

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15379

研究課題名(和文) ECEL1/DINE遺伝子変異による先天性関節拘縮症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of congenital contracture disorder with ECEL1/DINE deficiency

研究代表者

永田 健一 (Nagata, Kenichi)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：50587798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術を使うことで、ヒト患者で同定された病的変異(C760R、G607S)を有するノックインマウスを作製した。これらのノックインマウスは胎生期において四肢および頭部の運動神経の発達に異常を示した。また、組織学的・生化学的な解析により、C760RはECEL1/DINEタンパクの局在異常、G607SはECEL1/DINE mRNAのスプライシング異常により運動神経系の発達に障害を呈することが明らかとなった。さらに、loxPを2箇所に導入したfloxedマウスを作製し、Creの発現依存的にECEL1/DINEを欠失するin vivoのシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では患者で同定された病的変異をもつノックインマウスを複数作製し、これらのノックインマウスで運動神経の発達異常が生じることを明らかにした。得られた知見はECEL1/DINE変異による先天性関節拘縮症がどのようにして発症するかを理解する上で重要であり、治療法の開発やリハビリテーションの手法への発展性が期待できる。また、floxedマウスの作製により成体期のECEL1/DINEの機能を探索することが可能になった。今後、多様なCreマウスと交配し表現型を解析することで、先天性関節拘縮症の発症機序のみならず、神経系の恒常性維持、損傷後の再生過程についても有意義な知見を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Using genome editing technology, we established two distinct knock-in mouse lines with ECEL1/DINE pathogenic mutations (C760R or G607S). These knock-in mice showed developmental abnormalities in the motor nerves throughout the body. Histological and biochemical analyses revealed distinct functional consequences of these pathogenic mutations: C760R knock-in mice exhibit abnormal localization of ECEL1/DINE protein, whereas G607S mice showed splicing defects of ECEL1/DINE mRNA. We also generated floxed mouse lines with two loxP sites in ECEL1/DINE gene locus to further explore the function of ECEL1/DINE in adult stages.

研究分野：神経形態学

キーワード：ECEL1/DINE 先天性関節拘縮症 運動神経 軸索分岐 ゲノム編集技術 ノックインマウス

1. 研究開始当初の背景

Endothelin converting enzyme like-1 (ECE1、齧歯類では DINE) は胎生期より神経系に発現する膜一回貫通型プロテアーゼである。基質が同定されておらず、その機能には未だ不明な点が多い。近年、先天性関節拘縮症の家系を対象とする遺伝学的解析の結果、ECE1 の変異が疾患発症につながる事が報告された。先天性関節拘縮症は原因不明の疾患群であり多数のサブタイプが含まれるが、共通してみられるのは関節が自由に動かせない症状 (拘縮と呼ばれる) である。ECE1 変異の場合は「5 型」に分類され、常染色体劣性遺伝で発症する。5 型では特に上肢・下肢の遠位の関節が影響を受け、自由に屈曲・伸展させることができない。加えて、眼球運動の異常 (斜視など) や呼吸障害が特徴である。これまでに世界各地で数十人の患者が ECE1 変異をもつことが報告されている。変異によって症状が異なる可能性が指摘されているが、なぜ ECE1 の変異間で臨床症状に差が出るのか、ヒト研究でその理由を探ることは困難である。ECE1/DINE の発現プロファイルおよびアミノ酸配列はヒト・マウス間で高度に保存されていることから、マウスを動物モデルとして疾患の発症原因を探ることが有用であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は ECE1/DINE 遺伝子の変異がどのようにして先天性関節拘縮症につながるのか、2 タイプの動物モデルを使って解明することである。ゲノム編集技術を駆使して作製したユニークなマウスモデルを解析することで、ヒト臨床報告では明らかとならなかった問いに答えを出す。

3. 研究の方法

(1) 病的変異を導入した 2 系統のノックインマウス (C760R、G607S) の運動ニューロンを GFP でラベルし、whole mount 免疫染色法を用いて可視化した。その後、共焦点顕微鏡で筋ごとに運動神経の分布の 3D イメージを取得した。解析ソフト IMARIS を用いて運動神経の分布をトレースし、軸索長や分岐数をカウントした。

(2) 胎生期ノックインマウス脊髄の組織切片を作製し、脊髄運動ニューロンにおける DINE タンパクの発現量や局在に変化がみられるかどうかを精査した。また、胎生期ノックインマウスの脊髄から RNA、タンパクを抽出し、RT-PCR や western blotting により DINE の発現を評価した。

(3) ゲノム編集技術を使って、DINE 遺伝子上の 2 カ所に loxP を導入した flox マウスを作製した。flox マウスと Cre マウスを交配することで DINE のコンディショナルノックアウトマウスを樹立した。

4. 研究成果

(1) 胎生期マウスの運動神経の発達異常を全身性に評価した。病的変異間の差異を明らかにするため C760R、G607S の 2 つの系統で同じ解析を行った。共焦点顕微鏡を使って 3D イメージを取得したところ、下肢の複数の骨格筋において運動神経の枝分かれの著しい減少が認められた。外転神経においては、軸索の伸展が停止している個体、また経路外に伸びている個体が認められた (図 1)。ただし、外転神経の表現型の浸透率は 100%ではなく、ノックイン系統においても 2 割または 4 割程度の個体で正常に眼球周囲に到達していた。

