

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591321

研究課題名（和文）核蛋白質ラミン代謝異常症に対する治療効果の検討

研究課題名（英文）Approach to the progeroid syndrome including laminopathy

研究代表者

三善 陽子（MIYOSHI YOKO）

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40457023

研究成果の概要（和文）：

早老症の研究は生理的老化の病態解明への手がかりとなる。我々は早老症の小児 4 例(2 家系)を対象に研究を実施した。早老症の一種でラミン代謝異常(ラミノパチー)の下顎先端異形成症の姉妹(*ZMPSTE24* 新規変異を証明)に対し、骨代謝異常を含む早老症による臨床症状の改善を目的に aminobisphosphonate を投与し治療効果を認めた。原因不明の早老症の兄妹例について全ゲノムシーケンシング(Exome 解析)をおこない、新規の遺伝子変異を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We have reported on four Japanese children (two pedigrees) with progeroid syndrome. Aminobisphosphonate has improved lumbar BMD along with suppression of early ageing in the mandibuloacral dysplasia (MAD) sisters. We have found a new mutation by exome analysis in the other progeroid patients with unknown etiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：老化、早老症、ラミン、ラミノパチー、成長障害、骨代謝、ゲノム、exome 解析

1. 研究開始当初の背景

小児は成長発育の途上にある一方、成人では老化という緩徐に進行する生理的な加齢現象がみられる。早老症（progeroid syndrome）は、老化が異常に早期におこり急速に進行する稀な疾患であるが、この病態について研究することは、健常なヒトにおけ

る老化のメカニズムを解明する重要な手がかりとなる。我々は早老症の一種である下顎先端異形成症（mandibuloacral dysplasia、以下 MAD）の日本人姉妹例を長期間フォロー中である。我々はこれまでに原因遺伝子である *ZMPSTE24* に新規の遺伝子変異を見いだし、ラミン A (lamin A) のプロセッショ

グ異常が原因であることを証明した (*Clinical Genetics* 2008; 73(6): 535-44、筆頭著者)。また原因不明の早老症の日本人兄妹例もあらたにフォローを開始した。

早老症は若年期から皮膚の老化や動脈硬化を示すことを臨床的特徴とするが、骨格形成異常や骨粗鬆症、成長障害の合併などもみられる。Werner 症候群、Hutchinson-Gilford progeria 症候群 (以下 progeria)、Cockayne 症候群、restrictive dermopathy (以下 RD)、MAD などが代表的疾患で、責任遺伝子として *WRN*、*CSA*、*CSB*、*LMNA*、*ZMPSTE24* などが同定されている。これらの疾患では、DNA helicase や DNA 修復機構の異常、ラミン合成過程の異常などにより、染色体の不安定や核機能の低下をきたすことが早老症の原因と考えられている。近年、核膜の裏打ち蛋白ラミナの主要構成成分であるラミン A の合成過程に異常がみられるラミノパシー (laminopathy) という疾患群が注目されており、progeria、RD、MAD が含まれる。MAD は頭蓋顔面の異常、骨格の異常、皮膚の異常、脂肪萎縮症、関節拘縮、成長障害などを臨床的特徴とし、常染色体劣性遺伝形式をとる大変稀な早老症の一種である。責任遺伝子である *LMNA* はラミン A/C を、*ZMPSTE24* はプレラミン A からラミン A の合成過程に関わる蛋白分解酵素 *ZMPSTE24* をコードしている。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では早老症の小児 (家系例) における病的な老化現象としての、骨代謝異常、成長障害、皮膚病変、脂肪萎縮症、糖脂質代謝異常などを含む病態の詳細を明らかにすることを目的とする。
- (2) 早老症患者の姉妹例に対して治療的介入をおこない、その治療効果を検討することにより、生理的老化に対する治療法への適用と発展をめざす。
- (3) 早老症患者と高齢者の皮膚線維芽細胞の糖鎖構造の相違を解析し、老化と糖鎖構造の変化との関連性を検討する。
- (4) 原因不明の早老症兄妹例の遺伝子解析をおこない、新規の病因遺伝子の発見をめざす。

3. 研究の方法

(1) MAD では、ラミン A のプロセッシングが障害され中間代謝物であるファルネシル化プレラミン A が蓄積することで、核の形態と機能に異常をきたすとされている。海外では既に早老症の治療として、ファルネシル化阻害剤の投与をおこなう臨床治験が progeria の患者達を対象におこなわれてい

るが、ラミン代謝の代償経路として geranylgeranyltransferase 1 により prelamin A が prenyl 化されるために効果が不十分とされている。我々は骨粗鬆の治療薬として国内で既に承認され多数使用されている aminobisphosphonat を、geranylgeranyl 化抑制による上記代謝経路の阻害による核機能の改善と破骨細胞機能抑制による骨吸収抑制効果を目的として、MAD の姉妹例に継続投与を行った。身長、体重、体脂肪率、皮膚病変、骨格病変、骨年齢、糖代謝、脂質代謝などを経時的に測定し、骨密度、骨代謝マーカー、骨病変および全身症状を経時的に解析した。

(2) 糖鎖は細胞の顔とも呼ばれ、癌化、分化、老化に伴って大きくその構造が変化するだけでなく、近年その生物学的機能の重要性が明らかになりつつある。若年者、高齢者、ならびに早老症患者 (MAD の姉妹例) 由来の皮膚から線維芽細胞を採取し、その糖鎖構造に関して、キャピラリー電気泳動ならびにマスペクトロメトリ法を用いて解析をおこなった。

(3) 原因不明の早老症の日本人兄妹例に関して、まずはじめに *LMNA* および *ZMPSTE24* について遺伝子異常の有無を検討した。ついで、大阪大学ヒトゲノム研究の倫理審査の承認を得た後に、埼玉医科大学ゲノム医学研究センターおよび東京大学大学院新領域創成科学研究科との共同研究として、全ゲノムシーケンセス (Exome 解析) による遺伝子解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) MAD type B と遺伝子診断した早老症姉妹に関して、無投薬での経過観察をおこなったのちに、ビスフォスホネート製剤週 1 回内服による治療を開始した。姉は 9 歳時から、妹は 6 歳時から治療を開始した。現在までに姉は 4 年、妹は 3 年が経過したが、フォロー期間中、特に副作用を認めていない。治療開始後皮膚病変や脂肪萎縮の程度は横ばいで進行を認めず、頸部エコー検査にて血管病変は認めていない。また、腰椎骨密度に関して明らかな改善傾向 (治療前は低下傾向、治療開始後より増加傾向) と、骨吸収マーカーの低下傾向を認めている。脂肪萎縮に伴う耐糖能異常もみられていない。早老症の患者において、ビスフォスホネート製剤は有効な治療法の 1 つと考えられるため、今後更に長期の投与における治療効果を評価する予定である。一方、末節骨の骨融解と腎臓および皮下の石灰化病変の進行は抑制できていない。ファルネシル化したプレラミン A の蓄積が本症の原因であることから、骨外病変 (腎機能、尿所

見、インスリン抵抗性など)の変化についても、さらに観察していく予定である。

(2) ラミノパチーでは、生体の早期老化の指標として皮膚線維芽細胞の倍加時間の短縮と、継代可能数の減少が報告されている。患者姉妹由来の皮膚線維芽細胞の細胞株を培養したところ、成人健常者由来の皮膚線維芽細胞より増殖が遅い傾向を認めた。高齢者および早老症の一種であるMADの姉妹例の線維芽細胞においては、若年者に較べて非還元末端のシアル酸の増加と、N型糖鎖の分岐鎖構造の増加を認めた。今後は更に症例数を増やして検討するとともに、糖鎖遺伝子の発現パターンを検討する予定である。

(3) 新たにフォローを開始した原因不明の早老症の日本人兄妹例に関して、*LMNA* および *ZMPSTE24* 遺伝子検査を施行したが、*progeria* および *MAD* で既報の遺伝子変異を認めなかった。ついで共同研究施設においてExome解析をおこない、同定された変異を確認するために、当院で患者(兄、妹)と両親の末梢血から抽出されたgenomic DNAを鋳型として直接PCRを行った。両親においてヘテロ接合体変異を、二人の患者においてホモ接合体変異を認めた。これらの候補遺伝子はexome解析で同定された変異と同一で、アミノ酸置換を引き起こすものと考えられた。今後は、変異蛋白の機能解析をすすめ、早老症の病因であるかを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計20件)

(英語原著)

