

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03443

研究課題名(和文) 表現型がメンデル遺伝則に従わないヒト疾患のエピジェネティクス研究

研究課題名(英文) Epigenetics studies of human diseases whose phenotypes do not follow Mendelian inheritance rules.

研究代表者

小林 慎 (Kobayashi, Shin)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10397664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：PCDH19群発てんかんは、X染色体上のPCDH19遺伝子の変異により発症するが、なぜ女の子のみが発症するのかメカニズムは未解明であり治療法も存在しない。本疾患がエピジェネティック制御であるX染色体不活性化(XCI)の異常で起こると仮説を立て、患者家族の血液サンプルを集めメチローム解析を行った。その結果、X染色体全体では大きなメチル化の異常は認められなかった。また、疾患モデルであるFtx KOマウスの解析から、Xist発現制御メカニズムの解明に成功した。今後、さらに領域を絞り詳細なメチル化の解析を行ない、患者検体を増やすことで、発症メカニズム解明に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった非メンデル遺伝の疾患発症メカニズム解明へ、従来見過ごされてきたXCI異常の検出に焦点を当て全く新しいアプローチで取り組んだ。本課題では、ヒト疾患解析において、ゲノム配列を基盤とする遺伝学に新たにエピジェネティクスを組み合わせた解析の基盤を整えた。今後患者の検体を揃えることにより、エピジェネティクスがヒト遺伝性疾患で果たす重要な役割を明らかにできると期待される。その成果は患者の治療法の確立に結び付く社会的意義のほか、他の非メンデル遺伝を示す疾患の発症理解にも新しい視点を提供できる点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：PCDH19 clustering epilepsy is caused by mutations in the PCDH19 gene on the X chromosome. However, the mechanism explaining why only girls are affected remains unclear and there is no treatment available. We hypothesized that the disease is caused by abnormalities in X-chromosome inactivation (XCI), an epigenetic regulatory process. To test this, we collected blood samples from affected families and performed methylome analysis. The results showed no obvious methylation abnormalities across the entire X chromosome. Future analyses will focus on more specific regions for detailed methylation analysis. In addition, the analysis of Ftx KO mice, a disease model, led to the successful elucidation of the Xist expression control mechanism. Increasing the number of patient samples in the future is expected to contribute to the understanding of the disease mechanism.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 性差を示す遺伝性疾患 X染色体不活性化

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでノックアウト(KO)マウス疾患モデルの解析から、メンデル遺伝に従わない遺伝パターンを示す表現型が、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構である「X染色体不活性化(XCI)」の異常で起こることを明らかにしてきた(Hosoi, *Nat Commun*, 2018)。XCIは、哺乳動物の雌の発生に必須なエピジェネティック制御機構として知られている。この機構により雌が持つ2本のX染色体の内の1本が不活性化され、実際に働くX染色体の本数が、雄と雌の間で揃う。もしXCIが完全に破綻すると雌は胎仔期に死亡するので、この機構は発生に必須である。これまで我々は、タンパク質をコードしない長いRNA(lncRNA)である*Ftx*をXCI制御因子候補として同定し、その生理機能を個体レベルで調べるためKOマウスを作製・解析した(Kobayashi *PlosOne* 2013; *SciRep* 2014; *Nat Commun* 2018)。その結果、一部の雌*Ftx* KOマウスがヒトの小眼球症に似た症状を示すことを明らかにした(図1、左側)。興味深いことに雄のKOマウスでは異常は見られない。*Ftx*はX染色体上にコードされているため、この遺伝パターンは従来の遺伝学では説明できない。すなわち通常、X染色体上の変異は、X染色体を1本しか持たない、雄(-/Y)が雌(-/+ )よりもより重篤な表現型を示す。しかし*Ftx* KOマウスはその逆で雌のみで表現型が現れるのである。更に興味を引くのは、このKOマウスは同じゲノム配列を持つにもかかわらず、全てのマウスが表現型を示すわけではなく、表現型の有無や軽重にばらつきがあることを明らかにした(図1、右側)。このような遺伝学では説明できない現象は、どう説明すればよいのであろうか？申請者は、これまでに*Ftx* KOマウスはXCIの異常を示し、本来不活性化を受けるX染色体から一部のX連鎖遺伝子が漏れ出て発現することを突き止めた。このことは雌KOマウスの体細胞で起こるXCIの異常が、表現型が雌のみで検出される原因であることを強く示唆している。また*Ftx* KOマウスでは、不活性化されたX染色体から漏れ出た遺伝子の数の多少が小眼球症様表現型の有無や軽重と強い相関があることを明らかにした。これらの結果から、①*Ftx* KOマウスでは、XCIの異常が引き金になり、最終的に目の発生の異常が引き起こされること、②KOマウスの示すメンデル遺伝に従わない特殊な遺伝はエピジェネティックな現象であるXCIの異常で起こることを提案した(Hosoi *Nat Commun* 2018)。

