

学位論文題名

Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly.

(優性と劣性の複合ヘテロ変異より発症した単純型表皮水疱症の研究によりケラチン中間径線維形成におけるスタッター領域の重要性が示唆された)

学位論文内容の要旨

ケラチン中間径線維はケラチノサイトの形態や機能を維持する重要な構造蛋白である。表皮基底細胞ではケラチン5とケラチン14が発現しているが、このどちらかの遺伝子の一方の allele に変異が生じるとケラチン線維形成が障害され、基底細胞が脆弱となり単純型表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex; EBS) を引き起こす。EBS は軽症型の Weber-Cockayne 型 (EBS-WC)、中間型の Köbner 型 (EBS-K)、最重症型の Dowling-Meara 型 (EBS-DM) に分類される。EBS の重症度とケラチン分子内の変異部位には相関がみられる。ケラチン分子は α ヘリックス構造をとるロッドドメイン (1A, 1B, 2A, 2B) と非ヘリックス構造のリンカー領域より構成されるが、線維形成の初期の段階に重要とされるロッドドメインの両端に変異が生じると EBS-DM となる。EBS-DM 患者の培養ケラチノサイトではケラチンが線維構造を形成できずに小球状に凝集する像が観察される。

今回まずは臨床症状が患者間で異なる EBS の一家系について詳細に研究した。発端者は出生時より全身に水疱形成があり、22歳の現在も手足に水疱とびらんをくりかえしており EBS-K の臨床像であった。亡くなった兄も同様の所見を呈した。一方その父と祖母 (双方とも故人) と父方伯父は長期歩行時に足底に水疱ができる程度で病識も乏しく EBS-WC の臨床像を呈した。この家系についてケラチン5とケラチン14の遺伝子の変異検索をおこなった。発端者の末梢血より genomic DNA を抽出し、PCR 法にて全てのエクソン領域を増幅しダイレクトシーケンス法にて解析したところケラチン5遺伝子に二つの変異を検出した。これらの変異はコントロールの健常者 100 allele においては検出されなかったため polymorphism ではないと考えられた。一つの変異 (E170K) は 1A ドメインの N 末端の非常によく保存された helix initiation peptide にあり、水疱症状がある発端者と父方伯父に認められたことより EBS-WC を引き起こしている優性型変異と考えられた。もうひとつの変異 (E418K) は発端者と症状のない母と兄に認められ、2B ロッドドメイン内の heptad repeat 構造を中断するスタッターという領域の変異だった。この結果に基づき、スタッター領域の変異 E418K はもう片方の allele が野生型の場合は母と兄のように水疱を形成しないが、E170K と複合ヘテロ変異を形成した場合は EBS の症状を重症化する劣性型 silent の変異であるとの仮説を立てた。

この仮説を証明するため、細胞に変異のあるケラチン5遺伝子を導入し発現させることで

どのような変化がみられるかを実験した。まずヒトケラチノサイトライブラリーよりケラチン5 cDNA をPCRにて増幅し、pCMV-tag ベクターにFLAG エピトープがケラチン5のC末端に発現するように組み込んだ (pK5F)。この遺伝子を内因性のケラチン5とケラチン14を持たない MDCK 細胞にリポ製剤を用いて導入し、抗FLAG 抗体にて染色しケラチン線維の発現を確認した。次に site-directed mutagenesis system を用いて E170K と E418K の変異を含むベクター (pK5E170KF、pK5E418KF) をそれぞれ作成した。この家系の変異結果と同様に pK5F と pK5E170KF、pK5E170KF と pK5E418KF、pK5F と pK5E418KF をそれぞれ同時に遺伝子導入し、本症を反映する線維構造がとれず小球状にケラチンが凝集している細胞の数を比較した。

pK5F と pK5E170KF を導入した細胞は 12.7% にケラチン線維の凝集像が認められたが pK5E170KF と pK5E418KF の導入では 30.0% で有意差が認められた ($p < 0.05$)。pK5F と pK5E418KF では 4% であった。この結果はこの EBS 家系の患者の重症度をそのまま反映するかたちとなった。

今回の研究により中間径線維のスタッター領域においてはじめて変異 (E418K) が検出され、単独では劣性型 silent 変異であるが優性型変異と複合ヘテロとなることで臨床症状がさらに重症化することが *in vitro* の実験においても証明された。このような優性と劣性の複合ヘテロ変異により発症したことが証明された症例はケラチン遺伝子においてはじめてである。スタッター領域は中間径線維間でよく保存されている部位であるにもかかわらずこれまでその役割は明らかではなく、ケラチン遺伝子においても今までこのスタッター領域に変異は報告されていない。しかし優性と劣性の複合ヘテロ変異より発症した単純型表皮水疱症の今回の研究によりケラチン中間径線維形成におけるスタッター領域の重要性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly.

