

学 位 論 文 題 名

Mutation analysis of the *ATP2A2* gene
in two Darier's disease pedigrees with marked differences
in clinical severity within affected family members.

(家族内で臨床症状に著しい差異を生じた Darier 病 2 家系における
ATP2A2 遺伝子変異検索)

学位論文内容の要旨

Darier 病は臨床的に軀幹・四肢屈側・頭部に疣贅状丘疹または局面を呈する常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患である。その原因は 12 番遺伝子長腕上の 23-24.1 にある *ATP2A2* 遺伝子の変異である。*ATP2A2* 遺伝子は 21 の exon からなり、小胞体膜上に存在し Ca^{2+} を細胞質から小胞体内に輸送する蛋白質 sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 isoform (SERCA2) をコードしている。SERCA2 は SERCA2a と SERCA2b の 2 つの isoform を持ち、前者は心筋や骨格筋、後者は平滑筋や表皮、付属器に発現している。*ATP2A2* 遺伝子の変異は現在 100 以上発見されているが、その変異部位は遺伝子全体に分布しておりホットスポットとなる部分はない。現在まで臨床症状と遺伝子変異の間に明らかな関連性があったとする報告はない。

しかしながら他の常染色体性優性遺伝性疾患である単純型表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex) においては家系内で臨床症状の差異をみとめた症例で K5 遺伝子にもう 1 つの変異が発見された報告がある。そのように変異の数によって臨床症状に差異が生じる可能性が指摘されているが、Darier 病の家系内においてもその可能性は否定できない。

今回の研究で皮膚科専門医によって臨床的・皮膚病理組織学的に診断された日本人 Darier 病 10 家系についてその臨床症状を軽度・中等度・重度に分類し、かつそれぞれの遺伝子変異検索を行った。

家系 1-3 は家族内発症例で、そのうち家系 1 と 2 はその臨床症状に軽度・重度の差が見られ、家系 3 は全て重度であった。家系 4-10 はそれぞれ孤発例であり臨床症状は軽度から重度まで認められた。

遺伝子検索には患者末梢血の白血球から genomic DNA を抽出し、polymerase chain reaction を用いて *ATP2A2* 遺伝子の 21 個の exon と exon-intron の境界領域を全てを増幅した。その後 ABI PRISM 3100 genetic analyzer を用いて direct sequencing を行い変異を検索し、発見した変異はそれぞれ適切な制限酵素を用いて確認した。

その結果、10 家系中 7 家系で *ATP2A2* 遺伝子の変異が発見された。内容は missense 変異が 6 種類 (M1V, N39D, L180R, G233R, C318R, A838P)、insertion 変異が 1 種類 (2170insG) であり、うち 3 種類 (L180R, G233R, 2170insG) が新たに発見された変異であった。変異の分布も *ATP2A2* 遺伝子上に散在しており、とくに集中は認めなかった。

またそれぞれの家系内で変異は1種類ずつであり、複数の変異の存在は確認できなかった。

次に家系内で臨床症状に軽度・重度の差がある家系1と2において臨床症状とその遺伝子変異とを比較検討した。家系1は77歳男性（軽度）とその50歳の息子（重度）であり、遺伝子変異はG233Rであった。家系2は17歳（重度）と13歳（軽度）の姉妹例で遺伝子変異はC318Rであった。G233RはSERCA2の3つのcytoplasmic domainsの中で β -strand domainのC末端に位置していた。SERCA2におけるこの部分の明らかな役割は未だ不明であるが、SERCA2内でCa²⁺が輸送される部位の近傍に位置しており、何らかの重要な機能が示唆された。またC318RはSERCA2の膜通過部位で全部で10-11個ある α -helix部分のうち、Ca²⁺の通路を形成する3本のうちの1本であるS4に位置していた。特にこの部分は“Ca²⁺-binding sites”となり、類縁の蛋白質であるSERCA1aにおける報告ではこの部位での遺伝子変異でSERCA1aの機能が約50%に落ちるという報告がなされており、SERCA2においてもこの部分がCa²⁺輸送に重要な役割を担っていることが示唆された。

Darier病の臨床症状と遺伝子変異の関連についての研究はこれが最初であり、Ca²⁺-binding sites およびその近傍の変異が臨床症状の差異に関連する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Mutation analysis of the *ATP2A2* gene in two Darier's disease pedigrees with marked differences in clinical severity within affected family members.

