

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15678

研究課題名（和文）新規神経変性疾患TBCD異常症の解明

研究課題名（英文）Analysis of TBCD gene mutation and deletion in novel neurodegenerative diseases

研究代表者

池田 俊郎（Ikeda, Toshio）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20423717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：Tbcd遺伝子を改編したマウス(KI:点突然変異KO:13塩基欠失)を評価した。KIヘテロマウス、KOヘテロマウスは異常なく、KOホモマウス(KO-/-)は胎児致死した。早発脳症のTBCD遺伝子異常疾病モデルとして KO-/-の胎児評価 KIホモマウスの長期生存での経過観察を行った。胎生9.5-12.5日前後で数十例以上胎仔を解析したがKO-/-は2例しか得られず、胎生早期致死のため難航した。解析法を変更したが胎仔早発死で再現性ある研究継続は困難であった。KIホモマウスにおいて、2年の長期生存後下肢の運動障害が発現した。成体での評価が可能のため、今後の実験はKIマウスの評価を主とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初計画したTbcd遺伝子を改編したマウスによる解析のうち、KOホモマウスの解析は病状による胎仔早発死で再現性ある研究継続は困難とわかり、期間内の論文報告にはいたらなかった。しかし、新たにKIホモマウスにおいて長期生存後下肢の運動障害が発現することがわかった。今後の新たな解析・研究の方向性が導かれた。今後KIホモマウスの運動機能解析や組織解析等がTBCD遺伝子異常による早発性脳症を解明しうる、将来の研究につながる知見を得た

研究成果の概要（英文）：We evaluated mice with a modified Tbcd gene (KI: point mutation KO: 13 base deletion). KI heterozygous mice and KO heterozygous mice were normal, and KO homozygous mice (KO-/-) were fetal lethal. We performed the following analyses as TBCD gene abnormality model mice of early-onset encephalopathy. 1) Fetal mice evaluations of KO-/- (2) Follow-up of one KI homo-mouse case in long-term survival. (1) We analyzed more than dozens of fetuses around 9.5-12.5 days of fetal life. Unfortunately, only 2 cases of KO-/- were obtained, and it was difficult due to early fetal lethality. Although we changed the analysis methods, it was difficult to continue the study with reproducibility due to premature fetal death. (2) A KI homozygous mouse developed motor paralysis of the lower limbs after long-term survival for two years. Evaluation in adults is possible, and future experiments will mainly evaluate KI mice.

研究分野：小児神経学 遺伝学

キーワード：疾患モデル 早発性脳症 運動障害 胎児致死 遺伝子改編マウス チューブリン

1. 研究開始当初の背景

昨今の遺伝学的手法は飛躍的進歩を遂げ、多くの遺伝性疾患が同定されたが、日本から疾患概念の同定まで至った例はごくわずかである。我々は2016に、TBCD 遺伝子変異が新たな神経変性疾患の原因であることを、家族症例の全エクソーム解析から同定し JHG に報告した。1) 同時期に横浜市立大ら国内外4施設も TBCD 遺伝子異常症を報告し、新たな疾患概念が萌芽した。TBCD は細胞内微小管のチューブリン折りたたみを司るシャペロン蛋白であり、neurofilament の形成を担うことが *in vitro* ではわかっている。しかし TBCD 遺伝子異常が *in vivo* で神経変性を引き起こす病態はいまだ未解明である。本研究は我々が準備した *Tbcd*^{-/-} マウス(胎児致死)などを用いて、病理像などの形態学的手法や分子生物学的手法から、TBCD 遺伝子異常が生体内の神経形成をどのように修飾しているのか病態生理を明らかにし、大脳形成における TBCD/チューブリン折りたたみの役割を解明する。得られた成果は生体の神経形成・遊走・分化に新たな知見を提示し、中枢神経の発生機構の解明に寄与すると思われる。

2. 研究の目的

本研究はまだ解明されていないヒト TBCD 遺伝子の役割を、マウスのホモログ遺伝子 *Tbcd* を改変した遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。
実際の症例で確認された TBCD 遺伝子 R942Q 変異を再現した *Tbcd* ノックインマウス(C57BL/6J*Tbcd*^{tm1(amp)}Arak)および *Tbcd* ノックアウトマウス(C57BL/6J-*Tbcd*^{tm2}Arak)を作製し、これらの変異が実際にヒトの症例と同様の症状を示すかを確認する(このマウス作製は広島大学、東京医科歯科大学との共同研究で行った)。
Tbcd 遺伝子 exon31 を改変したマウス(KI:点突然変異 KO:13 塩基欠失の臨床型を評価した。KI ヘテロマウス、KO ヘテロマウスは生存と運動機能に異常なく、KO ホモマウス(KO^{-/-})は全て胎児致死した。KI ホモマウスは当初健常と考えられた。TBCD 遺伝子異常の疾病モデルには、KO^{-/-}の胎児評価が適切と考えたが、KI ホモマウスも微細な神経症状を将来発現する可能性があり、KO^{-/-}の胎児評価 KI ホモマウスの長期生存での経過観察を行った。

