

2013/7083A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）
下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成26（2014）年5月

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）
下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成26（2014）年5月

目 次

I.	総括研究報告		
	下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	1
	大野欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）		
II.	分担研究報告		
	1. 下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	7
	東雄二郎（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長）		
	2. 下肢の感覚障害に対する装具治療に関する研究	-----	10
	芳賀信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）		
	3. 下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	12
	柳田晴久（福岡市立こども病院・整形・脊椎外科科長）		
	4. 下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	13
	鬼頭浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授）		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	19

総括研究報告

総括研究報告書

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究代表者 大野 欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）

研究要旨

胎生初期における下部神経管閉鎖障害は二分脊椎とともに下肢運動感覚障害、膀胱・直腸機能障害を惹き起こす。本症における脊髄神経細胞障害の発症機構は十分に解明されておらず治療法も存在しない。妊娠初期における 400 µg 以上の葉酸摂取が本症の発症率を低下させることが知られている (*N Engl J Med* 350:101, 2004)。しかし、葉酸欠乏は本症の唯一の原因ではない。一部遺伝性症例がみられるが、多くは孤発例である。我々はホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2* 欠損マウスが神経管閉鎖障害を起こすことを以前に報告した (*Am J Hum Genet* 72: 465, 2003; *Dev Dyna* 235: 1941, 2006)。モデル動物において神経管閉鎖に関わる遺伝子が他に 80 種類同定をされているが (*Nat Rev Genet* 4: 784, 2003)、ヒトにおいては *VANGL1* (*New Engl J Med* 356: 1432, 2007) と *VANGL2* (*New Engl J Med* 362: 2232, 2010) の遺伝子変異が報告をされているのみである。(i) 本研究では患者会の協力を得て下部神経管閉鎖障害の臨床・疫学調査を行なうとともに、(ii) 下部神経管閉鎖障害の一部には *ZEB1, ZEB2* 遺伝子を含む神経管形成遺伝子群の *de novo* 変異が存在する可能性を考え網羅的なエキソームシーケンス解析を行い、(iii) 同定をした候補遺伝子のノックダウンによる細胞レベルの検証、shRNA レンチウイルス脳室内導入、ノックアウトマウス作成による個体レベルの検証と分子機構の解明を行う。(iv) また、本症における運動感覚障害・自律神経障害は脊髄円錐部の *tethering* に伴う虚血再還流が原因であるという仮説を *Zeb1, Zeb2* 欠損モデル動物を用いて検証する。(v) さらに、脊髄運動神経細胞の維持・分化に関わる分子群の基盤的研究を行うとともに、(vi) 脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する既認可薬スクリーニングを行い本症に対する治療戦略を探る

研究分担者

- 東雄二郎
(愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長)
- 鬼頭浩史
(名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授)
- 芳賀信彦
(東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授)
- 柳田晴久
(福岡市立こども病院・整形・脊椎外科科長)

A. 研究目的

胎生初期における下部神経管閉鎖障害は二分脊椎とともに下肢運動感覚障害、膀胱・直腸機能障害を惹きおこす。本症における脊髄神経細胞障害の発症機構は十分に解明されておらず治療法も存在しない。妊娠初期における 400 µg 以上の葉酸摂取が本症の発症率を低下させることが知られているが (*New Engl J Med* 350:101, 2004)、葉酸欠乏は本症の唯一の原因ではない。遺伝性症例も報告されているが、多くは孤発例である。我々はホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2 (Sip1)* 欠損マウスが神経管閉鎖障害を起こすことを報告してきた (*Am J Hum Genet* 72: 465, 2003; *Dev Dyna* 235: 1941, 2006; *PLoS Genet* 7: e1002307, 2011; *Neuron* 73: 713, 2012; *Neuron* 77: 83, 2013; *Genesis* in press)。モデル動物において神経管閉鎖に関わる遺伝子が他に 80 種類同定をされているが (*Nat Rev Genet* 4: 784, 2003)、ヒトにおいては *VANGL1* (*New Engl J Med* 356: 1432, 2007) と *VANGL2* (*New Engl J Med* 362: 2232, 2010) の遺伝子変異が報告をされているのみである。(i) 本研究では、下部神経管閉鎖障害の一部には *ZEB1*, *ZEB2* 遺伝子を含む神経管形成遺伝子群の *de novo* 変異が関与する可能性を考え、患者会の協力を得て下部神経管閉鎖障害の網羅的なエキソームシーケンス解析を行い、同定をした候補遺伝子の細胞・モデル動物における分子作用機構の解明を行う。(ii) をさらに、モデル動物における本症の原因遺伝子 *Zeb2 (Sip1)* の神経管閉鎖に関わる分子作用機構を解明することにより、*VANGL2*, *ZEB2* の遺伝子変異が本症を発症する分子機構を解明する。(iii) 加えて、我々が新規に同定をした脊髄運動神経細胞特異的に発現をする *RSPO2*、分子 X、分子 Y の運動神経細胞分化促進作用の分子機構を解明するとともに、脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する薬剤を *drug repositioning* 法により同定をする。

