

【要約】

Calcification in Werner syndrome associated with
lymphatic vessels aging

(Werner 症候群における石灰化はリンパ管老化と関連する)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻 (医学)
(主任：三川 信之教授)
緒方 英之

【目的】

Werner 症候群 (WS) は 1904 年にドイツの眼科医師 Otto Werner により、「強皮症を伴う白内障」として初めて報告された常染色体劣性遺伝形式をとる早老症である。現在報告されている患者数の 2/3 が日本人と、本国に多い疾患である。国内患者は約 2000 人、発病率は 5-6 万人に 1 人、近親婚の多い地域で発生頻度が高いと報告されている。

本疾患の原因遺伝子は第 8 染色体の短腕領域に存在する。本遺伝子より作られる WRN 蛋白は DNA ヘリカーゼ活性およびエキソヌクレアーゼ活性を持っており、DNA 修復に関与しゲノム維持に働いている。WS の遺伝子変異はほとんどが C 末端側の核局在シグナル (NLS) より N 末端側で生じたナンセンス変異やフレームシフトによる中途終止コドンとなっており、生成される WRN 蛋白質は C 末端に存在する NLS を失っている。

WS の主要症状としては禿髪、白髪などの毛髪症状を初発症状として白内障、糖代謝異常、脂質異常症、骨粗鬆症、嚔声、鳥様顔貌など多岐にわたるが、皮膚軟部組織の石灰化は皮膚潰瘍や強い疼痛と関連を持ち、患者の quality of life に深刻な影響を及ぼしている。この石灰化は主にアキレス腱や肘関節に生じ、X 線写真では火焰様陰影という独特の所見を示す。難治性潰瘍は時に感染を伴って下肢切断に至ることもあり、その治療法の確立が強く求められている。in vitro の研究では Honjo らが WS 患者の皮膚から得られた培養線維芽細胞が正常なリン酸環境において自発的にアリザリンレッドで染

色されるカルシウムが生じることを報告している。また同研究では細胞表面にあるナトリウム・リン酸共輸送体である Pit-1 が過剰発現していることが報告されている。この Pit-1 はリン酸の取り込みにより骨芽細胞分化を誘導する Cbfa1 をアップレギュレートする機能がある。しかし in vivo において WS の石灰化が火焰様の形態を呈し、潰瘍や疼痛を引き起こすメカニズムに関しては現在までほとんど明らかになっていない。その解明のためには石灰化が実際の皮膚の皮膚軟部組織のどこに、どのような原理で発生するのかを明らかにする必要がある。本研究の目的は本疾患患者の石灰化を生じている皮膚に対し、病理組織学的検討をおこない、そしてその原因を明らかにするために原因遺伝子により作られる NLS が存在する C 末端を失った WRN 蛋白の発現がどのように存在するのかをしらべ、組織レベルでの石灰化メカニズムを解明することである。

【方法】

対象患者は X 線撮影で石灰化部位（肘と足首）に有痛性潰瘍を発症し、外科的治療を必要とした WS 患者 4 名である。末梢動脈疾患（PAD）と慢性腎不全を伴う下肢の慢性皮膚潰瘍患者 3 名を対照群とした。WS とは異なるメカニズムで四肢末梢に潰瘍を生じる疾患であるため、対象として PAD を選んだ。対象となった WS 患者の遺伝子変異の種類は過去の検査で明らかになっており、いずれの変異も NLS が存在する 1369 - 1402 aa より N 末端寄りでナンセンス変異やフレームシフトにより終始コドンとなり、核局在シグナルが存在する C 末端を失う変異である。組織の採取方法は WS 群ではデ

ブリードマンの際に切除した潰瘍周囲の皮膚、そして植皮の際に余剰となった正常皮膚を検体とした。PAD 患者群では足部の壊疽により切断を要した部位の壊死組織と正常組織の境界から検体を採取した。

本研究は以下の3段階に分けて行われた。1) WS 患者の潰瘍皮膚に対し走査型電子顕微鏡、エネルギー分散型 X 線分析、免疫組織化学染色を使用して石灰化物質の組織内における分布と組成を同定した。2) 免疫組織化学染色により WS 患者の潰瘍皮膚と正常皮膚、および末梢動脈疾患 (PAD) 患者の潰瘍皮膚のリンパ管内腔面積 (LA) とリンパ微小血管密度 (MLVD) を測定し比較した。3) 蛍光免疫組織化学染色により WS 患者と PAD 患者の潰瘍皮膚内における WRN 蛋白の発現を観察した。

【結果・考察】

1) 走査型電子顕微鏡で Werner 症候群患者の石灰化を伴う潰瘍周囲皮膚を観察すると真皮深層の管腔構造に結晶状の物質が存在していることが確認された。そしてこの結晶状物質に対してエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を使用して構成している原子を解析するとリンとカルシウムが高検出されたため、この結晶状物質がリン酸カルシウムであることが明らかとなった。さらにこの結晶状物質が存在している管腔構造に対して免疫組織化学染色を行った結果、管腔構造を形成する細胞がリンパ管内皮細胞のマーカである podoplanin で陽性となった。以上の結果により WS ではリンパ管内腔にリン酸カルシウムが沈着しているということが明らかになった。WS 患者の関節部 X 線写真で

認められる火焰様陰影は方向性を持った棘状に並び、骨とは独立して存在する。これはリンパ管という方向性を持っている脈管内に石灰化が生じているといった本研究の結果と矛盾するものではない2) WS 群では PAD 群と比較して LA は狭く、MLVD は増加していた。過去の報告では老化したマウスの耳ではリンパ管の直径が減少していることが報告されており、WS でリンパ管が細くなっていたという結果は、早期老化疾患としての老化症状の一つである可能性が示唆された。また過去の方奥では加齢により脳硬膜内のリンパ管が狭小化しアミロイドのドレナージが減少することが報告されており、リンパ管内径が未発達な状態にある WS においてもドレナージ機能が低下している可能性がある。その結果、線維芽細胞から産生されたリン酸カルシウムがリンパ管内に回収され、ドレナージ機能が低下しているために沈着、結晶化したと考えられた。3) リンパ管内皮細胞内の WRN 蛋白の分布が PAD 群では核内に局在していたが、WS 群では細胞質に蓄積していた。既存の報告を踏まえると細胞質内への WRN 変異蛋白の蓄積がリンパ管内皮細胞に細部レベルでの障害を与えている可能性がある。

【結論】

本研究により WS 患者における石灰化がリンパ管のドレナージ機能低下に伴う内腔へのリン酸カルシウム蓄積であることが示唆された。またリンパ管機能障害の一因として WRN 変異蛋白質の細胞質蓄積が関連している可能性が示された。