

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K19673
研究課題名(和文)皮膚の老化における核膜タンパク質ラミンAの役割

研究課題名(英文)The role of lamin A in cutaneous aging

研究代表者

山田 和哉 (Yamada, Kazuya)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90420190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラミンA 遺伝子変異による光老化(UV 照射による細胞へのダメージ)と自然老化への影響について検討を行ったところ、ラミンA 遺伝子変異を有する線維芽細胞はUVA照射や過酸化水素によるダメージ(アポトーシス)を受けやすい可能性が示唆された。Hutchinson-Gilford syndromeのラミン遺伝子変異をもつ細胞に対する治療的効果を持つ「ファルネシル転移酵素阻害薬」に対する影響を検討したが、Atypical Werner 症候群のラミンA 遺伝子変異を有する線維芽細胞に対する治療効果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to elucidate the sensitivity to cell damage induced by oxidative stress or UVA in fibroblasts from Atypical Werner syndrome (AWS) patient. Using immunofluorescence staining and flow cytometry analysis, the amount of early apoptotic cells and degree of intra-cellular reactive oxygen species (ROS) generation were higher in H2O2-or UVA-treated AWS fibroblasts than in normal fibroblasts, suggesting that repeated UV exposure may induce premature ageing of the skin in AWS patients and that protecting against sunlight is possibly important for delaying the emergence of AWS symptoms. In addition, we demonstrated that H2O2-, or UVA-induced apoptosis and necrosis in normal and AWS fibroblasts were enhanced by farnesyltransferase inhibitor (FTI) treatment, indicating that FTI might not be useful for treating our APS/AWS patient.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ラミンA 光老化 早老症

1. 研究開始当初の背景

ラミン A は、核膜内側に局在する蛋白質であり、核の形態や大きさを維持するほか、細胞分裂、DNA 修復能など様々な機能を持つことが知られている。ラミン A の遺伝子異常として、Hutchinson-Gilford syndrome (HGS) や拡張型心筋症、家族性脂肪萎縮症などが知られており、これらは Laminopathy と総称されている。

HGS は、生後 2 年頃までに発症する早老症(Progeria)であり、真皮の線維化、皮下脂肪の萎縮、脱毛、色素脱失などを呈する。ラミン A 遺伝子変異によって、通常より 50 アミノ酸短いラミン(プロジェリン)が核内に蓄積し、核の形態異常、DNA 修復機能異常、テロメアの短縮などが起こり、細胞寿命が短縮すると考えられている。臨床的に Werner 症候群と考えられる患者の約 20% に Werner 症候群遺伝子変異を持たない患者が存在し、Atypical Werner 症候群として報告されていたが、最近になって、これらの患者の中にラミン A 遺伝子変異を持つ例が見つかった。最近、我々は Werner 症候群様の症状を呈する早老症患者においてラミン A 遺伝子変異を同定した。(Journal of Dermatology, 2014; in press.) 患者は、40 歳頃より心疾患(狭心症、弁膜症、完全房室ブロック)、脳梗塞、脳出血を繰り返しており、皮膚所見について当科紹介受診した。四肢末端の皮膚硬化、皮膚萎縮、足趾潰瘍、嘔声あり。足底の角化、白髪、白内障はみられなかった。東京女子医大東医療センター整形リウマチ科客員教授、後藤 眞先生に Werner 症候群の遺伝子検索を行っていただいたが WRN 遺伝子変異はみられなかった。その後、ラミン A 遺伝子変異(p.D300N)を同定し、Atypical Werner 症候群(AWS)と診断した。変異部位はラミンの 2 量体形成に重要な部位である。自験例は本邦初症例であり、これまでに自験例と同部位の遺伝子変異の報告はフランス人 1 例のみであった。過去の報告を検討した結果、Atypical Werner 症候群の臨床症状の特徴として、Werner 症候群で見られる特徴的な症状のうち白内障、低身長、糖尿病等がなく、心血管異常が強く現れることを見出した。以上の様に、我々は臨床症状から診断を考え、その原因遺伝子を明らかにし、さらに機能解析を開始した。

