

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19524

研究課題名(和文) がん遺伝子MYCNの神経発生での役割とその変異により起こる新規症候群の病態の解明

研究課題名(英文) A role of MYCN in neurodevelopment and in a novel syndrome

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：MYCNは古典的ながん遺伝子であり、特に神経芽腫における役割が知られている。私たちは巨脳症患者にエクソーム解析を実施し、de novoのMYCN変異(NM_005378.5; c.173C>T; p.Thr58Met)をヘテロ接合性に同定した。一連の解析を行い、この変異はMYCNの分解に必要なリン酸化部位のミスセンス変異であり、リン酸化が阻害される結果、MYCNの分解が阻害され、長時間機能が継続する機能亢進型変異であることを証明した。更に、変異を導入したノックインマウスの作成を行なった。本研究によりMYCNは正常な脳形成に必須であり、機能亢進型変異が新規巨脳症の原因となることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCNはがん遺伝子、また、脳発生における役割について知られている。MYCN遺伝子の機能喪失型変異が小頭症を示すことも知られていた。しかし、MYCN遺伝子の機能亢進型変異についての知見はこれまで存在しなかった。私たちは世界に先駆けてMYCN遺伝子のミスセンス変異を巨脳症患者に同定した。この変異の機能解析を細胞レベル、神経幹細胞/前駆細胞レベル、発生期のマウス脳レベルで解析し、機能亢進型変異であることを証明した。更に、変異を導入したノックインマウスの作成に成功した。本研究はMYCN遺伝子の適切な発現調整が正常な脳形成に必須であることを証明し、脳の大きさ制御のメカニズム解明に資する意義がある。

研究成果の概要(英文)：We identified a novo c.173C>T mutation in MYCN which leads to stabilization and accumulation of the MYCN protein, leading to prolonged CCND1 and CCND2 expression. This may promote neurogenesis in the developing cerebral cortex, leading to megalencephaly. While loss-of-function mutations in MYCN are known to cause microcephaly, we for the first time uncovered that a germline gain-of-function mutation in MYCN causes a novel megalencephaly syndrome. Additionally, we successfully generated knock-in mice of the identified mutation in MYCN using the CRISPR/Cas9 technology. Our findings provide new insight into the critical role of MYCN in brain development, as well as the consequences of MYCN defects.

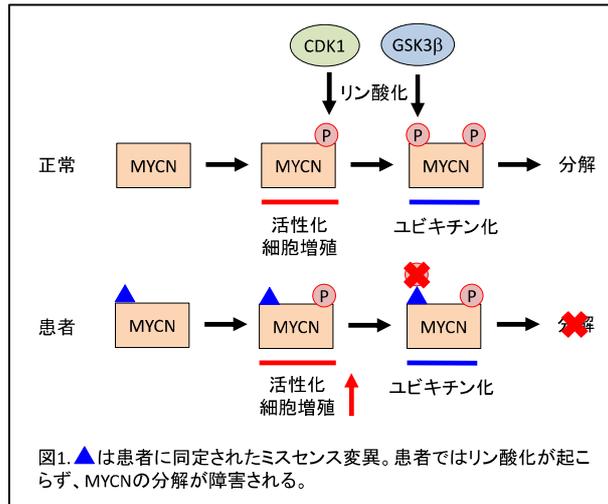
研究分野：小児科

キーワード：巨脳症 脳形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは遺伝的巨脳症患者に対する遺伝子解析パネルを作成し、遺伝子解析を実施している (Negishi et al. BMC Med Genet 2017;18:4)。パネル解析にて変異が同定されなかった患者を対象として全エクソーム解析を行ったところ、一例に de novo の *MYCN* 変異 (NM_005378.5; c.173C>T; p.Thr58Met) をヘテロ接合性に同定した。この変異は *MYCN* の分解に必要なリン酸化部位のミスセンス変異であり、リン酸化が阻害される結果、*MYCN* の分解が阻害され、長時間機能が継続する機能亢進型変異と考えた (図 1)。*MYCN* のハプロ不全は小頭症と指趾異常を特徴とする Feingold 症候群の原因となることが知られている。私たちの患者の症状は Feingold 症候群とは反対の大頭症であるが、指趾異常は共通している。さらに、私たちの患者は乳児期に神経芽腫の既往歴があることから、患児の症状は *MYCN* の機能亢進が原因であり、*MYCN* は機能低下では小頭症、機能亢進では大頭症の原因となるとの仮説を立てた。そこで、私たちが同定した変異の病原性を証明するために、一連の実験を行うことを計画した。



2. 研究の目的

MYCN は古典的ながん遺伝子であり、特に神経芽腫における役割が知られている。*MYCN* は正常な脳発生に必須であることが知られている。主として神経前駆細胞の増殖に必要であり、神経系での *MYCN* ノックアウトマウスは大腦、小脳共にとても小さいサイズとなる。しかし、*MYCN* の機能亢進型変異の影響は知られていない。本研究は *MYCN* の機能亢進型変異に着目し、*MYCN* の発生における役割を明らかにすることを目的とする。さらに、新規疾患概念としての *MYCN* 関連疾患の概念を確立し、病態に基づく治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 患者に同定された変異 (c.173C>T; p.Thr58Met) を導入したコンストラクトを作成し、種々のベクターを用いて様々な培養細胞に導入し、*MYCN* の機能を評価する。
- 2) 子宮内脳遺伝子導入法によりマウス胎仔の大腦皮質における *MYCN* の神経幹細胞 / 前駆細胞への影響を検討する
- 3) CRISPR/Cas9を用いて変異 *MYCN* を導入したノックインマウスを作成する。同時に、indel変異を導入することで *MYCN* ノックアウトマウスを作成する。

4. 研究成果

1) 変異 *MYCN* は機能亢進型変異である

患児に同定されたミスセンス変異 (c.173C>T; p.Thr58Met) の機能解析を実施した。野生型および変異型のコンストラクトを作成し、HEK293T 細胞に導入したところ、変異蛋白の T58 リン酸化が消失していることが示された (図 2A)。図 1 に示したように T58 のリン酸化が起こらないことで、ユビキチン化が阻害され蛋白の安定性が増加すると考えた。しかし、HEK293T 細胞では変異 *MYCN* の安定性の変化を認めなかった。*MYCN* は胎生期に強く発現しているので、

HEK293T 細胞では MYCN の分解系が存在しないためと考え、次に、神経幹細胞 / 前駆細胞での実験を行なった。胎生 14 日のマウス胚から neurosphere を樹立し、以後の実験を行なった。図 2B, C に示すように変異 MYCN は野生型と比較して安定性が増加していることが示された。更に、マウスの神経幹細胞 / 前駆細胞において、変異 MYCN は野生型より細胞増殖を促進する *Ccnd1*、*Ccnd2* の発現を有意に増強した。これらの結果から、患児に同定されたミスセンス変異は機能亢進型変異であることを解明した (Kato et al. J Med Genet 2019;56:388-395)。

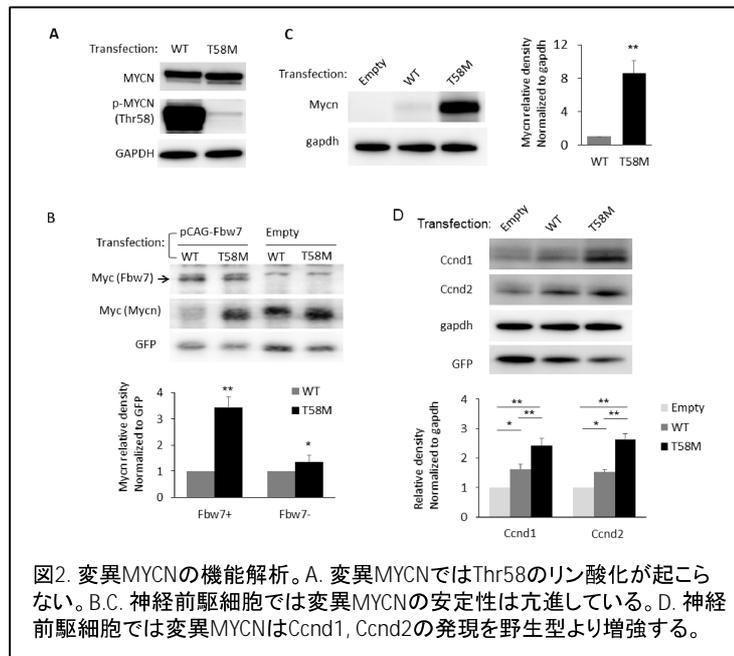


図2. 変異MYCNの機能解析。A. 変異MYCNではThr58のリン酸化が起こらない。B.C. 神経前駆細胞では変異MYCNの安定性は亢進している。D. 神経前駆細胞では変異MYCNは*Ccnd1*、*Ccnd2*の発現を野生型より増強する。

2) 変異 MYCN は野生型 MYCN と同様に細胞周期を促進する

次に、生体の中での変異 MYCN の意義を検討するために、子宮内の胎生 14.5 日胎仔マウスを用いて、子宮内胎仔脳遺伝子導入法によりマウス脳に野生型および変異 MYCN を導入した。細胞増殖マーカーである Ki67 陽性神経幹細胞 / 前駆細胞の数を測定したところ、野生型および変異 MYCN は同様に神経細胞の増殖を促進した (図 3A, B)。この結果は、変異 MYCN は野生型 MYCN と同等の細胞増殖作用を有することを示している。変異 MYCN はしたがって、安定性が増加し、長時間作用が持続することにより機能が亢進すると結論づけた。

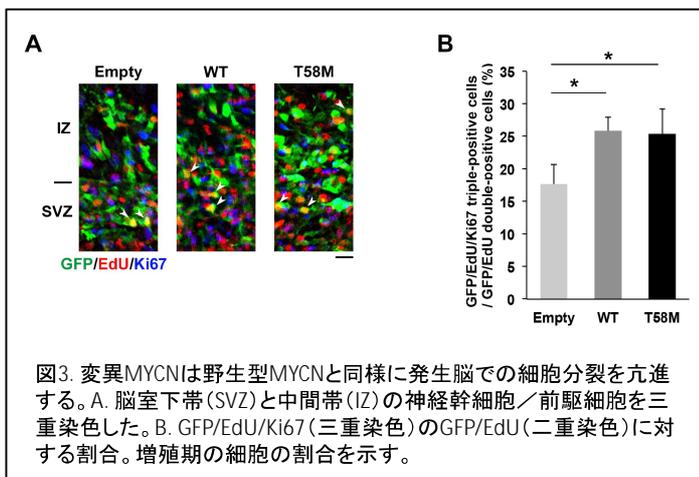


図3. 変異MYCNは野生型MYCNと同様に発生脳での細胞分裂を亢進する。A. 脳室下帯 (SVZ) と中間帯 (IZ) の神経幹細胞 / 前駆細胞を三重染色した。B. GFP/EdU/Ki67 (三重染色) の GFP/EdU (二重染色) に対する割合。増殖期の細胞の割合を示す。

3) 患者変異を導入した Knock-in マウスの作成

最後に、機能亢進型変異の発生脳における役割を明らかにするために、患者に同定された変異を導入するノックイン (KI) マウスの作成を CRISPR/Cas9 法により行った。変異導入のためのガイド RNA および組み替え用オリゴ DNA を受精卵に導入し、患者変異を有する KI マウスおよび 2 塩基欠失 (p.Pro60Valfs*49) と 9 塩基欠失 (p.58_61delTPP) マウスを得た。現在系統維持のための交配を行っているが、出生率の低さや食殺などのために安定的な系統維持が得られておらず、人工授精を試みている。更に、マウスの系統維持と並行して E14 にて変異マウスの脳から神経幹細胞を取り出し、neurosphere の作成を行い、2 塩基欠失 (p.Pro60Valfs*49) からの neurosphere の作成に成功した。モデルマウスと並行して neurosphere を作成することにより MYCN の機能変化により影響を受けるパスウェイの解明が可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kato Kohji, Miya Fuyuki, Hamada Nanako, Negishi Yutaka, Narumi-Kishimoto Yoko, Ozawa Hiroshi, Ito Hidenori, Hori Ikumi, Hattori Ayako, Okamoto Nobuhiko, Kato Mitsuhiro, Tsunoda Tatsuhiko, Kanemura Yonehiro, Kosaki Kenjiro, Takahashi Yoshiyuki, Nagata Koh-ichi, Saitoh Shinji	4. 巻 56
2. 論文標題 MYCN de novo gain-of-function mutation in a patient with a novel megalencephaly syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 388-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2018-105487	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, Mizuno Seiji, Inaba Mie, Fukumura Shinobu, Kurahashi Naoko, Maruyama Koichi, Ieda Daisuke, Ohashi Kei, Hori Ikumi, Negishi Yutaka, Hattori Ayako, Saitoh Shinji	4. 巻 40
2. 論文標題 Distinctive facies, macrocephaly, and developmental delay are signs of a PTEN mutation in childhood	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 678-684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.04.008	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤耕治、宮冬樹、浜田奈菜子、根岸豊、岸本洋子、小沢弘、伊藤英則、堀いくみ、服部文子、岡本信彦、加藤光広、角田達彦、金村米博、小崎健次郎、高橋義行、永田浩一、齋藤伸治
2. 発表標題 MYCNの新生機能獲得型変異は新規の巨脳症候群の原因となる Authors
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Kato ^{1,2} , Fuyuki Miya ^{3,4} , Nanako Hamada ⁵ , Yutaka Negishi ¹ , Yoko Narumi-Kishimoto ⁶ , Hiroshi Ozawa ⁶ , Hidenori Ito ⁵ , Ikumi Hori ¹ , Ayako Hattori ¹ , Nobuhiko Okamoto ⁷ , Mitsuhiro Kato ⁸ , Tatsuhiko Tsunoda ^{3,4} , Yonehiro Kanemura ^{9,10} , Kenjiro Kosaki ¹¹ , Yoshiyuki Takahashi ² , Koh-ichi Nagata ⁵ , Shinji Saitoh
2. 発表標題 A de novo gain-of-function mutation in MYCN causes a novel megalencephaly syndrome
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤伸治
2. 発表標題 PI3K-AKT-mTOR経路が関連する巨脳症
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会（招待講演）
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	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)	
研究分担者	永田 浩一 (Nagata Koichi) (50252143)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・分子病態研究部・部長 (83902)	