

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10043

研究課題名(和文) ゴーシェ病の治療標的探索：RNAエピジェネティクスによるGBA翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文) Explore of the GBA translation regulatory mechanism by RNA epigenetics: To find the therapeutic targets for Gaucher disease

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(歯学域)・准教授

研究者番号：20304537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原因遺伝子変異と臨床症状が必ずしも相関しない亜型ゴーシェ病患者および家族由来口腔粘膜線維芽細胞を用いて、GBA翻訳制御機構に関わるRNAエピジェネティック制御の関与について解析した。その結果、今回のmiRNAの網羅的発現解析では顕著な差は認められなかった。RNA修飾の網羅的解析については、現在解析中である。

また、GBA遺伝子構造解析に基づく発現調節機構の解析により、2つのプロモーターによる転写産物の発現様式が細胞特異的であること、さらに翻訳制御機構が既知のcap依存性制御機構に加えてcap非依存性IRES依存性な制御が存在していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、当初の予定通りには進まなかったが、少なくともmiRNAの発現変動解析からは、酵素活性に関与する可能性を示唆する所見が得られなかった。一方、計画の変更により取り組んだ、遺伝子構造解析から新たなGBA翻訳制御機構を見出し、より複雑な制御機構の存在を示した。これらの成果により、これまで原因遺伝子変異と臨床症状が必ずしも相関しなかったゴーシェ病の発症機序の解明や、疾患の新規診断・治療標的の提案につながる可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Using oral mucosa fibroblasts from the patient and the family members of atypical Gaucher disease, which the causative gene mutations and clinical symptoms are not always correlated, we analyzed the involvement of RNA epigenetic regulation in the GBA translation mechanism. Unfortunately, no significant differences were found in the comprehensive expression analysis of miRNA at this time. RNA modification is still under analyzing. The further analyses will be required.

Furthermore, the regulatory mechanisms of GBA gene expression were analyzed based on GBA gene structure, and we found the cell-type-specific expression pattern of GBA transcripts by the two promoters, and another translational machinery, cap-independent and IRES-dependent control, exists in addition to the known cap-dependent translational mechanism.

研究分野：分子生物学、口腔生化学

キーワード：ゴーシェ病 口腔粘膜線維芽細胞 GBA遺伝子発現調節機構 Cap非依存性IRES依存性翻訳機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病 (GD)患者は肝脾腫、骨症状を主症状とするが、神経症状の有無で3つに分類され、特に重篤な神経症状を伴う II 型・III 型は小児期に発症し、予後不良な場合が多い。本邦では II 型・III 型患者が全 GD 患者の 2/3 を占め(厚生労働省難治性疾患等政策研究事業に関する調査研究班ホームページ)、未だ 39%の患者の原因遺伝子変異が不明である(ゴーシェ病診断・治療ハンドブック、2014)。実際、原因とされる GBA の変異は 300 以上報告されており、GBA 遺伝子変異と臨床症状の相関が低いことが、診断および治療法の選択・開発を困難にしている(*Hum Mutat*, 29(5), 567, 2008)。この事実は GCase 酵素活性を制御する、GBA 遺伝子以外のモディファイヤーの存在を示唆しており、すでに GCase の品質管理機構関連因子、立体構造、輸送機構、酵素活性制御等に関わる遺伝子変異の報告もあるが、まだ不十分である。

研究代表者らはこれまでに、神経型 GD 患者由来口腔粘膜線維芽細胞(GOF)を樹立し、GOF-iPS 細胞の樹立を完了するとともに、GOF の GBA の遺伝子型がヘテロ接合型である亜型 GD であることを見出した(基盤研究(C)H24-H26、代表)。そこで本患者と家族の口腔粘膜線維芽細胞(OF)を用いて GCase の発現を比較検討したところ、GBA の遺伝子型がヘテロで mRNA レベルが同等であるのに、患者では GCase のタンパク質量と酵素活性が著減していたことから、モディファイヤーは翻訳および翻訳後調節因子であると仮定し、基盤研究 (C)H27-H30(代表)の支援により、exome 解析を行なったが、モディファイヤー候補が同定できなかった。そのため、ゲノム変異というジェネティック制御だけではなく、エピジェネティック制御の観点からも探索する必要があるという考えに至った。

