

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03457

研究課題名（和文）遺伝子量バランスの崩壊とヒト疾患発症メカニズムに関する解析

研究課題名（英文）Analysis of the dosage balance of genes in human chromosomal disorders

研究代表者

田村 勝（Tamura, Masaru）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：50370119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト4番染色体長腕部分重複症（4q+）において頭蓋骨、鎖骨に現れる症状の発症メカニズムを遺伝子量バランスの観点から解明することを目的とし、Hand2遺伝子と他の遺伝子の量的バランスの崩壊が症状を引き起こす原因か否かを解析した。同時にHand2や他の原因候補遺伝子の頭蓋骨、鎖骨形成過程での遺伝子機能の解析を行った。本研究により4q+症状発症メカニズムに関する有用な情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は希少染色体異常疾患、ヒト4番染色体長腕部分重複症（4q+）を疾患モデルマウスを用いて解析し、この疾患の頭蓋骨や鎖骨に現れる症状の原因がHand2遺伝子と他の遺伝子との遺伝子量バランスの崩壊が原因であることを突き止めたところに意義がある。加えて、これまで不明であったHand2の遺伝子量変化が引き起こす症状を明らかにした。これらのことは染色体異常疾患やHand2 遺伝子機能を理解する上で大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have analyzed whether the disruption of gene dosage balance between the basic helix-loop-helix transcription factor, Hand2, and other genes is the cause of the skull and the clavicle phenotype in partial trisomy distal 4q (4q+). In addition, we have carried out the functional analysis of Hand2 and other candidate genes during the skull and the clavicle formation process. The data from this study will provide useful information to understand the mechanism of appearance of the 4q+ symptom.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：Hand2 マウス 染色体異常疾患 ヒト4番染色体長腕部分重複症 遺伝子量バランス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の体が正常に形作られ機能する為には、決められた場所で決められた量の遺伝子が発現する必要がある。その破綻は疾患につながる。遺伝子量に注目すると染色体異常疾患のモノソミーやトリソミーがその例となる。一方で、遺伝子量が半分 (KO/+もしくは+/-で表記)で表現型が出現するにも関わらず、そこに別遺伝子の KO/+変異を導入することにより、その表現が消失する事例がある。例えば、マウス肢芽 (limb bud) 発生における bHLH 転写因子、*Twist1* と *Hand2* である。*Twist1* と *Hand2* は、それぞれ初期肢芽の前側と後側の間充細胞群で発現し、前後軸の基盤を作る。ゲノム上の *Twist1* の遺伝子量が半分となり *Twist1* KO/+の状態になると、セートレ・ヒョツツェン症候群の症状である軸前側多指症 (Preaxial Polydactyly: PPD) の症状を示す。また、*Hand2* を強制的に過剰発現させると、同様に軸前側多指症を発症する (Charité et al., 2000)。一方、*Twist1* がモノソミーであるにも関わらず、*Hand2* もモノソミー、つまり両遺伝子とも正常量の半分ではあるものの、量的には同量存在する状態 (*Twist1* +/-; *Hand2* +/-) になると PPD が消失し正常な四肢発生となる (Firulli et al., 2005)。これらのことは、四肢発生の肢芽、初期肢芽の間充細胞において *Twist1*、*Hand2* の遺伝子量変化により、遺伝子量バランスの崩壊が生じ、その結果として軸前側多指症が起こることを示している。

我々はこれまでに 4 番染色体長腕部分重複症モデルマウスである自然発症優性突然変異マウス *Rim4* を用いて、当該疾患における軸前側多指症の原因が *Hand2* 遺伝子の量的変化であることを明らかにした (Tamura et al., 2013)。*Rim4* は、*Hand2* を含む 17 遺伝子が trisomy の状態にあり、4 番染色体長腕部分重複症患者と多くの表現型の共通点がある。例えば、軸前側の指形成異常や頭蓋骨・鎖骨低形成などである。*Hand2* は、四肢や心臓発生に重要な機能を持ち、多くの先行研究がなされている。しかしながら、膜性骨化領域である頭蓋骨や鎖骨の形成に関与していることを明らかにした研究は存在しなかった。

このような状況下で我々は、*Rim4* の解析から見出した 4 番染色体長腕部分重複症 (*Hand2* が 3 copy) における頭蓋骨・鎖骨低形成が runt 型転写因子 *Runx2* の遺伝子量不足 (*Runx2* +/-) で引き起こされる鎖骨頭蓋骨異形成症と非常に似通っていることに気づき、これらの症状は *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊が原因ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、「遺伝子量バランスと疾患」という立場から、以下の 4 点に関して解明を試みた。

(1) 4 番染色体長腕部分重複症で見られる頭蓋骨・鎖骨低形成の発症原因が *Hand2* と他の遺伝子との遺伝子量バランスの崩壊であるかを検証する。具体的な相手遺伝子は *Runx2* である。(2) 4 番染色体長腕部分重複症の頭蓋骨・鎖骨低形成に関わる遺伝子は *Hand2* のみであることを明らかにする。(3) *Hand2* 遺伝子の頭蓋骨・鎖骨形成に関する機能を解明する。(4) *Hand2* の遺伝子量の低下が引き起こす症状に関して、網羅的な表現型解析を行う。同時に *Runx2* に関しても同様の解析を行う。そこで見えてきた表現型に関して、*Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊が原因かを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) の *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊が頭蓋骨・鎖骨低形成の発症原因であることを確かめるために、*Hand2* 遺伝子ノックアウトヘテロマウス (*Hand2* +/-) と *Runx2* 遺伝子ノックアウトヘテロマウス (*Runx2* +/-) を交配し、*Hand2* : *Runx2* ダブルヘテロマウス (*Hand2* +/-; *Runx2* +/-) を作製した。これまでの我々の研究から *Hand2* +/-; *Runx2* +/- の遺伝的背景が 129 系統である場合には部分的な低い頻度でのみ頭蓋骨・鎖骨低形成が見られていたので、基準実験マウス系統として最も解析に使用されている C57BL/6N 遺伝的背景でゲノム編集技術を用いて遺伝子ノックアウトマウスを作製し、剖検、及び単純 X 線 (レントゲン検査) 解析を実施した。

(2) に関しては、*Hand2* を含む 17 遺伝子が 3 コピー存在する *Rim4*+/+ マウスに遺伝子ノックアウトヘテロマウスを交配し、コピー異常の 17 遺伝子の内、目的遺伝子のみを 2 コピーに戻したダブル変異マウスを作製、その表現型解析を実施した。最初に *Hand2* +/-; *Rim4*+/+ マウスを作製、その頭蓋骨・鎖骨を剖検、および X 線 CT を用いて解析を行った。

(3) に関しては時期、領域特異的遺伝子破壊が可能な *Hand2* Conditional KO マウス系統と骨芽細胞 (Osteoblast) 系譜特異的に Cre を発現する Cre ドライバーマウス系統を交配して表現型解析を行った。

(4) に関しては、B6N 遺伝的背景で作製した *Hand2* 遺伝子ノックアウトヘテロマウス、および *Runx2* 遺伝子ノックアウトヘテロマウスを国際マウス表現型解析コンソーシアムで使用されている国際標準マウス表現型解析法により網羅的に解析を行った。さらにこれらのマウスで見出された表現型が *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊によるものであるかを *Hand2* : *Runx2* ダブルヘテロマウスを作製して解析した。

