

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：94421

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07789

研究課題名（和文）福山型筋ジストロフィーのロングリードシーケンサーによる診断法確立と病態解明

研究課題名（英文）Establishing Diagnostic Methods and Elucidating the Pathogenesis of Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy Using Long-Read Sequencers

研究代表者

長坂 美和子（Nagasaka, Miwako）

社会医療法人愛仁会高槻病院（臨床研究センター）・成育医療研究室・研究員

研究者番号：70723998

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）：福山型筋ジストロフィー（FCMD）は重度の先天性筋ジストロフィー、型滑脳症、眼症状の3症状を示す希少難病で、特に本邦に多い。FCMDの疾患責任遺伝子はフクチン遺伝子（FKTN, 9q31）で、約90%の患者は、FKTNの3'側非翻訳領域に約3kbのレトロトランスポゾン（SINE-VNTR-Alu; SVA）挿入型変異を認める。挿入されるSVA配列の多様性と表現型の関係は不明であり、今回SVAの多型について調べた。SVA内には多型が存在することがわかり、表現型との関連についてさらなる検討を進めている。また健康な小児およびFCMD患者より採取した尿を用いて幹細胞性のある尿中細胞を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、FCMDの治療として、FCMDの発症機序であるエクソントラップを阻害するアンチセンス核酸を用いた「アンチセンス療法」の医師主導治験が施行されている。SVA内の多型と表現型の重症度との関連がわかれば治療の効果判定などに役立つ可能性がある。

また、我々はFCMD患者の尿より幹細胞性のある尿中細胞を樹立した。尿の採取は非侵襲的であり、尿中細胞の樹立もiPS細胞などに比較して簡便で安価である。この尿中細胞を用いて疾患筋細胞を作成することにより、治療の効果判定を行ったり、上記のSVAの多型や重症度評価と組み合わせることにより、より個別化した医療を目指すことができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy (FCMD) is a rare and severe disorder characterized by congenital muscular dystrophy, type II lissencephaly, and ocular abnormalities, particularly prevalent in Japan. The causative gene for FCMD is the Fukutin gene (FKTN, located at 9q31), with approximately 90% of patients having a 3kb retrotransposon insertion (SINE-VNTR-Alu; SVA) in the 3' untranslated region of the FKTN gene. The relationship between the diversity of inserted SVA sequences and the phenotypic expression of the disease remains unclear. This study investigated the polymorphisms within the SVA sequence and found variations. Further studies are ongoing to explore the correlation between these polymorphisms and the phenotypes. Additionally, stem cell-like urinary cells were established from urine samples collected from healthy children and FCMD patients.

研究分野：小児科学

キーワード：福山型筋ジストロフィー SVA ロングリードシーケンサー レトロトランスポゾン 尿中細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は重度の先天性筋ジストロフィー、型滑脳症、眼症状の3症状を示す常染色体潜性遺伝形式の希少難病である (Fukuyama, et al. *Brain Dev* 1981)。日本ではデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に次いで2番目に多い小児の筋疾患で、生後～乳児早期に筋緊張低下、筋力低下で発症し、10代のうちに死に至る重篤な疾患である。日本では毎年約100名の患児が出生し、現在の患者数は約2000名である。患者は全例、精神運動発達遅滞を伴い、大多数の患者が生涯歩行困難な予後不良の疾患である。FCMDの疾患責任遺伝子はフクチン遺伝子 (*FKTN*, 9q31) で、約90%の患者は、*FKTN* の3'側非翻訳領域に約3kbのレトロトランスポゾン (SINE-VNTR-*Alu*; SVA) 挿入型変異を認める (Kobayashi, et al. *Nature* 1998)。この変異は約100世代前、日本人祖先の1人に生じた創始者変異であり、日本人の約90人に1人が保因者とされ、本邦に特に多い疾患である。SVA挿入配列を検出する遺伝学的検査によりFCMDの確定診断となるが、挿入変異をホモ型に持つのは全体の約8割で、残りは挿入変異とイントロン5の点変異 (Kobayashi, et al. *J Hum Genet* 2017) やエクソン3のナンセンス変異などによる複合ヘテロ型であり、表現型は軽症～重症まで様々である (Kondo-iida, et al. *Hum Mol Genet* 1999)。また挿入されるSVA配列の多様性と表現型の関係は不明である。FCMDはSVA挿入変異によりフクチンタンパクをコードする最終エクソン内に新たなスプライシング部位が生じ、新生エクソン由来の異常タンパクが産生されることで発症する、「エクソントラップ」という機構により生じるスプライシング異常症である (Taniguchi-Ikeda, et al. *Nature* 2011)。このエクソントラップを阻止するアンチセンス核酸を用い、正常なスプライシングを誘導する「アンチセンス療法」により、正常蛋白の回復や、機能的回復を示唆するDG糖鎖修飾の回復がみられた。研究開始当初は骨格筋に対するアンチセンス療法の治験にむけて準備段階であり、アンチセンス治療の実現により、運動機能が改善し、患者及びその家族のQOL向上につながることを期待されている。

