

令和元年6月11日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16263

研究課題名(和文) 福山型先天性筋ジストロフィーの重症化因子の探索と治療への応用

研究課題名(英文) Finding modifying factor for phenotypic difference of Fukuyama muscular dystrophy

研究代表者

長坂 美和子 (NAGASAKA, MIWAKO)

神戸大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：70723998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は重度の筋ジストロフィーに脳の形成異常や眼奇形を伴う。独歩困難、重度の知的障害を合併するが、この挿入変異ホモ型の患者には、一部歩行や会話が必要な軽症例が存在し、表現型には患者間差がある。我々はまず、複数患者における挿入変異の配列・ハプロタイプを検討し、重症度と配列・ハプロタイプの相関はみられなかった。スプライシング活性に関しては、軽症において正常フクチンの発現が高い傾向があった。これは、軽症型においてジストログリカン(DG)の糖鎖活性が高いことも相関し、重症化因子では、DG活性の差が関わっていることをつきとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FCMD患者における表現型の差がSVAの塩基配列の特異性によるものであれば、確定診断後にSVA配列のシーケンシングを行い、その結果によって予測される予後などの情報提供が可能となる。また、スプライシング活性の差が表現型に影響しているのであれば、エクソントラップ阻害剤に対する効果もスプライシング活性によると考えられるため、治療効果判定の結果を踏まえて、今後その差を生み出す分子標的に対する治療薬の研究が可能となる。DGの糖鎖活性への関与に関する解析は、FCMDだけでなく世界中に患者が存在する類縁疾患への新たな治療法の開発につながり、本邦のみならず国際的意義もあり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Fukuyama Fukuyama muscular dystrophy (FCMD) is an autosomal recessive, severe childhood muscular dystrophy with brain anomaly. FCMD is mainly caused by an ancestral insertion of 3-kb SVA (SINE-VNTR-Alu) type retrotransposal element into the 3' untranslated region of the causative gene, fukutin. Recently, we testified that pathogenic exon trapping by SVA transposon cause splicing abnormality in FCMD. FCMD patients have variable phenotype, which suggests the existence of modifying factor. We checked the haplotype of the FCMD patients and checked if there are any differences according to the phenotype, but it seemed that the haplotype was not related. Instead, we checked the alpha dystroglycan glycosylation activity and we found that this remained activity correlated well to the phenotype.

研究分野：小児科

キーワード：福山型先天性筋ジストロフィー フクチン遺伝子 ジストログリカン スプライシング異常 糖鎖異常

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

1. 研究開始当初の背景

FCMD 研究の学術的背景

(1) FCMD の疾患概念

FCMD は重度の先天性筋ジストロフィー、型滑脳症(多小脳回を基本とする脳奇形)、眼症状(近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離など)の3症状を示す常染色体劣性の希少難病である(Fukuyama, et al, *Brain Dev* 1981)。日本ではデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に次いで2番目に多い小児の筋疾患で、生後~乳児早期に筋緊張低下、筋力低下で発症し、10代のうちに死に至る重篤な疾患である。患者は毎年約100名弱出生し、日本に約2000名弱存在する。患者は高度な精神運動発達遅滞を伴い、ほとんどの患者が生涯歩行困難である。

(2) 原因遺伝子フクチンと創始者変異

1998年にポジショナルクローニング法によりFCMDの疾患責任遺伝子であるフクチン遺伝子(*fukutin*, 9q31)が同定された。約90%の患者は、フクチンの3'側非翻訳領域に約3kbのレトロトランスポゾン(SVA)の挿入型変異を認める(Kobayashi, et al, *Nature* 1998)。この変異は約100世代前、日本人祖先の1人に生じた創始者変異であり、日本人の約90人に1人が保因者とされ、患者は約1/3万出生で発症する本国特有の疾患でもある。

