

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02624

研究課題名(和文) DNA二重鎖切断応答シグナルに応じた神経病態の決定機構の解明

研究課題名(英文) Neuro-pathological mechanism caused by impaired DNA damage response signaling

研究代表者

宮本 達雄 (Miyamoto, Tatsuo)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：40452627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断修復酵素MRE11ヌクレアーゼをコードするMRE11遺伝子は、変異タイプによって「運動失調」または「小頭症」の原因遺伝子となる。本研究では、ゲノム編集技術を用いて、MRE11 c.658A>Cスプライシング変異(小頭症型)とp.A47V変異(運動失調型)を導入したマウスを作製した。MRE11 c.658A>Cスプライシング変異ホモマウスは、ヒトと異なり、正常発生をした。一方で、MRE11 p.A47V変異ホモマウスは、ヒト同様にミオクローヌス様症状を示しており、神経変性疾患研究の有用な疾患モデル動物であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製したMRE11 A47Vミスセンス変異ホモ接合マウスは、神経変性疾患研究にとって有用なモデルマウスとして活用できる。また、本マウスの雄は生殖能力を有しているが、雌は不妊であった。本研究の予期せぬ成果として、MRE11の生殖細胞形成における寄与に性差があることが示されたと同時に、MRE11 A47Vミスセンス変異ホモ接合マウスは、生殖研究における新たな疾患モデルとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Germline mutations of the MRE11 gene, which encodes a DNA double-strand breakage repair enzyme MRE11 nuclease, cause neurodegeneration or microcephaly. Here we attempted to generate the MRE11 p.A47V mutation (ataxia-type)-homozygous mice and MRE11 c.658A>C splicing mutation (microcephaly type). Unfortunately, the MRE11 c.658A>C splicing mutation homozygote did not any neurological phenotypes. In contrast, the MRE11 p.A47V mutation homozygotes showed a mild ataxia, suggesting these animals might be useful as a neurodegenerative disease model.

研究分野：病態医化学

キーワード：DNA修復欠損症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等生物は多様な外的・内的ストレスによって生じる DNA 損傷を速やかに認識して、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシスなどの細胞応答を介して遺伝情報を防護している。紫外線や複製フォーク停止によって生じる DNA 一本鎖損傷に対しては ATR キナーゼを中心とする経路が活性化される。一方、電離放射線やウイルス感染による DNA 二本鎖切断に対しては ATM キナーゼを中心とする経路がそれぞれ活性化されてゲノム安定性を維持している。

ATR 経路遺伝子欠損症 (*ATR*, *ATRIP*, *PCNT*) は、重度小頭症に特徴づけられる Seckel 症候群を発症する。一方、ATM 経路遺伝子欠損症では、毛細血管拡張性運動失調症 (A-T: *ATM*) や A-T 様疾患 (A-TLD: *MRE11*) のように運動失調を特徴とする疾患に加えて、ナイミーヘン症候群 (NBS: *NBS1*) や NBS 様疾患 (NBS-LD: *Rad50*) のように小頭症を発症する疾患がある。このように、ATM 経路関連遺伝病の神経症状には大きな異質性がある (Cicia *et al.*, *Mol Cell* 2010)。しかし、DNA 損傷応答を担う分子経路内の遺伝子変異が、異なる神経病態(「運動失調」と「小頭症」)を生み出す分子病理機構は不明な点が多く、解明すべき重要課題である。また、放射線の胎内被ばくや Zika ウイルスの胎内感染は小頭症を高頻度に引き起こすため、DNA 損傷応答経路異常による神経病態決定機構の解明は、外的ストレスによる小頭症発症機序の理解や診断・予防に繋がる点で臨床的にも大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