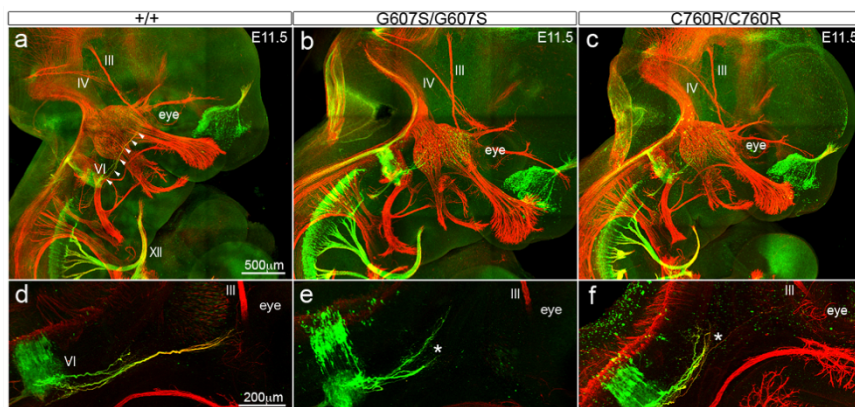


図1. DINE欠損運動神経の異常

(a-c) 野生型、G607S、C760Rの頭部の神経分布。図の中央に位置するのが外転神経 (VI)
 (d-f) a-cの外転神経を拡大したもの。ノックインでは伸展が途中で止まっている (*)

(2) 病的変異が DINE の発現に及ぼす影響を調べるため、組織学的・生化学的に解析した。胎生期マウス組織切片を作製し、免疫染色を行なったところ、C760R では ECEL1/DINE タンパクの局在異常が検出された (図 2 左)。一方、G607S では DINE タンパクの発現はほぼ消失していた (図 2 右)。追加の解析により、G607S ではスプライシング異常により mRNA レベルで発現が顕著に減少することが明らかとなった。

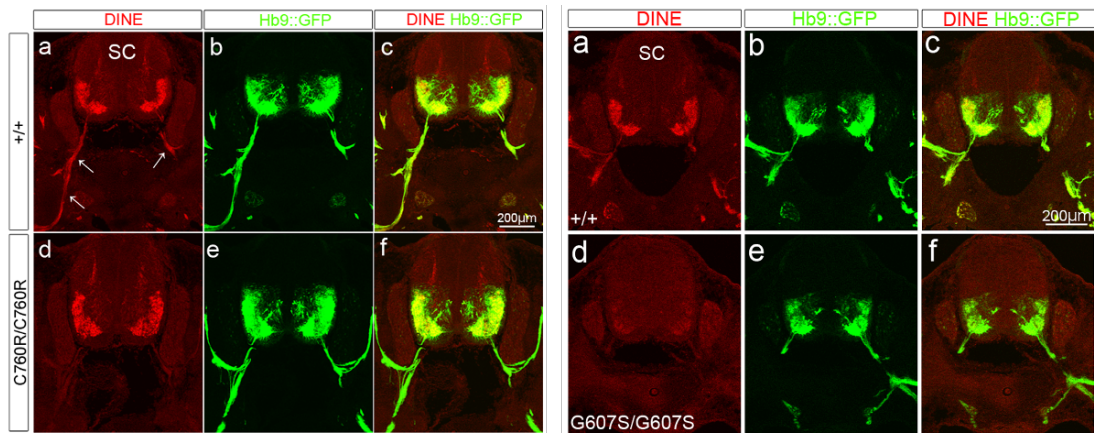


図2. 病的変異のDINE発現への影響

(左パネル) 胎生期マウス脊髄におけるDINEの発現。野生型とC760Rの結果の比較
(右パネル) 野生型とG607Sの結果の比較

(3) ECEL1/DINE 変異マウスの生直後の致死性克服を目指し、flox マウスの作製に取り組んだ。マウス受精卵にゲノム編集技術ツールを導入し、DINE 遺伝子上の 2 箇所のイントロンに loxP 配列を挿入した。マウス誕生後に尾からゲノムを抽出し、loxP が正しく挿入されている個体を選別した。野生型マウスと交配したところ、loxP の挿入が次世代に伝わっていた。また、in vitro の Cre リコンビナーゼと反応させ、loxP の組み換えが生じることを確認した。さらに、flox マウスは DINE を正常に発現しているが、Cre マウスとの交配により Cre 依存的に時空間的に局限して DINE の発現が消失することが分かった (未発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kiryu-Seo Sumiko, Nagata Kenichi, Saido Takaomi C., Kiyama Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 New Insights of a Neuronal Peptidase DINE/ECEL1: Nerve Development, Nerve Regeneration and Neurogenic Pathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	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/s11064-018-2665-x	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田 健一
2. 発表標題 点変異ノックインマウスの作出による疾患発症機序の探索
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 健一、木山 博資、西道 隆臣
2. 発表標題 ECEL1/DINE遺伝子におけるミスセンス変異の in vivo機能解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Nagata, Mika Takahashi, and Takaomi C. Saido
2. 発表標題 Conditional targeting of DINE using CRISPR/Cas9 technology in mice
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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