

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09561

研究課題名（和文）側弯症発生における脳脊髄液動態の包括的検討

研究課題名（英文）The role of cerebrospinal fluid for the development of scoliosis

研究代表者

八木 満 (YAGI, MITSURU)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：40338091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：AIS患者と健常者のTime-SLIP MRIを用いた脳脊髄液の解析ではTDはmain curveのcobb角、Lenke type、Risse sign、年齢と明らかな相関関係が認められなかった。一方でボランティアとの比較ではボランティア群でTDが低い傾向にあった。繊毛のマスター遺伝子であるPTK7を中枢神経系で生まれた後に特異的に欠損させるマウスでは脳脊髄液の灌流障害による水頭症および側弯の発生が生じた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTK7は発生の際の運動性繊毛のマスター遺伝子であり、遺伝子欠損マウスは致死である。したがって出生後のPTK7の役割は明らかでなかった。今回PTK7を中枢神経系に特異的に出生後の欠損させるマウスを樹立し、解析することで、PTK7を介したWntシグナルは運動性繊毛に恒常性維持にも必須の遺伝子であり、その欠損は脳脊髄液の還流障害と水頭症、側弯変形をきたすことを明らかとした。また、側弯症の患者におけるTime-SLIP MRIの解析からヒトのAISでも脳脊髄液の還流障害が生じていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Analysis of cerebrospinal fluid using Time-SLIP MRI in AIS patients and normal subjects showed no clear correlation between TD and the Cobb angle of the main curve, Lenke type, Risse sign, or age. On the other hand, TD tended to be lower in the volunteer group when compared with volunteers. Mice in which PTK7, the master gene for cilia, was specifically deleted after birth in the central nervous system developed hydrocephalus and scoliosis due to impaired perfusion of cerebrospinal fluid.

研究分野：整形外科学

キーワード：ライブイメージング 脳脊髄液 側弯症

1. 研究開始当初の背景

思春期特発性側弯症 (AIS) は全人口の 3% に及ぶ。この疾患は脊椎の側方への彎曲と脊柱の回旋によって特徴つけられる。AIS の発症原因は不明であるが、双子の研究や家族性側弯症の報告は、遺伝要因が病因において重要な役割を果たすことを示唆している。近年 AIS に関連する一塩基多型やまれな共通遺伝子変異体の同定により、LBX1 を代表とするいくつかの新規疾患遺伝子および遺伝子座が明らかになり AIS は遺伝的に様々な種類の原因があることが確認された (Takahashi et al. Nat Gen. 2011).

疾患に関連する遺伝子として昨年 Grimes らは PTK7 (Wnt/PCP シグナル伝達のレギュレーター: Planer cell polarity 平面内細胞極性) の変異が、Wnt/PCP シグナルは脊椎動物では体毛および内耳有毛細胞の方向性や、神経管形成に関与することが知られている (Lu et al. Nature. 2004)。また、AIS や神経管形成異常を有するヒトの疾患の多くでシグナルの異常が確認されている (Lee et al. Curr Biol. 2012, Hayes et al. Nat Commun. 2014)

Grimes らは昨年 *ptk7* の機能喪失突然変異を有するゼブラフィッシュは、AIS に類似した遅発性の側弯変形を発症する (Grimes et al. Science 2016)。さらにこの研究では PTK7 の発現を回復させると側弯変形が改善することを報告している。一方ヒトでは重度の AIS 患者における PTK7 ミスセンス突然変異が報告されている。

しかし、現在に至るまで PTK7 を介した Wnt シグナルの発生後の脳脊髄液の動態や側弯発症における役割は明らかでない。

2. 研究の目的

AIS の家系の exome シーケンシングからの報告では、Wnt/PCP シグナル伝達経路の別のメンバーをコードする VANG1 の変異が AIS と関連している可能性があることが示唆されている (Andersen et al. Spine 2017)。また、立位 MRI を用いた髄液の流れに関する研究では、AIS 患者における髄液の流れの異常が確認されている (Chu et al. Spine 2007)。Hitier らは AIS 患者の蝸牛の MRI の解析から、蝸牛内壁の皺の形成に異常があり細胞外液流の方向性に異常がある可能性を発見している (Hitier et al. PLoS One 2015)。申請者らも AIS 患者の三半規管の蝸牛内壁の皺の骨微細構造の解析から形態学的異常を確認している。これらの報告は Wnt/PCP シグナル伝達と AIS の発症との関連性についてのさらなる研究の重要性を示唆している。

Wnt- β -カテニンおよび非標準 (non canonical) Wnt/PCP シグナル伝達経路はいずれの経路の異常も発達異常と関連するが、Wnt- β -カテニン及び Wnt/PCP シグナル伝達の両方が繊毛の機能に関与している。繊毛は、細胞外空間に突出し、環境シグナルの知覚および統合において重要な役割を果たす微小管ベースの細胞小器官である。運動性繊毛は、特殊な細胞の表面上に存在し、神経管や蝸牛における細胞外液流の方向性を調整する (Lee et al. Curr Biol. 2012)。

そこで本研究では *ptk7* を介した Wnt/PCP シグナルの側弯変形における役割を解析した。

3. 研究の方法

ptk7 遺伝子欠損マウスの樹立と解析

ptk7 は運動性繊毛のマスター調整遺伝子として知られ、ptk7 遺伝子欠損マウスは髄膜瘤のため胎児期に死亡する。そこで本研究ではすでに樹立され、他の論文でも使用されていて実績のある ptk7 flox マウスを用いて遺伝子特異的欠損マウスを作成する。次にマウスを2足歩行として、側弯の発生の有無を解析する。2足歩行モデルは申請者らが以前に行った両前脚の切断による2足歩行モデルを用いた。

Ptk7 を欠失させる時期に関しては ptk^{flox/flox} マウスが幼児期を超えた後に2種類の Cre マウス (Foxj1tm1.1(cre/ERT2/GFP)Htg/J 及び CAG-cre/Esr1) を用いて欠失させる。

1. Foxj1-cre (tamoxifen inducible cre+EGFP)

幼児期を超えた後にタモキシフェンを投与し繊毛運動のマスター遺伝子 FoxJ1 の発現部位に特異的に (中枢神経周囲) ptk-7 を欠失させる。EGFP の発光で遺伝子の欠失を確認する。

2. C57B6. Cg-Tg (CAG-cre/Esr1*)5Amc/J

幼児期を超えた後に CAG 全身性に ptk-7 を欠失させる。Wnt/PCP シグナルの幼児期以降の他の器官への影響も解析可能 (軟骨など)。

特発性側弯症患者の脳脊髄液の動態の解析

同時に特発性側弯症患者 79 例及び健常者 10 例に関して Time-SLIP MRI を用いて脳脊髄液の動態を解析した。

4. 研究成果

ptk7 遺伝子欠損マウスの樹立と解析

2018 年秋 Ptk7 flox マウス, Foxj1-cre マウスを搬入、2020 年 10 月に目的とする PTK7CK0 マウスが出生し、11 月よりタモキシフェンの投与を開始した。6W, 4W でタモキシフェンを投与した個体については既に解析済みであり、先行論文で示された zebrafish だけでなくマウスにおいても水頭症をきたす事が明らかになった。表現型については CT で解析を行い、側弯変形をきたしていることを確認した(図 1)。

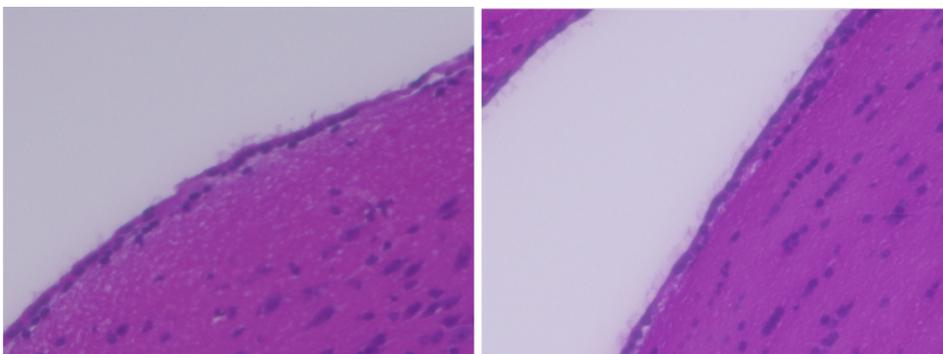


図 1 野生型マウスおよび PTK7KO マウスの繊毛の異常

また小動物における脳脊髄液のライブイメージングはこれまでに樹立されておらず、困難であったため、Time-SLIP MRI を用いた脳脊髄液の動態の解析方法を樹立し、野生型マウスと靭帯の骨化のために脳脊髄液の還流障害をきたす TWY マウスにおいて、その解析結果を報告した。TWY マウスとコントロール(12W, 17W 5 匹ずつ、計 20 匹)で撮影を行い、第 4 脳室での髄液の広がり方を stir distance (SD) と定義し測定した。12W, 17W においても有意に SD は TWY 群で低く (p 値 12W 2.65×10^{-15} , 17W 1.74×10^{-4})、また計測者 3 名における ICC は 0.95 以上と非常に再現性の高い結果が得られた。したがって Time slip 法はヒトだけでなくマウスにおいても有用な髄液動態評価ツールとなりうる事が明らかにした(図 2, 3)。

