

令和元年6月6日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01693

研究課題名(和文) アジアのT2欠損症およびHSD10病の遺伝子変異の同定と遺伝子型、表現型の解析

研究課題名(英文) Asian T2 deficiency and HSD10 disease gene mutation identification and genotype-phenotype analysis

研究代表者

青山 友佳 (AOYAMA, Yuka)

中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・講師

研究者番号：40460498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アジアのT2欠損症を疑う症例について責任遺伝子ACAT1の解析を行った。インドの1症例にて、イントロン2内のスプライスアクセプター部位のポリピリミジン領域にc.121-13T>Aのホモ接合性の変異を認めた。患者皮膚線維芽細胞によるシクロヘキシミド存在下培養条件でのcDNA解析ではエクソン3のスキップが認められたため、この変異がT2欠損症を引き起こすかを証明するためminigene splicing実験の確立を行った。解析の結果、エクソン3のスキップを証明し、ACAT1遺伝子イントロン2のc.121-13の位置は、もともとの認識が低いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T2欠損症とHSD10病に関する遺伝子解析は、アジアの国々ではまだ研究が進んでいない国もあり診断が難しい状況にある。本研究では、ACAT1遺伝子のスプライスアクセプター部位のポリピリミジン領域存在するc.121-13T>Aのホモ接合性の変異がT2欠損症を引き起こすことをminigene splicing実験にて明らかにした。これら実験系の確立およびスプライシング異常を引き起こす変異の同定は、T2欠損症だけでなく他疾患においても診断の助けとなるはずである。

研究成果の概要(英文)：In this study, mutational analysis of an Indian T2-deficient patient revealed a homozygous c.121-13T>A mutation located at the polypyrimidine tract of the splice acceptor site of intron 2, and exon 3 skipping was identified by cDNA analysis using cycloheximide. I made the c.121-13T>A, T>C, and T>G mutant constructs followed by making a wild-type minigene construct that included an ACAT1 segment from exon 2 to 4 for a splicing experiment. The minigene splicing experiment demonstrated that exon 3 skipping was induced not only by c.121-13T>A mutation, but also by the other two substitutions. The c.121-13 position of ACAT1 gene appears to be an originally low-recognized site. In the routine diagnostic practice, in silico tools can predict the potential consequences of mutations on splicing, but their results are not so reliable. The minigene splicing experiment remains the most reliable method to unravel splicing abnormalities.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：先天代謝異常症 ケトン体代謝 -ケトチオラーゼ ACAT1 スプライシング異常 minigene splice実験 HSD10病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケトン体代謝異常症には、HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、サクシニル CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ (SCOT) 欠損症、 β -ケトチオラーゼ (T2) 欠損症が挙げられる。これらの疾患は新生児期の代謝不全や乳幼児期の突然死、Reye 様症候群といった急性脳様発作などを引き起こし重篤な後遺症を来しうる疾患である。しかし、早期の診断そしてケトン体代謝が血糖維持に重要な幼少期の適切な管理があれば重篤な発作を予防して正常発達ができることから早期診断と発作予防が重要である。確定診断にはタンデムマス分析、尿の有機酸分析、酵素診断、遺伝子解析での変異確認が必要であるが、診断が見つからない患者もいる。

T2 欠損症は新生児マススクリーニングの 2 次対象疾患に指定されている。本疾患ではケトン体の利用が障害されるため、ケトン体の産生が促進されるような空腹時、感染やそれに伴う発熱において、ケトン体が著しく体内に蓄積しケトアシドーシス発作をきたす。これまで、T2 欠損症についての解析を進めてきたなかで、症状は認められているが酵素活性は正常、遺伝子解析で変異がない症例にて 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (HSD10) 病を疑い責任遺伝子 HSD17B10 を解析した結果、本邦初の乳幼児期発症の HSD10 病を明らかにしてきた。これらの疾患は日本だけでなく海外でも診断法の確立や症例情報の蓄積が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ケトン体代謝異常症に関する研究を進めてきたなかで、ゲノム解析で片方の変異は確認されているものの、もう一方のアリルでの変異が確認されていない症例が認められている。このような症例ではもう一方のアリルでの広範囲の欠失や重複が考えられるため、そのような変異を明らかにできる Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法を確立してきた。T2 欠損症において、国内患者だけでなく海外からの変異が同定されない症例の解析にも取り組んできたが、本邦とは異なる変異、未だ明らかにならない症例が存在している。

T2 欠損症は稀な疾患であり、また、もう一方のアリルでの変異が見つからない症例の遺伝子変異の背景は複雑である。HSD10 病は世界的にも症例数が少ないため、本疾患を疑い HSD17B10 遺伝子の解析まで実施するまでには至らないケースの方が多いと考えられる。また、アジア諸国では研究が進んでおらず診断が難しい状況にある。HSD10 病についての情報はまだ少なく、変異の位置によっては重症化することから、これら疾患の変異を明らかにすることは国内だけでなく海外においても重要である。本研究では、アジアにおいて T2 欠損症を疑われた症例を中心に解析を実施し、診断が見つからない患者に対して HSD10 病の遺伝子解析を進め、これら疾患の病態解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

T2 欠損症を疑うアジアの症例について責任遺伝子 ACAT1 の解析を実施し、これらの解析にて、T2 欠損症の変異が明らかにならない症例においては、HSD10 病の責任遺伝子 HSD17B10 の解析を進める。T2 欠損症と HSD10 病の遺伝子解析の結果をもとに、遺伝子変異とその症状についてまとめる。T2 欠損症において片方の変異が同定され、もう一方のアリルでの変異が確認されない症例を認めただけには、T2 欠損症の責任遺伝子 ACAT1 に確立した MLPA 法を用いて解析を行い、疾患に関わるエクソンのコピー数解析を実施する。エクソンの大きな欠失や重複が認められた場合には、その変異の位置を詳細な遺伝子解析にて同定する。

4. 研究成果

日本、インド、ベトナム、リビアの T2 欠損症を疑う症例にて遺伝子解析を行った。これら症例の解析では ACAT1 遺伝子での変異が同定され、HSD10 病を疑う症例はなかった。しかし、インドの 1 症例にて、ACAT1 遺伝子のエクソン内に遺伝子変異が確認されず、イントロン 2 内のスプライスアクセプター部位のポリピリミジン領域に c.121-13T>A のホモ接合性の変異を認めた。この変異が T2 欠損症を引き起こす可能性が考えられたため、詳細な解析を進めた。

(1) 酵素活性とイムノブロット解析

c.121-13T>A のホモ接合性の変異を持つ本症例が T2 欠損症を引き起こすかを明らかにするために、患者皮膚線維芽細胞を用いて T2 酵素活性測定およびイムノブロット解析を行った。その結果、T2 酵素活性は存在せずまたイムノブロットにおいても β -ケトチオラーゼのタンパクは検出されなかったことから T2 欠損症と同定した。

(2) シクロヘキシミド存在下・非存在下培養条件での cDNA 解析

シクロヘキシミドを添加することで、不安定なメッセンジャー RNA が壊される nonsense-mediated mRNA decay を阻害して、変異を持つメッセンジャー RNA を安定化させる。コントロールと患者線維芽細胞をシクロヘキシミド存在下、非存在下で、37 度 5 時間培養した後、RNA を抽出、cDNA 合成を行った。患者では、シクロヘキシミド存在下での cDNA で、コントロールと比べやや短い cDNA が増幅された。この cDNA を解析したところエクソン 3 のスキップが確認された。

(3) minigene splicing 実験の確立

c.121-13T>A のホモ接合性の変異がエクソン 3 のスキップを引き起こすかを in vitro での実験にて証明するため、minigene splicing 実験の確立を行った。まず、wild-type のエクソン 2 から 4 の配列を pCAGGS ベクターに導入し minigene splicing construct とした。次に、患者の

