

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16329

研究課題名(和文) 常染色体優性遺伝性縮毛症および乏毛症の分子病態解明

研究課題名(英文) Molecular-based analysis of autosomal dominant woolly hair/hypotrichosis

研究代表者

藤本 篤 (Fujimoto, Atsushi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10571937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝性縮毛症および乏毛症はKeratin71遺伝子の変異により発症するが、その発症機序は未だ明らかでない。本研究は、縮毛症を呈するマウスから得たkaratin71 (Krt71) の新規変異について、毛包の形態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。蛍光二重染色では、変異型Krt71を導入した培養細胞はケラチン中間径フィラメントが形成されず核周囲に凝集した。変異型keratin71は、培養細胞の内在性のタイプIケラチンとの二量体形成に何らかの影響を及ぼすと考えられた。本結果より、Krt71変異により生じる毛包上皮の形態異常が縮毛症発症に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性毛髪疾患は極めて稀な疾患であり、実際の患者数は決して多くない。しかし、遺伝性毛髪疾患の発症するメカニズムを解明することで、毛髪の形状や太さ、長さ、数などの異常がなぜ起きるかを説明できるかもしれない。本研究では、ケラチン71というタンパク質の異常によって毛の工場である「毛包」の形に異常をきたすことが示され、カールした髪の毛ができるメカニズムの一部が明らかにされた。この研究がさらに進めば、将来的には髪の毛の形状を自由にコントロールできるようになるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant woolly hair and hypotrichosis (ADWH/H) are caused by mutations in the Keratin71 gene. However, the pathomechanism remains still unclear. The purpose of this study is to clarify the effect of a novel mutation of karatin71 (Krt71) obtained from a mouse exhibiting woolly hair on the morphology of hair follicles. By immunofluorescence double staining, cultured cells introduced with mutant Krt71 did not form keratin intermediate filaments (KIFs) and aggregated around the nucleus. The mutant keratin71 was considered to have some influence on the dimer formation with endogenous type I keratin in cultured cells. These results suggest that the abnormal morphology of the hair follicle epithelium caused by the Krt71 mutation is important for the development of woolly hair.

研究分野：遺伝性毛髪疾患、炎症性角化症

キーワード：遺伝性毛髪疾患 縮毛症 乏毛症 ケラチン71

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

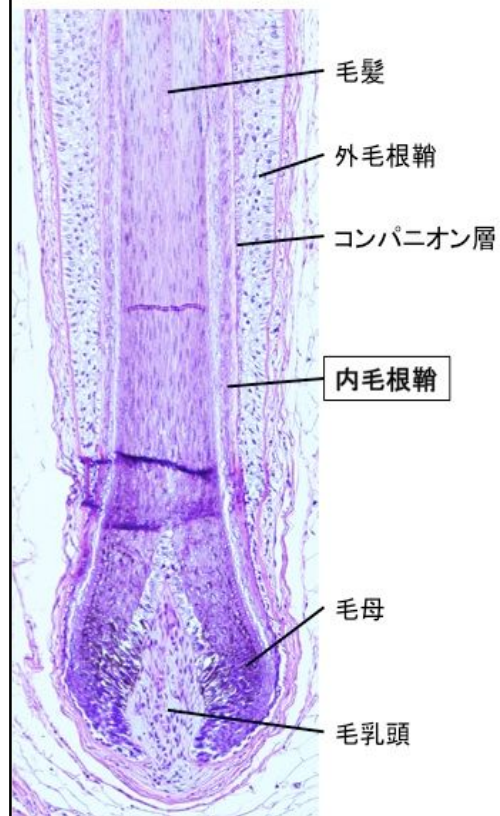
1. 研究開始当初の背景

毛包は皮膚付属器のひとつであり、個々は非常に小さいが、驚くべき自己再生能力を有する魅力的な器官である。毛包は、中央に位置する毛髪を、内毛根鞘、コンパニオン層、外毛根鞘が順次取り囲んでいる(図1)。

近年の分子生物学の進歩によって、毛包に発現する多数の遺伝子が同定されてきた。さらに、それらの異常(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 (Shimomura et al., Nat. Genet., 2008; Shimomura et al., J. Invest. Dermatol., 2009; Shimomura et al., Am. J. Hum. Genet., 2010; Shimomura et al., Nature, 2010)。

