主論文の要旨

Apparent homozygosity due to compound heterozygosity of one point mutation and an overlapping exon deletion mutation in *ABCA12*: A genetic diagnostic pitfall

（*ABCA12* 遺伝子の点変異と重複するエクソン欠損変異の複合ヘテロ接合体における apparent homozygosity）

名古屋大学大学院医学系研究科　機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座　皮膚病態学分野
（指導：秋山 真志　教授）
柴田 章貴

【背景】

道化師様魚鱗癬は常染色体劣性遺伝性の、極めてまれな予後不良の疾患で、出生時、全身皮膚が深い亀裂を伴う厚い板状の角質に覆われ、眼瞼外反、口唇の突出開口、耳介変形が顕著である。皮膚表皮角化細胞に発現する膜型の脂質トランスポーター蛋白質である ABCA12 の遺伝子である *ABCA12* が原因遺伝子として知られており、完全な機能欠失に至る遺伝子変異のホモ接合体、あるいは、完全な機能欠失変異と部分機能欠失変異の複合ヘテロ接合体において道化師様魚鱗癬が発症する。

道化師様魚鱗癬のような常染色体劣性遺伝性疾患において、一つのアレルの点変異部位を含むように、もう一つのアレルにエクソン欠失変異が重なって存在すると、サンガー法では一見、点変異のホモ接合体のようにみえ、そのような現象は apparent homozygosity と呼ばれる。

【目的】

本研究の目的は、非近親婚の道化師様魚鱗癬患者における*ABCA12*変異のapparent homozygosityでの存在を証明することである。

【患者・方法】

患者

非近親婚の両親より在胎 37 週、自然分娩で出産した。生下時より全身が潮紅しており、深い亀裂を伴う分厚い板状の鱗屑に覆われていた。重篤な口唇外反、眼瞼外反も認め、典型的な道化師様魚鱗癬の外観を呈していた(Figure 1)。

方法

まず患者および両親のゲノム DNA(gDNA)の *ABCA12* 遺伝子のエクソン・イントロン境界領域を含めた全翻訳領域に対してサンガー法を施行した。続いて患者及び両親の *ABCA12* 遺伝子の隣接領域の SNP 解析により segregation study 行った。*ABCA12* のエクソン 11 の gDNA の定量 PCR、エクソン 9-12 の cDNA およびイントロン 9-11 の gDNA のダイレクトシークエンス法を用いた変異解析を施行した。

【結果】

サンガー法による変異検索

患者および両親のゲノム DNA(gDNA)の *ABCA12* 遺伝子のエクソン・イントロン境界領を含めた全翻訳領域に対してサンガー法を施行した。

患者は新規のホモもしくはモノ接合体のナンセンス変異である c.1216A>T (p.Lys406X)をエクソン 11 に有していた。 同変異は父にヘテロ接合体で存在したが、母には存在しなかった(Figure 2)。

SNP 解析

患者及び両親の *ABCA12* 遺伝子の変異存在部位の隣接領域の SNP 解析により

segregation study 行った。

患者は rs1967693（イントロン 8)と rs10498030（exon 22）をヘテロ接合体で有しており、この間(34kb)の uniparental isodisomy (UPD)の存在は否定的であった(Figure 3)。

ABCA12 のエクソン 11 の gDNA の定量 PCR

点変異部位を含むように、もう一つのアレルにエクソン欠失変異が重なって存在する可能性を検証するために *ABCA12* のエクソン 11 の gDNA の定量 PCR を施行した。*ABCA12* exon 11 の gDNA 量は患者および母で減少していた(Figure 4)。患者および母において exon 11 を含めたエクソン欠損の存在が示唆された。

ABCA12 のエクソン 10-13 間の Reverse transcription(RT)-PCR

ABCA12 のエクソン 11 の gDNA の定量 PCR の結果、エクソン 11 を含んだエクソン欠損の存在が示唆された。cDNA レベルでの欠損範囲の確認のため、患者の父母の毛髪より採取した mRNA を cDNA に変換した後に、*ABCA12* のエクソン 10-13 を増幅するよう設計した primer(856bp)を用いて RT-PCR を行った。患者母において短い cDNA の増幅を認めたが、父では認めなかった(Figure 5a)。

患者母の cDNA の短いバンドを切り出してダイレクトシークエンス法により変異解析を施行したところ、エクソン 10,11 が欠損していることが確認された(Figure 5b)。

ABCA12 の intron 8-13 間の gDNA の PCR およびダイレクトシークエンス法による変異範囲の同定

イントロン 8 とエクソン 13 の間の PCR では，患者母において目的の 12,772 bp のバンドだけでなく約 11,000 bp の短いバンドも得られた(Figure 6a)。イントロン 9 とイントロン 11 の間の PCR では,患者および母では 2,302 bp と約 600 bp のバンドがみられた(Figure 6b)。この母の短いバンドを切り出してダイレクトシークエンスにて解析したところイントロン 9 の 3 末端側 144bp，エクソン 10，イントロン 10，エクソン 11，イントロン 11 の 5 末端側 462bp あわせて 1872bp の欠損が確認された(Figure 6c)。

【考察】

今回我々は非近親婚の道化師様魚鱗癬患者において *ABCA12* の変異が apparent homozygosity で存在することを証明した。

道化師様魚鱗癬は常染色体劣性遺伝性の、極めてまれな予後不良の疾患である。常染色体劣性遺伝性疾患の変異解析において、サンガー法で非近親婚患者が創始者変異ではない点変異をホモで有することが示唆された場合に、片親のみにしかその変異がみられないことがある。そのような場合には、一般的にはまず一対の相同染色体がどちらも片方の親から由来し他方の親からは由来しない UPD の可能性が考えられる。染色体の一部分だけが UPD になることがあり segmental UPD と呼ぶが、その確率は 0.026%との報告もある。ABCA12 が存在する 2 番染色体においては、100 kb 以上の大き

さの segmental UPD の報告例がほとんどであり、本症例においては SNP 解析により当該点変異の近傍、34kb の範囲で UPD が示されなかったことから、UPD の可能性は低いと考えた。

UPD 以外の可能性として、一つのアレルの点変異部位を含むように、もう一つのアレルにエクソン欠失変異が重なって存在することがある。サンガー法では UPD と同様に一見、点変異のホモ接合体のようにみえ、そのような現象は apparent homozygosity と呼ばれる。

本研究では、まず一つのアレルの点変異部位が存在する *ABCA12* のエクソン 11 が、もう 1 つのアレルで欠損している可能性を、gDNA を用いた qPCR により示した。次いで cDNA レベルでの欠損範囲を確定し、最終的に gDNA レベルでの欠損範囲を同定することができた。

本患者において一つのアレルの点変異部位が *ABCA12* のエクソン 11 に存在し、もう 1 つのアレルではイントロン 9 の 3 末端側 144bp, エクソン 10, イントロン 10, エクソン 11, イントロン 11 の 5 末端側 462bp あわせて 1872bp の欠損しており、*ABCA12* の変異が apparent homozygosity で存在することが証明された(Figure 7)。

【結論】

サンガー法で、非近親婚患者が創始者変異ではない点変異をホモで有することが示唆されるものの片親にしか変異を認めない場合には、UPD の他に、点変異にエクソン欠損変異が重なって存在する apparent homozygosity の可能性を念頭に入れて変異検索を進めていく必要がある。