

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：83902
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2011～2013
 課題番号：23592636
 研究課題名(和文) 巨大結腸症、魚鱗癬様皮膚症状を伴う精神遅滞の病因遺伝子の同定
 研究課題名(英文) ***MBTPS2* mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome**
 研究代表者
 山田 憲一郎 (YAMADA, KENICHIRO)
 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・主任研究員
 研究者番号：30291173
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究により、巨大結腸症に魚鱗癬様皮膚症状、頭部脱毛、精神運動発達遅滞と脳・頭部・脊椎・腎の形成異常を伴う BRESEK/BRESHECK 症候群は、*MBTPS2* 遺伝子のミスセンス変異 (c.1286G>A, [p.Arg429His]) により発症することが明らかとなった。さらに、マウス海馬初代培養神経細胞を用いて *Mbtps2* 発現抑制実験を行い、1) *Mbtps2* 発現抑制細胞ではアポトーシスを起こしている細胞の割合がコントロール細胞の約 2.5 倍に増加していること、2) *Mbtps2* 発現抑制細胞の細胞死は活性型 ATF6 を導入することで回復できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified the p.Arg429His mutation in *MBTPS2* encoding membrane-bound transcription factor peptidase, site 2 (S2P) causes BRESEK/BRESHECK syndrome, which is characterized by brain anomaly, intellectual disability, growth retardation, ectodermal dysplasia, vertebral (skeletal) anomaly, Hirschsprung disease, low set and large ears, cryptorchidism, and small-sized kidneys. *Mbtps2* knockdown increased the ratio of abnormal cells stained with an anti-activated-caspase-3 antibody. *Mbtps2* protein transduces ER stress signals by cleaving and activating the transcriptional factor ATF6. Transfection of activated ATF6 into *Mbtps2*-knockdown neurons decreased the number of apoptotic cells demonstrating caspase-3 activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：MBTPS2、BRESHECK/IFAP 症候群、小胞体ストレス、巨大結腸症、魚鱗癬

1. 研究開始当初の背景

巨大結腸症は、腸管壁内の神経節細胞の欠損により発症する小児外科の代表的な疾患である。本症の病因遺伝子として、レットプロトオンコジーン (*RET*)、エンドセリン 3 とそのレセプター (*END3*, *EDNRB*) が同定されている。一方、巨大結腸症の中には精神遅滞を伴う疾患があり、2001 年に申請者らがその病因遺伝子である *ZFHX1B* (別名 *ZEB2*) を同定した。この疾患は現在、Mowat-Wilson 症候群と呼ばれている。さら

に、Reish らは、巨大結腸症に魚鱗癬様皮膚症状と頭部脱毛、精神運動発達遅滞、頭部・脳・脊椎・腎の形成異常が合併した 2 症例を報告した。著者らは本疾患を患者に見られる臨床所見の頭文字を取って BRESEK/BRESHECK (Brain anomalies, Retardation of Mentality and Growth, Ectodermal dysplasia, Skeletal malformations, Hirschsprung disease, Ear deformity and deafness, Eye hypoplasia, Cleft palate, Cryptorchism, and Kidney

dysplasia/hypoplasia) 症候群と命名した。本症候群は極めてまれな疾患で上記 2 例の他にもう 1 例報告されているだけである。本研究の申請時において、愛知県心身障害者コロニーの中央病院では、巨大結腸症に魚鱗癬様皮膚、頭部の脱毛、脳梁形成異常と脊椎・腎の形成異常が見られる本症候群を経験した。そこで、本研究では当施設の本症候群の病因を明らし、病態解明を行う。以上の 4 症例が全て男児であることと最初の報告の 2 症例が異父兄弟であることより、X 染色体劣性疾患が強く疑われた。

2. 研究の目的

我々は巨大結腸症に魚鱗癬様皮膚症状、頭部脱毛、精神運動発達遅滞と脳・頭部・脊椎・腎の形成異常を伴う症例を経験した。本疾患は BRESEK/BRESHECK 症候群と呼ばれる稀な疾患である。本研究では、本症候群の病因遺伝子を同定し、脳、腸管神経節細胞を含む様々な器官の形成に関する遺伝子の機能と異常病態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 病因遺伝子の同定

IFAP 症候群は、魚鱗癬様皮膚症状、無毛症、羞明 を三主徴とする X 染色体劣性遺伝の疾患であるが、まれに魚鱗癬様皮膚症、無毛症などに加えて、巨大結腸症(11 症例中 2 例)の合併が見られる。本研究の申請直後に、病因遺伝子として *MBTPS2* が同定された。そこで、本症例のゲノム遺伝子を抽出後、*MBTPS2* の 11 個のエクソンと隣接するイントロン部分を PCR により増幅し、直接シーケンシング法を用いて塩基配列を決定した。

