

学 位 論 文 題 名

道化師様魚鱗癬の出生前診断とモデルマウスの 解析による病態解明

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

先天性魚鱗癬のうち最も重篤な症状を呈する道化師様魚鱗癬は、生下時より全身を板状の厚い鱗屑で覆われ、眼瞼外反・口唇の突出開口が特徴的であり、生後早期に死亡する例も多く認める。長い間原因は不明であったが、2005 年、当科の研究グループは ABC トランスポーター A12(ABCA12)が病因遺伝子であることを明らかにした。今回、詳しい病態解明と治療実験を行うために、モデルマウスが必要であると考え ABCA12 ノックアウトマウスを作成した。また、原因遺伝子の解明による臨床現場における応用として、道化師様魚鱗癬に対する遺伝子レベルでの出生前診断を実施した。

【材料と方法：道化師様魚鱗癬モデルマウス】

Abca12 の Exon30 をネオマイシンカセットに置換するベクターを設計し、129Sv/Ev 胎生期幹細胞に、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした。マウス胚幹細胞を、C57BL/6J マウスから得られた胚盤胞にマイクロインジェクトして、キメラ胚を得た。得られたキメラ胚を、C57BL/6J メスマウスに着床して、キメラマウスを発生させた。ヘテロマウスを掛け合わせるにより、*Abca12*^{-/-}マウスを作製した。マウスの Genotyping はマウスの尾を切断し、DNA を抽出して行った。*Abca12*^{-/-}マウスの解析は、RT-PCR 法・ウェスタンブロット法・光学顕微鏡・電子顕微鏡・免疫蛍光抗体法・皮膚透過性試験にて行った。

【対象と方法：出生前診断】

発端者は日本人同士の両親から生まれた第 2 子である。発端者は道化師様魚鱗癬に罹患しており、出生後 3 日目に死亡した。第 1 子は死産であり、道化師様魚鱗癬の皮膚症状を呈していた。発端者および両親の遺伝子変異検査を行ったところ、父親由来のナンセンス変異と母親由来のスプライスサイト変異が認められた。第 3 子の妊娠において、両親は出生前診断を希望された。超音波下に妊娠 16 週の羊水から胎児由来細胞を採取し胎児 DNA を抽出した。その後、遺伝子検索をダイレクトシーケンス法と、Modified PCR・制限酵素処理にて実施した。

【結果：Abca12 ノックアウトマウスの解析】

Abca12 ノックアウトマウスはヒト道化師様魚鱗癬の臨床症状を忠実に再現しており、皮膚の著

明な過角化と亀裂、口唇の突出開口を認めた。HE 染色を行うと、ABCA12 ノックアウトマウスでは角層構造が失われ、角層間脂質が正常に形成されていなかった。電顕および免疫染色にて、層板顆粒の異常と角層セラミドの分布障害が見られた。これらの新生児肉眼所見・病理所見・角層でのセラミド分布はヒト道化師様魚鱗癬患者皮膚と同様であり、このマウスは道化師様魚鱗癬モデルマウスと考えられた。

このモデルマウスの胎児期の皮膚を詳細に検討したところ、胎生 18.5 日目では顆粒層・角層の形成異常、角質細胞内の多数の脂肪滴を認めた。この形態学的な異常を、皮膚バリア機能を指標として解析したところ、トルイジンブルーを用いた皮膚透過性試験、および経表皮水分喪失量測定にて、本来であれば皮膚バリア機能の完成している胎生 18.5 日目でも重篤な皮膚バリア障害を認めた。以上の結果から、道化師様魚鱗癬モデルマウスの胎児期の顆粒層～角層形成障害およびバリア機能形成障害が明らかになった。さらに、興味深いことに *Abca12*^{-/-}マウスの肺では、2 型肺胞上皮細胞の層板体の異常と肺胞拡張障害を認め、肺組織抽出物を用いたウェスタンブロット法ではサーファクタント蛋白の減少を認めた。

【結果：出生前診断】

ダイレクトシーケンス法および Modified PCR・制限酵素処理の結果、胎児は父親由来の遺伝子変異を受け継いでいたが、母親由来の遺伝子変異を持っていなかった。この胎児は罹患していないと診断し、母親の妊娠は継続され、出生前診断から 5 カ月後に全く皮膚に異常所見を認めない新生児を出産した。

【考察】

今回報告した *Abca12*^{-/-}マウスは初めての道化師様魚鱗癬モデルマウスであった。道化師様魚鱗癬患者の解析により ABCA12 の変異が明らかにされ、*Abca12* ノックアウトマウスによってヒト道化師様魚鱗癬の症状が再現されたことから、この最重症の魚鱗癬である道化師様魚鱗癬の原因が ABCA12 であることが示された。これまでの研究から ABCA12 が角化過程においてきわめて重要な役割を果たしているのは明らかである。しかしながら、皮膚の脂質輸送機構および最終分化の過程（＝角化）では非常に多くの分子が厳密に制御されながら機能している。今後、ABCA12 を中心として、この複雑な角化過程が解明され、それに基づく新しい治療法の開発が期待される。さらに、このモデルマウスを用いた治療実験は、今回の実験では成功しなかったが、今後さまざまな治療実験の可能性があり、新規治療法の開発が期待される。

また、今回実際の臨床現場に直結した研究として、出生前診断を報告した。道化師様魚鱗癬は、予後不良の重篤な遺伝性皮膚疾患であり、出生前診断が適応となることが多い。2005 年の原因遺伝子の解明まで、胎児皮膚生検という方法で行われてきたが、施行には多くの問題点抱えていた。原因遺伝子の解明により遺伝子レベルでの出生前診断が可能となり、実際の臨床応用に至った。調べ得た限り、この報告が道化師様魚鱗癬に対する世界初の遺伝子レベルでの出生前除外診断である。

【結論】

世界で初めての *Abca12*^{-/-}マウスを報告し、ヒト道化師様魚鱗癬皮膚の特徴を示す道化師様魚鱗

癬モデルマウスであることを示した。この道化師様魚鱗癬モデルマウスは ABCA12 が肺サーファクタント蛋白の分泌と皮膚脂質バリアの形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、このモデルを用いた新規治療法の開発が期待される。また、現時点ですぐに応用できた例として、出生前診断を報告した。今後、遺伝子レベルでの出生前診断は道化師様魚鱗癬を出生する可能性のある両親にとって非常に有効な検査になると考えられる。

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 守 内 哲 也

副 査 教 授 寺 沢 浩 一

副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

道化師様魚鱗癬の出生前診断とモデルマウスの 解析による病態解明

審査会では、申請者より 1) 道化師様魚鱗癬モデルマウスの解析による病態解明、2) 道化師様魚鱗癬の出生前診断の 2 つについての研究内容が発表された。1) では、分子生物学的手法、病理組織学的解析、生理学的手法により ABCA12 ノックアウトマウスを解析し、このノックアウトマウスがヒト道化師様魚鱗癬を忠実に再現する道化師様魚鱗癬モデルマウスであるということを示した。2) では、日本人家系における世界初の DNA レベルでの出生前除外診断について報告し、出生前診断の有用性を示した。

審査では、守内教授より ABCA12 ノックアウトマウスについて、ヘテロマウスでの変化について問われた。申請者からは、野生型マウスと比較しヘテロマウスは皮膚症状・生存期間に明らかな差が認められなかったという回答が得られた。また守内教授よりエトレチネートでの奇形発生について問われた。申請者からは、エトレチネートでの奇形は妊娠初期から内服させた時のみ認められたとの回答が得られた。笠原教授より、ABCA3 と ABCA12 で互いに補う性質がないかどうかについて問われた。申請者からは、現時点では明らかになっておらず、ABCA3 と ABCA12 の脂質輸送の差も明らかでないとの回答が得られた。また笠原教授より、ABCA12 の発現している他臓器についての変化について問われた。申請者からは現時点では胎盤・神経などの変化は確認できていないとの回答が得られた。山本教授より、モデルマウスの皮膚症状はヒト道化師様魚鱗癬に比べて軽症ではないかという点について問われた。申請者からはモデルマウスで皮膚の亀裂まで生じているのは数例であり亀裂を生じないことが多く、その点では皮膚症状は軽症であると解釈可能であるという回答を得た。また山本教授よりモデルマウスでは四肢の短縮があるが、ヒト道化師様魚鱗癬ではあまり目立たない点について問われた。申請者からは、ヒトにおいても皮膚が硬く柔軟性を欠くために正常の四肢の発達が認められないという回答を得た。清水教授からは、この論文が世界初の道化師様魚鱗癬モデルマウスの報告であり、また日本皮膚科学会にて高く評価され 2008 年の日本皮膚科学会賞受賞論文であることについてコメントを頂いた。

出生前診断については、守内教授より全長すべてのエクソンについては変異がないこと

を確認しなくてよいのかについて問われた。申請者からは、今回の出生前診断については発端者で認められた変異部位のみの変異検索を行ったこと、およびこの方法（＝他の部位の変異検索をしていないこと）は世界的に認められている点について回答を得た。寺沢教授より、発端者の死因について問われた。申請者からは、剖検では肺水腫と皮膚の変化以外認められなかったという回答を得た。また寺沢教授より、皮膚の裂けたところはどうなっているのかについて問われた。申請者からは角層・表皮だけでなく皮膚全層におよぶ亀裂であるという回答を得た。さらに、出生前診断にて罹患していることが判明した場合にはどうするのかについて問われた。申請者からは、最終的には依頼者（依頼した夫婦）が決定するが、妊娠を中断することが多いとの回答を得た。清水教授から、道化師様魚鱗癬の出生前診断について、①原因遺伝子解明前の電子顕微鏡を用いた胎児皮膚生検による出生前診断、②羊水・絨毛からの胎児由来 DNA を用いた遺伝子レベルでの出生前診断、さらに③着床前診断の可能性についてコメントを頂いた。

以上のように、この学位論文は道化師様魚鱗癬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点、また出生前診断による臨床現場への応用という点で高く評価され、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。