 1 コロニーだけが観察されるウェルを複数選択し、コンフルエントになった時点で 24 ウェルプレートへ拡大した。最終的に 5 クローン (細胞株名を U2OS_Tet3G_#1-#5 とした) を得た。

9-1-3. ルシフェラーゼアッセイによる Tet-On 3G の発現確認

Tet-On 3G の発現を確認するため、キットに付属の pTRE3G-Luc を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。サンプルは 9-1-2. で得たクローンに pTRE3G-Luc をトランスフェクションしたもの (サンプル_1) の他、ネガティブコントロールとして未処理の U2OS 細胞、ポジティブコントロールとして U2OS 細胞に pTRE3G-Luc と pCMV-Tet3G をコトランスフェクションしたもの (サンプル_2) と U2OS 細胞に pNL1.1[Fluc PGK] をトランスフェクションしたもの (サンプル_3) を用意 (96 ウェルプレートに 4 ウェルずつ) した。まず各細胞株を 3×10^4 個/well ずつ播種 (培地量は 100 μ l) し、12 時間培養した。トランスフェクションは 1-10-2. に準じ、以下のように調整した。

- サンプル_1: 培地 90 μ l、Xfect Reaction Buffer 9 μ l、pTRE3G-Luc 0.27 μ g、Xfect Polymer 0.081 μ l
- サンプル_2: 培地 90 μ l、Xfect Reaction Buffer 9 μ l、pTRE3G-Luc 0.27 μ g、pCMV-Tet3G 0.27 μ g、Xfect Polymer 0.162 μ l
- サンプル_3: 培地 90 μ l、Xfect Reaction Buffer 9 μ l、pNL1.1[Fluc PGK] 0.27 μ g、Xfect Polymer 0.081 μ l

トランスフェクション後 4 時間の時点で、各サンプルの半分 (2 ウェル) に Dox を終濃度 500 ng/ml になるよう添加し、さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイには ONE-GloTM EX Luciferase Assay System (Promega) を使用した。まず培地を全て除き、ONE-GloTM EX Luciferase Assay Substrate (キット中の buffer で溶解) と PBS を 1:1 で混和した溶液を 75 μ l/well で添加した。プレートをシールで密閉し、アルミホイルで遮光した上で、室温下、400 rpm 程度で 15 分間震盪させた。最後に Spectra Max Paradigm (Molecular Devices) にて Fluc (565 nm) の発光を測定した。図 12 に示す通り、U2OS_Tet3G_#2 のみ Dox 添加により Fluc の発光を認め、以降の実験に使用した。

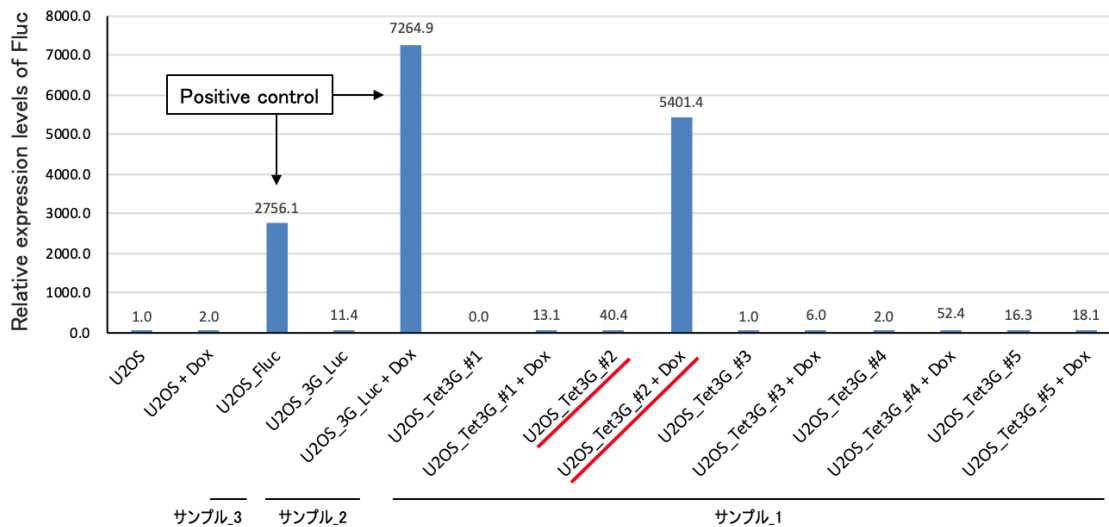


図 12. ルシフェラーゼアッセイによる Tet-On 3G の発現確認

各サンプルで Fluc の発光を測定し、その平均値をネガティブコントロール (U2OS) の値と比較した。U2OS_Tet3G_#2 のみ Dox 添加により Fluc の発光を認め、Tet-On 3G を安定発現していることが確認された。

9-2. CARD14 発現誘導細胞株の樹立

9-2-1. トランスフェクション、薬剤セレクション、シングルセルクローン化

まず、9-1.と同様の方法で U2OS_Tet3G_#2 に pTRE3G-Pur-3FLAG-CARD14wt/M119T/Q136L をトランスフェクションし、G418 (250 μ g/ml) および puromycin (0.75 μ g/ μ l) で薬剤セレクションしてシングルセルクローニングを行った。得られたクローンは順次拡大培養した。最終的に U2OS_Tet_CARD14_WT を 16 株 (#1-#16)、U2OS_Tet_CARD14_M119T を 15 株 (#1-#15)、U2OS_Tet_CARD14_Q136L を 12 株 (#1-#12) 得た。

9-2-2. CARD14 の発現確認

9-2-2-1. 免疫染色による CARD14 発現確認

8 ウェルチャンバースライドに、作製したクローンをそれぞれ 0.8×10^5 個/well ずつ播種した。12 時間後、Dox を終濃度 500 ng/ml になるよう添加しさらに 24 時間培養した。培養後、8-1.の方法で免疫染色を実施した。また一度に扱うサンプル数が多い場合は 96 ウェルプレートを使用して染色を行った。この場合は細胞を 1.5×10^4 個/well で播種し、以降は同様の作業を行った (観察には BZ-X800 を使用)。この結果、U2OS_Tet_CARD14_WT#7/#10/#13、U2OS_Tet_CARD14_M119T#3/#6/#15、U2OS_Tet_CARD14_Q136L#1/#6/#8 で CARD14 の発現を確認した (図 13)。

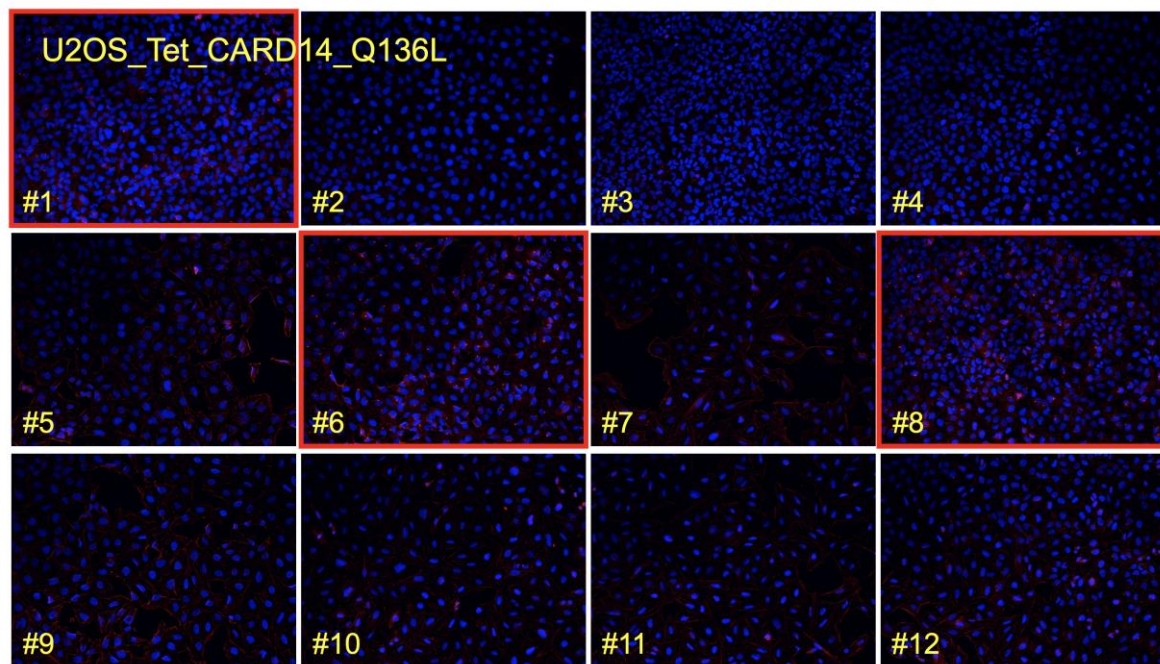
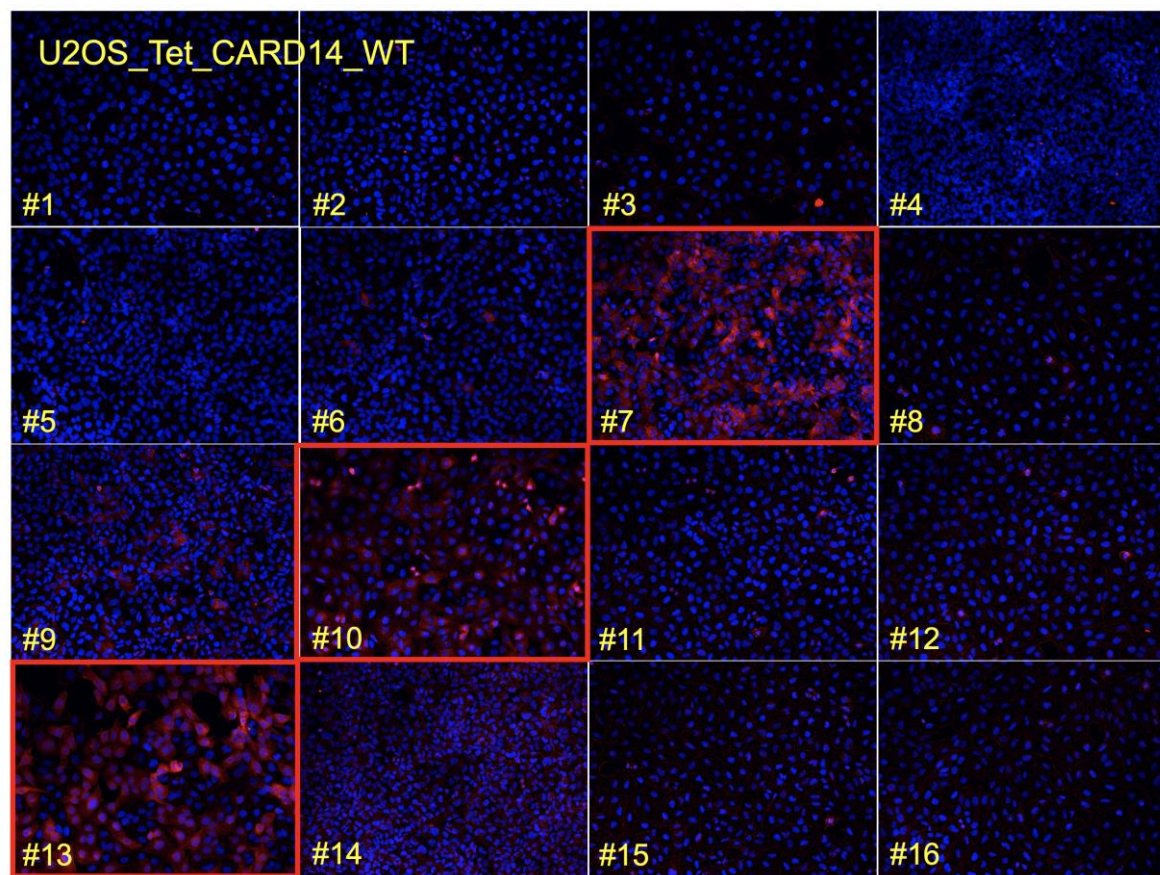


図13. U2OS_Tet_CARD14_WTとU2OS_Tet_CARD14_Q136LにおけるCARD14発現確認

9-2-2-2. ウェスタンブロッティングによる CARD14 発現確認

9-2-2-1.で発現を確認した細胞株に関し、24ウェルプレートにそれぞれ 0.8×10^5 個/wellずつ播種した。24時間後にDoxを終濃度500 ng/mlになるよう添加し、さらに24時間経過した。1×sample bufferで細胞溶解液を回収し、ウェスタンブロッティングで116 kDa付近にシグナルがあるかどうかを評価した (ウェスタンブロッティングのサンプル調製、泳動方法、データ取得に関しては12.に詳述)。その結果、U2OS_Tet_CARD14_WT#7/#10、U2OS_Tet_CARD14_M119T#6/#15、U2OS_Tet_CARD14_Q136L#1/#6/#8で綺麗に発現が確認された (図14)。一方で、U2OS_Tet_CARD14_WT#13とU2OS_Tet_CARD14_M119T#3では想定されるサイズにバンドが検出されなかった。免疫染色、ウェスタンブロッティングの結果を踏まえ、U2OS_Tet_CARD14_WT#7、U2OS_Tet_CARD14_M119T#6、U2OS_Tet_CARD14_Q136L#6を以降の実験に使用することとした。

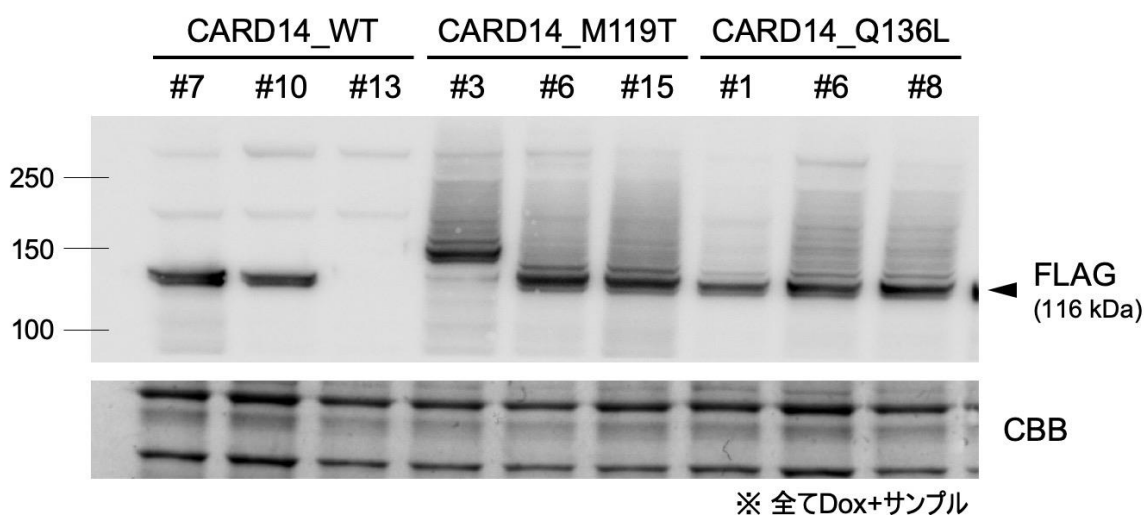


図14. ウェスタンブロッティングによるCARD14発現確認

9-3. DR-GFP assay 用細胞株の樹立

9-3-1. pDRGFPの線状化

購入したpDRGFPベクター 10 μ gをFSP1で切断して線状化し、制限酵素処理産物を精製、エタノール沈殿で濃縮した。

9-3-2. トランスフェクション、薬剤セレクション、シングルセルクローニング

U2OS 細胞を 24 ウェルプレートに 1.2×10^5 個/well で播種し、1-10-1-1.の方法で線状化した pDRGFP をトランスフェクションした。48 時間後から puromycin (0.75 μ g/ μ l) で薬剤セレクションを行い、9-1-2.の方法でシングルセルクローニングを行った。得

られたクローンは順次拡大培養し、最終的に8クローン(細胞株名をpDRGFP_U2OS_#1-#8とした)を得た。

9-3-3. pDRGFP ベクター導入の確認

9-3-3-1. 各クローンからの DNA 抽出

各クローンを6ウェルプレートで培養し、コンフルになった時点でトリプシン処理により回収した。PBS 200 μ l で懸濁後、proteinase K を 20 μ l 添加した。その後、QIAamp DNA Mini Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、NanoDropTM 2000c Spectrophotometer を用いて濃度を測定した。

9-3-3-2. EGFP 領域の増幅と電気泳動

10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus- (Toyobo) 2 μ l、2 mM dNTP 2 μ l、25 mM MgSO₄ 0.8 μ l、forward プライマー : pDRGFP_full_F_1 (5'-CTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGC-3') 0.6 μ l、reverse プライマー : pDRGFP_full_R_1 (5'-CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC-3') 0.6 μ l、細胞由来 gDNA (100 ng/ μ l) 0.4 μ l、KOD-Plus- (Toyobo) 0.4 μ l、脱イオン水 13.2 μ l を 0.2 ml 容 PCR チューブに調製し、サーマルサイクル : 94 $^{\circ}$ C 2 分間、(94 $^{\circ}$ C 20 秒間 $\rightarrow$ 64 $^{\circ}$ C 30 秒間 $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C 5 分 10 秒間) $\times$ 35 サイクルで反応させ、目的領域の遺伝子を増幅させた。PCR 産物を 0.8% アガロースゲルにより電気泳動し、増幅断片長 5196 bp の位置にバンドを認めるクローンを選定した。この解析により pDRGFP_U2OS_#5 と pDRGFP_U2OS_#6 で遺伝子導入を確認でき、前者に関してのみさらなる検証を行った。

9-3-3-3. DR-GFP assayによるEGFP発現細胞出現の確認

pDRGFP_U2OS_#5の最終評価として実際にDR-GFP assay (原理は後述) を実施し、EGFP陽性細胞が得られるか確認した。まずpDRGFP_U2OS_#5を6 cmディッシュに 0.5×10^6 個ずつ播種し、24時間後に1-10-1-1の方法でpCBASceIをトランスフェクションした。またEGFP陽性細胞のポジティブコントロールとしてpDRGFP_U2OS_#5に pDRGFPwt (pCBASceIなし) をトランスフェクションしたサンプルも用意した。72時間培養を継続した後、トリプシン処理で細胞を回収した。回収した細胞をPBS 2 ml で懸濁し、ナイロンフィルターネット (目開き 50 μ m) を通して濾過した後、FACSCanto II (BD Biosciences) でEGFP陽性細胞の存在を確認した。図15に示す通り、SceI発現時にEGFP陽性細胞の出現を確認し、pDRGFP_U2OS_#5がDR-GFP assay に使用可能な細胞株であることを確認した。

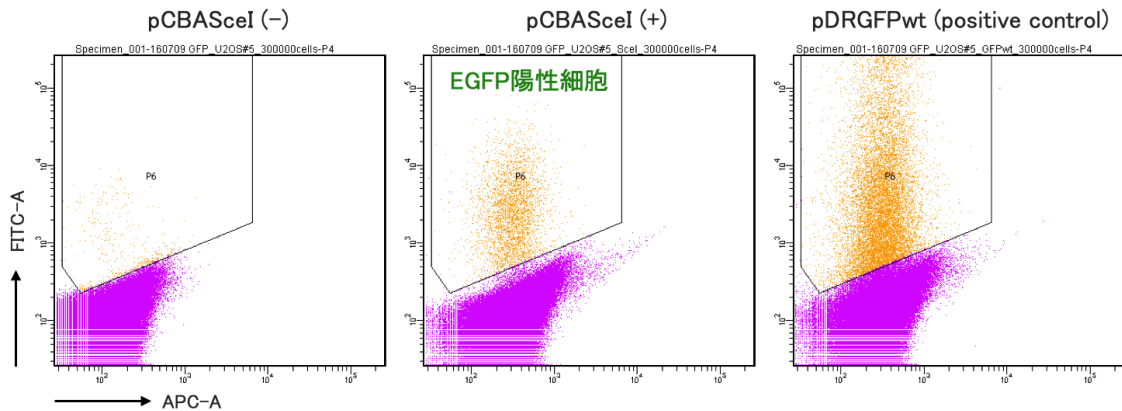


図 15. DR-GFP assay による pDRGFP_U2OS_#5 の評価

10. mRNA 定量実験

10-1. TaqMan Array Card を用いたスクリーニング実験

10-1-1. 細胞株からの RNA 抽出

U2OS_Tet_CARD14_WT#7、と U2OS_Tet_CARD14_M119T#6、U2OS_Tet_CARD14_Q136L#6 を使用し、24 ウェルプレートで RNA 抽出サンプルを用意した。HU 未添加サンプルは 1×10^5 個/well で播種して 24 時間後に Dox を終濃度 500 ng/ml になるよう添加し、さらに 24 時間培養した。HU 添加サンプルは 0.8×10^5 個/well ずつ播種して 24 時間後に Dox を添加、さらに 24 時間経過した時点で HU を 2 mM となるよう添加して 36 時間培養した。それぞれのタイミングで培地を全て除いて PBS で 1 回洗浄し、各 well に【Buffer RLT Plus 350 μ l + メルカプトエタノール 3.5 μ l】を加えて数分間震盪させ、細胞を溶解した。その後全量を 1.5 ml 容チューブへ回収した。RNA 抽出は RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて実施し、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。最後に NanoDropTM 2000c Spectrophotometer を用いて濃度を測定した。

10-1-2. 逆転写反応

ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Toyobo) を使用し、50 μ l 反応系で逆転写反応を行った。患者皮膚由来 RNA (2-2-4.参照) は 250 ng、細胞株由来 RNA (10-1-1.参照) は 1000 ng を使用した。まず用意した RNA に DNase/RNase free water を添加して合計 23 μ l (0.2 ml 容 PCR チューブ) とし、65°C 下で 5 分間反応後、氷上で 2 分間急冷した。次に 5 $\times$ RT Buffer 10 μ l、Primer mix 2.5 μ l、Enzyme mix 2.5 μ l、DNase/RNase free water 12 μ l を加えて合計 50 μ l とし、37°C 15 分間 $\rightarrow$ 98°C 5 分間で反応させ、cDNA を合成した。

10-1-3. Custom TaqMan Array Card

NF- κ B シグナル伝達経路や炎症、細胞周期、DNA 複製、DNA 損傷修復などに関連する遺伝子をピックアップして下記項目の Custom TaqMan Array Card (8 ポート, 384 ウェルプレート, フォーマット 96a, Thermo) を作製した (表 8)。

表 8. Custom TaqMan Array Card の遺伝子リスト

No.	Gene Symbol	Assay ID	No.	Gene Symbol	Assay ID	No.	Gene Symbol	Assay ID
1	ATR	Hs00992123_m1	33	RPA3	Hs01047933_g1	65	PCNA	Hs00427214_g1
2	ATM	Hs00175892_m1	34	SMARCA1	Hs00204242_m1	66	TOPBP1	Hs00199775_m1
3	ATRIP	Hs04335019_s1	35	XRCC1	Hs00959834_m1	67	HAVCR1	Hs00930379_g1
4	PALB2	Hs00954121_m1	36	XRCC2	Hs03044154_m1	68	TIPIN	Hs00762756_s1
5	PARP1	Hs00242302_m1	37	XRCC3	Hs00193725_m1	69	CLSPN	Hs00898637_m1
6	PARP2	Hs00193931_m1	38	XRCC4	Hs00243327_m1	70	WDHD1	Hs00173172_m1
7	BRCA1	Hs01556193_m1	39	TOP3A	Hs00172806_m1	71	CCNA2	Hs00996788_m1
8	BRCA2	Hs00609073_m1	40	TOP3B	Hs00172728_m1	72	CCNB1	Hs01030099_m1
9	BRIP1	Hs00908143_m1	41	LIG4	Hs01866071_u1	73	CCND1	Hs00765553_m1
10	RAD18	Hs00892551_m1	42	XRCC6	Hs01922652_g1	74	CCNE1	Hs01026536_m1
11	18s rRNA	Hs99999901_s1	43	RBBP8	Hs01090339_m1	75	CDK1	Hs00938777_m1
12	EXO1	Hs01116190_m1	44	TP53BP1	Hs00996827_m1	76	CDK2	Hs01548894_m1
13	DNA2	Hs01055240_m1	45	RIF1	Hs00871714_m1	77	CHEK1	Hs00967506_m1
14	BLM	Hs00172060_m1	46	RFC1	Hs01099126_m1	78	CHEK2	Hs00200485_m1
15	WRN	Hs00172155_m1	47	ATRX	Hs00997529_m1	79	POLA1	Hs00213524_m1
16	EME1	Hs01103357_g1	48	DAXX	Hs00985566_g1	80	POLD1	Hs01100821_m1
17	GEN1	Hs00416248_m1	49	FANCD2	Hs00276992_m1	81	POLE	Hs00923952_m1
18	MUS81	Hs00228383_m1	50	FANCF	Hs00256030_s1	82	CARD14	Hs01106900_m1
19	SLX1B	Hs02341353_g1	51	FANCM	Hs00913609_m1	83	BCL10	Hs00961847_m1
20	SLX4	Hs00972341_m1	52	BOD1L1	Hs00386033_m1	84	MALT1	Hs01120060_m1
21	RECQL4	Hs00171627_m1	53	ORC1	Hs01069758_m1	85	TNF	Hs00174128_m1
22	MRE11A	Hs00967437_m1	54	ORC6	Hs00941233_g1	86	CXCL8	Hs00174103_m1
23	NBN	Hs01039845_m1	55	MCM2	Hs01091564_m1	87	CCL20	Hs00355476_m1
24	RAD50	Hs00990023_m1	56	MCM7	Hs00428518_m1	88	IL1A	Hs00174092_m1
25	RAD51	Hs00947967_m1	57	MCM10	Hs00218560_m1	89	IL1B	Hs01555410_m1
26	RAD51B	Hs01568763_m1	58	CDC6	Hs00154374_m1	90	IL6	Hs00174131_m1
27	RAD51C	Hs04194939_s1	59	CDT1	Hs00925491_g1	91	IL17A	Hs00174383_m1
28	RAD51D	Hs00979545_g1	60	CDC45	Hs00907337_m1	92	CASP3	Hs00234387_m1
29	RAD52	Hs01028879_m1	61	GINS1	Hs01040834_m1	93	CASP8	Hs01018151_m1
30	RAD54L	Hs00269177_m1	62	GINS2	Hs00211479_m1	94	FADD	Hs00538709_m1
31	RPA1	Hs00161419_m1	63	GINS3	Hs01090589_m1	95	ACTB	Hs01060665_g1
32	RPA2	Hs00989573_g1	64	GINS4	Hs01077879_m1	96	GAPDH	Hs02786624_g1

10-1-4. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR を行うにあたり、皮膚由来の逆転写産物は 1 ポートあたり RNA 50 ng 分、細胞由来の逆転写産物は 1 ポートあたり RNA 100 ng 分を使用してリアルタイム PCR を実施した。まず TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo) 200 μ l、Nuclease-free Water 160 μ l、逆転写産物 (皮膚) 40 μ l を混和、あるいは TaqMan® Fast Advanced Master Mix 200 μ l、Nuclease-free Water 180 μ l、逆転写産物 (細胞) 20 μ l を混和し、各ポートに 96 μ l ずつ 4 ポートにアプライした (biological replicate = 1、technical replicate = 2)。このプレートを専用の遠心機で 1200 rpm、1 分間遠心してサンプルを各 well へ行き渡らせた後、専用のシーラーでシールした。サーマルサイクルおよび蛍光検出、データ解析は QuantStudio 12K Flex Real Time PCR System (Thermo) で実施し、サーマルサイクルの設定は 50°C 2 分間、92°C 10 分間、(95°C 1 秒間 $\rightarrow$ 60°C 20 秒

