

令和元年6月23日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21084

研究課題名(和文) DNA二本鎖間の架橋修復を指標とした新規の小頭症原因遺伝子変異の探索

研究課題名(英文) Identification of novel pathogenic variants caused by defects of interstrand DNA crosslink repair

研究代表者

岡 泰由 (OKA, Yasuyoshi)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：60762383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ゲノムの安定化維持機構の破綻により発症する遺伝性疾患患者から、新規の疾患発症関連遺伝子を同定することである。ゲノム安定化維持機構の破綻によって発症した遺伝性疾患患者の主徴の一つとして小頭症が知られている。そこで、先天性小頭症患者の次世代ゲノム解析を実施した結果、DNA二本鎖間架橋の原因となり得るアルデヒドの代謝関連酵素に変異を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム安定化維持機構に異常を持った劣性遺伝性疾患の臨床像として小頭症を呈する患者群に着目し、ICL修復との関連性から新規の原因遺伝子変異を探索するというアプローチは前例がなく、斬新である。本研究では、ゲノムの不安定化により発症した新規の劣性遺伝性疾患の発症原因となる候補遺伝子変異を同定しており、小頭症発症の詳細な分子メカニズムの解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The goal in this study is to identify novel pathogenic variants caused by the loss of genome stability from patients with microcephaly. Whole exome sequencing identified possible pathogenic variants in two different aldehyde metabolism-related genes from Japanese patients with short stature, microcephaly and hematological abnormality. To understand the molecular mechanisms by which the digenic variants cause microcephaly and hematological abnormality, we performed cellular experiments using cells derived from patients, knockout cell lines using CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology, and umbilical cord blood CD34+ cells. These experiments showed two different aldehyde metabolism-related genes contribute to genome maintenance and hematopoietic homeostasis synergistically because simultaneous loss of function of two aldehyde metabolism-related genes leads to hypersensitivity to genotoxic stress or low differentiation ability of hematopoietic stem and progenitor cells in vitro.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷応答 DNA修復 遺伝性疾患 ゲノム不安定性 疾患モデル動物 プロテオーム解析 造血幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は、生体内の代謝反応で生じる活性酸素、DNA 複製中に起きるエラー、もしくは紫外線、化学物質などの外的要因によって恒常的に損傷を受けている。ゲノム DNA を安定的に維持し、娘細胞に伝達するためには DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構が正常に働くことが必須である。

2015 年にノーベル化学賞を受賞した Lindahl、Modrich、Sancar らの DNA 修復システムに関する研究成果を含む現在までの研究結果から、細胞内では、DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構が機能するために数多くの蛋白質が協調して働くことにより、ゲノムの安定性が維持されていることが分かってきた。DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構に関与する蛋白質をコードする遺伝子の異常は様々な疾患（成長障害、形成異常、がん、免疫不全など）で見つかることから、DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構に関する更なる理解はこれら遺伝性疾患の病因解明に繋がることを期待される。

2. 研究の目的

DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構に異常を持った細胞ではゲノムの安定化維持機構が破綻しているために、高頻度に突然変異、染色体の欠失・転座などの構造異常が観察される。DNA 損傷応答ならびに DNA 修復機構に関わる遺伝子の変異が原因となり発症する劣性遺伝性疾患として、コケイン症候群、ファンコニ貧血、ゼッケル症候群などが知られている。これらの疾患群に共通した臨床像として“小頭症”が挙げられる。コケイン症候群、ファンコニ貧血、ゼッケル症候群の疾患発症に関連した遺伝子は、DNA 二本鎖間の架橋（DNA interstrand crosslink: ICL）修復に関与していることが知られている。そこで、本申請の研究目的は、小頭症を発症した遺伝性疾患患者から新規原因遺伝子変異を同定し、発症分子メカニズムを明らかにすることで病因解明に迫ることである。

3. 研究の方法

課題 1: 先天性小頭症患者由来の細胞から DNA 損傷応答・DNA 修復機構に異常を示す細胞を見つける。

先天性小頭症患者由来の線維芽細胞を用いて、DNA 損傷応答・DNA 修復機構に異常があるかどうかを、DNA 損傷誘発剤を処理した後の細胞応答機構の変化を指標として検討する。健常人由来の線維芽細胞を比較対象として、DNA 二本鎖架橋剤であるマイトマイシン C を処理した後の DNA 損傷依存的な蛋白質発現量の変化、翻訳後修飾（FANCD2、RPA、CHK1）について検討する。

課題 2: 先天性小頭症患者のゲノム DNA を用いて、次世代ゲノム解析を実施する。

先天性小頭症患者のエクソーム解析を実施し、疾患発症に関わる新たな候補遺伝子変異を同定する。新規遺伝子変異ならびに新規疾患概念に繋がる場合には、分子・細胞レベルでの解析を実施する。

