

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06758

研究課題名(和文) コケイン症候群における転写調節異常と神経細胞の分化・維持機構への影響

研究課題名(英文) Abnormal transcriptional regulation in Cockayne syndrome and its effect on neuronal differentiation

研究代表者

橋本 悟 (HASHIMOTO, Satoru)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：60352150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コケイン症候群は紫外線によって生じるDNA損傷の修復因子に変異を伴う常染色体劣性遺伝病である。その症状は多岐にわたり、出生時に発症している重症型の存在も鑑みて、DNA損傷修復機構の破綻だけでは全ての症状に対する病態メカニズムを理解することが困難である。そこで、コケイン症候群原因遺伝子の別の機能として転写調節機能の有無を、神経細胞への分化系を用いて検討した。SH-SY5Yをベースに、コケイン症候群原因遺伝子の一つであるCSB遺伝子を標的としたCRISPRシステムを用いて軽症型、重症型の各コケイン症候群モデル細胞を作製し、分化誘導因子に対する反応に異常があることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Cockayne syndrome is a rare autosomal recessive disease with a mutation on DNA repair genes against UV induced DNA lesions. Since Cockayne syndrome has multiple phenotypes, the pathophysiological symptoms of Cockayne syndrome patients are rather complicated. To explore the new function of Cockayne syndrome genes, we investigated the cell-differentiation experiments using SH-SY5Y cells. We success to established mild and severe Cockayne syndrome model cells using CRISPR system against CSB gene, and found the difference between mild and severe model cells upon cell differentiation inducing factors.

研究分野：転写調節

キーワード：コケイン症候群

## 1. 研究開始当初の背景

コケイン症候群は常染色体劣性遺伝形式を示す神経、発育障害、光線過敏、難聴、網膜色素変性症、齲歯を主体とする全身性疾患であるが、神経症状は患者 QOL 低下の大きな要因である。早老症の一種として知られるコケイン症候群は、臨床的に 5 歳以下で死亡する重症型から、50 歳以上まで生存する軽症型まで幅広いスペクトラムを持つ常染色体劣性遺伝疾患であり、重症型と古典型である中等症型では精神遅滞が、軽症型では認知症の急激な進行が問題となっている。このことは、コケイン症候群の原因遺伝子が神経細胞の分化と維持の両方に関与していることを強く示唆する。

一方でこれまでのコケイン症候群に関する研究は、その原因遺伝子の働きである、紫外線による DNA 障害の修復機序を解明することを目的とし、主に線維芽細胞を用いて行われてきた。紫外線による DNA 損傷の修復には、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) が行われるが、この NER には 2 種類の経路がある。一つはゲノム全体における修復を担う経路、もう一つは遺伝子領域のみ修復する転写と共役した経路である。コケイン症候群の原因遺伝子は、この転写と共役した経路に関与するため、コケイン症候群の原因遺伝子と転写活性は密接に関与していると考えられている。また紫外線が皮下の臓器に到達する事はなく、コケイン症候群の様々な症状を研究するには、個々の臓器由来の細胞を用いて、原因遺伝子の DNA 修復機構以外の機能を検討する必要があると考えられている。

コケイン症候群原因遺伝子の一つである ERCC6 (CSB) 遺伝子は、転写伸長因子としても知られている。また我々はこれまでに、DNA 修復因子が特定の遺伝子の転写調節に関わり、この転写調節の異常が認知機能の形成と深く相関する事を報告している。同様の研究は複数の欧州の研究チームと共同で進めており、転写異常症候群という新しい疾患概念を提唱している。これまでの研究で、コケイン症候群における皮下脂肪組織の減少は、脂質代謝関連遺伝子発現の異常と脂肪細胞の分化の異常によることを見いだしている。さらにコケイン症候群の原因遺伝子である CSB 遺伝子において、臨床症状と遺伝子変異部位との部分的な相関性をすでに見いだしており、重症型と軽症型の CSB 変異体の機能を正常型の CSB の機能と比較することにより、神経細胞の分化および維持に関する新たな知見が得られることが期待されている。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、軽症型コケイン症候群では原因遺伝子の一種である CSB 遺伝子の翻訳開始付近に終止コドンが挿入され、結果と

して CSB 蛋白質が全く発現しないといった、変異の位置と臨床症状との関連性を明らかにしている。

そこで、神経細胞へ分化可能な SH-SY5Y 細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来) を用いて軽症型及び重症型のコケイン症候群モデル細胞を作製して、以下の項目を明らかにすることで、認知機能異常の分子メカニズムを明らかにしていく。

- (1) CSB が SH-SY5Y 細胞の神経細胞への分化・維持にどのような影響を及ぼすかを形態学的、生化学的に明らかにする。
- (2) 各 CSB 変異を導入した SH-SY5Y 細胞の遺伝子発現パターンを、神経細胞への分化・維持の過程を通して経時的に調べる。
- (3) (2) で観察される異常発現を示す遺伝子群の転写調節において、CSB がどのような役割を有するか明らかにする。特に、CSB が転写の開始、伸長、停止のどの段階で、どのような因子と相互作用を及ぼすかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

