

## 学位論文題名

日本人慢性膿皮症患者における $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異

## 学位論文内容の要旨

## 【背景と目的】

慢性膿皮症は毛包を中心とする皮膚付属器から発症する遷延性の化膿性炎症であり、毛包脂腺系において角栓形成による毛包閉塞が生じた結果、毛包・脂腺・アポクリン腺の分泌・代謝物が貯留し、これに二次的な細菌感染や異物反応が加わって難治性の瘻孔が形成される。一般的には再燃を繰り返すうちに難治性となり、患部に瘢痕と瘻孔の形成を繰り返すため、患者に整容面での多大な苦痛を与えるだけでなく、慢性膿皮症を発症母地として皮膚有棘細胞癌が発症することがある。本症の病因は長らく不明であったが、その発症には宿主側の要因が深く関係しており、約30%の症例で、常染色体優性遺伝の症例が報告されていた（家族性慢性膿皮症）。2010年、家族性慢性膿皮症の原因遺伝子が膜貫通タンパクの一種である $\gamma$ -セクレターゼをコードする遺伝子であることが明らかになり、その後、中国やイギリスから相次いで家族性慢性膿皮症における $\gamma$ -セクレターゼの遺伝子変異が報告された。 $\gamma$ -セクレターゼは presenilin、nicastrin、presenilin enhancer-2、anterior pharynx defective 1 の4つのサブユニットで構成されており、それらはそれぞれ *PSEN1*、*PSEN2*、*NCSTN*、*PSENEN*、*APH1A*、*APH1B* という6つの遺伝子でコードされている。本研究の目的は、家族性及び孤発性慢性膿皮症の日本人患者における $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異の有無を同定することである。

## 【材料と方法】

材料：日本人家族性慢性膿皮症患者 11 家系、孤発性慢性膿皮症患者 21 人、一般コントロール 50 人。

方法：①患者、及びその家族の末梢血または唾液から DNA を抽出し、 $\gamma$ -セクレターゼを構成する6つの遺伝子：*PSEN1*、*PSEN2*、*NCSTN*、*PSENEN*、*APH1A*、*APH1B* のエクソン及びエクソン-イントロン境界部のシーケンスを行った。

②*NCSTN*の変異を認めた1家系目の家族性慢性膿皮症患者の末梢血から mRNA を抽出し、real time RT-PCR を行い、その発現量を正常コントロールと比較した。

③抽出した mRNA を cDNA へと変換し、TA クローニングを行い、どのようなスプライシングが起きているかをシーケンスで確認した。

## 【結果】

①  $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異検索

家族性慢性膿皮症家系：日本人家族性慢性膿皮症 11 家系において、2 家系で $\gamma$ -セクレターゼを構成する遺伝子の一つである *NCSTN* にそれぞれ c. 582+1delG のスプライシング変異及び

p. Gln568Term のナンセンス変異をヘテロ接合性に認めた。

孤発性慢性膿皮症：孤発性慢性膿皮症患者では1名で *PSEN2* のエクソン13に p. Thr421Met のミスセンス変異をヘテロ接合性に認めた。その他の患者では6つの遺伝子に変異を認めなかった。

- ② *NCSTN* mRNA 発現量の比較：リアルタイム RT-PCR にて *NCSTN* mRNA 発現量の比較を行ったところ、*NCSTN* に c. 582+1delG の遺伝子変異を持つ発端者では、正常コントロールと比較してその発現量が有意に低下していた。
- ③ スプライシングの検討：正常コントロールでは *NCSTN* のエクソン5からエクソン6へのスプライシングのみを認めた。一方、*NCSTN* に c. 582+1delG の遺伝子変異を持つ発端者ではエクソン5からエクソン6への正常なスプライシングがある一方で、エクソン5からエクソン7、エクソン5からエクソン9への異常なスプライシング産物を認めた。

#### 【考察】

$\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異検索：今回、日本人家族性慢性膿皮症2家系で $\gamma$ -セクレターゼを構成する遺伝子の一つである *NCSTN* に新規変異、c. 582+1delG 及び p. Gln568Term を同定した。

c. 582+1delG を持つ1家系目ではこれまでの報告と同様、同じ変異を持っていても臨床症状の重症度は異なっていた。さらに p. Gln568Term の変異を認めた2家系目では、同じ *NCSTN* のナンセンス変異を持ちながらも、同一家系内に慢性膿皮症の症状を持つ個体と全く慢性膿皮症の症状を持たない個体がいることが判明した。肥満、喫煙などの $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異以外の要因がその重症度に大きく関わっていると考えられた。孤発性慢性膿皮症患者では、 $\gamma$ -セクレターゼを構成する6つの遺伝子には、明らかな機能喪失変異を認めなかった。1名で *PSEN2* のエクソン13に p. Thr421Met のミスセンス変異をヘテロ接合性に認めたが、慢性膿皮症発症との関連は不明であった。

*NCSTN* mRNA 発現量の比較：*NCSTN* に c. 582+1delG のスプライシング変異をヘテロ接合性に持った発端者では、正常コントロールと比較してその mRNA 発現量が約30%程度まで低下していた。これは、変異をもった mRNA がナンセンス変異依存 mRNA 分解機構によって細胞内で分解された結果であると考えた。

