OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Baraitser-Winter syndromeにおけるACTB変異の機能解析
Author(s)	辻本, 貴行
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91866
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　辻本　貴行　　）	
論文題名	Baraitser-Winter syndromeにおける*ACTB*変異の機能解析

論文内容の要旨

【諸言】

Baraitser-Winter syndrome (BWS) は低身長、両眼隔離、眼瞼下垂、無脳回・脳回肥厚症等を特徴とする先天性の疾患である。本疾患における顎顔面領域の特徴として口唇口蓋裂が挙げられ、約20%の割合で発症する。口唇口蓋裂は顎口腔顔面領域における最も頻度の高い先天性疾患であり、その発症機序には口蓋発生中の障害が大きく関与している。口蓋発生には複数の遺伝的要因と環境的要因との相互作用が重要であり、口唇口蓋裂はそれらの要因の異常が原因となり発症する多因子性疾患であると考えられている。シークエンス技術の飛躍的な進歩により口唇口蓋裂の多くの遺伝的要因が明らかとなっているが、個々の遺伝的要因がどの様なメカニズムで口唇口蓋裂を発症するのかは不明な部分が多く更なる研究が必要である。

BWSの原因遺伝子の*Actin-β(ACTB)* はアクチン蛋白をコードすることで細胞骨格を構成するアクチンフィラメントを形成する。アクチン蛋白は数百にもおよぶタンパク質と結合して複合体を形成することにより様々な機能を果たすことが報告されている。代表的な機能としては、仮足形成による細胞の遊走や細胞間に局在することでの細胞接着等が挙げられる。しかしながらBWSに見られる*ACTB*の変異がどのようにこれらのアクチン蛋白の動態に寄与するかは未知な部分が多い。さらに、BWSは高い頻度で口唇口蓋裂を発症するがその発症機構については全く不明である。そこで、本研究では当科を訪れた口唇口蓋裂を伴うBWS患者から病的な*ACTB*のミスセンス変異(c.1043C>T: p.S348L)を同定し、その変異の口唇口蓋裂発症におけるメカニズムを解明する事を目的とした。

【材料および方法】

1、未診断疾患患者の遺伝子解析

当科を訪れるまで未診断であった両側性唇顎口蓋裂・両眼隔離・心房心室中隔欠損・頭蓋骨形成不全を有する9歳男児およびその両親から同意を得たうえで採血を行い、エクソームシークエンスを行った。

2、顎顔面発生段階における部位特異的な*Actb* mRNA・ACTB蛋白の発現解析

実験動物は胎生9.0, 10.5, 14.5日のICR系統野生型マウス胎仔を使用し、*in situ* hybridization法を用いて*Actb*の検出を行った。胎生14.5日マウス胎仔の凍結切片を作製し、抗ACTB抗体・抗E-cadherin抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。

3、変異ACTB (p.S348L) を強制発現させたMDCK細胞における細胞遊走の解析

GFP-ACTB結合蛋白を発現するpcDNA3ベクター (野生型ACTB発現ベクター) とGFP-変異型ACTB (p.S348L) 結合蛋白を発現するpcDNA3ベクター (変異型ACTB発現ベクター) を作製し、それぞれMDCK細胞に遺伝子導入した後、創傷治癒アッセイを行い固定染色による観察とタイムラプスによる経時的観察を行った。

4、変異型ACTB (p.S348L) を強制発現させたMDCK細胞における変異型ACTBの局在

野生型ACTB発現ベクターと変異型ACTB発現ベクターをそれぞれMDCK細胞に遺伝子導入した後、37℃、5%二酸化炭素気相下にて培養した。24時間培養後固定し、Alexa Flour594ファロイジンプローブ・DAPIにて染色し観察した。

5、変異型ACTB (p.S348L) の重合に与える影響

野生型ACTB発現ベクターと変異型ACTB発現ベクターをそれぞれMDCK細胞に遺伝子導入した後、37℃、5%二酸化炭素気相下にて培養した。24時間培養後LatrunclinA (アクチン重合阻害剤) を添加し、固定染色による観察とタイムラプスによる経時的観察を行った。

6、変異型ACTB (p.S348L) とともにProfilinを強制発現させることによる重合脱重合への影響

RFP-Profilin結合蛋白を発現するpcDNA3ベクター (Profilin発現ベクター) を作製し、変異型ACTB発現ベクターとともにMDCK細胞に遺伝子導入した後、37℃、5%二酸化炭素気相下にて培養した。24時間培養後固定し、Alexa Flour350ファロイジンプローブ・DAPIにて染色し観察した。

【結果】

1、未診断疾患患者の遺伝子解析

患児のみにおいてのみPathogenicな*ACTB*のミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) を同定した。

2、顎顔面発生段階における部位特異的な*Actb* mRNA・ACTB 蛋白の発現解析

胎生9.0日のマウス胎仔では*Actb* mRNAは全身に一様に発現していることを確認した。一方、胎生10.5日では鼻上顎突起や前後肢芽により強い発現を認め組織毎に異なった発現強度を示した。また、胎生14.5日では二次口蓋癒合部、特にその上皮組織に*Actb* mRNAの強い発現を認めた。さらにmRNAと同様に口蓋突起癒合時の上皮組織にACTB蛋白の強い集積を認めた。これらのことから、ACTBは胎児期における顎顔面発生過程、特に二次口蓋突起癒合時に上皮細胞において強く発現していることが示された。

3、変異型ACTB (p.S348L) を強制発現させたMDCK細胞における細胞遊走の解析

変異型ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群では野生型ACTB強制発現細胞群に比べて細胞遊走した面積が低下していることが示された。さらに、創傷治癒開始後に固定・細胞染色を行った結果、野生型ACTB強制発現細胞では遊走方向に活発なラメリポディアの形成を認めたのに対して変異型ACTB (p.S348L) 強制発現細胞においてはラメリポディアの形成異常が認められた。これらの結果から変異型ACTB (p.S348L) を強制発現させた細胞はラメリポディアの形成不全等を引き起こし細胞遊走に影響を与える事が示唆される。

4、細胞間接着部位における野生型および変異型ACTB (p.S348L) の局在

野生型ACTB強制発現細胞ではGFPで標識された野生型ACTBが細胞間接着部位に優位に局在するのと比較して、変異型ACTB (p.S348L) 強制発現細胞ではGFPで標識された変異型ACTB (p.S348L) は細胞間接着部位への局在が限定的であることを確認した。また、細胞間接着部のGFP輝度を計測した結果からも変異型ACTB (p.S348L) が野生型ACTBと比較して優位に細胞間接着部位への局在が抑制されている事が示された。

5、変異型ACTB (p.S348L) の重合に与える影響

野生型ACTB強制発現細胞において、LatrunclinA投与前に比べて投与後ではPhalloidinの著しい断片化が認められた。また興味深い事に断片化されたPhalloidinとGFPで標識された野生型ACTBが共局在を示す部位が多く認められた。一方、変異型ACTB (p.S348L) 強制発現細胞においてはLatrunculinAを添加後にPhalloidinの断片化を認めたもののGFPで標識された変異型ACTBの局在に大きな変化は認めなかった。これらの事から変異型ACTB (p.S348L) は適切にアクチンフィラメントを形成する能力を喪失しており、細胞内における適切な部位に局在する能力が低いことが示唆された。

6、変異型ACTB (p.S348L) とともにProfilinを強制発現させることによる重合脱重合への影響

野生型ACTB強制発現細胞に比べて変異型ACTB (p.S348L) 強制発現細胞ではGFPにより標識された変異型ACTB (p.S348L) の細胞間結合部位への局在が低下していることが確認されたが、変異型ACTB (p.S348L) とともにProfilinの発現ベクターを強制発現させた細胞ではGFPにより標識された変異型ACTB (p.S348L) の細胞間接着部位への局在が回復する傾向が確認できた。これらの結果は、変異型ACTB (p.S348L) はProfilinとの結合性が低下することにより重合異常が生じて異常な挙動を引き起こすことを示唆している。

【考察】

今回我々が同定した*ACTB*のミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) は上皮細胞においてProfilinとの結合不足に起因したアクチン分子多量体形成の異常が生じており、細胞内での局在変化やアクチンのダイナミクスが阻害されている事が示された。さらに、この機能異常が上皮組織の残存を引き起こすことで口蓋裂発生に関連していることが示唆された。

シークエンス技術の飛躍的な進歩により疾患の原因となる遺伝子変異も多数同定されているが、個々の遺伝子変異の機能解析は膨大な労力と時間を費やす必要があり、十分に行われていないのが現状である。本研究では同定された遺伝子変異の機能解析を行ったとともに、個々の遺伝子変異の機能解析をより効率的にできる有効な実験系であることが示された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　辻本　貴行　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教　授　山城　隆 副査　教　授　阪井　丘芳 副査　准教授　伊藤　祥作 副査　准教授　大川　玲奈	

論文審査の結果の要旨

本研究は口唇口蓋裂を伴う BWS 患者から病的な *ACTB* のミスセンス変異を同定した。さらに、この ACTB の機能異常が上皮組織の動態に影響することで口蓋裂発生に関与していることを証明した。今回の研究は口蓋裂の原因解明にとどまらず、アクチン関連分子の変異が原因となる疾患病態の機能解析を効率的に行う実験系を提唱したものである。

以上より、本研究は病的な *ACTB* のミスセンス変異が口唇口蓋裂を引き起こすメカニズムの一端を明らかにし、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。