

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03591

研究課題名(和文) 遺伝解析からとらえる運動毛機能異常による水頭症および認知症の病態生理

研究課題名(英文) Hydrocephalus and Dementia due to motile cilia dysfunction

研究代表者

吉浦 孝一郎 (Yoshiura, Koh-ichiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：00304931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：CFAP43遺伝子ノックアウトマウスの上皮細胞をマイクロダイセクション法によって集め、cDNAライブラリー合成後に次世代型シーケンサーを使った発現解析を実施した。発現量変化遺伝子を用いたオントロジー解析により、神経発生関連の遺伝子群の発現変化が認められた。正常圧水頭症患者の線毛構成遺伝子96個変異解析では、DRC1遺伝子をはじめ、一般集団での minor allele frequency <0.01の truncation型の変異を5個の遺伝子に認め、ミスセンス変異を19遺伝子に認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線毛関連遺伝子の変異は、水頭症発生に関与することが明確に示された。上皮細胞の機能異常は神経分化関連の遺伝子群に集中し、線毛の構造異常から分化異常に至り機能不全に陥っていることが示唆された。ただし、その詳細は今後の研究を待たざるをえない。

線毛関連遺伝子の変異が、正常圧水頭症患者に多く見つかっていることは、正常圧水頭症・水頭症・認知症患者の一部が、線毛関連遺伝子異常症であることを明確に示唆しており、成人あるいは初老期に発症する遺伝病であることを世に知らしめた意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Ependymal cells of CFAP43 gene knockout mice (KO mice) were collected by microdissection method, cDNA library was synthesized, and expression analysis was performed using a next-generation sequencer. KO mice and control mice were clearly distinguished on classification, and ontology analysis using genes with altered expression levels revealed altered expression of gene clusters related to ensheathment of neuron, telencephalon development, and negative regulation of cell differentiation.

Analysis of mutations in 96 genes construction cilia in patients with normal pressure hydrocephalus revealed truncation-type mutations with a minor allele frequency <0.01 in the general population, including the DRC1 gene, in 5 genes, and missense mutations in 19 genes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：CFAP43 正常圧水頭症 変異解析 モデルマウス 発現解析

1. 研究開始当初の背景

我々は、正常圧水頭症家系解析により、*CFAP43* 遺伝子の機能喪失が原因となって水頭症を発症することを発表した (Morimoto, Yoshiura, Ono et al., *Neurology*, 2019)。論文は、古典的な家系解析から水頭症の原因を明らかにしたものである。稀少疾患 / 遺伝性疾患は、症状が明確で、原因遺伝子が見つかった場合には、その遺伝子に着目して病態を詳細に把握することで病態解析が一気に進む。遺伝病の病態から、ヒトの生理状態が明らかになることは多く、当該遺伝病に現れる症状に対する病態生理の新しいとらえ方を与えてくれる。*CFAP43* は運動線毛を構成するタンパクであり、*CFAP43* 遺伝子変異と正常圧水頭症発症の関連が明らかになったことで、遺伝性とは認識されていない通常の正常圧水頭症 (iNPH: idiopathic normal pressure hydrocephalus) も、運動線毛の機能異常によるものが含まれているのではないかと考えられた。また、正常圧水頭症は、「歩行障害」「認知症」「尿失禁」の三主徴によって臨床的にその発症が疑われる治療可能な認知症である。仮に認知症から発症して尿失禁がないような場合には、通常の認知症と間違えられている可能性もある。本研究は、iNPH と運動線毛の変異との関係が、より一般的なのではないかと考え開始することにした。

研究開始当初は、モデルマウスとして *Cfap54* 遺伝子 (McKenzie et al., *Molecular Biology of The Cell*, 2015) と *Gemc1* 遺伝子 (Terre et al., *The EMBO Journal*, 2016) (いずれの遺伝子も繊毛構成成分) のノックアウト導入で水頭症をきたすことが報告されていた。その報告は、「ノックアウトマウスを作ってみたら水頭症のように脳室が拡大しました」ということであり、ヒトの水頭症患者、正常圧水頭症患者、認知症患者などにそれら遺伝子の変異があることを証明した論文ではなかった。ただ、これらの論文と我々の論文を考えると、水頭症は運動線毛である可能性が高く、ノックアウトマウスの病態発症過程を詳細に明らかにすることで、ヒトの通常型の水頭症患者、正常圧水頭症患者、認知症患者の病態を明らかにできるのではないかと考えて本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、motile cilia (運動繊毛) 関連の遺伝子群が、日本人の水頭症・認知症のリスク因子であることを、臨床検体を用いて検証する。また、*Cfap43* 変異モデルマウスを解析することによって、実際に医療に役立つ水頭症の病態生理を明らかにすることを目標とした。motile cilia (運動繊毛) 関連の遺伝子群変異がリスク因子であることは、患者集団でそれら遺伝子に変異が蓄積していることを証明することが必要で、水頭症の病態生理の解明にはモデルマウスの脳での遺伝子発現解析、免疫組織学的解析が必要である。

3. 研究の方法

(1) *Cfap43* ノックアウトモデルマウスの病態解析

Cfap43 タンパクは、脳室の最表層で脳脊髄液と接する上皮細胞に発現していることが分かっており、我々の解析においても、上皮細胞の数の減少や線毛異常が観察されており、水頭症発症の基盤にある変化は上皮細胞であると考えられる。そこで、作成済みの *Cfap43* ノックアウトモデルマウスの脳室周辺の凍結切片を作成し、脳室周囲の上皮細胞をマイクロダイセクションして、RNA 抽出後、全 RNA を鋳型として QIAseq UPX3' Transcriptome Kit (QIAGEN)

を用いて次世代型シーケンサー（NGS）用にライブラリー調整し、NGSによる塩基配列決定からライブラリーの tag カウントを取得することで、発現定量解析を実施した。発現定量解析データは、遺伝子発現量の変化から、Gene Ontology エンリッチメント解析や、Gene Set エンリッチメント解析を行い、上皮細胞で発現変化している細胞内機能を明らかにする。それらの機能変化のオントロジーは水頭症の病態に重要なことが示唆され、カスケードの根にある遺伝子は新規の水頭症や認知症の原因遺伝子の可能性も示唆される。

（2）運動線毛遺伝子の変異解析

運動線毛遺伝子の変異が、「水頭症，正常圧水頭症，認知症の原因である」，あるいは「リスク因子である」ことを示すためには，ヒトゲノムにある運動線毛遺伝子の変異解析を多くの患者群で実施する必要がある。新規患者収集には，神経内科と脳神経外科の協力が必要であり，患者収集の協力体制を整える。当初から，神経内科1教室，脳神経外科1教室との共同研究を進めることを計画した。また，正常圧水頭症を収集していた研究施設・研究者と線毛関連遺伝子の変異解析を実施することを計画した。

運動線毛構成タンパク遺伝子は，運動線毛構成タンパク 96 遺伝子（機能不明な遺伝子もあるので多めに選定した）のエクソン領域の濃縮キャプチャー用の修飾オリゴヌクレオチドを作成する。キャプチャーオリゴを使用したハイブリダイゼーション法によるエクソン部 DNA 濃縮後，ショートリード型次世代シーケンサーによって，遺伝子変異スクリーニングを実施する。このエクソン領域の濃縮と次世代シーケンサーは，全エクソン解析法と同様の手法である。

4．研究成果

（1）*Cfap43* ノックアウトモデルマウスの病態解析

マウスは，生後4ヶ月齢を，ノックアウトマウスと対照コントロールマウスを2匹ずつ用いた。図1に，RNA 発現によりクラスタリング解析を実施した。ノックアウトマウス2例と対照2例は各カテゴリーでクラス分けされており，RNA-seq 発現解析実験が成功していると判断できる。

オントロジー解析の結果は，上位3個が，ensheathment of neuron，telencephalon development，negative regulation of cell differentiation となっており，尤もらしい結果が得られている（図2）。今後，発現変化のあった遺伝子を個別に詳細に見ることで，水頭症の病態発症における上皮細胞の役割を明らかにしていきたい。

