



## 二分脊椎の責任遺伝子の同定

小森 裕美子 (こもり ゆみこ)

関西医科大学脳神経外科学講座 助教

この度は、第30回（2023年度）の研究助成において採択いただき、財団の皆様、賛助会員の皆様、そして貴重なご寄付を下された皆様に心から御礼申し上げます。

私は、医師免許を取得してから一貫して臨床医として小児を中心とした脳神経外科診療に従事してまいりました。その過程で経験した先天異常に関する業績を纏めて、医学博士の学位を取得しました。また、科研費基盤研究に研究協力者として参加し、ゲノム編集マウスの4系統を確立しました。この先行研究では、先天性の難病である二分脊椎の原因遺伝子を同定し、ゲノム編集マウスにおける病態の再現および、機能不全のメカニズムを明らかにしました。

二分脊椎は、神経組織が露出した状態で生まれてくる開放型の脊髄髄膜瘤（図1）と、病変部が皮膚により閉鎖された状態で生まれてくる潜在性二分脊椎の両方を含みます。本邦では年間1000出生に1名前後の患者さんが生まれていると推定されています。特に、脊髄髄膜瘤は発達の遅れを引き起こす水頭症や、呼吸や嚥下障害を来す原因となるキアリII型奇形を合併し、生涯にわたって継続的な医療ケアが必要です。この疾患は日本では指定難病118番に指定されています。現在、二分脊椎の予防法や根治療法の開発が期待されていますが、創薬のターゲットが不明なままです。

二分脊椎は神経管の形成過程において異常が生じていると考えられており、遺伝的な要素が60～70%と推測されています。この患者さんのおよそ2.5%にVANGL1遺伝子の変異が関与しています。また、母体が葉酸を摂取することで二分脊椎の発生率が低減することが知られています。したがって、葉酸代謝や酸化ストレスに関連する遺伝子が発病に関与する可能性があります。しかしながら、その他の大多数の患者さんにおける原因とされる遺伝子は特定されていませんでした。

私たちは、二分脊椎の患者の全ゲノム解析による遺伝子変異の同定を試みました。その結果、8種類の遺伝子がこの疾患に関わっている可能性を見いだしました（図2）。それらから、1）遺伝子をノックアウトした動物モデルにおいて二分脊椎の原因となることが確認されている遺伝子、2）これまでヒトでは原因となる変異が特定されていない遺伝子、3）今回の検討で親子が同じ疾患を持つ例について、親子ともに変異があるもの、4）他の症例にも変異がみられる遺伝子、という条件を満たす転写因子をコードする2つの遺伝子を同定しました（図3）。

これまでの成果を踏まえて、本研究では、私たちが発見した転写因子に焦点を当て、二分脊椎の予防法の開発を目指します。具体的には、遺伝子変異マウスの作製、そのマウスにおける転写因子の発現の検証、さらには転写因子の発現パスイの解明を行います。

二分脊椎の患者さんから同定された遺伝子変異により、マウスでも形態に異常が発生するかどうかを、ゲノム編集により検討します。形態の評価には、出生したマウスの尻尾の形態を観察します（図4）。その後、小動物実験用マルチモダリティ SPECT/CT を使用して脊椎の形態異常を検証します。さらに、この遺伝子変異マウスの胎生期における転写因子の発現への影響を免疫組織化学法で評価します。特に、神経管の形成時期の神経板に着目します。さらに、私たちが同定した2つの遺伝子の発現パスイで共通している遺伝子の発現パターンを解析し、責任遺伝子を同定します。

本研究は、二分脊椎に対する新たな創薬ターゲットを明らかにします。さらに、神経管の形成を促進する新薬の研究を行い、二分脊椎の予防法を開発していく予定です。

## 二分脊椎の責任遺伝子の同定



図1.脊髄髄膜瘤

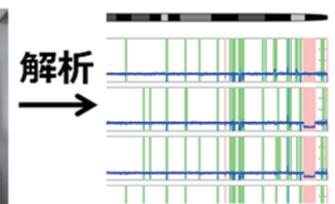


図2.全ゲノム解析



図4.ゲノム編集

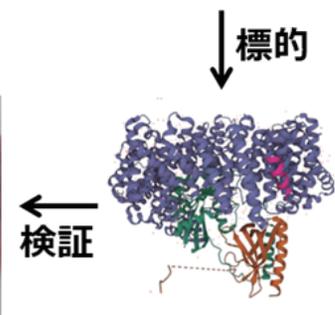


図3.転写因子



## *Pax3* 遺伝子へのレトロトランスポソンの挿入が神経管閉鎖不全を引き起こすメカニズムの解明

石塚 佑太 (いづか ゆうた)

