

原 著

## Buschke-Ollendorff 症候群における *LEMD3* 遺伝子変異とその機能解析

金 城 千 尋      中 野      創      是 川 あゆ美      豊 巻 由 香  
松 崎 康 司      澤 村 大 輔

**抄録** Buschke-Ollendorff 症候群(以下 BOS)は *LEMD3* 遺伝子の変異により発症する常染色体優性遺伝性疾患である。皮膚における I 型コラーゲンの過剰蓄積による結合組織母斑が主たる病変であるが、その発症機序は不明である。今回我々は、実際の患者で同定された遺伝子変異によって生じた変異型リコンビナント *LEMD3* タンパク質が、TGF- $\beta$  で刺激された I 型コラーゲン遺伝子の発現上昇にどう影響するかをレポーターアッセイにより調べるとともに、変異型 *LEMD3* タンパク質の細胞内局在についても検討した。野生型 *LEMD3* は TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性の上昇を抑制したが、変異型 *LEMD3* は抑制できなかった。また、野生型と変異型 *LEMD3* はいずれも培養細胞内で核膜に局在していた。BOS の皮膚病変は TGF- $\beta$  刺激によるコラーゲンの過剰産生を変異型 *LEMD3* が抑制できないことによって生じると考えられた。変異型 *LEMD3* は核膜においてその病的役割を發揮することが示唆された。

弘前医学 65 : 21—26, 2014

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

### ORIGINAL ARTICLE

## FUNCTIONAL ANALYSIS OF *LEMD3* MUTATION IN BUSCHKE-OLLENDORFF SYNDROME

Chihiro Kinjo, Hajime Nakano, Ayumi Korekawa, Yuka Toyomaki,  
Yasushi Matsuzaki, and Daisuke Sawamura

**Abstract** Buschke-Ollendorff syndrome (BOS) is an autosomal genodermatosis caused by mutations of the *LEMD3* gene. This disease is characterized by multiple collagenous nevi in the skin and osteopoikilosis and melorheostosis in the bone. While a number of pathogenic *LEMD3* mutations have been identified in BOS families, the pathogenesis causing the cutaneous lesions of BOS still remains to be elucidated. Recently, we have identified in a Japanese BOS family a novel splice-site mutation, resulting in the C-terminal Smad-binding domain deletion. To clarify the pathogenetic mechanism of the cutaneous lesions, we investigate the effect of the *LEMD3* mutation on the TGF- $\beta$ -induced type I collagen gene (*COL1A2*) expression. Reporter assay showed that the mutant *LEMD3* failed to counteract activation of the *COL1A2* promoter by TGF- $\beta$ , whereas the wild type counterpart efficiently suppressed the activation. Recombinant *LEMD3* expression experiments demonstrated that both of the wild type and mutant *LEMD3* localized to the nuclear membrane. These findings strongly suggest that the collagenous nevi of BOS are caused by the inability of the mutant *LEMD3* to counteract the TGF- $\beta$ -inducible *COL1A2* promoter stimulation and that the mutant *LEMD3* exerts its pathogenic function at the nuclear membrane.

Hirosaki Med. J. 65 : 21—26, 2014

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

弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座  
別刷請求先：金城千尋  
平成24年12月28日受付  
平成25年1月7日受理

Department of Dermatology Hirosaki University  
Graduate School of Medicine  
Correspondence: C. Kinjo  
Received for publication, December 28, 2013  
Accepted for publication, January 7, 2014

## はじめに

Buschke-Ollendorff 症候群 (MIM 166700, 以下 BOS) はまれな常染色体優性遺伝性疾患である。発生頻度は20000人に1人といわれており, 皮膚に結合組織母斑が多発し長幹骨や骨盤に骨斑紋症や骨流蝕症を伴う症候群である<sup>1)</sup>。本症候群は TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達経路に抑制的に働く LEMD3 タンパク質をコードする *LEMD3* 遺伝子の変異により発症する<sup>2)</sup>。*LEMD3* 遺伝子異常についてはこれまで変異解析症例が極めて少なく, 遺伝子変異と臨床症状の関係は明らかになっていない。皮膚に生じる結合組織母斑を構成する主たるタンパク分子は I 型コラーゲンと弾性線維であることがわかっているが, なぜ結合組織母斑が生じるかは解明されていない。