4. 研究成果

課題 1: 先天性小頭症患者由来の細胞から DNA 損傷応答・DNA 修復機構に異常を示す細胞を見つける。

50 症例の先天性小頭症患者由来の線維芽細胞を用いて、DNA 損傷応答・DNA 修復機構が正常に機能しているかを検討した。蛍光免疫染色法ならびにウエスタンブロッティング法を用い、DNA 損傷を誘導した後に、DNA 損傷応答・DNA 修復機構に関連した蛋白質の局在、発現量、翻訳後修飾に異常が見られるかどうかを検討した。その結果、マイトマイシン C 処理後に誘導される CHK1 のリン酸化が減弱している患者由来の細胞を見出した。DNA 損傷後に CHK1 は複数のセリン残基がリン酸化されることが知られているが、Ser317 と Ser345 のリン酸化レベルが低下していることを確認した。この患者のエクソーム解析を実施した結果、熱ショック蛋白質の一つにホモ接合変異を同定した。ゲノム編集技術により、ヒト骨髓肉腫由来の U2OS 細胞に当該遺伝子の機能喪失型変異を導入し、マイトマイシン C 処理後の CHK1 リン酸化の誘導を検討した。その結果、患者由来の線維芽細胞で見られた CHK1 のリン酸化の減弱が U2OS 細胞では観察されなかった。当該遺伝子の機能喪失細胞の樹立過程で adaptation が生じたか、もしくは細胞種に依存した応答反応である可能性が考えられる。今後は、siRNA を含む他の遺伝子発現抑制法を用いた解析アプローチが必要である。

課題 2: 先天性小頭症患者のゲノム DNA を用いて、次世代ゲノム解析を実施する。

小頭症患者のエクソーム解析を実施した結果、DNA 二本鎖間架橋の原因となり得るアルデヒドの代謝関連酵素に変異を見出した。当該患者は小頭症、低身長、精神遅滞、汎血球減少症を示し、臨床像から、汎血球減少症を主徴とするファンコニ貧血、もしくは低身長、小頭症、特徴的な顔貌ならびに造血不全を示すブルーム症候群が疑われていた。エクソーム解析を実施したが、上記遺伝性疾患の発症に関連する既知の遺伝子変異は同定されなかった。しかしながら、これら患者に共通してアルデヒド代謝関連酵素に機能喪失を伴う変異が同定された。さらに興味深いことに、当該患者は、東アジア人集団に高頻度に見られる一塩基多型を同時に保有していることから、本疾患の発症には、二遺伝子同時変異が関与していることが強く示唆された。

当該遺伝子の細胞内での機能を明らかにするため、患者由来の細胞を用いてアルデヒドに対する感受性試験を実施した。その結果、健常人由来の細胞と比較して、患者由来の細胞は高い感受性を示すことが明らかとなった。また、ゲノム編集技術により、ヒト骨髓肉腫由来の U2OS 細胞に当該遺伝子変異を導入した細胞においても、アルデヒドに高感受性であることがわかった。さらに、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた実験より、同時に当該二遺伝子に変異を導入した細胞では、顕著に、メチルセルロース培地上での造血コロニー形成能が低下していることが明らかとなった。興味深いことに、同時に当該二遺伝子に変異を導入した造血幹・前駆細胞の分裂増殖能は、野生型ならびに単独機能喪失細胞と比較した際に、有意な差は観察されなかった。これらの結果は、当該二遺伝子が造血組織中での分化過程において重要な役割を持つことを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

なし

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① 岡 泰由, 荻 朋男. マルチオミクス解析により同定した重症アイカルディ・ゴーティエ症候群の分子病態解析. 第 41 回日本小児遺伝学会学術集会, 2019 年
- ② Oka Y, Ogi T. Identification of pathogenic mutations in patients with rare diseases using multiomics approaches. Japanese Proteomics Society 2018 Conference (JPrOS 2018), 9th Asia-Oceania Human Proteome Organization (AOHUP0), and 66th Annual Conference on Mass Spectrometry, 2018 年
- ③ 岡 泰由, 中沢 由華, 荻 朋男. マルチオミクス解析による希少遺伝性疾患発症責任因子の同定. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年
- ④ 中沢 由華, 千住 千佳子, 岡 泰由, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 郭 朝万, 賈 楠, 荻 朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の疾患責任遺伝子変異の探索. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年
- ⑤ Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Molecular pathogenesis underlying Cockayne syndrome and UV-sensitive syndrome. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ⑥ Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Very mild CS type-IV cases with mutations in the CSB gene. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2017 年
- ⑦ Oka Y, Nakazawa Y, Ogi T. Identification of pathogenic mutations in patients with rare diseases using multi-omics analysis. 日本プロテオーム学会 2017 年大会, 2017 年
- ⑧ 中沢 由華, 賈 楠, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 郭 朝万, 岡 泰由, 荻 朋男. DNA 修復機構欠損性疾患の病態解明研究. 第 2 回放射線災害・医学研究拠点カンファレンス, 2017 年
- ⑨ 岡 泰由, 郭 朝万, 賈 楠, 唐田清伸, 中沢由華, 荻 朋男. トランスオミクス解析を用いた希少遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑩ 中沢由華, 岡 泰由, 郭 朝万, 賈 楠, 唐田清伸, 嶋田繭子, 宮崎 仁美, 千住千佳子, 荻 朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑪ 賈 楠, 中沢 由華, 郭 朝万, 唐田 清伸, 岡 泰由, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. コケイン症候群と紫外線高感受性症候群の分子病態解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑫ 郭 朝万, 中沢 由華, 嶋田 繭子, 唐田 清伸, 賈 楠, 岡 泰由, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. TC-NER 因子 UVSSA による RNA ポリメラーゼ II のユビキチン化に関する分子機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑬ Oka Y, Nakazawa Y, Karata K, Guo C, Lehmann AR, Ogi T. Screening of microcephaly cases to identify pathogenic mutations in DNA repair genes. The 10th 3R Symposium, 2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

① 名古屋大学環境医学研究所 HP <http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html>

② 名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野 HP
<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。