

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19506

研究課題名（和文）遠位型遺伝性運動ニューロパチー7型の病態解明と病態抑止療法の開発

研究課題名（英文）Reserch to dicover disease pathogenesis of distal hereditary motor neuropathy

研究代表者

井口 洋平（Iguchi, Yohei）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80790659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは遠位型運動ニューロパチーの家系の全エクソーム解析からSLC5A7C末端の新規欠失変異を同定した。培養細胞実験でSLC5A7 C末端の特定領域が細胞内輸送に必須であることを確認した。また、Slc5a7変異ノックイン（Slc5a7KI）マウスを解析し進行性の運動障害を来すことを確認した。Slc5a7KI/KIマウスの腰髄前根に軸索変性像を認め、Slc5a7KI/+マウスは下肢遠位筋の神経筋接合部に脱神経所見を認めた。Slc5a7KIマウスはdHMN- の病態モデルとなりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠位型遺伝性運動ニューロパチー（dHMN）は四肢遠位優位の低位運動ニューロン障害による筋萎縮を進行性に認める遺伝性疾患である。SLC5A7のC末端欠失ヘテロ接合変異がdHMN- の原因遺伝子として同定されている。SLC5A7は神経筋接合部のシナプス前終末でコリンの再取り込みを担う分子であり、SLC5A7の膜貫通ドメインのホモ接合点変異は常染色体劣性の先天性筋無力症候群を生じる。SLC5A7のC末端欠失変異が運動ニューロパチーを生じる機序は解明されていない。本研究の結果はdHMN- の病態解明につながる成果であり治療法開発への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：Distal hereditary motor neuropathy (dHMN) is an inherited disorder with progressive distal-dominant lower motor neuron deficits. We identified a novel truncation mutation at the C-terminus of SLC5A7 by genetic analysis of a family history of progressive muscle weakness in the distal muscles of the extremities. Cultured cell experiments confirmed that a specific region at the SLC5A7 C-terminus is essential for intracellular trafficking. We also analyzed Slc5a7 mutation knock-in (Slc5a7KI) mice. We confirmed that they develop progressive motor deficits: axonal degeneration was observed in the anterior root of the lumbar spinal cord in Slc5a7KI/KI mice. In contrast, Slc5a7KI/+ mice showed denervation at the neuromuscular junction of the distal leg muscle. Slc5a7KI mice may serve as a animal model for the pathogenesis of dHMN-VII.

研究分野：神経内科学

キーワード：遠位型遺伝性運動ニューロパチー SLC5A7 ノックインマウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遠位型遺伝性運動ニューロパチー (dHMN) は四肢遠位優位の下位運動ニューロン障害による筋萎縮を進行性に認め、明らかな上位運動ニューロン徴候や感覚障害を認めない遺伝性疾患で、dHMN-VIIは声帯麻痺を伴う常染色体顕性の遠位型運動ニューロパチーとして分類されている。近年、SLC5A7 の C 末端欠失ヘテロ接合変異が dHMN-VIIの原因遺伝子として同定された (Barwick et al., Am. J. Hum. Genet. 2012)。同変異を有する患者は声帯麻痺を欠く症例や、上位運動ニューロン徴候を伴い筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と診断され得る症例も報告されている。SLC5A7 は神経筋接合部のシナプス前終末でコリンの再取り込みを担う分子であり、SLC5A7 の膜貫通ドメインのホモ接合点変異は常染色体潜性の先天性筋無力症候群を生じる (Bauche et al., Am. J. Hum. Genet. 2016)。SLC5A7 の C 末端欠失変異が運動ニューロパチーを生じる機序は解明されていない。

