

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390100

研究課題名 (和文) DNA修復経路による遺伝性小頭症の病因遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Toward the identification of the genes for hereditary microcephaly

研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

研究成果の概要 (和文)：

日本人遺伝性小頭症サンプルを10家系11例収集して、原因遺伝子をDNA修復経路上から探索した。2家系に *MRE11A* 遺伝子に変異を、2家系に中心体構成因子ペリセントリン遺伝子に変異を同定した。患者はいずれも発生初期に神経細胞のアポトーシスが亢進していたために小頭症を発症したと考えられた。残りの6家系にはDNA修復経路上の遺伝子に変異を認めなかった。

研究成果の概要 (英文)：

We have collected DNA samples of 11 Japanese patients with hereditary severe microcephaly from 10 families, and analyzed for mutations in the DNA repair genes. Two patients had mutations in the *MRE11A* gene, and two patients had mutations in the *Pericentrin* gene. It was assumed that, in these patients, DNA damage accumulated in neuronal cells, and these cells were eliminated by apoptotic cell death, leading to development of microcephaly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：遺伝医学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の過程で染色体は正確に複製され、娘細胞に均等に分配される。この過程が不正確だと細胞は染色体の異常を来して最終的にがん化に至ると考えられる。これに対して高等生物はDNA修復機構や細胞周期チェックポイント機構を進化獲得してゲノムを防護してきた。ヒト遺伝病にはこうした染色体維持機構が先天的に欠損して高発がん性を示す一連の疾患が知られている。遺伝性小

頭症は重度小頭症と鳥様顔貌・出生時からの成長障害・精神遅滞を特徴とする稀な常染色体劣性遺伝病である。世界で約100例、国内で18例が報告されている。これまでにパキスタンの近親婚の2家系でDNA修復遺伝子 *ATR* に遺伝子変異が同定されたが、この2家系 (*ATR*-セッケル症候群と呼ぶ) 以外には *ATR* 遺伝子を原因とする家系は見つからなかった。したがって遺伝性小頭症の主要な原因遺伝子は未だに不明であり、病因遺伝子の同定

は今後の重要課題である。

2. 研究の目的

DNA修復経路には、1) 電離放射線によるDNA二重鎖切断で活性化されるATM経路と、2) 紫外線照射や複製フォークの障害で生じた一本鎖DNAで活性化されるATR経路のそれぞれ独立した2つの経路が存在し、NBS1はATM経路でのみ機能すると考えられてきた。申請者は、NBS1はATMとATRの両分子と機能連係しており、そのためナイミーヘン症候群は毛細血管拡張性運動失調症とATR欠損症の両方の臨床症状を呈することを報告した。本研究では、遺伝性小頭症の病因遺伝子を、DNA修復経路上の分子から探索・同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性小頭症のサンプル収集と不死化細胞株の樹立

MajewskiとGoeckeのセッケル症候群診断基準『(1) 子宮内発育遅延(出生児体重が2,055g以下)、(2) 出生後の発育遅延(身長が-5SD以下)、(3) 重度小頭症(頭囲が-4SD以下)、(4) 重度知的障害、(5) 鳥様顔貌』に適合する症例を収集する。患者およびその両親から同意を得て、それぞれ血液を10ml採血する。そのうち半分の5mlからDNAを抽出し、残り5mlで末梢血リンパ球を分離してEBウイルスを用いて不死化細胞株を樹立する。患者の肘から縦1mm x 横5mm x 深さ1mmの皮膚を無菌的に採取して培養器で培養し、初代線維芽細胞を樹立する。線維芽細胞にSV40ウイルスとhTERT発現ウイルスを感染させて不死化細胞株を樹立する。

