

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08269

研究課題名(和文) 多面的アプローチによる外胚葉形成不全症の発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathomechanisms for ectodermal dysplasia with a multilateral approach

研究代表者

下村 裕 (Shimomura, Yutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70397107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：外胚葉形成不全症(ED)の発症機構をin vitroレベルで明らかにすることを主な目的として本研究を実施した。まず、低汗性外胚葉形成不全症(HED)の家系の解析で新規の遺伝子変異を同定した。次に、HEDの原因遺伝子であるEDARとEDARADD遺伝子について詳細な解析を行った結果、優性遺伝型のEDARとEDARADDの変異型蛋白は野生型蛋白に対してdominant-negative効果を発揮することを証明した。また、劣性遺伝型のEDARとEDARADD変異は機能喪失型であることも明らかにした。さらに、別のEDの原因遺伝子であるWNT10Aの変異についても機能を喪失することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、これまでほとんど解明されていなかったEDARとEDARADD遺伝子変異による低汗性外胚葉形成不全症、およびWNT10A遺伝子変異による外胚葉形成不全症の発症機構をかなり明らかにすることができた。これらの疾患は、発汗低下や歯の低形成などの症状により、患者の生活の質を著しく低下させる。現在、欧米においては疾患の発症を胎生期の段階で抑制するような画期的な治療法に関する研究が進められており、本研究の成果は、本邦においても新規の治療法の開発に向けた研究を行う上で重要な知見を提供しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed this study mainly to reveal the molecular basis of ectodermal dysplasia at in vitro levels. First, we identified a novel mutation in a family with hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED). Then, we conducted detailed analyses for EDAR and EDARADD genes of which mutations were causative for HED. We proved that dominantly-inherited mutant proteins of EDAR and EDARADD genes showed a dominant-negative effect against wild-type proteins. In addition, we revealed that recessively-inherited mutations in these genes lost their functions. Furthermore, we demonstrated that mutations in WNT10A gene, a causative gene for another form of ectodermal dysplasia, behaved in a loss-of-function manner.

研究分野：皮膚科学

キーワード：外胚葉形成不全症 EDA EDAR EDARADD WNT10A

### 1. 研究開始当初の背景

過去 20 年間の研究成果によって外胚葉形成不全症の疾患原因遺伝子が数多く同定されたが、原因遺伝子の機能、遺伝子間の機能的関連性や変異が発現・機能に及ぼす影響については未解明な部分が多く、また、原因遺伝子が未知の疾患も残されている。例えば、低汗性外胚葉形成不全症 (hypohidrotic ectodermal dysplasia: HED) は、*EDA*、*EDAR* または *EDARADD* 遺伝子の変異によって発症することが判明している。過去の研究で *EDA* 遺伝子変異による発症機構はほぼ解明されている一方で、*EDAR* と *EDARADD* の変異による発症機構に関する知見は乏しい。また、*WNT10A* 遺伝子変異によって発症することが知られている *odonto-onycho-dermal dysplasia* (OODD) についても、変異型 *WNT10A* に関する発現・機能解析は行われていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、HED と OODD を主な対象とし、それらの原因遺伝子がコードする蛋白についてさまざまな発現・機能解析を *in vitro* レベルで施行することで、原因遺伝子の変異による発症機構をできる限り明らかにすることを目的とする。さらに、患者・家系の試料を用いた遺伝子解析も並行して行う。本研究を通じ、複雑な外胚葉形成不全症の発症機構についての貴重な新知見が得られるとともに、ヒトにおける外胚葉の発生・分化機構の解明や治療薬の開発に向けた新たな標的分子の同定などにも貢献できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

- (1) 山口大学医学部附属病院を受診した外胚葉形成不全症の患者・家系について、書面を用いたインフォームド・コンセント後に末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出する。それを用いて既知の疾患原因遺伝子を解析し、変異が同定されなかった場合はエクソーム解析で新規の原因遺伝子を検索する。なお、本研究は本学倫理委員会の承認を得ている (遺伝性皮膚疾患の病因・病態解明に関する研究: 承認番号 H2019-083)。
- (2) *EDAR*、*EDARADD* および *WNT10A* について、野生型および変異型蛋白の発現ベクターを作製する。
- (3) 作製した発現ベクターを培養細胞 (HEK293T) にトランスフェクションして過剰発現させ、各蛋白の発現パターンを western blot (WB) 法と免疫染色法で解析する。
- (4) *EDAR* と *EDARADD* に関しては、HEK293T 細胞での過剰発現系において NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを、*WNT10A* に関しては同様の過剰発現系で TOP/FOPFlash レポーターアッセイを行い、下流のシグナルの活性化について解析する。
- (5) 関連する蛋白との結合能を検討するために、HEK293T 細胞での過剰発現系において免疫沈降法を施行する。