翻訳制御機構については TCP80 タンパク質が GBA mRNA のコード領域への結合による翻訳抑制が唯一報告されている(*Mol Genet Metab* 68, 441, 1999)が、TCP80 は現在 interleukin enhancer binding factor 3 と同一であり、結合遺伝子特異性は不明である。

RNA エピジェネティクスの研究はまだ遅れていて、miRNA の研究は国外で2報あり、1報は GBA ホモ変異患者の皮膚線維芽細胞とコントロール細胞を用いた網羅的スクリーニング(*RNA Biol*, 11(10), 1291, 2014)が酵素活性により評価しており、本研究に近いが、酵素活性の促進・抑制の機能を持つ miRNA をそれぞれ多数検出しているが、続報はない。

また、もう1報は *in silico* 解析から1つの miRNA(miR22-3p)について検討し、GBA mRNA に対する偽遺伝子 GBAP による RNA スポンジ効果を解析したもので(*Sci Rep* 7, 12702, 2017)、転写レベルの制御であり本研究とは視点が異なる。RNA 修飾については報告がない。従って、本研究は GD 分野では未開拓の領域であり、本研究は、今後の GD 研究に資するところが大きいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では未解明な GD 発症機序を解明するため、まず GBA 特異的翻訳開始調節に関与する RNA エピジェネティックモディファイヤーの探索を目的とし、miRNA 及び RNA 修飾について解析する。さらに患者 OF 由来 iPS 細胞(GOF-iPS)からマクロファージ、神経、およびミクログリアに分化誘導した病態モデルを作成し、同定した miRNA の組織特異性の検討と共に、病態モデルでの miRNA 阻害による治療標的としての可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 各種倫理審査委員会への追加申請と再インフォームドコンセントによる承認取得

① 徳島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会(承認番号:R2-15)

② 徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会(承認番号:708、1130 および 1533)

なお、①および②は現在学内で統合され、「徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会」となり、承認内容は継続している。

(2) miRNA を含む全 RNA の抽出および miRNA アレイ解析

患者及びご家族由来 OF から、miRNA を含む全 RNA を抽出し、Nano drop にて品質を確認後、東レ株式会社による 3D-Gene 受託解析を行なった。具体的には total 250ng を 3D-Gene miRNA Labelling kit にてラベリングし、Human miRNA Oligo Chip にハイブリダイズさせ、洗浄後、3D-Gene Scanner 3000 (TORAY)を用いて発現解析した。酵素活性と遺伝子型を念頭に候補遺伝子を絞り込み、実際の発現レベルを THUNDERBIRD® NextSYBR® qPCR Mix (Toyobo)及び CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を用いて検討した。

(3) 全 RNA の抽出および RNA 修飾解析

患者及びご家族由来 OF から全 RNA を抽出し、Nano drop にて品質を確認後、epitranscriptomic Microarray (フィルジェン株式会社)の受託解析を行った。RNA をそれぞれ Cy5 及び Cy3 でラベリングし、epitranscriptomic Microarray にハイブリダイズした。洗浄後、Agilent Scanner にて scan し、データ解析を行った。

(4) GBA 遺伝子バリエーションの発現パターン解析

GBA 遺伝子バリエーションの発現パターンを、ヒト皮膚線維芽細胞(DF)および口腔粘膜線維芽細胞(OF)、ヒト HL60 細胞を用いて分化誘導した好中球(iNeu)およびマクロファージ(iMac)由来の RNA

を用いて、qPCRにて解析した。

(5) スプライシングバリエント由来のアイソフォームの翻訳産物と酵素活性の有無の確認

既知の酵素活性を持つアイソフォームとは異なる翻訳産物について、CMV プロモーターを用いた、標識タグ付き GCCase 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。さらに酵素活性を測定した。酵素活性は 4-Methylumbelliferyl-beta-D-glucopyranoside(4-MU-Glc)を基質とし、cell lysate assay 系(GCase を含む細胞抽出液と基質を 37°C で 40 分間反応)にて、酵素反応により生じた 4-Methylumbelliferone (4-MU)の蛍光強度を測定した。

(6) IRES 活性の測定

IRES 活性測定のためバイシストロニックレポーターシステムを構築し、OF または iMac にリポフェクションにて一過性に導入して測定した。本システムでは EF1a promoter により Cap 依存性翻訳機構が働き、Renilla luciferase 活性として測定、IRES 依存性翻訳機構を介した翻訳は各バリエントの 5' UTR 配列を挿入し、firefly luciferase 活性として測定できる。コントロールとして EMCV ウイルスの IRES 領域を挿入したポジティブコントロールベクターを構築した。

(7) Cap 依存性・非依存性翻訳機構の解析

Cap 依存性の翻訳機構の阻害剤として既知のラパマイシンで OF 細胞を 48 時間処理後、細胞から抽出したタンパク質を用いて western blot 解析を行い、GCCase タンパク質を検出した。ラパマイシン処理のコントロールはリン酸化型 p70S6K の検出によって行った。

また、GCCase のアイソフォームと糖鎖付加型 GCCase とを見分けるために、ラパマイシン処理の有無による細胞の抽出液を PNGase F 処理により(タンパク質 20 µg を変性液中で 100°C・10 分間処理後、37°C・1時間の PNGase F 処理)糖鎖を除去し、同様に GCCase タンパク質を検出した。

(8) 偽遺伝子 GBAP と既知の miR22-3p の発現パターン解析

DF、OF、HL60 およびその誘導体 iMac の RNA を用いて、GBA、GBAP、および miR22-3p の発現レベルを CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を用いて検討した。また、患者家族の線維芽細胞由来 RNA を用いても同様に解析した。

4. 研究成果

(1) miRNA アレイ解析およびデータマイニング

倫理委員会の変更承認を得た後、患者ご家族に再度インフォームドコンセントを行い、承認を得た後、ヒト miRNA Oligo chip(3D-Gene マイクロ RNA チップ; 東レ)、を用いて網羅的に miRNA の発現解析を行った。

その結果、各サンプル間で 2 倍以上発現の異なるものは 100~200 遺伝子ほど存在するが、GCCase 酵素活性とタンパク質量を念頭に、疾患の表現系に結びつく可能性のある遺伝子を検討したところ、合計 4 個、1.25 倍以上の違いに下げると 18 個の遺伝子が見つかったが、発現レベルが低過ぎるものも含まれるため、比較的全てのサンプルで発現レベルが高い miRNA について、qPCR で再検討したところ、アレイの結果と相関しなかった(図1)。

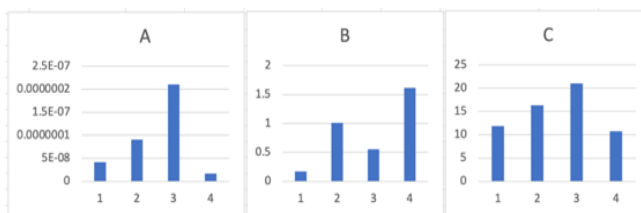


図1 qPCR による miRNA アレイの確認 (RNA6 にて標準化)

そのため、今回のデータセットでは miRNA と GCCase 酵素活性とタンパク質量に裏打ちされた GD 表現型との相関は見出せなかった。

(2) アレイを用いた RNA 修飾解析およびデータマイニング

当初、RNA シークエンスという手法も念頭にあったが、各転写産物に対する修飾の割合を同時にプロファイルできる epitranscriptomic Microarray が開発されたことから、このアレイを用いることで網羅的に検討することにした。現在解析中であるが、性別や年齢によっても RNA 修飾のパターンが異なることが容易に予測され、さらに公共データベース等と比較しながら候補を絞り込み、in vitro の実験にて検証する必要があると考える。今回の研究期間内に、それを検証することができなかったが、次年度、関連・継続した内容で科学研究費(基盤 C)が採択されたことから、次年度以降に本研究を発展させる予定である。