DNA 二本鎖切断修復酵素 MRE11ヌクレアーゼをコードする *MRE11* 遺伝子は、変異タイプによって「運動失調」または「小頭症」の原因遺伝子となる。我々が報告した *MRE11* 遺伝子のスプライシング変異 (Matsumoto Y, Miyamoto T *et al*, *DNA repair*, 2011) は、重度小頭症を発症する。一方、A47V ミスセンス変異は軽度な運動失調 (ミオクローヌス) を引き起こすことが知られている (Miyamoto R *et al*, *J Neurol Sci*, 2013)。近年、我々はこれらの変異の複合ヘテロ接合体が中間的な神経症状である A-TLD を発症する症例を経験した。そこで、ゲノム編集技術を用いて、これらの *MRE11* 遺伝子の疾患特異的変異をマウス胚に導入して、ATM シグナル経路に与える影響を評価して、「ATM シグナル経路過剰亢進 = 小頭症」、「ATM シグナル経路不全 = 運動失調」の疾患概念を確立することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) *MRE11* 遺伝子変異ごとの DNA 修復活性に及ぼす影響の定量解析:

MRE11 遺伝子のスプライシング変異 (c.658A>C) と A47V ミスセンス変異の複合ヘテロ接合による A-TLD 患者とその両親の末梢血リンパ球を採取する。放射線を照射後、サイトカラシン-B を用いて細胞質分裂を停止させて、2 核細胞を得る。これらの 2 核細胞において、DNA 修復異常によって生じる微小核を、サイトジェネティックス顕微鏡を用いて、定量的に評価する。これにより、ATM シグナルの下流で働く DNA 二重鎖切断修復活性に対する *MRE11* 遺伝子変異ごとの影響を評価する。

(2) *MRE11* 遺伝子変異疾患のモデルマウスにおける病態再現:

各 *MRE11* 遺伝子変異 (p.A47V ミスセンス変異、c.658A>C スプライシング変異) をもつ ssODN、

Cas9 組換えタンパク質とガイド RNA (gRNA) をマウス受精卵にエレクトロポレーション法にて共導入する。F0 個体の遺伝子型を直接シーケンス法で決定する。変異導入 F0 個体は、野生型マウスとの戻し交配を経てヘテロ変異マウス (F1) を得た後、ヘテロマウス同士の交配によりホモまたは複合ヘテロ変異マウス (F2) を作製して、運動失調型 (p.A47V ホモ)、A-TLD 型 (p.A47V/c.658A>C)、小頭症型 (c.658A>C ホモ) モデルマウスを樹立する。

各疾患モデルマウスの大脳および小脳の形態学的解析に加えて、運動能力を評価する簡便な行動学テストを実施して、これらのマウスの運動失調を評価する。

4. 研究成果

我々は、*MRE11* 遺伝子小頭症型スプライシング変異 c.658 A>C と軽度な運動失調の原因である *MRE11* 遺伝子変異 p.A47V の複合ヘテロ接合体が中間的な神経症状である A-TLD を発症する症例を経験した。研究の方法 (1) により、本患者とその両親の末梢血リンパ球に放射線を照射して、DNA 修復活性の指標となる微小核形成頻度を計測したところ、c.658 A>C スプライシング変異の方が、p.A47V ミスセンス変異に比べて有意に高い放射線感受性を示した。この結果は、これら 2 種類の *MRE11* 遺伝子変異を遺伝学的に組み合わせることによって、「小頭症」と「運動失調」の病態モデルを創出でき、ATM シグナル活性化レベルに応じた神経病態決定機構を先駆的に解明できる可能性が示唆された。

