

令和元年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09974

研究課題名（和文）CDC42遺伝子異常症の病態解明

研究課題名（英文）Pathogenetics of Takenouchi-Kosaki syndrome

研究代表者

武内 俊樹（Takenouchi, Toshiki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60383741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：研究成果として、巨大血小板の電子顕微鏡を用いた形態解析、遺伝子改変モデル動物を用いた機能解析の結果、国内外の本患者の表現型スペクトラムについて、研究分担者である上原朋子を筆頭著者、研究代表者（武内俊樹）を責任連絡著者として、国際学会誌Scientific Reportsに英文論文として発表した。国内外の5人の患者について、詳細な表現型の比較検討を行った。その結果、巨大血小板性血小板減少症、知的障害、屈指、脳構造異常と感音性難聴、甲状腺機能低下症、易感染性が本疾患の核となる症状であることを見出した。患者由来の血小板を高解像度の電子顕微鏡で解析し、顆粒は減少し、空胞が増加していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果をもとに、さらに治療に向けた研究に発展させるため、2018年度から日本医療研究開発機構 難治性疾患克服研究事業「CDC42阻害剤による武内・小崎症候群の治療法の開発」研究班が発足した。本疾患が2019年度から厚生労働省小児慢性特定疾病に指定されることが決定した。

研究成果の概要（英文）：We performed electron micrographic analysis of the patients' platelets, and functional analysis of mutant *C. elegans* carrying the p.Tyr64Cys mutation in *cdc-42*. The results were published in Scientific Reports. Macrothrombocytopenia, intellectual disability, sensorineural deafness, distinctive facial features and structural brain abnormalities are cardinal features of Takenouchi-Kosaki syndrome.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：武内・小崎症候群 巨大血小板 知的障害 血小板減少症 リンパ浮腫 免疫不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2008年から米国 NIH で、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を診断がつかないままになっている、いわゆる未診断患者の診断に応用する取組み (Undiagnosed Diseases Program (UDP)) が開始された。当該研究を通じて、参加者の3割程度で診断が得られたことから、医療の質を上げる試みとして注目され、英国をはじめとした各国で、同様のプロジェクトが開始された。このような研究を通じて、既知の希少遺伝性疾患の診断に加えて、新たな疾患が発見された。わが国でも2015年から、未診断患者に対する網羅的遺伝子解析の臨床応用に関する研究 (未診断疾患イニチアチブ (IRUD: Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases)) が開始された。

研究代表者らは、血小板低下症、精神運動発達遅滞を呈し、指趾の関節拘縮、特徴的顔貌、下腿リンパ浮腫を特徴とし、10年以上診断が不明であった患者に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、*CDC42* 遺伝子のエキソン3にヘテロ接合性のミスセンス新生突然変異 (c.191A>G p.Tyr64Cys (NM_001039802.1)) を確認した。

患者の上記表現型のうち、特に血小板の表現型が *Cdc42* 欠失モデル動物で報告されていた表現型と類似することから、*CDC42* 遺伝子異常による新規症候群であると考えた。さらに、共同研究ネットワークを通じて、大阪地区においても、同様の表現型を呈し、同一遺伝子変異を有する患者をもう一人見出すことで新規疾患として確立し、両患者に共通の表現型と分子基盤について解析を開始した。

研究代表者が診断した上記2患者は、同一の *CDC42* 遺伝子新規突然変異 (c.191A>G p.Tyr64Cys (NM_001039802.1)) を有していた。臨床的には、両患者ともに血小板低下症と知的障害を認めたと、腎病変や眼病変の有無などについて両患者間で表現型の差を認めており、より大規模な患者コホートを構築することで、本疾患の表現型スペクトラムを明確にする必要があると考えた。分子学的には、2患者において同一部位に変異を認めたことから、機能獲得型変異の可能性が示唆された。一方で、患者で観察された巨大血小板性血小板減少症や中枢神経発生の異常は、*Cdc42* のノックアウトマウスで報告されており、さらなる機能解析によって遺伝子変異の影響を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

CDC42 は、Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) や Rho-GTP dissociation inhibitor (Rho-GDI) などと相互作用し、細胞周期、細胞分裂、細胞骨格の形成・調節・維持に重要な役割を果たすことは知られていたが、この分子の異常によるヒト疾患は知られていなかった。本研究は、研究代表者らが、2015年に、世界に先駆けて見出した新規ヒト疾患「*CDC42* 遺伝子異常症 (武内・小崎症候群)」の表現型スペクトラムと分子レベルでの病態解明を目的とした。すなわち、人類遺伝学的アプローチとして、国際標準の表現型記載法 Human Phenotype Ontology により国内外から効率的に症例を収集し、表現型スペクトラムを明らかにし、同時に、分子生物学的アプローチとして、モデル動物 (*Caenorhabditis elegans*) を用いた機能解析により、*cdc-42* が「いつ、どこで、どれだけ」発現しているかを明らかにすることで、本新規疾患の病態を徹底的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

