

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16650

研究課題名(和文)正常圧水頭症におけるグリンパティックシステム機能異常の解析

研究課題名(英文)Analysis of glymphatic system dysfunction in normal pressure hydrocephalus.

研究代表者

森本 芳郎 (Morimoto, Yoshiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：70816686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：まず、解析において十分量のCFAP43ノックアウトマウスを繁殖させることを試みた。しかしながら、CFAP43ヘテロノックアウトマウス同士の交配による妊娠確率が低く、出生しても、母マウスに食殺されることが続き、相当回数の交配作業を繰り返したものの、解析における十分頭数のCFAP43ノックアウトマウスを得ることは困難であった。CFAP43ノックアウトマウスの頭数は限られていたことから、貴重な個体をサクリファイスすることなく脳室拡大の程度を計測する必要性が生じたため、マイクロCTを用いた脳室を計測を試みた。しかしながら、子マウスの脳及び脳室は極めて小さく、正確な描出が困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の解析を行う中で、CFAP43ノックアウトマウスにおける以下の特徴が示唆された。(1)個体・組織・細胞レベルにおいて、表現系が均一ではないこと。(2)CFAP43遺伝子は、ハプロ不全においても何らかの表現系を来す可能性があること。

今後のCFAP43遺伝子の機能解析および表現系発現に繋がるメカニズムを解明するにあたっては、本研究において明らかとなった上記2つの課題について取り組む必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：First, we attempted to breed sufficient numbers of CFAP43 knockout mice in the analysis

However, 1) the probability of CFAP43 knockout mice becoming pregnant/being born is low 2) Even if they are born, they are eaten and killed by their mothers. Due to these circumstances, it was difficult to obtain a sufficient number of CFAP43 knockout mice for analysis, even after a considerable number of breeding attempts. Due to the limited number of CFAP43 knockout mice, an attempt was made to create a protocol to measure the ventricles of the brain using micro CT. However, 1) The brains and ventricles of the knockout mice were extremely small, making accurate delineation difficult. 2) Due to phenotypic differences at the individual level, there are no clear criteria for determining the degree of ventricular enlargement that constitutes "hydrocephalus". For these two reasons, it was difficult to measure ventricular enlargement in the mouse pups using micro-CT.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：正常圧水頭症 CFAP43

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常圧水頭症は 80 歳以上の 5.9% に発症する、ありふれた認知症である。それに関わらず、その病態生理に関しては依然として不明である。治療には一般的にシャント術が選択され、歩行障害には有効であるものの、精神症状を含むその他の症状に対する効果は限定的であるとする報告もあり、シャント術に変わる治療法の開発が望まれている。

正常圧水頭症は通常散発性に発症するが、家族性に発症する症例があることが報告されている。このような多発家系は、遺伝的要因が正常圧水頭症の病態生理に影響を与えることを示唆している。

2019 年、我々は、正常圧水頭症多発家系の遺伝子解析の結果を国際誌に報告した。興味深いことに、この正常圧水頭症多発家系の患者は重篤な抑うつ状態を併発していた(図 1)。全エクソン解析の結果、原因遺伝子として CFAP43 遺伝子が同定された。CFAP43 遺伝子ノックアウトマウスを作成したところ、同マウスは精巣・気管支・側脳室などの繊毛構造異常を示し、生後 6 週間より水頭症を発症した。これらのデータは繊毛の構造異常から生じる髄液の循環不全が、正常圧水頭症の原因となりうることを示唆された(図 2)。

ここで、この正常圧水頭症多発家系の患者が呈していた重篤な抑うつ状態も、繊毛機能障害に起因するものだろうか? という疑問が生じた。

2. 研究の目的

正常圧水頭症の症状として、認知症・歩行障害・尿失禁の 3 つの主症状の他に、抑うつ状態や無関心といった精神症状を生じることが知られている。しかしながら、正常圧水頭症と抑うつ症状を繋ぐ生物学的メカニズムに関しては、依然不明な状態である。

本研究では、CFAP43 遺伝子ノックアウトマウスの表現系の解析を行うことにより、正常圧水頭症の精神症状が生じるメカニズムを解明し、ひいては精神疾患に対する新たな診断・治療法の開発への臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、以下の手順で研究計画を立案した。

- (1) まず、解析において十分量の CFAP43 ノックアウトマウスを繁殖させる
- (2) 繁殖させた CFAP43 ノックアウトマウスの側脳室拡大の程度を出生時から継続的に計測し、脳室拡大の時期や程度を把握する
- (3) CFAP43 ノックアウトマウスの継続的な行動評価を行い、2 で計測した継続的脳室拡大のデ

