

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16282

研究課題名（和文）LIPHと縮毛症の新規原因遺伝子C3ORF52の関連性の解析

研究課題名（英文）Analysis of functional relationships between LIPH and C3orf52 responsible for woolly hair

研究代表者

浅野 伸幸（永井伸幸）（Asano, Nobuyuki）

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50786100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではまず、野生型LIPHと5つの変異型LIPHの発現ベクターを作製し、培養細胞で発現解析を行った。その結果、3つの変異型LIPHは細胞外に全く分泌されないことが分かった。また、詳細な共免疫沈降法を行った結果、C末端側の変異であるV437Gfs*4のみC3orf52との結合能が著しく低下し、LIPHとC3orf52は互いのC末端で結合することが判明した。なお、C3orf52は毛包内毛根鞘のヘンレ層に主に発現していた。最後に、変異型LIPHが下流のシグナル伝達系に及ぼす影響について機能解析を行った。その結果、いずれの変異型LIPHでも下流のTGF β の分泌量が著しく低下することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

縮毛症は日本人で最も患者数の多い先天性毛髪疾患であり、その病態を解明することには大きな意義がある。本研究を通じ、LIPH遺伝子変異の性質が明らかになるとともに、LIPHとC3orf52との物理的および機能的関連性もかなり解明された。本研究により、将来的に本疾患に対する治療薬を開発するための重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, expression vectors of wild-type LIPH and five mutant LIPH proteins were generated and Western blotting was performed in an overexpression system in cultured cells. The results showed that the three mutant LIPH proteins were not secreted out of the cells at all. Next, an expression vector of wild-type C3orf52 was generated and co-immunoprecipitated with wild-type LIPH and mutant LIPH. The results showed that only the C-terminal mutation, V437Gfs*4, showed significantly-reduced affinity to C3orf52, while the binding ability of the other mutations was comparable to that of the wild type. Further co-IP assays showed that LIPH and C3orf52 interacted via their C-terminus. We also showed that C3orf52 was mainly expressed at the Henle's layer in human hair follicles. Finally, we performed functional analysis for the effects of mutant LIPH on the downstream signaling pathways. We found that downstream TGF β secretion was markedly reduced in all the mutant LIPH analyzed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：縮毛症 woolly hair LIPH C3orf52

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

縮毛症 (wooly hair: WH) は、頭髪が過度に縮れ、さらにその成長が数 cm で止まってしまうことが特徴の毛髪奇形である。遺伝性の WH は、掌蹠角化症や拡張型心筋症などを合併する症候性の群と非症候性の群に大別されるが、後者の頻度が高い、非症候性の WH は常染色体顕性 (autosomal dominant: AD) または潜性 (autosomal recessive: AR) の遺伝形式を示す。そのうち、AR の非症候性 WH (ARWH) は、主に *LIPH* 遺伝子または *LPAR6* 遺伝子の変異によって発症することが知られている。*LIPH* 遺伝子は、細胞膜に局在するホスホリパーゼ A₁ (PA-PLA_{1α} または LIPH) をコードしており、ホスファチジン酸から生理活性の高い脂質メディエーターである 2-アシル-リゾホスファチジン酸 (2-acyl-lysophosphatidic acid: 2-acyl-LPA) を合成する機能を有する。一方、*LPAR6* 遺伝子は、2-acyl-LPA の受容体である LPA₆ をコードしている。PA-PLA_{1α}/2-acyl-LPA/LPA₆ から構成されるシグナル伝達系は、その下流において、TACE による TGF α の細胞外への遊離を介して epidermal growth factor receptor (EGFR) の活性化を誘導し、毛包の分化や毛髪の成長に重要な役割を果たしていることが判明している。近年、ARWH の新たな原因遺伝子として *C3orf52* が報告された。特記すべきことに、*C3orf52* 蛋白は LIPH 蛋白と結合する性質を有する。しかしながら、*LIPH* 遺伝子変異の多くは発現機能解析が十分に行われておらず、また変異型 LIPH が下流のシグナルに及ぼす影響や野生型 *C3orf52* との相互作用に関して全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、5 つの変異型 LIPH (p.W108R, p.H205R, p.C246S, p.H248N, p.V437Gfs*4) について発現解析を行うとともに、*C3orf52* との結合能やそれらが下流に及ぼす影響について培養細胞レベルで詳細な解析を行うことで、ARWH の病態をさらに明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの作製

