

白皮症の病因遺伝子の解明とその遺伝子産物のメラニン色素生成における機能解析

山形大学医学部皮膚科学分野

鈴木 民夫

Oculocutaneous albinism (OCA) is a group of autosomal recessive disorders characterized by reduced or absent biosynthesis of melanin in melanocytes of the skin, hair, and eye. OCA is caused by mutations in the genes associated with melanin synthesis. So far, 16 genes have been reported to be involved in OCA. We have investigated the mechanism of melanogenesis. Here, we describe the analysis of the OCA genes in Japanese OCA patients and the identification of ten these patients, one OCA1, one OCA2, and eight OCA4. Ten novel mutations (c.445delTA in *TYR* gene for OCA1, p.792V in *P* gene for OCA2, and p.Y49C, p.G89R, p.C229Y, p.T437A, p.T440A, p.G473A in *SLC45A2* gene for OCA4) were detected. Furthermore, we analyzed an OCA patient who was a Moroccan origin Belgian boy with type 4 oculocutaneous albinism (homozygous p.H38R mutation in the *SLC45A2* gene). Functional analysis by transfection of the mutant OCA4 cDNA, p.D157N, or p.G188V which had been reported as high frequent mutations in Japanese OCA4 into *uvr*-mutant melanocytes established from OCA4 model mice showed that these missense substitutions are pathologic, resulting in these variant being unable to produce melanin. The p.H38R mutation was also investigated for the function in melanogenesis, and revealed to have no activity for melanogenesis. This is the first report on patient with OCA4 identified among African origin ethnic groups.

1. 緒 言

ヒトの色素として、ヘモグロビン、カロチノイド、フラボノイド、メラニンなどが知られているが、最も重要な役割を担っているのはメラニンである。メラニンは複雑な組成を持つ高分子化合物であり、生体高分子化合物の中でも際立った特異性を有している。つまり、溶媒に不溶性であり、構造が不規則であり、加水分解により単量体に分解するのも困難である。このような特異的で複雑な構造ゆえに、メラニンは光の吸収と発散、フリー・ラジカル補足、熱の保持などの多様な機能を持つことが知られている。このメラニンは、皮膚においては紫外線障害を防御している。メラニン合成に関わる研究は、近年急速な発展を遂げている。ここ 15 年間にメラニン合成に関わる分子が次々に明らかにされ、その数は 100 種類以上といわれている。メラニンはメラノサイトのメラノソーム内で合成される。メラノソームはメラニンを合成、保持する唯一の細胞内小器官であり、最終的にはメラニンごと近隣のケラチノサイトに受け渡される。このメラノソーム内でメラニン合成に直接関わっている分子をはじめ、メラノサイトの細胞質やエンドソームに局在し膜輸送を介してメラノソームの生合成、あるいは成熟に必須とされる分子、さらにはメラノサイトの発生、分化に特異的に関与する分子が明らかにされ

てきた。これらの分子の異常は、結果としてメラニン合成の低下、あるいは消失をもたらし、臨床的には眼皮膚白皮症 (oculocutaneous albinism, OCA)、あるいは OCA に加えて出血傾向や間質性肺炎を合併する Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) などの症候群付随型白皮症を引き起こす¹⁾。

我々は皮膚科医として、これまでに臨床的には白皮症を呈する患者に対してその遺伝子診断による確定診断を行い、その診断をもとに日常生活における紫外線対策などの生活指導などを行ってきた。一方で、基礎研究を通じて白皮症の病因、病態、つまり、メラニン合成およびメラノソームの生合成およびその制御機構を明らかにしてきた。今回、臨床的アプローチとして、日本各地からの日本人白皮症症例に加え、モロッコ系ベルギー人症例の検体を解析する機会を得たので、その結果を報告する。さらに基礎的アプローチとして、*in vitro* 培養メラノサイトを使用した解析により、1) 日本人 OCA 4 型白皮症患者で見つかった変異 OCA 4 遺伝子産物の機能解析を行い、遺伝子異常によるメラニン合成能の変化を検討し、さらに 2) モロッコ系ベルギー人にて明らかになった OCA4 原因遺伝子 *SLC* 症例の遺伝子変異について 1) と同様に機能解析を行った。

2. 実 験

2. 1 臨床的アプローチ

白皮症を呈する症例の原因遺伝子変異スクリーニングは、PCR-SSCP (polymerase chain reaction- single stranded conformation polymorphism) 法にて行なった。患者末梢血 2 ~ 10 ml より genomic DNA を抽出し、それを鋳型に用いて各 OCA 原因遺伝子増幅用の PCR プライマーにて、原因遺伝子のエクソンをその近傍を含め 200 ~ 300bp ごとに増幅した。次に、これらの PCR 産物を SSCP にてス



Investigation and functional analysis on the responsible genes for oculocutaneous albinism

Suzuki Tamio

Department of Dermatology, Yamagata University School of Medicine

クリーニングを行い、異常バンドを検出した場合は、そのバンドの塩基配列を direct sequencing 法にて変異を同定した。

2. 2 基礎的アプローチ

正常ヒト OCA4cDNA をヒト培養メラノーマ細胞である MNT-1 cell cDNA library よりクローニングした。次に、その正常型 OCA4cDNA に p.D157N、p.G188V と p.D153N の変異をそれぞれ導入し、これらの cDNA を CMV プロモーター下のハイグロマイシン耐性ベクター (pIRESHyg3) に移し、OCA4 のモデルマウスである *underwhite* マウスより樹立された培養メラノサイト (uw cell) に導入した。その後、ハイグロマイシンで選択し、stable transformant を樹立した。なお、コントロールとして OCA4cDNA を組み込んでいない空のハイグロマイシン耐性ベクターを導入し、同様にそれぞれ独立クローンの stable transformant を 6 個以上、樹立した。こうして得られた stable transformant のメラニン含有量とタンパク量を測定した。

3. 結果

3. 1 臨床的アプローチ

3. 1. 1 日本人白皮症症例

日本各地よりの白皮症 (OCA) 患者の集積に努め、その遺伝子診断による分類を行なったところ、OCA1 と OCA2 を各 1 例ずつ²⁾、確定診断した (図 1 および 2)。これらの症例は、それぞれ各 1 種類の新規遺伝子変異を伴っていることが判明した。また、8 症例の OCA4 患者を同様に遺伝子診断した³⁾。これら 8 症例では、合計 6 種類の新規遺伝子変異が見つかった (図 3 および 4、表 1)。

3. 1. 2 モロッコ系ベルギー人症例

ベルギー・アントワープ大学の Storm 博士より依頼のあった白皮症患者を遺伝子変異スクリーニングした。症例は 5 歳、男児。生下時より、全身の白色皮膚、白色頭髮、青色虹彩、眼振陽性。メラニン色素沈着低下による症状以外の異常所見は認めなかった (図 5)。血液検査、血液凝集検査では特に異常を認めない。両親はモロッコ系移民でいとこ婚。1 歳の弟は皮膚色については健常。白皮症の原因遺伝子検索目的で当科にコンサルトされた。1～4 型眼皮膚白皮症の全ての原因遺伝子の変異スクリーニングを行なった。その結果、SLC45A2 遺伝子に p.H38R 変異を認めた。データベースの検索では、調べ得たすべての哺乳類、魚類、鳥類、両生類で 38 番目のアミノ酸であるヒスチジンは保存されていた。また、27 人のモロッコ系ベルギー人健常コントロールでは p.H38R は全く認めなかったことから、H38 は SLC45A2 タンパク質の機能上、重要なアミ

ノ酸と考えられた。

3. 2 基礎的アプローチ (変異タンパク質の機能解析)

