

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09644

研究課題名(和文) 先天性p53機能亢進型変異による新たな疾患モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new disease model by congenital p53 hyperactive mutation

研究代表者

中根 貴弥 (NAKANE, Takaya)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：90422683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、最近、先天性の小頭症、成長障害、免疫不全症、骨髄形成不全を呈する男児を経験した。この患者はp53変異を有し、その結果p53蛋白は機能が亢進し、特異的症状が生じると予想した。ヒトでは同等のp53変異の報告は、私たちが調べ得た限りでは未だない。私たちは、今回、高度骨髄機能不全患者で見出したC末欠失によるp53機能亢進型変異(p53CTD)と同等のp53変異を持つマウスを遺伝子編集技術により作成した。p53CTD/WTマウスはp53異常活性化の特徴である手足の高度色素沈着に加え、末梢リンパ球著減と大球性貧血を示した。

研究成果の概要(英文)：We recently experienced a boy with congenital microcephaly, pre- and post-growth failure, immunodeficiency, bone marrow failure. This patient had a p53 mutation, so that the function of p53 protein was enhanced and the specific symptoms were expected to occur. In humans p53 hyperactive mutation has not been reported as far as we could investigate. We created mice with a p53 mutation equivalent to p53 hyperactivity mutation (p53CTD) due to C-terminal deletion found in patients with advanced bone marrow dysfunction by genetic editing technique. p53CTD / WT mice showed a decrease in peripheral lymphocytes and macrocytic anemia in addition to hyperpigmentation of limbs which is a feature of p53 abnormal activation

研究分野：小児科

キーワード：p53

1. 研究開始当初の背景

p53 は「ゲノムの守護神」とも呼ばれる重要ながん抑制遺伝子である (Hartwell and Kastan, 1994)。DNA 損傷によって p53 は活性化され、DNA 損傷が重度の場合は細胞死へと向かうが、p53 機能が低下している場合には、細胞の異常増殖からがん化へと進行する。反対に p53 機能が亢進している場合には、細胞ストレスがなくても、アポトーシスが進行する。p53 の機能低下型変異が先天的に生じると家族性のがんを多発する LiFraumeni 症候群の原因となる。一方、p53 機能亢進型変異が先天的に生じるとどのような表現系を示すかはわかっていなかった。動物モデル：最近になって、p53 機能亢進型変異のホモ体のマウスが報告された (Simeonov et al., 2013)。p53 COOH 末端欠損 (31) をホモで持つモデルマウスでは、p53 蛋白が negative regulation を受けなくなるため、p53 活性が亢進し、アポトーシスが異常に亢進するとともにテロメアも短縮し、高度な造血障害、成長障害、肺線維症が生じる。

ヒトの症例 (自験例)：我々は、最近、先天性の小頭症、成長障害、免疫不全症、赤芽球癆を呈する男児を経験した。Diamond-Blackfan 貧血・ファンconi 症候群などの既知の原因遺伝子は、遺伝子変異解析や蛋白発現を調べて、いずれも有意な結果は得られなかった。テロメア長は正常範囲下限を示した。p53 遺伝子の解析を行ったところ (弘前大学小児科、伊藤悦郎先生、京都大学、小川誠司先生と共同研究。未発表) 末梢血単核球ゲノムにおいて p.Ser362AlafsX7(c.1279delA) というヘテロ変異を見いだした。この変異の部位が Simeonov たちがマウスに導入した p53 機能亢進型変異の部位と酷似していることから、p.Ser362AlafsX7(c.1279delA) もまた、p53 機能亢進型変異であると考えられた。私たちは動物モデルから推論し、ヘテロの p53 亢進型変異だけでは赤芽球癆などの症状は出現しないのではないかと考え、さらに合併するゲノム変異を検索したところ、色素性乾皮症の原因遺伝子である XPD 遺伝子変異 (c.519_522del, pL174Tfsx6 ; ヘテロ) の合併を見出した。同じ XPD 遺伝子変異を母親のゲノムでも確認した。色素性乾皮症は常染色体劣性遺伝疾患であり、通常ヘテロの変異では症状を示さない。

2. 研究の目的

53 と XPD の相互作用について、XPD 欠損線維芽細胞では、対照と比べて、少量の紫外線照射で p53 蛋白が誘導される (Dumaz et al., 1998)。以上のことを踏まえて、私たちは p53 活性化変異 (ヘテロ) と XPD 変異 (ヘテロ) が組み合わさることによって、p53 機能が著しく亢進する、と仮説を立てた。今回の研究の目的は、p53 機能亢進がどのように

して小頭症、成長障害、免疫不全症、赤芽球癆等の特異的な症状に結びつくのか、培養細胞・実験動物 (ゼブラフィッシュ・マウス) を用いて明確にすることであり、先天的な p53 機能亢進型変異がきわめて特徴的な疾患を形成するという新たな症候群のモデルをヒトで世界で初めて提示することである。

3. 研究の方法

新規の遺伝子導入方法である CrisperCas9 により正確に今回の患者でみられた遺伝子変異を実験動物で再現する。

(1) マウス p53・XPD 遺伝子配列から今回の症例の変異相当の部位に、ターゲット配列を設計。

(2) ターゲット配列を作成しベクター px330 (px330 は all in one vector で Cas9 ヌクレアーゼ活性を有する) に組み込み、大腸菌に導入して増幅する。

(3) B6 雄マウスから精子を、BDF 雌マウスから卵子を採取。体外授精を行い、受精卵の精子由来前核に、ターゲット配列を組み込んだ px330 ベクターをインジェクションする (F0 founder)。

(4) F0 founder どうし (p53 ノックアウトマウスと XPD ノックアウトマウス) 掛け合わせて、p53 と XPD がともにヘテロでノックアウトされている F1 founder を得る。遺伝子変異が導入されていることを、尾の一部を用いて、直接シーケンス法で確認し、表現型 (貧血、小頭症、成長障害) を調べる。

4. 研究成果

p53 遺伝子改変マウスの作成

高度骨髓機能不全患者で見出した C 末欠失による p53 機能亢進型変異 (p53CTD) と同等の p53 変異を持つマウス (c.1074_1075insC, p.Ser359GlnfsX20 : 末端の 32 アミノ酸の欠失) を遺伝子編集技術により作成した。

ウェスタンブロット

p53CTD/WT マウス (p53CTD のヘテロ体) について、ウェスタンブロットにより異常 p53 蛋白の検出を行ったところ、正常な p53 のバンドに加えて、異常な p53 に相当するバンドがあり、機能亢進型 p53 が実際に生成していることを確認した。

体重の確認

p53CTD/WT マウスは対照マウスと比較して、約 10-20% 程度体重が少なかった。

p53CTD/WT マウスは p53 異常活性化の特徴である手足の高度色素沈着を認めた。

寿命

p53CTD/WT と対照マウスで、寿命に有意差をみとめなかった。p53 CTD マウスで腫瘍の発生もみとめなかった。

末梢血液データ

表1 p53 CTD マウスと対照マウスの血液データ (生後5 - 6週齢)

Group	p53 CTDマウス		対照マウス	
	mean	sd	mean	sd
WBC	4.77	2.3324	7.526	3.239
	5	59	667	403
RBC	776	37.523	844.6	23.86
		33	667	071
HGB	13.2	0.2828	12.6	0.529
		43		15
HCT	46.9	1.3601	45.33	2.042
	5	47	333	874
MCV	60.5	1.7310	53.66	0.923
	5	88	667	76
PLT	382	18.690	300.6	25.40
		46	667	341
RET%	4.41	0.8928	7.283	0.224
	25		333	796
RET#	34.0	5.4465	61.48	0.196
	072	76	42	253
NEUT#	0.68	0.5182	0.593	0.200
	5	98	333	333
LYMPH#	4.04	1.8649	6.84	3.070
	5	31		44

HCT と NEUT#を除き、統計的有意差を認められた。p53 CTD マウスでは、末梢リンパ球著減と大球性貧血を示すことがわかった(表1)。

男性不妊

雄 p53CTD/WT マウスでは男性不妊を認め、肉眼では精巣の縮小(図では P53 1bp ins hetero と記載) 組織では精巣の高度の萎縮を認められた(図1, 2)。

