

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16927

研究課題名(和文) アンチセンス核酸によるPHOX2B (+7Ala mutant)の発現抑制

研究課題名(英文) Suppression of PHOX2B (+7Ala mutant) expression by antisense nucleic acid

研究代表者

福島 祥代 (Fukushima, Sachiyo)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20866032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：患者検体由来ゲノムDNAよりPHOX2BのEx1-Ex3を含むミニ遺伝子を作製し、そのミニ遺伝子を用いてASOスクリーニングを行った。結果、PHOX2B(+7Ala mutant) mRNAの発現を特異的に抑制する4種類のASOを取得した。患者由来の血液サンプルよりiPS細胞を4株樹立し、PHOX2Bを発現する神経細胞へ分化誘導した。今後、分化誘導した神経細胞でASOのPHOX2B (+7Ala mutant) mRNA抑制効果の評価を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PHOX2B遺伝子の7アラニン伸長変異mRNAの発現をASOで抑制することでCCHSに対する治療法開発を試みた。ミニ遺伝子を利用して得られたASOはPHOX2B (+7Ala mutant) pre-mRNAに特異的に作用し、スプライシングを抑制することで変異mRNAの産生を抑制することが示唆された。さらに、本研究で樹立したCCHS患者由来iPS細胞は、PHOX2B遺伝子の7アラニン伸長変異を標的とするASOや低分子化合物などのスクリーニングに利用できることからCCHSの新規治療法の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：(1) ASO screening was performed using mini-genes containing Ex1-Ex3 of PHOX2B from genomic DNA derived from patient samples. Four ASOs that specifically suppress the expression of PHOX2B(+7Ala mutant) mRNA were obtained. (2) Four iPS cell lines were established from patient-derived blood samples and induced to differentiate into PHOX2B-expressing neurons. In the future, the effect of ASO on PHOX2B (+7Ala mutant) mRNA suppression will be evaluated in the differentiated neurons.

研究分野：新生児

キーワード：PHOX2B CCHS iPS細胞 ASO

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

先天性中枢性低換気症候群(Congenital central hypoventilation syndrome: CCHS)は、神経堤関連疾患の1つで、呼吸の調節と自律神経系の障害を特徴とし、主に睡眠時に、重症型では覚醒時にも低換気を来す疾患である。典型例では新生児期より、非典型例では乳児期～成人期に睡眠時低換気症状を呈する。本症の基本病態は、呼吸中枢における化学的な調節機構の障害と考えられている。現在、CCHSの基本病態である低換気を改善する根本的な治療法は存在せず、患児は対症療法を受けるのみで、必然的に生涯人工呼吸管理を要する。大多数が精神・運動発達が問題ないにも関わらず、人工呼吸を要するため、患児を含め家族のQOLの低下を来す。病因は、染色体4p12に位置するPHOX2B遺伝子の変異で、優性遺伝を示す。75%がde novo変異、25%はモザイクまたは変異のある未発症の親からの遺伝である。PHOX2Bは9個と20個のポリアラニン鎖とホメオボックスを有する転写調節因子であり、特に脳幹部のニューロンや自律神経系の神経節などに発現し、呼吸中枢などの自律神経系の分化や発達に重要な役割を果たしている。CCHSを引き起こすPHOX2遺伝子変異の内、90%以上で20ポリアラニン鎖領域における4～13個のアラニン伸長変異(polyalanine repeat expansion mutations: PARM)が検出され、PARMの中でも7アラニン伸長変異PHOX2B(+7Ala mutant)が一番多い。残りの約10%には欠失、挿入、ミスセンス変異(non-PARM: NPARM)が検出される。

申請者は、新生児期発症のCCHS症例を臨床診断し、さらに遺伝学的検査にて患児がPHOX2B(+7Ala mutant)を持つことを確定診断した。患児は睡眠時及び覚醒時に低換気を来すため、気管切開・在宅人工呼吸器にて自宅退院となり、現在外来通院中である。運動発達は正常であるものの、終日人工呼吸管理を要し、日常生活において大幅な制限がかかる現状である。患児をはじめCCHS症例は低換気に対する根本的治療がなく、早急に新たな治療法の確立が望まれる。そこで、新規治療法開発において鍵を握るPHOX2Bの分子機構に着目し、CCHSに対するアンチセンス核酸(ASO)による治療法を提唱する。

本研究は「CCHSの原因遺伝子であるPHOX2B遺伝子の20ポリアラニン鎖領域における7アラニン伸長変異(+7Ala mutant)の発現を特異的に抑制するアンチセンス核酸(ASO)医薬品の取得」を目的とし、CCHSの新規治療法の第一歩を目指す。

## 2. 研究の目的

PHOX2B(+7Ala mutant)の発現を特異的に抑制するASOを取得すること。

## 3. 研究の方法

PHOX2B(+7Ala mutant)を有する児の血液サンプルよりDNAを抽出、ハプロタイプの同定

末梢血よりゲノムDNAを抽出後、ポリアラニン鎖をコードする領域を増幅したPCR産物をクローニングして、シークエンス解析を行い、ハプロタイプの診断を行う。

### 患者検体由来ゲノムDNAよりミニ遺伝子を作製

PHOX2B(+7Ala mutant)を発現する細胞を入手できなかったため、ASOによるスプライシング阻害を評価するためにPHOX2B(+7Ala mutant)配列を持つミニ遺伝子の作製を行う。このミニ遺伝子は、pre-mRNAのスプライシングが阻害されるとイントロンが保持され、mRNAが産出されなかった。

