

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19844

研究課題名（和文）ゲノム不安定性疾患の新規疾患原因遺伝子変異同定法の確立と探索

研究課題名（英文）Mutation Screening of Genome Instability Syndromes

研究代表者

中沢 由華（NAKAZAWA, Yuka）

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：00533902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：次世代ゲノム解析技術が普及し、各種疾患の発症原因となっている遺伝子変異同定が急速に進む一方で、意義が明らかでない変異（VUSs）のデータも大量に蓄積されてきている。本研究では、ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患を対象に、マルチオミクスのアプローチによりVUSの病原性評価と疾患原因変異の同定、疾患治療薬候補の探索に取り組んだ。その結果、新規のイントロン変異を同定し、人工核酸を用いた治療薬候補を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、全エクソーム解析で疾患原因変異が同定されるのは、両親のゲノム情報も併せて解析したうえで、およそ30-40%程度と言われている。残りの60-70%の解決には、イントロン領域も含めた全ゲノム解析とVUSの適切な評価が重要と考えられる。本研究の成果は、今後の遺伝性疾患の原因変異特定および創薬・個別化医療に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：With the widespread adoption of next-generation sequencing technologies, the identification of gene mutations responsible for various diseases has rapidly advanced. However, a large amount of data on variants of uncertain significance (VUSs) has also accumulated. In this study, we targeted genetic disorders characterized by genomic instability and utilized a multi-omics approach to evaluate the pathogenicity of VUSs, identify causative mutations, and explore potential therapeutic candidates. As a result, we identified novel intronic mutations and proposed therapeutic candidates using antisense oligonucleotides (ASOs).

研究分野：人類遺伝学、ゲノム生物学、分子細胞生物学

キーワード：ゲノム不安定性疾患 VUS

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代ゲノム解析技術が普及してきたことにより、各種疾患の発症原因となっている遺伝子変異の同定が急速に進んできた。しかし、同定される変異の多くは、疾患原因である事の確認が得られやすい、エキソン領域あるいはエキソンとイントロンの境界領域に生じたものである。一方、病的意義が明らかでない変異 (Variants of Uncertain Significance: VUSs) のデータも大量に蓄積されてきているが、これら VUS の疾患発症原因としての検証あるいは生物学的な意義付けについては、十分には行われていない。

ゲノム不安定性疾患群は、DNA 損傷応答や DNA 修復機構の先天的な異常により発症する様々な遺伝性疾患を包括しており、多種類の希少な疾患も含まれる。一般的に、次世代ゲノム解析 (全エクソーム解析) で疾患原因変異が同定されるのは、両親のゲノム情報も得られたうえで、およそ 30-40%程度と言われており、残りの 60-70%は発症原因が不明なままである。我々は、ゲノム不安定性疾患が疑われるものの疾患原因が特定されていない症例を多数収集し、その原因解明に取り組んでいる。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群を対象として、マルチオミクスのアプローチにより VUS の病原性について検討・評価し、疾患原因変異を同定する新たな手法の構築に取り組んだ。全エクソーム解析のみでは疾患原因が特定できないゲノム不安定性疾患疑い症例について、全ゲノム解析やトランスクリプトーム解析、蛋白質発現解析、細胞機能評価 (DNA 修復活性評価) などの解析手法を組み合わせ、VUS とされている変異が病的であるかの評価を実施することで、新規疾患原因変異の特定を目指した。さらに、これらマルチオミクスのアプローチを応用する事で、疾患原因の特定だけでなく、疾患治療薬・緩和薬・予防薬の探索にも取り組んだ。

3. 研究の方法

既存のゲノム不安定性疾患が疑われる症例で、疾患原因変異が未同定の症例について、DNA 修復活性評価とウイルス相補性試験により、疾患発症の原因となっている因子の特定を行った。合わせて、次世代ゲノム解析 (全ゲノム解析および RNAseq) とサンガーシーケンシングを実施し、イントロン領域を含むゲノムの配列情報と mRNA 発現情報・配列情報を取得し、疾患原因変異候補 (VUS を含む) の抽出と絞り込みを実施した。候補と考えられる変異について、デジタル PCR や Minigene Assay を行うことで、原因変異の検証を行った。さらに、ASO (Artificial antisense oligonucleotides) を利用することで、原因変異としての確認を得ると同時に治療薬候補の特定を実施した。

4. 研究成果

ゲノム不安定性疾患の一つである色素性乾皮症 (XP: xeroderma pigmentosum, 指定難病 159) が疑われるものの、疾患原因変異が不明である症例 17 例について解析を行った。色素性乾皮症は、常染色体潜性遺伝性疾患で、本邦では約 2 万 5 千人に 1 人の割合で発症すると考えられ、現在 XP-A、B、C、D、E、F、G、V の 8 つの相補性群が知られている。このうち、XP-A から G までの 7 つの相補性群では、DNA 修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復機構 (NER: Nucleotide excision repair) の機能異常が認められる。

そこで、対象 17 例の患者由来線維芽細胞を用いて、NER の修復活性を調査した。NER にはゲノム全体で働く NER (GG-NER: global genome NER) と転写と共役した NER (TC-NER: transcription-coupled NER) の 2 つの修復経路が知られており、異常をきたしている経路を調べることで、変異を持つと予想される遺伝子を絞り込むことが可能である。本対象 17 例を調査したところ、全て GG-NER と TC-NER の両方の経路に異常があることが確認された。このことから、これら 17 例は XPA、ERCC3/XPB、ERCC2/XPD、ERCC4/XPF、ERCC5/XPG のいずれかに変異を持っていることが示唆された。

次に、ウイルス相補性試験にて原因因子の特定を試みた。ウイルス相補性試験は、患者由来細胞に野生型の NER 関連因子を強制発現させることで、修復活性が回復するかを指標に、原因因子を特定する手法である。ウイルス相補性試験の結果、対象 17 例全てに関して、ERCC4/XPF の異常が判明した。しかし、一部の症例では、ERCC4/XPF 遺伝子上に 1 つの原因変異が検出されたものの、もう片アリルの変異は特定されなかった。また残りの症例では、原因変異候補が ERCC4/XPF 遺伝子上には確認されなかった。

いずれの症例でも ERCC4/XPF 遺伝子上には疾患原因と考えられる 2 つの変異が特定されないことから、イントロンなどエクソン領域以外の変異が原因である可能性を考え、全ゲノム解析 (次世代ゲノム解析) での変異探索を実施した。その結果、17 例中の 15 例で、イントロン 1 の深部に intron 1 c.207+196T>A 変異が共通して抽出された。本変異は、ERCC4/XPF 遺伝子上に 1 つの変異が見つかった症例では 1 つ、ERCC4/XPF 遺伝子上には原因変異が見つからなかった症例では 2 つずつ特定された。また、17 例中 2 例では、intron 8 c.1811+326C>T 変異が共通して

ホモ接合で抽出された。

これらの変異について、患者由来細胞を用いて RNAseq 解析 (次世代ゲノム解析) や cDNA の配列調査、デジタル PCR による mRNA 発現調査を実施したところ、intron 1 c.207+196T>A 変異では、イントロンの一部が mRNA に残存し、フレームシフトを起こしている可能性があること、intron 8 c.1811+326C>T 変異では、エクソン 8 以降の発現が低下していることなどが判明した。ウエスタンブロット法による蛋白質発現調査では、17 例全てで XPF 蛋白質の発現量が低下していることが確認された。

これらの変異について、疾患原因としてのさらなる確証を得るため、ミニジーンスプライシング試験を実施した。これは、患者由来細胞あるいは健常人由来細胞を元にした *ERCC41/XPF* のゲノム DNA 断片をプラスミドに組み込み、別細胞内に取り込ませることで、擬似的にスプライシングを調査する方法である。この結果、健常人由来細胞を元にしたゲノム DNA 断片では正常な *ERCC41/XPF* スプライシングが観察されたが、intron 1 c.207+196T>A 変異を持つ患者由来細胞を元にしたゲノム DNA 断片では、エクソン 1 とエクソン 2 の間にイントロン 1 の領域を一部含む異常なスプライシング産物が得られた。また、intron 8 c.1811+326C>T 変異を持つ患者由来細胞を元にしたゲノム DNA 断片では、エクソン 8 以降にイントロン 8 の一部とその後により A が付加された異常な産物が得られた。そこで、それぞれの変異を元の正常な配列へ実験的に戻したところ、それぞれで確認されたイントロンの挿入やポリ A 付加などの異常が認められなくなり、健常人由来細胞を元にしたゲノム DNA 断片と同じ正常なスプライシング産物が得られた。

これらのことから、intron 1 c.207+196T>A 変異では、通常エクソン 1 とイントロン 1 の境界部分のイントロン GU 配列を含むスプライシング部位を認識するスプライシング因子が、変異によってスプライシング配列としての特異性が高まった部位に誤って結合することで、イントロン 1 の一部を含んだスプライシングが実行され、フレームシフトが生じることで、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) が起きているものと考えられた。一方、intron 8 c.1811+326C>T 変異では、通常 CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) は AAUAAA 配列を認識して結合するが、変異によって通常とは異なる位置 (イントロン 8 内) に AAUAAA 配列が生じ、CPSF が誤って結合することで、異常な mRNA が誘導されていると考えられた。

