

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253020

研究課題名(和文) ICF症候群とエピゲノム制御の分子基盤

研究課題名(英文) ICF syndrome and the molecular network regulating the human epigenome

研究代表者

佐々木 裕之 (SASAKI, Hiroyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30183825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全、染色体の不安定化、顔貌異常を特徴とするICF症候群は、反復配列のDNAメチル化の低下とヘテロクロマチンの崩壊を伴う劣性(潜性)の遺伝病で、ヒトのエピゲノム制御機構を解明する良いモデルである。本研究課題では、既知の2原因遺伝子(DNMT3B、ZBTB24)に加え、新たに2つの原因遺伝子(CDCA7、HELLS)を同定することに成功した。また、これらの遺伝子に欠損を持つ細胞をそれぞれ樹立して調べたところ、遺伝子産物間の物理的な相互作用、機能的な上流・下流の関係、DNA損傷修復との関係が明らかになり、これまで全く知られていなかったエピゲノム制御ネットワークの存在を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：ICF (immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies) syndrome is a monogenic disorder accompanied by hypomethylation of satellite DNA and relaxed heterochromatin and thus considered to be a model for the studies of the human epigenome regulation. In the present study, we have identified two new causative genes CDCA7 and HELLS for ICF syndrome, in addition to the known DNMT3B and ZBTB24 genes, which now allows us to diagnose over 90% of all ICF patients by DNA tests. We then established cultured cell lines each carrying mutations in one of the causative genes and revealed the physical interactions between the gene products, their involvement in the same biological pathways, and their common association with DNA damage repair. Our findings suggest that the products of the ICF causative genes are involved in a here-to-fore unknown molecular network regulating the human epigenome.

研究分野：分子生物学、人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 ヘテロクロマチン 免疫不全 遺伝病

1. 研究開始当初の背景

免疫不全、染色体の動原体近傍での不安定化、顔貌異常を特徴とする Immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies (ICF) 症候群は、複数の原因遺伝子に起因する劣性(潜性)の単一遺伝子病である。染色体不安定化はサテライト DNA の低メチル化と動原体近傍のヘテロクロマチンの崩壊による。本研究の開始当時、原因遺伝子として DNA メチル化酵素 DNMT3B (1 型 ICF) と核内蛋白質 ZBTB24 (2 型 ICF) が同定されていたが、これらの遺伝子に変異のない症例も多数存在していた。よって、未知の原因遺伝子を特定し、全症例の早期確定診断と早期治療開始を可能にすることが、患者救命のための急務であった。また、原因遺伝子の産物が関わる分子病態の全体像を明らかにすれば、未だ不明な点の多いヘテロクロマチン形成の制御ネットワークの解明に寄与すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、まず、全 ICF 症例の確定診断を可能にするため、DNMT3B 及び ZBTB24 遺伝子に変異のない ICF 症例の DNA サンプルを用いて、「(1)新規原因遺伝子を同定すること」を第一の目的とした。これは本疾患の全体像を明らかにすることに繋がる。また、患者由来の細胞リソースや原因遺伝子とその産物に関する情報を活用して、疾患モデル細胞やモデルマウスを作成し、「(2)本疾患の分子病態とヘテロクロマチン形成の制御ネットワークを解明すること」を第二の目的とした。本研究の成果は、免疫不全を伴う難病である ICF 症候群の克服のみならず、老化やがんに伴うゲノム不安定性、染色体異数性の解明などに役立つと考えられる。

3. 研究の方法

(1)新規原因遺伝子の探索

国内外の DNMT3B 及び ZBTB24 遺伝子に変異のない ICF 症例の DNA サンプルから全遺伝子エキソン断片を濃縮し、次世代シーケンサーで網羅的な塩基配列決定を行う(エキソーム解析)。同定された多数の変異から既知の多型を除外し、複数の ICF 患者で共通に機能欠損型変異を持つ遺伝子を種々の方法で絞り込み、新規原因遺伝子を同定する。

(2)分子病態とヘテロクロマチン形成の制御ネットワークの解明

新規原因遺伝子の産物について抗体を入手し、正常な細胞における局在などを観察する。従来の相同組換え法又は CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により、各原因遺伝子に変異を導入したモデル細胞・マウスを作成する。(1 型 ICF の原因遺伝子である DNMT3B 遺伝子を欠損した細胞・マウスについては既に多数の報告があるので、主にそれ以外の遺伝子について研究する。) 入手可能であれば患

者由来 iPS 細胞も使用する。これらの変異細胞・変異マウスの表現型(細胞機能、核型、発生分化の状況など)及び分子的な異常(メチル化・遺伝子発現など)を同定する。また、各変異遺伝子同士の遺伝的相互作用を検討するとともに、各正常遺伝子産物の相互作用因子を網羅的に同定し(プロテオミクス解析) ICF 症候群の分子病態とヘテロクロマチン制御のネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

