

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08347

研究課題名(和文)脂質関連遺伝子の異常による先天性毛髪疾患の病態解析

研究課題名(英文)Analysis of hair disorders caused by mutations in lipid-related genes

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LSS遺伝子変異に関するgenotype-phenotype correlationを明らかにするために、野生型と6種類の変異型LSS(G12D, R177Q, V487E, P549L, W581R, T705K)について培養細胞での過剰発現系で発現・機能解析を行ったが、変異型蛋白間で明確な差異は認められなかった。LSS遺伝子変異により、毛包のミニチュア化や毛小皮の異常が認められ、同遺伝子異常が重篤な毛髪成長障害をきたすことが示唆された。また、SREBF1やPLCD1のような脂質関連遺伝子の異常によって先天性毛髪疾患や毛包系腫瘍が発症することが再確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、LSS遺伝子変異に関するgenotype-phenotype correlationを明確にする知見を得ることはできなかったが、同遺伝子変異による毛髪異常の特徴はかなり明らかになり、診断を決定する際の一助になると思われる。また、SREBF1、PLCD1はともに脂質関連遺伝子であり、それらの異常が先天性毛髪疾患や毛包系腫瘍の発症に関与していることが改めて示された。特に、PLCD1遺伝子におけるmonoallelic two hitsという現象は腫瘍の発生過程としては極めてまれな現象である。本研究は、脂質関連遺伝子の毛包における役割や重要性を解き明かす足がかりになったと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed detailed expression and functional studies in cultured cells in order to disclose genotype-phenotype correlations for LSS gene mutations, which have been reported to underlie several distinct diseases. We overexpressed wild-type and a total of 6 LSS gene mutants (G12D, R177Q, V487E, P549L, W581R, T705K) in cultured cells and analyzed their expression patterns and the ability to generate lanosterol. However, we did not find obvious differences in either expression or function between the LSS gene mutations analyzed. Nevertheless, we were able to further characterize the hair shaft anomalies resulting from LSS gene mutations. In addition, we reconfirmed that mutations in SREBF1 and PLCD1 genes underlie a congenital hair disorder and a familial hair follicle-derived tumor, respectively. Our data further highlight that lipid-related genes are involved in causing various hair disorders in humans.

研究分野：皮膚科学

キーワード：脂質関連遺伝子 LSS 乏毛症 PLCD1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩によって、毛包に発現する遺伝子の異常(変異)が様々な先天性毛髪疾患の原因であることが判明してきている。その中で、脂質メディエーター関連蛋白をコードする *LIPH* または *LPAR6* 遺伝子の変異によって先天性縮毛症・乏毛症を発症することが明らかになったことで、ヒト毛包の分化・毛髪の成長における脂質の役割が注目された。さらに近年、lanosterol synthase (*LSS*) 遺伝子の劣性変異によって hypotrichosis simplex という非症候性の先天性乏毛症を発症することが報告された。*LSS* 蛋白はコレステロールの合成経路において 2,3-Oxidosqualene から Lanosterol の合成を触媒する酵素であり、毛包の分化過程における脂質関連遺伝子の重要性がさらに示された極めて興味深い新知見である。特記すべきことに、本研究の研究代表者らは、日本人の hypotrichosis simplex の 2 家系の遺伝子解析で、*LSS* 遺伝子に病的変異を同定している。患者は頭部全体に極めて容易に抜去可能な 2~3 mm の軟毛しか生えず、全身の毛髪も疎である。また、抜去した頭髪を走査顕微鏡または光学顕微鏡で観察すると、著しくミニチュア化した成長期毛包だった。すなわち、*LSS* 遺伝子変異によって患者の毛包の毛周期が異常に短縮していることが強く示唆された。*LSS* 遺伝子は、hypotrichosis simplex だけでなく、先天性白内障、精神発達遅滞を伴う先天性乏毛症および成長障害を伴う先天性乏毛症の原因であることが知られている。つまり、*LSS* 遺伝子変異によって 4 種類の異なる疾患を発症しうる。しかしながら、明確な genotype-phenotype correlation はないとみられ、どのようなタイプの変異が各疾患を引き起こすのかは未解明である。また、*LSS* 遺伝子に変異を有する患者の頭髪の、より詳細な形態学的観察や分子レベルでの検討は行われていないのが現状である。さらに、*LIPH*、*LPAR6*、*LSS* 以外の脂質関連遺伝子の変異によって発症する先天性毛髪疾患の存在も示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、*LSS* 遺伝子変異が発現・機能に及ぼす影響を in vitro レベルで明らかにするとともに、患者の毛包で起きている変化を in vivo レベルで解明することを目的とする。さらに、*LSS* 遺伝子変異による乏毛症と類似した毛髪異常を呈するが *LSS* 遺伝子に変異を持たない患者・家系についてゲノム解析を行い、新規の原因遺伝子の同定も目指す。これらの研究を通じ、脂質関連遺伝子のヒト毛包の分化過程における役割がさらに明らかになり、毛髪疾患の新規治療薬の開発に向けた標的分子の同定などにつながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞での発現・機能解析

