

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21583

研究課題名(和文) エンドソームリサイクル病の提案：エンドソームリサイクルの破綻による疾患発症機構

研究課題名(英文) Endosomal recycling disorders: a novel disease entity caused by endosomal recycling defects

研究代表者

齋藤 伸治 (Saitoh, Shinji)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：00281824

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)：VPS35L関連Ritscher-Schinzel症候群(RSS)について、既に報告した家系に加えて、日本人患者1例、フランス人患者1例、オランダ人患者1例を集積することができ、世界中の患者の集積ができた。MAGEL2の変異はSchaaf-Yang症候群(SYS)については日本人症例25例について詳細な臨床情報を得た。これらの疾患のデータベースを構築した。retriever複合体のコアサブユニットVps35lの組織特異的ノックアウトマウス(中枢神経および間葉系幹細胞)を作成し、VPS35L関連RSSの症状を再現した。そのメカニズムとして膜蛋白の異常を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜蛋白のリサイクルに必須な分子機構であるエンドソームリサイクルを担うretromerおよびretriever複合体の機能障害により先天性疾患が発症することを明らかにし、エンドソームリサイクル病の疾患概念を提唱した。新しい生物学的機構の障害による疾患の存在を明らかにしたことで、エンドソームリサイクルに注目した病態解明および治療法開発のパラダイムが広がることが期待される。さらに、モデル動物を作成したことで、疾患研究の基盤を作ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have identified three new cases of VPS35L-related Ritscher-Schinzel syndrome (RSS), one Japanese, one French, and one Dutch case, and delineated clinical features. This is the largest collection of patients with VPS35L-related RSS, and now we have established the new clinical entity of VPS35L-related RSS. Regarding Schaaf-Yang syndrome (SYS), we have collected detailed clinical information from 25 Japanese patients with genetically confirmed SYS. We also successfully established tissue specific conditional knock-out mice (central nervous system and mesenchymal stem cell), and recapitulate clinical features of VPS35L-related RSS. Using the mouse models, we successfully identified altered expression of membrane integral proteins.

研究分野：小児科学、遺伝学

キーワード：エンドソームリサイクル 膜蛋白

1. 研究開始当初の背景

膜タンパクは定期的に置き換わることで品質管理を受けている。早期エンドソームにて取り込まれた膜タンパクはリソゾームにて分解される。しかし、一部の膜タンパクはリソゾームに行かずに再利用されることで効率的な運用がなされている。このリサイクルを担うシステムとして retromer 複合体が知られている。retromer 複合体は WASH 複合体や MUST 複合体と相互作用して機能し、その機能障害はパーキンソン病などの神経

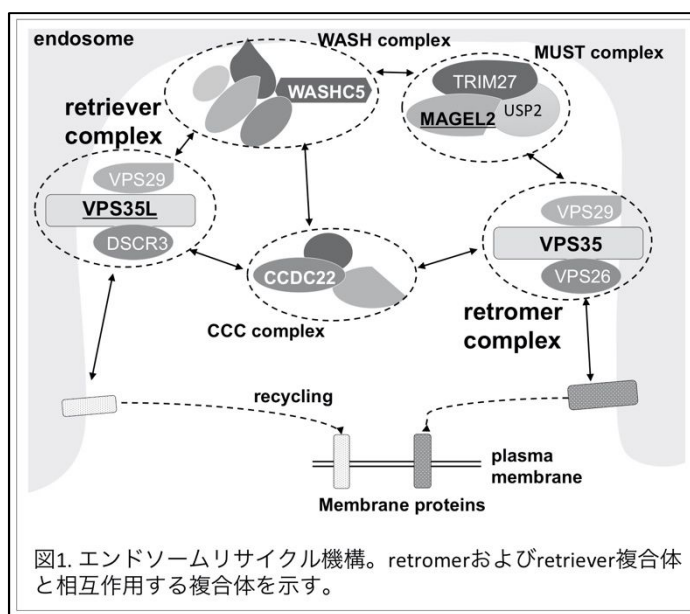


図1. エンドソームリサイクル機構。retromerおよびretreiver複合体と相互作用する複合体を示す。

変性疾患との関連が知られている (図1)。近年、もう一つのリサイクルシステムとして

retreiver 複合体が同定された。retreiver 複合体は WASH 複合体や CCC 複合体と相互作用を行い、膜タンパクのリサイクリングを担っている (図1)。エンドソームリサイクルの破綻が先天性疾患の原因になるかどうかは十分に明らかにされていない。私たちは新たに retreiver 複合体を構成するサブユニットである VPS35L の両アレル性変異が Ritscher-Schinzel 症候群 (RSS) 類似疾患の原因となることを世界に先駆けて報告した(Kato et al. J Med Genet 2020)。一方、retromer 複合体と相互作用する MUST 複合体のサブユニットである MAGEL2 の変異は Schaaf-Yang 症候群 (SYS) の原因となる。SYS は RSS と共通する症状を有し、特に重度知的障害は共通している。従って、retreiver 複合体と retromer 複合体は中枢神経においてはどちらも必須の役割があり、それらの機能障害は先天性疾患の原因となる可能性がある。