(2) マウス海馬初代培養神経細胞における *Mbtps2* 発現抑制実験

本症の患者で同定された R429H 変異体は、Sterol 合成酵素群の発現誘導活性が最も低い変異であるので、以下の解析には *Mbtps2* 特異的な siRNA を用いた。

胎生 17.5 日のマウス胎仔より初代海馬神経細胞 (以下、培養神経細胞) を取り出して培養し、24 時間後に *Mbtps2* 特異的な siRNA とマーカーとなる GFP を共発現するベクターを導入した。培養 3 日後に細胞をパラホルムアルデヒドを用いて固定し、GFP 及び MAP2 または、活性型 Caspase-3 に対する抗体を用いて細胞を免疫染色した。

(3) *Mbtps2* 発現抑制による細胞死のレスキュー実験

Mbtps2 をノックダウンした培養神経細胞に神経細胞の核に移行する活性化型 ATF6 (FLAG タグ付加) を発現するベクターを導入し、(2) と同様に GFP 及び FLAG に対する抗

体を用いて細胞を免疫染色した。

4. 研究成果

(1) 病因遺伝子の同定

本症例の *MBTPS2* の 11 個のエクソンと隣接するイントロン部分を直接シーケンシング法を用いて塩基配列を決定したところ、患者においてミスセンス変異 (c.1286G>A, [p.Arg429His]) を同定した (図 1)。母親は、ヘテロ接合体であった。

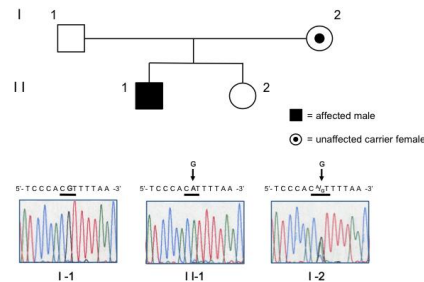


図 1 病因遺伝子 *MBTPS2* の同定

以上より *MBTPS2* の変異により BRESEK/BRESHECK 症候群が引き起こされることが明らかとなった。類似疾患であり別々の症候群と認識されていた BRESEK/BRESHECK 症候群と IFAP 症候群は、同じ病因遺伝子の異なる変異部位による表現型 (症状) の違いであることを、我々は初めて報告した (文献 6)、その後、OMIM で二つの症候群は 1 つの疾患としてまとめられた (IFAP SYNDROME WITH OR WITHOUT BRESHECK 症候群)。

(2) マウス海馬初代培養神経細胞における *Mbtps2* 発現抑制実験

マウス海馬初代神経培養細胞の *Mbtps2* を siRNA を用いて発現抑制すると、神経突起中の GFP が dot 状に染色される異常細胞 (GFP-dot 細胞) がコントロールに比較して、約 2.5 倍増加した (図 2)。大部分の GFP-dot 細胞は、活性型 Caspase-3 陽性であり、アポトーシスを起こしていた (図 3)。

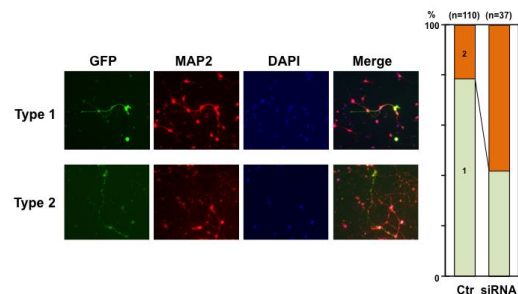


図 2 マウス海馬初代神経培養細胞における *S2P* 発現抑制の効果

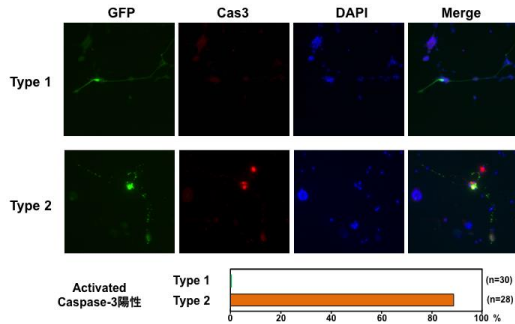


図3 マウス海馬初代神経培養細胞における S2P 発現抑制の効果 (アポトーシス)

