

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02718

研究課題名（和文）染色体数可塑性を利用したPatau症候群の繊毛病発症機構の解明

研究課題名（英文）Pathological mechanism of ciliopathy in Patau syndrome using aneuploidy rescue technology

研究代表者

宮本 達雄（Miyamoto, Tatsuo）

山口大学・大学院医学系研究科・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）：13トリソミー症候群（Patau症候群）は脳・心奇形に加えて、多発性嚢胞腎、多指症、内臓逆位などの「繊毛病」を合併する。患者皮膚細胞では繊毛形成が低下しており、13番染色体上の繊毛「抑制」遺伝子のコピー数増加による繊毛病発症が示唆された。そこで、本研究では、染色体数可塑性を利用してPatau症候群の繊毛病発症機構を解明することを研究目的とした。すなわち、同一遺伝的背景をもつトリソミー13と正常核型iPS細胞を用いた遺伝子発現比較とそれに続く逆遺伝学解析（候補遺伝子の機能獲得・阻害実験）によって、Patau症候群における繊毛病責任遺伝子を探索したところ、13番染色体上の2遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Patau症候群患者細胞の初期化によって作製した、同一遺伝的背景をもつトリソミー13 iPS細胞と正常核型iPS細胞における遺伝子発現解析と逆遺伝学解析、小型魚類を用いた迅速疾患モデリングを組み合わせた機能ゲノミクスを行い、Patau症候群における繊毛病責任遺伝子の2遺伝子を世界に先駆けて同定した。これまでの繊毛病の疾患概念は、繊毛形成遺伝子の異常によるものが主流であったが、本研究によって、繊毛「抑制」遺伝子のコピー数増加による繊毛病発症の新たな疾患概念の確立に大きく貢献すると位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：13 trisomy syndrome (Patau syndrome) is associated with ciliopathies such as polycystic kidney, polydactyly, and visceral inversion, in addition to cerebral and cardiac malformations. Ciliogenesis was impaired in the patient skin derived fibroblasts, suggesting that the ciliopathies in Patau syndrome might be attributed to increased copy number of the ciliary suppressor gene on chromosome 13. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the mechanism of ciliopathogenesis in Patau's syndrome using chromosome number plasticity. We screened for the genes responsible for ciliopathy in Patau syndrome by comparing gene expression between trisomy 13 and normal nucleated iPS cells with the same genetic background, followed by reverse genetic analysis (gain-of-function and inhibition experiments of candidate genes), and identified two genes on chromosome 13.

研究分野：病態医化学

キーワード：繊毛病 iPS細胞 トリソミーレスキュー 13番染色体 Patau症候群 繊毛抑制遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は、G0 期の中心体を起点として細胞表面に形成される微小管性の細胞小器官であり、sonic hedgehog (Shh) や Wnt シグナルなどの形態形成を担う発生シグナルを受容する。繊毛「形成」遺伝子の先天的欠損は、多発性嚢胞腎や多指症に特徴づけられる「繊毛病」を引き起こす。一方、細胞増殖に伴って、繊毛形成を生理的に抑制して細胞周期進行を担う繊毛「抑制」遺伝子の存在が報告されていた(引用文献 1, 2)。しかし、繊毛「形成」遺伝子に比べて、繊毛「抑制」遺伝子が原因となる繊毛病の発症機構は不明な点が多く、遺伝医学・病態生物学分野における解明すべき重要課題である。

13 番染色体の重複による Patau 症候群は、多発性嚢胞腎、多指症、内臓逆位といった繊毛病症状を高頻度に合併する。また、患者皮膚線維芽細胞の繊毛形成の低下が確認された(未発表)。これらの知見から、13 番染色体上の繊毛「抑制」遺伝子のコピー数増加が繊毛病の原因であると考えられた。しかし、トリソミー疾患では、メンデル遺伝病研究における常套手段であるゲノム解読による病態責任遺伝子の同定が困難であるため、どの 13 番染色体遺伝子が真の繊毛病責任遺伝子であるか? は不明であった。

