

低汗性外胚葉形成不全症に関する研究

研究分担者 下村 裕 山口大学大学院医学系研究科皮膚科学講座 教授

研究要旨

低汗性外胚葉形成不全症の原因遺伝子は判明しているが、遺伝子型と臨床型との相関関係についての情報は乏しいのが現状である。令和4年度は、本疾患の原因遺伝子の1つである *EDAR* 遺伝子に着目し、詳細な検討を行った。本研究では、過去に報告された計4種類の *EDAR* 遺伝子の潜性（劣性）変異について培養細胞レベルで発現・機能解析を実施した。その結果、変異型 *EDAR* 蛋白間で機能喪失の程度に差異が認められ、本疾患の重症度と相関している可能性が示唆された。

A. 研究目的

低汗性外胚葉形成不全症（hypohidrotic ectodermal dysplasia：以下HED）は、低汗症、乏歯症、乏毛症を3徴候とする先天性疾患で、ほとんどがX連鎖潜性（劣性）遺伝だが、一部では常染色体顕性（優性）または潜性（劣性）遺伝形式を示す家系も存在する。現在までに、X連鎖潜性（劣性）遺伝の原因遺伝子として *EDA* 遺伝子が、常染色体遺伝の原因遺伝子として *EDAR* 遺伝子と *EDARADD* 遺伝子がそれぞれ同定されている。これら3つの遺伝子がコードする蛋白は、外胚葉の形成に重要なシグナル伝達系で密接に相互作用していることがわかっている。一方で、遺伝型とHEDの重症度との相関関係についての知見は極めて乏しいというのが現状である。そこで、本研究では、*EDAR* 遺伝子の4種類の潜性（劣性）変異について培養細胞レベルで検討を行い、得られた結果と臨床型との相関関係の有無を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

過去に *EDAR* の death domain 内に同定された潜性（劣性）遺伝形式を示す4種類のミスセンス変異（p.R358Q、p.G382S、p.I388T、p.T403M）について、培養細胞での過剰発現系で一連の解析を実施した。これらの変異の中で、p.R358Qは *EDARADD* との結合能を失い、下流のNF- κ B活性を低下させることが知られており、機能喪失の陽性対照

として用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は山口大学倫理委員会の承認を得ている（遺伝性皮膚疾患の病因・病態解析に関する研究；承認番号 H2019-083）。

C. 研究結果

まず、細胞溶解液を用いたwestern blot法では、p.R358Qおよびp.T403M変異型 *EDAR* 蛋白は野生型 *EDAR* 蛋白よりも発現量が減衰し、より大きい分子量を示した。一方で、p.G382Sおよびp.I388T変異型 *EDAR* 蛋白は野生型 *EDAR* 蛋白と同様の発現パターンを示した。また、各 *EDAR* 蛋白の細胞内での局在を解析するために実施した蛍光免疫染色法では、野生型 *EDAR* 蛋白と同様にp.G382Sおよびp.I388T変異型 *EDAR* 蛋白は細胞質内に局在が認められたが、p.R358Qとp.T403M変異型 *EDAR* 蛋白は細胞膜に発現していた。これらの結果から、変異型蛋白間で発現パターンが異なることが示された。続いて行ったNF- κ Bレポーターアッセイでは、すべての変異型 *EDAR* 蛋白がNF- κ Bの活性化を抑制したが、p.R358Qとp.T403M変異型 *EDAR* 蛋白に比べ、p.G382Sとp.I388T変異型 *EDAR* 蛋白による抑制効果は軽微であった。*EDAR* と *EDARADD* の結合を検討した共免疫沈降法では、p.R358Qとp.T403M変異型 *EDAR* 蛋白は *EDARADD* との結合能を完全に喪失していたが、p.G382Sとp.

I388T変異型EDAR蛋白は、ある程度結合能を維持した。これらの解析で、p.G382S変異型EDARの機能喪失の程度は最も軽度と考えられた（表1）。

表1. 本研究のまとめ

	R358Q	G382S	I388T	T403M
発現量	減少	正常	正常	減少
発現パターン	分子量が増加	正常	正常	分子量が増加
細胞での局在	細胞膜	細胞質	細胞質	細胞膜
NF-κBの活性化	顕著に低下	わずかに低下	中程度低下	顕著に低下
EDARADDとの結合能	喪失	わずかに低下	中程度低下	喪失
変異の評価	完全な機能喪失	軽度の機能低下	中程度の機能低下	完全な機能喪失
臨床型	重症	軽症～中等症	中等症	重症

D. 考察

培養細胞での過剰発現系においては、機序は不明だがEDAR蛋白を含む種々のTNF受容体が細胞質内に発現する傾向を示すことが知られていたことから、p.R358Qおよびp.T403M変異型EDAR蛋白の細胞膜への局在は異常な発現パターンと考えられる。NF-κBレポーターアッセイおよび共免疫沈降法の結果から、各変異型EDAR蛋白とEDARADDの親和性はNF-κB活性低下の程度と強く相関することが示唆された。今回解析した4種類のミスセンス変異は、いずれもEDARの機能や構造に重大な影響を与えると複数のデータベースで推測されていたが、各データベースのスコアは4つの変異の間で非常に類似していた。すなわち、現在の予測ツールの解析能力には限界があり、本研究のように実際に発現・機能解析を行う重要性がハイライトされたといえる。

本研究で得られた結果に基づき、各変異を機能喪失の度合いで評価した。R358QとT403Mを「重度」、p.I388Tを「中等度」、p.G382Sを「軽度」とした。特記すべきことに、各変異を報告した文献に提示されていた表現型と比較検討した結果、EDAR遺伝子変異の機能喪失の程度がHEDの重症度と

相関している可能性が示唆された（表1）。

E. 結論

少なくとも今回解析したEDAR遺伝子の潜性（劣性）変異に関しては、遺伝子型と臨床型との相関関係があると思われる。今後、他の遺伝子変異についても同様の検討を行うことで、相関関係がさらに明らかになると期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yagi S, Yasuno S, Ansai O, Hayashi R, Shimomura Y. Different degree of loss-of-function among four missense mutations in the EDAR gene responsible for autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia may be associated with the phenotypic severity. *J Dermatol*, 50(3): 349-356, 2023.

2. 学会発表

下村 裕、安野秀一郎、林 良太、安齋 理. 常染色体潜性低汗性外胚葉形成不全症の発症に関わるEDAR遺伝子変異の比較検討. 第30回日本発汗学会総会 (2022年9月17日)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし