

氏 名	内山 慶一
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第704号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 3月10日
学位論文題目	Expression of a mutated allele, non-reduced by aging, in a Japanese family with localized epidermolysis bullosa simplex due to a novel mutation, p.Arg169Gly, of keratin 5 gene. (加齢による変異アレルの発現減退を伴わない、ケラチン5の新規遺伝子変異(Arg169Gly)が同定された先天性表皮水疱症単純型・限局型(ウェーバーコケイン型)の日本人一家系)
審査委員	主査 教授 平田 多佳子 副査 教授 等 誠司 副査 教授 縣 保年

論文内容要旨

※整理番号	710	(ふりがな) 氏名	(うちやまけいいち) 内山慶一
学位論文題目	<p>Expression of a mutated allele, non-reduced by aging, in a Japanese family with localized epidermolysis bullosa simplex due to a novel mutation, p.Arg169Gly, of keratin 5 gene.</p> <p>(加齢による変異アレルの発現減退を伴わない、ケラチン5の新規遺伝子変異 (Arg169Gly) が同定された先天性表皮水疱症単純型・限局型 (ウェーバー・コケイン型) の日本人一家系)</p>		
(目的)	<p>先天性表皮水疱症単純型 (epidermolysis bullosa simplex : 以下 EBS) は、先天性の素因により生後間もなくより、機械的刺激を受けやすい部位に水疱を形成する常染色体優性遺伝の疾患である。軽症の限局型 (ウェーバー・コケイン型)、中等症の汎発型 (ケブネル型)、最重症のダウリング・メアラ型の3型に分類される。EBS はケラチン遺伝子の変異によって基底細胞が脆弱化するために発症し、ケラチン5あるいはケラチン14 遺伝子において様々な変異の報告がある。</p> <p>今回、限局型 (ウェーバー・コケイン型) EBS の15歳の日本人男性及び家族に対しケラチン5、14における遺伝子変異を明らかにするとともに、臨床症状との関連を明らかにする為の解析を行った。また、EBS は加齢により症状の改善がみられるという特性を持つが、その機構についてはいまだ明らかになっていない。そこで変異遺伝子の発現の変化に関わる可能性を考え、この仮説を明らかにする為、一家系の世代間の変異遺伝子の発現につき調査し検証した。</p>		
(方法)	<p>患者及び研究の対象は、限局型 (ウェーバー・コケイン型) EBS と診断された15歳の日本人男性及びその家族 (母親、母方の祖母、姉、弟、父親) である。現在母親及び母方の祖母に症状は認めないが子供の頃に症状があり、姉、弟、父親はこれまで無症状であった。</p> <p>(1) ケラチン5、ケラチン14の遺伝子変異解析 患者及び患者家族の末梢血よりDNAを抽出し、ケラチン5、14のそれぞれのエクソンについてPCRで増幅して塩基配列を調べた。</p> <p>(2) 加齢によるケラチン5の遺伝子変異アレルの発現頻度解析 患者及び症状がかつてあった母親、母方の祖母の同一部位である足背の皮膚組織からRNAを抽出した。RT-PCRを行って変異部位を増幅した後、増幅産物を制限酵素を用いて正常アレルを分解した。</p>		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

(結果)**(1) ケラチン5、ケラチン14の遺伝子変異解析**

患者のケラチン5遺伝子の解析により、新規の遺伝子変異(Arg169Gly)を認めた。ケラチン14に遺伝子変異は認めなかった。正常アレルで切断され変異アレルでは切断されない制限酵素(Hha I)を用いた解析では、症状の無い姉、弟、父親では全て切断されたが、患者、母親、母方の祖母では部分的に切断しないものもみられた。これにより症状のある患者、母親、母方の祖母には同じ制限酵素切断パターンの遺伝子変異が生じていることが確認された。