間 → 蛍光測定)×40 サイクルとした。また解析に際し、各遺伝子の mRNA 量は *ACTB* 量で補正する $\Delta\Delta C_t$ 法により比較定量した。

10-2. スクリーニング結果の確認実験

10-1.で得られた結果の一部に関しては再度サンプルを用意し直して確認実験を実施した (biological replicate = 3)。この実験では 96 ウェルプレートを使用してサンプル調製を行った。HU 未添加サンプルは 1×10^4 個/well、HU 添加サンプルは 0.8×10^4 個/well ずつ播種して細胞を用意し、10-1-2.と同じ流れで各種処理を加えた。細胞は SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を用いて溶解、逆転写反応を実施した。リアルタイム PCR は TaqMan® Fast Advanced Master Mix 200 μ l、TaqMan probe 0.5 μ l、Nuclease-free Water 3.5 μ l、逆転写産物 1 μ l を混和して 10 μ l 反応系を作製し、サーマルサイクルおよび蛍光検出、データ解析は上記同様に QuantStudio 12K Flex Real Time PCR System で実施した。TaqMan probe は *CARD14* (Hs01106900_m1)、*CXCL8* (Hs00174103_m1)、*CCL20* (Hs00355476_m1)、*ORC1* (Hs01069758_m1)、*MCM10* (Hs00218560_m1)、*GINS1* (Hs01040834_m1)、*GINS2* (Hs00211479_m1)、*ACTB* (Hs01060665_g1) を使用した。

11. NF- κ B ルシフェラーゼアッセイ

実験には NF- κ B レスポンスエレメント (NF- κ B-RE) を持つ pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]を使用した。このエレメントが NanoLuc® (トゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼ, Nluc) の転写を駆動するため、NF- κ B 経路の活性を Nluc の発光強度を用いて比較することが可能である。

11-1. CARD14 一過性発現系での実験

CARD14 遺伝子変異に伴う NF- κ B 経路の異常活性化を検証するため U2OS 細胞への *CARD14* 一過性発現系でルシフェラーゼアッセイを実施した。まず 96 ウェルプレート (白色) に U2OS 細胞を 4×10^4 個/well ずつ播種し、12 時間培養した。1-10-2.の方法で p3FLAG-CARD14wt/ M119T/ Q136L、pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]、pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]をトランスフェクションし、さらに 48 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイには Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を使用した。まず培地を全て除き、ONE-Glo™ EX Luciferase Assay Substrate (キット中の buffer で溶解) と PBS を 1:1 で混和した溶液を 75 μ l/well で添加した。プレートをシールで密閉し、アルミホイルで遮光した上で、室温下、400 rpm 程度で 15 分間震盪させ、Spectra Max Paradigm にて Fluc (565 nm) の発光を測定した。測定後、NanoDLRTM Stop & Glo® Buffer 2000 μ l と NanoDLRTM Stop & Glo® Substrate 20 μ l を混和した溶液を 37.5 μ l/well で添加した。再度シールで密閉し、アルミホイルで遮光した上で、室

温下、400 rpm 程度で 20 分間震盪させた。最後に Spectra Max Paradigm で Nluc (460 nm) の発光を測定した。実験は biological replicate = 3 で実施し、pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]と pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]の 2 種類のみをトランスフェクションしたサンプルを内因性コントロールとした。データは Nluc シグナルを Fluc シグナルで標準化し、内因性コントロールのデータと比較することで CARD14 発現の影響を検証した。また、inhibitor of κ B kinase α (I κ B α) 発現 (NF- κ B シグナル伝達に対し抑制性に働く) の効果を確認する際は上記反応系に pCMV4-3 HA/I κ B-alpha も同時にトランスフェクションし、以降同様の行程で作業を行った。

11-2. CARD14 発現誘導細胞株での実験

U2OS_Tet_CARD14_WT/M119T/Q136L 細胞株を使用して CARD14 発現に伴う NF- κ B シグナル伝達経路の異常活性化を検証した。1-10-1-2.の方法で pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]、pNL1.1.PGK[Fluc/PGK]をトランスフェクションし、播種する細胞数は 4×10^4 個/well とした。Dox 添加群にはトランスフェクション・播種の時点で Dox を 500 ng/ml となるように添加し、24 時間培養した。その後のルシフェラーゼアッセイは 11-1.と同様の方法で行った。なお実験は biological replicate = 6 で実施し、I κ B α 発現の効果を確認する際は上記反応系に pCMV4-3 HA/I κ B-alpha も同時にトランスフェクションして実験を行った。

12. ウェスタンブロッティング

12-1. サンプルの準備

ウェスタンブロッティング用のサンプルはCARD14発現誘導細胞株を使用し、24ウェルプレートで用意した。

12-1-1. CARD14 発現サンプルの準備

各細胞株を 1×10^5 個/well (Dox 24時間サンプル)、 0.8×10^5 個/well (Dox 48時間サンプル)、あるいは 0.5×10^5 個/well (Dox 72時間サンプル) ずつ播種し、12時間後にDoxを終濃度500 ng/mlになるよう添加してさらに指定の時間培養を継続した。それぞれのタイミングでサンプルを回収した。

12-1-2. X線照射サンプルの準備

各細胞株を 1×10^5 個/well ずつ播種し、12時間後にDoxを終濃度500 ng/mlになるよう添加してさらに24時間培養した。その後、7-3-1.の方法でX線照射を行い、図16aのようなスケジュールでサンプルを回収した。

12-1-3. エトポシド添加サンプルの準備

各細胞株を 1×10^5 個/wellずつ播種し、12時間後にDoxを終濃度500 ng/mlになるよう添加してさらに24時間培養した。その後、7-3-2.の通り終濃度が10 μ M、あるいは250 μ Mとなるようエトポシドを添加し、DNA損傷を誘導した。図16bのようなスケジュールでサンプルを回収した。

12-1-4. HU/ APH 添加サンプルの準備

各細胞株を 0.8×10^5 個/wellずつ播種し、24時間後にDoxを終濃度500 ng/mlになるよう添加してさらに24時間培養した。その後、7-3-3.の通りHUを終濃度2 mM、あるいはAPHを終濃度2 μ g/mlとなるよう添加し、複製ストレスを与えた。図16c, dのスケジュールでサンプルを回収した。

また IkB α 発現による NF- κ B 経路阻害の影響をみる際には、上記 Dox を添加するタイミングで pCMV4-3 HA/IkB-alpha をトランスフェクション (1-10-1-2.の方法) して実験を行った (図 16e)。

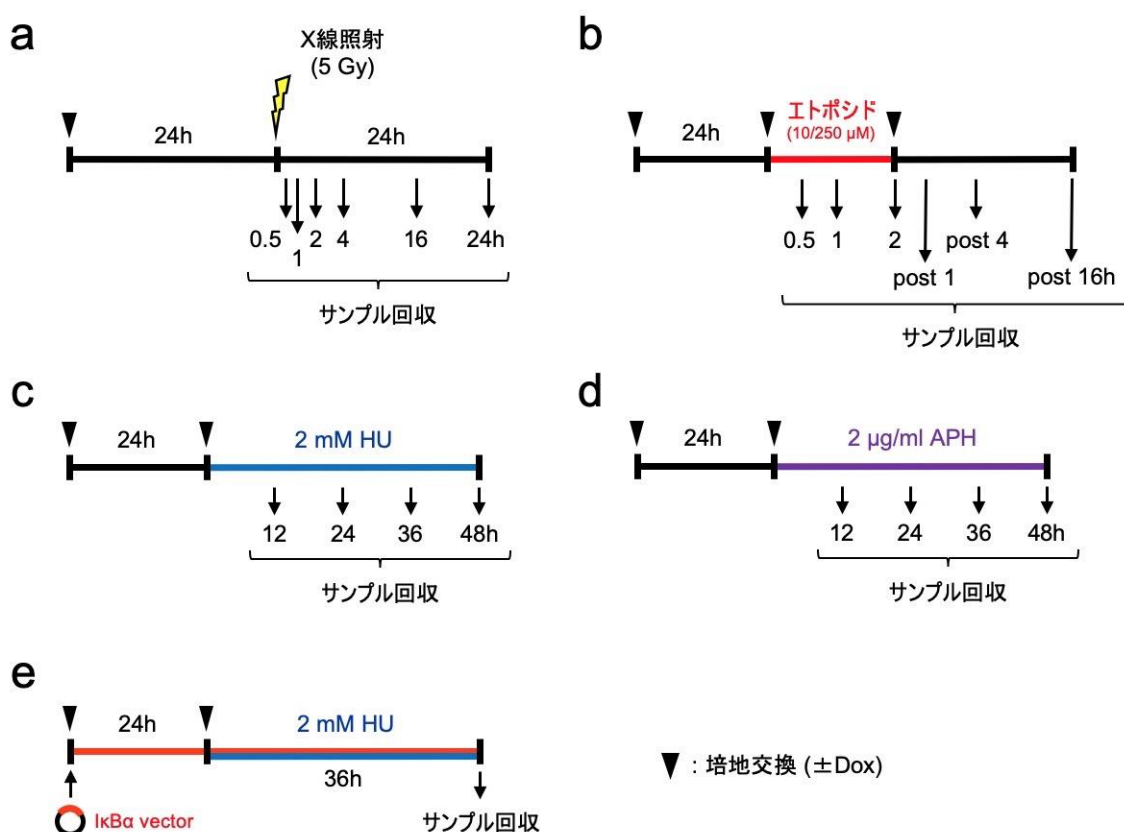


図 16. ウェスタンブロッティング用サンプルの調製スケジュール

12-2. 細胞の回収とサンプル調製

氷冷したPBSで1回洗浄し、各ウェルに1 $\times$ sample buffer*を100 μ lずつ添加して細胞を

溶解させ、全量を2.0 ml容チューブに回収した。回収したサンプルは氷上に置いたままHandy Sonic UR-21P (TOMY) を用いて30秒間ソニケーションした後、4°C下で14000 rpm、10 分間遠心した。遠心後、上清を新しい2.0 ml容チューブに回収し、ウェスタンブロットティング用のサンプルとした。泳動に際し、サンプルは適量を取って1×sample bufferで希釈し総量を20 µlとした上で、70°C下10 分間の熱変性を加えた。なお、上記サンプル調製と同時にサイズマーカーとして1×sample buffer 18 µlにプレシジョン Plus プロテイン™ 2色スタンダード (BIO RAD) 2 µlを加えたサンプルも用意した。

***1x sample buffer**

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×) (Thermo)、NuPAGE® Sample Reducing Agent (10×) (Thermo)、水を 25:10:65 で混和して作製した。

12-3. 電気泳動とPVDF膜への転写

泳動槽はXCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo)、パワーサプライはPowerEase® 500, 100/120VAC (Thermo) を使用した。プレキャストポリアクリルアミドゲルは実験のサンプル数に合わせ、4-12% NuPAGE™ Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 12well (Thermo)、あるいは4-12% NuPAGE™ Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 15well (Thermo)を使用した。泳動バッファーはNuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20×) (Thermo) 40 mlと超純水 760 mlを混和して作製し、泳動槽にプレキャストゲルをセッティング後、上側バッファーチャンバーに200 ml、残りを下側バッファーチャンバーに入れた。泳動条件は200 V, 120 mA, 25 Wとし、45分間泳動を行った。

泳動が終了したら、ゲルを超純水に浸し、20%エタノール水溶液に移した後、5分間震盪させた。平衡化したゲルを再び超純水に10秒間ほど浸した後、iBlot® 2 Dry Blotting System (Thermo) を用いてiBlot® 2 PVDF Regular Stacks (Thermo) に転写 (設定: P1, 25 V, 10分間) した。転写終了後、ゲルはCBB Stain One Super (Nacalai) に浸して一晚震盪させた。またメンブレンは超純水に浸して洗浄し、パラフィルムで挟んで乾燥させないように注意しながら必要な部位を切り出した。

12-4. メンブレンの染色

切り出したメンブレンは5%スキムミルク-tween*、あるいは1%BSA-tween**に浸し、室温下で1 時間ブロッキングした後、1×TBST bufferで5分間ずつ3回洗浄した。1次抗体は5%スキムミルク-tween、あるいはCan Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 1 (Toyobo) で希釈し、メンブレンを浸して4°C下オーバーナイトで震盪反応させた。1次抗体反応終了後、1×TBST bufferで10分間ずつ4回洗浄し、2次抗体反応を

行った。2次抗体は1次抗体の希釈液に応じて5%スキムミルク-tween、あるいはCan Get Signal Immunoreaction Enhance Solution 2 (Toyobo) で希釈した。室温下で1時間震盪反応させ後、1×TBST bufferで10分間ずつ4回洗浄した。なお、本研究では表9の抗体を使用した。

表 9. ウエスタンブロッティングで使用した抗体一覧

ターゲット	宿主	メーカー	製品番号	希釈倍率	抗体希釈液
1次抗体					
FLAG	mouse	Sigma-Aldrich	F3165	1:1000	5%スキムミルク-tween
HA	rabbit	abcam	ab9110	1:1000	5%スキムミルク-tween
phospho-Histone H2A.X (γ H2AX) (Ser139)	mouse	Millipore	05-636	1:1000	Can Get Signal 1
Histone H3	rabbit	abcam	ab1791	1:1000	Can Get Signal 1
RPA32 (RPA2) (9H8)	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-56770	1:500	Can Get Signal 1
phospho-RPA2 (Ser33)	rabbit	Novus Biologicals	NB100-544	1:1000	Can Get Signal 1
53BP1	rabbit	Cell Signaling Technology	4937	1:1000	Can Get Signal 1
phospho-53BP1 (Ser1778)	rabbit	Cell Signaling Technology	2675	1:1000	Can Get Signal 1
BRCA1 (D-9)	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-6954	1:500	Can Get Signal 1
phospho-BRCA1 (Ser1524)	rabbit	Cell Signaling Technology	9009	1:1000	Can Get Signal 1
2次抗体					
HRP-linked anti-mouse IgG	horse	Cell Signaling Technology	7076	1:2000	(1次抗体にあわせて)
HRP-linked anti-rabbit IgG	goat	Cell Signaling Technology	7074	1:2000	(1次抗体にあわせて)

*5%スキムミルク-tween; スキムミルク粉末 (Wako) 2.5 g、1x TBS buffer*** 35 ml、1×TBST buffer**** 15 ml を混和して作製した。

1%BSA-tween; BSA 0.5 g と 1x TBST buffer* 50 ml を混和して作製した。

***1×TBS buffer; 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl

****1×TBST buffer; 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20

12-5. 化学発光とシグナル検出

化学発光には20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide (Cell Signaling Technology)、あるいはSuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo) を使用し、ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm) を用いてシグナルを検出した。

13. DR-GFP assay

DR-GFP assay はエンドヌクレアーゼ I-SceI 発現により DSB を誘導し、その修復過程において生じた HR を EGFP 陽性細胞として検出する実験系である (Pierce et al., 1999)。図 17 に示すように pDRGFP は SceGFP 配列とそれに続く iGFP 配列からなる。SceGFP は EGFP 配列中に I-SceI 切断配列を含み、それ自体では蛍光を発することはない。そこへ pCBASceI ベクター由来のエンドヌクレアーゼ I-SceI を発現させ

ると I-SceI 部位を切断し、DSB を誘導する。その修復に際し、近傍に位置し、かつ相同性の高い配列をもつ iGFP 領域をテンプレートとした HR 修復が選択されると切断部位が EGFP の配列で修復され、EGFP 発現細胞として検出することが可能となる。つまり、DR-GFP assay における EGFP 発現細胞の割合は DSB 部位で選択される HR の頻度を反映していると言える。

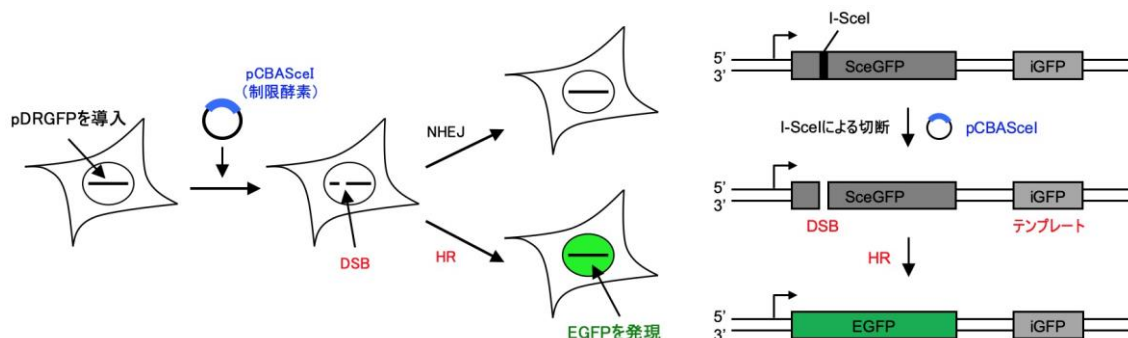


図 17. DR-GFP assay の仕組み

13-1. CARD14 一過性発現系での実験

pDRGFP_U2OS_#5 に CARD14 を一過性発現させて DR-GFP assay を実施し、CARD14 発現に伴う HR 頻度の変化を検証した。播種する細胞数は 2.5×10^5 個/well (6 ウェルプレート) とし、1-10-1-2.の方法で p3FLAG-CARD14wt/ M119T/ Q136L と pCBASceI の 2 種類をリバーストランスフェクションした。また CARD14 非発現サンプルとして pDRGFP のみをトランスフェクションしたサンプルも用意した。トランスフェクション後 24 時間の時点で一度培地を交換し、さらに 48 時間培養を継続した。トリプシン処理で細胞を回収し、細胞を PBS 2 ml で懸濁、ナイロンフィルターネット (目開き 50 μm) を通して濾過した後、FACSCanto II で EGFP 陽性細胞数を測定した。30000 細胞/サンプルを解析してデータを取得し、biological replicate = 3 で実験を行った。

13-2. CARD14 発現誘導細胞株での実験

一般的に DR-GFP assay は pDRGFP をゲノム内に遺伝子導入した安定発現細胞株を使用するが、pDRGFP と pCBASceI を一過性に共発現させることでも EGFP 細胞の出現は確認でき、HR 頻度の評価は可能である (図 18)。pDRGFP を遺伝子導入した CARD14 発現誘導細胞株は作製していないため、この pDRGFP 一過性発現系で解析を行った。

播種する細胞数は 2.5×10^5 個/well (6 ウェルプレート) とし、1-10-1-2.の方法で pDRGFP と pCBASceI の 2 種類をリバーストランスフェクションした。またトランス

フェクション効率確認用サンプルとして pDRGFPwt と pCBASceI をトランスフェクションしたサンプル、ネガティブコントロールとして pDRGFP のみをトランスフェクションしたサンプルも用意した。トランスフェクション後 24 時間の時点で一度培地を交換し、さらに 36 時間培養を継続した。トリプシン処理で細胞を回収し、細胞を PBS 2 ml で懸濁し、ナイロンフィルターネット (目開き 50 μ m) を通して濾過した後、FACSCanto II で GFP 陽性細胞数を測定した。30000 細胞/サンプルを解析してデータを取得し、biological replicate = 3 で実験を行った。

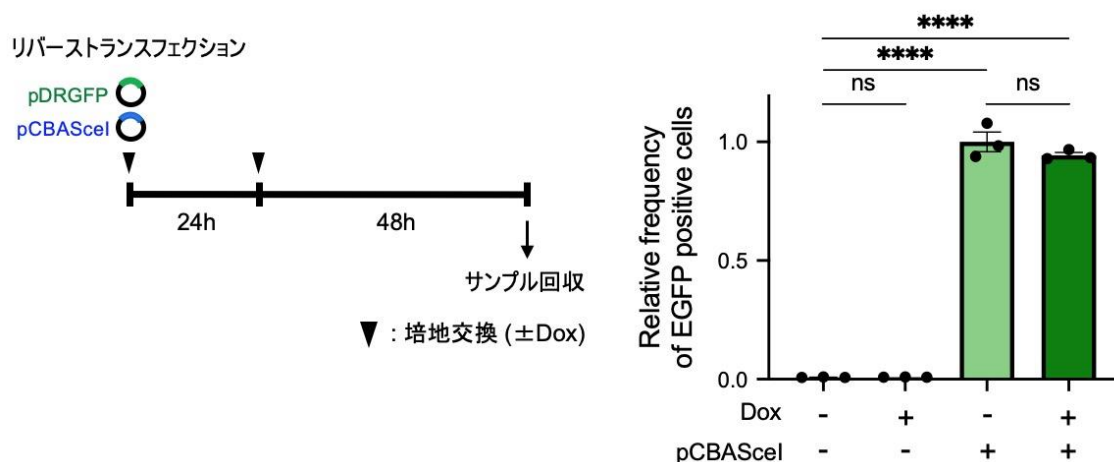


図 18. pDRGFP 一過性発現系での DR-GFP assay

U2OS 細胞に pDRGFP と pCBASceI を共発現させて EGFP 陽性細胞の出現を確認した。CARD14 発現誘導細胞株を用いた解析を念頭におき、培地に Dox を添加したサンプルも用意したが、Dox の有無で EGFP 陽性細胞の出現率に差は認めなかった。

14. フローサイトメトリー法 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)

14-1. 細胞周期解析

CARD14 発現に伴い細胞周期の変化があるかを FACS にて解析した。解析には CARD14 発現誘導細胞株を使用し、Dox 添加後 24、48、72 時間後の時点での状態を解析した。

まず各細胞株を 6 ウェルプレートへ 0.4×10^6 /well (Dox 24 時間サンプル)、 0.2×10^6 /well (Dox 48 時間サンプル)、 0.1×10^6 /well (Dox 72 時間サンプル) ずつ播種し、24 時間経過した時点で Dox を 500 ng/ml となるように添加した。指定のタイミングまで培養を継続し、最後の 30 分間のみ 10 mM EdU stock solution (Thermo) を最終濃度 10 μ M になるよう添加して培養した。この作業により S 期細胞のゲノムを EdU で標識した。その後はトリプシン処理で細胞を回収し、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit (Thermo) を用いて EdU の染色を実施した。最終ステッ

ブで 1× Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent 500 µl で細胞を懸濁する際に、FxCycle Violet Stain (水で溶解して 1 mg/ml とした, Thermo) を 0.5 µl 添加し、室温下で 30 分間静置して DNA 染色も行った。ナイロンフィルターネット (目開き 50 µm) を通して濾過した後、FACSCanto II で Alexa Fluor 647 と FxCycle Violet の蛍光を測定した。まず上記 3 つのタイミングに関して biological replicate = 1 でプレ実験を行い、最終的に 24 時間後のタイミングのみ biological replicate = 3 で再度実験を実施した。いずれのデータも 30000 細胞/サンプルを解析して取得し、FlowJo software (BD Biosciences) で解析を行った。

14-2. DNA 損傷、HR 関連因子活性化の評価

14-2-1. サンプル調製と染色

DNA 損傷や HR 関連因子活性化の状態をシングルセルレベルで解析する目的で FACS を用いた評価を行った。実験には CARD14 発現誘導細胞株を使用し、HU により DNA 複製を 36 時間停止させた状態の解析を行った。

まず各細胞株を 6 ウェルプレートへ 2×10^5 /well ずつ播種し、24 時間経過した時点で Dox を 500 ng/ml となるように添加した。さらに 24 時間経過した時点で HU 添加サンプルには HU を 2 mM となるよう添加し、36 時間培養を継続した。指定のタイミングまで培養を継続し、トリプシン処理で細胞を回収した。1% BSA (PBS) 3 ml で細胞を懸濁し、室温下、 $300 \times g$ で 3 分間遠心 (以下の遠心ステップは全て同条件) して上清を除去した。4% PFA 100 µl で懸濁し、室温下で 15 分間静置して細胞を固定した。固定後、1% BSA 3 ml を追加のうえ遠心して上清を除去した。同作業をもう一度繰り返して細胞を洗浄後、dilution buffer (0.5% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS) 1 ml で細胞を懸濁し、室温下で 30 分間静置した。遠心して上清を除去後、下記 1 次抗体液 (1 種類あるいは 2 種類) 100 µl で細胞を懸濁し、室温下で 30 分間反応させた。その後、dilution buffer 4 ml を追加のうえ遠心して上清を除去し、2 次抗体液 100 µl で細胞を懸濁して室温下で 30 分間反応させた。再度 dilution buffer 4 ml を追加のうえ遠心して上清を除去し、最後に FxCycle Violet Stain を 0.3 µl 添加した dilution buffer 300 µl で細胞を懸濁して室温下で 30 分間静置 (DNA 染色) した。ナイロンフィルターネット (目開き 50 µm) を通して濾過した後、FACSCanto II で Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647、FxCycle Violet の蛍光を測定した。いずれのデータも 30000 細胞/サンプルを解析して取得し、取得したデータは FlowJo software で解析を行った。

14-2-2. データ解析

14-2-1.のデータ解析は【Dox-, HU+】サンプルで得られた蛍光強度の平均値を閾値とし、それを上回る蛍光強度を示した細胞 (γ H2AX に関する解析の場合 γ H2AX^{hi} cells と呼ぶ) の割合を測定した (図 19)。

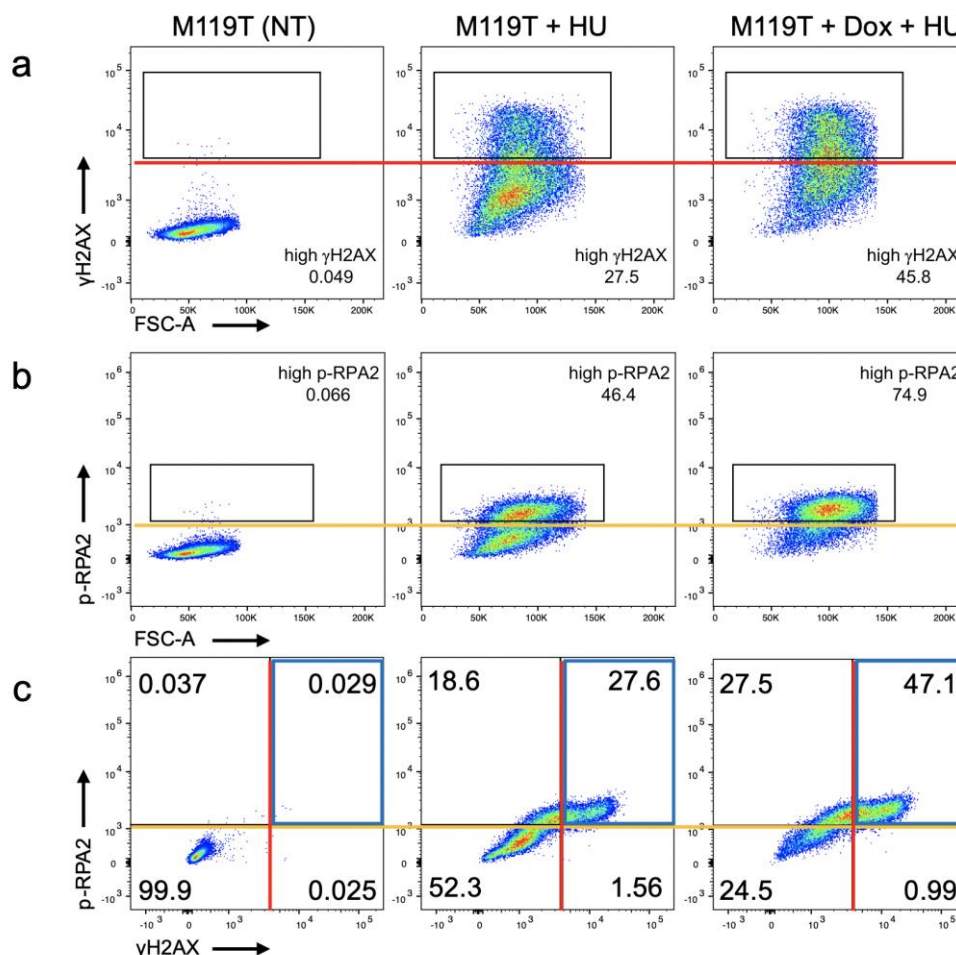


図 19. FACS データの解析方法

U2OS_Tet_CARD14_M119T を用いて行った実験データを例として示す。

- γ H2AX の蛍光強度を測定し、【M119T + HU (Dox-, HU+)】サンプルが示した蛍光強度の平均値を閾値とした (赤線)。その閾値を上回る蛍光強度を示した細胞の割合 (γ H2AX^{hi} cells) を各パネル右下に記載した (M119T (NT); 0.049%, M119T + HU; 27.5%, M119T + Dox + HU; 45.8%)。
- p-RPA2 の蛍光強度の場合も閾値 (黄線) を設定して閾値以上の蛍光を呈した細胞 (p-RPA2^{hi} cells) の割合を計測した。
- γ H2AX と p-RPA2 を共染色した場合、両方の閾値を超えた細胞 (γ H2AX^{hi}p-RPA2^{hi} cells) の割合も計測した (青枠)。

