

原著

LEMD3 遺伝子のエクソン / インترون接合領域に遺伝子変異を認めた Buschke-Ollendorff syndrome

是川 あゆ美 中野 創 六戸 大樹 赤坂 英二郎
中島 康爾 豊巻 由香 澤村 大輔

抄録 Buschke-Ollendorff 症候群 (BOS) は近年 *LEMD3* 遺伝子の変異により発症することが明らかになった。これまでは変異解析症例がきわめて少なく、病態と変異との関係が明らかになっていない。本研究では臨床的に BOS が疑われた 1 家系について遺伝子変異解析を行った。5 歳男児の発端者は背部と腹部に、無症候性、常色の円形または卵円形の扁平小結節を有していた。病理組織では真皮から皮下脂肪織内にかけて膠原線維の著明な増生を認めた。骨レントゲン写真は正常であった。発端者の父、姉にも体幹に同様の結節がみられた。骨レントゲン写真では、父の長管骨に骨斑紋症の像を認めた。以上より BOS が疑われた。遺伝子変異解析を行った結果 *LEMD3* 遺伝子のエクソン 6 / インترون 6 接合部において、G が T に変わる遺伝子変異が同定され、発端者の父と姉にも同変異が検出されたことから BOS の診断が確定した。今回同定された変異がどのような病的意義を有するか、分子生物学的に議論する。

弘前医学 62 : 117—121, 2011

キーワード : Buschke-Ollendorff 症候群 ; *LEMD3* ; 遺伝皮膚疾患.

ORIGINAL ARTICLE

BUSCHKE-OLLENDORFF SYNDROME PATHOGENETIC MUTATION IN AN INTRON/EXON BOUNDARY OF THE *LEMD3* GENE

Ayumi Korekawa, Hajime Nakano, Daiki Rokunohe, Eijiro Akasaka,
Koji Nakajima, Yuka Toyomaki and Daisuke Sawamura

Abstract Buschke-Ollendorff syndrome (BOS) is recently shown to result from mutations in the *LEMD3* gene. This study examined a 5-year-old boy with asymptomatic multiple flesh-colored round or oval cutaneous plaques on his abdomen and back. Skin biopsy specimen revealed increased amounts of collagen in the dermis extending into the subcutaneous fat. Radiographs of the long bones were normal. Physical examination on the other family members demonstrated that the proband's father and the elder sister had similar skin plaques on their trunk. Radiographs of the long bones revealed osteopoikilosis in the father. These findings made a diagnosis of BOS. We performed a mutational analysis of the *LEMD3* gene using genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes. Direct sequencing of all exons and intron/exon boundaries of the *LEMD3* gene, identified a nucleotide change in the intron6/exon6 boundaries in all the affected family members. We discuss the possible molecular pathogenic mechanism of BOS in relation to the defect of *LEMD3* function.

Hirosaki Med. J. 62 : 117—121, 2011

Key words: Buschke-Ollendorff syndrome; *LEMD3*; genodermatosis.

弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座
別刷請求先 : 中野 創
平成22年12月24日受付
平成23年1月5日受理

Department of Dermatology, Hirosaki University
Graduate School of Medicine
Correspondence: H. Nakano
Received for publication, December 24, 2010
Accepted for publication, January 5, 2011

はじめに

Buschke-Ollendorff 症候群 (以下 BOS) はまれな常染色体優性遺伝疾患である。発症頻度は 20000 人に 1 人といわれており, 皮膚に結合織母斑が多発し長管骨や骨盤に骨斑紋症や骨流蝕症を伴う症候群である¹⁾。本症候群は TGF- β /Smad シグナル伝達経路に抑制的に働く LEMD3 タンパク分子をコードする LEMD3 遺伝子の変異により発症する²⁾。BOS の臨床症状は非常に多彩であり, 本症は致命的疾患ではないが特異な外観を有する皮膚病変が家族内に種々の程度に発現するため, 確定診断をし, 的確な遺伝カウンセリングを行うことが, 患者の精神的苦痛を取り除くために必要である。しかし, これまで遺伝学的解析例が皆無に近く, 遺伝子診断法の確立が望まれていた³⁾。BOS でみられるこうした表現型の多様性がどのようなメカニズムで生じるのかは, 解析された症例が極めて少ないため未だに明らかになっていない。LEMD3 遺伝子異常についてはこれまで国内外合わせてわずか 15 種類の変異しか報告されていないため, 遺伝子変異と臨床症状の関係も全く不明である。

