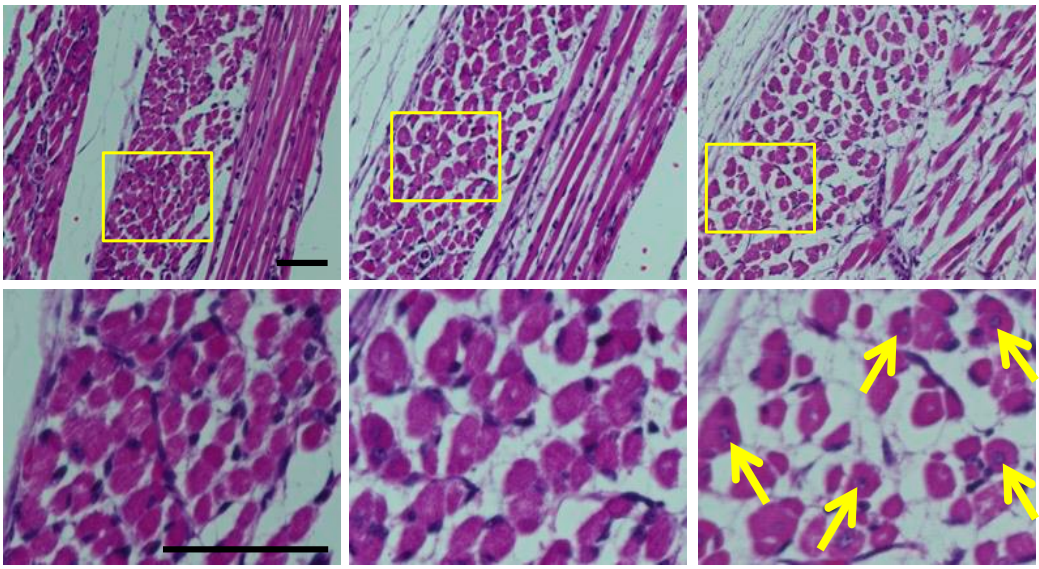
206　鏡–緒方症候群の治療法の開発	石野　史敏

【目的】鏡–緒方症候群は染色体 14 番父親性 2 倍体によって引き起こされるゲノムインプリンティング疾患であり、難病指定を受けている疾患である。呼吸不全による新生児致死、腹直筋乖離、胎盤の過形成生後成長遅延など重篤な症状を呈するが、胎盤の異常以外の主病態である筋肉関連異常の原因は長い間不明であった。我々はその主原因が *PEG11/RTL1* の過剰発現であると考え、本研究ではマウスモデルにおける *Peg11/Rtl1* の筋肉での発現と過剰発現による異常を明らかにし、アンチセンス RNA に含まれる miRNA で過剰発現を抑制する遺伝子治療開発を試みる。

【方法】ヒト染色体 14 番の相同染色体であるマウス 12 番染色体の父親性 2 倍体、母親性 2 倍体でもヒト同様の症状が見られる。そこで、原因インプリンティング領域に含まれる *Peg11/Rtl1* とそのアンチセンス RNA をコードする *antiPeg11/antiRtl1* 領域を欠失したノックアウトマウスを作製した。この欠失を父親由来で伝達したマウスは *Peg11* KO となり、母親由来で伝達した場合には *antiPeg11/antiRtl1* KO マウスとなる。*AntiPeg11/antiRtl1* には *Peg11/Rtl1* を標的とする 6 個の miRNA が含まれることから、このマウスでは miRNA 欠失により *Peg11/Rtl1* mRNA の過剰発現が誘導される。まず、野生型のマウスを用いて個体発生の各ステージでの *Peg11/Rtl1* の発現時期と部位の詳細を明らかにし、筋肉での発現の有無を明らかにする。次に筋肉での発現が見られる発生ステージにおいて、*Peg11/Rtl1* の欠失と過剰発現による筋肉の異常を明らかにする。最終的に、*antiPeg11/antiRtl1* に含まれる miRNA または *antiPeg11/antiRtl1* 自身を導入が、実際に胎児期において *Peg11/Rtl1* の抑制に機能するかを確認する。

【結果】マウスにおいて胎児期および新生児期特異的に *Peg11/Rtl1* が骨格筋で発現することを確認した。これらには肋間筋、腹筋、横隔膜など新生児の呼吸に重要な筋肉が含まれることから、これらが鏡–緒方症候群の新生児における呼吸不全の原因になる可能性が高いことを突き止めた。また、新生児期のこれらの筋肉を調べると、固定化処理をした標本において筋繊維が筋細胞膜から剥離し、著しく収縮することを発見した（右図）。また、筋細胞において細胞核が中央部に位置する未成熟タイプが多いことを発見した（右下図の矢印）。これらのことから、*Peg11/Rtl1* の過剰発現が、実際に呼吸関連の骨格筋の構造的異常を引き起こしていることが明らかになった。さらに胎児期に *antiPeg11/antiRtl1* に含まれる複数の miRNA を投与することにより、これらの筋肉に影響が出ることを確認した。投与量と投与時期を詳細に詰めることにより、この方法は鏡–緒方症候群の遺伝子治療となりうると考えている。

Peg11/Rtl1 の欠失（左）および過剰発現（右）は骨格筋の異常を引き起こす



206. 鏡－緒方症候群の治療法の開発

石野　史敏

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

Key words：鏡–緒方症候群，ゲノムインプリンティング疾患，*PEG11/RTL1*，筋肉発生，miRNA 療法

緒　言

鏡–緒方症候群は染色体 14 番父親性 2 倍体によって引き起こされるゲノムインプリンティング疾患である。呼吸不全による新生児致死、腹直筋乖離、胎盤の過形成生後成長遅延など重篤な症状を呈し、日本では難病指定を受けている［1]。ヒト染色体 14 番母親性 2 倍体ではテンプル症候群という成長不良を主とする異なる疾患が引き起こされる[2]。相同染色体であるマウス 12 番染色体の父親性・母親性 2 倍体でも、ヒト同様の症状が見られることから、マウスは有効な疾患モデルとして使うことができる［3］。このインプリント領域には *DLK1*、*PEG11/RTL1*、*DIO3* の 3 つのタンパク質をコードする父親性発現インプリント遺伝子（*PEG*）と、*MEG3/GTL2*、*antiPEG11/antiRTL1*、*MEG8*、*MEG9* などの母親性発現をするノンコーディング RNA（*MEG*）が含まれる［4］。我々は、以前、*Peg11/Rtl1* とそのアンチセンス領域に存在する *antiPeg11/Rtl1* を含む領域を欠失したモデルマウスを作製した［5］。この欠失を父親由来で伝達したマウスは *Peg11* KO、母親由来で伝達した場合には *antiPeg11/antiRtl1* KO マウスとなる。*AntiPeg11/antiRtl1* はノンコーディング RNA であるが、*Peg11/Rtl1* mRNA を標的とする 6 個の miRNA を含む。そのため *AntiPeg11/antiRtl1* を欠失したマウスでは *Peg11/Rtl1* mRNA の過剰発現が誘導される［5，6］。これらのマウスの解析から、*Peg11* の欠失と過剰発現のどちらもが胎盤構造・機能の異常を起こすことを 2008 年に報告し、*Peg11/Rtl1* が個体発生に必須の胎盤遺伝子であることを明らかにした［5］。しかし、鏡–緒方症候群の主病態である筋肉関連の異常の原因遺伝子は長い間不明であった。そのため、個体発生における *Peg11/Rtl1* の発現を再度見直し、これらのモデルマウスの再解析を進めることで、筋肉関連病態の病態を説明することを試みた。本研究では、モデルマウスの解析結果から、鏡–緒方症候群とテンプル症候群の原因が、*PEG11/RTL1* の過剰発現と発現欠失であるという証拠が得られたため、胎児に直接 *AntiPeg11/antiRtl1* に含まれる miRNA を投与したところ筋肉発生に影響を与えることを確認できた。これにより、鏡–緒方症候群の発症を抑える有効な遺伝子治療として miRNA 療法が有望であることを明らかにした。

方　法

1.　個体発生過程における *Peg11/Rtl1* の詳細な発現解析

Peg11/Rtl1 タンパク質の発現は胎盤では確認されるものの、それ以外の組織では mRNA の発現はあっても免疫染色によるタンパク質発現は確認されていなかった。今回、改めて胎児期からの個体発生過程における *Peg11/Rtl1* mRNA およびタンパク質の発現を詳細に調べることにより、発現時期および発現部位の詳細を明らかにした。

2.　*Peg11/Rtl1* の欠失・過剰発現による筋肉の異常

胎児期から新生児期における様々な筋肉組織（特に呼吸に関係する肋間筋、横隔膜、腹筋など）の切片の詳細な解析を行い、*Peg11/Rtl1* の欠失・過剰発現による筋肉の異常を確認した。

3.　胎児への *antiPeg11/antiRtl1* に含まれる miRNAs の投与による欠失病態発症の確認

実際に、染色体 Peg11/Rtl1 タンパク質が筋肉発生に関係することを確かめるために *Peg11/Rtl1* mRNA に対する miRNA をマウス妊娠 14.5 日目の胎仔に直接投与し、呼吸関連筋肉組織への効果を調べた。

結　果

1.　個体発生過程における *Peg11/Rtl1* の詳細な発現解析

これまで出生児や成体の筋肉組織を用いた解析では *Peg11/Rtl1* の筋肉での発現は検出できず、父親性 2 倍体による筋肉組織の異常の原因は長い間不明であった。今回、胎仔期から新仔児期、離乳期の各臓器における遺伝子発現解析を行ったところ、*Peg11/Rtl1* は胎仔期中期から新生仔期の時期、特異的に骨格筋特異的な発現が確認できた（図 1）。この発現は出生後 2 週間後には全く消失してしまい、成体では全く検出できない。このため、これまで長い間、その　発現が見つけられなかったと考えられる。これらの骨格筋には、肋間筋、腹筋、横隔膜など新生児の呼吸機能関連のものが含まれており、鏡−緒方症候群患者の新生児期における呼吸不全による致死の原因である可能性が高いと考えられた。

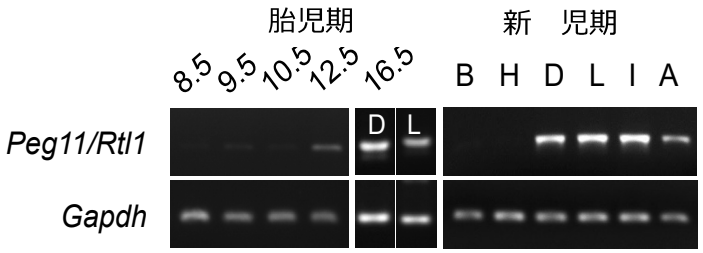


図 1.　*Peg11/Rtl1* の胎仔期・新生仔期骨格筋での特異的発現

2.　*Peg11/Rtl1* の欠失、過剰発現による筋肉の異常

新生仔の肋間筋、腹筋、横隔膜および四肢の骨格筋の病理切片を作製したところ、*Peg11/Rtl1* 欠失では筋繊維の直径の減少（図 2 左）、*Peg11/Rtl1* の過剰発現では逆に増大を認めた。しかし、固定処理をしたサンプルでは、*Peg11/Rtl1* の過剰発現の標本において著しい直径の減少が見られた（図 2 右）。固定処理によりサルコメアの筋繊維が細胞膜から分離した像が見えることから、*Peg11/Rtl1* の過剰発現は、胎仔期および新生仔期の骨格筋の構造的脆弱性をもたらすことが明らかになった。筋細胞において細胞核が中央部に位置するものが多いことから、筋細胞の成熟が遅れていると考えられる（図 2 の矢印）。このような収縮異常は上記の全ての骨格筋で見られたが、肋間筋、腹筋、横隔膜において著しく、四肢の骨格筋では程度は少なかった。通常、筋肉の異常は四肢の骨格筋を用いて観察されることが多いため、*Peg11/Rtl1* の過剰発現の効果がこれまで見逃されていたと考えられる。

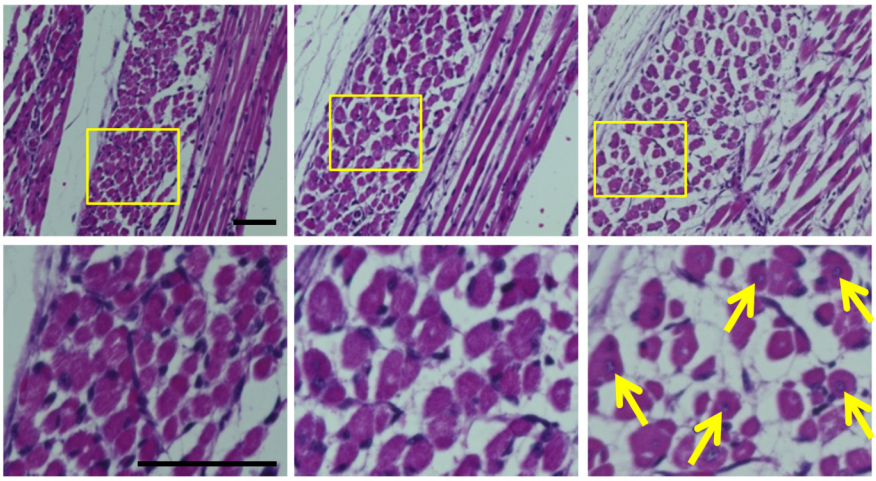


図 2.　*Peg11/Rtl1* の欠失および過剰発現による骨格筋の異常

肋間筋の例：（左）欠失、（中央）正常、（右）過剰発現の標本で、全て固定化処理を施している。肋間筋では肋骨間を直交する 2 つの筋肉束が見える。そのうち筋肉の断面部分（黄色の四角）を拡大したのが下の図である。スケールバーは上図では 1 mm、下図では 50 μm を表す。

これらマウスモデルで検出された異常は、テンプル症候群にみられる筋緊張低下や鏡–緒方症候群患者にみられる呼吸不全による新生児致死、腹直筋乖離の原因になると考えられた。鏡–緒方症候群にはベル型肋骨が特徴的に見られるが、肋骨での *Peg11/Rtl1* 発現は見られない。しかし骨の成長にはそれに張力刺激を与える筋肉の存在が重要であることから、鏡–緒方症候群患者で特徴的に見られるベル型肋骨という形態異常は、肺呼吸に関係する肋間筋の脆弱性が原因となった骨の形成異常である可能性が高いと考えられる［7，8］。

3.　胎児への *antiPeg11/antiRtl1* に含まれる miRNAs の投与による欠失病態発症の確認

モデルマウスの結果が、実際に *Peg11/Rtl1* の欠失および *Peg11/Rtl1* の過剰発現による直接の影響であることを確認するために、妊娠 14.5 日目のマウスの胎児に *AntiPeg11/antiRtl1* 内に含まれる miRNA 配列を基にした siRNA を直接投与してその効果を見た。その結果、胎児の肋間筋（図 3 左）、横隔膜（図 3 右）で筋肉発生が阻害されていることが確認できた。

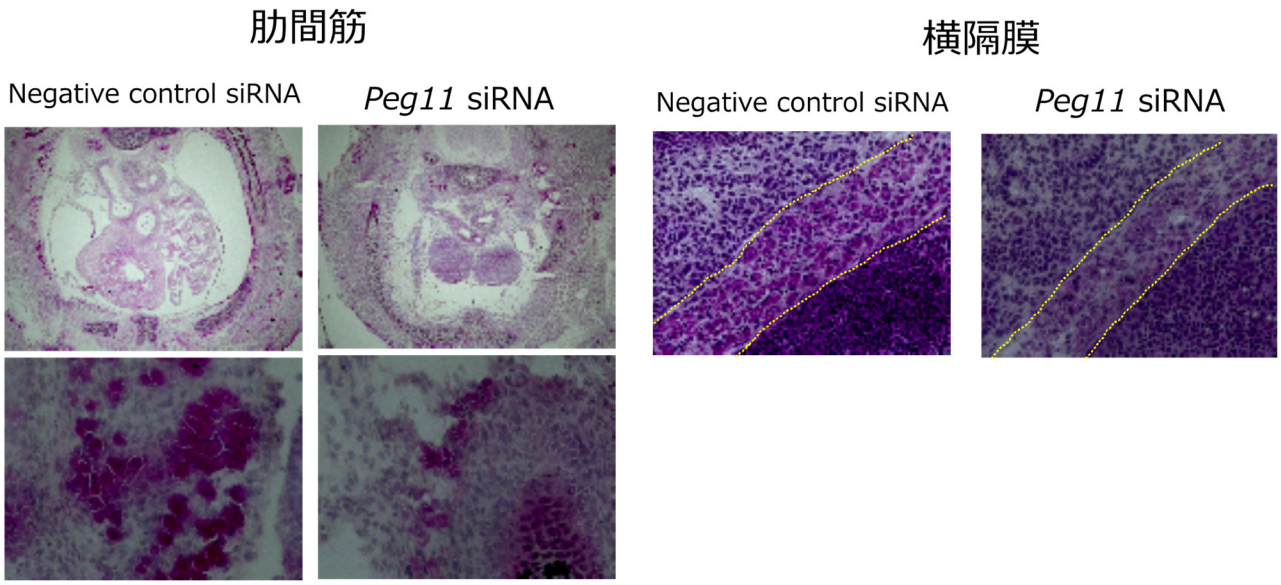


図 3.　*Peg11/Rtl1* に対する siRNA の胎児への直接投与による骨格筋の異常

（左）肋間筋 : 上は胸腔全体の画像、下はその拡大画像。肋骨周辺の筋肉束（赤く染まっている所）が siRNA 投与で減少した。スケールバーは上図では 1 mm、下図では 50 μm を表す。

（右）横隔膜 : 黄色の点線で示した横隔膜の厚さおよび密度が siRNA 投与で減少した。スケールバーは 50 μm を表す。

考　察

鏡–緒方症候群やテンプル症候群の患者にみられる筋肉関連の異常に関しては、長い間、原因が不明であった。このインプリント領域に含まれる*DLK1*が原因遺伝子として研究されてきたが、そのノックアウトマウスや過剰発現モデルマウスにおいて疾患病態を説明できるような結果は出ていない。一方、我々は*PEG11/RTL1*に着目してノックアウト マウスや過剰発現の影響を解析し、これまでこの遺伝子が胎盤の異常を起こすことで胎児期の成長不良や致死性に関係することを明らかにした［5，9］。しかし、*Peg11/Rtl1*の筋肉での発現が確認できないため、筋肉異常との関係にアプローチすることができなかった。しかし、胎盤の影響で胎児期致死は説明できるが、新生児致死の原因までは難しいことから、この時期の各臓器の*Peg11/Rtl1*の発現を再検討した結果、胎児期後期から新生児期までの限られた時期でのみ、*Peg11/Rtl1* mRNAの発現、および抗体を使ったPeg11/Rtl1タンパク質の発現が確認できた。これにより新たに鏡–緒方症候群やテンプル症候群の再検討が可能になった。今回、疾患症状から考えて呼吸に関係する筋肉（肋間筋、横隔膜、腹筋）を標的にして観察したことも成功の大きな理由で、これらの筋肉では著しい筋繊維の異常を確認できたが、四肢の筋肉ではその程度は弱く、コントロールと差を見出すことは難しい。通常、筋肉の解析は四肢の筋肉を用いて行われてきたことも、異常の原因解明が遅れた理由と考えられる。Peg11/Rtl1タンパク質の発現

欠失と過剰のどちらもが異なる筋肉の異常を引き起こすが、これもヒト疾患の症状と一致している。2008年には、*PEG11/RTL1*の過剰発現の度合いが鏡–緒方症候群の重篤度と一致することを報告していたが［6］、ようやくその理由を明らかにできたと考えている［7］。また、*AntiPeg11/antiRtl1*内に含まれるmiRNA配列が*Peg11/Rtl1* mRNAを分解することで、Peg11/Rtl1タンパク質の発現量の制御に利用できることを明らかにできたのは大きな成果である。この疾患は通常、小児科領域の疾患に分類されているが、その原因が明らかになることで胎児期の治療が必要である産婦人科領域疾患と考えるべきであることが明らかになった。投与量、投与時期を詳細に検討することで鏡–緒方症候群の新しい遺伝子治療法として使える道が拓けたと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野准教授の李知英、助教の北澤萌恵、東海大学医学部教授の金児–石野知子である。モデルマウスの筋肉の異常解析には国立精神・神経センター研究所の武田伸一、今村博道両博士、筋肉の衛星細胞の解析には日本医科大学の大石由美子教授、国立精神・神経センター研究所の林晋一郎博士のご協力をいただいた。ここに感謝の意を表します

文　献

1) Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). Eur J Hum Genet. 2015 Nov;23(11):1488-98. doi: 10.1038/ejhg.2015.13. Epub 2015 Feb 18.

2) Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. J Med Genet. 2014 Aug;51(8):495-501. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102396. Epub 2014 Jun 2.

3) Georgiades P, Watkins M, Surani MA, Ferguson-Smith AC. Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. Development 2000; 127: 4719–4728. PMID:11023874

4) Charlier C, Segers K, Wagenaar D, Karim L, Berghmans S, Jaillon O, Shay T, Weissenbach J, Cockett N, Gyapay G, Georges M. Human–Ovine Comparative Sequencing of a 250-kb Imprinted Domain Encompassing the Callipyge (*clpg*) Locus and Identification of Six Imprinted Transcripts: *DLK1*, *DAT*, *GTL2, PEG11*, *antiPEG11*, and *MEG8*. Genome Res 2001; 11: 850–862. PMID:11337479 DOI:10.1101/gr.172701

5) Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. Nat Genet. 2008 Feb;40(2):243-8. doi: 10.1038/ng.2007.51. Epub 2008 Jan 6.

6) Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaka K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. Nat Genet. 2008 Feb;40(2):237-42. doi: 10.1038/ng.2007.56. Epub 2008 Jan 6.

7) Kitazawa M, Hayashi S, Imamura H, Takeda S, Oishi Y, Kaneko-Ishino T and Ishino F. Deficiency and overexpression of Rtl1 in the mouse cause distinct muscle abnormalities related to the Temple and Kagami-Ogata syndromes. Development. 2020 Sep 2;147(21):dev185918. doi: 10.1242/dev.185918

8) Shwartz Y., Farkas Z., Stern T., Aszódi A. and Zelzer E. (2012) Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. Dev Biol. 370, 154–163. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.026. Epub 2012 Aug 2.

9) Kitazawa M, Tamura M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Severe damage to the placental fetal capillary network causes mid to late fetal lethality and reduction of placental size in *Peg11/Rtl1* KO mice. Genes Cells. 2017 Feb;22(2):174-188. doi: 10.1111/gtc.12465. Epub 2017 Jan 23.