まず、正常人と患者由来皮膚線維芽細胞を用いて核の構築を比較した結果、患者由来細胞では HGS 患者由来細胞様の核変形が多くみられた。電子顕微鏡にてヘテロクロマチンの局在異常を明らかにした。加齢に伴って、正常線維芽細胞でも異常ラミン A (プロジェリン) の発現が増加し、HGS 様の核形態異常がみられることが知られている(Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14:13-24.)。また最近、UVA 照射によって正常線維芽細胞でもプロジェリンの発現が増加し、HGS 様の核形態異常がみられることが報告されており(J

Invest Dermatol 2013; 133:1857-62.)、ラミン A が光老化の制御に關与する可能性が示唆される。

そこで自験例のラミン A 遺伝子変異を有する線維芽細胞を用いて、UVA 照射に対するアポトーシスについて Annexin V と 7AAD による FACS を用いた検討を行った。その結果、UVA 照射によって誘導されるアポトーシス数は患者由来細胞で亢進し、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞は UVA 照射によるダメージを受けやすい可能性が示唆された。この結果より、老化の進行や症状の発症を遅らせるために患者や家族に遮光指導を行う必要性が示唆された。以上の如く、ラミン A 遺伝子変異によって UVA 照射によるアポトーシスが亢進することを明らかにしたが、その機能については未だ不明である。また、酸化ストレスにおけるラミン A 遺伝子変異の影響についても明らかにしていない。

また、近年、HGS のラミン遺伝子変異をもつ細胞において、ファルネシル転移酵素阻害薬によってプロジェリンの蓄積が解消され、核の形態異常が改善することや、HGS 患者に投与した結果、血管病変、骨構造異常が改善したとの報告がされている(PNAS2012; 109:16666-71)。また、プラバスタチンとゾレンドロネートの併用によって HGS の核異常が改善したとの報告(Nat Med, 2008; 14:767-72)もある。しかし、Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ細胞における紫外線、酸化ストレスに対するこれらの薬剤の有効性については明らかになっていない。本研究では、上記に示す明らかになっていないところを解明することを目指す。

2. 研究の目的

ラミン A 遺伝子変異による光老化(UV 照射による細胞へのダメージ)への影響を解明すること。

ラミン A 遺伝子変異による自然老化(酸化ストレス:過酸化水素によるダメージ)への影響を解明すること

ラミン A 遺伝子変異によるクロマチン局在異常の機能を解明すること

紫外線、酸化ストレスによる老化に対するファルネシル転移酵素阻害薬の有効性を調べることの 4 点である。

3. 研究の方法

ラミン A 遺伝子変異による光老化(UV 照射による細胞へのダメージ)への影響を解明する。

自験例のラミン A 遺伝子変異を有する皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞を用いて、核の形態について検討を行う。次に UVA 照射に対する光老化(アポトーシス)について Annexin V と 7AAD による FACS を用いた検討を行う。UVA 照射によって誘導される活性酸素種(ROS)や、細胞増殖能の変化につ

いても変異ラミン A の影響を検討する。

ラミン A 遺伝子変異による自然老化(酸化ストレス:過酸化水素による細胞へのダメージ)への影響を解明する

光老化だけではなく、自然老化(加齢による皮膚老化)におけるラミン A 遺伝子変異の影響を調べるために過酸化水素水刺激を用いた、酸化ストレスに対する細胞へのダメージ(アポトーシス)についても FACS による検討を行う。この酸化ストレスにおける検討においても、アポトーシスに関する細胞内シグナル分子や ROS 量、細胞増殖能について検討を行う。

ラミン A 遺伝子変異によるクロマチン局在異常の機能を解明する

電子顕微鏡を用いた検討の結果、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞では、ヘテロクロマチンが核膜内側や核内に異常集積する所見が得られた。ラミン A はヘテロクロマチンの機能を制御することが知られており、HGS 患者線維芽細胞でもヘテロクロマチンの局在異常が報告されている。本研究では、ヒストンやヘテロクロマチンのマーカーである H2AX や HP1 の染色を行い、UV 照射や酸化ストレスによるクロマチンの変化について詳細に検討し、ラミン A とクロマチンの関係性について解析する。