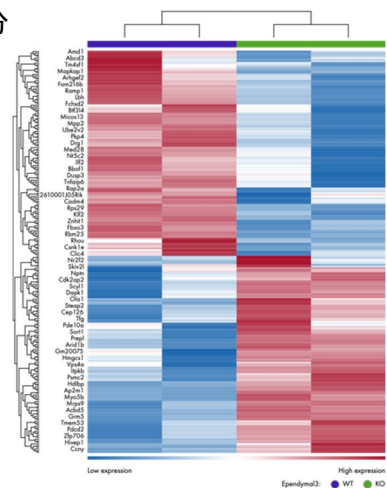


図1．RNA 発現解析によるノックアウトマウスと対照のクラスタリング解析

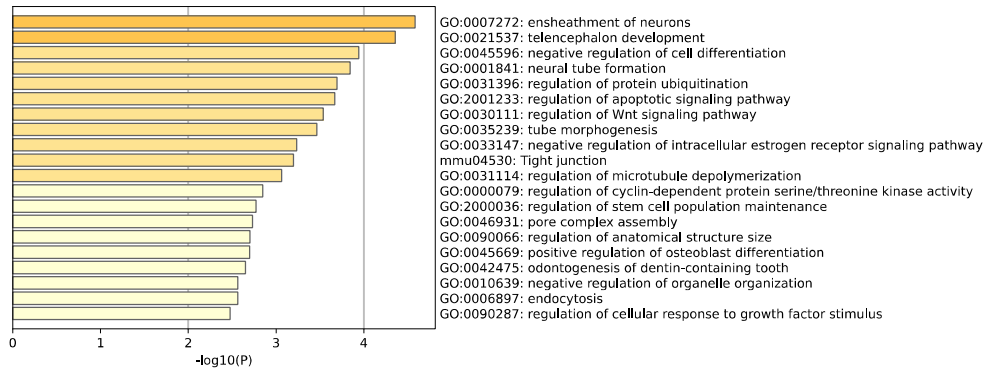


図2 . RNA 発現解析結果によるノックアウトマウスの ontology 解析

(2) 運動線毛遺伝子の変異解析

リストアップした 96 遺伝子を変異解析対象とした。脳神経外科から新規収集した正常圧水頭症 6 例，神経内科から提供された 1 例，大阪の病院から検査を依頼された 1 例を解析したが，疾患原因と考えられる変異は特定できなかった。

ある施設との共同研究で 100 例の正常圧水頭症を解析した。*DRC1* 遺伝子 (exon1 ~ exon4 の欠失が原発性線毛異常症の原因と報告されている) を初めとして，一般集団で <0.01 minor allele 頻度の truncation 型の変異を 5 個の遺伝子に認め，ミスセンス変異を 19 遺伝子に認めた。最終的には，96 遺伝子から 23 遺伝子に変異を認めたが，一般集団でのアレル頻度との比較で p -値 < 0.03 (多重検定の補正を実施すると有意ではない) の遺伝子が多くある。我々が選択した線毛遺伝子構成・関連遺伝子は，一遺伝子病としての「原因遺伝子」，あるいは多因子疾患としての「感受性遺伝子」の可能性があると思われる，今後のさらなる正常圧水頭症，水頭症，認知症患者での変異解析が必要である。

truncation 型の変異を持つ遺伝子，正常対照集団に認められないミスセンス変異を有する遺伝子は，正常圧水頭症の原因である可能性が高く，マウスに変異を導入することで，ヒト正常圧水頭症の原因遺伝子とみなしてよいのかを確認中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita Akira, Ohyama Kaname, Tanimura Susumu, Matsuda Katsuya, Kishino Tatsuya, Negishi Yutaka, Asahina Naoko, Shiraishi Hideaki, Hosoki Kana, Tomiwa Kiyotaka, Ishihara Naoko, Mishima Hiroyuki, Mori Ryoichi, Nakashima Masahiro, Saitoh Shinji, Yoshiura Koh-ichiro	4. 巻 148
2. 論文標題 Itp1 regulates the formation of anterior eye segment tissues derived from neural crest cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 188755 ~ 188755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.188755	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 -
1. 著者名 Nakashiki Suguru, Miura Satoshi, Mishima Hiroyuki, Masumoto Hiroshi, Hidaka Masaaki, Soyama Akihiko, Kanda Yasuko, Fukushima Masanori, Haraguchi Masafumi, Sasaki Ryu, Miyaaki Hisamitsu, Ichikawa Tatsuki, Takatsuki Mitsuhiisa, Eguchi Susumu, Yoshiura Koh-ichiro, Nakao Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Bile extracellular vesicles from end-stage liver disease patients show altered microRNA content	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 821 ~ 830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12072-021-10196-5	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 -
1. 著者名 Ishikawa T, Kimoto H, Mishima H, Yamagata K, Ogata S, Aizawa Y, Hayashi K, Morita H, Nakajima T, Nakano Y, Nagase S, Murakoshi N, Kowase S, Ohkubo K, Aiba T, Morimoto S, Ohno S, Kamakura S, Nogami A, Takagi M, Karakachoff M, Dina C, Schott JJ, Yoshiura KI, Horie M, Shimizu W, Nishimura K, Kusano K, Makita N.	4. 巻 42
2. 論文標題 Functionally validated SCN5A variants allow interpretation of pathogenicity and prediction of lethal events in Brugada syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/eurheartj/ehab254	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 Kanazawa N, Hemmi H, Kinjo N, Ohnishi H, Hamazaki J, Mishima H, Kinoshita A, Mizushima T, Hamada S, Hamada K, Nishikomori R, Tsumura M, Yamashita Y, Tamura S, Orimo T, Ozasa T, Kato T, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Wakaki-Nishiyama N, Inaba Y, Kunimoto K, Okada S, Taketani T, Nakanishi K, Murata S, Yoshiura KI, Kaisho T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6819 ~ 6819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27085-y	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 -

