

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04755

研究課題名(和文)ハプロ不全優性遺伝病発症・重篤化の根幹となるエピジェネティックなゆらぎ

研究課題名(英文) Epigenetic fluctuation associated with onset and severity of haploinsufficient dominant diseases

研究代表者

大鐘 潤 (Ohgane, Jun)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：50313078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：FBN1遺伝子座についてブタ型CpGショア正常アリルおよびマウス欠損アリルをヘテロ接合性に保持するマウスの作製について、ES細胞樹立を行い、今後は個体を作製する予定である。また、FBN1のプロモーターアッセイにより、DNAメチル化のゆらぎを示すCpGショアは近位エンハンサーとして機能することが明らかになった。さらにCpGアイランド、CpGショアのプロモータ活性は、DNAメチル化によって抑制されることも見出した。RUNX2については、軟骨細胞に分化誘導可能な幹細胞にDNA高メチル化誘導のエピゲノム編集ベクターを導入し、Runx2プロモーターでの高メチル化誘導が可能なことを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハプロ不全優性遺伝病の発症が、原因遺伝子のCpGショアでのDNAメチル化のゆらぎによって決定されることを証明するためのモデル動物作製を行った。また、作製するモデル動物を使ってDNAメチル化のゆらぎを模したDNA高メチル化および低メチル化誘導を行うためのエピゲノム編集技術の最適化を図り、培養細胞レベルでFBN1、RUNX2遺伝子プロモーター領域でのDNAメチル化改変に成功した。これらにより、将来的には効率的な病態モデル動物の作成や発症予防・治療につながる基盤技術の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：To generate mice that are heterozygous for the porcine CpG shore normal allele and the mouse null allele for the FBN1 gene locus, we established ES cells with the above genotype and are planning to generate the heterozygous mice. Furthermore, promoter assays of FBN1 revealed that the FBN1 CpG shores exhibiting fluctuations in DNA methylation, function as a proximal enhancer. Furthermore, we found that the promoter activities of the CpG island and shore are suppressed by DNA methylation. Regarding RUNX2, we introduced an epigenome editing vector that induces DNA hypermethylation into stem cells that can differentiate into chondrocytes, and demonstrated that it is possible to induce DNA hypermethylation in the Runx2 promoter.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス ハプロ不全 DNAメチル化 エピゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類遺伝子の約半数はプロモーターに CpG アイランドと呼ばれる CpG (5' CG3' の二塩基) に富んだ領域を持ち、その外側との境界部は CpG ショアと呼ばれる。CpG での DNA メチル化は遺伝子発現抑制の主要なエピジェネティック修飾であり、申請者は CpG ショアでの組織特異的 DNA メチル化が遺伝子発現記憶として重要であることを発見した。恒常的に低メチル化の CpG アイランド内からの低メチル化の広がり、逆に恒常的に高メチル化の外部からの高メチル化の広がりが境界部の CpG ショアでぶつかり、CpG ショアでは偶然のメチル化変動として “ゆらぎ” が見られることも独自に発見している (図 1)。

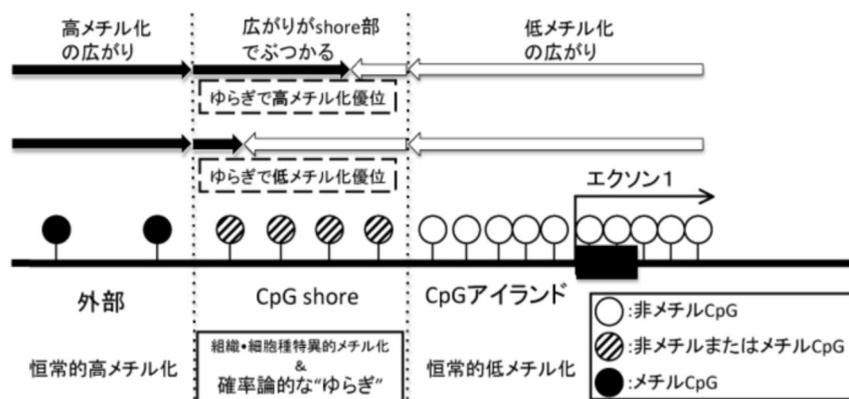


図 1 CpG ショアでの DNA メチル化のゆらぎ CpG ショアは低メチル化と高メチル化の広がりがぶつかる境界である。組織・細胞種特異的な DNA メチル化制御とともに確率論的なゆらぎが起きることで、偶然に高メチル化または低メチル化に偏ることがあり、発現量にも影響する。