15. DNA fiber assay

培地にチミジン類似体の 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) や 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) を加えることで S 期細胞 (DNA 複製中) で新規に合成された DNA 鎖を標識することができ、後に免疫染色を行うことで線状の DNA を可視化することが可能である (図 20) (Nieminuszczy et al., 2016)。CARD14 発現が DNA 複製や複製ストレス反応へ与える影響を検証するために CARD14 発現誘導細胞株を使用して DNA fiber assay を実施した。

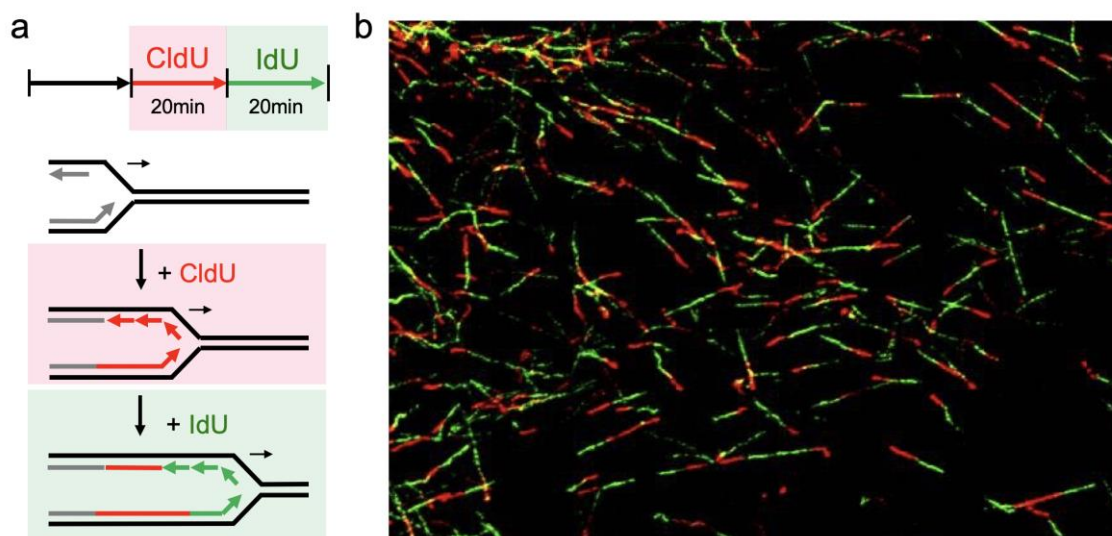


図 20. DNA fiber assay の例

a, b. 培地に CldU、IdU を 20 分間ずつ連続して添加し、免疫染色 (前者を赤、後者を緑で出力) を行くと b. のような画像データを取得することができる。

15-1. チミジン類似物質 CldU・IdU による複製 DNA 鎖標識

25 mM CldU* を終濃度 25 μ M、2.5 mM IdU* を終濃度 250 μ M になるよう 37°C に加温した DMEM に加えて混和し、使用するまで遮光室温保持した。また以下の作業は全てクリーンベンチ内で消灯して行った。

*25 mM CldU、2.5 mM IdU

CldU (Sigma) を 25 mM になるように加温した滅菌水に攪拌溶解した。また IdU (Sigma) は 2.5 mM になるように滅菌水を加え、50°C 温浴槽で 1 時間以上遮光しながら加温溶解した。溶解した CldU、IdU はいずれも分注して -30°C で遮光保存した。

15-1-1. HU なし (CARD14 発現に伴う DNA 複製の変化)

各細胞株を 24 ウェルプレートに 0.25×10^5 個/well ずつ播種し、16 時間培養した時点で Dox を 500 ng/ml となるように添加して、さらに 24 時間培養を行った。培地を取り除いて加温した PBS で 1 回洗浄し、25 μ M CldU を 500 μ l 添加して 37°C 下で 20 分間遮光静置した。CldU を除去し加温した PBS で 1 回洗浄後、250 μ M IdU を 500 μ l 添加して、37°C 下でさらに 20 分間遮光静置した (図 20)。IdU を除去し氷冷した PBS で洗浄後、トリプシン処理で細胞を回収し、PBS 30 μ l を加えて細胞を懸濁した。懸濁した細胞は、TC10™ 全自動セルカウンターを用いて細胞濃度を測定し、 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 個/ml になるよう適宜 PBS を追加して調整した。

15-1-2. HU あり (複製ストレス下における CARD14 発現影響)

各細胞株を 12 ウェルプレートに 0.7×10^5 個/well ずつ播種し、16 時間培養した時点で Dox を 500 ng/ml となるように添加して、さらに 24 時間培養を行った。培地を取り除いて加温した PBS で 1 回洗浄し、25 μ M CldU を 1 ml 添加し、37°C 下で 20 分間遮光静置した。CldU を除去し加温した PBS で 1 回洗浄後、HU を終濃度 2 mM になるよう添加して、さらに 40 時間遮光培養した。その後、HU を除去して加温した PBS で洗浄し、250 μ M IdU を 1 ml 添加し、37°C 下で 40 分間遮光静置した (図 21)。IdU を除去し氷冷した PBS で洗浄後、トリプシン処理で細胞を回収し、PBS 50 μ l を加えて細胞を懸濁した。懸濁した細胞は、TC10™ 全自動セルカウンターを用いて細胞濃度を測定し、 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 個/ml になるよう適宜 PBS を追加して調整した。

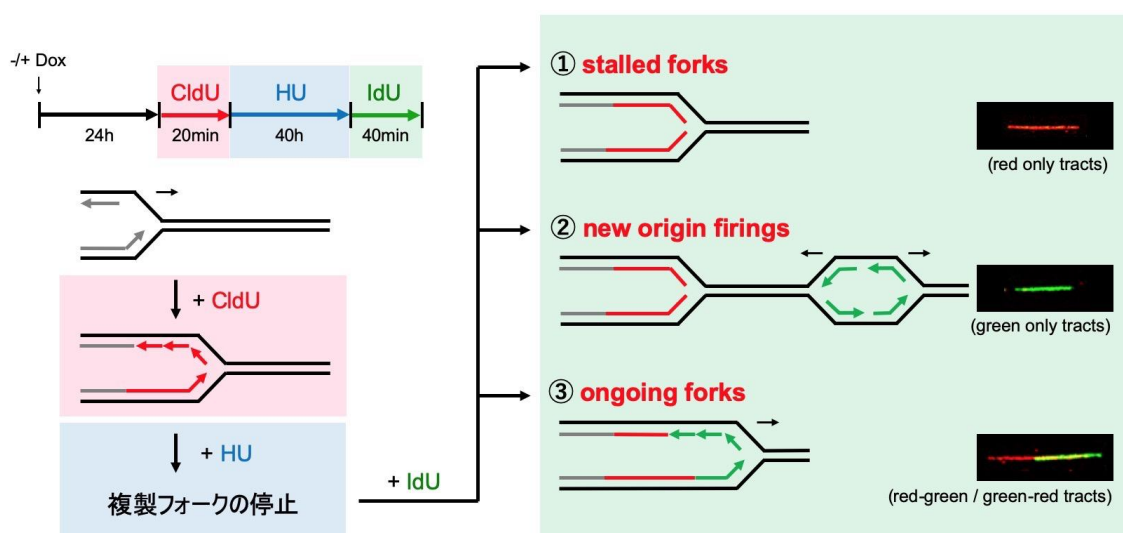


図 21. HU による複製ストレスを与えた場合の DNA fiber assay

CldU と IdU の間で HU による複製ストレスを加え、stalled forks (赤のみ)、new origin firings (緑のみ)、ongoing forks (赤-緑) の 3 パターンの出現数に変化が生じるか解析した。

15-2. DNA 鎖の伸長および固定

上記で調製した細胞を APS コートスライドガラス (MATSUNAMI) に 2 μ l ずつ 2 ヶ所に滴下し、2 分間遮光静置した。ついで室温に戻した spreading buffer* を 8 μ l ずつ滴下し、5 分間静置後チップの先で静かにゆっくりと混ぜ、さらに 3 分間静置した。次に、スライドガラスが約 15 度傾くように設置し、ゆっくりと懸濁液がスライドガラスの下部に到達するまで約 10 分間遮光静置した。全てのサンプルの懸濁液がスライドガラスの下部に達したのち、下部にたまった液をキムワイプで吸い取り、冷風ドライヤーで完全に乾燥させた (図 22)。乾燥後、氷冷した 3%PFA (PBS) を 120 μ l/スライドで滴下し、室温下で 10 分間遮光静置した後、氷冷した PBS に浸漬して 5 分間遮光洗浄した。

*spreading buffer

脱イオン水 10 ml に 1 M Tris-HCl (pH8.0) を 6 ml、0.5 M EDTA を 3 ml、sodium dodecyl sulfate を 0.15 g 添加して完全に溶解させたあと、脱イオン水で 30 ml までメスアップして作製した。100 μ l ずつ分注して -30°C で保存した。

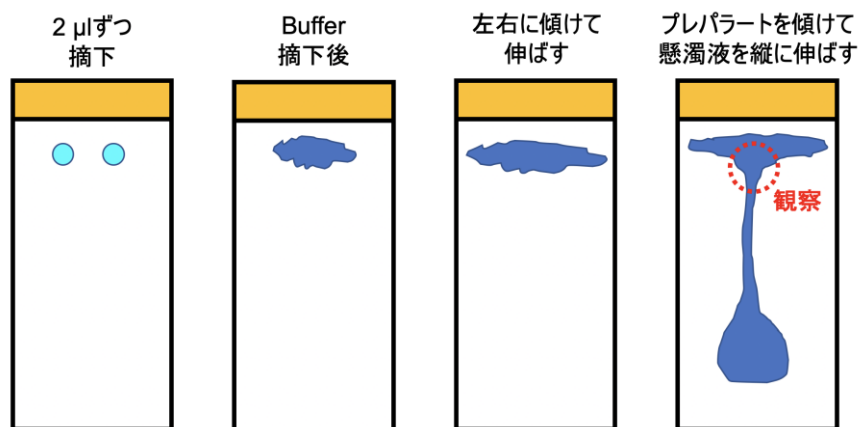


図 22. スライド作製の流れとポイント

15-3. DNA 鎖の変性

27°C に設定したアルミビーズ恒温槽 (SCH05, SANSYO) 内で 2.5 M 塩酸を洗浄バッドに入れて保持し、上述の固定サンプルを 80 分間遮光浸漬した。その後、氷冷した PBS に浸漬して 5 分間ずつ 2 回遮光洗浄した。

15-4. 免疫染色

スライドガラスの水分を除き、3% BSA (PBS) を 80 μ l ずつ滴下し、パラフィルムを

被せ、37°C下で1時間遮光静置してブロッッキングを行った。次に、水分を軽く除き、3% BSA で希釈した1次抗体液 (表 10) を 80 μ l ずつ滴下し、パラフィルムを被せて4°C湿潤条件で遮光のうえオーバーナイトで抗原抗体反応させた。続いて氷冷した PBS に浸漬して5分間遮光洗浄後、3% BSA で希釈した2次抗体液を 120 μ l ずつ滴下し、パラフィルムを被せ、37°C下で1時間遮光静置した。最後に氷冷した PBS に浸漬して5分間遮光洗浄を2回実施し、スライドガラスの水分を軽く除いて、封入剤 PermaFluor を滴下で封入し、カバーガラスを被せて4°C下で静置・固化させた。

表 10. DNA fiber assay で使用した抗体一覧

ターゲット	宿主	メーカー	製品番号	希釈倍率
1次抗体				
BrdU (BU1/75 (ICR1)) : CldUを検出	rat	abcam	ab6326	1:500
BrdU (clone B44) : IdUを検出	mouse	BD Biosciences	347580	1:250
2次抗体				
Alexa Fluor 488-conjugated anti-rat IgG	goat	Thermo Fisher Scientific	A11006	1:100
Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG	goat	Thermo Fisher Scientific	A11005	1:100

15-5. データ取得と解析

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000) で観察した。60 倍対物レンズを使用し、各サンプル 20 枚程度ずつ視野をかえながら撮影した。データ取得に際し、CldU の fiber は赤色、IdU の fiber は緑色に設定した。得られた写真データは University of Illinois College of Medicine の Dr. Paul Chastain から購入した Computer Assisted Scoring & Analysis (CASA) を用いて解析し、複製スピードの測定や停止複製フォーク (stalled forks)、新規に複製を開始した複製フォーク (new origin firings)、進行複製フォーク (ongoing forks) 等の DNA fiber のパターン分類・計数を行った。この実験を各条件に関し biological replicate = 3-10 で実施した。

16. SCE assay

姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange, SCE) とは、複製によって同一の染色体から生じた相同な染色分体 (姉妹染色分体) が、その相同な一部分を相互に交換する現象である。SCEs は自然にも一定の確率で生じることが知られているが、DNA 複製や細胞分裂の異常を生じた時にその頻度が上昇し、現象としては広義の HR と考えられ、中でも交叉型組換え (crossover) を反映する現象といえる (Stults et al., 2014)。

SCE assay はこの SCEs を可視化する実験系で、チミジン類似体である 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を使用する。この BrdU 標識法の原理は染色体 DNA のチミン塩

基を BrdU に置換することである。細胞を BrdU を含む培養液中で 2 細胞周期の間培養すると、2 本の染色分体のうちの 1 本は DNA の 1 本鎖のチミンが BrdU に置換される。一方、もう 1 本は DNA の 2 本鎖のチミンが BrdU に置換される。この染色体をギムザ染色すると染色の濃淡差として 2 本の染色分体を区別することが可能となる (図 23) (Stults et al., 2014)。

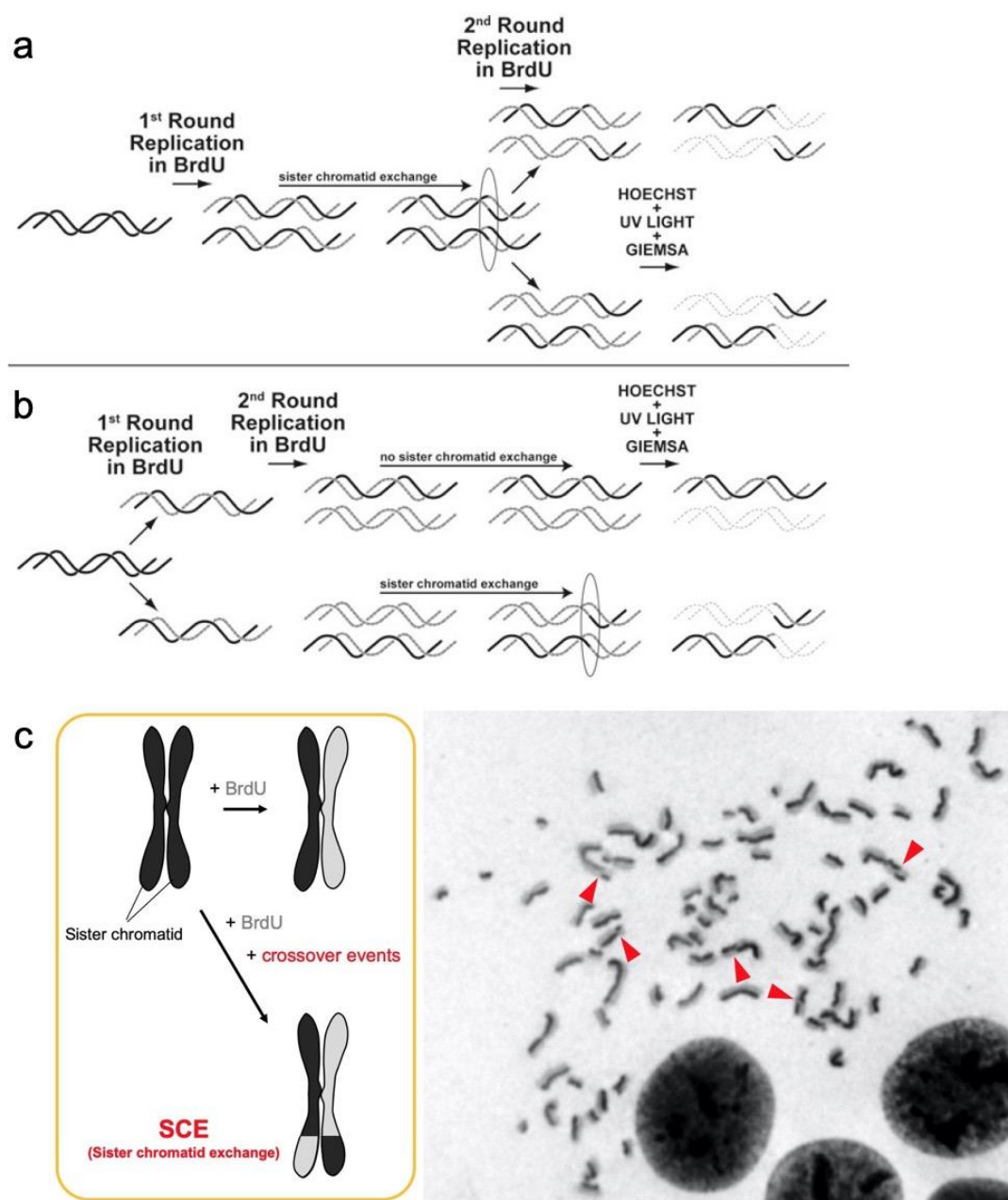


図 23. SCE assay の原理と U2OS 細胞での染色例

a, b. BrdU 含有培地で 2 細胞周期分培養するが、その間に SCE を生じない場合、1 サ

イクル目で SCE を生じる場合 (a)、2 サイクル目で SCE を生じる場合 (b) が考えられる。SCE を生じない場合は姉妹染色分体の片方を黒色 (均一)、もう片方を灰色 (均一) に染め分けることが可能である。どこかの段階で SCE を生じた場合は組換えポイントを境に黒色と灰色が入れ替わるような像を得ることができる (Stults et al., 2014 から抜粋)。

c. U2OS 細胞で BrdU を添加して 40 時間程度培養 (おおよそ 2 細胞周期分に相当) し、SCE assay を行った際の染色例。

16-1. スライドガラスの準備

実験に使用するスライドガラスを 0.1 N HCl (99.5%エタノール) に室温下で 20 分間浸し、その後 99.5%エタノールで 3 回洗浄した。洗浄後、蒸留水に浸した状態で 4°C で冷蔵保管した。この作業は SCE assay を行う前日までに実施した。

16-2. BrdU による複製 DNA 鎖標識

16-2-1. HU なし

CARD14 発現誘導細胞株を 6 cm ディッシュに 4×10^5 個ずつ播種し、この時点から Dox を 500 ng/ml となるよう添加して培養を行った。24 時間後に BrdU (Sigma) を終濃度 20 μ M となるように培地に添加し、さらに 40 時間培養した (図 24a)。

16-2-2. HU あり

CARD14 発現誘導細胞株を 6 cm ディッシュに 4×10^5 個ずつ播種し、この時点から Dox を 500 ng/ml となるよう添加して培養を行った。24 時間後に BrdU を終濃度 20 μ M となるように培地に添加し、さらに 20 時間 (1 サイクル目) 培養した。その後 2 mM HU を含む培地 (BrdU は含まない) に交換し、36 時間培養を継続後、再度 BrdU 含有培地へ交換して 21 時間 (2 サイクル目) 培養した (図 24b)。

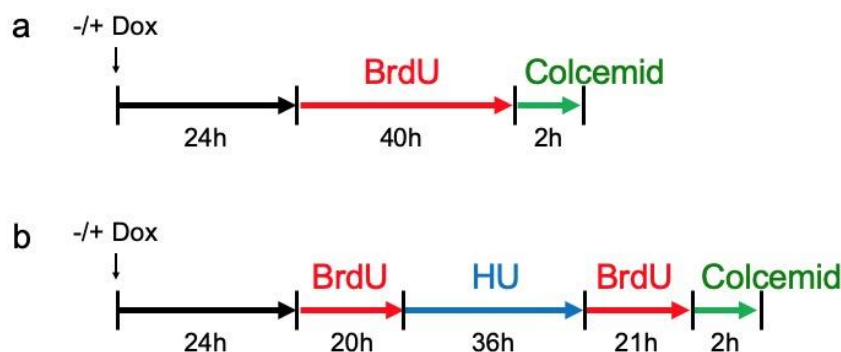


図 24. 本研究における BrdU 標識のスケジュール

16-3. 細胞回収とスライド作製

分裂期 (M 期) 細胞を集めるために colcemid (Sigma) を終濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加して 2 時間培養した。培地を破棄し、トリプシン処理で細胞を回収後、hypotonic solution (46.5 mM KCl, 8.5 mM Na-Citrate) 1 ml で細胞を懸濁した。さらに 7 ml を追加し、37°C 下で 13 分間静置後、メタノール酢酸 (固定化溶液、メタノール:氷酢酸を 3:1 で混合して作製) を 2 ml 加えて転倒混和し、室温下、200 $\times$ g で 5 分間遠心した。上清を破棄し、メタノール酢酸を 5 ml 加えて懸濁し、4°C 下で 20 分間静置した。その後、同様の方法で遠心、懸濁をさらに 2 回追加し、最終的にメタノール酢酸 200 μl で懸濁した。4°C で冷蔵保管していたスライドグラスを蒸留水から取り出し、できるだけ表面の水分を落とした上で、ガラスパスツールピペットで細胞懸濁液を数滴滴下した。わずかに傾斜をつけた状態で遮光し、完全に乾燥するまで静置した (4 時間～一晩)。

16-4. 染色

乾燥させたスライドを Sorensen's phosphate buffer (0.1 M Na_2HPO_4 , 0.1 M KH_2PO_4 , pH 6.8) で洗浄後、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33258 (Sigma) を 400 μl /スライドで滴下し、遮光の上、室温下で 60 分間静置した。その後 Sorensen's phosphate buffer で 1 回洗浄し、同バッファを 400 μl ほど滴下した上でカバーグラスを被せ、55°C に温めたヒートブロック上にスライドグラスを設置し、UV ランプ (UVL-56, analyticjena) で 60 分間紫外線を照射した。照射後、ゆっくりとカバーグラスを取り除いて超純水で洗浄し、1 $\times$ SSC buffer (20 $\times$ SSC buffer を超純水で希釈, Thermo) に浸した状態で、50°C 下で 1 時間静置した。超純水で洗浄後、10% Gimsa 液 (Sorensen's phosphate buffer で希釈, 富士フィルム和光純薬) に浸し、室温下で 30 分間静置した。最後に超純水で 3 回洗浄し、室温下で完全に乾燥させた後、MOUNT-QUICK (Funakoshi) を適量のせ、カバーグラスを被せて乾燥させた。

16-5. 顕微鏡観察、データ取得・解析

BZ-X800 (Keyence) を用いてスライドを観察 (対物レンズ: CFI Plan Apo λ 100xH) し、各サンプル 25 枚 (1 枚で 1 細胞の写真) 以上撮影して写真データを取得した。取得した写真データは一枚ずつ手動で総染色体数、SCE 数をカウントし、染色体 100 個あたりの SCE 数を算出した。実験は 3 回実施し、それらのデータを合計して比較検討した。

17. 統計学的解析

統計学的解析は Prism 8.0 (GraphPad) を使用し、解析結果は平均 $\pm$ 標準誤差で示し

た。検定は正規分布データに関してはtwo-tailed t-tests、あるいはone-way ANOVA with multiple comparisons testsを、非正規分布データに関してはtwo-tailed Mann-Whitney U testsを使用した。P値は0.05 未満を統計学的有意差有りとし、 $*0.01 \leq P < 0.05$ 、 $**0.001 \leq P < 0.01$ 、 $***0.0001 \leq P < 0.001$ 、 $****P < 0.0001$ で示した。また有意差なしの場合、not significant (ns) と表記した。

結果

1. CAPE 患者の皮膚では revertant mosaicism を生じる

本研究で解析対象とした患者 (Case 1; 60 歳, 男性) は生下時より全身に皮疹があり、幼少期から北海道大学病院の皮膚科外来に通院していた。臨床的には全身に鱗屑を伴う角化性紅斑が広がり、いわゆる紅皮症の状態を呈していた。また眼瞼外反や掌蹠の過角化、手指関節の屈曲拘縮等の所見も認めた (図 25a-c)。先天性魚鱗癬様紅皮症という魚鱗癬の一型と臨床診断して長らく経過観察していたが、各種遺伝子解析では病原変異の同定に至っていなかった。2012 年に *CARD14* 遺伝子変異に伴う乾癬や毛孔性紅色糠疹が報告され (Fuchs-Telem et al., 2012; Jordan et al., 2012b, 2012a)、臨床的に魚鱗癬に類似し得ることがわかってきたことから自験例でも *CARD14* 遺伝子の変異解析を行うこととした。患者血液由来ゲノム DNA を用いて解析を行ったところ、データベースに記載のないヘテロ接合性のミスセンス変異 c.356T>C (p.Met119Thr) を認めた (図 25d)。同変異は *CARD14* 遺伝子の exon 4 に位置していたが、過去の報告からこの周辺が病原変異のホットスポットであることがわかっており (図 25e) (Craiglow et al., 2018; Mellett, 2020)、自験例の皮膚症状にも関連している可能性が高いと考えられた。ミスセンス変異のため病原性の証明は難しいが、本研究では変異型 *CARD14* 発現細胞の解析を通じ、その病原性を担保した (結果は後述)。以上より、本症例を CAPE と診断した。

