

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08153

研究課題名（和文）ゲノム編集マウスを用いたBリンパ球欠損症新規原因遺伝子の証明

研究課題名（英文）Proof of a novel gene underlying B lymphocyte deficiency using genome-edited mice

研究代表者

菊池 敦生（Kikuchi, Atsuo）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30447156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本遺伝子変異のあるBリンパ球欠損症症例は同定されず、遺伝学的証明は本研究内では達成されなかった。また患者と同等の変異を有するゲノム編集マウスのヘテロマウスのBリンパ球を含む造血系細胞の解析では野生型マウスとの有意な差を認めず、患者の表現型は再現されなかった。一方、ホモマウスはほぼ胎生致死で胎児・胎盤の粗大な解析ではホモマウスは成長障害と蒼白な体、皮下の浮腫や皮下出血を呈していた。組織学的な解析では、特に胎盤の変化が最も早期に観察され、胎盤の障害が胎生致死の原因である可能性を考えた。当初の予想と異なり、機能不明であった本遺伝子の機能の一つとして胎盤の正常発生に必要な分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトBリンパ球欠損症の症状を再現する目的で作成した、候補遺伝子変異を有するマウスの解析を通じて、予想外にもこの機能不明であった本遺伝子の産物の機能の一つとして胎盤の正常発生に必要な役割を果たしている可能性を挙げることができた。本研究で作成したモデルマウスを用いた今後の研究によって、本分子の生理的機能および欠損時の病態メカニズムのさらなる解明につながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we did not identify any patient with B lymphocyte deficiency and a variant in gene X, and could not genetically prove this gene as the causative gene. Analysis of hematopoietic cells, including B lymphocytes, from genome-edited mice carrying the same mutation as the patient did not reveal significant differences compared to wild-type mice, and the patient's phenotype was not replicated.

On the other hand, homozygous mice were found to be almost embryonic lethal. Gross analysis of the fetus and placenta in homozygous mice showed growth retardation, pale bodies, subcutaneous edema, and subcutaneous hemorrhage. Histological analysis revealed that changes in the placenta were observed at the earliest stages, suggesting that placental damage might be the cause of embryonic lethality. Contrary to our initial expectations, it was suggested that one of the functions of this gene, previously unknown, is to be a molecule necessary for the normal development of the placenta.

研究分野：希少疾患

キーワード：胎盤 Bリンパ球 ゲノム編集マウス 希少疾患

1 . 研究開始当初の背景

- (1) B リンパ球の分化や維持には様々な分子基盤が関与している。B 細胞レセプターやプレ B 細胞レセプターの異常は無ガンマグロブリン血症を起こすことが知られている。このうち、X 連鎖性無ガンマグロブリン血症を起こす *BTK* 遺伝子が 85% を占め、この他の原因としてプレ B 細胞レセプターのシグナル伝達異常が知られるが、残り 10% 弱では、未だに原因が明らかでない。
- (2) 研究代表者は既知の原因遺伝子の解析で原因を同定できなかった B リンパ球を欠損している無ガンマグロブリン血症患者に対して両親を含むトリオエクソーム解析を施行し、機能不明のタンパクをコードする遺伝子 *X* に *de novo* ナンセンス変異を同定した。この遺伝子 *X* はマウスではリンパ球性共通前駆細胞で発現しており、その遺伝子産物は DNA 結合ドメインを持つことが予測されているが詳細な機能は不明である。また、健常人において観察される機能喪失性変異が遺伝子 *X* では統計学的に有意に少なく、片アレルの機能喪失により何らかの症状を呈することが示唆されている
- (3) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によるモデル動物解析を試みた。患者の変異をノックインしたゲノム編集マウスを作成すると、多くが胎生致死、少数のみが生存した。実際胎生致死のマウス (n=10) のほとんど (9/10) が目的の変異のホモ接合体であった。

2 . 研究の目的

本研究での目的は以下の通りである。

新規候補遺伝子 *X* が B リンパ球欠損症の原因となることを B リンパ球欠損症患者の遺伝学的解析や遺伝子改変マウスの解析を含む機能解析を通じて示す。また、これらの解析を通じて新規候補遺伝子 *X* の生理的機能を示す。

3 . 研究の方法

- (1) 遺伝子 *X* の変異を有する B リンパ球欠損症患者が他に存在することを見出す。免疫不全の遺伝学的解析を行っている機関や国内外の稀少難病エクソームデータ (Matchmaker Exchange など) との照合による同一遺伝子の変異を有する第二の患者を検索する。
- (2) 作成した遺伝子 *X* 改変マウスを用いて B リンパ球欠損をきたすかを中心に表現型を解析し、患者の表現型が再現されるか示す。
- (3) 作成した遺伝子 *X* 改変マウスで得られた表現型から遺伝子 *X* の産物の生理的機能を推察する。

4 . 研究成果

- (1) 遺伝子 *X* の変異を有する B リンパ球欠損症症例の検索と変異の証明  
申請者の検索・照会では本遺伝子変異のある B リンパ球欠損症症例は同定されなかった。
- (2) 患者と同等の変異を有するゲノム編集マウスについて、ヘテロマウスの B リンパ球を含む造血系細胞の解析を行った。成獣マウスの末梢血や骨髓血、腹水中のリンパ球のサブセット解析を行った。本解析では野生型マウスとの有意な差を認めなかった。
- (3) ホモマウスはほぼ胎生致死であった (表 1)。胎児・胎盤の粗大な解析ではホモマウスは成長障害と蒼白な体が胎生 12.5 日で見られ、続いて皮下の浮腫や皮下出血を呈していた (図 1)。組織学的な解析では、特に胎盤の変化が最も早期に観察され、胎盤の障害が胎生致死の原因である可能性を考えた (図 2)。当初の予想と異なり、機能不明であった本遺伝子の機能の一つとして胎盤の正常発生に必要な分子であることが示唆された。野生型胎盤幹細胞に対して当該遺伝子をノックダウンし、発現解析を行ったが一定の結論はこれまで得られていない。

Stage	Litters	Number of each <i>Gene X</i> genotype, total (Number of dead mice*)			Total, (Dead)	P-value**
		WT/WT	KI/WT	KI/KI		
E9.0-9.75	4	10	17	4	31	n.s.
E10.0-10.5	5	9 (1)	23 (4)	8 (1)	40 (6)	n.s.
E11-E11.5	16	25 (2)	47 (5)	28 (3)	100 (10)	n.s.
E12.5	8	15 (1)	36	20 (4)	71 (5)	n.s.
E13.5	3	5	13	4	21	n.s.
E14.5	7	17	27	6 (1)	50 (1)	n.s.
E16.5	4	11	19	5 (2)	35 (2)	n.s.
E18.5	2	1	8 (2)	6 (5)	15 (7)	n.s.
Neonate	18	26 (1)	62 (2)	3 (2)	91 (5)	<0.01
P0-1						