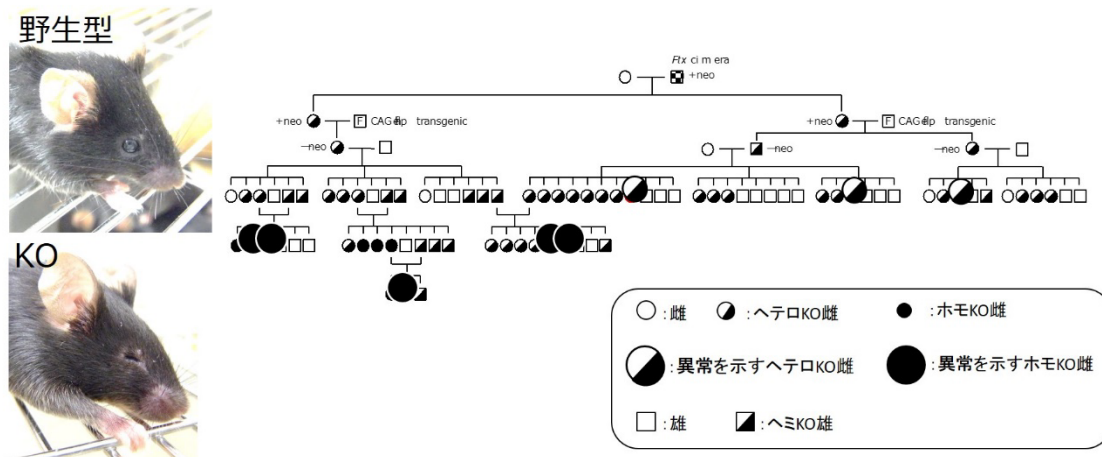


図1、*Ftx* KOマウスは雌でのみ表現型が現れ、従来の遺伝学では説明できない遺伝パターンを示す。

左写真：小眼球症、右図：KOマウス家系図、*Ftx*はX染色体上の遺伝子にも関わらず、表現型は雌のみで、散発的に出現する。(表現型が現れた雌はグレーの大きい丸印にて表示)

### 2. 研究の目的

*Ftx* KOマウスに酷似した非メンデル遺伝パターンを示すヒト疾患は2例(PCHD19群発てんかん(旧称:PCHD19関連症候群、指定難病152)及び、クラニオフロントネイザル症候群)が知られている。これらはX染色体に連鎖する疾患でありながら、女兒のみが発症することが知られている。しかし、なぜ女兒のみで発症するのか？その発症機構は未解明であり治療の手がかりがない状況である。本課題では、これらの疾患のうちPCHD19群発てんかんに注目し、X染色体不活性化の異常が本疾患発症の原因であ

るという仮説を立て、その検証を行う。解析を通じて、エピジェネティクスの異常がヒト遺伝性疾患で果たす役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