### 4. 研究成果

#### (1) HED の家系の解析

本研究期間に山口大学医学部附属病院を受診した HED の家系について遺伝子解析を実施した結果、家系内の 2 名の患者の *EDA* 遺伝子に新規の病的変異を同定した。興味深いことに、2 名 (兄弟) の臨床所見には差異があり、環境因子の関与や疾患修飾遺伝子の存在などが示唆された (引用文献 1)。

#### (2) *EDAR* 遺伝子の優性変異による低汗性外胚葉形成不全症の発症機構の解明

現在までに、常染色体優性型 HED の原因として約 10 種類の *EDAR* 遺伝子変異が報告されているが、いずれも *EDAR* の death domain 内に生じたミスセンス変異または早期終止コドン変異である。本研究では、これらの優性変異の中で、*EDAR* 遺伝子の最終エクソンに存在し、コドン 398 で早期終止コドンを生じる変異 (p.F398\*) に焦点を絞って解析を行った。

まず、野生型と変異型の *EDAR* の発現ベクターを HEK293T 細胞に過剰発現させて NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを行った結果、野生型 *EDAR* は著しくルシフェラーゼを活性化したが、一方で p.F398\* 変異型 *EDAR* は活性化しなかった。更に野生型と変異型 *EDAR* の共発現系では、変異型 *EDAR* の量を増やした場合のみ、野生型 *EDAR* によって誘導されたルシフェラーゼ活性を有意に低下させた (図 1a)。次に、*EDAR* に加えて *EDARADD* を共発現させた系で同アッセイを行ったところ、変異型 *EDAR* は野生型 *EDAR* によって誘発されたルシフェラーゼ

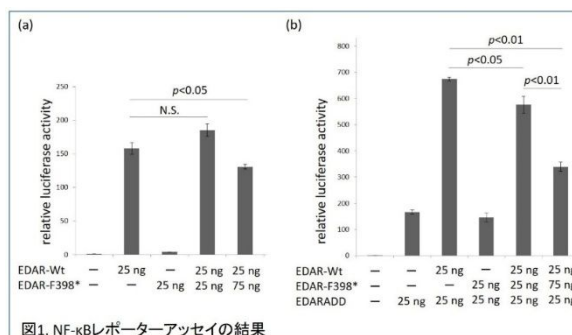


図1. NF- $\kappa$ Bレポーターアッセイの結果

活性をより顕著に抑制した(図1b)。したがって、変異型 EDAR は野生型 EDAR に対して dominant-negative 効果を発揮することが強く示唆された。

続いて、EDARADD との結合能を免疫沈降法で解析した結果、変異型 EDAR は EDARADD との結合能を完全に喪失することがわかった(図2)。

最後に、レポーターアッセイで示唆された dominant-negative 効果のメカニズムをさらに解明するために、HEK 293T 細胞において追加の免疫沈降法を施行した結果、p.F398\*変異型 EDAR は野生型 EDAR と EDARADD 間の相互作用を変異型 EDAR タンパクの用量依存的に妨げた(図3)。過去の研究で、EDAR は細胞膜上で 3 量体を形成することがわかっているが、我々の解析結果より、野生型と p.F398\*変異型 EDAR のヘテロ三量体は EDARADD との親和性が減少すると予想され、その結果 NF- $\kappa$ B の活性化を減少させ HED を生じると考えられた(図4)(引用文献2)。