研究代表者らは家族性 ALS 家系の全エクソーム解析を行い SLC5A7 の C 末端欠失ヘテロ接合変異 F502Lfs10 (SLC5A7fs) を新規に同定した。今までに本変異と同程度の C 末端欠失を来す 4 つの SLC5A7 変異が dHMN-VII家系から報告されている。SLC5A7 は運動ニューロンのシナプス前終末で働く choline transporter であり、SLC5A7 のホモ接合点変異が先天性筋無力症の原因となることから、dHMN-VIIの病態も軽度の神経筋接合部障害が想定されている (Salter et al., Neurol Genet, 2018)。しかし、dHMN-VIIの臨床病態は遠位筋の筋萎縮であり、通常筋無力症に見られる近位筋の筋力低下や筋疲労現象は認めない。電気生理学的にも筋無力症に特徴的な waning (反復刺激で筋電図の振幅が漸減する現象) は認めず、運動神経の軸索障害の所見が主体であるため、研究代表者は dHMN-VIIに対して神経筋接合部障害とは異なった病態を想定した。さらに、本家系では四肢腱反射の亢進 (上位運動ニューロン徴候) や split hand (短母指外転筋の萎縮が小指外転筋に比し強い現象) など ALS の臨床的特徴を有しており、SLC5A7 の C 末端欠失変異に起因する dHMN-VIIの病態が ALS と深く関連すると考え本研究計画を立案した。

### 2. 研究の目的

in vitro の解析からは SLC5A7fs は細胞内輸送に支障を来し運動ニューロン障害を生じることが想定される。遺伝子診断された dHMN-VIIは本症例を除き本邦では 1 家系しか報告されていないが、dHMN や ALS と診断されている症例に一定程度潜在している可能性がある。さらに、研究代表者らは病理学的解析により SLC5A7 が孤発性 ALS (sALS) の脊髄運動ニューロン内で病的に蓄積していることを確認している。sALS では核蛋白である TDP-43 の核内喪失と細胞質内封入体が病態の中心と考えられているが SLC5A7 との関連を示した報告はない。dHMN-VIIは sALS と共通病態を有していることが想定されるため、本研究で得られた知見は ALS の新規病態の解明と治療法開発に繋がる可能性がある。本研究では SLC5A7 の C 末端欠失変異が運動ニューロパチーを生じる病態を解明することを目的に研究を行った。

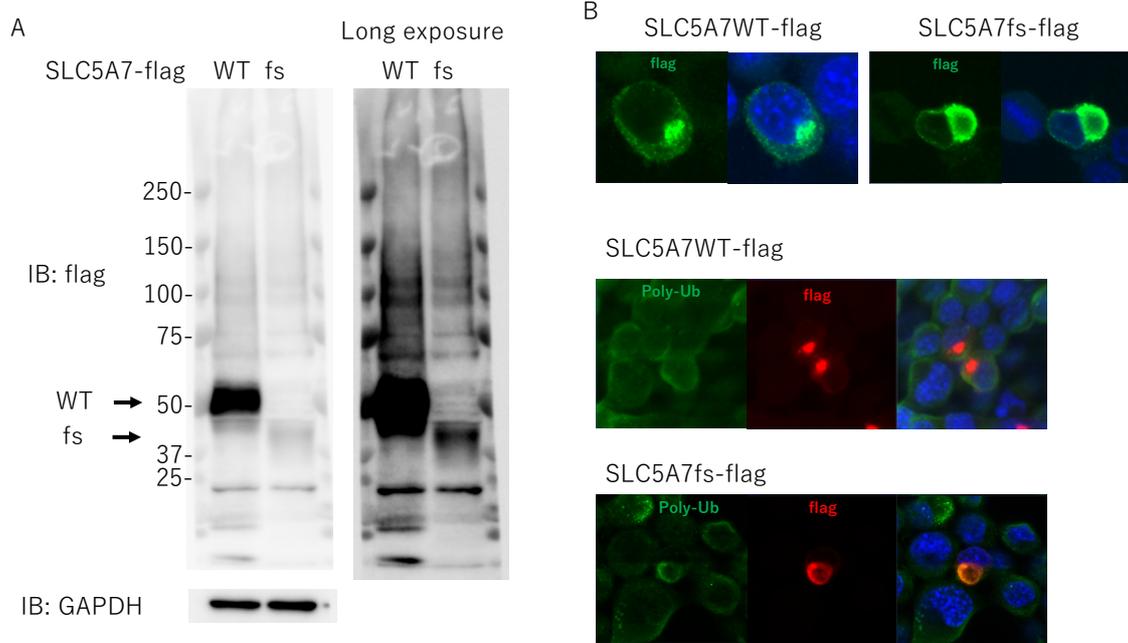
### 3. 研究の方法

Neuro2a 細胞に SLC5A7-flag の野生型と fs 変異、さらには複数の C 末端欠失変異を発現させ、免疫染色と Western blotting を行い細胞内局在や凝集性を検証した。さらに、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行い F502Lfs10 と同部位に変異を導入した Slc5a7 ノックイン (Slc5a7KI) マウスを作成し 12 週齢より 4 週毎に体重、握力測定と wire hanging test を施行し運動機能を解析した。また、マウス脊髄、腰髄前根を病理学的に評価した。