その中でも注目すべき新知見として、常染色体優性遺伝形式を示す縮毛症および乏毛症 (autosomal dominant woolly hair/ hypotrichosis: 以下 ADWH/H)が、Keratin71 (*KRT71*)遺伝子の変異で発症することが挙げられる (図2) (Fujimoto A et al., J. Invest. Dermatol., 2012)。

図1. 毛の構造



keratin71 は、毛髪の成長や毛質の決定に重要な役割を持つ毛包内毛根鞘 (inner root sheath (IRS)) に特異的に発現している上皮系ケラチンであ

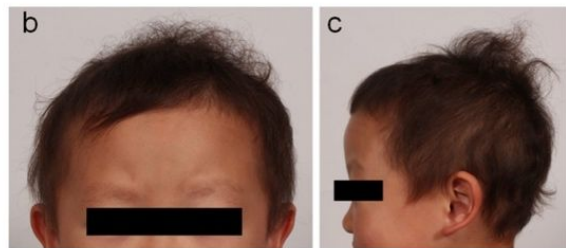
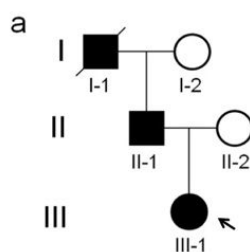


図2. *KRT71*遺伝子に変異を持つADWH/H患者の臨床像

5歳女兒、生下時より頭髪が縮れ、数センチ以上伸びず、眉毛の密度も疎である (b, c)。父と父方の祖父も同様の症状を呈する (a)。

り、タイプIIケラチン (塩基性ケラチン) の一つである。生体内では、タイプIケラチン (酸性ケラチン) とヘテロ2量体を形成して keratin intermediate filament (KIF) を形成し、内毛根鞘を構成する細胞の形態維持に大きな役割を果たしている。先天性毛髪疾患の原因遺伝子の多くが内毛根鞘に強く発現していることから、変異型の keratin71 により内毛根鞘の形態、機能異常が生じることが縮毛症の主な発症機序であると予想される。しかしながら、*KRT71* 遺伝子の変異による疾患発症の詳しい機序を裏付けるデータは全くなく、*KRT71* 遺伝子の発現調節の機構についても、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、縮毛症を呈するマウスから得た karatin71 (*Krt71*) の新規変異 (c.1117_1123del7ins10 (p.L373_T375delinsSLLS))について、変異が毛包の形態、機能に及ぼす影響を詳細に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、縮毛症を呈するマウスから得た *keratin71* (*Krt71*) 遺伝子の新規変異 (c.1117_1123del7ins10 (p.L373_T375delinsSLLS)) を用いた〔図3〕。