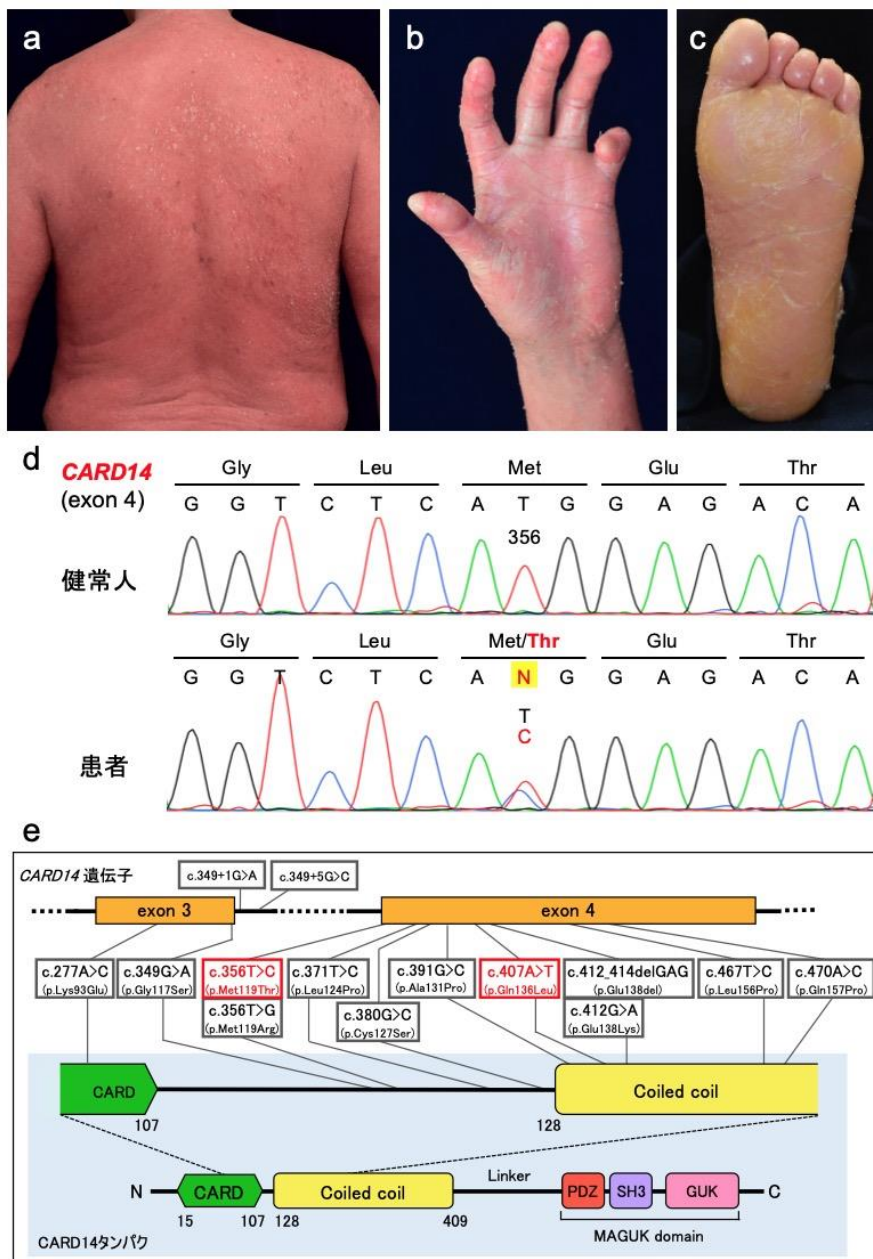


図 25. Case 1 の臨床像と *CARD14* 遺伝子解析

- a, b, c. 全身に落屑性紅斑が広がり、紅皮症の状態であった (a)。掌蹠の過角化 (b, c) や関節の屈曲拘縮も見られた (b)。
- d. *CARD14* 遺伝子の変異解析では exon 4 にミスセンス変異 c.356T>C (p.Met119Thr) をヘテロ接合性に認めた。
- e. CAPE に関連する変異のほとんどが exon 3 あるいは 4 に限局しており、この部位がホットスポットと考えられる。Case 1 で認めた c.356T>C もこの領域の変異であった (赤でハイライト)。なお、後述する Case 2 の変異 c.407A>T (p.Gln136Leu) も同領域に認められる (赤でハイライト)。

Case 1 の皮膚を詳しく観察すると、全身に数 mm～20 mm 程度の常色～緑色調のスポット状皮膚領域が多数見られることがわかった (図 26a)。これらのスポットでは他で見られるような鱗屑や皮膚の硬化がなく、一部はごくわずかに陥凹して触知された。問診上、本人はこれらのスポットに注目したことがなく、出現時期ははっきりしなかった。臨床的にこれらのスポットが *revertant spot* である可能性を考え、病変部位 1 ヶ所 (*affected skin*) と正常化皮膚スポット 3 ヶ所 (*revertant spot* #1/ #2/ #3) を皮膚生検して病理組織学的に比較した (図 26b-d)。その結果、病変皮膚では不全角化を伴う過角化、顆粒層消失、表皮肥厚、真皮浅層の炎症細胞浸潤が見られるのに対し、スポット 3 ヶ所ではそれらの所見が消失し、健常人皮膚と同じパターンを呈していた (図 26e-h)。CAPE は *CARD14* 遺伝子変異に伴い発症するがその発症メカニズムは一般的な尋常性乾癬に類似し、病変皮膚 (特にケラチノサイト) では炎症性ケモカインである interleukin-8 (IL8) や C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20) の発現が亢進すると考えられている (Mellett, 2020)。そこで病変皮膚と正常化皮膚スポットの *IL8*、*CCL20* mRNA 発現量を比較したところ、正常化皮膚スポットではこれらの発現量が有意に低下していた (図 27)。この結果から患者で認められたスポット領域は遺伝子変異の影響を受けていない、つまり遺伝子変異が消失している可能性が高いと考えられた。

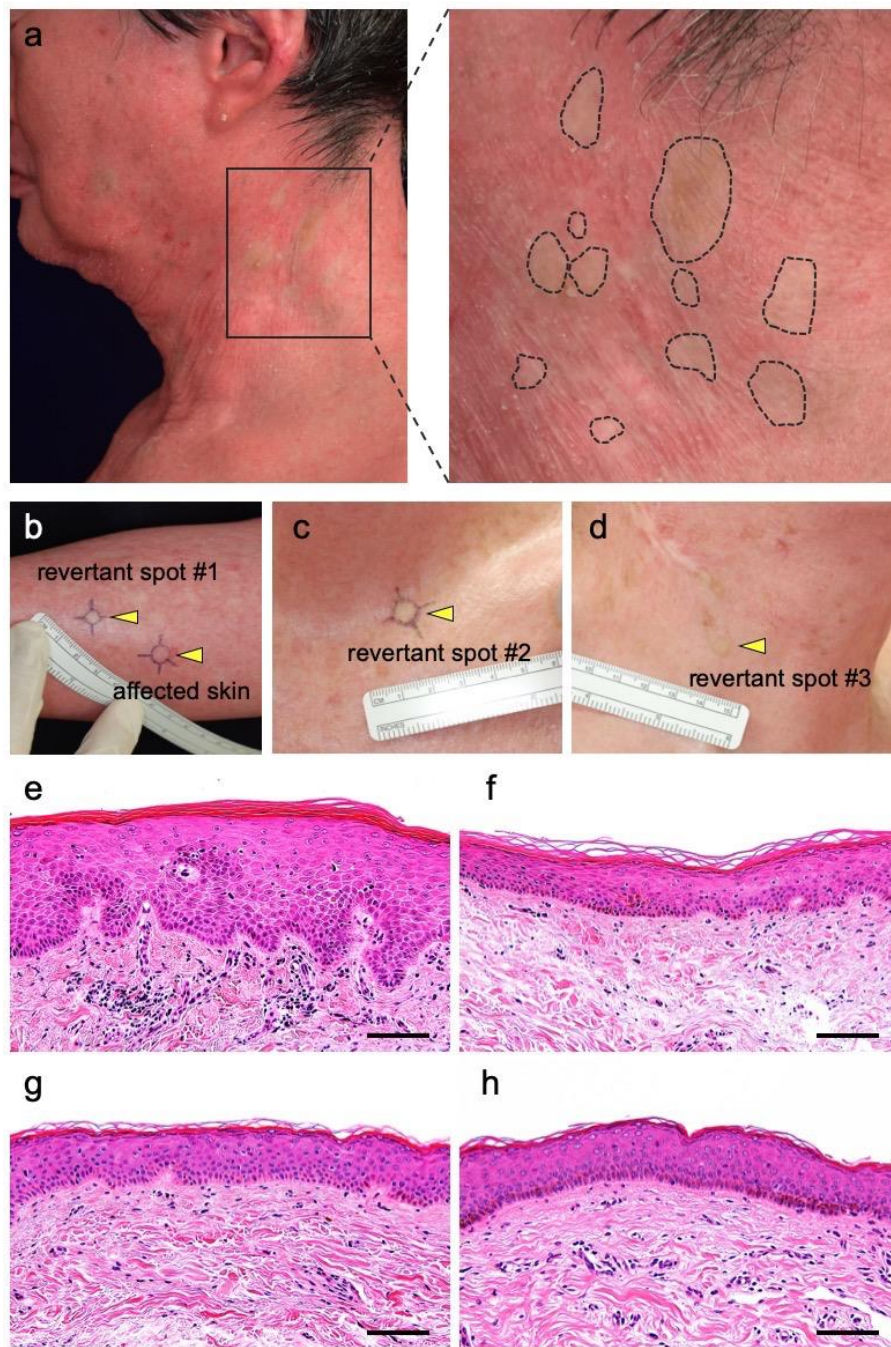


図 26. Case 1 における正常化皮膚スポットの臨床・病理所見

- a. 常色～緑色調で鱗屑を伴わない正常化皮膚スポットが多発していた。
- b-d. 左前腕の病変部位 (affected skin) (b) の他、左前腕 (b)、左前胸部 (c)、右前頸部 (d) の正常化皮膚スポット (それぞれ revertant spot #1/ #2/ #3) から皮膚生検を実施した。
- e-h. 病変部位 (e) と revertant spot #1 (f)、#2 (g)、#3 (h) の病理組織学的所見 (HE 染色, scale bar = 100 μ m)。

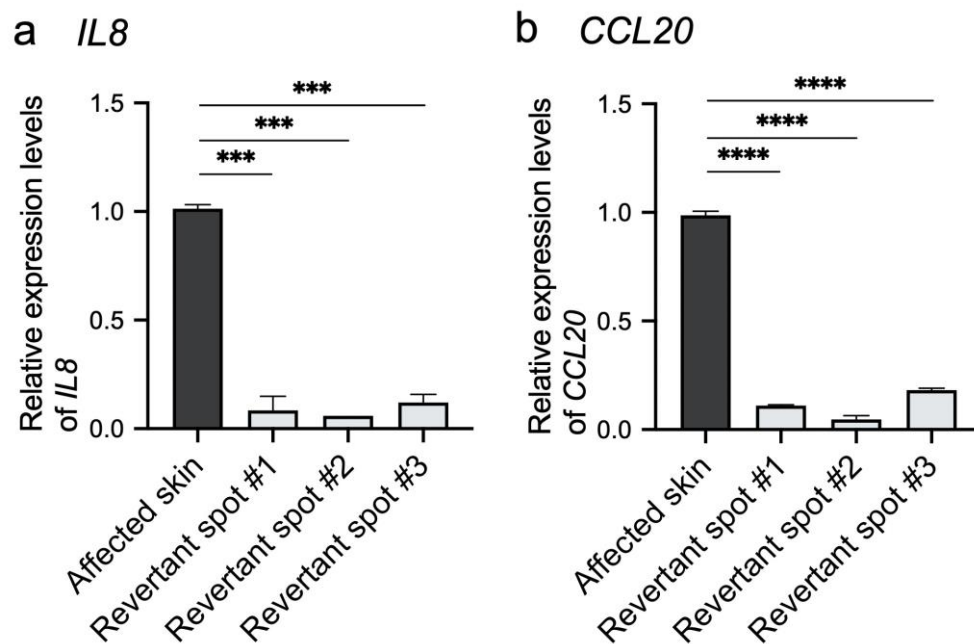


図 27. 病変皮膚と正常化皮膚スポットにおける炎症性ケモカインの発現
 病変皮膚と正常化皮膚スポット 3 ヶ所の *IL8* (a) と *CCL20* (b) の mRNA 量を比較すると、正常化皮膚スポットで有意に発現が低下していた。

次に、正常化皮膚スポットの遺伝子型を調べるために、採取した皮膚検体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、*CARD14* 遺伝子の病原遺伝子変異の有無を調べた。その結果、正常化皮膚スポットの表皮のみで遺伝子型が野生型ホモ、すなわち変異 allele の消失が確認された (図 28)。以上より、患者に多数認められた正常化皮膚スポット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 spot であることが証明された。なお、これまでに CAPE 患者において revertant mosaicism は報告されておらず、自験例で得られた結果は世界初の知見であった。

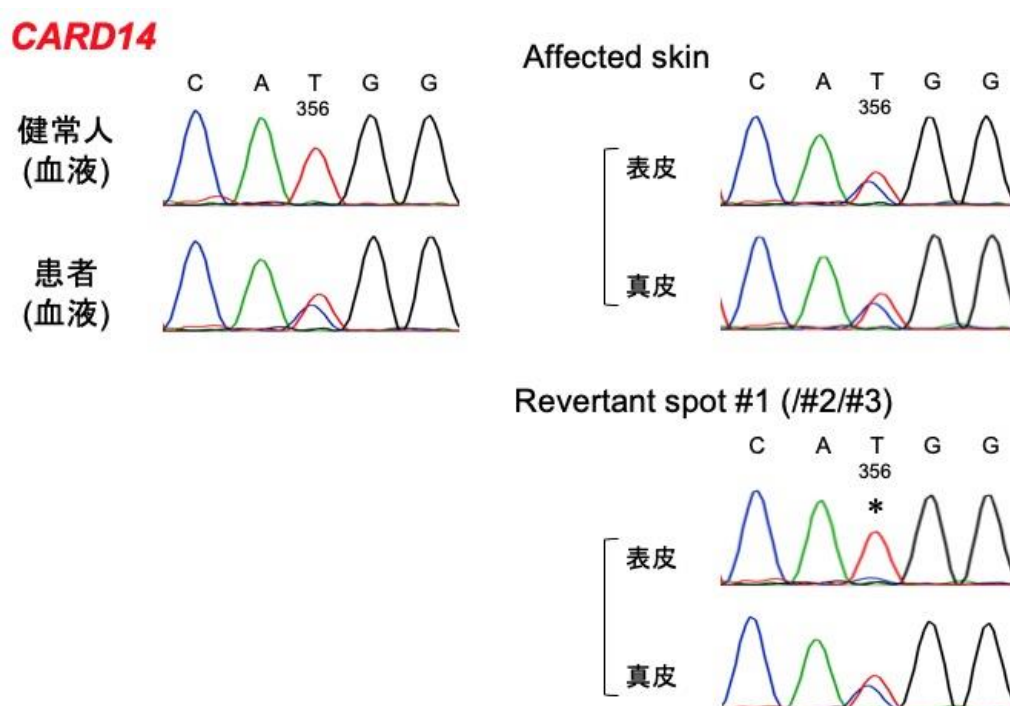


図 28. Revertant spot の遺伝子解析

臨床的に正常化していると思われたスポット 3 ヶ所の表皮由来ゲノム DNA を解析すると *CARD14* 遺伝子変異が消失していた (*).

2. Revertant spot の表皮細胞では 17 番染色体の LOH により変異が消失している

これまで遺伝性角化症における revertant mosaicism では HR による変異消失機序が報告され、北海道大学皮膚科でも同様の現象を複数の疾患で確認・報告している (Nomura, 2020; Nomura et al., 2018; Suzuki et al., 2016, 2019)。そこで、CAPE における revertant mosaicism でも同様の変化を認めるかどうかを調べるため、全ゲノム SNP アレイを実施した。Affymetrix® CytoScan™ HD Array (Affymetrix) を用いて、病変皮膚、および revertant spot 3 ヶ所 (表 5) の表皮から抽出したゲノム DNA の SNP を 260 万ヶ所以上解析した。その結果、revertant spot 3 ヶ所全ての 17 番染色体においてコピー数変化を伴わない大規模な LOH が検出された (図 29a)。コピー数変化を伴わないことから変異の消失が変異 *CARD14* 遺伝子の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。また、この LOH は *CARD14* 遺伝子よりも明らかにセントロメア側に交叉点があり、それがテロメアまで続いていた。この結果は、交叉点からテロメア側が全て一種類の配列になっていること、すなわち交叉点で片方の相同染色体の配列と組換えが起こることでテロメア側の配列が置き換わり、元の配列を失ったことを示す。さらにその交叉点の位置は解析したスポット 3 ヶ所で全て異なっており、この変化が体細胞であるケラチノサイトにおける HR により生じたことが明らかとなった。なお、revertant spot #1 と #3 に関しては 17 番染色体以外の領域については明らかな LOH は検出されなかったが、revertant spot #2 では 9 番染色体にモザイク状の LOH が検出された (図 29b)。過去の遺伝性角化症における revertant mosaicism では病原遺伝子の座乗する染色体でのみ LOH を生じて変異が消失しており、その他の染色体異常が報告されたことはない。この revertant spot #2 における他の染色体異常の存在は組換え現象が全ての染色体でランダムに生じうることを示唆している可能性が考えられた。

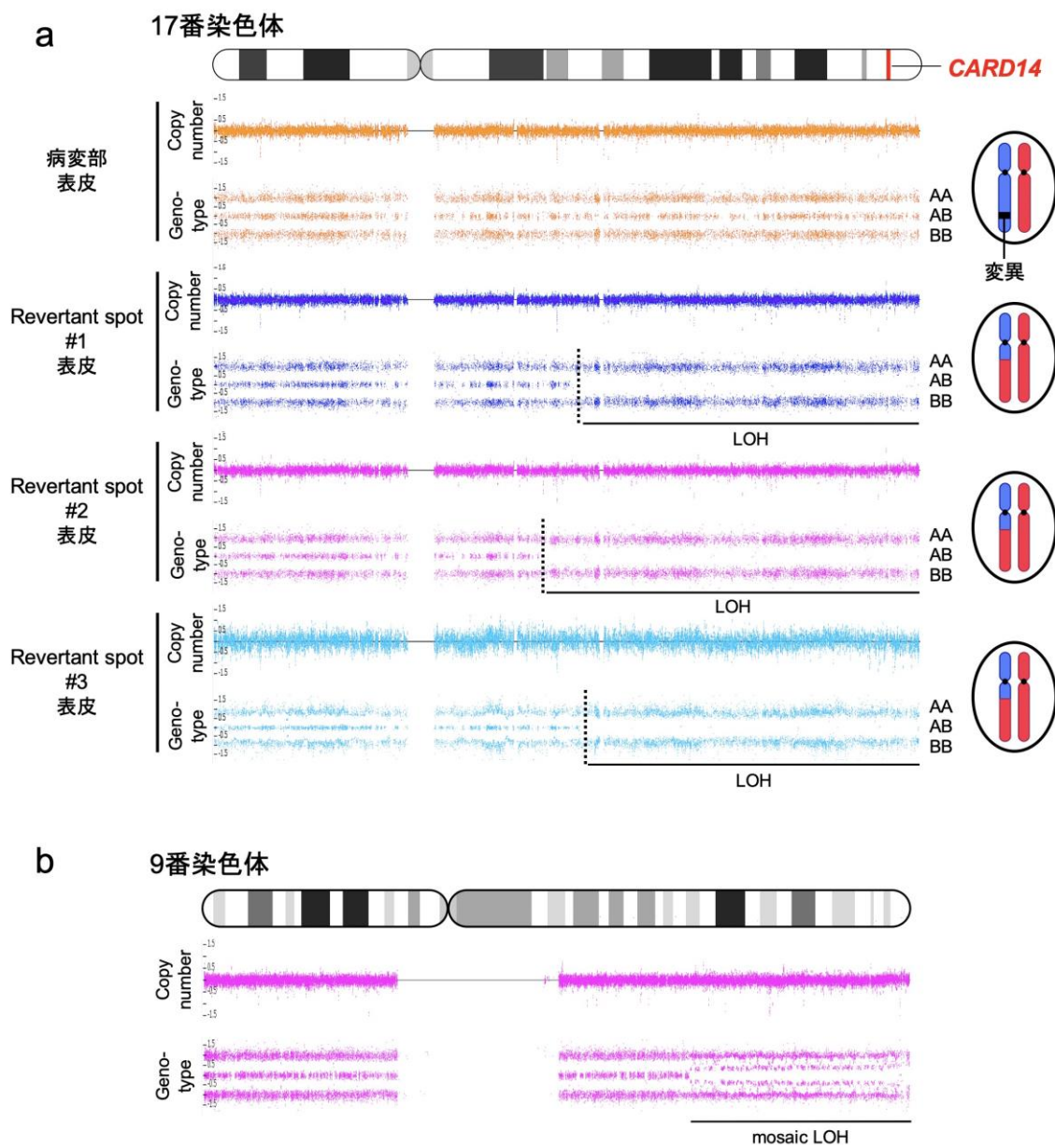


図 29. 全ゲノム SNP アレイ解析の結果

- a. Revertant spot 3 ヶ所の表皮ゲノム DNA では 17 番染色体で LOH が認められた。図中の点線は交叉点の位置、右図は各スポットにおける染色体のイメージを表す。
- b. Revertant spot #2 では 9 番染色体の変化も見られた。

3. CAPE では染色体異常に伴う皮膚腫瘍を形成する可能性がある

Case 1 では過去に複数回皮膚腫瘍を生じ、その都度腫瘍摘出術を行ってきた経緯があった (Arita et al., 2003; Natsuga et al., 2007)。過去の腫瘍の臨床・組織学的診断は有棘細胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) や悪性黒色腫であった (図 30)。今回、revertant mosaicism の解析を行っている時期に、左頸部と右後頸部に小さな腫瘍性病変があることに気づいた (図 31)。治療を含め腫瘍を全摘し、病理組織学的検査を行ったところいずれも SCC in situ と考えられる所見であった。これらの病変も revertant spot と同様に表皮と真皮を分離し、表皮由来ゲノム DNA を用いて全 SNP アレイ解析を行った。その結果、左頸部の皮疹からは 2 番染色体のトリソミー、9 番染色体 (短腕) と 19 番染色体 (短腕) の LOH が検出され、右後頸部の皮疹からは 9 番染色体 (長腕) の LOH が検出された (図 31)。これらの染色体異常が腫瘍形成に関与したかどうかの判断は難しいが、少なくとも組織学的に異常な部位で染色体異常があることがわかり、この事実もまた組換え現象が全ての染色体で生じうることを示唆していると考えられた。

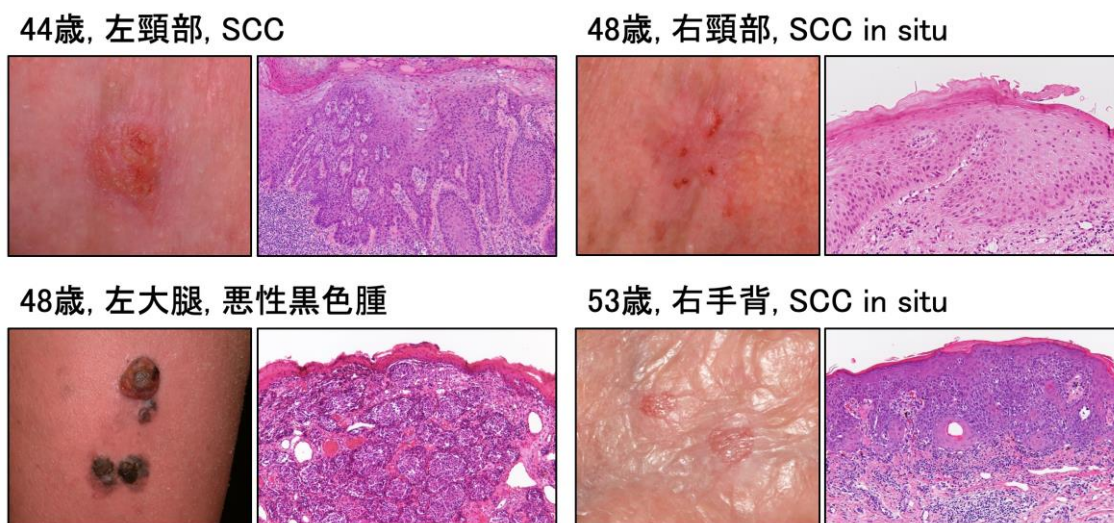


図 30. Case 1 で過去に治療された皮膚腫瘍

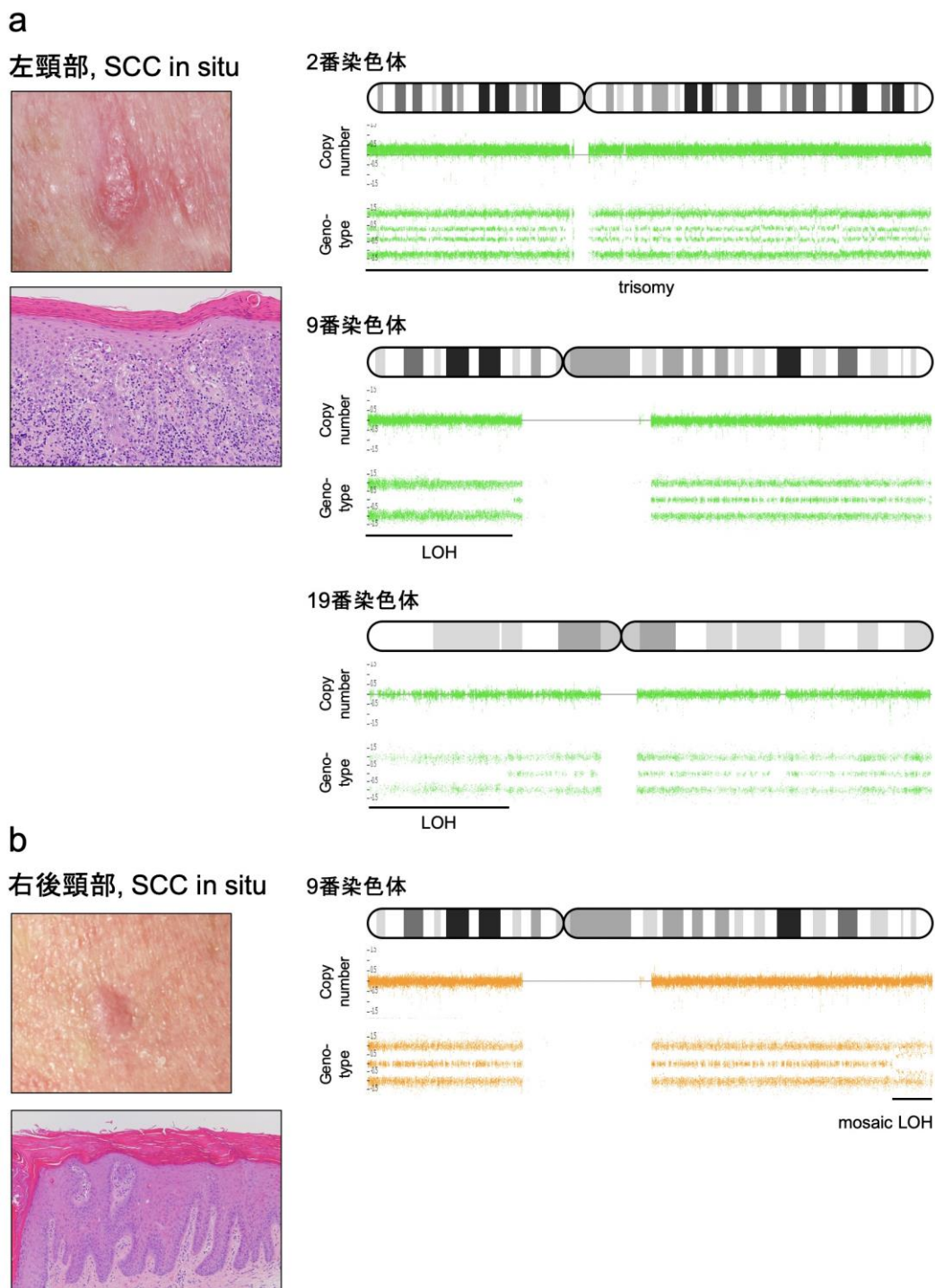


図 31. Case 1 に生じた皮膚腫瘍とそのゲノムに認められた染色体異常

- 左頸部の SCC in situ からは 2 番染色体のトリソミー、9 番・19 番染色体 (いずれも短腕) の LOH が検出された。
- 右後頸部の SCC in situ からは 9 番染色体 (長腕) にモザイク状に LOH が検出された。