B. 研究方法

(i) 血液 DNA から Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 を用いて exome capture resequencing (ECR) 解析を行う。解析ツールと解析パラメータにより検出される SNV が大幅に変動することを我々は他疾患の ECR 解析で経験をしており (*Hum Genet* 2011; *J Neuro Sci* 315:15, 2012; *Hum Mutat* 34: 997, 2013; *Neurology* 82: 1058 2014; *Hum Mol*

Genet 23: 1856, 2014)、高信頼度から低信頼度までパラメータを変動させながら、*VNAGL1*, *VANGL2*, *ZEB1*, *ZEB2* に加えて、葉酸代謝に関与する 31 遺伝子、モデル動物において神経管閉鎖に関わる 80 遺伝子に絞り *de novo* 遺伝子変異解析を行った。コントロールとして自験 44 サンプル・1000 ゲノムデータベース・NHLBI ESP 6500 例・本邦 Human Genetic Variation Database (HGVD) を用いた。dbSNP137 から Mendelian disorders の原因遺伝子変異を除いても、dbSNP137 は多数の正常人の SNV データを含むために autosomal recessive disease を起こす disease-causing mutations が数多く含まれる可能性があるために、dbNSP137 によるフィルターリングは行わず、参考データベースとした。(ii) *Zeb2 (Sip1)* 欠損モデル動物を用いて神経管細胞極性、神経管細胞増殖、BMP シグナルの関連性を明らかにするべく実験を行った。(iii) 脊髄運動神経細胞のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により同定をした *Rspo2*、分子 X、分子 Y のノックアウトマウス解析ならびに脊髄運動神経初代培養細胞を用いて、これら分子の運動神経細胞分化促進作用の分子機構を解明を行った。また既認可薬パネルと Array Scan を用いて脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する薬剤を同定を試みた。

(倫理面への配慮)

下部脊椎管閉鎖障害の臨床解析は、「臨床研究に関する倫理指針 (平成20年7月31日全部改正)」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成20年12月1日一部改正)」に則り行っている。また、参加各施設の生命倫理委員会の承認を得た。

組み換え DNA 実験と動物実験は、名古屋大学・愛知県身体障害者コロニーの組み換え DNA 実験指針・動物実験指針、ならびに、カルタヘナ法を遵守し、参加各施設長の承認を得て進めている。

C. 研究結果

(i) 現在までに 9 名の患者の exome capture resequencing 解析を行い、以下の遺伝子を候補として解析を行った: *VANGL1* 遺伝子 (上述 *New Engl J Med* 2007); *VANGL2* 遺伝子 (上述 *New Engl J Med* 2010); 申請者らが研究を行ってきたホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2 (Sip1)* (上述 5 報); モデル動物において神経管閉鎖に関わる 80 遺伝子 (上述 *Nat Rev Genet* 2003); 葉酸代謝に関与する 31 遺伝子

(*PLOS ONE* 6: e28408, 2011); イノシトール代謝に関わる *ITPK1* 遺伝子(*ASHG Meeting 2012*, Abstract 2623T)。

その結果、一例において *VANGL1* 遺伝子に新規ヘテロ変異を同定した(未発表)。この変異は魚類まで遡り脊椎動物で保存をされたアミノ酸の置換であり、SIFT, LRT, Mutation Taster はこの変異の病原性を示唆している。他の症例においては *CELSR1* 遺伝子(Robinson et al. *Hum Mut* 33: 440, 2012; Allache et al. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94: 176, 2014), *DVL3* 遺伝子(De Marco et al. *J Mol Neurosci* 49:582, 2013)を含む複数の候補遺伝子群に SNVs を同定しており今後分子機構の解析を予定している。

(ii) 研究分担者東らの報告書に詳細を記すが、神経管閉鎖過程への関与が推測される様々な細胞生物学的あるいは生化学的観点から、(a) 細胞極性、(b) 神経管の細胞増殖 (c) BMP シグナルとの関連性について *Sip1* ノックアウトマウスの解析を行った。(a) 細胞極性の異常については、神経板の apical 側(将来の閉鎖腔側)に沿って形成されるべき索状のリン酸化ミオシン軽鎖(pMLC)が形成不全で寸断化していた。(b) 細胞増殖については、リン酸化ヒストン H3 抗体を用いて調べたところ、*SIP1-KO* 胚と正常胚の間で大きな違いは見られなかった。(c) BMP シグナル伝達の指標となる *Smad5* のリン酸化について解析を行ったところ、*Sip1* ノックアウト胚では神経管背側の局所的な *Smad5* のリン酸化が見られなかった。このように、*Sip1* ノックアウト胚では、神経管閉鎖が起こる背側領域で、BMP シグナルが正常に入力されず、神経管細胞の極性が正常に形成されていないことが示唆された。(iii) マウス脊髄前角細胞のレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにて脊髄前角細胞特異的に発現をする *Rspo2*、分子 X、分子 Y を同定した。*Rspo2* は神経筋接合部形成を促進する agrin に次ぐ重要なタンパクであることを同定するとともに、*Rspo2*、分子 X、分子 Y はいずれも運動神経細胞の神経突起延長作用を有することを明らかにした。さらに、マウス脊髄運動神経細胞プライマリー培養に対して既認可薬 Z が濃度依存的に神経突起延長促進作用を有することを同定し、薬剤 Z の製薬メーカーと秘密保持契約を締結し共同研究の討議を開始した。

D. 考察

本研究において本邦発の二分脊椎原因遺伝子変異を 3 種類同定した。Neural tube defects への関与が知られている遺伝子であるが、いずれも新規変異であり、タンパクレベル、細胞レベルの解析にて病原性の証明を開始している。

基礎研究においては *Rspo2*、分子 X、分子 Y の神経突起延長作用を明らかにすることができた。本研究を継続するとともに *Rspo2*、分子 X、分子 Y の発現を増強する薬剤の screening を drug repositioning strategy により同定を行う。さらに、NSC34 の neurites 延長促進作用を有する off-label 薬 Z の効果をモデル動物を用いて今後検証する。

E. 結論

下部神経管閉鎖障害患児 9 例の exome capture resequencing 解析により *VANGL1* の新規ミスセンス変異を含む候補遺伝子変異群を同定するとともに、*ZEB2* (*SIP1*) が神経管閉鎖に関わる重要な分子であることを明らかにした。さらに、*Rspo2*、分子 X、分子 Y が運動神経突起延長促進作用を有する脊髄運動神経に特異的に発現をする新規分子であることを明らかにするとともに、既認可薬 Z が脊髄運動神経突起延長促進作用有することを同定した。

F. 健康危険情報

研究代表者の施設においても、研究分担者の施設においても、特記事項はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(Original Article)

1. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab* 2013, 31: 26-33.
2. Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100a10 is required for the organization of actin stress fibers and

- promotion of cell spreading. *Mol Cell Biochem* 2013, 374: 105-111.
3. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating cd36 expression in HepG2 cells. *Med Gas Res* 2013, 3: 6.
 4. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (sam) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 248.
 5. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction. *Hum Mutat* 2013, 34: 997-1004.
 6. Selcen D, Shen XM, Milone M, Brengman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. Gfpt1-myasthenia: Clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. *Neurology* 2013, 81: 370-378.
 7. Tsunoda M, Hirayama M, Ohno K, Tsuda T. A simple analytical method involving the use of a monolithic silica disk-packed spin column and HPLC-ECD for determination of L-Dopa in plasma of patients with Parkinson's disease. *Anal Methods* 2013, 5: 5161-5164.
 8. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep* 2013, 3: 2388.
 9. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. *Sci Rep* 2013, 3: 2931.
 10. Kitoh H, Achiwa M, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Horowitz JD, Sallustio BC, Ohno K, Ishiguro N. Perhexiline maleate in the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva: an open-labeled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis* 2013, 8: 163.
 11. Matsushita M, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Kaneko H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLOS ONE* 2013, 8: e81569.
 12. Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio* 2014; 4: 1-10.
 13. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
 14. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
 15. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K,

- Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
16. Kokunai Y*, Nakata T*, Furuta M*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. *Equal contribution.
 17. Mano Y, Kotani T, Ito M, Nagai T, Ichinohashi Y, Yamada K, Ohno K, Kikkawa F, Toyokuni S. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage caused by in utero ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2014, 69: 324-330.
 18. Takamatsu A, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Sakai T, Ishiguro N, Ohno K. Verapamil protects against cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *PLOS ONE* 2014, 9: e92699.
 19. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
- (Review and Book Chapters)
1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact.* 2013, 203(1): 335-340. (査読有)
 2. Ohe K, Masuda A, Ohno K. Chapter 2: Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans. *Genomics I - Humans, Animals and Plants*. ISBN: 978-1-477554-91-3. iConcept Press, Hong Kong, 2013, pp 29-46. (査読有)
 3. Ohno K, Ito M, Kawakami Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci*, 2013, DOI 10.1007/s12031-013-0170-x, 3 pages, Epub ahead of print. (査読有)
 4. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Manuscript ID: A24314.R1, in press. (査読有)
- ## 2. 学会発表 (Presentation, English)
1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K, Krejci E. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for causing anti-MuSK myasthenia gravis
XIV International Symposium on Cholinergic Mechanisms (Invited), Hangzhou, China May 5-9, 2013
 2. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Milone M, Ito Y, Engel AG, Ohno K
Mutations in the third β -propeller domain of LRP4 in congenital myasthenia compromise agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner
36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Kyoto, Japan Jun 22, 2013
 3. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K
Meclozine facilitates chondrocyte proliferation and differentiation by attenuating abnormally activated fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in achondroplasia
International Skeletal Dysplasia Society (ISDS) Meeting Bologna 2013 (Poster), Bologna, Emilia-Romagna, Italy Aug 29, 2013
 4. Masuda A, Okuno T, Okamoto T, Ohno K

- Global analysis reveals relationship between RNA-binding sites of FUS and transcriptional regulation
8th Brain Research Conference (Poster), San Diego, California, USA
Nov 7-8, 2013
5. Masuda A, Okuno T, Okamoto T, Ohno K
FUS regulates transcription termination through binding to nascent RNA
43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA
Nov 11, 2013
6. Nakashima H, Ohkawara B, Imagama S, Ito Z, Ishiguro N, Ohno K
R-spondin2 is crucial for neuromuscular junction formation
43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA
Nov 13, 2013
7. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Shen X, Ito Y, Engel AG, Ohno K
Mutations in LRP4 in congenital myasthenia reveal position-specific regulations of agrin and Wnt signaling of LPR4
43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA
Nov 13, 2013
- H. 知的所有権の取得状況
なし

分 担 研 究 報 告

分担研究報告書

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究分担者 東 雄二郎（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長）

研究要旨

マウスにおける神経管閉鎖は、胎生8.5日から9日にかけて起こり、その後の中枢神経組織構築の基礎となる重要なプロセスである。SIP1（Smad interacting protein 1）遺伝子のノックアウトマウス（以下、KOマウスと略す）においては、この神経管閉鎖が起こらない。SIP1 KOマウスを二分脊椎症のモデルマウスとして、その障害の分子機構の解明のための分子レベルでの解析を行った。本年度は、（1）細胞極性、（2）神経管の細胞増殖、（3）BMPシグナルとの関連性についてSIP1-KOマウスの解析を行った。1）細胞極性については、神経板のapical側（将来の閉鎖腔側）に沿って形成されるべき索状のリン酸化ミオシン軽鎖（pMLC）が形成不全で寸断化していた。2）細胞増殖については、リン酸化ヒストンH3抗体を用いて調べたところ、SIP1-KO胚と正常胚の間で大きな違いは見られなかった。3）BMPシグナル伝達の指標となるSmad5のリン酸化については、SIP1-KO胚では神経管背側の局所的なSmad5のリン酸化が見られなかった。これらのことから、SIP1-KO胚では、神経管閉鎖が起こる背側領域で、BMPシグナルが正常に輸入されず、神経管細胞の極性が正常に形成されていないことが示唆された。

共同研究者

- 西崎有利子

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）

- 松井ふみ子

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）

A. 研究目的

転写因子 SIP1 のノックアウトマウス（以下、KOマウスと略す）は、神経管が閉鎖しない表現型を示し、胎生致死である。現在、SIP1 が神経管閉鎖障害にどのように関わっているのかは明らかになっていない。また、正常な神経管閉鎖のメカニズムに関しても、その詳細な理解は不十分である。本研究では、ヒトの二分脊椎症のモデル動物となる SIP1 KOマウスを使用し、その障害メカニズムを解明することにより、二分脊椎の障害ならびに正常な神経管形成のメカニズムを理解し、将来的に、この疾患の予防や治療に貢献できる基礎研究を行う。本年度は、神経管閉鎖過程における（1）細胞極性、（2）神経管の細胞増殖、（3）BMPシグナルとの関連性について SIP1-KO マウスを材料に解析を行った。

B. 研究方法

SIP1 KO マウスを用いて、そのヘテロ変異同士の交配により、ホモ変異胚の胎仔を得る。胎生 8.5 日で、体節数が 1, 2 個から 5, 6 個生じたもの（まさにこれから神経管閉鎖を起こそうとする段階である）で、遺伝子型がホモ変異のものと、その対照群としてヘテロ変異および野生型の胚を用いた。それぞれについて、（1）細胞極性、については、リン酸化ミオシン軽鎖タンパクに対する抗体、（2）神経管の細胞増殖、については、リン酸化ヒストン H3 タンパクに対する抗体、（3）BMPシグナルとの関連性については、リン酸化 Smad5 に対する抗体を用いて、免疫組織染色を用いて解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究においては患者サンプルならびに患者情報を扱わなかった。組み換え DNA 実験と動物実験は愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の承認を得たのちに、カルタヘナ法、ならびに、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の動物実験指針を遵守して動物実験を行った。