### 2. 研究の目的

FCMDの治療法の開発に伴い、早期診断による早期治療開始が重要となる。保険適用の遺伝学的検査は挿入変異の検出のみであり、保因者頻度を考えると保因者を患者と誤診する可能性や、PCR増幅の困難なSVA配列ではアリルドロップアウト現象による誤診の可能性、また挿入変異以外の変異検出が困難であることから、治療法開発に沿った正確な診断技術の確立が喫緊の課題である。本研究では本邦に比較的患者数の多いFCMDに対する網羅的早期診断法の開発を目的として研究を立案した。さらに、挿入変異ホモ型の患者でも症状に差があるため、SVA配列内に存在する多型が表現型の差や治療効果に影響するのではないかと考え、遺伝学的および疾患細胞株で評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

まずSVAの配列をロングリードシーケンサーで解析可能であるか調べるため、ロングリードシーケンサーであるナノポアシーケンサー (Oxford Nanopore Technologies社) を用い、SVA配列の解読を試みた。通常、SVA領域はGCが豊富でありPCRで増幅困難であるが、この領域のみを増幅するPCRで濃縮する方法を確立し用いた。また現状のナノポアシ

ーケンサーはエラー率が高いため、ショートリード型の次世代シーケンサーである MiSeq (イリミナ社) でシーケンス補正を行い、より正確な配列の取得を目指した。これらの解析により得られたデータから判読困難、あるいはSVA内に多型があると予想される部位を中心にサンガーシーケンスを行った。さらに、マイクロサテライト解析を用いて、SVA内の多型について調べた。

DGは主に筋、神経で発現しており、主としてiPS細胞が実験に用いられるが、iPS細胞樹立は煩雑で費用も高額であり、多数患者での樹立は困難である。近年、尿中の幹細胞 (尿中細胞) が注目されており、これにより非侵襲的かつ簡便に疾患細胞系を樹立することが可能となる。DMDにおいて尿中細胞より分化誘導した疾患筋細胞を用いて患者の病態把握や治療効果判定を行った報告 (Takizawa. et al. *Sci Rep* 2018) を参考に、同意の得られた健康な小児およびFCMDの患児より尿を採取し、尿中細胞の樹立を行った。尿中細胞の幹細胞性についてはFACSを用いて解析した。その後、MYOD-1を導入したレトロウイルスベクターを用いて筋分化誘導を試みた。

#### 4 . 研究成果

45 名の患者検体でナノポアシーケンサーを用いた SVA 領域の解析、ショートリード型の次世代シーケンサーを用いて補正、さらに判読が難しかった部位についてはサンガーシーケンスを行い、SVA 配列内に多型を示唆する所見を認めたが、同定するには至らなかった。次に、SVA 領域のマイクロサテライト解析を行った。SVA 挿入をホモ型でもつ患者 28 検体において、17 検体で多型を示唆する所見を認めた。この多型と表現型の関係を現在解析中である。

尿中細胞の樹立については、FCMD 患者 1 名、健康小児 3 名の尿中細胞樹立を終えた。その後、FACS による解析で間葉系幹細胞のマーカである CD73、CD90 の発現を認め幹細胞であることを確認した。この尿中細胞を用いて MYOD-1 を導入したレトロウイルスベクターを用いた筋分化誘導を開始したが、本研究期間内では筋分化まで到達できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Harada Risa, Taniguchi-Ikeda Mariko, Nagasaka Miwako, Nishii Tatsuya, Inui Atsuyuki, Yamamoto Tetsushi, Morioka Ichiro, Kuroda Ryosuke, Iijima Kazumoto, Nozu Kandai, Sakai Yoshitada, Toda Tatsushi	4. 巻 32
2. 論文標題 Assessment of the upper limb muscles in patients with Fukuyama muscular dystrophy: Noninvasive assessment using visual ultrasound muscle analysis and shear wave elastography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuromuscular Disorders	6. 最初と最後の頁 754 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmd.2022.05.004	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 Enkhjargal Sarantuya, Sugahara Kana, Khaledian Behnoush, Nagasaka Miwako, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Koshimizu Hisatsugu, Toda Tatsushi, Taniguchi-Ikeda Mariko	4. 巻 32
2. 論文標題 Antisense oligonucleotide induced pseudoexon skipping and restoration of functional protein for Fukuyama muscular dystrophy caused by a deep-intronic variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac286	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1件

1. 著者名 Miwako Nagasaka, Mariko Ikeda-Taniguchi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 2964
3. 書名 Comprehensive Glycoscience (Second Edition)	

〔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
研究分担者	池田 真理子(谷口)  (Ikeda-Taniguchi Mariko)  (00410738)	藤田医科大学・大学病院・准教授    (33916)	
研究分担者	加藤 武馬  (kato Takema)  (20387690)	藤田医科大学・総合医科学研究所・助教    (33916)	
研究分担者	粟野 宏之  (Awano Hiroyuki)  (30437470)	神戸大学・医学研究科・特命教授    (14501)	

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