

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10044

研究課題名(和文) 病因特異的治療の可能性を秘めた新規コレステロール合成経路代謝異常症の疾患概念確立

研究課題名(英文) Identification of a novel gene causing cholesterol synthesis deficiency

研究代表者

菊池 敦生 (Kikuchi, Atsuo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30447156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール合成経路酵素欠損による先天代謝異常症では多発奇形に種々の先天性皮膚異常、白内障を伴うが、未だ大部分の酵素でヒトでの報告がない。研究代表者は先天性無毛症と多発奇形兄弟例で同経路酵素をコードする新規候補遺伝子LSSを同定していた。本研究ではLSS遺伝子欠損症の遺伝学的・機能的証明を試みた。LSS遺伝子変異は無毛症のほか先天性白内障の報告がある。3種類のコンディショナルノックアウトマウスを作成したところ、それぞれ、皮膚バリア機能障害、一過性脱毛、白内障を呈し、いずれも患者の表現型を再現していた。これらのマウスは今後のLSS欠損症の病態解明に有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトLSS欠損症の症状を再現するモデルマウスを作成することができた。またヒトやマウスの皮脂・皮膚を使った代謝産物の解析により本疾患における酵素ブロックの証明に成功した。本研究で作成したモデルマウスを用いた今後の研究によって、LSSが欠損した際の病態メカニズムのさらなる解明及び本症への治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Skin lesions, cataracts, and congenital anomalies have been frequently associated with inherited deficiencies in enzymes that synthesize cholesterol, but most of the enzymes have not been reported in humans yet. We had identified a novel candidate gene, LSS, that encodes an enzyme of the same pathway in siblings with congenital hypotrichosis and multiple malformations. In this study, we attempted to genetically and functionally prove the LSS gene deficiency by generating three types of conditional knockout mice that presented skin barrier dysfunction, transient alopecia, and cataract, respectively, all of which reproduced the patient's phenotype. These mice will be useful for understanding the pathogenesis of LSS deficiency in the future.

研究分野：希少疾患

キーワード：無毛症 コレステロール合成経路 脂質代謝 新規病変遺伝子 コンディショナルノックアウトマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) コレステロール合成経路酵素欠損症では多発奇形に種々の先天性皮膚・毛髪異常を認めるがこの経路の大部分の酵素欠損症はヒトでの報告がない。

コレステロール合成経路はアセチル CoA からコレステロールを合成する経路であり、多くの酵素が関わっている。この経路の酵素欠損症は Smith-Lemli-Opitz 症候群、CHILD 症候群、Conradi-Hünermann-Happle 症候群などが知られているが白内障、種々の多発奇形に加えて、多彩な皮膚症状を呈する。しかしながら、いまだ他の多くのコレステロール合成経路に関わる酵素においてヒトでの欠損症の報告がない。

(2) 多発奇形に先天性無毛症を呈した兄弟例のエクソーム解析から脂質代謝関連酵素をコードする新規候補遺伝子 *LSS* を同定した。

研究代表者は多発奇形に先天性無毛症を呈した兄弟例 (図 1b) のエクソーム解析からコレステロール合成経路酵素をコードする新規候補遺伝子 *LSS* を同定した。患者はミスセンス変異とナンセンス変異による複合ヘテロ接合体であった (図 1a)。患者由来リンパ芽球と強制発現による解析からは同定した変異は機能喪失性と考えられた (図 1g, h)。実際、共同研究者 (仲川) による酵素 *LSS* の基質/産物比は脂質でコントロールと比較して有意に上昇しており (図 1i, j)、これは *LSS* 欠損症患者における世界初の酵素ブロックの証明である。本遺伝子変異によるヒト疾患の報告は白内障のみ (1) で無毛症の症例は未だなかった。

