

令和元年5月29日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08235

研究課題名(和文) 高いスプライス異常修復能を有した改変U1 snRNA発現ベクターの構築と疾病治療

研究課題名(英文) Use of modified U1 snRNA for rescue from exon skipping caused by 5' splice site mutation of human CTSA gene

研究代表者

山崎 尚志 (YAMAZAKI, Naoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授

研究者番号：20271083

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)：ガラクトシアリドーシスは糖鎖の分解に関わる酵素であるカテプシンA(CTSA)の先天性異常によって発症するリソソーム病である。発症原因となるCTSA遺伝子変異はいくつか報告されているが、日本人患者でよく見られる一塩基変異(IVS7 +3a>g)は異常なRNAスプライスを起こすため酵素が欠損する。我々はRNAスプライスに必要な細胞内因子U1 snRNAに着目し、塩基を改変したU1 snRNAによってこの変異を持つCTSA遺伝子から正常なmRNAを合成することに成功した。個体レベルでこの方法が適用できれば本疾患の有効な治療法になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、ガラクトシアリドーシスの発症原因となるCTSA遺伝子IVS7 +3a>g変異によって起こるRNAスプライス異常を、改変U1 snRNAによって是正できることを培養細胞を用いた実験によって明らかとした。ガラクトシアリドーシスは難病指定されているリソソーム病(ライソソーム病)の一種であり、現在は対症療法しか存在せず、根本的な治療法は確立されていない。RNAスプライス異常が原因で発症する他の遺伝性疾患においても塩基改変したU1 snRNAを治療に用いる試みが為されている。従って、我々の確立した手法をさらに進展させればガラクトシアリドーシスの有効な治療法開発に繋がるのが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cathepsin A (CTSA) is a multifunctional lysosomal enzyme, and its hereditary defect causes an autosomal recessive disorder called galactosialidosis. In a certain number of galactosialidosis patients, a base substitution from adenine to guanine is observed at the +3 position of intron 7 (IVS7 +3a>g) of the CTSA gene. With this mutation, a splicing error occurs; and mRNA lacking exon 7 is produced. To produce properly spliced mRNA from the CTSA gene with this mutation, we examined the possible usefulness of modified U1 snRNA that could interact with the mutated 5' splice site. As a result, we succeeded in obtaining improved formation of properly spliced CTSA mRNA from the mutant CTSA gene. Our results suggest the usefulness of modified U1 snRNA for rescue from exon 7 skipping caused by the IVS7 +3a>g mutation of the CTSA gene.

研究分野：薬学

キーワード：スプライス U1 snRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リソソーム(ライソソームとも呼ばれる)は細胞内の不要な物質や細胞外から取り込んだ物質を様々な加水分解酵素で分解する細胞小器官である。ここで働く多機能性酵素であるカテプシン A (CTSA)の先天的な欠損はガラクトシアリドーシスという代謝異常症の発症原因となる。CTSAは酸性カルボキシペプチダーゼ活性やデアミダーゼ活性を有する酵素であるが、他のリソソーム酵素である -ガラクトシダーゼやノイラミニダーゼ-1 と複合体を形成し、前者を安定化、後者を活性化する保護タンパク質としても働いている。 -ガラクトシダーゼやノイラミニダーゼ-1 は糖タンパク質や糖脂質に結合している糖鎖の分解を担っているため、CTSA が欠損すると二次的に -ガラクトシダーゼやノイラミニダーゼ-1 の機能が低下し、細胞や組織内に糖鎖が過剰蓄積してガラクトシアリドーシスとなる。本症は常染色体劣性遺伝病であり、その発生頻度は出生児 10 万人に 1 人程度と推定されているが、世界症例の 60%が日本人である。発症原因となる CTSA 遺伝子変異がいくつか報告されているが、日本人ガラクトシアリドーシス患者の多くで CTSA 遺伝子イントロン 7 での一塩基変異 (IVS7 +3a>g) が見いだされている。この変異は RNA スプライスの異常を引き起こし、その結果不完全な mRNA が産生されるため CTSA 酵素が欠損する。ガラクトシアリドーシスの根本的な治療法は確立されておらず、対症療法が主となっている。現在、動物培養細胞などを用いて調製した正常な CTSA 酵素を患者組織に補充する「酵素補充療法」が試みられているが、精製酵素が大量に必要であり莫大な手間とコストが掛かってしまうという問題がある。従って、より簡便で安価なガラクトシアリドーシス治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

日本人ガラクトシアリドーシス患者の多くで見られる CTSA 遺伝子 IVS7 +3a>g 変異は、イントロン 7 の 3 番目の塩基がアデニンからグアニンに変化している (CAG/GTATGGGA CAG/GTGTGGGA、[/]はエクソンとイントロンの境界部位を意味し、エクソン 7/イントロン 7 の塩基を示している)。RNA スプライスは遺伝子の転写によって生じた mRNA 前駆体からイントロンを除去し、タンパク質合成に必要な領域であるエクソンを繋ぎ合わせる反応であり、タンパク質(酵素)合成の鋳型である mRNA を産生するために重要な過程である。この反応は核内低分子 RNA の一種である U1 snRNA が mRNA 前駆体のエクソン/イントロン境界部位(5' ss)に塩基対形成して結合することで開始される。しかし IVS7 +3a>g 変異を持った mRNA 前駆体には U1 snRNA が結合できないため、エクソン 7 を含まない mRNA が産生される。このため活性型の CTSA 酵素が合成されなくなりガラクトシアリドーシスが発症する。申請者らは RNA スプライスの開始因子である U1 snRNA に着目し、変異 5' ss と結合できるように塩基改変した U1 snRNA を細胞に発現させれば IVS7 +3a>g 変異を持った CTSA 遺伝子の RNA スプライス異常を修復できる可能性があると考えた。また、改変 U1 snRNA を細胞に発現させるための DNA は大量調製が可能で、かつ安価である。そこで、改変 U1 snRNA のスプライス異常修復効果を検証し、これを用いた新しいガラクトシアリドーシス治療法の確立を目的として本研究を開始した。

3. 研究の方法

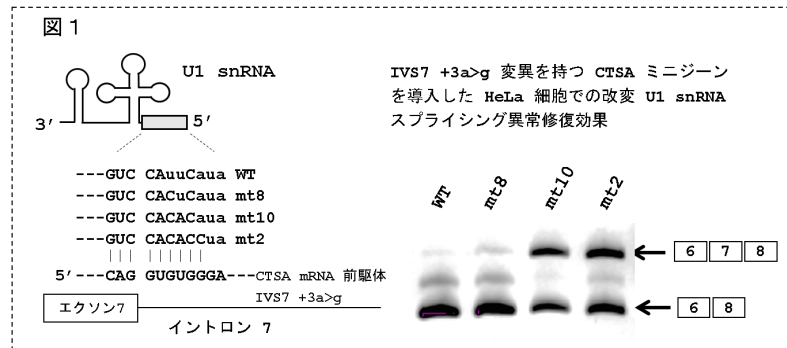
(1) 変異 5' ss と相補になるような改変 U1 snRNA を、相補塩基数を変えていくつか設計し、これらの発現プラスミドを作製した。IVS7 +3a>g 変異を有する CTSA ミニジーンを導入した HeLa 細胞、あるいはこの変異を持つガラクトシアリドーシス患者の皮膚線維芽細胞から樹立された株化細胞 (ASVGS-1 細胞) に改変 U1 snRNA 発現プラスミドを導入した。その後、細胞から RNA を単離し、RT-PCR によって CTSA mRNA 中のエクソン 6 からエクソン 8 の領域を増幅した。得られた PCR 産物の解析から、エクソン 7 を含んだ mRNA が産生されているかどうか検証した。