健常人の抜去した頭髪から抽出した total RNA を用いて、*LIPH* と *C3orf52* の cDNA を PCR 法で増幅し、発現ベクターに組み込んだ。実験の目的に応じて、Flag-tag や HA-tag などを各ベクターに導入した (詳細は省略)。解析対象の *LIPH* 遺伝子変異は、野生型ベクターを鋳型として site-directed mutagenesis 法 (Agilent) で作製した。なお、LPA₆ と ALP 標識した TGF α の発現ベクターについては、東北大学薬学部の井上飛鳥先生より供与していただいた。

(2) Western blot 法

野生型および変異型 LIPH の発現ベクター 1.0 μ g ずつを、6 well plate で培養した HEK293T 細胞に lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。なお、トランスフェクションの直前に培養液を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に置換した。24 時間後に細胞を回収して cell lysis buffer (Promega; 1X Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (TAKARA) を添加) 中で溶解後、4 °C 15,000 g で 5 分遠心して上清を細胞溶解液とした。細胞培養液は、Amicon Ultra-30K カラム (Millipore) を用いて室温にて 4,000g で 10 分遠心し濃縮した。細胞溶解液と培養液に 4 X LDS sample buffer および 10 X reducing agent (Thermo Fisher Scientific) を加えて 75 °C で 10 分加熱した後に、4-12% NuPAGE gel (Thermo Fisher Scientific) で蛋白を分離した。その後、ニトロセルロース膜に転写させ、Western blot (WB) を施行した。1 次抗体には rabbit polyclonal anti-LIPH (Proteintech; 希釈倍率 1:1,000) および mouse monoclonal anti-actin (Sigma; 希釈倍率 1:3,000) を、2 次抗体には HRP 標識 Goat-anti-rabbit IgG または anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific; 希釈倍率 1:4,000) を用いた。

(3) 共免疫沈降法

作製した各ベクター 1.0 μ g ずつを、6 well plate で培養した HEK293T 細胞に lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収して lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 0.5% Triton X, and 1X Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (TAKARA)) 中でソニケーション後、4 °C 15,000 g で 10 分遠心して上清を回収した。それらに mouse monoclonal anti-HA agarose gel (Sigma-Aldrich) を加えて 4 °C で 2 時間インキュベートし、agarose beads を lysis buffer で 5 回洗浄した。続いて、4 X LDS sample buffer および 10 X reducing agent (Thermo Fisher Scientific) を加えて 75 °C で 10 分加熱したのちに、4-12% NuPAGE gel (Thermo Fisher Scientific) で蛋白を分離した。また、免疫沈降前の cell lysate についても同様に調整して泳動した。その後、ニトロセルロース膜に転写させ、WB を施行した。WB に用いた 1 次抗体には rabbit polyclonal anti-LIPH (Proteintech; 希釈倍率 1:1,000) または Rabbit polyclonal anti-HA (Abcam; 希釈倍率 1:3,000) を、2 次抗体には HRP 標識 Goat-anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific; 希釈倍率 1:4,000) を用いた。

(4) TGF α 切断アッセイ

野生型または変異型 LIPH の発現ベクター (6 ng)、C3orf52 の発現ベクター (6 ng)、pCAGGS-LPA6 ベクター (8 ng) および pCAGGS-AP-TGF α ベクター (20 ng) を、96 well plate で培養した HEK293T 細胞に lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。27 時間後に、細胞培養液 (40 μ l) を別の well に移し、培養細胞には HBSS バッファを 40 μ l 加えた。各 well に AP reaction buffer (0.01 M pNPP, 120 mM Tris-HCl (pH9.5), 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) を加え、直ちに 415 nm の吸光度 (OD) を測定した。その後、37 $^{\circ}$ C で培養細胞は 45 分、細胞培養液は 120 分反応させ、再び 415 nm の吸光度を測定した。培養液に遊離された AP-TGF α は、(培養液の 120 分時の OD - 0 分時の OD) / ((培養細胞の 45 分時の OD - 0 分時の OD) + (培養液の 120 分時の OD - 0 分時の OD)) で計算した。各条件を 3 つずつ行い、平均値と標準偏差を求め、グラフを作成した。

4. 研究成果

(1) 5 つの変異型 LIPH は全て細胞内発現するが、3 つの変異型は細胞外に分泌されない

現在までに多くの LIPH 遺伝子変異が報告されているが、そのほとんどについて発現機能解析が十分に行われていない。今回は 5 つの変異型 LIPH (p.W108R, p.H205R, p.C246S, p.H248N, p.V437Gfs*4) (図 1a) を用いて、培養細胞内での過剰発現系において検討することにした。まず、変異型 LIPH の細胞内での発現および分泌能を評価するために、野生型と変異型 LIPH の発現ベクターを導入した HEK293T 細胞の細胞溶解液と培養液を用いて WB 法を行った。その結果、いずれの変異型も野生型と同様に細胞内で安定に発現することが分かった (図 1b)。一方で、3 つの変異型 LIPH (p.W108R, p.H205R, p.V437Gfs*4) は、細胞外に全く分泌されないことが分かった (図 1b)。

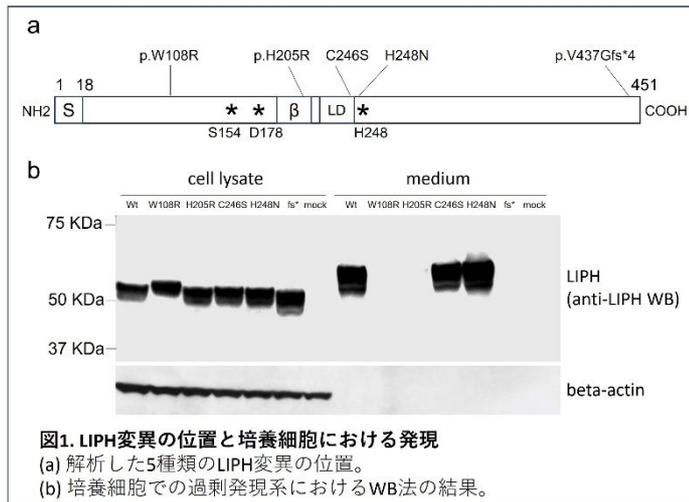


図1. LIPH変異の位置と培養細胞における発現
(a) 解析した5種類のLIPH変異の位置。
(b) 培養細胞での過剰発現系におけるWB法の結果。

(2) p.V437Gfs*4 変異型 LIPH のみ C3orf52 との結合能を著しく喪失する

変異型 LIPH が C3orf52 との結合能に及ぼす影響を確かめるために、C 末端に HA-tag を導入した C3orf52、および野生型または変異型 LIPH を培養細胞に過剰発現させた系で共免疫沈降法を行った。その結果、p.V437Gfs*4 変異型 LIPH を除く 4 つの変異型 LIPH は野生型と概ね同程度の結合能を有するのに対し、p.V437Gfs*4 変異型 LIPH は C3orf52 との結合能を著しく低下させることが分かった (図 2)。これにより、おそらく LIPH の C 末端が C3orf52 との結合に重要なドメインであることが強く示唆された。

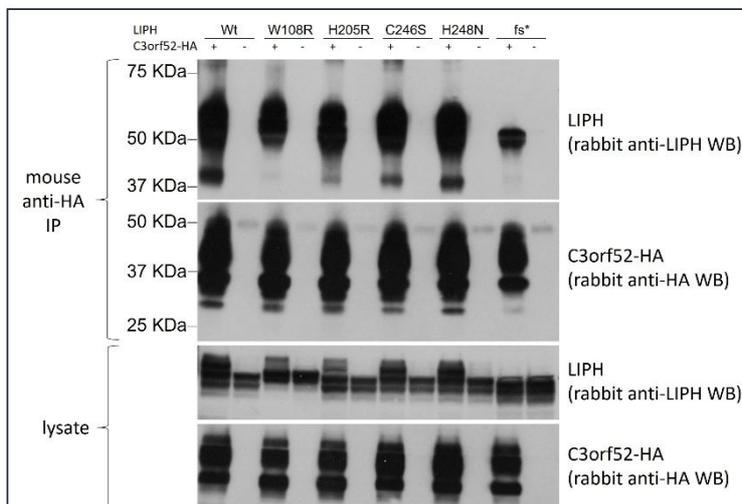


図2. 免疫沈降法の結果①

C末端の一部が欠損するp.V437Gfs*4 (fs*) のみ、C3orf52と共沈する量が著しく減少していた。

(3) LIPHはそのC末端でC3orf52と結合する

上記の仮説を証明するために、3つに断片化したLIPH(図3a)と全長のC3orf52との間で共免疫沈降法を行った。その結果、予想通りLIPHのC末端のみがC3orf52と共沈した(図3b)。