人類遺伝学的アプローチと分子細胞学的アプローチを組み合わせ、「*CDC42* 遺伝子異常症」の臨床表現型スペクトラムを明らかにしつつ、病態機序を分子レベルで徹底的に解明するために、以下の研究計画を立案した。

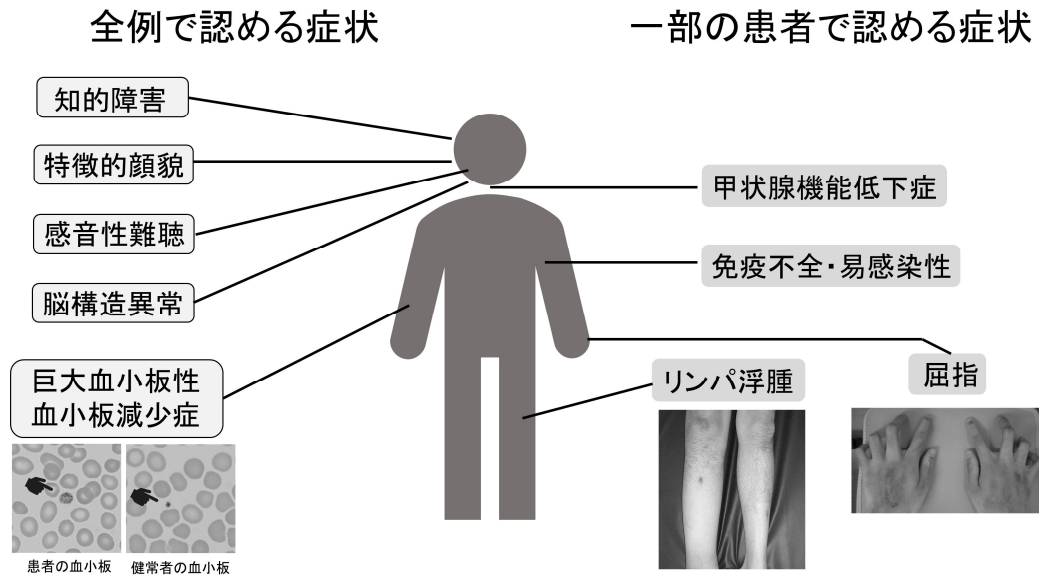
人類遺伝学的アプローチとして、既存の国内小児専門医療専門施設との共同研究ネットワークを利用するだけでなく、海外の研究機関とも連携し、Human Phenotype Ontology (HPO) 形式での記載により、*CDC42* 遺伝子異常症の可能性の高い患者を効率的に収集し、次世代シーケンサーを用いた解析によって診断を確定する。全国に未診断となっている「*CDC42* 遺伝子異常症」患者のコホートを形成、臨床スペクトラムを明らかにする。

分子細胞学的アプローチとしては、患者で同定された遺伝子変異 (p.Tyr64Cys) をモデル動物に導入し、遺伝子変異が個体に与える影響を解析する。*CDC42* 遺伝子は保存性が高く、下等動物まで配列が保存されている。モデル動物として全細胞の系譜が明らかとなっている *C. elegans* (線虫) が最適であると考え、*cdc-42* が「いつ、どこで、どれだけ」発現しているかを明らかにすることで病態を解明し、本疾患の発症機序を分子レベルで明らかにし、治療法開発の端緒とする。

4. 研究成果

本研究計画の予定どおりに研究が進捗し、本研究の成果を最終年度に国際学術誌 Scientific Reports 誌に publish した。

図1 武内・小崎症候群の臨床表現型のまとめ



人類遺伝学的アプローチの成果として、国内外に合計5人の本疾患患者を同定した。国際共同研究として、患者コホートの表現型を詳細に検討し、本疾患の表現型スペクトラムを定義することに成功した。すなわち、知的障害、巨大血小板性血小板減少症、屈指、脳構造異常と感音性難聴、甲状腺機能低下症、易感染症が本疾患の核となる症状であることを見出した(図1)。

さらに、本疾患患者3名について血小板の電子顕微鏡による微小構造解析を行った。巨大化した血小板は球形の形態を取り、顆粒が減少し、空胞が増加していた(図2)。血小板のサイ