(2) 他の遺伝子のスプライス異常を対象とした研究において、本来 U1 snRNA が結合する部位 (mRNA 前駆体の 5' ss) よりも下流の領域、すなわちイントロン領域に結合できる U1 snRNA によってもスプライス異常が修復されることが報告されており、このような改変 U1 snRNA は Exon Specific U1 (ExSpeU1) と名付けられている。U1 snRNA は他のスプライス因子が mRNA 前駆体に集合するために必要な因子であるが、5' ss を決定して切断している因子ではない。このことが ExSpeU1 によってスプライス異常が修復できる理由であるとされている。そこで、CTSA イントロン 7 内を標的とする ExSpeU1 発現プラスミドも作製し、IVS7 +3a>g 変異のスプライス異常を修復できるのかも検証した。

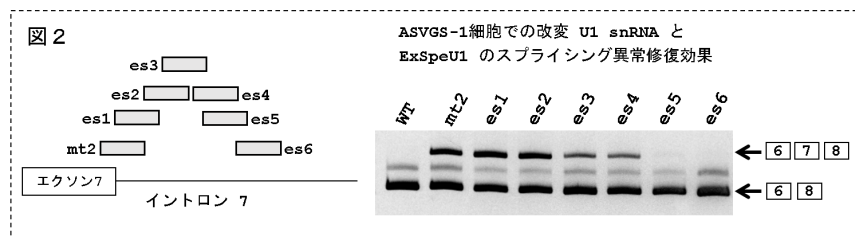
(3) 細胞への遺伝子導入の際に通常用いられているプラスミドベクターは、大腸菌での薬剤耐性領域や複製領域など動物細胞内では不要な領域を多く含んでいるため分子サイズが大きくなっており、組織移行性が低い。そこで iRed 作製技術により改変 U1 snRNA を細胞で発現させることも試みた。iRed (intergent shRNA expression device) は核酸医薬のヒト組織への移行性向上を目的として開発された核酸デバイスである。RNA 合成に必要な最小限のユニットを PCR によって人工合成したものであり、合成の際に修飾ヌクレオチドを取り込ませてヌクレアーゼ抵抗性を付与することも可能である。この技術を用いて、dSCTP (デオキシヌクレオチド糖部の 4' -酸素を硫黄に置換した 4' -チオ DNA) 存在下、PCR を行って改変 U1 snRNA 発現ユニットを作製し、得られた DNA 断片を細胞に導入してそのスプライス異常修復効果を検証した。

4. 研究成果

(1) IVS7 +3a>g 変異を有した CTSA ミニジーンと改変 U1 snRNA 発現プラスミドを HeLa 細胞に共導入し、生じた mRNA にエクソン 7 が含まれているかを解析した。その結果、いくつかの改変 U1 snRNA によってエクソン 7 含有率が著しく増加することが示された(図 1。U1 snRNA の 5' 末端の灰色ボックス部分の塩基を改変した WT は野生型 U1 snRNA を、mt8, mt10, mt2 は変異 5' ss と相補になるように塩基を変えた改変 U1 snRNA を表す。小文字は変異 5' ss と相補ではない塩基を表す)。患者由来 ASVGS-1 細胞に改変 U1 snRNA 発現プラスミドを導入した場合にも概ね同様の結果が得られた。この結果から、変異 5' ss と相補になるように塩基改変した U1 snRNA にスプライス異常修復効果があることが示された。



(2) インtron 7 に結合できるよう塩基改変した ExSpeU1 の効果を ASVGS-1 細胞で検証した。その結果、それらにいくつかスプライス異常修復効果があることが確認でき、5' ss との距離が近い ExSpeU1 の方がその効果が高いことも明らかとなった(図 2。灰色ボックスは塩基改変した U1 snRNA の 5' 末端を表しており、CTSA mRNA のインtron と塩基対形成する場所を相対的に表している。mt2 は図 1 で示した 5' ss に結合する改変 U1 snRNA を示す)。5' ss の配列は異なる遺伝子(異なるエクソン/インtron 境界部位)であっても比較的類似しているため、改変 U1 snRNA が CTSA エクソン 7 だけでなく、他の遺伝子(エクソン)のスプライスに影響する可能性がある。これに対してインtron 領域の塩基配列類似性は低いため、ExSpeU1 は改変 U1 snRNA が持つ副作用すなわちオフターゲット効果を抑制できる可能性が期待されている。従って、今後、5' ss に作用する改変 U1 snRNA(mt2 など)に加えて ExSpeU1(es1 など)のオフターゲット効果を詳細に解析する必要はあるが、これら U1 snRNA が CTSA 遺伝子の IVS7 +3a>g 変異が原因で発症するガラクトシアリドーシス治療に有用であることが示された。



