

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 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591554

研究課題名（和文） 遺伝子変異型により分類化した血管型エーラス・ダンロス症候群の治療手法の開発

研究課題名（英文） Development and classification of therapeutic method for vascular Ehlers-Danlos syndrome by mutation types

研究代表者

渡邊 淳 (WATANABE ATSUSHI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号 10307952

研究成果の概要（和文）：

血管型エーラス・ダンロス 症候群（血管型 EDS, エーラス・ダンロス 症候群 IV 型）は、血管や管腔臓器に特異的に発現する III 型コラーゲン（COL3A1）の片方のアレルの遺伝子変異で発症する。本症候群は血管破裂、消化管破裂、子宮破裂を合併し、時に突然死を呈する常染色体優性遺伝病であり、他のエーラス・ダンロス 症候群と異なる疾患群と考えられている。現在のところ、根本的な治療法はなく対症療法が主となっている。本研究では血管型 EDS の COL3A1 変異型（グリシン変異、splicing 変異）ごとに、COL3A1 変異アレルに対する RNAi (RNA interference) による発現抑制効果を検討し、これまで治療法のない血管型 EDS に対する治療の可能性について臨床応用に向けた基礎的研究成果を集積することを目的とした。それぞれの変異型に対して変異部位特異的な siRNA を作成し、変異線維芽細胞に導入した。Splicing 変異においては、変異 mRNA の発現を特異的に 80%以上減少することができた。さらに、コラーゲンの発現増加に関わる *Lysyl oxidase (LOX)* の発現ベクターを siRNA と同時に導入したところ正常 COL3A1 の発現の増加を認めた。その後、グリシン変異、splicing 変異による dominant negative メカニズム以外に、haploinsufficiency を来すナンセンス変異に対しては、*Lysyl oxidase (LOX)* を導入することで正常 COL3A1 の発現の増加を認めた。新たに splicing 異常をきたす変異を同定し、スプライスを人工的に起こす発現ベクターを構築し、in vitro 変異評価できるシステムを構築した。

研究成果の概要（英文）：

Vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS), is a life-threatening dominantly inherited disorder caused by COL3A1 mutation. Although gene therapy is an important option for treatment of genetic disorders, addition of the defective gene is not applicable for dominant diseases such as vEDS. To establish a therapeutic strategy for vEDS, we examined the feasibility of two approaches in each mutation. First, we tested RNAi mediated inhibition of the mutant allele. We synthesized several small interfering RNA (siRNA) molecules targeting sequence specific for mutant mRNA and introduced into patient's fibroblasts. Quantitative measurement of COL3A1 mRNA showed that mutant mRNA levels could be selectively decreased up to 80 % in splicing mutation and it was possible to increase the relative concentration of normal triple helix. Second, we attempted to increase the

concentration of normal *COL3A1* mRNA, since half-dose of *COL3A1* may not be sufficient to prevent vEDS symptoms. *Lysyl oxidase (LOX)* is a bifunctional protein carrying activities of both an extracellular enzyme that controls the maturation of collagen and elastin and an intracellular transcriptional activator for the human collagen III promoter. When patient's cells were transfected with mutant specific siRNA and *LOX* expression vector, specific inhibition of the mutant allele and enhancement of the normal allele were observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学、家族性大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

血管型エーラス・ダンロス 症候群 (血管型 EDS, エーラス・ダンロス 症候群 IV 型) は、血管や管腔臓器に特異的に発現する III 型コラーゲン (*COL3A1*) の片方のアレルの遺伝子変異で発症する。本症候群は血管破裂、消化管破裂、子宮破裂を合併し、時に突然死を呈する常染色体優性遺伝病であり、他のエーラス・ダンロス 症候群と異なる疾患群と考えられている。現在のところ、根本的な治療はなく対症療法が主となっている。欧米では家族歴のある動脈瘤の鑑別疾患としてマルファン症候群と対比されている。血管型 EDS はマルファン症候群に比して血管脆弱性が強く、血管へのアプローチが難しく手術による対応が難しい。我々は *COL3A1* 遺伝子解析法を確立し、本邦での遺伝子変異を同定するとともに、血管型 EDS の遺伝診療のあり方を検討している。血管型 EDS を来す *COL3A1* 遺伝子変異には、コラーゲン構造に重要な役割を示すグリシン変異が 2/3、splicing 変

異が 1/3 を占める。両者の変異はともにドミナント・ネガティブにより、正常コラーゲン産物機能を阻害し、正常コラーゲンの増加では治療に結びつかないことが予測されていた。

