

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09565

研究課題名（和文）I型筋強直性ジストロフィー疾患iPS細胞を用いたリピート伸長メカニズムの解明

研究課題名（英文）The repeat expansion mechanism in Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs.

研究代表者

加門 正義（Masayoshi, Kamon）

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90557224

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）：リピートの伸長メカニズムを明らかにするために、樹立したDM1-iPS細胞をクローニングし、遺伝背景が同一でリピート長のみ異なるクローンを得た。これらのクローンを長期継代培養したところ、リピートの伸長が抑制されているクローンを発見した。リピート伸長抑制クローンとリピート伸長クロンの遺伝子発現を網羅的に比較解析し、得られた候補遺伝子をDM1-iPS細胞で遺伝子操作し、ノックダウンするとリピートの伸長が抑制される遺伝子を同定した。同定した遺伝子はリピート配列に結合し、リピートの伸長に関係すると報告されているDNAミスマッチ修復遺伝子MSH2/MSH3と近接することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患iPS細胞を用いた研究で治療薬開発の対象となる新遺伝子を同定することができた。同定した遺伝子はリピート配列に結合し、DNAミスマッチ修復(MMR)遺伝子と相互作用することが示唆されているため、本研究でMMR機構がリピートを異常伸長させるメカニズムの一端を明らかにしたとともに、DM1治療薬の対象として有望であることを示した。MMR遺伝子に作用する薬剤だとMMRが阻害される等の副作用が考えられるが、同定した遺伝子を対象にするとリピートの異常伸長に限定した効果が得られる可能性が高い。本研究によって、未だ有効な治療法のないDM1や他のリピート病に対する治療薬の開発に新たな可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：To analyze the mechanism of repeat instability, we established DM1 patient-derived iPSC cells (DM1-iPSCs). We first isolated DM1-iPSC clones with different repeat sizes while they have identical genomic background. We happened to identify a DM1-iPSC clone whose repeat size was exceptionally stable even after long-term passages. Therefore, we performed comprehensive gene expression analysis to identify genes differentially regulated in the repeat expansion suppression clone. To identify whether any of differentially expressed genes may be related to the repeat stability of the repeat expansion suppression clone, we performed overexpression and down-regulation of each gene in DM1-iPSCs and examined the effect on repeat size. Furthermore, we revealed that the identified gene can associate with repeat sequences and colocalize with the DNA mismatch repair genes MSH2/MSH3.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：疾患iPS細胞 DM1 リピート病 DNAミスマッチ修復

1. 研究開始当初の背景

リピート病はゲノム上の遺伝子領域に存在する数塩基の繰り返し配列が異常に伸長することによって引き起こされる遺伝性疾患のことである。3塩基の繰り返し配列の異常伸長が原因の疾患は少なくとも17種類、4塩基以上の繰り返し配列を持つ疾患も報告されている。これらの疾患では、リピート長が不安定で、個体内のみならず世代間においてもリピートが伸長することが知られている。リピートの伸長メカニズムの解明は、病気の治療即ちリピート伸長の抑制や短縮といった観点からも待望されている。

そこで、本研究ではリピート病の一つであるDM1に注目した。DM1は有病率が8/10万人程度と成人でもっとも頻度の高い筋ジストロフィーでもあり、治療が必要な患者数が比較的多い。筋萎縮・筋強直などの骨格筋障害に加え、不整脈(心筋障害)、認知障害(中枢神経機能障害)など多系統の臓器障害を示す全身性疾患で、症状の進行に伴って起こる呼吸筋の低下による呼吸不全や不整脈により死に至るケースが多くみられる。生活の質の指標とされるQOLの低下が著しい疾患であるが、未だ有効な治療薬は見つかっておらず、病態全貌の解明と治療薬の開発が強く望まれている。

これまでの研究により、DMPK遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTGリピート配列が異常伸長していることがDM1の原因として特定されている。この異常に長くなったリピート配列を含んで転写されたRNAは、リピート部分がヘアピン構造をつくることから核内で凝集し、蓄積する。核内に蓄積したRNAの凝集体により、RNAに結合する能力を持つスプライシング因子が影響を受けて正常なスプライシングが障害され、スプライシング異常を引き起こす。DMPKは、骨格筋や心筋等で強く発現するため、これらの細胞でスプライシング異常が起こり、骨格筋障害や心筋障害が引き起こされることが明らかとなっている。DM1の治療に向けて、スプライシング異常を緩和する薬剤の探索が注目を集めており、リピートを含むRNAに結合するアンチセンスオリゴや小分子化合物などが開発されている。

