

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21524

研究課題名(和文)ジストロフィン遺伝子微小変異症例の解析によるスプライシング促進配列の同定

研究課題名(英文) Identification of exonic splicing enhancer sequences by analysis of dystrophin gene micromutation

研究代表者

下村 英毅 (Shimomura, Hideki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30441273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行性筋ジストロフィーは遺伝子異常により、筋を構成するタンパク質が減少あるいは欠損することによって発症する。本研究ではMLPAで欠損・重複変異が認められなかった筋ジストロフィーの症例で、欠失や数塩基の点変異を同定し、これらのスプライシングタイプを解析した。その結果、微小な変異がスプライシングに与える影響を明らかにすることができた。一方で、ウルリッヒ型筋ジストロフィーにおいて、近接した2か所の遺伝子異常を同定し、それがスプライシングに変化を起こして2種類のメッセンジャーRNAを産生することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては進行性筋ジストロフィーにおいてスプライシングに影響を及ぼす微小変異を明らかにした。今回の解析ではエクソン内配列の変異によりスプライシング異常を生じた症例は認められなかったため、ESEの同定は困難であったが、潜在的スプライシングサイトの活性化に関する知見が得られた。ESE制御とともに、潜在的スプライシングサイト制御による治療法の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Progressive muscular dystrophy mainly develops due to genetic abnormality which result in decrease or lack muscle component. In cases of muscular dystrophy for which deletion / duplication mutations were not identified by the MLPA, we identified deletion or point mutations with a small number of nucleotides using direct nucleotide sequence or next-generation sequencer, and analyzed the splicing type in these cases. As a result, we were able to clarify the effect of small mutations on splicing. In analysis of the type 6 collagen gene, we found that two types of mRNA were produced by having two closely mutations on the same allele.

研究分野：小児神経学

キーワード：筋ジストロフィー スプライシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィン遺伝子変異により発症する進行性の筋萎縮症で 10 歳前後で歩行不能となり、10~20 歳台で心不全・呼吸不全を呈する重篤な疾患であるが、根治治療は確立されていない。本疾患に対し、エクソン内のスプライシング促進配列 (Exonic splicing enhancer: ESE) に対する AS-oligo (AS-oligo) によりエクソンスキッピングを誘導し遺伝情報を修正する治療法の有効性が示され、最も可能性の高い治療法として注目されている。すなわち、DMD の 60% の症例は 1 ないし数エクソンの欠失を有しており、欠失によりアミノ酸読み取り枠のずれが生じているため (欠失領域の塩基数が 3 の倍数でない)、ジストロフィンが産生されない。本治療はこのような症例に対し欠失領域に隣接するエクソンのスキッピングを誘導することにより、アミノ酸読み取り枠のずれを修正し、ジストロフィン蛋白の産生を誘導するものであり、申請者らは現在、エクソン 45 のスキッピングを誘導する治療法の検討を進めている。しかし、本治療は各症例の変異部位に応じたオーダーメイド分子治療であるため、より多くの症例に対し本治療を適応するには、他のエクソンのスキッピングを誘導する AS-oligo の開発が不可欠である。

一方、ジストロフィン遺伝子内に点変異・挿入欠失変異などの微小変異を有する症例において、変異エクソンのスキッピングが生じる症例が経験される。このような症例は、微小変異により ESE が破壊されたためにエクソンスキッピングが生じたものと考えられる。

申請者はジストロフィン遺伝子・メッセンジャー RNA の解析を行う過程において、このような症例のスプライシングの解析を行うことにより、ESE を同定することが可能であり、そのことにより、エクソンスキッピングを誘導し得る新たな AS-oligo を開発することに着想した。

本研究は DMD 症例で自然に生じているエクソンスキッピングの解析から、エクソンスキッピングを誘導し得る新たな AS-oligo を見出すものである。その成果は、現在臨床応用を進めているエクソンスキッピング誘導治療の適応範囲をさらに拡大するものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、ジストロフィン遺伝子の微小変異による DMD/Becker 型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy: BMD) 症例の筋組織あるいはリンパ球における mRNA の解析を行うことにより、スプライシングに影響を及ぼす微小変異を明らかにする。また、他の筋ジストロフィーにおいても、微小変異によるスプライシングへの影響を明らかにする。さらに、エクソンスキッピングを誘導し得る AS-oligo を同定するために、微小変異をカバーする AS-oligo をデザインし、培養細胞・モデルマウスを用いて、その有効性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### ・ DMD/BMD 症例の MLPA 法によるジストロフィン遺伝子解析