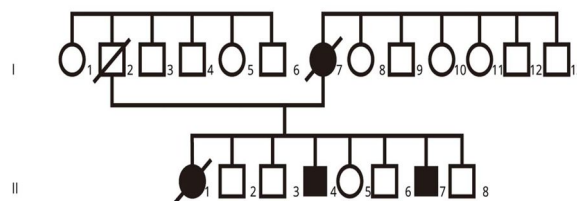


図 1 : 正常圧水頭症多発家系

この家系の患者は正常圧水頭症と併せて、重篤な抑うつ状態を呈する。

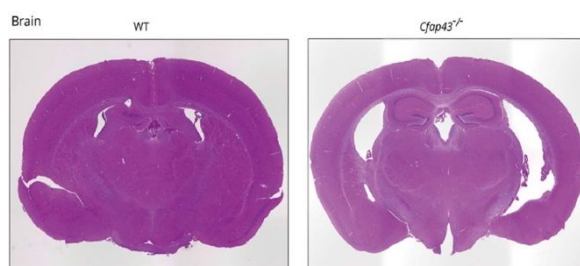


図 2 : CFAP43 ノックアウトマウスに見られる水頭症

ータと合わせて、脳室拡大と行動変化の相関を解析する

4. 研究成果

前項の研究計画の(1)を達成するため、CFAP43 ノックアウトマウスの繁殖を試みた。

まず CFAP43 ノックアウトの雄雌を用いての繁殖を行ったが、CFAP43 ノックアウトマウスは精子形成に問題があり(図3)、CFAP43 ノックアウトマウス同士の掛け合せにおいて、妊娠に至ることはないことが判明した。そのため、CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士を掛け合わせることで繁殖を試みた。

CFAP43 ヘテロノックアウトマウスの精子形成には、光学顕微鏡レベルの形態には異常が見られなかったものの(図4)、CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士の掛け合わせにおいて妊娠が成立する確率は低く、何らかの要因による(例えば、精子に光学顕微鏡では確認できない微細な構造異常が存在する可能性、構造に異常がなくても、精子鞭毛の運動異常が生じている可能性、メスの卵巣・卵管・子宮において繊毛に構造異常や運動異常が生じている可能性)等が考えられた。

また、CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士の掛け合わせで妊娠が成立しても、CFAP43 ノックアウトマウスが生まれる数は、CFAP43 ヘテロノックアウトマウスや WT マウスと比較して統計学的に優位に低かった。おそらく、CFAP43 遺伝子の機能が完全になくなった場合には、何らかの理由で胎生期に母体内で発育不全となり死亡しているのではないかと予想された。

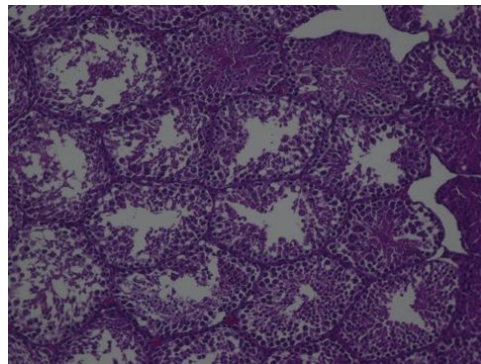


図3 CFAP43 ノックアウトマウスの精巣
精子の形成不全が見られる

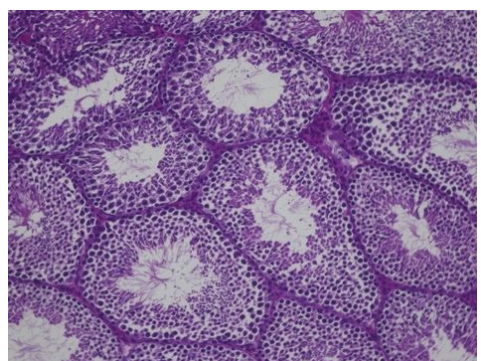


図4 CFAP43 ヘテロノックアウトマウスの精巣
精子の形成不全は見られない

Genotype	Observed numbers (n = 51)	Expected numbers (n = 51)	χ^2 value	p Value
<i>Cfap43^{+/+}</i>	18	12.75	—	—
<i>Cfap43^{+/-}</i>	27	25.5	0.9	0.1797
<i>Cfap43^{-/-}</i>	6	12.75	6.0	0.0143 ^a
Total	51	51	5.8235	0.0544

表1 CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士の交配結果

CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士の掛け合わせで妊娠が成立しても、CFAP43 ノックアウトマウスが生まれる数は、CFAP43 ヘテロノックアウトマウスや WT マウスと比較して統計学的に優位に低かった。

また、少数の出生した CFAP43 ノックアウトマウスに関しても、そのほとんどが母マウスに食

殺されることが続いた。同一母から出生した CFAP43 ヘテロノックアウトマウス及び WT マウスは食殺を免れていたことを考慮すると、CFAP43 ノックアウトマウスは、原因は定かではないものの、仮に出生できたとしても生存・成長することは困難/稀なケースである可能性が示唆された。



上記の3つの理由

- (1)CFAP43 ヘテロノックアウトマウス同士の交配による妊娠確率が低いこと
- (2)妊娠が成立しても、CFAP43 ノックアウトマウスが出生する確率が低いこと
- (3)出生しても、母マウスに食殺されること