(優性と劣性の複合ヘテロ変異より発症した単純型表皮水疱症の研究により
ケラチン中間径線維形成におけるスタッター領域の重要性が示唆された)

表皮基底細胞のケラチン中間径線維であるケラチン5とケラチン14のどちらか一方の遺伝子の片方の allele に変異が生じるとケラチン線維形成が障害され、単純型表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex; EBS)をひき起こす。EBS は軽症型の Weber-Cockayne 型 (EBS-WC)、中間型の Köbner 型 (EBS-K)、最重症型の Dowling-Meara 型 (EBS-DM)に分類される。EBS の重症度とケラチン分子内の変異部位には相関がみられ、線維形成の初期の段階に重要とされるロッドドメインの両端に変異が生じると EBS-DM となる。

今回まずは臨床症状が患者間で異なる EBS の一家系について研究した。発端者は出生時より全身に水疱形成があり EBS-K の臨床像であった。一方その父と祖母 (双方とも故人) と父方伯父は長期歩行時に足底に水疱ができる程度で病識も乏しく EBS-WC の臨床像を呈した。この家系についてケラチン5とケラチン14の遺伝子の変異検索を行なった。発端者のケラチン5遺伝子に二つの変異を検出した。一つの変異 (E170K) は 1A ドメインの N 末端の非常によく保存された helix initiation peptide にあり、水疱症状がある発端者と父方伯父に認められたことより EBS-WC をひき起こしている優性型変異と考えられた。もうひとつの変異 (E418K) は発端者と症状のない母と弟に認められ、2B ロッドドメイン内の heptad repeat 構造を中断するスタッターという領域の変異だった。この結果に基づき、スタッター領域の変異 E418K はもう片方の allele が野生型の場合は母と弟のように水疱を形成しないが、E170K と複合ヘテロ変異を形成した場合は EBS の症状を重症化する劣性型 silent の変異であるとの仮説を立てた。この仮説を証明するため、細胞に変異のあるケラチン5遺伝子を導入し発現させることでどのような変化がみられるかを実験した。まずヒトケラチンサイトライブラリーよりケラチン5cDNA を PCR にて増幅し、pCMV-tag ベクターに FLAG エピトープがケラチン5の C 末端に発現するように組み込んだ (pK5F)。この遺伝子を内因性のケラチン5とケラチン14を持たない MDCK 細胞にリポ製剤を用いて導入し、抗 FLAG 抗体にて染色しケラチン線維の発現を確認した。次に site-directed mutagenesis system を用いて E170K と E418K の変異を含むベクター (pK5E170KF、pK5E418KF) をそれぞれ作成した。この家系の変異結果と同様に pK5F と pK5E170KF、pK5E170KF

と pK5E418KF、pK5F と pK5E418KF をそれぞれ同時に遺伝子導入し、本症を反映する線維構造がとれず小球状にケラチンが凝集している細胞の数を比較した。ケラチンの凝集像を呈した細胞の比率と患者の重症度には相関がみられた。今回の研究により中間径線維のスタッター領域においてはじめて変異 (E418K) が検出され、単独では劣性型 silent 変異であるが優性型変異と複合ヘテロとなることで臨床症状がさらに重症化することが in vitro の実験においても証明された。このような優性と劣性の複合ヘテロ変異により発症したことが証明された症例はケラチン遺伝子において初めてである。スタッター領域は中間径線維間によく保存されている部位であるにもかかわらずこれまでその役割は明らかではなく、ケラチン遺伝子においても今までこのスタッター領域に変異は報告されていない。しかし優性と劣性の複合ヘテロ変異より発症した単純型表皮水疱症の今回の研究によりケラチン中間径線維形成におけるスタッター領域の重要性が示唆された。

公開発表に際し、副査の本間研一教授から2つのベクターの細胞導入率と発現率についての質問、EBS の遺伝子治療などの質問、副査の清水 宏教授からは今回の研究結果を今後どう役立てるかの質問、主査の小林邦彦先生からはスタッター領域におけるアミノ酸変化がケラチン構造にどう影響するかの質問など、多くの質問があったが、申請者は大概適切な解答をなした。

この論文はケラチン遺伝子において優性と劣性の複合ヘテロ変異の存在がはじめて明らかになった点、またいままで不明だったケラチン分子のスタッター領域にはじめて変異が確認されこの変異によりケラチン線維形成障害が助長されたことよりその重要性が示唆された点が高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。