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法により、エクソン単位の欠失・重複変異の解析を行った。本法はすでに保険収載されており、検査会社への外注で実施した。申請者の研究室責任者らの検討では、MLPA 法により 7 割の症例の遺伝子変異の同定が可能であることが明らかにされている (Takeshima Y. et al. J Hum Genet. 2010; 55: 379-88.)。

#### ・ DMD/BMD 症例のジストロフィン遺伝子微小変異の解析

MLPA 法によって欠失・重複変異が同定されなかった症例に対し、ダイレクトシーケンシング法あるいは次世代シーケンサーにより点変異、1 ないし数塩基の欠失・重複変異などの微小変異の同定を行った。従来、ダイレクトシーケンシング法で行っていたが、ジストロフィン遺伝子が 2.4Mb に及ぶ巨大な遺伝子であるため、次世代シーケンサーによる解析を導入し、微小変異解析の効率化を図った。

#### ・ 肢帯型筋ジストロフィーにおける遺伝子解析

DMD/BMD 以外の筋ジストロフィー症例においても、ゲノム変異のスプライシングに及ぼす影響を明らかにするため、解析を行った。ゲノム変異の同定は次世代シーケンサー法およびサンガー法によって行った。

#### ・ ジストロフィン遺伝子および肢帯型筋ジストロフィー責任遺伝子 mRNA の解析

微小変異による DMD/BMD 症例および肢帯型筋ジストロフィー症例の筋生検組織あるいはリンパ球より RNA を抽出した。RT-PCR 法により mRNA の解析を行い、エクソンスキッピングなどのスプライシング異常の検討を行った。

#### ・ スプライシングの解析

DMD/BMD 症例のジストロフィン遺伝子のゲノム・mRNA の解析を行い、mRNA でみられたスプライシング型より、スプライシングに影響を及ぼす塩基配列の検討を行った。すなわち、微小変異によりエクソンスキッピング誘導が見られた場合、その微小変異周辺の塩基配列

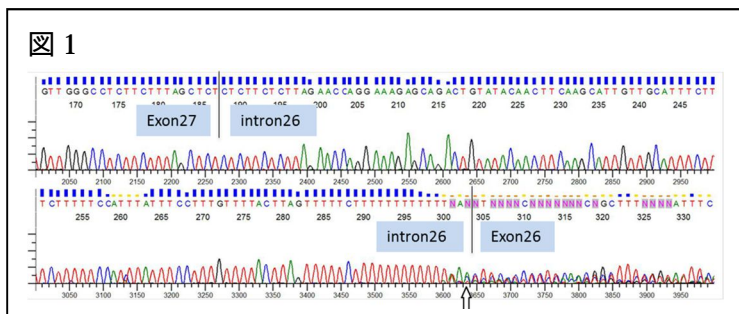
が ESE として作用しており、微小変異によって、その ESE が分断されたと考えられる。

#### 4. 研究成果

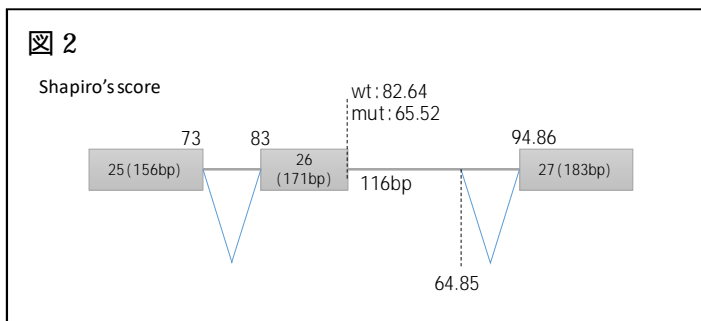
DMD/BMD および Ullrich 型先天性筋ジストロフィー (UCMD) において、スプライシングに影響を及ぼすゲノム変異を同定した。今回同定した変異は、いずれもエクソン・イントロン境界部の変異であり、エクソン内の微小変異によりスプライシング異常を生じた症例はみられなかった。解析症例の中から、代表的な症例を示す。