- ① Miyoshi Y, Ohta H, Namba N, Tachibana M, Miyamura T, Miyashita E, Hashii Y, Oue T, Isobe A, Tsutsui T, Kimura T, Ozono K. Low serum concentration of anti-Müllerian hormone are common in 53 female childhood cancer survivors. *Hormone Research in Paediatrics*, 査読あり. 79:17-21, 2013.
- ② Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and Clinical Studies in 138 Japanese Patients with Silver-Russell Syndrome. *PLoS ONE*. 査読あり. 8(3): e60105, 2013.
- ③ Kanai C, Terao M, Tanemura A, Miyoshi Y, Ozono K, Katayama I. Generalized lichen nitidus in Russell-Silver syndrome. *Pediatric Dermatology*. 査読あり. 30(1): 150-151, 2013.
- ④ Ozono K, Namba N, Kubota T, Kitaoka T,

Miura K, Ohata Y, Fujiwara M, Miyoshi Y, Michigami T. Pediatric Aspects of Skeletal Dysplasia.

Pediatric Endocrinology Reviews. 査読あり. 10(1): 35-42, 2012.

⑤ Yamada H, Kondou H, Kimura T, Ikeda K, Tachibana M, Hasegawa Y, Kiyohara Y, Ueno T, Miyoshi Y, Mushiake S, Ozono K. Humoral immunity is involved in the development of pericentral fibrosis after pediatric live donor liver transplantation.

Pediatric Transplantation 査読あり, 16: 858-865, 2012.

⑥ Kato-Nishimura K, Mohri I, Nabatame S, Akagi M, Sakai N, Miyoshi Y, Ozono K, Tachibana N and Taniike M. nCPAP Improves the Quality of Life of Siblings with Mandibuloacral Dysplasia. *The Open Sleep Journal*. 査読あり. 4. 26-28, 2011.

⑦ Murakami M, Bessho K, Mushiake S, Kondou H, Miyoshi Y, Ozono K.

Major role of apolipoprotein B in cycloheximide-induced acute hepatic steatosis in mice. *Hepatology Research*. 査読あり. 41:446-54, 2011.

⑧ Miyoshi Y, Sakai N, Hamada Y, Tachibana M, Hasegawa Y, Kiyohara Y, Yamada H, Murakami M, Kondou H, Kimura-Ohba S, Mine J, Sato T, Kamio N, Ueda H, Suzuki Y, Shiomi M, Ohta H, Shimozawa N, Ozono K.

Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocrine Journal*, 査読あり. 57 (11), 965-972, 2010.

⑨ Eiji Miyoshi, Yasuhiro Ito, Yoko Miyoshi.

Involvement of Aberrant Glycosylation in Thyroid Cancer, *J Oncol*, 査読あり. 2010: 816595: doi: 10.1155/2010/816595.

⑩ Bessho K, Etani Y, Ichimori H, Miyoshi Y, Namba N, Yoneda A, Ooue T, Chihara T, Morii E, Aoki T, Murakami M, Mushiake S, Ozono K.

Increased type 3 iodothyronine deiodinase activity in a regrown hepatic hemangioma with consumptive hypothyroidism. *Eur J Pediatr*, 査読あり. 169(2):215-221, 2010.

⑪ Miyoshi Y, Oue T, Oowari M, Soh H, Tachibana M, Kimura S, Kiyohara Y, Yamada H, Bessyo K, Mushiake S, Homma K, Hasegawa T, Sasano H, Ozono K. A Case of Pediatric Virilizing Adrenocortical Tumor Resulting in Hypothalamic-pituitary Activation and Central Precocious Puberty Following Surgical Removal. *Endocrine Journal*, 査読あり. 56(8): 975-982, 2009.

⑫ Kitaoka T, Namba N, Kim JY, Kubota T,

Miura K, Miyoshi Y, Hirai H, Kogo M, Ozono K. A Japanese Male Patient with 'Fibular Aplasia, Tibial Campomelia and Oligodactyly': An Additional Case Report. Clin Pediatr Endocrinol. 査読あり. 18(3): 81-86, 2009.

