

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860928

研究課題名(和文) LEMD3異常から結合織の増生に至る新しい分子機構の解明

研究課題名(英文) A possible role of LEMD3 mutation to cause increase of collagenous fiber

研究代表者

是川 あゆ美 (KOREKAWA, Ayumi)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70436020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Buschke-Ollendorff症候群は遺伝性疾患で、皮膚の結合織母斑と骨の異常を特徴とする。原因遺伝子はLEMD3遺伝子であるが症状は多彩である。H25年度は正常の線維芽細胞でのLEMD3遺伝子の働きを研究した。H26年度は患者の遺伝子変異を調べ、患者細胞での実験を行った。2名の患者から採取した線維芽細胞を培養しそれらの細胞で結合織に関わる遺伝子の働きを調べた。また、患者線維芽細胞に遺伝子を組み込むことを試みた。H27年度はケロイドなどにおけるLEMD3遺伝子の変化を観察した。過去の手術検体から様々なコラーゲン疾患を選び、RNAを抽出したり特殊な染色をしたりしてLEMD3の働きを調べた。

研究成果の概要(英文)：Buschke-Ollendorff syndrome (BOS) is a rare autosomal dominant condition characterized by the development of multiple connective tissue naevi in association with osteopoikilosis and occasionally melorheostosis. The clinical expression of this syndrome is quite variable. BOS results from loss-of-function mutations in the LEMD3 gene. In 2013, we examined the function of LEMD3 gene in normal fibroblasts. In 2014, we picked up the skin tissues of two patients affected BOS, and examined the function of some genes that are closely related to fibrosis. Also, we tried to incorporate those genes into the fibroblasts of patients. In 2015, we examined the function of LEMD3 gene in keloid. And, we got skin tissues from surgical specimens of collagen disorders such as keloid and dermatofibroma, then extracted RNA from those tissues and selectively stained them in order to examine the function of LEMD3 gene.

研究分野：遺伝性皮膚疾患

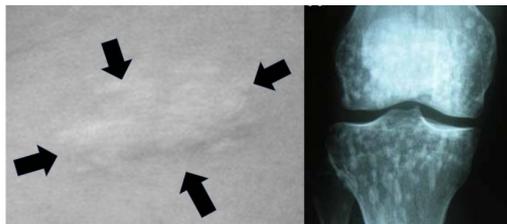
キーワード：真皮 コラーゲン LEMD3 線維芽細胞 骨 ケロイド

1. 研究開始当初の背景

Buschke-Ollendorff 症候群は常染色体性優性を示し、臨床的には皮膚の結合織母斑と長管骨の骨斑紋症を特徴とする。本症の原因遺伝子は LEMD3 遺伝子であり、一方のアリルの loss-of-function 変異で生じる。しかしながら、臨床症状は多彩で、皮膚の結合織母斑のみ、骨の骨斑紋症のみのものであるし、家系内で同じ変異を持ちながら発症しない症例もあり、正常のアリルの LEMD3 遺伝子発現の個人差や組織での違いによるものと推測されている。近年、申請者は皮膚にケロイド様の皮疹の多発する 5 歳男児を経験し、LEMD3 遺伝子変異を同定し本症と診断している (Korekawa et al. BJD 2012)。

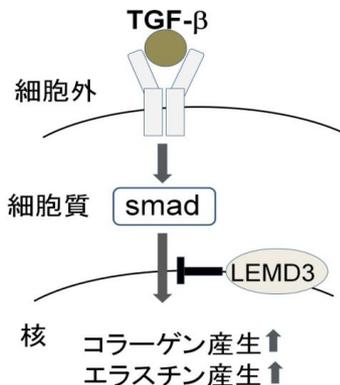
TGF- β は極めて多彩な機能を持っているが、特に皮膚では線維芽細胞のコラーゲン、エラスチンの産生を強力に誘導する。TGF- β のシグナルは細胞内で smad 蛋白群によって核に伝達される。本症の原因遺伝子である LEMD3 遺伝子は核膜に存在する蛋白で、TGF- β の経路の暴走を抑制している。

従って、Buschke-Ollendorff 症候群では LEMD3 遺伝子の loss-of-function 変異がおこり、TGF- β 経路の抑制が外れ、コラーゲンやエラスチンからなる結合織母斑が起こると予想されているが、その詳細ははまだ不明である。また、LEMD3 のノックアウトマウス (LEMD3^{-/-}) が作成されているが致死性であり、また本症と同じ LEMD3 遺伝子の状態であるそのヘテロマウス (LEMD3^{+/-}) は、皮膚症状も骨症状もなく正常である。申請者は、本症の発症機構が明らかにされれば、他の皮膚結合織異常症の機序解明、さらに新規治療法の開発に大きな助けになるのではないかと考え本研究を発想した。



結合織母斑

骨斑紋



LEMD3はTGF- β シグナルを抑制

2. 研究の目的

本研究の目的は、LEMD3 の loss-of-function 変異により結合織の増生機構解明、ならびに結合織増生皮膚疾患での LEMD3 異常の検索である。その目的のために、主に以下の研究を予定している。

(1) LEMD3 遺伝子機能：正常線維芽細胞における LEMD3 の遺伝子導入と遺伝子抑制による結合織関連遺伝子の発現の変化

(2) 本症線維芽細胞の解析：本症線維芽細胞における LEMD3 遺伝子導入による細胞の正常化を実現

(3) 各種皮膚疾患の解析：ケロイド、皮膚線維腫などの結合織増生疾患における LEMD3 遺伝子の変化

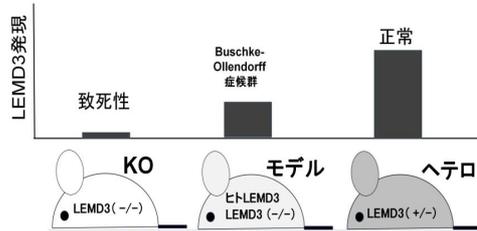
(4) モデルマウス作成：LEMD3 遺伝子改変マウスを駆使して Buschke-Ollendorff 症候群のモデルマウスの作成する。

第1の特色・独創性は、Buschke-Ollendorff 症候群における LEMD3 の活性低下に着目し、新しい結合織の増生機構の解明を試みる新機軸である。

真皮においてコラーゲンやエラスチンが増加する状態は、線維化、創傷治癒といった正常の反応から、強皮症といった炎症、ケロイドや皮膚線維症などの腫瘍まで、多種多様であるが、いまだ多くの状態でその原因は不明である。今回申請者は LEMD3 や smad が関連する新しいシグナル経路の関与を提案する。

第2は、ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを用いた本症モデルマウス作成への新しい挑戦である。

LEMD3 のノックアウトマウス LEMD3^{-/-} は致死性であり、そのヘテロマウス LEMD3^{+/-} は、皮膚症状も骨症状もなく正常である。その原因として、ヘテロ状態でもマウスの遺伝子は十分機能していると考えられる。そこで、ヒト LEMD3 遺伝子のトランスジェニックマウスを作成する。プロモーターは薬剤誘導性のものとして発現を調節できるものとする。そしてノックアウトマウスとそのトランスジェニックマウスを掛け合わせ、ヒトの LEMD3 遺伝子のみ発現するようなマウスを作成する。そして、薬剤で LEMD3 の発現を調整し、本症のモデルマウスを作成する。本症の予想される結果と意義は皮膚科分野への波及効果である。もちろん、本症で LEMD3 の抑制からコラーゲンやエラスチンの発現増加がおこることが明らかにされれば、新しい結合織増生のメカニズムが提案される。また、本症や結合織母斑では、その経路をブロックするような治療の開発も期待できる。さらに上述したような現在我々を悩ませる強皮症やケロイドなどの難治性疾患の新しい観点からの治療にも発展すると確信する。



3. 研究の方法

平成 25 年度：正常細胞での LEMD3 遺伝子の強制発現・抑制実験、本症患者の遺伝子解析、平成 26 年度：患者細胞での LEMD3 レスキュー実験、トランスジェニックマウスの作成、平成 27 年度：結合織増生疾患での LEMD3 の発現の検討、モデルマウスの作成、を行う。平成 25 年度

