

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K06085

研究課題名（和文）人工染色体技術を活用した脆弱X症候群関連染色体脆弱部位の機能解析とモデル系の構築

研究課題名（英文）Construction of model systems for functional analysis of chromosomal fragile sites associated with fragile X syndrome using artificial chromosome technology

研究代表者

中山 祐二（Nakayama, Yuji）

鳥取大学・研究推進機構・助教

研究者番号：40432603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：家族性の知的障害である脆弱X症候群（以下、FXS）はトリプレットリピート病と呼ばれる神経変性疾患群に分類される。発症メカニズムには不明な点が多いが、その一因は根本的病因であるリピート伸長現象を正確に再現できる系がないことである。本研究は染色体工学を用いてFXS発症に至るFXS責任遺伝子FMR1内の(CGG)*n*リピートの伸長とFMR1遺伝子発現抑制にまで至る病態を再現し解析するモデル動物系の構築を目指し、リピート周辺のゲノム領域全体をFXSに関わる脆弱部位として人工染色体上に搭載した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FXSに限らずトリプレットリピート病は、リピート伸長（不安定化）そのものが根本的病因であり、新しい治療法開拓のためにも、そのメカニズムの解明が急務である。リピートを本体とする染色体領域は、染色体脆弱部位と呼ばれており、近年の研究からリピートの不安定化は脆弱部位全体の制御に関わるとされている。本研究で活用している染色体工学技術は、FXSのCGGリピートとその周辺領域だけを機能的に独立した染色体脆弱部位としてクローニングし、動物個体に導入して解析することができる唯一の技術である。将来、他のトリプレットリピート病の解析系の構築にも染色体工学技術は応用可能である。

研究成果の概要（英文）：Fragile X syndrome (FXS), a familial intellectual disability, is one of the neurodegenerative disorders known as triplet repeat diseases. Many aspects of the onset mechanism remain unknown, may be due to the lack of a system that can accurately reproduce the repeat expansion phenomenon, which is the underlying cause of the disease. In this study, we aim to use chromosome engineering to construct an animal model system that reproduces and analyzes the initial sequential events of the expansion of (CGG)*n* repeats in the FXS responsible gene FMR1 and the suppression of FMR1 gene expression, which lead to the onset of FXS. During this study, we cloned the "fragile site related to FXS", which includes entire (CGG)*n* repeats surrounding genomic region, onto an artificial chromosome vector.

研究分野：染色体工学

キーワード：脆弱X症候群 染色体医工学 トリプレットリピート病 染色体脆弱部位

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群 (FXS: Fragile X syndrome、以下 FXS) は最も頻度の高い家族性の X 連鎖性知的障害であり、トリプレットリピート病に分類されている難治性疾患である。近年、40 を超える神経変性疾患群であるトリプレットリピート病は、その病態や発症にいたるメカニズムが明らかにされつつあるが、いずれの研究もリピート伸長が起きた後のイベントに対する研究である。単純リピート配列がどうして不安定化に至り、伸長するのか、トリプレットリピート病の根本的な病因については、研究が停滞しており不明な点が多い。その要因はリピート伸長を正確に再現する系がないことである。

FXS は、責任遺伝子 FMR1 の 5' 非翻訳 (UTR) 領域にある CGG リピートの数が 50 ~ 200 未満である保因者アレルが母性伝播した際に 200 リピート以上に伸長し、FMR1 プロモーター領域が高度メチル化を受け、FMR1 遺伝子が不活性化して発症する。本研究ではこれら一連の反応を「CGG リピート動態」と呼び、FXS の発症の根本病因と捉えている。

現在、CGG リピート動態の再現を目的とした FXS 関連のモデルマウスとして、100 CGG リピートをノックインしたマウスが 2 系統が作製されている。100 CGG リピートはヒトの病態であれば母性伝播を通してリピート伸長が起きて発症に至る保因者相当レベルのリピート長であるが、どちらのマウスでも CGG リピート動態が再現できていない。これらのノックインモデルマウスの結果は、CGG リピート動態の惹起にはリピートだけでなくその前後のシス染色体領域 (エレメント) が必須であることを強く示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、FXS における CGG リピート動態を正確に再現するモデルを構築することである。FXS の発症に至る過程で、CGG リピート動態がどのように発動されて、どのように FMR1 が発現抑制されるのか、その機序とそこに関わる因子を同定してリピート不安定性そのものを治療ターゲットとして開拓することは、FXS の研究、そしてリピート病全体の研究が未だに到達できていない課題である。そのために本研究では、染色体工学技術を活用し、CGG リピート前後のシスエレメント全部を「FXS に関わる染色体脆弱部位」として人工染色体に搭載し、種々の細胞、そして動物に安定に導入できるようにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、FXS 発症に関わる CGG リピート動態に必要な染色体領域 (シスエレメント) を「FXS 脆弱部位」と定義し、この FXS 脆弱部位をマウス人工染色体ベクター (MAC) に搭載する (以下、搭載が完了したものを「FXS-MAC」とする)。FXS-MAC の構築のために、本研究では FXS 保因者 X 染色体の CHO 細胞へのクローニング、ゲノム編集を用いた CHO 細胞内での FXS 保因者 X 染色体の改変、FXS 脆弱部位のマウス人工染色体への搭載、の 3 工程を進めた。工程 1 では、FXS 保因者由来リンパ芽球をソースとして、染色体工学の根幹技術である微小核細胞融合法という染色体移入法によって CHO 細胞にクローニングした。本研究では CGG リピート数が 115 リピートの保因者アレルを使用した。工程 2 は、人工染色体上に特定の染色体領域を搭載するために必須の改変過程であり、全てゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 系を利用したゲノム編集によって、工程 3 で樹立した CHO 細胞内で実施した。

ゲノム編集による染色体改変の工程は 3 つであり、FXS 脆弱部位としてマウス人工染色体に搭載する領域以外の下流領域を削除するテロメアトランケーション、Cre/loxP 部位特異的組換えを起こすための loxP 配列の挿入、ならびに薬剤選択のための内在性 HPRT 遺伝子の破壊である。工程 3 は改変した保因者 X 染色体上の loxP 配列とマウス人工染色体上の loxP 配列間での部位特異的組換えによる転座の誘導により、FXS 脆弱部位をマウス人工染色体の搭載する工程である。本研究では、こうして完成した FXS-MAC をマウス個体に導入し、CGG リピート動態に着目して世代間解析を行う。そのために、マウス ES 細胞に FXS-MAC を微小核細胞融合法によって導入する。得られた ES 細胞からキメラマウス、そして生殖系列キメラを作製する。生殖系列伝播 (germline transmission) を経て得られた FXS-MAC を保持する仔マウスにおいて、CGG リピート動態が起きたかどうかを検証する。本研究で得られる in vivo 再現系は、CGG リピート動態、特にリピート伸長とヒト FMR1 遺伝子の不活性化について世代間解析が可能な再現系であり、CGG リピート動態が再現できれば、そこに働く因子の解析、CGG リピート動態の時期、組織、また分子メカニズムの解明につなげるための貴重なツールとなる。

### 4. 研究成果

本研究実施期間において、人工染色体に搭載する「FXS 脆弱部位」を長短2種類選定した。短いものは、FMR1 遺伝子座全体と上流領域を含む約70kbの領域であり、長いものは、CGG リpeat領域から上流、下流に約1 Mb ずつを含む広い染色体領域である。本研究では、短いものについてマウス人工染色体への搭載を完了し、マウス ES 細胞への導入を進めている。また、長いものについては、現在も染色体改変工程を進めている（いずれも2025年6月現在）。

CGG リpeat動態は、CGG リpeatが存在するだけでは惹起されないことが強く示唆されている一方で、その惹起に必要なシスエレメントはかなり広い領域であることを示唆する報告が多くなされている。CGG リpeat動態に必要なシスエレメントを同定していくためには、長短両方のFXS 脆弱部位搭載人工染色体をマウスあるいは *in vitro* であれば、同じバックグラウンドの細胞に導入して比較解析することが必要であり、その上ではじめてリpeat伸長、エピゲノム変化、遺伝子発現抑制と、それぞれの CGG リpeat動態の各ステップに関わる因子を詳細に追跡できることが期待できる。それを可能とするのが本研究で活用した染色体工学である。

