

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860796

研究課題名(和文) FLNA異常症の病態解析、診療基盤の確立、および特異的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathology and development of specific medical care system and treatment associated with FLNA deficiency

研究代表者

河合 朋樹 (Kawai, Tomoki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20631568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Filamin A (FLNA) 遺伝子はX染色体に存在し、女性はその異常により多彩な臨床像を呈呈するが、男性は通常胎生致死である。本研究では、非典型的なFLNA異常症の兄弟例の解析を通じ、FLNA異常症は従来の想定以上に臨床像の幅が広く、また内因性のエキソンスキップがその臨床像の多彩さに影響しうる可能性を示した。またエキソンスキップ誘導が患者の治療につながる可能性を示した。さらに巨大分子のため遺伝子診断が煩雑な本疾患において血小板を用いた迅速診断法の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Loss-of-function mutations in FLNA cause variable multiple organ complications in females and are typically lethal to males. This study investigated familial male cases with a loss-of-function mutation in FLNA who showed atypical mild clinical courses. A 4 bp deletion in exon 40 was detected, which was predicted to cause a lethal premature protein truncation in the patients. However, intrinsic induced in-frame skipping of the mutated exon led to the translation of a mutant FLNA missing an internal region of 41 amino acids. The exon-skipped FLNA protein was revealed to restore partially its function comparable to the wild type FLNA. The present study expands the diversity of the phenotypes associated with loss-of-function mutations in FLNA and indicated induction of exon skipping could be a therapeutic option. In addition, this study indicated the usefulness of rapid diagnosis using FLNA immunostaining of platelets.

研究分野：小児科学

キーワード：FLNA エキソンスキップ

1. 研究開始当初の背景

Filamin A (FLNA) 遺伝子は X 染色体に存在し、多系統の組織に普遍的に発現する。アクチン細胞骨格構築の形成に関わり、その異常により多彩な臨床像を呈する (Trends cell Biol 2010, 20:113)。主に機能亢進変異により Otopalatodigital-spectrum disorders とよばれる難聴を伴う骨形成異常、主に機能欠損または機能低下変異で periventricular nodular heterotopia (PVNH) という難治性のもてんかんと認知障害を特徴とする脳皮質形成異常、早期の弁置換を要する心臓弁膜症、難治性出血傾向を示す血小板減少症、エーラーズ・ダンロス症候群、中心静脈栄養を要する Chronic Intestinal Pseudo-obstruction syndrome (CIPS) など、患者 QOL を著しく損なう多彩な慢性合併症を伴う (brain 2006, 129:1892)。機能欠損または機能低下変異では通常男性は劣性遺伝により胎生致死となり、出生しえた男性の多くは重篤な心不全や凝固異常により乳児期早期に死亡すると報告されている (Am J Hum Genet 2007, 80:751)。

研究代表者、河合朋樹は FLNA 異常症の兄弟例で、腸回転異常症、心臓弁膜症、鼠径ヘルニア、血小板減少症を合併したものの、FLNA 異常症に典型的な症状である PVNH を発症せず、生直後から CIPS を発症するも自然軽快し、1 才には無治療となった非典型的な症例を見いだした。さらに特記すべき点として兄は 4 才からこれまでに報告のない炎症性腸疾患を発症している。原因遺伝子を網羅的に検索すべく SNP アレイ解析、及び全エクソン解析による家族内解析を行ったところ FLNA 遺伝子 exon39 の 4 塩基欠失を同定した。本変異は早期ストップコドンにより正常では約 280kDa の蛋白が約 250kDa となり、男性では致命的と予想されるものであった。しかしながら本兄弟例の臨床像は想定に比し軽微であり、かつ非典型的な臨床像であ

った。

2. 研究の目的

上記兄弟例が非典型的な経過を呈した機序を解明し、ひいては FLNA 異常症が多様な症状・合併症を発症する機序を解明する。それを通じて、まだ十分把握されていない本邦における FLNA の臨床像を明らかにし、有効な治療法の開発につなげる。

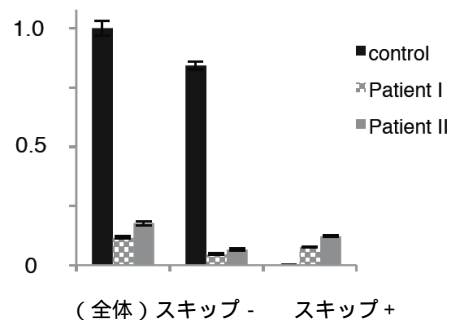
3. 研究の方法

患者検体由来の RNA、蛋白を解析することにより、本来致命的と予想される上記 FLNA 異常の兄弟例が軽微な臨床像を呈した原因を解明する。

また FLNA 遺伝子がエクソン数 48 と多く、また広範囲欠失も多いことから従来用いられていたサンガー法の塩基配列解析手法では実用性に乏しく、このことが遺伝子診断なされず FLNA 異常症の実病像が把握されていなかった。これに対し、次世代シーケンサーの導入した診断法を確立することで、少ない労力かつ低コストで行える実用的な診断体制を構築する。これにより本邦の FLNA 異常症の臨床像を把握し、標準的な診断法・治療法の開発につなげる。

4. 研究成果

FLNA 異常兄弟例の RNA 解析を行った結果、本症例で発現している大部分の RNA は 4 塩基欠失部位を含むエクソンがスプライシングスキップされたものであった。(図 1)