スプライシングの検討：*NCSTN* エクソン5からエクソン7のスプライシング産物に関しては早期終止コドンが生じていたことから、生体内では変異をもった mRNA がナンセンス変異依存 mRNA 分解機構によって細胞内で分解されると考えられた。エクソン5からエクソン9へのスプライシングに関してはインフレームの変異であり、明らかな早期終止コドンを確認することができなかった。しかし、*NCSTN* のミスセンス変異が機能喪失変異であると推測されていることを照らし合わせると、この異常なスプライシング産物もエクソン6から8がコードするアミノ酸の欠失により $\gamma$ -セクレターゼ活性が低下している可能性が高いと推測した。

#### 【結論】

日本人家族性慢性膿皮症家系において、 $\gamma$ -セクレターゼを構成する遺伝子の一つである *NCSTN* に新規のスプライシング変異及びナンセンス変異を同定した。本研究により、日本人でも $\gamma$ -セクレターゼの遺伝子変異は慢性膿皮症発症に深くかかわっていることが明らかになった。一方、孤発性慢性膿皮症患者では、明らかな機能喪失遺伝子変異は認められなかった。 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異以外にも喫煙、肥満などの外的要因が慢性膿皮症の発症と重症度に大きく関係している可能性が明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	野口昌幸
副査	教授	畠山鎮次
副査	教授	清水宏
副査	教授	佐邊壽孝

## 学位論文題名

### 日本人慢性膿皮症患者における $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異

審査会では、申請者より「日本人慢性膿皮症患者における $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異に関する研究」について発表された。近年、家族性慢性膿皮症の原因遺伝子が $\gamma$ -セクレターゼを構成する遺伝子であることが国外から報告されたが、今回申請者は、日本人家族性慢性膿皮症11家系中2家系で $\gamma$ -セクレターゼを構成する遺伝子である *NCSTN* に新規のスプライシング変異及びナンセンス変異を同定し、日本人においても同遺伝子が本症の病因の一つであることを示した。スプライシング変異を持つ1家系目においては、その変異を持つ患者で *NCSTN* の mRNA が低下しており、cDNA からのスプライシングの検討により、異常スプライシング産物があることが示された。2家系目においては、ナンセンス変異が慢性膿皮症の症状を持つ発端者、その兄、そして慢性膿皮症の症状を持たないその姉に認められた。日本人孤発性慢性膿皮症患者21例では、 $\gamma$ -セクレターゼのフレームシフト変異、スプライシング変異およびナンセンス変異はいずれも認められなかった。1例のみ、*PSEN2* にミスセンス変異を認めたが、その変異がその患者の慢性膿皮症の原因である可能性は低いと結論づけられた。これらの結果から、日本人家族性慢性膿皮症の発症にも $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異が関与していることが示されたが、その一方で、 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異を認めない症例も多く、それ以外の遺伝子変異が関与している可能性も示唆された。また、慢性膿皮症の孤発例の発症には $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異が関与していないことが初めて示された。変異を持つ家系の解析結果からは、慢性膿皮症の発症及び重症度には、 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異以外の要因も重要であることが示された。

審査では、日本と海外での発症率に関する差について質問があり、申請者からは、ヨーロッパでは人口の1%程度発症すると報告があり、人種間での明らかな差は報告されていないとの回答が得られた。 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異がある患者での血管形成異常などの皮膚以外の症状について質問があり、申請者からは、家族性慢性膿皮症1家系目の発端者は30代で大腸がんを発症して

いるものの、それ以外に明らかな異常はないとの回答が得られた。1 家系目では *NCSTN* の遺伝子変異によって、フレームシフトが起こるのかとの質問があり、申請者からは cDNA を調べたところ、スプライシングは複数あるが、少なくとも 1 つのスプライシングではフレームシフトが起こり、早期終止コドンが出現することを確認しているとの回答が得られた。 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子の浸透率、保因者に関する質問があり、申請者からはこれまでの報告では 20 家系以上で 100% の浸透率であり、保因者はいないと考えられていたが、今回発表した 2 家系目では変異をもちながらも発症していない症例が存在したとの回答があった。慢性膿皮症と皮膚有棘細胞癌発症に関して、 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異があることで Notch のシグナルが落ちている証拠があるのかとの指摘に、申請者からはそういった報告はなく、推測の域を出ないが、ヒトの皮膚有棘細胞癌では 70% 以上で Notch の遺伝子変異を認めるとの報告があるとの回答が得られた。1 家系目に関して、末梢血から mRNA を取り出しているが、慢性炎症の影響はないのかとの指摘に、申請者は、末梢血を採取した患者はすでに植皮術後であり、現在症状が落ち着いているため、その影響は少ないと考えられると回答した。また、 $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異がある患者ではリンパ球の異常やサブセットの違いがあるのかとの質問に、申請者からはサブセットに関して今回は検討していないが、白血球の明らかな異常はないとの回答が得られた。今回の遺伝子変異があることにより、 $\gamma$ -セクレターゼの安定性などが失われると思うが、転写に関しては考えなくてよいのかとの指摘があり、申請者からは、これまでの報告で行われていると同様の方法で mRNA の低下を検討したことが報告された。2 家系目では同じ変異を持っていても発症していない家族もいたが、それをどのように今後証明するのかとの質問に対して、申請者からは、おそらく 50% 程度の  $\gamma$ -セクレターゼ発現低下が、発症するかどうかの分岐点であり、それに肥満や喫煙などの要素が加わることで発症するのではないか、そうであれば患者が喫煙などをしなければ発症しない、もしくは重症にならない可能性があると考えているとの回答が得られた。

この論文は、日本人家族性慢性膿皮症患者でも  $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子変異が関わっていること、またそれ以外の要因が慢性膿皮症の発症及び重症度の決定に関与することを明らかにした点で高く評価され、今後の慢性膿皮症予防ならびに治療への応用、開発が期待される。

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。