### 4. 研究成果

(1) *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊と頭蓋骨・鎖骨低形成

これまで *Hand2*、及び *Runx2* ノックアウトマウスは幾つかの研究グループにより作製されているが、それらは 129S1/Sv; C57BL/6 ミックスのマウス系統として維持されており、遺伝的背景が統一されていない。そこで我々は遺伝的背景を揃え、その影響を排除して解析を行うためにゲノム編集技術を用いて C57BL/6 系統遺伝的背景の *Hand2*、及び *Runx2* ノックアウトマウス (Conventional KO 系統) を作製した。なお、これら遺伝子ノックアウトマウスは理研バイオリソース研究センター・実験動物開発室から分譲を行い、誰もが入手できるようになっている (*Hand2* KO: BRC リソース No.: RBRC10889; *Runx2* KO: BRC リソース No.: RBRC10890)。  
*Hand2*; *Runx2* ダブルヘテロマウスを作製して、X 線による骨形態観察を行ったところ、*Runx2* ヘテロマウスで観察される鎖骨の低形成が 14 個体中 5 個体で鎖骨の回復や低形成の改善が見られた (図 1)。また、頭蓋骨で見られる大泉門の閉鎖不全も *Hand2*; *Runx2* ダブルヘテロマウスでは多くの個体はその閉鎖不全領域が縮小していた。このことから 4 番染色体長腕部分重複症、鎖骨頭蓋骨異形成症で見られる頭蓋骨・鎖骨低形成に *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスが関わっていることが示唆された。一方で、*Hand2*; *Runx2* ダブル変異マウスで完全にはそれら症状が回復しなかったことから、*Hand2*、*Runx2* のみならず他の遺伝子も関わっていることが考えられた。



図 1 : *Runx2* +/- で見られる鎖骨低形成は、*Hand2* 遺伝子を等量にすることにより改善される。各遺伝型における頸部から胸部にかけて正面からのレントゲン像。矢印は鎖骨を示す。

#### ( 2 ) 4 番染色体長腕部分重複症の頭蓋骨低形成に関与する遺伝子は何か？

*Hand2*+/-;*Rim4*+ マウスを作製し、その詳細な骨形態解析を行ったところ、*Rim4*+ で見られる側頭骨部分の形態異常は *Hand2*+/-;*Rim4*+ では全く改善しないことが明らかとなった。このことは *Rim4* で遺伝子コピー数が増加している 17 遺伝子の中に、*Hand2* 以外にも少なくとも側頭骨形態に関与する遺伝子が含まれていることを意味している。そこでそれら 17 遺伝子のうちで骨形成に関与することが予想される遺伝子を in silico スクリーニングした結果、*Hmgb2* 遺伝子が候補として考えられた。加えて *Hmgb2* 遺伝子は polyQ タンパク質と相互作用すること、また *Runx2* は polyQ ストレッチを持つことが知られていることより、この領域の表現型も *Hmgb2* と *Runx2* の遺伝子量バランスが関与することも考えられた。そこで最初に *Rim4*+;*Hmgb2*+/- ダブル変異体を作製して、その表現型解析を X 線 CT により詳細に解析した。その結果、*Rim4*+;*Hmgb2*+/- で側頭骨部分の形態異常は改善しなかった。このことから *Rim4* の頭蓋骨形態異常に *Hmgb2* は関与していないと考えられた。次に *Hmgb2* が鎖骨頭蓋骨異形成症で見られる頭蓋骨・鎖骨低形成に *Hand2* と *Runx2* と共に関わっている可能性を確かめるために、*Hand2*;*Runx2*;*Hmgb2* トリプルヘテロマウスを作製して解析を行ったが、この結果も *Hmgb2* は頭蓋骨・鎖骨低形成に関与していないことを示していた。なお、*Hmgb2* を用いた解析にはイタリア Istituto Scientifico San Raffaele の Dr. M.E. Bianchi らにより作製された *Hmgb2* Conventional KO 系統を用いた (Ronfani L. et al., 2001)。

#### ( 3 ) *Hand2* の頭蓋骨・鎖骨形成での機能

*Hand2* conventional KO マウスは胎齢致死となるので頭蓋骨・鎖骨形成過程における *Hand2* 遺伝子の機能を明らかにするために、*Hand2* Conditional KO マウス系統を用いて解析を行った。なお、この *Hand2* Conditional KO マウス系統は、スイス University of Basel の Dr. R. Zeller らにより作製されたマウス系統 (Galli et al., 2010) を用いた。1 type-I collagen 遺伝子プロモーターを使用して matured osteoblast 特異的に Cre レコンピナーゼを発現する Cre ドライバーマウス系統 (B6.Cg-Tg(Coll1a1-cre)1Haak; BRC No. RBRC05524) と *Hand2* Conditional KO マウスを交配、その表現型解析を行ったところ、頭蓋骨・鎖骨に表現型はみられなかった。このことより matured osteoblast では *Hand2* 遺伝子は機能していないことが考えられた。現在、Osterix (Sp7) プロモーターを使用し Osteoblast precursor cell で Cre レコンピナーゼを発現する Cre ドライバーマウス系統 (Tg(Sp7-tTA,tetO-EGFP/cre)1Amc を Jackson Laboratory から導入、JAX Stock#006361) と *Hand2* Conditional KO マウスを交配して *Hand2* の機能解析を行っている。この解析から *Hand2* の頭蓋骨・鎖骨形成時における機能が明らかになることが期待される。

#### ( 4 ) *Hand2*、*Runx2* の遺伝子量低下

*Hand2* や *Runx2* の遺伝子量低下が引き起こす表現型、疾患の症状候補を洗い出すために、国際標準マウス表現型解析法を用いて我々が構築した日本マウスクリニク表現型解析パイプラインを使用して、行動解析、感覚器系解析、血液生化学、形態解析、免疫系解析、代謝系解析など 700 項目を超える項目を *Hand2* +/-、*Runx2* +/- マウスで調べた結果、非常に多くの検査項目で表現型を見出すことができた。特に興味深いのは血液検査での異常であった。*Hand2* +/-、*Runx2* +/- マウス、共に赤血球、血小板、リンパ系など複数の項目で異常が見られた。中には *Hand2* +/-、*Runx2* +/- マウスに共通して増加、あるいは減少している項目が観察された。この結果は、血液系の細胞分化にこれら遺伝子が関与していることを示すものである。また、今回見出された表現型には、*Hand2* や *Runx2* 遺伝子改変マウスでこれまで報告されていない新たな表現型が多く含まれていた。さらにそれらの *Hand2* +/-、*Runx2* +/- マウスで見られた表現型が *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊によるものかを明らかにするために、*Hand2* +/- マウスと *Runx2* +/- マウスを交配して *Hand2* +/-;*Runx2* +/- ダブルヘテロマウスを作製して、網羅的表現型解析を行った。その結果、図 2 に示す BASO (%) : 好塩基球パーセンテージの様には *Hand2* +/-、*Runx2* +/- で見られていた表現型が消失する表現型が複数確認された。即ち、新たに見出された表現型の中に *Hand2* と *Runx2* の遺伝子量バランスの崩壊が原因であるものが存在することが明らかとなった。これらの結果を踏まえて、今後は今回明らかになった表現型にどのような遺伝子カスケード、分子メカニズムが関与しているのか(遺伝子量バランスの崩壊が何を引き起こしているか)を解明して行く予定である。