川崎医科大学病態代謝学 講師

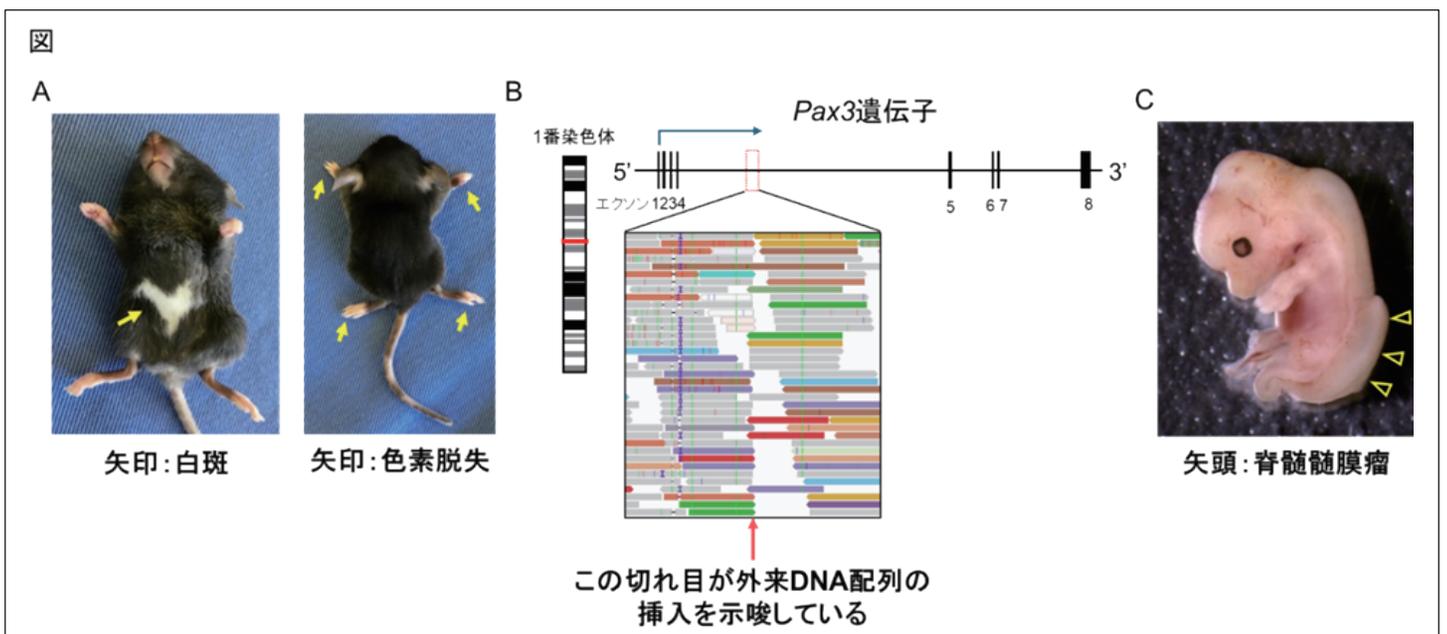
この度は、日本二分脊椎・水頭症研究振興財団の第30回(2023年度)研究助成に採択いただき、財団関係者の皆様、賛助会員の皆様に心より御礼申し上げます。私は、新潟大学脳研究所で学位を取得しましたので、脳研究所所長であられた故・生田房弘先生(新潟大学名誉教授)が、貴財団の創設時から選考委員長として審査に携わっておられたことに不思議なご縁を感じております。

