

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	林 良太
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第737号
学位授与の日付	平成29年3月23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	Analysis of unique mutations in the <i>LPAR6</i> gene identified in a Japanese family with autosomal recessive woolly hair/ hypotrichosis: Establishment of a useful assay system for LPA ₆ . (常染色体劣性縮毛症/乏毛症の日本人家系で同定された <i>LPAR6</i> 遺伝子変異の解析: 有用な LPA ₆ アッセイ系の確立)
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 教授 藤井 雅寛 副査 教授 阿部 理一郎

博士論文の要旨

背景: 先天性縮毛症/乏毛症は、毛髪が過度に縮れ成長が数センチで止まってしまう遺伝性毛髪疾患である。非症候性の先天性縮毛症/乏毛症は、常染色体優性もしくは常染色体劣性遺伝形式を示し、後者は *LIPH* 遺伝子または *LPAR6* 遺伝子の劣性変異によって発症することが知られている。*LIPH* 遺伝子は、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) を合成するホスホリパーゼ A₁ の1つ (PA-PLA₁ α) をコードしており、*LPAR6* 遺伝子は LPA の受容体の1つである LPA₆ をコードしている。日本人における常染色体劣性縮毛症/乏毛症の患者のほとんどは、*LIPH* 遺伝子の創始者変異によって発症することが判明している。一方、*LPAR6* 遺伝子変異は過去に日本人では同定されていなかった。また、PA-PLA₁ α / LPA / LPA₆ シグナル伝達系が細胞内で tumor necrosis factor-α converting enzyme (TACE) を活性化し、TACE によって細胞膜上の transforming growth factor-α (TGF-α) が細胞外に遊離されることが分かっている。すなわち、遊離された TGF-α の発現量は、LPA₆ シグナルの活性化を反映している。PA-PLA₁ α、LPA₆ およびアルカリホスファターゼ標識した TGF-α (AP-TGF-α) を培養細胞に過剰発現させ、遊離型の TGF-α を検出することで LPA₆ シグナルの活性化を測定するアッセイ系が過去に確立されたが、感度が極めて低いという問題点があった。

今回、申請者らは日本人の先天性縮毛症/乏毛症の1家系について遺伝子解析を施行し、*LPAR6* 遺伝子に興味深い病的変異を同定した。さらに、変異が発現・機能に及ぼす影響について解析を行う過程で、従来の手法よりも極めて感度が良い LPA₆ のアッセイ系の確立に成功した。

方法: 臨床的に非症候性の先天性縮毛症/乏毛症と診断した患者および家系のメンバーの血液試料から抽出したゲノム DNA を用いて、候補遺伝子である *LIPH* 遺伝子および *LPAR6* 遺伝子をサンガー法で解析した。次に、患者の毛髪試料から抽出した total RNA を用いて RT-PCR 法を施行し、変異型 *LPAR6* の発現を mRNA レベルで解析した。更に、培養細胞を用いた機能解析を施行した。HEK293FT 細胞に N 末端に Flag-tag をつ

けた LPA₆ の野生型または変異型蛋白を過剰発現させ、抗 Flag 抗体を用いてフローサイトメトリーを施行した。その後、HEK2 同細胞株に PA-PLA₁ α、LPA₆ および AP-TGF-α を共発現させ、LPA₆ 遺伝子変異が LPA₆ シグナルの活性化に及ぼす影響を検討した。

結果：患者の LIPH 遺伝子は変異陰性だった。LPA₆ 遺伝子の解析では、新規のナンセンス変異 c. 756T>A (p. Try252*) をヘテロ接合型で同定したが、コーディング領域にはもう一方のアレルに変異が存在していなかった。そこで、LPA₆ 遺伝子のプロモーター領域内に変異がある可能性を考慮して PCR 法を施行した結果、同領域内に 4, 156 bp の挿入変異を同定した。家系のメンバーの解析結果と合わせ、患者は LPA₆ 遺伝子に複合ヘテロ接合型変異（ナンセンス変異およびプロモーター領域内の挿入変異）を有することがわかった。次に、患者の毛髪由来の total RNA を用いて RT-PCR 法を施行した結果、プロモーター領域内に挿入変異を持つ LPA₆ 遺伝子からは全く mRNA が合成されないことが判明した。一方、ナンセンス変異 p. Try252* を持つ LPA₆ の mRNA は安定に発現していたため、p. Try252* 変異型 LPA₆ に焦点を絞って培養細胞で機能解析を行った。まず、野生型または変異型 LPA₆ を培養細胞に過剰発現させてフローサイトメトリーを施行したところ、驚くべきことに野生型の LPA₆ も細胞膜にほとんど発現しないことが判明した。この LPA₆ の発現量の低さが今までのアッセイ系が低感度である原因と考えられた。そこで、アミノ酸は変化しないが発現量が向上するように発現ベクター内の LPA₆ の塩基配列に改良を加えた。結果、野生型 LPA₆ が効率よく細胞膜に発現するようになった。更に、培養細胞内に内在性に発現する LPA₁₋₃ のアンタゴニストを培養液中に添加することで、LPA₆ の活性化を極めて鋭敏に測定可能なアッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて解析した結果、p. Try252* 変異型 LPA₆ は細胞膜に全く発現せず、LPA 刺激による活性化も起こらないことがわかった。以上より、p. Try252* は機能喪失型変異と結論付けた。

考察と結論：本研究において、申請者らは日本人において初めて LPA₆ 遺伝子変異により先天性縮毛症/乏毛症を発症した患者を同定し、変異が発現・機能に及ぼす影響を明らかにした。更に、本研究を通じ、LPA₆ の活性化を鋭敏に測定するアッセイ系を開発した。特に、LIPH 遺伝子変異を有する本疾患患者に対しては LPA アナログ等を用いた治療が理論上は可能であり、本研究で確立したアッセイ系を利用することで、治療薬の候補分子を効率よく探索できるようになると期待される。

審査結果の要旨

先天性縮毛症/乏毛症は、毛髪が過度に縮れ短縮する遺伝性毛髪疾患である。非症候性常染色体優性型は、LIPH 遺伝子または LPA₆ 遺伝子変異で発症する。LIPH 遺伝子はリゾホスファチジン酸(LPA)を合成するホスホリパーゼ A1 (PA-PLA1 α)、また LPA₆ 遺伝子は LPA 受容体の LPA₆ をコードする。日本人の本症のほとんどは LIPH 遺伝子の変異を有し、LPA₆ 遺伝子変異は報告がない。

患者、家系メンバーのゲノム DNA を用いて遺伝子解析した。培養細胞株に PA-PLA1 α、LPA₆ を発現させ、LPA₆ 遺伝子変異が LPA₆ シグナルの活性化への影響を検討した。

患者の LIPH 遺伝子は変異陰性だったが、LPA₆ 遺伝子は新規のナンセンス変異 c. 756T>A (p. Try252*) を同定した。さらにプロモーター領域内に挿入変異を同定し、複合ヘテロ接合型変異であった。患者毛髪で、プロモーター領域内変異型からは mRNA が合成されなかったが、p. Try252* 変異型では安定に発現した。野生型 LPA₆ を培養細胞に発現させてもタンパク発現がなかったため、発現量が向上するように塩基配列に改良を加え、効率よく細胞膜に発現させることができた。さらに LPA₆ の活性化を鋭敏に測定可能なアッセイ系を確立し、p. Try252* 変異型は細胞膜に発現せず、LPA 刺激による活性化も起こらないことを明らか

にした。以上より、p. Try252*は機能喪失型変異と結論した。

日本人において初めて LPAR6 遺伝子変異による先天性縮毛症/乏毛症を同定し、変異が発現・機能に及ぼす影響を明らかにした。更に、LPA6 の活性化を測定するアッセイ系を開発した。このアッセイ系を用いて、治療薬候補を効率よく探索できるようになると期待する。以上をもって学位論文としての価値を認める。