同変異により生じる毛髪の形態変化を走査型電子顕微鏡で解析したところ、縮毛症マウスの毛幹は野生型に比べて径が非常に細く、波打った形態を示した〔図4〕。

次に、本症マウスの毛包における *keratin71* の発現パターンを詳細に解析するために、背部より皮膚を採取し、4%

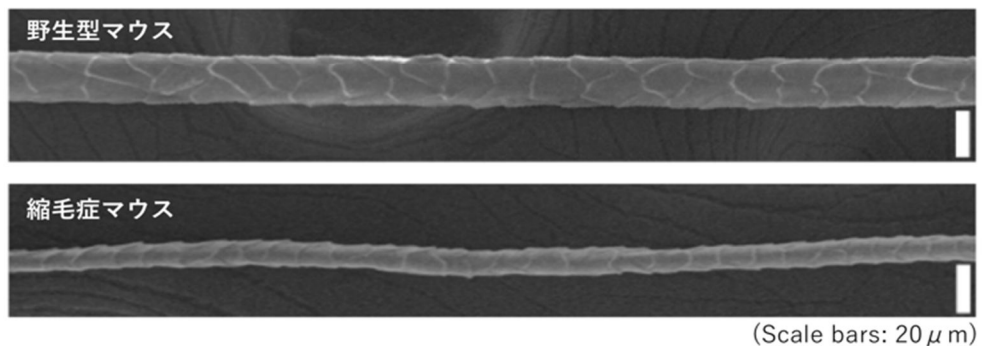
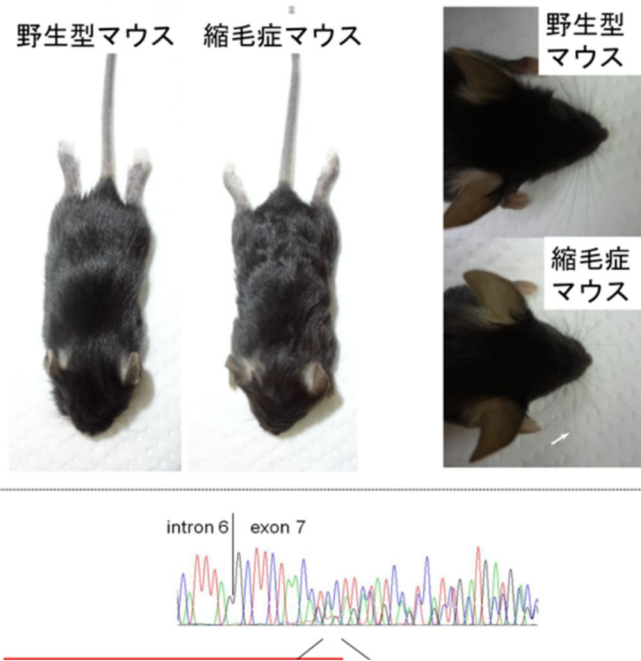


図4. 縮毛症マウスの毛髪の走査型電子顕微鏡像
野生型に比べて細く波打った形態の毛髪が観察された。

Paraformaldehyde で固定したパラフィン包埋切片を用いて *keratin71* に対する抗体で免疫組織化学染色を行った。本症マウス毛包においては、野生型マウスに比べ、毛包そのものに波打ち像が観察された。また、野生型では、内毛根鞘は毛幹を軸として左右対称に観察されたのに対し、本症マウスではその対称性が失われていた〔図5〕。

この理由として本来、対称性を保って毛幹を同心円状に取り囲むべき内毛根鞘の厚みに3次元的な不均衡が生じたことによるものと推察した。さらに、内毛根鞘の厚みに不均衡を生じたのは、内毛根鞘を構成するケラチノサイトの主要な細胞骨格であるケラチン中間径フィラメント (keratin intermediate filament: KIF) に異常を生じ、内毛根鞘の形態が破綻したためではないかと推