2. 研究の目的

本研究では血管型 EDS の *COL3A1* 変異型 (グリシン変異、splicing 変異) ごとに、*COL3A1* 変異アレルに対する RNAi (RNA interference) による発現抑制効果ならびに正常 *COL3A1* の増加を RNA、蛋白、細胞レベルで解析、安全性も含め検討し、これまで治療のない血管型 EDS に対する治療の可能性について臨床応用に向けた基礎的研究成果を集積することを目的とする。

3. 研究の方法

血管型 EDS で報告された *COL3A1* 遺伝子変異型それぞれについて、治療の可能性を検討した。splicing 異常では splicing donor site

が消失し、変異 mRNA では正常 mRNA とは異なる配列を含めて転写される。2種類の splicing 部位変異に対し、それぞれ変異 mRNA に特異的配列を有する2種類の siRNA を設計し、患者線維芽細胞に導入した。グリシン変異についても変異部位に対する2種類の siRNA を設計し、患者線維芽細胞に導入した。発現の評価は total RNA から得られた RT-PCR をリアルタイム法で検討した。コラーゲンを増幅する目的として、*Lysyl oxidase (LOX)* を含む発現ベクターを構築した。

4. 研究成果

splicing 異常をきたす2つの変異部位に対しては、変異特異的 siRNA を用いることで、変異 RNA の発現を特異的に阻害することが可能であった。*Lysyl oxidase (LOX)* を含む発現ベクターを同時に細胞に導入することで、正常 *COL3A1* の特異的発現増加を来すことを明らかにした。グリシン変異に対しては、変異 RNA においては1塩基の違いしかないため、変異 siRNA を作成したが、正常 RNA の発現阻害も認められた。

その後、グリシン変異、splicing 変異による dominant negative メカニズム以外に、haploinsufficiency を来すナンセンス変異に対しては、*Lysyl oxidase (LOX)* を導入することで正常 *COL3A1* の発現の増加を認めた。

新たに splicing 異常を来すイントロン部位の変異を同定した。変異部位によりスプライスを人工的に起こす発現ベクターを構築し、*COL3A1* を発現していない COS 細胞に導入することにより変異 RNA を産生する in vitro 変異評価できるシステムを構築した。この変異に対しては、変異特異的なアンチセンスオリゴを合成し、変異線維芽細胞と発現ベクターとともに COS 細胞に導入したが正常修復を来さなかった。

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8件)

- ① Kimura K, Sakai-Kimura M, Takahashi R, Watanabe A, Mukai M, Noma S, Fukuda K: Too friable to treat? Lancet 375:1578, 2010
- ② Kinoshita H, Watanabe A, Hisayasu S, Suzuki S, Shimada T: Targeted gene delivery to selected liver segments via isolated hepatic perfusion. J Surg Res 160 47-51, 2010
- ③ Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y: Pleuropulmonary pathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome: Laceration, haematoma, and fibrous nodules. Histopathology 56 944-950, 2010
- ④ 古庄知己, 渡邊 淳, 森崎裕子, 福嶋義光, 簗持 淳: 難治性疾患克服事業による血管型エーラスダンロス症候群の実態調査. 日本遺伝カウンセリング学会誌 31:157-161, 2010
- ⑤ Banyar Than Naing, Watanabe A, Shimada T: A novel mutation screening system for Ehlers-Danlos Syndrome, vascular type by high-resolution melting curve analysis in combination with small amplicon genotyping using genomic DNA. Biochem Biophys Res Commun 405:368-372, 2011
- ⑥ 渡邊淳, 島田隆: Ehlers-Danlos 症候群の基礎. 日本胸部臨床 70: 319-328, 2011
- ⑦ Masuno M*, Watanabe A*, Banyar Than Naing, Shimada T, Fujimoto W, Ninomiya

S, Ueda Y, Kondo E, Yamanouchi Y, Ouchi K, Kuroki Y. Ehlers-Danlos Syndrome, Vascular Type: A Novel Missense Mutation in *COL3A1* Gene. *Congenit Anom* 2012;52:207-210

- ⑧ Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, Watanabe A, Iijima O, Migita M, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T. Successful gene therapy *in utero* for lethal murine hypophosphatasia. *Hum Gene Ther* 2012;23:399-406

[学会発表] (計 13 件)

