

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 柳 輝希

### 学位論文題名

道化師様魚鱗癬の出生前診断とモデルマウスの解析による病態解明

#### 【背景と目的】

先天性魚鱗癬のうち最も重篤な症状を呈する道化師様魚鱗癬は、生下時より全身を板状の厚い鱗屑で覆われ、眼瞼外反・口唇の突出開口が特徴的であり、生後早期に死亡する例も多く認める。長い間原因は不明であったが、2005年、当科の研究グループはABCトランスポーターA12(ABCA12)が病因遺伝子であることを明らかにした。今回、詳しい病態解明と治療実験を行うために、モデルマウスが必要であると考えABCA12ノックアウトマウスを作成した。また、原因遺伝子の解明による臨床現場における応用として、道化師様魚鱗癬に対する遺伝子レベルでの出生前診断を実施した。

#### 【材料と方法：道化師様魚鱗癬モデルマウス】

Abca12のExon30をネオマイシンカセットに置換するベクターを設計し、129Sv/Ev胎生期幹細胞に、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした。マウス胚幹細胞を、C57BL/6Jマウスから得られた胚盤胞にマイクロインジェクトして、キメラ胚を得た。得られたキメラ胚を、C57BL/6Jメスマウスに着床して、キメラマウスを発生させた。ヘテロマウスを掛け合わせることで、Abca12<sup>-/-</sup>マウスを作製した。マウスのGenotypingはマウスの尾を切断し、DNAを抽出して行った。Abca12<sup>-/-</sup>マウスの解析は、RT-PCR法・ウェスタンブロット法・光学顕微鏡・電子顕微鏡・免疫蛍光抗体法・皮膚透過性試験にて行った。

#### 【対象と方法：出生前診断】

発端者は日本人同士の両親から生まれた第2子である。発端者は道化師様魚鱗癬に罹患しており、出生後3日目に死亡した。第1子は死産であり、道化師様魚鱗癬の皮膚症状を呈していた。発端者および両親の遺伝子変異検査を行ったところ、父親由来のナンセンス変異と母親由来のスプライスサイト変異が認められた。第3子の妊娠において、両親は出生前診断を希望された。超音波下に妊娠16週の羊水から胎児由来細胞を採取し胎児DNAを抽出した。その後、遺伝子検索をダイレクトシーケンシング法と、Modified PCR・制限酵素処理にて実施した。

#### 【結果：Abca12ノックアウトマウスの解析】

Abca12ノックアウトマウスはヒト道化師様魚鱗癬の臨床症状を忠実に再現しており、皮膚の著明な過角化と亀裂、口唇の突出開口を認めた。HE染色を行うと、ABCA12ノックアウトマウスでは角層構造が失われ、角層間脂質が正常に形成されていなかった。電顕および免疫染色にて、層板顆粒の異常と角層セラミドの分布障害が見られた。これらの新生児肉眼所見・病理所見・角層でのセラミド分布はヒト道化師様魚鱗癬患者皮膚と同様であり、このマウスは道化師様魚鱗癬

モデルマウスと考えられた。

このモデルマウスの胎児期の皮膚を詳細に検討したところ、胎生 18.5 日目では顆粒層・角層の形成異常、角質細胞内の多数の脂肪滴を認めた。この形態学的な異常を、皮膚バリア機能を指標として解析したところ、トルイジンブルーを用いた皮膚透過性試験、および経表皮水分喪失量測定にて、本来であれば皮膚バリア機能の完成している胎生 18.5 日目でも重篤な皮膚バリア障害を認めた。以上の結果から、道化師様魚鱗癬モデルマウスの胎児期の顆粒層～角層形成障害およびバリア機能形成障害が明らかになった。さらに、興味深いことに *Abca12*<sup>-/-</sup>マウスの肺では、2 型肺胞上皮細胞の層板体の異常と肺胞拡張障害を認め、肺組織抽出物を用いたウェスタンブロット法ではサーファクタント蛋白の減少を認めた。

#### 【結果：出生前診断】

ダイレクトシーケンス法および Modified PCR・制限酵素処理の結果、胎児は父親由来の遺伝子変異を受け継いでいたが、母親由来の遺伝子変異を持っていなかった。この胎児は罹患していないと診断し、母親の妊娠は継続され、出生前診断から 5 カ月後に全く皮膚に異常所見を認めない新生児を出産した。

#### 【考察】

今回報告した *Abca12*<sup>-/-</sup>マウスは初めての道化師様魚鱗癬モデルマウスであった。道化師様魚鱗癬患者の解析により ABCA12 の変異が明らかにされ、*Abca12* ノックアウトマウスによってヒト道化師様魚鱗癬の症状が再現されたことから、この最重症の魚鱗癬である道化師様魚鱗癬の原因が ABCA12 であることが示された。これまでの研究から ABCA12 が角化過程においてきわめて重要な役割を果たしているは明らかである。しかしながら、皮膚の脂質輸送機構および最終分化の過程（＝角化）では非常に多くの分子が厳密に制御されながら機能している。今後、ABCA12 を中心として、この複雑な角化過程が解明され、それに基づく新しい治療法の開発が期待される。さらに、このモデルマウスを用いた治療実験は、今回の実験では成功しなかったが、今後さまざまな治療実験の可能性があり、新規治療法の開発が期待される。

また、今回実際の臨床現場に直結した研究として、出生前診断を報告した。道化師様魚鱗癬は、予後不良の重篤な遺伝性皮膚疾患であり、出生前診断が適応となることが多い。2005 年の原因遺伝子の解明まで、胎児皮膚生検という方法で行われてきたが、施行には多くの問題点抱えていた。原因遺伝子の解明により遺伝子レベルでの出生前診断が可能となり、実際の臨床応用に至った。調べ得た限り、この報告が道化師様魚鱗癬に対する世界初の遺伝子レベルでの出生前除外診断である。

#### 【結論】

世界で初めての *Abca12*<sup>-/-</sup>マウスを報告し、ヒト道化師様魚鱗癬皮膚の特徴を示す道化師様魚鱗癬モデルマウスであることを示した。この道化師様魚鱗癬モデルマウスは ABCA12 が肺サーファクタント蛋白の分泌と皮膚脂質バリアの形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、このモデルを用いた新規治療法の開発が期待される。また、現時点ですぐに応用できた例として、出生前診断を報告した。今後、遺伝子レベルでの出生前診断は道化師様魚鱗癬を出生する可能性のある両親にとって非常に有効な検査になると考えられる。