

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19512

研究課題名(和文)ナンセンス変異に対する内因性修復機構の解明と、その治療への応用研究

研究課題名(英文)Understanding of intrinsic readthrough mechanisms of nonsense mutations for its therapeutic applications

研究代表者

佐橋 健太郎 (Sahashi, Kentaro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90710103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はSEP1ナンセンス変異による、高齢発症の先天性ミオパチーを見出している。Copy-neutral LOHを同定し、同胞5名中患者3名という高頻度に常染色体劣性遺伝疾患を発症した背景が判明した。機能喪失病態が見込まれたが、骨格筋のSEP1が高発現していた。骨格筋、血液では変異部のRNA正常再コード化が認められ、モデル細胞にてRNA編集酵素ADAR2の関与が確認された。続いてモデルマウス骨格筋のSEP1 RNAの高発現が再現され、変異部分のRNA再コード化を示唆する結果が得られている。RNA編集による軽症化機構の可能性があり、ADAR2を標的とした治療戦略が示されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は網羅的遺伝子解析を通じ、筋疾患家系の変異同定に成功している。骨格筋の病理所見も合わせ、重篤な先天性遺伝性疾患の高齢発症型であることが判明し、そのメカニズムの探索目的に本研究を立ち上げている。発症者生体試料に加え、作製したヒト細胞モデルおよび動物モデルを用い、編集酵素による変異相当部分の転写レベルでの正常コード化という機構を見出しており、変異編集の遺伝子治療応用への可能性を示す重要な知見といえる。

研究成果の概要(英文)：We identified a late-onset congenital myopathy due to a novel homozygous nonsense mutation in SEP1. A high incidence of this autosomal recessive disorder observed in 3 cases out of 5 siblings was attributed to copy-neutral LOH in chromosome 1p36.11. Despite the loss-of-function mutation, SEP1 was highly expressed in patients' skeletal muscle. The recoding of the mutation at the RNA level was detected in both muscle and blood cells, and the RNA editing enzyme ADAR2 was shown to catalyze this nucleotide conversion in patient fibroblasts. Furthermore, we uncovered high expression of SEP1 mRNA and the possible recoding event in muscle of a model mouse. The finding of ADAR2-mediated attenuation of the pathology would further provide insights into alternative therapeutic approaches for genetic disorders.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：先天性ミオパチー リードスルー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性ミオパチーは遺伝子異常により筋障害を引き起こす疾患群であり、そのうち *SEPN1* 遺伝子関連ミオパチーは乳児期に発症し、早期に人工呼吸器の管理を要し、重篤である。*SEPN1* 翻訳タンパク質である SeIN は小胞体に局在し、細胞内レドックス恒常性やカルシウム恒常性に関わり、骨格筋形成に重要な役割を果たす。その発現、活性は胎生期で高く、成人期で低いことが分かっている。我々は高齢発症家族性ミオパチー家系のゲノム DNA を全エクソーム解析し、*SEPN1* コード領域内にホモ接合型 c.XXXC>T ナンセンス変異を同定した。本家系はナンセンス変異が原因であるにもかかわらず生検筋にて全長型 SeIN の発現が認められ、これが晩発発症に寄与していると考えられた。この一見矛盾した SeIN 翻訳機序として、患者皮膚線維芽細胞などを解析し、ナンセンス変異 RNA 部位が少なくとも ADAR2 により U>C に RNA 編集されることで正常配列に再コード化される新たな発見を見出している。すなわち、我々の予備的検討から、RNA 編集によるナンセンス変異病態の軽減が、*SEPN1* 遺伝子関連ミオパチー発症時期を遅らせ軽症化させるという、新たな疾患修飾機序が示唆された。

2. 研究の目的

マイクロ RNA(miRNA)はタンパク質に翻訳されない短鎖一本鎖ノンコーディング RNA であり、細胞質にて標的 mRNA と塩基対形成することで、その不安定化や翻訳開始阻害などを通じサイレンシング機構を担う。さらに miRNA の、核内への輸送や RNA 結合タンパク質との結合を介する遺伝子発現制御も報告されており、我々も編集部位近傍に相補鎖をもつ核内 miRNA が ADAR2 と結合し、RNA 編集効率に影響を与えることを培養細胞を用いて確認している。RNA 編集は動物種を超えて必ずしも保存されていないことを踏まえ、本研究では *SEPN1* ナンセンス変異を再現するヒト培養細胞モデル、マウスモデルの両者を構築し、ナンセンス変異に伴う RNA 編集など終止コドンのリードスルー転写誘導の可能性に注目し、新規 RNA 骨格筋病態機序の解明を目指す。さらに、ADAR2 の部位特異的 RNA 編集機構について、編集近傍配列を認識する miRNA の、ADAR2 の編集部位へのリクルートという、ガイド RNA としての生理機能の可能性を探究する。ナンセンス変異の新たな表現型多型の理解につながるるとともに、miRNA 依存的 RNA 編集機構の解明研究を通じて、これまでにない、RNA レベルでの遺伝子発現改変技術が開発され、遺伝子治療の新機軸を打ち出すことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞モデルを用いた病態検討