今回, 我々は LEMD3 遺伝子にこれまで報告のないスプライシング異常を同定した, BOS の本邦 1 家系について分子遺伝学的解析を行ったので述べる。

症例と方法

症例は 5 歳男児で, 体幹に多発する自覚症状のない皮膚の隆起性病変を主訴に受診した。初めて皮疹に気付いたのは生後 5 か月頃で, 下背部に生じたものだった。受診時の臨床所見としては, 腹部と下背部に常色で円形ないし楕円形の局面が多発していた (図 1a)。それらは左右非対称に分布し, 表面は健常皮膚で覆われていた。発端者の下背部の皮疹からの皮膚生検では, 真皮から皮下脂肪織にかけて膠原線維の増生を認めた。発端者の父親と姉には小範囲であるが, 下背部に結合織母斑に類似した同様の皮疹がみられた。しかし, 母親には明らかな皮膚症状はなかった。骨の単純レントゲン撮影では, 父親の長管骨と骨盤骨

に骨斑紋症を認めたが, 発端者には認めなかった (図 1b)。一般採血では, 家族は全て正常範囲内であった。以上の所見より本家系を BOS の 1 家系と診断した。

十分なインフォームドコンセントを得た後, 発端者とその家族から採取した末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出し, LEMD3 遺伝子について遺伝子変異検索を行った²⁾。発端者の LEMD3 遺伝子に存在する全てのエクソンおよびイントロン/エクソン接合部とを PCR 法を用い増幅させ, それらのシーケンスを解析した。また, 変異を認めた部分の PCR 産物を制限酵素 *Mse I* を用いて消化し, 正常な PCR 産物での断片のサイズとで比較した。さらに, *Mse I* を用いた制限酵素断片長多型解析を発端者の家族全員に行い, 同じ遺伝子変異が検出されるか調べた。また, 104 人の健常日本人に対しても検索し, 同じ変異が検出されるかを調べた。

結 果

発端者の LEMD3 遺伝子へのシーケンス解析の結果, エクソン 6/イントロン 6 接合部においてイントロン側の G が T に置換される変異を認めた (図 2a)。エクソン 6/イントロン 6 接合部を含む 436bp の PCR 産物を制限酵素 *Mse I* を用いて消化すると正常な PCR 産物は 209, 109, 64, 32, 22bp の断片に分かれるが, 変異を有する PCR 産物では新たに消化部位が 1 か所生じ, 154, 109, 64, 55, 32, 22bp の断片に分かれた (図 2b)。*Mse I* を用いた制限酵素断片長多型解析を家族全員に行ったところ, 症状を有する父親と姉が発端者と同じ変異をヘテロ接合性に有することが分かった。さらにこの遺伝子変異の有無を 104 人の健常日本人について検索したが, 同変異はどの健常者にも検出されなかった。従って, 今回同定された変異は単なる遺伝子多型ではなく, 病的変異と考えられた。

考 察

本症例においては, LEMD3 遺伝子のエクソン 6/イントロン 6 接合部に存在する, 正常なスプ



図 1. a: 発端者の体幹に、常色で円形～楕円形の局面が多発している.
b: 父親の大腿骨レントゲン写真では、骨斑紋症を認める(矢印).

