

# ゲノム解析研究部門

## 「疾患原因変異の機能解析」

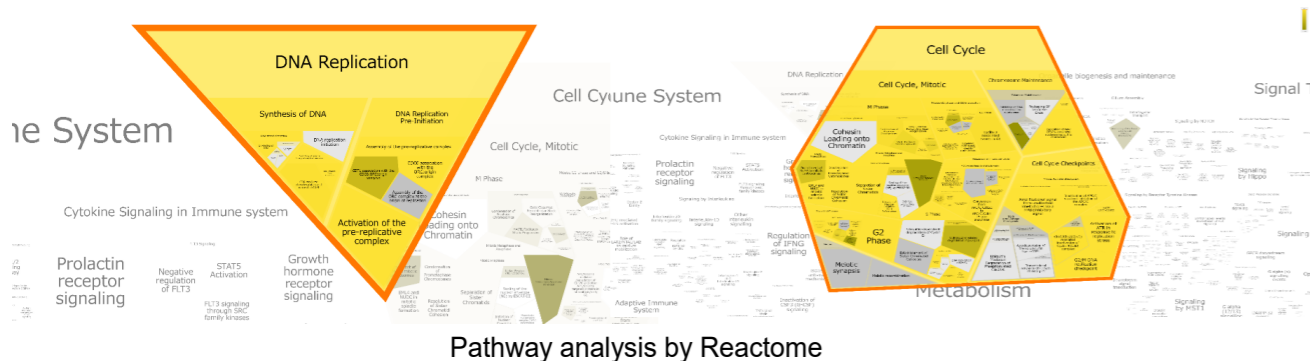
### 【研究概要】

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極めて多く、その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ならびに全身性強皮症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、シーケ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。



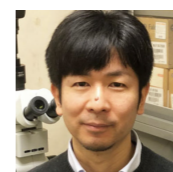
変異を有する個体で有意に発現上昇が認められた122個の遺伝子の内、細胞周期に関与する遺伝子が102個認められた。さらに、ここから細胞周期の有糸分裂のステージで機能する遺伝子が75個、さらにspindle-assembly checkpoint (SAC) 紡錘体チェックポイントに関与する遺伝子が26個認められ、この解析で最もエンリッチされた特異的遺伝子群と考えられた。したがって、cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)を中心とした分子群とRXRBは機能的に関与していると示唆された。興味深いこととして、近年このCDK1を標的とした薬剤が強皮症の治療薬として期待されている。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。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ロ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。



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  
生体機能学 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



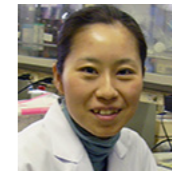
三浦浩美  
Miura Hiromi  
分子生命科学 助教



鈴木 進吾  
Suzuki Shingo  
分子生命科学 助教

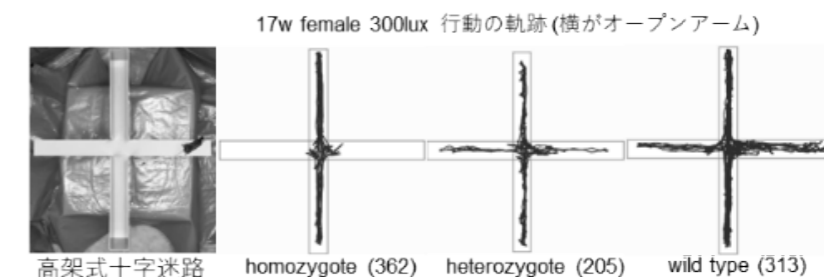
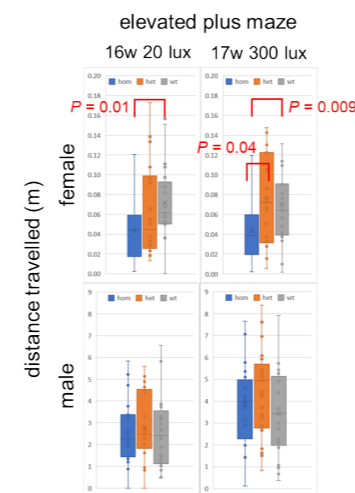


福田 篤  
Fukuda Asushi  
分子生命科学 講師



大友麻子  
Otomo Asako  
生体機能学 講師

そこでCRISPR/Cas9によりC57BL/6系のマウスを用いて、この変異を導入した*Crhr2*<sup>G751A</sup>マウスを作製した。このマウスを用い変異の遺伝子型間の機能的差異を調査するため、*Crhr2*<sup>G751A</sup>のホモ接合、ヘテロ接合、野生型の3種と性別を合わせた合計6群にて行動解析を実施した。各実験で週齢を一致させ統計学的検出力0.8以上を目指し、各群の個体数は約20個体使用した。CRHR2はストレス、不安ならびに摂食行動の制御に関連しているため、まず不安様行動を調査するため、高架式十字迷路、オープンフィールド、明暗選択箱で評価した。その結果、3種すべての試験において、変異型マウスにおいて雌のみ不安様行動を示すことを明らかにした。図で示したのはそのうちの1つ高架式十字迷路で、高所 (50cm) に壁を持つアームとオープンなアームを十字に配置した装置上での行動を観察する。マウスが壁際を好み、高所を避けるという性質を利用するものであり、オープンアームでの行動が減少すれば不安様行動の増加が示唆されるものである。照明を20luxならびに300luxの2条件で評価したが、いずれもオープンアーム上での行動距離が野生型と比較して変異ホモ接合型の雌で統計学的有意に減少(約50%)していることが明らかとなった。すなわち、遺伝学的に見出した変異とマウスの不安様行動との関連を明らかにすることに成功した。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るが、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ロールする重要な枠割を担っている。さらに背側縫線核は不安や恐怖の神経情報を処理する分界条床核へ投射している。そして、げっ歯類ではこの分界条床核が雌で有意に大きく、*Crhr2*のKOマウスは不安様行動の増幅に性差が認められており、患者はほぼ女性であることを考慮すると、本研究成果は非常に興味深い。



### 【今後の展望】

疾患原因変異探索において、その強いリスク要因を突き止め、リスクアレルの生物学的機能についても証明することができた。今後は各疾患原因遺伝子の機能と疾患との関係を明らかにしていきたい。

患者数の多い、いわゆるcommon diseaseの原因変異は1疾患当たりの変異数が多く、1つの変異が疾患に寄与する割合(リスク)が極端に低く、生物学的な機能解析ができない。しかしながら、リスクの強い変異も存在することから、いくつかの課題を克服しつつこれを遺伝学的に検出し、さらにその変異の機能を解析することで、今までにない疾患の新たな理解を目指している