(3) Mbtps2 発現抑制による細胞死のレスキュー実験

MBTPS2 は、ATF6 を介する小胞体ストレスシグナル経路を仲介する。Mbtps2 の発現を抑制したマウス培養神経細胞では、ATF6 は Mbtps2 の切断により活性化されないため核に移行できず、シャペロン (GRP78) が誘導されず、細胞はアポトーシスを起こしたと考えられる。そこで、Mbtps2 を発現抑制した培養神経細胞に、活性化型 ATF6 (神経細胞の核に移行しシグナルを伝達できる) を導入した。その結果、GFP-dot 細胞が減少し、ATF6 を介する経路の異常が神経細胞死に関与していることが明らかとなった (図4)。

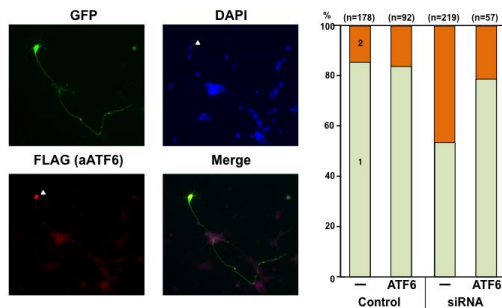


図4 活性化型 ATF6 による細胞死の抑制

以上より、本症例に見られる重度知的障害や巨大結腸症などの神経系の合併症状は、ATF6 を介する小胞体ストレスシグナル経路の障害が関与していると考えられ、小胞体ストレスの軽減や、別の小胞体ストレスシグナル経路を増強することで本症を治療できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yamada Y, Nomura N, Yamada K, Matsuo M, Suzuki Y, Sameshima K, Kimura R, Yamamoto Y, Fukushi D, Fukuhara Y, Ishihara N, Nish E, Imataka G, Suzumura H, Hamano S, Shimizu K, Iwakoshi M, Ohama K, Ohta A, Wakamoto H, Kajita M, Miura K, Yokochi K, Kosaki K, Kuroda T, Kosaki R, Hiraki Y, Saito K, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Wakamatsu N.

The spectrum of *ZEB2* mutations causing the Mowat-Wilson syndrome in Japanese populations.

Am J Med Genet A, in press, (2014) 査読有

2. Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N.

Mutations in *HADHB*, which encodes the β -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy.

Am J Med Genet A. 164(5), 1180-1187 (2014) 査読有

3. Fukushi D, Yamada K, Nomura N, Naiki M, Kimura R, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi K, Miyake Y, Wakamatsu N.

Clinical characterization and identification of duplication breakpoints in a Japanese family with Xq28 duplication syndrome including *MECP2*.

Am J Med Genet A. 164A(4), 924-933 (2014) 査読有

4. Yamada K, Takado Y, Kato YS, Yamada Y, Ishiguro H, Wakamatsu N.

Characterization of the mutant β -subunit of β -hexosaminidase for dimer formation responsible for the adult form of Sandhoff disease with the motor neuron disease phenotype.

J Biochem. 153(1), 111-119 (2013) 査読有

5. Yamada K, Nomura N, Yamano A, Yamada Y, Wakamatsu N.

Identification and characterization of splicing variants of *PLEKHA5* (*Plekha5*) during brain development.

Gene. 15, 492(1):270-275 (2012) 査読有

6. Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N.

MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK

syndrome.

Am J Med Genet A. 158, 97-102 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1. Yamada K, Fukuhara Y, Mizuno S, Nakanishi K, Nomura N, Yamada Y, Wakamatsu N

The pathogenic mechanism of severe intellectual disability caused by *MBTPS2* deficiency (BRESHECK/IFAP syndrome).

The Asian Congress for Inherited Metabolic Disease (ACIMD) and The Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD). 2013年11月 浦安

2. 山田憲一郎, 福原弥生, 中西圭子, 水野誠司, 山田裕一, 若松延昭

海馬初代培養神経細胞を用いた *MBTPS2* 変異により発症する重度知的障害の病態解明.

日本生化学会大会 2013年9月 横浜

3. 山田憲一郎, 水野誠司, 中西圭子, 野村紀子, 山田裕一, 若松延昭

重度型 *MBTPS2* 異常症 (BRESEK/BRESHECK 症候群) の病態解明. 東海臨床遺伝・代謝懇話会, 2013年6月 名古屋

4. 山田憲一郎, 福原弥生, 水野誠司, 内木美沙子, 木村礼子, 山田裕一, 中西圭子, 若松延昭

BRESEK/BRESHECK 症候群の原因遺伝子 (*MBTPS2*) の脳発達における機能解析.

日本生化学会大会, 2012年12月 福岡

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田憲一郎 (YAMADA KENICHIRO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・主任研究員

研究者番号: 30291173

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: