

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19597

研究課題名(和文)先天性大脳白質形成不全症の新規発症機序：ミトコンドリアへの低分子RNA輸送障害

研究課題名(英文) A new pathogenesis of myelin-related disorders: a dysfunction of small RNA import into mitochondria

研究代表者

菊池 敦生 (Kikuchi, Atsuo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30447156

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)：先天性大脳白質形成不全症は中枢神経系の髄鞘形成不全を呈し遺伝学的背景は多様である。申請者らは先天性大脳白質形成不全症の家系例からミトコンドリアへ低分子RNAを輸送するタンパクをコードする新規候補遺伝子を同定していた。同一遺伝子の変異症例検索と遺伝子改変マウスや培養細胞による機能解析から本遺伝子が先天性大脳白質形成不全症の原因と証明することが本研究の目的である。培養細胞の機能解析により患者変異がこのタンパクの機能障害を起こすことを示した。CRISPR/Cas9による遺伝子改変マウスを作成し、胎生致死であることを示した。同一遺伝子の変異症例は同定されず、極めて希少な症例であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that impaired transcription or mitochondrial translation of small RNAs can cause abnormal myelination. We identified two siblings with "gene X" mutations who presented delayed myelination as well as mitochondrial dysfunction. The protein X facilitates the import of small RNAs into mitochondria. In this study, analyses of skin fibroblasts from the patient showed that import of the small RNA RNase P into mitochondria was impaired. Exogenous expression of wild-type PNPT1, but not mutants, rescued ATP production in patient skin fibroblasts, suggesting the pathogenicity of the identified mutations. We also generated mice carrying mutations in gene X. The first line of the mice results in embryonic lethal. We found no gene X mutations in 20 patients with dysmyelination.

研究分野：小児神経学

キーワード：髄鞘化 ミトコンドリア 低分子RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性大脳白質形成不全症の一部は低分子 RNA 関連遺伝子異常による。

先天性大脳白質形成不全症は中枢神経系の髄鞘形成不全を呈する疾患群である。約半数を *PLP1* 遺伝子異常による Pelizaeus-Merzbacher 病が全体の半数程度を占めるが、残りの遺伝学的背景は多様であり、どの病型にもいまだ確立された治療法はない。近年網羅的ゲノム解析により原因遺伝子の同定が進み、その中に低分子 RNA の転写や翻訳に関わる遺伝子群が含まれていた。このことから低分子 RNA の機能低下が先天性大脳白質形成不全症を引き起こすという新たな病態の機序が示唆され注目を集めている。

(2) 先天性大脳白質形成不全症家系よりエクソーム解析にて新規候補遺伝子 X を見出した。

申請者らは先天性大脳白質形成不全症の一家系について、患者由来線維芽細胞の増殖能や形態学的変化よりミトコンドリア機能不全を示唆する実験結果を得ていた。家系情報からは常染色体劣性遺伝形式による発症が想定され、エクソーム解析にて新規候補遺伝子 X を同定した。患者はナンセンス変異と高度に保存された領域のミスセンス変異からなる複合ヘテロ接合体であった(図1)。線維芽細胞での遺伝子産物 X のウエスタンブロットによる発現解析では、コントロールと比べて有意に低下していた(図2)。以上より、遺伝子 X が原因遺伝子であると推察された。

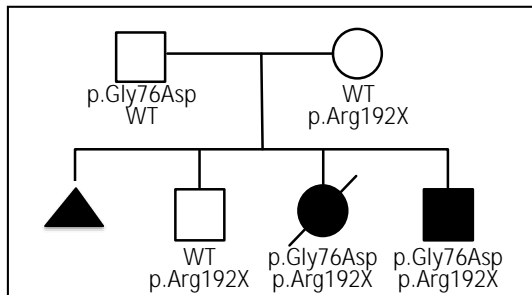


図1. 先天性大脳白質形成不全症家系

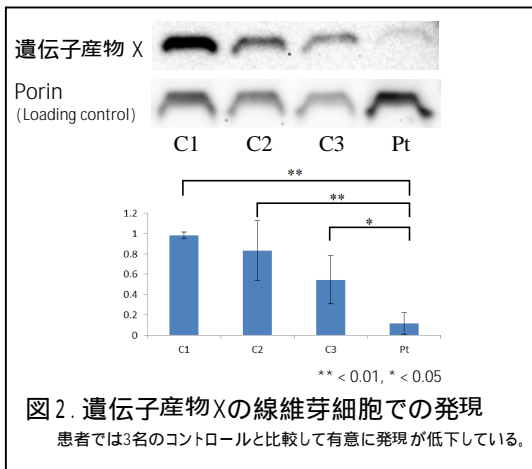


図2. 遺伝子産物 X の線維芽細胞での発現
患者では3名のコントロールと比較して有意に発現が低下している。

(3) 先天性大脳白質形成不全症はミトコンドリアへの低分子 RNA 輸送を担う遺伝子の異常によっても発症するという仮説を立てた。

この遺伝子 X はミトコンドリアへの低分子 RNA 輸送に関わるタンパクをコードする。患者の線維芽細胞においてミトコンドリア機能不全が示唆されたことに合致している。この遺伝子は先天性大脳白質形成不全症の原因遺伝子として現在まで報告されていない新規候補遺伝子であった。

近年、先天性大脳白質形成不全症の原因遺伝子として tRNA を含む低分子 RNA の転写に関わる RNA polymerase III のサブユニットをコードする *POLR3A/POLR3B* 遺伝子、およびミトコンドリア tRNA 合成酵素をコードする *DARS2*, *RARS* 遺伝子などの一連の遺伝子群が原因遺伝子として報告され注目されている(図3)。これらの研究によって低分子 RNA が発症に関わることが示唆されていたが、本研究による新規原因遺伝子としての遺伝子 X の同定は、ある種の低分子 RNA がミトコンドリアへ輸送されることが白質形成に必須であり、その障害は先天性大脳白質形成不全症を引き起こすという新たな機序を加えることにつながると考えられる。

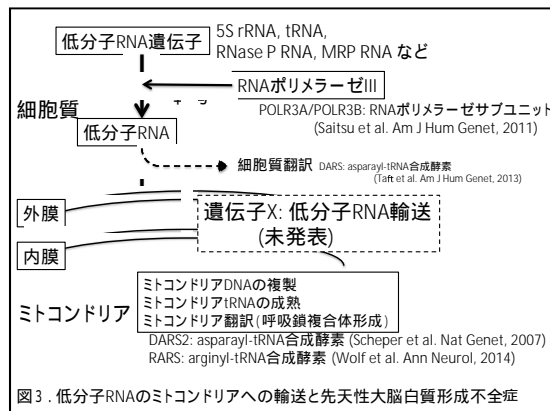


図3. 低分子RNAのミトコンドリアへの輸送と先天性大脳白質形成不全症

2. 研究の目的

以下のように遺伝子 X が先天性大脳白質形成不全症に関わることを示し、その機序を解明する。

- 遺伝子 X の変異を有する先天性大脳白質形成不全症患者が他に存在することを見出す。
- 患者の変異を有する遺伝子改変マウスを作成し、大脳白質形成に障害を来すかを中心に表現型を解析し、遺伝子 X の変異によって患者の表現型が再現されるか示す。
- 遺伝子 X の患者の変異によって低分子 RNA のミトコンドリアへの輸送機能が低下していることおよびミトコンドリア機能が低下していることを患者の線維芽細胞により示す。

3. 研究の方法

- (1) 新規候補遺伝子 X に変異を有する先天性大脳白質形成不全症症例の検索

新規候補遺伝子 X が先天性大脳白質形成不全症の原因遺伝子であることを遺伝学的に示すためには、血縁関係のないもう一人の変異保有患者の発見を必要とする。国内の先天性大脳白質形成不全症研究者に協力を仰ぎ患者 DNA 検体の収集を図る。また、すでにエクソーム解析を終了している一部の施設に対しては同一の変異がないか個別の問い合わせを行う。

- (2) CRISPR/Cas9 システムによる患者の変異を有する遺伝子改変マウスの作成と表現型解析

患者の変異はナンセンス変異と高度に保存された領域のミスセンス変異であった。完全ノックアウトマウスは胎生致死であり (Cell, 2010)、ナンセンス変異は明らかに有害である。そこで、患者のミスセンス変異をもつ遺伝子改変マウスを作成する。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 による短時間・低コストでの遺伝子改変マウスの作成システムを分子血液学分野が構築中であり、支援を得て作成する。

- (3) 培養細胞を用いた酸化ストレス存在下での野生型あるいは変異型 cDNA によるレスキュー実験

L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) による酸化ストレス存在下での培養細胞の細胞生存性アッセイを行う。ミトコンドリア機能障害のある細胞は BSO による酸化ストレスによって細胞生存性が低下する。さらに候補遺伝子の野生型あるいは変異型 cDNA を患者線維芽細胞で強制発現させ、細胞生存性が回復するか検討し、この遺伝子変異がミトコンドリア機能を低下させているか検証する。

- (4) 培養細胞による低分子 RNA 輸送障害の解析

ミトコンドリアへの低分子 RNA 輸送機能を検討する。ラジオアイソトープで標識した低分子 RNA と線維芽細胞から単離したミトコンドリアを培養し、取り込まれた RNA をノーザンブロッティングで検出し (Cell, 2010)、低分子 RNA の輸送が障害されているか患者とコントロール間で比較する。

4. 研究成果

- (1) 新規候補遺伝子 X に変異を有する先天性大脳白質形成不全症症例の検索

国内の先天性大脳白質形成不全症研究者の協力により原因不明の先天性大脳白質形成不全症の患者 20 名の DNA 検体から候補遺伝子 X の変異を検索した。また、ミトコンドリア病症例を収集し、すでにエクソーム解析を終了している施設に対しては同一の変異がないか問い合わせたが該当症例はなかった。これらの結果は本遺伝子の変異による疾患が極めて希少であることを示している。

- (2) CRISPR/Cas9 システムによる患者の変異を有する遺伝子改変マウスの作成と表現型解析

遺伝子 X に変異をもつ遺伝子改変マウスを作成に成功した。はじめに作出されたマウスは 4 塩基欠失であり、既報同様に胎生致死であることを確認した (表 1)。次いで 6 塩基欠失の変異をもつマウスが作成された。フレームシフトを起こさない変異であるため、より軽い表現型であることが期待され、現在解析中である。患者のミスセンス変異を有するノックインマウスの作成には研究期間内には至らなかった。

表 1: 4 塩基欠失マウス交配表

	w/w	w/m	m/m	計	カイ二乗検定
胎生 9.5 日	14 (7.25)	15 (14.5)	0 (7.25)	29	p = 0.0011
胎生 11.5 日	10 (6.5)	16 (13)	0 (6.5)	26	p = 0.0107
胎生 15.5 日	15 (9.75)	24 (19.5)	0 (9.75)	39	p = 0.0011
生後 28 日	14 (13.25)	39 (26.5)	0 (13.25)	53	p < 0.0001
w: 野生型 (wild type), m: 変異型 (mutant type)					
カッコ内の数値は理論値					

- (3) 培養細胞を用いた酸化ストレス存在下での野生型あるいは変異型 cDNA によるレスキュー実験

BSO による酸化ストレス存在下では患者培養細胞の細胞生存性 (ATP 産性能) は著明に低下した (図 4)。これにより患者ではミトコンドリア機能障害を呈していることが示唆された。さらにこの細胞生存性の低下は候補遺伝子の野生型 cDNA のみで (変異型 cDNA ではなく) 回復することが判明し (図 5)、この遺伝子 X の変異がミトコンドリア機能を低下させていることが示された。

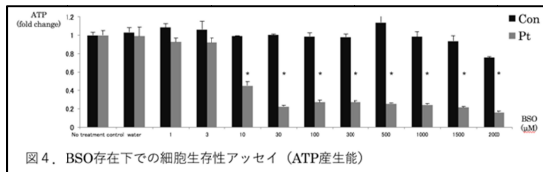


図4. BSO存在下での細胞生存性アッセイ (ATP産生能)

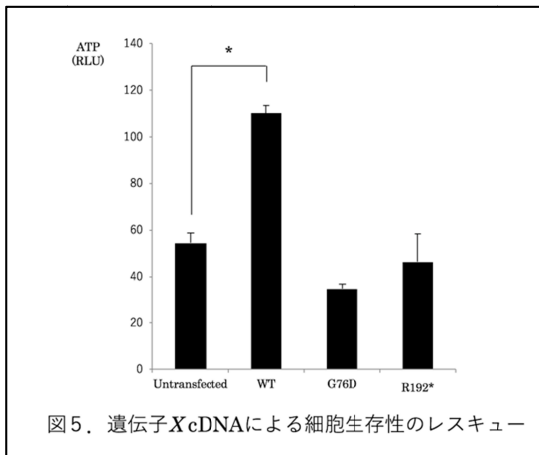


図5. 遺伝子XcDNAによる細胞生存性のレスキュー

(4) 培養細胞による低分子RNA 輸送障害の解析

ミトコンドリアへの低分子RNA 輸送機能を検討した。患者線維芽細胞ではコントロールとくらべ *RNaseP* RNA (低分子RNA) の輸送が障害されていることが示された (図6)。

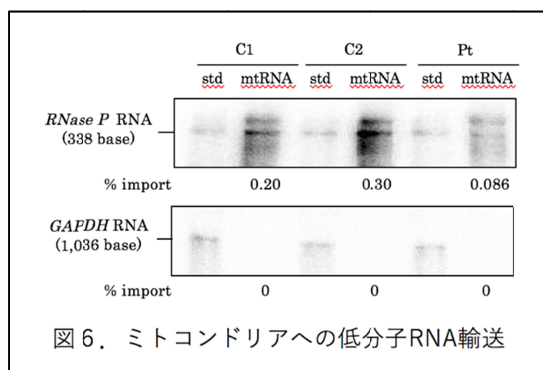


図6. ミトコンドリアへの低分子RNA輸送

(5) まとめ

上記の結果から、遺伝子Xの変異により患者の表現型が起こっていることを機能的に証明することができた。これら本研究の結果をまとめ、現在論文投稿中である (**Clinical Genetics**, In revision)。

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3件)

1. Shi R-M, Kobayashi T, Kikuchi A, Sato R, Uematsu M, An K, et al. (計7人、3番目 [**corresponding author**]) Phenytoin-responsive epileptic encephalopathy with a tandem duplication involving FGF12. *Neurol Genet.* 2017 Feb 1;3(1):e133. DOI: 10.1212/NXG.000000000000133 (査読有)
2. Anzai M, Kikuchi A, Kure S, Haginoya K, et al. (計10人、8番目) Patchy white matter hyperintensity in ring chromosome 18 syndrome. *Pediatr Int.* 2016 Sep;58(9):919-22 DOI: 10.1111/ped.13043 (査読有)
3. Arai-Ichinoi N, Kikuchi A, Kure S, et al. (計12人、6番目) Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy. *Hum Genet.* 2016 Jan;135(1):89-98. DOI: 10.1007/s00439-015-1617-7 (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 敦生 (KIKUCHI, ATSUO)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：30447156