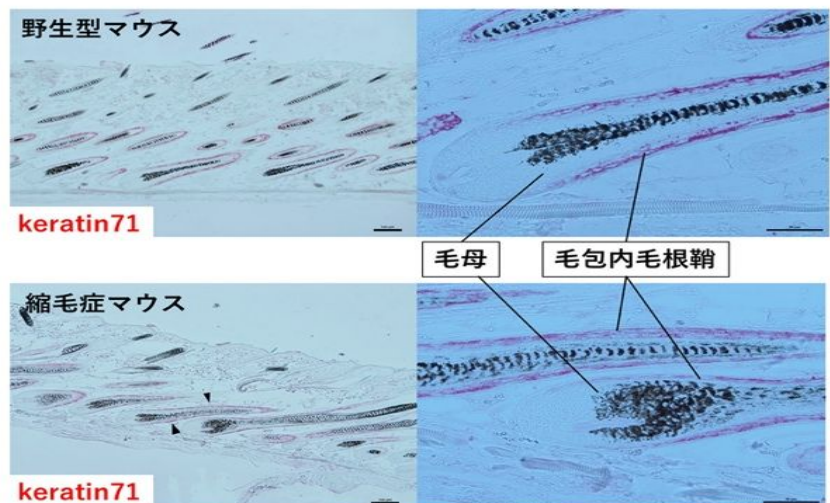


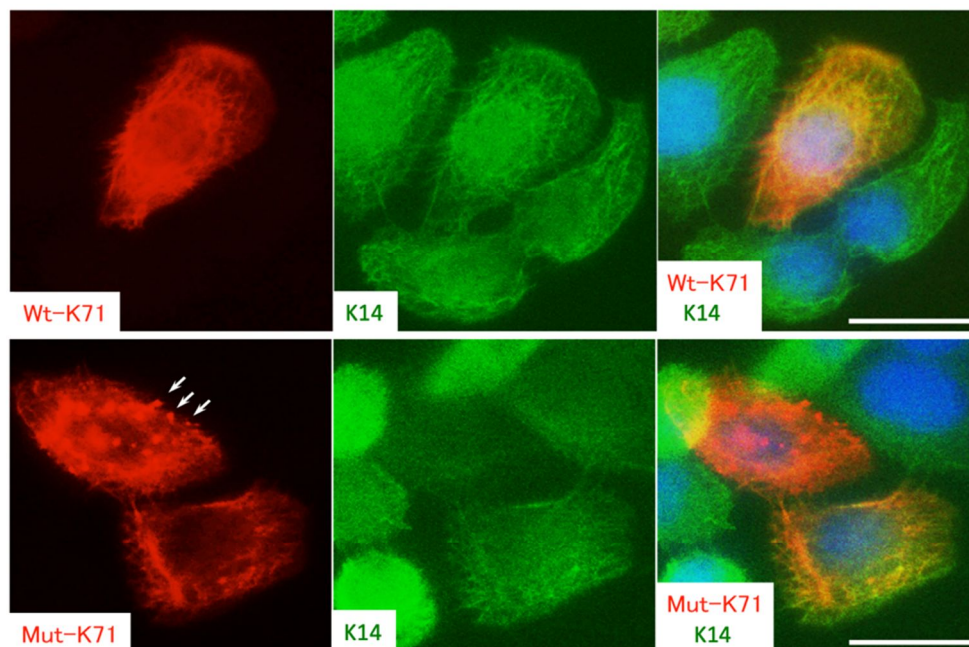
図5. 免疫組織化学染色を用いた縮毛症マウスの毛包形態の観察
縮毛症マウスの毛包は、野生型に比べて波打っており、毛包内毛根鞘の厚みも非対称性である。

測した。そこで本研究では、まず *in vitro* で、同変異を導入した培養細胞において、変異がケラチノサイトの細胞骨格である keratin intermediate filament の形成に及ぼす影響を検証した。

- (1) 縮毛症を呈するマウスから得た karatin71 (*Krt71*) 遺伝子の新規変異 (c.1117_1123del7ins10 (p.L373_T375delinsSLLS)) をクローニングし、発現ベクター (pCXN2) を用いて HaCaT (human keratinocyte) 細胞および Ptk2 (kangaroo rat kidney epithelial) 細胞に導入し発現させた。
- (2) 変異型の keratin71 が、それぞれの細胞の内在性のタイプ I ケラチンである keratin 14、keratin 18 との相互作用に及ぼす影響について、蛍光二重染色法で解析した。

4. 研究成果

変異型 *Krt71* を導入した培養細胞においては KIF が形成されず、核周囲に凝集して観察された〔図5〕。つまり、変異型 keratin71 は、HaCaT の細胞の内在性のタイプ I ケラチンである keratin 14 とのヘテロ二量体を形成する際に何らかの影響を及ぼすものと考えられた。本結果より、*Krt71* 変異により毛包上皮細胞を形成するケラチノサイトの形態学的異常が生じることが縮毛症発症において重要であることが示唆された。



【図6】 蛍光2重染色を用いた培養細胞におけるケラチン中間径フィラメント(KIF)の形態変化
野生型ケラチン71を導入したHaCaT細胞(上段)では、内在性のタイプ I ケラチンであるケラチン14と
きれいなKIFを形成している。
一方、変異型ケラチン71を導入した細胞(下段)では、KIF構造が破綻して核周囲に凝集している。

また、今後は発現調節機構の解明を目指し HEK293T (human embryonic kidney) 細胞、HeLa (human cervical cell carcinoma) 細胞などの培養細胞に導入し、KRT71 遺伝子のプロモーター活性を詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tomii K., Fujimoto A., Yokoyama R., Kabata Y., Fujita S., Hayashi R., Abe R.	4. 巻 34
2. 論文標題 Erythema dyschromicum perstans with a Wagyu beef - like appearance on dermoscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 141-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.16096	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 Tomii Koichi, Deguchi Tokiko, Katsumi Tatsuya, Suzuki Takeo, Fujimoto Atsushi, Miida Hiroshi, Abe Riichiro	4. 巻 なし
2. 論文標題 Case of toxic epidermal necrolysis successfully treated with repeated i.v. immunoglobulin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15356	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
--	---------------------------	-----------------------	----