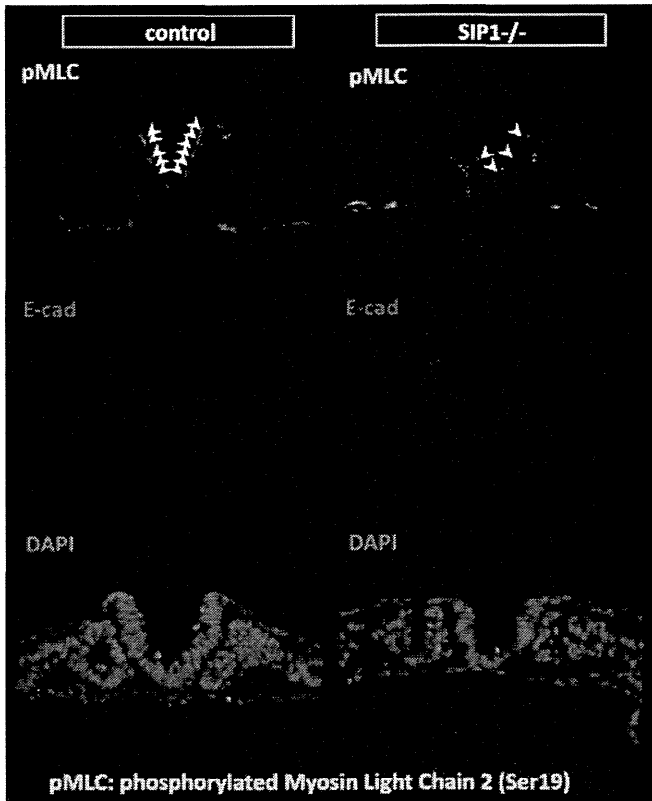


図1 SIP1 KO 胚における、pMLC 発現の異常
SIP1 KO 胚における pMLC の発現が正常胚とは異なり、apical 側での均一な発現が見られない。さらに KO 胚では、神経板での E-cadherin の発現が亢進している。

C. 研究結果

① SIP1 KO 胚神経板の極性について

胎生 8 日目の神経管閉鎖期直前にある SIP1 KO 胚の神経板では、神経板細胞の細胞極性不全が観察され、野生型胚と比較して Sox2 の発現が低下していることが免疫組織染色で確認された(昨年度、本研究課題報告書)。また、胎生 8.5 日目のノックアウト胚では、神経管の形成されるべき背部に、異所的な小疱が形成されていた。小疱は上皮様の一層からなる細胞で構成されており、Sox2 の発現と E-cadherin の発現が見られた(昨年度、本研究課題報告書、および図 1)。神経管閉鎖過程にある胎生 8 日目の SIP1^{-/-}胚では、Par3 などの apical 側に局在するべき分子の局在が明確でなく、apical 側の細胞収縮を担う pMLC の形成にも異常が見られた。SIP1-KO 胚では、神経板の apical 側に沿って形成されるべき索状の pMLC が、形成不全で寸断化していることが明らかになった。(図 1)。

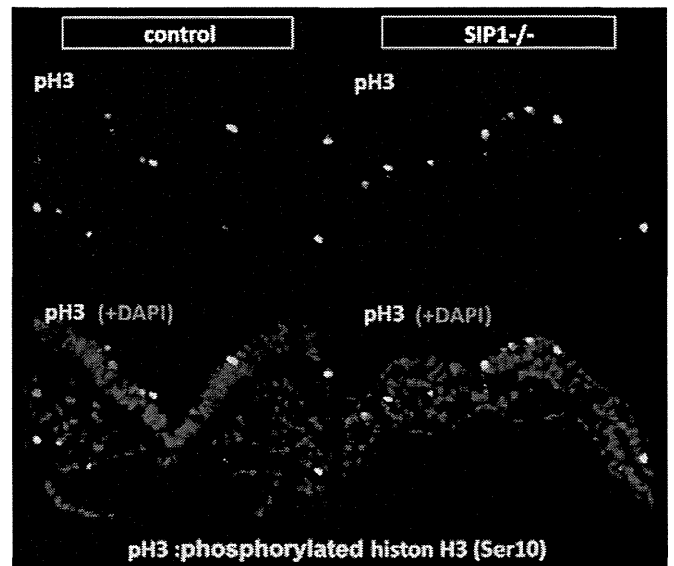


図2 SIP1 KO 胚の神経板の細胞増殖能の検討
リン酸化ヒストン H3 を指標に、SIP1 KO 胚と野生型で神経板における細胞増殖能をみたが、両者で大きな差異はみられない。

② 神経板(管)の細胞増殖、について

神経板(管)内の細胞増殖については、リン酸化ヒストン H3 抗体を用いて異常が見られるかどうかを調べたところ、SIP1-KO 胚と正常胚の間で大きな違いは見られなかった。すなわち、KO 胚での細胞増殖能に関しては野生型と比較して、差異はないと思われる。