(3) IVS7 +3a>g 変異を有した CTSA ミニジーン導入した HeLa 細胞を用いて iRed 化した改変 U1 snRNA(mt2)の効果を検証した。まず改変 U1 snRNA mt2 発現プラスミドを鋳型として、U1 snRNA 発現ユニット(プロモーターと U1 snRNA コード領域)を通常の PCR で合成した。得られた DNA 断片をプラスミドのおよそ 6 倍の分子数で細胞に導入した場合にプラスミドと同程度のスプライス異常修復が見られた。一方、dSCTP 存在下で PCR を行って得られた DNA 断片(iRed 化した DNA 断片)を細胞に導入した場合はほとんど全くスプライス異常修復が見られなかった。iRed 化した場合に効果が見られなかった理由は不明だが、iRed は shRNA 発現のためのデバイスであり RNA polymerase III プロモーターが含まれている。一方、U1 snRNA 発現ユニットには RNA polymerase II プロモーターが含まれている。従って dSCTP を含んだプロモーターでは RNA polymerase II が作用できないため、改変 U1 snRNA が発現せずスプライス異常が修復されなかった可能性が考えられる。このことから改変 U1 snRNA を iRed で発現させることは困難であると判断した。

(4) 図 1 や図 2 に示した結果から、改変 U1 snRNA あるいは ExSpeU1 の発現によってエクソン 7 を含んだ CTSA mRNA 量は増加しているが、エクソン 7 を含まない mRNA もまだ多く残っていることが示された。改変 U1 snRNA は自身のプロモーター(U1 プロモーター)から転写されるようにプラスミドに挿入されているが、スプライス異常修復効果を高めるため、U1 プロモーターの上流や下流に SV40 や CMV などのウイルス由来エンハンサーを組み込んでその効果を検証した。しかしながらこれらのエンハンサーによってスプライス異常修復効果は高まらなかった。U1 プロモーターは RNA polymerase II で転写されるが、一般的な RNA polymerase II プロモーターとは異なることが報告されている。従って一般的なエンハンサーを用いて U1 プロモーターからの転写を増加させることは困難であることが明らかとなった。

(5) IVS7 +3a>g 変異を持たない野生型の CTSA ミニジーンを細胞に導入してもエクソン 7 を含まない mRNA が生じることを見いだした。RNA スプライスは 5' ss だけでなくイントロン/エクソン境界部位(3' ss)やエクソン内、イントロン内のスプライス制御配列によっても調節されていることが知られている。CTSA エクソン 7 付近の塩基配列を解析した結果、イントロン 6 とエクソン 7 の境界部位が一般的に保存されている配列との類似性が低いことが示された。このことから、CTSA mRNA 前駆体のスプライスにおいて、エクソン 7 は元々認識されにくく、IVS7 +3a>g 変異によって完全に認識されなくなることがスプライス異常の原因である可能性が示唆された。従って、改変 U1 snRNA あるいは ExSpeU1 によって変異 5' ss を認識させるだけでなく、例えばスプライス抑制配列の効果を阻害するなど RNA スプライスに関与する他の領域の作用も利用すれば、より効率的にスプライス異常を修復できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Yamazaki Naoshi, Kanazawa Keisuke, Kimura Maria, Ike Hironobu, Shinomiya Makiko, Tanaka Shouko, Shinohara Yasuo, Minakawa Noriaki, Itoh Kohji, Takiguchi Yoshiharu, Use of modified U1 small nuclear RNA for rescue from exon 7 skipping caused by 5' -splice site mutation of human cathepsin A gene, *Gene*, 査読有, Vol.677, 2018, pp.41-48
DOI:10.1016/j.gene.2018.07.030

Yamazaki Naoshi, Shinomiya Makiko, Ike Hironobu, Shinohara Yasuo, Minakawa Noriaki, Itoh Kouji, Takiguchi Yoshiharu, Use of modified U1 small nuclear RNA for improved formation of properly spliced mRNA encoding human cathepsin A from the gene having an IVS7 +3a>g mutation, *FEBS Open Bio*, 査読無, Vol.8, 2018, pp.10-79 (pp31.ShT.35-1)
DOI:10.1002/2211-5463.12449

[学会発表](計 12 件)

高田 元太, 橋本 晴香, 山崎 尚志, 滝口 祥令, トランススプライシングを用いたヒトカテプシン A エクソンスキップ修復の試み, 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2018, 11 月

四宮 槇子, 小出 華永, 高橋 里奈, 山崎 尚志, 月本 準, 伊藤 孝司, 滝口 祥令, Exon specific U1 snRNA による CTSA エクソン 7 スプライス異常の修復, 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2018, 11 月

高田 元太, 橋本 晴香, 山崎 尚志, 滝口 祥令, トランススプライシングを用いたヒトカテプシン A エクソン 7 スキップの修復, 第 91 回日本生化学会大会, 2018, 9 月

四宮 槇子, 小出 華永, 高橋 里奈, 山崎 尚志, 月本 準, 伊藤 孝司, 滝口 祥令, Exon specific U1 snRNA を用いた CTSA エクソン 7 スキッピングの修復, 第 91 回日本生化学会大会, 2018, 9 月

Yamazaki Naoshi, Shinomiya Makiko, Ike Hironobu, Shinohara Yasuo, Minakawa Noriaki, Itoh Kouji, Takiguchi Yoshiharu, Use of modified U1 small nuclear RNA for improved formation of properly spliced mRNA encoding human cathepsin A from the gene having an IVS7 +3a>g mutation, The 43rd FEBS Congress (国際学会シンポジウム口頭発表), 2018, 7 月

四宮 槇子, 小出 華永, 高橋 里奈, 月本 準, 山崎 尚志, 伊藤 孝司, 滝口 祥令, 改変 U1 snRNA によるカテプシン A スプライス異常修復効果の検討, 第 59 回日本生化学会 中国四国支部例会, 2018, 5 月

齋藤 朱里, 四宮 槇子, 高橋 里奈, 山崎 尚志, 滝口 祥令, ヒトカテプシン A エクソン 7 スキッピングにおける 3' スプライスサイトの関与, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2017, 11 月

山村 桃子, 高田 元太, 富永 和也, 山崎 尚志, 滝口 祥令, ヒトカテプシン A スプライス異常修復を目指したトランススプライシング法の確立, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2017, 11 月

Naoshi Yamazaki, Yasuo Shinohara, Kouji Itoh, Noriaki Minakawa, Yoshiharu Takiguchi, Rescue of mutation-induced exon 7 skipping in human Cathepsin A by using modified U1 small nuclear RNA, 2016 ASCB Annual Meeting (国際学会ポスター発表), 2016, 12 月

井上 真緒, 高田 元太, 山崎 尚志, 滝口 祥令, トランススプライシングを用いたヒトカテプシン A スプライシング異常修復の検討, 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2016, 11 月

木村 麻里安, 四宮 槇子, 池 啓伸, 齋藤 朱里, 山崎 尚志, 伊藤 孝司, 南川 典昭, 滝口 祥令, カテプシン A スプライシング異常の修復を目指した改変 U1 snRNA 発現系の構築, 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2016 年, 11 月

木村 麻里安, 池 啓伸, 齋藤 朱里, 山崎 尚志, 伊藤 孝司, 南川 典昭, 滝口 祥令, 塩基改変した U1 snRNA によるカテプシン A スプライス異常修復効果の検討, 第 57 回日本生化学会 中国四国支部例会, 2016, 5 月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：南川 典昭

ローマ字氏名： (MINAKAWA, noriaki)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (薬学域)

職名：教授

研究者番号 (8桁): 40209820

研究分担者氏名：伊藤 孝司

ローマ字氏名： (ITOU, kouji)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (薬学域)

職名：教授

研究者番号 (8桁): 00184656

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。