

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：大野欽次⁽²⁾野中里紗⁽¹⁾，寧亮⁽¹⁾

(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

本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損による軟骨異栄養性筋強直症（Schwartz-Jampel 症候群, SJS）の臨床診断・遺伝子診断方法を確立し、更に分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究へ繋ぐことである。SJS は原因遺伝子が明らかになったが、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。さらに、モデルマウスを使って、全身の合併症リスクを調査して注意を喚起する。

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。本研究の目的は、細

胞外マトリックス分子パールカン欠損による SJS の臨床診断・遺伝子診断サービスを提供し、更に分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究へ繋ぐことである。パールカン欠損証明による確定診断を行っているのは、現状では、パリ大学 Nicole 博士と本邦申請者のグループであり、特に本邦での症例の発掘、診断、病態解明は不十分である。他のミオトニア症候群同様、抗てんかん薬・抗不整脈薬による対症療法が行なわれるが、経験例では効果少なく、治療の適正化が急がれる。SCN4A 変異による myotonia permanents と SJS の臨床症状、電気生理学所見が似ており鑑別を要す。これまでに文献上、抗てんかん薬等が著効した例では、パールカンの遺伝子変異が示されておらず、Na チャネルの変異例であった可能性もある。現在診断システム自

体が確立されていないため、患者数の把握すら不詳である。パールカンの部分欠損に起因する SJS は、同じパールカン欠損疾患である致死性軟骨異栄養症 dyssegmental dysplasia, Silverman- Handmaker type (DDSH)に比べ、SJS は良性の経過を取り、天寿を全うしうる筋疾患であるため、全身合併症の理解と予防が重要と考えられる。ミオトニア以外の臨床症状が診断、診療における重要検討事項となる。筋症状と並ぶ心血管系のリスクについてマウスモデルによる検討し、広報する必要がある。分担研究者らは、パールカンを欠損するマウス大動脈が約 15% の頻度で大動脈解離を発症する知見を得ている（未発表データ）。

B：研究方法

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立と分子病態解明（平澤、大野）

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、筋生検は必要に応じ行なう。

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。

動物モデルマウスによる病態解析（平澤、寧、野中）

パールカンを軟骨特異的に発現させて生存可能としたレスキューマウス（*HSPG2^{-/-} Tg*）と同腹の野生型対照マウス（*HSPG2^{+/+} Tg*）を解析した。両表現系から胸部大動脈を摘出し、肉眼的健常部分から大動脈リングを作製し、大動脈張力試験を用いて、パールカン欠損の大動脈組織の収縮・弛緩機能の検討を行った。内皮非依存性弛緩作用は、ニトロプルシドナトリウムの添加により、内皮細胞依存性弛緩作用はアセチルコリンの添加により検討を行った。摘出した両表現型マウスの胸部大動脈組織における内皮マーカータンパク質（vWF）と NO 合成酵素（eNOS）の RNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

（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

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立（平澤、大野）

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。エキソームリシーケ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 はオポッサムを除く哺乳類で高度に保存をされていた。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、エキソームリシーケンシング断片を、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。

動物モデルマウスによる病態解析・(平澤、寧、野中)

大動脈張力試験より内皮細胞の機能を検討した結果、パールカン欠損の大動脈において、内皮非依存性弛緩作用には変化が認められなかったが、内皮細胞依存性弛緩作用に有意な低下が認められた。更

に、RNA 発現の解析より、vWF の発現に有意な差は認められなかったが、eNOS の RNA 発現が有意に低下している事が認められた。これらの実験結果から、内皮細胞における弛緩作用の低下は、eNOS 発現の低下を介した NO 遊離低下によることが示唆された。以上のことより、大動脈においてパールカンは、eNOS 発現を調節し、内皮依存性の血管拡張に関与すると考えられた。

D：考察

次世代シーケンサーによる解析を行い、過去に遺伝子変異が判明しなかった症例も診断が可能になった。しかし、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 が存在することを明らかにした。

・パールカン欠損大動脈を使った薬理的、分子生物学的解析より、大動脈においてパールカンは、eNOS 発現を調節し、内皮依存性の血管拡張に関与すると考えられた。SJS 患者の大血管イベントリスクについて注意を喚起する必要がある。

F：健康危険情報

特になし

G：研究発表

1：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 fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys* in press.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Prolif* 2013, 46: 137-145.
- 8 Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate BMP-7 inhibition of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Neurosci Lett* 2012, 528: 120-125.
- 9 Futami I, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa N, Sadatsuki R, Muneta T, Arikawa-Hirasawa E, Sekiya I, Kaneko K. Isolation and Characterization of Multipotential Mesenchymal Cells from the Mouse Synovium. *PLoS ONE* 2012, 7: e45517.
- 10 Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K, Akazawa C, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J Neurosci* 2012, 32: 11586-11599.
- 11 Ishijima M, Suzuki N, Hozumi K, Matsunobu T, Kosaki K, Kaneko H, Hassell JR, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation. *Matrix Biol* 2012, 31: 234-245.
- 12 Inomata T, Ebihara N, Funaki T, Matsuda A, Watanabe Y, Ning L, Xu Z,

- Murakami A, Arikawa-Hirasawa E: Perlecan-Deficient Mutation Impairs Corneal Epithelial Structure, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 1277-1284.
- 13 ○Yoshinaga H, Sakoda, S Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, and Ohtsuka Y: A novel mutation in *SCN4A* causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci* 2012, 315: 15-19.
- 14 Mercier F, Arikawa-Hirasawa E: Heparan sulfate niche for cell proliferation in the adult brain. *Neurosci Lett* 2012, 510: 67-72.
- 15 Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xu Z, Kamikubo Y, Sakurai, T, Kohsaka S, Chiba H, Hattori H, Yamada Y, and Arikawa-Hirasawa E. Laminin $\alpha 1$ is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biol* 2012, 31: 17-28.

2 : 学会発表

1. Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa. Role of perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, in aortic endothelial cell activity in response to arterial tension in vitro 35th MBSJ Dec 11 – 14th, 2012 Fukuoka Japan
3. Kerever A, De Vega S, Nonaka R, Mercier F, Oda Y and Arikawa-Hirasawa E Perlecan is an essential component of the neurogenic niche.

4. Ning L, Kurihara H, Ichikawa-Tomikawa N, Yamada Y, and Arikawa-Hirasawa E Laminin $\alpha 1$ deficiency causes abnormal increase in mesangial cell proliferation and matrix production 35th MBSJ Dec 11 -14th, 2012 Fukuoka Japan

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