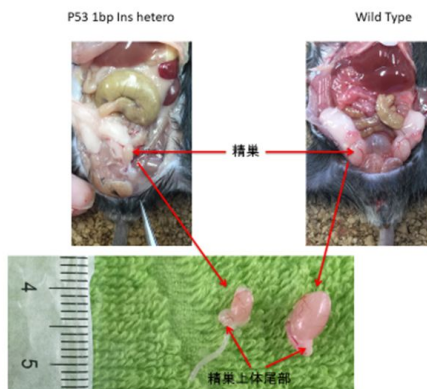


図1

組織標本(HE染色) 精巣

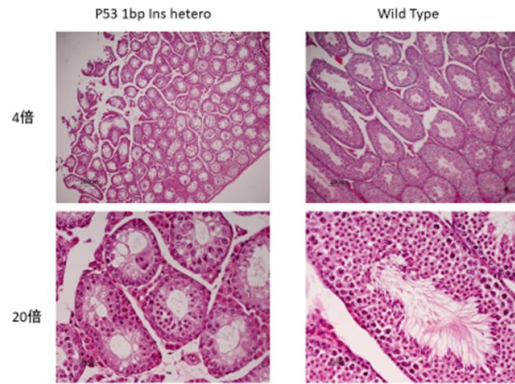


図2

造血幹細胞のコロニー形成細胞アッセイ
マウス/ラット造血幹細胞用メチルセルロース培地を用いて、赤血球系前駆細胞のBFU-E (erythroid burst-forming unit) とCFU-E (erythroid colony-forming unit) を調べたところ、p53CTD/WT は対照マウスと比べていずれも有意な低下を認めた(図3)。

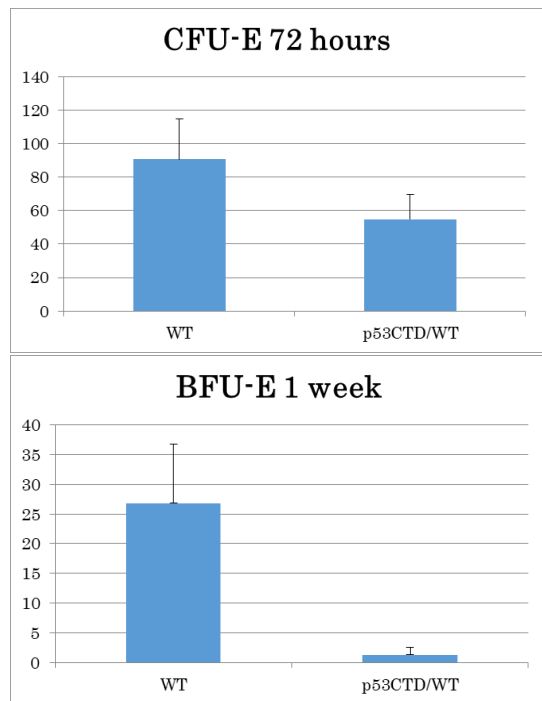


図3

3 Gy の全身放射線照射後 10 日で高度な貧血が生じ、その後短期間で死亡した。(私たちの患者では生後5日目に高度貧血が発見されているが、今回作成しモデルマウスでは放射線照射の刺激なしでは高度な貧血は生じないというように、患者と p53CTD/WT マウスでは症状の現れ方に違いがあった。

XPD 遺伝子改変マウスの作成

研究の発端となったヒトと同じ Xpd exon 7 にフレームシフトを生じる変異を導入した。Xpd 遺伝子改変マウスでは、変異導入遺伝子

による異常 Xpd 蛋白に相当するバンドはウェスタンブロットでは確認できなかった。おそらく変異導入遺伝子では Nonsense-mediated mRNA decay により、異常 XPD 蛋白が産生されないものと推測された。

掛け合わせ

p53CTD 変異と Xpd 変異をいずれもヘテロで有するダブルヘテロ体を作成した。p53CTD 単独変異体と比較して、若干体重、赤血球値などが小さい傾向があるが、統計的有意差を示すには至っておらず、さらに検討を続けているところである。

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 11 件)

1. Saito T, Nakane T, Narusawa M, Yagasaki H, Nemoto A, Naito A, Sugita K. Giant umbilical cord and hypoglycemia in an infant with Proteus syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018 May;176(5):1222-1224. doi: 10.1002/ajmg.a.38674. PubMed PMID: 29681107.
2. Koizumi K, Hoshiai M, Toda T, Nakane T, Sugita K. Marked pleural effusion after i.v. immunoglobulin therapy for Kawasaki disease. *Pediatr Int*. 2018 Mar;60(3):307-308. doi: 10.1111/ped.13489. Epub 2018 Feb 26. PubMed PMID: 29480538.
3. Yagasaki H, Toda T, Koizumi K, Sugiyama T, Ohyama T, Hoshiai M, Nakane T, Sugita K. A de novo 10.1-Mb 3p25 terminal deletion including SETD5 in a patient with ptosis and psychomotor retardation. *Pediatr Neonatol*. 2017 Sep 6. pii: S1875-9572(16)30389-8. doi: 10.1016/j.pedneo.2017.09.004. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 28951171
4. Saito T, Nakane T, Yagasaki H, Naito A, Sugita K. Shprintzen-Goldberg syndrome associated with first cervical vertebra defects. *Pediatr Int*. 2017 Oct;59(10):1098-1100. doi: 10.1111/ped.13354. Epub 2017 Aug 31. No abstract available. PMID: 28857439
5. Nakane T, Sawanobori E, Ohashi H, Sugita K. Hyperechoic renal medullary pyramids in a boy with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2018 Jan;27(1):25-26. doi: 10.1097/MCD.000000000000195.
6. Yagasaki H, Nakane T, Toda T, Kobayashi K, Aoyama K, Ichikawa T,

