

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10309

研究課題名(和文) 繊毛機能不全症として捉えた正常圧水頭症多発家系の分子遺伝解析と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The molecular analysis of idiopathic normal pressure hydrocephalus as ciliary dyskinesia

研究代表者

黒滝 直弘 (Kurotaki, Naohiro)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20423634

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)：私たちが経験した正常圧水頭症の家族集積症例で、何らかの遺伝要因があると仮定し、罹患者と非罹患者に対し次世代型シーケンサーによる全エクソーム解析を行ったところ、罹患者のみにCFAP43遺伝子の機能喪失変異を認めた。CRISPR/Cas9を用いてノックアウトマウスを作成し解剖学的、及び組織学的な解析を行ったところ、脳室内の繊毛の形態異常を伴っていることが確認された。ゆえに繊毛の機能異常により髄液の循環不全が生じNPHを呈していたのではないかと考えた。今後は、脳外科医や神経科医との共同研究を広く、症例を集積し、本研究で得られた結果の再現性や普遍性に関する検討を行うこととしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歩行障害や尿失禁を伴う認知症である、正常圧水頭症のほとんどは直接の原因がはっきりしない孤発例であるが、私たちが偶然遭遇した症例は家族の中に複数の患者さんがいるいわゆる家族症例であった。そこで、私たちがこの症例においては何らかの遺伝子変異の影響があるのではと考え、次世代型シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行ったところ、CFAP43遺伝子の変異が見つかったので、そのノックアウトマウスを作り、解剖学的、組織学的検索を行った。その結果、脳室や呼吸器系における繊毛の形態不全や発育不全が起きていることがわかった。これはカルタゲナー症候群と類似の病態であり今後の薬物療法の開発に示唆を与えられた。

研究成果の概要(英文)：Normal-pressure hydrocephalus (NPH) is usually sporadic, but some cases were reported as familial. We found 3-generated familial cases including 4 patients and one showed several psychotic symptoms. In order to identify responsible genes in the family, we used whole-exome sequencing (WES) and analyzed cases. We identified a loss-of-function variant in the CFAP43 gene linked to this disease in this family. Considering result of further study of Cfap43 knockout mice, we conclude mutation in CFAP43 elicits abnormalities in cilia and leads to NPH.

研究分野：精神科

キーワード：正常圧水頭症 認知症 繊毛機能不全 全エクソーム解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の中にあつて認知症の治療法の開発と支援体制を構築していくことは急務である。2016年現在、認知症患者の数は約500万人に及びその半数はアルツハイマー型認知症であるとされているが、約10%は「治療しうる認知症 (Treatable Dementia, TD)」であり臨床現場では見落としはならない重大な視点である。そのTDの中で2%とされる正常圧水頭症 (NPH) は未だ原因が不明で治療法はリスクを考慮してのシャント術が選択されている。研究代表黒滝は長崎大学と米国ペーラー大学で単一遺伝子病のゲノム異常をテーマに分子遺伝学を学んだ後、臨床精神科医として長崎大学病院に勤務し、平成24年3月に同病院に設置された基幹型認知症医療疾患センターの副センター長を併任し老年精神医学の臨床に従事している。基礎医学と臨床医学の両者を学んだこれまでの経験に基づき、臨床から研究への橋渡しとなる仕事を一貫して手掛けてきた。その姿勢に基づいて本研究は幻覚妄想を呈しセンターを受診した1名の認知症の患者を発端として発案された計画である。その手がかりは、(1) その患者(サンプル2)の診断がNPHであり、しかも多発家系の一員であったこと、(2) 次世代型シーケンサーを用いて全エクソン解析を行ったところ、繊毛分化と構造維持に重要な働きを持つと推測される候補遺伝子Xが同定されたこと(研究開始当初は未発表データ)の2点である。本プロジェクトにおいては初めに同定された原因遺伝子の詳細な機能解析、及びモデルマウスの解析を行うこととした。一方で、NPHの患者のレジストリを構築するとともに次世代型シーケンスによるエキソーム解析による患者の遺伝解析を行い、本症例と同じ遺伝子異常の有無を検索するとともに、他に遺伝子異常があればそれらの機能解析を開始し、将来は薬物による治療法の一里塚を得ることによって高齢化する日本の医療への貢献を目指した。