(3) FCMD と ジストログリカン

FCMD患者の骨格筋では、細胞膜と基底膜を繋ぐ糖蛋白である α -dystroglycan (DG) の O-マンノース(O-Man)型糖鎖に異常があり、この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻するために重度の筋ジストロフィーが発症する(Michele DE, et al, *Nature* 2002)。FCMDと類似の臨床症状を来す muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群等においても、DGの O-Man 型糖転移酵素の遺伝子異常が次々と同定され、 α -ジストログリカノパチー(α -DGpathy)と総称する新しい疾患概念が確立した(Muntoni, et al, *Lancet* 2002, Toda, et al, *Congenit Anom* 2003)。また、フクチンが O-Man 糖鎖の中に存在するリビトールという珍しい糖の転移酵素であることがごく最近本邦で発見された(Kanagawa, et al *Cell Rep* 2016)。また最近は O 結合型 N アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)という生体内で必須の糖鎖を合成する O-GlcNAc 転移酵素がエピジェネティックに制御されている報告(Chen, et al., *Nature* 2013)や、組織(脳)特異的な糖転移酵素である O-Man 糖鎖 GnT-IX の遺伝子発現がヒストン修飾の制御をうけるとの報告(Kizuka, et. al., *JBC* 2014)もあり、糖転移酵素とエピゲノムの関係に注目が集まっている。

(4) エクソントラップ阻害剤による FCMD に対するアンチセンス療法

FCMDはSVA挿入変異によりフクチンタンパクをコードする最終エクソン内に新たなスプライシング部位が生じ、新生エクソン由来の異常タンパクが産生されることで発症する、「エクソントラップ」という機構により生じるスプライシング異常症であることが証明された(Taniguchi-Ikeda, et. al., *Nature*, 2011)。このエクソントラップを阻止するアンチセンス核酸を用い、正常なスプライシングを誘導する「アンチセンス療法」により、正常蛋白の回復や、機能的回復を示唆する α -DG 糖鎖修飾の回復がみられた。現在この治療法は前臨床試験中であり、骨格筋に対する臨床試験が待たれている。骨格筋治療の実現により運動機能が改善し、患者およびその家族のQOLの上昇につながる事が期待される。一方、発症が乳幼児早期であり症状の重症化が早期におこること、脳奇形が先天性に発症すること、また同じ「SVA挿入」の遺伝子変異患者においても、その表現系の差異が大きく、中には歩行可能で知的発達障害の軽い症例が存在することなど、FCMD治療の実現には解決すべき未解明な機序が多く存在する。

この中でも「軽症例」に起こっている病態機序を解明することは、疾患の重症化の予測や予防、また新たな治療法の開発に繋がるのではないかと、この着想に至った。アンチセンス療法に対する臨床治験の実現に向けては、運動機能評価法の確立、バイオマーカー検索、中枢神経系治療介入等の課題に加え、重症化にかかわる因子の同定が必要も重要であると考え。

2. 研究の目的

本研究の目的は FCMD の表現型の差を引き起こす因子を解明・同定し、新規治療法を開発することである。疾患特異的 iPS 細胞などの細胞系を用い、スプライシング活性や糖鎖・糖転移活性を検討した。また患者フクチン遺伝子をエピジェネティックに調節する因子の有無を、メチル化解析やヒストン修飾の検討より探索した。これらと運動機能評価やバイオマーカー等の客観的指標との相関を検討し、重症化に關与する病態解明を目指した。

3. 研究の方法

-1 SVA 挿入領域の塩基配列の同定とフクチン遺伝子周辺のハプロタイプ解析

当院に通院する FCMD 患者ホモ型約 20 例の末梢血より DNA を抽出し、SVA 挿入配列及びスプライシング標的配列（ドナーサイト・アクセプターサイト・エクソンあるいはイントロンのスプライス調節領域）のダイレクトシーケンスを行う。工夫点：レトロトランスポソンの配列同定はリピート配列が多く通常の方法では大変難しい。そこで制限酵素を用いて SVA 配列のうち、スプライシングにかかわる標的配列付近のみを制限酵素で切断し、その部位をクローニングし塩基配列決定を行った。サンガー法による解析が難しい場合は、TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit (Illumina 社) を使用し次世代シーケンサーを用いた遺伝学的解析を行った。

フクチン遺伝子のハプロタイプ解析はフクチン周囲の 6 つのマイクロサテライトマーカーを用いて行った (Toda, et. Al., Nat Genet 1993)。

-2 スプライシング活性の検討

患者由来末梢血あるいはリンパ芽球より RNA を抽出し、エクソン領域及びスプライシング領域に設計したプライマーを用いて、RT-PCR 法を用いて挿入変異ホモ型患者における異常スプライシングの効率を測定した。