- ① 渡辺 淳, 古庄知己, 鈴木由美, 日本エーラスダンロス症候群協会 (友の会). 日本におけるエーラス・ダンロス症候群の現状と課題患者会と協働で行ったアンケート調査を踏まえて. 第 34 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (平成 22 年 5 月, 於東京)
- ② バニャー タン ナイン, 渡邊 淳, 島田 隆. 高解像度融解曲線分析法を用いた血管型 Ehlers-Danlos 症候群 (vEDS, EDS type IV) の新規遺伝子変異スクリーニングシステムの開発. 第 42 回日本結合組織学会学術大会 (平成 22 年 8 月, 於秋田)
- ③ 吉橋博史, 濱崎祐子, Banyar Than Naing, 島田 隆, 渡邊 淳. 腎移植を契機に診断された血管型エーラスダンロス症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会 第 5 5 回大会 (平成 22 年 10 月, 於さいたま)
- ④ Banyar Than Naing, 渡邊 淳, 森崎裕子, 菅野美紀, 船越美由紀, 籾持 淳, 島田 隆. *COL3A1* 遺伝子にナンセンス変異を同定した血管型 Ehlers-Danlos 症候群 2 症例. 日本人類遺伝学会 第 5 5 回大会 (平成 22 年 10 月, 於さいたま)
- ⑤ Banyar Than Naing, WATANABE A, HATAMOCHI A, MORISAKI M, SHIMADA T. Nonsense mutations of *COL3A1* gene causing nonsense-mediated mRNA decay in two Japanese patients with Vascular type of Ehlers-Danlos Syndrome. 60th Annual meeting of American Society of Human Genetics ASHG (Nov, 2010, ワシントン DC)
- ⑥ WATANABE A, Banyar Than Naing, SHIMADA T. a novel mutation screening system FOR vascular type Ehlers-Danlos syndrome (vEDS, EDS type IV) using high resolution melting curve analysis (hrMCA). 9th Asia Pacific Conference on Human Genetics (Nov -Dec 2010, HongKong)
- ⑦ 升野光雄, 渡邊 淳, 藤本 亘, 二宮伸介, 上田恭典, 近藤英生, 山内泰子, 尾内一信, 黒木良和. *COL3A1* 遺伝子新規ミスセンス変異による血管型 Ehlers-Danlos 症候群の一例. 日本人類遺伝学会 第 5 6 回大会 (平成 23 年 11 月, 於幕張メッセ)
- ⑧ Banyar Than Naing, 渡邊 淳, 佐々木 元子, 坪 宏一, 小齊平 聖治, 弦間 昭彦, 島田 隆. イントロンの塩基置換から新規スプライシングを来した血管型 Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会 第 5 6 回大会 (平成 23 年 11 月, 於幕張メッセ)
- ⑨ Watanabe A, Naing BT, Sasaki M, Akutsu K, Kosaihiira S, Gemma A, Shimada T. An intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the *COL3A1* gene as novel mechanisms causing vascular Ehlers-Danlos syndrome. American Society of Human Genetics Meeting 2012 (San Francisco, CA, USA, Nov 6-10,

2012)

- ⑩ Naing BT, Watanabe A, Hatamochi A, Morisaki H, Shimada T. Phenotype differences in patients with nonsense mutations of *COL3A1* causing nonsense-mediated mRNA decay in vascular Ehlers-Danlos Syndrome. First International Symposium on the Ehlers-Danlos Syndrome. (Ghent, Belgium, Sep 8-11, 2012)
- ⑪ Watanabe A, Naing BT, Shimada T. A novel gene therapy strategy for vascular Ehlers-Danlos syndrome. First International Symposium on the Ehlers-Danlos Syndrome. (Ghent, Belgium, Sep 8-11, 2012)
- ⑫ Watanabe A, Hatakeyama M, Tsunoda R, Matsumoto K, Kawame H, Shimada T. Hypermobility Syndrome in Japan. First International Symposium on the Ehlers-Danlos Syndrome. (Ghent, Belgium, Sep 8-11, 2012)
- ⑬ Watanabe A, Hatakeyama M, Tsunoda R, Matsumoto K, Kawame H, Shimada T. The first case of Tenascin-X deficient type Ehlers-Danlos syndrome in Japan. European Human Genetics Conference 2012 (Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012)

[図書] (計1件)

渡邊淳, 島田隆: Ehlers-Danlos 症候群. 先天代謝異常ハンドブック 遠藤文夫 (総編集) 中山書店 2013年 410-411

○取得状況 (計1件)

名称: 家族性大動脈瘤の遺伝子変異スクリーニング方法に関する特許1件
発明者: 渡邊 淳、島田 隆
権利者: 日本医科大学
種類: 特開
番号: 2011-050284

取得年月日: 平成23年3月17日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 淳 (ATSUSHI WATANABE)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号 10307952