

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17298

研究課題名(和文) スプライシング修正による日本人ガラクトシアリドーシスの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy due to correcting splicing error of patients with galactosialidosis

研究代表者

坊 亮輔 (Bo, Ryosuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10749188

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)：ガラクトシアリドーシスの日本人では IVS7+3A>G が高頻度にみられ軽症例が多い。今回、本バリエーションが軽症の症状を呈するメカニズムに関して解析を行い、さらにアンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)によって修正を行うことで新規治療法になりうるかを検証した。患者リンパ球より作成したcDNAの解析や、mini-geneを用いたin vitroの研究ではexon7の欠失したmRNAに加えて2塩基の"gt"が挿入された新規のスプライシング産物がえられ軽症化に関わる可能性が示唆された。本検討ではAOによる治療効果は確認できなかったが、新規疾患メカニズムにつながりうるスプライシング産物を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日本人ガラクトシアリドーシス患者に多くみられる遺伝子変異に関して検討をおこなった。従来本変異による軽症化の機序は、通常のmRNA産物が一部で産生されるためと考えられていた。しかし本研究から、本変異からの正常mRNAは確認できず、exon7が欠失したうえで2塩基の挿入がみられる新規のスプライシング産物が認められた。これは従来想定されていたものとは異なる機序で臨床像に影響を与えている可能性を示唆している。本研究ではスプライシングを修正し正常化させる薬剤の同定まではできなかったが、新規の治療対象となりうる軽症化のメカニズムに関する新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Galactosialidosis is a rare lysosomal disease, caused by mutation in the CTSA gene. In Japanese cases, common variant, IVS7+3A>G, has been identified, which was related to the milder phenotype. However, this mechanism of genotype and phenotype was not fully declared. At first, we analyzed the splicing pattern of this variant both in vivo and vitro. In previous report, this common variant produced exon 7 skipping and normal mRNA. However, our study revealed normal mRNA was not obtained in both. Furthermore, novel alternative splicing product including gt insertion was demonstrated. Skipping of exon 7 (92 bases) was assumed to cause nonsense mediated decay, but this product could be strongly related to the milder phenotype. We planed to clarify whether the specific antisense nucleotide can modify the splicing pattern of CTSA gene or not, but we can not obtain any sufficient effect. However, this new splicing variant could be the novel target of therapy with galactosialidosis.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ガラクトシアリドーシス CTSA遺伝子 ライソソーム病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ガラクトシアリドシス (GS) は常染色体劣性遺伝形式をとる希少な代謝異常症であり、ライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A (PPCA) をコードする CTSA 遺伝子の異常により引き起こされる。PPCA はノイラミニダーゼ-1、ガラクトシダーゼ などの酵素の安定、活性化に影響を与える多機能タンパク質であるため、GS では低身長、視力低下、心障害、錐体路障害、小脳失調など複数の臓器にまたがる多彩で重篤な症状を呈する。しかし、GS には現在に至るまで対症療法以外に根本治療法は存在しない。

GS の原因遺伝子である CTSA 遺伝子は、世界中でこれまで多数の遺伝子変異が同定されているが、日本人 GS 患者では創始者効果により IVS7 + 3A>G が高頻度変異であることが報告されている。この変異は pre-mRNA から成熟 mRNA におけるスプライシングの過程で exon7 が欠失するスプライシング異常を引き起こすとされている。

近年、分子学的治療法の研究の発展により、スプライシング異常を修正する治療法が開発されている。中でも合成ヌクレオチドであるアンチセンスオリゴヌクレオチド (AO) は、pre-mRNA に選択的に結合することで標的となる成熟 mRNA のスプライシングを変化させることが可能であるため、スプライシング修正を目的に AO などの核酸医薬品の開発が進められている。例えば、GS と同じ代謝異常症の Pompe 病においても、AO を用いたスプライシング修正の有効性が *in vitro* の報告で近年示された。この結果は日本人 GS 患者の高頻度変異に対しても、AO を用いたスプライシング修正が有効であることを示唆している。しかしながら、これまで日本人 GS 患者の高頻度変異に対して AO を用いたスプライシング修正の効果を明らかにした報告はない。