3. 2. 1 日本人症例で見られた変異

我々がこれまでに報告した 18 例の日本人白皮症 4 型患者⁴⁾ でみられた SLC45A2 遺伝子変異のうち、最も高頻度に見られた p.D157N と p.G188V の 2 種類のアミノ酸置換を伴う変異について検討した。また同時に、OCA4 型のモデルマウスである *underwhite* マウスで既に同定され報告されている p.D153N 変異もあわせて検討した。ヒト変異 OCA4cDNA 導入 *uw-melanocyte stable transformant* のメラニン合成能を調べる目的で、メラニン含有量を測定した。

その結果、図 6 に示すように、正常型 OCA4cDNA を導入したメラノサイトは、control ベクターを導入した Mock に比べ、有意な差をもってメラニン合成能が上昇した ($P < 0.005$)。このことは、ヒト正常型 OCA4cDNA は、マウス由来の *uw-melanocyte* においてメラニン合成について代償機能があることを示すものである。そこで、次に変異 cDNA を導入した stable transformant のメラニン含有量を調べたところ、変異 cDNA を導入した stable transformant ではいずれもメラニン含有量は少なく、control ベクターを導入した Mock に比べ合成能の上昇が見られなかった。つまり、control ベクターを導入した Mock に比べ、メラニン量について有意差はなかった。このことより、変異型 OCA4cDNA はメラニン合成活性が欠損、あるいは極めて低いことが推定された。

3. 2. 2 モロッコ系ベルギー人症例で見られた変異

p.H38R 変異を導入した SLC45A2 cDNA を同様にして培養メラノサイトに導入してメラニン合成活性を正常型 cDNA 導入クローンと比較検討したところ、変異 cDNA を導入したクローンは有意な差を持ってメラニン合成能が少なかった (図 7)。以上の結果より、p.H38R はメラニン色素合成能が低下した病的変異である事が確認された。

4. 考察

OCA は、日本人では 4 万人に 1 人の頻度で見られる比較的稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。今回、臨床的アプローチとして積極的に OCA 患者の集積に努め、遺伝子診断したところ、1 種類ずつの新規遺伝子変異を伴う OCA1 型 1 例、2 型 1 例、6 種類の新規遺伝子変異を伴う OCA4 型 8 例を新たに確定診断することができた。OCA4 型は、世界的にはこれまでに報告数が少ない稀なタイプと言われている⁵⁾。しかし、日本人では主要病型の 1 つであり、日本人白皮症の約 25% を占めると報告されている⁴⁾ が、実際にはさらに頻度が高く 30% 程度は OCA4 型が占める事が予想される。



図1 8ヶ月日本人女児。OCA 1型の原因遺伝子であるチロシナーゼ遺伝子 (TRY) に2種類の遺伝子変異 (c.445_445delTA and c.929insC) が明らかになりOCA1A型と遺伝子診断した。眼振、白髪、白色皮膚、そして蒙古班の欠如など、典型的な1A型の症状を呈した。



図2 4ヶ月日本人男児。双生児の一方。OCA 2型の原因遺伝子であるP遺伝子 (P) に2種類の遺伝子変異 (c.2373_2375delCGT and p.A481T) が明らかになりOCA 2型と遺伝子診断した。金髪、クリーム色の皮膚、褐色の虹彩を呈する比較的軽症の症状を示す。双子のもう一方も同様な白皮症症状を呈する。同様に白皮症を呈する。



図3 6歳日本男児 (表1、患者1)。OCA 4型の原因遺伝子である SLC45A2 遺伝子に2種類の遺伝子変異 (p.D157N and p.T440A) が明らかになりOCA4型と遺伝子診断した。褐色の頭髮、赤褐色の虹彩、眼振なし。軽症型。

