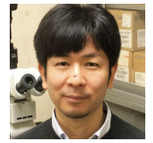
「疾患原因変異の機能解析」

中川　草
Nakagawa So
分子生命科学 准教授



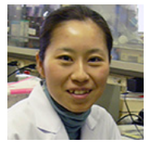
大塚正人
Ohtsuka Masato
分子生命科学 教授

秦野伸二
Hadano Shinji
分子生命科学 教授

プロジェクトリーダー：岡　晃
Oka Akira
医学部医学科基礎医学系分子生命科学 講師

福田　篤
Fukuda Asushi
分子生命科学特任講師

三浦浩美
Miura Hiromi
分子生命科学 助教



大友麻子
Otomo Asako
分子生命科学 講師

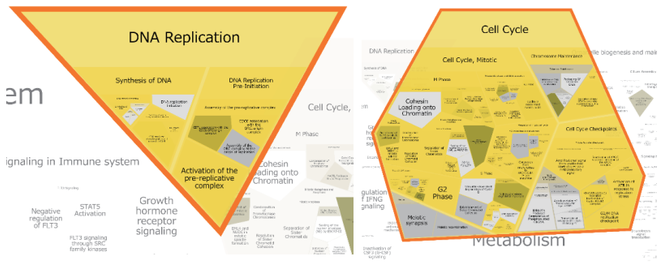
【研究概要】

メンデル遺伝性を示さない、集団中で頻度の高い common disease の原因変異はリスクが極めて低く、さらに変異の数が数百個以上と多く、変異と機能の生物学的な解析は難しい課題である。我々はこの課題に挑戦し、遺伝学的な解析により円形脱毛症 (*EBioMedicine.* 2020 21;57:102810.) ならびに全身性強皮症 (*J Invest Dermatol.* 2017 137:1878-86) の原因変異を少なくとも 1 つずつ主要組織適合性抗原 (MHC) ゲノム領域に見出すことに成功した。さらに、摂食障害の罹患同胞対のゲノムを用い、シークエンシング解析により候補となる変異を見出した。これらの変異の生物学的機能を追求することにより、各疾患の発症機序を明らかにすることが研究の目的である。

【研究成果】

1) 全身性強皮症原因遺伝子の機能解析

全身性強皮症は繊維化に伴う各臓器の硬化を特徴とする自己免疫疾患である。MHC 領域内において極めて強い遺伝学的関連が認められることから、原因変異探索を行ったところ、2 つのリスク要因が存在することを突き止め、その内 1 つについては、機能遺伝子上のアミノ酸置換を伴う 1 個の変異が疾患との関連を生じさせていることを明らかにしている。この遺伝子 RXRB (retinoid X receptor beta) がコードするタンパクは、レチノイン酸をリガンドとする核内レセプター且つ転写因子であり、さらに創薬ターゲットとしても注目されている分子である。そこで、患者患部から分離された線維芽細胞を用いて変異の機能を解析した。すなわち、変異を有する患者ならびに無い患者由来の線維芽細胞を調整し、さらに通常培養およびレチノイド添加での培養にて得られた細胞を対象に、RNA sequencing による網羅的発現解析を実施した。すべての試料群の組み合わせで遺伝子発現の差異を検討した結果、レチノイド添加の培養条件における変異の有無の間でのみ、極めて有意にエンリッチされたパスウェイが見出された。



Pathway analysis by Reactome

変異を有する個体で有意に発現上昇が認められた 122 個の遺伝子の内、細胞周期に関与する遺伝子が 102 個認められた。さらに、ここから細胞周期の有糸分裂のステージで機能する遺伝子が 75 個、さらに spindle-assembly checkpoint (SAC) 紡錘体チェックポイントに関与する遺伝子が 26 個認められ、この解析で最もエンリッチされた特異的遺伝子群と考えられた。したがって、cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) を中心とした分子群と RXRB は機能的に関与していると示唆された。興味深いこととして、近年この CDK1 を標的とした薬剤が強皮症の治療薬として期待されている。さらに一部の患者において治療薬としてレチノイドは非常に効果があるとのデータもあり、今後の研究の展開に期待している。

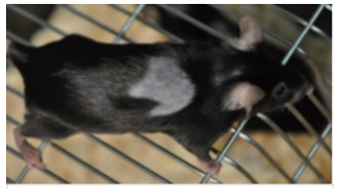
2) 摂食障害原因遺伝子の機能解析

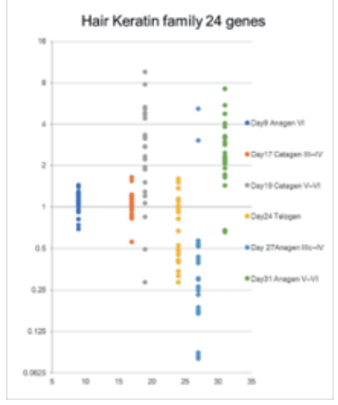
摂食障害は思春期の女性に多く発症し、精神疾患の中で最も死亡率が高い。摂食障害患者の中でも障害病歴が一致した罹患同胞は遺伝性が高いことが知られており、この条件を満たす日本人摂食障害罹患同胞を含む 10 家族を厳選して全ゲノムエクソーム解析を行った。その結果、Corticotropin releasing hormone receptor 2 (CRHR2) 遺伝子内において、生物種間で高度に保存される機能性モチーフ上に、アミノ酸置換を生じさせる変異を見出した（論文投稿中）。CRHR2 はコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) に対する神経ペプチドレセプターで、ストレス応答の主要コンポーネントである視床下部 - 下垂体 - 副腎軸 (HPA axis) の重要なコーディネーターである。さらに、CRHR2 は CRH ファミリーの 1 つである UCN のレセプターとしても機能し、ストレス、不安ならびに摂食行動の制御に関連している。すなわち、摂食行動を制御することでよく知られるセロトニンは、脳幹にある背側縫線核のセロトニンニューロンで産生され、CRHR2 はこのセロトニンニューロン特異的に発現し、セロトニンニューロン活性をコントールする重要な枠割を担っている。一方、摂食障害患者では食行動の異常に加え、高率で不安障害を有することから共通の関連因子が想定されている。さらにストレス対処行動が十分に機能しないことから、ストレスが両障害の発症や増悪に深く関与していると考えられている。したがって、前提の無い網羅的なエクソーム解析により見出された CRHR2 が機能的にも摂食障害に関与する可能性が極めて高い。そこで、この変異の生物学的機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 system によりこの変異を導入したマウスの作製し、不安様行動を測定するいくつかの行動解析を始め、機能解析に着手している。

Elevated plus maze test

3) 円形脱毛症リスクアリルの機能解析

我々は遺伝学的に支持された MHC 領域内の CCHCR1 に存在する円形脱毛原因変異 (rs142986308, p.Arg587Trp) をマウスに導入して、マウスが脱毛することを示した。このマウスならびに変異を有する患者の毛髪は、それぞれ類似した毛皮質に著しい乱れが観察され、さらに、ケラチン関連遺伝子群が共に特異的にシフトしていた。すなわち、この原因変異はマウスならびにヒトにおいても毛軸に対して同様な影響を与えることを明らかにした。続いて、この脱毛のメカニズムを明らかにするために、毛周期別に Cchcr1 および野生型マウスの皮膚を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、毛髪ケラチン遺伝子群は毛周期特異的にその発現量が変化していることが明らかになった。これらの研究結果により、我々が遺伝統計学的に見出した原因変異が、毛髪の角化異常ならびに脱毛を引き起こすことを証明することに成功した。





【今後の展望】

原因変異探索は極めて困難であるが、円形脱毛症において、その強いリスク要因を突き止めることが不可能ではないことを示すとともに、リスクアリルの生物学的機能についても実験動物で証明することができた。しかし当然のことながら、あらゆる疾患で同じように解析できるわけではなく、それは疾患そのものの資質が大きく寄与していると考えられる。今後は、円形脱毛症に加え、全身性強皮症ならびに摂食障害などで見出した原因変異の機能解析を実施する予定である。

Selected Papers.

1. Zhao Q, Koyama S, Yoshihara N, Takagi A, Komiyama E, Wada A, Oka A, Ikeda S. The Alopecia Areata Phenotype Is Induced by the Water Avoidance Stress Test In cchcr1-Deficient Mice. Biomedicines. 2021 Jul 19;9(7):840.