HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝性掌蹠角化症の2病型；長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症における原因遺伝子とその病態に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	水野, 修
Description	配架番号：2171
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11689号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58806
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Osamu_Mizuno_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　水野　修

学 位 論 文 題 名

遺伝性掌蹠角化症の 2 病型；長島型掌蹠角化症と線状掌蹠角化症における
原因遺伝子とその病態に関する研究
（Studies on the causative genes and pathogenesis in two forms of palmoplantar keratodermas; Nagashima-type palmoplantar keratosis and striate palmoplantar keratoderma）

【背景と目的】　表皮の角化細胞は、表皮最下層の基底層で分裂し、成熟に伴い有棘層、顆粒層、角層の順に上方に移行し、分化する。しかしながら、角化のメカニズムには不明な点も多い。遺伝性掌蹠角化症は掌蹠に過角化を生じる常染色体優性遺伝または常染色体劣性遺伝形式をとる稀な遺伝性皮膚疾患の総称であり、臨床症状や病理所見、遺伝形式、原因遺伝子に基づいて分類される。一部の病型の病因遺伝子が明らかになっているが、病態の全容は未解明である。

日本人で多いとされてきた常染色体劣性遺伝形式をとる長島型掌蹠角化症（NPPK）の病因はこれまで不明であったが、2013 年に原因遺伝子が *SERPINB7* であることが報告された。

PPK の別の亜系である線状掌蹠角化症（SPPK）は常染色体優性遺伝形式をとる稀な疾患であり、本邦では症例報告がわずかに 1 例のみで変異検索の報告例はなく、世界でも 20 例弱しか変異は同定されていない。これまで細胞骨格に関与する *Keratin1*（*KRT1*）、細胞間接着に関与する *Desmoglein1*（*DSG1*）および *Desmoplakin*（*DSP*）の変異が原因として報告されており、細胞間接着分子の異常を基盤に細胞間接合が減弱することで、荷重などの機械的ストレスがその発症の誘因の一部になっている可能性が考えられてきたがその詳しい発症機序は不明である。

このように多様でその発症機序は未だ不明で疾患分類も完全とは言えない PPK の中で、2 病型について集中的に調べ、その原因遺伝子と病態、発症機序の一端を明らかにすることで、角化のメカニズムに新しい知見をもたらしうると考えた。

【対象と方法】　NPPK の原因遺伝子の解析のために、互いに血縁関係のない日本人 9 家系から 9 人の罹患者と 12 人の非罹患者の合計 21 人を集積、検討した。全員の血液または唾液から DNA を採取し Sanger sequencing により遺伝子変異検索を行った。同定した遺伝子変異のうち、2 種類のスプライスサイト変異については、罹患者手掌皮膚組織から採取した mRNA を用いた解析から異常スプライス産物を同定した。また、臨床的に NPPK に合致するものの遺伝形式的には常染色体優性遺伝のパターンが疑われた 1 家系の罹患者 4 人と非罹患者 2 人の DNA を用いて、whole-exome sequencing（WES）解析を行った。合計 5 家系の患者からは皮疹部皮膚を採取し、組織学的にも検討した。

SPPK の罹患者 1 人の DNA を血液から採取し *DSG1*、*DSP* および *KRT1* の遺伝子変異検索を行った。同時に、HE、電子顕微鏡観察および免疫組織染色の組織学的検討を行った。

【結果】NPPK では、*SERPINB7* に 1 つの新規変異と 3 つの既報告変異の計 4 つの機能喪失変異が同定された。全ての罹患者が *SERPINB7* 変異をホモ接合性または複合ヘテロ接合性に有していた。その内訳は、4 家系でナンセンス変異の c.796C>T（p.Arg266Ter）についてホモ接合性に、3 家系で c.796C>T と c.218_219del2ins12 を複合ヘテロ接合性に、2 家系で c.796C>T と c.455-1G>A を複合ヘテロ接合性に、そして 1 家系が c.796C>T と c.336+2T>G を複合ヘテロ接合性に保有していた。一方、非罹患者はいずれも罹患者で同定された変異のうちの 1 つをヘテロ接合性に有していた。エクソン 3 の 3’末端のスプライス

供与部位での欠失・挿入変異である c.218_219del2ins12 では、frameshift を伴わない、エクソン 3 あるいはエクソン 3 と 4 が欠失（in-frame deletion）する 2 パターンの異常スプライス産物； p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del が生じていた。イントロン 5 のスプライス受容部位での 1 塩基置換である c.455-1G>A では、6 コドン下流に premature termination codon（PTC）の p.Gly152AlafsTer6 を生じていた。イントロン 4 のスプライス供与部位の変異である c.336+2T>G（p.?）は NPPK の原因変異としてはこれまで未報告のものであり、日本人健常コントロール 50 人において保有されていなかった。