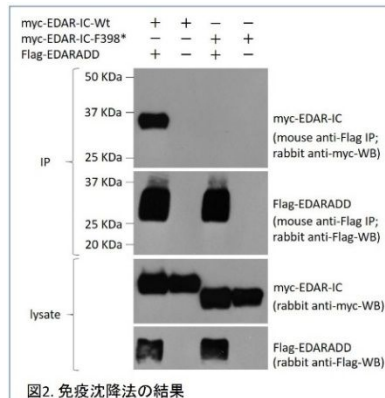


図2. 免疫沈降法の結果

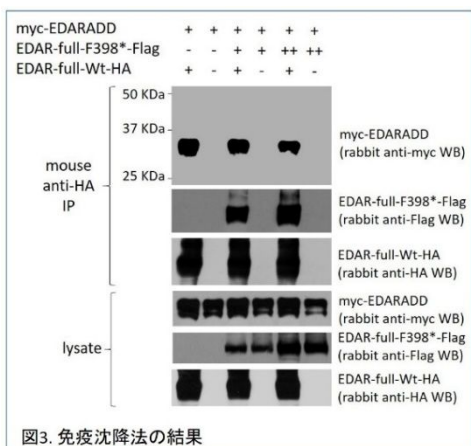


図3. 免疫沈降法の結果

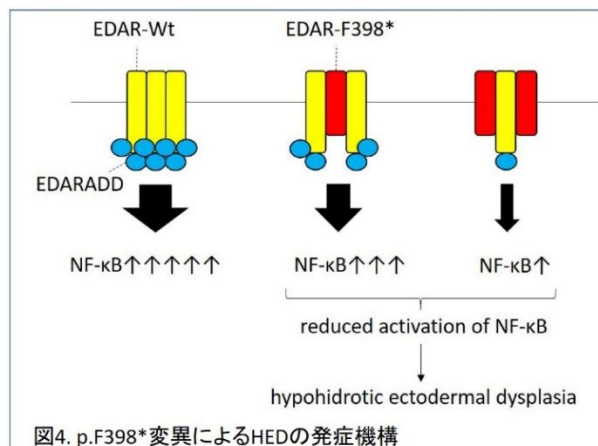


図4. p.F398\*変異によるHEDの発症機構

### (3) EDAR 遺伝子の劣性変異による低汗性外胚葉形成不全症の発症機構の解明

本研究では、過去に EDAR 蛋白の death domain 内に同定された 4 種類の変異 (p.R358Q, p.G382S, p.I388T, p.T403M) について発現・機能解析を行った。

まず、野生型と変異型の EDAR をそれぞれ HEK293T 細胞に過剰発現させて WB 法を行った結果、抗 EDAR 抗体を用いた WB において、2 種類の変異型 EDAR (p.R358Q, p.T403M) で予想される分子量よりも大きいバンドが検出された(図5)。次に、抗 EDAR 抗体と抗 pan-cadherin 抗体を用いた免疫 2 重染色を行ったところ、野生型、p.G382S および p.I388T は細胞質内に、p.R358Q と p.T403M は細胞膜に主に局在していた(図6)。過剰発現系での NF- $\kappa$ B レポーターアッセイでは、4 種類の変異すべてが野生型よりも NF- $\kappa$ B 活性が有意に低下していたが、p.G382S と p.I388T による低下は軽度だった(図7)。最後に、EDARADD との結合能について免疫沈降法で検討した結果、p.R358Q と p.T403M は完全に EDARADD との結合能を喪失していた一方で、p.G382S と p.I388T は野生型 EDAR より劣るものの EDARADD との結合が認められた(図8)。以上の結果から、常染色体劣性遺伝形式の HED の原因として報告された変異型 EDAR の種類によって、その機能低下の程度が異なることが判明した。さらに、今回の研究で認めた各変異の動態と過去の論文に報告されている臨床所見との間に相関関係があることが示唆された。本研究の成果は 2020 年度に開催された第 28 回日本発汗学会総会と第 45 回日本研究皮膚科学会で報告し、現在論文を作成中である。