我々はこれまでに BOS が疑われた 1 家系について遺伝子変異解析を行い, *LEMD3* 遺伝子のエクソン6/イントロン6 接合部において, GがTに変わる遺伝子変異を同定した<sup>3)</sup>。さらに, この変異によって, *LEMD3* メッセンジャー RNA のスプライシング異常が生じることを確認したが, その結果, 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。

今回我々は, LEMD3 の変異が結合組織母斑の発生とどう関係するのかを調べるために, 野生型および変異型 LEMD3 の発現ベクターを作成し, これら発現ベクターから生じるリコンビナント蛋白が I 型コラーゲン遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかを検討した。また, より詳細な発症機序を調べるために, 変異型 LEMD3 が細胞内でどのような局在をするのかも併せて検討した。

## 実験材料と方法

【発現ベクターの作成】pcDNA 4/TO/myc-HisA vector (Invitrogen) に human LEMD3 cDNA (野生型2740bp, 変異型1860bp) を挿入し, 野生型と変異型の発現ベクターをそれぞれ作成した。

【ウエスタンブロッティング】アフリカミドリ

ザル腎臓由来細胞である COS7 を用い, 細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS), 炭酸水素ナトリウム (2 mg/ml), ペニシリン (100  $\mu$ g/ml), ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml), アンホテリシン B (2.5 mg/ml) を添加した Dullbecco's modified eagle medium (DMEM) を用い, 5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。細胞密度が 80% の時点で Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて野生型と変異型の発現ベクターのトランスフェクションを行い, 24 時間後に回収した。Dignam 法で細胞核を単離し, 尿素抽出にてタンパクを抽出<sup>4)</sup>, 10% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し, PVDF membrane (BIO-RAD) にブロッティングを行った。1 次抗体は 1,000 倍希釈した mouse anti-c-myc 抗体 (SANTA CRUZ) を, 2 次抗体は 1:30,000 希釈した sheep anti-mouse IgG (GE Healthcare Japan) を使用した。バンドは ECL-Western blotting detection system (GE Healthcare Japan) で検出した。

【免疫蛍光抗体法】COS7 の細胞密度が 80% の時点で Lipofectamine 2000 を用いて野生型と変異型の発現ベクターのトランスフェクションを行い, 24 時間後に培地を交換し, 固定・染色を行った。1 次抗体は 1:100 希釈した mouse anti-c-myc 抗体 (SANTA CRUZ) を, 2 次抗体は 1:200 希釈した goat anti-mouse IgG FITC (SANTA CRUZ) を使用した。LEMD3 タンパクの局在を共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FV1000-D) で観察した。

【レポーターアッセイ】マウス線維芽細胞由来培養細胞 NIH/3T3 に I 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖遺伝子 (*COL1A2*) のプロモーター部分を組み込んだプラスミドベクターをトランスフェクションさせ, transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (1 ng/ml) 刺激し, 24 時間後のルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase (Promega) 試薬を使用してルミノメーターで測定した。また, NIH/3T3 細胞に *COL1A2* プロモーターのレポーターベクターと LEMD3 発現ベクター (野生型, 変異型) をトランスフェクションさせ, TGF- $\beta$  刺激し, 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性測定は triplicate で行った。実験結果の有意差検定は *t* 検定を行った。

