

学位取得者／学位記

●平成29年度 (2017.4~2018.3) ●

●学位取得者

大森早也佳

A Pair of Maternal Chromosomes Derived from Meiotic Nondisjunction in Trisomy 21 Affects Nuclear Architecture and Transcriptional Regulation.

Scientific Reports, 10 : 7(1) : 764, 2017.

取得年月日 : 2017年9月25日

橘 雅弥

Rescuing effects of RXR agonist bexarotene on aging-related synapse loss depend on neuronal LRP1

Exp Neurol.277 : 1-9, 2016.

取得年月日 : 2018年3月22日

谷河純平 (平成29年度博士課程優秀者)

Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties.

Hum Mutat, 38(7) : 805-815, 2017.

取得年月日 : 2018年3月22日



A Pair of Maternal Chromosomes Derived from Meiotic Nondisjunction in Trisomy 21 Affects Nuclear Architecture and Transcriptional Regulation

大森 早也佳

医学系研究科 情報統合医学 医学専攻

Scientific Reports, 10;7(1):764, 2017

● 目的

体細胞分裂間期の核において、各染色体は染色体テリトリーと呼ばれる一つの塊として特定の領域を占有し、遺伝子密度や染色体のサイズに応じた核内配置をとっている。染色体テリトリーは遺伝子発現に関与することが明らかになっており、一般的に染色体の外側に配置される遺伝子は遺伝子発現が促進され、内側にある遺伝子は抑制される傾向にある。核膜との相関も明らかになっており、核ラミナに接する遺伝子領域は遺伝子の発現が抑えられる。核内配置は細胞の分化に伴って変化し、遺伝子の発現制御に大きく関わっている。

ダウン症候群 (21トリソミー)は過剰な21番染色体により引き起こされる最も頻度の高い染色体異常である。過剰な21番染色体が核内配置に与える影響に関しては、21トリソミーのリンパ球を解析した報告から、55%の核において3本のうち2本の21番染色体が近接し、残りの1本は離れた特徴的な核内配置をとることが知られている。しかし、その核内配置が遺伝子発現にどのような影響があるか、また染色体の由来(父親または母親由来)に関係があるかについてはいまだ明らかになっていない。

そこで我々は、ダウン症新生児から樹立したiPS細胞とゲノム編集技術を組み合わせて3本の21番染色体の由来を特定し、核内配置との関係を調べた。さらに21トリソミーから21番染色体を1本取り除き正常な核型となった細胞を樹立し、3本の21番染色体を比較することで、21トリソミーにおける染色体の由来と核内配置および遺伝子発現との関係を明らかにすることを目指した。

● 方法ならびに結果

21トリソミーにおける21番染色体の由来と核内配置および遺伝子発現との関係を明らかにするために、以下の2種類の細胞を樹立した。なお本研究ではダウン症候群の中で最も頻度が高い、卵子形成時の減数第一分裂不分離由来の検体を使用している。

(1) Partial trisomy 21 iPS細胞の樹立 -4Mbの欠失導入- TALENを用いて父親由来の21番染色体上にloxP配列を2箇所同方向に導入し、Cre-loxPシステムを介した4Mbの領域欠失を誘導した。これにより4Mbの領域内にあるDYRK1Aの有無で父親由来(DYRK1A欠失)と母親由来(DYRK1A正常)が区別可能となった。樹立した細胞を用いて21番染色体の核内配置を解析した結果、特徴的な核内配置において、母親由来の2本が近接し、父親由来の1本がそれらと離れて配置する傾向を示すことがわかった。また、父親由来の21番染色体は母由来と比べて核膜に近い配置を示すことも明らかになった。

