

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08324

研究課題名（和文）シングルセル解析を用いた劣性栄養障害型表皮水疱症における遺伝子型-表現型相関解析

研究課題名（英文）Genotype-phenotype analysis in recessive dystrophic epidermolysis bullosa using single cell analysis and mouse models

研究代表者

新保 敬史（Shimbo, Takashi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：70780609

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）：遺伝性皮膚難病である劣性栄養障害型表皮水疱症はCOL7A1遺伝子変異によって引き起こされる表皮水疱症の最重症型の一つであり、現在根治治療法がない。本研究では、遺伝子変異の種類と病態の相関を明らかにし、遺伝子診断に基づく病態予測を可能とすることを目指した。患者由来遺伝子変異モデルマウスの作成と単一細胞解析を通じて、本疾患における皮膚恒常性破綻メカニズムを分子レベルで理解することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスモデルを用いた遺伝子型-表現型相関に基づく病態予測の可能性を探究した。特に、遺伝病や希少遺伝性難病において、遺伝子変異の種類と病態・予後の正確な関連付けのための基盤研究を展開した。この研究成果は、劣性栄養障害型表皮水疱症患者に対する適切な治療方針の決定の助けとなる。さらに、本手法は他の遺伝病にも応用可能であり、難病治療戦略の向上に寄与する可能性があり社会的意義も非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is one of the most severe forms of epidermolysis bullosa caused by mutations in the COL7A1 gene. Currently, there is no cure. This study aimed to clarify the correlation between the type of mutations found in the patients and the clinical manifestations. Through the establishments of mouse models with the patient derived mutations, and by performing single-cell RNA/chromatin analyses, we were able to understand skin homeostasis is disrupted in RDEB, at the molecular level in this disease.

研究分野：再生医療

キーワード：シングルセル解析 劣性栄養障害型表皮水疱症 遺伝子型-表現型相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性皮膚難病である劣性栄養障害型表皮水疱症は、COL7A1 遺伝子変異によって引き起こされる表皮水疱症の最重症型の一つであり、現在、根治的治療法はない。COL7A1 遺伝子変異による VII 型コラーゲンの機能喪失は皮膚基底膜構造の破綻を招き、劣性栄養障害型表皮水疱症患者においては、軽微な外力が加わるだけで表皮剥離が繰り返し起こる。最重症型患者では、20-30 歳台において扁平上皮癌を生じ、その 5 年生存率は低い。患者ごとに病態の大きく異なる本疾患において適切な治療法を選択するためには、遺伝子型-表現型相関解析が重要であることは明らかである。しかし劣性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子型-表現型相関は以下の理由により、未だ未解明な点が多い。

- (1) 原因遺伝子である COL7A1 が 118 個のエクソンからなる巨大遺伝子であること
- (2) 原因遺伝子変異は、遺伝子全体に分布していること
- (3) 本疾患は劣性遺伝形式をとるため、多くの場合、相同染色体に異なる遺伝子変異をもつこと
- (4) 本疾患は希少疾患であり、遺伝子型-表現型相関解析のための十分な患者数を確保できないこと

さらに、劣性栄養障害型表皮水疱症患者の皮膚病態は、遺伝的背景のみでなく、外的要因によって大きな影響を受ける。そのため水疱や潰瘍の出現数や面積を評価するだけでは、遺伝子型-表現型相関を議論できない。これらの問題点を解決し、劣性栄養障害型表皮水疱症の治療戦略決定法を刷新することは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究開発課題では、劣性栄養障害型表皮水疱症における遺伝子型-表現型相関を解明し、遺伝子診断に基づいた正確な病態予測を可能にするための基盤情報の集積を目的とした。具体的には、迅速マウスゲノム編集技術を用いて患者由来遺伝子変異を有したモデルマウスを複数作製し、遺伝子型と病態(表現型)を対応させることを試みた。さらにモデルマウスをシングルセル技術により詳細に解析し、患者由来変異が引き起こす変化を 1 細胞レベルで評価した。