紫外線、酸化ストレスによる老化(ダメージ)に対するファルネシル転移酵素阻害薬の有効性について解明する。

HGS のラミン遺伝子変異をもつ細胞において、ファルネシル転移酵素阻害薬によってプロジェリンの蓄積が解消され、核の形態異常が改善することや、HGS 患者に投与した結果、血管病変、骨構造異常が改善したとの報告がされている(PNAS 2012; 109:16666-71)。そこで、本研究では、Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ細胞と正常細胞を用いて、紫外線、酸化ストレスによる細胞のダメージがファルネシル転移酵素阻害薬によって改善されるのかどうかを検討する。

4. 研究成果

ラミン A 遺伝子変異による光老化(UV 照射による細胞へのダメージ)への影響を解明する。

まず、自験例のラミン A 遺伝子変異を有する皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞を用いて、核の形態について検討を行った。その結果、患者由来細胞では HGS 患者由来細胞様の核変形が多くみられた。次に UVA 照射に対する光老化(アポトーシス)について Annexin V と 7AAD による FACS を用いた検討を行った。その結果、UVA 照射によって誘導されるアポトーシス数は患者由来細胞で亢進したため、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞は UVA 照射によるダメージ

(アポトーシス)を受けやすい可能性が示唆された。さらにアポトーシスの機序について検討するために、アポトーシスに関する細胞内シグナル分子(p53, Bcl-2, Bax, TRAF2, Caspase など)の変化についてリアルタイム PCR 法やウエスタンブロットによる検討を行った。その結果、患者由来細胞においてアポトーシス関連因子の発現亢進がみられた。また、UVA 照射によって誘導される活性酸素種(ROS)についても変異ラミン A の影響を検討したところ、患者由来細胞では、UVA 照射による ROS 産生が健常由来細胞より増加していた。

ラミン A 遺伝子変異による自然老化(酸化ストレス:過酸化水素による細胞へのダメージ)への影響を解明する

光老化だけではなく、自然老化(加齢による皮膚老化)におけるラミン A 遺伝子変異の影響を調べるために過酸化水素水刺激を用いた、酸化ストレスに対する細胞へのダメージ(アポトーシス)についても FACS による検討を行った。その結果、過酸化水素水刺激によって誘導されるアポトーシス数は患者由来細胞で亢進した。また、患者由来細胞では、過酸化水素水刺激による ROS 産生が健常由来細胞より増加していた。これらの結果より、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞は酸化ストレスによるダメージ(アポトーシス)を受けやすい可能性が示唆された。

ラミン A 遺伝子変異によるクロマチン局在異常の機能を解明する

電子顕微鏡を用いた検討の結果、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞では、ヘテロクロマチンが核膜内側や核内に異常集積する所見が得られた。ラミン A はヘテロクロマチンの機能を制御することが知られており、HGS 患者線維芽細胞でもヘテロクロマチンの局在異常が報告されている。現在は、ヒストンやヘテロクロマチンのマーカーである H2AX や HP1 の染色を行い、UV 照射や酸化ストレスによるクロマチンの変化について詳細に検討し、ラミン A とクロマチンの関係性について解析している。

紫外線、酸化ストレスによる老化(ダメージ)に対するファルネシル転移酵素阻害薬の有効性について解明する。

Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ細胞と正常細胞を用いて、紫外線、酸化ストレスによる細胞のダメージがファルネシル転移酵素阻害薬によって改善されるのかどうかを検討した。しかし、紫外線、酸化ストレスによるラミン遺伝子変異を持つ細胞へのダメージがファルネシル転移酵素阻害薬によって、さらに亢進するという結果になった。この結果より、ファルネシル転移酵素阻害薬は、Atypical Werner 症候群の光老化及び生理的老化に対して有効な効果が

得られない可能性が示唆された。また、プラバスタチンとゾレンドロネートの併用によって HGS の核異常が改善したとの報告 (Nature Medicine, 2008; 14: 767-72) があり、今後は、その効果も検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Motegi S, Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, Perera B, Takeuchi Y, Ishikawa O
Increased susceptibility to oxidative stress- and ultraviolet A-induced apoptosis in fibroblasts in atypical progeroid syndrome/atypical Werner syndrome with LMNA mutation
Experimental Dermatology 査読あり 2016; 25 Suppl 3: 20-27.

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 和哉 (YAMADA Kazuya)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：9 0 4 2 0 1 9 0