患者間における DG の糖鎖修飾・糖転移活性と重症度の違いの検討

FCMD の原因遺伝子であるフクチンは、リピトール 5 リン酸の糖転移酵素であることがごく最近発見された。この糖転移活性の検討を液体クロマトグラフィー測定装置 (LC) を用いて行った。また DG の糖鎖活性はウエスタンブロッティングを用いて行った。

フクチン遺伝子のエピジェネティックな調節に関する検討

1. 患者フクチン遺伝子の転写活性部位のメチル化解析を行うために、メチル化シーケンスを行う。

2. フクチン遺伝子におけるヒストンを修飾する因子の同定

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を細胞に投与し、フクチン発現の増減、及び転写因子のフクチンへの結合量を各種抗ヒストン抗体を用いた ChIP アッセイを行い、標的領域の DNA に対しリアルタイム PCR を用いることで、転写の活性及び抑制を検討する。

3. フクチン遺伝子のクロマチンを活性化させる因子の探索を目的に、核内糖修飾として注目されている O-GlcNAc 転移酵素(OGT)と複合体を形成するメチルシトシン水酸化酵素(TET1,2,3) (Chen, et. al., *Nature* 2013) がフクチンの遺伝子発現制御に関与するかを重症及び軽症由来の iPS 細胞のノックダウン系を用いて検討する。工夫点:この際、筋芽細胞へ分化後、あるいは神経系細胞に分化させた際におけるノックダウンによる発現の変化も検討する。TET1,2,3 とフクチン遺伝子の転写因子との結合を ChIP アッセイにより検討する。上記検討において説明できる結果が出ない場合に、フクチン以外の他の糖転移酵素などの遺伝子発現の影響を検討する。研究が順調に進んでいる場合はレポーターアッセイによるフクチンプロモーター部分の解析も行う。

FCMD 患者の臨床症状との相関を検討することによる重症化因子の探索

FCMD の臨床スコアと対比させ、 から の結果を比較し解析した。

1. FCMD 挿入ホモ型患者を臨床経過から重症例と軽症例の 2 群に分け、SVA 挿入領域の塩基配列を比較し、挿入配列特異的な臨床症状の有無を検討した。
2. 2 群間でスプライシング活性、画像検査結果、バイオマーカー結果、 DG 糖鎖修飾状況を比較する。バイオマーカーやエラストグラフィーでは正常コントロールとの比較も行い検討した。
3. これらのパラメータを用いて多重検定を行い、有意差検定や相関係数を解析し、FCMD のゲノム配列と FCMD の臨床症状の相関について検討した。

4 . 研究成果

まず、複数の患者における挿入変異の配列及びハプロタイプを検討した。結果は重症度と配列・ハプロタイプの相関はみられなかった。スプライシング活性に関しては、軽症において正常フクチンの発現が高い傾向があり、正常フクチンの活性が病状に関与している可能性が示唆された。この結果は、軽症型において ジストログリカンの糖鎖活性が高いこととも相関した。糖転移活性については、より良いアッセイ系の構築を検討中である。本研究より挿入変異の配列とスプライシング活性は関連が薄く、スプライシング活性については挿入変異配列以外の要因が関与している可能性が示唆された。

次にフクチン遺伝子の配列決定のため、ロングリードの配列同定が可能な次世代シーケンサーであるナノポアをもちいて患者及び両親(保因者)の挿入 変異配列の配列を検討した。結果、いまだエラー率や挿入配列内の繰り返し配列の解読に難渋したため、個人間での配列の差と臨床症状の相関についての検討ま だにはいたらなかった。しかし、この技術をもちいて、今後は RNA の配列を決定し、発現での表現型の差も検討を予定している。また患者フクチン遺伝子をエピジェネティックに調節する因子の有無を、メチル化解析やヒストン修飾の検討より探索することを予定し予備検討を行っている。重症化因子では、 DG 活性の差がかかわっていることをつきとめたため、今後は DG 活性に関わる因子について、さらに検討を予定している。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

池田真理子 長坂美和子 小林和浩 戸田達史

演題名：福山型先天性筋ジストロフィーの中樞治療

第 122 回日本小児科学会学術集会 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：池田（谷口） 真理子

ローマ字氏名：Ikeda-Taniguchi Mariko

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。