変異である c.121-13T>A construct および T>G、T>C construct を作成し、これらの construct を SV40 化 T2 deficient 皮膚繊維芽細胞に導入し培養後、RNA を抽出、cDNA 合成を行いエクソン 3 のスキップについて確認した。この結果、患者と同じ変異である T>A ではエクソン 3 のスキップを生じた。また、興味深いことに、T>G も患者変異と同じスキップを、T>C もそのほとんどがスキップを生じた。さらに、wild-type においてもエクソン 3 のスキップが認められたことから、ACAT1 遺伝子イントロン 2 の c.121-13 の位置は、もともとの認識が低いことが考えられた。スプライスアクセプター部位の変異がエクソンのスキップを引き起こすかを予測するいくつかの in silico tool が開発されている。今回の minigene splicing 実験結果を踏まえ、患者の c.121-13T>A 変異および T>G、T>C 変異について Shapiro and Senapathy score、Analyzer Splice Tool、Human Splicing Finder を用いて解析を行った。しかしながら、これら変異の in silico tool を用いたスプライシングの予測は必ずしも minigene splicing 実験の結果とは一致しなかった。In silico tool の解析精度はまだ低く、本疾患が持つようなスプライスアクセプター部位のポリピリミジン領域の変異は見逃されやすいため、診断には minigene splicing 実験を用いた変異の確認が有用であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1) Fukao T, Sasai H, [Aoyama Y](#), Otsuka H, Ago Y, Matsumoto H, Abdelkreem E, Recent advances in understanding beta-ketothiolase (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase, T2) deficiency. *J Hum Genet.* 2019 64(2):99-111. doi: 10.1038/s10038-018-0524-x. 査読有り
- 2) Nakama M, Otsuka H, Ago Y, Sasai H, Abdelkreem E, [Aoyama Y](#), Fukao T, Intronic antisense Alu elements have a negative splicing effect on the inclusion of adjacent downstream exons. *Gene.* 2018 20;664:84-89. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.064. 査読有り
- 3) Sasai H, [Aoyama Y](#), Otsuka H, Abdelkreem E, Naiki Y, Kubota M, Sekine Y, Itoh M, Nakama M, Ohnishi H, Fujiki R, Ohara O, Fukao T, Heterozygous carriers of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency can develop severe ketoacidosis. *J Inherit Metab Dis.* 2017 40(6):845-852. doi: 10.1007/s10545-017-0065-z. 査読有り
- 4) [Aoyama Y](#), Sasai H, Abdelkreem E, Otsuka H, Nakama M, Kumar S, Aroor S, Shukla A, Fukao T, A novel mutation (c.121-13T>A) in the polypyrimidine tract of the splice acceptor site of intron 2 causes exon 3 skipping in mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Mol Med Rep.* 2016 15(6):3879-3884. doi: 10.3892/mmr.2017.6434. 査読有り
- 5) Sasai H, [Aoyama Y](#), Otsuka H, Abdelkreem E, Nakama M, Hori T, Ohnishi H, Turner L, Fukao T, Single-nucleotide substitution T to A in the polypyrimidine stretch at the splice acceptor site of intron 9 causes exon 10 skipping in the ACAT1 gene. *Mol Genet Genomic Med.* 2017 5(2):177-184. doi: 10.1002/mgg3.275. 査読有り
- 6) Abdelkreem E, Alobaidy H, [Aoyama Y](#), Mahmoud S, El Aal MA, Fukao T, Two Libyan siblings with beta-ketothiolase deficiency: A case report and review of literature. *Egyptian Journal of Medical Human.* 2017 18:199-203. doi: 10.1016/j.ejmhg.2016.11.001. 査読有り
- 7) Nguyen KN, Abdelkreem E, Colombo R, Hasegawa Y, Can NT, Bui TP, Le HT, Tran MT, Nguyen HT, Trinh HT, [Aoyama Y](#), Sasai H, Yamaguchi S, Fukao T, Vu DC, Characterization and outcome of 41 patients with beta-ketothiolase deficiency: 10 years' experience of a medical center in northern Vietnam. *J Inherit Metab Dis.* 2017 40(3):395-401. doi: 10.1007/s10545-017-0026-6. 査読有り
- 8) Abdelkreem E, Akella RR, Dave U, Sane S, Otsuka H, Sasai H, [Aoyama Y](#), Nakama M, Ohnishi H, Mahmoud S, Abd El Aal M, Fukao T, Clinical and Mutational Characterizations of Ten Indian Patients with Beta-Ketothiolase Deficiency. *JIMD reports.* 2016 35:59-65. doi: 10.1007/8904_2016_26. 査読有り
- 9) Abdelkreem E, Otsuka H, Sasai H, [Aoyama Y](#), Hori T, Abd El Aal M, Mahmoud S, Fukao T, Beta-Ketothiolase Deficiency: Resolving Challenges in Diagnosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening.* 2016 4: 1-9. doi: org/10.1177/2326409816636644. 査読有り
- 10) Otsuka H, Sasai H, Nakama M, [Aoyama Y](#), Abdelkreem E, Ohnishi H, Konstantopoulou V, Sass JO, Fukao T, Exon 10 skipping in ACAT1 caused by a novel c.949G>A mutation located at an exonic splice enhancer site. *Molecular medicine rep.* 2016 14: 4906-4910. doi: 10.3892/mmr.2016.5819. 査読有り
- 11) Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, [Aoyama Y](#), Kaneko K, Japanese Male Siblings with 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency (HSD10 Disease) Without Neurological Regression. *JIMD reports.* 2016 32: 81-85. doi: 10.1007/8904_2016_570. 査読有り
- 12) [Aoyama Y](#), Yamamoto T, Sakaguchi N, Ishige M, Tanaka T, Ichihara T, Ohara K, Kouzan H, Kinoshita Y, Fukao T, Application of multiplex ligation-dependent probe amplification, and identification of a heterozygous Alu-associated deletion and a uniparental disomy of chromosome 1 in two patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency.

〔学会発表〕(計 25 件)

- 1) Sasai H, Ohnishi H, Akagawa S, Akiba K, Hasegawa Y, Kobayashi M, Otsuka H, Aoyama Y, Ago Y, Fukao T, Functional analysis of mutant recombinant HSD17B10 proteins using an E. Coli expression system. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2018
- 2) 笹井英雄、大西秀典、赤川翔平、秋葉和壽、長谷川行洋、小林正久、大塚博樹、青山友佳、深尾敏幸、リコンビナント HSD17B10 タンパクを用いた HSD10 病の病態解析. 第 59 回日本先天代謝異常学会 2017
- 3) Abdelkreem E, Akella RR, Dave U, Sane S, Otsuka H, Sasai H, Aoyama Y, Nakama M, Ohnishi H, Mahmoud S, Abd El Aal M, Fukao T, Clinical and mutational characterizations of 10 Indian patients with beta-ketothiolase deficiency. 第 58 回日本先天代謝異常学会 2016
- 4) Fukao T, Sasai H, Otsuka H, Aoyama Y, Elsayed A, Nakama M, Hori T, Ohnishi H, Turner L, Sweetman L, An c. IVS9-9 T > A substitution identified in beta-ketothiolase deficient patients results in exon 10 skipping in most transcripts of ACAT1 gene. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2016
- 5) 青山友佳、笹井英雄、大塚博樹、Elsayed Abdelkreem、深尾敏幸、ACAT1 遺伝子イントロン 2 の c.121-13T > A によるエクソン 3 スキップとスプライシングの予測. 第 43 回日本マススクリーニング学会 2016
- 6) 青山友佳、笹井英雄、大塚博樹、Sandeep Kumar, Anju Sukla, Shriki ran Aroor, Suneel Mundkur、深尾敏幸、ACAT1 遺伝子のイントロン 2 内の c.121-13T>A 変異によるエクソン 3 のスキップ. 第 57 回日本先天代謝異常学会 2015
- 7) Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2015

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。