

学 位 論 文 題 名

Molecular genetics of plectin-deficient epidermolysis bullosa and identification of IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid

(プレクチン欠損型表皮水疱症の分子遺伝学的解析および
粘膜類天疱瘡患者の抗ラミニン332IgA・IgE 自己抗体同定)

学位論文内容の要旨

研究1. Molecular genetics of plectin-deficient epidermolysis bullosa (プレクチン欠損型表皮水疱症の分子遺伝学的解析)

【背景と目的】プレクチンは、中央の rod domain を N 末端と C 末端の globular domain がそれぞれ挟み込む、独特なダンベル様構造を呈する細胞骨格リンカー蛋白であり、皮膚・筋肉・消化管をはじめとした様々な臓器で発現している。プレクチンには全長の蛋白とともに、rod domain が除かれた rodless プレクチンが選択的スプライシングによって生じることが知られており、ヒトでは表皮細胞と筋細胞での発現が報告されている。この rod domain は、プレクチン遺伝子 (*PLEC1*) のエクソン 31 によってコードされている。*PLEC1* の遺伝子変異は、筋ジストロフィー合併型表皮水疱症 (EBS-MD) と幽門閉鎖合併型表皮水疱症 (EBS-PA) という二つの異なる表皮水疱症を引き起こす。しかしながら、*PLEC1* 変異によって、なぜ二つの病型が生じるか知られていない。本研究の目的は、*PLEC1* 変異によって生じる二つの表皮水疱症の病型について病態を解明することである。

【対象と方法】*PLEC1* 変異が同定されている 6 人の EBS-MD、3 人の EBS-PA 患者皮膚組織を解析した。プレクチンの N 末端領域、rod 領域、C 末端領域のそれぞれに対する抗体を用いて、蛍光抗体法で患者皮膚組織のプレクチンの発現パターンを明らかにした。また、EBS-MD 患者由来培養線維芽細胞と EBS-PA 由来羊水細胞のプレクチン発現パターンについて、それぞれの抽出液を免疫ブロット法で解析するとともに、RT-PCR で mRNA レベルの発現についても検討した。

【結果】解析した 9 症例のうち、EBS-MD の 2 症例は新規の *PLEC1* 変異を有していた。蛍光抗体法の結果、EBS-PA 皮膚組織では、プレクチンのすべての領域について発現が減弱～消失していた。これに対して EBS-MD 皮膚組織では、N 末端と C 末端の発現は減弱しながらも保たれていたが、rod domain の発現はほぼ消失していた。免疫ブロットと RT-PCR の結果、正常ヒト線維芽細胞では、全長のプレクチンと rodless プレクチンが発現していた。これに対して EBS-MD 由来線維芽細胞では全長のプレクチンが消失し、rodless プレクチンのみが発現していた。EBS-PA 由来羊水細胞では、全長、rodless プレクチンともにほぼ消失していた。

【考察】本研究の結果は、ほとんどの EBS-MD の患者で *PLEC1* 変異が rod 領域をコードするエクソン 31 に認められ、逆に EBS-PA ではエクソン 31 以外の部位に変異を持つことが多いという事実と一致する。EBS 患者のプレクチンの発現について検討した過去の報告では、rod domain に対する抗体が主に用いられていたため、全長と rodless プレクチンの存在について判別することができなかった。しかしながら、本研究では N 末端、C 末端を認識する抗体と合わせて使うことで、蛍光抗体法と免疫ブロット法にて全長と rodless プレクチンの発現を解析することができた。なぜ rodless プレクチンのみが発現していると筋ジストロフィーを合併し、全長と rodless プレクチンがともに欠損していると幽門閉鎖症を生じるかといった詳細なメカニズムは解明されておらず、今後の課題となる。

【結論】EBS-MD では、全長のプレクチンは発現していないが、rodless プレクチンの発現が保たれている。これに対して、EBS-PA では全長、rodless プレクチンともに著明に減弱～消失している。

研究 2. Identification of IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid (粘膜類天疱瘡患者の抗ラミニン 332IgA・IgE 自己抗体同定)

【背景と目的】抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡は、慢性に経過する稀な自己免疫性水疱症である。患者血清中のラミニン 332 に対する IgG 抗体について、これまで文献的に記載されているが、ラミニン 332 に対する IgA 抗体や IgE 抗体の存在については知られていない。本研究 2 では、抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡患者血清中にラミニン 332 と結合する IgA または IgE 抗体が存在するかを解明することである。

【対象と方法】下記の 4 つの基準を満たした 4 人の患者血清と皮膚組織を使用した。(1)粘膜を主として表皮下水疱が認められる。(2)患者皮膚組織の表皮基底膜において in vivo で IgG の沈着が証明されている。(3)患者血清中に、1MNaCl 処理正常人皮膚 (split-skin) の真皮側と反応する IgG 抗体が存在する。(4)患者血清中に認められた IgG 自己抗体は、真皮抽出液を用いた免疫ブロットで VII 型コラーゲン(290kDa)やラミニン $\gamma 1$ (200kDa) の蛋白と反応しない。ラミニン 332 に対する IgG/IgA/IgE 血中抗体は免疫ブロットにて解析した。

