

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16932

研究課題名（和文）クリッペルフェイル症候群の原因遺伝子の解明

研究課題名（英文）Molecular insight into the etiology of Klippel-feil syndrome

研究代表者

浜中 耕平（HAMANAKA, Kohei）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20801129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：染色体5番と8番の転座によるクリッペルフェイル症候群と小頭症のメカニズムの解明を試みた。この二つの症状は、骨芽細胞の骨化の異常と解釈できるため、この観点から解析した。まず、全ゲノム解析により、本転座の断端を決定した。この断端が破壊する2つのトポロジカルドメイン内に、骨芽細胞の骨化を促進するFGF18が位置していた。FGF18が転座により位置するトポロジカルドメイン内に、エンハンサーが密集した領域を同定した。次に、DNA配列から遺伝子の転写量を予測する深層学習モデル（インシリコルシフェラーゼアッセイと名付けた）で、このエンハンサー群がFGF18の発現量を骨芽細胞で増加させると予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果から、染色体転座がエンハンサーの異所性相互作用を介してFGF18の発現を上昇させ、骨芽細胞による骨化が亢進することで、クリッペルフェイル症候群や小頭症を起こしている可能性が示唆された。本研究の結果から、疾患のメカニズムに基づいた細分化と精密医療が将来的に進むと思われる。また、本研究で開発したin-silico “luciferase” assayは、現実にin vitroで行うluciferase assayと比べて、1)多様な細胞種で活性が調べられる、2)注目している遺伝子のプロモーター配列が使える、などのメリットを有し、今後国内外の幅広い研究で活用されると思われる。

研究成果の概要（英文）： We investigated the pathomechanism of Klippel-Feil syndrome and microcephaly emerging from t(5;8)(q35.1;p21.1) translocation. Because these two features can be explained by over-ossification of osteoblast, we investigated whether the translocation leads to it. First, we determined the breakpoints of the translocation with whole genome sequencing. The breakpoints disrupted a topologically associating domains (TAD) at chr5, which encompasses FGF18 encoding a growth factor differentiating osteoblasts. FGF18 was relocated to another TAD at chr8 by the translocation, where a super enhancer active in osteoblast resides. To assess the effect of the super enhancer on FGF18 expression, we modified the protocol of Enformer, a deep learning model predicting gene expression level from DNA sequence and devised in-silico “luciferase” assay. The assay predicted the vast super enhancer region upregulates FGF18 expression level in osteoblast.

研究分野：遺伝学

キーワード：クリッペルフェイル症候群 染色体転座 トポロジカルドメイン スーパーエンハンサー エンハンサーハイジャッキング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クリッペルフェイル症候群は頸椎癒合や二分脊椎症など骨の症状を主徴とし、加えて様々な症状を合併する遺伝性希少疾患である。クリッペルフェイル症候群は、遺伝子の構造を壊さないゲノム構造異常が原因と考えられる症例が今までに複数報告されている。我々のグループも t(5;8)(q35.1;p21.1)染色体転座を有しクリッペルフェイル症候群と小頭症を呈する家族例を過去に報告している。しかし、これらのゲノム構造異常が疾患を起こす病態メカニズムやその真の原因遺伝子は明らかでない。そのため、クリッペルフェイル症候群の細分化、医学的な管理や治療法の開発は道半ばである。

ゲノム構造異常はたとえ遺伝子の構造を壊さずとも、周辺の遺伝子の発現を変化させることが知られている。遺伝子はトポロジカルドメイン (topologically associating domain, TAD) と呼ばれるゲノム領域内でエンハンサーと相互作用し発現が制御されており、ゲノム構造異常はこの制御を変化させることがある。我々は、このメカニズムが t(5;8)(q35.1;p21.1)染色体転座によるクリッペルフェイル症候群と小頭症の発症に関連している可能性を考えた。

2. 研究の目的

t(5;8)(q35.1;p21.1)染色体転座がクリッペルフェイル症候群と小頭症を起こす病態メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