Sugita K. Carotid intima media thickness in a girl with sitosterolemia carrying a homozygous mutation in the ABCG5 gene. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017 Aug 28;30(9):1007-1011.

7. Kasai S, Furuichi Y, Ando N, Kagami K, Abe M, Nakane T, Goi K, Inukai T, Saitoh S, Ohno S, Okazaki S, Nagano O, Saya H, Sugita K. Inflammatory mediator ultra-low-molecular-weight hyaluronan triggers necrosis of B-precursor leukemia cells with high surface CD44 expression. *Cell Death Dis*. 2017 Jun 1;8(6):e2857. doi: 10.1038/cddis.2017.249. PubMed PMID: 28569787.

8. Yagasaki H, Murakami Y, Ohyama T, Koizumi K, Hoshiai M, Nakane T, Sugita K. Total energy intake accounts for postnatal anthropometric growth in moderately/late preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017 May;30(9):1080-1084. doi: 10.1080/14767058.2016.1201473. Epub 2016 Jul 4. PubMed PMID: 27296357.

9. Watanabe A, Nakane T, Kobayashi C, Ohyama T, Kise H, Yagasaki H, Toda T, Koizumi K, Hoshiai M, Sugita K. A Knotted Elemental Diet Tube in a Neonate: Serial Radiographs Demonstrating the Process of Loop Formation. *Pediatr Neonatol*. 2016 Apr 26. pii: S1875-9572(16)30035-3. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.12.004. [Epub ahead of print]

10. Yagasaki H, Nakane T, Hasebe Y, Watanabe A, Kise H, Toda T, Koizumi K, Hoshiai M, Sugita K. Co-occurrence of hypertrophic cardiomyopathy and myeloproliferative disorder in a neonate with Noonan syndrome carrying Thr73Ile mutation in PTPN11. *Am J Med Genet A*. 2015 Dec;167(12):3144-7. doi: 10.1002/ajmg.a.37295. Epub 2015 Aug 19.

11: Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kikuchi A, Goi K, Nakane T, Ikeno M, Noguchi Y, Uike N, Miyajima Y, Matsubara K, Koh K, Sugita K, Imaizumi M, Kure S. Analyses of genetic and clinical parameters for screening patients with inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Dec;62(12):2082-8. PMID:26175287

[学会発表](計 3 件)

1. 2017年8月30日(水)～31日(木)第23回 小型魚類研究会(甲府)Takaya Nakane, Masako Abe, Minori Tamai, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara, Yuko Nishiwaki, Ichiro Masai, Kanji Sugita. CRISPR/Cas9-mediated homozygous

knockout of xpd gene in zebrafish causes small eyes and forebrains, severe growth failure and early lethality

2. 2017年4月14日(金)~16日(日) 第120回日本小児科学会学術集会(東京)
Takaya Nakane, Masako Abe, Minori Tamai, Hiromune Narusawa, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara, Yuko Nishiwaki, Ichiro Masai, Kanji

Sugita.1CRISPR/Cas9-mediated homozygous knockout of xpd gene in zebrafish causes small eyes and forebrains, severe growth failure and early lethality

3. 2016年8月20日 第22回小型魚類研究会(岡崎) Abe M, Nakane T, Narusawa M, Ohga R, Ota S, Kawahara K, Sugita K. CRISPR/Cas9-mediated homozygous knockout of xpd in zebrafish causes small eyes and brains, severe growth failure and early lethality.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中根 貴弥 (NAKANE, Takaya)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号：90422683

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

杉田 完爾 (SUGITA, Kanji)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：60138055

合井 久美子 (GOI, Kumiko)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号：70324192

川原 敦雄 (KAWAHARA, Atsuo)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：10362518

若山 照彦 (WAKAYAMA, Teruhiko)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：40360672

(4)研究協力者

阿部 正子 (ABE, Masako)