

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06183

研究課題名(和文)人工染色体へのFXS脆弱部位の搭載とCGGリピート不安定化再現モデルの作製

研究課題名(英文)Chromosomal cloning of FXS-related chromosomal fragile site including pathogenic CGG triplet repeat

研究代表者

中山 祐二 (NAKAYAMA, Yuji)

鳥取大学・研究推進機構・助教

研究者番号：40432603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：家族性の知的障害である脆弱X症候群(FXS)はトリプレットリピート病と呼ばれる神経変性疾患群に分類されるが、根本的病因であるリピート伸長現象を正確に再現できる系がないため、発症メカニズムには不明な点が多い。本研究ではFXS発症の根本的病因である、FXS責任遺伝子FMR1内の(CGG) n リピートの伸長とFMR1遺伝子発現抑制に至る現象を再現し解析する系の構築を目指した。このリピート伸長現象は、リピートだけの問題ではなく、その周辺の広いゲノム領域で制御されていると言われている。そのため、本研究は染色体工学を用いることでリピート周辺のゲノム領域全体をまとめて取り扱う方法論を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FXS罹患者は自閉症症状を併発することが多く、難治性疾患であるFXSの解明は、神経変性疾患の機能解明や治療法の開発のためにも重要である。FXSは、リピート伸長そのものが根本的病因であり、新しい治療法開拓のためにも、そのメカニズムの解明が急務である。リピートを本体とする染色体領域は、特別に染色体脆弱部位と呼ばれており、本研究はそれを機能的に独立した染色体領域としてまとめて取り扱うことが重要であるという立場に立ち、FXSのCGGリピートとその周辺領域だけをクロニングすることを目指している。本研究で活用している染色体工学技術は、将来、他のトリプレットリピート病の解析系の構築にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Fragile X syndrome (FXS) is most frequent familial form of intellectual disability caused by single gene, FMR1 and is categorized to trinucleotide repeat disorders (TRDs). In FXS, (CGG) n repeat within 5'UTR of FMR1 gene becomes unstable and expand exclusively through maternal transmission. A son maternally received X chromosome with expanded (CGG) n repeats more than 200 repeats becomes FXS, as these large expansions shut down FMR1 expression. The mechanism of (CGG) n repeat expansion, a fundamental cause of FXS, has not been fully elucidated, due to lack of the appropriate experimental system(s) to recapitulate it so far. Our study demonstrated that chromosome with unstable repeat such as (CGG) n repeat can be manipulated by means of chromosome engineering and established set of rodent cells that harbors human X chromosome with various (CGG) n repeat length from FXS related individuals. Our chromosomal engineering strategy established in this study may be useful for studying other TRDs.

研究分野：染色体工学

キーワード：脆弱X症候群 染色体工学 トリプレットリピート病 染色体脆弱部位 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群 (FXS: Fragile X syndrome) は最も頻度の高い家族性の X 連鎖性知的障害であり、自閉症スペクトラム症 (以下、ASD: Autism Spectrum Disorders) の併発率が高いために、ASD の遺伝的モデルとしても注目されている。FXS は、責任遺伝子 FMR1 の 5' 非翻訳 (UTR) 領域にある CGG リピートの長さによって、正常、保因者、患者に分類できる。FXS では、CGG リピート数が 50~200 未満である保因者アレルが母性伝播した際に 200 リピート以上に伸長し、FMR1 プロモーター領域が高度メチル化を受け、FMR1 遺伝子が不活性化して発症する (本研究ではこれら一連の反応を「CGG リピート動態」と呼ぶ)。FXS では、FMR1 遺伝子産物の FMRP が欠損することが問題とされるものの、その発症の根本病因は CGG リピート動態である。CGG リピート動態がどのように発動されて、どのように FMR1 が発現抑制されるのか、その機序とそこに関わる因子を同定してリピート不安定性そのものを治療ターゲットとして開拓することは、FXS 病態研究が今に到達できていない課題である。

