

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05333

研究課題名(和文)放射線誘発二重鎖切断損傷修復に関与する新規疾患責任遺伝子の分子機能解析

研究課題名(英文) Analysis of a new genetic disorder caused by the deficiency in radiation-induced DNA double-strand break repair

研究代表者

中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：00533902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：コケイン症候群が疑われたが疾患原因が不明であった症例の解析から、放射線二重鎖切断修復機構の1つである非相同末端結合(NHEJ)が欠損した疾患として、新たにXRCC4症候群を定義した。同じNHEJ欠損性疾患のLIG4症候群の症例では免疫不全が認められるが、本研究で対象としたXRCC4症候群の患者では認められない。この原因を明らかにするため、変異型XRCC4の機能解析、患者由来細胞でのV(D)J組換えやクラススイッチ反応の調査を行った。さらに、より詳細な病態の解明を目指して疾患モデルマウスの作製を実施した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed an uncharacterised Cockayne syndrome like patient with normal NER (nucleotide excision repair) activity. We performed next-generation exome sequencing and identified pathogenic mutations in the XRCC4 gene, which encodes a non-homologous end joining (NHEJ) protein required for the ligation process. Our XRCC4 syndrome patient retained normal immune response, although LIG4 syndrome patients usually display immunodeficiency. Fibroblast cell lines derived from the XRCC4 and LIG4 patients showed significant radiation sensitivity. We performed plasmid-based V(D)J recombination assays for the XRCC4 patient cell lines. We are currently establishing model mice to further study molecular pathogenesis of XRCC4 syndrome.

研究分野：DNA修復学、人類遺伝学

キーワード：修復 DNA修復 NHEJ 遺伝性疾患

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者らは、遺伝性が疑われる小頭症や発育異常を示す症例の収集を実施し、その疾患責任遺伝子変異の同定を試みてきた。コケイン症候群も解析対象疾患の1つであり、小頭症、発育異常の他、早期老化様症状、日光過敏、特徴的な顔貌などを示す。コケイン症候群は、ヌクレオチド除去修復機構 (NER) のサブパスウェイの1つである、転写共役 NER (TC-NER) の先天的な欠損によって発症する。

コケイン症候群が疑われるものの、疾患原因が不明であった1症例を解析したところ、TC-NER は正常であり、コケイン症候群とは別の疾患であることが示唆された。そこで、次世代ゲノム解析 (全エクソーム解析) を実施したところ、放射線二重鎖切断 (DSB) 修復の1つである非相同末端結合 (NHEJ) に関与する *XRCC4* 遺伝子上に疾患原因変異 (p. R225*/p. D254fs*68) が同定され、新たな疾患であることが示唆された (N-of-1)。両親の gDNA にて *XRCC4* の塩基配列を確認したところ、それぞれの片アレルに、患者で同定された各変異が1つずつ認められた。また、患者由来細胞にて、 γ H2AX を指標として放射線照射後の DSB の発生・消失のカイネティクスを調べたところ、健常人由来細胞と比べて損傷が長期間残留することが確認された。一方、レンチウイルスを用いて、患者由来細胞に野生型 *XRCC4* を発現させたところ、放射線照射後の γ H2AX のカイネティクスが正常に戻る事が確認された。

2. 研究の目的

新規疾患として *XRCC4* 症候群を確定したことから (N-of-2)、本患者にて同定された疾患原因変異の解析と病態の理解を目的とした。先天的な NHEJ の欠損は、DSB 修復活性の低下による放射線感受性だけでなく、V(D)J 組み換え/クラススイッチ反応の異常からくる免疫不全を呈すると予想される。NHEJ 関連因子で *XRCC4* と複合体を形成する *LIG4* の先天的な欠損により発症する *LIG4* 症候群では、放射線感受性と免疫不全がともに認められる。ところが、*XRCC4* 上に変異を同定した本患者では免疫系の異常は認められていない。そこで、*XRCC4* の変異機能解析と *XRCC4* 症候群の病態解明、特に NHEJ が欠損しているにも関わらず免疫不全を示さない原因を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

患者由来細胞での変異型 *XRCC4* の発現についてより詳細に調査したほか、変異型 *XRCC4* が他の NHEJ 関連因子へ及ぼす影響について細胞レベルで調査を実施した。患者由来細胞での他の NHEJ 関連因子の発現量・安定性を確認した他、野生型 *XRCC4* と変異型 *XRCC4* とで相互作用が変化する因子について免疫沈降法等を用いて観察した。また、NHEJ に関連

