

原著

## Papillon-Lefèvre 症候群：カテプシンC酵素活性が 臨床症状に及ぼす影響

滝吉典子 中野 創 澤村大輔

**抄録** Papillon-Lefèvre 症候群 (PLS) は掌蹠を含む四肢末端の潮紅と過角化、若年性歯周膜炎を特徴とする稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。PLS はジペプチジルペプチダーゼ I (DPPI) としても知られる酵素カテプシンC (CTSC) をコードする CTSC 遺伝子の変異によって発症する。CTSC はシステインプロテアーゼであり、好中球エラスターゼなどのセリンプロテアーゼを活性化し、骨髄・リンパ球系細胞の炎症・免疫反応に関与する。

今回我々は、CTSC 遺伝子上にある比較的稀な一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) のひとつである c.1357 A>G (p.I453V) と、PLS における CTSC 機能解析を行った。遺伝子型が c.1357A/A である健常人に比し、c.1357A/G の健常人における CTSC 酵素活性は 50%、さらに c.1357G/G の健常人では 10% と段階的に低下することが明らかになった。さらに PLS 患者の CTSC 酵素活性は 1% 以下であり、CTSC 酵素活性がほぼ 0 になることより PLS が発症することがわかった。

弘前医学 64: 65-70, 2013

**キーワード:** Papillon-Lefèvre 症候群 (PLS), カテプシン C (CTSC); ジペプチジルペプチダーゼ I (DPPI); 一塩基多型.

ORIGINAL ARTICLE

## PAPILLON-LEFÈVRE SYNDROME: IMPACT OF CATHEPSIN C ACTIVITIES ON THE PHENOTYPIC EXPRESSION

Noriko Takiyoshi, Hajime Nakano, and Daisuke Sawamura

**Abstract** Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) is a rare autosomal recessive disorder characterized by palmoplantar keratoderma (PPK) and early-onset periodontitis. PLS is caused by mutations in the gene coding for cathepsin C (CTSC) known as dipeptidyl peptidase I (DPPI). CTSC is a lysosomal cysteine proteinase that activates many serine proteinases in immune/inflammatory cells.

We conducted functional analyses of a single nucleotide polymorphism (SNP); c.1357 A>G (p.I453V) in CTSC. Compared to controls homozygous for c.1357A, the CTSC activity was 50% in individuals heterozygous for c.1357G, while that was only 10% in those homozygous for c.1357G. Furthermore, we also determined the CTSC activity of the five proband's of PLS, the average of activity was less than 1% of controls homozygous for c.1357A. All the homozygotes for the SNP examined had no symptoms of PPK and periodontitis compatible with PLS. These findings strongly suggest that the disease expression of PLS requires nearly total loss of the CTSC activity.

Hirosaki Med. J. 64: 65-70, 2013

**Key words:** Papillon-Lefèvre syndrome (PLS); Cathepsin C (CTSC); Dipeptidyl peptidase I (DPPI); single nucleotide polymorphism (SNP).

## 緒 言

Papillon-Lefèvre 症候群 (PLS, MIM: 245000) は掌蹠を含む四肢末端の潮紅と過角化, 若年性歯周囲炎を特徴とし, 100万人に1-4人の割合で発症する稀な常染色体劣性遺伝性疾患である. PLS における若年性歯周囲炎は進行性であり, 多くの症例では永久歯の脱落に至る. さらに肝あるいは腎への膿瘍形成や, 化膿性毛嚢炎などの皮膚の易感染症状を併発することも少なくない.

PLS は11番染色体長腕の11q14-q21領域に局在するカテプシンC (CTSC) 遺伝子変異によって発症する<sup>1)</sup>. これまでPLS患者において同定されたCTSC 遺伝子変異は70以上報告されているが, 本邦での変異同定の報告は3家系のみである<sup>2,4)</sup>. CTSC はジペプジルペプチダーゼI (DPPI) としても知られるシステインプロテアーゼで, 好中球エラスターゼなどのセリンプロテアーゼを活性化し, 骨髄・リンパ球系細胞の炎症・免疫反応に関与する. PLS においてみられる歯周囲炎や皮膚などにおける易感染症状は, CTSC の酵素活性低下に起因する白血球の機能障害と考えられている. しかし, 表皮角化細胞におけるCTSC の役割については未だ明らかになっておらず, CTSC がPLS における表皮の肥厚及び過角化とどのように関与しているかは明らかになっていない.

CTSC 遺伝子は7つのエクソンからなり, 463のアミノ酸をコードする. c.1357 A>G (GenBank: rs3888798) は, CTSC 遺伝子のエクソン7にある一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) で, Nakanoらが最初に報告した<sup>2)</sup>. この塩基置換は453番目のアミノ酸イソロイシンをバリンに変化させるが (p.I453V), 健常人中に1%以上の頻度で検出されるので, 病的変異ではなく多型として扱われる. Noackらの統計によると, c.1357G のアレル頻度は3.2%と稀であり, c.1357G/G の遺伝子型を有する者はいない<sup>5)</sup>. さらに, c.1357G をヘテロ接合で保有する健常人では, 保有していない健常人に比しCTSC の酵素活性が明らかに低下することを示すとともに, 汎発性侵襲性歯周囲炎患者ではヘテロ接合でc.1357G を保有している頻度が, 健常人の2倍であったと報告している<sup>5)</sup>. 一方, 本邦におけるc.1357の遺伝子型の頻度は

明らかになっておらず, 日本人健常人におけるc.1357多型とCTSC 酵素活性との関係は未だに明らかになっていない. また, PLS の一部では比較的軽症な症例が報告されているが, その原因も明らかになっていない.

そこで今回我々は, PLS 患者及びこのSNP を有する健常人のCTSC の酵素活性を測定. 各群の活性を比較することで, c.1357G の機能を分析し, さらに酵素活性とPLS 発症との関連について検討した.

## 材料と方法

**健常人及びPLS 患者の選択:** 健常人は日本在住の日本人50人を選択した. PLS 症例はCTSC 遺伝子の変異を確認済みの5例を選択した. そのうち3例は, PLS に典型的な高度の若年性歯周囲炎と掌蹠に明らかな過角化病変を有し, 2例は歯牙病変や皮膚病変が典型例と比較して軽度な症例であった.

**DNA シークエンス:** インフォームドコンセントを得て, 日本人の健常人50人より末梢血を採取した. 採取した末梢血より白血球を分離, QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNA を抽出した. さらにc.1357の塩基配列を確認するために, c.1357を含むエクソン7の領域を以下のプライマーでPCRにて増幅, オートシーケンサー-3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した.

Forward: 5'-CAATGAAGCCCTGATGAAGC-3'

Reverse: 5'-CTTCTGAGATTGCTGCTGAAAG-3'

**CTSC 酵素活性:** c.1357 における遺伝子型を決定した健常人50人の内35人, 及び当科で遺伝子診断をしたPLS 患者5人のCTSC 酵素活性を測定した. 測定法は, Toomes<sup>1)</sup>らが用いた方法を基に, 末梢白血球由来のタンパクを酵素源として行った. QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて末梢血1 mlを遠心して白血球ペレットを分離, 0.1% Triton X-100 (Sigma) を含むリン酸バッファー (0.1 M, pH 6.5) 100 µl でペレットを溶解し, 超音波破碎にてタンパクを抽出した後, Protein Assay (Bio-Rad, CA, U.S.A.) を用いたBradford法で濃度測定を行った. 96穴

プレートに試料タンパク10  $\mu\text{g}$ , NaCl (2 mM) と dithiothreitol (2 mM, Sigma) を含むリン酸バッファー(0.1 M, pH 6.5) 90  $\mu\text{l}$ , 合成ペプチド glycyL-L-arginine-7-amino-4-methylcoumarin (H-gly-arg-NHMec, GL Biochem Shanghai Ltd.) 5 mM を計100  $\mu\text{l}$  になるように調整, 混和し, 蛍光プレートリーダー(Fluoroskan Ascent, Thermo scientific)を用い, 25°Cでインキュベートしながら, 370 nmで励起, 460 nmで発光させ H-gly-arg-NHMec が加水分解して生じる NHMecの量を経時的に測定した. なお, 測定は duplicateで行った.

## 結 果

### 1. 日本人における SNP, c.1357G の遺伝子型頻度およびアリル頻度

健常人50人の内, 41人(82%)が c.1357G を保有せず(c.1357A/A), 7人(14%)が c.1357G をヘテロ接合で保有していた(c.1357A/G). 一方, わずか2人(4.0%)がホモ接合(c.1357G/G)であった(Fig. 1). 日本人健常人における c.1357A と c.1357G のアリル頻度はそれぞれ89%および11%であった.

### 2. 健常人における c.1357G と CTSC 活性および臨床所見との関連性および PLS 患者における CTSC 活性

c.1357 の塩基配列を確認した健常人50人のうち35人の CTSC 酵素活性を測定した. c.1357G の保有のパターンによって3群に分類, さらに PLS 患者群も含めて, 各群で CTSC 酵素活性の値を比較した(Fig. 2). 遺伝子型が c.1357A/A である健常人の CTSC 酵素活性を100%とすると ( $n=26$ ), c.1357A/Gの健常人の CTSC 酵素活性は50% ( $n=7$ ), さらに c.1357G/Gの健常人では10%まで低下していた( $n=2$ ). この2名の臨床所見について詳細に調べたが, 歯周囲炎の既往及び罹患や掌蹠の過角化病変, あるいは化膿性毛嚢炎などの易感染皮膚病変はまったく見られなかった. PLS 患者の酵素活性は SNP の遺伝子型が c.1357A/A である健常人コントロールの1%以下であり( $n=5$ ), ほぼ活性を失っていた.  $t$ 検定を

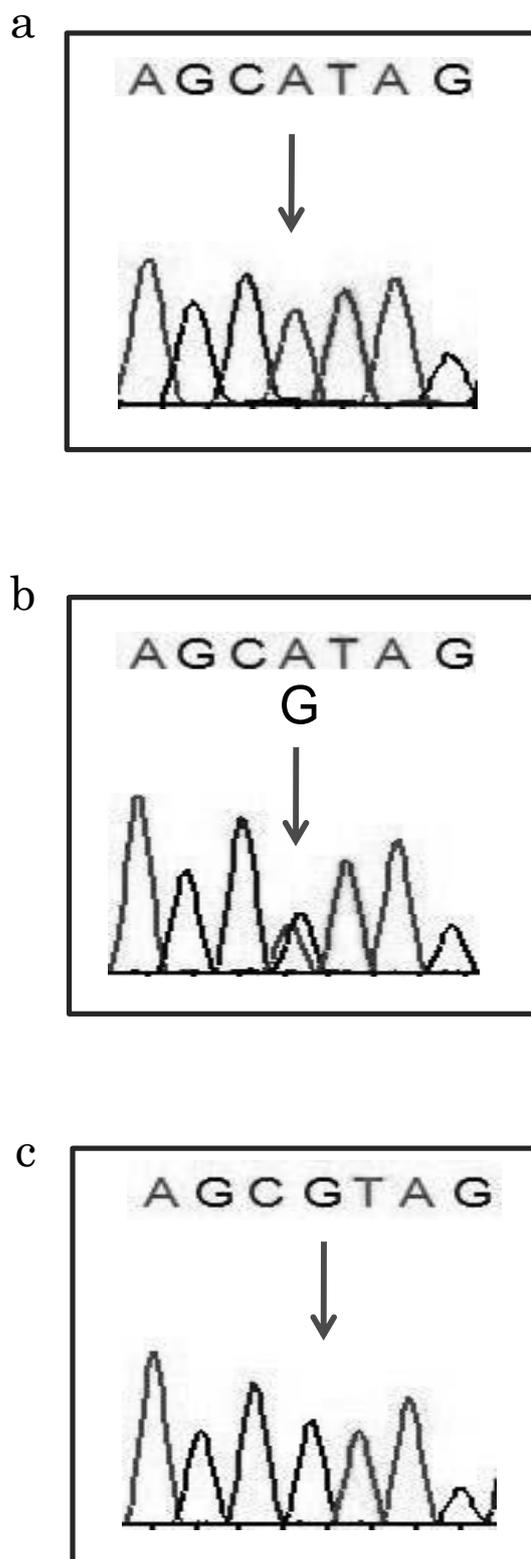


Figure 1 オートシーケンサーによる日本人健常人における CTSC c.1357 の遺伝子型の証明. Gのアリルを保有していない群(c.1357A/A) (Fig.1a), Gをヘテロ接合で保有する群(c.1357A/G) (Fig.1b), Gをホモ接合で保有する群(c.1357G/G) (Fig.1c)の3群が証明された.

