

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24年 5月21日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591094

研究課題名（和文）：6型コラーゲン関連筋疾患の治療法開発に関する研究

研究課題名（英文）： Study on the development of treatments for collagen VI related myopathy.

研究代表者：樋口 逸郎 (HIGUCHI ITSURO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80183573

研究成果の概要（和文）：

6型コラーゲン関連疾患の治療法開発のため Ullrich 病や Bethlem ミオパチーを長期経過観察している。Bethlem ミオパチーの歩行困難の主因は関節拘縮であり、整形外科的治療により歩行可能期間が延長した。非定型例発掘のため関節拘縮や過伸展を呈する診断未確定例について6型コラーゲンの3遺伝子および関連蛋白遺伝子について遺伝子解析を続けている。また、thrombomodulin が Ullrich 病線維芽細胞の接着能を改善し、6型コラーゲンの発現を増強することを解明した。

研究成果の概要（英文）：

We have been continuing a long-term follow-up of collagen VI related diseases as Ullrich disease and Bethlem myopathy. The main cause of difficulty in walking in Bethlem myopathy was joint contracture, and the ambulatory period was extended by the orthopedic treatment. We have been performing genetic analysis of genes of collagen VI and related proteins. We found that recombinant thrombomodulin can improve the adhesive capacity of fibroblasts and increase the expression of collagen VI in Ullrich disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：【医歯薬学】

科研費の分科・細目：【内科系臨床医学・神経内科学】

キーワード：【6型コラーゲン, Ullrich 病, Bethlem ミオパチー, 関節拘縮, thrombomodulin, 実験的治療, 細胞接着】

1. 研究開始当初の背景

(1) 6型コラーゲン (collagen VI) の遺伝子変異を有する筋疾患は Ullrich 病 (Ullrich congenital muscular dystrophy) と Bethlem

ミオパチー (Bethlem myopathy) が主要疾患であり、Ullrich 病は我が国では福山型先天性筋ジストロフィーに次いで頻度の高い先天性筋ジストロフィーである。以前は

Ullrich 病と Bethlem ミオパチーは独立した別の疾患と考えられていたが、最近では典型的な重症の Ullrich 病と軽症の Bethlem ミオパチーは 6 型コラーゲン関連筋疾患の連続したスペクトラムの両端に位置する疾患と考えられている。さらに 6 型コラーゲン変異が見られない Ullrich 病も報告され未知の病因による Ullrich 病の研究も続けられている。一方新たな 6 型コラーゲン関連筋疾患として Ullrich 病や Bethlem ミオパチーとは異なり、全身の筋硬化と関節拘縮を呈する筋硬化性ミオパチー (myosclerosis myopathy) が 6 型コラーゲン $\alpha 2$ 遺伝子の劣性変異により生ずることが報告され、6 型コラーゲン関連筋疾患の臨床病型が拡大しつつある。

(2) 我々は Ullrich 病において 6 型コラーゲンの完全欠損が見られることを世界で初めて明らかにし、6 型コラーゲン VI $\alpha 2$ 鎖のホモの frameshift mutation を証明し、Ullrich 病を独立疾患として確定した。また、COL6A1, IVS14DS, G-A, +1 変異を有する Bethlem ミオパチー家系を本邦で初めて報告した。Bethlem ミオパチーは海外では比較的多くの症例が報告されているが、本邦で 6 型コラーゲン変異の確立した典型的 Bethlem ミオパチーは我々が報告した家系が唯一である。Ullrich 病は重症例が多く、本邦では福山型先天性筋ジストロフィーに次いで頻度の高い先天性筋ジストロフィーであり、治療法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

(1) 6 型コラーゲン遺伝子は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ と 3 種類あり、それぞれ exon も多い。そのため遺伝子解析を施行している施設は極めて少ない。

(2) 6 型コラーゲン関連筋疾患の非定型例は見逃されている可能性が高いので、臨床的に関節拘縮や関節過伸展を伴う原因不明の症例についても遺伝子解析を行い診断確定する。

(3) Ullrich 病の病態解析・治療法開発を目的として recombinant thrombomodulin (rTM) が Ullrich 病患者皮膚線維芽細胞に及ぼす影響を検討し、細胞接着能を中心とした細胞機能を改善するための至適条件を確立し臨床応用を目指す。

(4) 最近基底膜に限局した 6 型コラーゲン欠損を呈する Ullrich 病や 6 型コラーゲン遺伝子のヘテロ変異を有する Ullrich 病も報告されており、Bethlem ミオパチーとの異同が問題になっている。さらに 6 型コラーゲン変異が見られない Ullrich 病症例も存在す

ることが明らかになり、Ullrich 病は遺伝学的には heterogeneous な疾患であると考えられる。6 型コラーゲン関連筋疾患の臨床病型を確立し治療法を開発することは他の多くの筋疾患の治療法開発にもつながる重要なものである。

3. 研究の方法

(1) Ullrich 病, Bethlem ミオパチーおよびその他の 6 型コラーゲン関連疾患の診断基準、治療指針を明らかにするため、臨床徴候、臨床経過を解析する。6 型コラーゲン関連筋疾患の非定型例は見逃されている可能性が高いので、臨床的に関節拘縮や関節過伸展を伴う症例や病理学的に 6 型コラーゲンの部分欠損が見られる症例についても積極的に遺伝子解析を行う。

