

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月19日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08287

研究課題名(和文)体細胞モザイクがもたらす病態のモデル細胞系の構築

研究課題名(英文)Cell culture model elucidates severe phenotype of female in X-linked disorder

研究代表者

稲垣 秀人 (INAGAKI, Hidehito)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：70308849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メンデル遺伝病の基本として、X連鎖遺伝は男性は重症、女性は軽症あるいは保因者となることが想定される。しかし、X染色体上のEFNB1遺伝子が原因の頭蓋・前額・鼻症候群では、女性重症、男性軽症でありX連鎖遺伝のパラドックスと言われている。この現象は、女性におけるX染色体のランダムな不活化が、正常タンパク発現細胞と変異発現細胞の混在状態、いわゆるモザイク状態を引き起こすことで正常発生を攪乱することが原因とされる。本研究ではこのモザイク状態をin vitroで再現することを目指し、EFNB1発現培養細胞株を樹立し、培養皿上にてこの混在状態での細胞移動度がより阻害される現象を再現することができた。

研究成果の概要(英文)：In Mendelian disorders, X-linked diseases often manifest more severe phenotypes in men than in women. But in craniofrontonasal dysplasia women develop more severe symptoms than men do, so to say a paradox in X-linked diseases. This peculiar phenomenon is believed to be caused by random X inactivation in women, which leads to the mosaicism of normal ligand EFNB1 protein-expressing cells and mutant protein cells that disrupting normal development of embryo. In this research, I established EFNB1-expressing cell lines and observed more severe inhibition of proper cell migration under the mixture of normal cells and mutant cells, which reproduced the more severe phenotype in women in craniofrontonasal dysplasia.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：X連鎖 X不活化 ephrin 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

メンデル遺伝病(単一遺伝子疾患)では、優性劣性の区別はそのタンパクの機能に対する変異の影響によって規定され、表現型として表出される。ハプロ不全、ドミナントネガティブ効果などさまざまである。伴性遺伝、例えばヒトのX連鎖遺伝病は通常男性の方が重篤であり、女性はキャリアあるいは軽症である。女性の重症例は男性致死で多くは説明される。これらの表現型はいずれも、女性がXXであることにより変異アレルの機能を正常アレルが相補した結果として捉えられるが、実際には女性のX染色体不活化現象を考慮しなければならない。すなわち、ヒトのX染色体不活化は細胞によって両親由来のうちのどちらか片側をランダムに不活化することで、X染色体上の遺伝子の男女間の量的不一致を防ぐ。これにより、X連鎖遺伝病では、女性は正常な細胞と変異遺伝子の発現する細胞との2種類が混在した、いわゆる「モザイク」な状態になっている。

頭蓋・前額・鼻症候群(CFNS、MIM#304110)では、女性の重症例が多く知られ、眼間解離などのさまざまな症状が現れる一方、同じ家系の男性患者は軽症である。この疾患はXq12のEFNB1遺伝子に変異が見つかった(Wieland et al. 2004)。X連鎖の遺伝性疾患として、CFNSでの男性軽症例の多さはパラドックスとしてそのメカニズムが議論されてきた。患者女性の組織では、X染色体のランダムな不活化により、正常タンパク発現細胞と変異タンパク発現細胞の2種類の独立した細胞集団が混在しているモザイクな状態が確認された(Wieland et al. 2008)。さらについで最近、男性の特殊な重症例6例を調べた結果、さまざまな組織サンプルにおいて、6例すべてで正常遺伝子と変異遺伝子の配列が検出され、正常細胞とのモザイク変異であることが確認された(Twigg et al. 2013)。すなわち、これらの例では発生の初期段階で変異が起きたことで、初期胚が正常細胞と変異細胞のモザイクとなり、これが女性でのランダムなX染色体不活化と同様な状態となり、男性での重篤化につながっていることを示唆している。

EFNB1は細胞表面に発現する膜タンパク質Ephrinの一種であり、同様に膜表面に発現するEphレセプターに対するリガンドである。このリガンド-レセプターが結合すると、細胞内へシグナル伝達され、細胞の接着や形態を制御する。Ephrin(リガンド)が発現する細胞とEph(レセプター)が発現する細胞は生体内で別個に存在し、別の領域の細胞群がそれぞれ移動してきて界面で接触することによってシグナルが走り、反発を起こすことにより、例えば神経系での神経細胞移動、軸索ガイダンスなどの機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

CFNSでは胎生期の顔面中心における癒合での不具合が発生し、完全に閉じない状態での

いわゆる口唇口蓋裂等を引き起こす。このタイミングで細胞群の移動が攪乱されることが、症状を引き起こすと考えられる。しかしながら、一般的に男性では軽症であることを考慮すると、EFNB1の変異が即症状に結びつくような単純なものではなく、正常細胞と変異細胞のモザイク状態による、何らかの統御不安定性が想定された。

2. 研究の目的

本研究では、CFNSの変異例を代表としてモデル培養細胞系を構築し、X連鎖のCFNSの女性重症化のパラドックスを解決することをめざす。また、細胞のモザイク状態が引き起こす疾患という新しい視点から、単一遺伝病の病態の解明に役立つ新しい概念を提唱することを目標とした。

CFNSの女性重症化を例に、モデル細胞系を構築し、その変異の種類、あるいはX不活化のskewが表現型に与える影響を詳細に解析することで、モデル化する。このモデル系が機能すれば、女性患者から生まれる男児の症状の予測にもつながり、またX不活化のskewによる症状の違いの予測も可能になると考えた。

女性重症化例では、もう一つプロトカドヘリン遺伝子PCDH19が知られており、また一方で、体細胞モザイクによる疾患が近年明らかになってきている。このように、細胞の混在状態が疾患を重篤化する例はCFNSにとどまらず、他にも存在する可能性が考えられる。細胞レベルでのいわば「ドミナントネガティブ効果」という現象からさらに、体細胞モザイクがもたらす遺伝病の病態の新たな概念を確立することができれば、インパクトは大きいと考えた。

3. 研究の方法

(1) In vitroでのEFNB1機能解析

EFNB1の変異のタンパク機能への影響を調べるため、当大学病院のCFNS患者より同定された変異2種類および既報告の変異1種類の合計3種類について、in vitroでのリガンド-レセプター結合実験をおこなった。細胞外ドメインにタグをつけたコンストラクトを作製し、大腸菌にて発現させた。EFNB1のレセプターであるEPHB2の細胞外ドメインにFLAGタグをつけたタンパクを作製した。そしてanti-FLAG-agaroseビーズに結合させ、一方正常型および各変異型のEFNB1細胞外ドメイン-T7タグタンパクを作製し、ビーズに結合させ、単離した。得られた結合EFNB1-T7タンパクをウエスタンブロットにより検出し、結合量を定量することで、各変異体のリガンドへの結合能を数値化した。

(2) 細胞での機能解析

EFNB1およびそのレセプターEPHB2はともに特定の細胞でのみ発現しているため、通常の培養細胞に強制発現することにより、それぞ

れの発現細胞を再現し、その機能を調べることができる。内在のそれらのリガンドレセプターを発現していないHEK293細胞を用いて、タンパク全長を強制発現するコンストラクトを作製した。その際、蛍光タンパクをIRESで共発現させてリガンド、レセプター細胞を区別できるようにした。タンパク発現量が実験結果に影響するのを最小限にするため、stableラインを複数樹立し、発現量が適切なラインを選抜した。この細胞を用いて、リガンド細胞とレセプター細胞の接触面での反発の速度について、経時的に追って測定した。

(3)細胞塊形成実験

次に、EFNB1の正常型と変異体発現細胞が接触した際に起こる反発を調べるために、EPHB2細胞(蛍光タンパク質で標識してある)との共存下での細胞の移動を観察した。まずは一定時間培養した後のコロニー状に細胞塊を形成するEPHB2細胞の形態を観察した。正常な機能を有するEFNB1を用いた場合はある一定の大きさになるのに対し、EFNB1変異体の場合において、EPHB2細胞がどのような挙動を示すか、また実際にEFNB1-EPHB2結合からのシグナル伝達に異常が起きているかを調べた。コロニーの大きさあるいはコロニーの出現率などから、正常細胞との違いを数値化して比較した。

4. 研究成果

(1)プルダウン実験

大腸菌で発現させた細胞外ドメインを用いた結合実験にて、CFNS患者の変異について、正常型や別の報告の変異と合わせて、発現ベクターを構築し、プルダウンアッセイによりその結合能を測定した。その結果、変異型aについては正常型に比較して結合能が低下し、変異型bは結合能が逆に上昇している結果が得られた。一方、別の文献の既報告の変異型cでは変異型aと同様に結合能が低下していた。変異の位置はいずれもレセプターリガンド結合に関わる部位であることから、構造変化により親和性が変化したと考えられた。親和性が上がっても下がっても、これらの変異は典型的なCFNSの症状を呈していることから、どの変異でも、同じメカニズムで症状を呈することが示唆された。このことは、女性でのランダムなX不活化に伴って生じるモザイシズムにより、細胞によって結合能の差が生じるために、正常な細胞移動が妨げられることの重要な裏付けになると考えられた。

(2)細胞での機能解析

EFNB1を強制発現するヒト培養細胞を作成し、レセプター発現細胞との相互作用の効果を検討した。EPHB2発現細胞(EGFPで検出)はEFNB1発現細胞(DsRedで検出)と接触すると反発し、migrationの速度が低下する。その速度を野生型と変異型において検討し

たところ、変異型では野生型と比較して反発しにくい結果が得られた。さらに、野生型EFNB1細胞との混在状態において同様に速度を検討したところ、変異型単独と比較してさらに速度が低下する結果が得られた。一部詳細を検討する必要のあるデータではあったが、おおむねランダム不活化説を支持する結果が得られた。

(3)細胞塊形成実験

野生型あるいは変異型EFNB1を発現する前述のモデル培養細胞を用いて、レセプター発現細胞と混在して培養皿上で培養し、レセプター細胞を蛍光にて検出した。混在させてから2、3日後に観察すると、野生型リガンド細胞と混在したレセプター細胞は比較的大きな細胞塊を形成し、明確にEFNB1発現細胞と区別して観察された。一方、変異型a、b、cいずれかと混在させたレセプター細胞では、細胞塊の形成が不明瞭になり、または細胞塊が見られない、混在したままの状態を観察された。このため、細胞塊形成にはある程度の結合能が存在することが必要であることが考えられた。一方、変異型のいずれかと野生型EFNB1細胞にレセプター細胞を混在させた場合には、細胞塊の形成がほとんど見られなくなった。そのため、変異型単独で混在した際に見られていた残存細胞塊形成能が、野生型と変異型の混在状態ではほとんど見られなくなった。この結果は、女性におけるランダムなX不活化由来のモザイシズムをよく示しており、ヘテロ変異における野生型EFNB1と変異型EFNB1の発現細胞の混在状態が、正常な細胞移動や反発を阻害し、口唇口蓋裂のような発生異常の原因となることを示唆する結果となった。

以上の結果から、体細胞モザイクがもたらす病態のモデル細胞系の構築が概ね達成させた。これらの結果は、2017年度の日本分子生物学会にて口頭発表し、近日中に論文としてまとめる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

- (1) Yokoi K, Nakajima Y, Ohye T, Inagaki H, Wada Y, Fukuda T, Sugie H, Yuasa I, Ito T, Kurahashi H. Disruption of the Responsible Gene in a Phosphoglucomutase 1 Deficiency Patient by Homozygous Chromosomal Inversion. *JIMD Rep.* 2018 *in press*. 査読有. doi: 10.1007/8904_2018_108.
- (2) Kibe M, Ibara S, Inagaki H, Kato T, Kurahashi H, Ikeda T. Lethal persistent pulmonary hypertension of the newborn in Bohring-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018 *in press*. 査読有. doi: 10.1002/ajmg.a.38681.
- (3) Taniguchi-Ikeda M, Morisada N,

