

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651222

研究課題名(和文)革新的両方向性遺伝学的アプローチによる重度小頭症の病態解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of primary microcephaly using genome editing technique

研究代表者

松浦 伸也(MATSUURA, SHINYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

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)：日本人遺伝性小頭症家系を用いて、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行った。その結果、遺伝性小頭症の兄妹にWDR62遺伝子の新規変異を同定した。いずれもc.731 C>T (p.Ser 244 Leu)とc.2413G>T (p.Glu 805 X)の複合ヘテロ接合体であった。WDR62の機能を明らかにするために、人工ヌクレアーゼCRISPR/Cas9を用いてWDR62/MCPH2欠損ヒト培養細胞株を樹立した。樹立した欠損細胞は紡錘体形成に異常を来しており、これにより初期発生で十分な神経幹細胞が得られないために小頭症を発症したことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We searched for mutations in Japanese patients with primary microcephaly using a next-generation sequencer, and found novel mutations in the WDR62/MCPH2 gene in the siblings. To study the functional role of WDR62 in neuronal development, we established a WDR62 knockout cell line using CRISPR/Cas9 system. The cell line showed abnormal mitotic spindle formation. This may result in depletion of neuronal progenitor cells, which lead to reduced brain size in early development.

研究分野：遺伝医学

キーワード：遺伝性小頭症

1. 研究開始当初の背景

遺伝性小頭症は、遺伝的異質性が特段に高いことが知られており、これまでに原因遺伝子として、*NBS1*、*Rad50*、*Ligase4* (DNA 二重鎖切断修復遺伝子)、*ATR*、*MCPH1*、*ORC1* (DNA 一本鎖損傷修復遺伝子)、*PCNT*、*ASPM*、*CENPJ*、*CDK5RAP2*、*STIL*、*CEP152*、*CEP63* (有糸分裂制御遺伝子) などが同定された。これらの研究から、遺伝性小頭症の患者は、出生前からのゲノム安定性機構の破綻により、器官形成期で神経幹細胞が十分増殖できず、そのために脳サイズが小さくなることが考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、日本人 10 家系 11 例のサンプルを収集して、DNA 修復経路上から原因遺伝子を探索し、2 家系に DNA 二重鎖切断修復遺伝子 *Mre11A* に変異を、2 家系に中心体構成因子 *PCNT* 遺伝子に変異を同定した。いずれの患者細胞も DNA 損傷後のアポトーシスが亢進しており、神経幹細胞の増殖不良にアポトーシスの関与が示唆された。一方、残り 6 家系には DNA 修復経路上の小頭症関連遺伝子に変異を認めず、新規の原因遺伝子が予想された。本研究では、日本人遺伝性小頭症の 6 家系について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析で原因遺伝子を同定して、病因と病態を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

Agilent Technologies 社の SureSelect target Enrichment System を用いて、ゲノム DNA のエクソン配列に相当する DNA 断片を濃縮し、Genome Analyzer IIx (Illumina 社) で塩基配列を決定する。塩基配列のアセンブリとマッピングは解析ソフトウェア用サーバーを利用する。候補遺伝子変異が次世代シーケンサーのエラーでないことを、キャピラリーシーケンサーで確認する。さらに、患者細胞に正常遺伝子を導入して、中心体数の異常を指標にした相補性試験を行って、原因遺

伝子であることを機能的に証明する。

4. 研究成果

共同研究によりミオクローヌス運動失調の成人女性に *Mre11A* 遺伝子変異を同定して、同遺伝子変異が臨床的に多様な症状を示すことを明らかにした。

さらに、遺伝性小頭症の日本人兄妹に *WDR62* 遺伝子の新規変異を同定した。患者は重度小頭症を呈する 7 歳男児と 3 歳女児であり、*WDR62/MCPH2* 遺伝子の c.731 C>T (p.Ser 244 Leu) と c.2413G>T (p.Glu 805 X) の複合ヘテロ接合体であった。