(家族内で臨床症状に著しい差異を生じた Darier 病 2 家系における
ATP2A2 遺伝子変異検索)

Darier 病は 12 番遺伝子長腕上にある *ATP2A2* 遺伝子の変異で発症する常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患である。*ATP2A2* 遺伝子は 21 の exon からなり、小胞体膜上に存在し Ca^{2+} を細胞質から小胞体内に輸送する蛋白質 sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 isoform (SERCA2) をコードしており、SERCA2a と SERCA2b の 2 つの isoform を持つ。*ATP2A2* 遺伝子の変異は現在 100 以上発見されているが、その変異部位は遺伝子全体に分布しており hot spot となる部分はない。また現在まで臨床症状と遺伝子変異の間に明らかな関連性があったとする報告はない。しかし他の常染色体性優性遺伝性疾患である単純型表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex) においては家系内で臨床症状の差異をみとめた症例で K5 遺伝子にもう 1 つの変異が発見された報告がある。そのように変異の数によって臨床症状に差異が生じる可能性が Darier 病の家系内においても否定はできない。今回の研究で 10 家系の日本人 Darier 病患者についてその臨床症状を軽度・中等度・重度に分類し、かつそれぞれの遺伝子変異検索を行った。家系 1-3 は家族内発症例で、そのうち家系 1 と 2 はその臨床症状に軽度-重度の差が見られ、家系 3 は全て重度であった。家系 4-10 はそれぞれ孤発例であり臨床症状は軽度から重度まで認められた。遺伝子検索には患者末梢血の白血球から genomic DNA を抽出し、polymerase chain reaction を用いて *ATP2A2* 遺伝子の 21 個の exon と exon-intron の境界領域を全てを増幅した。その後 ABI PRISM 3100 genetic analyzer を用いて direct sequencing を行い変異を検索し、発見した変異はそれぞれ適切な制限酵素を用いて確認した。

その結果、10 家系中 7 家系で *ATP2A2* 遺伝子の変異が発見された。内容は missense 変異が 6 種類 (M1V, N39D, L180R, G233R, C318R, A838P)、insertion 変異が 1 種類 (2170insG) であり、うち 3 種類 (L180R, G233R, 2170insG) が新たに発見された変異であった。変異の分布も *ATP2A2* 遺伝子上に散在しており、とくに集中は認めなかった。またそれぞれの家系内で変異は 1 種類ずつであり、複数の変異の存在は確認できなかった。

次に家系内で臨床症状に軽度-重度の差がある家系1と2において臨床症状とその遺伝子変異とを比較検討した。家系1は77歳男性(軽度)とその50歳の息子(重度)であり、遺伝子変異はG233Rであった。家系2は17歳(重度)と13歳(軽度)の姉妹例で遺伝子変異はC318Rであった。G233RはSERCA2の3つのcytoplasmic domainsの中で β -strand domainのC末端に位置していた。SERCA2におけるこの部分の明らかな役割は未だ不明であるが、SERCA2内で Ca^{2+} が輸送される部位の近傍に位置しており、何らかの重要な機能が示唆された。またC318RはSERCA2の膜通過部位で全部で10-11個ある α -helix部分のうち、 Ca^{2+} の通路を形成する3本のうちの1本であるS4に位置していた。特にこの部分は“ Ca^{2+} -binding sites”となり、類縁の蛋白質であるSERCA1aにおける報告ではこの部位での遺伝子変異でSERCA1aの機能が約50%に落ちるという報告がなされており、SERCA2においてもこの部分が Ca^{2+} 輸送に重要な役割を担っていることが示唆された。Darier病の臨床症状と遺伝子変異の関連についての研究はこれが最初であり、 Ca^{2+} -binding sites およびその近傍の変異が臨床症状の差異に関連する可能性が示唆された。

公開発表に際し、副査の岩永敏彦教授からは、SERCA2の正常皮膚細胞での働きについての質問、副査の清水宏教授からは検索した症例での神経疾患の合併の有無と変異の関係についての質問、主査の佐々木秀直教授からは複数の遺伝子変異をもって重症化する他の皮膚疾患の有無および変異が見つからなかった症例での考察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Darier病において臨床症状と遺伝子変異の関連についての初めての研究でありこの点を高く評価された。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。