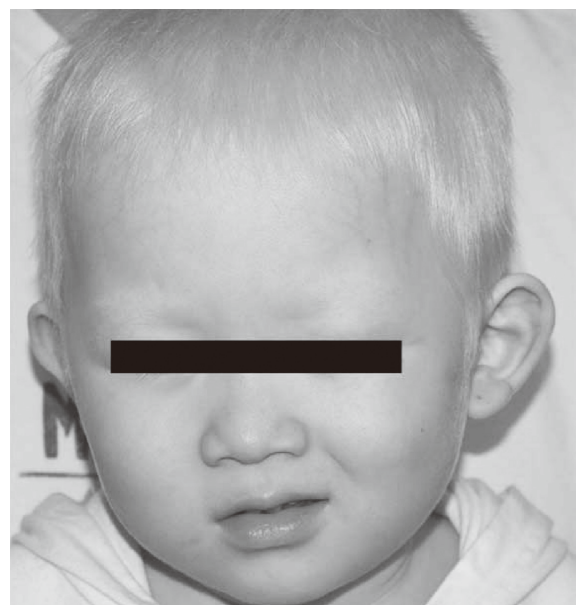


図4 8歳日本男児 (表1、患者8)。OCA 4型の原因遺伝子である SLC45A2 遺伝子に2種類の遺伝子変異 (p.G89R and p.G188V) が明らかになりOCA4型と遺伝子診断した。白色の頭髮、青い虹彩、眼振陽性。重症型。同じOCA4型であっても、図3の症例に比べ明らかに色素沈着が少ない。

表 1 8 人の日本人 OCA4 症例の *SLC45A2* 遺伝子変異形と臨床症状

Patient			Mutations		Clinical	phenotype	
No.	Age	Sex	Maternal	Paternal	Hair color	Iris color	Nystagmus
1	6 years	M	p.D157N	p. T440A	Brown	Red-brown	Negative
2	5 months	M	p.G188V	p. T440A	Brown	Hazel	Negative
3	8 months	F	p. T440A	p. G89R	Blond	Brown	Negative
4	11 months	F	p. T437A	p.D157N	Blond	Hazel	Negative
5	3 months	M	p. G473D	p.D157N	Light brown	Blue	Positive
6	1 year	M	(p. Y49C p.D157N) ^a		Blond	Blue	Positive
7	4 years	F	p. C229Y	p.D157N	Blond	Gray	Positive
8	2 years	M	p. G89R	p.G188V	White	Blue	Positive

新規遺伝子変異は太字で示した。

^a 両親どちら由来かを確定できなかった。



図 5 5 歳、男児。生下時より、全身の白色皮膚、白色頭髪、青色虹彩、眼振陽性。メラニン色素沈着低下による症状以外の異常所見は認めず。血液検査、血液凝集検査特に異常なし。両親はモロッコ系移民でいとこ婚。1 歳の弟は正常。

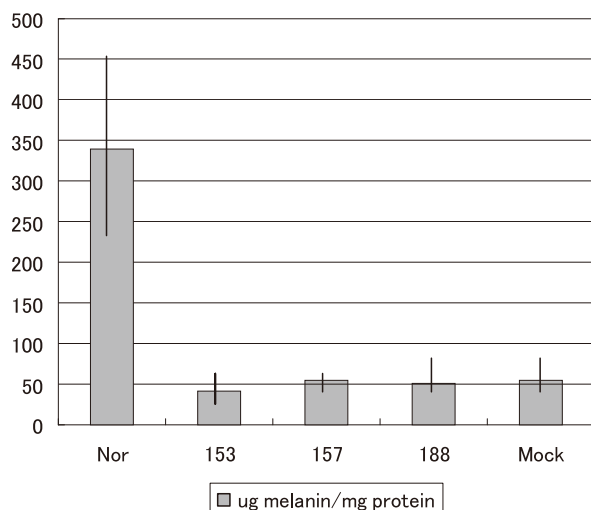


図6 日本人 OCA4 症例で見られた *SLC45A2* 変異の機能解析結果。変異を導入した培養細胞は、正常 *SLC45A2* を導入した細胞に比べ、有意な差を持ってメラニン合成能が低く、陰性コントロールとほぼ同程度である。Nor：正常ヒト *SLC45A2* cDNA 導入 stable transformant, 153：p.D153N 変異導入 stable transformant, 157：p.D157N 変異導入 stable transformant, 188：p.G188V 変異導入 stable transformant, Mock：control stable transformant, *： $P < 0.005$