(2) 加齢によるケラチン5の遺伝子変異アレルの発現頻度解析

患者及び母親、母方の祖母の足背の皮膚組織からRNAを抽出、RT-PCRを行って作成した増幅産物に制限酵素を作用させたが、患者及び母親、母方の祖母の間で、切断された正常アレルと切断されなかった変異アレルの割合に明らかな差はみられなかった。

(考察)**(1) ケラチン5、ケラチン14の遺伝子変異解析**

ケラチン分子の α -ヘリックス構造の両端の領域はhelix initiation peptide(以下HIP)、helix termination peptide(以下HTP)と呼ばれ、最もよく保存された非常に重要な部位であるとされる。ここでの変異は特に大きな障害を引き起こすとされ過去の報告例でも最重症のダウリング・メアラ型が最も多くみられるが、中には本例のように軽症の限局型(ウェーバー・コケイン型)の報告も複数みられる。今回見つかった新規の変異はHIP領域の最初のアミノ酸(169番目)で生じたものであったが、同じ位置で最重症のダウリング・メアラ型の報告例(Arg169Pro)もみられる。HIP領域のような重要な位置で生じた変異にも拘わらず重症型でない例が存在する理由や、同じ位置で生じた変異で症状が異なる理由について現時点では不明であるが、置換されたアミノ酸の形態や電荷の違い等が原因である可能性も考えられる。

(2) 加齢によるケラチン5の遺伝子変異アレルの発現頻度解析

EBSの病態のうち未解明の問題の一つは、加齢により症状の改善がみられるという特性である。我々は、加齢により皮膚のケラチン5の変異mRNAの発現頻度の減退が生じ、相対的に正常mRNAの発現の割合が増加するという仮説をたてその検証を行った。患者及び家族の皮膚のケラチン5のmRNAの発現頻度につき検証を行ったが、患者・母親・祖母の間で正常アレルと変異アレルの割合の変化はなく、発現頻度の減退は確認されなかった。他に考えられるメカニズムとしては、加齢により何らかの代償機構、例えば他のケラチンの過剰発現が生じる、あるいは他の部位で突然変異が生じるなどが考えられているが、今回の研究では検証はできておらず、更なる調査・研究が必要である。

(結論)

先天性表皮水疱症単純型・限局型(ウェーバー・コケイン型)の日本人一家系につき遺伝子解析を用いた調査を行ったところ、患者及び同症状の家族のケラチン5に新規の遺伝子変異(Arg169Gly)が生じていることを確認した。変異はHIPドメインで生じていたが、軽症の限局型(ウェーバー・コケイン型)であった。またEBSの未解明の問題の一つである、加齢による症状の改善が得られる機構につき仮説をたて検証を行ったが、加齢によるケラチン5の変異mRNAの発現減退以外の要因が考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	710	氏名	内山 慶一
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>先天性表皮水疱症単純型 (epidermolysis bullosa simplex, EBS) は、常染色体優性遺伝形式をとる水疱症で、これまでにケラチン5あるいは14遺伝子においてさまざまな変異が報告されている。本研究では、限局型 (ウェーバー・コケイン型) EBS の日本人一家系において、遺伝子変異と臨床症状との関連および加齢による症状改善の機構を明らかにすることを目的として、ケラチン5および14の遺伝子変異と変異遺伝子の発現について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 限局型 EBS と診断された 15 歳日本人男性患者のケラチン 5 遺伝子に新規の変異 (Arg169Gly) を認めた。 2) 患者のケラチン 14 遺伝子のエクソンには変異を認めなかった。 3) 上記の変異は、患者家族のうち、症状のある母親と母方の祖母には認められたが、症状のない姉、弟、父親には認められなかった。 4) 患者および患者の母親、母方の祖母の足背の皮膚組織のケラチン 5 の mRNA 解析では、正常アレルと変異アレルの発現の割合に、患者、母親、祖母の間で明らかな差は認められなかった。 <p>本論文は、限局型 EBS においてケラチン 5 遺伝子に新規の変異を同定し、EBS の原因となる遺伝子変異と臨床症状との関連について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 594字)</p> <p style="text-align: right;">(平成26年 1月29日)</p>			