

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893131

研究課題名(和文)アルポート症候群に対するリードスルー誘導療法を利用した遺伝子治療

研究課題名(英文)Nonsense read-through therapy for Apopt syndrome

研究代表者

野津 寛大(Kandai, Nozu)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70362796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1. アルポート症候群250家系において、遺伝子変異の同定及び遺伝子型と臨床像の相関に関する検討を行い、遺伝子型と臨床型の相関を明らかとしてきた。2. 患者尿中落下細胞の培養により、患者由来尿細管上皮細胞のcell lineの作成に成功した。3. 培養尿細管上皮細胞における4型コラーゲン 5鎖免疫染色を行い、ナンセンス変異を有する細胞では陰性、ミスセンス変異を有する細胞では陽性であることが明らかとなった。4. アンチセンスオリゴを作成し、目的とするエクソンスキッピングを誘導させることに成功した。今後、実際の患者由来細胞に対して投与を行い、その治療効果を判定する。

研究成果の概要(英文)：1. We conducted the genetic analysis for 250 suspected Alport syndrome family members and conducted the genotype-phenotype analysis. 2. From patients urine samples, we collected the urinary sediment cells and cultured those cells, and made the disease specific cell lines for the further experiment. 3. We conducted the immunohistochemical analysis of type IV collagen alpha 5 chain (a5) expression and identified that patients with truncating mutations don't express a5, on the contrary, patients with non-truncating mutations express a5. 4. We designed the antisense-oligonucleotide and tried to lead to exon skipping for some of the specific exons. One of them introduced the exon skipping and possibly lead truncating mutations to non-truncating mutations.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：遺伝性腎疾患 ナンセンスリードスルー療法

1. 研究開始当初の背景

アルポート症候群は重篤な遺伝性腎疾患で、そのほとんどが30歳までに末期腎不全へと進行する。最も頻度の高いX染色体連鎖型アルポート症候群(XLAS)は4型コラーゲン5鎖をコードする遺伝子COL4A5遺伝子の異常で発症する。私たちはこれまで、200家系以上のXLAS患者の遺伝子診断を行ってきた結果、ナンセンス変異を有する患者に比し、ミスセンス変異を有する患者では末期腎不全到達年齢が大幅に遅延することを明らかにした。この事実からナンセンス変異を有するXLAS患者において、ナンセンス変異をリードスルーすることで、臨床症状を軽症化することが可能である。本研究はXLASに対する遺伝子治療の可能性を明らかにする、世界初の研究である。

2. 研究の目的

ナンセンスリードスルー療法やエクソスキッピング療法による、アルポート症候群の治療の可能性につき検討を行う。

3. 研究の方法

(1)すでに遺伝子診断により変異が判明している患者尿中落下細胞の培養により、患者由来尿細管上皮細胞のcell line作成を行う。

(2)培養尿細管上皮細胞における4型コラーゲン5鎖染色を行い、遺伝子変異の種類とその発現の相関関係を再確認する。ナンセンス変異株では陰性であることを確認する。

(3)ナンセンス変異を有する患者培養細胞でgentamicinやatalurenなどstop codonのリードスルーを誘導する薬剤を投与し、mRNAレベルで実際にリードスルーが起こり同部位の3塩基欠失に置換されていることの確認および、それにより4型コラーゲン5鎖が発現することの

確認を行う。

できうる限り多数のナンセンス変異を有する患者において同研究を行い、すべてのナンセンス変異保有患者の培養細胞において同治療が有効であるかの確認を行う。

4. 研究成果

今回私たちは、本研究期間内に以下の研究を行った。

(1)患者における遺伝子変異の同定及び遺伝子型と臨床像の相関に関する検討：私たちはアルポート症候群250家系において、遺伝子診断を行い、遺伝子型と臨床型の相関を明らかとしてきた。その結果、COL4A5遺伝子にミスセンス変異を有する場合、COL4A5遺伝子にインフレーム変異を有する場合、COL4A5遺伝子に体細胞モザイク変異を有する場合、

