

令和元年6月4日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10163

研究課題名(和文) Mowat-Wilson症候群の原因遺伝子ZEB2のコラーゲン合成経路への関与

研究課題名(英文) Participation in collagen synthesis of ZEB2, the causative gene of Mowat-Wilson syndrome.

研究代表者

寺石 美香 (TERAISHI, MIKA)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：40437736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：モワット・ウィルソン症候群(MOWS)はZEB2遺伝子変異を原因とし、重度知的障害、特徴的顔貌、小頭症などを呈する疾患である。皮膚所見に関してあまり論じられていないが、我々はMOWS患者の皮膚で、過伸展、関節の過屈曲、皮膚萎縮性癬痕など、エーラス・ダンロス症候群(EDS)に似た症状を確認した。MOWS患者の真皮は薄く、電顕でコラーゲン線維束の狭小化を認めた。真皮でZEB2遺伝子を欠損したマウスはMOWS患者と同様の皮膚症状を呈し、線維芽細胞で細胞外基質の発現低下と分解する分子の増加を認めた。MOWS患者はZEB2遺伝子変異によるコラーゲン線維形成の変化からEDS様の皮膚症状を示すと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで皮膚症状について検討されていなかったMOWS患者に、EDS患者様の症状が出現することを初めて見出した。このことは、MOWSの病態にEDSと同様のコラーゲン線維形成の異常を示す疾患という概念を与えただけでなく、コラーゲン合成におけるZEB2の関与を示す一因となった。今後、コラーゲン合成におけるZEB2の役割について詳細に検討することで、皮膚だけでなく全身の臓器に生じる線維化疾患に、ZEB2という新たな方向からの治療戦略を与えた。

研究成果の概要(英文)：Mowat-Wilson syndrome (MOWS) is a congenital disease caused by ZEB2 mutation. MOWS patients show intellectual disability, distinctive facial appearance, microcephaly, and so on. However, the skin manifestation has not been documented in detail. Here, we recognized that MOWS patients exhibit Ehlers-Danlos syndrome (EDS)-like symptoms, such as skin hyperextensibility, atrophic scars and joint hypermobility. MOWS patients showed a thinner dermal thickness and electron microscopy revealed miniaturized collagen fibrils. Notably, mice with a mesoderm-specific deletion of the Zeb2 gene (Zeb2-cKO) demonstrated skin manifestations similar to those of MOWS patients. Dermal fibroblasts derived from Zeb2-cKO mice showed a decreased expression of extracellular matrix (ECM) molecules, whereas molecules involved in degradation of the ECM were up-regulated. We conclude that MOWS patients exhibit an EDS-like skin phenotype through alterations of collagen fibrillogenesis due to ZEB2 mutations.

研究分野：皮膚科学

キーワード：Mowat-Wilson症候群 ZEB2 コラーゲン合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

Mowat-Wilson 症候群 (MOWS) とは、胎生期の神経板および神経堤細胞の形成に関与する ZEB2 遺伝子の片側アレルの変異により、精神運動発達障害、特徴的な頭部顔面所見、小頭症、ヒルシュブルグ病、てんかんなど多様な臨床症状を呈する症候群である。原因となる ZEB2 は標的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を抑制する働きを持ち、上皮系細胞においては、細胞間接着に関わる E-カドヘリンの発現を抑制し、上皮系細胞を脱分化させて遊走性の高い間葉系細胞の表現型を獲得させる。この現象は上皮-間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal transition, EMT) と呼ばれ、癌細胞の浸潤・遠隔転移との関連が示唆されている。発生における器官形成にも関わるため、ZEB2 異常は MOWS にみられる多彩な臨床症状の原因と考えられる。一方で、間葉系細胞における ZEB2 の働きについては未だ明らかにはされておらず、MOWS 患者でも間葉系細胞由来の器官異常についてはこれまで論じられていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では転写抑制因子である ZEB2 遺伝子の異常によって発症する MOWS に着目し、間葉系細胞における ZEB2 の働きを、同じ遺伝子変異をおこしたモデルマウスを作製してその結果と比較しながら臨床的に検証する。我々が先行して行った研究の結果、間葉系細胞特異的 ZEB2 ノックアウトマウスでは、線維芽細胞のコラーゲン合成に障害が起き、真皮に異常を認めた。実際、MOWS 患者の皮膚は臨床的に健常人に比べて軟らかく、進展性を認めたが、これまで皮膚症状について詳細な検討はされていない。この研究結果より、MOWS にこれまで知られていなかったコラーゲン変性疾患としての新たな側面を見出し、コラーゲン関連疾患に対して ZEB2 を主とした治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) MOWS 患者の皮膚、関節所見の解析

倫理委員会の承認のもと、MOWS 患者に十分な研究内容およびその意義について説明、同意を得られた後に、コラーゲンの関与する器官として、皮膚および関節の所見（皮疹の有無、硬化や過進展、関節可動域など）について視診、触診を行い、超音波を用いた真皮および皮下脂肪織の厚さの計測などを行い、健常人と比較する。また、病理組織学的な検討を行い、線維芽細胞の形態や、膠原線維および弾性線維の性状、厚さ、蓄積の程度など、特殊染色なども併用しながら検討を加える。また、電子顕微鏡を用いた線維芽細胞、コラーゲン線維の変化についても検討する。

### (2) 間葉系細胞特異的 ZEB2 ノックアウトマウスにおける解析

MOWS 患者での変化をマウスモデルで検討すべく、ZEB2 ノックアウトマウスを作製、解析する。体細胞全てで ZEB2 を欠損させた場合、マウスは胎生致死となるため、本研究では間葉系細胞に発現する Prx1 をプロモーターとした Cre マウスと、ZEB2 遺伝子に flox を組み込んだマウスを交配させて、真皮を形成する間葉系細胞に特異的に ZEB2 をノックダウンする。このマウスの皮膚や関節の所見を観察し、皮膚の採取、病理組織学的な検討に加え、電子顕微鏡を用いて真皮コラーゲン線維の形態や構造などにつき、正常コントロールマウスとの比較を行う。

### (3) モデルマウスおよび MOWS 患者由来線維芽細胞の単離、培養および検討

間葉系細胞特異的 ZEB2 ノックアウトマウスおよび MOWS 患者より採取した皮膚より皮膚線維

芽細胞を分離、培養する。培養した線維芽細胞で増殖能や遊走能など一般的機能の確認、ZEB2発現などを調べた後、コラーゲンの合成や分解に関わる遺伝子やタンパクの発現について検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) MOWS 患者の皮膚、関節所見の解析

12 人の研究に同意が得られた MOWS 患者を対象に、皮膚の伸展性、関節の可動域、癍痕の有無などを調べた結果、多くの患者で皮膚の過伸展や過可動が見られた (図 1)。超音波にて四肢、体幹などの 7 カ所の真皮の厚さを測定し、健常人と比較した結果、いずれの部位でも健常人に比べて MOWS 患者で真皮が薄いという結果を得た。

光学顕微鏡所見では真皮のコラーゲン線維の太さや染色性に MOWS 患者と健常人で明らかな変化は認めなかったが、電子顕微鏡の所見では、MOWS 患者でコラーゲン線維束径の狭小化を認めた (図 2)。

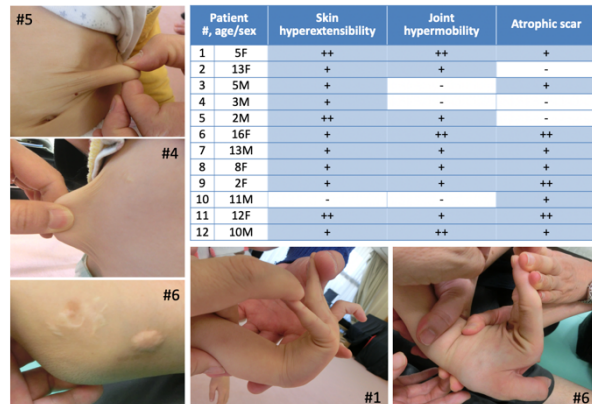


図1. MOWS患者にみられたEDS様の皮膚/関節所見

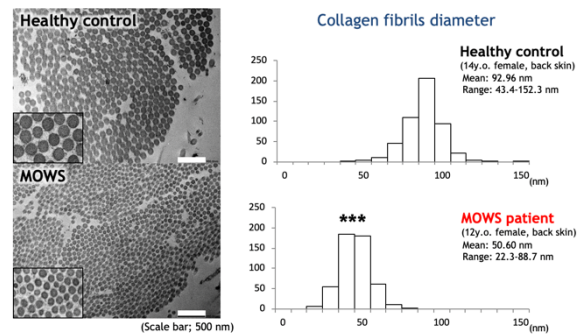


図2. 真皮コラーゲン線維の電子顕微鏡所見

##### (2) 間葉系細胞特異的 ZEB2 ノックアウトマウスにおける解析



図3. Zeb2-cKOマウスの皮膚所見

真皮線維芽細胞における ZEB2 の働きをより詳しく調べるため、Cre/loxP システムを用いて、間葉系細胞で特異的に ZEB2 をノックアウトしたマウス (Zeb2-cKO マウス) を作製した。このマウスは生下時には健常マウスと見分けがつかないが、成長に伴って頭部や四肢、腹部の脱毛が目立ち、特に四肢では皮膚が薄く、細かな皺を伴って伸展性を認めた (図 3)。採取した皮膚の病理組織所見でも、四肢では真皮および脂肪織

が薄く、電子顕微鏡所見はコラーゲン線維束径の狭小化がみられ (図 4)、MOWS 患者と同様の所見が再現された。

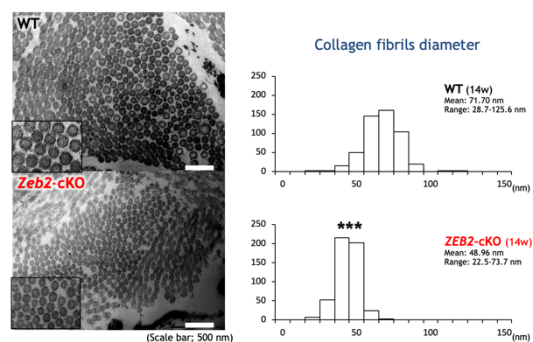


図4. 真皮コラーゲン線維の電子顕微鏡所見 (マウス)

(3) モデルマウスおよび MOWS 患者由来線維芽細胞の分離、培養および検討

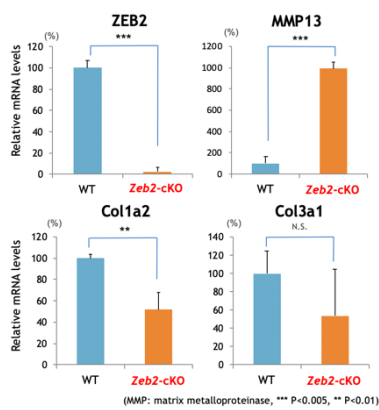


図5. 培養線維芽細胞の遺伝子発現

Zeb2-cKO マウスの線維芽細胞で同様に ZEB2 の mRNA 発現を調べたところ、その発現はわずかしきみられず、1 型および 3 型コラーゲンの mRNA 発現量はほぼ半減していた (図 5)。一方でコラーゲンの分解を行う MMP13 はコントロールマウスの 10 倍ほどに発現が増加していた。これらの結果をタンパク質レベルで確認すると、1 型コラーゲンは Zeb2-cKO マウスでコントロールマウスの 6 割ほどに減弱、MMP13 は 7 倍以上に増加しており、mRNA での測定結果を反映していた。

MOWS 患者および Zeb2-cKO マウスの皮膚組織より線維芽細胞を分離、培養し、コラーゲンの合成、分解に関わる遺伝子発現について検討を行った。MOWS 患者の真皮より得た線維芽細胞で ZEB2 遺伝子発現をみると、ZEB2 と同じ ZEB ファミリーに属する ZEB1 の発現には変化がみられないのに対し、ZEB2 は MOWS 患者で健康人の 6 割ほどの発現となっていた。また、蛋白レベルでは約半分に減弱しており、MOWS 患者の真皮線維芽細胞では、ZEB2 のハプロ不全が認められることが示された。

Zeb2-cKO マウスの線維芽細胞で同様に ZEB2 の mRNA 発現

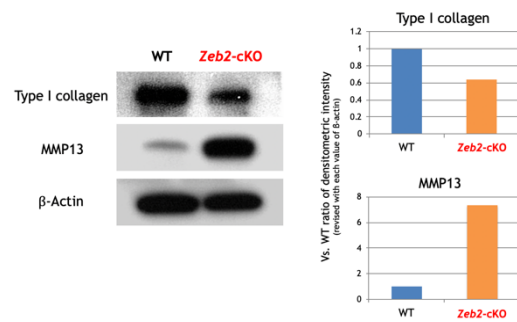


図6. 培養線維芽細胞のタンパク質発現

以上の結果より、ZEB2 はコラーゲンの合成、分解に関与し、真皮の構築に必要な遺伝子の一つであることが示された。今後、ZEB2 のコラーゲン合成に関わる分子的な詳細について調べていくことで、線維化疾患に対する新たな経路からの治療法の確立につながる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Teraishi Mika, Takaishi Mikiro, Nakajima Kimiko, Ikeda Mitsunori, Higashi Yujiro, Shimoda Shinji, Asada Yoshinobu, Hijikata Atsushi, Ohara Osamu, Hiraki Yoko, Mizuno Seiji, Fukada Toshiyuki, Furukawa Takahisa, Wakamatsu Nobuaki, Sano Shigetoshi. Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular similarity between Mowat-Wilson syndrome and Ehlers-Danlos syndrome. Scientific Reports 7: 46565, 2017, DOI: 10.1038/srep46565. 査読あり.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 寺石美香、高石樹朗、中島喜美子、佐野栄紀: Mowat-Wilson 症候群は変異 ZEB2 によるコラーゲン合成異常を介して Ehlers-Danlos 様症状を呈する. 第 48 回日本結合組織学会学術大会、2016 年 06 月 24 日、長崎大学医学部 良順会館・記念講堂(長崎県長崎市)

[その他]

ホームページ等

真皮コラーゲン生成に関わる新たな分子 ([http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_drmtl/research/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_drmtl/research/))

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：高石 樹朗

ローマ字氏名：TAKAISHI, Mikiro

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：10303223

研究分担者氏名：中島 喜美子

ローマ字氏名：NAKAJIMA, Kimiko

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20403892

研究分担者氏名：佐野 栄紀

ローマ字氏名：SAN0, Shigetoshi

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80273621

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。