

学位論文題名

Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (*PLEC1*).

(幽門閉鎖症を合併した単純型表皮水疱症はプレクチン遺伝子 (*PLEC1*) における遺伝子変異によって生じる表皮水疱症の新しい亜型である。)

学位論文内容の要旨

遺伝的に皮膚の脆弱をきたし水疱を生じる表皮水疱症(epidermolysis bullosa; EB)は表皮・真皮境界部位における電子顕微鏡的な裂隙の生じる部位により 3 型に分類される。すなわち裂隙が表皮基底細胞内にあるものを単純型(EB simplex; EBS)、基底膜部の透明層内にあるものを接合部型(junctional EB; JEB)、および真皮内にあるものを栄養障害型と呼称する。常染色体優性遺伝性の EBS は、表皮基底細胞で発現しているケラチン中間径線維であるケラチン5および14のどちらかの遺伝子における変異によって生じる。一方、常染色体劣性遺伝性の EBS には、著明な遅発性進行性の筋ジストロフィーを合併する症例があり、この病型はヘミデスマゾームの inner plaque の構成成分であり、かつ筋の sarcolemma にも存在するプレクチン分子をコードする遺伝子 (*PLEC1*) の変異によって引き起こされる。また、JEB は Herlitz 型、非 Herlitz 型、および先天性幽門閉鎖症合併型 (JEB associated with pyloric atresia; JEB-PA) に大別される。これらのうち、JEB-PA はヘミデスマゾームに関連する膜貫通蛋白である、 $\alpha 6$  あるいは  $\beta 4$  インテグリンをコードする遺伝子変異により同蛋白が欠損するために発症し、多くの症例において生後1年以内に死亡する。

今回、我々は異なる 2 家系に発症した幽門閉鎖症を伴う EB の患者について詳細に検索し、その発症機序の解明を試みた。家系1の発端者は健康な両親の間に生まれた男児で、幽門閉鎖症に加えて、生直後より躯幹を中心に典型的な EB の水疱の多発を認めた。家族歴として発端者の兄にも同様の症状認め、生後約 4 ヶ月で死亡している。一方、家系2の発端者は女児で、幽門閉鎖症と EB の合併を認め生後31日目に死亡したが、家族歴はなかった。

いずれの発端者においても、電子顕微鏡的に水疱形成部位は表皮基底細胞内にあり、ヘミデスマゾームの著明な低形成を認め、EBS を示唆する所見で、JEB ではなかった。また蛋白レベルでは、表皮基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的検索において、プレクチンの発現が、家系1の発端者では著明に減弱し、家系2の発端者では発現を全く認めなかった。一方、JEB-PA の原因遺伝子である  $\alpha 6$  インテグリンおよび  $\beta 4$  インテグリンを含め、その他の基底膜蛋白の発現は正常であった。そこでこれらの家系について *PLEC1* に関する遺伝子変異検索を行った。すなわち、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シング法にて解析

した結果、*PLEC1* に4つの新規変異を同定した。家系1では、母方アリルにおいて305番目のグルタミンが終止コドンに置き換わっており Q305X というノンセンス変異を生じており、父方アリルでは *PLEC1* のエクソン12のスプライス部位で1344番目のヌクレオチドがグリシンからアデニンに変換されて1344G→A というスプライス部位変異を生じていた。エクソン・トラップ法による検索では、1344G→A の変異を含むゲノム DNA 断片からは2つの PCR 産物が得られ、これらをダイレクトシーケンス法により解析したところ、一方の PCR 産物にはエクソンの11と13が、他方にはエクソンの11のみが含まれていた。なお、正常のゲノム DNA 断片から得られた PCR 産物にはエクソン11、12、および13が含まれていた。また、エクソン12が欠損した場合は下流域に早期終止コドンが生じるが、エクソン12と13の欠損ではフレーム（あるいは open reading frame）の変化は起こさなかった。一方、家系2の発端者ではホモ接合性変異とヘテロ接合性変異の双方を認めた。すなわち、ホモ接合性変異は1189番目のアルギニンがストップ・コドンに置き換わり R1189X というノンセンス変異で、この変異は父由来であった。一方、ヘテロ接合性変異は2538番目のグルタミンがストップ・コドンに変換し Q2538X というノンセンス変異を生じ、この変異は母由来であった。*PLEC1* における10か所の遺伝的多形を比較したところ、父親は3か所において、母親は6か所においてヘテロ接合性であり、R1189X とイントロン28/10648T→A という2つの変異は父親に存在して母親に認められなかった。従って、家系2の発端者における R1189X の変異とそれに隣接した短い領域の DNA 断片は父由来であり、segmental uniparental isodisomy を生じている可能性が示唆された。

今回の研究により、常染色体優性遺伝の予後良好な単純型表皮水疱症に対して、常染色体性で極めて予後不良の幽門閉鎖症合併型 EBS という新規亜型が *PLEC1* の変異により生じることが初めて示され、今後遺伝子治療の対象となりうることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正  
副 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

## Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (*PLEC1*).