私たちは実験用マウスを飼育・管理している過程で、腹部および手足に色素脱失と神経管閉鎖不全による二分脊椎を呈するマウスを偶然発見し、本研究の着想を得ました(図A)。色素脱失と二分脊椎を呈するヒトの疾患としては Waardenburg 症候群が知られています。その原因は発生初期の神経管に由来する神経堤細胞の分化・遊走異常とされており、現在まで6つの原因遺伝子—*PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *EDNRB*, *EDN3*—が同定されています。私たちは上述の自然発生色素脱失マウスの原因遺伝子を解析し、*Pax3* 遺伝子のイントロン4に約5 kbpのレトロトランスポソンが挿入されていることを見出しました(図B)。色素脱失マウス同士を交配したところ、片方の *Pax3* 遺伝子に変異を持つマウスは100%腹部および手足に色素脱失を呈し、一部のマウスでは二分脊椎や水頭症を呈しました。一方、両方の *Pax3* 遺伝子に変異を持つマウスはほぼ100%神経管閉鎖不全による脊髄髄膜瘤を呈し、胎生致死であることを見出しました(図C)。*Pax3* 遺伝子の変異マウスはこれまでに複数の報告がありま

すが、レトロトランスポソンの挿入を原因とする報告はありません。レトロトランスポソンの挿入が原因の疾患としては、福山型筋ジストロフィー(Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: FCMD)が知られています。この疾患は、原因遺伝子 *fukutin (FKTN)* の3'側非翻訳領域へのレトロトランスポソンの挿入によるスプライシング異常が原因とされており、私たちの発見した色素脱失マウスでも、*Pax3* 遺伝子へのレトロトランスポソンの挿入によってスプライシング異常が起こり、*PAX3* の機能欠損によって色素脱失や二分脊椎、水頭症、脊髄髄膜瘤を呈すると推定しています。

本研究では、まずレトロトランスポソンの挿入配列と *Pax3* 遺伝子の転写配列を解析することで *Pax3* 遺伝子に生じているスプライシング異常を証明し、次に、マウスの表現型を詳細に解析することで神経管閉鎖不全の病態解明に有用な新規モデルマウスとして確立したいと考えています。また、神経堤細胞の初代培養、神経管オルガノイドの作製に取り組み、*PAX3* の異常が神経管の閉鎖不全を引き起こす病態メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指します。

二分脊椎や水頭症といった神経管閉鎖不全症の患者さんの治療や予防に役立つ研究成果を上げることができるよう、チーム一丸となって研究に取り組んでまいります。今後ともご指導ご鞭撻のほど、宜しくお願い致します。





## 既存の地域住民コホート研究データを用いた繊毛鞭毛関連タンパク遺伝子変異と特発性正常圧水頭症との関連の検討

宮田 潤 (みやた じゅん)

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科  
離島・へき地医療学講座 助教

この度は、日本二分脊椎・水頭症研究振興財団の第30回(2023年度)研究助成に採択頂き、貴財団の皆様、ならびに賛助会員の皆様にご心より御礼申し上げます。

私は2012年に筑波大学を卒業し、その後臨床医として総合診療分野に従事しながら、2018年に大阪大学大学院医学系研究科社会医学講座公衆衛生学教室に進学し、地域住民コホート研究(対象地域の住民を登録し、生活習慣や各種バイオマーカーなどと、その後の病気の発症との関連を調査していく研究)などの疫学研究を行ってまいりました。2022年4月より、長崎県と五島市による寄附講座である長崎大学離島・へき地医療学講座の助教に着任し、Nagasaki Islands Study (NaIS) という5,000人規模の地域住民コホート研究の運営に携わっております<sup>1)</sup>。

まず、今回の研究の基盤となるNaISについて説明します。NaISは、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、長崎大学原爆後障害医療研究所などの複数の研究室によって2014年に立ち上げられました。研究参加に同意して頂いた住民に対し、市の一般住民健診の際に、独自に生活習慣の調査や、動脈硬化や骨粗しょう症、歯周病などのスクリーニングを行っているほか、健診のため採取した血液検体の一部を遺伝子解析等のために凍結保存しています(図1)。また、参加されている住民が研究登録後に心筋梗塞、脳卒中や骨折などの疾患を発症していないか調べるため、五島市内の医療機関で追跡調査を行っています。

次に、今回の研究テーマについてご説明します。近年、特発性正常圧水頭症(iNPH)患者さんの家系において、繊毛鞭毛関連タンパク遺伝子の1つであるCFAP43遺伝子の機能喪失性変異(タンパク質ができなくなる変異)が報告されています<sup>2)</sup>。日本人一般集団でのこの変異のアレル頻度(個々の染色体上のDNA配列をアレルといいます)は、東北メディカル・メガバンクTMM54KJPNの公開データによると0.16%と比較的高く<sup>3)</sup>、iNPHの発症原因を説明できる可能性があります。そこで私たちは、NaISの保存DNA検体と、五島市内の医療機関における発症調査データや頭部CT・MRI検査の画像をもとに、前述の変異とiNPHの発症との関連を検証することにしました。

本研究ではまず、NaISの研究参加者の

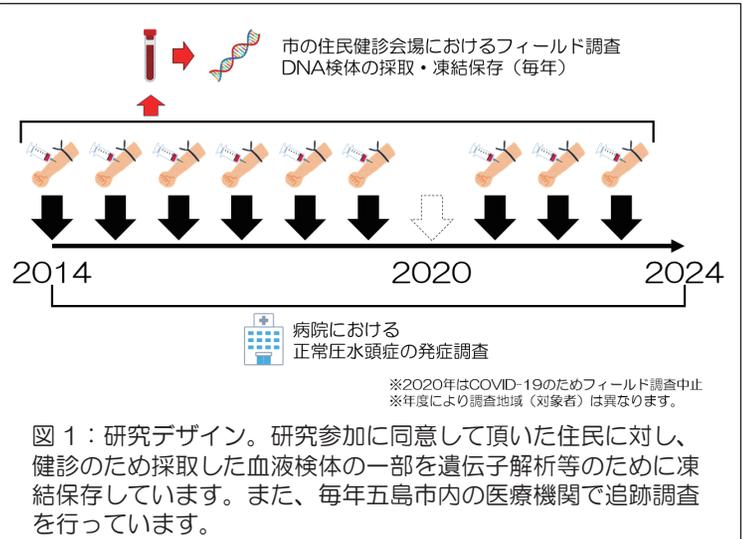


図1: 研究デザイン。研究参加に同意して頂いた住民に対し、健診のため採取した血液検体の一部を遺伝子解析等のために凍結保存しています。また、毎年五島市内の医療機関で追跡調査を行っています。

中からiNPHを発症された方を特定した上で、DNA検体を用いてCFAP43などの線毛関連遺伝子の変異解析を行い、発症者において変異が認められる遺伝子(候補遺伝子)を検索します(図2a)。次に、iNPHの発症者に加えて、年齢・性別をマッチングさせた未発症者の保存検体に対して、検出された変異の有無を分析します(図2b)。発症者と未発症者における遺伝子変異の頻度の差を統計学的に解析し、各候補遺

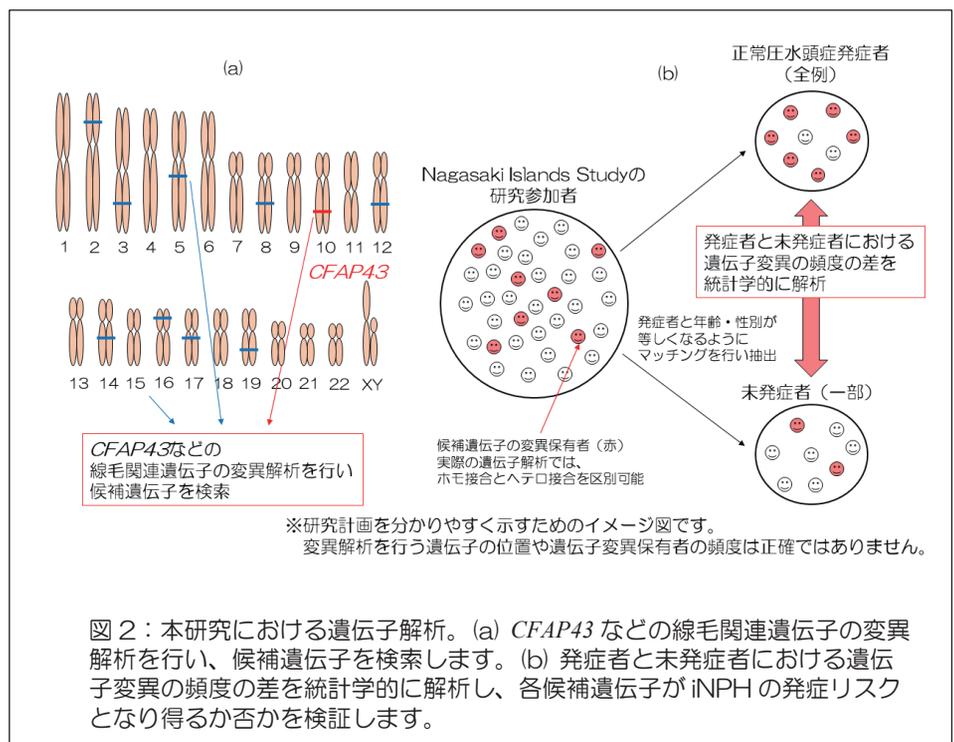


図2: 本研究における遺伝子解析。(a) CFAP43などの線毛関連遺伝子の変異解析を行い、候補遺伝子を検索します。(b) 発症者と未発症者における遺伝子変異の頻度の差を統計学的に解析し、各候補遺伝子がiNPHの発症リスクとなり得るか否かを検証します。

伝子が iNPH の発症リスクとなり得るか否かを検証する方針です。

本研究の強みは、5,000 人規模の地域住民コホート研究の参加者からサンプリングを行い、未発症者集団と発症者集団の遺伝子解析結果の比較を行えること、また 2014 年以降、最長 9 年間の自然歴を追跡できることです。さらに、NaIS は離島である長崎県五島市で行われ、島内で頭部 CT・MRI を実施できる医療機関は限られていますので、網羅的な発症調査が可能になります。本研究の成果は、iNPH の発症前リスクの評価や、分子標的薬の創薬等につながる可能性があります。引き続きのご支援、よろしくお願い申し上げます。

#### 引用文献

1. Miyata J, et al. Profile of Nagasaki Islands Study (NaIS): a population-based prospective cohort study on multi-disease. *J Epidemiol.* 2023 Jul 29.
2. Morimoto Y, et al. Nonsense mutation in *CFAP43* causes normal-pressure hydrocephalus with ciliary abnormalities. *Neurology.* 2019;92(20):e2364-e2374.
3. Japanese Multi Omics Reference Panel. <https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/> (2024/3/16 アクセス)

## 事務局からのおたより

寒暖を繰り返しながら本格的な春に向かっていきます。機関誌前号 30-5 に続き、本号では助成対象になりました研究課題について詳しく掲載させていただきます。

### 第 26 回理事会・臨時評議員会・第 30 回研究助成金贈呈式

2 月 18 日、第 30 回研究助成金贈呈式がホテルオークラ神戸で開催され、3 名の先生方が受賞されました。澤田理事長から贈呈書が手渡され、「研究費や時間に制限がある中で一生懸命に研究しておられると思います。しかしそういうさまざまな制約の中で良いアイデアが生まれるものです。制約によってやる気もでできます」という意味の言葉が述べられました。その後、先生方の所属されている大学や研究室の様子、実験最中の鮮明な写真や図表などと共に研究の内容が紹介されました。日々充実した研究活動をされていることがわかるプレゼンテーションに感銘を受けました。財団役員、選考委員長は受賞者にお祝いと激励の言葉を、そして長嶋会長から本課題を選考して下さった選考委員の先生方への謝辞が述べられました。

コロナの感染拡大のために令和元年（2019 年）度から令和 3 年（2022 年）度、第 26、27、28 回贈呈式は開催できませんでした。再び贈呈式ができるようになって、その意義を痛感しています。受賞された先生方と直接お会いし、お人柄に触れることで、一生懸命研究に取り組んでおられるお姿を想像することができます。より一層応援させていただきたいという思いが湧いてきます。

助成総額は 30 年で 1 億円を越えました。「塵も積もれば…」といいますが、皆様からお預かりしたご支援は決して塵ではありません。いずれ大きな成果を実感する日が必ずくると思



います。その日を想像しながら、公益法人の務めを日々果たしてまいりたいと思います。来年度も皆様の変わらぬご指導をお願いいたします。

九十九そのえ (3/18)

### Brain and Spinal Cord "B & C" Vol. 30-6

- Contents
- ① 研究助成… 小森 裕美子
  - ② 研究助成… 石塚 佑太
  - ③ 研究助成… 宮田 潤
  - ④ 事務局からのおたより

発行日：2024年3月20日 発行者：長嶋 達也 編集者：九十九 そのえ

### 公益財団法人 日本二分脊椎・水頭症研究振興財団

〒654-0047 神戸市須磨区磯馴町 4-1-6

Tel: 078-739-1993 Fax: 078-732-7350

E-mail: jsatoshi@xa2.so-net.ne.jp

<https://spinabifida-research.com>