

論文内容要旨

論文題目

眼皮膚白皮症 6 型：日本人症例における新規遺伝子バリエントとモデルマウスによる原因遺伝子の機能解析

責任講座： 皮膚科学 講座
氏 名： 齊藤 亨

【内容要旨】 (1,200 字以内)

【背景】眼皮膚白皮症 6 型 (OCA6) は非症候性 OCA の稀なサブタイプで、眼振や弱視などの眼症状を強く伴うが、皮膚や髪の色調低下はある程度保たれる傾向がある。責任遺伝子の *SLC24A5* は、 K^+ 依存性 Na^+/Ca^{2+} チャネルである *NCKX5* をコードし、メラノソームの成熟に関わっているとされるが、その機能の詳細は不明である。これまで中国やヨーロッパを中心に 30 例ほど報告があるが、本邦では報告がない。

【目的】本研究の目的は [1] 日本人 OCA 疑い児の原因遺伝子解析、[2] 解析で明らかになったミスセンスバリエントの機能を明らかにすること、[3] *SLC24A5* (*NCKX5*) のメラニン生合成における役割を明らかにすることである。

【方法】[1] ターゲットリシーケンス法によるメラニン合成に関わる 58 遺伝子の網羅的解析、[2] CRISPR/Cas9 を用いて非相同末端連結による *SLC24A5* の機能消失マウス (4 塩基欠損; KO) , および患者で同定されたミスセンスバリエントを導入したノックインマウス (KI) を作製し、表現型やメラニン量・組成の比較を行った。また、[3] 作製したマウスの眼杯由来の網膜色素上皮と、皮膚や毛根と同じ神経堤由来のメラノサイトを有する脈絡膜を用いて免疫組織化学染色を行い、染色性を比較した。

【結果】[1] 患者の遺伝子解析により、OCA6 の責任遺伝子である *SLC24A5* に複合ヘテロ接合バリエント (c.590+1dupG + c.598G>A, p.G200R) を同定した。[2] KO・KI ともにホモ接合体を作製し解析したところ、いずれも毛髪・耳介および尾に再現性をもって軽度の色調低下、またマウスの毛髪と耳介でユーメラニンの有意な低下が認められた。患者と健常者コントロールの毛髪を用いた測定でも同様の傾向が見られた。以上より自験例を OCA6 と診断した。[3] 免疫組織化学染色で KO は網膜色素上皮と脈絡膜ともに *SLC24A5* の染色性が低下したが、KI では網膜色素上皮のみ染色性が低下していた。一方で KO・KI ともに未成熟メラノソームのマーカーである *PMEL* の染色性が上昇していたが、輝度の定量化では脈絡膜よりも網膜色素上皮で染色性が上昇する傾向がみられた。

【結論】本研究により、自験例で同定されたミスセンスバリエント (c.598G>A, p.G200R) は、CRISPR/Cas9 を用いて作製したモデルマウスの表現型およびメラニン定量の解析結果から病的バリエントであることが明らかとなった。また *SLC24A5* の機能異常は、網膜色素上皮と脈絡膜のメラノサイトで異なる影響を与える可能性が示唆された。

令和3年 1月15日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：齊藤 亨

論文題目：眼皮膚白皮症6型：日本人症例における新規遺伝子バリエントとモデルマウスによる原因遺伝子の機能解析

審査委員：主審査委員 後藤 薫



副審査委員 山下 英俊



副審査委員 山口 浩明



審査終了日：令和3年 1月14日

【 論文審査結果要旨 】

眼皮膚白皮症6型 (OCA6) は、眼振や弱視などの眼症状を強く伴う一方で、皮膚や髪の色調低下は軽度な非症候性 OCA の亜型である。責任遺伝子である *SLC24A5* は、 K^+ 依存性 Na^+/Ca^{2+} チャンネルである *NCKX5* をコードすることが明らかとなっているが、その機能の詳細は不明であり、本邦では未だ報告がない。本研究において齊藤氏は、日本人 OCA 疑い児の原因遺伝子解析、ならびに明らかになったミスセンスバリエントの機能解析を行った。

齊藤氏は、メラニン合成に関わる 58 遺伝子の網羅的解析を行った結果、OCA 疑い児において、*SLC24A5* に [1]c. 590+1dupG (cDNA590 番 (エキソン5の最後) の後のイントロンの最初の G が重複してスプライス部位が変化し、フレームシフトを生じさせる)、および [2]c. 598G>A (p. G200R) (cDNA598 番の G が A に変異し、その結果アミノ酸 200 番が G から R に点変異を起こす) を明らかにした。次に、CRISPR/Cas9 を用いて [2] の点変異を持つ KI マウスと KO マウスを作製し解析を行ったところ、両マウスに毛髪・耳介および尾に軽度の色調低下、また毛髪と耳介のユーメラニン (真性メラニン) の低下が認められた。患者と健常者コントロールの毛髪を用いた測定でも同様の傾向が見られた。また免疫組織化学染色において、KO マウスでは網膜色素上皮と脈絡膜ともに *SLC24A5* の染色性が低下したが、KI マウスでは網膜色素上皮のみ染色性の低下が認められた。以上より、*SLC24A5* に見られる [2]c. 598G>A (p. G200R) の点変異は、眼皮膚白皮症6型 (OCA6) の原因となると考えられた。

これらの研究結果は、本邦において初めて OCA6 患者の遺伝子変異を明らかにして実験的に解析したもので、OCA6 の病態解明に大きく寄与すると考えられる。よって学位審査委員会は本研究が博士 (医学) の授与に値するものと判定した。