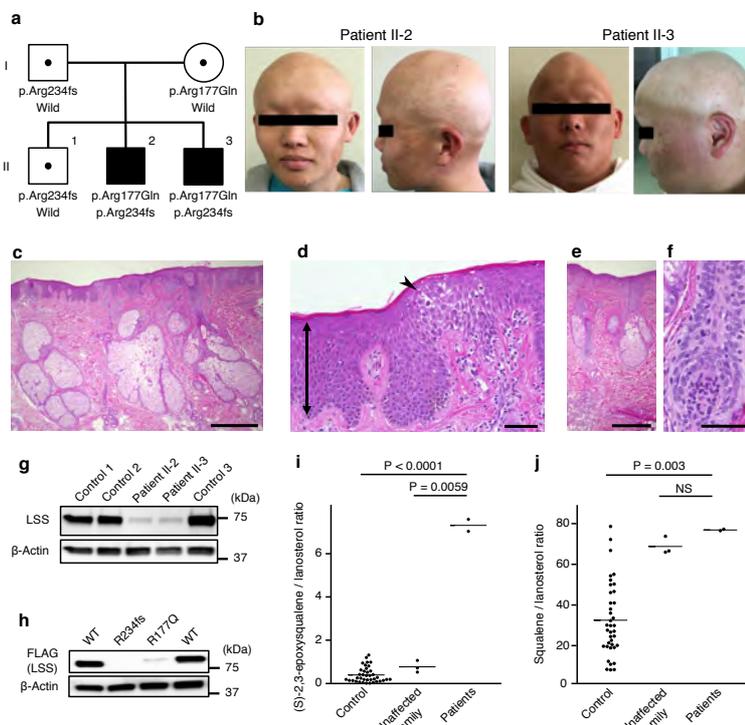


図1. *LSS*欠損症無毛症家系

### 2. 研究の目的

*LSS* 遺伝子が先天性無毛症を伴う多発奇形に関わることを示した後、機序に基づく病因特異的治療を提案する。研究期間内には以下を明らかにすることを目的とした。

- *LSS* 遺伝子の変異を有する先天性無毛症を伴う多発奇形患者が他に存在することを見出す。
- *LSS* 遺伝子改変マウスを作成し、無毛症をきたすかを中心に表現型を解析し、*LSS* 遺伝子の欠損によって患者の表現型が再現されるかを示す。
- 遺伝子変異に対応した抗高脂血症薬による治療は疾患モデルマウスの表現型を改善することを示す。

### 3. 研究の方法

(1) *LSS* 遺伝子の変異を有する先天性無毛症を伴う多発奇形患者が他に存在することを見出す。  
先天性無毛症の遺伝学的解析を行っている機関や国内外の稀少難病エクソームデータ (Matchmaker Exchange など) との照合による同一遺伝子の変異を有する第二の患者を検索する。

(2) *LSS* 遺伝子改変マウスを作成し、無毛症をきたすかを中心に表現型を解析し、*LSS* 遺伝子の欠損によって患者の表現型が再現されるかを示す。

既報からは全身ノックアウトマウスは胎生致死であることが予想されている。まずは実際に胎生致死であるかを確認する。KOMPで購入したマウス系統は *Lss* 遺伝子のエクソンを loxp で挟んだコンディショナル ready であるため、別途購入する皮膚特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと掛け合わせて、皮膚特異的ノックアウトマウスを作成できる。皮膚特異的ノックアウトマウスの生仔が得られた場合は毛の発育や表皮の変化について、LC-MS/MS による皮脂・皮膚組織のコレステロール合成経路の解析や病理学的検討を行う。

- (3) 遺伝子変異に対応した抗高脂血症薬による治療は疾患モデルマウスの表現型を改善することを示す。

#### 4. 研究成果

- (1) *LSS* 遺伝子の変異を有する多発奇形を伴う先天性無毛症症例の検索と変異の証明  
申請者の検索・照会では *LSS* 遺伝子変異のある無毛症症例は同定されなかったが、*Lss* 遺伝子の変異による無毛症症例が平成 30 年度に相次いで報告され (2, 3)、結果として遺伝学的証明がなされた。

- (2) *Lss* 遺伝子改変マウスの作成と表現型解析

- ① 全身ノックアウトマウスは胎生致死であった。皮膚特異的ノックアウトマウス (*Lss<sup>fl/fl</sup>-K14*) は生産であったが新生児期死亡となった。マウス皮膚における (S)-2,3-epoxysqualene/lanosterol (基質/産物) はコントロールと比して有意に増加しており、*Lss* 欠損状態を呈していた (図 2 b)。ひげがみられない (図 2 a) ほか、コントロールと比べ有意に生後体重減少量が多く (図 2 c)、皮膚の組織学的解析ではデスモゾームの低形成を認め (図 2 f)、色素浸透試験 (図 2 d)、経表皮水分蒸散量 (TEWL) の結果 (図 2 e) と合わせて皮膚バリア機能の障害による脱水が新生児期死亡の原因と考えた。

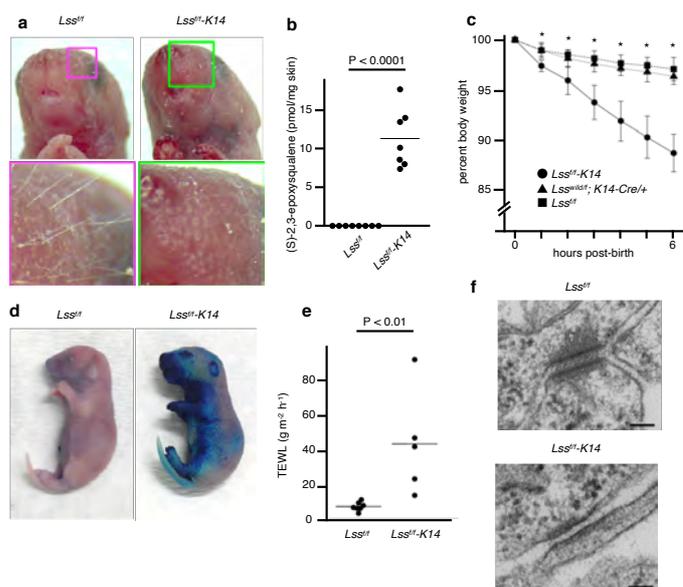


図 2：皮膚特異的ノックアウトマウス (*Lss<sup>fl/fl</sup>-K14*) は皮膚バリア機能の障害により脱水で新生児死亡に至る

- ② 成獣皮膚での *Lss* 欠損の影響を解析するため、タモキシフェン誘導皮膚特異的ノックアウトマウス (*Lss<sup>fl/fl</sup>-K14ERT*) を作成した。皮膚における *Lss* 発現は低下しており (図 3 e)、マウス皮脂における (S)-2,3-epoxysqualene/lanosterol (基質/産物) はコントロールと比して有意に増加していた (図 3 c)。このマウスは一過性の脱毛を呈し (図 3 a, b)、患児の皮膚所見 (図 1 c-f) と類似して表皮肥厚を認め (図 3 d) 患児の表現型を再現した。

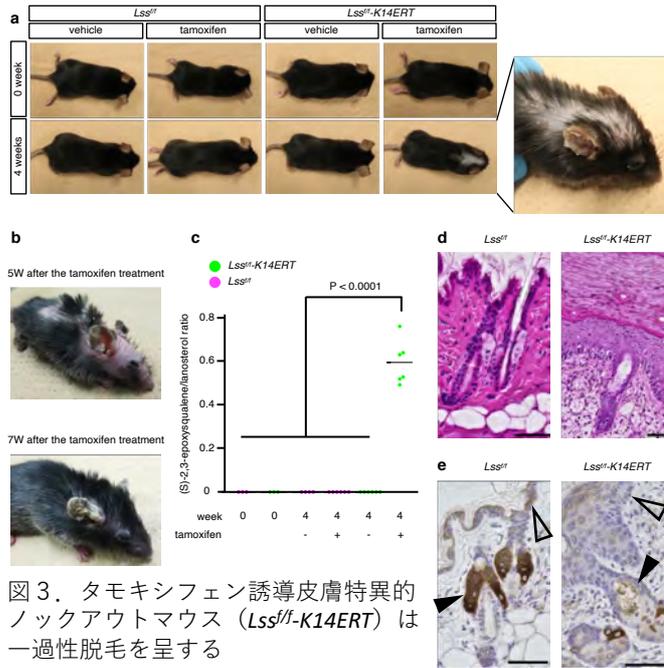


図3. タモキシフェン誘導皮膚特異的ノックアウトマウス ( $Lss^{fl/f}$ -K14ERT) は一過性脱毛を呈する

- ③ 前述のように *LSS* 遺伝子の変異を持つ白内障症例は報告されていた。そこでレンズ特異的ノックアウトマウス ( $Lss^{fl/f}$ -*PAX6*) を作成した。このマウスは白内障を呈しており (図4)、ヒトでの報告と合致していた。

