

栄養障害型表皮水疱症のⅦ型コラーゲン遺伝子 (COL7A1)変異検索

学位論文内容の要旨

背景: 表皮水疱症は、軽微な外的機械刺激により、皮膚に容易に水疱やびらん、潰瘍を形成する疾患の総称である。本症は、水疱形成部位により単純型、接合部型、栄養障害型の大きく3つに分類されている。単純型は表皮内に水疱を形成し、接合部型では表皮真皮接合部に位置する lamina lucida に水疱を形成し、栄養障害型では真皮最上部の lamina densa 直下に水疱を形成する。さらに、近年の皮膚分子生物学の進歩により、単純型はケラチン5, ケラチン14, プレクチン遺伝子の異常により発症、接合部型はラミニン5, $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン, XVII 型コラーゲンの遺伝子の異常、栄養障害型は VII 型コラーゲン遺伝子の異常により発症することが明らかになった。VII 型コラーゲン遺伝子がコードしている VII 型コラーゲンは、表皮と真皮の境界部にあたる基底膜を構築させる構造蛋白である。そのため、栄養障害型では、VII 型コラーゲン遺伝子の異常により、VII 型コラーゲンから成る anchoring fibrils の形成不全を伴い、生後まもなくから真皮内に水疱を生じる。栄養障害型は、遺伝形式により優性型、劣性型に分類されており、劣性型はさらに比較的臨床症状が軽症である non-Hallopeau-Siemens (nHS) 型と臨床症状が重篤化する Hallopeau-Siemens (HS) 型に分類されている。現在、本症の有効な治療法は見つかっておらず、新しい治療法の開発が期待されている。

目的: 本研究の目的は、栄養障害型表皮水疱症患者の VII 型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) の変異検索を行い、日本人 COL7A1 変異の詳細を明らかにすることである。

方法: 2000年から2006年に北海道大学病院に紹介または受診された全く血縁関係の無い日本人の栄養障害型表皮水疱症28家系について、臨床症状や家族歴について詳しく聴取した。

次に、患者の皮膚生検を行い、電子顕微鏡学的所見を検討するため、ブロック作製、超薄切片作製、電子染色を行い、透過型電子顕微鏡にて観察した。また、各種基底膜抗原発現の有無をスクリーニングするため、患者皮膚の凍結ブロックを作製し、基底膜抗原に対する抗体を用い、免疫染色を施行した。

COL7A1 変異検索を行うため、エクソン-イントロン境界部を含めたエクソンと COL7A1 のプロモーター部位を PCR により増幅した。増幅した PCR 産物を Big Dye Terminator System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、自動核酸シーケンス装置にて塩基配列を決定した。

結果: 栄養障害型患者の電子顕微鏡学的所見は、真皮最上部の lamina densa 直下に水疱形成を確

認した。さらに、免疫組織化学的に基底膜蛋白の発現を解析したところ、優性型ではVII型コラーゲンの発現が認められたが、nHS型ではVII型コラーゲンの減弱、HS型では全くVII型コラーゲンの発現を認めなかった。また、VII型コラーゲン以外の基底膜蛋白の発現の減弱および欠損は認められなかった。

次に、COL7A1の変異検索を行ったところ、56 allele中、45 alleleにCOL7A1の変異を同定し、栄養障害型と診断された患者の80%に変異を同定した。栄養障害型の内訳は、優性型が6例(21%)、nHS型が14例(50%)、HS型が8例(29%)であった。今回同定したCOL7A1の変異は、優性型では6変異中、4変異(67%)が新規変異であった。新規変異はG1776V(5327G>T)、G2003E(6008G>A)、G2064E、8069del17insGAであった。劣性型では28変異中、19変異(68%)が新規変異であった。新規変異の内訳は、G1595R(4783G>A)、G1667E(5000G>A)、G1815R(5443G>A)、R1957Q(5870G>A)、G2304R(6910G>A)、G2623S(7867G>A)、G2633S(7096G>T)、G2677S(8029G>A)、C2876F(8627G>T)、R137X(409C>T)、Q641X(1921C>T)、R1683X(5047C>T)、R2261X(6781C>T)、Q2827X(8479C>T)、434insGCAT、1474del8、5604+2G>C、8109+2T>A、8358+1G>Tであった。今回のCOL7A1変異検索において、片方のalleleのみにしか変異を同定出来なかった3家系といずれのalleleにも変異を同定出来なかった1家系があった。

結論: 近年、栄養障害型の遺伝子型と表現型の関連について多数の報告があるが、劣性型の患者のほとんどは臨床症状が重篤化している。特にHS型では、COL7A1の両alleleに早期終止コドン変異を有するため、完全なVII型コラーゲン欠損をきたす。そのためVII型コラーゲンから形成されるanchoring fibrilsの形成不全に至り、臨床症状が重症化する。さらに、nHS型は、免疫組織化学的所見により基底膜にVII型コラーゲンの沈着を認めるため、臨床症状が重症化しない。nHS型は、早期終止コドン変異同士の組み合わせを除く、早期終止コドン、アミノ酸置換変異、スプライスサイト変異の組み合わせを両alleleに有することにより、VII型コラーゲンの減弱となる。

本研究において、日本人に多く認められる変異として報告されている変異の出現頻度は、28家系中、5818delCの変異は7家系(25%)、6573+1G>Cは3家系(11%)、E2857Xは2家系(7%)で同定された。さらに、Q2827Xは2家系(7%)で認められ、日本人のCOL7A1変異に多く認められる変異の1つであることが示唆された。さらに、34種類のCOL7A1の病的変異は、新規変異が23種類同定されたことから、日本人のCOL7A1の変異は、家族特異性の変異であることが示唆される。

今回COL7A1変異検索において、片方のalleleのみにしか変異を同定出来なかった3家系(11%)と変異を同定出来なかった1家系(4%)があった。しかしながら、過去の報告でも、49家系中片方のalleleにしか変異を同定出来なかった家系が13家系(27%)がある。このことから、病気を引き起こす変異は、COL7A1以外の部位に存在する可能性が示唆される。

日本人の栄養障害型表皮水疱症患者のCOL7A1変異検索を行った結果、海外の変異報告とおおむね同様の結果であったが、日本人特有の変異も同定し得た。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 有 賀 正

学 位 論 文 題 名

栄養障害型表皮水疱症のⅦ型コラーゲン遺伝子 (COL7A1)変異検索

表皮水疱症は、軽微な外的機械刺激により、皮膚に容易に水疱やびらん、潰瘍を形成する疾患の総称である。本症は、水疱形成部位により単純型、接合部型、栄養障害型の大きく3つに分類されている。近年の皮膚科学領域における分子生物学の進歩により、栄養障害型はⅦ型コラーゲン遺伝子の異常により発症することが明らかになった。Ⅶ型コラーゲン遺伝子がコードしているⅦ型コラーゲンは表皮と真皮の境界部にあたる基底膜を構築させる構造蛋白である。栄養障害型は、遺伝形式により優性型、劣性型に分類されており、劣性型はさらに比較的臨床症状が軽症である non Hallopeau-Siemens(nHS)型と臨床症状が重篤化する Hallopeau-Siemens(HS)型に分類されている。

本研究の目的は、栄養障害型表皮水疱症患者のⅦ型コラーゲン遺伝子(COL7A1)の変異検索を行い、日本人 COL7A1 変異の詳細を明らかにすることである。

初めに、栄養障害型表皮水疱症 28 家系について、患者の皮膚生検を行い、電子顕微鏡学的検索と各種基底膜抗原に対する抗体を用い、免疫染色を施行した。次に、PCR法により、COL7A1 変異検索を行った。

栄養障害型患者の電子顕微鏡学的所見は、真皮最上部の lamina densa 直下に水疱形成を確認した。さらに、免疫組織化学的に基底膜蛋白の発現を解析したところ、優性型ではⅦ型コラーゲンの発現が認められたが、nHS型ではⅦ型コラーゲンの減弱、HS型では全くⅦ型コラーゲンの発現を認めなかった。次に COL7A1 の変異検索を行ったところ、56 allele 中 45 allele に COL7A1 の変異を同定し、栄養障害型と診断された患者の 80% に変異を同定した。栄養障害型の内訳は、優性型が 6 例 (21%)、nHS 型が 14 例 (50%)、HS 型が 8 例 (29%) であった。今回同定した COL7A1 の変異は、優性型では 6 変異中、4 変異 (67%) が新規変異であった。劣性型では 28 変異中、19 変異 (68%) が新規変異であった。本研究において、日本人に多く認められる変異として報告されている変異の出現頻度は、28 家系中、5818delC は 7 家系 (25%)、6573+1G>C は 3 家系 (11%)、E2857X は 2 家系 (7%) で同定され、過去の報告と概ね同様であった。さらに、Q2827X は 2 家系 (7%) で認められ、日本人の COL7A1 変異に多く認められる変異の 1 つであることが示唆された。

副査の有賀正教授からは、栄養障害型表皮水疱症の診断確定に至る過程の質問、またⅦ型コラーゲン遺伝子に変異を同定出来なかった症例に関して、次にどのような実験計画で確定する

のかという質問, 副査の守内哲也教授からは, 本症の発症頻度, および保因者における表現型についての質問, また主査の清水宏教授から, VII 型コラーゲン遺伝子変異検索の今後の臨床への展望の質問があったが, 申請者は大概適切な回答をした。

この論文は, 栄養障害型表皮水疱症の診断を確定する手法, また本症で同定された変異と臨床症状との関連を明らかにし, 今後, 新しい治療法が開発されると, 患者ごとに適切な治療法を選択できる可能性が期待される。

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。