ハプロ不全は常染色体優性遺伝様式の一つで、ヒト遺伝病データベースには 700 件以上の登録がある。さらに、機能喪失変異アリルのヘテロ接合であることは共通でも発症様態は患者ごとに異なる。しかし、その理由は責任遺伝子での配列変異のみでは十分説明できない。そのため、発症の有無に浸透度、発症様態 (時期・組織など) の違いに表現度といった遺伝学用語を定義し、統計的な確率論として扱われてきた。これらの発症危険度推定概念は遺伝カウンセリングでは重要であるが、他方、発症機序解明や治療法確立につながる可能性が低いことが最大の課題である。

細胞外弾性繊維タンパク質をコードする *FBN1* 遺伝子でのハプロ不全で発症するマルファン症候群の家系では、同一の *FBN1* 機能喪失アリルを持ちながら患者ごとに病態が異なる。一方、*FBN1* ヘテロ欠損クローンブタ系統は全個体で同一遺伝的背景を持つにも関わらず、遺伝的背景の異なるヒトと同様に個体ごとに発症様態のバラツキが見られた。このバラツキには核移植に起因するエピジェネティック変異の関与も示唆された。実際に *FBN1* ヘテロ欠損繊維芽細胞では、培養過程での正常アリルの DNA メチル化変化のみが mRNA 量と連動していた。別のハプロ不全疾患・鎖骨頭蓋骨異形成症の責任遺伝子 *RUNX2* についても、同一変異アリルを持つ患者間で異なる表現型が報告され、マウスでは *Runx2* mRNA 量と骨格異常の表現型の相関が示されている。さらに、プロモーター領域 CpG ショアの DNA メチル化と遺伝子発現の負の相関も報告されている。以上より、ハプロ不全では疾患責任遺伝子でのエピジェネティック異常が発症・重篤化の原因である可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究ではさまざまな動物種で疾患モデル動物の長所を最大限利用できる研究環境を生かして、ハプロ不全モデル動物でのエピゲノム改変によりゆらぎを模した DNA メチル化変動を誘導し、責任遺伝子の正常アリル由来 mRNA 量の増減が発症や重篤化の指標となることを検証する。ハプロ不全疾患の責任遺伝子は構造的な共通点も多く、本研究によりハプロ不全疾患全般についてもエピジェネティックな “ゆらぎ” と発症・重篤化についての重要な示唆を与えられよう。さらに、作製する疾患モデル動物について、DNA 高メチル化誘導による発症の効率化、DNA 低メチル化誘導による予防・治療につながる基礎技術としてのエピゲノム編集の最適化を行う。

### 3. 研究の方法

ブタ *FBN1* は CpG shore での DNA メチル化により mRNA 発現が制御され、*FBN1* ヘテロ欠損では正常アリル CpG shore のメチル化状態のランダムな変動と mRNA 量が相関することを見出した。一方でブタでは発症までの期間が長く、発症個体の割合を高める工夫の必要性も浮かび上がった。これに対して、マウスでは発症までの期間が短く、多頭数での検討から確率論的なハプロ不全発症個体も見つけやすい。しかしマウス *Fbn1* CpG ショア配列は、ブタと比較してヒトとの相関性が低く、エピジェネティック制御の類似性が疑われる欠点も無視できない。そこで、ブタでのヒトとの生理学的類似性・配列保存性の高さ、マウスでの多頭数解析により短期間で発症個体を

解析できる可能性の高さの双方を利用することを考えた。ブタ型 CpG ショアで正常エクソン 1 のアリル、およびマウス型 CpG ショアでマウス機能喪失エクソン 1 のアリル、をヘテロ接合性に持つ ES 細胞およびマウスを作製する。このブタ型 CpG ショアアリルのみから正常 mRNA を発現するように工夫したマウスを用いて、ブタ型 CpG ショア配列のみを標的とした更なるエピゲノム改変と継時的な採材を行う。このマウスでの発症個体とともにヒトに近いヘテロ欠損ブタを併用して DNA メチル化変動を詳細に検討する。また、CpG アイランドおよび CpG ショアのプロモーター活性および DNA メチル化による転写抑制効果を確認し、DNA 低メチル化誘導による *FBN1* 発現誘導が可能かどうかを検証する。*Runx2* の転写開始点近傍の CpG アイランドは低メチル化状態に、さらに上流は高メチル化状態に保たれている。これらの境界領域は CpG ショアであり、この領域のメチル化状態は組織ごとに違いが見られ、*Runx2* mRNA 発現と負に相関する。そこでエピゲノム編集ツールを用いて、マウス間葉系幹細胞の *Runx2* CpG ショアの高 DNA メチル化誘導を行い、mRNA 発現および細胞分化との関係を解析する。以上、ヒト疾患モデルとして優れたブタと、遺伝子改変や多頭数・短期間解析の容易なマウスの双方の利点を生かしつつ、疾患モデルのヘテロ欠損動物作製およびエピゲノム編集・改変薬剤などにより、DNA メチル化のゆらぎと病態表現型の因果関係の実証を目指す。

#### 4. 研究成果

*FBN1* 遺伝子座についてブタ型 CpG ショア正常アリルおよびマウス欠損アリルをヘテロ接合性に保持するマウスの作製について、ゲノム編集の効率から新たにマウス ES 細胞での作製を行った。これをもとにブタ型 CpG ショア正常アリルおよびマウス機能喪失アリルとなる *FBN1* ヘテロ欠損マウス系統を樹立する準備を完了した。また、*FBN1* CpG ショアを中心として CpG アイランドおよび CpG ショアの連結順序および方向の組み合わせについてルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性の測定を行った。その結果、CpG ショアは単独では非常に弱いプロモーター活性しか持たないことが明らかになった。一方 CpG アイランドは単独で強いプロモーター活性を示し、CpG ショアを連結した場合は CpG ショアの方向に関わらずプロモーター活性が増強された。以上の結果から DNA メチル化のゆらぎを示す CpG ショアは *FBN1* 遺伝子の近位エンハンサーとして機能することが明らかになった。さらにエピゲノム編集およびプロモーターアッセイにおいて CpG アイランドと CpG ショア内の CpG をメチル化した場合は、プロモーター活性が顕著に低下した。この結果から、CpG アイランドおよび CpG ショアによるプロモーター領域での転写活性は、DNA メチル化によって抑制されることも見出した。*RUNX2* については、軟骨細胞に分化誘導可能な幹細胞に DNA 高メチル化誘導のエピゲノム編集ベクターを導入し、*Runx2* プロモーターでの DNA 高メチル化誘導が可能であることを証明した。以上より、ハプロ不全優性遺伝病での DNA メチル化のゆらぎと発症様態の相関を検証するモデル動物作製およびエピゲノム改変による実験的なゆらぎの再現に目処が立ち、DNA メチル化のゆらぎと発症有無や重篤度などの因果関係の検証や効率的な疾患モデル動物の作製につながる基盤整備を終えることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 JACK Naomi, MUTO Tomoyuki, IEMITSU Keigo, WATANABE Tamaki, UMEYAMA Kazuhiro, OHGANE Jun, NAGASHIMA Hiroshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetically engineered animal models for Marfan syndrome: challenges associated with the generation of pig models for diseases caused by haploinsufficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 233 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-027	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 Kawa Yutaro, Shindo Miyuki, Ohgane Jun, Inui Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Epigenome editing revealed the role of DNA methylation of T-DMR/CpG island shore on Runx2 transcription	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101733 ~ 101733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2024.101733	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 日向史織、宮代梨央、大和屋健二、大鐘潤	4. 巻 13
2. 論文標題 ブタをモデルとしたヒト遺伝性疾患のエピジェネティックなゆらぎの解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 155-161
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 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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大和屋 健二, 大鐘 潤
2. 発表標題 受精能獲得に向けた精子先体赤道部膜裏打ち構造の制御機構
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加和優多郎、大鐘潤、乾雅史
2. 発表標題 エピゲノム編集による Runx2 転写調節機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重松 さとり、雨宮 侑也、梅山 一大、長嶋 比呂志、大鐘 潤
2. 発表標題 ハプロ不全疾患責任遺伝子FBN1のDNAメチル化異常の蓄積とエピゲノム改変による改善の試み
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮代 梨央、大和屋 健二、梅山 一大、長嶋 比呂志、大鐘 潤
2. 発表標題 培養細胞をモデルとした加齢に伴うDNAメチル化変化によるFBN1発現制御の解析
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大和屋 健二、重松さとり、雨宮 佑也、日向 史織、宮代 梨央、梅山 一大、長嶋 比呂志、大鐘 潤
2. 発表標題 ブタ初代培養繊維芽細胞におけるCas9誘導DNAメチル化編集によるFBN1 CpG island shoreの脱メチル化と生殖細胞におけるメチル化
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023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	乾 雅史  (Inui Masafumi)  (20643498)	明治大学・農学部・専任准教授   (32682)	
研究 分担者	長嶋 比呂志  (Nagashima Hiroshi)  (50318664)	明治大学・農学部・専任教授   (32682)	

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