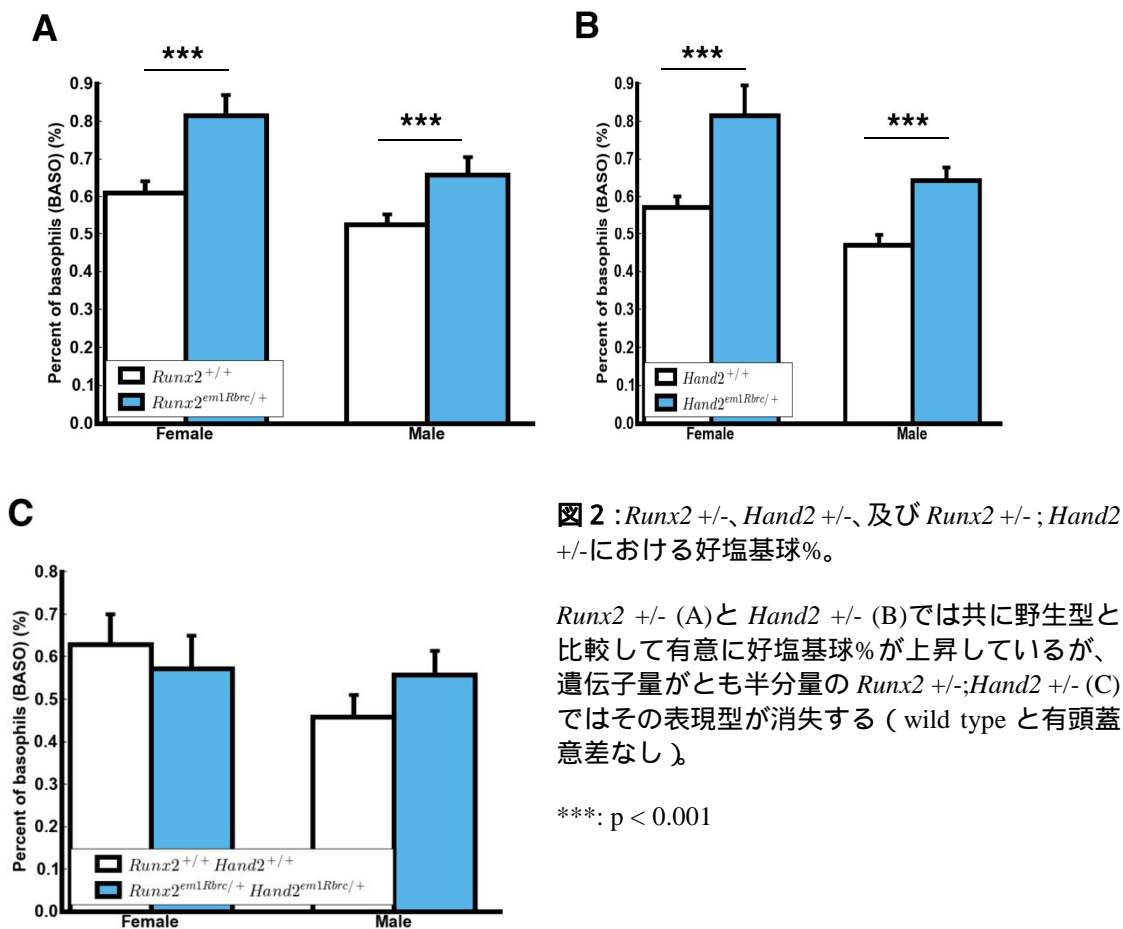


図 2 : *Runx2* +/-、*Hand2* +/-、及び *Runx2* +/- ; *Hand2* +/- における好塩基球%。

*Runx2* +/- (A) と *Hand2* +/- (B) では共に野生型と比較して有意に好塩基球%が上昇しているが、遺伝子量がとも半分量の *Runx2* +/- ; *Hand2* +/- (C) ではその表現型が消失する (wild type と有頭蓋意差なし)。

\*\*\*:  $p < 0.001$

#### 参考文献

- Charité J. et al., 2000. *Development* 127:2461-2470.  
 Firulli BA. et al., 2005. *Nature Genetics* 37 :373-381.  
 Tamura M. et al., 2013. *Human Molecular Genetics* 22:2471-2481.  
 Ronfani L. et al., 2001. *Development* 128: 1265-1273  
 Galli A. et al., 2010. *Plos Genetics* 6: e1000901