野生型および 6 種類の変異型 *LSS* の発現ベクター (C 末端に Flag-tag を導入) を HEK293T 細胞に過剰発現させ、24 時間後に細胞溶解液を回収し、抗 *LSS* 抗体と抗 beta-actin 抗体を用いた western blot (WB) 法を行った。次に、同様の過剰発現系で、抗 Flag 抗体と抗 calnexin 抗体を用いた免疫染色法 (蛍光抗体間接法) を行った。さらに、各 *LSS* を過剰発現させた培養細胞から、いわゆる Bligh & Dryer Method で脂質を抽出し、LC-MS 解析を施行した (各実験の詳細は省略)。

(2) 患者毛髪の観察

LSS 遺伝子の両アレルに病的変異が同定された患者 1 名の抜去した頭髪を gold coating した後、走査電子顕微鏡で観察した。

(3) 遺伝子解析

LIPH、*LPAR6*、*LSS* を含む既知の遺伝子の変異が除外された先天性毛髪疾患 (単純型乏毛症、連珠毛、家族性外毛根鞘嚢腫) の家系のメンバーの末梢血 DNA を用いてエクソーム解析を行い、MAF<0.01 のバリエーションに着目しながら各家系の疾患原因遺伝子の候補を抽出した。必要に応じて、サンガー法で確認し、さらに RT-PCR 法で遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 発現・機能解析の結果

野生型と 6 種類の変異型 *LSS* (G12D, R177Q, V487E, P549L, W581R, T705K) の培養細胞での発現量を WB 法で検討した結果、3 種類の変異型 *LSS* (R177Q, V487E, P549L) が野生型 *LSS* と比較して発現量が軽度低下していた (図 1)。続いて、細胞内での発現パターンを解析するために免疫染色法を実施したが、野生型および全ての変異型 *LSS* は主に小胞体に発現が認められ、それらの発現パターンに明らかな違いは認められなかった (図 2)。さらに、LC-MS 解析で lanosterol の合成能を測定したが、解析した全ての変異型 *LSS* で、野生型と比較して同様に lanosterol の合成能の低下が認められ、変異間で有意差はなかった。

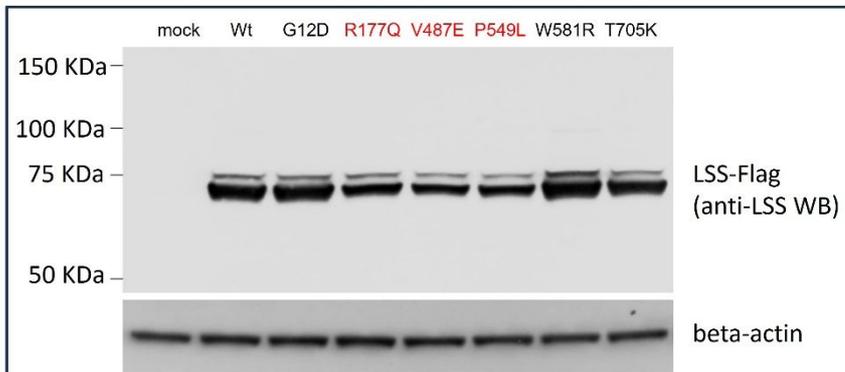


図1. Western blot (WB)法の結果
3種類の変異型LSS蛋白(赤字)で明らかな発現量の低下が認められた。

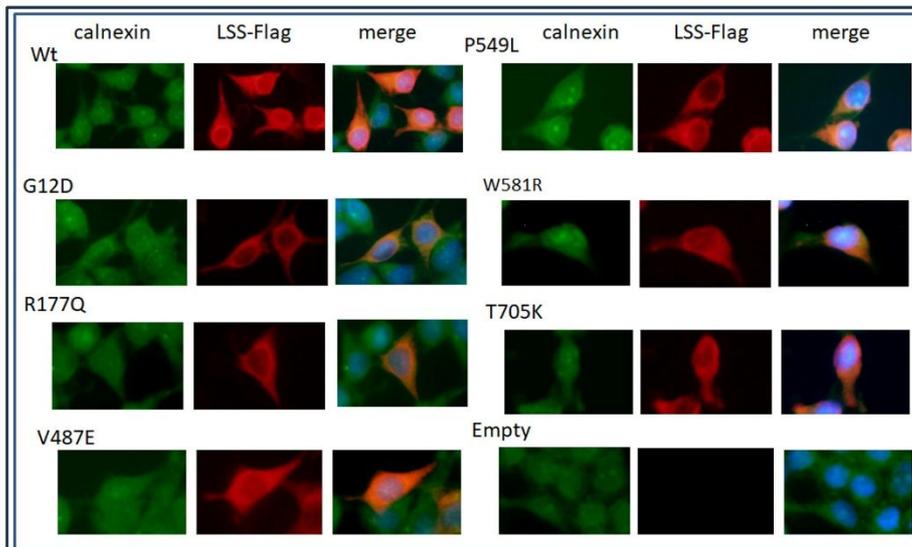


図2. 培養細胞での免疫染色の結果
抗Flag抗体と抗calnexin抗体(小胞体)との2重染色の結果、野生型および全ての変異型LSS蛋白が主に小胞体に発現しており、局在に明らかな差異は認められなかった。

(2) LSS 遺伝子変異を有する患者の頭髪の観察結果

LSS 遺伝子に変異を有する患者の頭髪は異常に細く、毛包のミニチュア化が改めて示唆された。さらに、毛小皮が脆弱ではがれやすく、毛髪の表面は粗造で、頻繁に長軸方向に溝が認められた。

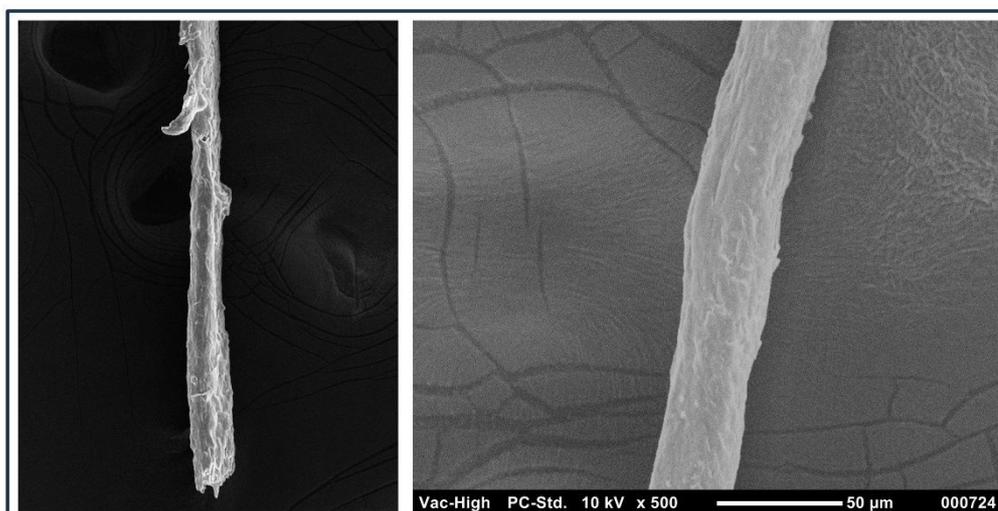


図3. LSS遺伝子変異を有する患者の頭髪の走査電子顕微鏡での所見
毛包の著しいミニチュア化と粗造な毛小皮が観察された。

(3) 遺伝子解析の結果

単純型乏毛症の家系の解析では、エクソーム解析で原因遺伝子の同定には至らなかったが、連珠毛の家系の解析では、*SREBF1* 遺伝子に病的と考えられるミスセンスバリエーションがヘテロ接合型で同定された。培養細胞での発現解析で、同バリエーションによって *SREBF1* 遺伝子がコードする SREBP-1 蛋白が核内に移行できなくなることが確認された。

家族性外毛根鞘嚢腫の解析では、患者の末梢血 DNA の *PLCD1* 遺伝子にミスセンスバリエーション p.S460L がヘテロ接合型で同定された(図 4a)。また、患者の外毛根鞘嚢腫から抽出した DNA を用いた解析で、末梢血 DNA には存在していなかったミスセンスバリエーション p.S745L が同定された(図 4b)。さらに、患者の外毛根鞘嚢腫から total RNA を抽出して RT-PCR 法で *PLCD1*-cDNA を増幅し、ベクターに組み込んでサンガー法で解析した結果、p.S745L は p.S460L アレル上に生じていることが判明した(図 4c, d)。つまり、*PLCD1* 遺伝子への second hit (p.S745L) が first hit (p.S460L) の起きたアレル上に生じていることが明らかになった(図 4e)。