COL4A5遺伝子にスプライシングに影響を与える変異を有するが、腎臓においては、異常なmRNAと同時に正常のmRNAが産生される場合、腎病理組織の免疫染色で糸球体に4型コラーゲン5鎖の発現を認める場合に臨床症状が軽症であることを次々と明らかとした。(Hashimura Y, Nozu K, Kidney Int 2014;85:1208-13)(Nozu K et al. Clin J Am Soc Nephrol 2014;9:1958-64.)(Nozu K et al. Mol Genet Genomic Med 2014;2:451-3.)(Oka M, Nozu K et al. Pediatr Nephrol 2014; 29: 1535-44)

(2)患者尿中落下細胞の培養により、患者由来尿細管上皮細胞のcell lineの作成に成功した。さらには、尿中落下細胞より腎前駆細胞を抽出し培養することにも成功している。今後、podocyteへと分化誘導を行い、分子標的薬の治療効果判定に用いる予定である。

(3)培養尿細管上皮細胞における4型コラーゲン5鎖免疫染色を行い、遺伝

子変異の種類とその発現の相関関係を再確認を行った。その結果、ナンセンス変異を有する細胞では陰性、ミスセンス変異を有する細胞では陽性であることが明らかとなった。この結果から、分子標的薬の治療効果判定に用いることができることが明らかとなった。

(4) アンチセンスオリゴを作成し、目的とするエクソスキッピングを誘導させることに成功した。今後、実際の患者由来細胞に対して投与を行い、その治療効果を判定する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

1. Alport 症候群の軽症亜型 野津寛大、飯島一誠 Annual Review2015 腎臓 75-79, 2015
2. Nozu K, Iijima K, Ohtsuka Y, Fu XJ, Kaito H, Nakanishi K, Vorechovsky I. Alport syndrome caused by a COL4A5 deletion and exonization of an adjacent AluY. Mol Genet Genomic Med 2014;2:451-3.
3. Nozu K, Vorechovsky I, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, Hashimoto F, Kamei K, Ito S, Kaku Y, Imasawa T, Ushijima K, Shimizu J, Makita Y, Konomoto T, Yoshikawa N, Iijima K. X-Linked Alport Syndrome Caused by Splicing Mutations in COL4A5. Clin J Am Soc Nephrol 2014;9:1958-64.
4. Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, Morisada N, Yan K, Matsuo M, Yoshikawa N, Vorechovsky I,

Iijima K. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. Pediatr Nephrol 2014;29:1535-44.

5. Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, Hashimoto F, Oka M, Ninchoji T, Ishimori S, Morisada N, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Yoshikawa N, Iijima K. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV alpha5 chain. Kidney Int 2014;85:1208-13.
6. 【内科疾患最新の治療-明日への指針】Alport 症候群 . 野津寛大、飯島一誠、内科、6, 1172-1173, 2014

[学会発表](計 5件)

1. Alport 症候群:軽症患者における病理学的および分子生物学的検討 野津寛大 第13回日本腎病理協会研究会 2015年1月10日-11日
2. Alport syndrome, Kandai Nozu, The 12th Japan-Korea Pediatric Nephrology Seminar, 2014 2014/4/19-20
3. X-linked Alport syndrome patients caused by atypical splicing mutations in COL4A5, Kandai Nozu, Naoya Morisada, Hiroshi Kaito, Takeshi Ninchoji, Koichi Nakanishi, Norishige Yoshikawa, Kazumoto Iijima, 47th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Nephrology 2014/9/18-20
4. アルポート症候群-重症軽症を規定する因子に関する再考 野津寛大 第49回日本小児腎臓病学会学術集会 2014年6月5日-7日
5. 遺伝性腎疾患の遺伝子診断方法とその意義 野津寛大 第31回新潟小児腎臓病フォーラム 2014年11月7日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野津 寛大 (NOZU, Kandai)

神戸大学・医学部附属病院・周産母子
センター・講師

研究者番号： 70362796

(2)研究分担者

飯島 一誠 (IIJIMA, Kazumoto)

神戸大学・大学院医学研究科・内科系
講座小児科・教授

研究者番号： 00240854

(3)連携研究者

庄野 朱美 (SHONO, Akemi)

神戸大学・大学院医学研究科・内科系
講座小児科・技術補佐員

研究者番号： 10535066