

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07438

研究課題名(和文) 早老症の皮膚硬化、脂肪萎縮の病態解明と新規治療法の開発を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of skin sclerosis and lipatrophy in progeria and development of novel treatment

研究代表者

遠藤 雪恵 (Endo, Yukie)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00372350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Werner症候群は、思春期以降に、白髪、白内障など様々な老化兆候が出現する「早老症」である。同じく早老症の一つである「Atypical Werner症候群」とは、皮膚硬化と脂肪萎縮を呈し、Werner症候群様の症状を呈し、核膜蛋白質ラミンAの遺伝子変異をもつ。本研究では、「Atypical Werner症候群」の線維芽細胞や脂肪細胞を用いて、皮膚硬化や脂肪萎縮が生じる機序の解明を試み、新たな成果が得られつつある。一方で、同じくラミンA遺伝子変異が原因であるハッチンソンギルフォード症候群由来細胞において有効性が得られたmTOR阻害剤やファルネシル転移酵素阻害薬の優位な改善効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Atypical Werner症候群患者由来皮膚線維芽細胞では、同じくラミンA遺伝子変異が原因である Hutchinson-Gilford syndrome (HGS)の細胞様の核変形が多くみられ、ヘテロクロマチンの局在異常もみられた。さらに、健常人由来線維芽細胞と比べて、患者由来線維芽細胞では、酸化ストレスによる老化が亢進するだけでなく、UVA照射による光老化も亢進することを見出した。本研究の成果によって、さらに線維化と脂肪萎縮の機序を明らかにすることができれば、早老症における皮膚硬化の病態解明や新たな治療法の開発に貢献できると予想される。

研究成果の概要(英文)：Werner syndrome is a "premature aging syndrome" in which signs of aging appear after puberty. Atypical Werner syndrome, which is also a form of premature aging syndrome, is characterized by skin sclerosis and lipatrophy, Werner syndrome-like symptoms, and genetic mutations in the nuclear membrane protein lamin A. In this study, we have attempted to elucidate the mechanism of skin sclerosis and lipatrophy using fibroblasts and adipocytes from patients with Atypical Werner syndrome, and new results are being obtained. On the other hand, mTOR inhibitors and farnesyltransferase inhibitors, which have been shown to be effective in Hutchinson-Gilford syndrome-derived cells, also caused by lamin A mutation, did not show any significant improvement.

研究分野：皮膚科学

キーワード：老化 早老症 ラミンA 線維化

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、家族性脂肪委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、皮膚硬化 (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。

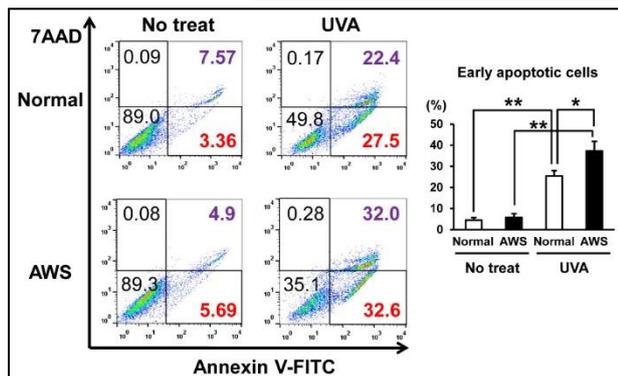
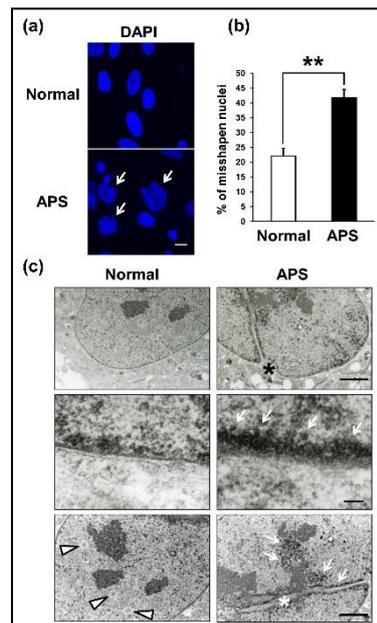
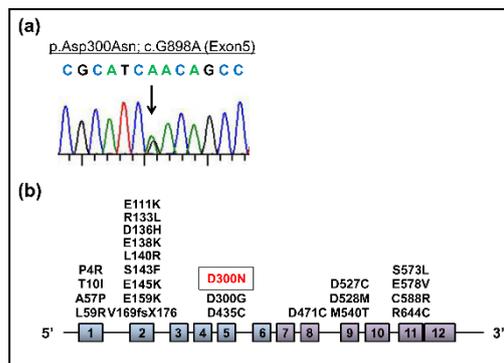
Werner 症候群は、思春期以降に、白髪、白内障などさまざまな老化兆候が出現する「早老症」であり、RecQ 型の DNA ヘリカーゼ遺伝子が原因遺伝子として知られている。臨床的に Werner 症候群が考えられる患者の約 20%に Werner 症候群遺伝子変異を持たない患者が存在し、Atypical Werner 症候群として報告されていたが、最近になって、これらの患者の中にラミン A 遺伝子変異を持つ例が見つかった。