(1)新規原因遺伝子の探索

DNMT3B 及び ZBTB24 遺伝子に変異のない ICF 症例 6 例(国内 2 症例+フランス 4 症例)の DNA サンプルについてエキソーム解析を実施した。フランスの症例は研究協力者である Claire Francastel 博士から提供してもらった。その結果、幾つかの候補遺伝子が見つかったが、フランスの症例を含めても数が少なく、我々のデータだけでは確証を持てる新規原因遺伝子はなかった。そこで同様の ICF 症例のエキソーム解析を行っている Silvere M. van der Maarel 教授(Leiden 大学; 研究協力者)と協議して双方のデータを合わせたところ、CDCA7 (3 型 ICF) 及び HELLS (4 型 ICF) を新たな原因遺伝子として同定することに成功した(Thijssen et al. Nat. Commun. 2015; 本研究課題の研究代表者佐々木は責任著者かつ最後尾著者)。このうち HELLS は別名 LSH とも呼ばれるクロマチン再構成因子であり、既に DNA メチル化に必要な因子として知られていた。一方、CDCA7 は細胞周期関連の転写制御因子と考えられるが、その機能の詳細は未知であった。

以上により ICF 症候群の原因遺伝子は合計 4 個となり、初めて同疾患患者の 90%以上を確定診断することが可能となった。一方、これら 4 つの遺伝子に変異のない ICF 症例が 2 例(国内 1 症例+フランス 1 症例)残った。第 5 の原因遺伝子を同定するため症例数の追加を目指したが、稀な疾患であるため国内外で新たな症例は現れず、本研究課題の期間内に同定することはできなかった。第 5 の原因遺伝子の同定は今後の課題である。

また、ICF 患者の末梢血細胞において生殖系列遺伝子の異常な低メチル化と発現を見つけ、診断に有用な新規バイオマーカーとして、Claire Francastel 博士との共著論文において発表した(Velasco et al. Orphanet J. Rare Dis. 2014)。

(2)分子病態とヘテロクロマチン形成の制御ネットワークの解明

4 つの ICF 症候群原因遺伝子のうち新規に同定した CDCA7 及び HELLS の産物に対する抗体を入手し、免疫染色法により細胞内局在を調べたところ、予想通り既知の DNMT3B 及び ZBTB24 と同様に細胞核内に局在していた。4 つの原因遺伝子の産物の生理的な機能を知るため、マウスとヒトの培養細胞(NIH3T3 及

び HEK293)を用いて、ゲノム編集により各遺伝子のノックアウト(欠損)細胞を作成した。その結果、これらの細胞は増殖が非常に遅いこと、核型の異常や染色体数の異常を呈することが分かった。すなわち、ICF 患者の症状の幾つかは、細胞増殖の異常や染色体分配の異常で説明できるのかもしれない。ただし、ICF 患者のリンパ球で見られるような花冠状接合染色体は見られなかった。また、ZBTB24 欠損細胞では CDCA7 遺伝子の転写物が減少すること、その逆は真でないことを明らかにし、ZBTB24 が CDCA7 遺伝子の転写を正に制御する上流因子であることを発見した。これにより ICF 症候群の原因遺伝子産物どうしの機能的な相互関係、つまり制御ネットワークの一端が明らかになった。

次に ICF 症候群原因遺伝子の産物と物理的に相互作用するタンパク質を調べた。タグ付 ZBTB24 又はタグ付 CDCA7 を培養細胞中で発現させ、タグに対する抗体で標的タンパク質の複合体をプルダウンしたのち、MS/MS 法により複合体に含まれていたタンパク質を網羅的に同定した(プロテオミクス解析)。その結果、ZBTB24 及び CDCA7 それぞれについて 100 個程度の複合体構成タンパク質の候補を同定することに成功した。非常に興味深いことに、CDCA7 は HELLS と相互作用していた。又、CDCA7 が非相同 DNA 末端結合に関連する数種類の因子と相互作用することを発見し、ICF 症候群と DNA 修復との関係を初めて指摘することに成功した(Unoki et al.投稿準備中)。興味深いことに、CDCA7 に ICF 患者で見つかったアミノ酸置換を導入すると、DNA 修復関係の因子との相互作用が消失又は減弱した。これにより、ICF 症候群で観察される免疫グロブリンの産生異常やヘテロクロマチンの崩壊に対して、DNA 修復の異常という観点からアプローチできる可能性を示すことができた。

最後に、ICF 症候群の病態を個体レベルで研究するため、ZBTB24 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。その結果、誕生後 2 型 ICF 症候群を呈するヒトの ZBTB24 の完全欠損とは異なり、ZBTB24 完全欠損マウスはすべて胎生致死であり、生仔は得られなかった。おそらくヒトには ZBTB24 の欠損を補う因子が存在するが、マウスにはそれがないため致死なのであろう。このため、ZBTB24 ノックアウトマウスはヒトの 2 型 ICF のモデルとはならなかった。ただし、発生遅滞があるものの死亡する前の胎仔の羊膜組織を調べたところ、サテライト DNA の低メチル化を示唆する所見を得たので、ZBTB24 は恐らくマウスにおいても DNA メチル化に関わると推定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Thijssen, P.E., Ito, Y., Grillo, G., Wang, J., Velasco, G., Nitta, H., Unoki, M., Yoshihara, M., Suyama, M., Sun, Y.,

Lemmers, R.J.L.F., de Greef, J.C., Genery, A., Picco, P., Kloeckener-Gruissem, B., Gungor, T., Reisli, I., Picard, C., Kebaili, K., Roquelaure, B., Iwai, T., Kondo, I., Kubota, T., van Ostaijen-Ten Dam, M.M., van Tol, M.J.D., Weemaes, C., Francastel, C., van der Maarel, S.M. & Sasaki, H. Mutations in CDCA7 and HELLS cause immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome. Nat. Commun. 6, 7870, 査読有, 2015
DOI: 10.1038/ncomms8870

鷗木元香, 佐々木裕之. エピジェネティック調節(DNA メチル化)生体の科学 66 (特集)細胞シグナル操作法, 474-475, 2015
<https://doi.org/10.11477/mf.2425200314>

Velasco, G., Walton, L. E., Sterlin, D., Hedouin, S., Nitta, H., Ito, Y., Fouyssac F., Megarbane, A., Sasaki, H., Picard, C. & Francastel, C. Germline genes hypomethylation and expression define a molecular signature in peripheral blood of ICF patients: implications for diagnosis and etiology. Orphanet J. Rare Dis. 9, 56, 査読有, 2014

DOI: 10.1186/1750-1172-9-56

[学会発表](計 9 件)

鷗木元香. 招待講演, DNA 低メチル化を伴う ICF 症候群発症の分子基盤. 大阪大学蛋白質研究所蛋白研セミナー「生命システムを支配するエピジェネティクス」, 大阪大学(大阪府吹田市) 2016.12.21

佐々木裕之. 招待講演, エピジェネティクスと細胞記憶と医学. 三和化学研究所 Advans 研究会 2016, ホテルグランドパレス(東京都千代田区) 2016.12.11

佐々木裕之. 招待講演, エピジェネティクスと細胞記憶と医学. 九州大学医学部第一内科第 112 回開講記念会, 九州大学(福岡県福岡市) 2016.11.23

鷗木元香. 招待講演, DNA 低メチル化を伴う ICF 症候群発症の分子基盤の解明. 第 1 回エピジェネティック修飾読み手分子の構造と生命機能をつなぐ会, 九州大学(福岡県福岡市) 2016.9.13

佐々木裕之. 招待講演, エピジェネティクスと細胞記憶と疾患. 第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会, 国立成育医療研究センター(東京都世田谷区) 2016.7.23-24

佐々木裕之, 新田洋久, 伊藤雄哉, 鷗木元香. 招待講演, ZBTB24 の欠損はサテライト配列の DNA メチル化異常と先天性免疫不全症 ICF 症候群を引き起こす, 第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015.12.1-3

伊藤雄哉, P. E. Thijssen, Guillaume Velasco, 新田洋久, 鵜木元香, 吉原美奈子, Capucine Picard, 岩井艶子, 近藤郁子, 久保田健夫, 須山幹太, Claire Francastel, S. M. van der Maarel, 佐々木裕之. ICF 症候群の新規原因遺伝子の同定, 第9回日本エピジェネティクス研究会年会, 学術総合センター 一橋講堂 (東京都千代田区) 2015.5.25-26
伊藤雄哉, 新田洋久, 鵜木元香, Guillaume Velasco, Claire Francastel, Capucine Picard, P. E. Thijssen, S. M. van der Maarel, 岩井艶子, 久保田健夫, 吉原美奈子, 須山幹太, 佐々木裕之. 2型 ICF 症候群の新規原因遺伝子の同定, 日本人類遺伝学会第59回大会・日本遺伝子診療学会第21回大会合同大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区) 2014.11.19-22
Sasaki, H. 招待講演, Epigenetics in human health, 第10回中国河北省腫瘍学術大会, 中国河北省唐山市, 2014.8.16

〔図書〕(計2件)

Unoki, M. & Sasaki, H. ICF syndrome. Encyclopedia of Cancer 1-5, Springer Berlin Heidelberg, 2015
鵜木元香, 佐々木裕之. 第5章: 生殖細胞形成と個体発生におけるエピジェネティクス, エピジェネティクスの産業応用 (畑田出穂, 久保田健夫監修), 78-89 シーエムシー出版, 東京, 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/epigenome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 裕之 (SASAKI, Hiroyuki)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 30183825

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鵜木 元香 (UNOKI, Motoko)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号: 30525374

(4) 研究協力者

新田洋久 (NITTA, Hirohisa)

九州大学・生体防御医学研究所・研究生

伊藤雄哉 (ITO, Yuya)
九州大学大学院・医学系研究科・大学院生

須山幹太 (SUYAMA, Mikita)
九州大学・生体防御医学研究所・教授

van der MAAREL, Silvere M.
Leiden University Medical Center・教授

FRANCASTEL, Claire
Universite Paris Diderot・グループリーダー