

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	藤本 篤
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 583 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	A Missense Mutation within the Helix Initiation motif of the <i>Keratin K71</i> Gene Underlies Autosomal Dominant Woolly Hair/Hypotrichosis (Keratin 71 遺伝子の helix initiation motif 内のミスセンス変異により常染色体優性遺伝性縮毛症/乏毛症を生じる)
論文審査委員	主査 教授 牛木 辰男 副査 教授 小野寺 理 副査 教授 伊藤 雅章

博士論文の要旨

1. 背景

先天性縮毛症・乏毛症は、生下時あるいは幼少期より細く縮れた特徴的な毛髪と種々の程度の乏毛を生じる稀な遺伝性毛髪疾患である。本症は、遺伝形式により常染色体劣性遺伝性縮毛症/乏毛症 (autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis (ARWH/H)) と常染色体優性遺伝性縮毛症/乏毛症 (autosomal dominant woolly hair/hypotrichosis (ADWH/H)) に分類される。現在までに ARWH/H の原因遺伝子としては、lipase H (LIPH) 遺伝子と lysophosphatidic acid receptor 6 (LPAR6) 遺伝子の二つが、ADWH/H の原因遺伝子としては、タイプ II ケラチンの一つである keratin 74 (KRT74) 遺伝子が同定されている。興味深いことに、これらの 3 つの遺伝子は、毛髪の成長や毛質の決定に重要な毛包内毛根鞘 (inner root sheath (IRS)) に特異的に発現していることが分かっている。すなわち、ARWH/H と ADWH/H はともに、IRS の機能的、形態的異常が生じるため、互いによく似た表現型を示していると考えられる。

申請者らは、既知の候補遺伝子に変異が同定されなかった ADWH/H 患者の 1 家系について解析を行い、keratin 74 と同様に IRS に特異的に発現するタイプ II ケラチンの一つである keratin 71 をコードする KRT71 遺伝子に病的変異を見出した。

2. 方法

臨床的に ADWH/H と診断した患者およびその家族のメンバーより採取した血液からゲノム DNA を抽出し、同症の原因となりうる候補遺伝子についてサンガー法でダイレクトシーケンスを行った。同定された新規の変異について、健常人コントロール 200 人のゲノム DNA を用いて PCR-RFLP 法でスクリーニングを行った。次に、同定された変異が発現・機能に及ぼす影響を、変異型、野生型それぞれの keratin 71 を過剰発現させた培養細胞を用いて蛍光抗体間接法で解析した。

3. 結果

患者は 5 歳女児。生下時より細く縮れた頭髪を認め、数 cm 以上に伸長しないことを主訴に来院した。頭

髪その他、眉毛と睫毛の分布も粗であったが、毛髪外症状は認めなかった。また、患者の父および父方の祖父も同様の症状を呈していた。患者より採取した毛幹を走査型電子顕微鏡で観察したところ、毛髪の成長異常を示唆する縦走溝がみられた。以上の所見を総合し、本家系を ADWH/H と臨床診断した。

遺伝子解析の結果、既知の候補遺伝子に変異が同定されなかった。過去の研究で、IRS に特異的に発現する KRT71 遺伝子の変異によって wavy coat や curly hair を呈するモデル動物 (マウス・ラット・ネコ・イヌ) が報告されていたことから、申請者らは、ヒトにおいても同遺伝子に変異を持つ家系が存在するのではないかと仮説を立てて解析を行った。その結果、患者および患者の父親の KRT71 遺伝子に、ミスセンス変異 (c. 422T>G (p. Phe141Cys)) がヘテロ接合型で同定された。同変異は健康人コントロール 200 人には認めなかった。培養細胞における蛍光抗体間接法では、HaCaT (human keratinocyte) 細胞および Ptk2 (kangaroo rat kidney epithelial) 細胞とともに、野生型の keratin 71 を発現させたもので、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 とともに keratin intermediate filament (KIF) を形成し正常な細胞形態を維持した。しかし変異型の keratin 71 は、それぞれ keratin 14、keratin 18 とともに核周囲に凝集し正常な KIF を形成できず細胞形態に破綻を来した。

4. 考察と結論

本研究において、申請者らは既知の候補遺伝子に変異のない ADWH/H 患者の 1 家系について遺伝子解析を行い、ヒトでは過去に報告されていない KRT71 遺伝子にミスセンス変異を同定した。同変異は、タイプ I ケラチンとタイプ II ケラチンがヘテロ 2 量体を形成して KIF を形づくる際に重要な helix initiation motif (HIM) 内に生じた non-conservative なアミノ酸置換であり、培養細胞を用いた機能解析の結果もあわせて、病的変異である可能性が極めて高いと考えられた。本研究から、申請者らは毛髪の成長や毛質の形成に重要な毛包内毛根鞘において、変異型の keratin 71 が正常な KIF 形成を阻害する dominant-negative 効果が ADWH/H 発症の主たる機序であると推察、結論付けた。

審査結果の要旨

先天性縮毛症・乏毛症は、常染色体劣性遺伝性縮毛症/乏毛症 (ARWH/H) と常染色体優性遺伝性縮毛症/乏毛症 (ADWH/H) に区別される。このうち ADWH/H については、keratin 74 (KRT74) 遺伝子が原因遺伝子として同定されている。本研究では、この既知の候補遺伝子に変異が同定されなかった ADWH/H 患者の 1 家系に注目し、その原因遺伝子の解析を行った。

その結果、keratin 71 の遺伝子 (KRT71) に、ミスセンス変異が同定された。また、同変異は健康人コントロールには認めなかった。さらに、遺伝子発現させた培養細胞による蛍光抗体間接法解析を行ったところ、野生型の keratin 71 を発現させた細胞では、keratin 71 が内在性のケラチンとともに keratin intermediate filament (KIF) を形成していたが、変異型の keratin 71 を発現させた細胞においては、正常な KIF 形成ができなかった。

以上の結果は、KRT71 の変異による ADWH/H 症が存在し、変異型の keratin 71 が正常な KIF 形成を阻害する dominant-negative 効果が発症の主たる機序であることを初めて明らかにしたもので、この点に本論文の学位論文としての価値を認める。