最近、当科では以下の臨床症状を呈する患者を経験した。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 (脂肪萎縮)、足趾潰瘍、皸声あり。足底の角化、白髪、白内障はみられなかった。Werner 症候群の遺伝子検索を行ったが 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 (前ページ右下図参照)。変異部位はラミンの 2 量体形成に重要な部位である。当科の症例は本邦初症例であり、これまでに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 (J Dermatol 2014;41:1047-52.)。患者由来細胞で HGS 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 (右図)。

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することが報告されており (J Invest Dermatol 2013; 133:1857-62.)、ラミン A が光老化を制御する可能性が示唆された。そこで 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 (右下図)。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 (Experimental Dermatology 2016; S3: 20-7.)。

以上の如く、ラミン A 遺伝子変異によって UVA 照射による光老化が亢進することを明らかにしたが、皮膚硬化(線維化)と脂肪萎縮が生じる原因、機序については不明である。

ラミン A 遺伝子異常を有する病気 (Laminopathy) の中には、HGS に対する治療効果が海外より報告されている。ファルネシル転移酵素阻害薬 (ロナファルニブ) 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



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)。別のファルネシル転移酵素阻害薬であるティピファルニブを用いた検討も行われており、HGS 細胞の核異常が改善された報告がある(Am J Med Genet A 2013; 161A: 1599-611)。本邦ではロナファルニブを入手することは困難なため、ティピファルニブを用いて検討を行う。また、mTOR 阻害剤によって HGS の核異常や細胞増殖能異常が改善することも報告されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2018; 115(16): 4206-4211.)。プラバスタチン (メバロチン) とゾレンドロネート (ゾメタ) の併用によって HGS の核異常や HGS モデルマウスの症状が改善したとの報告(Nature Medicine, 2008; 14: 767-72)がある。しかし、Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ線維芽細胞における線維化亢進、及び脂肪細胞の細胞死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。

2. 研究の目的

次の 2 点を主な目的とした。

1. 患者由来線維芽細胞や脂肪細胞を用いて、線維化と脂肪萎縮の機序を明らかにする。
2. Atypical Werner 症候群の皮膚線維化、脂肪萎縮に対する、HGS に効果のあった薬剤による治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- ① 患者由来線維芽細胞や脂肪細胞を用いて、線維化と脂肪萎縮の機序を明らかにする。

患者由来線維芽細胞と健常人由来線維芽細胞を用いて、線維化に関する因子(Collagen type I, TGF- β , α SMA, CTGF, MMP-1, TIMP-1 など)を免疫染色、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法にて比較する。さらに TGF- β 刺激による線維化についても検討する。増殖能も検討する。マイクロアレイ法にて患者由来線維芽細胞と健常人由来線維芽細胞で発現している様々な因子について違いを検討する。患者由来脂肪細胞と健常人由来脂肪細胞を用いて、脂肪細胞の増殖能やアポトーシスの程度を比較する。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) 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う。近年、脂肪組織から産生されるサイトカイン (アディポカイン) が皮膚の線維化の制御に関係することが注目されている (Arthritis Rheumatol 2015;67:1062.)。例えば、血清アディポネクチン量は強皮症患者の皮膚硬化度と逆相関することが報告されている。そこで、アディポカインの産生量も検討する。脂肪細胞の培養上清を用いて線維芽細胞を培養して、線維化への影響についても検討する。

- ② Atypical Werner 症候群の皮膚線維化、脂肪萎縮に対する、HGS に効果のあった薬剤による治療効果を明らかにする。

Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ線維芽細胞における線維化亢進や脂肪細胞のアポトーシス亢進がファルネシル転移酵素阻害薬ティピファルニブによって改善されるのか検討する。また、mTOR 阻害剤やプラバスタチンとゾレンドロネートの併用によって HGS の核異常や増殖能異常が改善したとの報告があり、その効果も検討する。

4. 研究成果

患者由来線維芽細胞と健常人由来線維芽細胞を用いて、線維化に関する因子(Collagen type I, TGF- β , α SMA, CTGF, MMP-1, TIMP-1 など)を免疫染色、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法にて比較した結果、Atypical Werner 症候群由来線維芽細胞では、線維化が亢進する傾向が得られた。また、その機序についても明らかにしつつある。脂肪細胞のアポトーシスについては優位な変化が得られていないが、線維化への関与について検討を行っている。

これまでに 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。そこで、Atypical Werner 症候群のラミン遺伝子変異を持つ線維芽細胞における線維化亢進がファルネシル転移酵素阻害薬ティピファルニブによって改善されるのか検討した。その結果、ティピファルニブによる優位な線維化抑制、改善効果は得られなかった。さらに、mTOR 阻害剤も有効性が報告されているため、Atypical Werner 症候群由来細胞での有効性について検討を行った。その結果、Atypical Werner 症候群由来細胞でみられる核変形やヘテロクロマチンの局在異常の優位な改善は得られなかった。また、細胞増殖異常や線維化への改善効果も得られなかった。プラバスタチンとゾレンドロネートの併用による HGS の核異常や増殖能異常、線維化への影響についても検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	茂木 精一郎 (Motegi Sei-ichiro) (20420185)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関