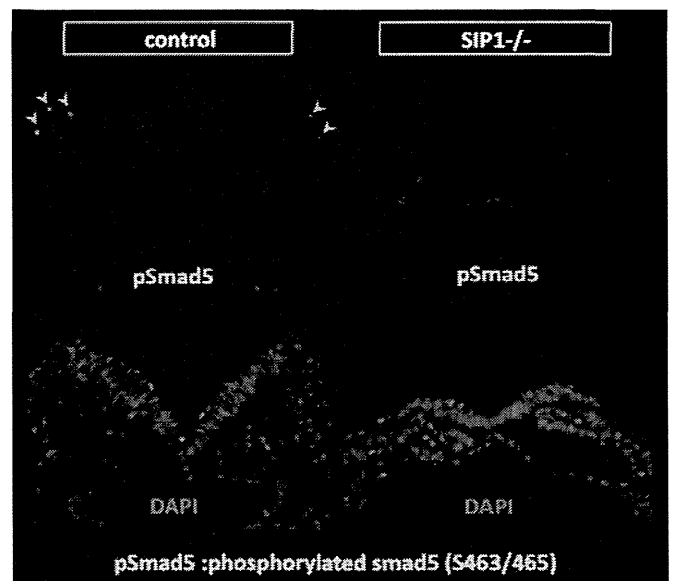


図3 SIP1 KO 胚における、BMP シグナルの異常
SIP1 KO 胚においては、神経褶における Smad5 のリン酸化が見られない。すなわち、BMP シグナルの入力が欠失している可能性がある。

③ BMP シグナルとの関連性について

マウス 8.5 日胚では、神経板に隣接する非神経外胚葉（将来の表皮にあたる）に BMP (Bone morphogenetic protein) 分子が発現し、神経堤細胞の形成等に重要であることがわかっている。神経堤細胞の形成と神経管形成はカップルした現象であり、その BMP シグナルが神経管形成にも何らかの役割を担っていることが考えられる。そこで、BMP シグナルによりリン酸化を受ける Smad5 に関して、そのリン酸化の状態を調べた。その結果、神経管の背側に見られるべき Smad5 のリン酸化が SIP1 KO 胚では見られなかった。

D. 考察

これらの結果から、昨年度本研究課題の結果と合わせると、SIP1 の欠失により細胞極性が消失した神経板の細胞は、上皮組織でしか発現が見られないはずの E-cadherin の発現が起こり、閉鎖腔側のアクチン-ミオシンによる細胞収縮が障害されている可能性が考えられる。また、これと同時に、正常胚で見られる神経管の背側の局所的な Smad5 のリン酸化が、SIP1-KO 胚では見られないことから、SIP1-KO 胚では、神経管の閉鎖が起こるべき背側領域で、BMP シグナルが正常に入力されていない可能性がある。このことは神経板の閉鎖障害となんらかの関連性を示唆していると思われる。

E. 結論

SIP1-KO 胚では、神経管の閉鎖が起こるべき背側領域で、BMP シグナルが正常に入力されていないこと、及び、神経管の閉鎖腔側の極性が正常に形成されず、閉鎖腔側のアクチン-ミオシンによる細胞収縮が障害されていることが明らかになった。本年度の研究により、これまで解明されていなかった神経管閉鎖の分子機構と SIP1 との関係が明らかになってきた。これまで知られていない二分脊椎症の発症原因の特定につながる成果が得られたと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishizaki, Y., Takagi, T., Matsui, F. and Higashi, Y.
SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse.
Genesis. 52:56-67. (2014)

Kimura, M., Machida, J., Yamaguchi, S., Shibata, S., Tatematsu, T., Miyachi, H., Peter A. Jezewski, P. A., Nakayama, A., Higashi, Y., Shimozato, K. and Tokita, Y. Novel nonsense mutation in MSX1 in familial nonsyndromic oligodontia: subcellular localization and role of homeodomain/MH4
Eur J Oral Sci 122:15-20. (2014)

2. 学会発表

高木豪、西崎有利子、松井ふみ子、東雄二郎 モデルマウスを用いたモワット・ウィルソン症候群の病態形成の解析 第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013 年 12 月 5 日

西崎有利子、高木豪、松井ふみ子、東雄二郎、レポーターノックインマウスを用いたモワット-ウィルソン症候群の原因遺伝子 SIP1 の発現解析 第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013 年 12 月 3 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下肢の感覚障害に対する装具治療に関する研究

研究分担者 芳賀 信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）

研究要旨 二分脊椎における感覚障害から生じる関節障害の予防法確立を目的に、インソールの材質の違いが歩行に及ぼす影響を調査した。その結果、荷重に対する変位が大きく、反発性が低い材質のインソールを用いた場合に、踵接地時垂直成分の最大値と垂直成分の最大値に達するまでの時間の比、踵部の圧力分布の最大値と踵部の圧力分布の最大値に達するまでの時間の比が小さかった。