in vitro 培養メラノサイトをつかったアミノ酸置換変異によるメラニン合成能回復試験の解析で、今回解析した D157N と G188V 変異については、確かに正常型 cDNA を導入した細胞に比べメラニン合成能が低下しており、この2種類の変異が確かに病的変異であることが証明された。このような *in vitro* での変異遺伝子解析報告はこれまでにない新しい手法の確立であり、今後の新しい変異に対しても応用が可能である。

今回、アフリカ系人種であるモロッコ系ベルギー人白皮症症例の遺伝子診断する機会を得た。白皮症1～4型原因遺伝子全てを調べたところ、OCA4型原因遺伝子である *SLC45A2* にアミノ酸置換変異（ミスセンス変異）を認めた。この変異は、調べ得た限り他の種で保存されている重要なアミノ酸に生じていること、また、入手可能であった同民族の健常人27人において同じ変異を認めなかったことより、病的変異の可能性が高いと考えられた。そこでさらに、OCA4モデルマウスより樹立した培養メラノサイトを使用した *in vitro* のシステムを用いてメラニン合成活性を調べたところ、ほとんどメラニン合成活性がないことが示され、p.H38R変異は明らかに病的変異である事が示された。これまでにアフリカ系人種でOCA4症例の報告がなく、本症例がOCA4と診断された初めての症例である。

今回の研究により、明らかに眼皮膚白皮症4型の研究が推進されたと考える。

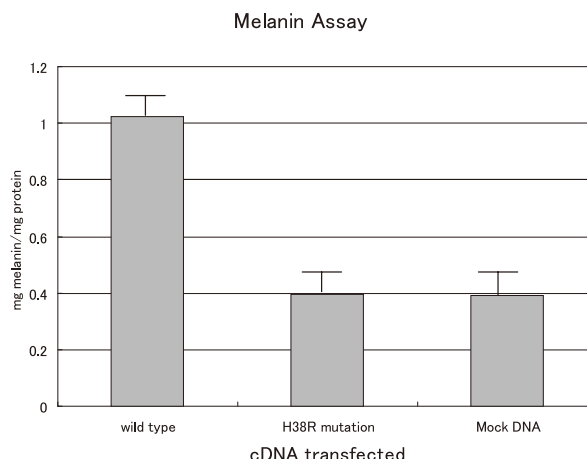


図7 モロッコ系ベルギー人 OCA4 症例で見られた *SLC45A2* 変異の機能解析結果。変異を導入した培養細胞は、正常 *SLC45A2* を導入した細胞に比べ、有意な差 ($P < 0.01$) を持ってメラニン合成能が低く、陰性コントロールとほぼ同程度である。

(文献)

- 1) Tomita Y, and Suzuki T: Genetics of Pigmentary Disorders. (review) *Am J Med Genet* 131C: 75-81 (2004)
- 2) Ito S, Suzuki T, Inagaki K, Suzuki N, Kono M, Iwamoto T, Mochizuki S, Tomita Y: Two novel mutations detected in Japanese patients with oculocutaneous albinism. *J Dermatol Sci* 44: 116-118 (2006)
- 3) Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Adachi K, Okuyama T, Nakata Y, Shimizu H, Matsuura H, Oono T, Iwamatsu H, Kono M, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene (*SLC45A2*) and their phenotype. *Pigment Cell Res* 19:451-453 (2006)
- 4) Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet* 74: 466-471 (2004)
- 5) Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH: Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet* 69: 981-988 (2001)