### 4. 研究成果

Neuro2a 細胞に SLC5A7-flag の野生型と fs 変異を発現させ Western blotting で解析すると fs 変異は野生型に比し発現量が少なく、短いタンパク質を発現することが判明した (図 1 A)。免疫蛍光染色で観察すると、野生型は核近傍に集積が確認されたが、fs 変異を発現させた細胞の多くは SLC5A7 が細胞質にリング状に蓄積した (図 1 B)。SLC5A7 の C 末端欠失により細胞内局在異常を来すことから C 末端の特定の配列が細胞内輸送に関与している可能性が示唆された。

図 1



また、ゲノム編集により *Slc5a7*<sup>KI</sup> マウスの作成に成功し 12 週齢より運動機能解析を行なった。*Slc5a7*<sup>KI/KI</sup> マウスは解析当初から体重が有意に少なく、年齢依存性に減少傾向がみられた (図 2 A)。*Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスには 40 週齢までの解析で体重減少は認めていない。握力測定では *Slc5a7*<sup>KI/KI</sup> マウス、*Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスともに野生型に比し有意な低下を認め、年齢依存性に減少傾向がみられた (図 2 B)。wire hanging test で評価すると、*Slc5a7*<sup>KI/KI</sup> マウスに握力以上に有意な機能低下が観察され、*Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスにおいても年齢依存性に低下し 28 週では野生型に対して有意差が認められた (図 2 C)。

lumbrical muscle の病理学的解析では *Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスの神経筋接合部に脱神経所見を認めた (図 3 A)。18 週齢の腰髄前根エボン包埋トルイジンブルー染色では *Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスには有意な所見を認めなかったが、*Slc5a7*<sup>KI/KI</sup> マウスでは軸索変性像、有髄繊維の脱落が散在して認められた (図 3 B 矢印、赤丸)。

*Slc5a7*<sup>KI/+</sup> マウスは dHMN-VII の遺伝的な背景を持った動物モデルであり、進行性の筋力低下と末梢の筋における脱神経所見を認めたことから dHMN-VII の病態モデルとなりうることを示唆された。