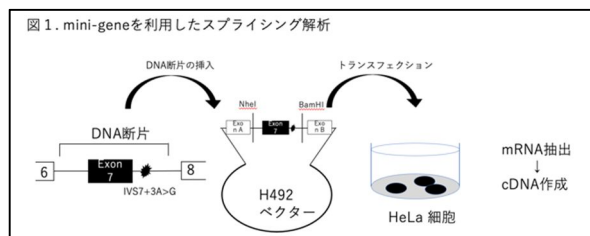
2. 研究の目的

本研究の目的は、“日本人 GS の高頻度変異から生じるスプライシング機構を明らかにし、さらにそれによって起こった異常が AO を用いて修正可能であることを証明する”ことである。

3. 研究の方法

はじめに、当院で診療している日本人 GS の高頻度変異、c.1184A>G の 2 つの変異を有する患者より同意をえてリンパ球を用いた mRNA の解析を行った。リンパ球より抽出した mRNA に対して RT-PCR 法によって cDNA を作成し、直接シークエンス法で解析を行った。

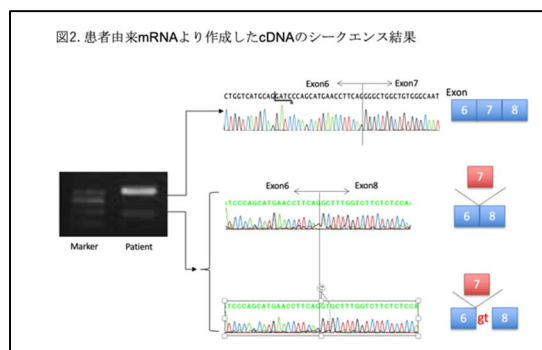
次に、図 1 のように患者由来のリンパ球に対して mini-gene を用いて、患者の体内で起こっているスプライシングを再現する検討をおこなった。具体的には日本人 GS 高頻度変異を、HeLa 細胞にトランスフェクションした後、mRNA を強制発現させた。



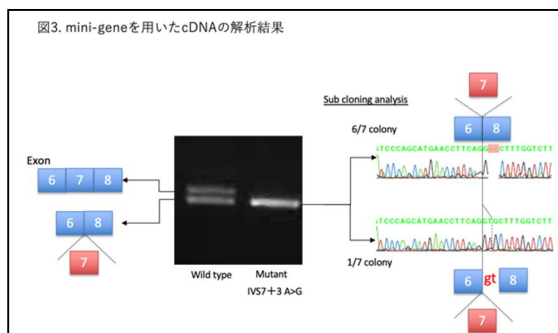
その後、これらの結果でみられたスプライシング産物に対して AO によるスプライシング修正効果について検討した。

4. 研究成果

患者由来のリンパ球を用いた mRNA を RT-PCR したところ、図 2 のように 2 つのバンドが得られた。各バンドを exon6-14 にかけてシークエンス解析したところ、上のバンドは Exon6, 7, 8 が直接つながる正常スプライシング産物であった。そして、これらはいずれも c.1184A>G に由来するものであった。下のバンドでは、既報同様に exon7 の欠失したスプライシング産物がえられるのと同時に exon7 (92 塩基) の欠失に加えて、2 塩基の "gt" の挿入がみられる新規のスプライシング産物が得られた。



次に mini-gene を用いて行った検討においては 図 3 のように日本人の高頻度変異からは正常のスプライシング産物はえられず、多くが従来指摘されている exon7 の欠失した cDNA であった。しかし、少数ではあるが得られたバンドに対してサブクローニング解析を行ったところ、1/7 の細胞からは *in vivo* の検討同様に exon7 (92 塩基) の欠失に加えて、2 塩基の "gt" が挿入された mRNA がえられた。この結果は Yamazaki からも同様に mini-gene での解析で一部のトランスクリプトにおいて exon7 の欠失した "gt" の 2 塩基挿入がみられたことを報告している。



