

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23823

研究課題名（和文）retriever複合体の機能不全が新規の先天異常症候群を生じるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification of molecular mechanism in a novel congenital malformation syndrome caused by retriever dysfunction.

研究代表者

加藤 耕治（Kato, Kohji）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：40844056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々はVPS35LをRitcher-Schinzel症候群（別名3C症候群）の新規の原因遺伝子として報告し、国際共同研究により症例を集積し、疾患概念を確立しました。患者さんの集積により多様な合併症を呈することが明らかになりましたので、VPS35L欠損細胞を樹立して患者表現型の分子メカニズムを検討し、特に脂質異常症に関してはLRP1とLDLRの発現変化が原因であることを明らかにしました。加えて、患者で見られた様々な表現型を個体レベルで検討するため、VPS35L欠損マウスを世界で初めて樹立し、それが胎生致死であることを示しました。更に臓器特異的欠損マウスを作製し、各組織の解析系を樹立しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義としては、新規の疾患概念を確立したことにあります。これにより、従来原因が不明であった先天異常症候群の患者さんの診断が可能となり、同一の診断を有する患者さんを集積していくことで、疾患の理解を深め、定期的なフォローアップに役立てることが可能です。また、その疾患の病態を解明し、将来的な治療法や介入方法を検討していくことで、患者さんに対してより良い医療を提供できる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：We reported VPS35L as a novel causative gene for Ritcher-Schinzel syndrome (also known as 3C syndrome) and established the disease concept by accumulating cases through international collaborative research. The accumulation of patients revealed a diverse range of complications. Therefore, we established VPS35L-deficient cells to investigate the molecular mechanisms of patient phenotypes, and particularly elucidated that changes in the expression of LRP1 and LDLR are responsible for lipid abnormalities. Additionally, to examine various phenotypes observed in patients at the individual level, we established VPS35L-deficient mice for the first time in the world and demonstrated that it is embryonic lethal. Furthermore, we generated organ-specific knockout mice and established analysis systems for each tissue.

研究分野：小児科学

キーワード：3C症候群 エンドソームリサイクル 脂質異常症 VPS35L レトリバー複合体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は VPS35L を新規の疾患原因遺伝子として同定しました。VPS35L はレトリーパー複合体を形成し、エンドソームにおける細胞膜蛋白質の選択的リサイクル機能を担います。このリサイクル機構は多くの細胞膜蛋白質の発現量維持に寄与していますが、ヒトの疾患との関連については従来報告がありませんでした。

患者さんは中枢神経系、筋骨格系、心臓、眼球などに形成異常を伴う先天異常症候群の症例です。従来は未診断であり、病態も分からずに管理に難渋していましたが、VPS35L の両アレル性の機能喪失型変異が原因であると推察されました。しかし、研究開始時点では VPS35L に変異を有する症例は我々が同定した 1 家系しかなく、疾患の全体像や、本当に VPS35L 変異が原因なのか確かではありませんでした。また、患者さんの表現型の原因となる分子メカニズムも不明でした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的としては、VPS35L に変異を有する患者さんを更に複数同定することで、疾患概念を確立して表現型の全体像を理解することが挙げられました。また、それらの症状を引き起こすメカニズムを細胞レベル、個体レベルで理解することを本研究の目的としました。

### 3. 研究の方法

VPS35L に変異を有する患者さんの集積に関しては、国内のゲノムセンター各施設との共同研究を行うとともに、Genematcher などを用いて国際的にも症例の共有を行える体制を構築しました。VPS35L に同定された変異が病的変異かどうかを検討するための細胞実験系も確立しました。

患者さんで観察された表現型の分子病態を理解するため、VPS35L の遺伝子欠損細胞を神経系、腎泌尿器系などの複数の細胞株で樹立しました。

また、個体レベルで表現型や分子メカニズムを検討するため、VPS35L の遺伝子欠損マウスや患者変異導入マウス(KI マウス)、組織特異的 VPS35L 欠損マウスを樹立しました。

### 4. 研究成果

VPS35L が 3C 症候群 (Ritscher - Schinzel 症候群) の原因であることを確立。

VPS35L に変異を有する姉弟の 1 家系を論文報告しました (Kato ら、J Med Genet、2019)。患者さんは先天性心疾患、小脳形成異常、特徴的な顔貌を呈していました。特徴的顔貌は大泉門開大、広い前額、アーチ状の眉、薄い上口唇などが含まれました。これらの症状は臨床的には 3C 症候群 (別名: Ritscher-Schinzel 症候群) に合致する表現型であり、VPS35L を 3C 症候群の新規の原因として定義し、OMIM データベースにも登録されました。患者さんは従来報告されていた 3C 症候群の表現型に加え、蛋白尿や点状軟骨異形成症など、従来は報告されたことのない新規の合併症を呈しており、更なる症例の集積による疾患表現型の理解が求められました。

そこで、国内、国外の共同研究を基に VPS35L に変異を有する症例の更なる収集を行いました。結果として日本国内から 1 例、オランダから 1 例、フランスから 1 例を同定することが出来、これにより VPS35L が原因となる 3C 症候群の表現型の多様性を理解することが出来ました (Otsuji、Kato ら、J Med Genet、2023)。

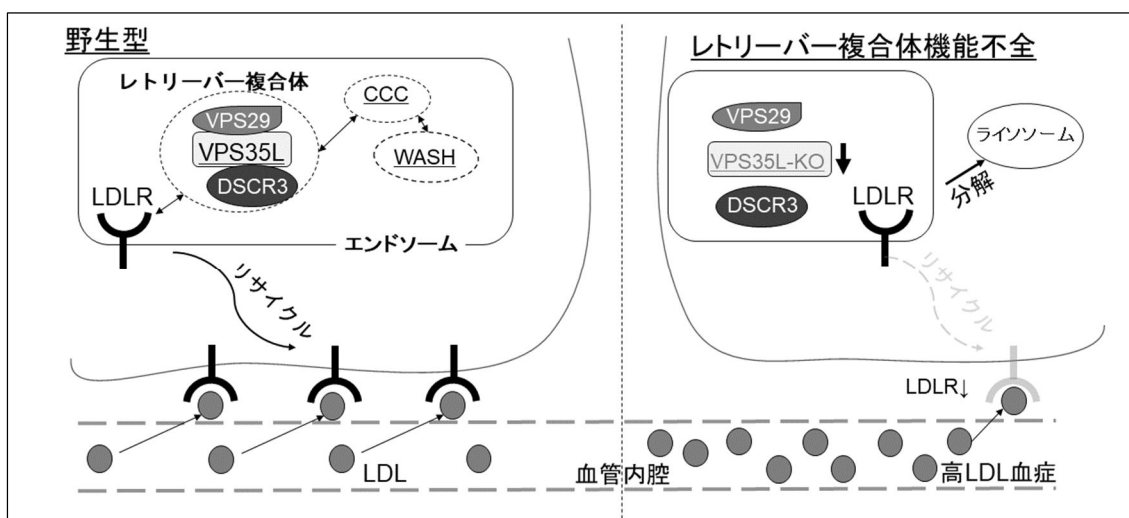
これらの臨床情報を整理して患者さんで起こり得る合併症を明確にすることで、より良い医学的管理を患者さんに届けることが可能となると考えています。一例として、幼児期の一人の患者さんの血液生化学的検査で脂質異常症の合併が分かりました。小児科領域では幼年期には必ずしも脂質のチェックはルーティンでは行われません。そこで海外の症例も含めて患者さんの脂質異常の有無を確認したところ、複数の症例で脂質異常症を呈していることが分かりました。この様に、希少な先天異常症候群では臨床像の把握

が臨床にとっても役に立ちます。今後は更なる症例の集積を行い、詳細な理解を通じて患者さんへと成果を還元できるようにしていきたいと考えています。

#### VPS35L の遺伝子欠損細胞の作製と分子病態解析

患者さんの表現型を明らかにしたのちは、その背景に存在する分子メカニズムの検討を行いました。VPS35L はエンドソームで膜蛋白のリサイクル機構に関与することが知られています。そこで、VPS35L の機能障害によって膜蛋白のリサイクルが正常になされず、それによって本来はリサイクルされるべき膜蛋白が上手く制御されずに分解されることで、膜蛋白の発現量が低下することが病態に関与しているのではないかと仮説を立て、患者さんの症状に関与する膜蛋白の同定を試みました。

VPS35L を含むレトリーパー複合体は、SNX17 蛋白と共同して NPxY モチーフを有する膜蛋白のリサイクルを制御することが知られています。そこで、患者さんで共通して観察された脂質異常症に着目して、病態に関与しうる膜蛋白を検証しました。その中で、脂質の制御に重要な LDL 受容体 (LDLR) は細胞質ドメインに NPxY モチーフを有することに着目して、VPS35L 欠損によるレトリーパー複合体機能不全で LDLR の挙動を検討しました。その結果、通常はエンドサイトーシスの後にリサイクルされて細胞膜へ再輸送される LDLR が、レトリーパー複合体機能不全においてはリサイクルされずにライソソームへ輸送され分解されることが分かりました (図)。結果として、LDLR の細胞膜での発現量が低下し、LDL の細胞内への取り込みが低下することが、患者さんでの脂質異常症の原因であると明らかにしました。