(3) GBA 構造解析に基づく新規 GBA 翻訳機構の解明 (Communications Biology に現在投稿中)

① 細胞特異的 GBA variants の発現解析

図 2 に示すように qPCR 解析にて転写産物の発現レベルを確認したところ、線維芽細胞 (a) と HL60 の分化誘導系 (b) では GBA variants の発現パターンが異なった。

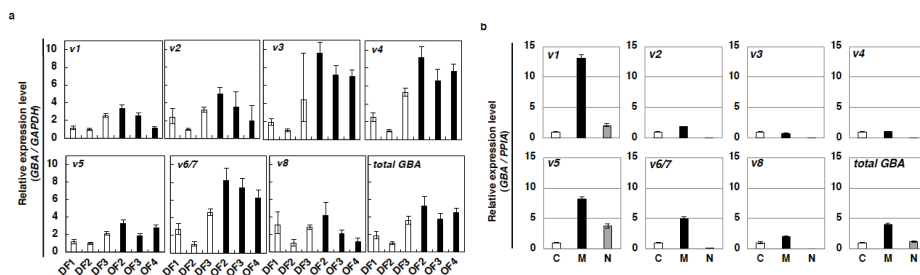


図 2 細胞特異的 GBA variants の発現解析. (a)線維芽細胞 (b)HL60 の分化誘導系. C, HL60; M, iMac; N, iNeu.

② スプライシングバリエント由来のアイソフォームの翻訳産物と酵素活性の有無

スプライシングバリエントのうち、v1~v3 および v6~8 はアイソフォーム1、v4はアイソフォーム2、v5はアイソフォーム3の翻訳産物が得られることが、理論上、既に知られていたが、実際にアイソフォーム2と3の翻訳産物および酵素活性は未報告であった。そこで、v1、3、4、5 の各発現ベクターを作成し、HEK 293 細胞に導入してタンパク質レベルおよび GCase 酵素活性を測定した。結果、図3に示すように、各アイソフォームのタンパク質は検出できたが、酵素活性が検出されたのはアイソフォーム1のみ(v1、v3)であった。

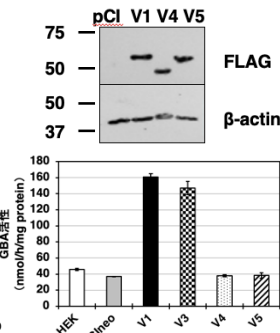


図 3 スプライシングバリエント由来のアイソフォームの翻訳産物(上)と酵素活性(下)

③ IRES 活性

GBA 遺伝子は P1、P2 の2つのプロモーターから転写されるが、特に P1 プロモーターからの転写産物の 5'UTR が長く、GC 含量も高いことから IRES 活性の有無を検討した。活性の計算法と活性測定用ベクターを図4に示す。



図4 IRES 活性の計算式と活性測定用レポーターベクターの模式図

測定の結果、図5に示すように、P1 プロモーター由来の v2、3、6/7、8については IRES 活性を認めたが、P2 プロモーター由来の v1 については IRES 活性を検出できなかった。さらに、IRES 活性は細胞特異性があることも判明した。

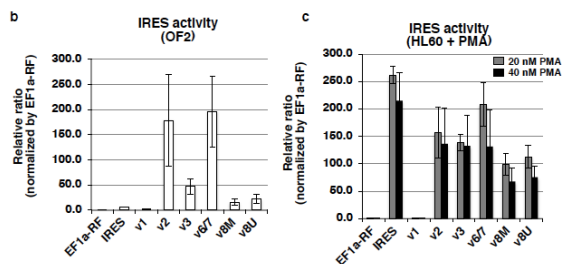


図5 細胞特異的 IRES 活性レベル. (b)OF2、(c)HL60 由来マクロファージ(iMac; HL60+PMA)

④ Cap 依存性・非依存性翻訳機構

IRES 活性が検出されたので、Cap 非依存性の翻訳機構が示唆された。そこで、Cap 依存性翻訳機構の阻害剤であるラパマイシン処理により、GCase タンパク質の発現レベルが変動するか検討した。その結果、OF では図6に示すようにタンパク質レベルが変動しないこと、また3本の検出されたバンドは糖鎖修飾由来であり、異なるアイソフォーム由来ではないと考えられた。

