

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08176

研究課題名（和文）新たなアプローチによるX連鎖性疾患に伴うskewed X染色体不活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of skewed X chromosome inactivation associated with X-linked diseases.

研究代表者

加藤 君子（KATOH, Kimiko）

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・研究員

研究者番号：30598602

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）：性染色体として、女性はX染色体を2本もち、男性はX染色体とY染色体を1本ずつもつ。このため、女性では2本のX染色体のうちどちらか一方のX染色体の働きが抑制される。このことを「X染色体不活性化」と言う。この機構は厳密に制御されており、その乱れはX染色体が関与する様々な疾病の発症につながる。そこで本研究課題では、患者由来のiPS細胞を用いて、X連鎖性疾患でXCIの乱れが起りやすくなる原因の探索を行った。この結果、XCIの偏りとの関係が示唆される分子群を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多能性幹細胞を用いたヒト初期胚モデルの作製の報告が相次いでおり、着床前後の初期胚における遺伝子発現変動が明らかになってきた。しかし、X連鎖性疾患の女性患者でskewed XCIが生じやすくなる原因については、未だ不明である。本研究により、患者でskewed XCIが確立する機構を解明できれば、ヒトのXCIの機構のみならず、X連鎖性疾患の理解に大きな前進をもたらす意義深い研究になると考えられる。さらにこの知見は、X連鎖性疾患の新たな予測・診断・治療法の創出につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Because XY males have a single X chromosome, whereas XX females have two of them, to ensure dosage compensation between females and males, one of the two X chromosomes is chosen for silencing (X chromosome inactivation, XCI). This machinery is tightly regulated, and its dysregulation leads to the development of various diseases involving the X chromosome. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of XCI dysregulation in X-linked diseases using patient-derived iPS cells. As a result, we found several groups of molecules which were suggested to be related to dysregulation of XCI.

研究分野：胎児医学

キーワード：X連鎖性疾患 X染色体不活性化

## 1. 研究開始当初の背景

X染色体不活性化(XCI)は女性のもつ2本のX染色体の片方を不活性化させる現象であり、妊娠の最初期に生じる。通常、XCIはランダムに起こるため、母由来のX染色体が不活性化された細胞と、父由来のX染色体が不活性化された細胞は半分ずつになる。しかし、どちらか由来のX染色体が偏って不活性化される場合があり、これをskewed XCIという。とりわけ、skewed XCIはX連鎖性疾患の原因遺伝子にヘテロ変異をもつ女性で多く報告されており、同一の変異であっても重症度や臨床経過が大きく異なる一因となっている。したがって、skewed XCIの理解は、保因者や潜在的な患者の同定、患者の予後や治療戦略を考える上で非常に重要である。現在、skewed XCI確立の機序として、XCIの確立を直接制御する領域や遺伝子の変異、細胞増殖や生存に影響を与える遺伝子変異、XCI開始時に起こる異数性細胞の排除、加齢などが示されている[Schurz et al., 2019]。しかし、上記では説明できない例も多く、未知のskewed XCIの確立機構が存在している可能性が強く示唆された。

マウスでは初期胚を模倣した細胞(XCIが開始していない未分化な細胞)であるES細胞を用いてXCIの確立機構が明らかにされてきた。しかし、ヒトでは、初期胚の遺伝子発現やエピゲノムを模倣するナイーブ型ES細胞やナイーブ型iPS細胞は作製できたが、XCIの記憶の消去には成功していなかった。XCIの記憶の正体も不明である。このため、ヒトではskewed XCIのみならず、ランダムXCIの確立機序にも不明な点が数多く残されている。加えて、ヒトではマウスと異なった機構が存在することが示されている[Okamoto et al., 2011; Vallot et al., 2013; Petropoulos et al., 2016 など]。

## 2. 研究の目的

申請者は、ヒトナイーブ型iPS細胞の作製法の構築を進め、予備的な知見ではあるが、ナイーブ型iPS細胞の細胞表面抗原であるCD130を発現する細胞が出現する培養方法を独自に構築していた。このため、本培養方法を用いることで、これまで明らかにされていないskewed XCIの確立機序を検討できる可能性を考えた。そこで本研究では、「X連鎖性疾患の女性で起こるskewed XCIの確立機構はどのようなものか、その解明によってX連鎖性疾患の新たな診断法や治療法の創出につなげることができるか」を学術的な問いとして設定した。具体的には、X連鎖性疾患の女性で認められるskewed XCIがどのような機序で確立するのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 構築したナイーブ型iPS細胞培養系の確認

ランダムXCIを示す健常女性由来のiPS細胞(プライム型)からナイーブ型iPS細胞を作製し、ヒト初期胚と同様の遺伝子発現を示すかどうかをRT-qPCR、RNA-FISHなどにより調べる。次に、XCIの記憶の消去を確認するため、ナイーブ型iPS細胞をプライム型iPS細胞へと分化誘導し、ランダムXCIが起こるかどうかを調べる。ランダムXCIが起きない場合は、XCIの記憶が残存する可能性を示唆する。この場合には、培養方法をさらに検討する。また、ヒト初期胚を模倣するナイーブ型iPS細胞の作製は世界中で精力的に試みられているため、状況によってはその方法を用いて上述の検証をする。

### (2) Skewed XCIの確立を積極的に誘導する機構の探索

ランダムXCIまたはskewed XCIを示す、健常女性および女性患者由来の末梢血からプライ

ム型 iPS 細胞を樹立し、ナイーブ型 iPS 細胞を作製する。得られたナイーブ型 iPS 細胞をクローニングし、それぞれをプライム型 iPS 細胞へと分化させ、XCI を起こさせる。それぞれの細胞について、XCI 状態（ランダム/skewed）を調べる。Skewed XCI を示す女性患者では高い割合で skewed XCI が示された場合には、skewed XCI を遺伝的に規定する機構が存在する可能性が予想される。

### (3) Skewed XCI の確立分子機構の探索

ナイーブ型 iPS 細胞からプライム型 iPS 細胞への分化誘導により、ランダム XCI を示した細胞群と skewed XCI を示した細胞群について、遺伝子発現や、DNA メチル化状態、タンパク質発現等を網羅的に調べ、skewed XCI が生じた原因を探索する。得られた知見をさらに発展させ、患者における skewed XCI 確立機構を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) ナイーブ型 iPS 細胞培養方法の検討

申請者独自のナイーブ型 iPS 細胞作製方法では、ナイーブ型 iPS 細胞マーカーである CD130 陽性細胞の出現は確認されるが、出現率が低い。このため、その後の解析を行うためには、CD130 陽性細胞を分取する必要があった。そこで、磁気ビーズを用いた細胞分離法（MACS 法）により、CD130 陽性細胞のみを回収し、解析を進めていた。

一方、この間に、XCI 記憶が消去されたナイーブ型 iPS 細胞作製の報告が相次いだ[An et al., 2020; Bayerl et al., 2021; Karvas et al., 2022]。これらの培養方法は、基礎培地に低分子化合物を加えた非常にシンプルな培地であり、ナイーブ型 iPS 細胞マーカー陽性細胞の出現率も非常に高いことが示されていた。このため、申請者の培養系よりも解析に適していると考えられた。そこで、報告された培養方法を用いてプライム型 iPS 細胞からナイーブ型 iPS 細胞の作製を試みたところ、XCI 記憶が消去されたナイーブ型 iPS 細胞が作製できることを確認した。

2020 年度および 2021 年度の先進ゲノム支援による支援により、申請者独自の方法と報告された方法により作製したナイーブ型 iPS 細胞クローンについて、RNA-seq および WGBS により細胞の性質を比較した結果、いずれのクローンも E6 ステージのヒト初期胚とよく似た遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった（未発表）。そこで、操作が簡便であり、培地成分が非常にシンプルであることから、skewed XCI の確立機構の解析には、申請者独自の方法ではなく、これらの方法を用いることにした。一方で、両者の培養方法はともに培養系が非常に不安定であり、研究期間の間には、性質の良いナイーブ型 iPS 細胞を安定して作製するには至らなかった。

### (2) Skewed XCI 確立機構の探索

XCI 状態（ランダム/skewed）を把握済みの健常女性あるいは女性患者から作製したプライム型 iPS 細胞からナイーブ型 iPS 細胞を作製したところ、いずれも XCI がリセットされ、2 本の X 染色体からの遺伝子発現が確認された。そこで、それぞれ 10 クローン程度をクローニングし、プライム型 iPS 細胞へと分化させ、RNA-FISH およびアレル特異的発現解析により XCI 様式（ランダム・skewed）を同定した。ランダム XCI を示したクローンと skewed XCI を示したクローンに対して RNA-seq を行い、遺伝子発現を網羅的に比較した。この結果、発現変動遺伝子には、ある特定の機能をもつ分子群が多く含まれていた（未発表）。

近年、多能性幹細胞を用いたヒト胚モデルの作製の報告が相次いでおり、着床前後の初期胚における遺伝子発現変動が明らかになってきた。しかし、X 連鎖性疾患の女性患者で

skewed XCI が生じやすくなる原因については、未だ不明である。本研究により、患者で skewed XCI が確立する機構を解明できれば、ヒトにおける XCI の機構のみならず、X 連鎖性疾患の理解に大きな前進をもたらす意義深い研究になると考えられる。さらにこの知見は、X 連鎖性疾患の新たな予測・診断・治療法の創出につながる可能性がある。

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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|