

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16293

研究課題名(和文) X連鎖性疾患におけるX染色体不活性化機構の解析

研究課題名(英文) The analysis of X chromosome inactivation in X-linked disorders

研究代表者

加藤 君子 (Kato, Kimiko)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・研究員

研究者番号：30598602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Xq27.3q28領域の欠失は知的障害および運動発達遅滞の原因となる。本研究では、Xq27.3q28に欠失をもつが、症状の異なる2例の女児の解析を行った。患者の末梢血を用いてX染色体不活性化解析を行った結果、症状の重い患者1では、欠失のないX染色体が偏って不活性化されていた。一方、もう一方の患者ではランダムX染色体不活性化が認められた。また、HiCデータベースにより欠失領域のクロマチン高次構造の変化を調べた結果、患者1では劇的にクロマチン構造が変化する可能性が示された。以上のことから、X染色体不活性化状態やクロマチン高次構造の変化の違いが患者の症状の違いを与えたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Xq27.3q28領域に欠失をもつ女性に対しては、その重症度の評価にはX染色体の不活性化状態を調べるのが有効であることが示された。欠失をもつX染色体が偏って活性化している場合には、知的障害や運動発達遅滞の程度が重度になる可能性が考えられる。また、欠失領域を正確に同定することで、既存のHiCデータを活用したクロマチン高次構造(topologically associating domains, TADs)の変化予測が可能となる。TADsの変化により欠失領域周辺遺伝子の発現が変化する可能性があるため、TADsの変化を調べることも診断に有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A heterozygous deletion at Xq27.3q28 including FMR1, AFF2, and IDS causes intellectual disability and developmental delay. Here, I examined two female patients with different clinical features harboring Xq27.3q28 deletion. I assessed X chromosome inactivation (XCI) in peripheral blood from both patients. Both patients had almost overlapping deletion at Xq27.3q28, however the more severe patient (Patient 1) showed skewed XCI of the normal X chromosome (79:21) whereas the milder patient (Patient 2) showed random XCI. Next, we analyzed topologically associated domains (TADs) using published Hi-C data on the Xq27.3q28 region, and found that only patient 1 had a possibility of a drastic change in TADs. This might lead to misexpression of genes on neo-TADs and affect severe phenotypes of patient 1. Therefore, there is a possibility that the ratio of XCI of the normal X chromosome and TADs alteration influence the clinical differences of patients with deletion at Xq27.3q28.

研究分野：小児神経

キーワード：Xq27.3q28欠失 X連鎖性疾患 X染色体不活性化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

X染色体には、脳の発達に重要な多くの遺伝子がマップされており、それらの異常ではX染色体性の知的障害が見られる。女性には2本のX染色体、男性には1本のX染色体があるため、女性のX連鎖遺伝子の発現はX染色体不活性化という機構で厳密に制御されている。その破綻はX染色体が関与する様々な疾病の発症につながる。例えば、DNA結合タンパク質をコードし、X連鎖遺伝子であるMethyl-CpG binding protein 2 (MECP2)の発現量の増加や減少は脳神経疾患の発症に関与する。MECP2の変異は女兒ではRett症候群を呈し、男児では胎生致死である。Rett症候群患者は様々な病態を示すが、その重篤度は変異をもつMECP2が発現する細胞の比率と正の相関がある可能性が指摘されている。一方、MECP2重複を有する男児ではMECP2重複症候群を呈し、重度の知的障害を示す。しかし、MECP2重複をもつ女性では、重複をもつX染色体が特異的に不活性化されており、症状が認められない。これらのことは、X連鎖遺伝子に異常がある場合、遺伝的に不均衡な細胞に対して、異常のあるX染色体に強い不活性化(重複例)と弱い不活性化(変異例)の2つ選択が起きていることを示唆する。強い不活性化は、遺伝子変異により細胞の生存や増殖が影響を受け、細胞選択が起こるためと考えられているが、弱い不活性化は偶然によるのか、あるいは何等かのメカニズムにより制御されているのかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、Rett症候群女兒、MECP2重複症候群の母親、MECP2領域を含むX長腕端部欠失(Xq26-ter)欠失女兒のリンパ芽球と、各症例由来のiPS細胞を用い、MECP2に異常が生じた際に、それぞれどのようなメカニズムにより不活性化されるX染色体が選択されるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) X長腕端部欠失(Xq26-ter)欠失女兒における欠失領域の同定

今回新たに、MECP2領域を含むX長腕端部欠失(Xq26-ter)をもつ女兒検体を得た。検査会社によるGバンド解析では、2例の女兒は、ともにX染色体長腕末端が欠失し(Xq26-ter)他の染色体が挿入されている(以下、add(X))ことが示されていた。SNPアレイCGH、FISH、およびPCR法を用い、欠失領域および挿入領域を同定する。

