

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07307

研究課題名(和文) MeCP2-LBX1転写制御に着目したレット症候群の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a Novel Treatment for Rett Syndrome Focusing on MeCP2-LBX1 Transcriptional Regulation

研究代表者

目黒 牧子 (Meguro, Makiko)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・技術補佐員

研究者番号：20304222

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)：本研究は、思春期特発性側弯症と強く相関するLBX1遺伝子がレット症候群の原因遺伝子MeCP2のターゲット遺伝子の一つであるか否かを明らかにすると同時に、MeCP2-LBX1転写制御系の下流遺伝子を同定することを目的とした。その結果、ChIPアッセイにより、MeCP2がLBX1遺伝子の上流領域に局在することを確認し、LBX1はMeCP2のターゲット遺伝子の一つであることを明らかにした。さらに、PCR Arrayを用いてLBX1の下流の遺伝子を探索した結果、P2RX7、GABRB1遺伝子を同定した。いずれの遺伝子も、ミクログリアでシナプスの可塑性に深く関与しており、大変興味深い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LBX1は脳で極めて高い発現を示すことより、神経発達において極めて重要な役割を果たしていると考えられている。非常に興味深いことに、側弯症だけでなく、GABA作動性ニューロンの機能障害や呼吸不整はレット症候群患者でも高頻度に見られる症状であることなどから、LBX1が真のMeCP2のターゲットであり、脊柱側弯症を含むレット症候群の主症状に深く関わっていることが強く示唆される。したがって、遺伝子量コントロールが難しいMeCP2の遺伝子治療ではなく、LBX1およびそのターゲット遺伝子に着目した遺伝子治療法の確立が今後のレット症候群の新たな治療法開発へのブレイクスルーとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine whether the LBX1 gene, which is strongly correlated with adolescent idiopathic scoliosis, is one of the target genes of MeCP2, the causative gene of Rett syndrome, and to identify the downstream genes of the MeCP2-LBX1 transcriptional regulatory system. We confirmed that MeCP2 localized to the upstream region of the LBX1 gene by ChIP assay and that LBX1 is one of the target genes of MeCP2. Furthermore, we searched for genes downstream of LBX1 using PCR Array and identified P2RX7 and GABRB1 genes. Both genes are deeply involved in synaptic plasticity in microglia and are very interesting.

研究分野：分子生物学

キーワード：レット症候群 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

レット症候群は出生後 6 ヶ月～18 ヶ月で発症する進行性の神経発達障害で、女兒にのみ認められ、全世界で約 1 万 5 千人に 1 人の割合で発症する。主な臨床症状としては、知能や言語、運動機能の低下、常に手をもむような反復運動、さらには自閉的傾向、呼吸不整、てんかん発作などがあげられる。また、患者の多くは学童期以降から筋緊張が亢進し、ジストニアと呼ばれる不随意運動、脊柱側弯などの症状が顕著となる。1999 年にはじめて Amir らがレット症候群の原因遺伝子が Xq28 に位置しメチル化 CpG 結合タンパク質をコードする *MeCP2* であることを突き止め、その後の臨床的典例において、レット症候群の 80-90% に *MeCP2* の変異が認められることが明らかにされた。*MeCP2* は当初、メチル化シトシンを認識することでヒストンテール修飾酵素、クロマチン再構成因子の複合体をリクルートし、近傍の遺伝子の転写を抑制していると考えられており、哺乳類を含む多くの真核生物のゲノム中に存在する CpG の約 60-90% は DNA メチル化を受けていることから、*MeCP2* の変異はグローバルな遺伝子の活性化をもたらすことが予想された。しかしながら、レット症候群患者や *Mecp2* 欠損マウスにおけるマイクロアレイ解析から、*MeCP2* がターゲット遺伝子の抑制だけでなく、活性化にも働いていることが示された。このような *MeCP2* の多様な機能を明らかにすることは、レット症候群の複雑な臨床症状の理解に不可欠であり、レット症候群の治療研究につながるものと考えられる。

申請者らは最近、広島大学の宿南先生や理研の池川先生らと共に思春期特発性側弯症 (AIS) と強く相関する一塩基多型 (SNP) rs11190870 を含むゲノム領域がクロマチンループ構造を介して約 10kb 離れた *LBX1* 遺伝子のプロモーターに働きかけて発現を上昇させることを明らかにした【図 1】(Guo L. et al, *Plos Genetics*, 2016)。興味深いことに *LBX1* 遺伝子のプロモーター領域の一部は、A172