(1) 正常線維芽細胞での LEMD3 遺伝子の強制発現

LEMD3 の cDNA を構築し、ベクターに挿入し発現ベクターを構築する。

さらに、LEMD の発現を調整できるテトラサイクリンでの誘導可能な発現ベクターも作成する。

線維芽細胞に通常の発現ベクターを一時的に導入し、ファイブロネクチン、メタロプロテナーゼ群、I、III 型コラーゲン、エラスチンなどの結合織に関連する遺伝子発現の抑制を RT-PCR やウエスタンブロットで確認する。

さらに、発現誘導の系でも線維芽細胞の細胞株で stable な系を作成する。

またテトラサイクリンでの誘導前後でも、それらの細胞で遺伝子発現を検討する。

(2) 正常線維芽細胞での LEMD3 遺伝子の発現抑制

LEMD3 の種々の shRNA を使い線維芽細胞に導入し、LEMD3 の発現から抑制効率のよい shRNA を選択する。

さらに、その shRNA の発現ベクターや誘導可能な発現ベクターも作成する。

線維芽細胞に shRNA そのものを導入し、結合織に関連するファイブロネクチン、メタロプロテナーゼ群、I、III 型コラーゲン、エラスチンの発現抑制を RT-PCR やウエスタンブロットで測定する。

さらに、shRNA の発現ベクターや誘導の系でも線維芽細胞の stable な系を作成し、種々の遺伝子発現の増加をみる。

(3) Buschke-Ollendorff 症候群患者の遺伝子変異検索と資料の保存

弘前大学病院に来院あるいは他の施設からの依頼のあった患者の遺伝子変異検索は継続して行う。

患者の結合織母斑部と正常部から線維芽細胞を採取し培養し、保存する。

組織は、凍結保存も行う。

平成 26 年度

(4) 患者細胞での LEMD3 レスキュー実験

申請者は 2 名の Buschke-Ollendorff 症候群患者の経過を観察している。患者の結合織母斑部と正常部から線維芽細胞を採取し培養する。

それらの細胞で上述した結合織関連の遺伝子の発現を測定する。

患者線維芽細胞に遺伝子強制発現で使用した通常の発現ベクターや誘導可能な発現ベクターを導入する。可能であれば、stable な系も作成する。

その細胞株にて結合織関連の遺伝子群の発現を見る。

(5) ヒト LEMD3 遺伝子トランスジェニックマウスの作成

ヒト LEMD3 遺伝子を、テトラサイクリン誘導型のプロモーターを有するトランスジェニックマウス用のベクターに組み込む。

正常あるいは患者線維芽細胞に導入して、LEMD3 の発現を確認する。

その細胞株にて結合織関連の遺伝子群の発現を確認する。

そのコンストラクトにてトランスジェニックマウスを作成する。

皮膚を採取して、ヒト LEMD3 の発現を確認する。

テトラサイクリン投与での誘導も確認する。

平成 27 年度

(6) ケロイド、皮膚線維腫などの結合織増生疾患における LEMD3 遺伝子の変化

弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座あるいは医学部附属病院に保管している過去の手術検体から、各種結合織増生疾患を選択する。

凍結組織あるものは、そこから RNA を抽出し、RT-PCR にて LEMD3 の発現を検討する。

凍結組織のないものは、酵素抗体法にて組織学的に LEMD3 の発現を見る。

(7) モデルマウスの作成

ジーントラップ法によって作成されたノックアウトマウスを Baygenomics 社から購入する。ジーントラップベクターは LEMD3 のエクソン 4 に挿入され遺伝子が発現していないことを確認する。

ヒト LEMD3 遺伝子のトランスジェニックマウスとヘテロマウスとの交配を繰り返し、LEMD3 ノックアウトマウスにトランスジーンが導入された状態のマウスを作成する。