(4) C3orf52はそのC末端でLIPHと結合する

続いて、2つに断片化したC3orf52(図4a)と全長のLIPHとの間で共免疫沈降法を行った。その結果、C3orf52のC末端のみがLIPHと共沈した(図4b)。

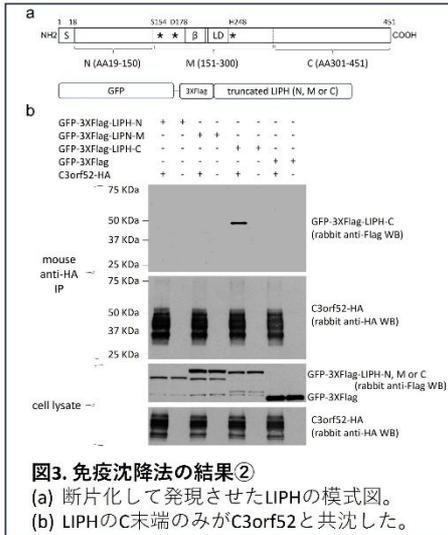


図3. 免疫沈降法の結果②
(a) 断片化して発現させたLIPHの模式図。
(b) LIPHのC末端のみがC3orf52と共沈した。

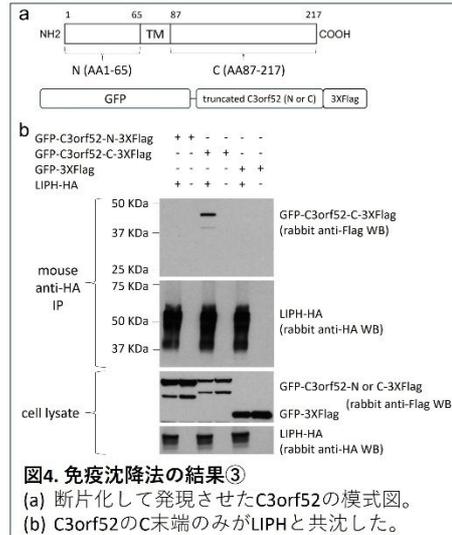


図4. 免疫沈降法の結果③
(a) 断片化して発現させたC3orf52の模式図。
(b) C3orf52のC末端のみがLIPHと共沈した。

(5) C3orf52は細胞膜に局在し、成長期毛包のヘンレ層に豊富に発現する

C3orf52の発現パターンを解析するために、まずは培養細胞での過剰発現系で免疫染色を行った結果、C3orf52は細胞膜に局在することがわかった(図5a)。また、健康人の成長期毛包のパラフィン切片を用いた免疫染色では、内毛根鞘のヘンレ層に主な発現が認められた(図5b, c)。

(6) 変異型LIPHはTGFαの遊離能を著しく低下させる

野生型LIPHは受容体であるLPA₆に結合すると、TGFαの遊離が引き起こされ下流のシグナル伝達系が働く。予備実験として、過去の研究で実施されたアッセイ系を用いて(図6a)野生型LIPHによるALP標識したTGFα(AP-TGFα)の遊離能を検討した結果、LPA₆と野生型LIPHの両方を過剰発現させた条件でのみ、有意に細胞外に遊離されるAP-TGFαの量が増加した(図6b)。続いて、各変異型LIPHにおけるTGFαの遊離能を検討するために、AP-TGFα、LPA₆と変異型LIPHを培養細胞で過剰発現させ、細胞外に遊離されたAP-TGFαの量を測定した。その結果、5つの変異型LIPHのいずれも野生型と比較してAP-TGFαの遊離が顕著に低下していた(図6c)。また、C3orf52も共発現させた系では、野生型LIPHでのみ遊離されるTGFαの量の増加が認められた(図6c)。

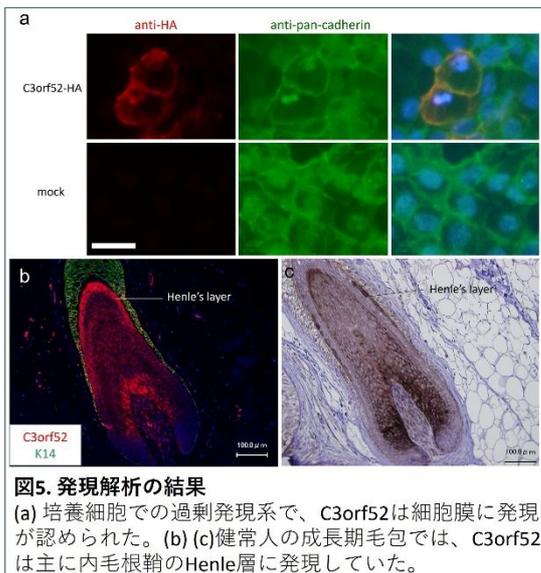


図5. 発現解析の結果
(a) 培養細胞での過剰発現系で、C3orf52は細胞膜に発現が認められた。(b)(c)健康人の成長期毛包では、C3orf52は主に内毛根鞘のヘンレ層に発現していた。

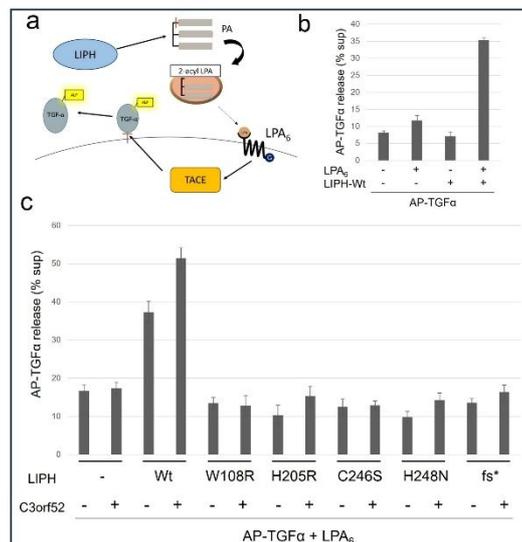


図6. 機能解析の結果
(a) 機能解析の模式図。(b) 機能解析の予備実験の結果。(c)機能解析の結果、全ての変異型LIPHが完全に機能を喪失していることが示された。

[考察]

本研究ではまず、各変異型 LIPH の細胞内発現および分泌能を確認するために、培養細胞の細胞溶解液を用い WB 法を行った。その結果いずれの変異型も細胞内では安定に発現したが、3 つの変異型 LIPH (p.W108R, p.H205R, p.V437Gfs*4) は細胞外に全く分泌されないことが分かった (図 1b)。これまでに、ARWH の患者の *LIPH* 遺伝子に複数のミスセンス変異が同定されているが、いずれの変異型 LIPH 蛋白も細胞外への分泌が認められていた。分泌能の失う機序に関しては未解明だが、立体構造の著しい変化によって細胞内小器官に留まってしまうのかもしれない。野生型の LIPH 蛋白は、細胞外に分泌された後に細胞膜の表面に局在して酵素活性を発揮する性質を有する。つまり、ホスホリパーゼ A1 として正常に機能するためには細胞外への分泌過程が必須であることから、3 つの変異型は下流のシグナル伝達系を動かす能力を喪失することが予想された。

次に、変異型 LIPH が野生型 C3orf52 との結合に及ぼす影響を検証するために共免疫沈降法を行った。その結果、野生型 LIPH は C3orf52 と結合することが再確認され、p.V437Gfs*4 変異以外は野生型と概ね同様に C3orf52 と結合していることが判明した (図 2)。本研究の結果からは、これらの変異型蛋白と C3orf52 との結合能は ARWH 発症のメカニズムにはあまり関与しないことが予想される。一方、LIPH 蛋白の C 末端に同定された p.V437Gfs*4 変異は C3orf52 との結合能を著しく喪失することが判明した (図 2)。さらなる解析で、LIPH と C3orf52 は互いの C 末端領域で結合する性質を有することが示された (図 3, 4)。また、C3orf52 は主に毛包内毛根鞘のヘンレ層の細胞膜に局在することもわかった (図 5)。過去の研究で LIPH も内毛根鞘に発現することが報告されており、*in vivo* での発現パターンからも両蛋白の機能的な関連性が示唆された。

最後に、変異型 LIPH が下流シグナルに及ぼす影響および C3orf52 との相互作用を検証するために過去の研究で実施されたアッセイ系を用いて AP-TGF α の遊離能を検討した。結果はいずれの変異型も野生型に比べ TGF α の遊離能を著しく低下させることが分かった (図 6)。

以上の結果より今回用いた 5 つの変異型 LIPH は分泌能の有無や C3orf52 との結合能に関わらず完全に機能を喪失していることがわかった。ただし、機能喪失に至るメカニズムは変異間で異なる可能性も示唆された。本研究の結果は、*LIPH* 遺伝子変異に関して遺伝子型と臨床型との明らかな相関関係が認められない事実を説明しうる知見といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔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
---------	---------