図 2

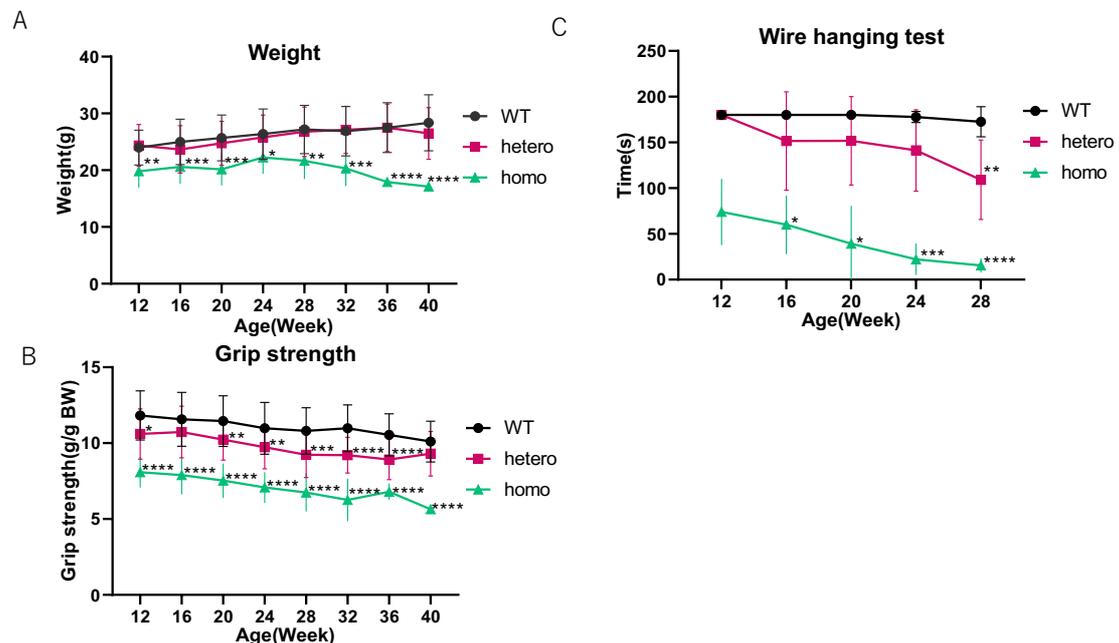
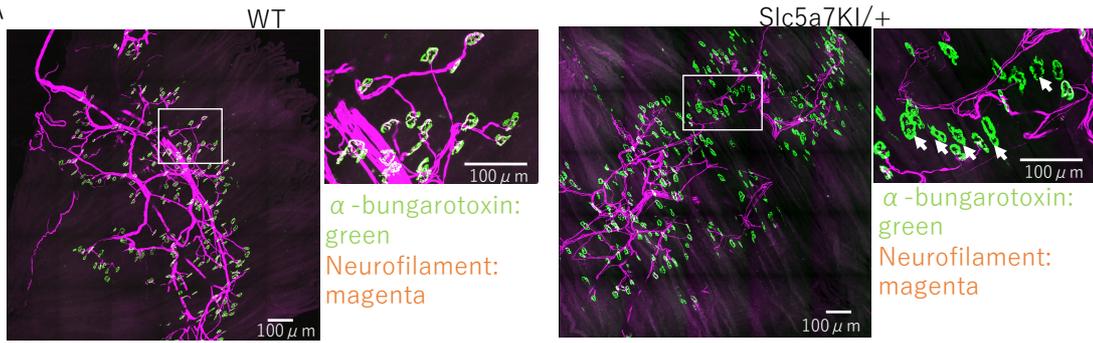
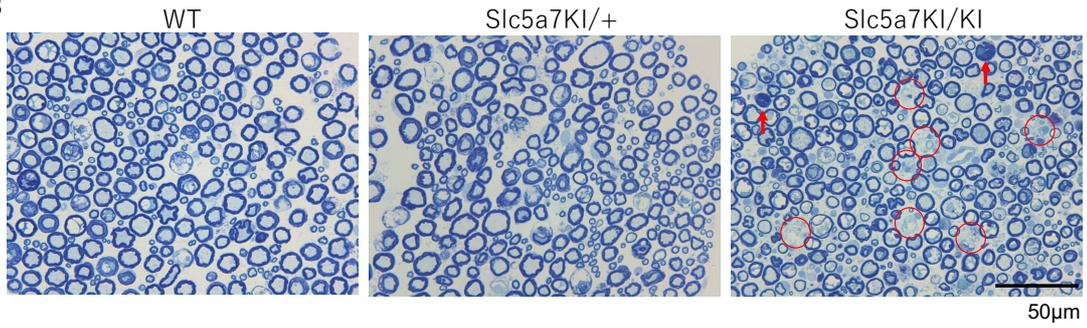