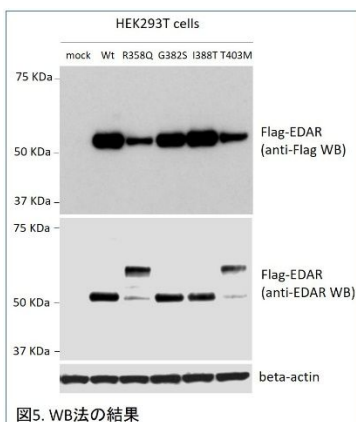


図5. WB法の結果

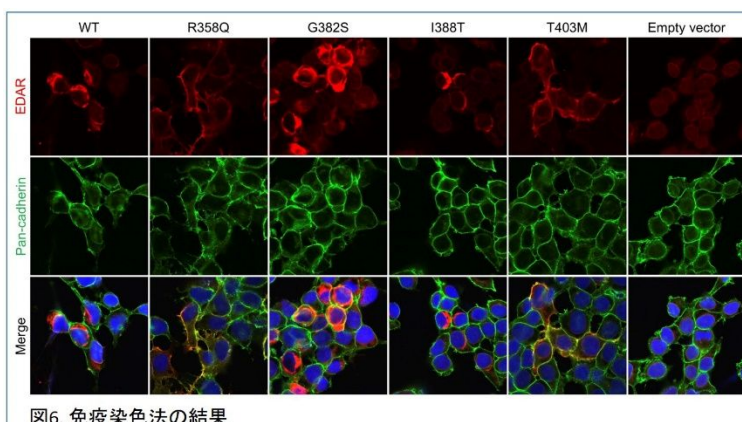


図6. 免疫染色法の結果

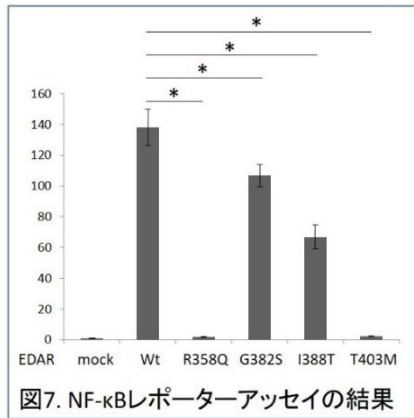


図7. NF-κBレポーターアッセイの結果

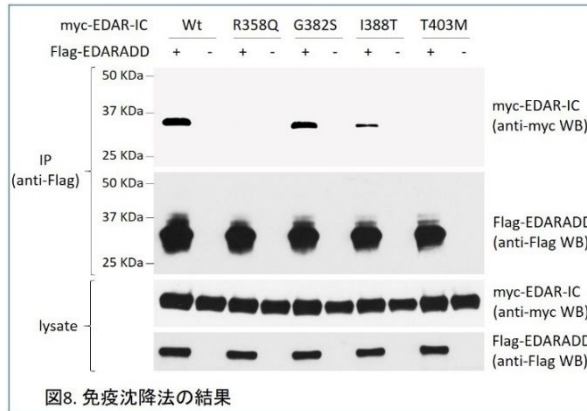


図8. 免疫沈降法の結果

#### (4) EDARADD 遺伝子変異による低汗性外胚葉形成不全症の発症機構の解明

EDARADD 遺伝子変異による HED の発症機序を明らかにするために、3 種類の優性遺伝型変異 (p.D120Y, p.L122R, p.D123N) と 1 種類の劣性遺伝型変異 (p.E152K) について培養細胞レベルで詳細な解析を行った。いずれの変異も EDARADD 蛋白の death domain 内または近傍に生じたミスセンス変異である (図 9a)。

まず、野生型または変異型 EDARADD をシンプルに HEK293T 細胞に過剰発現させた系で NF-κB レポーターアッセイを行った結果、いずれの変異型 EDARADD も野生型よりも有意に NF-κB 活性が低下していた (図 9b)。EDAR との共発現系でも同様の結果であり (図 9c)、特に優性遺伝型の変異では機能喪失の程度が顕著であることが示唆された。

次に、変異型 EDARADD が野生型 EDARADD の機能に及ぼす影響を検討するために、EDAR との共発現系において NF-κB レポーターアッセイを行った結果、優性遺伝型の 3 種類の変異型 EDARADD は野生型 EDARADD によって生じた NF-κB の活性化を若干ではあるが統計学的有意差を持って低下させることがわかった (図 10)。

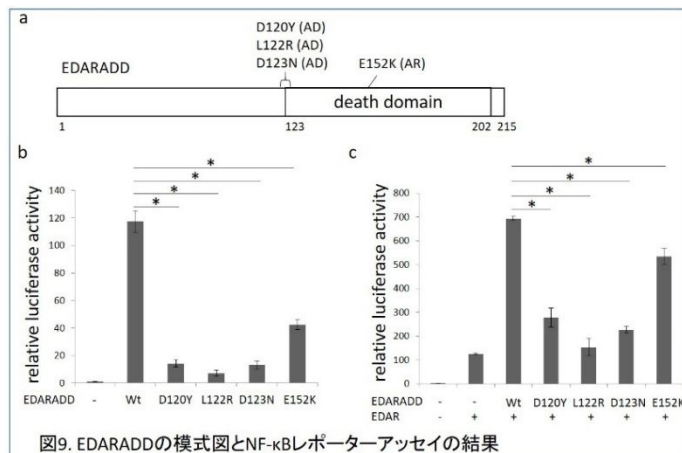


図9. EDARADDの模式図とNF-κBレポーターアッセイの結果

したがって、優性遺伝型の変異型 EDARADD は野生型 EDARADD に対して dominant-negative 効果を発揮していることが示唆された。一方、劣性遺伝型の変異型 EDARADD は野生型 EDARADD の機能に影響を及ぼしていないとみられた (図 10)。

次に、変異型 EDARADD が EDAR および野生型 EDARADD との結合に及ぼす影響について免疫沈降法で検討した結果、いずれの変異型 EDARADD も EDAR および野生型 EDARADD との結合能を維持していることが示された (図 11)。

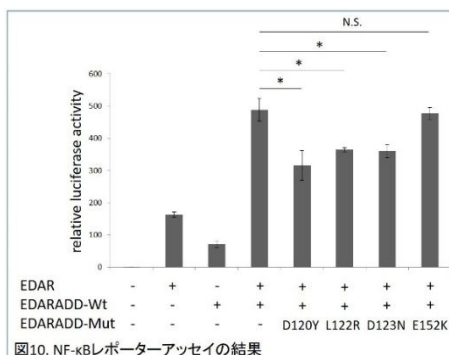


図10. NF-κBレポーターアッセイの結果

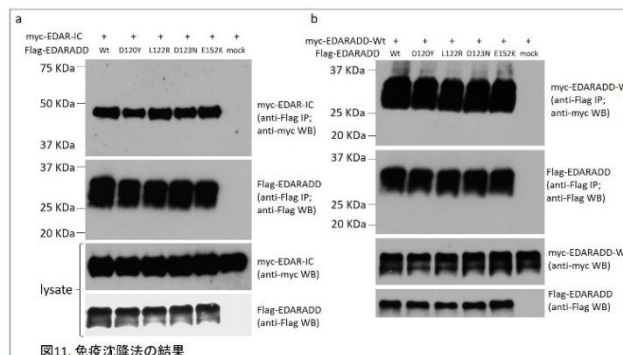


図11. 免疫沈降法の結果

続いて、野生型 EDARADD と EDAR との結合が変異型 EDARADD によって影響を受けているかどうかを検討するために免疫沈降法を行った結果、3 種類の優性遺伝型の変異型 EDARADD は、いずれも野生型 EDARADD が EDAR と結合する効率を下げていることが示された (図 12)。

以上の結果から、優性遺伝型の変異型 EDARADD は野生型 EDARADD が EDAR と結合することを阻害することで dominant-negative 効果を発揮し、劣性遺伝型の変異型 EDARADD は優性遺伝型の変異型 EDARADD

よりも機能低下の程度は弱い、ホモ接合型の状態では HED を発症すると予想される。

現在、EDARADD 変異の解析結果については、欧米誌に投稿中である。(Asano/Shimomura et al. J Dermatol, under revision)。

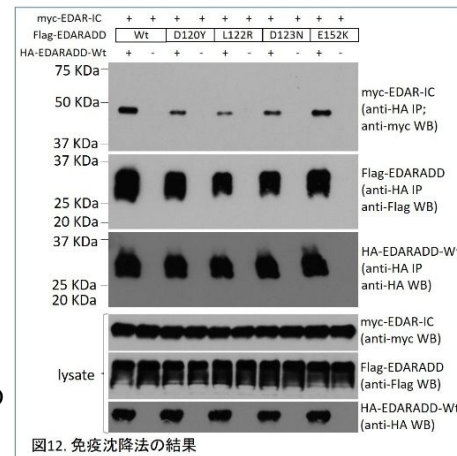


図12. 免疫沈降法の結果

#### (5) WNT10A 遺伝子の劣性変異による OODD の発症機構の解明

本研究では、過去に報告された 3 種類の WNT10A 遺伝子のミスセンス変異 (p.V145M, p.F228I, p.R360C) について培養細胞レベルで解析を行った。

まず、野生型または変異型の WNT10A を HEK293T 細胞に過剰発現させ、細胞内および培養液中での発現量を WB 法で検討した。その結果、いずれの変異型 WNT10A も細胞内で野生型と同様に発現し、さらに細胞外への分泌も野生型と同様に認められた (図 13)。したがって、変異によって蛋白の不安定性や分泌異常は呈さないことが示唆された。一方、WNT10A の受容体 (FZD8) と共受容体 (LRP5) を共発現させた系で TOP/FOPFlash レポーターアッセイを行った結果、全ての変異型 WNT10A 蛋白は下流のシグナルの活性化能を著しく喪失していることが示された (図 14)。しかしながら、これまでに我々が行った追加の解析では、変異型 WNT10A は FZD8 と LRP5 との結合能を野生型と遜色なく維持しているというデータが得られており、機能を喪失する具体的な機序は未解明であることから、今後の更なる検討を要する。

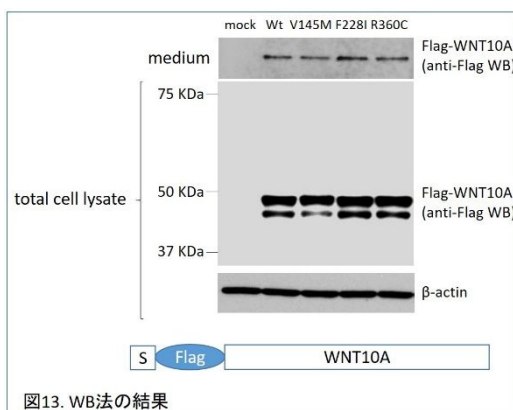


図13. WB法の結果

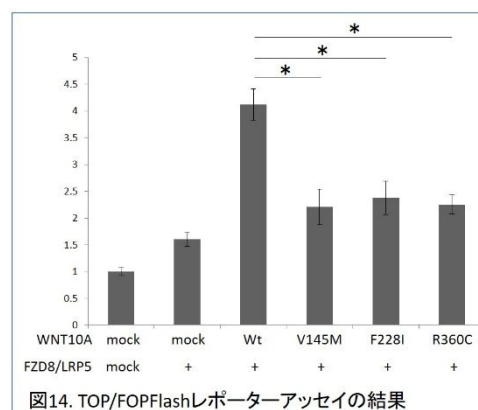


図14. TOP/FOPFlashレポーターアッセイの結果

#### <引用文献>

- 1) Okita T, Yamaguchi M, Asano N, Yasuno S, Kashiwagi K, Shimomura Y. Two Japanese families with hypohidrotic ectodermal dysplasia: Phenotypic differences between affected individuals. J Dermatol. 2019; 46(3):e99-e101. doi: 10.1111/1346-8138.14606.
- 2) Okita T, Asano N, Yasuno S, Shimomura Y. Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia. J Dermatol. 2019; 46(8):710-715. doi: 10.1111/1346-8138.14983.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okita Tomoko, Asano Nobuyuki, Yasuno Shuichiro, Shimomura Yutaka	4. 巻 46
2. 論文標題 Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 710～715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下村 裕	4. 巻 2
2. 論文標題 免疫異常を呈する遺伝性毛髪疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本皮膚免疫アレルギー学会雑誌	6. 最初と最後の頁 252～256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下村 裕	4. 巻 80
2. 論文標題 遺伝性毛髪疾患（前編）	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 西日本皮膚科	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下村 裕	4. 巻 80
2. 論文標題 遺伝性毛髪疾患（後編）	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 西日本皮膚科	6. 最初と最後の頁 239-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okita T, Yamaguchi M, Asano N, Yasuno S, Kashiwagi K, Shimomura Y	4. 巻 46
2. 論文標題 Two Japanese families with hypohidrotic ectodermal dysplasia: Phenotypic differences between affected individuals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e99-e101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yutaka Shimomura
2. 発表標題 Scalp lesions of congenital hair diseases
3. 学会等名 World Congress for Hair Research 2019 (Barcelona, Spain) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 発汗異常を伴う遺伝性疾患
3. 学会等名 第27回日本発汗学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Shimomura
2. 発表標題 Genetic Skin Diseases
3. 学会等名 14th Annual Congress of Dermatology (Beirut, Lebanon) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 遺伝性毛髪疾患のアップデート
3. 学会等名 第152回日本皮膚科学会徳島地方会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 毛髪疾患の病態と治療
3. 学会等名 第31回福岡県臨床皮膚科医会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 遺伝性角化異常症～毛髪疾患を中心に～
3. 学会等名 第143回日本皮膚科学会広島地方会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 先天性毛髪疾患と毛包の加齢
3. 学会等名 第15回加齢皮膚医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年



〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------