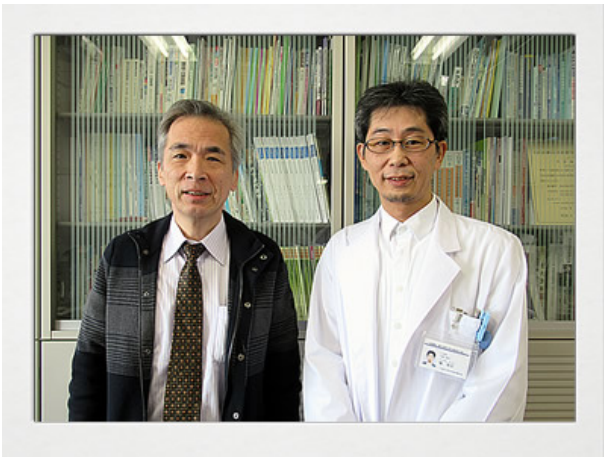
(2) corrected disomy 21 iPS細胞の樹立 -染色体除去技術の確立- 次に3本の21番染色体の各々の機能を比較するために、21トリソミー由来のiPS細胞から染色体を1本除去し正常核型となった細胞を3種類樹立した。染色体除去は、向かい合ったloxP配列を含むカセットを21番染色体上に導入し、Cre-loxPシステムを介すことで得られた。樹立した細胞の核内配置と遺伝子発現を比較したところ、21トリソミーと一致して父親由来の染色体を除去した場合のみ核膜から離れた配置をとる傾向を示した。また一部の遺伝子において父親由来の染色体を除去した場合のみ、有意に高い発現を示すことがわかった。一方、健常児のiPS細胞において2本の21番染色体の核膜からの距離に有意な差はないことから、21トリソミー特異的な現象であると考えられる。さらに遺伝子発現に違いをみとめた遺伝子の一部の発現パターンをRNA FISHで解析したところ、揺らいだ発現パターンを示すことが明らかとなった。

●総括

ダウン症候群において、不分離で生じた母親由来の2本と父親由来の一本はそれぞれ特徴的な核内配置を示し、その影響と考えられる遺伝子発現の変化をみとめた。一方、健常児においては染色体の由来による差を認めないことから、不分離で生じた21トリソミー特有の現象であると考えられる。

●本人コメント

修士及び博士課程を小児科学講座で過ごしました。医学部出身ではない私にとって、患者さんに会ったり、患者さん由来の細胞からiPS細胞を樹立して実験に用いたりと臨床教室ならではの研究ができたことは貴重な経験でした。小児科で学んだことを活かして今後も研究を続けていきたいと思います。最後になりますが、本研究を行うにあたりご指導くださった大園先生、北畠先生ならびに多くの先生方、誠にありがとうございました。



Rescuing effects of RXR agonist bexarotene on aging-related synapse loss depend on neuronal LRP1

橘 雅弥

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Exp Neurol. 277:1-9, 2016

● 目的

Apolipoprotein E(apoE)は、中枢神経系においては主たるコレステロール担体であり、ニューロンに発現する表面レセプター、特にlow-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1) を介してコレステロールをシナプスに供給し、シナプスの維持や修復に重要な役割を果たしている。加齢による認知機能の低下には脳内コレステロールの減少を背景としたシナプス機能の低下が関係していると考えられ、脳内でコレステロールに結合したapoEを増加させることによって、加齢に伴うシナプスのダメージが修復できる可能性がある。レチノイドX アゴニストであるbexaroteneは、脳内のapoEとその脂質との結合を増加させ、アルツハイマー病モデルマウスなどにおいて認知機能を改善することが報告されている。本研究では、bexaroteneが加齢に伴うシナプス変化を、apoEを増加させることで回復させる作用があるか、またその作用へのニューロンに発現するLRP1の関与の有無を検討することを目的とした。

● 方法ならびに結果

前脳神経細胞特異的にLRP1の発現が消失するコンディショナルノックアウトマウス (nLRP1^{-/-}) とその同腹子コントロールマウス(20-24か月齢)に対して、100mg/kg/dayのbexarotene含有餌またはコントロール餌を8週間投与した。脳内の蛋白発現量をウェスタンブロットティングおよびELISAで検討したところ、bexarotene投与群においては、nLRP1^{-/-}マウス群、コントロールマウス群とも脳内のapoE発現量、およびapoEのコレステロール結合に関与するATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1)の発現量がコントロール餌群に比較して有意に増加していた。また、シナプス蛋白であるPSD95、GluR1、NMDAレセプターNR1サブユニット (NR1) の発現量は加齢とともに減少していたが、コントロールマウス群ではbexarotene投与群においてコントロール餌群に比べてこれらのシナプス蛋白の発現量の増加を認めた。一方、nLRP1^{-/-}マウス群では、bexarotene投与群とコントロール餌群でシナプス蛋白の発現量に有意な差はなく、bexaroteneのシナプス蛋白回復作用には、神経に発現するLRP1が関与していることが示唆された。しかしながら、免疫染色による組織学検討では、bexarotene投与群ではnLRP1^{-/-}マウス、コントロールマウスともに脳内のアストロサイトとマイクログリアの活性化を認め、神経炎症の悪化が認められた。また、bexarotene投与群においては、nLRP1^{-/-}マウス、コントロールマウスとも、肝機能障害によると思われる肝腫大と体重減少を認め、bexaroteneの臨床的な使用には注意を要すると考えられた。

● 総括

本研究で使用したbexaroteneは副作用が強く、臨床応用には適さないと考えられたが、加齢に伴うシナプスの変化に対して、RXR経路を介したapoEをターゲットとする治療が有効である可能性が示唆された。

● 本人コメント

大学院同期の中では最後になりましたが、お陰様で学位を取得することができました。長きに渡ってご指導いただいた大藪先生、谷池先生、毛利先生はじめ諸先生方、留学中にご指導いただいたDr. Bu、兼清先生とラボの仲間たちに心より感謝いたします。



Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties.

谷河 純平

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Hum Mutat. 2017 Jul;38(7):805-815.

●目的

先天性Glycosylphosphatidylinositol(GPI)欠損症(IGDs)は、細胞表面に発現しているGPIアンカー型タンパク質の合成や輸送に関する遺伝子の異常によって生じ、2006年に初めて報告され、非常に多様な臨床症状を示すことが特徴である。Mabry症候群として知られる、高ALP血症を伴う精神運動発達遅滞を示す症候群もIGDsの一型である。GPIアンカー型タンパク質の生合成や輸送には少なくとも26種の遺伝子が関わっているが、IGDsは極めて稀な疾患であるため、その原因遺伝子ごとの臨床症状とその遺伝子変異の関連などは明らかになっていない。そこで、今回我々はPIGO遺伝子異常症の新規4家系を報告するとともに、過去に報告された5家系についても併せて、遺伝子変異とその臨床症状との関係について検討した。

●方法ならびに結果

精神発達遅滞にてんかんや様々な奇形を合併し、診断がついていない日本人の患者154人に対して血液の顆粒球を用いてFlow cytometryによる解析を行い、スクリーニングを施行した。スクリーニングの結果、顆粒球表面のGPIアンカー型タンパク質であるCD16などの発現に低下を認めた患者に対して、全エクソーム解析などの遺伝子検査を行い、PIGO欠損症と診断した。また今回患者の死後に全エクソーム解析にて診断した症例を含めた新規4家系6名の患者を診断した。患者の臨床症状としては特異顔貌、末節骨短縮症、筋緊張低下などを共通して認めており、重症例でのみHirschsprung病や魚鱗癬の合併を認めた。診断には高ALP血症が有用であると報告されているが、患者の血清ALP値と臨床的重症度の間には相関を認めなかった。患者の血液を用いた顆粒球のFlow cytometryによる解析の結果も臨床的な重症度とは相関を認めなかった。次に機能解析として、既報告の変異も含め、PIGOをknock outしたHEK293細胞に野生型と患者の変異を持ったcDNAを導入し、その細胞表面のGPIアンカー型タンパク質の発現がどの程度回復するかを検討した。その結果、臨床的に重症となる患者が有する変異では、GPIアンカー型タンパク質の発現は低く、軽症となる患者の有する変異では、GPIアンカー型タンパク質の発現が高くなる傾向を認めた。また、IGDsの中でGPIアンカー型タンパク質の生合成の早期の段階に関与するPIGA欠損症と臨床症状を比較すると、高ALP血症、末節骨短縮症、Hirschsprung病がPIGO欠損症に特徴的であると考えられた

●総括

PIGO欠損症は、乳児期に死亡する症例から、軽度学習障害を呈する症例まであり、従来の報告よりも臨床像が多様であることが明らかとなった。血清ALP値や顆粒球でのFlow cytometryの結果は診断には有用であるものの、臨床的な重症度とは相関せず、細胞を用いた機能解析の結果が臨床的な重症度と相関を認めた。

●本人コメント

先天性GPI欠損症は比較的最近見つかった大変希少な疾患です。以前勤務していた病院で担当したお子さんの中に、当時何の病気か診断ができなかった方がいて、大学院に入学して間もない頃、遺伝子検査でこの病気であると診断されました。それ以来ご縁があり、微生物病研究所の村上教授にご指導頂き多くの先生方と共同研究をすることができ、その成果の一部をこのような形で論文にまとめることができました。また、

在学中には、脳磁図を用いた自閉症のお子さんの聴覚についての研究にも従事させて頂きました。この2つは分野の大きく異なる研究ですが、どちらも今後の臨床や研究に活かすことができ、小児科医としての視野を拡げることができたと思います。研究を続けるにあたり大菌教授をはじめ、多くの先生方のご指導、ご協力を頂きました。この場を借りて心より感謝申し上げます。