本研究は、本来不安定性を示す FXS 脆弱部位を人工染色体に搭載することで安定に取り扱えるようにできる点で世界初の試みであり、マウスに導入してから世代間解析できる点でも他に類を見ない資材・アプローチである。本研究で樹立した FXS-MAC に搭載された短い FXS 脆弱部位（70 kb）が、CGG リpeat動態の惹起に十分かどうかは今後の解析が待たれるが、これだけの疾患保因者由来のシスエレメントを異種動物内に独立した染色体として導入できるのは染色体工学技術において他にはない。

その一方で、本研究では、長い方の FXS-MAC の構築を完了することができなかった。使用した方法論は原則的に短い方の FXS-MAC と同じであるため、ゲノム編集による染色体改変工程のさらなる改良が課題として残った。本研究ストラテジーにとって、ゲノム編集は必須のツールであり、染色体工学技術の活用において、任意のゲノム領域を改変、あるいは取り出すことができるのは大きな強みである。今後、FXS-MAC の構築を進め、本研究の目的である CGG リpeat動態の再現とその解析を行うモデル系を構築することで、FXS の CGG リpeat動態の統合的なシスエレメントとそこに働く分子メカニズムの解明を目指す。さらに本研究の成果は将来、CGG リpeat動態そのものを治療ターゲットとするための新しい系の開拓につながると期待する。加えて、本研究を通して、染色体工学技術の持つ特長がリpeat病モデル作製に非常に有用であることが示された。今後、他のトリプレットリpeat病の研究にも染色体工学技術が広く応用されることを期待する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 SUGEZAWA KEN, MORIMOTO MASAKI, YAMAMOTO MANABU, MATSUMI YOSHIAKI, NAKAYAMA YUJI, HARA KAZUSHI, UEJIMA CHIHIRO, KIHARA KYOICHI, MATSUNAGA TOMOYUKI, TOKUYASU NARUO, SAKAMOTO TERUHISA, UMEKITA YOSHIHISA, FUJIWARA YOSHIYUKI	4. 巻 42
2. 論文標題 GPX4 Regulates Tumor Cell Proliferation<i>via</i>Suppressing Ferroptosis and Exhibits Prognostic Significance in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5719 ~ 5729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16079	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 Hirota Saeka, Nakayama Yuji, Ekino Keisuke, Harashima Satoshi	4. 巻 137
2. 論文標題 Highly genomic instability of super-polyploid strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 77 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.11.009	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 -
1. 著者名 Yamane Kohei, Yamaguchi Kosuke, Teruya Yasuhiko, Miyake Naomi, Nakayama Yuji, Nonaka Takafumi, Chikumi Hiroki, Yamasaki Akira	4. 巻 26
2. 論文標題 ULBP2 Promotes Tumor Progression by Suppressing NKG2D-Mediated Anti-Tumor Immunity	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2950 ~ 2950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms26072950	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 Makinoya Masahiro, Miyatani Kozo, Matsumi Yoshiaki, Sakano Yu, Shimizu Shota, Shishido Yuji, Hanaki Takehiko, Kihara Kyoichi, Matsunaga Tomoyuki, Yamamoto Manabu, Tokuyasu Naruo, Takano Shuichi, Sakamoto Teruhisa, Hasegawa Toshimichi, Saito Hiroaki, Nakayama Yuji, Osaki Mitsuhiro, Okada Futoshi, Fujiwara Yoshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Exosomal miR-493 suppresses MAD2L1 and induces chemoresistance to intraperitoneal paclitaxel therapy in gastric cancer patients with peritoneal metastasis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-60967-x	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 Hara Kazushi, Horikoshi Yosuke, Morimoto Masaki, Nakaso Kazuhiro, Sunaguchi Teppei, Kurashiki Tatsuyuki, Nakayama Yuji, Hanaki Takehiko, Yamamoto Manabu, Sakamoto Teruhisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matsura Tatsuya	4. 巻 28
2. 論文標題 TYR03 promotes chemoresistance via increased LC3 expression in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101608 ~ 101608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2022.101608	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 Nagata Keiko, Hayashi Kazuhiko, Kumata Keisuke, Satoh Yukio, Osaki Mitsuhiro, Nakayama Yuji, Kuwamoto Satoshi, Ichihara Yoshinori, Okura Tsuyoshi, Matsuzawa Kazuhiko, Miake Junichiro, Fukata Shuji, Imamura Takeshi	4. 巻 EJ22-0609
2. 論文標題 Epstein-Barr virus reactivation in peripheral B lymphocytes induces IgM-type thyrotropin receptor autoantibody production in patients with Graves' disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.ej22-0609	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 Utami Sulistiyati Bayu, Endo Ryo, Hamada Toshihiro, Notsu Tomomi, Minato Hiroyuki, Komatsu Koji, Nakayama Yuji, Shirayoshi Yasuaki, Yamamoto Kazuhiro, Okada Shinichi, Ninomiya Haruaki, Otuki Akihiro, Hisatome Ichiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Hsp70 promotes maturation of uromodulin mutants that cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy and suppresses cellular damage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 522 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02196-y	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 -

1. 著者名 Satofuka Hiroyuki, Abe Satoshi, Moriwaki Takashi, Okada Akane, Kazuki Kanako, Tanaka Hiroshi, Yamazaki Kyotaro, Hichiwa Genki, Morimoto Kayoko, Takayama Haruka, Nakayama Yuji, Hatano Shinya, Yada Yutaro, Murakami Yasufumi, Baba Yoshihiro, Oshimura Mitsuo, Tomizuka Kazuma, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficient human-like antibody repertoire and hybridoma production in trans-chromosomal mice carrying megabase-sized human immunoglobulin loci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1841-1856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29421-2	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 Kazuki, Y., Gao, F. J., . . . Oshimura M., Reeves R. H. (28名中17番目)	4. 巻 109
2. 論文標題 A transchromosomal rat model with human chromosome 21 shows robust Down syndrome features	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 328 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2021.12.015	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 Hirota Saeka, Nakayama Yuji, Itokazu Hodaka, Ekino Keisuke, Nishizawa Masafumi, Harashima Satoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Novel breeding method, mat 2-PBT, to construct isogenic series of polyploid strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 515 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.02.003	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 Uno Narumi, Takata Shuta, Komoto Shinya, Miyamoto Hitomaru, Nakayama Yuji, Osaki Mitsuhiro, Mayuzumi Ryota, Miyazaki Natsumi, Hando Chiaki, Abe Satoshi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Suzuki Teruhiko, Nakajima Yoshihiro, Oshimura Mitsuo, Tomizuka Kazuma, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Panel of human cell lines with human/mouse artificial chromosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3009~3023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06814-3	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 市川稜真、石川瑞樹、牛田凜、中山祐二、久郷裕之
2. 発表標題 染色体工学技術を用いた脆弱X症候群モデルマウスの作製
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 下川大翔、岡田和樹、東海林宝、奈良井節、中山祐二、岸本利彦、古倉健嗣
2. 発表標題 肺がん細胞株A549細胞を用いた、骨微小環境想定因子と間葉上皮転換の関連の解析
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 奈良井節、中山祐二、水上洋一、小谷勇
2. 発表標題 成熟骨芽細胞の濃縮・純化を可能とする細胞表面マーカーの探索
3. 学会等名 第24回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 奈良井 節、中山祐二、水上洋一、小谷 勇
2. 発表標題 骨芽細胞の純化を可能とする細胞表面マーカーの検索
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奈良井 節、中山祐二、水上洋一、小谷勇
2. 発表標題 効率的な骨再生を可能とする成熟骨芽細胞表面マーカーの検索
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市川稜真、石川瑞樹、牛田凜、中山祐二、久郷宏之
2. 発表標題 染色体工学を用いた脆弱X症候群モデルマウスの作製
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中山祐二、石川瑞樹、太田伊政、水上洋一、久郷裕之
2. 発表標題 染色体工学を適用した脆弱X症候群に関連した家系からのX染色体のクローニング
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川瑞樹、太田伊政、中山祐二、久郷裕之
2. 発表標題 FXS脆弱部位を搭載した人工染色体によるFXSモデル動物の作製
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川和奏、森脇崇史、岸間菜々美、中山祐二、宇野愛海、冨塚一磨、香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術応用(8):人工染色体とゲノム編集技術によるHLA遺伝子の置換
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田伊政、石川瑞樹、中山祐二、久郷裕之
2. 発表標題 染色体工学を用いたFXSモデル動物の作製 - 染色体へのFXS領域の搭載 -
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山祐二、太田伊政、石川瑞樹、久郷裕之
2. 発表標題 染色体工学を適用した脆弱X症候群責任脆弱部位のクローニング
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------