

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16040

研究課題名(和文)染色体分配異常を伴う新規早老症患者の疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Characterization of a patient with premature aging phenotype showing random chromosome number instabilities

研究代表者

藤田 春美 (FUJITA, Harumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30736971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：紡錘体チェックポイント(SAC)は、分裂期の細胞で姉妹染色分体の均等分配を保證する監視機構である。申請者らは、SAC異常と全身性老化症状を同時に呈する症例をはじめてヒトで見出した。患者は細胞周期制御遺伝子CDC20の片アレルに新規突然変異を有し、本変異を導入したHCT116細胞はSAC異常と染色体数異常を示した。変異CDC20蛋白は、CDC20の抑制因子BUBR1のN末端KEN boxへの親和性が低下しており、BUBR1によるCDC20抑制の不全がSAC異常を通じて染色体の不均等分配を招いたと考えられた。本例より、ヒトにおいてSAC異常が老化症状をまねく可能性があることがはじめて示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々の知る限り、染色体分配異常と早老性を呈するヒト患者をはじめて見出し、解析を行った研究である。本研究により下記の学術的に新規な発見が得られた。

- ・CDC20がヒトにおいて染色体数不安定性を招く新規原因遺伝子であることが明らかになった。
- ・本研究により、ヒトにおいて染色体分配異常と早老性に相関がある可能性がはじめて示唆された。特に、既知の早老症の多くはゲノムDNA損傷の蓄積により発症すると考えられているが、ヒトにおいて染色体分配異常が老化症状をまねく可能性があることがはじめて示唆された。

研究成果の概要(英文)：The spindle assembly checkpoint (SAC) ensures proper chromosome segregation during mitosis. Here, we identified a patient showing premature aging phenotypes of various organs including early hair loss, atrophic skin, and loss of hematopoietic stem cells; instability of chromosome numbers known as mosaic variegated aneuploidy (MVA); and SAC failure. Exome sequencing identified a de novo heterozygous germline missense mutation of c.856C>A (p.R286S) in the mitotic activator CDC20. The mutant CDC20 showed lower binding affinity to KEN-box in N-terminus of BUBR1, an important regulator of SAC. Knock-in of the mutant CDC20 induced SAC failure and random aneuploidy in cultured cells, indicating that this particular missense mutation is pathogenic. Our findings indicate that CDC20 is a novel causative gene of MVA syndrome and suggest that SAC defects could cause premature aging in humans, which may be associated with early loss of stem cells.

