

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	重原 庸哉
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 798 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Mutations in SDR9C7 gene encoding an enzyme for vitamin A metabolism underlie autosomal recessive congenital ichthyosis (常染色体劣性先天性魚鱗癬の新規の疾患原因遺伝子 SDR9C7 の同定)
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 准教授 大石 誠 副査 教授 阿部 理一郎

博士論文の要旨

1. 背景と目的

魚鱗癬は、厚い鱗屑が全身の皮膚を被い鱗状の外観を呈し、組織学的には表皮角層の過角化が認められることが特徴の皮膚疾患である。本症は、先天的または後天的に表皮の分化 (角化) 過程に何らかの異常が生じることで発症する。常染色体劣性先天性魚鱗癬 (autosomal recessive congenital ichthyosis : 以下 ARCI) は、原因遺伝子/遺伝子座の違いによって計 11 種類 (ARCI1 ~ ARCI11) に分類されている。しかし、ARCI7 のみ遺伝子座だけの報告に留まり、原因遺伝子が同定されていなかった。今回申請者らは、生下時から全身に鱗状の乾皮症と掌遮角化を呈し、ARCI の既知の疾患原因遺伝子が完全に除外された近親婚のレバノン人の 3 家系について大規模なゲノム解析を行った。その結果、ARCI の新規の疾患原因遺伝子として SDR9C7 遺伝子の同定に至った。

2. 方法と結果

患者の血液から抽出されたゲノム DNA を用いて ARCI1 ~ ARCI11 の既知の疾患原因遺伝子及び ARCI7 遺伝子座内とその周辺についてマイクロサテライトマーカーによるハプロタイプ解析を行ったところ、ARCI1 ~ ARCI11 の既知の疾患原因遺伝子が局在する領域に明らかな連鎖は認められなかった。一方で、ARCI7 遺伝子座を含む約 45Mb (メガベース) の領域に連鎖が認められた。サンガー法で解析するには領域が大きいため、家系のメンバーの血液から抽出されたゲノム DNA を用いてエクソームシーケンスを行った。しかし、当初の予想に反して、抽出された 5 つの候補遺伝子はすべて ARCI7 遺伝子座から外れた下流の領域に局在していた。そこで、この領域に焦点を当てて、3 家系すべてに追加のハプロタイプ解析を行った。その結果、12 番染色体長腕 (Ch12q13.13-q14.1) の 9.5Mb (メガベース) の領域に連鎖が認められ、エクソームシーケンスの結果を再確認したところ、この連鎖領域内に局在する候補遺伝子は SDR9C7 のみであった。患者のゲノム DNA を用いてサンガー法によるシーケンス解析を行い、2 種類の変異 (2 家系は c.599T>C (p.Ile200Thr) ホモ接合体、1 家系は c.214C>T (p.Arg72Trp) ホモ接合体) が同定された。続いて PCR-RFLP 法を用いてレバノン人の健常人コントロール 300 名にどちらの変

異も存在しないことが確認された。次に、ホモロジーモデリングを用いて変異型の SDR9C7 が蛋白質の立体構造に及ぼす影響について検討したところ、R72 と S24 がイオン結合して β シートの安定化に寄与しており、I200 と M264 が相互作用して酵素活性に非常に重要な Rossmann-fold という構造を形成していることが推測された。したがって申請者らは、2 種類の変異が蛋白質の安定性に何らかの支障をきたすことで SDR9C7 蛋白質の立体構造に重篤な影響を及ぼすと予想した。実際、*in vitro* で変異が発現に及ぼす影響を解析するために、変異型、野生型それぞれの SDR9C7 を過剰発現させた HEK293T 細胞を用いて健常人の皮膚でウェスタンブロット法を行ったところ、いずれの変異型蛋白質も野生型蛋白質に比べて顕著な発現量の低下が認められた。また、エピトープの異なる 2 種類の SDR9C7 抗体を用いても同様の結果が得られた。これらの結果から、変異型 SDR9C7 蛋白質は野生型 SDR9C7 蛋白質に比べて構造が不安定になる可能性が強く示唆された。さらに、*in vivo* で変異が発現に及ぼす影響を解析するために、健常人と患者の皮膚を用いて SDR9C7 とロリクリンの二重染色による蛍光抗体間接法を行ったところ、SDR9C7 蛋白質は表皮の角層～顆粒層に特異的に発現しており、患者の皮膚では角層における SDR9C7 蛋白質の発現が優位に低下し、網目状の構造の不明瞭化が認められた。この結果は、表皮角化細胞が顆粒層から角層にかけて分化する段階で、変異型 SDR9C7 蛋白質が不安定になり、発現が低下することで正常な構築を保てなくなったことを反映したものと考えた。

3. 考察と結論

今回申請者らは、ARCI の新規の疾患原因遺伝子として SDR9C7 を同定した。SDR9C7 遺伝子は short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member7 という 313 アミノ酸残基から構成される蛋白質をコードしており、特記すべきことに過去の解析で、レチナールをレチノールに変換する機能を有する、すなわちビタミン A の代謝・合成に関与する酵素であることが証明されている。しかし、過去に魚鱗癬を含めた遺伝性皮膚疾患で、ビタミン A 代謝に直接的に関連する疾患原因遺伝子はこれまでに報告されておらず、申請者らが世界で初めて同定した SDR9C7 が唯一であり、非常に画期的であると考えられる。ARCI における SDR9C7 遺伝子変異の同定は、ビタミン A 代謝が表皮の分化に重要であることを示唆する極めて貴重な新知見であると考えられる。

審査結果の要旨

ARCI は先天性魚鱗癬の代表的な疾患であり、道化師様魚鱗癬、葉状魚鱗癬、先天性魚鱗癬様紅皮症の表現型を呈することが知られている。近年、複数の疾患原因遺伝子が同定されているものの、いまだ未知の疾患原因遺伝子の存在が考えられ、具体的な発症機序についても不明な点が多い。申請者らは、レバノン人の近親婚の家系に生じた ARCI の患者について連鎖解析及びエクソーム解析を行い、ARCI の新規の疾患原因遺伝子として SDR9C7 を同定した。モデリングの結果から 2 種類の変異 (R72W, I200T) が蛋白質の安定性に何らかの支障をきたすことが推測された。実際、培養細胞を過剰発現させて行ったウェスタンブロット法で変異型蛋白質の発現の低下が認められ、蛍光抗体間接法によって患者の皮膚組織では角層の SDR9C7 の発現が低下することが示された。

以上の結果から、SDR9C7 の 2 種類の変異は ARCI の病的変異と考えられ、ARCI の新規の疾患原因遺伝子として SDR9C7 の同定に至った。SDR9C7 はビタミン A の代謝・合成に関与する酵素であるため、本論文は世界で初めてビタミン A が表皮の分化に重要であることを示したということだけに留まら

ず、将来的にビタミン A の表皮の分化における関与の解明と難治性の角化症患者の新しい治療薬の開発につながる可能性があり、この点に本論文の学位論文としての価値を認める。