1 例目は運動の稚拙さから精査を行った 4 歳男児である。一般的に DMD の遺伝子検査で行われる MLPA 法で異常を認めなかったが、臨床症状から DMD を強く疑い次世代シーケンサーでの解析を行ったところとスプライスサイト変異 c.3603+1G>T (intron26) を認めため、RNA の解析を行った。

その結果、図 1 のようにエクソン 26 と 27 の間にイントロン 26 の一部が挿入されていることがわかった。in silico 解析ではイントロン 26 始めのスプライスドナーサイトが変異にすることによりイントロン 26 内の潜在性スプライスドナーサイトが活性化することが本症例において DMD を発症した原因であることが解明された。



この症例では、活性化された潜在性スプライスドナーサイトに対して AS-oligo 作成することでエクソン 26 のスキップを誘導することが示唆された (図 2)。エクソン 26 はインフレームであるため、そのことで DMD の治療に結び付くと考えられた。

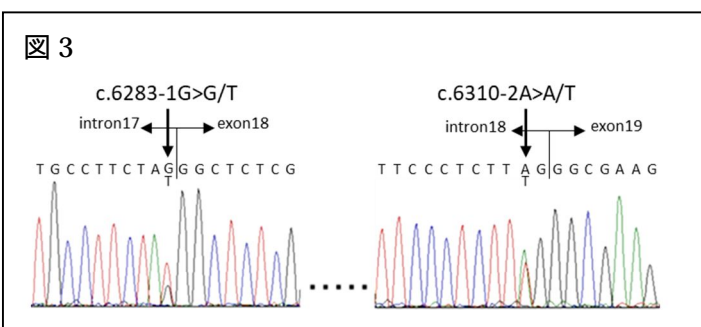


次に UCMD の症例を示す (Shimomura H. et al. Hum Genome Var 2019; 26: 21.)。

UCMD と Bethlem ミオパチーは共に 型コラーゲンの異常によるミオパチーで、 型コラーゲン関連ミオパチーとして連続したスペクトラムと考えられている。UCMD は常染色体劣性遺伝形式の重症型で、Bethlem ミオパチーは常染色体優性遺伝形式の軽症型と考えられていたが、近年、両者とも従来と異なる遺伝形式の症例が報告されるようになり、遺伝形式を明確に規定することが難しくなっている。

対象となった症例は幼少期に運動発達の遅れを認めて、筋生検で UCMD の診断に至った。次世代シーケンサーによる遺伝子解析で、COL6A3 遺伝子に 2 か所の変異が存在することがわかった (図 3)。この時点では複合ヘテロ変異による常染色体劣性遺伝形式であると考えられた。

さらなる解析を進めるために、生検筋組織から抽出したメッセンジャー RNA を解析したところ 3 種類のメッセンジャー RNA が検出された。ダイレクトシーケンス法で確認したところ、1 つは正常なメッセンジャー RNA で残りの 2 つが異常なメッセンジャー RNA であった (図 4)。



この結果は複合ヘテロ変異では説明が難しいため、ゲノムDNAのサブクローニングを行ったところ複合ヘテロ変異ではなく同一アレル上に137塩基しか離れていない近接した2種類の変異を認めることが明らかになった(図5)。

これらの2つの変異がスプライシングにどのように影響を与えたかについて in silico解析を行った。2か所の変異はともにスプライスサイトに存在していたため、イントロン18内の2か所の潜在性スプライスサイトが活性化されたと考えられた(図6)。

本疾患における遺伝子型と表現型の関連が明らかになると、潜在的スプライシングをシフトする治療の可能性も考えられる。

今回の解析ではエクソン内配列の変異によりスプライシング異常を生じた症例は認められなかったため、ESEの同定は困難であったが、潜在的スプライシングサイトの活性化に関する知見が得られた。ESE制御とともに、潜在的スプライシングサイト制御による治療法の可能性が考えられた。

図4

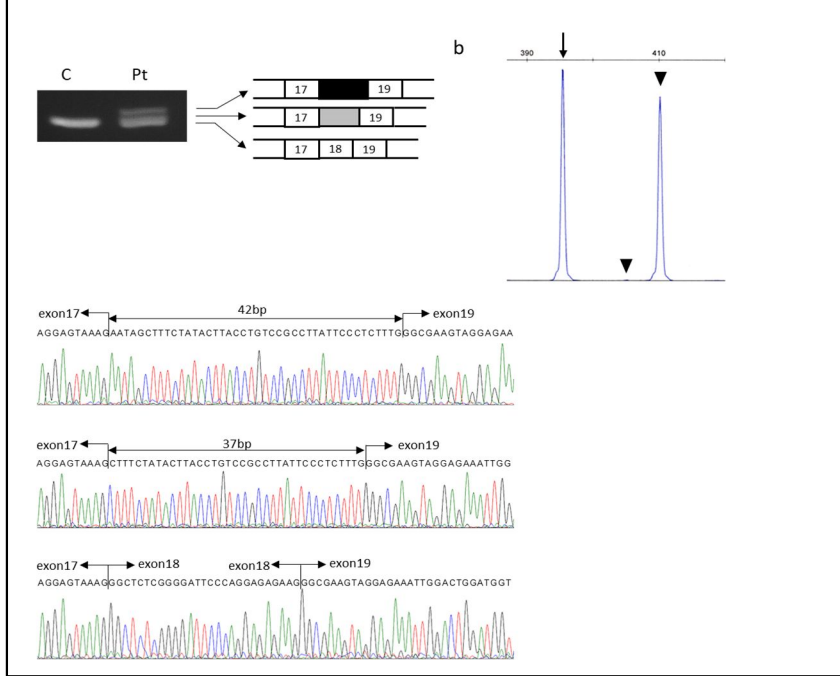


図5

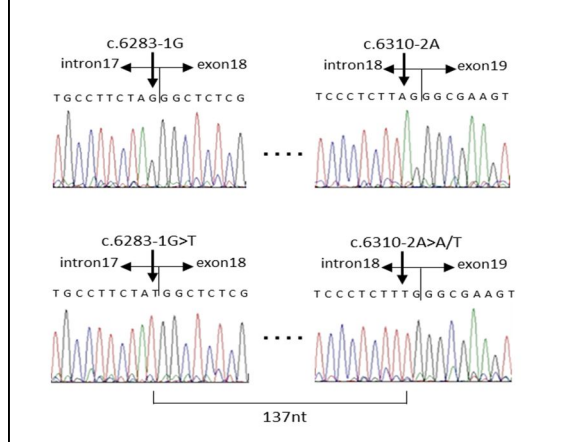
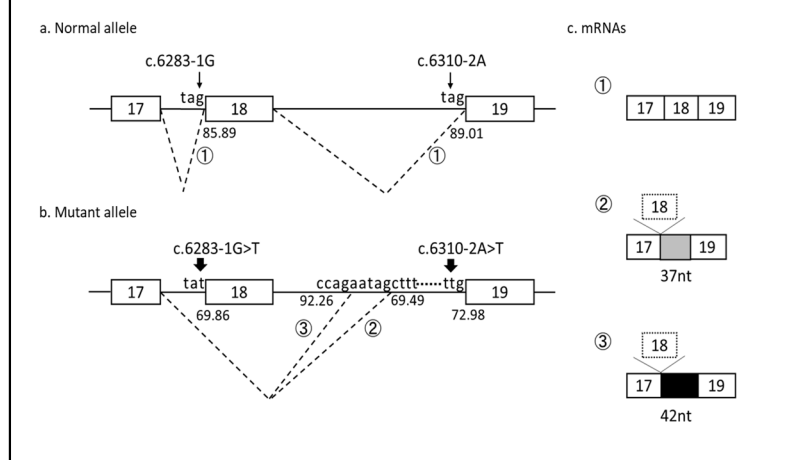


図6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Shimomura, Tomoko Lee, Yasuhiko Tanaka, Hiroyuki Awano, Kyoko Itoh, Ichizo Nishino, Yasuhiro Takeshima	4. 巻 26
2. 論文標題 Two Closely Spaced Mutations in cis Result in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human genome variation.	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-019-0052-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下村 英毅, 李 知子, 松本 真明, 粟野 宏之, 伊東 恭子, 西野 一三, 竹島 泰弘.
2. 発表標題 片側アレルに近接した2つの遺伝子異常を認めた常染色体優性Ullrich型先天性筋ジストロフィーの1例
3. 学会等名 第59回日本小児神経学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 李 知子, 下村 英毅, 粟野 宏之, 飯島 一誠, 荻 寛志, 伊東 恭子, 松尾 雅文, 竹島 泰弘.
2. 発表標題 Duchenne型筋ジストロフィーに対するENAアンチセンスオリゴヌクレオチド(A085)投与の効果
3. 学会等名 第59回日本小児神経学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----