

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20271

研究課題名(和文) Opitz G/BBB症候群(全身の正中部に生じる形成不全症)の病態解明に向けて

研究課題名(英文) Pathological analysis of Opitz G/BBB syndrome

研究代表者

中村 高志(Nakamura, Takashi)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：80724179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小脳の特に関節(虫部)において層構造異常を呈するRac1/3ダブルノックアウトマウスをモデルとして、全身の正中部で種々の奇形を生ずるOpitz G/BBB症候群の病態解明を行った。本研究機関における主要な成果は、アクチン骨格制御分子Rac1がMid1-mTORC1シグナルを制御するという新規のシグナル伝達経路を発見したこと、そして小脳正中部と外側における表現型の違いには、Mid2による代償機構が関わっている可能性が示されたことである。これらの成果は未だ機序不明である本症候群の病態解明に向けた大きな一歩であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the Rac1/3 double (conditional) knockout mice using histological and molecular biological approaches. The mice exhibit layered structural abnormality in cerebellar vermis that is similar to Opitz G/BBB syndrome characterized by systemic midline malformations. In this study, we found that the actin cytoskeleton regulatory molecule Rac1 regulates Mid1-mTORC1 signaling. And we showed that Mid2 was involved in the migration of cerebellar granule neurons. Mid2 may contribute to the mediolateral difference in Rac1/3 double knockout mice, and we believe that these findings lead to elucidate the pathogenesis of Opitz G/BBB syndrome.

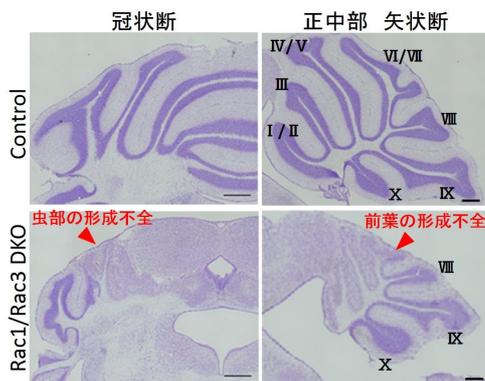
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：小脳顆粒細胞 Rac1 Mid1 mTORC1

## 1. 研究開始当初の背景

Opitz G/BBB 症候群は小脳虫部、脳梁、顔面(口蓋裂)、頸部(喉頭気管食道形成不全) 心臓、尿生殖器などにおいて、全身の正中部分の形成不全を呈する症候群である。本症候群は X 連鎖性もしくは常染色体優性の遺伝性疾患であり、現在までに原因遺伝子として同定されているのは X 染色体に位置する MID1 のみである。MID1 は、ホスファターゼ PP2A に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが知られている。しかし、X 連鎖性 Opitz G/BBB 症候群の中で MID1 に遺伝子変異が発見される頻度は 65%程度に止まるとの報告があり、また同じ変異型であっても表現型に違いがあることから、本疾患に関わる遺伝子は MID1 以外にもあることが予想され、その病態に関しても未だに解明されていない

現在までに小脳顆粒細胞における Rac1 の機能を細胞レベルで報告した論文は散見されるが、小脳顆粒細胞特異的に Rac1/Rac3 を欠失させたマウスの報告はない。そこで申請者は小脳顆粒細胞に発現する Atoh1 をプロモーターとして、小脳顆粒細胞特異的 Rac1/Rac3 ダブルノックアウトマウス (Rac1/Rac3 DKO マウス) を作製した。このマウスは生後の歩行開始時から顕著な失調性歩行を呈し、その小脳組織を確認したところ、内顆粒層の菲薄化と消失が認められた。その組織像は非常にユニークなもので、小脳全体のサイズは縮小し、何故か小脳虫部の前葉部分だけ (Lobule ~ ) 顆粒層が消失していた (下図)。



この Rac1/Rac3 DKO マウスの小脳発生過程を解析した結果、小脳顆粒細胞の分裂増殖能には異常がなく、神経突起の伸長が阻害されるため、内顆粒層への移動が障害されアポトーシスに陥ることを突きとめた。更に小脳の正中中部だけで顆粒層が消失する原因を究明す

べく、発達段階での小脳正中中部から抽出した mRNA を用いて DNA マイクロアレイを行ったところ、非常に面白い事に Opitz G/BBB 症候群の原因遺伝子である Mid1 の発現が低下していたのである。この事実を確かめるために、RN46A 神経細胞を用いて Rac1 をノックダウンさせたところ、Mid1 の mRNA が低下することを見出した。更に Rac の特異的な阻害因子や活性化因子を用いた実験でも確証をとり、Rac1 が Mid1 の発現を制御していることを突きとめた。更には、2 つの異なるグループから、終脳の神経細胞特異的に Rac1 を欠失させたマウスが報告されており、これらはいずれも脳梁が低形成となり、終脳においても Opitz G/BBB 症候群と類似した表現型を呈している。

これまでに Mid1 をノックアウトさせたマウスの報告もあり、Rac1/Rac3 DKO マウスと同じく小脳虫部の前葉の一部で内顆粒層の形成不全 (Lobule と の一部が消失) があるものの、その表現型は Rac1/Rac3 DKO マウス (Lobule ~ が消失) よりも軽微であった。このことは、小脳顆粒層において Rac の標的因子が Mid1 以外にも存在することを示唆している。そこで我々が着目したのは、Mid1 と同じドメイン構造を有し、Mid1 と同じく E3 ユビキチンリガーゼとして機能する「Mid2」である (Buchner et al, 1999)。実際に、培養細胞レベルで Mid1 と Mid2 に共通する標的タンパクであるホスファターゼ PP2A との結合実験の結果から、Mid2 も X 連鎖性疾患に関与する可能性を述べた報告もある (Short et al, 2002)。以上の事から申請者は、Opitz G/BBB 症候群の病態解明に向け、主に Mid2 に着目し研究を計画した。

## 2. 研究の目的

Mid2 が Rac1 により制御されている事を明らかにする。

Rac1 による Mid1/Mid2 の制御は、小脳正中中部 (小脳虫部) と外側 (小脳半球) で異なるのか検証を行う。

Mid1/Mid2 のダブルノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。

終脳における Rac1 ノックアウトマウスの脳梁欠損に、Mid1/Mid2 が関与するかを検証する。

小脳顆粒層において、Mid1 と Mid2 に共通

する結合タンパクを検索する。

### 3. 研究の方法

申請者はこれまでの研究で、NEPA21 エレクトロポレーター (NEPA GENE Co., Ltd.) を用いてラット神経細胞 RN46A に siRNA をトランスフェクションし定量的 PCR により Mid1 の発現が低下することを見出した。更に Rac1 特異的な阻害因子で処置することで、Mid1 の mRNA が低下する事、また Rac 特異的な GEF をトランスフェクションすることで、Mid1 の mRNA が増加する事を見出し、Rac1 が Mid1 の発現を制御していることを突きとめた。これと同様の手法を用いて、Mid2 も Rac1 により制御されていることを確認する。

Rac1/Rac3 DK0 マウスの小脳顆粒層が虫部の前葉でのみ消失している原因として「Rac1 (Rac1+Rac3) による Mid1/Mid2 の制御が、小脳の部位により異なる」という可能性が考えられた。これを検証するために、小脳正中中部と小脳外側部を分けて顆粒層を採取し、Mid1/Mid2 の発現量の違いを定量的 PCR で確認する。

既に存在する Mid1 のノックアウトマウスを譲渡していただき、Mid2 に関しては相同組み換えされた ES 細胞が入手可能であり、これを用いて Mid2 ノックアウトマウスを作製する。これらを掛け合わせて、最終的に Mid1/Mid2 ダブルノックアウトマウスを作製する。Mid1 と Mid2 はいずれも X 染色体上に存在するが、お互い離れた位置に存在するため、染色体間相同組み換えが期待でき、ダブルノックアウトマウスの作製は可能であると考えた。

東京大学の研究室から、終脳特異的 Rac1 KO マウスが脳梁の低形成を来すという報告がされている。この研究室からマウスを供与していただき、胎生期から生後 1 週間にかけての経時的な低形成脳梁を用意し、定量的 PCR により Mid1 が変化しているかを検討する。最後に Mid1 と Mid2 に共通する結合タンパク質を検索する。申請者はこれまでに、ヒト神経芽細胞腫に由来する SHSY5Y 細胞を用いて、FLAG-Mid1 と FLAG-Mid2 のそれぞれを過剰発現する安定発現株を既に樹立した。今後はこの細胞のライセートと抗 FLAG 抗体を用い、免疫沈降法によって Mid1/Mid2 と相互作用するタンパク質を溶出させる。このタンパク質

を SDS-PAGE により分離し、質量分析により同定する。

### 4. 研究成果

平成 28 年度はまず Rac1 による Mid1 転写制御の程度が、小脳内側と外側で異なっていることを確認した。生後 4 日目のマウスを用いて小脳内側と外側を別けてウェスタンブロット法を行ったところ、内側の方が明らかに Mid1 の発現が低下していることが判明した。続いて過去に報告された Mid1 KO マウスにおける小脳前葉形成不全の障害範囲が、我々の DK0 マウスより軽微であったことから、Rac の下流に存在する新たなシグナル因子を模索した。過去に mTORC1 シグナルをダウンレギュレートすることで Mid1 の機能が抑制されるという報告があったことから、Rac1-Mid1-mTORC1 シグナルについて検証した。PC12 ラット神経細胞を用いて Rac1 をノックダウンしたところ、Mid1 の発現が低下し、更に mTORC1 の標的分子である S6 リボソームと 4E-BP1 のリン酸化も減少した。同様に DK0 小脳組織においても、Mid1 と mTORC1 関連シグナルの発現低下が確認された。これらの結果から、Rac1 が Mid1-mTORC1 シグナル伝達に参与することが示された。

平成 29 年度は内外側の表現型の違いに対する Mid2 の関与について検討した。まず内側と外側を別けて qPCR を行ったところ、DK0 小脳外側では Mid2 の発現量が内側に比し相対的に多いことを発見した。さらに小脳外顆粒層の移植片培養に対して siMid1, siMid2 を添加することによる細胞移動能の変化を確認したところ、siMid1 単独投与群と siMid1+siMid2 投与群における移動能低下が認められ、後者においては siMid2 添加による相乗効果が見出された。これらの結果から、DK0 小脳外側では Mid2 の発現が相対的に多いことで移動能の低下が代償され、内顆粒層が内側に比べてある程度形成されるのではないかと考えられた。

### 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 2 件)

Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial

cerebellar development. Development. 2017;144:1863-1875. Nakamura T, Ueyama T, Ninoyu Y, Sakaguchi H, Chojookhuu N, Hishikawa Y, Kiyonari H, Kohta M, Sakahara M, de Curtis I, Kohmura E, Hisa Y, Aiba A, Saito N.

めまい疾患モデル動物-遺伝子医療・再生医療への扉 聴覚・平衡覚の成立における Rho-GTPase の関与 Equilibrium Research 2017;5:720-726 坂口博史, 中村高志, 上山健彦

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 高志 (NAKAMURA, Takashi)  
京都府立医科大学・耳鼻咽喉科・頭頸部外  
科学教室・研究員  
研究者番号：80724179

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )