

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17297

研究課題名（和文）Pierson症候群における重症化機序の解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Elucidation of the aggravation mechanism and new treatment in Pierson syndrome

研究代表者

榊原 菜々（Sakakibara, Nana）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90814319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、LAMB2異常症を8例診断した。またLAMB2異常症6例について遺伝子表現型関連を報告した。ここでは、ミスセンス変異と思われたが、スプライシング異常に伴うtruncating変異であったため重症であった例、またスプライシング異常による重症例と考えられたが、正常と異常のスプライシングを産生するため軽症であった例など、スプライシング解析により重症度機序を説明しえた。しかしLAMB2蛋白の機能に重要なLNドメイン内のミスセンス変異では、スプライシング異常を来さないにも関わらず、重症な表現型を示しており、スプライシング異常以外の重症化機序の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾患であるLAMB2異常による小児ネフローゼ症候群について、本邦の小児例の臨床遺伝学的特徴を明らかにした。LAMB2異常により発症するPierson症候群は眼病変、精神運動発達遅滞、先天性ネフローゼ症候群を特徴とし、生後早期に末期腎不全に至る重症疾患であるが、一方で眼病変を呈さず、精神運動発達は正常で、腎機能も比較的長期に保持されるような軽症例も存在することが知られていた。私たちのこれまでの研究で、こういった重症度の違いを規定する要素の一つとして、スプライシングが関連していることを示してきたが、今回の研究で、一部のLAMB2異常においても、スプライシングが重症度規定因子となることを示した。

研究成果の概要（英文）：Eight cases of LAMB2 abnormalities were diagnosed by a comprehensive diagnosis system for congenital nephrotic syndrome, infantile nephrotic syndrome and steroid-resistant nephrotic syndrome using a next-generation sequencing (NGS). In addition, six cases of LAMB2 abnormality were examined and reported. This paper explains the mechanism of the disease severity by splicing analysis, for example, a case in which the disease seemed to be a missense mutation but was severe because it was actually a truncating mutation associated with abnormal splicing, and a case in which the disease was suspected to be severe because it showed abnormal splicing but was mild because it produced both normal and abnormal splicing products. However, even though missense mutations in the LN domain, which is important for the function of the LAMB2 protein, do not cause splicing abnormalities, some cases show severe phenotypes, suggesting that mechanisms other than splicing abnormalities may also be involved.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：LAMB2 Pierson症候群 スプライシング異常

### 1. 研究開始当初の背景

Pierson 症候群は眼病変、精神運動発達遅滞、先天性ネフローゼ症候群を特徴とし、生後早期に末期腎不全に至る疾患である。Pierson 症候群は *LAMB2* 遺伝子の機能喪失型変異により発症するが、一方で *LAMB2* 遺伝子に機能喪失型変異を有するにもかかわらず、眼病変を呈さず、精神運動発達は正常で、腎機能も比較的長期に保持されるような軽症例も多数存在することが近年の分子生物学的研究により次々と明らかとなった。

過去のいくつかの報告では、一般に *LAMB2* 遺伝子の 2 本のアレルのうち、少なくとも一方のアレルに、ミスセンス変異などの機能喪失の程度が軽い変異(non-truncating 変異)などを持つ場合は軽症であるとされ、両側にナンセンス変異などの機能を著しく低下させる変異(truncating 変異)を持つ場合は重症であるとされている。しかしこの法則に当てはまらず、ミスセンス変異を有するにもかかわらず重症な例や、truncating 変異が疑われるにもかかわらず軽症の臨床像を呈する例も報告されている。また LN ドメイン内に変異を有する場合も、non-truncating 変異であっても重症となる症例があることが知られている。

我々のグループではすでに、遺伝性腎疾患において Minigene を用いたスプライシングアッセイ方法を確立し、スプライシングパターン解析に非常に有用であることを証明してきた。そして過去の研究から、いくつかの遺伝性腎疾患において、一見変異の種類と重症度が一致しない症例では、スプライシングの異常が大きく関与していることがわかっており、報告を重ねてきた。

一方近年あらゆる遺伝性疾患において、スプライシング調節に影響を与える薬剤を用いた遺伝子標的療法により治療が可能であることが示唆され、注目されている。スプライシング調節を目的とした遺伝子標的治療はこれまで有効な治療法が見出されていない遺伝性疾患に対する有効な治療法として実現の可能性が高い。そのため本疾患においても、スプライシングパターンと重症度の関連について検討することが重要である。

### 2. 研究の目的

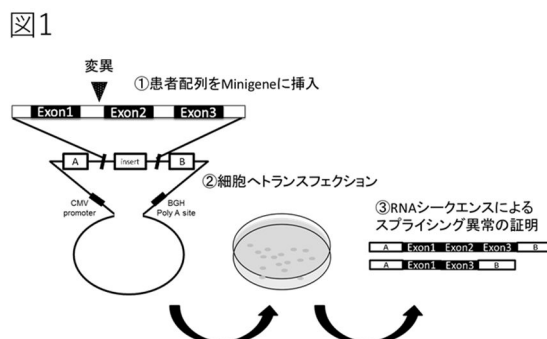
本研究は Pierson 症候群における重症化および軽症化機序の解明のみならず、スプライシング異常に起因した重症例における、スプライシング制御による軽症化を目的としたはじめての試みである。具体的には、既報の *LAMB2* 異常症について、minigene を使用した in vitro 実験系によりスプライシングパターン解析を行い、スプライシング異常による重症化の原因究明を行う。また最終的には、スプライシング異常を軽症化する可能性のあるアンチセンス治療により、重症例でみられる truncating 変異を比較的軽症と考えられる non-truncating 変異に修復することで、疾患の軽症化をはかる、*LAMB2* 異常症の分子治療法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

次世代シーケンサー(NGS)を用いた、先天性ネフローゼ症候群や乳児ネフローゼ症候群、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群に対する網羅的診断体制により、新規の *LAMB2* 異常症の発掘を行う。さらにその発症頻度、臨床的特徴、遺伝子型-表現型の関連について詳細に検討する。またこういった患者の発症頻度を解明するためには、全国から遺伝性腎疾患の症例を集め遺伝子解析を行い診断する必要があるため、今後関連学会で当研究室における取り組みを紹介し、全国から広く解析依頼を受け診断数を増やしていく。

既報の *LAMB2* 遺伝子変異におけるスプライシング異常発症メカニズムの解明を行う。既報の変異を掲載したデータベース(HGMD)上に登録されている、*LAMB2* 遺伝子に変異を持ち、変異の種類から予想される重症度と実際の重症度が一致しない症例を抽出する。さらに変異導入により、既報の *LAMB2* 遺伝子変異を含む DNA 配列を minigene(H492 ベクター)に挿入した minigene construct を作成する。その後培養細胞(HEK293T および HeLa)に導入し、mRNA を強制発現させ、培養細胞から mRNA を抽出し、cDNA に逆転写してスプライシングパターンの解析を行う。これにより、実際にその変異によりスプライシング異常が生じるかどうかを確認する(図 1)。

スプライシング異常により重症化していると考えられるものを治療対象とし、作成した minigene construct および患者腎由来培養細胞に対し、アンチセンス治療薬を投与することで、truncating 変異から、non-truncating 変異へと修復されることを証明する。Crisper-Cas9 システムを利用した、マウスモデルの作成を行い、実際にアンチセンス薬による治療効果を検討する。

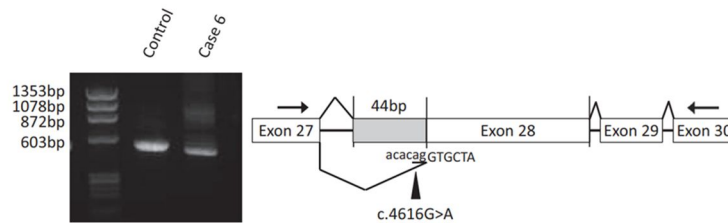


#### 4. 研究成果

今年度までに次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、*LAMB2* 異常症を 8 例診断した。また *LAMB2* 異常症 6 例について遺伝子表現型関連を報告した (Minamikawa, Sakakibara et al. *J Hum Genet.* 2020)。この 6 例のうち 4 例は軽症で、そのうち 1 例のみ 3 歳で末期腎不全に至ったが、残りの 3 例はそれぞれ 3 歳、5 歳、7 歳の時点で末期腎不全に至っていなかった。また重症例は 2 例で、これらの症例は生後早期に末期腎不全に至った。

重症例 2 例のうち 1 例は、ホモ接合体に LN ドメイン内のミスセンス変異を有していたため、重症であったと考えられた。もう 1 例は LN ドメイン外にミスセンス変異を有しているにも関わらず重症であった。そこで末梢血の mRNA 解析によりスプライシングパターン解析を行ったところ、

図2

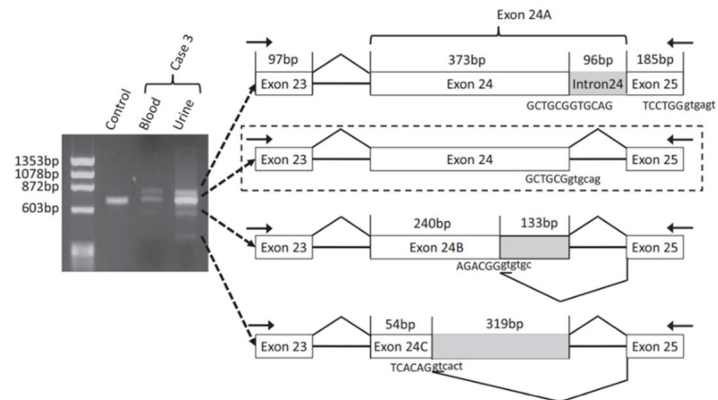


この症例では c.4616G>A の変異により、Exon28 の 5' 側 44 塩基が Exon と認識されず、その結果実際には truncating 変異であったことが明らかとなった (図 2)。そのため一見軽症が予測される変異であったにも関わらず、重症であったと考えられた。

また、軽症例 4 例のうち 3 例は少なくとも一方のアレルに LN ドメイン外のミスセンス変異 (non-truncating 変異) を有していたため、軽症であったと考えられた。しかし残りの 1 例は両方のアレルにスプライシング異常による truncating 変異を有していたことから重症が予測された例であった。これについても末梢血の mRNA 解析を行ったところ、c.3797 + 5G>A は、実際には正常と異常のスプライシングを産生していることが判明した (図 3)。つまりこの症例においては、一部の正常スプライシングが、軽症化に寄与したと考えられた。

今回の検討では、これらのスプライシングが重症度に関与したと考えられる 2 例において、スプライシング解析により重症度機序を説明しえた。また既報の通り、*LAMB2* 蛋白の機能に重要な LN ドメイン内のミスセンス変異では、スプライシング異常を来さないにも関わらず、重症な表現型を示しており、*LAMB2* 蛋白の構造に重要な LN ドメインの変異は重症化に大きな影響を与えることが改めて確認された。

図3



一方既報の *LAMB2* 遺伝子変異について前述の法則にあては

まらず、スプライシングが重症度に関与していると予想された症例について、minigene construct を用いたスプライシングパターン解析を行ったが、明らかなスプライシング異常は検出されなかった。つまり LN ドメイン外のミスセンス変異であっても、スプライシング異常以外の重症化機序によって、重症な表現型を示す症例があることがわかった。

今回既報の変異からはスプライシング異常により重症化していると考えられる症例は発掘できなかったが、今後も次世代シーケンサー解析を継続していく予定であり、図1に示した c.4616G>A 変異のようなスプライシング異常が重症化に寄与していると考えられる症例を蓄積し、治療開発につなげたいと考えている。

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 0件）

1. 著者名 S Minamikawa, S Miwa, T Inagaki, K Nishiyama, H Kaito, T Ninchoji, T Yamamura, CNagano, N Sakakibara, S Ishimori, S Hara, N Yoshikawa, D Hirano, R Harada, R Hamada, N Matsunoshita, M Nagata, Y Shima, K Nakanishi, H Nagase, H Takeda, N Morisada, K Iijima, K Nozu	4. 巻 65
2. 論文標題 Molecular mechanisms determining severity in patients with Pierson syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 355-362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-019-0715-0	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0件

〔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
---------	---------