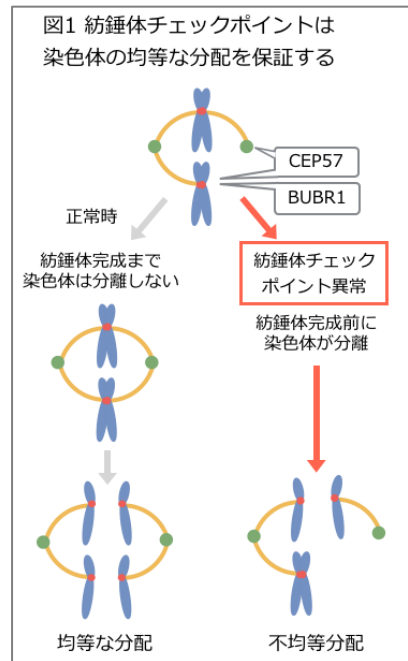
研究分野：皮膚科学

キーワード：染色体分配 老化 紡錘体チェックポイント

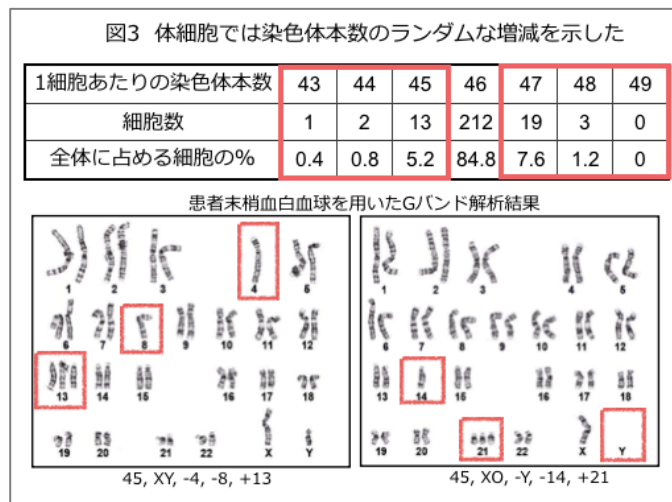
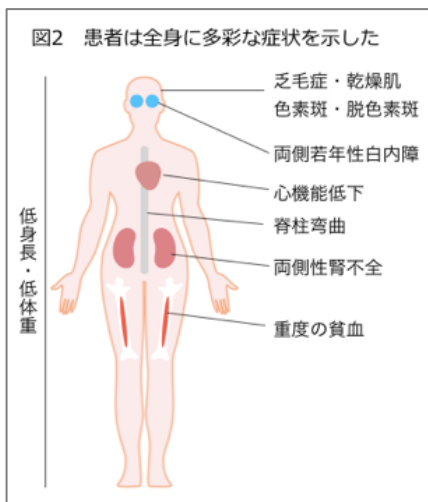
1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う全身的な身体能力低下は、総称して「老化」と呼ばれ、身体組織の機能低下を健常人より早期に呈する疾患は【早期老化症候群(早老症)】として分類される。ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群、ウェルナー症候群、コケイン症候群などが該当し、責任遺伝子として核ラミン、DNAヘリカーゼ、DNA修復酵素などゲノム恒常性維持・修復に関わる遺伝子群が同定されている。これらの早老症研究より、老化の原因の一端として「ゲノム不安定性」が重要視されるようになってきた (López-Otin *et al.* Cell 153 1194-1217(2013))。

一方、「染色体数の異常」と老化の関係を示唆する例もある。「紡錘体チェックポイント」は、細胞分裂期に紡錘体が完成するまで細胞周期を停止させ、娘細胞への染色体の均等な分配を保証するための分子機構である(図1)。これまでに、紡錘体チェックポイント機能を欠損させた複数の遺伝子改変マウスで、体細胞でランダムな染色体数異常を呈するとともに、短寿命、白内障、脊柱湾曲、筋肉量減少などの症状が早期に現れることが報告されている (Baker *et al.* Nat. Genet. 36 744-749(2004), Baker *et al.* J. Cell. Biol. 172 529-540 (2006))。これより、染色体数の不安定性が個体老化に関わる可能性が強く示唆されている。一方、ヒトで紡錘体チェックポイント異常に起因する遺伝性疾患としてPCS/MVA(染色分体早期解離/多彩異数性モザイク)症候群が存在する(責任遺伝子:*BUBR1*, *CEP57* など)が、発生異常と小児がんにより早逝する例が多く (Matsuura *et al.* Am. J. Med. Genet. 140A 358-367 (2006))、本症候群において老化症状が検討されたことはこれまでになかった。



このたび我々は、染色体数異常と全身性老化症状を同時に呈する患者をはじめて見出した。患者は多彩な皮膚症状(乏毛、脂肪織萎縮、乾燥肌、色素斑/脱色素斑の混在、多形皮膚萎縮など)および全身的症状(低身長、低体重、若年性白内障、腎萎縮、貧血など)を20~40代で次々と呈した(図2)。また、末梢血単核球の約15%に染色体数のランダムな増減を認め(図3)、PCS/MVA症候群の一例と診断された。



## 2. 研究の目的

本患者で早老性が発現したメカニズムとして、【染色体分配異常が一定頻度で繰り返され、異数性によるストレスが蓄積した結果、幹細胞の自己複製能・細胞機能が低下し、組織恒常性維持機能の低下に至った】と考えられた。そこで本研究では、「ヒトにおいて、紡錘体チェックポイント異常が早老性の原因となりうる」という新しい概念を提案することを目的に、本患者の詳細な検討を行なった。