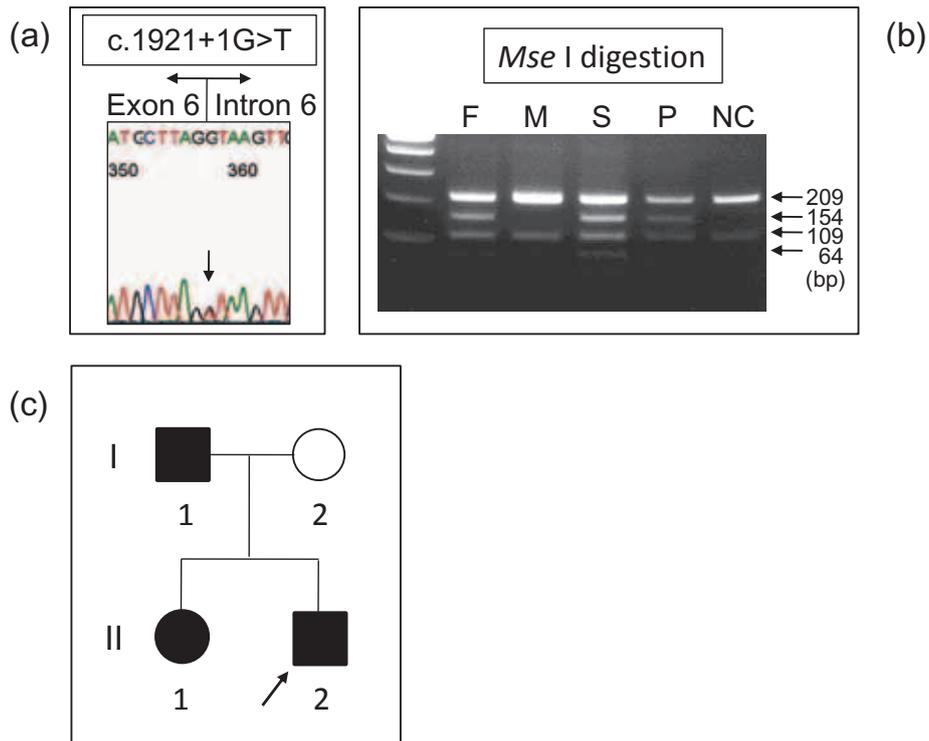


図 2. a: *LEMD3* 遺伝子のエクソン 6/イントロン 6 接合部にイントロンの G が T になる変異を認めた.
b: 制限酵素消化法では、発端者とその父、姉に同一の変異を認めた.
c: 家系図(矢印は発端者を示す).

ライシングに必要な普遍的ドナー配列の変異が同定された. そのために *LEMD3* メッセンジャー RNA のスプライシング異常を来し、結果的にフレームシフトを起こして早期停止コドンが生じ

ることにより、C 末端が欠失した短い *LEMD3* 分子が生じることが発症に関与していると考えられた. 変異から推測すると、野生型 *LEMD3* 分子は 910 アミノ酸であるのに対して、変異 *LEMD3*



図3. 野生型 LEMD3 は910アミノ酸であるのに対し, 変異型 LEMD3 は619アミノ酸と短い.

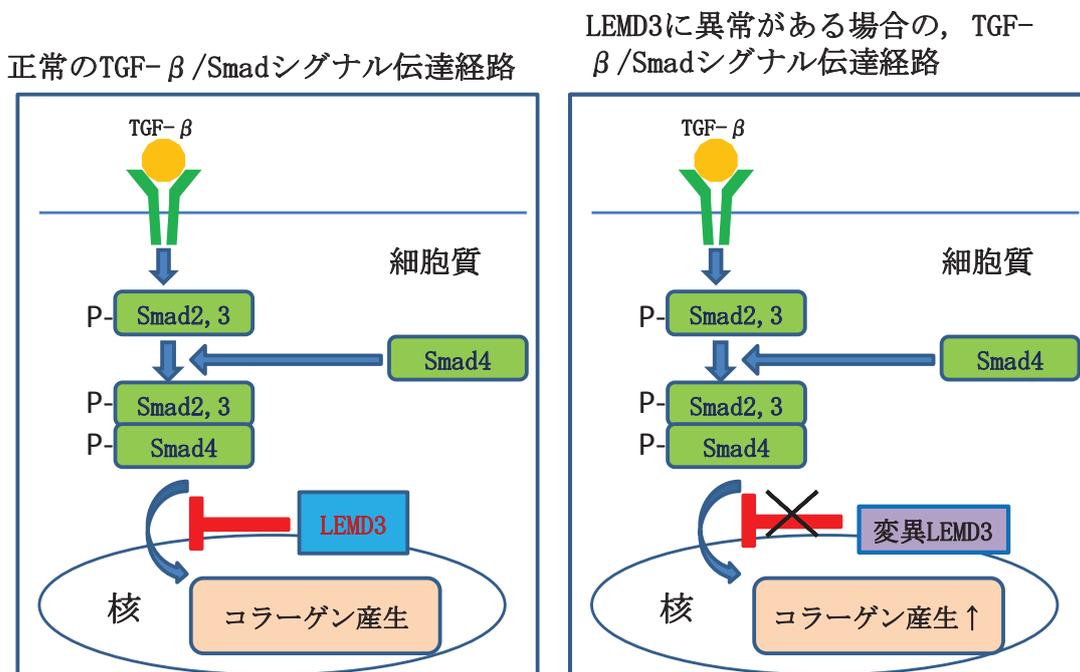


図4. 変異 LEMD3 は TGF- β /Smad シグナル伝達を抑制できず, コラーゲン産生が亢進する.