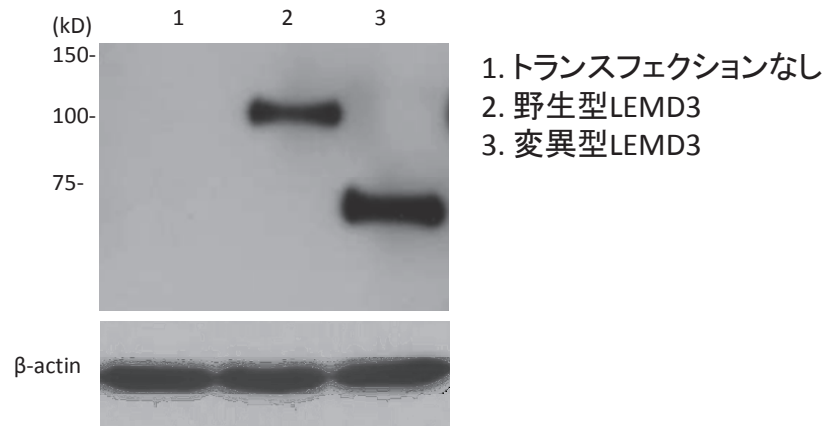


図1 COS7におけるLEMD3タンパクの発現。野生型LEMD3タンパクは約100kD, 変異型は約65kDの位置に発現がみられる。

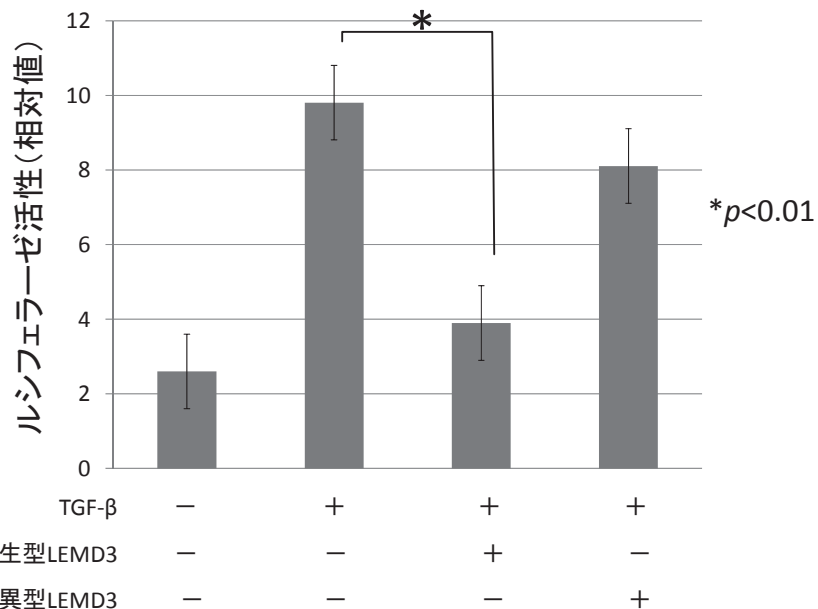


図2 I型コラーゲンプロモーターベクターを用いたレポーターアッセイ。培養線維芽細胞 NIH3T3 細胞に TGF- $\beta$  (1 ng/ml) 刺激を加えると, I 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性の上昇がみられる。LEMD3 リコンビナントタンパクを用いたレポーターアッセイでは変異型 LEMD3 は TGF- $\beta$  刺激による I 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性の上昇を抑制しない。

## 結 果

1. リコンビナント LEMD3 タンパクの発現:  
COS7 細胞に野生型と変異型の発現ベクターのトランスフェクションを行い, 24時間後の LEMD3 タンパクの発現をウエスタンブロッティングにて確認したところ, 野生型 LEMD3 タンパクは約100 kD, 変異型は約65 kD の位置に発現がみられた(図1)

2. リコンビナント LEMD3 タンパクが TGF- $\beta$  刺激による I 型コラーゲンプロモーター活性上昇に及ぼす影響: マウス線維芽細胞NIH/3T3 に *COL1A2* のプロモーター部分を組み込んだプラスミドベクターを遺伝子導入させ, TGF- $\beta$  (1 ng/ml) 刺激を加え, 24時間後のルシフェラーゼ活性を測定したところ, I 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性の上昇がみられた(図2)。また, 同様に LEMD3 発現ベクター(野

