

学 位 論 文 題 名

先天性乏毛症および掌蹼の梅毒性角化病変における  
分子生物学的発症メカニズムの解明

学位論文内容の要旨

近年、疾患の原因遺伝子が次々に解明され、多数の遺伝性皮膚疾患において、遺伝子診断が可能になりつつある。また、分子生物学の進歩に伴い、感染性皮膚疾患の原因となりうる様々な病原性微生物の遺伝子配列が明らかになった。そのため、DNA レベルにおいて感染性微生物の有無を確認し、同定することが可能になった。本研究では、実際に臨床現場で経験した先天性乏毛症および梅毒患者に対し、分子生物学的手法を用い、遺伝子および蛋白レベルで解析を行い、診断と発症メカニズムを解析した。

研究 1 先天性乏毛症

【背景と目的】

常染色体劣性乏毛症は生下時もしくは生後数カ月から乏毛を呈する遺伝性脱毛性疾患である。近年、常染色体劣性乏毛症の原因遺伝子として *DSG4*、*LIPH*、*LPAR6* 遺伝子が同定された。*LIPH* 遺伝子によってコードされる membrane-associated phosphatidic acid-preferring phospholipase  $A_1 \alpha$  (PA-PLA $_1 \alpha$ ) は、ホスファチジン酸をリゾホスファチジン酸に加水分解する酵素であり、産生されたリゾホスファチジン酸が *LPAR6* 遺伝子によってコードされる P2Y5 受容体を活性化することにより毛の成長が起こるとされている。本研究の目的は、先天性乏毛症患者の原因遺伝子解析を行い、さらに遺伝子変異によって生じた変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  の機能解析を行うことにより、先天性乏毛症の発症メカニズムを解明することである。

【方法】

北海道大学病院皮膚科を受診、もしくは紹介された先天性乏毛症 5 家系 6 名の患者において常染色体劣性乏毛症の原因遺伝子である *DSG4*、*LIPH*、*LPAR6* 遺伝子の変異検索を行った。さらに同定された変異を有する変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  の機能解析を行った。HEK293 細胞に変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  を強制発現し、ホスファチジン酸がリゾホスファチジン酸に加水分解される際に生じる遊離脂肪酸量を測定することにより、変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  の加水分解能を解析した。また、P2Y5 受容体が活性化することによりアルカリホスファターゼが遊離することがすでに知られており、変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  およびリコンビナント P2Y5 受容体をコトランスフェクトした細胞培養液中に生じた遊離アルカリホスファターゼ活性を測定することにより、変異体 PA-PLA $_1 \alpha$  の P2Y5 受容体活性化能を解析した。

## 【結果】

4 家系 5 名の患児で *LIPH* 遺伝子に c. 736T>A (C246S) と c. 742C>A (H248N) の複合ヘテロ接合型ミスセンス変異を認め、また、1 家系では c. 736T>A (C246S) のホモ接合体を認めた。C246S、H248N のいずれかの変異を有した変異体 PA-PLA<sub>1</sub>α を強制発現した HEK293 細胞の培養液中の遊離脂肪酸量は正常の PA-PLA<sub>1</sub>α を強制発現したもの 비해、有意に減少した。また、P2Y5 受容体および変異体 PA-PLA<sub>1</sub>α を導入した細胞の培養液中の遊離アルカリホスファターゼ量は、正常 PA-PLA<sub>1</sub>α に比し、有意に減少していた。

## 【考察と結論】

常染色体劣性乏毛症 5 家系 6 名の患者において遺伝子変異検索を行い、*LIPH* c. 736T>A (C246S) および c. 742C>A (H248N) を同定した。これらの変異を導入した変異体 PA-PLA<sub>1</sub>α の加水分解能および P2Y5 受容体活性化能は有意に減少しており、これらのミスセンス変異は機能喪失型遺伝子変異であることが分かった。本研究では、実際の臨床現場で経験した症例について、遺伝子解析を行い、さらにその変異体の機能について詳細に解析を行うことにより、同定された変異が病因となり得ることを証明した。今後、さらにデータを蓄積し、常染色体劣性乏毛症の病態メカニズムがより詳細に解明されることが期待される。

## 研究 2 掌蹠の梅毒角化性病変

### 【背景と目的】

二期梅毒疹には乾癬に類似した軽度の鱗屑や過角化を伴った紅斑が掌蹠に認められることがある。ごく稀に、掌蹠角皮症や尋常性疣贅に類似した著明な角化性病変を呈することがあるが、その発症メカニズムはいまだ不明である。本研究では、両側手掌および足底に巨大な尋常性疣贅様の皮疹を呈した角化型梅毒疹の発症メカニズムを明らかにするため、尋常性疣贅の原因となるヒト乳頭腫ウイルスの関与について解析を行った。

### 【方法】

掌蹠の症状の角化性局面を主訴に北海道大学病院皮膚科を受診した 2 期梅毒患者を対象とした。角化性病変について病理学的に解析を行った。さらに病変皮膚組織から DNA を抽出し、ヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を確認するために PCR 法を用いてヒト乳頭腫ウイルス DNA に特異的なフラグメントを増幅した。

### 【結果】

病理学的所見では表皮は外方に向かって手指状に突出し、真皮側では表皮稜の延長を認めた。真皮上層では稠密な炎症細胞浸潤を認め、形質細胞も多数認められた。角化性病変の組織から抽出した DNA を用いて、ヒト乳頭腫ウイルスを検出するため PCR 法を行ったが、バンドは検出されなかった。

### 【考察と結論】

角化を伴う原因として、ヒト乳頭腫ウイルスの合併を考え、ヒト乳頭腫ウイルス DNA に対する PCR 法を施行したが、ヒト乳頭腫ウイルスの感染を証明できなかった。今後、さらなる科学の進歩により、角化型梅毒疹の発症機序が解明されることが期待される。

## 【総括】

本研究では、常染色体劣性乏毛症に対し、患者の遺伝子解析を行うことにより、診断を確定し、さらにその変異の機能について詳細に解析することにより、同定された変異が病因となり得ることを証明した。また、巨大な尋常性疣贅様の皮疹を呈した角化型梅毒疹に対し、その稀な臨床像を呈するメカニズムを解明するために、ヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を確認した。実際に臨床の現場で経験した遺伝性および感染性皮膚疾患に対し、異なる側面から発症メカニズムの解明を試みることができた。今後も様々な皮膚疾患において、本研究で培った分子生物学的手法により診断のみならず、病態の解明を行っていきたい。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	山本	有平
副査	教授	清水	宏
副査	教授	瀬谷	司
副査	教授	守内	哲也
副査	准教授	篠原	信雄

## 学位論文題名

### 先天性乏毛症および掌蹠の梅毒性角化病変における 分子生物学的発症メカニズムの解明

第一章の先天性乏毛症の発症メカニズムの解明では、常染色体劣性乏毛症 5 家系において遺伝子変異検索を行い同定された *LIPH* 遺伝子変異 (c.736T>A (C246S) および c.742C>A (H248N)) について、分子生物学的手法を用いて発症機序を解明するという研究内容の発表がなされた。複数の家系および健常コントロールで同変異を認めたため、異種動物間における保存性の解析、3D 構造解析、さらにこれらの変異をもつリコンビナントタンパクを作製し、2 つの異なる系において機能解析を行うことにより、これらの変異の病的意義を解明し得た。

審査では、変異が同定された *LIPH* 遺伝子によってコードされる membrane-associated phosphatidic acid-preferring phospholipase A<sub>1α</sub> (PA-PLA<sub>1α</sub>) が機能欠損することにより、毛髪以外に何らかの表現型が出現するか否か問われた。発表者からは、RNA レベルにおいて PA-PLA<sub>1α</sub> が様々な臓器で発現しているが、常染色体劣性乏毛症患者では毛髪以外に明らかな異常が認められないという回答が得られた。さらに、様々な臓器で PA-PLA<sub>1α</sub> が発現しているにも関わらず、表現型が現れない理由を問われたが、これに対し、発表者は PA-PLA<sub>1α</sub> に非常に構造が似たタンパクの存在や PA-PLA<sub>1α</sub> から産生されるリゾホスファチジン酸に対する受容体の局在性について言及した。また、今回同定された *LIPH* 遺伝子変異 (c.736T>A (C246S) および c.742C>A (H248N)) が世界でも報告されているか問われた。発表者は、日本人症例ではほぼ同時期に同じ変異が報告されているが、日本以外では同じ変異は報告されていないと回答し、さらに、これまでのところ東アジア諸国からの *LIPH* 遺伝子変異検索に関する報告はなく、この変異を世界各地で解析することにより、民族の移動経路などを特定する足掛かりになる可能性について言及した。今回対象となった *LIPH* 遺伝子変異を伴った常染色体劣性乏毛症以外の様々な乏毛を呈する疾患における PA-PLA<sub>1α</sub> の関連の有無についての問いに対して、*LPAR6* 遺伝子変異を認める乏毛症では、*LPAR6* 遺伝子がコードする G タンパク共役受容体が PA-PLA<sub>1α</sub> から産生されるリゾホスファチ

ジン酸によって活性化されるという報告があること、最近、同様の症状を呈する常染色体優性乏毛症の原因タンパクであるケラチン 74 が PA-PLA<sub>1α</sub> を介するシグナル経路に関係している可能性があることなどが発表者から説明された。最後に、この研究の今後の発展性について問われた際、発表者は変異体 PA-PLA<sub>1α</sub> の受容体活性化能解析に用いた系を利用した新薬の開発を目指したいと回答した。

第二章、掌蹠の梅毒角化性病変の項では、巨大な尋常性疣贅様の皮疹を呈した角化型梅毒疹の発症メカニズムの解明に関する研究内容が発表された。病変皮膚組織からヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を確認するために PCR 法を用いてヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を解析した。

審査では発表者は非典型的な臨床像をとった二期梅毒疹と診断した根拠として血液学的検査、病理組織学的検査、治療に対する反応性などを挙げた。さらにこのような著明な角化性病変を呈する原因としてヒト乳頭腫ウイルスの合併を疑うに至った経緯などについて言及した。

この論文は、第一章、第二章ともに実際に臨床の現場で経験した遺伝性および感染性皮肤病疾患に対し、異なる側面から発症メカニズムを明らかにする重要な手掛かりを提起したといった点で高く評価され、今後のさらなる病態解明や治療法の開発などにつながる第一歩となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。