A. 研究目的

二分脊椎では、下肢の運動麻痺、感覚障害、膀胱直腸障害を示す。感覚障害は褥瘡形成や Charcot 関節につながりうるが、そのメカニズムを運動麻痺のある状態で検討することは困難である。そこでわれわれは感覚障害単独が歩行に及ぼす影響を知ることが目的に、運動麻痺がなく感覚の障害を示す遺伝性感覚自律神経ニューロパチー

(hereditary sensory and autonomic neuropathy: HSAN) の患者を対象として、歩行の特徴し、踵接地から全足底接地までの角速度が健常者より大きいことを報告した。これは、踵接地時の衝撃が大きいことを示唆しており、装具治療により緩和できる可能性がある。そこで本研究では足底装具に用いる材質の違いが、足底接地力の垂直成分及び足底の圧力分布に及ぼす影響を健常成人を対象として検討することを目的とした。

B. 研究方法

健常成人 20 名を対象とし、裸足ならびに 3 種類の材質でできた厚さ 5mm のインソールを用いた際の自由歩行を、圧センサーシートを用いた歩行計測装置（ニッタ社、GaitScan）を用いて計測した。

インソールの材質は、ア（商品名：スーパープラスチック）、イ（商品名：ソルボ）、ウ（商品名：ダイアベットローサ）とし、それぞれを用いた際の歩行を、裸足歩行と

比較した。それぞれの材料の特性は、以下の通りであった。

	ア	イ	ウ
密度	小	大	中
荷重に対する変位	中	小	大
反発性	高	中	低

解析したパラメータは、歩行速度、歩行率、歩幅、踵接地時垂直成分の最大値（F1）とそれに達するまでの時間（t1）およびこれらの比率（F1/t1）、踵部の圧力分布の最大値（P）とそれに達するまでの時間（t2）およびこれらの比率（P/t2）、である。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、研究参加者の書面での同意を得て行った。

C. 研究結果

歩行速度、歩行率、歩幅は、ア、イ、ウいずれの素材を用いた場合も、裸足と有意差がなかった。踵接地時垂直成分の最大値（F1）とそれに達するまでの時間との比率（F1/t1）は、ウを用いた場合に裸足よりも有意に小さかった。踵部の圧力分布の最大値（P）は、ア、ウを用いた場合に裸足よりも有意に値が小さく、P/t2 はウを用いた場合に裸足よりも有意に値が小さかった。

D. 考察

われわれの過去の研究結果より、下肢に感覚障害を有する患者の骨・関節障害を防止するためには、衝撃緩衝性が高いインソールが適切と考える。衝撃緩衝性が高いインソールでは、踵接地時の垂直成分の最大値が小さくなり、垂直成分が最大値に達するまでの時間が長くなると考えられる。従って、踵接地時垂直成分の最大値と垂直成分の最大値に達するまでの時間の比は小さくなる。本研究の結果では、材質ウのインソールにおいて、踵接地時垂直成分の最大値と垂直成分の最大値に達するまでの時間の比は裸足と比較して有意に小さかった。踵部の圧力分布の最大値と踵部の圧力分布の最大値に達するまでの時間の比でも同様な結果を得た。したがって、下肢に感覚障害を有する患者の骨・関節障害を防止するためには、材質ウの特性である荷重に対する変位が大きく、反発性が低い材質のインソールが適切と考える。

本研究では、健常者を対象に、インソールの材質の違いが歩行に及ぼす影響を調査した。今後は患者にインソールを装着し、

長期間の継続的な調査を行い、インソールの効果を検討する必要がある。

E. 結論

下肢に感覚障害を有する患者の骨・関節障害を防止するためには、荷重に対する変位が大きく、反発性が低い材質のインソールが適切と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang Y, Ogata N, Yozu A, Haga N: Two-dimensional video gait analyses in patients with congenital insensitivity to pain. *Dev Neurorehabil* 16(4): 266-270, 2013

2. 学会発表

1) 吉川二葉、緒方直史、中原康雄、四津有人、田中弘志、正田奈緒子、真野浩志、芳賀信彦：仙骨形成不全の下肢運動障害の特徴。第30回日本二分脊椎研究会，2013.7.6，仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究分担者 柳田晴久（福岡市立こども病院・整形・脊椎外科科長）

研究要旨 下部神経管閉鎖障害の患者ならびに無症状の両親・非罹患同胞の exome capture resequencing 解析を行い、遺伝子変異を同定することにより、本症の遺伝学的な要因の解明を行う。

A. 研究目的

下部神経管閉鎖障害の分子遺伝学的な要因を解明すること。

B. 研究方法

下部神経管閉鎖障害患者および家族から採血し、それを研究代表者の教室に送付する。遺伝子解析により疾患関連遺伝子の候補 SNVs を同定する

（倫理面への配慮）

本研究の目的・方法について説明し理解（インフォームドコンセント）が得られた場合のみ採血を行い、検体には名前は見入せず番号のみとし、プライバシーは厳重に守られる。なお当院の倫理委員会からの承認も得ている。