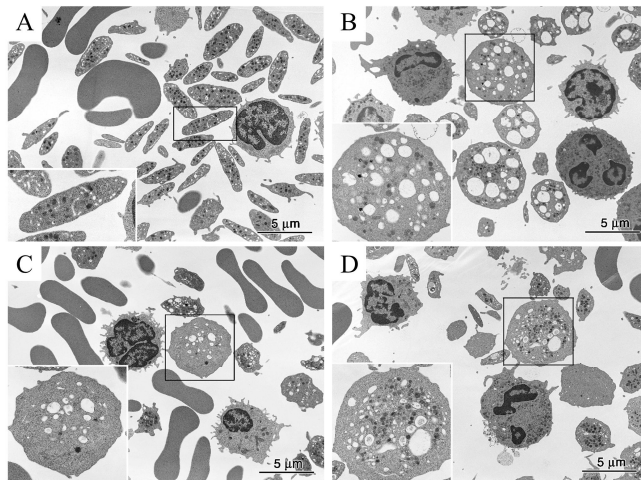


図2 患者とコントロールの血小板の電子顕微鏡写真

A: コントロール

B-D: 患者1-3

患者血小板では、顆粒が減少し、空胞が増加している。

ズの一部で有意に巨大化しているが、大部分の血小板の大きさは変わらないことを見出した。

分子細胞学的アプローチとして、CRISPR/Cas9により、CDC42 p.Tyr64Cysの遺伝子改変モデル動物(*C. elegans*)の作出に成功した。表現型の解析から、*cdc-42*がアポトーシスに關与する

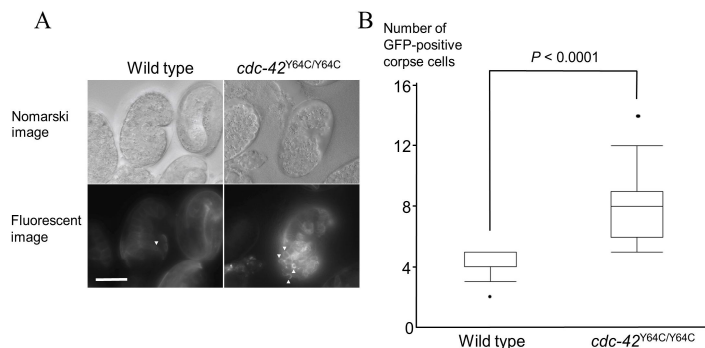


図3 p.Tyr64Cys変異をもつ線虫の卵細胞にお

ける死細胞数の計測結果。

(A) Nomarski と蛍光像

B: GFP陽性の死細胞数の定量評価

とされる死細胞の貪食能が低下することを見出した(図3)。

なお、社会福祉的な側面からは、本疾患が、「武内・小崎症候群」として、2019年後半から厚生労働省の小児慢性特定疾病に指定されることが決定した。本研究における成果を受けて、日

本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業「CDC42 阻害剤による武内・小崎症候群の治療法の開発(研究代表者:武内俊樹)」が採択され、患者由来疾患特異的 iPS 細胞の作成等を通じて、更なる病態解明と治療開発に向けて研究を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Uehara T (研究分担者), Suzuki H, Okamoto N, Kondoh T, Ahmad A, O'Connor BC, Yoshina S, Mitani S, Kosaki K, **Takenouchi T** (研究代表者). Pathogenetic basis of Takenouchi-Kosaki syndrome: Electron microscopy study using platelets in patients and functional studies in a Caenorhabditis elegans model. Scientific Reports. 査読あり 2019 Mar 14;9(1):4418. doi: 10.1038/s41598-019-40988-7.

[学会発表](計3件)

1. Toshiki Takenouchi, Tomoko Uehara, Kenjiro Kosaki. Mechanistic basis of Takenouchi-Kosaki syndrome: Electron microscopic studies of platelets in patients and functional studies in model organism. American Society of Human Genetics 2018

2. 武内俊樹、上原朋子、小崎健次郎 「武内小崎症候群：表現型スペクトラムと発症機序の検討」 第121回日本小児科学会学術集会 2018年

3. 武内俊樹 「新規疾患概念の確立と治療法開発についての今後の課題」 日本人類遺伝学会第63回大会 2018年

[その他]

NANBYO Research from Japan

<https://www.nanbyo-research.jp/research/1/well-studied-gene-implicated-in-rare-syndrome>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上原 朋子

ローマ字氏名：UEHARA, Tomoko

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 30767124

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 英紀

ローマ字氏名：SUZUKI, Hidenori

研究協力者氏名：三谷 昌平

ローマ字氏名：MITANI, Shohei

研究協力者氏名：小崎 健次郎

ローマ字氏名：KOSAKI, Kenjiro

研究協力者氏名：岡本 伸彦

ローマ字氏名：OKAMOTO, Nobuhiko

研究協力者氏名：近藤 達郎

ローマ字氏名：Kondoh, Tatsuro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。