染色体転座の断端を全ゲノムシーケンスで調べる。間葉系幹細胞において転座が破壊するトポロジカルドメインを Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture) を用いて明らかにする (3D Genome browser)。トポロジカルドメイン内に含まれる遺伝子が骨芽細胞の分化に関わるか文献から調べる。トポロジカルドメイン内のエンハンサーを、骨芽細胞におけるヒストン修飾 (H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac) に対するクロマチン免疫沈降シーケンスと、ヒストン修飾のパターンからクロマチン機能を予測する ChromHMM ソフトウェア (UCSC Genome browser) で探索する。トポロジカルドメイン内のスーパーエンハンサーを dbSUPER データベースにより探索する。これらのエンハンサーと *FGF18* の骨芽細胞における発現量の関係を、周辺の DNA 配列から遺伝子の発現量を深層学習で予測する Enformer ソフトウェアで調べる。

4. 研究成果

本家系の患者 (図 1A の -1) の血液から抽出した DNA を用いて全ゲノムシーケンスを行った。BreakDancer ソフトウェアを用いて転座の両断端の位置と配列を予測した。この予測された各断端をサンガーシーケンスし、その位置と配列を決定した (図 1B)。ブレイクポイント PCR により断端ゲノム領域が他の罹患者 (-2、-2、-3) で検出される一方、非罹患者 (-3) では検出されないことを確認した。

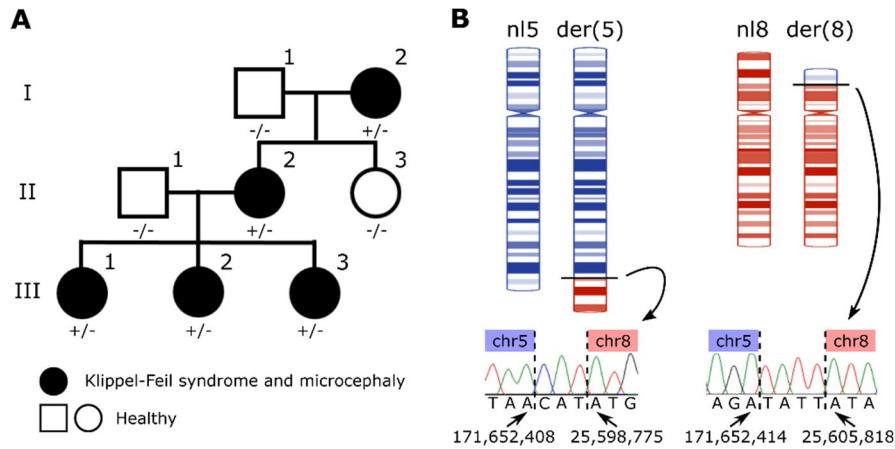


図1：クリッペルフェイル症候群と小頭症を併発し染色体転座を有する1家系

(A) 家系内における疾患と転座の共分離。(B)全ゲノムシーケンス解析により明らかになった転座の断端。

本家系が呈するクリッペルフェイル症候群と小頭症という一見異なる二つの異常は、骨芽細胞の骨化の異常としてまとめて説明できるため、この観点から本染色体転座を解析した。まず、両断端が破壊する2つのトポロジカルドメインをHi-Cを用いて決定した。骨芽細胞のHi-Cの公共データは残念ながら存在しないが、トポロジカルドメインは細胞種によって大きくは変わらないことが知られているため、代わりに骨芽細胞と細胞系譜が近い間葉系幹細胞のHi-Cデータ(3D Genome browser)を解析した。結果、転座の両断端がトポロジカルドメインを破壊していることが明らかになった(図2)。トポロジカルドメインは向き合ったCTCF結合部位の間に形成されることが知られているが、本転座で破壊された染色体5番と8番の二つのトポロジカルドメインは、転座の後も両端のCTCF結合部位が向き合うため、この二つのTADがneo-TADを形成すると考えられた。この二つのトポロジカルドメインは染色体5番側が8遺伝子(*NPM1*, *FGF18*, *SMIM23*, *FBXW11*, *STK10*, *EFCAB9*, *UBTD2*, *SH3PXD2B*)、染色体8番側が10遺伝子(*DOCK5*, *GNRH1*, *KCTD9*, *CDCA2*, *EBF2*, *PPP2R2A*, *PNMA2*, *DPYSL2*, *ADRA1A*, *STMN4*)を含んでいた(図2)。次に、これら18遺伝子の各々が骨芽細胞の分化に関わるかどうかを文献(PubMed)から調べた。結果、*FGF18*のみが骨芽細胞の骨化に関わり、軟骨内骨化や膜内骨化を促進することが知られていた(各々、椎骨と頭蓋の骨化メカニズム)。