(和文原著)

- ① 日本小児内分泌学会 CCS 委員会,横谷進, 西美和, 河野斉, 安達昌功, 石黒寛之, 大竹明, 田島敏広, 藤原幾磨, 堀川玲子, 有瀧健太郎, 三善陽子, 依藤亨. 小児がん経験者(CCS)のための内分泌フォローアップガイド. 日本小児科学会雑誌, 査読あり.116(12): 1976-1977, 2012.
- ② 三善陽子, 竹宮考子, 前川貴伸, 和田友香, 守本倫子, 成田雅美, 大藪恵一, 堀川玲子. 小児保健分野で働く女性を取り巻く職場環境・家庭環境と出産・育児・復帰支援体制. 小児保健研究.査読あり.71(1),60-66,2012.
- ③ 三善陽子, 酒井規夫, 池田佳世, 長谷川泰浩, 橘真紀子, 清原由起, 山田寛之, 近藤宏樹, 濱田悠介, 木村志保子, 里龍晴, 峰淳史, 神尾範子, 鈴木保宏, 塩見正司, 太田秀明, 下澤伸行, 大藪恵一. 副腎白質ジストロフィーの日本人男児 11 例における副腎機能解析. 日本内分泌学会雑誌, 査読なし. 87suppl;83-85, 2011.
- ④ 三善陽子. 子どもの健康なからだを育む, 小児保健研究, 査読なし. 230-236. 2010.

(和文総説)

- ① 三善陽子, 難波範行, 橘真紀子, 宮下恵実子, 橋井佳子, 太田秀明, 大藪恵一. 医学の世界社. 血清抗ミューラー管ホルモン (AMH) 測定は小児の性腺機能評価に有用である, ホルモンと臨床 59(12), 65-68. 2011.
- ② 三善陽子, 大藪恵一. 東京医学社. 小児内科. 小児疾患診療のための病態生理 2. 第 4 版, ビタミン D 依存性くる病, 575-578. 2009.
- ③ 三善陽子, 大藪恵一. 診断と治療社. 小児科診療. 小児の症候群 2009 年増刊号 Frasier 症候群, 322. 2009
- ④ 三善陽子, 大藪恵一. 診断と治療社. 小児科診療: 小児の症候群. 2009 年増刊号 Denys-Drash 症候群, 372. 2009.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中尾紀恵, 三善陽子, 中川夏季, 木村武司, 橘真紀子, 長谷川泰浩, 近藤宏樹, 難波範行, 大藪恵一. ビスフォスフォネート投与で骨密度の改善がみられた早老症姉妹例. 第 22 回臨床内分泌代謝 Update. 2013. 01. 18. 埼玉.
- ② Yoko Miyoshi, Noriyuki Namba, Keiichi Ozono. Osteoporosis and Partial Lipodystrophy in Two Sibling Patients with

Premature Aging Disease, Mandibuloacral Dysplasia. 14th International Congress of Endocrinology. 2010. 03. 26-30. 京都.

[図書] (計 9 件)

- ① 三善陽子. 診断と治療社. 小児消化器疾患: 臨床・病理カンファレンス. SGA 児の成因と予後. 2012. 103.
- ② 位田忍, 窪田昭男, 中山雅弘, 三善陽子, 惠谷ゆり. 診断と治療社. 小児消化器疾患: 臨床・病理カンファレンス. 乳児持続性高インスリン性低血糖症. 2012. 106-108.
- ③ 橘真紀子, 三善陽子. 東京医学社. 小児疾患の診断治療基準 第 4 版: 栄養・栄養性疾患 やせ, 2012. 90-91.
- ④ 三善陽子, 大藪恵一. 診断と治療社. 小児の発熱 A to Z: 診断・治療の pitfalls—第 9 章非感染性疾患: 5. 内分泌, 2012. 118-122.
- ⑤ 三善陽子, 大藪恵一. 日本臨床社. 新領域別症候群シリーズ: 腎臓症候群 第 2 版 先天性・遺伝性腎疾患: Frasier 症候群, 2012. 407-409.
- ⑥ 三善陽子, 大藪恵一. 中外医学社. ナースの小児科学: 改訂第 5 版, 第 6 章保健. 2011.
- ⑦ 橘真紀子, 三善陽子. 診断と治療社. 小児臨床栄養学: 第 9 章栄養指導: 小児科医, 2011. 412-414.
- ⑧ 三善陽子, 大藪恵一. 東京医学社. 最新成長障害の診かたと対応: 小児がん経験者と晩期内分泌障害, 小児内科, 2010. 627-631.
- ⑨ 三善陽子, 大藪恵一. へるす出版. ココからはじめる小児がん看護: 治療による障害(急性期)の理解と対応, 2009. 185-192.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三善 陽子 (MIYOSHI YOKO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40457023

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

難波 範行 (NAMBA NORIYUKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 10379076