する因子および野生型/変異型 *XRCC4* のリコンビナント蛋白質を精製し、*in vitro* にてライゲーション活性の評価を実施した。また、本 *XRCC4* 症候群患者で見つかった変異型 *XRCC4* の存在下で、V(D)J 組換え頻度や連結部位の配列形状がどのような影響を受けるかなど、詳細な調査を行った。平行して、*XRCC4* 症候群の病態解明のため追加の症例探索を進めた。当研究室では、本患者以外にもコケイン症候群様の病態を示すが、NER 活性が正常かつ原因不明の症例を数十例保有していたことから、これらの症例について、 γ H2AX を指標とした放射線応答の調査と *XRCC4* の変異探索を行った。さらに、国内外より同様の症状を示す症例を多数収集し、NER 活性及び γ H2AX を指標とした DSB 修復応答のスクリーニングを実施した。スクリーニングの結果、NHEJ 欠損が疑われた症例について、ウイルス相補性試験にて *XRCC4* が疾患原因であるかを確認した。既知の関連因子の異常が疾患原因ではない可能性が高まった場合には、次世代ゲノム解析 (全エクソーム解析) にて、疾患原因変異の同定を試みた。これらにより追加の *XRCC4* 症候群あるいは新規の NHEJ 欠損性症例の探索を実施した。さらに、個体レベルでの詳細な病態解明を実現するため、*XRCC4* 症候群の疾患モデルマウス作製を試みた。

4. 研究成果

患者由来細胞での *XRCC4* 蛋白質の発現について、詳細に確認したところ、野生型蛋白質の発現はほとんど認められなかったが、*XRCC4* p. D254fs*68 変異産物が僅かに発現していることが確認された。*XRCC4* p. D254fs*68 は Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) を免れ、変異部位以降に正常とは異なる 68 アミノ酸が連結した全長 322 アミノ酸の C 末変異型 *XRCC4* 蛋白質を発現していると考えられた。*XRCC4* の発現は通常、核内で認められるが、患者由来細胞の解析から、このフレームシフト変異型 *XRCC4* は細胞質に局在することが判明した。*XRCC4* 欠損細胞での変異型 *XRCC4* の強制発現によっても同様の結果を得た。さらに、変異型 *XRCC4* の大部分はプロテアソームによって分解されていることが明らかとなった。

変異型 *XRCC4* が僅かに発現していることが判明したことから、変異型 *XRCC4* が NHEJ 関連因子に与える影響について調査を進めたところ、変異型 *XRCC4* と XLF との相互作用が弱まっていること、患者由来細胞では *XRCC4* だけでなく、*LIG4* の発現も低下していること等が明らかになった。また、蛍光標識した DNA 断片と、精製した野生型 *XRCC4* あるいは変異型 *XRCC4* と関連因子 (XLF、*LIG4*) を用いて、*in vitro* にて、ライゲーション活性の比較検討を行った。しかし、野生型 *XRCC4* と変異型 *XRCC4* のライゲーション活性に差は認められなかった。これらのことから、本 *XRCC4* 症候

群では、XRCC4 の発現量低下により LIG4 が不安定化し、LIG4 の発現量も低下することで疾患を発症していると考えられた。

次に、XRCC4 症候群患者で免疫系の異常が見られない原因を明らかにするため、患者由来細胞で欠損している NHEJ に関して、詳細に調査した。患者由来細胞にて NHEJ のサブパスウェイごとの活性について調べた結果、Alt-NHEJ (alternative NHEJ) への影響はほとんど見られず、C-NHEJ (classical NHEJ) の活性が低下していることが示唆された。また、患者由来細胞での V(D)J 組換え/クラススイッチ反応について調査するため、患者由来細胞中でプラスミドを用いて V(D)J 組換え反応を再現し、結合部位の配列を明らかにする解析や、クラススイッチ反応による結合部位の配列形状を調査する解析等を実施したが、免疫不全につながると思われる異常な応答反応・配列形状は認められなかった。

XRCC4 症候群の病態についてより多くの情報を得るため、また細胞レベルの解析対象を増やすため、追加の症例収集を継続的に行った。しかし研究期間中には、既存症例および新規収集症例いずれからも新たな XRCC4 症候群の症例を得ることはできなかった。他方、新規収集症例の中で、本 XRCC4 症候群と同様にコケイン症候群を疑われたものの疾患原因不明であった症例の解析から、未知の遺伝子上に疾患原因変異候補を検出した。本遺伝子は機能未知であったが、細胞レベルの解析から DSB 修復への関与の可能性が示唆されたこと、また XRCC4 症候群と病態が類似することから、XRCC4 との関連を疑ったが、現在までに両者を繋ぐ直接的な証拠は得られていない。ヒトの症例収集と平行して、XRCC4 症候群のモデル動物を作製・解析することで、直接的な個体の病態解明を目指した。ヒト疾患型 XRCC4 変異マウスの作製に取り組み、その樹立に成功した。XRCC4 ノックアウトマウスは胎生致死であるとの報告があることから、我々の樹立したヒト疾患型マウスは、今回の研究対象の XRCC4 症候群患者と同様に、微量の XRCC4 蛋白質/変異型 XRCC4 蛋白質を発現していると考えられるが、詳細な解析はこれからである。本マウスの病態解明を実施することで、放射線感受性 (NHEJ 修復機構) と免疫不全 (V(D)J 組換え/クラススイッチ反応) との関係性について、新たな見解が得られると期待される。加えて、本モデルマウスは、XRCC4 症候群にて見られる小頭症や発育異常、神経変性など他の症状を発症するメカニズムの解明にも貢献すると期待され、引き続き解析を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

*equal contribution

- ① Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M,

Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations.

Journal of Human Genetics, **63**: 417-423 (2018). doi:

10.1038/s10038-017-0408-5. 査読有

- ② Calmels N, Botta E, Jia N, Fawcett H, Nardo T, Nakazawa Y, Lanzafame M, Moriwaki S, Sugita K, Kubota M, Obringer C, Spitz MA, Stefanini M, Laugel V, Orioli D, Ogi T, Lehmann AR. Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome.

Journal of Medical Genetics, **55**:

329-343 (2018). doi:

10.1136/jmedgenet-2017-104877. 査読有

- ③ Yasuda T, Kagawa W, Ogi T, Kato TA, Suzuki T, Dohmae N, Takizawa K, Nakazawa Y, Genet MD, Saotome M, Hama M, Konishi T, Nakajima NI, Hazawa M, Tomita M, Koike M, Noshiro K, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, Ui A, Fujimori A, Nakayama F, Hanaoka F, Sugasawa K, Okayasu R, Jeggo PA, Tajima K. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. *PLoS Genetics*, **14**: e1007277 (2018). doi:

10.1371/journal.pgen.1007277. 査読有

- ④ Tsuda M, Cho K, Ooka M, Shimizu N, Watanabe R, Yasui A, Nakazawa Y, Ogi T, Harada H, Agama K, Nakamura J, Asada R, Fujiike H, Sakuma T, Yamamoto T, Murai J, Hiraoka M, Koike K, Pommier Y, Takeda S, Hirota K. ALC1/CHD1L, a chromatin-remodeling enzyme, is required for efficient base excision repair. *Plos One*, **12**: e0188320 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0188320. 査読有

- ⑤ Okuda M, Nakazawa Y, Guo C, Ogi T, Nishimura Y. Common TFIIH recruitment mechanism in global genome and transcription-coupled repair subpathways. *Nucleic Acids Research*, **45**: 13043-13055 (2017). doi:

10.1093/nar/gkx970. 査読有

- ⑥ Doi R, Tsuchiya T, Mitsutake N, Nishimura S, Matsuo-Matsuyama M, Nakazawa Y, Ogi T, Akita S, Yukawa H, Baba Y, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Kamohara R, Hatachi G,