#### VPS35L の欠損マウスの作成と病態解析

細胞レベルの表現型を、個体レベルでも病態を解析するために VPS35L の欠損マウスを作製しました。VPS35L のヘテロ欠失マウスは表現型を示しませんでした。両アレルの欠損マウスは E 7.5 - E 10.5 の間に胎生致死であることを示しました (図)。

これらの結果は VPS35L が発生に必須の蛋白であることを改めて示唆しますが、遺伝子欠損マウスではそれ以上の病態解析が困難となりました。そこで、VPS35L を組織特異的に欠損させるマウスの作製と患者変異を導入した KI マウスの作製を行い、個体を得ることが出来ました。今後はそれらのマウスを用いて詳細な病態解析を行っていきたくて考えています。

#### Genotype analyses of offspring from *Vps35*<sup>+/-</sup> intercross.

Genotype	E7.5	E10.5	Postnatal
<i>Vps35</i> <sup>+/+</sup>	9	12	30
<i>Vps35</i> <sup>+/-</sup>	22	33	55
<i>Vps35</i> <sup>-/-</sup>	6	0	0
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>45</b>	<b>85</b>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuji Shiomi, Nishio Yosuke, Tsujita Maki, Rio Marlene, Huber Celine, Anton-Plagaro Carlos, Mizuno Seiji, Kawano Yoshihiko, Miyatake Satoko, Simon Marleen, van Binsbergen Ellen, van Jaarsveld Richard H, Matsumoto Naomichi, Cormier-Daire Valerie, J.Cullen Peter, Saitoh Shinji, Kato Kohji	4. 巻 60
2. 論文標題 Clinical diversity and molecular mechanism of VPS35L-associated Ritscher-Schinzel syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmg-2022-108602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato K, Miya F, Oka Y, Mizuno S, Saitoh S.	4. 巻 66
2. 論文標題 A novel missense variant in CUL3 shows altered binding ability to BTB-adaptor proteins leading to diverse phenotypes of CUL3-related disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 491-498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00868-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato K, Mizuno S, Morton J, Toyama M, Hara Y, Wasmer E, Lehmann A, Ogi T.	4. 巻 185
2. 論文標題 Expanding the phenotype of biallelic loss-of-function variants in the NSUN2 gene: Description of four individuals with juvenile cataract, chronic nephritis, or brain anomaly as novel complications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A.	6. 最初と最後の頁 282-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61927.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto H, Hayano S, Okuno Y, Onoda A, Kato K, Nagai N, Fukasawa Y, Saitoh S, Takahashi Y, Kato T.	4. 巻 326
2. 論文標題 Phosphorylated proteome analysis of a novel germline ABL1 mutation causing an autosomal dominant syndrome with ventricular septal defect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 81-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2020.10.032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato K, Oka Y, Muramatsu H, Vasilev F, Otomo T, Oishi H, Kawano Y, Kidokoro H, Nakazawa Y, Ogi T, Takahashi Y, Saitoh S.	4. 巻 57
2. 論文標題 Biallelic VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Genet.	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2019-106213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shiomi Otsuji, Kohji Kato, Celine Huber, Seiji Mizuno, Mariene Rio, Satoko Miyatake, Naomichi Matsumoto, Valerie Cormier Daire, Shinji Saitoh
2. 発表標題 Biallelic VPS35L pathogenic variants cause Ritscher-Schinzel-like syndrome: Description of clinical diversity and molecular mechanism.
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohji Kato, Peter J Cullen
2. 発表標題 Uncovering the underlying molecular mechanism in patients with Retriever dysfunction
3. 学会等名 UK membrane trafficking (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiomi Otsuji, Kohji Kato, Seiji Mizuno, Satoko Miyatake, Naomichi Matsumoto, Shinji Saitoh
2. 発表標題 A novel case with biallelic VPS35L variants confirms VPS35L as a causative gene of 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome.
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato K, Oka Y, Muramatsu H, Vasilev F, Otomo T, Oishi H, Kawano Y, Nakazawa Y, Ogi T, Takahashi Y, Saitoh S.
2. 発表標題 Biallelic VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex
3. 学会等名 ASHG 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤耕治, 岡泰由, 村松秀城, Vasilev F, 大友孝信, 大石久史, 河野好彦, 中沢由華, 荻朋男, 高橋義行, 齋藤伸治.
2. 発表標題 VPS35Lの両アレルにおける機能喪失型バリエーションは 3C/Ritscher-Schinzel 症候群に類似の先天異常症候群の原因となる
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------