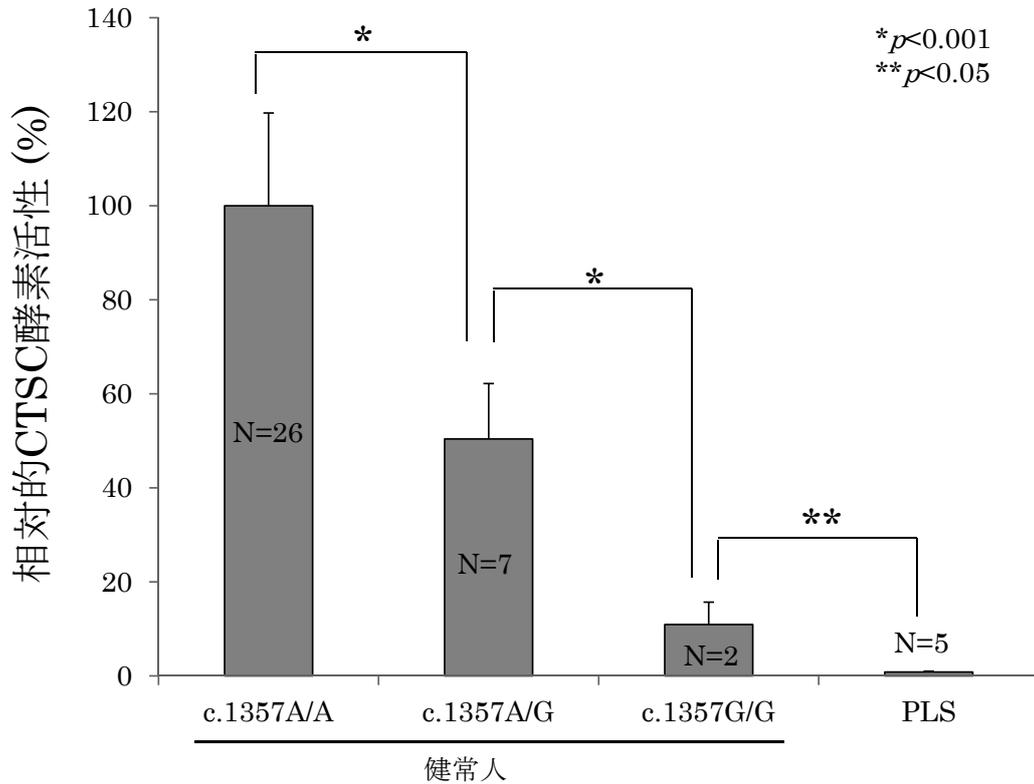


Figure 2 健常人と PLS 患者の CTSC 酵素活性.

c.1357A/A の健常人の CTSC 酵素活性を100%とすると ( $n=26$ ), c.1357A/G の健常人の酵素活性は50% ( $n=7$ ), さらに c.1357G/G の健常人では10%まで低下 ( $n=2$ ). PLS 患者の酵素活性 ( $n=5$ ) は, 1%以下だった.

行ったところ, いずれの群の間でも有意差がみられた.

### 3. PLS 患者における CTSC 活性と臨床症状との関係

PLS 患者 5 例のうち, 3 例は典型的症例であったが, 2 例は永久歯がすべて残存し, うち 1 例は掌蹠の角化も軽度であり, 軽症例といえる症例であった (Table 1). これら 5 例の CTSC 酵素活性を比較したが, 5 例いずれの症例においても 0%~0.96% の範囲まで活性が著明に低下しており, 症例間で差が見られなかった (Table 1).

## 考 察

c.1357 A>G が CTSC の酵素活性を低下させるメカニズムとして, 1 塩基の置換によりイソロイシンがバリンへとアミノ酸置換を起し, CTSC の高次構造が変化するためと考えられて

いる<sup>5)</sup>. 今回の我々の研究では c.1357G のアレル頻度は11%であり, 白色人種 (3.2%) の3倍以上の頻度であることがわかり, 人種間で差があるものと推測された. また CTSC の酵素活性は, c.1357G をヘテロ接合で, さらにホモ接合で保有する場合に段階的に低下することが明らかとなった. Noack らは汎発性侵襲性菌周囲炎の患者では c.1357G の保有率が健常人の2倍であったと報告している. 我々が調べた健常人50人のうち, c.1357G を有する者は9名であったが, c.1357G/G を有する2名を含むいずれの者においても, 菌周囲炎, 掌蹠の過角化あるいは易感染性皮膚症などの臨床所見は認められなかった. c.1357G/G は健常人の集団の中でも頻度が低いため, これまでの報告では測定されたことがなく, 本研究で初めて活性を調べることができた. Noack らが報告した汎発性侵襲性菌周囲炎と c.1357G との関連の有無は明らかではないものの, PLS 患者の CTSC 活性がほぼ0であることを鑑みると, 活

Table 1 PLS 患者の臨床症状と CTSC 酵素活性.