(2) 3 つの異なる遺伝子が存在する 6 型コラーゲンの遺伝子解析は最近当科に導入された次世代シーケンサーを用いて効率よく行う。

(3) rTM が Ullrich 病患者の培養皮膚線維芽細胞に与える作用を多角的に解析するため、細胞接着の他、増殖に与える影響を細胞学的・免疫化学的に検証した。実験に用いた rTM は全て ART-123 (旭化成) である。Ullrich 病患者の皮膚線維芽細胞をチャンバースライド上で培養・固定し rTM 添加群と対照群で 6 型コラーゲンの免疫染色を比較する。

(4) また thrombomodulin の N 末端、および EGF 様ドメインに特異的なモノクローナル抗体を用い、rTM の作用を阻止できるか検討した。新たに診断された 6 型コラーゲン不完全欠損 Ullrich 病および Bethlem ミオパチー患者の皮膚線維芽細胞においても rTM が低下している 6 型コラーゲンを増強させる作用があるかどうかを検討するため、免疫組織化学的染色を行うとともに、ウェスタンブロッティングおよび Real Time PCR を行い、6 型コラーゲン蛋白と mRNA の発現増強の有無を検出する。

(5) また、Ullrich 病で発現が低下している細胞膜 fibronectin 受容体、NG2 proteoglycan、HSP47 等についても蛋白レベルの解析を行い、これらの 6 型コラーゲン関連蛋白の遺伝子異常を有する症例の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) 3 世代にわたるベスレムミオパチーの家系例では症例により関節拘縮や筋力低下に違いが見られた。ベスレムミオパチーで歩行困難となる主な原因は筋力低下ではなく関節拘縮である症例が多く、整形外科的治療により歩行可能期間が著明に延長していた。

(2)実験的治療では rTM を添加した群は、対照群に比して 6 型コラーゲンの発現が亢進していた。種々の濃度 (0.1~100nM) で rTM を添加し、6 時間後の生細胞数を MTT アッセイにて測定したところ、Ullrich 病患者の培養皮膚線維芽細胞の増殖能は rTM 20nM 以下で改善された。thrombomodulin に特異的なモノクローナル抗体を加えても、rTM による作用は殆ど影響されず、rTM の作用機序は未だ明らかではない。

(3)また 6 型コラーゲンが細胞外に分泌されているかどうかを検証するため rTM を添加して培養した培養皮膚線維芽細胞を細胞成分と上清に分け、各々ウェスタンブロッティングを行った結果、rTM は Ullrich 病患者培養皮膚線維芽細胞の 6 型コラーゲン発現を確実に増強させるが、その細胞外分泌は対照と比して有意差は認めなかった。

(4) Ullrich 病で発現が低下している細胞膜 fibronectin 受容体、NG2 proteoglycan、HSP47 等や他の 6 型コラーゲン関連蛋白である collagen XIV α 1 (*COL14A1*), collagen XV α 1 (*COL15A1*), biglycan (*BGN*), fibromodulin (*FMOD*) などの遺伝子解析は次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析と免疫組織化学的検索を続行しており、新しい原因遺伝子を探索中である。

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)

樋口逸郎. コラーゲン 6 型変異によるミオパチー Brain and Nerve (査読無)2011, 63(11):1169-1178

1. Okamoto Y, Higuchi I, Sakiyama Y, Tokunaga S, Watanabe O, Arimura K, Nakagawa M, Takashima H. A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-creatinemia. Ann Neurol. (査読有) 2011, 70(3):486-492
2. Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I,

Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. Acta Neuropathol. (査読有) 2011, 121(6): 775-783

3. Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S. Histopathological differences between human T-lymphotropic virus type 1-positive and human T-lymphotropic virus type 1-negative polymyositis. Clinical and Experimental Neuroimmunology (査読有) 2011, 2, 12-24.
4. 5. Kato M, Nakamura M, Ichiba M, Tomiyasu A, Shimo H, Higuchi I, Ueno S, Sano A. Mitochondrial DNA deletion mutations in patients with neuropsychiatric symptoms. Neurosci Res (査読有) 2011, 69, 331-336.
5. 樋口逸郎. Ullrich 病の筋病理. 神経内科 (査読無) 2009, 71(4):360-368
6. Araya N, Arimura H, Kawahara K, Yagishita N, Ishida J, Fujii R, Aratani S, Fujita H, Sato T, Yamano Y, Higuchi I, Osame M, Nishioka K, Fukamizu A, Arimura K, Maruyama I, Nakajima T. Role of Kenae/CCDC125 in cell motility through the deregulation of RhoGTPase. Int J Mol Med (査読有) 2009,

24, 605-611

7. 樋口逸郎. 整形外科医に必用な筋疾患の知識. 日本整形外科学会雑誌(査読無)
2009, 83: 218-230

[学会発表] (計 2 件)

1. Itsuro Higuchi, Yukie Inamori, Keiko Higashi, Eiji Matsuura, Akihiro Hashiguchi, Tadafumi Shiraishi, Noriko Hirata, Kimiyoshi Arimura
Immunohistochemical studies on HSP47 and vessel related proteins in inclusion body myositis and muscular dystrophies. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases 2010. 7. 21 Naples
2. 白石匡史、樋口逸郎、橋口照人、末原雅人、丸山征郎 コラーゲン VI 欠損 UCMD 患者の皮膚線維芽細胞に対する thrombomodulin の作用 第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月 20 日仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口逸郎 (HIGUCHI ITSURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：80183573

(2) 研究分担者

高嶋 博 (TAKASHIMA HIROSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：80372803

(3) 研究分担者

有村公良 (ARIMURA KIMIYOSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：30140908