通常、exon7 が欠失した場合、exon7 は内部に 92 塩基 (3 の倍数でない) を有するため、翻訳の過程で読み枠がずれ、終始コドンによって正常の蛋白発現が期待できない。しかし 92 塩基を欠失した後、2 塩基の挿入が起こることで、合計すると 90 塩基の欠失となり、読み枠のズレがおこらないことが想定される。実際、蛋白のレベルでの解析は本検討では明らかにできていないものの、このような読み枠のズレが修復されるスプライシング産物が、一部機能を補うことで日本人の高頻度変異が軽症化につながっている可能性も示唆された。従来、日本人の高頻度変異によって起こる軽症化のメカニズムは過去の報告をもとに一部、正常スプライシング産物ができることで症状が軽症化すると想定していたが、今回の結果からは正常のスプライシング産物は *in vivo* においても *in vitro* においてもみられなかった。

本研究から、上記のような新たな軽症化のメカニズムにつながる可能性のある結果がえられた。A0 を用いた治療効果に関しては十分な結果がえられなかったものの、今後さらに蛋白のレベルでの解析や酵素の機能測定などを追加し、より多数の症例検体などでも今回のメカニズムが確認できるかを検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Bo Ryosuke, Awano Hiroyuki, Nishida Kosuke, Fujioka Kazumichi, Nishiyama Atsushi, Miyake Osamu, Iijima Kazumoto	4. 巻 24
2. 論文標題 False positive cases of elevated tetradecenoyl carnitine in newborn mass screening showed significant loss of body weight	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100634 ~ 100634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2020.100634	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 -
1. 著者名 Bo Ryosuke, Musha Ikuma, Yamada Kenji, Kobayashi Hironori, Hasegawa Yuki, Awano Hiroyuki, Arai Masato, Kikuchi Toru, Taketani Takeshi, Ohtake Akira, Yamaguchi Seiji, Iijima Kazumoto	4. 巻 24
2. 論文標題 Need for strict clinical management of patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency: Experience with two cases detected by expanded newborn screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100611 ~ 100611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2020.100611	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 -
1. 著者名 Bo Ryosuke, Awano Hiroyuki, Yamada Kenji, Ooi Mayu, Okata Yuichi, Bitoh Yuko, Mizobuchi Satoshi, Iijima Kazumoto	4. 巻 27
2. 論文標題 The perioperative transition of serum biomarkers of a 1.5-year-old boy with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100760 ~ 100760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2021.100760	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 -
1. 著者名 Hiroyuki Awano, Masashi Nagai, Ryosuke Bo, Mariko Murao, Yusuke Ishida, Tsukasa Tanaka, Kazumi Tomioka, Masahiro Nishiyama, Hiroaki Nagase, Kazumoto Iijima	4. 巻 27
2. 論文標題 Preliminary Effectiveness and Safety of High Frequency Oscillation in Addition to Mechanical Insufflation and Exsufflation for Intratracheal Mucus Removal in Patients With Neuromuscular Disease: Protocol for a Prospective Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JMIR Res Protoc.	6. 最初と最後の頁 e12102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/12102	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 -

1. 著者名 Matsumoto M, Awano H, Hirota Y, Nagai M, Bo R, Matsuoka A, Hamaguchi T, Takeuchi T, Nakagawa Y, Ogawa W, Iijima K.	4. 巻 64
2. 論文標題 The prescription rates of glucagon for hypoglycemia by pediatricians and physicians are low in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine	6. 最初と最後の頁 233-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12020-018-1793-z	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 Ryosuke Bo, Hiroyuki Awano, Tomohiko Yamamura, Kandai Nozu, Kazumoto Iijima10.2196/12102
2. 発表標題 Alternative splicing derived by a common mutation of CTSA in Japanese galactosialidosis in vivo and in vitro.
3. 学会等名 先天代謝異常学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 坊亮輔
2. 発表標題 新生児マススクリーニングにおけるC14:1偽陽性例では出生後の体重減少が大きい
3. 学会等名 日本マススクリーニング学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本小児医療保健協議会 (四者協) 治療用ミルク安定供給委員会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 152
3. 書名 特殊ミルク治療ガイドブック	

1. 著者名 坊亮輔	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学者	5. 総ページ数 880
3. 書名 小児の救急・搬送医療	

〔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
---------	---------