1. 著者名 Ishikawa T, Mishima H, Barc J, Takahashi MP., Hirono K, Terada S, Kowase S, Sato T, Mukai Y, Yui Y, Ohkubo K, Kimoto H, Watanabe H, Hata Y, Aiba T, Ohno S, Chishaki A, Shimizu W, Horie M, Ichida F, Nogami A, Yoshiura K-i, Schott JJ, Makita N	4. 巻 13
2. 論文標題 Cardiac Emerinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 e008712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCEP.120.008712	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 -

1. 著者名 Yamashita Yusuke, Morita Shuhei, Hosoi Hiroki, Kobata Hiroshi, Kishimoto Shohei, Ishibashi Tatsuya, Mishima Hiroyuki, Kinoshita Akira, Backes Bradley J., Yoshiura Koh-Ichiro, Papa Feroz R., Sonoki Takashi, Tamura Shinobu	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting Adaptive IRE1 Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6314 ~ 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176314	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 -

1. 著者名 Morishima Sakura, Maeda Miwako, Itonaga Tomoyo, Sato-Kawano Nanae, Yoshiura Koh-ichiro, Ihara Kenji	4. 巻 29
2. 論文標題 Sphenoethmoidal meningoencephalocele with variable hypopituitarism: A case report and review of literature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 183 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.29.183	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 -

1. 著者名 Morimoto Yoshiro, Ono Shinji, Yoshida Shintaro, Mishima Hiroyuki, Kinoshita Akira, Tanaka Takeshi, Komohara Yoshihiro, Kurotaki Naohiro, Kishino Tatsuya, Okazaki Yuji, Ozawa Hiroki, Yoshiura Koh-ichiro, Imamura Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 A unique missense variant in the E1A-binding protein P400 gene is implicated in schizophrenia by whole-exome sequencing and mutant mouse models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01258-1	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 -

1. 著者名 Motoyama Rie, Matsudaira Takashi, Terada Kiyohito, Usui Naotaka, Yoshiura Koh-ichiro, Takahashi Yukitoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 PRRT2 mutation in a Japanese woman: Adult-onset focal epilepsy coexisting with movement disorders and cerebellar atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epilepsy & Behavior Reports	6. 最初と最後の頁 100554 - 100554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebr.2022.100554	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 -

1. 著者名 Hamaguchi Yo, Mishima Hiroyuki, Kawai Tomoko, Saitoh Shinji, Hata Kenichiro, Kinoshita Akira, Yoshiura Koh-ichiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Identification of unique DNA methylation sites in Kabuki syndrome using whole genome bisulfite sequencing and targeted hybridization capture followed by enzymatic methylation sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 711 - 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01083-4	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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 濱口 陽, 三嶋博之, 河合智子, 斎藤伸治, 秦 健一郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎.
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた歌舞伎症候群の新規DNAメチル化サイトの検索
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会 / 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉浦孝一郎
2. 発表標題 新しいゲノム解析技術 -メチル化解析-
3. 学会等名 第44回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Mishima, Tetsuro Kitahara, Koh-Ichiro Yoshiura, Tomoko Komatsu, Masaichi Lee, Tatsuro Kondoh.
2. 発表標題 PatakaraPlus: The project for individuals with Down Syndrome to develop oral and physical training and evaluation.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高尾真未, 長谷川ゆり, 三浦生子, 松本 恵, 伊達木澄人, 古賀智裕, 田中 彩, 松尾久美, 長石恵美, 平間理子, 森藤香奈子, 佐々木規子, 松本 正, 吉浦孝一郎, 三浦清徳
2. 発表標題 長崎大学病院における遺伝カウンセリングの現状と課題
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会/第28回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	辻野 彰 (T sujino Akira) (70423639)	長崎大学・病院(医学系)・教授 (17301)	

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