## 3. 研究の方法

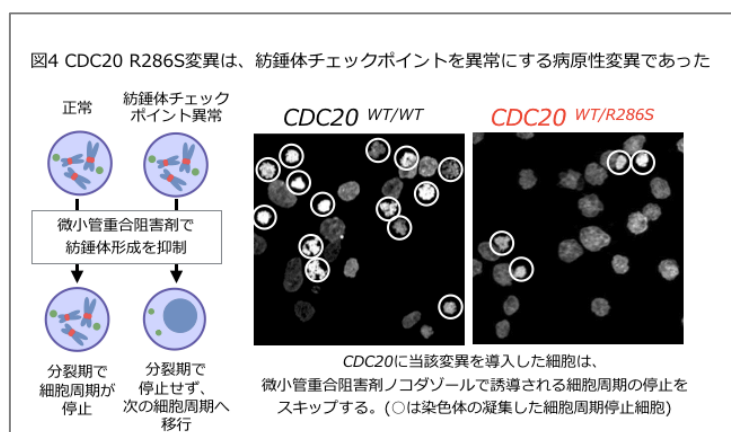
- (1)患者の遺伝学的解析および細胞生物学的解析を行い、患者の characterization を行った。
- (2)患者の変異が紡錘体チェックポイント異常を誘導する分子メカニズムについて *in vitro* の実験系を用いた検討を行った。(1)で同定された患者変異を培養細胞に導入する、変異タンパクを用いるなどの *in vitro* の実験系にて変異の病原性および機能について評価を行った。
- (3)CDC20 遺伝子はヒトとマウスで高い相同性を示す。患者と同じ変異を CRISPR 技術にてノックインしたマウスを作出し、本マウスを用いて、本変異が早老性、すなわち細胞/組織/個体レベルの恒常性維持機能の低下を誘導する病原性変異であるか検討した。

## 4. 研究成果

(1)次世代シーケンス解析技術により、患者と両親のゲノム DNA の全エクソン配列を網羅的に比較解析した結果、既知の早老症および PCS/MVA 症候群遺伝子に変異を持たず、紡錘体チェックポイントにかかわる遺伝子 *CDC20* に新規に生じたミスセンス変異 c. 856C>A (p. R286S) を同定した。また、患者末梢血白血球にて、細胞分裂時の微小核形成率が健常人と比較し上昇していることを確認し、患者体細胞において染色体分配異常に伴う染色体粉砕が発生している可能性が示唆された。患者の骨髄細胞ではコロニー形成能が低下しており、増結幹細胞の枯渇が示唆された。

(2)本変異を培養細胞株 HCT116 に CRISPR/Cas9 を用いて導入したところ、紡錘体チェックポイント異常および染色体数の不安定性を示したことにより、本変異が PCS/MVA 症候群の病原性変異であることが確定した(図4)。

また、*CDC20* 遺伝子の片アレルにフレームシフト変異を導入した HCT116 細胞株では SAC 異常が見られなかったことから、患者における SAC 異常は *CDC20* 遺伝子のハプロ不全によるものではなく *CDC20* 変異体そのものが引き起こしていることが示唆された。



また、データベース登録されているタンパク質結晶構造データより、R286S 変異は *CDC20* の調節因子である BUBR1 タンパク質への結合部位に位置することが確認された。そこで免疫沈降実験を行ったところ、BUBR1 上にある結合部のうち、*CDC20* の機能抑制に特に重要とされる N 末端の KEN box (KEN1) への結合親和性が *CDC20* 変異体で低下することを特定した(図5)。これより、患

者では変異 CDC20 と BUBR1 の結合が不安定となり、複合体が乖離してしまうことで染色体分配が早期に誘導され、染色体数の不安定性を招いたと考えられた。

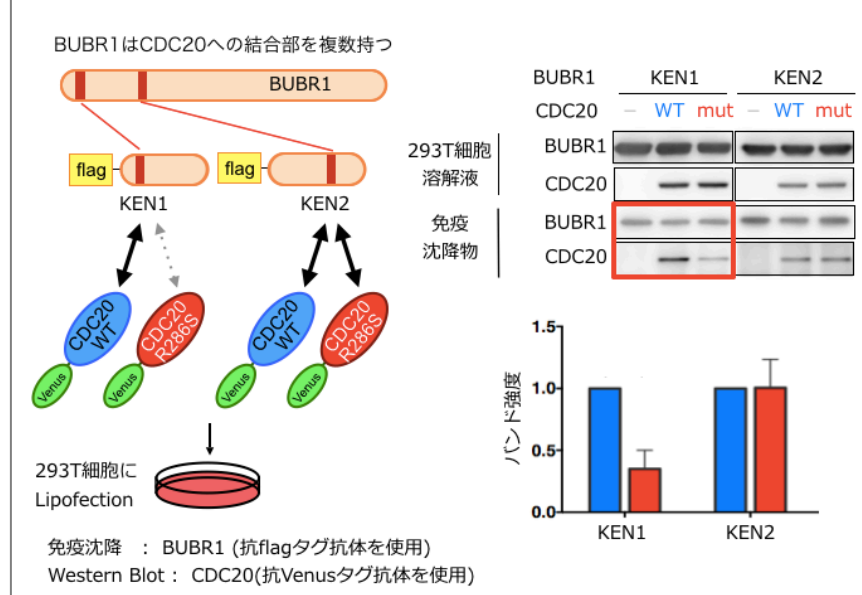
(3) CRISPR/Cas9 技術により *Cdc20* 遺伝子の片アレルおよび両アレルで患者と同じ変異 (p. R286S) を