PCDH19 群発てんかん疾患のサンプルは、分担研究者である福岡大学医学部、小児科の廣瀬教授が国内の患者家系について収集中のゲノムを用いる。収集した 39 家系のサンプルの中で、典型的な女性(女兒)のみの発症パターンを示す4家系について解析を行った(その内 2 家系を図 2 に示す)。またこれまでの疾患モデルマウスから、想定した PCDH19 関連症候群の発症モデルを図 3 に示す。このモデルでは、XCI の破綻により、一部の X 連鎖遺伝子群が 2 倍量発現する。このような遺伝子発現上昇が、直接または間接的に働き、「てんかん」の原因遺伝子の発現が乱れることが発症原因と考える。PCDH19 関連症候群と *Ftx* KO マウスでは、表現型が異なるため、最終的に発現に影響を受ける X 連鎖遺伝子及び常染色体上遺伝子は両生物間で異なることが予想される。

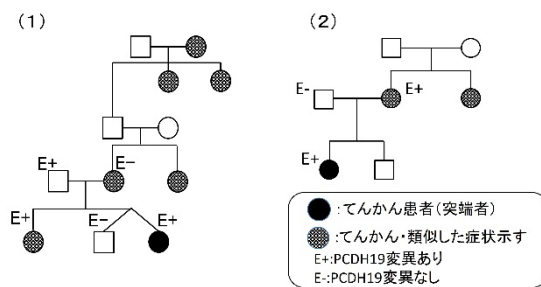


図2、女性のみで発症するX連鎖遺伝疾患:PCDH19関連症候群(指定難病152)の家系サンプル例  
X連鎖にも拘らず、女性のみ発症し男性は発症しない。*Ftx* KOマウスとよく似た非メンデル遺伝を示す。家系は、発症がPCDH19変異で説明できない(1)と、できる(2)に分かれる。

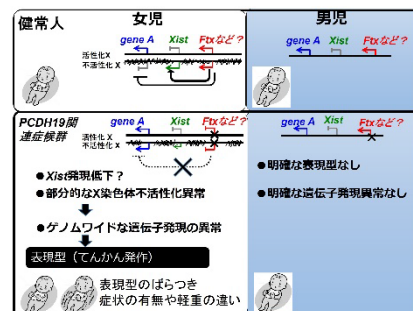


図3、X染色体不活性化異常で女兒のみで散発的に「てんかん」が起きるモデル  
XCI一部破綻が原因でX染色体上の遺伝子が2倍量発現。その二次的影響で常染色体上の「てんかん」の原因となる遺伝子の発現異常が起こるモデル。ヒト疾患についても、表現型や最終的に影響を受けるX連鎖遺伝子の違いこそあり、基本的に*Ftx* KOマウスモデルと同じ異常が想定できる。

#### 【患者サンプルの全ゲノム DNA メチル化解析】

本課題では XCI の異常を調べるために、DNA のメチル化に注目する。X染色体の不活性化機構は、lncRNA である *Xist* や *Ftx* を始め、様々なタンパク因子が協調して働くが、DNA メチル化は其中で、最も基盤となる遺伝子発現抑制機構と考えられる。現在、ゲノム全体の DNA メチローム解析技術は様々あるが、少量のサンプルから 1 塩基レベルで最も詳細に解析可能な PBAT 法を用いる。また、調べる対象はまず収集済みの患者血液サンプルを計画した。これまでの *Ftx* KO マウスモデルの胎仔期及び、培養細胞の解析から、XCI の異常は発生のかなり初期から始まり全身の細胞で起こると考えられる。ヒトでも、血液サンプルも含め全身でエピゲノムの異常が起こると、想定した。患者 4 名とその未発症同胞 4 名をコントロールとして、X 染色体のメチロームの比較を行う。

#### 【疾患モデルマウスの解析(X 染色体不活性化メカニズムの基礎研究)】

XCI 異常によるヒト疾患発症メカニズムを理解するには、モデルとなるマウスで XCI のメカニズムを理解することが、第一歩となる。*Ftx* lncRNA KO マウスを用いて、XCI メカニズムの中心である *Xist* lncRNA の発現制御について以下の解析を行う。①*Ftx* lncRNA の細胞内局在を解析する、②XCI の状態をモニタリングできる Momiji マウスと遺伝子多型を利用することにより、*Ftx* の発現制御作用が cis または trans どちらに働くのか明らかにする。③*Ftx* lncRNA KO がランダムに不活性化される X 染色体の選択にどのような影響を与えるかについて検討する。④個体では解析が難しい分子レベルの解析を可能にするため、KO マウスから新規 KO 細胞株を樹立する。