次に、我々は、ゲノム編集技術を用いて、*MRE11* 遺伝子の疾患特異的変異をマウスに導入したモデル実験系の作製を試みた。*MRE11* 遺伝子小頭症型スプライシング変異 c.658 A>C のホモ接合マウス (c.658 A>C/c.658 A>C) は、ヒトと異なり、小頭症を発症せず、正常に発生した。また、雌雄ともに、正常な生殖能力をもつことが示された。ヒトにおいては c.658 A>C 変異は、*MRE11* 遺伝子のスプライシング異常を引き起こしたが、マウスにおいては、スプライシングへの干渉が不十分であり、正常な *MRE11* タンパク質が産生されたため、小頭症モデルの作製に至らなかったと結論づけられた。一方、ミオクローヌスの原因となる *MRE11* の A47V ミスセンス変異を導入したホモ接合マウス (A47V/A47V) は、生後 1 年頃から、ミクローヌス様の行動異常を示した。つまり、A47V ミスセンス変異は生物種を超えて、神経変性を引き起こす生物効果があることが示唆された。また興味深いことに、*MRE11* A47V ミスセンス変異ホモ接合マウスの雄は生殖能力を示すのに対して、雌は不妊であった。この結果から、生殖細胞形成において、*MRE11*ヌクレアーゼ活性の依存度に雌雄差が存在することが示唆された。このように、*MRE11* A47V ミスセンス変異ホモ接合マウスは、神経変性疾患研究だけでなく生殖研究における新たな疾患モデルとして有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miki D, Kobayashi Y, Okada T, Miyamoto T, Takei N, Sekino Y, Koganezawa N, Shirao T, Saito Y | 4. 巻 44(7) |
| 2. 論文標題 Characterization of functional primary cilia in human induced pluripotent stem cell-derived neurons | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurochem Res | 6. 最初と最後の頁 1736-1744 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-019-02806-4. | 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 - |
| 1. 著者名 Akutsu SN, Fujita K, Tomioka K, Miyamoto T, Matsuura S. | 4. 巻 9(1) |
| 2. 論文標題 Applications of Genome Editing Technology in Research on Chromosome Aneuploidy Disorders. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 239 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9010239. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyamoto T, Hosoba K, Itabashi T, Iwane AH, Akutsu SN, Ochiai H, Saito Y, Yamamoto T, Matsuura S. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Ciliary cholesterol insufficiency in hereditary Zellweger syndrome. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 EMBO J | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103499 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takebayashi-Suzuki K, Konishi H, Miyamoto T, Nagata T, Uchida M, Suzuki A. | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Coordinated regulation of the dorsal-ventral and anterior-posterior patterning of Xenopus embryos by the BTB/POZ zinc finger protein Zbtb14. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Dev Growth Differ. | 6. 最初と最後の頁 158-173 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12431. | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Inoko A, Yano T, Miyamoto T, Matsuura S, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M, Hayashi Y. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Albatross/FBF1 contributes to both centriole duplication and centrosome separation. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Genes Cells. | 6. 最初と最後の頁 1023-1042 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12648. | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 宮本達雄、阿久津シルビア夏子、松浦伸也 | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 ゲノム編集を用いた遺伝性疾患の治療 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 生物の科学 遺伝 | 6. 最初と最後の頁 599-605 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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21件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 富岡啓太、Silivia Natsuko Akutsu、柳原啓見、田内広、山本卓、小林正夫、工藤美樹、宮本達雄、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 放射線感受性の遺伝的個人差を規定する候補素因としてのNBS1遺伝子I171V多型の定量 |
| 3. 学会等名 第60回原子爆弾後障害研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu、落合博、山本卓、大橋博文、宮本達雄、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 CRISPR-ObLiGaRe法を用いたiPS細胞における蛍光核標識によるモザイク・トリソミー21のモデル細胞系の開発 |
| 3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本達雄 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたオーファン織毛病の病因・病態解明 |
| 3. 学会等名 愛知医科大学 病理学セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 斎藤祐見子, 友重桜子, 宮本達雄, 小林勇喜 |
| 2. 発表標題 中枢性Gタンパク質共役型受容体を介する一次織毛縮退-RNAseqによる調節分子の同定 |
