

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 新熊 悟

### 学位論文題名

先天性乏毛症および掌蹠の梅毒性角化病変における分子生物学的発症メカニズムの解明

近年、疾患の原因遺伝子が次々に解明され、多数の遺伝性皮膚疾患において、遺伝子診断が可能になりつつある。また、分子生物学の進歩に伴い、感染性皮膚疾患の原因となりうる様々な病原性微生物の遺伝子配列が明らかになった。そのため、DNA レベルにおいて感染性微生物の有無を確認し、同定することが可能になった。本研究では、実際に臨床現場で経験した先天性乏毛症および梅毒患者に対し、分子生物学的手法を用い、遺伝子および蛋白レベルで解析を行い、診断と発症メカニズムを解析した。

### 研究1 先天性乏毛症

#### 【背景と目的】

常染色体劣性乏毛症は生下時もしくは生後数カ月から乏毛を呈する遺伝性脱毛性疾患である。近年、常染色体劣性乏毛症の原因遺伝子として *DSG4*、*LIPH*、*LPAR6* 遺伝子が同定された。*LIPH* 遺伝子によってコードされる membrane-associated phosphatidic acid-preferring phospholipase  $A_1\alpha$  (PA-PLA $_1\alpha$ ) は、ホスファチジン酸をリゾホスファチジン酸に加水分解する酵素であり、産生されたリゾホスファチジン酸が *LPAR6* 遺伝子によってコードされる P2Y5 受容体を活性化することにより毛の成長が起こるとされている。本研究の目的は、先天性乏毛症患者の原因遺伝子解析を行い、さらに遺伝子変異によって生じた変異体 PA-PLA $_1\alpha$  の機能解析を行うことにより、先天性乏毛症の発症メカニズムを解明することである。

#### 【方法】

北海道大学病院皮膚科を受診、もしくは紹介された先天性乏毛症 5 家系 6 名の患者において常染色体劣性乏毛症の原因遺伝子である *DSG4*、*LIPH*、*LPAR6* 遺伝子の変異検索を行った。さらに同定された変異を有する変異体 PA-PLA $_1\alpha$  の機能解析を行った。HEK293 細胞に変異体 PA-PLA $_1\alpha$  を強制発現し、ホスファチジン酸がリゾホスファチジン酸に加水分解される際に生じる遊離脂肪酸量を測定することにより、変異体 PA-PLA $_1\alpha$  の加水分解能を解析した。また、P2Y5 受容体が活性化することによりアルカリホスファターゼが遊離することがすでに知られており、変異体 PA-PLA $_1\alpha$  およびリコンビナント P2Y5 受容体をコトランスフェクトした細胞培養液中に生じた遊離アルカリホスファターゼ活性を測定することにより、変異体 PA-PLA $_1\alpha$  の P2Y5 受容体活性化能を解析した。

#### 【結果】

4 家系 5 名の患児で *LIPH* 遺伝子に c. 736T>A (C246S) と c. 742C>A (H248N) の複合ヘテロ接合型ミスセンス変異を認め、また、1 家系では c. 736T>A (C246S) のホモ接合体を認めた。C246S、H248N のいずれかの変異を有した変異体 PA-PLA $_1\alpha$  を強制発現した HEK293 細胞の培養液中の遊離脂肪酸量は正常の PA-PLA $_1\alpha$  を強制発現したものに比べ、有意に減少した。また、P2Y5 受容体および変異体 PA-PLA $_1\alpha$  を導入した細胞の培養液中の遊離アルカリホスファ

ターゼ量は、正常 PA-PLA<sub>1</sub> α に比し、有意に減少していた。

#### 【考察と結論】

常染色体劣性乏毛症 5 家系 6 名の患者において遺伝子変異検索を行い、LIPH c.736T>A (C246S) および c.742C>A (H248N) を同定した。これらの変異を導入した変異体 PA-PLA<sub>1</sub> α の加水分解能および P2Y5 受容体活性化能は有意に減少しており、これらのミスセンス変異は機能喪失型遺伝子変異であることが分かった。本研究では、実際の臨床現場で経験した症例について、遺伝子解析を行い、さらにその変異体の機能について詳細に解析を行うことにより、同定された変異が病因となり得ることを証明した。今後、さらにデータを蓄積し、常染色体劣性乏毛症の病態メカニズムがより詳細に解明されることが期待される。

## 研究 2 掌蹠の梅毒角化性病変

#### 【背景と目的】

2 期梅毒疹には乾癬に類似した軽度の鱗屑や過角化を伴った紅斑が掌蹠に認められることがある。ごく稀に、掌蹠角皮症や尋常性疣贅に類似した著明な角化性病変を呈することがあるが、その発症メカニズムはいまだ不明である。本研究では、両側手掌および足底に巨大な尋常性疣贅様の皮疹を呈した角化型梅毒疹の発症メカニズムを明らかにするため、尋常性疣贅の原因となるヒト乳頭腫ウイルスの関与について解析を行った。

#### 【方法】

掌蹠の疣状の角化性局面を主訴に北海道大学病院皮膚科を受診した 2 期梅毒患者を対象とした。角化性病変について病理学的に解析を行った。さらに病変皮膚組織から DNA を抽出し、ヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を確認するために PCR 法を用いてヒト乳頭腫ウイルス DNA に特異的なフラグメントを増幅した。

#### 【結果】

病理学的所見では表皮は外方に向かって手指状に突出し、真皮側では表皮稜の延長を認めた。真皮上層では稠密な炎症細胞浸潤を認め、形質細胞も多数認められた。角化性病変の組織から抽出した DNA を用いて、ヒト乳頭腫ウイルスを検出するため PCR 法を行ったが、バンドは検出されなかった。

#### 【考察と結論】

角化を伴う原因として、ヒト乳頭腫ウイルスの合併を考え、ヒト乳頭腫ウイルス DNA に対する PCR 法を施行したが、ヒト乳頭腫ウイルスの感染を証明できなかった。今後、さらなる科学の進歩により、角化型梅毒疹の発症機序が解明されることが期待される。

#### 【総括】

本研究では、常染色体劣性乏毛症に対し、患者の遺伝子解析を行うことにより、診断を確定し、さらにその変異の機能について詳細に解析することにより、同定された変異が病因となり得ることを証明した。また、巨大な尋常性疣贅様の皮疹を呈した角化型梅毒疹に対し、その稀な臨床像を呈するメカニズムを解明するために、ヒト乳頭腫ウイルスの感染の有無を確認した。実際に臨床の現場で経験した遺伝性および感染性皮膚疾患に対し、異なる側面から発症メカニズムの解明を試みることができた。今後も様々な皮膚疾患において、本研究で培った分子生物学的手法により診断のみならず、病態の解明を行っていきたい。