常染色体優性遺伝形式パターンが疑われていた 1 家系の WES 解析では、予想外にも、罹患者全員が *SERPINB7* の c.796C>T をホモ接合性に保有し、非罹患者がともにこの変異についてヘテロ接合性であった。このことから、*SERPINB7* のこのホモ接合性の機能喪失変異が本家系の PPK の原因と考えられ、本症例は NPPK と診断した。

SPPK についての遺伝子変異検索では、*DSG1* のエクソン 6 に PTC を生じる c.587delT（p.Phe196Serfs×3）をヘテロ接合性に同定し、この原因と判断した。組織学的には、HE 染色で表皮有棘細胞間隙が開大しており、電子顕微鏡観察では正常有棘細胞間に存在する desmoglea の mid-line が消失していた。免疫組織染色では、患者手掌の病変部皮膚では、健常者に比して EGFR が強く染色される像が観察された。

【考察】　SERPINB7 は serine protease inhibitor をその多くが有するセルピンスーパーファミリーのうち、clade B に属するタンパク質である。エクソン 8 のアミノ酸残基 331-352 にコードされる reactive center loop（RCL）が、標的タンパクは不明であるものの、その protease 阻害活性を担う重要な部位と考えられている。本研究で同定された 4 個の *SERPINB7* 変異のうち、PTC を生じる c.796C>T と c.455-1G>A により生成する SERPINB7 タンパクは、RCL を欠損するためその protease 阻害活性を有しないと考えられ、よって RCL の欠損が NPPK の発症の原因となると考えられた。その一方で、c.218_219del2ins12 の異常スプライス産物は、PTC を生じず、それは in-frame deletion の p.Leu57_Gln73del および p.Leu57_Lys112del であった。これら産物は完全な RCL を含む代りに、いずれもエクソン 3 にコードされるペプチドを欠いている。これは、RCL が欠損しなくても NPPK の症状を呈しうること、更には、エクソン 3 の欠損が NPPK の症状を呈しうることを示していると考えられる。注目すべきは、clade B に属するセルピンタンパクのエクソン 3 が他のタンパクと相互作用する機能を有すると考えられている CD-ループと呼ばれるヘリックス間ループを含んでいることである。よって、NPPK の発症機序や角層形成においては、SERPINB7 の RCL だけでなく CD-ループも何らかの役割を担っている可能性が示唆されると考えられる。

1000 ゲノムデータベースによれば、c.796C>T は日本人 89 人中 2 人がヘテロ接合性に保有し、極めて低い保有率とは言えない。漢民族中国人でも同様で、この変異は、日本人と漢民族中国人における創始者変異と考えられた。このような変異保有率のために、NPPK では本研究の 1 家系のように、偽優性遺伝形式を呈しうる。これは NPPK の正確な遺伝子検査および遺伝子相談につながるものと考える。

皮膚が外部要因からの防御臓器であることや、セルピン群が protease 阻害活性を有し抗炎症作用も有しうるタンパク群であることから、SERPINB7 の異常が、protease 活性と protease 阻害活性のバランスを保つホメオスタシスの障害を生じ、その結果として NPPK の症状である過角化や潮紅などの皮膚の変化を呈する可能性があると考えた。

SPPK の症例の解析において *DSG*1 変異を同定したが、本症例も含め、変異報告のほとんどが細胞間接着に直接関わる細胞外領域にあった。組織学的にも、接着分子異常が示唆された。一方、DSG1 は EGFR を介するシグナル伝達系を介する角化細胞の増殖と分化のバランスに影響する可能性があることが報告されており、本研究での EGFR の免疫染色では、正常皮膚に比してその発現が亢進している可能性が示された。それは細胞間接着機能以外にも、DSG1 は正常な表皮形態形成における増殖と分化のシグナル伝達に関与し、角化メカニズムのホメオスタシスに関与している可能性があることを示唆している。

【結論】本研究は、遺伝性掌蹠角化症の 2 病型について原因遺伝子とその病態を解析した。NPPK では、*SERPINB7* の機能喪失変異を示し、それが病因であることを改めて確認した。また NPPK が偽優性遺伝形式をとりうることを示した。SPPK では、*DSG1* 変異を同定し、細胞外接着の異常を生じている可能性を示した。さらに、*SERPINB7* および *DSG1* がコードするいずれのタンパクも正常角化メカニズムにおけるホメオスタシスに大きく関与している可能性が示唆された。