### 2. 研究の目的

(1) まず初めに、研究の学術的背景について述べる。

高齢化社会の中にあつて認知症の治療法の開発と支援体制を構築していくことは急務である。2016年現在、認知症患者の数は約500万人に及びその半数はアルツハイマー型認知症であるとされているが、約10%は「治療しうる認知症 (Treatable Dementia, TD)」であり(文献1)、臨床現場では見落としはならない重大な視点である。そのTDの中で2%とされる正常圧水頭症 (NPH) は未だ原因が不明で治療法はリスクを考慮してのシャント術が選択されている。研究代表黒滝は長崎大学と米国ペーラー大学で単一遺伝子病のゲノム異常をテーマに分子遺伝学を学んだ後(文献2, 3)、臨床精神科医として長崎大学病院に勤務し、平成24年3月に同病院に設置された基幹型認知症医療疾患センターの副センター長を併任し老年精神医学の臨床に従事している。基礎医学と臨床医学の両者を学んだこれまでの経験に基づき、臨床から研究への橋渡しとなる仕事を一貫して手掛けてきた。その姿勢に基づいて本研究は幻覚妄想を呈しセンターを受診した1名の認知症の患者を発端として発案された計画である。その手がかりは、1) その患者(サンプル2)の診断がNPHであり、しかも多発家系の一員であったこと、2) 次世代型シーケンサーを用いて全エクソン解析を行ったところ、繊毛分化と構造維持に重要な働きを持つと推測される候補遺伝子Xが同定されたこと(本研究申請時には未発表データ)の2点である。本プロジェクトにおいては初めに同定された原因遺伝子の詳細な機能解析、及びモデルマウスの解析を行う。一方で、NPHの患者のレジストリを構築するとともに次世代型シーケンスによるエキソーム解析による患者の遺伝解析を行い、本症例と同じ遺伝子異常の有無を検索するとともに、他に遺伝子異常があればそれらの機能解析を開始し、将来は薬物による治療法の一里塚を得ることによって高齢化する日本の医療への貢献を目指したものである。

(2) 次に、研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのかについて言及する。

研究期間は3年を予定している。初年度はNIH多発家系で罹患者のみで同定された遺伝子Xの詳細な機能解析を実施する。現時点では、罹患者は遺伝子Xの繊毛の機能異常が示唆されており、本罹患者のNPHの基礎病態としては、カルタゲナー(Kartagener)症候群のような繊毛機能不全症候群の一群と考えている。よって本家系の罹患者で副鼻腔炎、中耳炎、易感染性の呼吸器疾患や腎疾患など他の疾患の評価が必須であり連携研究者である内科医の協力の元これを実施する。もし臨床的に線毛の機能不全が視される場合には下鼻甲介のブラシ生検や擦過細胞診、電子顕微鏡による組織検査を実施する。合わせて2年目以降は長崎大学に設置されている基幹型認知症医療疾患センターを中心に、関連病院の協力を得て臨床的にNPHと診断された症例の収集を開始する。遺伝解析自体は2年目以降を予定し、末梢血からDNAを抽出し遺伝子Xの変異解析を行うとともに、合わせて大家系例で発見した患者で観察された鼻粘膜の繊毛の形態異常を評価する。さらにNPHの遺伝的背景を明らかにするために稀な変異による関連解析(Burden test)を実施し、疾患関連の遺伝子セットを同定する。患者数は50名を予定した。

3) 最後に、当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義についてまとめる。

当院の認知症医療疾患センターは単に物忘れ外来の運営だけではなく情報発信や行政からの要請により県内4か所の地域型認知症疾患センターとの協力の元、地域での医療を展開している。長崎県は島嶼部を始めとして比較的地理的に孤立した地域が多く、創始者効果(funder effect)の影響を示唆される難聴や神経疾患などの病態が地域に集積していることがある。本研究でもそのような地域の出身者で、物忘れ、幻覚、妄想を主訴に来院した60歳代女性の臨床像と画像からNPHと診断し、詳細な家族歴を聴取したところ同じ症状を有する者が少なくとも5名はいる大家系であることが判明したことが研究の発端である(図1、文献6)。本研究に先立ち既に、私

達は神経内科医の協力の元、全ての罹患者と健常者に直接診断面接と神経学的検査を行い、NPHと診断を確定した後に2名の罹患者と3名の健常者から末梢血を採取し次世代型シーケンサーで解析を行ったところ罹患者に特有の遺伝子Xのストップ変異を同定している。その遺伝子Xはこれまでなんら疾患との関連に関する報告はないものの、相同遺伝子WDR/CFAPの機能解析の結果解析で繊毛の機能を調節する可能性が考えられたので、本人の同意の元、患者(サンプル1,図1)の鼻粘膜より採取した組織では鼻粘膜細胞の繊毛がかなりの程度減少していた。このことからこの患者の水頭症は繊毛の機能異常が病態と深く関連しているのではないかと推論を得るに至っている。本研究は島嶼部を有する長崎県ならではの地理的特性を生かした点で独創的であり、理論的にも正常圧水頭症の一部を説明しうる有力な証拠を既に確保していること、記憶力障害や神経症状を主訴とした患者の中に遺伝子診断が可能な患者が存在することを強く示唆されており、今後の「治療しうる認知症」への診断、治療へ大きな一歩を踏み込むことが期待される。