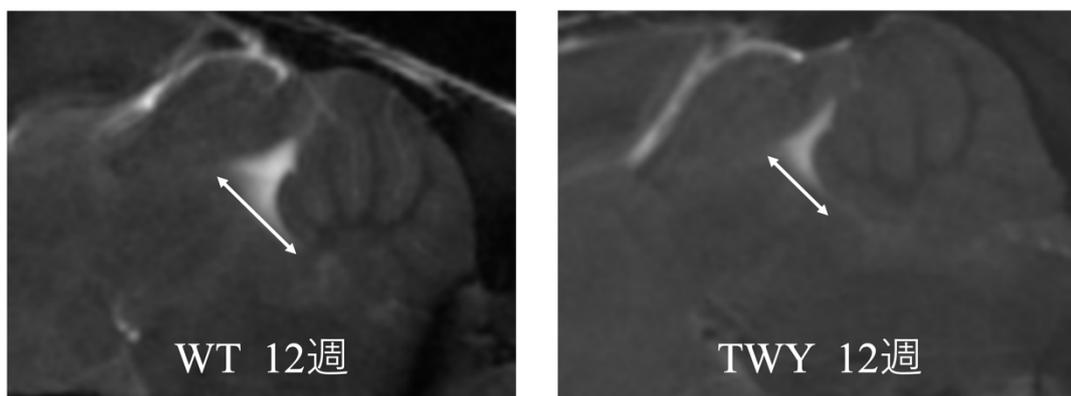


図 2 TWY マウスと野生型マウスの脳脊髄液の MRI

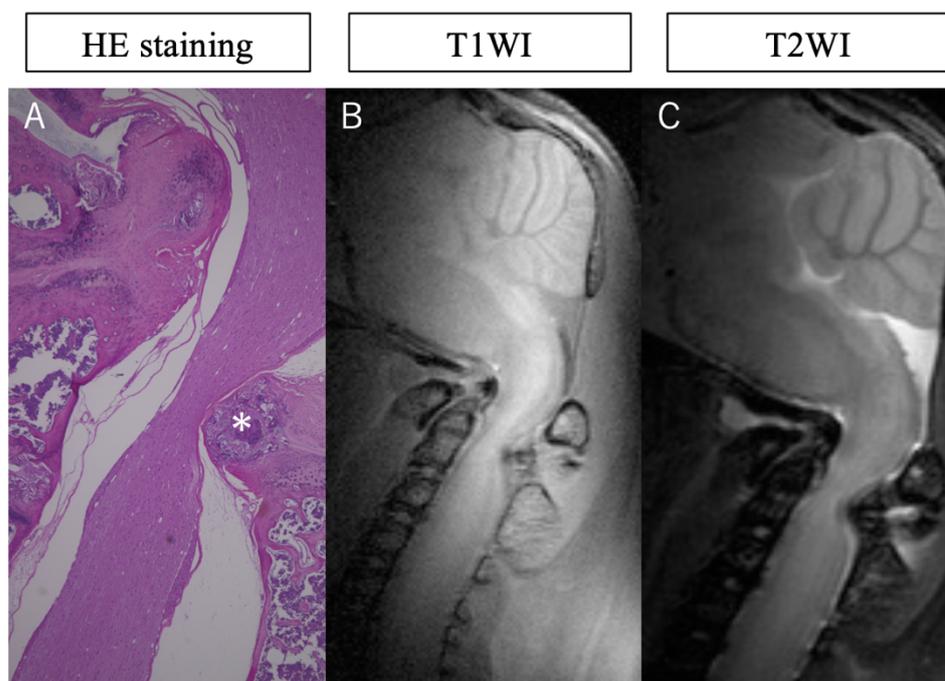


図 3 TWY マウスの脳脊髄

(3)2021年7月現在AIS患者76名、ボランティア(20代女性)10名の撮影が終了している。脊柱管腹側、背側の髄液最大移動距離の和を travel distance (TD)と定義して計測を行った。TDは main curve の cobb 角、Lenke type、Risse sign、年齢と明らかな相関関係が認められなかった。ボランティアとの比較ではボランティア群で TD が低い傾向にあった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小牧 裕司 (KOMAKI YUJI) (10548499)	公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・室長代理 (72611)	
研究分担者	中村 雅也 (NAKAMURA MASAYA) (30217898)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	
研究分担者	関 布美子 (SEKI FUMIKO) (40771407)	公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・研究員 (72611)	
研究分担者	宮本 健史 (MIYAMOTO TAKESHI) (70383768)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授 (32612)	

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