C. 研究結果

DNA に対して、Agilent SureSelect V4 によりエクソン領域の enrichment を行い、Illumina 社 HiSeq2500 により網羅的塩基配列決定を行った。読まれた配列を BWA によりマッピングし、Picard にて PCR duplicate の除去、GATK により single nucleotide variations (SNVs) の検出を行った。検出された SNVs に対して Annovar により dbSNP138 および SIFT、Polyphen の情報を付加し検討を行った。これらの SNVs に対して、既にヒトで神経管閉鎖障害との関連が報告されている 12 候補遺伝子ならびに葉酸代謝と関連があると報告されている 31 候補遺伝子上に存在する SNVs を抽出した。

D. 考察

SBP1 に VNGL1 と CELSR1 の候補遺伝子変異を認め、母親には認めなかった。SBP3 も同様に DVL3 に候補遺伝子変異を認め、母親に認めなかった。SBP2 の DVL3 と SCRIB の SNVs は母親にも認めるので normal SNPs と思われた。SBP4 は候補遺伝子変異を認めなかった。

E. 結論

下部神経管閉鎖障害の候補遺伝子変異が明らかになりつつあるが、さらなる研究を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis.

Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M, Ikegawa S.

Nat Genet. 2013 May 12;45(6):676-9.

2. 学会発表

Myelomeningocele Kyphosis Surgical Treatment in Infancy-1st EOS seminar in Japan
平成 25 年 8 月 29 日、名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究分担者 鬼頭浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授）

研究要旨 下部神経管閉鎖障害に対する分子レベルでの病態解明のため、網羅的なエクソームシーケンス解析手法を用いて、原因遺伝子を同定することを試みる。これまでに9名の患者および15名の患者両親のDNAサンプルを採取し、エクソームシーケンス解析を実施している。

A. 研究目的

下部神経管閉鎖障害は下肢の運動・知覚障害、膀胱直腸障害などを引き起こし、患者の移動能力や日常生活動作を著しく低下させる。本症における神経障害の発症機序は解明されていないが、家族内発症例の報告もあり、遺伝的因子の関連も示唆されている。本研究では、下部神経管閉鎖障害症例の原因となる候補遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

患者および両親の血液から genomic DNA を調整し、Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 を用いてエクソームライブラリーを作成する。HiSeq2500 にて塩基配列決を行い、読まれた配列を BWA を用いてヒトゲノムへの mapping を行う。検出された SNVs に対し、すでに神経管閉鎖障害との関連が報告されている候補遺伝子に存在する SNVs を抽出する。

（倫理面への配慮）

臨床研究および遺伝子解析は、「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、各施設の生命倫委員会ならびに各施設長の承認を得て遂行する。

C. 研究結果

東京大学附属病院および福岡こども病院から9家系の下部神経管閉鎖障害症例の血液サンプルを採取し、genomic DNAを調整した。

2例において母親にはないSNVsを同定した。1例はVANGL1におけるp. R335C、もう1例はDVL3におけるp. Y277Hであった。

D. 考察

次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子配列解析は本症を含む希少疾患に対してゲノムレベルからの新たな病態解明を進めることが期待されている新たな手法である。根本的で有効な治療法を確立するためには、分子レベルでの病態解明が必須となる。

E. 結論

9家系の下部神経管閉鎖障害症例に対し、エクソームシーケンス解析を行い、2例において候補遺伝子におけるSNVsを同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitoh H, et al. Perhexiline maleate in the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Orphanet J Rare Disease* 8:163, 2013

2. 学会発表

Matsushita M, Kitoh H, et al. Meclozine facilitates chondrocyte proliferation and differentiation by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. (ISDM, Bologna, 2013.8.28-31)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Ohno K.</u> , Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG.	Specific binding of collagen q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis		<i>Chem Biol Interact</i>			2013	203(1): 335-340 (査読有)
Ohe K, Masuda A, <u>Ohno K.</u>	Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans		<i>Genomics I - Humans, Animals and Plants</i>	iConcept Press	Hong Kong	2013	pp 29-46 (査読有)
<u>Ohno K.</u> , Ito M, Kawakami Y.	Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis		<i>J Mol Neurosci</i>			2013	Epub ahead of print. DOI 10.1007/s12031-013-0170-x, 3 pages (査読有)
<u>Ohno K.</u> , Ohkawara B, Ito M, Engel AG.	Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes		<i>eLS</i>	John Wiley & Sons, Inc.	Hoboken		in press. Manuscript ID: A24314.R1 (査読有)
芳賀信彦	二分脊椎	里宇明元、辻川将弘、杉山瑠、堀江温子	もう悩まない！ 100 症例から学ぶ リハビリテーション 評価のコツ	全日本病院 出版会	東京	2013	388-391
芳賀信彦	二分脊椎	伊藤利之、江藤文夫、木村彰男	今日のリハビリ テーション指針	医学書院	東京	2013	101-107