### 3. 研究の方法

研究は1)長崎県で発見したNPHの多発家系例から得た原因遺伝子Xの生化学的手法やモデルマウスの作成による機能解析と、2)認知症の患者での当該疾患のスクリーニングと新規遺伝子の単離である。初年度(平成27年度)はモデルマウスの作成と行動解析、組織解析を主とした遺伝子Xの機能解析と本研究の発端となった家系における詳細な臨床評価を行う。並行し長崎大学病院の認知症医療疾患センターを中心に関連病院からNPHの患者を3年で100名を収集し、末梢血から抽出したDNA解析や線毛の機能不全を示唆する所見があるか否かの検討は2年目以降を予定した。

### 4. 研究成果

臨床場面で遭遇した精神症状を有する家族集積症例に対し、頭部MRIを施行したところ正常圧水頭症(NPH)と診断された。NPHはそのほとんどが孤発例であり、わずかながら家族例の報告があるものの、遺伝学的な背景に関しての知見は極めて乏しい。そこで私たちはこの家系においては、何らかの遺伝要因があると仮定し、罹患者と非罹患者に対し次世代型シーケンサーによる全エクソン解析を行ったところ、罹患者のみにCFAP43遺伝子の機能喪失変異を認めた。CFAP43遺伝子の病的変異の報告は、これが世界で初めてであったが、クラスター遺伝子であるCFAP44遺伝子の突然変異は精子の運動能を低下させ、男性の不妊の原因として報告があったことから、私達の症例も類似の機序によって髄液の循環不全が起こりうるのではと推察した。CRISPR/Cas9を用いてノックアウトマウスを作成し解剖学的、及び組織学的な解析を行ったところ、脳室内の繊毛の形態異常を伴っていることが確認された。ゆえに少なくとも私たちの症例においては、繊毛の機能異常により髄液の循環不全が生じNPHを呈していたのではないかと考えた。今後は、脳外科医や神経科医との共同研究を広げ、症例を集積し、本研究で得られた結果の再現性や普遍性に関する検討を行うこととしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Y, Ono S, Imamura A, Okazaki Y, Kinoshita A, Mishima H, Nakane H, Ozawa H, Yoshiura KI, Kurotaki N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Deep sequencing reveals variations in somatic cell mosaic mutations between monozygotic twins with discordant psychiatric disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Morimoto Y, Ono S, Imamura A, Okazaki Y, Kinoshita A, Mishima H, Nakane H, Ozawa H, Yoshiura KI, Kurotaki N.	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) 10.1038/hgv.2017.32. eCollection 2017	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 Morimoto Y, Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Yoshida S, Kinoshita A, Mishima H, Yamaguchi N, Mori T, Imamura A, Ozawa H, Kurotaki N, Ziegler C, Domschke K, Deckert J, Umekage T, Tochigi M, Kaiya H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T, Yoshiura KI, Ono S.	4. 巻 2:8(1)
2. 論文標題 Whole-exome Sequencing and Gene-Based Rare Variant Association Tests Suggest That PLA2G4E Might Be a Risk Gene for Panic Disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41398-017-0088-0.	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 Morimoto Y, Yoshida S, Kinoshita A, Satoh C, Mishima H, Yamaguchi N, Matsuda K, Sakaguchi M, Tanaka T, Komohara Y, Imamura A, Ozawa H, Nakashima M, Kurotaki N, Kishino T, Yoshiura KI, Ono S.	4. 巻 14:92(20)
2. 論文標題 Nonsense Mutation in CFAP43 Causes Normal-Pressure Hydrocephalus With Ciliary Abnormalities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e2364-e2374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000007505.	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 Hatta D, Shirotni K, Hori Y, Kurotaki N, Iwata N.	4. 巻 34(1)
2. 論文標題 Activity-dependent Cleavage of Dyskinesia-Related Proline-Rich Transmembrane Protein 2 (PRRT2) by Calpain in Mouse Primary Cortical Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 180-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902148R	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本芳郎, 小野慎二, 吉田慎太郎, 三嶋博之, 木下 晃, 今村 明, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 木住野達也, 吉浦孝一郎, 山口尚宏:
2. 発表標題 CFAP43 遺伝子の機能喪失性変異は正常圧水頭症のリスク因子の可能性がある
3. 学会等名 第 63 回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018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	松坂 雄亮  (Mastuzaka Yusuke)  (30728944)	長崎大学・病院 (医学系)・助教   (17301)	
研究 分担者	小澤 寛樹  (Ozawa Hiroki)  (50260766)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・教授   (17301)	