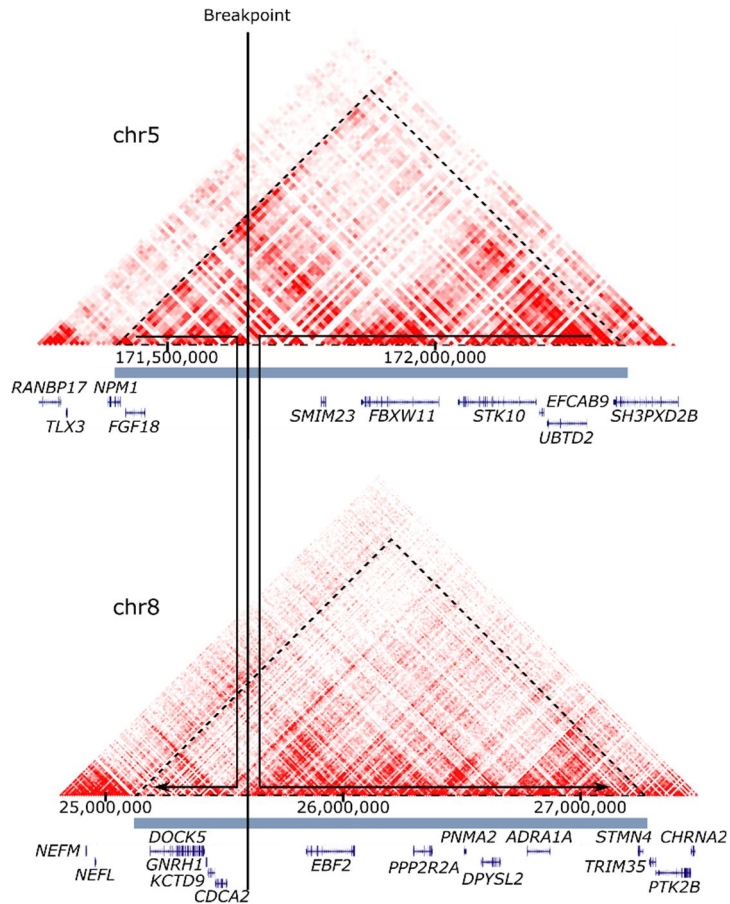


図 2：転座により形成される neo-TAD の範囲の予測

間葉系幹細胞の Hi-C によるクロマチン間相互作用の頻度を表したヒートマップ。下のグレーの水平線と点線の三角形が TAD の領域を表している。上図から下図にまたがる矢印が転座による neo-TAD の領域を表している。

次に、この *FGF18* が転座によりエンハンサーと異所性相互作用するか検討した。まず、上記の二つのトポロジカルドメイン内のエンハンサーをクロマチン免疫沈降シーケンスにより探索した。エンハンサーは骨芽細胞において特定のヒストン修飾パターン (H3K4me1 +、H3K4me3 -、H3K27ac +) をとり ChromHMM アルゴリズムでエンハンサーと判定された領域を考慮した。結果、両トポロジカルドメイン内にエンハンサーが散在していたが (図 3A、B の ChromHMM で橙色、黄色、黄緑色の領域)、特に *DOCK5* 上にエンハンサーが多く存在し、骨芽細胞におけるスーパーエンハンサーとして dbSUPER データベースに登録されていた (図 3A 下)。スーパーエンハンサーとして登録されているのは、両トポロジカルドメイン内ではこの領域のみであった。*FGF18* は neo-TAD において本スーパーエンハンサーと同じトポロジカルドメイン内に位置するため、エンハンサー領域の目立たない本来の染色体 5 番のトポロジカルドメインと比較して (図 3B)、より多くのエンハンサーと相互作用する可能性が考えられた。

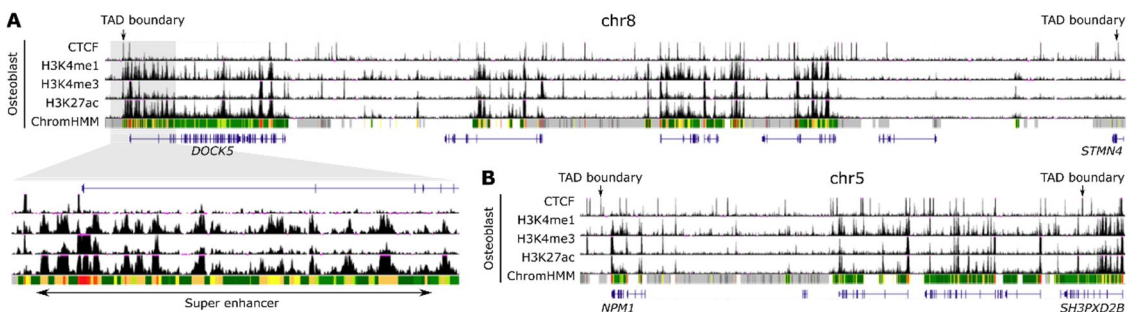


図 3 : 転座の断端周辺のエンハンサー

染色体 8 番 (A) と 5 番 (B) の断端周辺の骨芽細胞における CTCF とヒストン修飾 (H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac) に対するクロマチン免疫沈降シーケンスのカバレッジと ChromHMM によるクロマチン状態の予測。ChromHMM は橙色、黄色、黄緑色がエンハンサーを表す。(A) の下に *DOCK5* 遺伝子領域の拡大図とスーパーエンハンサーの領域を示す。

次に、*FGF18* が *DOCK5* 上のスーパーエンハンサーにより転写が活性化されるか評価した。転写開始点の周辺 200 キロ塩基対ほどの DNA 配列から遺伝子の転写量を予測する深層学習モデル (Enformer) を利用して、あるエンハンサーが特定の遺伝子の発現量に与える影響を予測するツールを開発し、in-silico “ luciferase ” assay と名付けた。このツールは、特定の遺伝子の転写開始点周辺の配列の上流、もしくは下流に興味のあるエンハンサーなどのエレメントを配置し、対象遺伝子の発現量の変化を調べることができる (図 4A)。本ツールを用いて、上記のスーパーエンハンサー領域が *FGF18* の発現量を増加させることが予測された (図 4B)。

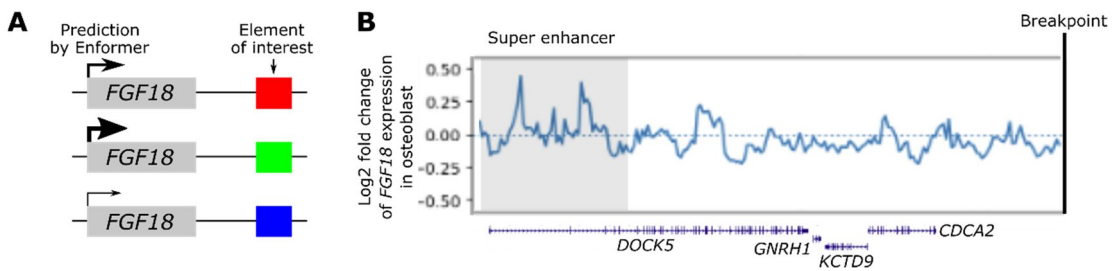


図 4 : *FGF18* の発現量に対するスーパーエンハンサーの影響の予測

(A) in-silico “ luciferase ” assay の概略図。本転座を模して *FGF18* の下流に転座先である染色体 8 番の配列の一部を挿入し、Enformer で骨芽細胞における *FGF18* の発現量の変化を予測する。(B) 転座先である染色体 8 番の配列が *FGF18* の発現量に与える影響。 *DOCK5* 上のスーパーエンハンサーの配列が *FGF18* の発現を亢進させている。

最後に、本家系以外のクリッペルフェイル症候群家系 (DNA 量が十分な二家系) において、*FGF18* を含むトポジカルドメインとその両側のドメインに稀な構造異常を用いて探索した。構造異常は Pindel と Breakdancer ソフトウェアを用いて検出した。結果、当該領域に構造異常を認めなかった。

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

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