

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 鈴木 翔多朗

学位論文題名

ケラチン 1 タンパク質 C 末端ドメインにおける変異とその病原性に関する研究
(Studies on the pathogenicity of mutations in the C-terminal domain of keratin 1)

【背景と目的】

ケラチン 1 は *KRT1* にコードされる線維タンパク質で線維形成のペアとなるケラチン 10 (*KRT10*)と共に皮膚の表皮上層細胞 (有棘細胞や顆粒細胞) で細胞骨格形成に関わり、これらの細胞の機械的強度保持に非常に重要な役割を担っている。実際、*KRT1* や *KRT10* の rod ドメインと呼ばれる中央付近の α ヘリックスに富んだ領域にアミノ酸置換が生じると、変異した *KRT1* や *KRT10* が細胞骨格の形成を阻害し、有棘細胞や顆粒細胞が脆弱になって外部からの物理的な刺激で細胞や細胞間隙が破壊されやすくなり、結果として表皮が脆く代償的に肥厚する表皮融解性魚鱗癬になることがわかっている。ここで、*KRT1* の C 末端側は V2 ドメインと呼ばれ、グリシン残基に富んだ繰り返し配列が特徴であり、その領域における変異は多様な重症度・臨床像の皮膚疾患の原因となることが知られている。しかしながら、これまで 8 種類の変異が報告されているにも関わらずその詳細なメカニズムに関する知見はほとんどない。さらに近年、*KRT1* の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異により *ichthyosis with confetti* (IWC) となる症例が報告された。IWC は全身の潮紅と過角化が主な症状のきわめて稀な常染色体優性遺伝性疾患で、最大の特徴はスポット状にゲノムレベルで正常化した皮膚領域 (revertant 領域) が多数出現すること、すなわち revertant mosaicism が認められることである。IWC の原因は *KRT10* の V2 ドメインにおけるフレームシフト変異が報告されており (IWC-I)、*KRT1* が原因の場合 (IWC-II) は 1 家系のみでの報告で、既報の *KRT1* 変異による他の疾患では revertant mosaicism は記載されておらず、臨床的特徴の詳細は不明であった。

本研究では *KRT1* の V2 ドメインに新規のフレームシフト変異を有し、revertant mosaicism が認められた IWC-II 患者を見出して詳細に解析した。さらに既報告の *KRT1* V2 ドメインにおける変異タンパク質の細胞内での挙動を解析することで、その病原性に関する知見を得た。

【対象と方法】

- 1) 患者: 全身がドライスキンで腹部および四肢は鱗屑を伴う潮紅、掌蹠では強い過角化を認めた常染色体優性遺伝性皮膚疾患患者の皮膚を採取して組織学的な検討を実施した。また、患者ゲノム DNA を解析して原因となる遺伝子変異の同定を試みた。
- 2) 患者に認められた正常化皮膚の解析: 患者に認められた正常化皮膚領域を採取し、組織学的解析を実施した。また、採取した皮膚を表皮と真皮に分離し、それぞれからゲノム DNA を抽出して遺伝子型を調べ、正常化皮膚出現機構の解明を試みた。
- 3) *KRT1* V2 ドメイン変異の細胞骨格形成に関する *in vitro* 解析: 既報告の V2 ドメイン変異をもつ *KRT1* を HaCaT 細胞へ一過的に発現させた後、蛍光イメージングにより細胞骨格の状態を観察し、細胞内で凝集体を形成する細胞の割合を測定することで変異 *KRT1* の病原性を評価し、各変異が起こす症状の特徴との関連を解析した。なお、HaCaT 細胞は

表皮角化細胞の自然発生不死化細胞株である。

【結果および考察】

1) 患者の組織では不全角化を伴う表皮の肥厚とケラトヒアリン顆粒の減少、空胞化した顆粒細胞が認められ、さらに有棘細胞や顆粒細胞、角層細胞（表皮の最外層細胞）においてケラチン線維の局在異常が認められた。しかしながら表皮融解性魚鱗癬に特徴的な有棘細胞や顆粒細胞の変性である顆粒変性（光学顕微鏡観察）やケラチンの凝集体（電子顕微鏡観察）は認められなかった。また遺伝子変異探索実験により、本患者は *KRT1* の V2 ドメイン領域に新規フレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) をヘテロ接合性に有することが明らかとなった。

2) 本患者は組織学的に正常化した皮膚領域が 30 歳頃から多発し、50 代後半の高齢になって急激にその数が増加することが長期にわたる観察で明らかとなった。正常化した皮膚領域の表皮における遺伝子型を調べた結果、12 番染色体の *KRT1* 領域よりもセントロメア側を break point とする loss of heterozygosity が検出され、病原変異が消失していた。したがって、正常化した領域は体細胞レベルでの相同組換えにより治癒していることが明らかとなった。以上の所見から、本患者は IWC-II と最終診断された。

ここで、IWC-I では眼瞼外反、小耳症、耳介形成異常、乳頭形成不全、低身長などが認められるが、本患者では認められず、魚鱗癬自体も IWC-I より軽症で、その傾向は既報の IWC-II の 1 家系でも同様であった。組織学的にも、IWC-I では不全角化を伴う過角化、表皮角化細胞の核周囲の空胞化、顆粒層の菲薄化が特徴であるが、IWC-II の 2 家系では核周囲の空胞化は IWC-I よりも軽度であり、IWC-I と IWC-II は臨床病理学的にそれぞれ異なる特徴を持つことが確認された。また、本研究により IWC-I と IWC-II では revertant 領域の出現する時期に大きな差異があることを見出した。すなわち、IWC-I では生下時または乳幼児期に revertant 領域が多発するが、IWC-II では生下時や幼少期・青年期にはきわめて少なく、20-30 代で初めてその存在に気づかれ、高齢になってから増加することが明らかとなった。さらに、同じ *KRT1* や *KRT10* の rod ドメインにおける変異で発症する表皮融解性魚鱗癬では revertant mosaicism はこれまで報告されていない事実から、V2 ドメインにおける変異により生じるペプチドまたは変異タンパク質全体が revertant 細胞の出現、すなわち体細胞における相同組換えに直接関わっていることが示唆され、先例のない生理現象である可能性が考えられた。

3) *In vitro* のケラチン線維形成能比較実験により、既報告 *KRT1* V2 ドメインフレームシフト変異を有する *KRT1* はすべて細胞骨格形成を阻害することがわかった。しかしながら、変異がおこす疾患の重症度や revertant mosaicism の有無と細胞骨格形成阻害能には相関が認められなかった。したがって、細胞骨格形成能とは異なる機能が V2 ドメインには存在し、それらが症状の重症度、さらには revertant mosaicism の有無に影響を与えている可能性が示唆された。

【結論】

- 1) *KRT1* の新規フレームシフト変異 c.1758_1759insT (p.Tyr587LeufsTer67) は病原性を持ち、revertant mosaicism を伴う魚鱗癬、IWC-II の原因となる。
- 2) IWC-II は IWC-I とは臨床病理学的に異なり、revertant 細胞の出現は青年期以降で、高齢になってから急激に増加しはじめる。
- 3) *KRT1* の V2 ドメインがフレームシフト変異したタンパク質は細胞内で細胞骨格の凝集を引き起こして細胞骨格形成を阻害するが、各変異がおこす症状の重症度や revertant mosaicism の有無とは相関がなく、これらの違いは細胞骨格形成能とは異なる V2 ドメインの機能により生じていると考えられた。