細胞 (ヒトグリア芽腫) においてメチル化を受け、且つその近傍には CT リッチな反復配列が散在していることを見出し、*LBX1* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化 CpG 結合タンパク質 *MeCP2* のターゲット領域である可能性が強く示唆された。

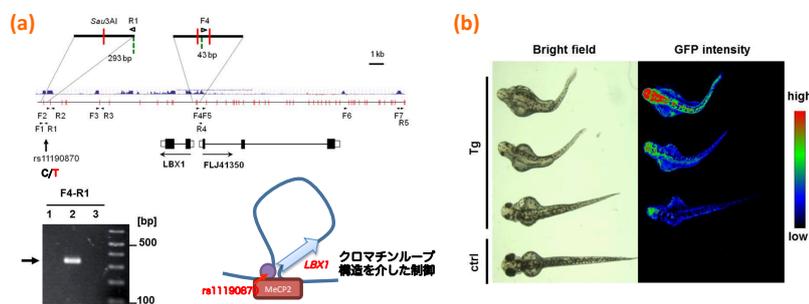


図 1. 思春期突発性側弯症の原因遺伝子 *LBX1* が側弯を引き起こす仕組み

(a): Chromosome conformation capture法により、AISと強く相関するSNP(rs11190870)が*LBX1*遺伝子のプロモーター領域と相互作用することが確認できた。

(b): *LBX1*の発現量(GFP intensity, 右)に相関して、体軸の湾曲の程度が重度になる(左)ことが示された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、思春期特発性側弯症 (AIS) と強く相関する *LBX1* 遺伝子がレット症候群の原因遺伝子 *MeCP2* のターゲット遺伝子の一つであるか否かを明らかにすると同時に、*MeCP2*-*LBX1* 転写制御系の下流遺伝子を同定することで、レット症候群の多彩な症状を軽減する効果的な遺伝子治療法の確立や治療薬の開発に向けた基礎的データを収集することを目的とする。

MeCP2 のターゲット遺伝子の探索はレット症候群患者サンプルや *MeCP2* 欠損マウスサンプルを用いたマイクロアレイ解析により盛んに行われており、候補遺伝子が複数同定されているが、それらがレット症候群のどの症状の発症にどの様に関わっているのか、治療に向けた具体的な研究などはほとんど進んでいない。我々は、レット症候群の主徴の一つである脊柱側弯症の関連遺伝子 *LBX1* に着目し、*LBX1* が *MeCP2* のターゲット遺伝子であることを明らかにしたい。*LBX1* は側弯症だけでなく、GABA ニューロンの分化や中枢性の呼吸調節に関与していることが知られて

おり、レット症候群の症状と極めて相関が高い。このような臨床症状側から MeCP2 のターゲットへ迫るアプローチはこれまでほとんど無く、レット症候群の治療研究においてブレイクスルーとなり得るのではないかと考えている。

3. 研究の方法

(1) MeCP2 欠損細胞株における LBX1 遺伝子発現解析

A172 細胞（ヒトグリア芽腫）にて、CRISPR/Cas9 システムにより *MeCP2* 遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立する。樹立した *MeCP2* 欠損細胞株にて、*LBX1* 遺伝子及び近接した *FLJ41350* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析する。

(2) *LBX1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析及び MeCP2 ChIP 解析

バイサルファイトシーケンス法にて、*LBX1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を解析する。また、MeCP2 抗体を用いた ChIP 解析にて、*LBX1* 遺伝子領域における MeCP2 結合部位を同定する。

(3) *LBX1* ターゲット遺伝子の同定

LBX1 は、神経発生において GABA 作動性ニューロンへの分化調節に極めて重要な働きをすることが知られている転写因子の一つである。そこで、QIAGEN の Human GABA & Glutamate RT² Profiler PCR Array を用いて *MeCP2* 欠損 A172 細胞で発現に変化の認める遺伝子をスクリーニングする。同定した遺伝子について、*LBX1* 遺伝子を導入するレスキュー実験を行い、真の *LBX1* ターゲット遺伝子を見出す。

4. 研究成果

(1) MeCP2 欠損細胞株における *LBX1* 遺伝子発現解析

CRISPR/Cas9 システムを用い、*MeCP2* 欠損 A172 細胞を樹立したところ、*LBX1* 遺伝子の発現量が半減していた。一方、近接する *FLJ41350* 遺伝子については遺伝子発現に変化はなかった。このことから、MeCP2 は *LBX1* 遺伝子を特異的に制御している可能性が示唆された。【図 2】

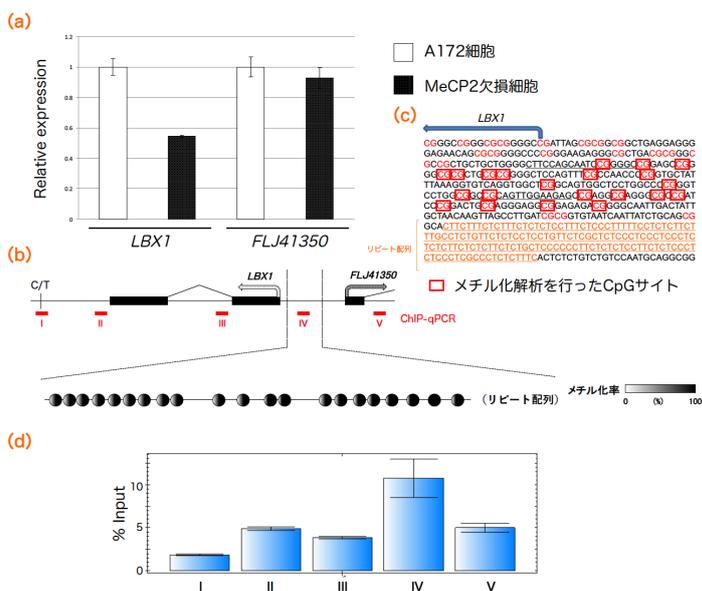


図2. *LBX1*はMeCP2のターゲット遺伝子である。

(a): MeCP2欠損A172細胞では、*LBX1*の発現が半減している。
 (b)(c): A172細胞にて、*LBX1*遺伝子の上流領域はメチル化を受け、且つその近傍にATリッチなリピート配列を有する。
 (d): MeCP2抗体を用いたChIP解析。*LBX1*上流領域(IV)にMeCP2が結合していることがわかる。

(2) *LBX1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析及び MeCP2 ChIP 解析

LBX1 遺伝子のプロモーター領域においてバイサルファイトシーケンス法

によりメチル化解析を行ったところ、高度にメチル化を受けていることが明らかとなった。さらに、興味深いことに、プロモーター領域の近傍にはCTリッチな反復配列が散在していることを見出し、MeCP2の結合領域である可能性が強く示唆された。実際、ChIPアッセイにより、MeCP2が*LBX1*遺伝子の上流領域に局在することを確認し、*LBX1*はMeCP2のターゲット遺伝子の一つであることを明らかにした。【図2】

(3) *LBX1* ターゲット遺伝子の同定

LBX1 は胎児期の神経発達において GABA 作動性ニューロンの分化に寄与していること、*LBX1*

欠損マウスでは中枢性の呼吸異常が見られること、さらに側弯モデル *LBX1* トランスジェニックゼブラフィッシュ【図1】からも分かるように、脳で極めて高い発現を示すことより、*LBX1* は神経発達において極めて重要な役割を果たしていると考えられている。非常に興味深いことに、側弯症だけでなく、GABA 作動性ニューロンの機能障害や呼吸不整はレット症候群患者でも高頻度に見られる症状であることなどから、*LBX1* が真の *MeCP2* のターゲットであり、脊柱側弯症を含むレット症候群の主症状に深く関わっていることが強く示唆される。したがって、遺伝子量コントロールが難しい *MeCP2* の遺伝子治療ではなく、*LBX1* およびそのターゲット遺伝子に着目した遺伝子治療法の確立は、難治性疾患レット症候群の新たな治療法開発へのブレイクスルーとなる可能性を秘めている。*MeCP2* のターゲットであることが明らかとなった *LBX1* は、神経発生において GABA 作動性ニューロンへの分化調節に極めて重要な働きをすることが知られている転写因子の一つである。そこで、QIAGEN の Human GABA & Glutamate RT² Profiler PCR Array を用いて *MeCP2* 欠損 A172 細胞で発現に変化の認める遺伝子をスクリーニングした。その結果、2倍以上発現が変化した遺伝子を9個同定した。さらにこの中から、*LBX1* の直接の制御下にある遺伝子を同定するため、*MeCP2* 欠損細胞に *LBX1* 遺伝子を導入するレスキュー実験を行った。その結果、*MeCP2* 欠損 A172 細胞で発現に変化を認めた9個の遺伝子のうち、2つの遺伝子 (*P2RX7*, *GABRB1*) の発現が回復し、*LBX1* の制御下にあることが示唆された【図3】。

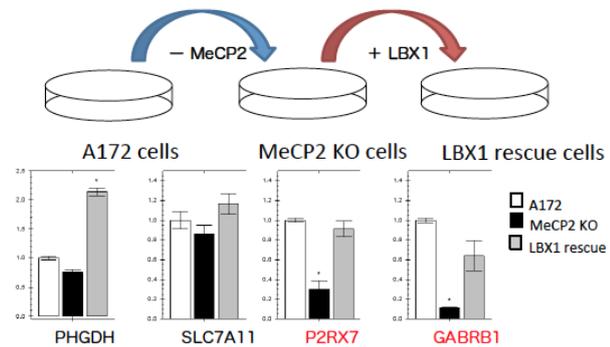


図3. *LBX1* ターゲット遺伝子の同定

Human GABA & Glutamate RT² Profiler PCR array を行い、*MeCP2* 欠損細胞で2倍以上発現が変化した遺伝子に関して、*MeCP2* 欠損細胞に *LBX1* 遺伝子を導入するレスキュー実験を行った結果、2つの遺伝子の発現が回復し、*LBX1* 直接の制御下にあることが明らかとなった。

今回同定した *LBX1* ターゲット遺伝子、*P2RX7*, *GABRB1* は、各々、ミクログリアでシナプスの可塑性に深く関与しており、その機能異常により自閉症などの発達障害を引き起こすことが知られており大変興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Mukai Kanae, Horike Shin-ichi, Meguro-Horike Makiko, Nakajima Yukari, Iswara Arya, Nakatani Toshio	4. 巻 17
2. 論文標題 Topical estrogen application promotes cutaneous wound healing in db/db female mice with type 2 diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0264572 ~ 0264590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0264572	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 Nagaya Satomi, Maruyama Keiko, Watanabe Atsushi, Meguro-Horike Makiko, Imai Yuta, Hiroshima Yuki, Horike Shin-ichi, Kokame Koichi, Morishita Eriko	4. 巻 107
2. 論文標題 First report of inherited protein S deficiency caused by paternal $PROS1$ mosaicism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2021.278527	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 Yiming Reheman, Takeuchi Yasuto, Nishimura Tatsunori, Li Mengjiao, Wang Yuming, Meguro Horike Makiko, Kohno Takashi, Horike Shin ichi, Nakata Asuka, Gotoh Noriko	4. 巻 112
2. 論文標題 MUSASHI 2 confers resistance to third generation EGFR tyrosine kinase inhibitor osimertinib in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3810 ~ 3821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15036	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 Takeda Yoshimichi, Demura Masashi, Wang Fen, Karashima Shigehiro, Yoneda Takashi, Kometani Mitsuhiro, Aomo Daisuke, Hashimoto Atsushi, Horike Shin-ichi, Meguro-Horike Makiko, Takeda Yoshiyu	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of potassium on DNA methylation of aldosterone synthase gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 1018 ~ 1024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002742	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大森健聖, 長屋聡美, 目黒牧子, 荒磯裕平, 森広太郎, 今井湧太, 富樫朋貴, 牧田友香, 堀家慎一, 千葉智哉, 三浦晃子, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 遺伝性プロテインC欠乏症2症例に同定した2つの遺伝子変異蛋白の機能解析
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長屋聡美, 丸山慶子, 渡邊淳, 目黒牧子, 廣島由紀, 堀家慎一, 小亀浩市, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 父性モザイク 遺伝性プロテインS欠乏症の1家系
3. 学会等名 第39回日本血液学会北陸地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下英理子, 長屋聡美, 渡邊淳, 目黒牧子, 堀家慎一, 朝倉英策
2. 発表標題 世界初の父性モザイクに起因した遺伝性プロテインS欠乏症
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Kojima, K. Miyazawa, M. Meguro, T. Sumikama, K. Imadate, N. Okano, S. Horike, K. Hirahara and T. Fukuma
2. 発表標題 Establishment of a method for visualizing nanometer-scale three-dimensional structures of chromosomes by three-dimensional atomic force microscopy
3. 学会等名 The 9 International Symposium on Surface Science (ISSS-9) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田清良, 目黒牧子, 岡田源作, 島津美幸, 伊藤雅之, 堀家慎一
2. 発表標題 エピゲノム編集に基づくレット症候群の治療法の開発
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 奥村兼汰, 目黒牧子, 堀家慎一
2. 発表標題 MeCP2-LBX1転写制御に着目したレット症候群の発症機序の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会(誌上開催)
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		
米国	カリフォルニア大学デービス校		