誘導型であるため、いろいろな量のテトラサイクリンをためし、LEMD3 の発現を調整し、モデルマウスを作成する。

いろいろな遺伝子の発現を RT-PCR、ウエスタンブロット、組織学的に検討する。

4. 研究成果

平成 25 年度は正常線維芽細胞での LEMD3 遺伝子の強制発現、発現抑制を検討した。平成 26 年度は Buschke-Ollendorff 症候群患者の遺伝子変異検索と資料の保存、患者細胞での LEMD3 レスキュー実験を行った。2 名の Buschke-Ollendorff 症候群患者の経過を観察していたので患者の結合織母斑部と正常部から線維芽細胞を採取培養し、それらの細胞で上述した結合織関連の遺伝子の発現測定を試みた。また、患者線維芽細胞に遺伝子強制発現で使用した通常の発現ベクターや誘導可能な発現ベクターを導入し stable な系の作成を検討した。平成 27 年度は、ケロイドや皮膚線維腫などの結合織増生疾患における LEMD3 遺伝子の変化を観察した。弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座あるいは医学部附属病院に保管している過去の手術検体から各種結合織増生疾患を選択し凍結組織があるものへは RNA を抽出し RT-PCR にて LEMD3 の発現を検討した。凍結組織のないものは酵素抗体法にて組織学的に LEMD3 の発現をみた。今後は、ケロイドや結合織母斑形成での LEMD3 遺伝子の変化の実験のみならず、骨斑紋症や骨流蝸症の形成での LEMD3 遺伝子の関わりについて実験を加えていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Korekawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D. Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome Showing Vascular Skin Lesions predominantly on the Face. *Case Rep Dermatol*. 査読有, 7(2):194-198;2015.
DOI:10.1159/000438664.

Korekawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D, Kitamura H, Harada K. Erythema induratum of Bazin in a patient with scrofuloderma. *Eur J Dermatol*. 査読有, 25(5):512-513:2015.
DOI:10.1684/ejd.2015.2625.

Korekawa A, Kaneko T, Nakajima K, Rokunohe D, Akasaka E, Nakano H, Sawamura D, Fukui T, Takiyoshi N, Kitamura H, Harada K. Mycosis fungoides bullosa associated with bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*. 査読有, 54(9):e366-368:2015.
DOI:10.1111/ijd.12821.

Korekawa A, Nakajima K, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D. Discoid lupus erythematosus with dystrophic calcinosis cutis. *JAAD Case Reports*. 査読有, 1(4):182-184:2015.

DOI:10.1016/j.jdc.2015.01.006.

Korekawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D. Necrobiosis Lipoidica in the Absence of diabetes mellitus: A case report and an analysis of 116 Japanese cases. *Case Rep Clin Med*. 査読有, 3:639-643:2014.
DOI:org/10.4236/orcm.2014.312136

Korekawa A, Nakano H, Aizu T, Kitamura H, Harada K, Sawamura D: A reddish, pedunculated, granulomatous nodule on the nasal dorsum. *Clin Exp Dermatol*, 査読有, 40(6):703-705, 2015.
DOI: 10.1111/ced.12613.

金城千尋、中野 創、是川あゆ美、豊巻由香、松崎康司、澤村大輔：Buschke-Ollendorff 症候群における LEMD3 遺伝子変異とその機能解析。弘前医学。査読有, 65:21-26, 2014.
<http://hdl.handle.net/10129/5311>

〔学会発表〕(計 2 件)

是川あゆ美、中島康爾、牧田瑛子、金子高英、中野 創、澤村大輔、熊野高行、佐藤正憲：下眼瞼に結節を形成した霰粒腫。日本皮膚科学会青森地方会第 371 例会、2015.8.30. ホテルニューキャッスル(青森県弘前市)

是川あゆ美：Buschke-Ollendorff 症候群における LEMD3 遺伝子変異とその機能解析。第 5 回日本研究皮膚科学会きさらぎ塾、2014.2.6-9. ホテル日航アリビラ(沖縄県那覇市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

是川 あゆ美 (KOREKAWA, Ayumi)
弘前大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70436020