3. 研究の方法

KO^{-/-}マウスの胎児評価と、KI homo マウスの評価に分けて論じる。

方法としては、以下を予定した。

- ・ライヘルト膜由来 DNA による胎児遺伝情報の確認
 - ・組織染色による、胎児マウス各種臓器の病理評価。外観の観察(マクロな病理)・固定/パラフィンないし凍結組織切片を作製し、染色による病理像の観察(ミクロな病理)を行う。免疫染色や蛍光染色も検討する。とくに大脳、骨格筋、脊髄、末梢神経などがマウスとヒト患者で相同・患者病態を説明できるかを観察・評価する。
 - ・*in situ* hybridization・免疫染色などによる胎児マウス各種臓器の *Tbcd* 遺伝子発現を評価する。上記で得られた病理と *Tbcd* 遺伝子の関連を評価する。マウスとヒト患者で相同・患者病態を説明できるかを観察・評価する。病理評価は宮崎大学の実験病理担当にもご相談し、遂行度を高める。
 - ・摘出した組織の mRNA 発現解析、Western blotting による *Tbcd* タンパクの発現量解析も視野に入れる。
 - ・TBCD 遺伝子がチューブリン重合・脱重合を担っていることがわかってきており、遺伝子改変マウスにおけるチューブリン重合能の評価なども視野に入れる。将来的にはチューブリン重合・脱重合を修飾する因子が疾患の治療薬となりうるかなど検討したい。
- KI ホモマウスは、当初生下時から成体に至るまで運動症状を呈さず、病的な表現型を呈さないと考えられていた。未知の遺伝子変異をもつマウスであり、微細な神経症状を経過と共に呈する可能性を考慮し、1頭のみ長期生存での経過を追跡する方策とした。

4. 研究成果

KO^{-/-}マウスの胎児評価と、KI homo マウスの評価に分けて論じる。

生まれてきた KO 胎児マウスの遺伝子変異の評価は、当方でプライマーを作製したサンガーシーケンスを用いた。より簡便、迅速に KO 胎児マウスを評価すべく、Stepone システムを用いた qPCR による評価系をサーモフィッシャーサイエンティフィックの協力を得て作製した。これにより、ごく微量の DNA から迅速に胎児の KO ホモ、KO ヘテロ、Wt を評価できるようになった。日齢 12.5 日前後(E12.5)で、2018/5 月・10 月に KO ヘテロマウス同士を交配し、帝王切開を行った。それ以前の事例も含め E12.5 でのべ 70-80 体前後の胎児を得たが、KO^{-/-}が確認できたのが 2 例である。このうち 1 例はごく小さく萎縮していたので Genotyping のみ試行、もう 1 例、唯一 HE 染色による組織を得られた検体は、まだトロポブラストのような幼若な形態であった。

KO-/-は、E12.5 では多くの場合死滅してしまっていると考えた。より早い時期に帝王切開したが、E8.5 から 9.5 で全例ヘテロ KO であった。母体 DNA の混入を考慮し、母体かん流、胎仔からの DNA 採取を増やす、Stepone とサンガーシーケンスの併用を行ったが帝王切開でも結果は変わらない。マウスの妊娠率の低さ・食殺率の高さから、系の維持に難航した。

2020 年に他研究室より子宮内穿孔法を用いた先行研究が呈示された (<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/suzuki/research.html>)。当初計画していた胎仔評価では、これ以上の予算・労力を投じて、他施設に先んじて論文報告を行うことは困難と判断した。内部で議論のうえ、当施設での胎仔評価は凍結とした。精子保存や最小数のマウス系統維持は行い、新たな視点から研究・論文発表が可能と考えた場合は再開する。

2020 年夏に下肢を引きずる運動障害が発現した個体を得た。前述 が胎仔を扱うため胎仔死亡・KO-/-が確認できる個体がほとんど得られないといった問題が浮上したことに対比して、KI ホモマウスはヒト症例と比して軽度な表現型ではあるが成体マウスでの評価が可能のため、今後は KI マウスの評価を主とする予定である。KI ホモマウスは 2 年ほどの長期飼育における自然歴を複数例確認することで、運動異常を呈する表現型が再現性を持って得られるか確認する。表現型が明らかになった事例では 2 歳をめやすに臓器の形態学・機能的解析および関連遺伝子の発現解析を行う。

運動機能評価の計画等を作成し、施設内で計画書を提出している。

今回の若手研究で論文報告まで到達することはできなかったが、新たな研究 の方向性が導かれた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(講演)宮崎大学大学院交流セミナー（サイエンスコミュニケーション特論） Ikeda T. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. 2017.7.22 英語			
--	--	--	--

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	盛武 浩 (Moritake Hiroshi)	宮崎大学・小児科・教授 (17601)	
研究協力者	木許 恭宏 (Kimoto Yoshuhiro)	宮崎大学・小児科・助教 (17601)	
研究協力者	前田 謙一 (Maeda Kenichi)	宮崎大・小児科・助教 (17601)	
研究協力者	河野 早弥賀 (Kawano Sayaka)	宮崎大・小児科・研究員 (17601)	

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------