

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860141

研究課題名(和文) DINE欠損運動神経の骨格筋支配における発生的異常の解析

研究課題名(英文) Morphological analyses of aberrant muscle innervation in DINE-deficient motor nerves

研究代表者

永田 健一 (Nagata, Kenichi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50587798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型メタロプロテアーゼECEL1は遠位関節拘縮症(DA)の原因遺伝子として近年新たに同定された。他の原因遺伝子と異なり、ECEL1は神経細胞特異的に発現するため、神経因性の新規の発症機序が想定された。本研究では齧歯類のECEL1相同物であるDINEの欠損マウスで運動神経支配の形成過程を詳細に追跡した。DINE欠損運動神経では軸索分岐が著しく低下することが明らかとなった。さらに、これらの表現型は、DA患者で同定された変異を有するノックインマウスにおいても再現された。以上の結果より、ECEL1変異によるDAが運動神経の分岐異常により発症する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The membrane-bound metalloprotease endothelin-converting enzyme-like 1 (ECEL1) has been newly identified as a causal gene of a specific type of distal arthrogryposis (DA). In contrast to most causal genes of DA, ECEL1 is predominantly expressed in neuronal cells, suggesting a unique neurogenic pathogenesis in a subset of DA patients with ECEL1 mutation. The present study analyzed developmental motor innervation in the rodent homologue damage-induced neuronal endopeptidase (DINE)-deficient mouse limbs. Morphological analyses of motor innervation in over 10 different hindlimb muscles provided evidence that disruption of DINE gene leads to insufficient arborization of motor nerves after arriving at the skeletal muscle. Furthermore, we successfully generated several DINE knock-in mouse lines with a pathogenic DA mutation, and found motor innervation defects in the DINE mutant muscles. These results suggest that abnormal motor innervation could be a primary cause of DA with ECEL1 mutation.

研究分野：先天性関節拘縮症の発症原因をモデル動物を用いて探索している

キーワード：DINE ECEL1 先天性関節拘縮症 運動神経 軸索分岐 CRISPR/Cas9 ノックインマウス 軸索伸展

1. 研究開始当初の背景

Distal arthrogryposis (遠位関節拘縮症、以下 DA と略) は先天性関節拘縮症の 1 グループであり、生まれつき関節の動きが制限される原因不明の疾患である。未だ治療法はなく、患者は特に手先、足先の運動障害を抱えて生涯を送ることとなる。これまでに複数の原因遺伝子が同定されているが、その多くは骨格筋側で働く遺伝子である。このため、骨格筋の発達過程に何らかの問題があり、結果として発症に至ると考えられてきた。最近、膜貫通型プロテアーゼ DINE のヒトホモログが新たな原因遺伝子として同定された。他の原因遺伝子と異なり、DINE は神経系で働く遺伝子であり、変異が入るとなぜ DA を発症するのか、その発症機構は不明なままであった。また、これまでに発症原因としてミスセンス変異が複数同定されているが、なぜ 1 アミノ酸置換で発症に至るのか、は明らかでない。

2. 研究の目的

DINE ヒトホモログの変異がどのようにして DA の発症につながるのか、を明らかにすることを目的とした。さらに、DA 患者で報告されているミスセンス変異間の機能的差異を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、マウスモデルを研究対象とした。DINE のアミノ酸配列はマウスとヒト間で 95% の相同性があり、マウスでの実験結果がヒト疾患の発症原因を推測するための材料になると考えた。そこで、運動神経特異的に GFP を発現するレポーター系統マウスと DINE ノックアウトマウスを交配させることで全身の運動神経を可視化し、DA 患者で異常が認められる上肢・下肢の運動神経の発達過程を詳細に追跡した。

(2) ミスセンス変異間の機能的差異を明らかにするため、DA の発症に関わる遺伝子変異を有する DINE ノックインマウスを複数系統作製した。

(3) 作製したノックインマウスは、ノックアウトマウスと同様、運動神経の発生過程を追跡するとともに、免疫染色やウエスタンブロットングを用いて発症原因を探索した。

4. 研究成果

(1) レポーター系統マウスを用いて GFP 抗体の whole mount 免疫染色を行った。胎生期 11.5 日齢 (E11.5) の上肢では、運動神経は上肢の付け根で一度束になり、その後、数本の主要な神経に分かれ伸びていく様子が観察された。この段階では、野生型マウスと DINE ノックアウトマウスの運動神経の形態に明らかな違いは認められなかった。しかし、E12.5 になるとノックアウトマウスの運動神経は終末部分の細かい枝分かれが野生型と

比較して乏しくなっていた。細かい枝分かれの異常は E13.5、E14.5、E15.5 と発達が進むごとに顕著になった。形態の異常は特定の運動神経に限定されることはなく、上肢全体で観察された。

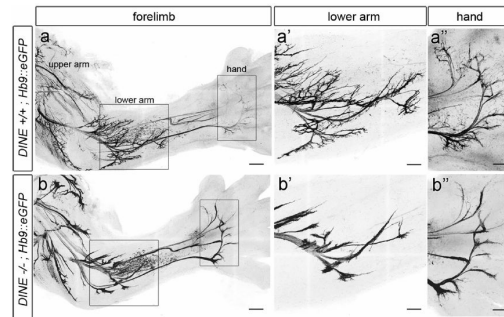


図 1. E15.5 の上肢における DINE 欠損運動神経の分岐異常 (発表論文の Fig. 1 より引用)

下肢では E14.5 から DINE 欠損運動神経の分岐の減少が認められた。発進が進んだ E17.5 の下肢で、10 種類以上の運動神経の分岐を定量的に評価したところ、半数以上で分岐数が著しく低下していることが明らかとなった (図 2)。また、運動神経の筋内分岐数の低下に伴い神経筋接合部の形成が乏しくなっていた。これらの結果から、DINE の欠損は神経因性に DA を発症させることが初めて証明された。

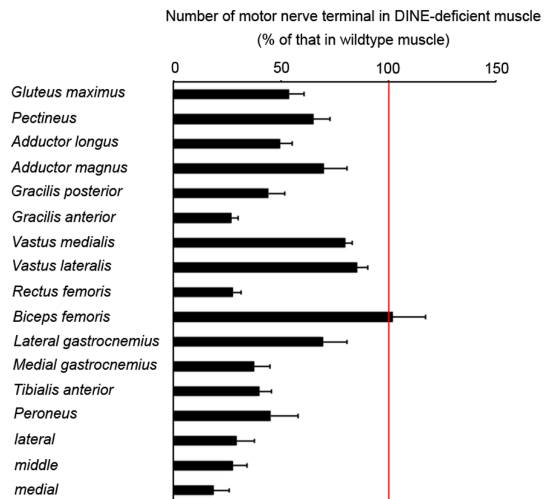


図 2. 下肢の骨格筋における DINE 欠損運動神経の分岐異常 (発表論文の Fig. 4 より引用)

(2) DINE ノックインマウスの作製はゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いた。培養細胞を使ってシステムが機能することを確認した上で、CRISPR/Cas9 システムの RNA を合成し、適切な変異の入ったオリゴ DNA とともにマウス受精卵にインジェクションし

た。仮親に胚を戻し、生後3週齢の時点でジェノタイピングを行った。1塩基置換が正しく挿入されている個体は性成熟を待って野生型マウスと交配し、次世代に変異が引き継がれるか、を調べた。C760R(760番目のアミノ酸がシステインからアルギニンに置換)、G607S(607番目のアミノ酸がグリシンからシステインに置換)の2系統の変異マウスの樹立に成功した(C760Rの作製については図3)。DINEノックアウトマウスと同様に、両変異マウスは運動神経の発達異常により、呼吸ができず死に至った。

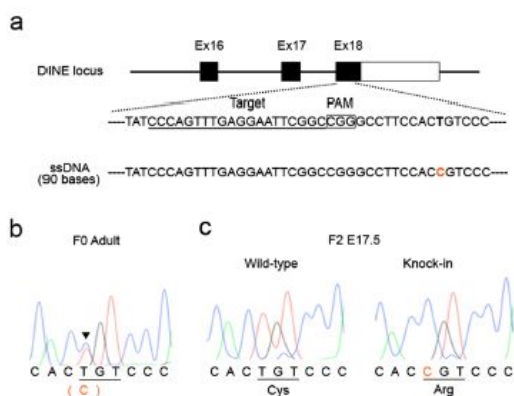


図3. ゲノム編集技術によるノックインマウスの作製(発表論文のFig. 7より引用)

(3) 胎生期E12.5日齢のC760Rマウスの脊髄においてDINEの免疫染色を行った。運動神経細胞の細胞体では発現が確認できたものの、野生型マウス(図4左)と対照的に、GFP陽性の運動神経では発現は消失していた(図4右)。

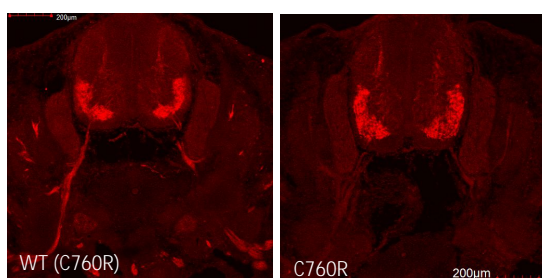


図4. DINEノックインマウスの免疫染色結果

ウエスタンブロッティングを行うと、グリコシダーゼEndo-H耐性のバンドがC760Rでは検出できず、翻訳後修飾の異常が生じていた。G607Sマウスで免疫染色を行うと、DINE陽性反応の著しい減少が認められた。real time PCRでも同様の発現低下が確認されたことから、G607Sでの発現低下がmRNAレベルで生じていることが明らかとなった。ヒトホモログに変異を有する患者の一部に外眼筋の運動

異常がみられる。そこで、変異マウスの外転神経の発生過程をwhole mount免疫染色により詳細に調べたところ、E12.5の時期にC760Rでは、軸索伸展が途中で止まる個体、間違った方向に伸びた個体が合計すると半数程度で認められた。このような軸索伸展の異常はG607Sマウスでも再現された(図5)。

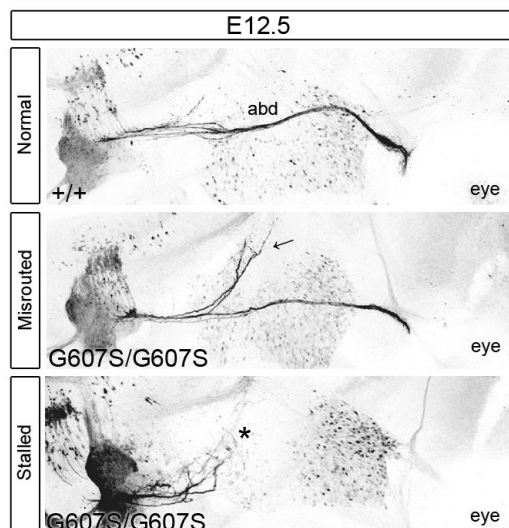


図5. DINEノックインマウスにおける外転神経の伸展異常

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Nagata K*, Kiryu-Seo S, Tamada H, Okuyama-Uchimura F, Kiyama H*, Saido TC*. ECEL1 mutation implicates impaired axonal arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogyrosis. Acta Neuropathol. 2016 Jul;132(1):111-26. (*co-corresponding authors) 査読有り doi: 10.1007/s00401-016-1554-0.

〔学会発表〕(計2件)

Kenichi Nagata, Mika Takahashi, Takaomi C. Saido. Generation of ECEL1-mutated distal arthrogyrosis model mice using CRISPR/Cas9 system. 日本ゲノム編集学会第1回大会、2016年9月6日、広島国際会議場(広島県広島市)

Kenichi Nagata, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, Takaomi C. Saido. Aberrant axonal arborization of motor nerves in Damage-Induced Neuronal Endopeptidase deficient limb. Cold Spring Harbor Laboratory meeting. 2014年9月19日、ニューヨーク(アメリカ合衆国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 健一 (Nagata, Kenichi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50587798

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし