

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08330

研究課題名(和文) RNA-FISH法による1細胞発現解析とエピジェネティックメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Research for single cell expression analysis and epigenetic mechanism using RNA-FISH analyses

研究代表者

涌井 敬子 (Wakui, Keiko)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：50324249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性疾患の発症には、ゲノムの一次構造の変化を伴わないエピジェネティックなメカニズムもあることが知られている。本研究では、相同染色体の一方に疾患関連のゲノムバリエーションを有する症例において、ゲノムバリエーションによる遺伝子発現の影響を1細胞単位でかつ相同染色体を区別して可視化することを可能とする、RNA-FISH法を確立し新知見を得ることをめざした。

X染色体の一方に部分欠失を有する保因者女性細胞を用い、XIST遺伝子のRNAプローブ、欠失領域/欠失していない領域のX染色体のDNAプローブを組み合わせた3色RNA-DNA連続FISH法により、異常Xと正常Xの不活化のパターンを解析し、有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Genetic diseases are usually caused by mutation of each responsible gene, but some genetic diseases are caused by epigenetic mechanism. This research aimed at obtaining new knowledge of pathogenesis through single cell expression analysis using RNA-FISH method which allow distinguish the homologous chromosomes. As one of the target diseases, we selected the structural X chromosome abnormalities in female. We succeeded in 3-color RNA-DNA FISH method using RNA probe for XIST gene, DNA probes for the reference region and for the target region mapped all on the X chromosome, which can detect X chromosome inactivation pattern and normal/abnormal X chromosome simultaneously in each individual nucleus. And the results of this study for the carrier females as the subjects confirmed the usefulness of this procedure, since the X chromosome inactivation pattern were consistent with the result using the another X chromosome inactivation analysis.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：1細胞解析 相同染色体 RNA-FISH エピジェネティクス X染色体不活化

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の原因に基づいた治療法や予防法の開発には、まずそれぞれの病態や発症機序の解明が重要で、そしてそれに基づく診断法の確立が求められる。

2014年時、すでに遺伝子との関連が明らかにされたヒトの疾患は4,300程度知られていたが、診断法として遺伝学的検査が確立していたのはそのうち半分ほどであり、その多くは責任遺伝子の一次構造すなわちシーケンスを解析することにより病的変異を検出しようとする方法であった。しかし、遺伝性疾患には責任遺伝子の一次構造の変化を伴わないエピジェネティックな発症機序によるものもあり、それらの疾患に対しては異なる方法を用いた新たな診断法の確立が求められる。

2. 研究の目的

ゲノムの一次構造の変化を伴わないエピジェネティックなメカニズムが、関連遺伝子の発現に影響あるいは示唆されている特定の遺伝性疾患における新たな解析法として、RNA-FISH法を用いた解析を検討する。RNA-FISH法は、相同染色体の一方にFISH法で検出可能な疾患関連遺伝子のゲノムコピー数バリエーションを有する症例などを対象として、ゲノムバリエーションによる遺伝子発現の影響を1細胞(間期核)単位で、かつ相同染色体を区別した遺伝子発現状態を可視化することを可能とする方法である。今回このRNA-FISH法を用いた解析法の確立をめざした。

現象は確認されているものの、まだ十分に解明されたとはいえない疾患や病態の発症機序についての新知見を得る可能性も期待できると考えた。

3. 研究の方法

解析候補となる疾患において発現を確認

したい遺伝子のプローブと、その遺伝子が載っている染色体のゲノムバリエーションの有無を区別できるレファレンスプローブ/ターゲットプローブとしてBACクローンをゲノムデータベースを利用して選択・準備した。それぞれ異なる蛍光色素で標識、対象から樹立したBリンパ芽球様細胞株を材料としてRNA-FISH解析し、検出された3色のシグナルを蛍光顕微鏡下で観察・解析する、ゲノムバリエーションを有する相同染色体上の遺伝子発現を直接評価する解析法の確立をめざした。

4. 研究成果

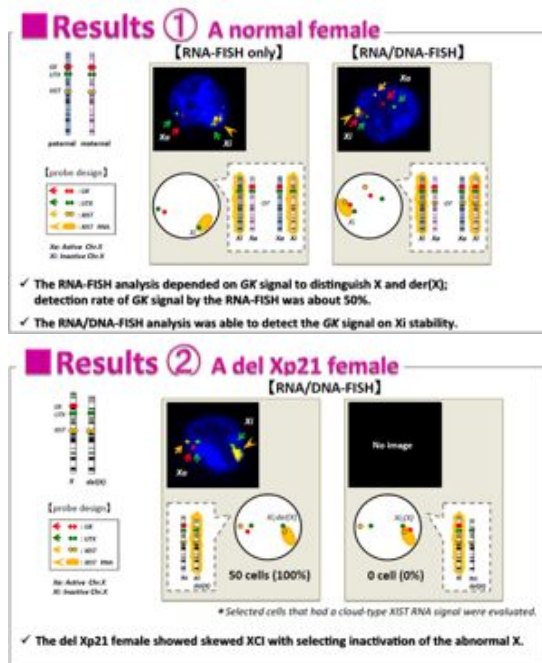
(1) 3色RNA-DNA連続FISH法の確立

X染色体不活化に関わりRNAシグナルが非常に強く観察されることが知られている*XIST*遺伝子をRNAプローブとした実験系で、手法の確立に取り組んだ。RNAシグナルを確認する*XIST*プローブ、両X染色体を認識する不活化を免れる遺伝子のレファレンスプローブ、そして正常Xと異常Xを区別するターゲットプローブの3種類を、それぞれ異なる蛍光色素で標識し、*XIST*のRNA-FISH法後、連続して他2プローブのDNA-FISH法を実施した。当初、3種類のプローブのRNA-FISH法を実施していたが、この改良法により解析精度が向上することを確認した。

(2) X染色体構造異常女性の*XIST*プローブのRNA-FISH解析

(1)で確立した*XIST*をRNAプローブとした3色RNA-DNA連続FISH解析法を、X染色体短腕に部分欠失を有する保因者女性(*del Xp21*)を対象として、各細胞ごとに正常Xと異常Xのどちらが不活化されているかX染色体不活化パターン解析し、いずれも構造異常のあるX染色体が優位に不活化されている結果を得た。アンドロゲン受容体遺伝子解析により得たX染色体不活化パターン結果と矛盾なく、本解析法の有用性が確認できた。

(1)(2)の研究成果を、2015年、ストラスブール(フランス)にて開催された第10回 European Cytogenetics Conferenceで発表したところ、ポスター賞を受賞した(213演題中5演題が選出)。



(3) *CTCF*遺伝子欠失を有する女児のX染色体不活化解析

X染色体不活化の制御に関連すると考えられている*CTCF*遺伝子の欠失を有する先天異常女児2症例のBリンパ芽球様細胞株について、X染色体不活化の異常パターンの有無について解析し、異常パターンは確認されなかった結果を得て、*CTCF*の欠失は少なくともBリンパ芽球様細胞株ではX染色体不活化に影響を及ぼさないことが示された。

この解析データを含む研究成果を、2016年第39回日本小児遺伝学会学術集会で発表、2017年にJournal of Medical Genetics に投稿・掲載された。

(4) 11p13構造異常症例の解析

無虹彩症の責任遺伝子である*PAX6*遺伝子が座位する11p13バンドにひとつの切断点を有するが、*PAX6*に関して均衡型転座に伴う欠失も転座による分断もないが、*PAX6*近傍に微細

欠失を有することが確認された無虹彩症児について、*PAX6*近傍に検出された微細欠失が*PAX6*の発現に影響を及ぼしていないかを確認するため、RNA-FISH法による解析を試みた。

対象のBリンパ芽球様細胞株において発現を確認する*PAX6*のRNAシグナルが十分な蛍光強度に検出されず、評価困難であることが判明した。

Bリンパ芽球様細胞株の次に遺伝性疾患患者の解析に材料として用いることが多い皮膚線維芽細胞株を細胞バンクより入手し、RNA-FISH解析の材料としての適性確認をめざし、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を実施し、皮膚線維芽細胞株であれば評価できる可能性が示唆されたが、本研究期間内に対象症例の皮膚線維芽細胞株を入手できず、追加解析には到らなかった。

RNA-FISH法による発現解析は、ゲノムバリエーションをFISH法で検出できることと対象の遺伝子発現が用いる材料で確認できることが必要で、利用しやすいBリンパ芽球様細胞株が材料として適していない場合があるという限界はあるが、ゲノムバリエーションの有無を相同染色体について区別したうえで発現を可視化する解析はこの方法でしかできない。特定の遺伝性疾患に対する有用な1細胞発現解析法として考慮できることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Hori I, Kawamura R, Nakabayashi K, Watanabe H, Higashimoto K, Tomikawa J, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Sugio Y, Wakui K, Hata K, Soejima H, Kurosawa K, Saitoh S. *CTCF* deletion syndrome: clinical features and epigenetic delineation. J Med Genet. 2017;54(12):836-842, 査読有, DOI:10.1136/jmedgenet-2017-104854

[学会発表](計3件)

Rie KAWAMURA, Wakaba IHA, Yoshimitsu FUKUSHIMA, Keiko WAKUI(corresponding).

Establishment of a single-cell RNA/DNA-FISH method for detecting inactivation patterns of structural X chromosome abnormalities.第10回 European Cytogenetics Conference (国際学会), 2015年, ストラスブール(フランス) *ポスター賞受賞

河村理恵, 伊波若葉, 福嶋義光, 涌井敬子 (corresponding), Xp21欠失女性症例における不活化X染色体解析 構造異常X染色体を識別するRNA/DNA-FISH 解析 . 日本人類遺伝学会第60回大会, 2015年, 東京 *若手ポスター賞ノミネート

堀いくみ, 河村理恵, 中林一彦, 家田大輔, 大橋圭, 根岸豊, 服部文子, 杉尾嘉嗣, 涌井敬子, 黒澤健司, 秦健一郎, 副島英伸, 齋藤伸治. *CTCF*遺伝子欠失を認めた2女兒の臨床的および遺伝学的検討, 第39回日本小児遺伝学会学術集会, 2016年, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

涌井 敬子 (WAKUI, Keiko)
信州大学・学術研究院医学系・講師
研究者番号: 50324249

(2)研究分担者

河村 理恵 (KAWAMURA, Rie)
信州大学・医学部・助教(特定雇用)
研究者番号: 20735534

(3)研究分担者

高野 亨子 (TAKAN0, Kyoko)

信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 70392420

(4)研究分担者

福嶋 義光 (FUKUSHIMA, Yoshimitsu)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 70273084

(5)連携研究者

古庄 知己 (KOSHO, Tomoki)
信州大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 90276311

(6)連携研究者

齋藤 伸治 (SAITOH, Shinji)
名古屋市立大学医学(系)研究科(研究院)
研究者番号: 00281824