次に我々は、人工核酸 ASO を用いて、それぞれの変異部位をブロックすることで、変異による異常スプライシングや異常 mRNA の誘導が抑制されるのではないかと考え、ASO の設計と詳細な調査を実施した。その結果、intron 1 c.207+196T>A および intron 8 c.1811+326C>T に対して設計したそれぞれの ASO に関して、患者由来細胞に添加処理することで、低下していた XPF 蛋白質の発現が回復した。また、デジタル PCR による mRNA の発現量調査においても、ASO 処理前は、intron 1 c.207+196T>A 変異を持つ患者由来細胞では正常スプライシングが低下し、イントロン 1 を含む異常スプライシングが増加していたところ、ASO 処理後は、正常スプライシングの量が回復し、異常スプライシングの量は減少した。intron 8 c.1811+326C>T 変異を持つ患者由来細胞でも、ASO 処理後に正常スプライシング量の回復が認められた。さらに、これらの回復した mRNA/蛋白質が正常に機能するかを確認するため、DNA 修復活性についても調査した。その結果、intron 1 c.207+196T>A 変異および intron 8 c.1811+326C>T 変異いずれについても、対応する ASO を患者由来細胞に添加処理することで、低下していた修復活性が回復することが確認された。

intron 1 c.207+196T>A 変異および intron 8 c.1811+326C>T 変異について、それぞれの変異部位をブロックする ASO を処理することで、正常な mRNA 発現と蛋白質発現、DNA 修復活性の全てにて回復が認められたことから、これらの変異は疾患原因変異であることが証明されたと考えられる。また同時に、解析に用いた ASO 配列は、そのまま ASO 薬としても検討可能であることを示唆している。

上記解析により、17 例の原因不明症例について、*ERCC41/XPF* 遺伝子のイントロン上の変異が疾患原因であることが明らかとなった。このことから、現在、既知のゲノム不安定性疾患が疑われているものの、疾患原因変異が遺伝子上に特定されない症例に関して、イントロン領域の検討を進めることの重要性が示された。また、これらイントロン領域の変異の探索と検証には、次世代ゲノム解析 (全ゲノム解析、RNAseq 解析) や DNA 修復活性評価などの細胞機能評価を併用するマルチオミクス解析技術が有効であること、さらに ASO による評価を実施することで、変異の検証と同時に治療薬候補の配列を得ることが可能であることも確認された。そこで、新たな疾患原因不明症例について、検討を行ったところ、別の複数のゲノム不安定性疾患症例でも、イントロン深部の変異が抽出されてきた。今回と同様にスプライシング異常を誘発する変異が確認され、偽エクソンが形成されるような新たなタイプの異常も認められた。さらに、これらの新たなタイプの異常に対しても、ASO ブロックは有効であり、ASO 処理後の蛋白質発現回復効果も確認された。今後、これらの変異についてより詳細な解析を進めてゆくほか、さらに対象症例を増やして解析を実施することで、ゲノム不安定性疾患の原因不明症例の解決に繋げてゆく。

<引用文献>

Y. Nakazawa *et al.*, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat. Genet* 44, 586-592 (2012).

N. Jia *et al.*, A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and

cytotoxic effects of DNA-damaging reagents. *Nat. Protoc.* 10, 12-24 (2015).
C. Senju *et al.*, Deep intronic founder mutations identified in the *ERCC4/XPF* gene are potential therapeutic targets for a high-frequency form of xeroderma pigmentosum. *PNAS* 120, e2217423120 (2023).

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Senju C*, Nakazawa Y* (第一著者), Oso T*, Shimada M, Kato K, Matsuse M, Tsujimoto M, Masaki T, Miyazaki Y, Fukushima S, Tateishi S, Utani A, Murota H, Tanaka K, Mitsutake N, Moriwaki S, Nishigori C, Ogi T.	4. 巻 120
2. 論文標題 Deep intronic founder mutations identified in the ERCC4/XPF gene are potential therapeutic targets for a high-frequency form of xeroderma pigmentosum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2217423120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2217423120	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 Senju C, Nakazawa Y, Shimada M, Iwata D, Matsuse M, Tanaka K, Miyazaki Y, Moriwaki S, Mitsutake N, Ogi T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Aicardi-Goutieres syndrome with SAMHD1 deficiency can be diagnosed by unscheduled DNA synthesis test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1048002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.1048002	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 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakazawa Y, Senju C, Oso T, Kato K, Shimada M, Ogi T.
2. 発表標題 Deep intronic mutations identified in XP-F cases are potential therapeutic targets for xeroderma pigmentosum
3. 学会等名 The EXPS Annual Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中沢由華, 岡泰由, 森永浩伸, 何予希, 荻朋男.
2. 発表標題 転写共役修復機構の分子メカニズムとその破綻による生体影響の解明.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中沢由華
2. 発表標題 RPB1-K1268とUVSSA-K414位でのユビキチン化修飾は転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に必要.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html 名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html

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
研究協力者	荻 朋男 (OGI Tomoo)		

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		
オランダ	LUMC		
英国	GDSC		