しかし、これらの治療薬が開発できたとしてもゲノム上には異常伸長したリピートが存在しており、根本的な治療には至らない。最近、DNAミスマッチ修復機構に関連する遺伝子がリピートの伸長に関係するという報告や、ゲノム上のリピート配列をゲノム編集技術で取り除く報告など、根治に向けた研究が始められている。

本研究では、DM1においても未だ明らかになっていないリピートが伸長するメカニズムを、確立したDM1-iPS細胞を用いたリピート伸長モデルを用いることで明らかにする。リピートが伸長するメカニズムを明らかにすることはDM1、ひいてはリピート病全般の理解を深め、治療に大きく貢献することになる。

2. 研究の目的

本研究では、DM1-iPS細胞を用いてリピート伸長のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

これまでの研究では、患者から採取した体組織の解析やマウス株細胞、ノックアウトマウス、遺伝子改変マウスを用いた解析が行われていた。しかし、マウスを用いた場合には種差の問題があり、ヒトの細胞を用いる場合には健康者や患者から採取した細胞を解析に必要な量まで増やすことや遺伝子操作が難しかった。

これまでの研究で、DM1患者由来の血液からiPS細胞(DM1-iPS細胞)を樹立し、リピート長の変化やスプライシングパターンなどの解析を行ってきた。その結果、DM1-iPS細胞では継代培養を繰り返すとリピートが伸長することを明らかにできた。また、細胞集団におけるリピート長の分布のばらつきが継代培養で大きくなることも明らかになった。これらの性質は、DM1においてみられる組織間でのリピート長のばらつきや世代間でのリピートの伸長を反映するものと考えられる。なお、リピートの異常伸長によって引き起こされるスプライシング異常もDM1-iPS細胞から分化させた細胞で確認され、DM1-iPS細胞がDM1の疾患細胞モデルとして有用であることが示された。

さらに本研究では、樹立したDM1-iPS細胞の細胞集団におけるリピート長の多様性に着目し、クローニングを行うことで、遺伝背景が同一でリピート長のみ異なるクローンを得ることに成功した。加えて、長期継代培養後のリピート長解析から、リピートの伸長が抑制されているクローンを発見した。このクローンを同じくクローニングしたリピートが伸長するDM1-iPS細胞のクローンと比較することで、リピート伸長に関する因子を同定を試みる。

本研究では、リピート伸長抑制クローンの性質をリピートが伸長するクローンと比較し、リピート伸長抑制に関する因子を同定することで、リピートの伸長メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、リピートの伸長が抑制されているクローンとリピートが伸長するクローンの比較によってリピート伸長のメカニズムを明らかにする。

1) 遺伝子発現の比較

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、リピートの伸長が抑制されているクローンとリピートが伸長するクローンで発現に差がある遺伝子を伸長抑制候補遺伝子とする。候補遺伝子を DM1-iPS 細胞に遺伝子操作で強制発現もしくはノックダウンし、リピート長を Small Pool PCR で解析することでリピート伸長に与える影響を確認し、リピートの伸長に影響を与える遺伝子として同定する。同定した遺伝子は、ChIP アッセイでリピート配列に直接結合するか、免疫沈降あるいは近接依存性プロチン標識法で他のタンパク質と相互作用しているかどうかを解析し、その機能を明らかにする。

2) エピジェネティクスの比較

DM1 においては、DMPK のリピート配列近傍の DNA メチル化状態が変化していることが報告されている。リピート配列近傍の DNA メチル化状態がリピート伸長に影響を与えているかどうかを明らかにするために、リピート伸長抑制クローンとリピート伸長クローンについてそれぞれパイロシークエンサーを用いて DMPK リピート配列近傍領域の DNA メチル化解析を行う。

4. 研究成果

DM1 患者の血液から DM1-iPS 細胞を樹立した。樹立した DM1-iPS 細胞では、継代培養を繰り返すとリピートが伸長することと、細胞集団におけるリピート長の分布のばらつきが大きくなることが明らかになった。これらの性質は、DM1 においてみられる組織間でのリピート長のばらつきや世代間でのリピートの伸長を反映するものと考えられる。また、リピートの異常伸長によって引き起こされるスプライシング異常も DM1-iPS 細胞から分化させた細胞で確認することができた。