4. 他の CAPE 症例でも revertant mosaicism を認める

Case 1 で revertant mosaicism を認めたが過去に CAPE における報告はないため、他の CAPE 症例で revertant mosaicism が見られるかどうかを検証する必要があると考えた。本邦ではこれまでに数例の CAPE 症例が報告されており、そのうちの一人に本研究へ協力いただくことができた (Takeichi et al., 2017)。患者は 27 歳女性で臨床的には Case 1 同様に全身の角化性紅斑、眼瞼外反、掌蹠の過角化、手指関節の屈曲拘縮を認め (図 32a-c)、明らかな腫瘍性病変は見られなかった。遺伝子変異はヘテロ接合性のミスセンス変異 c.407A>T (p.Gln136Leu) であった (Takeichi et al., 2017)。詳細な身体診察を行ったところ、下肢に revertant spot を思わせる部位が複数ヶ所見られることがわかり、皮膚生検を実施した。

病変部位 1 カ所、正常化皮膚スポット 3 カ所 (図 32d, e) を解析したところ組織学的には正常化皮膚スポットで表皮肥厚や炎症細胞浸潤の程度が軽減し、顆粒層も確認された (図 32f-i)。病変皮膚と正常化皮膚スポットで *IL8* と *CCL20* の mRNA 発現量を比較すると正常化皮膚スポットで有意に発現が低下していた (図 33)。それぞれの検体を表皮と真皮に分離し、ゲノム DNA を抽出して、*CARD14* 遺伝子の病原遺伝子変異の有無を調べたところ、revertant spot #1/ #2/ #3 の表皮のみで遺伝子変異の消失が確認され (図 34a)、これらのスポットが revertant spot であることが証明された。続いて全ゲノム SNP アレイ解析を実施したところ、revertant spot #3 のみ 17 番染色体にコピー数変化を伴わない LOH が検出され、revertant spot #1、#2 では認めなかった (図 34b)。Revertant spot #3 では 17 番染色体以外の染色体異常は確認されなかった。

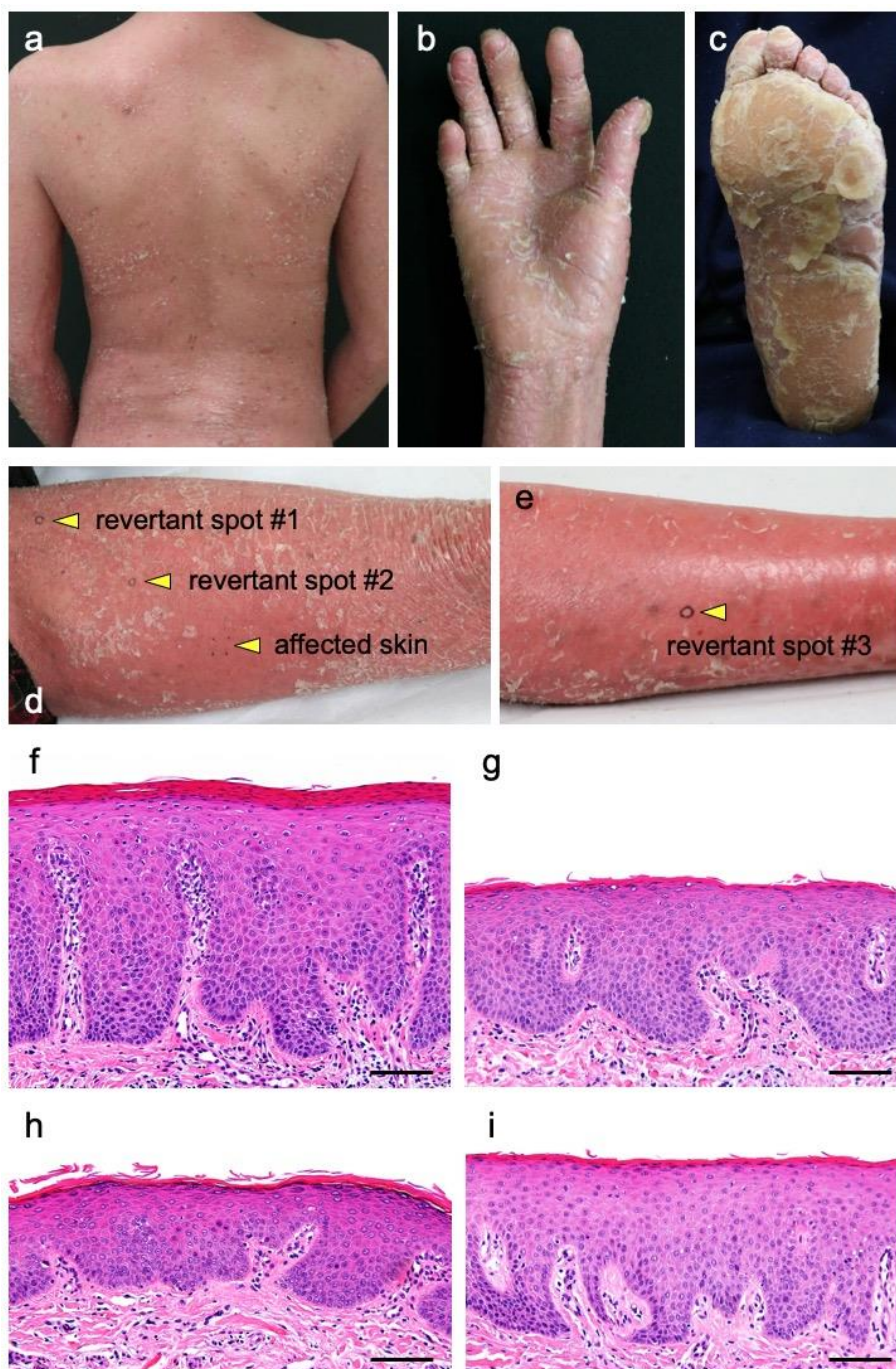


図 32. Case 2 の臨床像と正常化皮膚スポットの臨床・病理所見

a-c. 全身に落屑性紅斑が広がり (a)、掌蹠の過角化 (b, c) も顕著であった。

d, e. 左大腿 (d) の病変皮膚と正常化皮膚スポット 2 ヶ所 (revertant spot #1/ #2)、また左下腿 (e) の正常化皮膚スポット 1 ヶ所 (revertant spot #3) から皮膚生検を実施した。

f-i. 病変部位 (f) と revertant spot #1 (g)、#2 (h)、#3 (i) の病理組織学的所見 (HE 染色, scale bar = 100 μ m)。

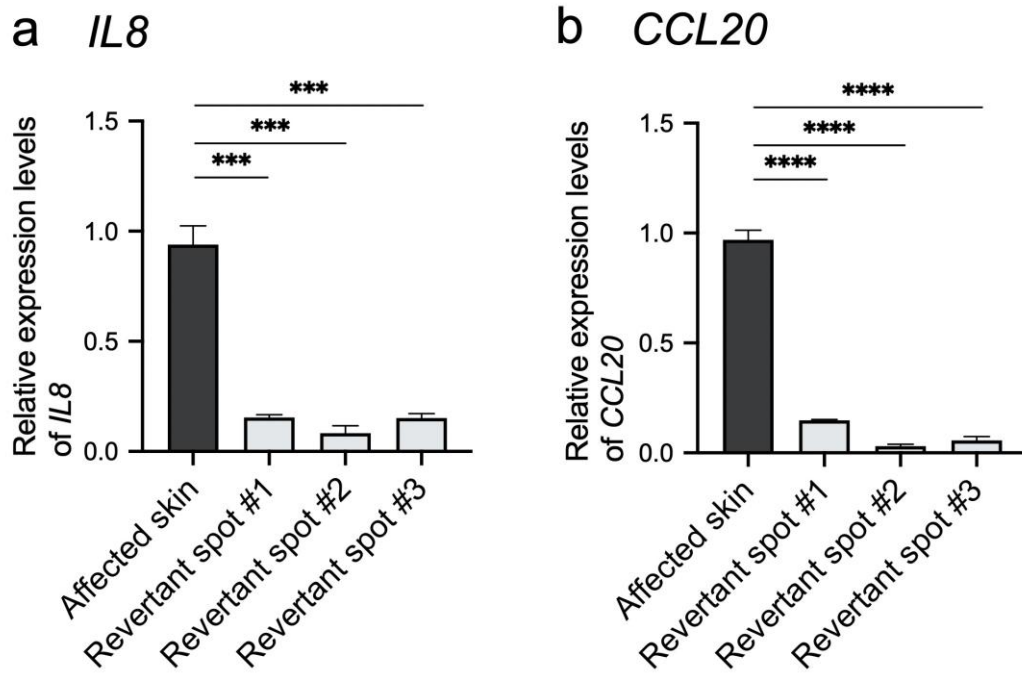


図 33. Case 2 の病変皮膚と正常化皮膚スポットにおける炎症性ケモカインの発現
病変皮膚と正常化皮膚スポット 3 ヶ所の *IL8* (a) と *CCL20* (b) の mRNA 量を比較すると、正常化皮膚スポットで有意に発現が低下していた。

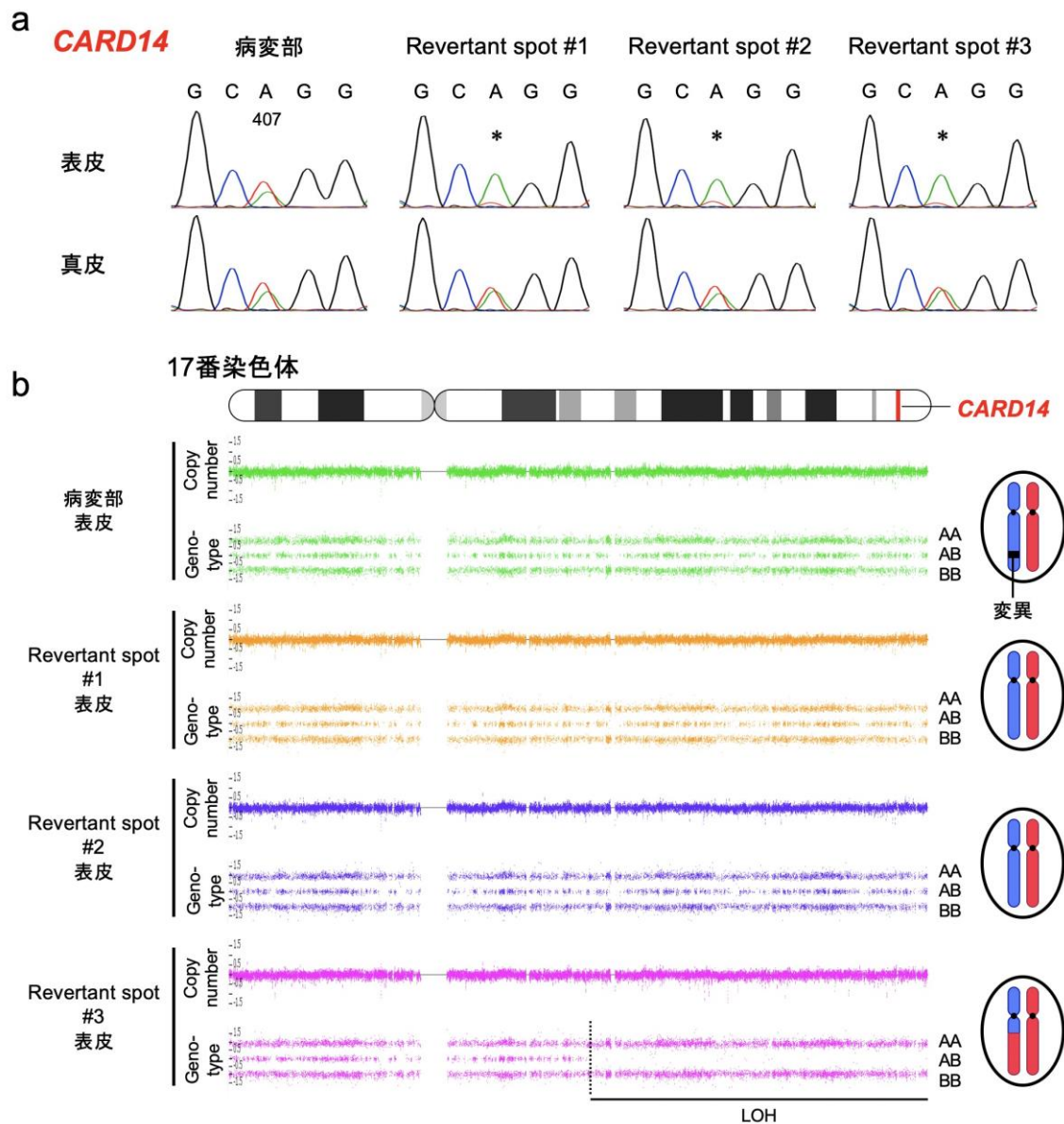


図 34. Case 2 における revertant spot の遺伝子解析

- 正常化皮膚スポット 3 ヶ所の表皮由来ゲノム DNA を解析すると *CARD14* 遺伝子変異が消失していた (*)。
- 全ゲノム SNP アレイ解析では revertant spot #3 に 17 番染色体の LOH を認めたが、revertant spot #1、#2 では認められなかった。図中の点線は交叉点の位置、右図は各スポットにおける染色体のイメージを表す。

Revertant spot #1、#2 に関しては LOH を認めなかったものの、狭い領域での組換え現象は可能性が残るため、変異近傍の SNP の状況をチェックすることとした。患者の唾液由来ゲノム DNA を用いて解析を行ったところ、病原変異のセントロメア側に c.349+17G>T (rs9902358)、テロメア側に c.633G>A (rs4889990) をヘテロ接合性に有することがわかった。この SNP を revertant spot のゲノム DNA で調べたところ、LOH が確認された revertant spot #3 では表皮において SNP のヘテロ接合性が失われているのに対し、revertant spot #1、#2 ではヘテロ接合性が保たれていた (図 35)。この結果から revertant spot #1、#2 における病原変異消失機序は back mutation か非常に狭い領域 (領域の特定が不可能な範囲) で生じた組換えと考えられたが、その区別は現時点では困難であった。

以上より、Case 2 の解析を通じて CAPE で revertant mosaicism を生じうること、また一部機序不明のスポットは見られたものの、患者皮膚の細胞で HR を介した染色体変化が生じうることでより強固に証明された。

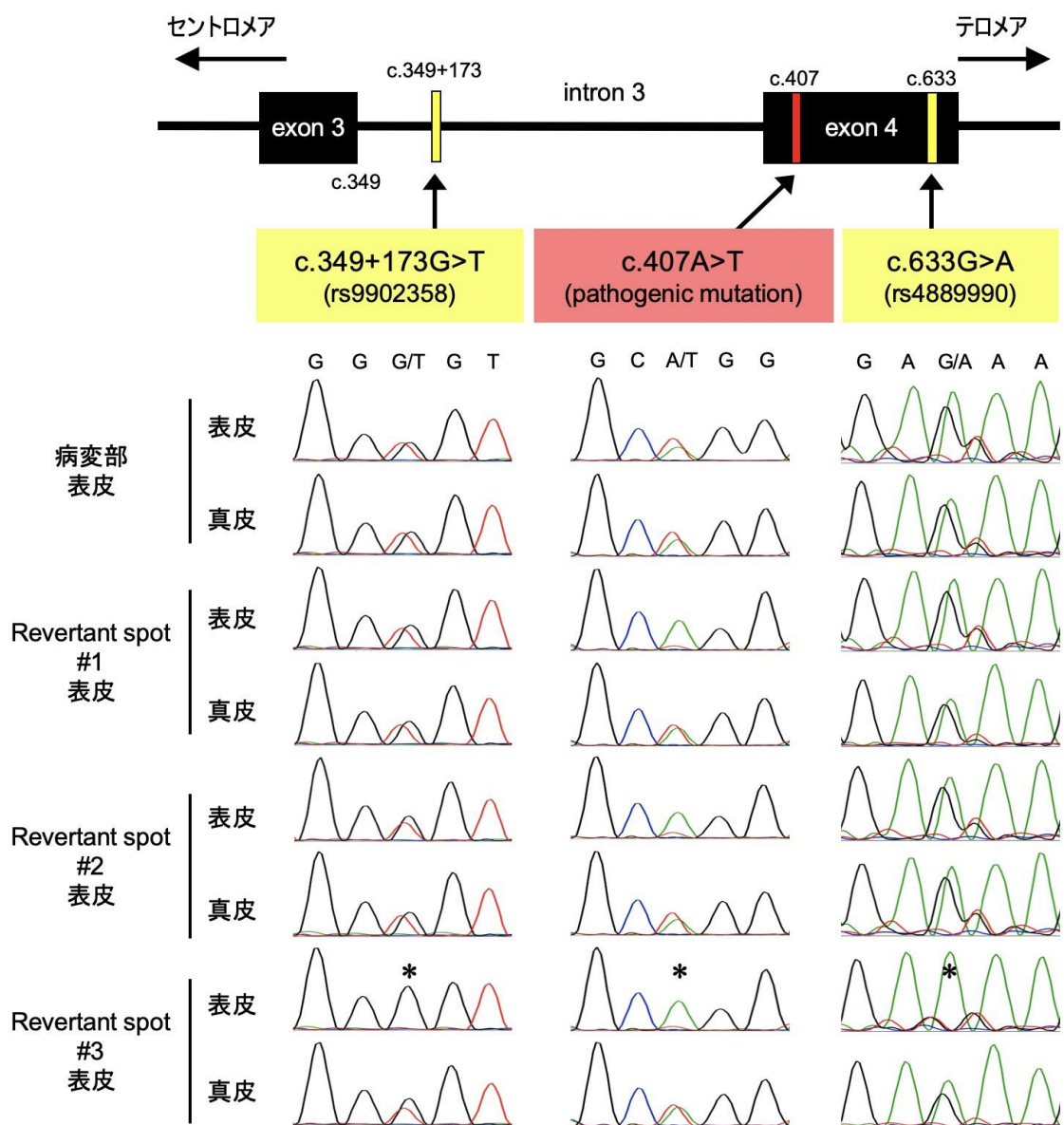


図 35. Case 2 の病原変異近傍の SNP 解析

患者は病原変異である c.407A>T の両サイドに rs9902358 と rs4889990 の SNP をヘテロ接合性に有していた。この SNP を病変皮膚と revertant spot 3 ヶ所で調べると revertant spot #3 の表皮ではいずれも片側 allele が消えてホモ接合性に変化していた (*)。一方、revertant spot #1、#2 の表皮では病原変異は消失しているものの両サイドの SNP はヘテロ接合性のまま残存していた。

5.2 症例で認めた *CARD14* 変異は NF- κ B 経路を活性化させる機能獲得変異である

CAPE に関連する *CARD14* 遺伝子変異は機能獲得変異で NF- κ B 経路を異常活性化させることが知られている (Craiglow et al., 2018; Fuchs-Telem et al., 2012; Jordan et al., 2012a; Mellett, 2020)。報告されているほぼ全ての病原変異がミスセンス変異だが、その病原性はほとんどのケースで確認されていない。本研究ではまず変異型 *CARD14* の病原性について検討した。

まずは野生型 (WT)、変異型 (M119T; p.Met119Thr と Q136L; p.Gln136Leu) の *CARD14* 発現ベクターを作製し、U2OS 細胞で過剰発現させて細胞内での局在を評価した。その結果、野生型は細胞質内にびまん性に局在したが、変異型は核周囲に凝集塊を形成した (図 36a)。*CARD14* は細胞内でオリゴマーを形成していると考えられているが (Wang et al., 2018)、変異に伴い異常に重合してしまうものと推察される。自験例とは異なるが c.413A>C (p.Glu138Ala) に関しては 293T 細胞内で異常凝集塊を形成することが確認されており (Wang et al., 2018)、異常凝集の所見は変異の病原性を示す傍証と考えられる。なお、自験例の変異体は HaCaT 細胞に発現させた際にも凝集塊を形成し (図 36b)、細胞種にかかわらず同様の変化を生じることが示唆された。

次に NF- κ B 経路を異常活性化させるかどうかカルシフェラーゼアッセイを用いて検証した。この方法は過去にも多数用いられているものである (Fuchs-Telem et al., 2012; Jordan et al., 2012a)。この結果、野生型 *CARD14* 発現時と比較して変異型 *CARD14* 発現時にはこのシグナル経路がより活性化することが示された (図 36c)。

以上の結果から、自験例における 2 種類の変異が細胞内で NF- κ B 経路を異常に活性化させる機能獲得変異であることが証明された。

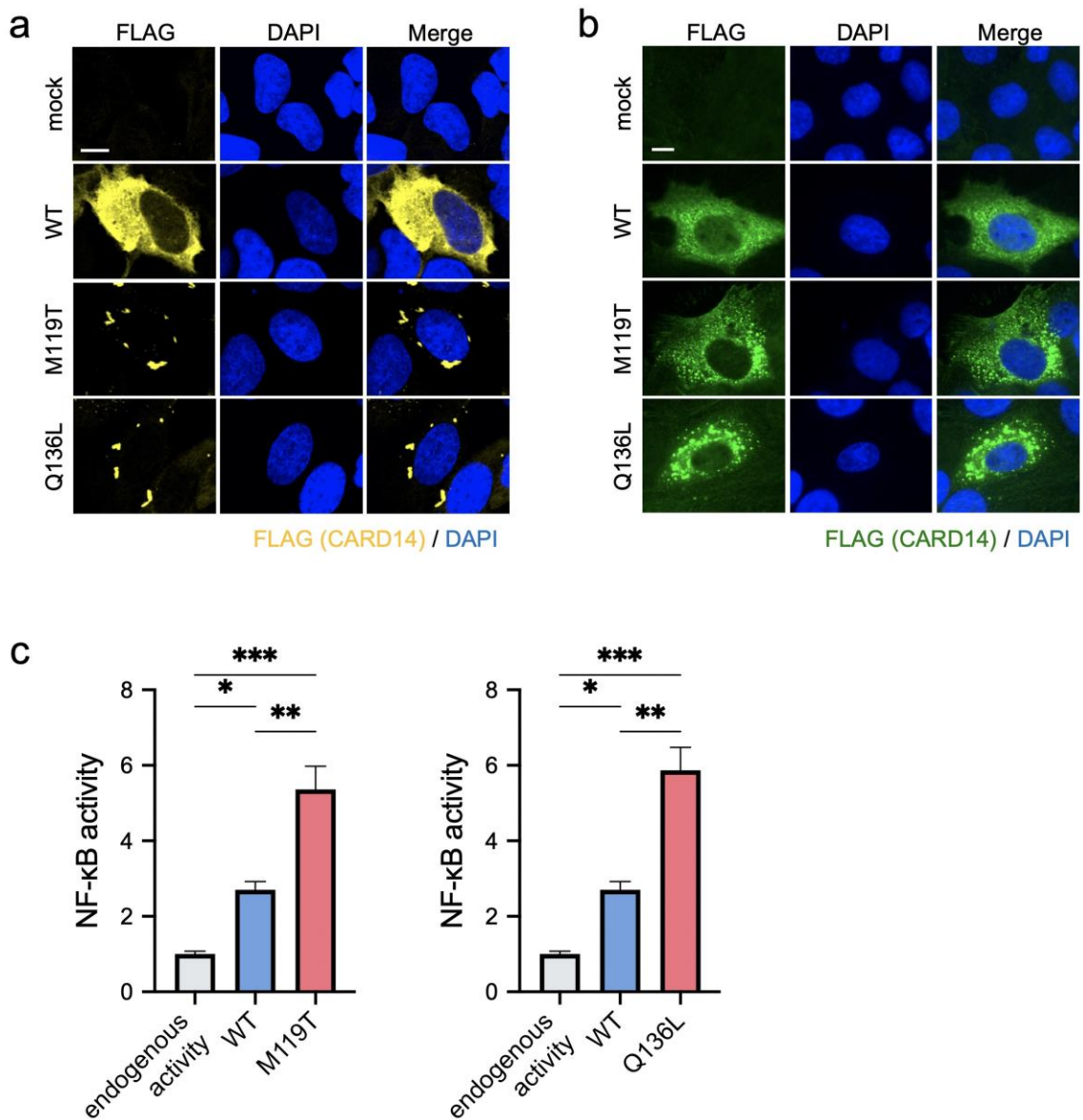


図 36. 変異型 CARD14 の病原性の評価

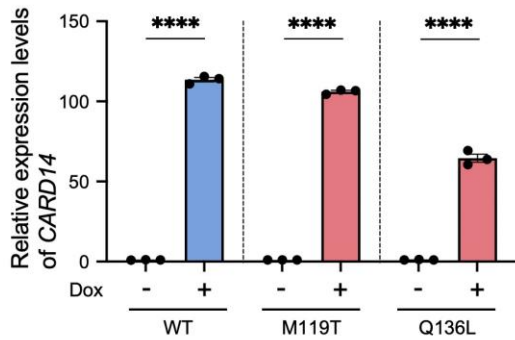
- a. U2OS 細胞内で一過性発現させた際の CARD14 局在 (scale bar = 10 μ m)。
 b. HaCaT 細胞内で一過性発現させた際の CARD14 局在 (scale bar = 10 μ m)。
 c. ルシフェラーゼアッセイによる NF- κ B 経路の活性化評価 (左; WT と M119T の比較、右; WT と Q136L の比較)。

6. CARD14 発現の影響を検証可能な CARD14 発現誘導細胞株を作製した

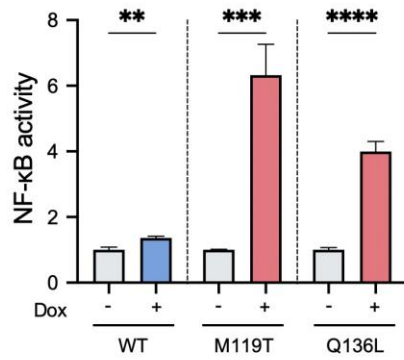
本研究では CAPE 症例において revertant mosaicism を認め、その変異消失メカニズムとして HR の関与が示唆された。変異型 CARD14 自体、あるいはそれに伴う NF- κ B 経路の活性化がこのゲノム変化を来している可能性があると考えられ、その機序解明を目指して実験に使用可能な細胞株を作製することとした。CARD14 発現に伴う細胞変化を純粋に評価するためには比較する細胞株 (変異型 CARD14 非発現細胞と発現細胞など) の遺伝的バックグラウンドが揃っていることが重要と考えられ、Dox の有無でタンパク質発現を調節できるテトラサイクリン発現誘導システムの利用が有効と考えられた。これを踏まえ「実験方法 9-1/9-2.」に記載したように細胞株を作製し、最終的に U2OS_Tet_CARD14_WT#7、U2OS_Tet_CARD14_M119T#6、U2OS_Tet_CARD14_Q136L#6 の 3 種類を樹立した。

この細胞株の評価として mRNA 定量と免疫染色による CARD14 発現・局在評価、ルシフェラーゼアッセイによる NF- κ B 経路活性化の評価、NF- κ B 経路活性化に伴うケモカイン産生の評価を行った。まず mRNA 定量では Dox の添加により *CARD14* mRNA の発現が強く誘導された (図 37a)。免疫染色は細胞株作製・選定の段階でも行っていたが (図 13)、最終評価として改めて実施し、いずれの細胞株でも Dox 添加時に CARD14 をほぼ全ての細胞で発現し、変異型 CARD14 が核周囲で凝集塊を形成することを確認した (図 38)。またルシフェラーゼアッセイでは一過性発現実験の時と同様に変異体発現時により顕著な NF- κ B 経路の活性化が見られた (図 37b)。さらにこの変化は I κ B α の過剰発現により実験的に抑制できることも確認された (図 37c)。最後にケモカイン産生の評価として *IL8* と *CCL20* の mRNA 定量を行ったところ、やはり変異型 CARD14 発現時に著明な発現上昇が見られた (図 37d, e)。以上より、作製した CARD14 発現誘導細胞株では変異体発現に伴い患者皮膚と同様の炎症性変化を誘導することが可能と証明された。