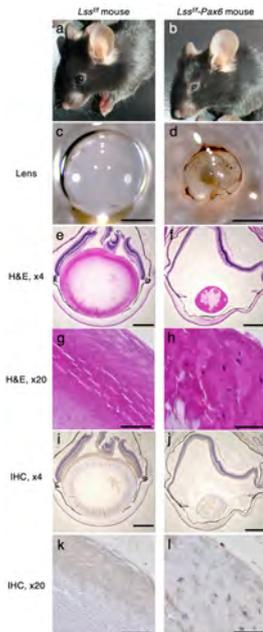


図4. レンズ特異的ノックアウトマウス ( $Lss^{fl/f}$ -*PAX6*) は白内障を呈する

④ *LSS* 欠損症の病態メカニズムを考察するために、コレステロール合成経路と *SHH* や *WNT* シグナリングの関連が指摘されていることをヒントにこれらの経路の制御不全が *Lss* 欠損で起こっているかを調べた。マウス胎児線維芽細胞では、これらの経路の転写応答には有意な変化が見られなかった。今後、空間的・勾配的な *SHH* または *WNT* シグナル伝達の解析が必要かもしれない。

(3) 遺伝子変異に対応した抗高脂血症薬による治療の試み

(2) で作成したタモキシフェン誘導皮膚特異的ノックアウトマウスに対して、ラノステロールないし抗高脂血症薬 (スタチン) の内服ないし外用療法を試みた。タモキシフェン誘導による皮膚病変はこれらの介入によって差異はなく、病態特異的治療のため、さらなるプロトコルの試行が必要と考えられた。

- (4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

上記に提示した本研究の成果をまとめ査読付き国際オープンアクセスジャーナル *PLOS Genetics* に投稿し、出版された(4)。*LSS* 欠損症が研究代表者が把握していた無毛症を起こすことは研究期間中に海外から複数の報告があり(2,3)、研究代表者の仮説を裏付ける形となった。一方、これらの報告では酵素ブロックについては血清や血漿を用いて試みられているものの証明に至らず、我々の油脂の解析が世界初となった。また、モデル動物については我々のマウスが無毛症・白内障ともに現時点において唯一の報告であり、多様な表現型を示す *LSS* 欠損症の今後の病態解明 (病態特異的治療法開発を含む) において、有力なツールとなることが期待される。

#### <引用文献>

1. Zhao L, Chen X-J, Zhu J, Xi Y-B, Yang X, Hu L-D, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*. Nature Publishing Group; 2015 Jul

30;523(7562):607-11.

2. Romano MT, Tafazzoli A, Mattern M, Sivalingam S, Wolf S, Rupp A, et al. Bi-allelic Mutations in LSS, Encoding Lanosterol Synthase, Cause Autosomal-Recessive Hypotrichosis Simplex. *Am J Hum Genet.* 2018 Nov 1;103(5):777-85.
3. Besnard T, Sloboda N, Goldenberg A, Küry S, Cogné B, Breheret F, et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene LSS involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome. *Genet Med.* Nature Publishing Group; 2019 Feb 6;24:806.
4. Wada Y, Kikuchi A (責任著者), Kaga A, Shimizu N, Ito J, Nakagawa K, et al. Metabolic and pathologic profiles of human LSS deficiency recapitulated in mice. Engelking L, editor. *PLoS Genet.* Public Library of Science; 2020 Feb 26;16(2):e1008628.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Yoichi, Kikuchi Atsuo, Kaga Akimune, Shimizu Naoki, Ito Junya, Onuma Ryo, Fujishima Fumiyo, Totsune Eriko, Sato Ryo, Niihori Tetsuya, Shirota Matsuyuki, Funayama Ryo, Sato Kota, Nakazawa Toru, Nakayama Keiko, Aoki Yoko, Aiba Setsuya, Nakagawa Kiyotaka, Kure Shigeo	4. 巻 16
2. 論文標題 Metabolic and pathologic profiles of human LSS deficiency recapitulated in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	仲川 清隆  (Nakagawa Kiyotaka)  (80361145)	東北大学・農学研究科・教授   (11301)	