2. 研究の目的

VPS35L の他に、WASH 複合体及び CCC 複合体の構成サブユニット (WASH5、CCDC22) の変異が RSS の原因となることが明らかにされている。したがって、retreiver 複合体の機能障害は RSS としての表現型を示す。しかし、その発症メカニズムは解明されていない。本研究では retreiver 複合体の主たるサブユニットである VPS35L に着目し、組織特異的のノックアウト (cKO) マウスを用いて、発症メカニズムを明らかにする。さらに、retromer 複合体の機能障害により発症する先天性疾患についても検討することで、新しい疾患概念であるエンドソームリサイクル病を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 患者集積による臨床症状の比較検討

VPS35L 変異による RSS 患者および MAGEL2 変異による SYS を集積し、データベースを構築する。VPS35L については希少疾患のため、genematcher を用いて国外の患者の集積を行う。

2) cKO マウスを用いた発症メカニズムの解析

私たちはこれまでに下記の Vps35l cKO マウスを作成した。これらの表現型を解析し、表現型を引き起こす膜蛋白について解析を行う。

作成した cKO マウス

1. Nestin-Cre/Vps35^{fl/fl} cKO マウス (Nestin-Vps351-cKO): 中枢神経系特異的に Vps351 を欠損する。
2. Prx1-Cre/Vps35^{fl/fl} cKO マウス (Prx1-Vps351-cKO): 間葉系幹細胞特異的に Vps351 を欠損する。

4. 研究成果

1) VPS35L 関連 RSS 患者および SYS 患者の集積とデータベース作成

既に報告した家系 (Family-1) に加えて、日本人患者 1 例、フランス人患者 1 例、オランダ人患者 1 例を集積することができた (図 2)。世界中の VPS35L 関連 RSS 患者を全て集約し、表現型を比較検討した。その結果、全例で特徴的な顔貌、知的障害、低身長は共通していたが、VPS35L 以外が原因の RSS に見られる小脳低形成や先天性心疾患は全例では見られなかった。また新しい症状として蛋白尿と高脂血症の存在が明らかになった。

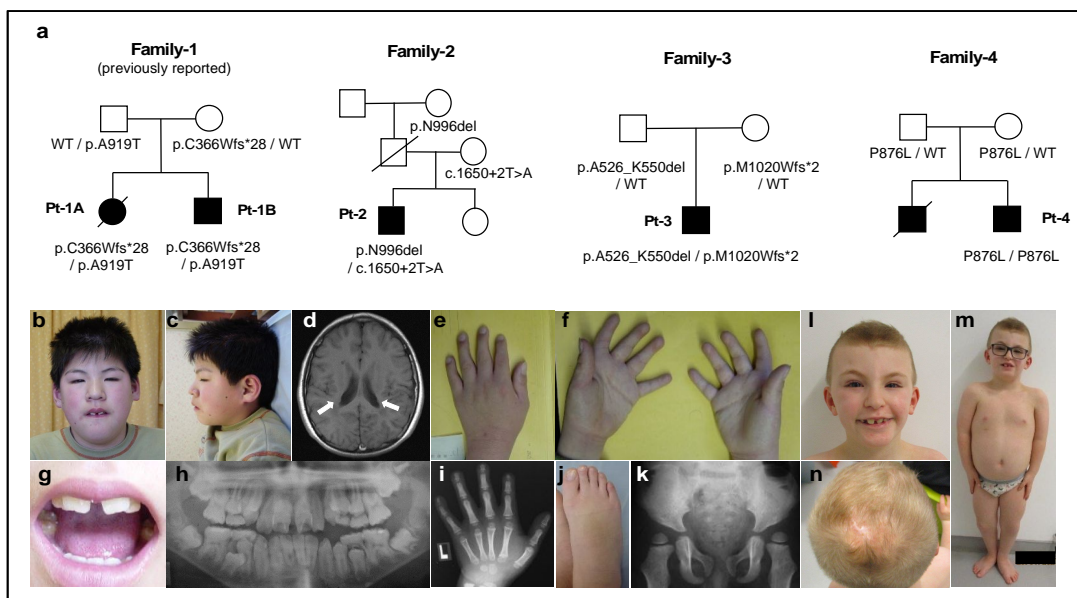


図 2.VPS35L 関連 RSS の臨床症状。b-k:Pt-2 の所見、l-n:Pt3 の所見

MAGEL2 変異による日本人 SYS 患者 29 例を集積し、25 例について詳細な臨床症状を検討することができた。日本人 SYS 患者集積は厚生労働科学研究費による全国疫学調査により実施された。

集積した患者情報を基にデータベースを作成した。VPS35L 関連 RSS については世界中の患者情報を集積することができた (Otsuji et al. J Med Genet submitted)。また、SYS は国内の患者情報の集積ができた。これらのデータベースが構築されたことで、エンドソームリサイクル病の臨床情報を解析する基盤を構築することができた。

2) cKO の表現型および発症メカニズムの解析

1. Nestin-Vps351-cKO を用いた解析

Nestin-Vps35I-cKO マウスは対照マウスと比較して、著明な成長障害を認めた(図3)。また、Nestin-Vps35I-cKO マウスの約半数が生後3-4週前後に死亡した。さらに、Nestin-Vps35I-cKO マウスは過敏性が強く、けいれん発作も認められた。

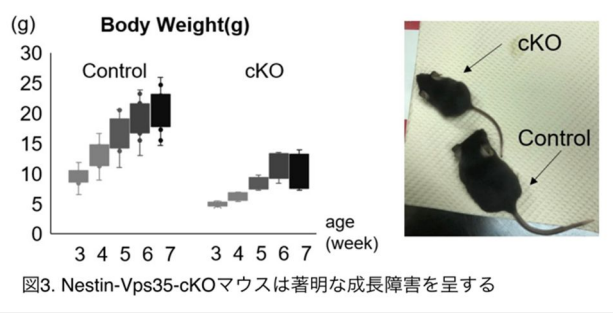


図3. Nestin-Vps35I-cKOマウスは著明な成長障害を呈する

次に、Nestin-Vps35I-cKO マウスの脳皮質から蛋白を抽出し、ウエスタンブロットで解析を行った。その結果、Vps35Iの欠損に加えて、膜蛋白であるLRP1やITGA5の発現量の低下を認めた(図4)。したがって、Vps35Iは脳皮質での膜蛋白の組成に大きな影響があり、何らかの重要な膜蛋白の減量により脳機能障害が生じると考えられる。

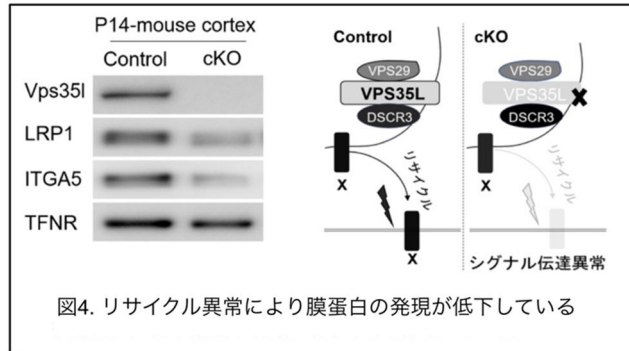


図4. リサイクル異常により膜蛋白の発現が低下している

2. Prx1-Vps35I-cKO マウスを用いた解析

Prx1-Vps35I-cKO マウスは対照マウスと比較して、体格が小さかった。しかし、Nestin-Vps35I-cKO マウスと比べると成長への影響は小さかった(図5)。

患者では低身長に加えて骨形成の異常を認めたため、当初は骨形成に注目したが、Prx1-Vps35I-cKO マウスでの骨の変化は軽微であった。しかし、Prx1-Vps35I-cKO マウスは著明な筋力低下を示し、筋肉量の減少を認めた(図5)。Prx1 陽性間葉系幹細胞は骨以外にも種々の細胞系列に分化するが、筋肉へは分化しないことが知られている。したがって、Prx1-Vps35I-cKO マウスに認められた筋肉の所見は筋肉自体ではなく、筋肉の形成に関連する間葉系の細胞の機能障害である可能性がある。そこで、Prx1 陽性間葉系幹細胞から分化することが知られている、ペリサイトや線維脂肪幹細胞に着目して、解析を予定している。

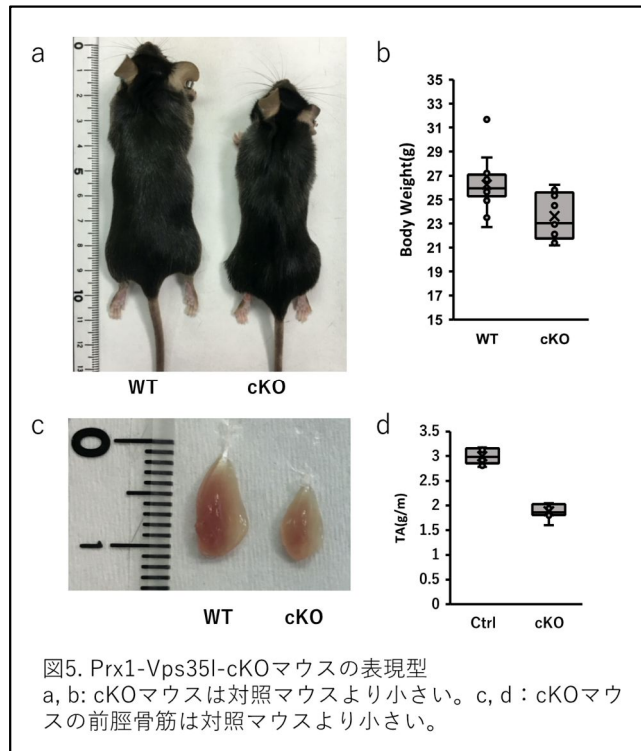


図5. Prx1-Vps35I-cKOマウスの表現型
a, b: cKOマウスは対照マウスより小さい。c, d: cKOマウスの前脛骨筋は対照マウスより小さい。

これらの解析により Vps35L が幅広い臓器の発生において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14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 Kato Kohji, Oka Yasuyoshi, Muramatsu Hideki, Vasilev Filipp F, Otomo Takanobu, Oishi Hisashi, Kawano Yoshihiko, Kidokoro Hiroyuki, Nakazawa Yuka, Ogi Tomoo, Takahashi Yoshiyuki, Saitoh Shinji	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 Journal of Medical Genetics	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 -

1. 著者名 Kato Kohji, Miya Fuyuki, Oka Yasuyoshi, Mizuno Seiji, Saitoh Shinji	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 Journal of Human Genetics	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 -

1. 著者名 Okamoto Nobuhiko, Miya Fuyuki, Kitai Yukihiro, Tsunoda Tatsuhiko, Kato Mitsuhiro, Saitoh Shinji, Kanemura Yonehiro, Kosaki Kenjiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Homozygous ADCY5 mutation causes early-onset movement disorder with severe intellectual disability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10072-021-05152-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 Yamamoto Hidenori, Hayano Satoshi, Okuno Yusuke, Onoda Atsuto, Kato Kohji, Nagai Noriko, Fukasawa Yoshie, Saitoh Shinji, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	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 International Journal of Cardiology	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 -

1. 著者名 Ieda Daisuke, Negishi Yutaka, Miyamoto Tomomi, Johmura Yoshikazu, Kumamoto Natsuko, Kato Kohji, Miyoshi Ichiro, Nakanishi Makoto, Ugawa Shinya, Oishi Hisashi, Saitoh Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Two mouse models carrying truncating mutations in Magel2 show distinct phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237814	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 Isobe Kouji, Ieda Daisuke, Miya Fuyuki, Miyachi Rieko, Otsuji Shiomi, Asai Masami, Tsunoda Tatsuhiko, Kosaki Kenjiro, Hattori Ayako, Saitoh Shinji, Mizuno Mihoko	4. 巻 44
2. 論文標題 Hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome in a patient with a de novo heterozygous variant in KIF1A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 249 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2021.11.007	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 Okamoto Nobuhiko, Miya Fuyuki, Tsunoda Tatsuhiko, Kanemura Yonehiro, Saitoh Shinji, Kato Mitsuhiro, Yanagi Kumiko, Kaname Tadashi, Kosaki Kenjiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Four pedigrees with aminoacyl-tRNA synthetase abnormalities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 2765 ~ 2774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10072-021-05626-z	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 Hayakawa Kozue, Kawase Koya, Fujimoto Masanori, Nakamura Yuji, Saitoh Shinji	4. 巻 63
2. 論文標題 Utility of breakpoint specific nested polymerase chain reaction for the diagnosis of Emanuel syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1534 ~ 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14644	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 Aiba Kaori, Nakamura Yuji, Sugimoto Mari, Yatsuka Yukiko, Okazaki Yasushi, Murayama Kei, Ohtake Akira, Yokochi Kenji, Saitoh Shinji	4. 巻 64
2. 論文標題 A case of ATR-X syndrome with mitochondrial respiratory chain dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 104251 ~ 104251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmg.2021.104251	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 Negishi Yutaka, Aoki Yusuke, Itomi Kazuya, Yasuda Kazushi, Taniguchi Hiroaki, Ishida Atsushi, Arakawa Takeshi, Miyamoto Sachiko, Nakashima Mitsuko, Saitsu Hiroto, Saitoh Shinji	4. 巻 43
2. 論文標題 SCN8A-related developmental and epileptic encephalopathy with ictal asystole requiring cardiac pacemaker implantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 804 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2021.03.004	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 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 dev188755
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 Okamoto Nobuhiko, Miya Fuyuki, Kitai Yukihiro, Tsunoda Tatsuhiko, Kato Mitsuhiro, Saitoh Shinji, Kanemura Yonehiro, Kosaki Kenjiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Homozygous ADCY5 mutation causes early-onset movement disorder with severe intellectual disability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 2975-2978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10072-021-05152-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 Ohashi Kei, Fukuhara Satomi, Miyachi Taishi, Asai Tomoko, Imaeda Masayuki, Goto Masahide, Kurokawa Yoshie, Anzai Tatsuya, Tsurusaki Yoshinori, Miyake Noriko, Matsumoto Naomichi, Yamagata Takanori, Saitoh Shinji	4. 巻 51
2. 論文標題 Comprehensive Genetic Analysis of Non-syndromic Autism Spectrum Disorder in Clinical Settings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autism and Developmental Disorders	6. 最初と最後の頁 4655 ~ 4662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10803-021-04910-3	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 Hori Ikumi, Ieda Daisuke, Ito Shogo, Ebe Seimi, Nakamura Yuji, Ohashi Kei, Aoyama Kohei, Hattori Ayako, Kokubo Minoru, Saitoh Shinji	4. 巻 43
2. 論文標題 Peripheral nerves are involved in hypomyelinating leukodystrophy-3 caused by a homozygous AIMP1 variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 590 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2020.12.008	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuji Nakamura, Kana Hosoki, Daisuke Ieda, Ikumi Hori, Yutaka Negishi, Ayako Hattori, Shinji Saitoh
2. 発表標題 Mild Phenotypic features associated with non-truncating UBE3A mutations in Angelman syndrome.
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀いくみ, 宮冬樹, 中島光子, 中村勇治, 家田大輔, 大橋圭, 根岸豊, 服部文子, 安藤直樹, 角田達彦, 才津浩智, 金村米博, 小崎健次郎, 齋藤伸治
2. 発表標題 当院でエキソーム解析を実施した小児神経疾患症例の臨床的検討
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020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回人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakamura Y, Shimada I, Fujimoto M, Sato E, Ieda D, Hattori A, Miya F, Tsunoda T, Okubo Y, Haginoya K, Koshimizu E, Miyatake S, Matsumoto N, Arioka Y, Ozaki N, Kato Y, Saitoh S
2. 発表標題 PNPLA8 deficiency induces microcephaly and reduces neurogenesis in a brain organoid model.
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋圭、川岡奈緒実、谷合弘子、三宅紀子、松本直通、齋藤伸治
2. 発表標題 NAA15遺伝子の変異に伴う重度知的発達症ならびに自閉スペクトラム症の男児の一例.
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村勇治、嶋田逸誠、加藤洋一、齋藤伸治
2. 発表標題 ミトコンドリアホスホリパーゼPNPLA8機能喪失は神経系細胞においてミトコンドリアダイナミクス異常を引き起こす.
3. 学会等名 第66回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsuji S, Kato K, Lequesne CH, Mizuno S, Rio M, Miyatake S, Nishio Y, Matsumoto N, Cormier-Daire V, Saitoh
2. 発表標題 VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Scinzel-like syndrome: Description of two novel cases confirming the pathogenicity and clinical diversity.
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Virtual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Nishio, Kohji Kato, Tran Mau-Them Frederic, Shiomi Otsuji, Chloe Quelin, Hisashi Oishi, Yoshiyuki Takahashi, Shinji Saitoh
2. 発表標題 MYCN gain-of-function variants induce excess proliferation of neurons and cause a novel megalencephaly syndrome.
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Virtual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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	大石 久史 (Oishi Hisashi) (30375513)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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			
フランス	Universite de Paris			
英国	University of Bristol			
オランダ	University Medical Center Utrecht			