- Sengyoku H, Watanabe H, Obata T, Niklason LE, Nagayasu T. Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells. *Scientific Reports*, **7**: 8447 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-09115-2. 査読有
- ⑦ Daigaku Y, Etheridge TJ, Nakazawa Y, Nakayama M, Watson AT, Miyabe I, Ogi T, Osborne MA, Carr AM. PCNA ubiquitylation ensures timely completion of unperturbed DNA replication in fission yeast. *PLoS Genetics*, **13**: e1006789 (2017). doi: 10.1371/journal.pgen.1006789. 査読有
- ⑧ Takahashi Y, Endo Y, Kusaka A, Nakamura S, Nakazawa Y, Ogi T, Uryu M, Tsuji M, Furue M, Moriwaki S. An XPA gene splicing mutation resulting in trace protein expression in an elderly xeroderma pigmentosum group A patient without neurological abnormalities. *British Journal of Dermatology*, **177**: 253-257 (2017). doi: 10.1111/bjd.15051. 査読有
- ⑨ Ono R, Masaki T, Mayca Pozo F, Nakazawa Y, Swagemakers SM, Nakano E, Sakai W, Takeuchi S, Kanda F, Ogi T, van der Spek PJ, Sugawara K, Nishigori C. A 10-year follow-up of a child with mild case of xeroderma pigmentosum complementation group D diagnosed by whole-genome sequencing. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, **32**: 174-180 (2016). doi: 10.1111/phpp.12240. 査読有
- ⑩ Tamura S, Higuchi K, Tamaki M, Inoue C, Awazawa R, Mitsuki N, Nakazawa Y, Mishima H, Takahashi K, Kondo O, Imai K, Morio T, Ohara O, Ogi T, Furukawa F, Inoue M, Yoshiura K, Kanazawa N. Novel compound heterozygous DNA ligase IV mutations in an adolescent with a slowly-progressing radiosensitive-severe combined immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, **160**: 255-260 (2015). doi: 10.1016/j.clim.2015.07.004. 査読有
- ⑪ Guo C*, Nakazawa Y*, Woodbine L*, Bjorkman A, Shimada M, Fawcett H, Jia N, Ohyama K, Li TS, Nagayama Y, Mitsutake N, Pan-Hammarstrom Q, Gennery AR, Lehmann AR, Jeggo PA, Ogi T. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **136**: 1007-1017 (2015). doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.007. 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Molecular pathogenesis underlying Cockayne syndrome and UV-sensitive syndrome. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ② 岡泰由, 中沢由華, 荻朋男. マルチオミクス解析による希少遺伝性疾患発症責任因子の同定. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ③ 中沢由華, 千住千佳子, 岡泰由, 嶋田繭子, 宮崎仁美, 郭朝万, 賈楠, 荻朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の疾患責任遺伝子変異の探索. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ④ Senju C, Nakazawa Y, Ogi T. A Novel Gene Mutation of Japanese Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F Patients. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ⑤ Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Very mild CS type-IV cases with mutations in the CSB gene. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2017 年
- ⑥ Oka Y, Nakazawa Y, Ogi T. Identification of pathogenic mutations in patients with rare diseases using multi-omics analysis. 日本プロテオーム学会 2017 年大会, 2017 年
- ⑦ 中沢由華, 賈楠, 嶋田繭子, 宮崎仁美, 千住千佳子, 郭朝万, 岡泰由, 荻朋男. DNA 修復機構欠損性疾患の病態解明研究. 第 2 回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス, 2017 年
- ⑧ 中沢由華, 岡泰由, 郭朝万, 賈楠, 唐田清伸, 嶋田繭子, 宮崎仁美, 千住千佳子, 荻朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑨ 賈楠, 中沢由華, 郭朝万, 唐田清伸, 岡泰由, 嶋田繭子, 宮崎仁美, 千住千佳子, 荻朋男. コケイン症候群と紫外線高感受性症候群の分子病態解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑩ 岡泰由, 郭朝万, 賈楠, 唐田清伸, 中沢由華, 荻朋男. トランスオミクス解析を用いた希少遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑪ 中沢由華. Screening of microcephaly cases to identify pathogenic mutations in DNA repair genes. The 10th 3R Symposium, 2016 年
- ⑫ Nakazawa Y. A Screening of Cockayne syndrome like patients identified a new class of disease associated with mutations in the XRCC4 gene. 10th

Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, 2016 年

- ⑬ 中沢由華、荻朋男、唐田清伸、郭朝万、岡泰由、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解析研究. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年
- ⑭ 荻朋男、中沢由華、唐田清伸、郭朝万、岡泰由、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の症例収集と病態解析研究. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年
- ⑮ 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年
- ⑯ 賈楠、中沢由華、荻朋男、唐田清伸、郭朝万、岡泰由、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. 各種コケイン症候群の分子診断. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年
- ⑰ 中沢由華、荻朋男、郭朝万、唐田清伸、岡泰由、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解析研究. 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 2015年
- ⑱ 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/index-sjis.html>

中沢由華. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索. 第39回日本分子生物学会年会優秀ポスター賞, 2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号: 00533902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

ジェゴ ペニー (JEGGO, Penny)