現在、CGG リピート動態に着目した FXS 関連のモデルマウスとして、100 CGG リピートをノックインしたマウスが 2 系統作製されている。100 CGG リピートはヒトの病態であれば母性伝播を通してリピート伸長がおき、発症に至るレベルであるが、どちらのマウスでも CGG リピート動態は再現できていない。これらのノックインモデルマウスの結果は、CGG リピートの不安定化にはリピートだけでなくその前後のシス領域 (エレメント) が重要であることを強く示唆している。研究代表者も参加した 2017 年 10 月の FXS および X 連鎖性知的障害疾患の国際ワークショップ (Fragile X and X-Linked Intellectual Disease workshop、カナダ、ケベック州) では、現存する FXS の CGG リピートモデルマウスは不完全であるという認識が研究者間で強いことが印象的であった。そこで、FXS の CGG リピート動態を再現し、新しい分子メカニズムを解明するための新しいモデル系を作成するには、シス領域を含めた広い染色体領域をハンドリングできる染色体工学技術の適用が最適であるという着想に至り、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は染色体工学技術を用いて、FXS 発症に関わる CGG リピート動態を再現できるモデル系の構築を目指している。本研究では、染色体工学を用いて、CGG リピート動態に必要なリピートも含めた長大なゲノム領域を一つの「機能的染色体領域」としてまとめて人工染色体に導入し、*in vitro* (細胞系) および *in vivo* (動物) の両方で、自由に扱うことができるようにする。そして、FXS 脆弱部位の CGG リピート動態、特に CGG リピートの伸長とそれに伴う FMR1 のメチル化を実験室レベルで再現し、FXS 発症に至るまでの分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では染色体工学を活用して、CGG リピート動態に必要な染色体領域を「FXS 脆弱部位」と定義し、この FXS 脆弱部位を人工染色体ベクターに搭載する (以下、「脆弱部位人工染色体」とする)。本研究ではこの脆弱部位人工染色体の構築がすべての出発点となる。脆弱部位人工染色体には、過去の報告等を踏まえて、CGG リピートを含めた最小限度の FXS 脆弱部位を搭載する。脆弱部位人工染色体は染色体工学の根幹技術である微小核細胞融合法という染色体移入法によって、種々の細胞に導入することができるため、ホスト細胞を選択することで CGG リピート動態の *in vitro* 再現系の構築が可能となる。さらに幹細胞へ導入することで脆弱部位人工染色体導入モデルマウスを作製し、子孫伝播における CGG リピート動態の解析を行うことが可能となる (*in vivo* 再現系)。In vitro、in vivo、いずれの系においても、CGG リピート動態、特にリピート伸長と FMR1 遺伝子の不活性化が再現できれば、そこに働く因子を網羅的に解析するよいツールとなり、CGG リピート動態の時期、組織、また分子メカニズムの解明につなげていくことができる。染色体工学技術の強みは、*in vitro*、*in vivo* の両方で脆弱部位人工染色体といった大きな機能的染色体領域を授受させることができることである。

4. 研究成果

本研究の目的に掲げた脆弱部位人工染色体の構築にまで至ることはできなかった。現在、その構築を引き続き続けている。本研究はまず FXS 関連の体細胞から正常、保因者、患者、それぞれの CGG リピートを持つ X 染色体をげっ歯類細胞の中にクローニングした。これらの出発資材については本研究期間内に論文で発表することができた。また、脆弱部位人工染色体構築のために、本研究の初年度から継続して、近年、標準的手法となったゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 系を用いて、種々のヒト X 染色体の改変を進め、ヒト X 染色体の必要な改変を全て終了した。しか

し、改変の1つとしてX染色体に組み込んだloxP配列とCre組み換え酵素を介した人工染色体ベクターへのFXS脆弱部位の搭載を完了することができなかった。転座による人工染色体への特定染色体領域の搭載については、鳥取大学で発展してきた染色体工学研究技術の1パートとして確立されているものであるだけに、当該ステップが進めないことは想定していなかった律速となった。本研究は、染色体工学技術を脆弱部位の取扱いに適用し、トリプレットリピート/脆弱部位のように本来不安定化ポテンシャルを持つ領域をまず安定にクローニングし、実験室レベルで取り扱えるようにすることが新しい試みである。本研究期間内は、脆弱部位人工染色体構築のための初期資材の作成にとどまる結果となったが、少なくとも、染色体移入を始めとする種々の染色体工学技術を適用することで、染色体脆弱部位という本来不安定な領域を安定に取り扱うことができることを示すことができた。その点で、本研究は他のトリプレットリピート病の研究にも応用可能な系であることを示した。今後、脆弱部位人工染色体構築を進め、本研究の当初目的に掲げたCGGリピート動態再現・解析系の構築を進め、FXSのCGGリピート動態の分子メカニズムの解明ならびにそれを治療ターゲットとするための新しい系の開拓につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Abe Satoshi, Honma Kazuhisa, Okada Akane, Kazuki Kanako, Tanaka Hiroshi, Endo Takeshi, Morimoto Kayoko, Moriwaki Takashi, Hamamichi Shusei, Nakayama Yuji, Suzuki Teruhiko, Takehara Shoko, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Construction of stable mouse artificial chromosome from native mouse chromosome 10 for generation of transchromosomal mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99535-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Y, Gao FJ, Yamakawa M, Hirabayashi M, Kazuki K, Kajitani N, Miyagawa-Tomita S, Abe S, Sanbo M, Hara H, Kuniishi H, Ichisaka S, Hata Y, Koshima M, Takayama H, Takehara S, Nakayama Y, Hiratsuka M, Iida Y, Matsukura S, Noda N, Li Y, Moyer AJ, Cheng B, Singh N, Richtsmeier JT, Oshimura M, Reeves RH.	4. 巻 109
2. 論文標題 A transchromosomal rat model with human chromosome 21 shows robust Down syndrome features	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 328 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2021.12.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Narai Takashi, Watase Ryohei, Nakayama Yuji, Kodani Isamu, Inoue Toshiaki, Kokura Kenji	4. 巻 6
2. 論文標題 Establishment of human immortalized mesenchymal stem cells lines for the monitoring and analysis of osteogenic differentiation in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05398 ~ e05398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama Yuji, Adachi Kaori, Shioda Nofirifumi, Maeta Shoya, Nanba Eiji, Kugoh Hiroyuki	4. 巻 398
2. 論文標題 Establishment of FXS-A9 panel with a single human X chromosome from fragile X syndrome-associated individual	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112419 ~ 112419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asamitsu Sefan, Yabuki Yasushi, Ikenoshita Susumu, Kawakubo Kosuke, Kawasaki Moe, Usuki Shingo, Nakayama Yuji, Adachi Kaori, Kugoh Hiroyuki, Ishii Kazuhiro, Matsuura Tohru, Nanba Eiji, Sugiyama Hiroshi, Fukunaga Kohji, Shioda Norifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 CGG repeat RNA G-quadruplexes interact with FMRpolyG to cause neuronal dysfunction in fragile X-related tremor/ataxia syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd9440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd9440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaoka, D. Sunamura, N. Ohira, T. Nakayama, Y. Kugoh, H.	4. 巻 42
2. 論文標題 A novel Xist RNA-mediated chromosome inactivation model using a mouse artificial chromosome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology letters	6. 最初と最後の頁 697~705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-020-02826-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uno Narumi, Takata Shuta, Komoto Shinya, Miyamoto Hitomaru, Nakayama Yuji, Osaki Mitsuhiko, Mayuzumi Ryota, Miyazaki Natsumi, Hando Chiaki, Abe Satoshi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Suzuki Teruhiko, Nakajima Yoshihiro, Oshimura Mitsuo, Tomizuka Kazuma, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Panel of human cell lines with human/mouse artificial chromosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06814-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kashiwagi A, Nakayama Y, Ishiguro N, Nanjo M
2. 発表標題 Anticancer effects of hyper-coordinated germanium complex in human lung cancer cells
3. 学会等名 ICCOC-GTL-16 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Susumu Ikenoshita1, Yuji Nakayama, Kaori Adachi, Hiroyuki Kugoh, Kazuhiro Ishii, Tohru Matsuura, Eiji Nanba, Norifumi Shioda
2 . 発表標題 Involvement of RAN translation product, FMRpolyG and neurodegeneration in Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS)
3 . 学会等名 19th International Workshop on Fragile X and other Neurodevelopmental Disorders, Sorrento, Italy, (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sefan Asamitsu1, Yasushi Yabuki, Yuji Nakayama, Kaori Adachi, Hiroyuki Kugoh, Hiroshi Sugiyama, Eiji Nanba, Kohji Fukuanga, Norifumi Shioda
2 . 発表標題 G-quadruplex-binding metabolites rescue decreased cognitive deficits seen in FXTAS model mice
3 . 学会等名 19th International Workshop on Fragile X and other Neurodevelopmental Disorders, Sorrento, Italy, (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kashiwagi A, Nakayama Y, Kugoh H
2 . 発表標題 30.Development of a novel screening system for the carcinogens in the tobacco smoke using mouse artificial chromosome
3 . 学会等名 The 6 th Asian conference on safety and education in laboratory (Bali) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuji Nakayama, Kaori Adachi, Norifumi Shioda, Hiroyuki Kugoh and Eiji Nanba
2 . 発表標題 Current Status of Fragile X study in Japan
3 . 学会等名 16th International Fragile X conference (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 中山祐二、足立香織、塩田倫史、久郷裕之、難波栄二
2. 発表標題 染色体操作により樹立した脆弱X症候群および関連疾患モデル細胞の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩田倫史、中山祐二、足立香織、久郷裕之、難波栄二
2. 発表標題 脆弱X関連振戦 / 失調症候群 (FXTAS) におけるRAN蛋白質の病態との関与
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲岡大悟、大平崇人、押村光雄、中山祐二、久郷裕之
2. 発表標題 X染色体不活性化機構の解明に向けた人工染色体の活用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------