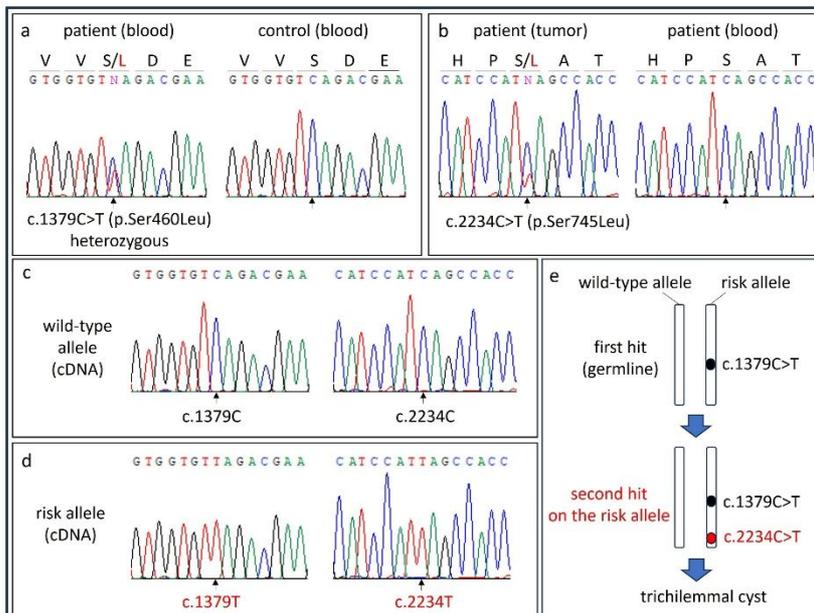


図4. 家族性多発外毛根鞘嚢腫の家系の遺伝子解析の結果

脂質関連遺伝子である *PLCD1* に germline level でミスセンスバリエーションがあり (a) (risk allele)、腫瘍内では risk allele 上にもう一つのミスセンスバリエーションが生じていることが証明された (b-e)。

[考察]

本研究では、*LSS* 遺伝子変異に関する genotype-phenotype correlation を明確にする知見を得ることはできなかったが、同遺伝子変異による毛髪異常の特徴はかなり明らかになり、診断を決定する際の一助になると思われる。また、*SREBF1*、*PLCD1* はともに脂質関連遺伝子であり、それらの異常が先天性毛髪疾患や毛包系腫瘍の発症に関与していることが改めて示された。特に、*PLCD1* 遺伝子における monoallelic two hits という現象は腫瘍の発生過程としては極めてまれな現象であり興味深い知見である。本研究は、脂質関連遺伝子の毛包における役割や重要性を解き明かす足がかりになったと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3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 駄阿也真人、青山裕美、下村 裕	4. 巻 22
2. 論文標題 縮毛症との鑑別を要したMarie-Unna型遺伝性乏毛症の1例	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Visual Dermatology	6. 最初と最後の頁 1161-1163
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 22
2. 論文標題 正常な毛包の特徴を踏まえて脱毛症を理解しよう	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Visual Dermatology	6. 最初と最後の頁 1098-1102
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 Shimomura Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular Basis of Hereditary Hair Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2302/kjm.2023-0007-IR	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 -

1. 著者名 下村 裕	4. 巻 2
2. 論文標題 皮膚症状からみる遺伝子解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 皮膚科	6. 最初と最後の頁 513-519
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 Shimomura Yutaka	4. 巻 49
2. 論文標題 Welcome to the hair world!	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 3~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16234	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 Hayashi Ryota, Shimomura Yutaka	4. 巻 49
2. 論文標題 Update of recent findings in genetic hair disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 55~67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16204	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 43
2. 論文標題 遺伝性毛髪疾患の形態学および遺伝学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 皮膚病診療	6. 最初と最後の頁 882~888
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yutaka Shimomura
2. 発表標題 Let's master one way: A message from an ordinary dermatologist who has continued working on rare genetic hair diseases
3. 学会等名 第31回毛髪科学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 専徳健太、久本岳史、浅野伸幸、井上飛鳥、下村 裕
2. 発表標題 LIPH遺伝子変異の発現機能解析
3. 学会等名 第31回毛髪科学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 常染色体劣性縮毛症の新規原因遺伝子の解析
3. 学会等名 第78回日本皮膚科学会高知地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 毛の形態学と疾患
3. 学会等名 第54回臨床分子形態学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Shimomura
2. 発表標題 Analysis of causative genes for autosomal recessive woolly hair
3. 学会等名 World congress for hair research 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 LIPH遺伝子変異による縮毛症・乏毛症以外の遺伝性毛髪疾患をどう診るか？
3. 学会等名 第86回日本皮膚科学会東京支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 遺伝性毛髪疾患の患者に遭遇した際にどうするか？
3. 学会等名 第37回日本臨床皮膚科医会九州ブロック総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 小児の脱毛症：遺伝性疾患を疑うとき
3. 学会等名 第45回日本小児皮膚科学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村 裕
2. 発表標題 脱毛症研究Update
3. 学会等名 第85回日本皮膚科学会東京支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021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72回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021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