(幽門閉鎖症を合併した単純型表皮水疱症はプレクチン遺伝子 (*PLEC1*)  
における遺伝子変異によって生じる表皮水疱症の新しい亜型である。)

遺伝的に水疱を生じる表皮水疱症(epidermolysis bullosa; EB)は、表皮基底膜部における裂隙形成部位が、表皮基底細胞内にあるものを単純型(EB simplex; EBS)、基底膜部の透明層内にあるものを接合部型(junctional EB; JEB)、および真皮内にあるものを栄養障害型と大別される。EBSは、表皮基底細胞で発現しているケラチン中間径線維であるケラチン5あるいは14の遺伝子における変異により生じる。一方、EBSには、常染色体劣性遺伝性で遅発性進行性の筋ジストロフィーを合併する症例があり、この病型はプレクチンをコードする遺伝子 (*PLEC1*) の変異により引き起こされる。また、JEBはHerlitz型、非Herlitz型、および幽門閉鎖症合併型 (JEB associated with pyloric atresia; JEB-PA)に大別される。これらのうち、JEB-PAはヘミデスモゾームに関連する膜貫通蛋白の $\alpha 6$ または $\beta 4$ インテグリンをコードする遺伝子変異により同蛋白が欠損するため発症し、多くは生後1年以内に死亡する。今回、異なる2家系に発症した幽門閉鎖症を伴うEBの患者について詳細に検索し、その発症機序の解明を試みた。家系1の発端者は健康な両親の間に生まれた男児で、幽門閉鎖症と典型的なEBを合併していた。また発端者の兄にも同様の症状認め、生後約4ヵ月で死亡している。一方、家系2の発端者は女児で、幽門閉鎖症とEBの合併を認め生後31日目に死亡したが、家族歴はなかった。いずれの発端者においても、表皮基底膜蛋白の免疫組織学的検索で、意外にも、JEB-PA関連の $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの発現は正常であった。しかし、プレクチンの発現は、家系1の発端者では著明に減弱し、家系2の発端者では全く認めなかった。その他の基底膜蛋白の発現も正常であった。一方、電子顕微鏡的な水疱形成部位は表皮基底細胞内で、ヘミデスモゾームの著明な低形成を認め、EBSを示唆する所見で、JEBではなかった。そこでこれらの家系について *PLEC1* に関する遺伝子変異検索を行った。その結果、*PLEC1* に4つの新規変異を同定した。家系1では、母方アレルで305番目のグルタミンが終止コドンに置き換わってQ305Xというノンセンス変異を生じ、父方アレルでは *PLEC1* のエクソン12のスプライス部位で1344番目のヌクレオチドがグリニンからアデニンに変換されて1344G→Aという変異を生じていた。後者の変異は、エクソン・トラッピング

グ法を用いた解析により、異常なスプライシングを生じ、蛋白合成の異常との関連が示唆された。一方、家系2の発端者ではホモ接合性変異とヘテロ接合性変異の双方を認めた。すなわち、ホモ接合性変異は1189番目のアルギニンが終止コドンに置き換わり R1189X という父親由来のノンセンス変異で、一方、ヘテロ接合性変異は2538番目のグルタミンが終止コドンに変換し Q2538X というノンセンス変異で母親由来であった。PLEC1における10か所の遺伝的多形を比較したところ、父親では3か所、母親では6か所のヘテロ接合性変異があり、R1189X とイントロン28/10648T→Aの2つの変異は父親に存在して母親に認められなかった。従って、家系2の発端者におけるR1189Xの変異とそれに隣接した短い領域のDNA断片は父由来であり、segmental uniparental isodisomyを生じている可能性が示唆された。今回の研究により、常染色体優性遺伝の予後良好なEBSに対して、常染色体性で極めて予後不良の幽門閉鎖症合併型EBSという新規亜型がPLEC1の変異により生じることが初めて示され、今後遺伝子治療の対象となりうることが示唆された。

公開発表に際し、副査の守内哲也教授からは、プレクチン遺伝子におけるuniparental isodisomyに関する質問、幽門閉鎖症を伴うEBSに対する治療法などの質問、副査の清水宏教授からは今回の研究対象のような症例に対する治療法などについての質問、主査の有賀正教授からは、筋ジストロフィー合併型EBの原因であるプレクチン遺伝子の変異によって幽門閉鎖症を生じる機序、今回の研究対象のような症例に対する遺伝子治療法についての質問など、その他多くの質問があったが、申請者は大概適切な回答をなし得た。

この論文は、遺伝性皮膚疾患のEBにおいて、これまで分類されていなかった幽門閉鎖症合併型のEBSという新規の亜型の存在を確認した点、またその病型の原因が、EBにおいて同定されているPLEC1の変異によることを突き止めた点で高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。