これらの状況のため、相当回数の交配作業を繰り返したものの、解析における十分頭数の CFAP43 ノックアウトマウスを得ることは困難であった。

図5 CFAP43 ノックアウトマウスの子マウス(上) WT マウス(下) CFAP43 ノックアウトマウスの子マウスは生後間もなく食殺されることが続いた

前項の研究計画(2)について、少数の得られた CFAP43 ノックアウトマウスの脳室拡大の程度を光学顕微鏡で確認したところ、その表現系(重症度)の程度には、個体により大きな差があることが示唆された。ある個体では、脳室が非常に拡大している一方で、他の個体においてはあまり脳室拡大が確認できない個体も存在した。

また、組織(細胞)レベルにおいても表現系に差があり、構造異常がある繊毛が確認できる一方で、少なくとも光学/電子顕微鏡で確認できる範囲内で構造異常が確認できない繊毛も存在した(図6)。

CFAP43 遺伝子ノックアウトマウスにおいて

は、身体中のすべての細胞で CFAP43 遺伝子の機能は失活しているはずであり、その観点からは、CFAP43 遺伝子が発現するすべての組織・細胞で均一な表現系が出て然るべき、と考えられることから矛盾する結果であった。

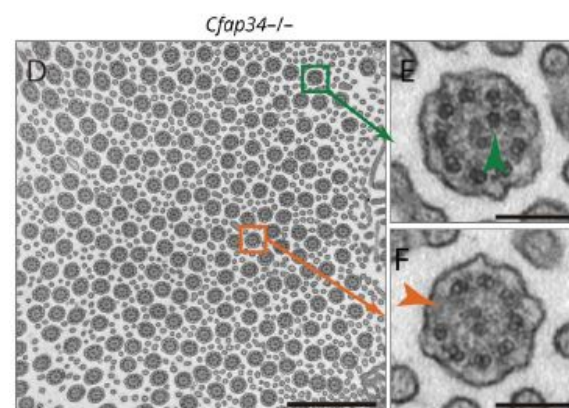
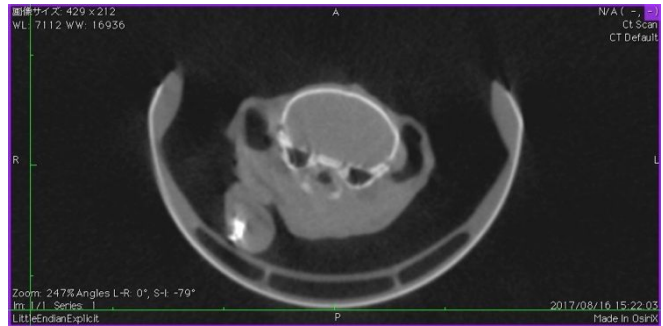


図6 CFAP43 ノックアウトマウスの繊毛微細構造
構造異常(緑・オレンジ矢印)が確認できる繊毛がある一方で、正常構造の繊毛も存在した

前項の研究計画(1)において、CFAP43 ノックアウトマウスの頭数は限られていたことから、脳室拡大の程度を計測するにあたり、その度にサクリファイス 組織切片を作成するという過程を行うことが現実的ではなく、貴重な個体をサクリファイスすることなく脳室拡大の程度を計測する必要性が生じた。

そのため、マイクロ CT を用いて脳室を計測するプロトコル作成を試みた(図7)。撮影条件を検討する中で、以下の2つの課題が生じた



CFAP43 ノックアウトマウスは生後間もなく死亡/食殺される事例が多いため、子マウスの脳室拡大を描出する必要性があるものの、子マウスの脳及び脳室は極めて小さく、正確な描出が困難であったこと

個体レベルでの表現系の差異のため、どの程度の脳室拡大を持って「水頭症がある」と判断するのかの基準が明確ではないこと

また、その基準を作成するにあたり、統計学的に有意差を十分に検討可能な CFAP43 ノックアウトマウスの頭数を準備できなかったこと

図7 マイクロ CT を用いたマウス(成体)の脳室描写

成体の WT マウスにおいてさえ、マイクロ CT を用いた脳室描写は困難であった。

上記2つの理由のため、マイクロ CT を用いて子マウスの脳室拡大を計測することは困難であった。

(得られた成果)

上記の解析を行う中で、CFAP43 ノックアウトマウスにおける以下の特徴が示唆された

- 個体・組織・細胞レベルにおいて、表現系が均一ではないこと
- CFAP43 遺伝子は、ハプロ不全においても何らかの表現系を来す可能性があること

今後の CFAP43 遺伝子の機能解析および表現系発現に繋がるメカニズムを解明するにあたっては、本研究において明かとなった上記2つの課題について取り組む必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 131-132
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 統合失調症の発症リスクを試験する方法、該方法に用いるキット、及び統合失調症のモデル哺乳動物	発明者 吉浦孝一郎, 森本芳郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-155875	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------