

| | |
|----------|---|
| 氏名 | 古林 撰 |
| 学位(専攻分野) | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 医博第2059号 |
| 学位授与の日付 | 平成10年11月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学研究科内科系専攻 |
| 学位論文題目 | Keratin9 point mutation in the pedigree of epidermolytic hereditary palmoplantar keratoderma perturbs keratin intermediate filament network formation (掌蹠角化症の家系にみられたケラチン9の点突然変異がケラチン中間系線維の構築に影響を与える) |
| | (主査) |
| 論文調査委員 | 教授 月田承一郎 教授 塩田浩平 教授 宮地良樹 |

論文内容の要旨

単純型先天性表皮水疱症, 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症, 掌蹠角化症などのケラチン分子病と総称される遺伝性皮膚疾患に共通する発症病理は, ケラチン遺伝子の点変異である。この遺伝子変異が細胞骨格であるケラチン中間系線維に及ぼす影響の解明は, これらの遺伝性皮膚疾患の原因解明, さらには治療を考える上にも大きな意味を持つ。これまで, ケラチン14遺伝子の異常が細胞骨格に影響を及ぼす実験結果は報告されているが, ケラチン9遺伝子については, 掌蹠角化症の家系で点突然変異は報告されているものの, 実際に細胞骨格に影響を与える証明はなされていなかった。そこで, 臨床症状が掌蹠に限局することから, ケラチン9遺伝子が原因遺伝子であることが強く示唆される遺伝性皮膚疾患の掌蹠角化症Voerner型の家系に着目し, ケラチン9遺伝子変異を患者末梢血液より抽出したDNAを用いて解析し, さらにこの変異が実際に細胞骨格に影響を及ぼすか否かを解明した。

遺伝性掌蹠角化症患者血液より抽出したDNAを鋳型とし, PCR法を用いてケラチン9遺伝子のエクソン1の領域を増幅した。塩基配列の決定により, 本疾患ではケラチン9遺伝子の551番目の塩基がGからAに変異していることを見出した。この変異は, 162番目のアミノ酸であるアルギニンをグルタミンに置換する。このGからAへの変異によって新たな制限酵素認識部位Pvu IIができるため, この酵素を用いて, 遺伝性掌蹠角化症の家系の成員より抽出したDNAを解析したところ, この点突然変異が家族内の発病者にのみみられることから本点突然変異を原因因子と考えた。

次に, このケラチン9遺伝子異常が, ケラチンのネットワーク形成の異常に関与しているかどうかを検討した。野生型ケラチン9 cDNAと変異型ケラチン9 cDNAにHAをコードする標識をつけてプラスミドに組み込み, それぞれ, MDCK細胞, DJM-1細胞の2種類の培養細胞に導入した。蛍光抗体法にてHAを検出し, confocal顕微鏡を用いて細胞骨格の変化を観察したところ, 変異型ケラチン9 cDNAを導入した細胞では, ケラチンのネットワーク形成に異常を生じ, ケラチン線維が滴状に変化している様子が観察された。この結果はこの遺伝子異常が, ケラチン中間系線維のネットワーク形成の構築に影響を及ぼし, 細胞骨格形成に異常をきたすことを示す。同時に内因性のケラチンを染色して観察した結果, 野生型ケラチン9 cDNAを導入した細胞ではケラチン線維の滴状化は認められないが, 変異型を導入した細胞では, 滴状化が観察された。さらに2重染色を行うことにより, 滴状変化はケラチン9と内因性ケラチンの両者から構築されていることが明らかとなり, この点突然変異が細胞におけるケラチン中間系線維の構成において, 優性抑制型に働くことを確認した。これらのことは, MDCK細胞, DJM-1細胞両者に観察されることより, どの細胞でも普遍的に起こると考えられる。

本研究は, ケラチン9遺伝子の点突然変異が疾患の原因であることを示すものである。

論文審査の結果の要旨

ケラチン遺伝子の変異は水疱症・角化症で報告されており、この遺伝子変異が細胞骨格であるケラチン中間径線維に及ぼす影響の解明は、これらの遺伝性皮膚疾患の原因解明、さらには治療を考える上で大きな意味を持つ。本研究は遺伝性皮膚疾患であるVoerner型掌蹠角化症の家系に着目し、患者末梢血液より採取したDNAを用いてケラチン9遺伝子変異を解析した。その結果、ケラチン9の162番目のアルギニンがグルタミンに置換されており、これが本症の原因と考えられた。さらに、ケラチン9遺伝子の異常がケラチン中間径線維に及ぼす影響については報告がないので、培養細胞にこの変異型ケラチン9 cDNAを導入したところ、細胞骨格に異常を生じ、ケラチン線維の滴状凝集が観察された。この結果はこの点突然変異がケラチン中間径線維ネットワーク形成の構築に影響を及ぼし、さらに疾患の原因に関与している可能性を強く示唆した。

以上の研究は、ケラチン9遺伝子の点突然変異が原因である掌蹠角化症の病態の解明に貢献し、今後期待される遺伝子治療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年10月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。