(図 1) FNLA RNA 発現量

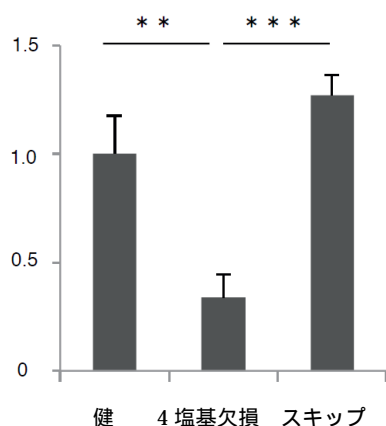
これに伴い発現した RNA はインフレームとなり、スキップしたエキソンがコードする 41 アミノ酸が欠失すると予想されるものであった。さらに FNLA 蛋白の解析から、ほぼ正常相当の長さの FLNA 蛋白が発現していた。これはエキソンスキップにより発現すると想定される 41 アミノ酸欠失の FLNA 蛋白長と同等であり、エキソンスキップにより FLNA の機能が回復していることが示唆された。(図 2)

(kDa) 健 母 兄 弟



(図 2) 兄弟症例の FNLA 蛋白発現

さらにメラノーマ細胞株を用いた機能解析において、この 41 アミノ酸欠失 FLNA は、FLNA の機能であるインテグリン結合能や細胞接着能について、正常 FLNA と同等であることを確認した。(図 3)



(図 3) FNLA 導入細胞株接着能

一方、本症例由来検体を用いた FLNA の RNA・蛋白の定量解析したところ、本症例の FLNA の RNA・蛋白の発現量は健常人と比較し低下していた。またキャリアである母親は X

染色体のランダム不活化により、正常 FLNA と変異 FLNA を発現する細胞が混在する。この母親の血球を用いた FLNA の免疫染色を行ったところ、FNLA 発現正常細胞と発現低下細胞が混在しており、その比率は血液細胞の分画により特に目立った偏りは認めなかった。以上の結果から、本症例ではエキソンスキップにより、機能が回復した FLNA 蛋白が低発現したことにより、致命的経過にならず、非典型的な臨床像を呈したと考えられた。この結果は後述する英文雑誌および学会発表にて報告した。

この知見により FLNA 異常症は想定以上に臨床像の幅が広く、またエキソンスキップがその臨床像の多彩さに影響している可能性が示唆された。さらに申請者は連携協力者の日本医科大学形態解析共同研究施設の鈴木英紀、および国立病院機構名古屋医療センター高度診断研究部の國島伸治らの協力で FLNA が血球では特に血小板に多く発現し、その異常では、従来から知られている巨大血小板減少症以外に、FLNA 蛋白の発現が低下や特徴的な構造異常を呈することを確認した。このことは血小板解析が FLNA 異常症のスクリーニングに有効となりうることを示した。さらに理化学研究所の小原収らの協力のもと、FLNA 遺伝子診断法を確立するとともに、エキソンスキップを認めた本兄弟例を再現する FLNA 変異ノックインマウスを作成した。これらの体制により、FLNA 異常症の診断体制を整備するとともに、血小板を用いた迅速診断法により、本疾患の疫学、臨床像を明らかにすることが可能となった。また FLNA はジストロフィンと類似した繰り返し構造をしており、また変異の多くはフレームシフトを伴う変異である (Trends cell Biol 2010, 20:113)。このことから Duchenne 型筋ジストロフィー

ですで行われてるエキソンスキップの誘導(Nature communications 2011, 2:308)が患者の治療につながる可能性がある。作成している FLNA 変異ノックインマウスの解析は FLNA 異常症の病態解明のみならず、エキソンスキップへの表現形への影響の評価、さらにはエキソンスキップを利用し治療法開発につながる。FLNA は臓器の発生や悪性疾患の転移にも関わっていることが知られており、その解析は FLNA 異常症患者の診断治療のみならず、自然科学の発展にも寄与することが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Oda H, Sato T, Kunishima S, Nakagawa K, Izawa K, Hiejima E, Kawai T, Yasumi T, Doi H, Katamura K, Numabe H, Okamoto S, Nakase H, Hijikata A, Ohara O, Suzuki H, Morisaki H, Morisaki T, Nuno H, Hattori S, Nishikomori R, Heike T. Exon skipping causes atypical phenotypes associated with a loss-of-function mutation in FLNA by restoring its protein function. Eur J Hum Genet. 2016 Mar;24(3):408-14.

〔学会発表〕(計 1 件)

FLNA 異常症男性患者の血小板機能評価
小田紘嗣, 國島伸治, 鈴木英紀, 河合朋樹,
西小森隆太, 小原収, 平家俊男
第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015 年
5 月 21-13 日、山梨

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合 朋樹 (Kawai Tomoki)
京都大学医学部附属病院小児科
助教
研究者番号: 20631568

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小原収 (Ohara Osamu)
理化学研究所
免疫ゲノミクス研究グループ
グループディレクター
研究者番号: 20370926

鈴木英紀 (Suzuki Hidenori)
日本医科大学形態解析共同研究施設
准教授
研究者番号: 30158977

國島伸治 (Kunishima Shinji)
国立病院機構名古屋医療センター
高度診断研究部分子診断研究室
室長
研究者番号: 60373495

小田紘嗣 (Oda Hirotsugu)
田附興風会 医学研究所北野病院
小児科 副部長
研究者番号: 20772239

日衛島栄太郎 (Hiejima Eitaro)

京都大学医学部附属病院小児科

医員

研究者番号:60773520