上述の目標を達成するため、以下の研究項目を順に実施した。

- (1) コケイン症候群モデル細胞の作製：神経細胞に分化可能なヒトグリオブラストーマ由来である SH-SY5Y 細胞内の CSB 遺伝子に、CRISPR-CAS9 システムを用いて軽症型 (翻訳開始直後部) および古典型 (ヘリケースドメイン内部) の欠失変異の導入を行い、各種コケイン症候群モデル細胞を作製する。
- (2) 神経細胞の分化・維持機構における CSB の影響の確認：IGF1 や NGF またはレチノイン酸を用いて神経細胞への誘導を行った後、細胞の形態学的変化を観察する。
- (3) 各モデル細胞における神経分化・維持における遺伝子発現パターンの確認：定量的 PCR を用いて、モデル細胞の神経分化・維持特異的遺伝子の発現パターンを確認する。
- (4) CSB による神経細胞分化・維持関連遺伝子群調節メカニズムの確認：クロマチン免疫沈降法を用いて、神経細胞分化・関連遺伝子上における CSB の局在を調べ、他の転写因子との相互作用を確認する。
- (5) 他疾患細胞との比較：コケイン症候群の類似疾患である色素性乾皮症患者由来の細胞、またコケイン症候群と類似の臨床症状を呈しつつ転写因子複合体であるメディアーターに変

異を有する患者由来細胞における転写調節機能との比較を行う。

#### 4. 研究成果

先ず初めに軽症型、および重症型の各 CSB モデル細胞を CRISPR システムで作成した。軽症型では CSB 遺伝子の翻訳開始点下流すぐの場所に、重症型ではヘリケースドメイン内部にガイド RNA を設定したコンストラクトを作成し、SH-SY5Y 細胞にエレクトロポレーション法にて導入した。導入後 48 時間の時点で Multina を用いた DNA 切断効率を確認し、その後限界気色法にてサブクローニングを行った。得られた複数のクローン中の CSB 蛋白質の発現量をウェスタンブロットにて確認したところ、軽症型にて完全に CSB が枯渇したクローンを得ることができなかった。このため、異なるガイド RNA 配列のコンストラクトを 3 種類作成し、同時に導入を行ったところ、得られたクローン中に CSB を欠失した細胞を得ることができた。重症型についても同様に異なる 3 種類のコンストラクトを作成してモデル細胞の作成を行った。最終的に CSB 遺伝子配列を確認した。

続いて、作成したモデル細胞を用いて神経細胞への分化誘導を行い、形態学的変化を観察した。IGF1 や NGF またはレチノイン酸といった複数の誘導因子を用いて分化誘導を開始し、1 週間後の携帯を観察したところ、いずれの誘導剤においても重症型、軽症型ともに神経突起を確認できた。形態学的に変化を認めなかったため、血清刺激に対する転写応答を検討した。これまでの研究で、コケイン症候群の類縁疾患である神経症状を有した色素性乾皮症で早期発現遺伝子群 (JUN, FOS, EGR) の発現異常を確認しているため、同様の変化が重症型 CSB 細胞でも見いだせると予測していたが、予想に反して共通の遺伝子発現異常パターンを認めることができなかった。しかしながら、軽症型 CSB と重症型 CSB 細の間では異なる遺伝子発現プロファイリングを示すことが見いだされた。このことより、同じグループにまとめられているコケイン症候群と色素性乾皮症であっても、それぞれの神経症状発症メカニズムは大きく異なり、また、同じコケイン症候群であっても遺伝子発現異常のパターンによって臨床症状が異なることが推測された。また転写因子複合体である MED の変異はコケイン症候群と類似の発達障害を示すため、MED 変異を有する患者細胞における血清刺激後の早期発現遺伝子プロファイリングも実施したが、コケイン症候群との共通性は見いだせなかった。

現在は、軽症型と重症型で異なるパターンの発現をする遺伝子のプロモーター上における転写開始調節機序の異常を確認すべく、クロマチン免疫沈降法を継続して実施し、ChIP シークエンスの準備を進めている。

#### 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 2 件)

1. Donnio, L. M., \* Bidon, B., \* Hashimoto, S., \* May, M., Epanchintsev, A., Ryan, C., Allen, W., Hackett, A., Gecz, J., Skinner, C., Stevenson, R. E., de Brouwer, A. P. M., Coutton, C., Francannet, C., Jouk, P. S., Schwartz, C. E., and Egly, J. M. (2017) MED12-related XLID disorders are dose-dependent of immediate early genes (IEGs) expression. *Hum Mol Genet* 26, 2062-2075 (\*: co-first author) (査読有り)
2. Hashimoto, S., Anai, H., and Hanada, K. (2016) Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ* 38, 9, (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

橋本 悟 (HASHIMOTO, Satoru)  
徳島大学・病院・特任講師  
研究者番号：60352150

##### (2) 研究分担者

花田 克浩 (HANADA, Katsuhiko)  
大分大学・医学部・助教

研究者番号：90581009

高成 広起 (TAKANARI, Hiroki)  
徳島大学・病院・特任講師  
研究者番号：70723253

寺林 健 (TERABAYASHI, Takeshi)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：40452429