### 2. 研究の目的

ヒト細胞が正常な染色体数を認識して異数性をレスキューする現象が知られている。我々は、Patau 症候群患者の皮膚線維芽細胞(GM02948 : 米国 Coriell 研究所から分与)を初期化したところ、同一遺伝的背景をもつトリソミー13 および正常核型 iPS 細胞クローンを作製することに成功した(引用文献 3)。また、正常核型 13 iPS 細胞は、トリソミー13 iPS 細胞の繊毛形成不全が回復することを見出した。これらの知見から、同一遺伝的背景内におけるトリソミー13 iPS 細胞と正常核型 iPS 細胞との遺伝子発現比較解析により、13 番染色体上の繊毛病候補遺伝子を抽出する着想を得た。本研究では、染色体数可塑性を利用した独自の機能ゲノミクス・フローを確立して、Patau 症候群の繊毛病発症の分子機構を明らかにすることを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ディープ・シーケンスを用いた遺伝子発現による責任遺伝子の「探索」

Patau 症候群患者 3 名に由来するトリソミー13 とダイソミー13 iPS 細胞のうち、それぞれ 3 クローンずつから RNA を回収する。その後、DNB seq™のプラットフォームを利用した RNA seq 解析を行い、各クローンの遺伝子発現情報を取得する。Patau 症候群における繊毛病候補遺伝子として、トリソミー13 iPS 細胞クローン間で共通して転写レベルが亢進している 13 番染色体上の遺伝子を抽出する。また、繊毛病を発症する部分的なトリソミー13 症候群 (Partial Patau syndrome)の文献情報を活用して、13 番染色体上の繊毛病「感受性」領域に相当する 13q31-34 (約 36 Mb)に位置する遺伝子を優先的に候補遺伝子として抽出する。

#### (2) 候補遺伝子の過剰発現・機能阻害による表現型解析による責任遺伝子の同定

繊毛病候補遺伝子プラスミドを繊毛研究モデルである hTERT-RPE1 細胞および mIMCD3 細胞に導入して、血清飢餓培養後の繊毛形成を免疫染色法による評価して、繊毛形成抑制活性を持つ遺伝子を探索する。また、繊毛病候補遺伝子に対する siRNA を hTERT-RPE1 細胞に導入して、血清存

在下での繊毛形成について免疫染色法を用いて評価して、繊毛形成を促進させた siRNA に対応する遺伝子を繊毛抑制遺伝子として探索する。

### (3) 小型魚類における責任遺伝子の過剰発現による Patau 症候群の繊毛病の再現

小型魚類であるメダカは、迅速にヒト遺伝病のモデル化できる。Patau 症候群における内臓逆位を評価するために、繊毛病責任候補遺伝子の mRNA をメダカ/受精卵に導入して、心臓のループ構造を観察する。

## 4. 研究成果

同一遺伝的背景内でのトリソミー13 iPS 細胞とダイソミー13 iPS 細胞との RNA seq 解析によって、トリソミー13 iPS 細胞において転写レベルが亢進している 13 番染色体上の遺伝子を探索した。次に、これらの遺伝子のうち、繊毛病を発症する部分的なトリソミー13 症候群 (Partial Patau syndrome) に共通の染色体領域に含まれる 20 遺伝子を、繊毛病責任候補遺伝子として抽出した。

各候補遺伝子に Halo-tag を融合した遺伝子の発現ベクターを、hTERT-RPE 細胞 (親細胞の繊毛形成率: 64.0%) と mIMCD 細胞 (親細胞の繊毛形成率: 48.7%) に導入して繊毛形成を評価した。hTERT-RPE1 細胞株を用いた実験では、7 種類の遺伝子導入細胞がコントロールに比べて、有意に繊毛形成の抑制効果を示した (28.3-36.3%)。一方で、mIMCD3 細胞株を用いた実験では、8 種類の遺伝子導入細胞がコントロールに比べて、有意に繊毛形成の抑制効果を示した (24.7-35.3%)。これらのうち、hTERT-RPE1 細胞および mIMCD3 細胞のどちらの実験系においても、繊毛形成抑制活性を示したのは 5 遺伝子に絞られた。

Gain of Function 実験によって抽出された Patau 症候群の 5 種類の繊毛病責任候補遺伝子の siRNA を hTERT-RPE1 細胞株に導入して、血清存在下での繊毛形成率を求めた。親細胞株やネガティブコントロール siRNA 導入細胞の血清存在下での繊毛形成率はいずれも 5% 未満であったが、候補遺伝子の siRNA 導入細胞はいずれも有意に高い繊毛形成率を示した (18.1%-23.1%)。

これらの 5 遺伝子が in vivo においても繊毛抑制遺伝子として機能するかを調べる目的で、各遺伝子の mRNA をメダカ受精卵にマイクロインジェクション法により導入して、Patau 症候群でも検出される内臓逆位を評価した。その結果、2 遺伝子の過剰発現により、内臓逆位が有意に誘導されることが明らかになった。

以上の結果から、Patau 症候群の繊毛病責任遺伝子として 13 番染色体上の 2 遺伝子 (アクチン重合制御因子および細胞周期制御因子) の同定に成功した。今後、これらの遺伝子の繊毛形成に対する役割を明らかにすることによって、Patau 症候群の繊毛病発症機構の解明に繋がることが期待される。

### <引用文献>

1. Wang, Dynlacht. The regulation of ciliym assembly and disassembly in development and disease. Development 145(18):dev151407, 2018
2. Miyamoto et. al., The microtubule-depolymerizing activity of a mitotic kinesin

protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation.  
Cell Rep 10(5):664-673, 2015

3. Akustu, Miyamoto et. al., iPSC reprogramming-mediated aneuploidy correction in autosomal trisomy syndromes. Plos One 17(3):e0264965, 2022

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Noguchi Yuki, Onodera Yasuhito, Miyamoto Tatsuo, Maruoka Masahiro, Kosako Hidetaka, Suzuki Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo CRISPR screening directly targeting testicular cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Genomics	6. 最初と最後の頁 100510 ~ 100510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xgen.2024.100510	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 Kume Kodai, Kurashige Takashi, Muguruma Keiko, Morino Hiroyuki, Tada Yui, Kikumoto Mai, Miyamoto Tatsuo, 他22名, Kawakami Hideshi	4. 巻 110
2. 論文標題 CGG repeat expansion in LRP12 in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2023.05.014	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 Kitagawa Takao, Kobayashi Daiki, Baron Byron, Okita Hajime, Miyamoto Tatsuo, Takai Rie, Paudel Durga, Ohta Tohru, Asaoka Yoichi, Tokunaga Masayuki, Nakagawa Koji, Furutani-Seiki Makoto, Araki Norie, Kuramitsu Yasuhiro, Kobayashi Masanobu	4. 巻 17
2. 論文標題 AT-hook DNA-binding motif-containing protein one knockdown downregulates EWS-FLI1 transcriptional activity in Ewing's sarcoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0269077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0269077	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 Hosoba Kosuke, Morita Tomoka, Zhang Ying, Kishi Hiroko, Yamamoto Takashi, Miyamoto Tatsuo	4. 巻 175
2. 論文標題 High-efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting to establish cell models of ciliopathies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2022.07.020	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 Morita Tomoka, Hosoba Kosuke, Miyamoto Tatsuo	4. 巻 3-4
2. 論文標題 Elucidation of the etiological mechanisms underlying rare hereditary cilia/centrosome disorders using genome editing technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene and Genome Editing	6. 最初と最後の頁 100016 ~ 100016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ggedit.2022.100016	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 Kimura Sotai, Morita Tomoka, Hosoba Kosuke, Itoh Hiroshi, Yamamoto Takashi, Miyamoto Tatsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Cholesterol in the ciliary membrane as a therapeutic target against cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1160415-1160415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1160415	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 Tomioka Keita, Miyamoto Tatsuo, Akutsu Silvia Natsuko, Yanagihara Hiromi, Fujita Kazumasa, Royba Ekaterina, Tsuchi Hiroshi, Yamamoto Takashi, Koh Iemasa, Hirata Eiji, Kudo Yoshiki, Kobayashi Masao, Okada Satoshi, Matsuura Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 NBS1 I171V variant underlies individual differences in chromosomal radiosensitivity within human populations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98673-7	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 該当する

