

論文内容の要旨

申請者氏名 Chai Muh Chyi

iPS 細胞技術確立により、患者由来の細胞を用いた疾患の病態研究や創薬研究が可能となっている。申請者は小児先天奇形症候群の一つである CHARGE 症候群に着目し、疾患の病態解明を目指した研究を行った。

CHARGE 症候群は網膜の部分欠損 (Coloboma)、心臓奇形 (Heart defect)、後鼻孔閉塞 (Atresia of choanae)、成長障害・発達遅滞 (Retarded growth and development)、外陰部低形成 (Genital abnormalities) そして耳奇形や難聴 (Ear anomalies) を主症状とする小児多発奇形症候群の一つである。申請者は CHARGE 症候群患者の原因遺伝子である *Chromodomain-Helicase-DNA-binding 7 (CHD7)* の中枢神経系における役割をヒト iPS 細胞由来神経上皮細胞を用いて解析した。

まず申請者は *CHD7* をノックダウンすると神経上皮細胞の神経分化能が抑制されることを見出した。また、さらに *CHD7* ノックダウン神経上皮細胞では神経堤前駆細胞のマーカー遺伝子 *SOX9* などの発現上昇が見出され、これらの細胞は平滑筋細胞へと分化することを見出した。この表現型は CHARGE 症候群より樹立された iPS 細胞を利用しても確認された。これらのことから *CHD7* は神経上皮細胞において神経分化能の制御に必須であり、この破綻により神経堤由来細胞へと分化転換することが示唆された。

次に申請者は、クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-seq) とトランスクリプトーム解析を統合することにより神経上皮細胞における *CHD7* の下流因子として *SOX21* と *BRN2* を見出した。*CHD7* がヒストン H3K27ac により特徴付けられる、活性化エンハンサー領域に結合し、*CHD7* 結合領域におけるエンハンサー活性を制御していることを見出した。

最後に *CHD7* ノックダウン神経上皮細胞及び CHARGE 症候群神経上皮細胞に *CHD7* 下流因子である *SOX21* と *BRN2* を導入したところ *CHD7* ノックダウン細胞および CHARGE 症候群由来神経上皮細胞で見出される表現型を回復可能であり、レスキューされた神経上皮細胞は神経分化能を再獲得されることを見出した。

以上のことから *CHD7* は神経上皮細胞においてエンハンサー活性を制御することにより神経上皮細胞としての性質を維持し、神経分化能を保つこと、その実行因子としては *SOX21* や *BRN2* であることが結論付けられた。*CHD7* ノックダウン神経上皮細胞や CHARGE 症候群由来神経上皮細胞は神経堤細胞のマーカー遺伝子の上昇のみならず遺伝子発現プロファイルが神経堤細胞へ類似することから、CHARGE 症候群においては従来知られていた神経堤細胞自体の細胞移動などの質的な異常に加えて、神経堤細胞自体が神経上皮細胞から過剰に産生される量的な異常が生じることが示唆された。本研究は CHARGE 症候群の病態解明の一つとなる知見が得られたと考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Chai Muh Chyi

発生過程において組織特異的な遺伝子群は時間空間的に精妙に制御され、エンハンサー領域はその中心的な役割を担うと考えられている。申請者が取り組んだ CHD7 はクロマチンリモデリング因子と知られ、申請者は近年の次世代シーケンスを用いた解析からエンハンサー領域に集積する因子の一つとして知られている。申請者は shRNA を用いた手法と患者由来 iPS 細胞を用いた手法を組み合わせることにより CHD7 の機能解析を実施した。申請者はまず CHD7 が神経分化に必須の因子であることを示しているが同時に CHD7 が神経上皮細胞において神経堤細胞への分化を抑制していることを見出している。このメカニズム解明のために申請者は遺伝子発現解析とクロマチン免疫沈降シーケンス法を組み合わせることにより CHD7 の標的因子の同定を試みている。この解析により CHD7 の発現が減少する、もしくは機能が欠失すると神経分化に関わる因子の発現低下が見られ、同時に神経堤細胞の機能や性質に関わる遺伝子群の発現上昇が見出されている。申請者はクロマチン免疫沈降シーケンス法では CHD7 の標的遺伝子のみならず、CHD7 の標的領域におけるヒストン修飾状態を解析しており、CHD7 がエンハンサー領域の活性を正に制御する因子として作用することを見出している。CHD7 の発現低下により CHD7 標的領域や神経上皮細胞におけるスーパーエンハンサー領域などの中枢神経系特異的エンハンサー領域でのエンハンサー活性が低下することをレポーター解析や H3K27ac に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法によっても示しており、CHD7 が神経上皮細胞におけるエンハンサー活性制御の中心的な役割を示していることが示唆されている。CHD7 ノックダウンや CHARGE 症候群患者由来神経上皮細胞においては非神経系で活性化するエンハンサー領域が活性化されており、分化誘導過程で観察された表現系とも一致するものであることを申請者は見出している。また CHD7 の下流因子として SOX21 及び BRN2 を同定し、中枢神経系において神経上皮細胞が自身の形質を維持する仕組みの一端を明らかとしている。

申請者は CHD7 に着目することでヒト中枢神経系におけるエンハンサー制御機構を明らかとただけでなく、患者由来の細胞を利用することで CHARGE 症候群の病態の一端を明らかとしている。以上のように、本論文は基礎生物学的に重要な知見を示したのみならず、小児先天奇形症候群の病態解明としても意義あるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。