は619アミノ酸であり, これはC末端側約1/3が欠失し, Smad分子と物理的に結合する部位を欠いているので, 変異 LEMD3 は TGF- β /Smadシグナル伝達を抑制できなくなると考えられる(図3).

現在までに LEMD3 遺伝子変異は15種類報告されているに過ぎない^{4~6}). LEMD3 は BOS のみならず骨流蝟症の原因遺伝子でもあるが, 骨流蝟症では皮膚病変を全く伴わない⁷). さらに皮膚に結合織母斑が多発する家族性皮膚膠原線維腫の原因遺伝子も LEMD3 であるが, 本症は骨病変を併発しない. 同様の事例は PTEN 遺伝子変異でも

知られ, 表現型いくつか重複する Cowden 病と Lhermitte-Duclos 病はいずれも原因遺伝子は PTEN 遺伝子である. 以上のように, 1つの遺伝子異常がどのようにして多彩な表現型を出現させるのかを説明するメカニズムは未だに明らかになっていない.

BOS において結合織母斑が皮膚になぜ生じるのかは明らかになっていない. 結合織母斑は病理組織学および生化学的に I 型コラーゲンの過剰な沈着であることが分かっている. TGF- β は I 型コラーゲン, エラスチン, フィブロネクチン等の細胞外マトリックスの産生を増強することが広

く知られている⁸⁾。TGF- β /Smad シグナル伝達経路を抑制する LEMD3 が機能不全を起こしているために、皮膚局所において何らかの刺激で生じた本シグナル伝達経路が過剰に働くために、I 型コラーゲン産生が亢進し、結果として結合織母斑が生じていると考えると理解しやすいが(図 4)、この仮説を証明するためには、さらなる研究が必要であり、野生型 LEMD3 分子と変異 LEMD3 分子の組織レベルでの作用の違いや、それによって生じる I 型コラーゲンの発現量の比較での研究が今後望まれると考える。

今回の研究では、臨床的に Buschke-Ollendorff 症候群が疑われた 1 家系において、LEMD3 遺伝子にこれまで未報告の変異を同定し確定診断を得ることができ、遺伝カウンセリングおよび希少性疾患の診断法確立にとって極めて有用であった。

参考文献

- 1) Uitto J, Santa-Cruz DJ, Eisen AZ. Familial cutaneous collagenoma: genetic studies on a family. *Br J Dermatol.* 1979;101:185-95.
- 2) Hellemans J, Preobrazhenska O, Willaert A, Debeer P, Verdonk PC, Costa T, Janssens K, Menten B, et al. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet.* 2004;36:1213-8.
- 3) Woodrow SL, Pope FM, Handfield-Jones SE. The Buschke-Ollendorff syndrome presenting as familial elastic tissue naevi. *Br J Dermatol.* 2001;144:890-3.
- 4) Hershkovitz D, Amitai B, Sprecher E. Familial cutaneous collagenomas resulting from a novel mutation in LEMD3. *Br J Dermatol.* 2007;156:375-7.
- 5) Couto AR, Bruges-Armas J, Peach CA, Chapman K, Brown MA, Wordsworth BP, Zhang Y. A novel LEMD3 mutation common to patients with osteopoikilosis with and without melorheostosis. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:81-4.
- 6) Gass JK, Hellemans J, Mortier G, Griffiths M, Burrows NP. Buschke-Ollendorff syndrome: a manifestation of a heterozygous nonsense mutation in the LEMD3 gene. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(5 Suppl 1):S103-4.
- 7) Hellemans J, Debeer P, Wright M, Janecke A, Kjaer KW, Verdonk PC, Savarirayan R, Basel L, Moss C, Roth J, David A, De Paepe A, Coucke P, Mortier GR. Germline LEMD3 mutations are rare in sporadic patients with isolated melorheostosis. *Hum Mutat.* 2006;27:290.
- 8) Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci.* 2004;35:83-92.