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horiai M., Otsuka A., Hidema S., Hiraoka Y., Ryotaro H., Miyazaki S., Furuse T., Mizukami H., Teruyama R., Tamura M., Bito M., Maejima Y. and Shimomura K. and Nishimori K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting oxytocin receptor (Oxtr)-expressing neurons in the lateral septum to restore social novelty in autism spectrum disorder mouse models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79109-0	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 Birling MC., Yoshiki A., Adams D., Ayabe S., .... Steel K., Tamura M., Tocchini-Valentini GP, ... et al.,	4. 巻 53
2. 論文標題 A resource of targeted mutant mouse lines for 5,061 genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 416 ~ 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-021-00825-y	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 該当する
1. 著者名 Matsumura K., Seiriki K., Okada S., Nagase M., Ayabe S., Yamada I., Yamamoto K., Kitagawa K., .. Tamura M., ....,and Nakazawa T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14697-z.	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 Haselimashadi H., Mason J., Munoz-Fuentes V., Lopez-Gomez F., Babalola K., Acar E., Kuma V., White J., Flenniken A., ... Tamura M. ... et al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Soft Windowing Application to Improve Analysis of High-throughput Phenotyping Data.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1492-1500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bioinformatics/btz744	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 該当する

1. 著者名 Mizuno-Iijima Saori, Nakashiba Toshiaki, Ayabe Shinya, Nakata Hatsumi, Ike Fumio, Hiraiwa Noriko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo, Masuya Hiroshi, Kawamoto Shoko, Tamura Masaru, Obata Yuichi, Shiroishi Toshihiko, Yoshiki Atsushi	4. 巻 33
2. 論文標題 Mouse resources at the RIKEN BioResource Research Center and the National BioResource Project core facility in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-021-09916-x	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 Kuno A., Ikeda Y., AyabeS. et al.,	4. 巻 20
2. 論文標題 DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001507	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線CTによるマウス軟組織形態計測
3. 学会等名 先端バイオイメージング支援プラットフォーム (ABiS) シンポジウム: 「先端バイオイメージングの現在そして未来 ~ 我が国の研究戦略 ~」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 軟組織をX線でみる: X線CT, X線顕微鏡による高精細マウス表現型イメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線CTによる高速・高精細マウス胎生致死表現型解析
3. 学会等名 第14回 NIBB Bioimaging Forum 「～非光学的モダリティによる生物イメージングの新展開～」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 高精細造影X線CTによる軟組織形態解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaru Tamura
2. 発表標題 Visualization of mouse embryos with the X-ray computed tomography (CT)
3. 学会等名 The 8th Japan-Sino-Korea Mouse Resource Workshop(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotoshi Shibuya, Taku Gotoh, Ruriko Tanabe, Shintaro Nomura, Masaru Tamura.
2. 発表標題 Development of the imaging methods for phenotyping of knockout mice with the X-ray Computed Tomography
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ruriko Tanabe, Taku Gotoh, Hirotooshi Shibuya, Masaru Tamura, Shintaro Nomura
2. 発表標題 Titanium Dioxide Nanoparticle is a Brilliant Perfusion Contrast Agent for Visualization and Diagnosis of Small-Animal Microvessel
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 X線イメージングによるマウス形態表現型解析の新展開
3. 学会等名 医学研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 勝
2. 発表標題 高精細造影X線CTによる軟組織病態診断の可能性
3. 学会等名 日本金属学会2020年春期講演大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綾部信哉
2. 発表標題 リソース機関における遺伝子改変マウスの遺伝品質管理
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Ayabe S, Kuno A
2. 発表標題 Multiplex genotyping using machine learning-assisted long-read sequencing approach to validate the outcomes of genome editing
3. 学会等名 Fast Tracks: Quick Insights In Animal Health (招待講演)
4. 発表年 2021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
研究分担者	綾部 信哉  (Ayabe Shinya)  (10633563)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員    (82401)	

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
---------	---------