【結果】4 人の患者血清から、それぞれラミニン 332 の $\gamma 2$ 、 $\alpha 3/\gamma 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 3/\beta 3/\gamma 2$ サブユニットに対する IgG 自己抗体が検出された。4 人の患者のうち 1 名からは、ラミニン 332 の $\alpha 3/\beta 3/\gamma 2$ サブユニットに対する IgA 自己抗体が同定された。また、4 人の患者のうち 1 名からは $\gamma 2$ サブユニットに対する IgE 自己抗体が検出された。

【考察】水疱性類天疱瘡などの他の自己免疫性水疱症では、IgG 自己抗体のほかに患者血清中で皮膚基底膜構成蛋白に反応する IgA 抗体や IgE 抗体が存在することが知られている。本研究によって抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡でも IgG 自己抗体のほかに、IgA 抗体や IgE 抗体が検出されることが証明された。しかしながら、検出される IgA 抗体や IgE 抗体の病的意義は不明である。

【結論】一部の抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡患者では、IgG 自己抗体とともに、ラミニン 332 に対する IgA と IgE 抗体が同定される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	山 本 有 平
副 査	教 授	清 水 宏
副 査	教 授	有 賀 正
副 査	教 授	守 内 哲 也
副 査	教 授	笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

Molecular genetics of plectin-deficient epidermolysis bullosa and identification of IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid

(プレクチン欠損型表皮水疱症の分子遺伝学的解析および
粘膜類天疱瘡患者の抗ラミニン332IgA・IgE 自己抗体同定)

第一章の Molecular genetics of plectin-deficient epidermolysis bullosa (プレクチン欠損型表皮水疱症の分子遺伝学的解析) では、プレクチンの変異によって生じる二つの異なる表皮水疱症、筋ジストロフィー合併型表皮水疱症 (EBS-MD) と幽門閉鎖合併型表皮水疱症 (EBS-PA) の発生機序の解明についての研究内容が発表された。さまざまな遺伝学、分子生物学的な手法を用いた結果、EBS-MD では、全長のプレクチンは発現していないが、rodless プレクチンの発現が保たれていた。これに対して、EBS-PA では全長、rodless プレクチンともに著明に減弱～消失していることが明らかになったという内容であった。

審査では、EBS-MD の症状について変異の位置によって症状の重症度が異なるかと問われた。発表者からは変異の位置によって皮膚症状の程度や筋ジストロフィーの発症時期が異なるという回答が得られた。また、EBS-PA において幽門がなぜ閉鎖するかという点が問われた。これに対しては、プレクチンとインテグリンの結合が幽門の発生に重要であるという説と、幽門が消化管のうちで最も狭いところであり、消化管粘膜の障害から二次的に線維化を起こして幽門が閉鎖するという説の二つが発表者から紹介された。EBS-MD と EBS-PA の臨床的特徴についても質問があった。EBS-MD では中年以降まで生存することが多いが、呼吸筋が侵されることによって呼吸不全に陥って死亡するといったことが説明された。また、EBS-PA では幽門閉鎖に対する外科的治療を施しても、生後 1 年以内に死亡してしまう症例がほとんどであると発表者から回答があった。EBS-PA のうち、解析した 1 症例で認められていたスプライス部位変異について、mRNA を解析したところいくつかの二種類の転写産物が認められたという点について質問があった。発表者からは、当該患者由来の培養細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR して cDNA を作成したのちに変異部位を増幅させたものを TA クローニングで解析した結果であると説明があった。TA クローニン

グで 60 ほどのクローンを採取してシーケンスした結果、二種類の転写産物が得られたと説明された。プレクチンの配列についてデータベース上で異なったものがいくつもみられるという点について質問があった。発表者は、プレクチンの N 末端については様々なスプライスバリエーションがあると報告があり、特にラットなどでは 10 種類近くのもので記載されていることを回答した。

第二章の Identification of IgA and IgE autoantibodies in anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid (粘膜類天疱瘡患者の抗ラミニン 332IgA・IgE 自己抗体同定) では、一部の抗ラミニン 332 型粘膜類天疱瘡患者では、IgG 自己抗体とともに、ラミニン 332 に対する IgA と IgE 抗体が同定されることが証明されたという内容の発表であった。

審査では同定された IgA、IgE 自己抗体の病的意義について問われたが、発表者からは、今回の研究ではいまだ病的意義は明らかとならず、臨床症状との相関についてもはっきりしないという回答であった。どのような方法をとれば病的意義が解明されるかという点も問われた。これに対して発表者は、患者血清から IgA や IgE を抽出して、これをマウスなどの実験動物に投与し、ヒトの疾患の表現型が再現されるかを観察するような実験系が最も適していると回答した。

この論文は、第一章、第二章ともに疾患の病態メカニズムを明らかにする重要な手掛かりを提起したといった点で高く評価され、今後のさらなる病態解明や治療法の開発などにつながる第一歩となることが期待される。

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。