症例	1	2	3	4	5
重症度					
皮膚	重症	重症	軽症	重症	重症
歯周囲炎	重症	重症	中等症 (永久歯残存)	中等症 (永久歯残存)	中等 - 重症 (永久歯一部残存)
相対的CTSC 酵素活性 (%)	0.6	0.96	0.92	0	0

性がほぼ完全に欠失した場合のみ PLS を発症するということができる。これは、活性が10%まで低下するホモ接合の c.1357G の保有率が4.3%だったのに対し、PLS の有病率が100万人に数人と非常に稀である事実に合致する。

また、PLS の中には、歯周囲炎や掌蹠の過角化が軽微な非典型的な臨床症状を呈する症例の報告もある<sup>6,7)</sup>。これらの症例では CTSC 活性は測定されていないため、なぜ軽症であるのかについては考察されていないが、遺伝子変異の種類に共通したものはなく、現時点で PLS における表現型と遺伝子型との関連性は明らかになっていない。今回我々が CTSC 活性を測定した PLS 患者 5 人の中には、成人後も永久歯がすべて保たれている症例が 2 例含まれており、興味深いことにそのうち 1 例は皮膚症状もごく軽微である。この比較的軽症の 2 例は、1 例はホモ接合体変異、もう 1 例は複合ヘテロ接合体変異が同定されており、2 例の間で共通する変異はなく、過去に報告された軽症例の変異とも異なる。

これら軽症例を含む PLS 患者 5 人の CTSC 活性は、我々の解析法ではいずれもほぼ欠失していることが証明されたが、測定する際に用いた基質は合成ペプチドであるため、それでは検出できない活性が存在する可能性は完全には否定できない。したがって、CTSC 酵素活性の解析方法、ならびに PLS 患者の CTSC 遺伝子型と酵素活性との関連についてさらなる検討が必要であると考えられる。しかし、我々の解析結果の通り、CTSC 遺伝子変異の種類に関わらず、PLS 患者では酵素活

性がほぼ欠失するのであれば、症状の重症度は酵素活性の程度によるものではなく、環境要因やその他遺伝子変異以外の要因が本疾患の重症度を左右するという可能性が考えられる。

PLS は幼少時に発症し、多くの症例においてその症状は一生涯に渡る。皮膚病変にはエトレチナート内服が有効とされ、また早期に診断がついた症例では歯牙の脱落予防を目的として入念な歯周ケアが試みられているが、根本的治療は未だ確立されていない。今後のさらなる研究において、皮膚における役割を含めた CTSC の機能がより明らかになり、かつ、PLS の臨床症状の重症度に影響をあたえる要因を明らかにできれば、今後の PLS の治療に役立つと考えられる。

## 謝 辞

PLS 患者の検体の提供にご協力くださいました、日本大学駿河台病院の落合豊子教授、松浦大輔助手、富山大学大学院医学薬学研究部皮膚科学講座の清水忠道教授、三澤恵助教、大阪回生病院の梅香路綾乃先生、青山のむら皮膚科の野村和夫院長に感謝申し上げます。また、皮膚科学講座の豊巻由香技術員、鷹木由里子、神田由起、田村由起子実験助手のご協力に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Hart TC, Hart PS, Michalec MD, Zhang Y, Marazita ML, Cooper M, Yassin OM, et al. Localisation of a

- gene for prepubertal periodontitis to chromosome 11q14 and identification of a cathepsin C gene mutation. *J Med Genet.* 2000;37(2):95-101.
- 2) Nakano A, Nomura K, Nakano H, Ono Y, LaForgia S, Pulkkinen L, Hashimoto I, et al. Papillon-Lefèvre syndrome: mutations and polymorphisms in the cathepsin C gene. *J Invest Dermatol.* 2001;116(2):339-43.
  - 3) Nakajima K, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe A, Ikenaga S, Aizu T, Kaneko T, et al. Papillon-Lefèvre syndrome and malignant melanoma. A high incidence of melanoma development in Japanese palmoplantar keratoderma patients. *Dermatology.* 2008;217(1):58-62.
  - 4) Ochiai T, Nakano H, Rokunohe D, Akasaka E, Toyomaki Y, Mitsuhashi Y, Sawamura D. Novel p.M1T and recurrent p.G301S mutations in cathepsin C in a Japanese patient with Papillon-Lefèvre syndrome: implications for understanding the genotype/phenotype relationship. *J Dermatol Sci.* 2009;53(1):73-5.
  - 5) Noack B, Görgens H, Hempel U, Fanghänel J, Hoffmann T, Ziegler A, Schackert HK. Cathepsin C gene variants in aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2008;87(10):958-63.
  - 6) Inalöz HS, Harman M, Akdeniz S, Inalöz SS, Isik AG. Atypical familial Papillon-Lefèvre syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15(1):48-50.
  - 7) Castori M, Madonna S, Giannetti L, Floriddia G, Milioto M, Amato S, Castiglia D. Novel CTSC mutations in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome with recurrent pyoderma and minimal oral and palmoplantar involvement. *Br J Dermatol.* 2009;160(4):881-3.