

学位論文題名

DNA-based prenatal diagnosis of plectin-deficient epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia

(幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型表皮水疱症の
DNAレベルでの出生前診断)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

表皮水疱症 (Epidermolysis Bullosa: EB) は水疱を形成する部位により単純型、接合部型、栄養障害型、キンドラー症候群型の4つに分類され、さらに予後不良なものや出産後早期に死亡するものなどに細分類される。致死性など重症型のEBに対する出生前診断は20年前から施行されてきた。しかし、電子顕微鏡を用いた超微細構造の解析や免疫蛍光抗体間接法を用いたタンパク発現の解析による出生前診断は、胎児皮膚生検が必要なため技術的に難しく、流産の危険性の高いものであった。近年、EBの責任遺伝子が次々と明らかになり、遺伝子変異検索による重症型EBに対する出生前診断が可能となってきた。幽門閉鎖症 (pyloric atresia: PA) を合併するEB (PA-EB) は基底膜透明層に水疱を形成するが、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン遺伝子変異によるものとされてきた。しかし、我々は最近このPA-EBに表皮基底細胞内で水疱を形成するものがあり、これがプレクチン遺伝子変異によるものと報告した。今回、この致死性のPA-EB家系に対して、プレクチン遺伝子変異検索による出生前診断を世界に先駆けて施行した。

【対象と方法】

症例は第1子、第2子とも出生時に水疱を形成し、幽門閉鎖症を合併して出生後まもなく死亡した。第2子出生時、父、母、第2子について遺伝子変異検索を行ったが、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン遺伝子変異を認めず、母はp.Q305X父はc.1350G>A(スプライスサイト変異)のプレクチン遺伝子heterozygous carriers、第2子はcompound heterozygoteでありプレクチン遺伝子変異による致死性のPA-EBと診断した。この家系において、両親の強い希望により第3子妊娠時にPA-EBに対するDNAレベルの出生前診断を実施した。さらにこの胎児皮膚に対して詳細な検証を行った。

出生前診断：妊娠16週時に羊水穿刺により羊水細胞を採取し、AmnioMAX培地にて1週間の培養後、胎児DNAを採取した。PCR法によりExon9 (p.Q305X) とExon12 (c.1350G>A) 部位を増幅後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、制限酵素 (*Hph I*, *Pst I*) にて確認した。同様に培養羊水細胞よりtotal RNAを採取し、RT-PCR法によりExon11からExon13 (Exon12のc.1350G>Aを含む部位) のcDNAを作成し、ダイレクトシーケンス法にてmRNAの塩基配列を決定した。

免疫蛍光抗体間接法：胎児皮膚よりクリオスタットを用いて5 μ m凍結切片を作成し、基底膜構成蛋白 (Plectin, $\alpha 6$ integrin, $\beta 4$ integrin, BP230, Type XVII collagen, uncein, Type IV collagen, Type VII collagen) の発現を共晶点レーザー走査型顕微鏡にて解析した。

【結果】

羊水細胞より採取した胎児DNAより、ダイレクトシーケンス法によりp.Q305Xとc.1350G>Aの存在を確認した。この変異は制限酵素*Hph I*および*Pst I*にても確認された。胎児はp.Q305Xおよびc.1350G>Aのcompound heterozygoteであった。同様に培養羊水細胞よりtotal RNAを採取し、cDNAの解析によりc.1347-1350に4塩基の欠損を確認した。したがって胎児は致死性のPA-EBを罹患していると診断され、両親は堕胎を選択した。両親の強い希望により堕胎児の詳細な検討を試行した。堕胎児皮膚(胎齢20週)から羊水細

胞と同様に、DNA および total RNA を採取し、DNA の解析により、p.Q305X と c.1350G>A の compound heterozygote を、cDNA の解析により c.1347-1350 に 4 塩基の欠損を確認した。墮胎児皮膚を用いた基底膜構成蛋白に対する免疫蛍光抗体間接法によりプレクチン蛋白のみに著しい発現の減弱を認めた。他の基底膜構成蛋白に減少・欠損は見られなかった。

【考察】

本家系の c.1350G>A 変異はアミノ酸置換を伴わない変異であるが、皮膚にはプレクチン蛋白の著しい減弱がみられ PA-EB の発症につながった。今回の研究でこの変異はスプライスドナーサイトに CAGTCA-GTGA という CAGT のリピートが形成され、正常なスプライスを阻害する変異であることが明らかとなった。その結果、mRNA において 4 塩基欠損を引き起こし、フレームシフトにより下流に PTC (premature termination codon) 変異を生じたと考えられた。

プレクチンは表皮基底細胞のヘミデスモソームに存在して、細胞骨格蛋白や中間径線維と結合して複雑な接着構造を形成していると考えられている。プレクチンの遺伝子変異は筋ジストロフィー合併単純型 EB、幽門閉鎖症合併接合部型 EB の両者を引き起こす。我々はプレクチン遺伝子のロッドドメインが残存する変異は筋ジストロフィー合併単純型 EB となり、ロッドドメインを欠損する変異は幽門閉鎖症合併単純型 EB となることを報告したが、今回の症例もロッドドメインを欠損する変異であり、この報告を支持する結果となった。

【結論】

今回、世界に先駆けて幽門閉鎖症を合併する致死性プレクチン欠損単純型 EB の DNA レベルでの出生前診断に成功した。幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型 EB は極めて予後不良で、生後 1 年以内に殆どが死亡する。このような家系では、再妊娠時に両親の辛い選択の末、墮胎が施行されることが多かった。DNA レベルによる出生前診断は、正常児を不必要な墮胎から救うことができる。また、柔毛膜や羊水から採取した胎児 DNA を用いることにより妊娠早期に実施可能であり、胎児および母親への負担を軽減させられるという、臨床的な利点につながることが期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	有 賀	正
副 査	教 授	三 輪	聡 一
副 査	教 授	清 水	宏

学 位 論 文 題 名

DNA-based prenatal diagnosis of plectin-deficient epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia

(幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型表皮水疱症の
DNAレベルでの出生前診断)

発表者は、表皮水疱症(EB)の新しいサブタイプである、幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型表皮水疱症(EBS-PA)の DNA レベルでの出生前診断についての研究内容を発表した。まず、発表者らが提唱した EB の新しいサブタイプについて、従来のインテグリン遺伝子変異で発症する接合部型 EB に属するものとは異なり、免疫学組織学的にプレクチンタンパクを欠損し、超微細構造学的に表皮基底細胞内で水疱を形成する単純型 EB であること、分子生物学的にプレクチン遺伝子変異によって発症する EBS-PA であることを説明した。また、出生前診断を行った家系について、母の p.G305X はナンセンス変異であったが、父の c.1350G>A については、120 のコントロールアレルを検索して polymorphism を否定し、Exon trapping system を用いてスプライス異常を引き起こす可能性が高いことを示した。発表者は、これらの十分な事前解析を経て出生前診断を行ったことを示した。今回の出生前診断は羊水細胞を用いて行われたが、この際、出生前診断についての種類や実施条件についても言及し、さらに北大皮膚科で行われる出生前診断の実施体制を示した。続いて施行した出生前診断の過程を説明した。結果、胎児が母由来の変異と父由来の変異を持つ compound heterozygote であることをダイレクトシーケンス法で明らかにし、制限酵素によるカッティングサイトの存在でも検証した。さらに父由来 c.1350G>A を、羊水細胞の mRNA 解析によって明らかにした。この変異はスプライス異常により 4 塩基を欠損してフレームシフトを起こし、下流に中途終始コドンを発現させたことを示した。以上の出生前診断の結果から、胎児が致死性 EBS-PA の罹患児であることが示された。発表者は罹患児の両親が堕胎の選択をし、堕胎児に対する精査を希望したことを述べて結果を示した。堕胎児皮膚も羊水細胞と同様の結果であった。発表者は世界で初めて幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型表皮水疱症の DNA レベルでの出生前診断を成功したことを示し、DNA レベルでの出生前診断の有効性についても言及した。

審査では、用いた羊水細胞への母由来細胞混入の可能性について問われた。発表者からは母親由来細胞の混入の可能性は低い、混入する可能性のあるマクロファージ系の細胞は1週間の培養によって排除されると回答した。続いて、本症の死因と治療の可能性について問われた。発表者は、多くは急性呼吸窮迫症候群で死亡するが、この原因は全身性の水疱、糜爛に基づく敗血症が考えられるが、気道や肺にもプレクチンは存在するためプレクチンタンパク異常による可能性も否定できないとした。治療については、プレクチンが全身に広く存在する構造タンパクであるためタンパク補充療法は難しく、遺伝子治療としては、EBS-PAの殆どがナンセンス変異であるためリードスルー療法が、プレクチンはスプライスバリエントが多く存在するので Exon skipping 療法が候補だが、出生後まもなく死亡するため、胎児への遺伝子治療は極めて難しいと回答した。続いて、Exon trapping system で予想された結果と、羊水細胞からの mRNA 解析との乖離について問われた。発表者は、スプライス異常を予測するプログラムでも Exon trapping system と同様の結果がでており、実験系に誤りは無かったと考える。しかし、この乖離の原因は不明であるとした。続いて、胎児のプレクチン欠損のコントロールに成人皮膚を用いたことについて問われた。発表者は正常胎児皮膚の入手は困難であり、文献的には胎生10週にてプレクチンの発現が確認されていると回答した。次に出生前診断を他施設から依頼された場合の体制と日本での着床前診断の扱いについて問われた。発表者は、原則として北大病院皮膚科の遺伝相談外来への受診をお願いしているが、対象が妊婦であるため必ずしも受診することはできない。この場合、担当医が十分な遺伝カウンセリングを行えるようあらゆる情報を提供し、コミュニケーションをとっていると回答した。さらに日本では出生前診断に関する法律は存在しないが、着床前診断については明確に規定されていると回答した。最後に今後の展望について問われた。発表者は、さらに妊婦への負担の少ない母体血中胎児細胞を用いた出生前診断を検討したいと回答した。

この論文は幽門閉鎖症を合併するプレクチン欠損単純型表皮水疱症に対する DNA レベルでの出生前診断を世界に先駆けて成功したことにより国際的に高い評価を受けている。審査員一同はこの結果が極めて高い臨床貢献を果たすものと期待されるとして、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。