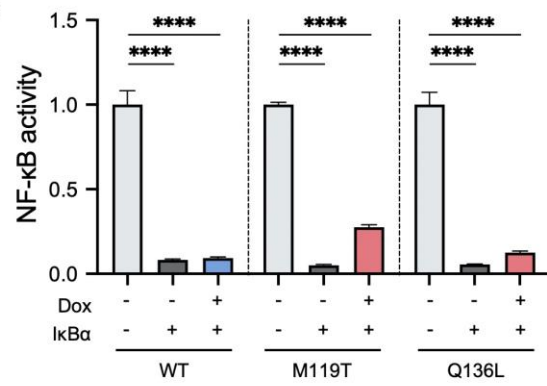
a *CARD14* mRNA



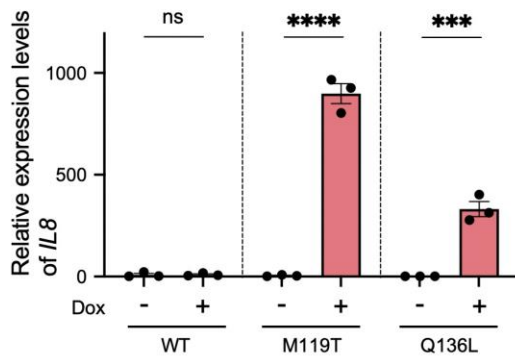
b



c



d *IL8* mRNA



e *CCL20* mRNA

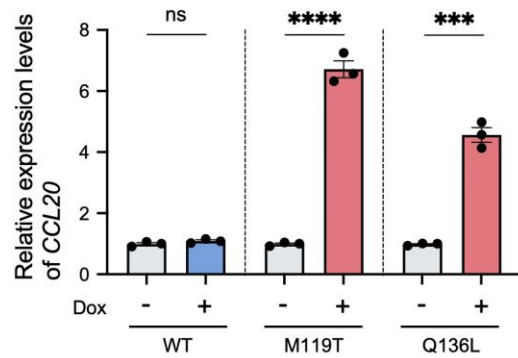


図 37. *CARD14* 発現誘導細胞株を用いた mRNA 定量と NF-κB 経路活性化の評価
a, d, e. Dox の有無による *CARD14* (a)、*IL8* (d)、*CCL20* (e) の mRNA 発現量の変化。
b. Dox の有無による NF-κB 経路活性の変化。
c. Dox 添加により活性化する NF-κB 経路は IκBα の過剰発現により抑制された。

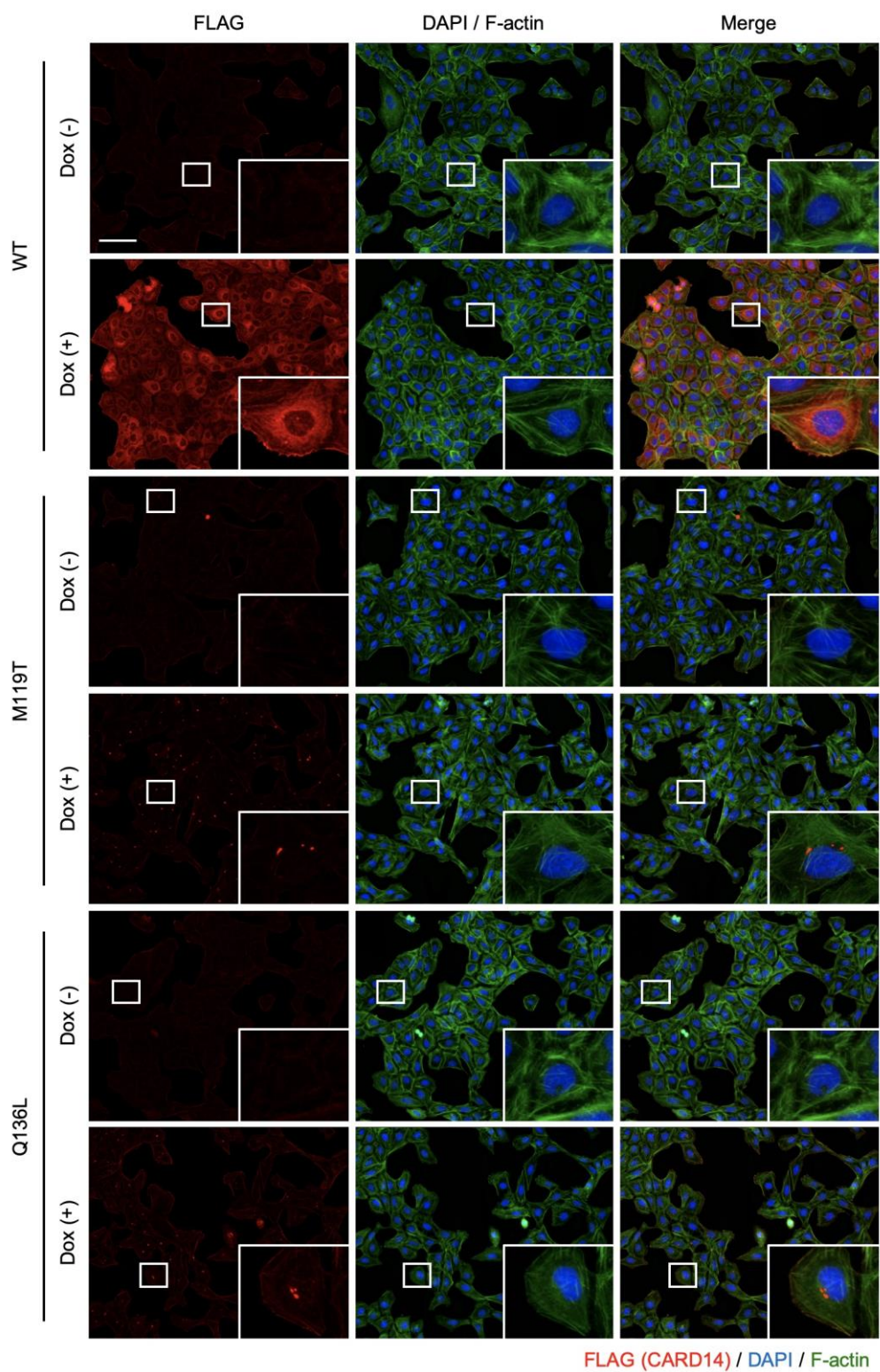


図 38. CARD14 発現誘導細胞株を用いた免疫染色
Dox を添加し、24 時間後に免疫染色を実施した。Dox 添加時のみ CARD14 が発現し、変異型は核周囲で凝集塊を形成した (scale bar = 100 μ m)。

7. 変異型 CARD14 発現は DNA 損傷を増加させない

変異型 CARD14 と HR の関連を追求するにあたり、DNA 損傷とその修復反応、あるいは DNA 複製と複製ストレス反応など多方面から CARD14 との関連を解析する必要があると考えた。そこでまずは DNA 損傷とその修復反応の面から解析を開始した。

「緒言: DNA 損傷と相同組換え」で述べたように、DNA 損傷には複数の種類が存在するが HR と関連があるのは DSB 修復のみである。DSB の修復経路は NHEJ、あるいは HR の 2 種類に大別され、HR 経路が選択された場合に結果として LOH を生じる可能性がある。ここで DSB の頻度自体が増えると相対的に HR 経路で修復される頻度も増えると考えられるため、まずは変異型 CARD14 が直接 DNA 損傷を誘導するかどうか (DSB を増加させるかどうか) に注目した。

DSB の存在を検出する最も有名なマーカーとしてヒストン H2AX のリン酸化が挙げられる。ヒストン H2AX はクロマチン構成タンパクの一つであるヒストン H2A のバリエーションで、DSB 出現に伴いその C 末端がリン酸化され、DSB 修復因子の誘導に関与するとされている (Fernandez-Capetillo et al., 2004)。まずは CARD14 発現に伴いリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) の蓄積量に変化があるかどうかを検証した。

CARD14 発現誘導細胞株に Dox を添加して 24 時間、48 時間、72 時間の時点でサンプルを回収し、その時点での γ H2AX 量を比較した。その結果、野生型、変異型共に明らかな γ H2AX の上昇は確認できず、変異型 CARD14 が直接 DSB を増加させる可能性は否定的と考えられた (図 39)。

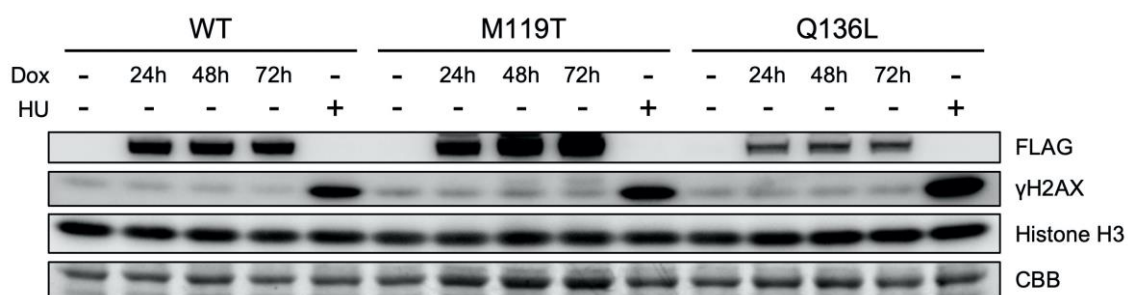


図 39. CARD14 発現に伴う DNA 損傷の評価

CARD14 発現誘導細胞株に Dox を添加し、24、48、72 時間後のタイミングで γ H2AX の蓄積量を評価した。なお、HU 添加サンプルをポジティブコントロール、Histone H3 染色をローディング量の指標 (以下同様) とした。

8. 変異型 CARD14 発現は DNA 損傷修復反応を変化させない

次に、CARD14 発現により DSB の修復経路選択が変化し HR の頻度が増えるかどうかを解析した。具体的には X 線照射やエトポシド添加による DSB の誘導、あるいはエンドヌクレアーゼによる特定部位の切断に対する修復反応を観察した。

まずは CARD14 発現誘導細胞株に X 線照射 (5 Gy) を行つて DSB を誘導し、その修復過程において NHEJ 関連因子 (53BP1)、あるいは HR 関連因子 (RPA2) の活性化 (リン酸化) に違いが見られるかどうかをウエスタンブロッティングで確認した。結果としては野生型、変異型共に CARD14 発現の有無による明らかな変化は見られなかった (図 40a)。 γ H2AX は照射直後に増加するものの 2~4 時間後には大幅に減少しており、その間に野生型、変異型いずれの場合も 53BP1 がリン酸化されていることから NHEJ が主要な修復経路であることがわかった。一方、RPA2 のリン酸化は時間が経過するにつれて徐々に増加することから長時間にわたり残存する DSB の修復に HR が関与していると考えられた。

同様の結果はエトポシドによる DSB 誘導実験でも確認された (図 40b)。今回は過去の報告 (Tammara et al., 2013) に則つて 10 μ M と 250 μ M の 2 種類の濃度を採用して実験を行ったが、いずれの場合にも γ H2AX の増加時期や減少速度、RPA2 のリン酸化のタイミングに明らかな変化は見られなかった。

さらに DR-GFP assay ではエンドヌクレアーゼによる DSB 誘導系で HR 頻度を測定・比較した。「実験方法 13.」に記載したように 2 種類の実験系を試したが、いずれの場合も変異型 CARD14 発現時に HR の頻度が上昇することはなかった (図 41)。

以上の結果から、変異型 CARD14 発現は DSB 修復経路の選択に影響を与えず、HR の頻度上昇には寄与しないことがわかった。

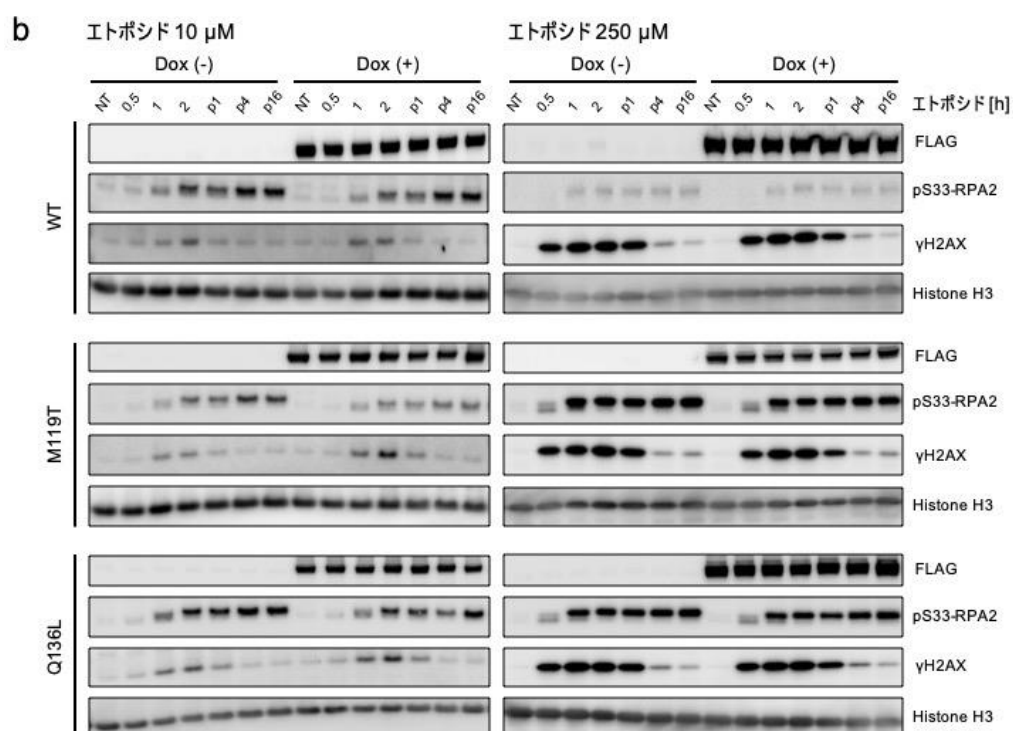
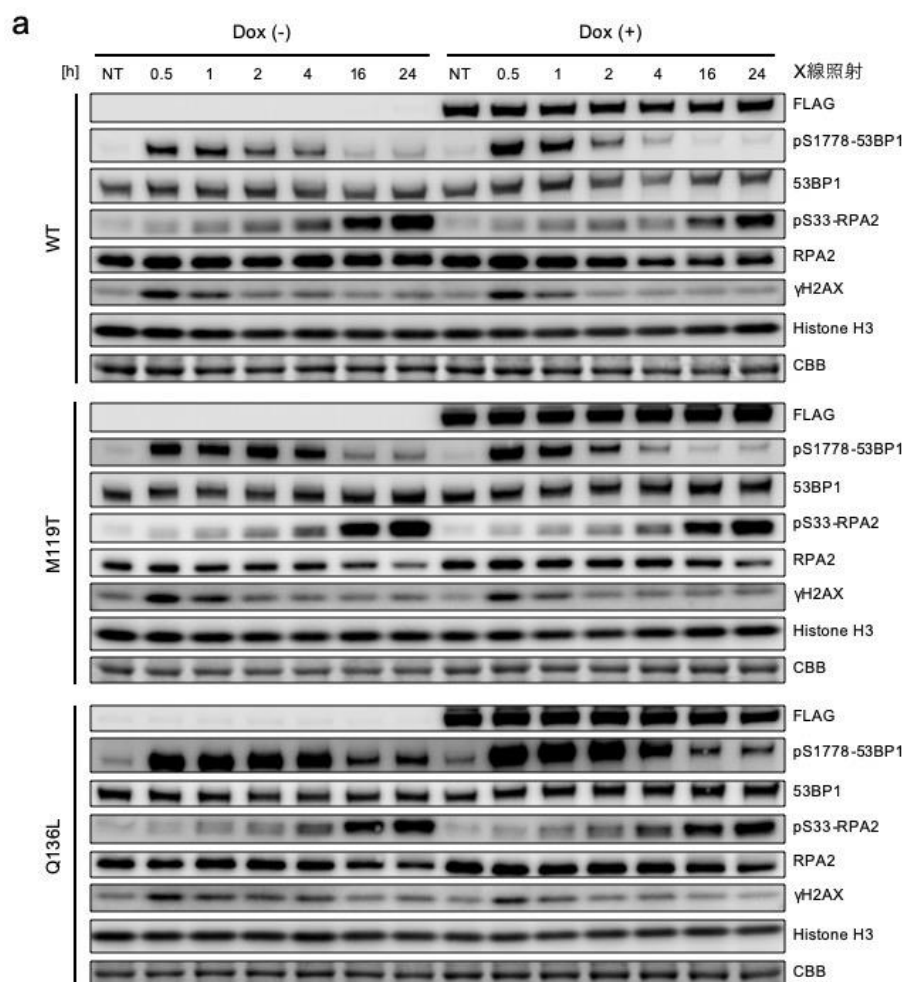


図 40. X 線とエトポシドにより誘導した DNA 損傷と修復の経時的変化

- a. X 線 (5 Gy) を照射後、24 時間経過するまでの γ H2AX 蓄積量と修復因子活性化の推移を評価した。
- b. エトポシド (10 μ M あるいは 250 μ M) を添加して 2 時間培養し、その後培地交換をしてさらに 16 時間後まで培養した。その過程における DSB 蓄積量と修復因子活性化の状態を評価した。

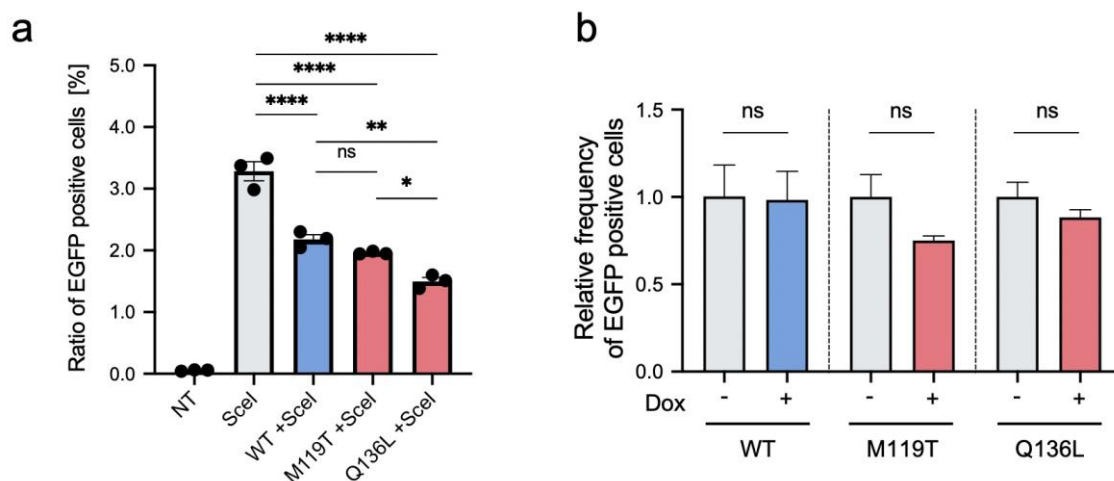


図 41. DR-GFP assay による HR の評価

- a. pDRGFP_U2OS_#5 に p3FLAG-CARD14wt/ M119T/ Q136L と pCBASceI を共発現させて評価を行った。変異型 CARD14 発現時に HR 頻度が上昇する結果は得られず、むしろ Q136L 発現時には若干の低下を認めた。
- b. CARD14 発現誘導細胞株に pDRGFP と pCBASceI を共発現させて評価を行った。いずれの場合も HR の頻度に差は見られなかった。

9. 変異型 CARD14 発現は細胞周期や DNA 複製を変化させない

CARD14 と DNA 損傷・修復反応の間に関連を見出すことはできなかったため、HR を生じうるもう一つの可能性として DNA 複製との関連を解析することとした。「緒言: DNA 複製と相同組換え」で述べたように DNA 複製と関連して HR を生じるとすると CARD14 発現により DNA 複製の停止が頻発するか、停止した際に複製フォークが崩壊しやすくなっている可能性が考えられる。これを踏まえ、まずは変異型 CARD14 発現が DNA 複製に影響を与え、複製速度や細胞周期の変化をきたすかどうかを検証した。

細胞周期に関しては CARD14 発現誘導細胞株を用いて FACS で解析した。まず Dox を添加して 24 時間後、48 時間後、72 時間後のタイミングで解析を行ったが、各細胞周期段階に位置する細胞の割合は野生型、変異型共に全く変化しなかった (図 42a)。さらに 24 時間後のサンプルに関しては EdU による S 期細胞の標識も行い、より詳細に評価したが、やはり明らかな細胞周期の変化は見られなかった (図 42b)。変異型 CARD14 が DNA 複製を阻害し、高頻度に複製を停止させているとすると徐々に S 期細胞が増加したり、あるいは G1 期から S 期への移行が阻害されたりすることで細胞周期の分布が変化すると考えられるため、得られた結果からは変異型 CARD14 により DNA 複製が阻害されている可能性は否定的と考えられた。

このデータを補強するために DNA fiber assay による解析も追加した。CldU と IdU を連続して 20 分間ずつ添加し、複製 DNA 鎖を標識した。その長さを計測することで DNA 複製の速度を計測したが、野生型・変異型共に速度の変化は生じなかった (図 43a)。さらに fiber のパターンから stalled forks、new origin firings、ongoing forks に分類 (図 43b) してその割合を比較したが、いずれのパターンも CARD14 発現に伴う変化は見られず (図 43c-e)、特に stalled forks の割合が増えない点は CARD14 発現と複製ストレスの増加に関連がないことを示していると考えられた。以上より、変異型 CARD14 の発現が DNA 複製を阻害し、その結果として HR の頻度が増えている可能性は否定的と判断した。

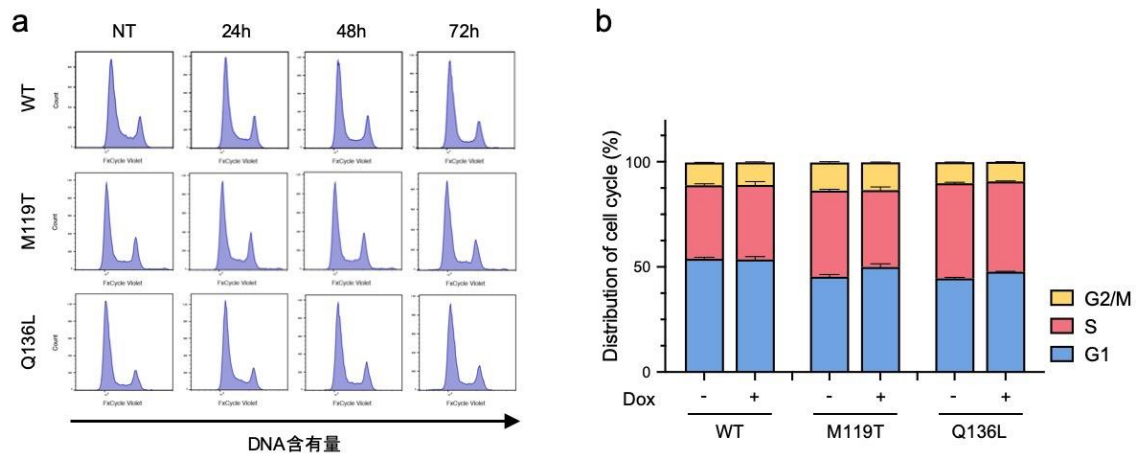


図 42. FACS による細胞周期解析

- a. FxCycle Violet による DNA 染色の染色度合いを利用した細胞周期解析。各パネルの左のピークが G1 期、右のピークが G2/M 期、その間の部分が S 期の細胞を表している。CARD14 発現後も明らかな分布の変化は見られなかった。
- b. EdU による S 期細胞の標識を行い、G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合をそれぞれ解析した。CARD14 発現の有無による明らかな変化は見られなかった。

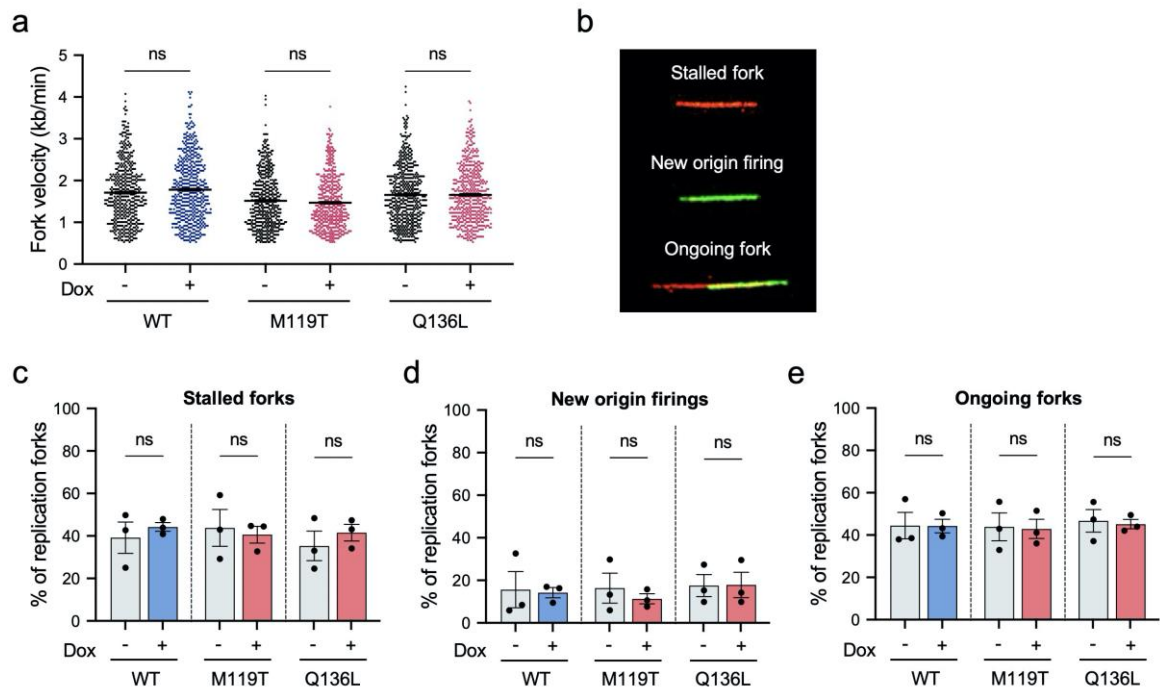


図 43. DNA fiber assay による DNA 複製動態の解析

a. CARD14 発現に伴う DNA 複製速度の変化をみた。DNA 複製速度は得られた DNA fiber の長さを測定し、2.59 kb/ μ m の変換係数を用いて推定した (Jackson and Pombo, 1998)。

b. Stalled fork、New origin firing、Ongoing fork の代表的な像。

c-e. CARD14 発現に伴う stalled forks (c)、new origin firings (d)、ongoing forks (e) の割合の変化。それぞれのパターンの fiber を計数し、CldU の取り込みがある fiber の総数に対する割合を算出した。