1. 著者名 Akutsu Silvia Natsuko, Miyamoto Tatsuo, Oba Daiju, Tomioka Keita, Ochiai Hiroshi, Ohashi Hirofumi, Matsuura Shinya	4. 巻 17
2. 論文標題 iPSC reprogramming-mediated aneuploidy correction in autosomal trisomy syndromes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0264965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0264965	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 Zhang Ying, Lu Qian, Li Nan, Xu Ming, Miyamoto Tatsuo, Liu Jing	4. 巻 8
2. 論文標題 Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41523-022-00402-4	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto Tatsuo, Hosoba Kosuke, Akutsu Silvia Natsuko, Matsuura Shinya	4. 巻 2374
2. 論文標題 Imaging of the Ciliary Cholesterol Underlying the Sonic Hedgehog Signal Transduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 49 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1701-4_5	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16件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 重信 圭祐, 宮本 達雄, 松崎 健太郎, 田邊 洋子, 岸 博子
2. 発表標題 血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達におけるピメンチン断片化の役割の解明
3. 学会等名 第101回日本生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 明道 友希, 谷本 早紀, 長島 明輝, 坂本 裕貴, 坪田 一希, 宮本 達雄, 松浦 伸也, 田内 広
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた突然変異高感度検出系の改良
3. 学会等名 第66回日本放射線影響学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板橋岳志, 細羽康介, 森田知佳, 山岡賢治, 木村相泰, 小林大悟, 岸博子, 伊藤浩史, 川上秀史, 橋本浩一, 山本卓, 宮本達雄
2. 発表標題 「ペルオキシソーム - 一次繊毛」接触部位はコレステロール輸送を介して上皮管腔形成を制御する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西 佑治, 岡田 清吾, 岸 博子, 元永 貴大, 脇口 宏之, 安戸 裕貴, 小林 誠, 宮本 達雄, 長谷川 俊史
2. 発表標題 定量的プロテオミクスを用いた川崎病冠動脈病変の予測マーカーおよび治療標的の探索
3. 学会等名 第55回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板橋岳志, 細羽康介, 森田知佳, 山岡賢治, 木村相泰, 小林大悟, 岸博子, 伊藤浩史, 川上秀史, 橋本浩一, 山本卓, 宮本達雄
2. 発表標題 繊毛膜コレステロール機能不全による多発性嚢胞腎発症の分子機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yui Tada, Kodai Kume, Kosuke Hosoba, Tatsuo Miyamoto, Yioshin Izumi, Hideshi Kawakami
2. 発表標題 A TTBK2 variant in a spinocerebellar ataxia patient impairs ciliary function
3. 学会等名 第46回日本神経科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本達雄
2. 発表標題 ペルオキシソームを介した繊毛へのコレステロール供給とその破綻
3. 学会等名 第63回日本生化学会 中国・四国支部例会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本達雄
2. 発表標題 コレステロール「欠乏」症としての繊毛病
3. 学会等名 AMED CREST/PRIME 脂質領域公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022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 希少性遺伝病の病態解明
3. 学会等名 令和4年度 山口産婦人科学会・山口県婦人科医会 学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田知佳, 木村相泰, 岸博子, 細羽康介, 伊藤浩史, 山本卓, 宮本達雄
2. 発表標題 機械受容性カルシウムイオンチャネル・Polycystin-2のコレステロール結合サイトの変異解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第45回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroko Kishi, Keisuke Shigenobu, Tatsuo Miyamoto
2. 発表標題 The role of vimentin cleavage in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本達雄
2. 発表標題 ゲノム編集技術の医学への応用
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会 公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本達雄, 細羽康介, 板橋岳志, 岩根敦子, 阿久津シルビア夏子, 落合博, 斎藤裕見子, 山本卓, 松浦伸也
2. 発表標題 ペルオキシソームを介した繊毛へのコレステロール輸送機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本達雄
2. 発表標題 ペルオキシソーム欠損による繊毛シグナル伝達障害の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本達雄, 細羽康介, 山本卓, 斎藤祐見子, 板橋岳志, 岩根敦子
2. 発表標題 Peroxisome-mediated cholesterol trafficking into primary cilia
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ying Zhang, Qian Lu, Nan Li, Ming Xu, Tatsuo Miyamoto, Jing Liu
2. 発表標題 Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway to inhibit actin stress fiber formation
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本卓, 宮本達雄, 一戸辰夫, 本庶仁子, 大森司, 加藤和人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 200
3. 書名 ゲノム編集と医学・医療への応用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多発性嚢胞腎の予防又は治療剤	発明者 宮本達雄, 板橋岳志, 鈴木啓司, 山本卓, 細羽康介	権利者 山口大学, 長崎大学, 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-204867	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	浅岡 洋一 (Asakoka Yoichi) (10436644)	山口大学・大学院医学系研究科・講師  (15501)	
研究分担者	阿久津 シルビア夏子 (Akutsu Silvia Natsuko) (Akutsu Silvia Natsuo) (10822299)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  (15401)	
研究分担者	清木 誠 (Seiki Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授  (15501)	
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