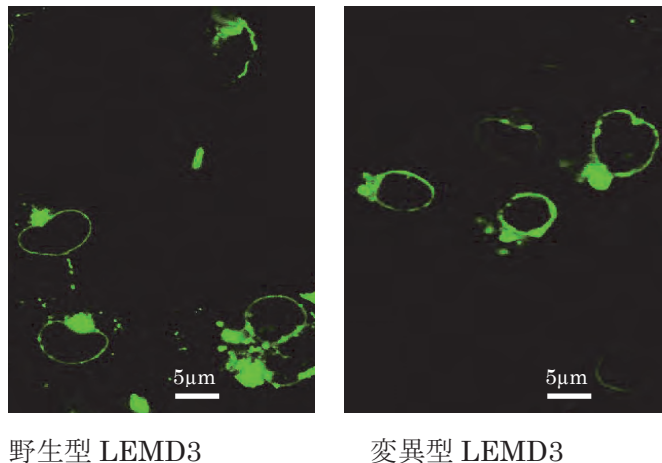


図3 COS7におけるLEMD3タンパクの局在. 野生型, 変異型 LEMD3タンパク共に核膜への局在がみられる.

生型, 変異型)を遺伝子導入し, TGF- $\beta$  刺激を加え, 24時間後のルシフェラーゼ活性を測定したところ, 野生型 LEMD3 は TGF- $\beta$  刺激による I 型コラーゲン遺伝子プロモーターの活性上昇を有意に抑制したが( $p < 0.01$ ), 一方, 変異型 LEMD3 はこの活性上昇を抑制しなかった(図2).

3. 動物細胞における LEMD3 タンパクの局在 : COS7 細胞に野生型と変異型の発現ベクターのトランスフェクションを行い, 24時間後の LEMD3 タンパクの発現を蛍光抗体法で調べたところ, 野生型, 変異型 LEMD3 タンパク共に核膜への局在がみられた(図3).

## 考 察

我々が実際の BOS 症例で同定し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, この変異型 LEMD3 は619アミノ酸であり, このためC末端側約1/3が欠失する. 予想されるリコンビナント LEMD3 の分子量は野生型, 変異型それぞれ99.8 kD, 65.9 kD であり, 実際にウエスタンブロッティングで確認した分子量サイズとほぼ一致していた. LEMD3 のC末端部分は Smad2 および Smad3 に特異的に結合する Smad 結合ドメイン(Smad binding domain, SBD)であり, このドメインを介して TGF- $\beta$  によ

り刺激されるシグナル伝達経路を抑制していることが実験的にわかっている<sup>5,6)</sup>. 従って, 本研究で調べた変異型 LEMD3 は, SBD を欠いているために, BOS 患者の線維芽細胞内においても TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達を抑制できなくなっていると推測される. 実際, 今回行った実験において, SBD を欠失した変異型 LEMD3 は TGF- $\beta$  による I 型コラーゲン遺伝子発現刺激に拮抗することができず, この推測が裏付けられた. BOS で生じる結合組織母斑は病理組織学的および生化学的に I 型コラーゲンの過剰な沈着であることがわかっている. TGF- $\beta$  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<sup>7)</sup>. TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達経路で抑制的に作用する 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活性化された本シグナル伝達経路が過剰に働くことにより I 型コラーゲン産生が亢進し, 結果として結合組織母斑が生じていると理解できる.

LEMD3 は TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達経路において, emerin と物理的に結合しながら, さらに他のタンパク分子と複合体を形成して核膜に局在する(図4)<sup>2)</sup>. 今回の研究で, 培養細胞内で発現させた変異型 LEMD3 は, 野生型 LEMD3 同様核膜に局在することが示された. この変異型 LEMD3 は SBD を失ってはいるものの, emerin との結合部位は保持されている. 従って, 変異型

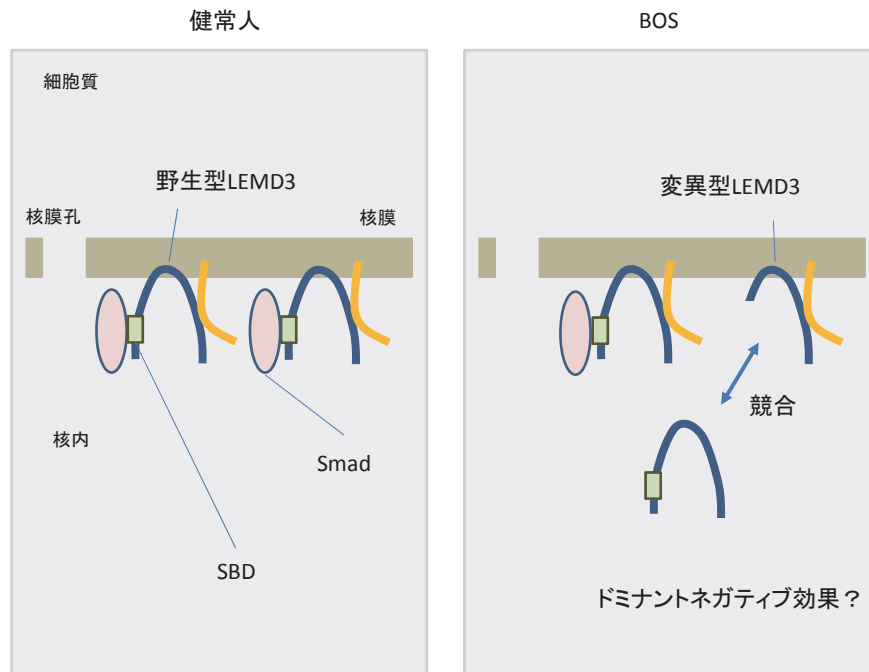


図4 BOSにおける分子病態学的模式図。LEMD3はemerinと物理的に結合しながら、さらに他のタンパク分子と複合体を形成して核膜に局在する。変異型LEMD3は、SBDを失ってはいるものの、emerinとの結合部位は保持されているため、核膜に移行した後、emerinと結合した状態でその病態を発揮している。

LEMD3は、核膜に移行した後、そしておそらくemerinと結合した状態でその病態を発揮していると推測される(図4)。LEMD3の変異がBOSを引き起こす発症メカニズムとしては、従来、ハプロ不全によるものと説明されてきた<sup>2)</sup>。つまり、健康人ではLEMD3をコードする遺伝子は2本あるので、そのうちの1本のLEMD3遺伝子に変異が生じて、LEMD3タンパクが完全に機能不全になっても、もう1本の正常LEMD3遺伝子から発現した野生型LEMD3タンパクがあれば無症状である。しかし、何らかの原因でもう片方の正常なLEMD3遺伝子からのLEMD3タンパクの発現が低下すると、結果として病的な症状が現れるという考えである。今回の研究で示されたとおり、変異型LEMD3が核膜に局在している事実を考慮すると、変異型LEMD3が野生型LEMD3のemerinとの結合に拮抗することによって病的作用を発揮するという、ドミナントネガティブ効果によりBOSが発症したという新しいメカニズムを提唱することが可能である。今後さらに研究を進めることによってこの仮説を証

明し、BOSの病態解明に貢献したい。

## 謝 辞

当皮膚科学講座の神田由起、鷹木由里子、田村由起子、清藤奈菜子実験助手の協力に感謝申し上げます。

## 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) Hellems J, Preobrazhenska O, Willaert A, Debeer P, Verdonk PC, Costa T, Janssens K, et al. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. Nat Genet. 2004;36:1213-8.
- 3) Korekawa A, Nakano H, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, et al. Buschke-Ollendorff syndrome associated with

- hypertrophic scar formation: a possible role for LEMD3 mutation. *Br J Dermatol.* 2012;166:900-3.
- 4) Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, Paulin-Levasseur M, et al. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem.* 2000;275:4840-7.
- 5) Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Hum Mol Genet.* 2005;14:437-45.
- 6) Bengtsson L. What MAN1 does to the Smads. TGF $\beta$ /BMP signaling and the nuclear envelope. *FEBS J.* 2007;274:1374-82.
- 7) 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.