| 3. 学会等名 Neuro 2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu, Tatsuo Miyamoto, Keita tomioka, Hiroshi Ochiai, Takashi Yamamoto, Hirofumi Ohashi, Shinya Matsuura |
| 2. 発表標題 Generation of Down Syndrome iPS cells targeted with fluorescence marker in chromosome 21 using genome editing technology |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 富岡啓太、阿久津シルビア夏子、柳原啓見、田内広、山本卓、小林正夫、工藤美樹、宮本達雄、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 NBS1遺伝子I171V多型の放射線感受性に対する定量的評価 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田内広、海野昌喜、松浦伸也、宮本達雄、鈴木啓司 |
| 2. 発表標題 DNA二重鎖切断修復を標的とした放射線治療薬の取り組み |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富岡啓太、阿久津シルビア夏子、柳原啓見、田内広、山本卓、小林正夫、工藤美樹、宮本達雄、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 放射線感受性の遺伝的個人差を規定する候補素因としてのNBS1遺伝子I171V多型の逆遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本達雄 |
| 2. 発表標題 「マンモスを再生せよ」に見るゲノム編集 |
| 3. 学会等名 科学道100冊・サイエンスカフェ（東広島市産業振興課）（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomioka K, Fujita K, Akutsu SN, Tauchi H, Yamamoto T, Kobayashi M, Kudo Y, Miyamoto T, Matsuura S. |
| 2. 発表標題 Quantitative evaluation of the NBS1 I171V variant on radiosensitivity |
| 3. 学会等名 The 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu, Tatsuo Miyamoto, Hrofumi Ohashi, Shinya Matsuura |
| 2. 発表標題 Exprimental trials for the chromosome aneuploidy correction in Down syndrome cell lines |
| 3. 学会等名 第43回中国地区放射線影響研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本達雄, Silvia Natsuko Akutsu, 松浦伸也 |
| 2. 発表標題 一塩基編集技術を用いた遺伝性小頭症の病因・病態解明 |
| 3. 学会等名 日本生化学第91回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 斎藤裕見子、三木大輔、宮本達雄、関野祐子、白尾智明、小林勇喜 |
| 2. 発表標題 環境センサー「一次繊毛」機能アッセイ系の構築に向けて |
| 3. 学会等名 日本神経化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本達雄, Silvia Natsuko Akutsu, 田中貴雄, 山本卓, 松浦伸也 |
| 2. 発表標題 Synthesis-Dependent-Strand Annealingに依存したssODNノックインの可能性：ssODN導入マウス作製からの知見 |
| 3. 学会等名 第3回日本ゲノム編集学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本達雄, Silvia Natsuko Akutsu, 松浦伸也 |
| 2. 発表標題 ヒト培養細胞におけるゲノム編集を用いた遺伝性小頭症の病因・病態解明 |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第63回大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮本達雄, Silvia Natsuko Akutsu, 田内広, 松浦伸也 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたNBS1 1171Vノックインマウスの作製 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu, Tatsuo Miyamoto, Hirofumi Ohashi, Shinya Matsuura |
| 2. 発表標題 Experimental strategies for the chromosome therapy in Down Syndrome cell |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮本達雄、富岡啓太、阿久津シルビア夏子、山本卓、田内広、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたナイミーヘン症候群原因遺伝子NBS1 1171V多型ノックインマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 久保亮治、藤田春美、佐々木貴史、中林一彦、宮本達雄、小崎健次郎 |
| 2. 発表標題 ゲノム不安定性が引き起こす加齢性皮膚疾患の分子病態解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tatsuo Miyamoto, Keita Tomioka, Silvia Natsuko Akutsu, Hiroshi Tauchi, Shinya Matsuura |
| 2. 発表標題 Generation of NBS1 I171V knock-in mice using genome editing technology |
| 3. 学会等名 The 3rd International Symposium of the Next network-type Joint Usage / Research Center for Radiation Disaster Medical Science（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮本達雄、富岡啓太、阿久津シルビア夏子、松浦伸也 |
| 2. 発表標題 放射線に対する強さ・弱さの個人差を決める遺伝子変化の探索 |
| 3. 学会等名 ふくしま県民公開大学 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 宮本達雄、藤田和将、阿久津シルビア夏子、松浦伸也 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 386 |
| 3. 書名 実験医学別冊・完全版 ゲノム編集実験スタンダード（山本卓、佐久間哲史 編） | |

〔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 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究 分 担 者 | 阿久津 シルビア夏子 (Akutsu Silvia Natsuko) (Akutsu Silvia) (10822299) | 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教 (15401) | |
| 研究 分 担 者 | 松浦 伸也 (Matsuura Shinya) (90274133) | 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |