

平成 28 年 3 月 9 日

神経因性の先天性多発性関節拘縮症の原因の解明 ～先天性多発性関節拘縮症で見られる ECEL1/DINE 遺伝子の変異は 運動神経の分岐異常を起こす～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）機能組織学分野の桐生 寿美子（きりゅうすみこ）准教授と木山 博資（きやまひろし）教授の研究グループは、理化学研究所脳科学総合研究センターの永田 健一（ながたけんいち）基礎科学特別研究員と西道 隆臣（さいどうたかおみ）チームリーダーのグループとの共同研究で、先天性多発性関節拘縮症の原因と予想されている原因遺伝子の変異が、実際に運動神経の異常を呈することをマウスで実証しました。

本研究成果は、国際科学誌「アクタ・ニューロパソロジー」（英国時間 2016 年 3 月 8 日付の電子版）に掲載されました。

ECEL1/ DINE は、本研究グループが神経特異的に発現するプロテアーゼとして以前同定していましたが、その機能が分かっていませんでした。最近、先天性多発性関節拘縮症のなかでも遠位関節拘縮症の家系でこの遺伝子に変異があることが同定され、原因遺伝子である可能性が示されました。先天性多発性関節拘縮症は、関節の稼働域が制限され、運動障害や眼瞼下垂、斜視などが見られる疾患です。そこで本研究グループは、運動神経だけが蛍光蛋白で標識されるマウスと ECEL1/DINE 遺伝子のノックアウトマウスを交配し、疾患発症の原因解明を目指しました。その結果、このマウスの四肢の骨格筋において、運動神経軸索の分岐が著しく低下していることを見いだしました。また、10 種類以上の下肢の骨格筋で異常を定量的に評価したところ、大腿や下腿と比べて足の運動神経の発達がより強く影響を受けていました。さらに、本研究グループは、遠位関節拘縮症患者でみつけた ECEL1/DINE 遺伝子の 1 塩基置換型変異を、正常な ECEL1/DINE 遺伝子と置き換えたノックインマウスの作成に成功しました。作製したノックインマウスでも運動神経の同様の発達異常が確認されたことから、ECEL1/DINE の欠失や変異は四肢、特に遠位の運動神経の分岐異常につながる事が明らかとなりました。

本研究の成果は、遠位関節拘縮症の病態および発症機序の解明や、神経筋接合部形成のメカニズムの解明につながる事が期待されます。

神経因性の先天性多発性関節拘縮症の原因の解明

～先天性多発性関節拘縮症で見られる ECEL1/DINE 遺伝子の変異は 運動神経の分岐異常を起こす～

ポイント

- ヒトの先天性多発性関節拘縮症の患者家系に見られる ECEL1/DINE 遺伝子の 1 塩基変異をマウスに導入しました。
- このマウスでは、運動神経が標的の骨格筋に至ってから分岐が十分に起こらないことが明らかになりました。
- 運動神経の分岐が不十分なために神経筋接合部が少なくなり、筋が十分に収縮できないことが予想されます。
- この運動神経の分岐異常は遠位の筋により顕著にみられ、この遺伝子変異を保有するヒトでは関節拘縮が遠位に見られることと一致しました。

1. 背景

名古屋大学の研究グループは、2000 年に運動神経の再生研究から新規のプロテアーゼを同定し、この分子が末梢神経の損傷後に著しく発現上昇することから、Damage-Induced Neuronal Endopeptidase (DINE)と命名しました。齧歯類で発見された DINE 遺伝子は、当時機能が不明であったヒトの ECEL1 と呼ばれる遺伝子と相同（オルソログ）であることも明らかになりました。また、同定後の発現解析により神経の発達過程でも発現していることから、ECEL1/DINE は、神経の発達・再生の過程で何らかの機能をもつと想定されていました。実際、ECEL1/DINE ノックアウトマウスは、生直後に呼吸ができずに死に至ります。これは横隔膜の神経支配がうまく行かず、横隔膜の機能不全によることが原因であるとされています。

先天性多発性関節拘縮症は、関節を自由に動かすことができなくなる先天性の疾患です。なかでも遠位型の関節拘縮症の患者では、手や足の関節拘縮や眼瞼下垂、斜視が顕著に見られることが知られています。遠位関節拘縮症の発症原因は分かっておらず、治療法も確立されていません。これまでに筋収縮に関わるいくつかの遺伝子が原因遺伝子として同定されており、筋組織の異常が疾患発症につながると指摘されていました。ごく最近、複数の研究グループから、一部の家系に ECEL1/DINE 遺伝子の変異があることが報告されました。他の原因遺伝子が筋で発現しているのとは異なり、ECEL1/DINE は神経組織に強く発現しており、この変異による関節拘縮症は神経に原因があり異常が生じるものと想定されました。そこで本研究グループは、運動神経を可視化した ECEL1/DINE ノックアウトマウスや遺伝子 1 塩基置換変異を導入したマウスを新たに作製し、四肢の運動神経の発達過程を詳細に解析しました。

2. 研究成果

1. 運動神経のみを可視化した ECEL1/DINE ノックアウトマウスを作製

上肢・下肢では、それぞれ数十種の運動神経が感覚神経と混在して走行しています。この複雑性のため、従来の ECEL1/DINE ノックアウトマウスでは、運動神経の異常のみを評価することが困

難でした。本研究グループは、ECEL1/DINE ノックアウトマウスと運動神経だけを蛍光タンパク GFP で標識する Hb9 トランスジェニックマウスを交配させました。このようにしてできた ECEL1/DINE ノックアウトマウスは、GFP に対する抗体を利用し免疫組織染色を行うことで、様々な発達段階で運動神経の走行や分岐を容易に観察することができるようになりました。

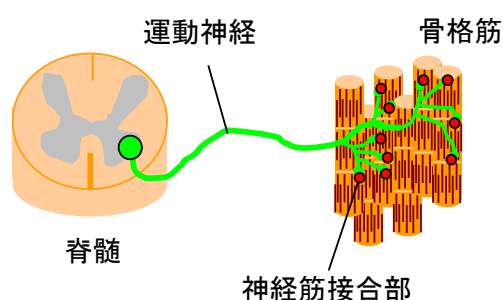
2. ECEL1/DINE ノックアウトマウスの四肢で運動神経の分岐異常を見出

上肢を発達過程に沿って観察したところ、ノックアウトマウスの運動神経は、途中まで正常に伸びていきましたが、標的の筋に至ると最終的な枝分かれの本数が極端に少なくなっていることが判明しました。上肢と同様の表現型は下肢でも認められました。さらに詳しい特徴を明らかにするため、10 種類以上の下肢の骨格筋で異常を定量的に評価したところ、腰や大腿、下腿では枝分かれの低下が通常の 30%程度の筋がある一方、足の運動神経では、調べた全ての箇所でも 70~80%の枝分かれの減少が確認されました。より遠位の領域での異常が強い傾向がみられ、この特徴は遠位関節拘縮症患者の特徴と一致していました。

3. 患者の遺伝子変異を導入したノックインマウスでも同様の異常を検出

遠位関節拘縮症患者では、1塩基程度のわずかな変異によって発症することが報告されています。1塩基置換によって、途中で ECEL1/DINE タンパクの翻訳が終了してしまう場合もあれば、ある特定のアミノ酸だけが別のアミノ酸に置換されて発症する場合があります。遠位関節拘縮症と運動神経の発達の関係をより深く理解するため、患者で同定された ECEL1/DINE 遺伝子の 1塩基置換型変異をマウスに組み込むことを試みました。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 によって、特定の塩基配列のみを切断し、修復過程を利用して 1塩基異なる DNA ドナーを導入しました。本研究では、760番目のシステインをアルギニンに置換しました。このようにして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に生直後に呼吸ができず死に至りました。さらに、下肢の骨格筋で運動神経の発達を調べたところ、ノックインマウスの運動神経では分岐が 50%以上低下していました。

正常



DINEの欠失や変異

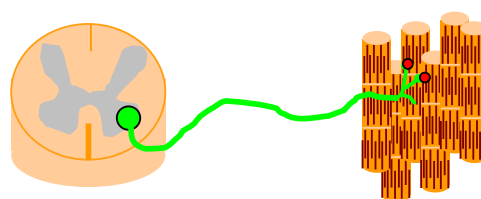


図: 本研究の成果

3. 今後の展開

本研究により、ECEL1/DINE の欠損あるいは遺伝子変異が遠位関節拘縮症の原因遺伝子であることがマウスで実証されました。ECEL1/DINE の遺伝子異常は、運動神経が骨格筋に至ってからの分

岐異常を起こし、これが筋の運動機能の低下につながり、結果的に関節拘縮を起こしていると考えられます。現在 ECEL1/DINE の基質が不明ですが、これを明らかにすることにより治療の可能性が開かれます。また、運動神経分岐異常の分子メカニズムを解明することにより、神経筋接合部形成の新たなメカニズムが解明されることが期待されます。

4. 発表雑誌

Kenichi Nagata*, Sumiko Kiryu-Seo, Hiromi Tamada, Fumi Okuyama-Uchimura, Hiroshi Kiyama*, Takaomi C Saido*, (*co-corresponding authors) (2016) ECEL1 mutation implicates impaired axonal arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogryposis, *Acta Neuropathologica*, (英国時間 2016 年 3 月 8 日オンライン)

English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical/en/res/ResearchTopics/2015/dine_20160309en.pdf