WDR62/MCPH2 遺伝子変異による小頭症発症の分子・細胞レベルでの機序は不明な点が多い。そこで本研究では *WDR62* の生理機能を明らかにする目的で、人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を用いて *WDR62/MCPH2* 欠損ヒト培養細胞株を樹立した。正常分裂期は細胞接着面に対して紡錘体を水平に形成することで均等分裂を保証する。*WDR62/MCPH2* 欠損培養細胞では、紡錘体を構成する微小管の重合低下により細胞分裂軸が大きく傾くことが明らかになった。ヒト神経発生において、神経幹細胞は均等分裂によって十分な数の幹細胞数を確保した後、不均等分裂によりニューロンを産生する。本研究から、*WDR62/MCPH2* 遺伝子変異による細胞分裂軸制御不全により十分な神経幹細胞数が得られないために小頭症が発症することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① [Miyamoto T](#), Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, [Matsuura S](#). The microtubule depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. *Cell Reports* (2015) 10, 664-673. (査読有り) doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.003

- ② Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SF, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld JB, Link BA, Senga T, Castillo-Morales A, Urrutia AO, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg CP, Furutani-Seiki M. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* (2015) 521, 217-221. (査読有り) doi: 10.1038/nature14215
- ③ 落合 博、松浦伸也. 新規一塩基置換導入法による高発癌性遺伝病の原因変異の同定. *医学のあゆみ* (2015) 252, 153-158. (査読無し)
- ④ 宮本達雄、松浦伸也. PCS (MVA) 症候群. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 29, 411-414. (査読無し)
- ⑤ 松浦伸也. Nijmegen (ナイミーヘン) 染色体不安定症候群. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 29, 617-620. (査読無し)
- ⑥ 宮本達雄、松浦伸也. DNA修復障害概論. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 28, 642-645. (査読無し)
- ⑦ Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T, Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111, 1461-1466. (査読有り) doi: 10.1073/pnas.1317008111.
- ⑧ Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Miyazaki Y, Maruyama H, Murakami N, Fukada K, Izumi Y, Matsuura S, Kaji R, Kawakami H Exome sequencing reveals a novel MRE11 mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *J Neurol Sci* (2014) 337, 219-223. (査読有り) doi: 10.1016/j.jns.2013.11.032.
- ⑨ Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep* (2013) 3: 3379. (査読有り) doi: 10.1038/srep03379.
- ⑩ 落合 博、佐久間哲史、松浦伸也、山本 卓 TALE nuclease (TALEN)を用いた培養細胞におけるゲノム編集 *実験医学* (2013) 31, 95-100. (査読無し)
- ⑪ Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* (2013) 18, 315-26. (査読有り) doi: 10.1111/gtc.12037.
- ⑫ Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PLoS ONE* (2012) 7, e49245. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0049245.
- ⑬ Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki K, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T, Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109, 10915-10920. (査読有り) doi: 10.1073/pnas.1202768109.
- [学会発表] (計 37 件)
- ① Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro S, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of radiosensitivity evaluated by semi-automatic cytokinesis-block micronucleus assay. The 4th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2015年2月14-15日
- ② Akutsu SN, Royba E, Miyamoto T, Matsuura M: Chromosomal analysis in myelodysplastic syndrome and acute

- myeloid leukemia cell lines through the cytokinesis block micronucleus assay (CBMA) and cytogenetic study. The 4th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2015年2月14-15日
- ③ Yanagihara H, Kato A, Matsuura S, Kobayashi J, Komatsu K: NBS1 initiates UV damage tolerance. The 30th RBC-NIRS International symposium. コープイン京都 (京都) 2015年2月20-21
- ④ Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Matsuura S: Constitutive activation of cell proliferation coupled-ciliary disassembly in a spindle assembly checkpoint-deficiency syndrome. The 5th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2015年3月2-3日
- ⑤ Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro S, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of radiosensitivity evaluated by semi-automatic cytokinesis-block micronucleus assay. The 5th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2015年3月2-3日
- ⑥ 宮本達雄、落合 博、Ekaterina Royba、Silvia Natsuko Akutsu、松浦伸也: 放射線感受性 SNP の定量的評価系構築のためのヒト培養細胞における一塩基編集法の開発 第55回原子爆弾後障害研究会 長崎原爆資料館 (長崎) 2014年6月1日
- ⑦ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、松浦伸也: ヒト分裂期チェックポイント欠損症における PLK1-KIF2A 経路の亢進による絨毛病発症機構 第57回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター (鹿児島) 2014年10月1-3日
- ⑧ 柳原啓見、加藤晃弘、斎藤裕一朗、小林純也、松浦伸也、小松賢志: 紫外線損傷応答における放射線修復因子 NBS1 の機能とマウスモデルの作製 第57回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター (鹿児島) 2014年10月1-3日
- ⑨ 角田治美、沖本由理、種山雄一、古舘和季、岩井潤、東本恭幸、四本克己、菱木知郎、小松秀吾、堀江弘、宮本達雄、松浦伸也: 横紋筋肉腫治療終了後、長期寛解を維持している染色分体早期解離 (PCS) 症候群の姉弟例 第56回日本小児血液・がん学会 岡山コンベンションセンター (岡山) 2014年11月28-30日
- ⑩ 松浦伸也、宮本達雄、落合 博、浅見恵子、小川 淳、渡辺輝浩、梶井 正、山本 卓: 次世代シーケンサーとゲノム編集法を用いた非コード領域の原因変異の解析 第59回日本人類遺伝学会 タワーホール船堀 (東京) 2014年11月19-22日
- ⑪ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、Ekaterina Royba、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也: ヒト紡錘体チェックポイント欠損症における細胞増殖に共役した一次絨毛退縮制御の破綻による絨毛病発症機構 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (横浜) 2014年11月25-27日
- ⑫ Miyamoto T, Ochiai H, Royba R, Matsuura S: Functional evaluation system of single nucleotide polymorphisms linked to radiosensitivity using genomic editing technology. The 4th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2014年2月13-14
- ⑬ Royba E, Akutsu SN, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of radiosensitivity detected by cytokinesis-block micronucleus assay. The 3rd International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2014年2月15-16日
- ⑭ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、松浦伸也: 細胞増殖に連動した分裂期キネシン分子 KIF2A による絨毛退縮機構 第54回原子爆弾後障害研究会 広島国際会議場 (広島) 2013年6月2日
- ⑮ 宮本達雄、落合 博、久米悟士、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也: ヒト培養細胞における一塩基編集技術: 放射線感受性 SNP の定量的評価系確立への試み 第38回中国地区放射線影響研究会 広島大学広仁会館 (広島) 2013年7月26日
- ⑯ 宮本達雄、落合 博、金井昭教、久米悟士、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也: 人工ヌ

- クレーゼを用いたヒト培養細胞での一塩基編集：放射線感受性 SNP の評価系構築への試み 第 56 回日本放射線影響学会 ホテルクラウンパレス青森（青森）2013 年 10 月 18-20 日
- ⑰ 小林純也、藤本浩子、奥井理予、加藤竹雄、Lavin Martin、松浦伸也、小松賢志：酸化ストレスによる ATM キナーゼの活性制御 第 56 回日本放射線影響学会 ホテルクラウンパレス青森（青森）2013 年 10 月 18-20 日
- ⑱ 松浦伸也、落合 博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、佐久間哲史、浅見恵子、小川 淳、渡辺輝浩、梶井 正、山本 卓：人工ヌクレアーゼによる一塩基編集法を利用した PCS (MVA) 症候群の遺伝子間領域変異の同定 第 58 回日本人類遺伝学会 江陽グランドホテル（仙台）2013 年 11 月 20-23 日
- ⑲ Miyamoto T, Ochiai H, Kanai A, Hosoba K, Kume S, Sakuma T, Kajii T, Yamamoto T, Matsuura S: Identification of an extragenic mutation of BUB1B gene for PCS (MVA) syndrome and functional analysis using TAL effector nucleases. The 63rd annual meeting of American Society of Human Genetics ボストン、USA 2013 年 10 月 22-24 日
- ⑳ 松浦伸也、落合博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、佐久間哲史、野路澄晴、山本卓：PCS (MVA) 症候群の遺伝子外変異の同定と人工ヌクレアーゼを用いた機能解析 第 72 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜（横浜）2013 年 10 月 3-5 日
- ㉑ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也：細胞増殖シグナル依存的な一次繊毛抑制過程における PLK1-KIF2A 経路の役割 第 72 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜（横浜）2013 年 10 月 3-5 日
- ㉒ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也：分裂期キネシン KIF2A を介した細胞増殖に共役した繊毛退縮機構 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド（神戸）2013 年 12 月 3-6 日
- ㉓ 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也：ヒト分裂期チェックポイント欠損症における繊毛形成異常 2013 年生体運動研究合同班会議 広島大学（東広島）2013 年 1 月 12-14 日
- ㉔ Hosoba K, Miyamoto T, Ochiai H, Matsuura S: KIF2A phosphorylation by PLK1 regulates primary cilia disassembly. The 2nd international symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館（広島）2013 年 2 月 10-11 日
- ㉕ Ohara M, Sakamoto Y, Fukasaku J, Komatsu K, Matsuura S, Tauchi H: Kinetics of radiation -induced DNA double strand break rejoining in DNA repair deficient cells. The 3rd international symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館（広島）2013 年 2 月 12-13 日
- ㉖ Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Yamamoto T, Matsuura S: Artificial nuclease-based targeted DSB introduction and its application. The 3rd international symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館（広島）2013 年 2 月 12-13 日
- ㉗ 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也：ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイント因子 BUBR1 の間期中心体における機能 第 53 回原子爆弾後障害研究会 長崎原爆資料館（長崎）2012 年 6 月 3 日
- ㉘ 細羽 康介、宮本 達雄、落合 博、松浦 伸也：分裂期キナーゼ PLK1 による繊毛形成機構 第 37 回 中国地区放射線影響研究会放射線影響研究所講堂（広島）2012 年 7 月 27 日
- ㉙ 落合 博、宮本 達雄、細羽 康介、佐久間 哲史、野地 澄晴、山本 卓、松浦 伸也：人工ヌクレアーゼを利用した一塩基置換の導入 岡崎コンファレンスセンター（岡崎）第 2 回ゲノム編集研究会 2012 年 9 月 20 日
- ㉚ 小林 純也、藤本 浩子、松浦 伸也、小松 賢志：低線量率放射線細胞応答におけるヒストン修飾の役割 第 55 回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012 年 9 月 6-8 日
- ㉛ 落合 博、宮本 達雄、細羽 康介、佐久間 哲史、野地 澄晴、山本 卓、松浦 伸也：人工ヌクレアーゼ TALEN を利用した DSB 導入とその応用 第 55 回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012 年 9 月 6-8 日

- ③② 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也：分裂期キネシンを標的とした単極性紡錘体形成の誘導法の探索 第55回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012年9月6-8日
- ③③ Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Noji S, Yamamoto T, Matsuura S: Establishment of human disease model cell lines by introduction of intergenic single nucleotide mutation using artificial nucleases. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 2012年12月11-14
- ③④ Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Matsuura S: Ciliary disassembly by the mitotic kinase PLK1 in a spindle assembly checkpoint-deficiency syndrome. 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場（福岡）2012年12月11-14日
- ③⑤ Kobayashi J, Fujimoto H, Okui M, Kato T, Matsuura S, Komatsu K: Role of MRE11/RAD50/NBS1 complex in regulation of ATM activation 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場（福岡）2012年12月11-14
- ③⑥ 松浦 伸也：教育講演「放射線の健康影響」放射線の医学生物学的影響 第20回 IPPNW世界大会 広島国際会議場（広島）2012年8月24-26日
- ③⑦ 宮本 達雄：ゲノム安定性を司る遺伝子 BUBR1 がつくる絨毛構造 第49回広島大学・生命科学フォーラム 広島大学（東広島）2012年5月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：90274133

(2) 研究分担者

宮本 達雄 (MIYAMOTO TATSUO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
研究者番号：40452627