10. 変異型 CARD14 発現は DNA 複製ストレス反応を変化させる

最後に DNA 複製が阻害された際の複製フォークの安定性に変化があるかどうかを解析した。一般的に複製フォークの停止時間が長くなればなるほど複製フォークが崩壊しやすくなり、その崩壊は DSB を意味する。まずは CARD14 発現誘導細胞株に HU を添加して DNA 複製を停止させ、12、24、36、48 時間後のタイミングで γ H2AX の蓄積量をウエスタンブロッティングで比較した。その結果、野生型ではいずれのタイミングでも CARD14 発現による変化は見られなかった。一方、変異型では 24 時間後までは明らかな差を検出できなかったが、36、48 時間後のタイミングでは変異型 CARD14 発現時に γ H2AX 量が増加していた (図 44a)。つまり、変異型 CARD14 発現状態では長時間複製フォークが停止すると発現していない状態と比べてより高頻度にフォークの崩壊を生じることがわかった。この変化は複製ストレスの原因を HU から APH へ変更しても同様であった (図 44b)。

次にこの変化が NF- κ B 経路の活性化によるものかどうかを検証するために、I κ B α で NF- κ B 経路活性化を阻害しつつ同様の実験を行った。まず野生型では上述の通り長時間にわたる複製ストレスに曝露しても CARD14 の発現に伴う DNA 損傷の程度は変化しないが、NF- κ B 経路を阻害するとやや損傷が減少する方向へ変化した (図 45)。つまり、NF- κ B 経路活性が DNA 損傷を蓄積させる方向に働き、変異型 CARD14 による NF- κ B 経路の異常活性化はより DNA 損傷を蓄積させる可能性が考えられた。実際に変異型 CARD14 発現下で NF- κ B 経路を阻害すると損傷は野生型の時と同様に減少する方向に転じた (図 45)。しかし CARD14 非発現時よりは DNA 損傷が多く残る形となり、この複製ストレス反応の変化が NF- κ B 経路の変化だけでは説明がつかず、変異型 CARD14 の存在によりさらなる影響を受けているものと考えられた。

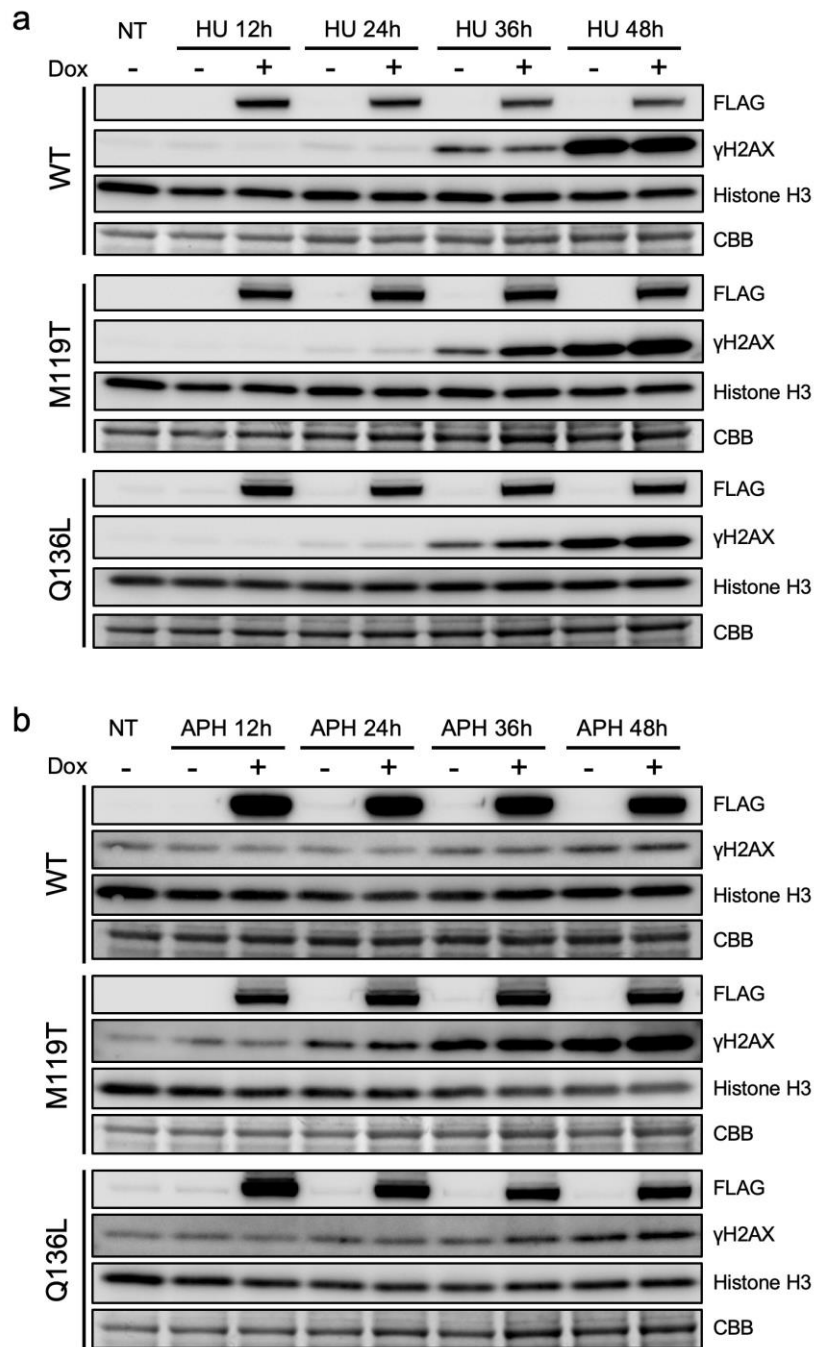


図 44. 複製ストレス負荷に伴う DNA 損傷の経時的変化

HU (a) あるいは APH (b) を添加し、48 時間後までの γ H2AX 量の推移を評価した。野生型では CARD14 発現の有無による γ H2AX の変化は見られなかったが、変異型では特に 36、48 時間のタイミングで CARD14 発現時に γ H2AX の蓄積量が多くなっていた。

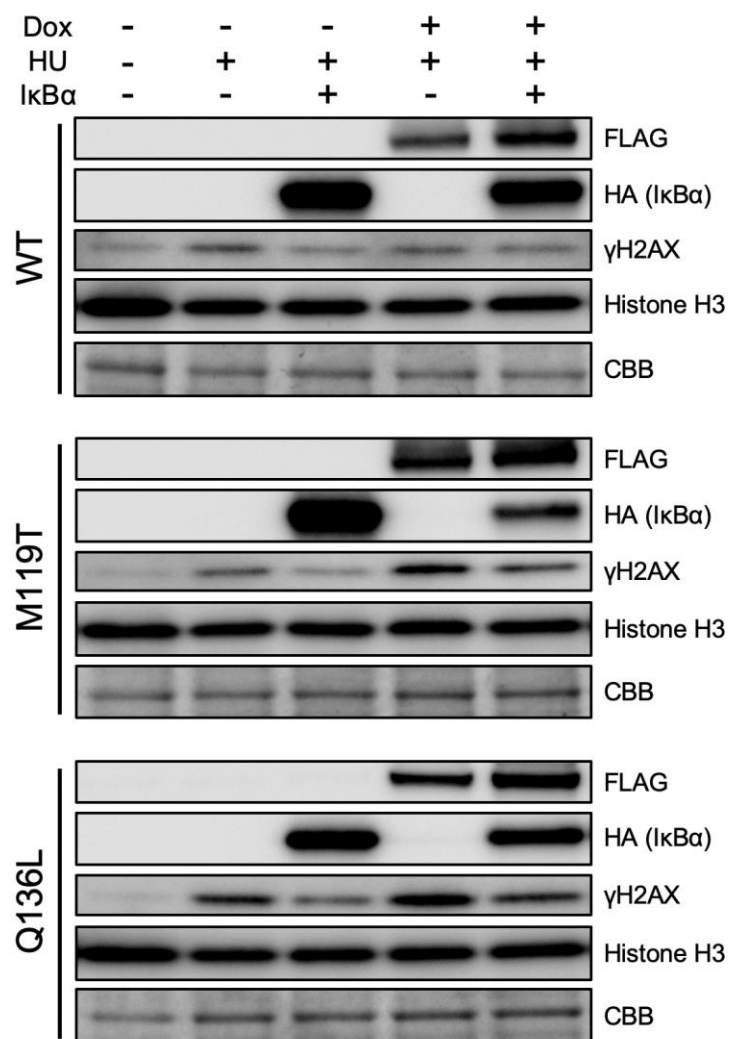


図 45. NF- κ B 経路と複製ストレス反応の関連

CARD14 発現と複製ストレス反応の関連が I κ B α 発現による NF- κ B 経路の阻害で変化するかどうかを検証した。HU による複製ストレス負荷時間は 36 時間とし、その終了時点での γ H2AX 量を比較した。

11. 変異型 CARD14 発現は長時間の複製ストレス下で DSB を増加させ、同時に HR 修復経路も活性化させる

変異型 CARD14 の発現下では長時間の複製ストレスを与えるとより大きな DNA 損傷を生じた。次にこの DNA 損傷が蓄積した状態で HR 関連因子の活性化が見られるかどうかを追求するため、FACS によるシングルセルレベルでの解析を実施した。まずはウエスタンブロッティングで認めた変化を検出できるかどうかを検証するため HU を添加して 36 時間が経過した時点で γ H2AX 染色を行い、その蛍光強度を比較した。その結果、変異型 CARD14 発現時に γ H2AX の明らかな上昇を認めた (図 46a, b)。この変化は APH を添加して複製ストレスを加えた際にも同様に検出することができた (図 46c)。同様の方法で HR 関連因子である RPA2 の活性化 (p-RPA2) をみたところ、こちらも変異型 CARD14 発現時により活性化しており、 γ H2AX と p-RPA2 の共染色ではより高度の DNA 損傷を受けた細胞において RPA2 がより高度に活性化している (γ H2AX^{hi}p-RPA2^{hi} cells の割合が増えている) ことがわかった (図 46d, e)。さらに RPA2 と同様に HR に関連する因子で、複製フォークの再開に際して BIR にも関与することが報告されている BRCA1 についても解析した (Xu et al., 2017)。結果は RPA2 と全く同じ傾向で、変異型 CARD14 発現時に p-BRCA1^{hi} cells、 γ H2AX^{hi}p-BRCA1^{hi} cells の割合が増えることが確認された (図 46f, g)。

複製ストレス反応における複製フォークの安定化や再開には ATR-CHK1 経路が大きく関与することが知られている (Saldivar et al., 2017)。さらにこの再開過程として HR-mediated fork restart を調整しているのも同経路と考えられている (Saldivar et al., 2017)。そこでこの経路の活性化について CHK1 で評価したところ、p-CHK1^{hi} cells、 γ H2AX^{hi}p-CHK1^{hi} cells の割合の増加が確認された (図 46h, i)。以上の結果から、変異型 CARD14 発現細胞では長時間にわたる複製ストレスを受けた際に複製フォークの崩壊を生じるが、そのフォークの修復とそこからの再開に際し、ATR-CHK1 経路を介した HR-mediated fork restart の方法をとっている可能性が考えられた。

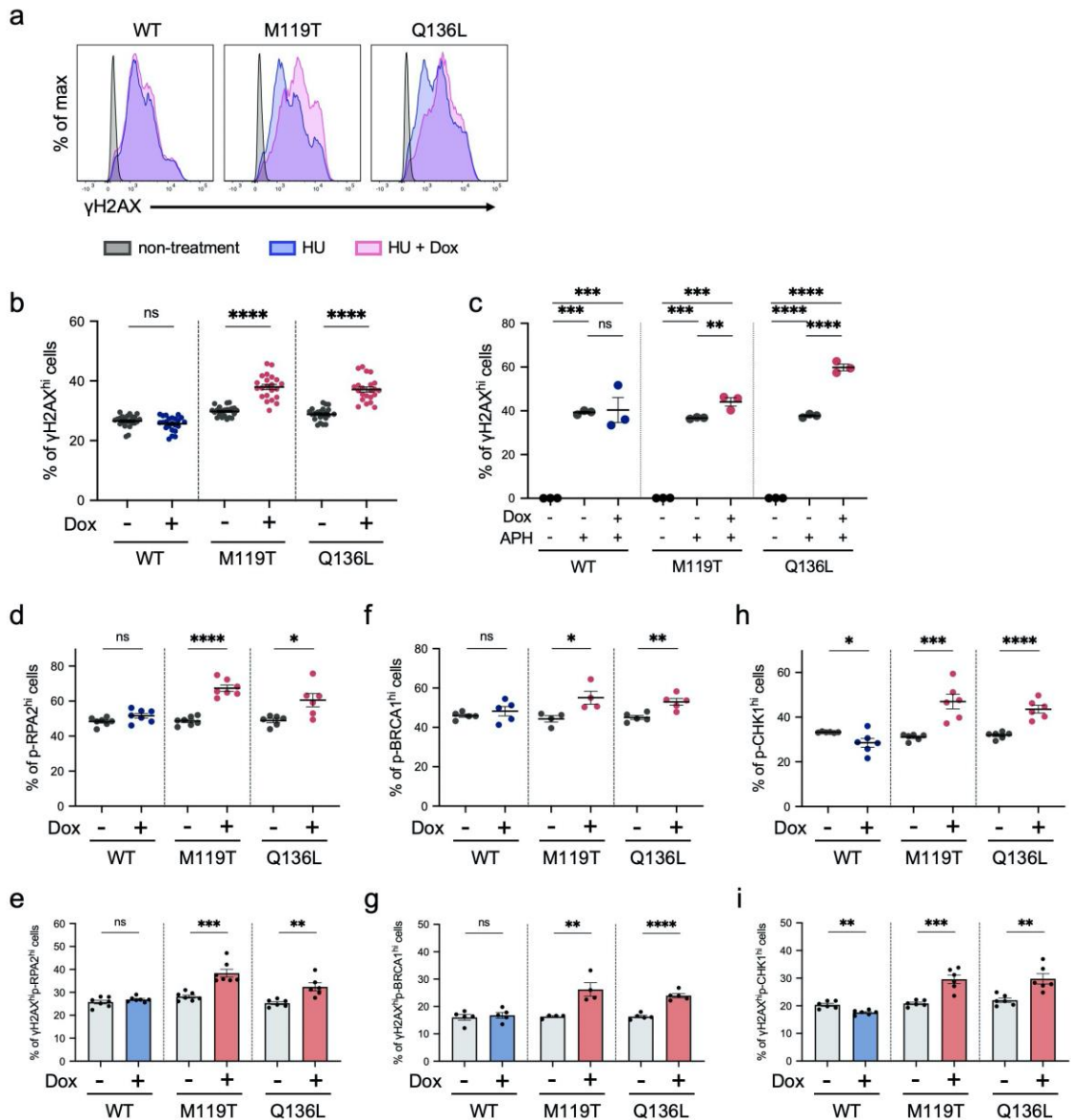


図 46. FACS による DNA 損傷と HR 関連因子活性化の評価

- a. γ H2AX 染色に関するヒストグラム。HU 未添加の場合 (ネガティブコントロール) と比較し、HU 添加時には明らかな γ H2AX 染色の蛍光強度が上昇した。
- b. HU を添加し、36 時間後の時点での γ H2AX^{hi} 細胞の割合。
- c. APH を添加し、36 時間後の時点での γ H2AX^{hi} 細胞の割合。
- d, f, h. HU を添加し、36 時間後の時点での p-RPA2^{hi} 細胞 (d)、p-BRCA1^{hi} 細胞 (f)、p-CHK1^{hi} 細胞 (h) の割合。
- e, g, i. HU を添加し、36 時間後の時点での γ H2AX^{hi}p-RPA2^{hi} 細胞 (e)、 γ H2AX^{hi}p-BRCA1^{hi} 細胞 (g)、 γ H2AX^{hi}p-CHK1^{hi} 細胞 (i) の割合。

12. 変異型 CARD14 発現は複製ストレス反応の中で BIR を促進する

HR は DSB 修復における主要な経路の一つであるが、正確にはさらに複数の副経路に分類され、いずれも崩壊した複製フォークの修復にも関与することが知られている (Jasin and Rothstein, 2013; Kramara et al., 2018)。中でも SDSA、dHJ、BIR の 3 種類の経路が重要であるが、SDSA と dHJ は DSB の両方の末端が利用できる際 (two broken ends) に選択されるのに対し、BIR は一つの末端しか利用できない時 (one broken end) に選択されうる点が異なっている。一般的に複製フォークが崩壊した時点では、その部位には one broken end が形成されるが、実際にはその近傍にある休眠複製開始点が活性化され反対方向から複製が進むため、最終的には two broken ends を介した修復経路が選択されることになる (図 47a) (Petermann and Helleday, 2010)。一方で、ここで重要なのは上記 3 経路全てが revertant mosaicism で見られる組換え結果をもたらす訳ではない点である。患者では染色体の交叉点からテロメアまでの広範囲に及ぶ組換えが見られたが、この結果は図 47b に示す通り、交叉型組換え (dHJ with crossover)、あるいは BIR のどちらかの経路でしか生じ得ない。そこで変異型 CARD14 の発現は崩壊した複製フォークの修復経路選択にも何らかの影響を与えているのではないかと考えた。上述のように修復経路の選択には休眠複製開始点の活性化 (複製の開始) が非常に重要であるため、まずは CARD14 の発現に伴う複製関連遺伝子の発現変化を解析した。結果は図 48 に示す通りであり、複製ストレスを加えると野生型 CARD14 発現時には各遺伝子の発現量が増加する傾向にあったが、変異型 CARD14 を発現した際には一部の遺伝子に関してその増加が抑制される傾向にあることがわかった。特に *ORC1*、*MCM10*、*GINS1*、*GINS2* に関しては個別で解析し直しても有意差を持って抑制されていた (図 49a-d)。これらの因子は図 49e に示すようにいずれも複製の開始に関連するものであり (Hills and Diffley, 2014)、これらの発現が抑制されると複製の開始自体も抑制されうると考えられた。この複製開始の抑制は DNA fiber assay において new origin firings の割合として観察できると考えた。そこで、CldU と IdU の間で HU による DNA 複製阻害を加え、DNA fiber assay にて new origin firings の頻度を検証した。結果は予想通りであり、変異型 CARD14 発現時に new origin firings の割合が減っていることが確認された (図 50b)。一方、stalled forks や ongoing forks の割合に変化は認めなかった (図 50a, c)。以上より、変異型 CARD14 発現下では複製ストレスの影響で複製フォークが崩壊し、休眠複製開始点からのレスキューが必要な状況でもその開始が抑制されてうまくレスキューされず、two broken ends の状況を作りにくくなっている可能性が示唆された。これは複数ある修復経路のうち SDSA や dHJ が選択されにくく、BIR がより選択されやすい環境ができている傍証と考えられた。

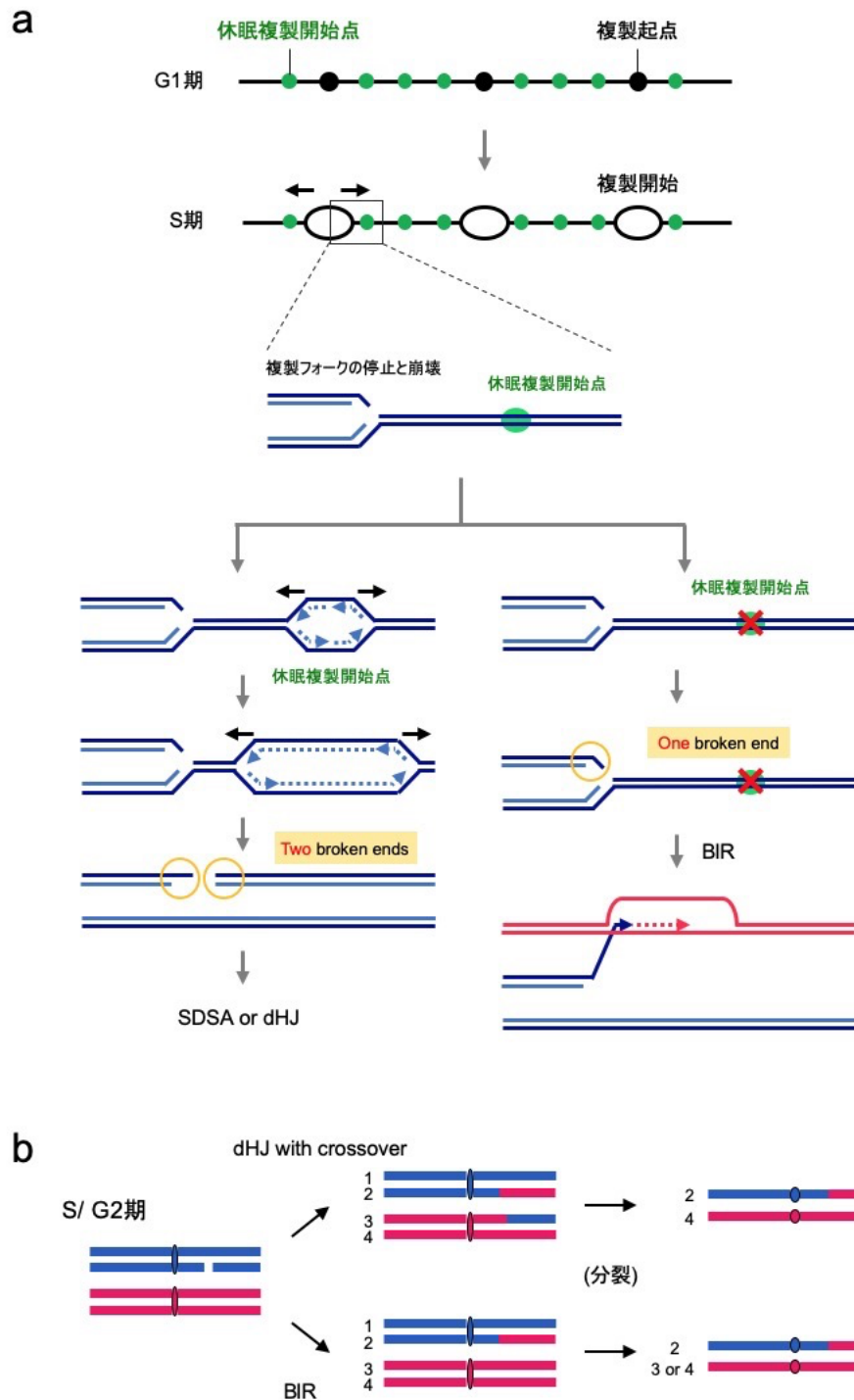


図 47. 複製フォークの停止・再開と LOH の関連

a. DNA 複製が停止し、複製フォークの崩壊が起こると、近傍に位置する休眠複製開始点が活性化し、レスキューに向かうとされている。このレスキューにより **two broken ends** が形成されると SDSA や dHJ の経路が選択される。一方、休眠複製開始点からのレスキューが及ばない場合は **one broken end** の状態から修復する必要がある、BIR が選択されうる。

- b. 患者で見られる染色体の構造は crossover 型の dHJ を生じた後に細胞分裂した場合 (上) か BIR を生じた後に細胞分裂した場合 (下) の 2 パターンで出現しうると考えられる。

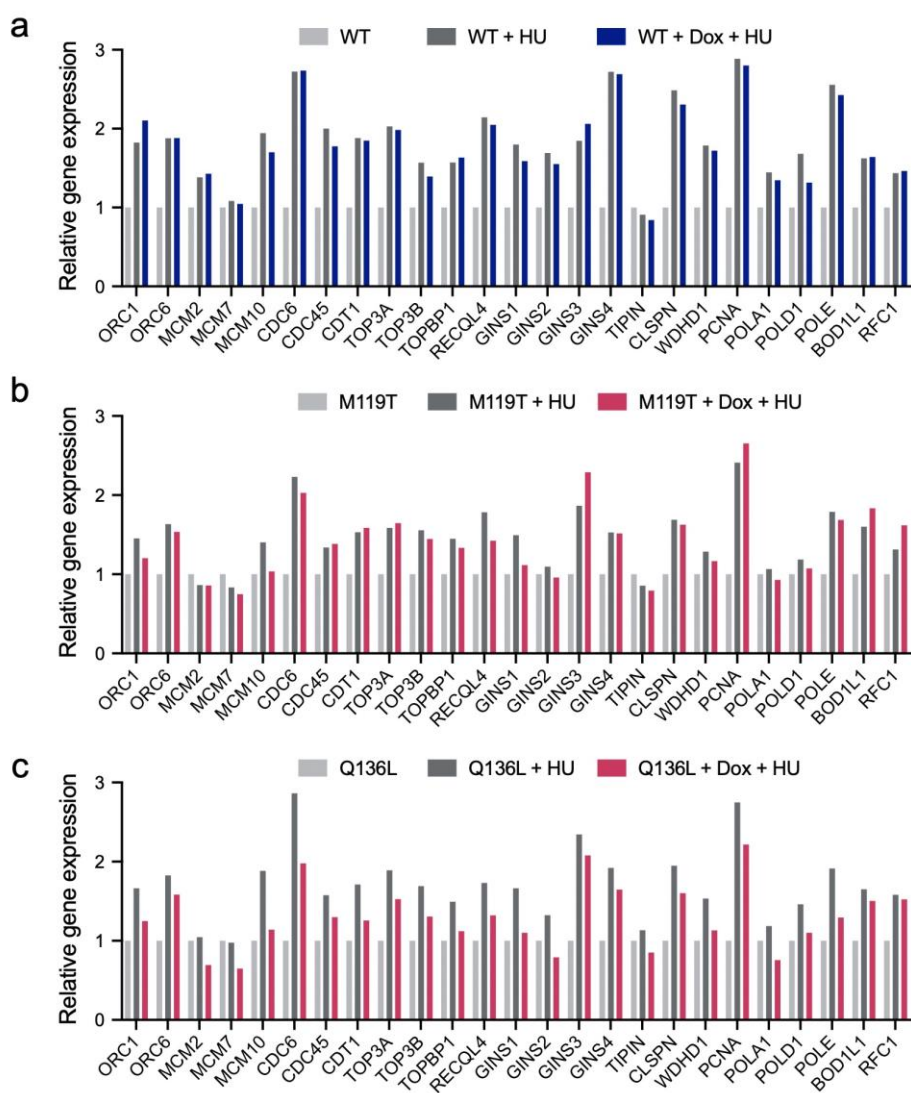


図 48. DNA 複製関連遺伝子の mRNA 定量スクリーニング

複製ストレス負荷に伴う DNA 複製関連遺伝子の発現量変化と、それに与える野生型 CARD14 (a)、変異型 CARD14 (b, c) の影響を TaqMan Array Card を用いてスクリーニングした。