### で同定したPHOX2B(+7Ala mutant) pre-mRNAに対するASOの設計・スクリーニング

PHOX2B(+7Ala mutant)と野生型PHOX2Bの塩基配列を比較し、PHOX2B(+7Ala mutant)に特異的な塩基配列を同定する。この特異的な配列と、予備実験から得られたPHOX2Bのスプライシングに重要な配列を含むASOを設計する。さらにミニ遺伝子を使用してASOスクリーニングを行い、mRNAの産出量がより少ないASOを同定する。

### 患者由来血液サンプルよりiPS細胞を樹立、神経細胞へ分化誘導、ASOの効果の検証

iPS細胞の樹立のため、患者由来の血液サンプルから単核球を分離する。分離した単核球の培養を行い、その後iPS細胞の樹立(遺伝子導入)を行う。さらに樹立された患者由来のiPS細胞を、PHOX2Bを発現する神経細胞に分化誘導する神経細胞に対してで同定したASOの処理を行い、効果を評価する。

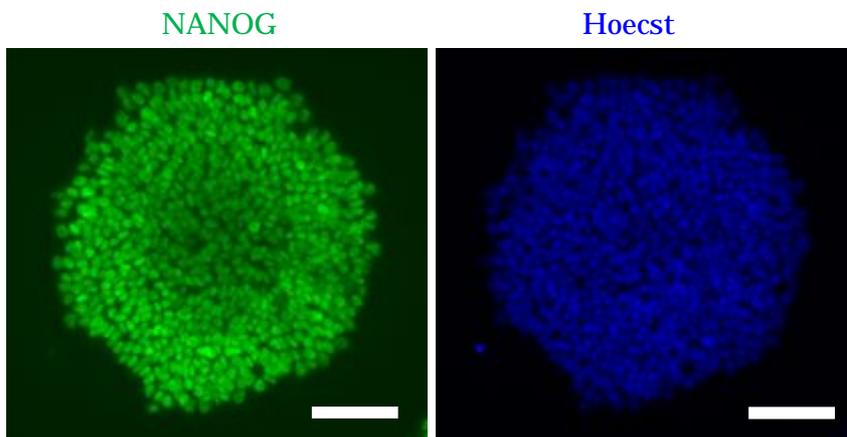
#### 4. 研究成果

患者検体由来ゲノム DNA より PHOX2B の Ex1-Ex3 を含むミニ遺伝子を作製し、これを用いて ASO スクリーニングを行った。PHOX2B(+7Ala mutant)の発現を特異的に抑制する 4 種類の ASO を取得した。患者由来の血液サンプルより iPS 細胞を 4 株樹立した(下記図)。iPS 細胞から PHOX2B を発現する神経細胞へ分化誘導の安定したプロトコルの確立には至らなかったため、今後、iPS 細胞の安定した神経堤細胞、神経細胞への分化誘導法を確立を目指し、分化誘導した神経細胞で ASO の PHOX2B (+7Ala mutant) mRNA 抑制効果の評価を行う予定である。

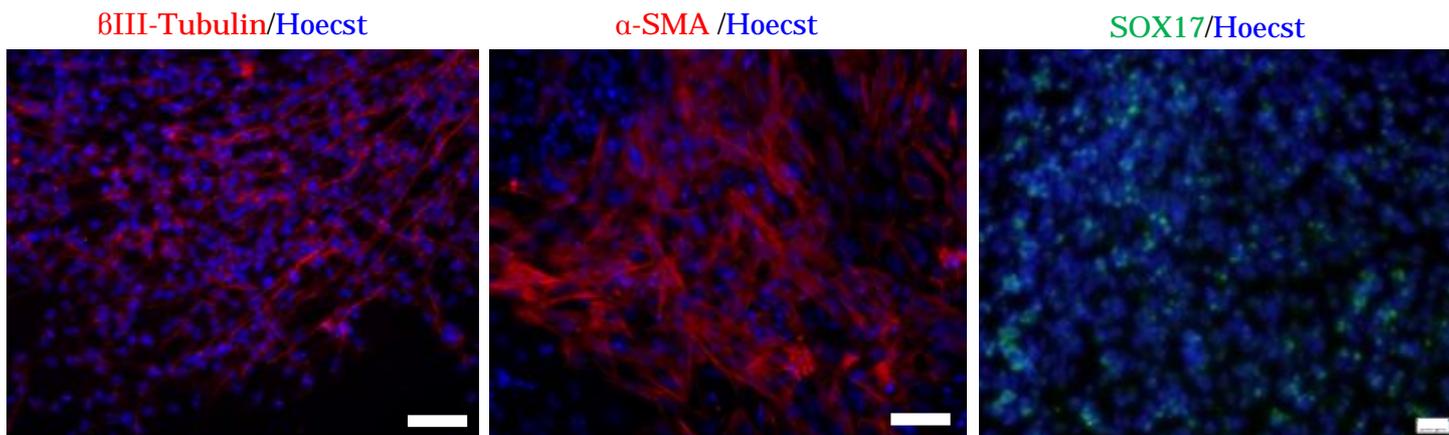
#### 【CCHS 患児由来 iPS 細胞を 4 株樹立】

CCHS 患児。PHOX2B 27Ala 伸長変異を有する。

#### 未分化マーカーの発現を確認



#### In vitro で三胚葉への分化を確認



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------