#### (2) MECP2を含む領域に変異のある女性由来リンパ芽球におけるX染色体不活性化解析

add(X)に特異的に不活性化が起きていると仮定すると女兒には症状が出ないはずであるが、1例では重度の知的障害、もう1例では手もみなどのRett症候群様の症状が見られ、全てのadd(X)の完全な不活性化が起きていることが示唆された。一方、MECP2を含むXq27.3q28領域に10.6 Mbの欠失をもつが、欠失をもつX染色体が特異的に不活性化されているため、ほぼ無症状の女兒例も報告されている(Marshall et al., 2013)。このことから、X長腕端部欠失の患者の場合は、Rett症候群患者の場合と同様、変異X染色体の不活性化に強い選択は働かないと考えられる。Rett症候群女兒(2名以上)、MECP2重複症候群の母親(3名)、X長腕端部欠失(Xq26-ter)を有する女兒(2名)のリンパ芽球において異常X染色体の不活性化が起きているかどうかを、HUMARA解析、免疫染色などの手法を用いて明らかにし、X染色体の不活性化と病態との関係を明らかにする。

#### (3) 不活性化X染色体選択システムの解明

上述の患者末梢血からnaïve iPS細胞を作製し、神経分化過程において異常をもつX染色体がいつ、どのように不活性化されるのか、あるいは排除されるのかを明らかにする。これにより、強い不活性化と弱い不活性化過程において、どのようなメカニズムの違いがあるのかを明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究により、本研究で対象とした2例の患者ではGバンド検査で示されていたようにMECP2領域を含むX長腕端部欠失および他の染色体の挿入があるのではなく、FMR1、FMR2、IDSを含むXq27.1q28領域の同じような部位に欠失を持つことが明らかになった。これにより、当初予定していた研究計画を変更し、なぜほぼ同じ領域に欠失をもつにも関わらず症状が異なるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。なお、FMR1、FMR2、IDSを含むXq27.3q28欠失患者については10例程度の報告があり、本欠失により患者は精神遅滞および運動発達遅滞を呈することが示されている。3例の男児の報告例では、欠失領域の大きさに関わらず、上記3遺伝子の欠失により重篤な精神遅滞および運動発達遅滞を呈することが報告されている。一方、女性患者では、報告されている症状の重篤度は様々であった。女性特有に生じるX染色体不活性化が症状に関与することが示唆されるものの、それぞれの報告例によって欠失領域や診断基準が異なるため、臨床症状がX染色体不活性化に起因するのか、あるいは他の遺伝子の欠失によるものなのか明確に示されていない。本研究で対象とする2例の患者ではほぼ同じ領域に欠失があるため、X染色体不活性化の影響を直接的に調べることができると考えられた。

(1) 患者における X 染色体不活性化解析

患者末梢血を用い、HUMARA 解析を行った結果、症状の重篤な患者 1 では変異をもつ X 染色体が偏って活性化していることが明らかになった。一方、もう一例の患者 2 ではランダム X 染色体不活性化が認められた。患者末梢血由来リンパ芽球に対し、欠失領域に含まれる FMRP 抗体を用いて免疫染色を行った結果、末梢血で得られた結果と同様の結果が得られた。このことから、欠失を持つ X 染色体の不活性化の程度が患者の症状の重症度と相関がある可能性が示唆された。

(2) クロマチン高次構想変化予測

本研究ではアレイ CGH、FISH 解析、および PCR 法により、患者の欠失部位を正確に同定した。HiC data browser を用い、脳皮質におけるクロマチン高次構造 (topologically associating domains、TADs) が欠失によりどのように変化しうるかを予測した。興味深いことに、重症例である患者 1 では欠失により TADs が大きく変化し、*MECP2* を含む多くの遺伝子発現が変化する可能性が示された。一方、患者 2 では大きな変化は予測されなかった。これらから、TADs の変化も患者の症状に影響を与える可能性が考えられた。

以上の結果より、少なくとも Xq27.3q28 に欠失をもつ女児では、臨床症状や予後を考える上で、X 染色体不活性化の状態や TADs の変化を調べることを有効であることを提唱する論文を投稿し、採択された (Katoh et al., Human mutation. In press)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katoh K, Aiba K, Fukushi D, Yoshimura J, Suzuki Y, Mitsui J, Morishita S, Tuji S, Yamada K, Wakamatsu N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Human Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and molecular genetic characterization of two female patients harboring Xq27.3q28 deletion with different ratios of X chromosome inactivation.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.24058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤君子、相場佳織、福士大輔、鈴木康予、山田憲一郎、若松延昭
2. 発表標題 症状が異なるXq27.1q28欠失の2女児例のX染色体不活性化解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimiko KATOH
2. 発表標題 TWO FEMALE PATIENTS WITH Xq27.3q28 DELETION AND SKEWED X-INACTIVATION DISPLAY SIMILAR PHENOTYPES AS HUNTER SYNDROME
3. 学会等名 第23 回世界神経学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤君子、相場佳織、福士大輔、山田憲一郎、若松延昭
2. 発表標題 Xq27-q28に欠失が見られた1女児症例
3. 学会等名 第106回 東海臨床遺伝代謝懇話会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----