DM1 の疾患細胞モデルとして有用であることが示された DM1-iPS 細胞を用いて、リピート伸長のメカニズムを明らかにするために、まずは DM1-iPS 細胞をクローニングし、遺伝背景が同一でリピート長のみ異なるクローンを得た。驚くべきことに、得られたリピート長が異なるクローンについて継代培養を続けると、継代培養を続けてもリピートの伸長が抑制されているクローンがあることを発見できた。そこで、リピートの伸長が抑制されているクローンとリピートが伸長するクローンの遺伝子発現をマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により比較し、リピート伸長抑制に関連する候補遺伝子を得た。得られた候補遺伝子を DM1-iPS 細胞に遺伝子操作でノックダウンまたは強制発現させて培養し、Small Pool PCR によってリピートの伸長が抑制されるかを検討したところ、ノックダウンすると伸長が抑制される遺伝子と強制発現で伸長を抑制する遺伝子をそれぞれ 1 つずつ同定した。

これらの候補遺伝子がリピート配列に直接結合するかどうかを明らかにするために、リピート配列を安定的に導入した C2C12 細胞へ候補遺伝子を強制発現させて ChIP アッセイを行った。その結果、ノックダウンすると伸長が抑制される遺伝子がリピート配列に結合することが明らかになった。また、この遺伝子がどのようにしてリピートの伸長に関与しているかを明らかにするため、リピートの異常伸長に関わることが報告されている DNA ミスマッチ修復遺伝子との関連を調べた。BirA を用いた近接依存性プロチン標識法で、同定した遺伝子のタンパク質に近接するタンパク質を解析したところ、DNA ミスマッチ修復遺伝子 MSH2/MSH3 が近接することが明らかになった。同定した遺伝子はリピート配列に結合し、DNA ミスマッチ修復遺伝子と相互作用してリピートの伸長に寄与することが示唆された。さらに、DM1 患者由来の骨格筋組織において、同定した遺伝子の発現とリピート長に関する関係があるか相関解析したところ、相関が示された。

また、エピジェネティクスについても、DMPK のリピート近傍の DNA メチル化状態検討したところ、DM1-iPS 細胞では健常者 iPS 細胞に比べてメチル化が増加していることが確認できたが、リピート伸長抑制クローンとリピート伸長クローンでの差はほとんどなかった。以上のことから、リピート近傍の DNA メチル化はリピートが伸長された結果起こったと考えられる。

本研究において、リピートの伸長に関連する遺伝子が新たに同定された。新たに同定した遺伝子はリピートの伸長に関与する DNA ミスマッチ修復遺伝子との関連が示唆されている。以上の成果を論文にまとめて現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Huang Kun, Masuda Akio, Chen Guiying, Bushra Samira, Kamon Masayoshi, Araki Toshiyuki, Kinoshita Masanobu, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates MeR2 enhancer and promotes Mbn11 transcription in myogenic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59517-y	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 Zhang Shaochuan, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Huang Zhizhou, Zhao Fei, Nakata Tomohiko, Takeuchi Tomoya, Sakurai Hidetoshi, Komaki Hirofumi, Kamon Masayoshi, Araki Toshiyuki, Ohno Kinji	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 A mutation in <i>DOK7</i> in congenital myasthenic syndrome forms aggresome in cultured cells, and reduces DOK7 expression and MuSK phosphorylation in patient-derived iPS cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddac306	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加門正義、加藤英政
2. 発表標題 WNTシグナルが引き起こすヒト羊膜上皮細胞分化過程における上皮間葉転換
3. 学会等名 2021年度分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹澤由起、加門正義、加門啓子、加藤英政、白石敦
2. 発表標題 不死化ヒト結膜上皮細胞株(iHCjEC)を用いた杯細胞分化誘導条件の検討
3. 学会等名 2021年度分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayoshi Kamon, Hidemasa Kato
2. 発表標題 AMNION FORMATION IS THE FIRST EMT PROGRAM IN HUMAN DEVELOPMEN
3. 学会等名 ISSCR TOKYO Symposium, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Hiraki-Kamon, Makoto Motono, Masayoshi Kamon, Hideki Masaki, Ayaka Saito, Hidenori Kiyosawa, Yoichi Kondo and Hidemasa Kato
2. 発表標題 QUANTITATIVE DNA METHYLATION ANALYSIS OF BIVALENT DOMAINS ALLOWS SELECTING TUMOR-PRONE HUMAN IPS CELL CLONES
3. 学会等名 ISSCR, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加門正義、若月修二、蕭淑麗(SIEW SOKELEE)、荒木敏之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の細胞を用いた神経筋接合部モデルの構築
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
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
---------	---------