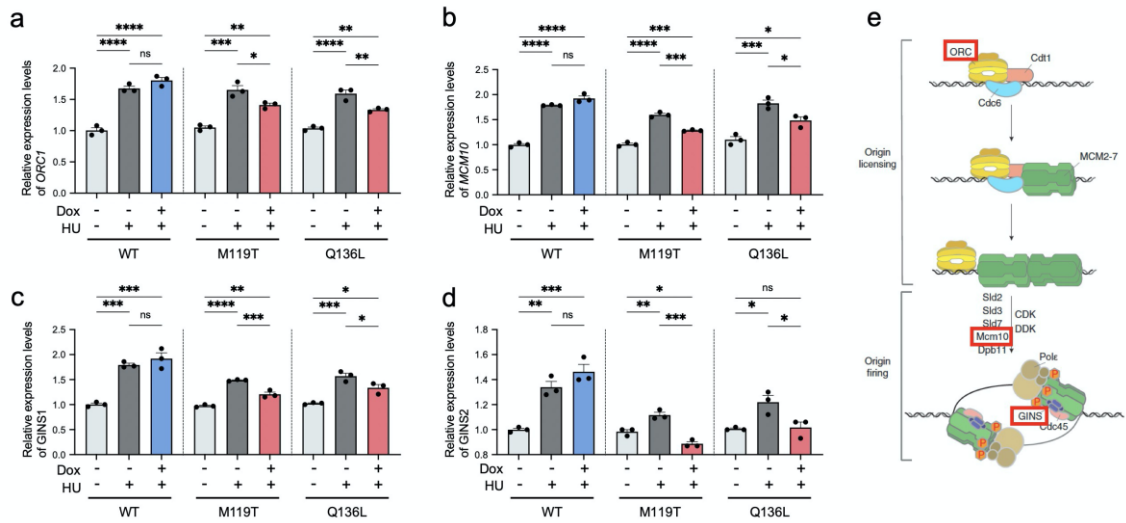


図 49. DNA 複製開始に関連する遺伝子発現量の変化

a-d. 図●で示したスクリーニング結果を踏まえ、変異型 CARD14 発現の影響が見られた遺伝子のうち、*ORC1* (a)、*MCM10* (b)、*GINS1* (c)、*GINS2* (d) に関して定量実験を再度実施した。

e. 上記 4 種類の遺伝子はいずれも DNA 複製の開始に関連する遺伝子であった (Hills and Diffley, 2014 より抜粋)。

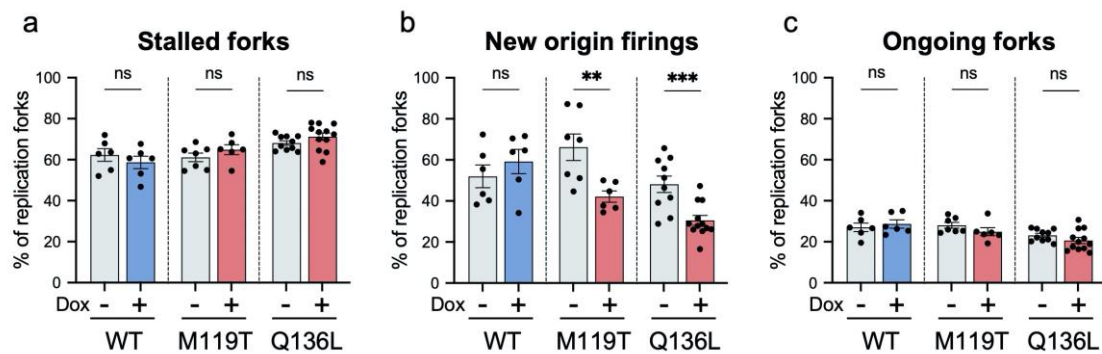


図 50. DNA fiber assay による DNA 複製動態の解析

長時間複製ストレスに曝露した後の DNA 複製動態に CARD14 発現が与える影響を調べるため、stalled forks (a)、new origin firings (b)、ongoing forks (c) の割合の変化を解析した。それぞれのパターンの fiber を計数し、CldU の取り込みがある fiber の総数に対する割合を算出した。

この仮説を補強するため、dHJ (特に crossover) が抑制されているかどうかを実験的に示すこととした。LOH を生じる crossover は相同染色体をテンプレートとした組換え現象であるが、通常はより近傍に存在する姉妹染色分体をテンプレートに組換え現象は起こるはずである。つまり、相同染色体をテンプレートとする組換え頻度は姉妹染色分体をテンプレートとする組換え頻度と相関すると推察され、これは SCE として実験的に観察が可能と考えた。そこで SCE assay を実施し、変異型 CARD14 発現時にその頻度が変化するかどうかを解析した。その結果、野生型・変異型共に CARD14 発現自体では SCE 出現頻度に変化はなかったが、複製ストレスを負荷した際には変異型 CARD14 発現時に限り SCE 頻度が減少していた (図 51)。つまり、dHJ による crossover 現象が抑制されていると考えられ、上述の仮説を補強するデータと考えられた。

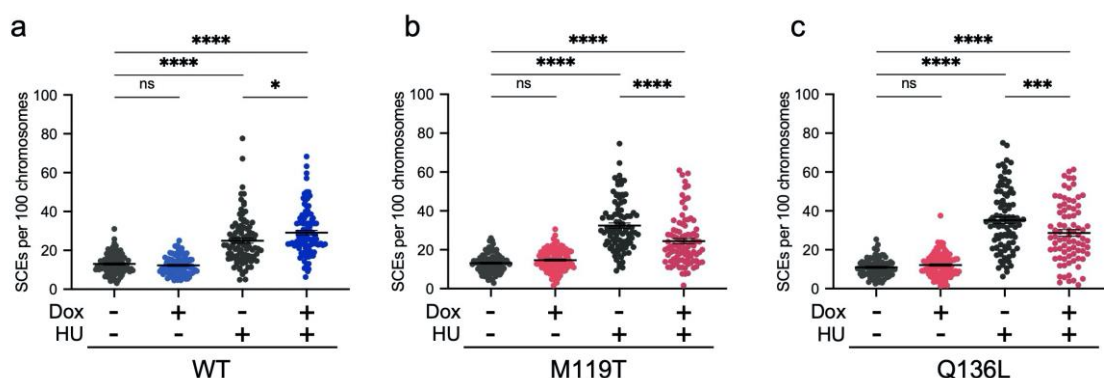


図 51. SCE assay による交叉型組換えの評価

野生型 CARD14 (a)、変異型 CARD14 (b, c) の発現が SCE の出現頻度に与える影響を解析した。各状態に関して計 27～35 個の分裂期細胞で SCE 数をカウントし、染色体 100 個あたりの SCE 数に変換した後、結果をドットプロットで表した。

考察

本研究では、AiKDsの一つとして近年注目されている CAPE において初めて revertant mosaicism の存在を証明した。またその主要な変異消失機序は HR であり、過去に revertant mosaicism が報告されている遺伝性角化症と同じであった (図 52)。さらに本研究では変異型 *CARD14* がどのようなメカニズムで HR を誘導し得るかを検証し、得られた結果は図 53 のようにまとめることができる。まず本研究で扱った 2 種類の *CARD14* 遺伝子変異はいずれも *CARD14* の機能獲得変異であり、NF- κ B 経路を異常活性化させ、皮膚の炎症性変化を生じる。この皮膚の変化は一般的に知られる乾癬におけるメカニズムに類似すると考えられるが、その程度は非常に重篤になり得る。一方、異常活性化した NF- κ B 経路はケラチノサイトにおける複製ストレス反応の変化も生じうる。変異型 *CARD14* が発現した細胞では長時間の複製ストレスに曝露された際に複製フォークが崩壊し、DSB を生じるリスクが高まる。一旦 DSB が生じると本来は近傍の休眠複製開始点の活性化によりレスキューされるはずであるが、この活性化が抑制されるために one broken end が残り、BIR 経路による修復、複製再開が誘導される。この BIR が相同染色体をテンプレートに進行した場合、結果として大規模な LOH を生じることとなる。この複製ストレス反応の変化は *CARD14* 遺伝子が座乗する 17 番染色体にのみ影響するわけではなく、ゲノム全体へ影響を与えるものと考えられる。つまり、17 番染色体長腕の *CARD14* よりもセントロメア側で DSB を生じ、BIR がテロメアまで続いた場合、*CARD14* 遺伝子変異は消失し、その細胞は revertant 細胞となる。一方、その他の染色体で同様のイベントを生じた場合は、その患者の持つ発癌遺伝子、癌抑制遺伝子等の変異や多型次第で腫瘍性増殖する機能を獲得し、皮膚腫瘍の形成につながる可能性があると考えられる。これまでに revertant mosaicism を生じる皮膚疾患で皮膚腫瘍を生じ、その腫瘍部の遺伝子解析が行われた報告はなく、引き続きデータの蓄積が必要である。ただし、IWC-I では皮膚腫瘍を生じ得ることが報告されており (Choate and Milstone, 2015)、CAPE でも皮膚腫瘍を続発する可能性は十分にあると考えられる。またこのようなメカニズムを想定すると、今後 Case 2 でも皮膚腫瘍の出現には十分に注意する必要がある。

今回、複製ストレス下で変異型 *CARD14* が複製フォークの修復、複製の再開メカニズムとして BIR を優先的に選択させる状況を作り出す可能性を見出した。しかし、BIR は LOH に伴う染色体異常等のリスクが高いため、一般的には正常細胞では逆方向から来る複製フォークの存在や MUS81 エンドヌクレアーゼの機能によって抑制されており、稀な事象と考えられている (Mayle et al., 2015)。最近の研究では、(1) MUS81-null の状態において複製起点を欠くゲノム領域にニックを生じた場合、(2) 複

製ストレス下 (癌遺伝子の過剰発現、複製起点のライセンス化不全、逆位反復配列、トリプレットリピート、R ループなどによる) において大規模に生じた崩壊複製フォークの修復、(3) 癌細胞などにおけるテロメラーゼ非依存性のテロメア維持機構、といった特殊な状況において BIR が促進され得ることが明らかにされている (Anand et al., 2013; Kim et al., 2017; Kramara et al., 2017, 2018; Lydeard et al., 2007; Macheret and Halazonetis, 2018; Sakofsky and Malkova, 2017)。本研究では変異型 CARD14 が複製ストレス下で複製フォークの崩壊を促進し、一方で休眠複製開始点を抑制していることから BIR が誘導される状況が生まれると推察された。Revertant mosaicism を生じる遺伝性角化症では revertant spot 毎に異なる交叉点をもつ LOH が多発することがわかっており、これら全てに BIR が関与しているのかどうかは非常に興味深い点である。これまで BIR は上述のような非常に限られた状況でしか起こらず、発癌などとの関連が強いと考えられてきたが、実際にはまだ不明な点が多いものと思われる。Revertant mosaicism の更なる研究は、BIR を制御するこれまで知られていなかった、あるいは評価されていなかったメカニズムを解明することにも役立つ可能性があると考えられる。

また、本研究の結果は慢性的な炎症、特に NF- κ B 経路を介する炎症が BIR や染色体変化を促進する可能性を示唆していると考えられる。潰瘍性大腸炎を対象とした最近の研究では、長期間に及ぶ炎症にさらされたヒト腸管幹細胞は LOH を含むゲノムや遺伝子の変化を獲得することで、そのような炎症に適応することが明らかにされている (Kakiuchi et al., 2020; Nanki et al., 2020)。さらに、広範囲に及ぶ LOH は最近 AiKDs の一つとしても認識されつつある汗孔角化症の皮疹出現にも大きく関与していることが報告された (Kubo et al., 2019)。こちらは CAPE と同様に慢性的な炎症を背景に LOH を生じるが、その結果として皮疹が全身に多発するため、revertant mosaicism とは逆のパターンと言える。興味深いことに、これまでの研究では複製ストレスにより NF- κ B 経路が活性化され、それによって HR が誘導されるとされていた (Volcic et al., 2012)。本研究では、I-SceI を介して外因性に DSB を誘導しても変異型 CARD14 は HR を促進しないが、複製ストレス下では BIR を促進することが示された。これらの結果は、複製ストレス下での NF- κ B 経路活性化に起因する炎症が BIR を誘導する可能性を示唆していると考えられる。炎症が BIR の選択や調節にどのように関与しているかについては、今後の研究が必要である。

Revertant mosaicism を生じる疾患は皮膚疾患以外にも多数存在するが、その治癒した現象を「視診で見つけることができる」という点は皮膚科学ならではの特徴であり、醍醐味でもある。他の皮膚疾患でも類似した現象が起きている可能性もあり、常にそのような視点を持って日々の診療に臨む必要があると思われる。

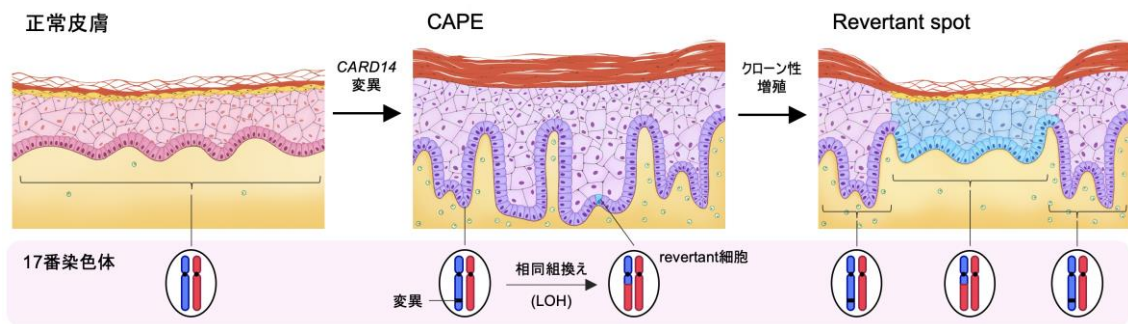


図 52. CAPE における revertant spot の組織学的、遺伝学的な模式図

CARD14 遺伝子変異により角層肥厚、顆粒層消失、表皮肥厚、炎症細胞浸潤などの組織学的な変化を生じる。その病変皮膚の基底層にある幹細胞で LOH による変異消失が生じた場合、revertant 細胞が出現する。その細胞がクローン性に増殖して一定の領域を占めた場合、目視可能な正常化皮膚領域として臨床的に観察される。

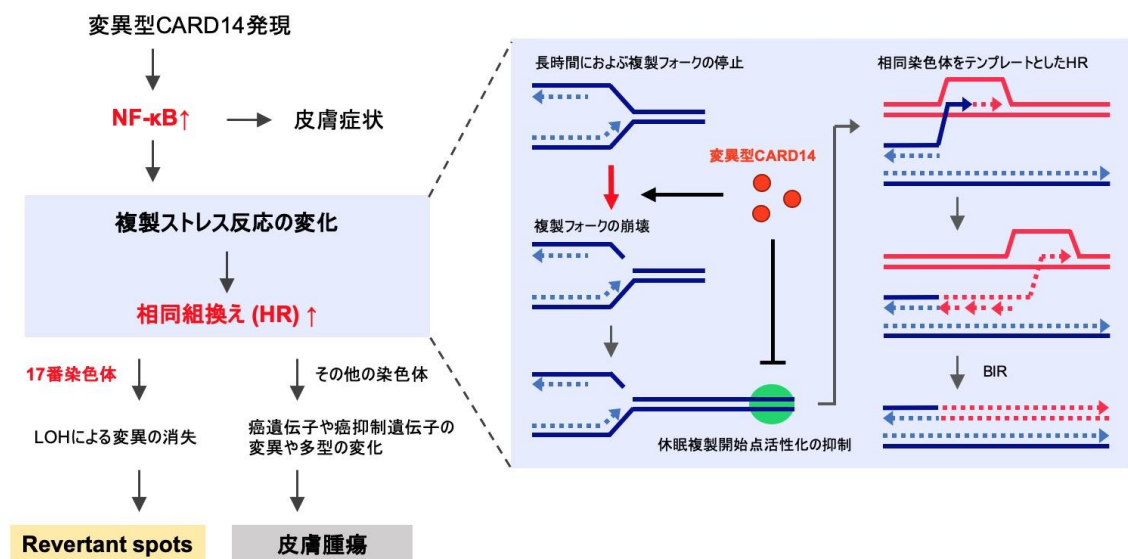


図 53. CAPE における revertant mosaicism 出現のメカニズム

結論

本研究により以下の新知見を得た。

- 1) *CARD14* 遺伝子のミスセンス変異 c.356T>C (p.Met119Thr)、あるいは c.407A>T (p.Gln136Leu) を持つ CAPE 症例において revertant mosaicism を生じることを証明した。
- 2) 変異消失の機序としては他の遺伝性角化症と同様に HR が主体であった。
- 3) 変異型 *CARD14* 発現細胞では複製ストレス反応の変化が見られ、長時間の複製ストレスに曝露した際の DNA 損傷が増加し、より大規模な複製フォークの崩壊が生じていると考えられた。
- 4) 一旦崩壊した複製フォークは休眠複製開始点の抑制を背景に、BIR 経路で修復される可能性が示唆された。

過去に revertant mosaicism を生じる疾患においてその変異体と変異消失メカニズムの関連に迫る研究の報告はなかったが、本研究では初めてその領域に踏み込み、DNA 複製ストレス反応や BIR との関連を見出すことができた。また皮膚で生じている現象と DNA 損傷や DNA 複製という大きな研究領域を結び付けられた意義も大きいと考えられる。

この疾患が自然に治癒する現象の分子機構を完全に解明することは、現在治療法が限られている遺伝性疾患に対して革新的な治療法を開発することにつながる可能性も秘めており、本研究はそのような目標に向けた大きな一歩になると思われる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くの御指導と御助言を賜りました北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水宏名誉教授に深甚なる謝意を表します。また研究計画の立案から論文作成まで全ての面に関して直接御指導いただきました筑波大学医学医療系皮膚科 乃村俊史教授 (元 北海道大学病院皮膚科講師) に心より深謝いたします。そして本研究にご協力いただきました角化症患者様にも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院皮膚科学教室のすべての教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Akiyama, M. (2020). Autoinflammatory Keratinization Diseases (AiKDs): Expansion of Disorders to Be Included. *Front. Immunol.* *11*, 280.

Akiyama, M., Takeichi, T., McGrath, J.A., and Sugiura, K. (2017). Autoinflammatory keratinization diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 1545–1547.

Alver, R.C., Chadha, G.S., and Blow, J.J. (2014). The contribution of dormant origins to genome stability: From cell biology to human genetics. *DNA Repair (Amst.)* *19*, 182–189.

Anand, R.P., Lovett, S.T., and Haber, J.E. (2013). Break-Induced DNA Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010397.

Arita, K., Akiyama, M., Tsuji, Y., Iwao, F., Kodama, K., and Shimizu, H. (2003). Squamous cell carcinoma in a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Br. J. Dermatol.* *148*, 367–369.

Ben-Chetrit, E., Gattorno, M., Gul, A., Kastner, D.L., Lachmann, H.J., Touitou, I., Ruperto, N., and Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO) and the AIDs Delphi study participants (2018). Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann. Rheum. Dis.* *77*, 1558–1565.

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., et al. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* *40*, 463–471.

Blokzijl, F., de Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., Sasaki, N., Huch, M., Boymans, S., Kuijk, E., Prins, P., et al. (2016). Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature* *538*, 260–264.

Choate, K.A., and Milstone, L.M. (2015). Phenotypic expansion in ichthyosis with confetti. *JAMA Dermatol* *151*, 15–16.

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., et al. (2010). Mitotic Recombination in Patients with Ichthyosis Causes Reversion of Dominant Mutations in KRT10. *Science* 330, 94–97.

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., et al. (2015). Frequent somatic reversion of KRT1 mutations in ichthyosis with confetti. *J. Clin. Invest.* 125, 1703–1707.

Clemmensen, A., Thomassen, M., Clemmensen, O., Tan, Q., Kruse, T.A., Petersen, T.K., Andersen, F., and Andersen, K.E. (2009). Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies. *Exp. Dermatol.* 18, 979–984.

Craiglow, B.G., Boyden, L.M., Hu, R., Virtanen, M., Su, J., Rodriguez, G., McCarthy, C., Luna, P., Larralde, M., Humphrey, S., et al. (2018). CARD14-associated papulosquamous eruption: A spectrum including features of psoriasis and pityriasis rubra pilaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 79, 487–494.

De, S. (2011). Somatic mosaicism in healthy human tissues. *Trends Genet.* 27, 217–223.

Deng, G., Lu, Y., Zlotnikov, G., Thor, A.D., and Smith, H.S. (1996). Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 274, 2057–2059.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst.)* 3, 959–967.

Fernández, L.C., Torres, M., and Real, F.X. (2016). Somatic mosaicism: on the road to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 43–55.

Fuchs-Telem, D., Sarig, O., van Steensel, M.A.M., Isakov, O., Israeli, S., Nussenzweig, J., Richard, K., Winnepeninckx, V., Vernooij, M., Shomron, N., et al. (2012). Familial pityriasis rubra pilaris is caused by mutations in CARD14. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 163–170.

Grateau, G., Hentgen, V., Stojanovic, K.S., Jéru, I., Amselem, S., and Steichen, O. (2013). How should we approach classification of autoinflammatory diseases? *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 624–

Hills, S.A., and Diffley, J.F.X. (2014). DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* 24, R435–R444.

Hirschhorn, R., Yang, D.R., Israni, A., Huie, M.L., and Ownby, D.R. (1994). Somatic mosaicism for a newly identified splice-site mutation in a patient with adenosine deaminase-deficient immunodeficiency and spontaneous clinical recovery. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 59–68.

Jackson, D.A., and Pombo, A. (1998). Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J. Cell Biol.* 140, 1285–1295.

Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012740.

Jonkman, M.F., Scheffer, H., Stulp, R., Pas, H.H., Nijenhuis, M., Heeres, K., Owaribe, K., Pulkkinen, L., and Uitto, J. (1997). Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell* 88, 543–551.

Jordan, C.T., Cao, L., Roberson, E.D.O., Duan, S., Helms, C.A., Nair, R.P., Duffin, K.C., Stuart, P.E., Goldgar, D., Hayashi, G., et al. (2012a). Rare and common variants in CARD14, encoding an epidermal regulator of NF-kappaB, in psoriasis. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 796–808.

Jordan, C.T., Cao, L., Roberson, E.D.O., Pierson, K.C., Yang, C.F., Joyce, C.E., Ryan, C., Duan, S., Helms, C.A., Liu, Y., et al. (2012b). PSORS2 is due to mutations in CARD14. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 784–795.

Kakiuchi, N., Yoshida, K., Uchino, M., Kihara, T., Akaki, K., Inoue, Y., Kawada, K., Nagayama, S., Yokoyama, A., Yamamoto, S., et al. (2020). Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature* 577, 260–265.

Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254.

Kim, J.C., Harris, S.T., Dinter, T., Shah, K.A., and Mirkin, S.M. (2017). The role of break-induced replication in large-scale expansions of (CAG)_n/(CTG)_n repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 55–60.

Kramara, J., Osia, B., and Malkova, A. (2017). Break-induced replication: an unhealthy choice for stress relief? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 11–12.

Kramara, J., Osia, B., and Malkova, A. (2018). Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How. *Trends Genet.* 34, 518–531.

Kubo, A., Sasaki, T., Suzuki, H., Shiohama, A., Aoki, S., Sato, S., Fujita, H., Ono, N., Umegaki-Arao, N., Kawai, T., et al. (2019). Clonal Expansion of Second-Hit Cells with Somatic Recombinations or C>T Transitions Form Porokeratosis in MVD or MVK Mutant Heterozygotes. *J. Invest. Dermatol.* 139, 2458-2466.e9.

Lydeard, J.R., Jain, S., Yamaguchi, M., and Haber, J.E. (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* 448, 820–823.

Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2018). Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* 555, 112–116.

Manthiram, K., Zhou, Q., Aksentijevich, I., and Kastner, D.L. (2017). The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nat. Immunol.* 18, 832–842.

Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., Wedge, D.C., Fullam, A., Alexandrov, L.B., Tubio, J.M., et al. (2015). High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 348, 880–886.

Mayle, R., Campbell, I.M., Beck, C.R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C.A., Bjergbaek, L., Lupski, J.R., and Ira, G. (2015). Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science* 349, 742–747.

Mellet, M. (2020). Regulation and dysregulation of CARD14 signalling and its physiological consequences in inflammatory skin disease. *Cell. Immunol.* 354, 104147.

Minten, E. V., and Yu, D.S. (2019). DNA Repair: Translation to the Clinic. *Clin. Oncol.* *31*, 303–310.

Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S.A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2013). Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* *493*, 246–249.

Nanki, K., Fujii, M., Shimokawa, M., Matano, M., Nishikori, S., Date, S., Takano, A., Toshimitsu, K., Ohta, Y., Takahashi, S., et al. (2020). Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature* *577*, 254–259.

Natsuga, K., Akiyama, M., Kato, N., Sakai, K., Sugiyama-Nakagiri, Y., Nishimura, M., Hata, H., Abe, M., Arita, K., Tsuji-Abe, Y., et al. (2007). Novel ABCA12 mutations identified in two cases of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma associated with multiple skin malignant neoplasia. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2669–2673.

Neelsen, K.J., and Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 207–220.

Nieminuszczy, J., Schwab, R.A., and Niedzwiedz, W. (2016). The DNA fibre technique – tracking helicases at work. *Methods* *108*, 92–98.

Nomura, T. (2020). Recombination-induced revertant mosaicism in ichthyosis with confetti and loricrin keratoderma. *J. Dermatol. Sci.* *97*, 94–100.

Nomura, T., Suzuki, S., Miyauchi, T., Takeda, M., Shinkuma, S., Fujita, Y., Nishie, W., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2018). Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes. *JCI Insight* *3*, e97595.

Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 683–687.

Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* *37*, 492–502.

- Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* *13*, 2633–2638.
- Revy, P., Kannengiesser, C., and Fischer, A. (2019). Somatic genetic rescue in Mendelian haematopoietic diseases. *Nat. Rev. Genet.* *20*, 582–598.
- Ruland, J., and Hartjes, L. (2019). CARD-BCL-10-MALT1 signalling in protective and pathological immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 118–134.
- Sakofsky, C.J., and Malkova, A. (2017). Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *52*, 395–413.
- Saldivar, J.C., Cortez, D., and Cimprich, K.A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 622–636.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 698–714.
- Siudeja, K., Nassari, S., Gervais, L., Skorski, P., Lameiras, S., Stolf, D., Zande, M., Bernard, V., Frio, T.R., and Bardin, A.J. (2015). Frequent Somatic Mutation in Adult Intestinal Stem Cells Drives Neoplasia and Genetic Mosaicism during Aging. *Cell Stem Cell* *17*, 663–674.
- Stults, D.M., Killen, M.W., and Pierce, A.J. (2014). The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Methods Mol. Biol.* *1105*, 439–455.
- Suzuki, S., Nomura, T., Miyauchi, T., Takeda, M., Nakamura, H., Shinkuma, S., Fujita, Y., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2016). Revertant Mosaicism in Ichthyosis with Confetti Caused by a Frameshift Mutation in KRT1. *J. Invest. Dermatol.* *136*, 2093–2095.
- Suzuki, S., Nomura, T., Miyauchi, T., Takeda, M., Fujita, Y., Nishie, W., Akiyama, M., Ishida-Yamamoto, A., and Shimizu, H. (2019). Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma. *Life Sci. Alliance* *2*, e201800284.
- Symington, L.S., and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 247–271.

Takeichi, T., and Akiyama, M. (2016). Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J. Dermatol.* 43, 242–251.

Takeichi, T., Sugiura, K., Nomura, T., Sakamoto, T., Ogawa, Y., Oiso, N., Futei, Y., Fujisaki, A., Koizumi, A., Aoyama, Y., et al. (2017). Pityriasis Rubra Pilaris Type V as an Autoinflammatory Disease by CARD14 Mutations. *JAMA Dermatol* 153, 66–70.

Tammaro, M., Barr, P., Ricci, B., and Yan, H. (2013). Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide. *PLoS One* 8, e79202.

Volcic, M., Karl, S., Baumann, B., Salles, D., Daniel, P., Fulda, S., and Wiesmüller, L. (2012). NF- κ B regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1–CtIP complexes. *Nucleic Acids Res.* 40, 181–195.

Wang, M., Zhang, S., Zheng, G., Huang, J., Songyang, Z., Zhao, X., and Lin, X. (2018). Gain-of-Function Mutation of Card14 Leads to Spontaneous Psoriasis-like Skin Inflammation through Enhanced Keratinocyte Response to IL-17A. *Immunity* 49, 66-79.e5.

Xu, Y., Ning, S., Wei, Z., Xu, R., Xu, X., Xing, M., Guo, R., and Xu, D. (2017). 53BP1 and BRCA1 control pathway choice for stalled replication restart. *Elife* 6, e30523.

Yang, T.P., Stout, J.T., Konecki, D.S., Patel, P.I., Alford, R.L., and Caskey, C.T. (1988). Spontaneous reversion of novel Lesch-Nyhan mutation by HPRT gene rearrangement. *Somat. Cell Mol. Genet.* 14, 293–303.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9.

清水宏 (2018). あたらしい皮膚科学 第3版 (東京: 中山書店).