

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11041

研究課題名(和文) 患者口腔粘膜線維芽細胞を用いた新規遺伝子変異によるゴーシェ病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Characterization of Gaucher disease by new gene mutation using patient-derived oral mucosa fibroblasts

研究代表者

三好 圭子 (MIYOSHI, Keiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：20304537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室のゴーシェ病(GD)患者由来線維芽細胞が異型GDの遺伝的背景を持つことが示唆されたため、GCCase酵素活性を修飾する新規モディファイヤー遺伝子の探索を行った。異型GD患者とご家族の口腔粘膜線維芽細胞(OF)を用いたexome解析結果から候補遺伝子を探索するために、transcriptome解析と種々のin silico解析を駆使したが困難を極めた。そこで、簡便なGCCase活性解析法(intact cell assay)を確立し、現在siRNAによる探索を行っているが、本研究期間内に終えることはできなかった。また、同時にGBAの分子構造と発現調節機構の再解析を行い、新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder with autosomal recessive inheritance. Previously we established the oral mucosa fibroblasts (OFs) derived from an "GD" patient and find he is "atypical GD" by whole exome sequencing. Together with OFs from his family, we found large number of SNPs. To minimize the candidate genes, we performed in silico analysis and transcriptome analysis, however, the molecular basis of GBA is limited. We also established the high-through-put assay system, intact cell GCCase activity assay. SiRNA screening of modifier genes is prepared and analyzing, however, we could not be completed during this research period. In addition, we confirmed the gene structure and expression profile of GBA variants.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ゴーシェ病 口腔粘膜線維芽細胞 exome解析 モディファイヤー検索 intact cell GCCase assay

## 1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病はリソソーム蓄積病の一つで、*GBA* 遺伝子変異が原因とされる常染色体劣性の遺伝性代謝疾患であり、現在厚生労働省難治性克服事業の対象疾患となっている希少難病の一つである。*GBA* 遺伝子は、細胞内リソソームの加水分解酵素の一つである  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ(GCase)をコードし、GCase 活性の低下によりグルコセレブロシドの細胞内蓄積を引き起こし、肝脾腫、けいれん、貧血、血小板減少や中枢神経症状等を引き起こす。

現在、原因と言われる *GBA* 遺伝子の変異は 300 以上報告されている(Human Mutation, 2008)が、その遺伝子型と表現型の相関が必ずしも認められず、未だ原因変異が不明の患者も多い。従って患者の治療には、遺伝子診断と病態予測の充実や、治療法開発のためのヒトの細胞による *in vitro* 疾患モデル系の構築が重要である。

そこで申請者らは、口腔粘膜由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞を樹立した実績 (Miyoshi et al., J Biosci Bioeng, 2010) をもとに、ゴーシェ患者由来口腔粘膜線維芽細胞から疾患 iPS 細胞株の樹立に成功した (三好、招待講演、HBS 公開シンポジウム 2013)。

ところが、遺伝子変異確定のため、患者および家族の口腔粘膜線維芽細胞を用いてゲノム解析および酵素活性の測定を行ったところ、従来のゴーシェ病の定義とは異なる結果が得られ、既知の *GBA* 遺伝子変異の他に、未知の原因遺伝子変異が病態に関与している可能性が示唆された (基盤研究(C)H24~H26、未発表データ)。

近年、ゴーシェ病の定義の一つである GCase 活性の低下が、GCase タンパク質の品質管理機構関連因子 (Human Mutation, 2012) や、タンパク質の輸送機構(Hum Mutat., 2011)、酵素活性制御タンパク質(Mol Genet Metab. 2012)等の遺伝子変異によって引き起こされることや、*GBA* 遺伝子のヘテロ変異がパーキンソン病のリスク因子の一つとして報告されていること(Trends Mol Med., 2011)から、この未知の原因遺伝子変異と GCase 活性、および病態との関連を解明することは、ゴーシェ病の新たな遺伝子診断と病態予測、治療法の開発に繋がるとともに、現在の高齢化社会における神経系の難病医学の発展に大きく貢献できると考えた。

## 2. 研究の目的

ゴーシェ病患者およびそのご家族の口腔粘膜線維芽細胞を用いて、GCase 活性を抑制する新規原因遺伝子変異を同定し、すでに樹立に成功している患者由来口腔粘膜線維芽細胞および iPS 細胞により、その病態発症メカニズムを解明するとともに、口腔粘膜線維芽細胞を用いたオーダーメイド *in vitro* 診断システムの構築を図ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種委員会の承認取得

- ① 徳島大学病院臨床研究倫理委員会  
: 承認番号 #1130, 1533
- ② 徳島大学遺伝子解析組み換え実験安全管理委員会  
: 承認番号 #26-104
- ③ 徳島大学動物実験委員会  
: 承認番号 #徳動物 14122
- ④ 徳島大学ヒトゲノム研究倫理委員会  
: 承認番号 #H26-20, #H27-57

### (2) エクソーム解析結果のデータマイニング (*in silico* 解析)

- ① Mutation Taster によるアミノ酸の変化に伴うタンパク質の機能変化予測
- ② BioGRID による分子間相互作用データベースに基づく GCase 結合タンパク質スクリーニング
- ③ 患者・家族の口腔粘膜線維芽細胞由来 RNA を用いたマイクロアレイ解析結果とエクソーム解析結果の比較検討

### (3) ハイスループット酵素活性測定法 (intact cell assay 系)の確立

4-Methylumbeliferylbeta-D-glucopyranoside(4-MU-Glc)を基質とし、①cell lysate assay 系または②intact cell assay 系における以下の酵素反応により生じた 4-Methylumbeliferon (4-MU)の蛍光強度を測定した。

- ① cell lysate assay : GCase を含む細胞抽出液と基質を 37°C で 40 分間反応
- ② intact cell assay : 細胞培養系に直接基質を添加し 37°C で 3 時間反応

### (4) *GBA* 遺伝子 5'側の構造とバリエーションの発現パターン解析

ヒト皮膚線維芽細胞株由来 RNA を用いて *GBA* 遺伝子の 5'側 RML-RACE を行い、転写開始点を決定したのち、各バリエーションの発現パターンを qPCR にて解析した。

### (5) In frame の上流 ATG からの翻訳産物の検討

既知の翻訳開始コドンと in frame で存在する上流 ATG から高分子量の GCase が発現する可能性について、CMV プロモーターを用いた、標識タグ付き GCase 発現ベクターを構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入した。細胞を回収し、タンパク質を抽出したのち、ウェスタンブロットにより、tag 抗体を用いて発現の有無を検討した。

### (6) siRNA スクリーニングによる新規モデルファイヤー遺伝子の探索

エクソーム解析結果のデータマイニングにより選択した遺伝子群について siRNA を各 2 種類デザイン・合成し、健常ボランティアの口腔粘膜線維芽細胞に

RNAiMax(Invitrogen)にて siRNA を導入し、確立したハイスループット intact cell assay 系にて酵素活性を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) エクソーム解析結果のデータマイニングによる候補遺伝子の選択 (*in silico* 解析)

患者とその家族の口腔粘膜線維芽細胞由来ゲノム DNA を用いたエクソーム解析をすでに行っていたが、全体で 19,293 個の SNPs から候補遺伝子を絞り込むことは容易ではない。遺伝様式および各 GCCase 活性を指標に SNPs を指標に 1,103 個まで絞り込んだが、機能解析を行うためにはさらに候補を絞る必要がある。

そこで、アミノ酸の変化に伴うタンパク質の機能変化予測を行い、進化上の保存性やスプライス-サイトの変化、タンパク質構造の変化、mRNA 量への影響等も考慮して影響を予測する「Mutation Taster」による評価に注目し、(A) disease-causing automatic, (D) disease-causing, (N) polymorphism, (P) polymorphism automatic のうち、A・D 評価で検討して 164 個程度とした (図 1)

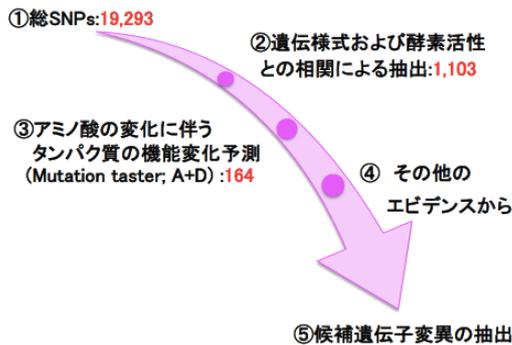


図 1 エクソーム解析の絞り込み

さらに BioGRID による分子間相互作用データベースに基づく GCCase 結合タンパク質スクリーニングを行ったところ、まだ報告が少なく、SNPs の中に含まれているものでは該当数は 4 個であった。

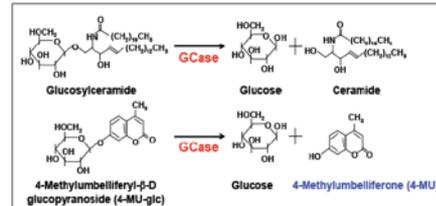
また、患者・家族の口腔粘膜線維芽細胞由来 RNA を用いたマイクロアレイ解析結果とエクソーム解析結果を比較検討したが、SNPs と発現レベルとに相関のあるものは見つからず、酵素活性に影響を及ぼす可能性のあるものについてはさらなる解析が必要であり、現時点では候補遺伝子のさらなる絞り込みはできなかった。

##### (2) ハイスループット酵素活性測定法 (intact cell assay 系)の確立

モディファイヤー遺伝子を同定するための評価は、GCCase 活性によって行う。そのため、簡便かつ一度に多検体を評価できるハイスループットなアッセイ系が

必要である。そこで、96 well plate に細胞を播種し、plate 内で酵素反応を行える intact cell assay 系の報告(Cell 134, 769-81, 2008)を基に、口腔粘膜線維芽細胞を用いたアッセイ系として改変し、確立した (図 2、図 3、図 4)。

##### GCCase酵素活性測定原理



プレートリーダーにて4-MUの蛍光シグナルを測定し、酵素反応時間とタンパク質量で補正して酵素活性値とする。

GCCase activity (nmol/h/mg protein)

図 2 GCCase 活性測定原理

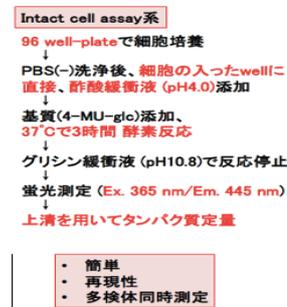


図 3 Intact cell assay

##### Intact cell assayによるGCCase酵素活性測定法の確立

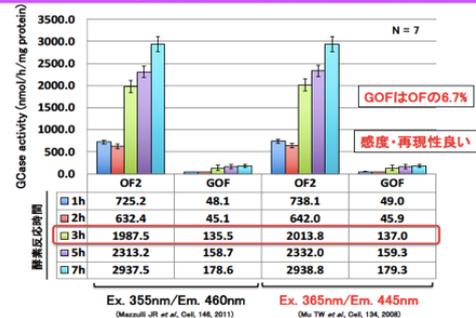


図 4 Intact cell assay の確立

##### (3) GBA 遺伝子 5'側の構造とバリエーションの発現パターン解析

候補遺伝子群の選択に困難をきたす要因の一つとして、GCCase の分子構造と機能制御機構情報が極めて少ないことがある。そこで、GCCase をコードする GBA 遺伝子の構造と発現制御機構について再検討したところ、図 5 に示す遺伝子構造の全体像を明らかにした (投稿準備中)。



図 5 GBA 遺伝子構造 (P: promoter)

また、各バリエーションの発現パターンを qPCR にて解析した結果、これまでとは異なる GBA 発現制御機構の存在を示唆する結果を得た (data not shown)。以上については現在、論文投稿準備中である。

(4) In frame の上流 ATG からの翻訳産物の検討

さらに、既知の翻訳開始コドンと in frame で存在する、上流 ATG から高分子量の GCCase が発現する可能性(69k)について、CMV プロモーター下に標識タグ付き 5'UTR+GBAcids を挿入した発現ベクターを構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入し、tag 抗体を用いてウェスタンブロットにより、高分子量の GCCase 発現を検討したが、69k に相当するバンドは検出されなかった (図 6)。

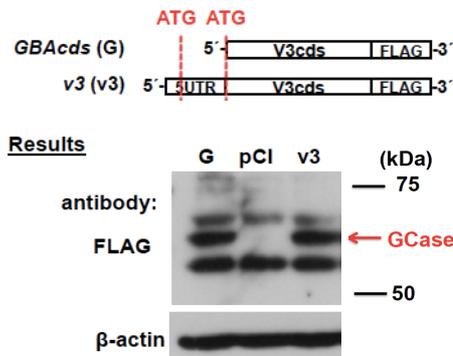


図 6 GCCase (60k)のみ検出

(5) SiRNA スクリーニングによる新規モディファイヤー遺伝子の探索

上述のエクソーム解析結果のデータマイニングにより選択した遺伝子群について siRNA を各 2 種類デザイン・合成した。

まず健常ボランティアの口腔粘膜線維芽細胞に siRNA を導入する条件検討を行った。口腔粘膜線維芽細胞は通常の細胞より遺伝子導入が困難である。コントロールとして validation 済みの GAPDH に対する siRNA を用いて、タンパク質レベルを指標にリポフェクションの条件を検討した (図 7)

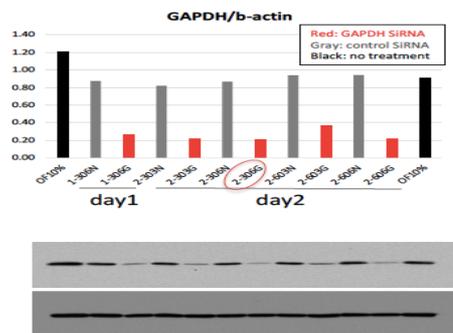


図 7 GAPDH siRNA による発現抑制

この条件を用いて、現在、モディファイヤーのスクリーニングを行っているが、本研究期間内に終わらせることができなかった。

(6) 総括

本研究成果を総括する。本研究は、

- 1) 新規異型ゴーシェ病患者とそのご家族の口腔粘膜線維芽細胞を用いたエクソーム解析結果をもとに、ゴーシェ病の既知の原因遺伝子 GBA がコードする GCCase の酵素活性を修飾する新規モディファイヤー遺伝子の変異同定
- 2) 異型ゴーシェ病の発症メカニズム解明
- 3) 歯科領域として強みのある口腔粘膜線維芽細胞を用いた新規遺伝子診断、病態予測・治療法の開発による神経系の難病医学発展への貢献、

の 3 大目標を有するチャレンジングなものであった。

ところが、最初のステップである新規モディファイヤー遺伝子の変異同定が極めて困難であった。その理由は、情報の少なさである。今回行った解析法は、既存のデータベースに依存したタンパク質の機能予測やタンパク質間相互作用のみであり、その内容には限界があり、未報告の重要な遺伝子変異を見逃す危険があると考えられる。今回は、サンプル間の遺伝子背景と酵素活性等の情報から、遺伝子発現制御機構が極めて重要であることが示唆されたため、当初計画にはなかったが、GBA 遺伝子構造の再解析を行った (論文投稿準備中)。今後、さらなる基本的 GBA 分子実態の解明は重要であろう。また、サンプル数が少ないことをカバーする一つの方向性として、種々のオミックス解析を駆使したトランスオミックスによる包括的アプローチの必要性も考えられる。本研究は現時点では未完であるが、新規モディファイヤー遺伝子の同定は、現在原因不明のゴーシェ患者の新たな標的を提供し、新規診断・治療へと結びつく可能性のある重要な課題であり、継続の必要性がある。

また、本研究で樹立したハイスループット intact cell assay の系は、多検体を一度に処理することが容易であり、口腔粘膜線維芽細胞は、現在使われている皮膚線維芽細胞よりも維持培養が簡単なことから、診断の一助として提案できると考えている。

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 1 件)

1. Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, Noma T. Gene signature of human oral mucosa fibroblasts: comparison with dermal fibroblasts and induced

pluripotent stem cells. Biomed Res Int., 査読有, 2015; 2015:121575.

[学会発表] (計 3 件)

1. 三好圭子, 萩田浩子, 谷村綾子, 堀口大吾, 野間隆文. GBA 遺伝子 5'側バリエーションの発現パターン解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio 2017, 2017 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド (兵庫, 神戸市)
2. 三好圭子. 口腔粘膜線維芽細胞の代謝と細胞の特性～トランスクリプトーム解析からのアプローチ～. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 30 日, 長崎大学坂本キャンパス(長崎・長崎市), 招待講演.
3. 三好圭子. 新規異型ゴーシェ病メカニズムの探索. 平成 27 年度革新的特色研究シンポジウム「再生医学研究プラットフォームの構築と臨床応用への展開」, 2016 年 1 月 27 日, 徳島大学 (徳島・徳島市).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三好 圭子 (MIYOSHI, Keiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号：20304537

### (2)研究分担者

野間 隆文 (NOMA, Takafumi)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：40189428

堀口 大吾 (HORIGUCHI, Taigo)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：70304532