

Schwartz-Jampel 症候群の病態分子機構

研究分担者：平澤恵理⁽¹⁾

共同研究者：野中里紗⁽¹⁾，寧亮⁽¹⁾大野欽司⁽²⁾

(1) 順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター

(2) 名古屋大学大学院医学系研究科

研究要旨

SJS の原因遺伝子が初めて解ったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。

本邦で遺伝子変異確定はまだ、潜在的な罹患者の存在が想定される。本研究の目的は、本邦における Schwartz-Jampel 症候群(SJS)の遺伝子診断は確立しておらず、潜在的な罹患者の存在が想定される。本邦における SJS の遺伝子診断を確立し、その分子病態を明らかにするための基礎研究を推進する。

A：研究目的

軟骨異栄養性筋強直症（Schwartz-Jampel 症候群, SJS）はパールカン欠損疾患であり（*Nature Genetics*,2001, *Am.J.Hum Genet* .2002）筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。申請者らは、生体におけるパールカンの機能解明のため、遺伝子改変動物を作成し、軟骨発生にパールカンが必須であることを示し（*Nature Genetics*1999, &2001）、アセチルコリンエステラーゼを神経筋接合部に局在させる必須分子であることを示した（*Nature Neuroscience* 2002）。これらの研究成果により、SJS の原因遺伝子が初めて明らかになった。効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。平澤等が、米国

で診断した邦人例の他、本邦で遺伝子変異が確定をした SJS はまだなく、潜在的な罹患者の存在が想定される。本研究の目的は、本邦における SJS の遺伝子診断を確立し、その分子病態を明らかにすることである。

B：研究方法

1999 年までに精神・神経センター（NCNP）筋バンクに臨床診断 SJS として登録された 4 中 2 例はパールカン遺伝子変異が検出された。その後、パールカン遺伝子（*HSPG2*）は巨大遺伝子であるので（mRNA で 14294 bp）生検筋を使ったパールカン免疫染色で除外診断してきた。本邦症例を中心に診断システムの構築を目指すため、症例の蓄積が重要である。候補例には、臨床診断・電気生理学検査、必要であれば筋生検を行う。遺伝子変異解析は大野、タンパク質解析は平澤が行

うことにしている。SJS を疑う 1 症例の

初代線維芽細胞をドメイン特異的抗体で染色し、細胞外局在を確認した。Agilent 社 SureSelect Human All Exon kit V4 を用いてエクソン領域の DNA を濃縮し、ABI SOLiD4 シークエンサにてエキソームリシークエンシング解析を行った。パールカンのドメイン III の 2nd laminin type B を cloning し細胞外分泌シグナルをつなげて、変異パールカンの細胞外分泌能を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異解析は順天堂大学および名古屋大学の生命倫理委員会の承認を得てヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い解析する。治療研究を開始する場合には、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に則り、順天堂大学及び名古屋大学の倫理委員会の承認を得た後に進める。

組み換え DNA 実験と動物実験は順天堂大学及び名古屋大学の承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、順天堂大学の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針を遵守して研究を進める。

C: 研究結果

パールカンドメイン特異的抗体による初代線維芽細胞染色ではドメイン I, IV, V に対する特異的抗体により細胞外パールカンが染色されたが、ドメイン III に対する抗体では染色されなかった。エキソームリシークエンシング解析でドメイン III の 2nd laminin type B に p.Leu1088Pro ヘテロ変異を認め、サンガー法にて確認を行った。Leu1088 はオボッサムを除く哺乳類で高度に保存されていた。ドメイン III の 2nd laminin type B に細胞外分泌シグナルを付加し HEK293 細胞に発現をさせたところ、細胞内にも培養液中にも組み換えパールカンの発現を認めた。p.Leu1088Pro を導入したところ細胞内の組み換えパールカンの発現が減弱した。この変異組み換えパールカンの細胞外分泌を全く認めなかった。プロテアーゼ阻害剤 MG132 を加えたところ変

異組み換えパールカンの細胞内発現が正常化し変異組み換えパールカンがプロテアーゼによって分解をされていることが示唆された。

もう一方のアレルにも遺伝子変異が存在することが想定をされるために、エキソームリシークエンシング断片を、BWA にて再度 mapping を行い、unmapped reads を BLAT で mapping を行い、stringency を下げて SNV コールを行ったが、もう一方の変異は同定できなかった。また、網羅的な RT-PCR でもエクソンレベルの large InDel を同定できなかった。

D: 考察

本邦で初めて診断した新規遺伝子変異を同定し、機能解析によりパールカンの分泌の障害を実証した。遺伝子診断は可能になったが、現状では、臨床、電気生理、及びタンパク質レベルの解析を併せ診断することが必要と考えられた。依然、患者数は少なく、さらなる症例発掘と診断基準の充実が必須である。報告例の多いフランスとの情報交換も重要と思われた。病態解析及び治療研究にはモデルマウスを使用して進めることが適正と思われた。さらに、マウス解析の結果より、全身合併症の注意点も警告して行きたい。

E: 結論

SJS の一例において新規ミスセンス変異を同定し、機能解析を行った。本邦においても SJS の診断を確立する必要せいがある。

F: 健康危険情報

特になし。

G: 研究発表

1: 論文発表

論文発表

- 1 Ning R de Vega S, Kurihara H, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Yamada Y, Miner J, Arikawa-Hirasawa E. Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF β pathway. *Am J Pathol* in press.
- 2 de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. A C-terminal fragment of

- 3 fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys* in press.
- 4 Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* in press.
- 5 Suzuki N, Numakawa T, Joshua Chou J, de Vega, S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi N, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Akazawa C. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. *FASEB J* in press.
- 6 ○Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, Okada Y, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res* 2013, 12: 492-505.
- 7 Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Tomikawa-Ichikawa N, Arikawa-Hirasawa E. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int* 2013, 29: 1205-1208.
- 8 Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Proliferation* *Cell Prolif* 2013, 46: 137-145.

2 : 学会発表

1. Kerever A, Mercier F, Oda Y and Arikawa-Hirasawa E, Perlecan is necessary for the maintenance of CD133 expressing neural stem cells in the subventricular zone. **ISSCR** 10th Annual Meeting, June 13-16 2013 Yokohama Japan
2. Mercier F, Vanessa Douet, Arikawa-Hirasawa E, Heparan sulfate connective tissue niche for the regulation of stem cell proliferation in the adult brain. **ISSCR** 10th Annual Meeting, June 13-16 2013 Yokohama Japan
3. Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Liu Y, Akazawa C, Yamataka A, Arikawa-Hirasawa E, Laminin-1 promotes neuronal development in mouse embryonic gut. XXVth International Symposium on Paediatric Surgical Research 21st-22nd September 2012 London UK
4. Arikawa-Hirasawa E, Douet V, Alarcon VB, Kerver A, Mercier F, Fractone niche for neuroepithelial and neural stem cell proliferation: From early brain development to adult subventricular zone. Society for **Neuroscience** annual **meeting 2013** San Diego CA USA
5. Kerver A, Yamada Y, Nonaka R, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E. Age-related alteration of extracellular matrix in the subventricular zone of the lateral ventricles. Society for **Neuroscience** annual **meeting 2013** San Diego CA USA

H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1 : 特許取得

なし

2 : 実用新案登録

なし

3 : その他

なし