- Inagaki H, Ouchi Y, Takami Y, Tachikawa M, Satake W, Kobayashi K, Tsuneishi S, Takada S, Yamaguchi H, Nagase H, Nozu K, Okamoto N, Nishio H, Toda T, Morioka I, Wada H, Kurahashi H, Iijima K. Two patients with PNKP mutations presenting with microcephaly, seizure, and oculomotor apraxia. *Clin Genet*. 2018 in press. 査読有. doi: 10.1111/cge.13106.
- (4) Kato T, Ouchi Y, Inagaki H, Makita Y, Mizuno S, Kajita M, Ikeda T, Takeuchi K, Kurahashi H. Genomic Characterization of Chromosomal Insertions: Insights into the Mechanisms Underlying Chromothripsis. *Cytogenet Genome Res*. 2017;153(1):1-9. 査読有. doi: 10.1159/000481586.
- (5) Azuma Y, Töpf A, Evangelista T, Lorenzoni PJ, Roos A, Viana P, Inagaki H, Kurahashi H, Lochmüller H. Intragenic DOK7 deletion detected by whole-genome sequencing in congenital myasthenic syndromes. *Neurol Genet*. 2017 May 3; 3(3):e152. 査読有. doi: 10.1212/NXG.0000000000000152.
- (6) Kohmoto T, Okamoto N, Naruto T, Murata C, Ouchi Y, Fujita N, Inagaki H, Satomura S, Okamoto N, Saito M, Masuda K, Kurahashi H, Imoto I. A case with concurrent duplication, triplication, and uniparental isodisomy at 1q42.12-qter supporting microhomology-mediated break-induced replication model for replicative rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2017 Apr 28;10:15. 査読有. doi: 10.1186/s13039-017-0316-6.
- (7) Nagasaka M, Taniguchi-Ikeda M, Inagaki H, Ouchi Y, Kurokawa D, Yamana K, Harada R, Nozu K, Sakai Y, Mishra SK, Yamaguchi Y, Morioka I, Toda T, Kurahashi H, Iijima K. Novel missense mutation in DLL4 in a Japanese sporadic case of Adams-Oliver syndrome. *J Hum Genet*. 2017 Sep;62(9):851-855. 査読有. doi: 10.1038/jhg.2017.48.
- (8) Inoue Y, Sakamoto Y, Sugimoto M, Inagaki H, Boda H, Miyata M, Kato H, Kurahashi H, Okamoto T. A Family With Craniofrontonasal Syndrome: The First Report of Familial Cases of Craniofrontonasal Syndrome With Bilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2017 Jan 31. 査読有. doi: 10.1597/15-347.
- (9) Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Ouchi Y, Ohye T, Kurahashi H. Palindrome-Mediated Translocations in Humans: A New Mechanistic Model for Gross Chromosomal Rearrangements. *Front Genet*. 2016 Jul 12;7:125. 査読有. doi: 10.3389/fgene.2016.00125.
- (10) Boda H, Uchida H, Takaiso N, Ouchi Y, Fujita N, Kuno A, Hata T, Nagatani A, Funamoto Y, Miyata M, Yoshikawa T, Kurahashi H, Inagaki H. A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome. *J Hum Genet*. 2016 Aug;61(8):701-3. 査読有. doi: 10.1038/jhg.2016.32.
- (11) Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. *J Virol Methods*. 2016 Feb;228:74-8. 査読有. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.001.
- (12) Morine M, Kohmoto T, Masuda K, Inagaki H, Watanabe M, Naruto T, Kurahashi H, Maeda K, Imoto I. A unique TBX5 microdeletion with microinsertion detected in patient with Holt-Oram syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Dec;167A(12):3192-6. 査読有. doi: 10.1002/ajmg.a.37359.
- (13) Miyazaki J, Ito M, Nishizawa H, Kato T, Minami Y, Inagaki H, Ohye T, Miyata M, Boda H, Kiriya Y, Kuroda M, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Intragenic duplication in the PKHD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease. *BMC Med Genet*. 2015 Oct 26;16:98. 査読有. doi: 10.1186/s12881-015-0245-3.
- (14) Nakamura Y, Kikugawa S, Seki S, Takahata M, Iwasaki N, Terai H, Matsubara M, Fujioka F, Inagaki H, Kobayashi T, Kimura T, Kurahashi H, Kato H. PCSK5 mutation in a patient with the VACTERL association. *BMC Res Notes*. 2015 Jun 9;8:228. 査読有. doi: 10.1186/s13104-015-1166-0.
- (15) Tsuge I, Morishita M, Kato T, Tsutsumi M, Inagaki H, Mori Y, Yamawaki K, Inuo C, Ieda K, Ohye T, Hayakawa A, Kurahashi H. Identification of novel FATP4 mutations in a Japanese patient with ichthyosis prematurity syndrome. *Hum Genome Var*. 2015 Feb 12;2:15003. 査読有. doi: 10.1038/hgv.2015.3.
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- (1) 稲垣秀人、杉本賢政、堤真紀子、井上義一、田口佳広、帽田仁子、宮田昌史、奥本隆行、吉川哲史、倉橋浩樹. 細胞培養モデルが明らかにしたX連鎖の疾患での

- 女性重症化. 第 40 回日本分子生物学会
年会. 2017 年 12 月 6 日～9 日. 神戸国際
会議場(兵庫県神戸市). 口頭発表
- (2) Hidehito Inagaki, Kazuo Kanyama,
Takema Kato, Yuya Ouchi, Toshiyuki
Yamamoto, Hiroki Kurahashi. 逆位重
複・端部欠失の全ゲノムシーケンスによ
る切断点解析. 日本人類遺伝学会第 62 回
大会. 2017 年 11 月 15 日～2017 年 11 月
18 日. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).
口頭発表.
- (3) Hidehito Inagaki, Kazuo Kanyama,
Takema Kato, Yuya Ouchi, Toshiyuki
Yamamoto, Hiroki Kurahashi. Breakpoint
analysis of chromosomes having inverted
duplication with terminal deletion by NGS.
ASHG2017(国際学会) October 17-21, 2017.
Orange County Convention Center (Orland,
USA) ポスター
- (4) Kazuo Kanyama, Hidehito Inagaki,
Takema Kato, Yuya Ouchi, Toshiyuki
Yamamoto, Hiroki Kurahashi. Breakpoint
analysis of chromosomes having inverted
duplication with terminal deletion by NGS.
The 12th International Workshop on Advance
Genomics. June 27-29, 2017 (2017 年 6
月 27 日～2017 年 6 月 29
日). Hitotsubashi Hall (Tokyo, Japan).
ポスター.
- (5) Hidehito Inagaki, Hiroko Boda,
Hidetoshi Uchida, Nobue Takaiso, Yuya
Ouchi, Naoko Fujita, Asami Kuno,
Tadayoshi Hata, Arisa Nagatani, Yuri
Funamoto, Masafumi Miyata, Tetsushi
Yoshikawa, Hiroki Kurahashi. A PDE3A
mutation in familial hypertension and
brachydactyly syndrome. The 13th
International Congress of Human
Genetics(国際学会)2016 年 4 月 3 日～
2016 年 4 月 7 日. 国立京都国際会館(京
都府京都市). ポスター.
- (6) Masanori Sugimoto, Hidehito Inagaki,
Makiko Tsutsumi, Yoshikazu Inoue,
Yoshihiro Taguchi, Hiroko Boda,
Masafumi Miyata, Takayuki Okumoto,
Tetsushi Yoshikawa, Hiroki Kurahashi.
Cell culture model for X-linked
disorder: craniofrontonasal
dysplasia and severe phenotype in
female. The 13th International
Congress of Human Genetics (国際学
会). 2016 年 4 月 3 日～2016 年 4 月 7 日.
国立京都国際会館(京都府京都市). 口
頭発表.
- (7) H. Inagaki, S. Ota, H. Nishizawa, H.
Miyamura, K. Nakahira, M. Suzuki, M.
Tsutsumi, T. Kato, S. Nishiyama, I.
Yanagihara, H. Kurahashi. Deep

sequencing of sodium
bisulfite-treated genomic DNA
revealed in vivo G-quadruplex
structure affecting the gene
expression of ANXA5 that causes
obstetric complications. The 11th
International Workshop on Advanced
Genomics (国際学会) 2016 年 5 月 20 日
～2016 年 5 月 22 日. 一橋講堂(東京都千
代田区). ポスター.

- (8) H. Inagaki, H. Miyamura, M. Tsutsumi,
T. Kato, H. Nishizawa, H. Kurahashi.
Massive parallel sequencing revealed
the conformational dynamics of the
non-B form DNA at the promoter.
ASHG2015 (国際学会). 2015 年 10 月 6
日～2015 年 10 月 10 日. ポルチモアコン
ベンションセンター(アメリカ合衆国メ
リーランド州ボルチモア). ポスター.
- (9) 稲垣秀人, 宮村浩徳, 大江瑞恵, 堤真紀
子, 加藤武馬, 西澤春紀, 倉橋浩樹. 次
世代シーケンサー解析によるプロモ
ータ部位の DNA 高次構造変化の解析. 日本
人類遺伝学会第 60 回大会. 2015 年 10
月 14 日～2015 年 10 月 17 日. 京王プラザ
ホテル(東京都新宿区). 口頭発表
- (10) 稲垣秀人, 宮村浩徳, 大江瑞恵, 堤真紀
子, 加藤武馬, 西澤春紀, 倉橋浩樹. NGS
によるプロモータ部位の DNA 高次構造変
化の解析. 第 38 回日本分子生物学会年
会. 2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日.
ポートピアホテル(兵庫県神戸市). ポ
スター.

〔図書〕(計 0 件)

〔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.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 秀人 (INAGAKI, Hidehito)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講
師

研究者番号: 70308849