图 3

A



B



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tsujikawa Koyo, Hamanaka Kohei, Riku Yuichi, Iguchi Yohei, Ishigaki Shinsuke, Hashizume Atsushi, Kobayashi Kenta, Sahara Naruhiko, Iwatsubo Takeshi, Ikeuchi Takeshi, Miyata Takaki, Sobue Gen, Matsumoto Naomichi, Sahashi Kentaro, Katsuno Masahisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Actin-binding protein filamin-A drives tau aggregation and contributes to progressive supranuclear palsy pathology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabm5029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abm5029	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 Kiryu Seo Sumiko, Matsushita Reika, Tashiro Yoshitaka, Yoshimura Takeshi, Iguchi Yohei, Katsuno Masahisa, Takahashi Ryosuke, Kiyama Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Impaired disassembly of the axon initial segment restricts mitochondrial entry into damaged axons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e110486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2021110486	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 Koike Haruki, Iguchi Yohei, Sahashi Kentaro, Katsuno Masahisa	4. 巻 90
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps: from antimicrobial innate immunity to the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 104526 ~ 104526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2023.104526	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 Oiwa Kotaro, Watanabe Seiji, Onodera Kazunari, Iguchi Yohei, Kinoshita Yukako, Komine Okiru, Sobue Akira, Okada Yohei, Katsuno Masahisa, Yamanaka Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadf6895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adf6895	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 Watanabe Seiji, Murata Yuri, Oka Yasuyoshi, Oiwa Kotaro, Horiuchi Mai, Iguchi Yohei, Komine Okiru, Sobue Akira, Katsuno Masahisa, Ogi Tomoo, Yamanaka Koji	4. 巻 120
2. 論文標題 Mitochondria-associated membrane collapse impairs TBK1-mediated proteostatic stress response in ALS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2315347120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2315347120	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 Fukami Yuki, Iijima Masahiro, Koike Haruki, Yagi Satoru, Furukawa Soma, Mouri Naohiro, Ouchida Jun, Murakami Ayuka, Iida Madoka, Yokoi Satoshi, Hashizume Atsushi, Iguchi Yohei, Imagama Shiro, Katsuno Masahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Autoantibodies Against Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase in Immune-Mediated Neuropathies	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e200199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.000000000200199	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 Iguchi Yohei, Takahashi Yuhei, Li Jiayi, Araki Kunihiko, Amakusa Yoshinobu, Kawakami Yu, Kobayashi Kenta, Yokoi Satoshi, Katsuno Masahisa	4. 巻 223
2. 論文標題 I B kinase phosphorylates cytoplasmic TDP-43 and promotes its proteasome degradation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202302048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202302048	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大岩 康太郎, 渡邊 征爾, 小野寺 一成, 井口 洋平, 岡田 洋平, 勝野 雅央, 山中 宏二
2. 発表標題 Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in ALS
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 大輔, 橋詰 淳, 山田 晋一郎, 井口 洋平, 岸本 祥之, 鳥居 良太, 飯田 円, 勝野 雅央
2. 発表標題 Dysregulated endocannabinoid metabolism is a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天草 善信, 井口 洋平, 横井 聡, 川上 裕, 勝野 雅央
2. 発表標題 Analysis of visual abnormalities in synucleinopathy
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohei Iguchi
2. 発表標題 Research to understand and overcome ALS
3. 学会等名 The 1st Fujita International Symposium on Brain Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yohei Iguchi
2. 発表標題 Unveiling a novel role of phosphorylation of TDP-43
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 大輔, 橋詰 淳, 井口 洋平, 山田 晋一郎, 岸本 祥之, 小森 祥太, 飯田 円, 勝野 雅央
2. 発表標題 Dysregulated endocannabinoid system is a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤田 雅裕, 平山 剛久, 柳橋 優, 福島 功士, 和泉 唯信, 直井 為任, 森田 光哉, 割田 仁, 青木 正志, 井口 洋平, 勝野 雅央, 小川 暢弘, 漆谷 真, 石原 智彦, 小野寺 理, 村上 義孝, 狩野 修
2. 発表標題 The reliability study for Japanese version of Columbia Muscle Cramp Scale in ALS
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳橋 優, 平山 剛久, 渋谷 茉莉, 長澤 潤平, 藤田 浩司, 和泉 唯信, 森田 光哉, 木田 耕太, 高橋 一司, 金井 数明, 熱田 直樹, 井口 洋平, 勝野 雅央, 村上 義孝, 狩野 修
2. 発表標題 The reliability of Japanese version Primary Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (PLSFRS)
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大岩 康太郎, 渡邊 征爾, 小野寺 一成, 井口 洋平, 岡田 洋平, 勝野 雅央, 山中 宏二
2. 発表標題 A novel reporter, TDP-DiLuc, detects TDP-43 monomerization preceding TDP-43 pathology
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Unveiling a novel role of phosphorylation of TDP-43
3. 学会等名 PACTALS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	勝野 雅央  (Katsuno Masahisa)  (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	
研究分担者	佐橋 健太郎  (Sahashi Kentaro)  (90710103)	名古屋大学・医学系研究科・准教授   (13901)	
研究分担者	横井 聡  (Yokoi Satoshi)  (30815460)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教   (13901)	

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