3. 研究の方法

本研究では、本邦劣性栄養障害型表皮水疱症患者において、比較的高頻度で見られる三種の COL7A1 変異について、同様の変異を有したモデルマウスを iGONAD 法により作製した。それにより、患者由来遺伝子変異が皮膚の恒常性維持に与える影響をマウスモデルを用いて迅速に解析するという本研究提案の核となるアイデアの Proof of Concept の取得を目的とした。具体的には、患者型変異を有したモデルマウスの作出、作出したモデルマウスの病態解析を遂行した。

(1) 患者型変異を有したモデルマウスの作出

劣性栄養障害型表皮水疱症の原因となる COL7A1 遺伝子変異に特定のホットスポットは存在しないが、本邦の劣性栄養障害型表皮水疱症患者において比較的高頻度に見られる遺伝子変異が同定されている (Tamai et al., 1999. PMID:10383751)。p.Glu2857* (2857 番目のグルタミン酸がストップコドンに置換)、c.5818delC (5818 番目のシトシンが欠失することにより下流にストップコドンが出現)、c.6573+1GtoC (6573 番目の塩基の 3' 側に隣のグアニンがシトシンに置換され、スプライシング異常が発生) の 3 変異が複数の患者において同定された。臨床的知見では、c.6573+1GtoC/p.Glu2857* を有する患者が比較的軽症であり、c.5818delC/p.Glu2857* を有する患者が重症である。そのため、VII 型コラーゲンの機能に与える影響は p.Glu2857* は比較的軽度で、c.5818delC は重度であると推定される。本項目では、iGONAD 技術を用いて本邦劣性栄養障害型表皮水疱症患者において比較的高頻度で見られる 3 変異をホモで有するマウス (両アリルに当該変異をもつ) を作製し、それぞれの COL7A1 における変異が VII 型コラーゲンや組織に与える影響を解明することを目的とした。また、複合ヘテロ接合性変異 (異なる二種の遺伝子変異の組み合わせ) を有するマウスも作製し、ヒトの病態を模倣しているか解析した。予備的検討により、iGONAD 法を用いて 1 塩基置換を導入できることを確認しており、本マイルストーン達成のための技術的障壁は存在しなかった。

令和 3 年度中に 3 変異のホモマウスの作出、令和 4 年度中に複合ヘテロ接合性変異マウスの作出を予定した。

(2) 作出したモデルマウスの病態解析

項目(1)で作製したモデルマウスの病態解析を行った。一般的な表現型解析に加え、シングルセル技術を活用した解析も行い、より詳細に各患者由来変異が皮膚の恒常性に与える影響を明らかにすることを試みた。具体的には、各モデルマウスから採取した皮膚組織をシングルセル RNA-seq/シングルセル ATAC-seq 解析した。シングルセル RNA-seq 解析では、皮膚を構成するすべての細胞の遺伝子発現情報をシングルセルレベルで取得した。本解析により、どの細胞種 (例えば線維芽細胞、角化細胞、マクロファージなど) がどれくらいの比率で対象組織に存在しているか、

それらの細胞のサブタイプや活性化状態など、詳細な特徴を明らかにできる。また、シングルセル ATAC-seq 解析では、オープンクロマチン領域（転写因子や RNA ポリメラーゼなどのタンパク質が近接しやすく、一般に遺伝子発現が活発なゲノム領域）を同定して、クロマチン構造をシングルセルレベルで明らかにできる。遺伝子発現制御の上位機構であるクロマチン構造の解析は、より詳細な細胞のプロファイリングを可能にする。本解析により、細胞集団ごとに特徴的に制御される転写因子を推定可能であり、細胞集団ごとの遺伝子発現制御メカニズムの同定が可能となる。以上の解析により、各患者由来変異が皮膚の恒常性に与える影響を 1 細胞レベルで明らかにすることを試みた。

項目(1)で作出されたマウスを順次解析する。令和 5 年度前半までにデータの取得を終え、令和 5 年度中に解析を終了する予定で取り組んだ。

4. 研究成果

(1) iGONAD 法を用いたマウス遺伝子型-表現型相関解析の迅速な実施

特定のホットスポットをもたない遺伝子変異によって引き起こされる疾患、とくに希少疾患の遺伝子型-表現型相関解析は十分に実施されていない。劣性遺伝性疾患では、異なる 2 つの遺伝子変異によって疾患が引き起こされることが多いため、遺伝子変異の種類と病態・予後を紐づけることはより難しくなる。そこでマウスを代表とするモデルシステムの活用が期待されるが、複数のモデルマウスを迅速に、また低コストで作出することは容易ではなかった。本研究では、東海大学の犬塚博士らが開発した卵管内受精卵の直接的ゲノム編集技術である iGONAD 法を用いて、迅速に低コストにマウスを用いた希少遺伝性疾患の遺伝子型-表現型相関解析が可能であることを実証した。iGONAD 法を活用した研究スキームは、容易に他の遺伝性疾患にも適応可能であり、遺伝子型-表現型相関解析が加速されることが期待される。また作出されたマウスは、患者型遺伝子変異を有していることから、よりヒト病態に近い疾患モデルマウスとして有用である可能性もある。その証左として、論文報告以降複数の海外の研究グループからマウス譲渡の依頼を受けている。iGONAD 法を用いたマウス遺伝子型-表現型相関解析の方法論のみでなく、その結果作出したモデルマウスも劣性栄養障害型表皮水疱症に対する革新的新規治療法開発の有用なツールとして貢献できる。

(2) 作出したモデルマウスのシングルセルレベルの遺伝子発現・クロマチン解析

本研究の特色として、従来の表現型解析にとどまらず、シングルセルレベルの遺伝子発現・クロマチン解析を実施した。これらのデータを統合的に解析し、単一遺伝子における変異が、いかに皮膚恒常性を破綻させるか分子レベルでも検討できた。特にシングルセル RNA-seq 解析からは、作出した疾患モデルマウスにおいてはケラチノサイトが減少し、代償的に線維芽細胞が増加していることが明らかになった。これはヒト病態ともよく合致した知見である。さらに詳細にケラチノサイトにおける影響を解析したところ、疾患モデルマウスではとくに Dcn/Mt2 陽性の亜集団が強く影響を受けていることが明らかになった。また線維芽細胞における詳細な解析では、Postn 陽性の線維芽細胞亜集団が疾患モデルマウスで増加していることが明らかになった。これは、ヒト病態とも合致した知見であり、作出したモデルマウスがヒト病態を忠実に模倣している可能性が示された。

以上のように、本研究では予定された実験が効率的に実施され、有用な知見を得ることができた。今後本研究の成果物である方法論、モデルマウス、データが劣性栄養障害型表皮水疱症の治療戦略決定の基盤となることを願う。

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 1件）

1. 著者名 Takaki S, Shimbo T, Ikegami K, Kitayama T, Yamamoto Y, Yamazaki S, Mori S, Tamai K	4. 巻 Feb 12
2. 論文標題 Generation of a recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model with patient-derived compound heterozygous mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-022-00735-5.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Shimbo, Atsushi Matsuba, Satoshi Takaki, Katsuto Tamai
2. 発表標題 Development of a method identifying revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa using long-read sequencing
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Asaka Miura, Yuki Kobayashi, Yoshikazu Hirose, Ayako Yamanishi, Yuya Ouchi, Ryoma Yamamoto, Tomomi Kitayama, Eiichi Takaki, Takashi Shimbo, Katsuto Tamai
2. 発表標題 Characterization of ectomesenchyme as an original of epidermal stem cells
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新保敬史
2. 発表標題 Rapid establishment of model mice for recessive dystrophic epidermolysis bullosa with patient-derived mutations
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022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
---------	---------