表1 KI/WT 同士の交配からの胎仔のジェノタイプ

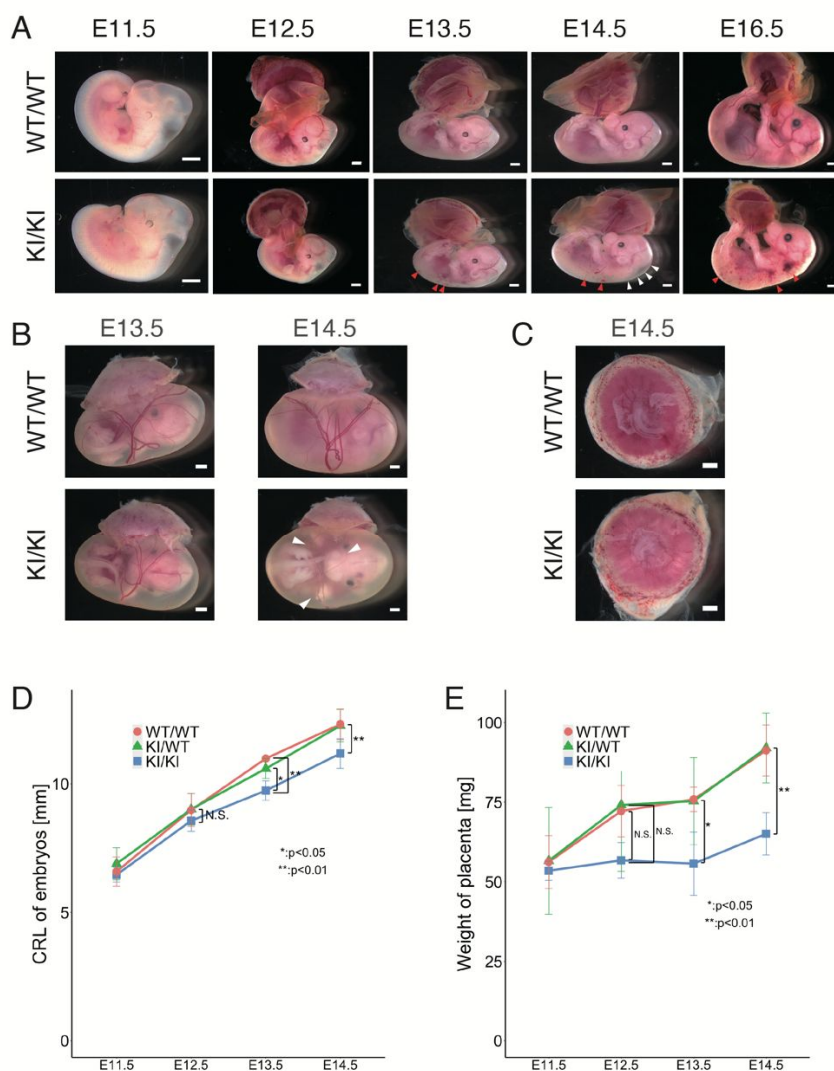


図1. KI ホモマウスの胎盤と胎仔の表現型

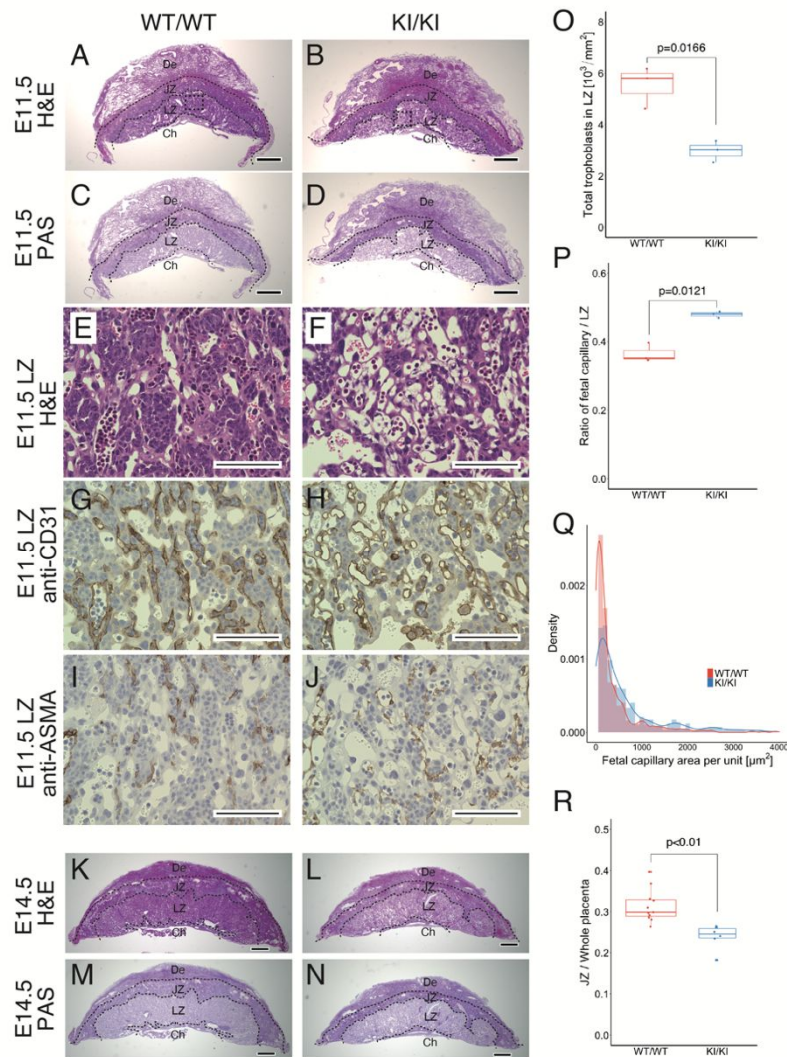


図 2 . 胎盤の病理学的解析

- (4) ホモマウス胎児の肝臓は白色調で、造血系の異常が示唆された。肝細胞における造血系細胞の詳細な解析として、FACS による細胞集団の野生型との比較、RNA-Seq 等による発現解析を引き続き行った。情報解析による解釈では造血系細胞がある分化段階で障害されている可能性が示唆されている。
- (5) 以上のように、当該遺伝子の予期しない、これまでに報告のない機能の手がかりを得たため、現在論文投稿を行っているところである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	石井 直人  (Naoto Ishii)  (60291267)	東北大学・医学系研究科・教授   (11301)	

	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 協 力 者	相原 悠  (Aihara Yu)		

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
---------	---------