有するマウスを作出したが、体細胞(脾臓細胞)における染色体本数のばらつきに有意な変化は認められなかった。染色体本数に違いがなくとも表現型が現れる可能性も考えられたが、変異を両アレルに有するノックインマウスの生存曲線は、野生型マウスおよび変異を片アレルに有するノックインマウスとほぼ同様であり、有意差を確認することができなかった。また、過去に報告された SAC 異常マウスモデルのひとつである BUBR1 低発現マウスでは、低体重・脊柱湾曲・白内障・筋繊維萎縮・皮膚組織萎縮など全身組織の萎縮・機能低下が報告されている。本マウスでもこれらの老化症状について組織学的検討を行ったが、いずれも有意な表現型を確認することができなかった。

【考察】 本研究により、CDC20 がヒトにおいて SAC 異常を誘導する新規原因遺伝子であることが示された。また、既知の早老症の多くはゲノム DNA 損傷の蓄積により発症すると考えられているが、本研究により、ヒトにおいて SAC 異常が老化症状をまねく可能性があることがはじめて示唆された。作出したノックインマウスが表現型を示さなかったため、患者の早老性発現メカニズムには不明点が残されるが、染色体数の異常は、細胞にタンパク質毒性(タンパク質の折りたたみ異常による細胞毒性)、エネルギー代謝ストレス、酸化ストレスなどの種々のストレスを誘導することが知られている (Santaguida and Amon, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 16 473-485 (2015))。これより、本患者における早老性発現メカニズムとして、染色体の不均等分配の繰り返しにより、染色体数の異常な細胞が蓄積した結果、細胞の自己複製能・細胞機能が低下し、組織恒常性の低下に至った可能性が考えられる。

興味深いことに、健常人においても、加齢に伴い体細胞の染色体数の不安定性が増加する傾向があることが、過去に複数の論文で指摘されている。また、正常マウス・ヒト個体においても、体細胞でモノソミー・トリソミー頻度が加齢に伴い増加することが既に報告されており (Faggioli *et al.* *Hum. Mol. Genet.* 21 5246-5253(2012), Laurie *et al.* *Nat. Genet.* 44 642-650(2012))、正常な老化プロセスにおいても染色体異数性ストレスの関与が想定される。今後、本例および他類似症例の更なる検討により、紡錘体チェックポイント異常および染色体数の不安定性と老化の関係について、より詳細な分子機序の解明が期待される。

図5 変異CDC20は、複合体形成ターゲットであるBUBR1への結合力が低下していた



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujita Harumi, Sasaki Takashi, Miyamoto Tatsuo, Akutsu Silvia Natsuko, Sato Showbu, Mori Takehiko, Nakabayashi Kazuhiko, Hata Kenichiro, Suzuki Hisato, Kosaki Kenjiro, Matsuura Shinya, Matsubara Yoichi, Amagai Masayuki, Kubo Akiharu	4. 巻 19
2. 論文標題 Premature aging syndrome showing random chromosome number instabilities with CDC20 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.13251	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 春美、佐々木 貴史、宮本 達雄、阿久津 シルビア 夏子、佐藤 尚武、森 毅彦、中林 一彦、秦 健一郎、鈴木 寿人、小崎 健次郎、松浦 伸也、松原 洋一、天谷 雅行、久保 亮治
2. 発表標題 A novel premature aging syndrome showing random chromosome number instabilities with CDC20 mutation
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------