

野村昌代 論文内容の要旨

主 論 文

Eosinophil infiltration in three patients with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa from a Japanese family:
molecular genetic and immunohistochemical studies
日本人家族3症例の良性汎発性萎縮型表皮水疱症における好酸球浸潤：
分子遺伝学的・免疫組織化学的研究

野村昌代、濱崎洋一郎、片山一朗、安倍邦子、新川詔夫、吉浦孝一郎

Journal of Human Genetics 50 巻 Number 9 483-489 2005 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：新川詔夫教授)

緒 言

先天性表皮水疱症は、日常の僅かな外力にて皮膚，粘膜に容易に水疱や糜爛を形成する遺伝性疾患群である。本症は、遺伝形式、電顕下の水疱形成部位、皮膚の臨床症状により4病型に大別され、さらに全身合併症及び予後により細分化され現在までに34種の亜型が報告されている。良性汎発性萎縮型表皮水疱症 (GABEB) は、常染色体劣性遺伝形式をとり、電顕下で表皮・真皮接合部に水疱を形成し、毛髪、歯牙、爪の形成異常を伴うが比較的予後良好な先天性表皮水疱症の1亜型である。従来、水疱周囲に好酸球浸潤を認めた GABEB は3例の白人小児患者において知られているが、成人例および全身性アミロイドーシス合併例の報告はない。

本研究は、GABEB を疑われるが、GABEB には通常見られない水疱周囲の好酸球浸潤と全身性アミロイドーシスを合併した日本人1家族における3症例において、新しい亜型である可能性を分子遺伝学、免疫組織学の手法を用いて検討したものである。

対象と方法

(1) 分子遺伝学的解析：3症例の臨床診断は、家系図、皮膚病理検査、皮膚電顕所見及び皮膚視診により行った。1家系13名(うち患者3名)の血液リンパ球よりDNAを抽出した。GABEBの原因遺伝子(局在)であるCOL17A1(10q24.3)、LAMA3(18q11.2)、LAMB3(1q32)、LAMC2(1q25-q31)およびITGB4(17q11-qter)の領域に関する連鎖解析と遺伝子型・ハイプロタイプ解析 Genotyper を用いて行い、GenehunterによりLOD得点を算出し、候補領域を確定した。候補領域内のCOL17A1エクソンをPCRにて増幅し、変異解析を行った。次いで、患者表皮を用いて、変異COL17A1 mRNA発現をRT-PCR法にて、蛋白(BP180)の発現は免疫組織学的方法で検討した。水疱周囲における好酸球浸潤が遺伝的素因に起因しているか否かを、14の好酸球発現関連遺伝子に関して、非罹

患者と患者の水疱形成部位の皮膚抽出 RNA を用いた RT-PCR 法にて比較検討した。

(2) 免疫組織化学的解析：水疱周囲の好酸球浸潤を中心とした炎症反応が、変異遺伝子産物に対する免疫応答の結果である可能性を考え、患者血清中の変異蛋白に対する抗体の存在を以下の方法で検討した。Hemagglutinin と変異 *COL17A1* (209-210ins CA) の cDNA 配列を PCR にて構築し、プラスミドベクターに挿入し、HEK293 細胞に導入することで変異遺伝子産物を作製した。この変異蛋白を膜に固定し、患者血清を反応させた後、二次抗体としてヒト型ポリクローナル抗体、三次抗体に HRP 結合抗ヒト抗体を使用し、患者血清中の変異蛋白質に対する抗体の有無をみた。

結 果

(1) 分子遺伝学的解析：本家系の連鎖解析において、*COL17A1* を含む 10q24.3 領域で、最大の LOD 得点が 3.08 (常染色体劣性遺伝の仮定で、組み換え率=0) を示した。患者 3 名は、*COL17A1* エクソン 5 への 2 塩基挿入がホモ接合として認められ、蛋白質切断型変異をもつことが確認された。患者皮膚 RNA を用いた RT-PCR 法で、変異 *COL17A1* mRNA の発現が確認された。*GAPDH* の発現量とのゲル電気泳動写真上の半定量的比較では、変異型 mRNA 発現量は、正常 *COL17A1* mRNA と同等であり、十分発現されているものと思われた。

(2) 免疫組織化学的解析：機能的に重要である BP180 の細胞内ドメイン (1A8c) と細胞外ドメイン (Nc16A) に対する抗体を用いた患者皮膚免疫染色では、BP180 は染色されなかった。好酸球の化学遊走に関与する 14 の遺伝子の RT-PCR では、患者皮膚と非罹患者皮膚で発現量の差異を認めなかった。HEK293 細胞にて作製した切断型 BP180 に対する患者血清中の抗体は、ウェスタンブロット法にては検出されなかった。

考 察

本家系の患者は、発症の時期・経過、皮膚所見、および電顕所見より、GABEB に分類された。原因遺伝子検索で、*COL17A1* 内の 2 塩基挿入のフレームシフト変異を同定した。*COL17A1* の変異は GABEB において多数報告されている。本家系の変異部位は最も 5'側に位置し、Bp180 蛋白の細胞内ドメインを僅かに形成するのみであり、本来の機能は消失しているために GABEB の皮膚症状が出現したと考えられる。免疫組織化学的解析で用いた 2 種の抗体 1A8c と Nc16A は、抗原認識部位が、変異部位よりも C 末端側であるため患者皮膚組織では染色できなかつたと推測された。一般に、最終エクソンより前のエクソンに生じたナンセンス変異の mRNA は、mRNA decay 機構により速やかに分解されることが多い。しかし患者皮膚の RNA を用いた半定量 RT-PCR の結果は、変異型 mRNA は相当量発現されていることが確認された。本研究では、同フレームシフト変異 BP180 に対して抗原抗体反応が生じ、好酸球浸潤と長年にわたる慢性持続性炎症反応の結果としてアミロイドーシスを生じたとの事前仮説をたてたが、そのような抗体の存在は証明できなかった。本患者において、ある種の免疫反応が皮膚を中心に生じていることは確かである。通常、GABEB 患者には好酸球浸潤・アミロイドーシスは認められない。上記症状が本家系の患者のみに固有な症状であり、二次的に水疱直下に好酸球が浸潤したとの説明は合理的でなく、好酸球浸潤誘因の探求が今後の課題である。