(2) シークエンスによる原因遺伝子の同定

ATRによるDNA修復経路上の遺伝子(ATR、Rad1、Rad9、Hus1、TopBP1、Chk1、Claspin、ATRIP、RPA1-3、Rad17)が最有力候補と考えられる。ATM経路上の遺伝子(ATM、NBS1、Mre11、Rad50、Rad51、53BP1、MDC1、Chk2)およびその他の遺伝子(MCPH1、ASPM、CENPJ、Cdk5rap2、FANCD2)も候補遺伝子に含まれる。これらの遺伝子について、ゲノムシークエンスによる変異スクリーニングを実施する。いずれの遺伝子も全エクソンとエクソン・イントロン接合部、5' -プロモーター領域と3' -非翻訳領域をシークエンスする。正常コントロールと異なる塩基配列を認めた場合、健常者200名のゲノムDNAで検討して変異が多型かを判定する。

(3) 患者細胞の機能的な検討

患者細胞にガンマ線を2Gy照射後、染色体核板を作成して染色体断裂やギャップ、四放射状染色体などの発生頻度を計測する。患者細胞の放射線感受性をコロニー形成法で解析する。次に、患者細胞の中心体を免疫染色

で観察し、数の異常があるかどうかを検討する。

4. 研究成果

全国の遺伝医学研究者の協力のもとで遺伝性小頭症の症例収集を試みた。最終的に10家系11例のサンプルを収集した。日本の遺伝性小頭症の頻度は不明だが、極めて稀であることが考えられた。患者細胞を不死化してDNAを抽出し、これらの細胞の機能解析を行った。その結果、全ての患者細胞が中心体数の増加を示し、中心体異常が小頭症発症の共通病理の一つと考えられた。

2家系の患者細胞にDNA二重鎖切断遺伝子*MRE11A*に遺伝子変異を同定した。患者細胞は電離放射線に著明な高感受性を示した。2例はいずれも*MRE11A*遺伝子変異のコンパウンドヘテロ接合体であり、同一のスプライス変異とそれぞれ異なったヌルタイプ変異を検出した。RT-PCRおよびウェスタンブロット解析により、このスプライス変異から正常mRNAがわずかに転写・翻訳されていた。患者細胞で放射線照射後のATM活性化と、p53およびSMC1のリン酸化、Caspase-3の活性化を検討したところ、いずれもAT様疾患細胞に比べて高いレベルを示し、アポトーシスの亢進が示唆された。これまで*MRE11A*遺伝子は毛細血管拡張性運動失調症様疾患(ATLD)の原因遺伝子として知られていた。私たちの収集した患者がナイミーヘン症候群に類似した高度小頭症を呈していた理由として、正常*MRE11A*タンパク質のわずかな発現により発生初期に神経細胞がアポトーシスを起こしたことが考えられた。

2家系2例にペリセントリン遺伝子変異を同定した。一例はフレームシフト変異とナンセンス変異のコンパウンドヘテロ接合体で、もう一例は二種類のフレームシフト変異のコンパウンドヘテロ接合体だった。患者細胞はウェスタンブロット法で正常サイズのペリセントリンバンドが欠失し、免疫染色法でペリセントリンの中心体局在が消失していた。患者の不死化線維芽細胞株は正常細胞と同程度の放射線感受性を示したが、UV照射後の分裂指数が正常細胞に比べ低下しておりATRシグナル経路の異常が示唆された。おそらく、患者は発生初期にDNA損傷が蓄積して神経細胞が細胞死を起こし、その結果として小頭症を発症したことが考えられた。

残りの6家系7例にATRおよびATMシグナル経路上の遺伝子異常を認めず、新規の原因遺伝子が考えられた。これらの病因遺伝子の同定が今後の課題として残された。

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 13 件)

1. Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Boravina A, Ciruna B, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, Matsuura S. Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired ciliogenesis in vertebrates. *Hum Mol Genet* 査読有 20, 2058-2070 (2011).
2. Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, Tahara H, Oku S, Hiramoto A, Shiiki T, Fujisawa Y, Ohashi H, Sakemi Y, Matsuura S. Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. *DNA Repair (Amst)* 査読有 10, 314-321 (2011).
3. Kobayashi J, Okui M, Asaithamby A, Burma S, Chen BP, Tanimoto K, Matsuura S, Komatsu K, Chen DJ. WRN participates in translesion synthesis pathway through interaction with NBS1. *Mech Ageing Dev* 査読有 131, 436-444 (2010).
4. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 査読有 465, 223-226 (2010).
5. Fujita K, Takechi E, Sakamoto N, Sumiyoshi N, Izumi S, Miyamoto T, Matsuura S, Tsurugaya T, Akasaka K, Yamamoto T. HpSulf, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development. *Mech Dev* 査読有 127, 235-245 (2010).
6. Kanemoto N, Fukushima T, Imoto N, Koike K, Kanemoto K, Matsuura S. Sporadic neonatal Fanconi's anemia with VACTERL association. *Pediatr Int* 査読有 52, 141-142 (2010).
7. Izumi H, Matsumoto Y, Ikeuchi T, Saya H, Kajii T, Matsuura S. BubR1 localizes to centrosomes and suppresses centrosome amplification via regulating Plk1 activity in interphase cells. *Oncogene* 査読有 28, 2806-2820 (2009).
8. Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Burma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 380, 752-757 (2009).
9. 宮本達雄、松浦伸也. 遺伝性小頭症におけるDNA損傷シグナル経路の破綻. *放射線生物研究* 査読なし 44, 330-342 (2009).
10. 松浦伸也. 日本人が発見に関わった疾患遺伝子. Nijmegen症候群. *小児科* 査読なし 50, 953-957 (2009).
11. 松浦伸也. セッケル症候群. *小児科診療* 査読なし 72, 85-85 (2009).
12. Antoccia A, Sakamoto S, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K. NBS1 prevents chromatid-type aberrations through ATM-dependent interactions with SMC1. *Radiat Res* 査読有 170, 345-352 (2008).
13. Uehara Y, Ikehata H, Komura J, Ito A, Ogata M, Itoh T, Hirayama R, Furusawa Y, Ando K, Paunesku T, Woloschak GE, Komatsu K, Matsuura S, Ikura T, Kamiya K, Ono T. Absence of Ku70 gene obliterates X-ray-induced lacZ mutagenesis of small deletions in mouse tissues. *Radiat Res* 査読有 170, 216-223 (2008).

[学会発表] (計 24 件)

1. T Miyamoto, Y Matsumoto, H Sakamoto, Y Nakazawa, T Ogi, S Matsuura. Molecular pathogenesis of a novel MRE11A mutation in two patients with Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. The First RIRMB International Symposium 広島 2011年3月3-4日
2. 宮本 達雄、松浦 伸也: 紡錘体チェックポイント欠損症における細胞分裂軸異常の解析 第33回日本分子生物学会年会 神戸 2010年12月7-10日
3. 音部 玲子、加瀬 佳寿江、家護谷 五月、兵頭 麻希、大原 正裕、村上 茂、横山 恭之、檜山 桂子、丸山 博文、檜山 英三、松浦 伸也、小林 正夫: 地域と連携した HBOC 遺伝子検査の導入に向けた活動報告 日本

人類遺伝学会第 55 回大会 埼玉 2010 年
10 月 27-30 日

4. 丸山 博文、森野 豊之、伊東 秀文、和泉 唯信、鎌田 正紀、松浦 伸也、阿部 康二、青木 正志、萩原 弘一、川上 秀史：筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子 Optineurin の同定 日本人類遺伝学会第 55 回大会 埼玉 2010 年 10 月 27-30 日
5. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、松浦 伸也：Mre11 遺伝子変異を原因とする重度小頭症の分子病理 日本人類遺伝学会第 55 回大会 埼玉 2010 年 10 月 27-30 日
6. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、松浦 伸也：Mre11 遺伝子変異を原因とする重度小頭症における ATM 依存性アポトーシスの亢進 日本放射線影響学会第 53 回大会 京都 2010 年 10 月 20-22 日
7. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、泉 秀樹、松浦 伸也：ナイミーヘン症候群に類似した 2 症例で同定した MRE11A 遺伝子変異とその機能解析 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日
8. 宮本 達雄、松浦 伸也：染色分体早期解離 (PCS) 症候群の臨床症状の分子病態 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜 2009 年 12 月 9-12 日
9. 坂本 裕美、宮本 達雄、松本 祥幸、松浦 伸也：中心体タンパク質 Pericentrin 欠損によって生じる遺伝性小頭症 MOPD II に見られる細胞周期異常 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜 2009 年 12 月 9-12 日
10. 宮本 達雄、坂本 裕美、松本 祥幸、松浦 伸也：中心体構成分子 Pericentrin 変異による遺伝性小頭症に見られる多様な細胞周期異常 日本放射線影響学会第 52 回大会 広島 2009 年 11 月 11-13 日
11. 小林 純也、松浦 伸也、小松 賢志：AT 様疾患における DNA 損傷応答の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日
12. 田内 広、小林 純也、松浦 伸也、小松 賢志：NBS1 修飾による DNA 損傷誘発アポトーシスの制御 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日
13. 坂本 裕美、宮本 達雄、松本 祥幸、小沢 浩、長谷川 奉延、松浦 伸也：遺伝性小頭症 MOPD II で同定された Pericentrin 遺伝子

変異と細胞周期異常 日本人類遺伝学会第
54 回大会 東京 2009 年 9 月 23-26 日

14. 宮本 達雄、松浦 伸也：染色分体早期解離 (PCS) 症候群に見られる一次繊毛機能不全の分子病態 日本人類遺伝学会第 54 回大会 東京 2009 年 9 月 23-26 日
15. 坂本 裕美、宮本 達雄、松本 祥幸、松浦 伸也：中心体タンパク質 Pericentrin による細胞周期制御機構の解析 第 34 回中国地区放射線影響研究会 広島 2009 年 7 月 29 日
16. 坂本 裕美、宮本 達雄、松本 祥幸、松浦 伸也：Pericentrin 変異を原因とする遺伝性小頭症の患者は G2/M 期と G1 期の細胞周期制御に異常を示す 第 50 回原子爆弾後障害研究会 広島 2009 年 6 月 7 日
17. 松本 祥幸、坂本 裕美、泉 秀樹、宮本 達雄、松浦 伸也：セッケル症候群患者で同定した変異型 Mre11 の機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会 神戸 2008 年 12 月 9-12 日
18. 泉 秀樹、松本 祥幸、松浦 伸也：Regulation of bipolar spindle formation by Polo-like kinase1 (Plk1) 第 31 回日本分子生物学会年会 神戸 2008 年 12 月 9-12 日
19. 藤本 浩子、小林 純也、松浦 伸也、小松 賢志：NBS1 のアルキル化剤による DNA 損傷修復における役割 日本放射線影響学会第 51 回大会 北九州 2008 年 11 月 19-21 日
20. 松本 祥幸、坂本 裕美、泉 秀樹、宮本 達雄、松浦 伸也：MRE11 遺伝子はセッケル症候群の発症に関与している 日本放射線影響学会第 51 回大会 北九州 2008 年 11 月 19-21 日
21. 松浦 伸也、松本 祥幸、泉 秀樹、坂本 裕美：MRE11 遺伝子変異を原因とするセッケル症候群の 2 家系 第 67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008 年 10 月 28-30 日
22. 泉 秀樹、松本 祥幸、松浦 伸也：Plk1 による両極性紡錘体形成の制御機構 第 67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008 年 10 月 28-30 日
23. 田内 広、小林 純也、坂本 修一、松浦 伸也、小松 賢志：NBS1 が制御する新規の DNA 損傷誘発アポトーシス経路 第 67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008 年 10 月 28-30 日

24. 松浦 伸也、松本 祥幸、坂本 裕美、泉 秀樹、奥 章三、平元 東、椎木 俊秀、藤沢 由樹、大橋 博文、酒見 好弘：MRE11 遺伝子変異を原因とするセッケル症候群の 2 例 日本人類遺伝学会第 53 回大会 横浜 2008 年 9 月 27-30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：9 0 2 7 4 1 3 3

(2) 研究分担者

泉 秀樹 (IZUMI HIDEKI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：1 0 3 9 7 9 8 7
辞退 2009 年 12 月 24 日
(H20→H21. 12)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：