

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16528

研究課題名（和文）結節性硬化症におけるTSC1/2の新規変異同定とその機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of novel TSC1/2 mutations found in TSC patients

研究代表者

研 澄仁 (TOGI, Sumihito)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：40709391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：今回我々は、結節性硬化症（Tuberous Sclerosis Complex：TSC）の原因遺伝子であるTSC1/2の網羅的スプライシング解析法を確立し、従来の遺伝子検査では診断のつかなかった患者から新規のスプライシング異常を多数発見した。さらにその新規異常スプライシング産物の機能解析のために、患者由来iPS細胞を樹立した。本研究で確立したスプライシング解析法は、ロングPCRによるTSC1/2の全長cDNA増幅と次世代シーケンサー(NGS)を組み合わせた解析法で、従来のスプライシング解析に比べて安価で高感度な解析法であり、2021年J Mol Diagnにて報告している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果からTSC1/2のスプライシングバリエーションには組織間や個体間で大きな多様性があり、それがTSC遺伝子の機能並びに疾患の重症度と深く結びついている可能性を見いだした。結節性硬化症は全身性の過誤腫病変を主とする遺伝性疾患であるが、その症状の現れ方や重症度には大きな個人差がある。一般的に遺伝子の機能はその発現量とタンパクの機能によって評価されるが、どのようなスプライシングバリエーションがどのような割合で発現しているかも遺伝子機能を見る上で重要な情報となる。iPS細胞を用いた機能解析により、TSC1/2の新しい機能制御機構の解析、ならびに疾患の重症度や予後の予測に寄与できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The genetic diagnosis of tuberous sclerosis complex is difficult because of its broad spectrum of mutations. In addition to point mutations in coding regions, intragenic or chromosomal-level large deletions, deep intronic splicing mutations, and mosaic mutations represent a significant proportion of the mutations. In this study, we focused on the splicing mutations, that has been missed by conventional genetic testing covering only genomic coding region of TSC1/2. And, we established the new genetic testing method, long-range PCR-based NGS analyses (CoLAS), that can be applied to detect various types of mutations simultaneously, using a single platform and multiplex PCR to reduce the experimental effort (J Mol Diagn. 2021).

Furthermore, we established TSC-patient derived iPS-cells for the functional analysis of the novel alternative splicing variants of TSC1/2 identified in TSC-patients. This is thought to be useful for understanding the molecular mechanism of developing TSC disease.

研究分野：臨床遺伝

キーワード：TSC スプライシング 遺伝子検査 iPS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex : TSC) は全身の様々な臓器に過誤腫と呼ばれる良性腫瘍が形成される常染色体優性遺伝性疾患である。その原因遺伝子として知られる TSC1 (hamartin) および TSC2 (tuberin) は、脳、腎臓、肺など多くの臓器に発現しており、通常複合体を形成して mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性を抑制的に制御している。しかし TSC1/2 に変異を起こしその機能が損なわれると、mTOR の異常活性化により全身で様々な症状を引き起こすと考えられている。

日本において、TSC は指定難病として登録されており、遺伝子診断により TSC1/2 のどちらかに病的な変異が認められた場合、確定診断となる。しかし現在の TSC 遺伝子診断には2つの問題がある。1つ目は検査感度の限界である。現在のところ臨床的に明らかに TSC の症状を持つ患者であっても、80%程度の患者でしか TSC の変異を検出できない。これは現在の遺伝子検査では遺伝子の限られた領域 (主に Exon) しか検査しないため、それ以外の領域 (Intron など) の変異は検出できないためである。また技術的な問題として低頻度モザイクの変異を検出できないことも挙げられる。2つ目は、検出した変異の評価システムが不完全であることである。現在 TSC1/2 に変異が見つかった場合、その変異が病的な変異であるかどうかの評価は、その変異が過去に同じ症例で報告があるかどうかと、コンピューター予測に頼る場合がほとんどである。そのため見つかった変異により TSC1/2 の機能がどのような影響を受け、その結果生体システムにどのような影響を及ぼすかといったメカニズムに関してはほとんど研究がなされておらず、いまだ発症メカニズムやヒト生体内における TSC1/2 の機能の多くは不明なままとなっている。したがって、遺伝子検査により見つかった変異の詳細な機能解析は、より正確な遺伝子診断と治療法の選択に寄与するだけでなく、TSC1/2 のヒト生体内における機能解析にも重要な意味を持つと考えられる。

### 2. 研究の目的

現在我々の研究室は TSC の遺伝子検査を臨床検査として実施し、その結果を患者や担当医師へと提供している国内唯一の施設である。全国から年間数十件の依頼があり、その中でこれまでに報告のない新規の変異が年間数例見つかっている。我々の目的は、新たに見つかった変異の機能解析を行うことで、その変異の生物学的意義を明らかにし、実際の診断と治療に役立てることである。さらにその解析を通じてこれまでまだ明らかとなっていない TSC1/2 の機能や細胞内シグナル制御機構を解明に役立てることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) TSC1/2 遺伝子変異の検出

我々の研究室ではより高感度で安価な遺伝子変異スクリーニング法として CHIPS (CEL nuclease mediated Heteroduplex Incision with Polyacrylamide electrophoresis and Silver staining) を開発した。この方法では、PCR で増幅した DNA 産物の片方のアレルに変異がある場合、野生型と変異型からなる二本鎖 (Hetero duplex) を形成させ、そのミスマッチ部位 (変異部位) を特異的に認識する酵素 (CEL nuclease) により切断し、短くなった DNA 断片を電気泳動、銀染色により検出する。この方法により例え 10%以下の低頻度モザイク変異であってもほぼ見逃すことなく変異検出が可能となった。しかし、CHIPS では Exon とその近傍の Intron しか調べないため、Intron の内部深くに変異があった場合検出することができない。そこで我々は 10kb-20kb の長さで TSC1/2 の遺伝子領域を区切り、それぞれを Long PCR により増幅し、そこからライブラリーを作成して NGS により網羅的にシーケンスを行うことにした。これによりこれまで調べられて来なかった、Intron の奥深くやプロモーター領域などほぼすべての領域の変異の検出を試みる。

本研究では TSC1/2 の遺伝子変異の検出は以下の2段階で行う。

CHIPS スクリーニング   ダイレクトシーケンス (サンガー)  
Long PCR   NGS による解析

まず Exon ならびに Exon 近傍の Intron の変異については、CHIPS 法によるスクリーニングを行い、その後サンガー法で変異を同定する。この方法で何も病的可能性のある変異を見つけれなかった場合、次に Intron も全て含むような Long PCR を行い、そこからライブラリーを作り、NGS による解析をおこなう。そして Intron 内部で病的変異と疑われる変異を見つけた場合は、スプライシングの異常を考え、RT-PCR 法もしくは RNA-Seq により異常スプライシングを探索する。

#### (2) TSC1/2 の新規変異の機能解析

検出された変異の多くは、過去のデータベースとコンピューター予測に基づき病原性があるか

どうか判断されるだけで、その変異により TSC1/2 の機能が実際にどのように影響を受けているかまでは調べられていない。そこで我々が検出した変異について、実際にそれらの変異遺伝子を細胞に発現させ、変異遺伝子の機能を mTOR シグナルの活性化を指標に検討し、変異の病原性を正確に評価するシステムを構築するとともに、TSC1/2 のより詳細な機能解析を試みる。mTOR はセリン・スレオニンキナーゼであり、mTORC1 あるいは mTORC2 と呼ばれる複合体を介し、下流にシグナルを伝える。特に mTORC1 経路はインスリンやアミノ酸により活性化されることが知られ、下流の S6K1 や 4EBP1 のリン酸化を介し、細胞の大きさや生存、オートファジーなどを制御している。また mTORC1 の活性化には低分子量 G タンパク質 Rheb が関与しており、TSC1/2 は複合体を形成し、TSC2 の C 末端側に存在する GAP (GTPase activating protein) ドメインを介して GTP 結合型 Rheb (活性化型) を GDP 結合型 Rheb (不活性化型) にすることで mTOR シグナルを負に制御している。そこで mTOR シグナル活性化に対する TSC1/2 の機能を評価するために以下の 3 点について、野生型もしくは変異型の TSC1/2 を強制発現させた細胞株を用い分析を行う。用いる細胞株は HEK293T、HeLa、Neuro2A (マウス神経芽細胞腫) MEF 細胞の他、数種類の細胞株で条件検討を行い、最適なものの中から 2, 3 種類に絞り評価する。条件検討の際は、すでに報告されている TSC1 (R22W)、TSC2 (D1601K) などポジティブコントロールとして用いる。

TSC1/2 複合体形成      共免疫沈降法  
 Rheb の活性化      GTP-Agarose Pull-Down Assay  
 S6K1 ならびに 4EBP1 のリン酸化      Western blot

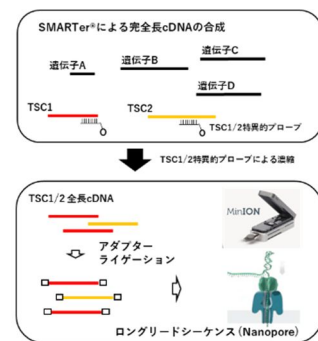
我々はこれまでの遺伝子検査からすでいくつかの新規の変異を同定に成功している。その中の一つが TSC1 (H181P) である。上記解析モデルの条件検討が終わり次第、まずはこの TSC1 (H181P) が野生型の TSC1 と比べ、機能的に差があるかどうかを上記 3 点の項目を指標に検討する。また我々はいくつかの Intron 内部の変異も見つけており、その中の一つが TSC2 の Exon37 の上流 2 塩基の場所で見つかった TSC2 (c.4850-2A>C) である。この変異ではスプライシング異常が疑われたために、RT-PCR 法により Exon37 の頭から 35 塩基がスキップした特徴的な異常 Splicing variant を同定している。今後この Splicing variant が正常 variant と比べてどの程度 mRNA レベルで発現しているか、また異常 variant からタンパクがどれだけ作られているかを明らかにする予定である。そしてタンパクの発現が確認できた場合、TSC1 (H181P) と同様に細胞内で発現させその機能を解析する。このように今後新たに見つかった変異に関しても、Exon 内のミスセンス変異に関しては実際に細胞内で発現させその機能を解析し、Intron 内の変異に関してはまず Splicing variant を同定し、その後より詳細な解析を行っていく予定である。

#### 4. 研究成果

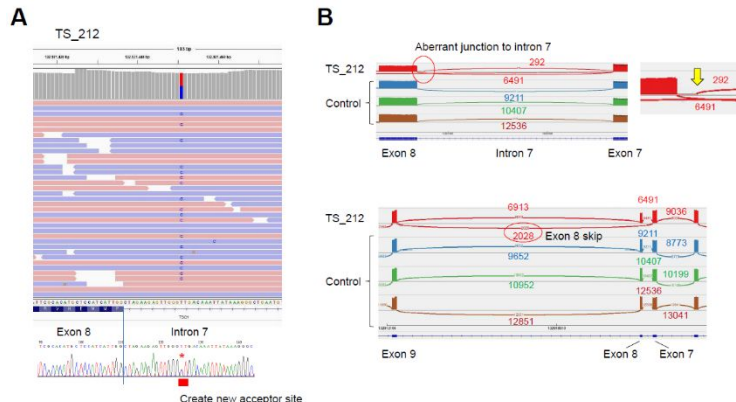
##### (1) TSC1/2 の新規のスプライシング異常産物の同定

本研究により我々は SMARTer® システムにより全長 cDNA を合成し、標的遺伝子 (TSC1/2) の全長 cDNA のみを特異的 RNA プロブ (Agilent 社設計) によりキャプチャーし、次世代シーケンサー (NGS) 解析 (Minion, ロングリードシーケンサー) する方法を開発した。 (Togi S, et al., J Mol Diagn, 2021; Ura H, Togi S, et al., RNA Biol. 2021)

この方法から、我々はいくつものスプライシング異常を引き起こす変異を患者血液から同定することに成功した。また興味深いことに、患者間において大きくスプライシング産物の組成が変わっていることを明らかにしている。



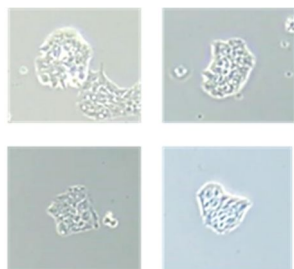
ロングリードシーケンスを用いた TSC1/2 のスプライシング産物の解析



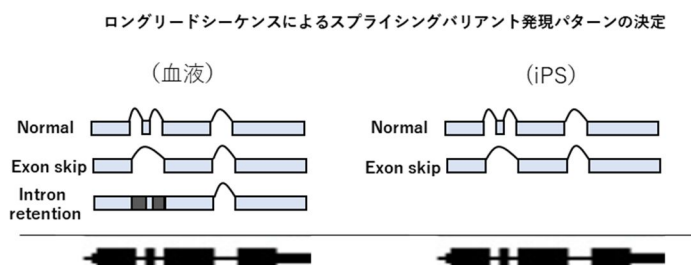
##### (2) 患者由来 iPS 細胞の樹立

同一家系で同じ変異を有しながら重症度の全く異なる患者を含む複数の TSC 患者と健常人の末

梢血単核球画分から、Cytotune2.0®を用い iPS 細胞を樹立させ、核型と未分化マーカー染色 (Nanog, Oct4) により品質確認をした。さらに iPS 細胞での TSC1/2 のスプライシング解析を行ったところ、血液中でのスプライシングパターンと大きく異なることも明らかにした。今後、神経細胞へと分化させ、組織間でのスプライシングパターンの違いやその制御機構などを明らかにする予定である。



樹立した患者由来 iPS 細胞 (Pt#1)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Togi Sumihito, Ura Hiroki, Niida Yo	4. 巻 23
2. 論文標題 Optimization and Validation of Multimodular, Long-Range PCR-Based Next-Generation Sequencing Assays for Comprehensive Detection of Mutation in Tuberous Sclerosis Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 424 ~ 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmoldx.2020.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ura Hiroki, Togi Sumihito, Niida Yo	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeted Double-Stranded cDNA Sequencing-Based Phase Analysis to Identify Compound Heterozygous Mutations and Differential Allelic Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 256 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology10040256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ura Hiroki, Togi Sumihito, Niida Yo	4. 巻 1
2. 論文標題 Target-capture full-length double-strand cDNA sequencing for alternative splicing analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2021.1872961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 Sumihito Togi
2. 発表標題 Identification of a novel splicing mutation in ACVRL1 gene in a family with several members affected by HHT
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Sumihito Togi
2. 発表標題 Functional analysis of ACVRL1 splicing mutation in blood and iPS cells from patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 (HHT2)
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年～2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関