### 4. 研究成果

#### 【患者サンプルの全ゲノム DNA メチル化解析】

これまで収集した 39 家系の PCDH19 群発てんかんサンプルの中には家系図の情報不完全なものも

含まれる。サンプルの中で家系図情報が入手可能で、女性(女兒)のみでてんかん症状の記載がある 4 家系を解析対象に選んだ。また比較対象のコントロールとして、患者本人の姉妹で未発症、もしくはマイルドな症状を示すサンプルを選んだ。最終的に患者 4 名とコントロール 4 名のサンプルについて、血液ゲノム全体のメチル化パターンをバイサルファイトシーケンス法により解析した。サンプルゲノムは量に限りがあるため、少量から解析可能な PBAT 法を用いた。結果は全てのサンプルで、ゲノムのカバレッジは、20-30 倍になり、メチル化定量を行うには十分なデータ量であること、更にバイサルファイト変換効率も 99%以上が確認でき、非常に良いデータが得られた。X 染色体全体を比較したところ、患者とコントロール間ではメチル化状態に大きな差異がないことが明らかとなった。一方、本疾患では出生自体には問題は無いことから、XCI の異常は一部の遺伝子に限られると予想され、より詳細なメチル化領域の比較が必要と考えられる。今後、比較するゲノム領域のウィンドウを短く絞り込み X 染色体上のメチル化パターンの検討を行うと同時に、患者サンプルの収集も継続する予定である。

#### 【疾患モデルマウスの解析—(X 染色体不活性化メカニズムの基礎研究)】

RNA FISH 法を用いて、*Ftx* の局在を調べたところ、*Ftx* は *Xist* シグナルと一部重なるが、主に核小体に局在する傾向にあることを明らかにした(図 4)。また KO マウスでは不活性化 X 染色体に集積する *Xist* のシグナルが縮小し細胞内の *Xist* 量が低下することから、*Ftx* が *Xist* の発現のアップレギュレーターとして働くことを明らかにした。更に、*Ftx* KO マウスに独自に開発した不活性化状態をモニタリングできる「Momiji」システムと遺伝子多型を組み合わせ、*Ftx* が Cis に働き X 染色体を不活性化することを明らかにした。*Ftx* は、*Xist* の発現を増加させ、かつ Cis に働くことから、*Ftx* KO ではランダムに起こる X 染色体の不活性化が片方の X 染色体に偏ることが予想される。そこで X 連鎖遺伝子の発現の多型解析を行ったが、影響はあるものの完全な偏りは無いことがわかり、ランダムに不活性化される X 染色体の選択には *Ftx* 単独ではなく、ほかの因子が共同で働くことが示唆された。

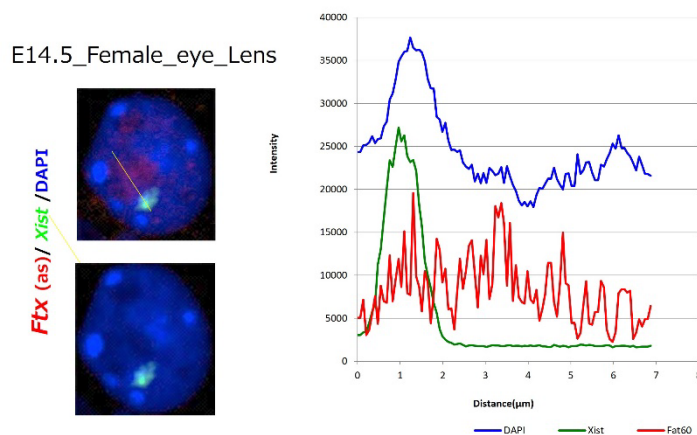


図4、*Ftx* lncRNA の核内局在

RNA FISHの結果、*Ftx* は核小体に集積し、一部の細胞で *Xist* と共局在していることが明らかになった。

従来見過ごされてきた XCI 異常の検出に焦点を当てることにより、これまで不明であった非メンデル遺伝の疾患発症メカニズムを理解する手掛かりが得られる。本研究では、配列解析を基盤とする遺伝学とエピジェネティクスを組み合わせた解析の基盤を整えた。今後患者の検体を揃えることにより、エピジェネティクスがヒト遺伝性疾患で果たす重要な役割を明らかにできると期待される。その成果は患者の治療法の確立に結び付く社会的意義のほか、本疾患に外の非メンデル遺伝を示す疾患の発症理解にも新しい視点を提供できる点で学術的意義がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Mengzhu, Kiyono Tohru, Aoki Kazunori, Goshima Naoki, Kobayashi Shin, Hiranuma Kengo, Shiraishi Kouya, Saya Hideyuki, Nakahara Tomomi	4. 巻 113
2. 論文標題 Development of an in vitro carcinogenesis model of human papillomavirus induced cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 904 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15246	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 Aizawa Shiho, Nishimura Ken, Mondejar Gonzalo Seminario, Kumar Arun, Bui Phuong Linh, Tran Yen Thi Hai, Kuno Akihiro, Muratani Masafumi, Kobayashi Shin, Nabekura Tsukasa, Shibuya Akira, Sugihara Eiji, Sato Taka-Aki, Fukuda Aya, Hayashi Yohei, Hisatake Koji	4. 巻 17
2. 論文標題 Early reactivation of clustered genes on the inactive X chromosome during somatic cell reprogramming	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 53 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.008	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 Haramoto Yoshikazu, Sakata Mino, Kobayashi Shin	4. 巻 10
2. 論文標題 Visualization of X chromosome reactivation in mouse primordial germ cells in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	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) 10.1242/bio.058602	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 Kojima S, Shiochi N, Sato K, Yamaura M, Ito T, Yamamura N, Goto N, Odamoto M, Kobayashi S, Kimura T, Sekita Y.	4. 巻 20;50(9)
2. 論文標題 Epigenome editing reveals core DNA methylation for imprinting control in the DIK1-Dio3 imprinted domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 5080-5094.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac344.	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 原本悦和、小林慎	4. 巻 283 (9)
2. 論文標題 生殖細胞初期化におけるX染色体再活性化のイメージング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 865-870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 小林慎	4. 巻 283 (9)
2. 論文標題 非メンデル遺伝とX染色体不活性化異常	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 853-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原本悦和、坂田美乃、小林慎
2. 発表標題 In vivo可視化技術を用いたマウス始原生殖細胞におけるX染色体再活性化の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原本悦和、坂田美乃、小林慎
2. 発表標題 始原生殖細胞におけるX染色体再活性化のin vivo イメージング解析
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関田 洋一、児島 進、塩地 直弥、小林 慎、木村 透
2. 発表標題 エピゲノム編集によるDlk1-Dio3インプリントドメインでのDNAメチル化の機能解析
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林慎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞分子工学研究部門 最先端バイオ技術探求グループ web page <a href="https://unit.aist.go.jp/cmb5/ja/group/6-9Group.html">https://unit.aist.go.jp/cmb5/ja/group/6-9Group.html</a>  研究者紹介（産業技術総合研究所） <a href="http://staff.aist.go.jp/kobayashi.shin/">http://staff.aist.go.jp/kobayashi.shin/</a>
--

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
研究分担者	三浦 史仁  (Miura Fumihito)  (50447348)	九州大学・医学研究院・准教授    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	廣瀬 伸一  (HIROSE Shinichi)  (60248515)	福岡大学・医学部・教授    (37111)	
研究分担者	石野 史敏  (Ishino Fumitoshi)  (60159754)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授    (12602)	

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			
オーストリア	ウィーン大学			