培養細胞株における *SEPN1* 発現および RNA 編集効率を検証する。RNA 編集酵素を介した編集効率の変化や、*SEPN1* mRNA、SeIN 挙動を検討し、鍵酵素を同定する。また変異近傍に相補鎖を持つ miRNA 候補を抽出し、miRNA 導入による ADAR2 の部位特異的 RNA 編集について検証を行い、新規 RNA 編集機構の解明を目指す。

(2) ノックイン(KI)マウスモデルの作製および病態検討

ナンセンス変異による、個体での病態検討に、CRISPR-Cas9 システムを用いて *SEPN1* ホモ接合型 c.XXXC>T 変異をはじめとする KI マウスモデルを作製し、先天性ミオパチーの病態を検討する。患者症例では見出すことが不可能な、発達期早期も含めた経時的な組織 RNA 編集効率、*SEPN1* 発現解析に加え、筋病理や筋力、生存期間などの表現型解析、治療介入研究が可能となる。

4. 研究成果

(1) 発症者病態精査

患者生検骨格筋の免疫染色および電子顕微鏡による超微細形態の観察などにより、本家系が高齢発症にも関わらず、早期発症の典型例と同様にマルチミニコア病と称される先天性異常の筋病理を示すことを明らかにしている。SNP アレイを施行し、*SEPN1* を含む chromosome 1p36.11 領域を含めた、複数の copy number neutral loss of heterozygosity 領域を同定しており、これは両親の血縁関係が近縁である可能性を示唆するとともに、本家系が同胞 5 名中患者 3 名という高頻度に常染色体劣性遺伝疾患を発症した遺伝的背景が明らかになっている。一方、ヘテロ型変異を有する同胞は未発症であった。ナンセンス変異を踏まえ、本家系の発症病態は SeIN の完全欠損による機能喪失が見込まれたが、

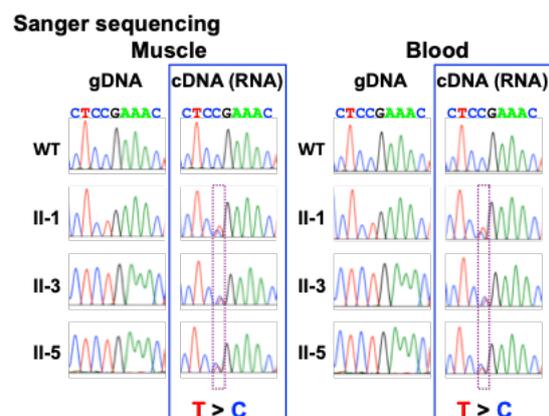


図1. 発症者の骨格筋および血球における変異RNA編集

図1. 発症者の骨格筋および血球における変異RNA編集

発達期以降では発現量が低い SeIN の全長型が、発症者全員の生検骨格筋においてむしろ正常より高発現しているエビデンスを、既存 C 末端側抗体に加え新規に作製した N 末端側抗体を用いたウエスタンブロットで確認している。また、骨格筋を用いた RT-PCR および RNA シークエンスにより本例の *SEPN1* mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構を回避し高発現していることを確認し、また RNA スプライシング変化としてナンセンス変異を含むエキソンのスキッピングの可能性を除外している。さらに骨格筋および血液由来の DNA および、RNA を逆転写した cDNA を用いた Sanger シークエンス精査を進め、RNA 編集による 50% 程度の変異相当部分の正常再コード化 T>C が発症者 3 名全員で認められており、*SEPN1* 発現回復機序の可能性が見出されている(図 1)。

(2) 細胞モデルにおける病態解析

患者(II-3)皮膚線維芽細胞を樹立し、本細胞モデルプラットフォームにて内因性の様々な RNA 編集酵素のノックダウンを行ったところ、ADAR2 発現低下により変異相当部分の正常再コード化効率および SeIN 発現が低下し、逆に外因性の ADAR2 過剰発現により効率が上昇する結果が得られている。また RNA 沈降により ADAR2 タンパク質と *SEPN1* mRNA 前駆体との結合も確認されている(図 2)。RNA 編集酵素による編集部位認識機構は不明であり、我々は RNA による、酵素の編集部位へのガイド機構の可能性を考え、シード配列の観点から、*SEPN1* 変異近傍に結合し得る miRNA に注目している。候補 miRNA ミミックあるいは抑制剤により患者線維芽細胞の変異部の編集効率が変化することが見出すことができ、また RNA 沈降により候補 miRNA と ADAR2 蛋白との結合も確認されている(図 3)。今後さらに miRNA スクリーニングを行い、RNA 編集との関わりが示唆された特定の miRNA 群について下記マウスを用い、標的特異的 miRNA 搭載 AAV 導入による、組織における ADAR2 介在 RNA 編集の可能性について検証を計画している。

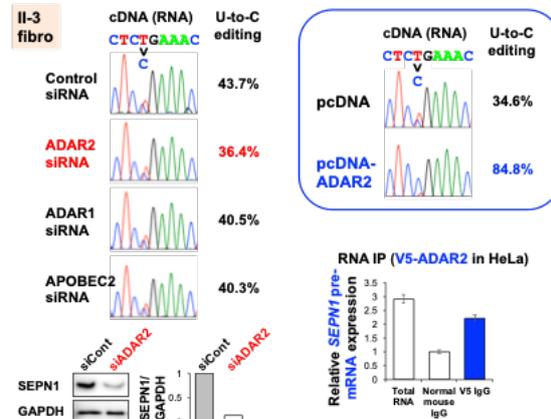


図2. 培養細胞系におけるRNA編集酵素ADAR2による変異RNA編集

(3) マウスモデルにおける病態解析

続いて CRISPR-Cas9 システムを用いた *Sepn1* 遺伝子ナンセンス変異ノックイン(KI)マウスモデル作製について、変異近傍のヒト DNA 配列とマウス DNA 配列の非同源性を考慮し、変異部位-10~+10 塩基配列をヒト化した塩基置換 KI マウスと、変異部位-30~+30 塩基配列をヒト化した塩基 KI マウスの 2 系統作製に成功している。前者マウスの生後 1 日齢での骨格筋において、ナンセンス変異存在下に *Sepn1* mRNA の高発現が再現されたが、ウエスタンブロットにより SeIN が検出されなかった。同齡骨格筋でも僅かではあるが変異部分の RNA 再コード化 T>C を示唆する所見が Sanger シークエンスにより確認されている(図 4)。今後解析用マウス抗体の再検討と、異なる時期における発現検証を進めていく。先天性 *SEPN1* 関連ミオパチーの晩発発症型の表現型を見極めるべく、高齢マウスの *Sepn1* 発現、RNA 編集効率に加え、体重、運動機能といった表現型および骨格筋など組織病理の評価を行い、個体モデルの妥当性についても検証する。

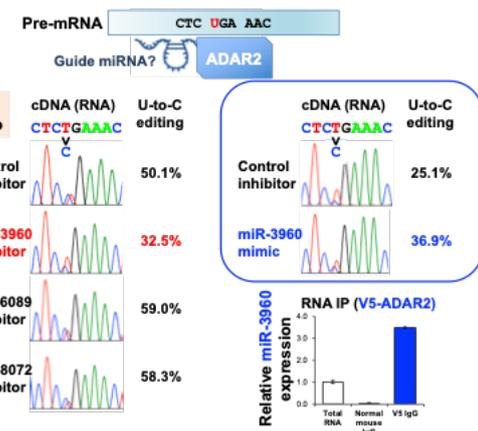


図3. 培養細胞系におけるmiRNA介在性の変異RNA編集

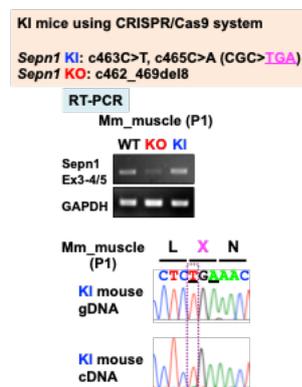


図4. ノックイン(KI)マウス筋における *Sepn1* mRNA 発現誘導および変異RNA編集可能性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	勝野 雅央 (Katsuno Masahisa) (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	