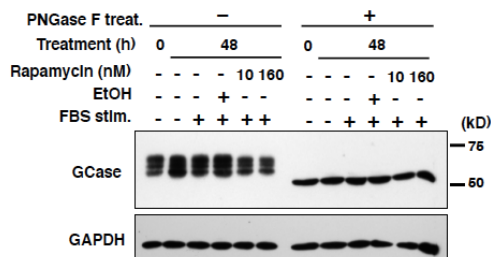


図6 OF2 でのラパマイシン処理後の GCase 発現レベル. PNGase F 処理は糖鎖修飾を外す。

⑤ 偽遺伝子 *GBAP* と既知の *miR22-3p* の発現パターン解析

エピジェネティック制御として既に報告のあった *miR22-3p* および RNA スポンジとしての役割をしている (*Sci Rep* 7, 12702, 2017) と報告された *GBAP* と *GBA* の各発現レベルを qPCR にて解析した。

図7に示すように、線維芽細胞(左)に比較して、HL60 と iMac では *GBAP* と *miR22-3p* に逆相関が認められた。

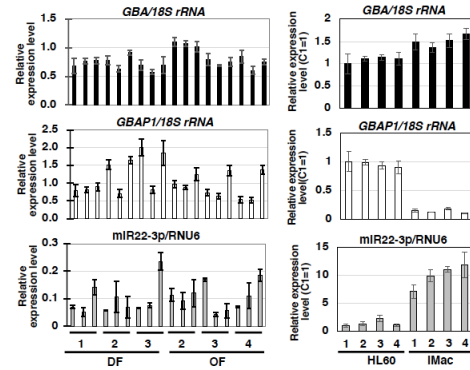


図7 *GBA*、*GBAP*、*miR22-3p* の、各細胞における発現レベル

(4) 総括

本研究を総括する。

ゴーシェ病(GD)は、原因遺伝子変異と臨床症状が必ずしも相関しないことから、エピジェネティック制御の関与が示唆された。そこで本研究では、申請者らが樹立した亜型 GD 患者および家族由来口腔粘膜線維芽細胞を用いて、*GBA* 遺伝子発現調節機構に関わる RNA のエピジェネティックモディファイヤーを探索し、未解明の GD 発症機序を解明することを目的とし、1) *GBA* 特異的翻訳開始調節に関与する RNA エピジェネティックモディファイヤーとしての *miRNA* 及び RNA 修飾の解析、2) 患者 OF 由来 iPS 細胞(GOF-iPS)からマクロファージ、神経、およびミクログリアに分化誘導した病態モデルを作成、3) 発見した *miRNA* の組織特異性の検討と共に、病態モデルでの *miRNA* 阻害による治療標的としての可能性を評価するというものであった。

エピジェネティック解析を行うにあたり、徳島大学の研究倫理審査に追加手続きを行った後、試料提供者に再同意を得た上で研究に取りかかったのだが、インフォームドコンセントのタイミング等により、大きく開始が遅れてしまった。しかし、その間に解析技術環境が進展し、*miRNA* および修飾 RNA のアレイによる網羅的解析が可能となった。その結果、成果(1)(2)で示したように、*miRNA* よりむしろ RNA 修飾パターンが患者において特異的であることを発見したことは、大きな成果である。また、本解析の過程で、性別や年齢による RNA 修飾の違いが、健常者間でも存在することがわかってきたこと、また RNA の修飾パターンが疾患の原因と関連するのか、結果としての二次的表現型なのか等については、公共データベース等のデータと統合するなど、工夫して慎重に検討する必要がある、さらなる解析が必須である。また、これまで当研究グループで行ってきたエクソーム解析や mRNA アレイ解析なども再度検討し直す必要があると思われる。本研究内容については当初の予定とは異なる結果が得られ、当初の研究計画通りには研究が進められなかったが、次年度から新たに採択された科学研究費(基盤 C)の支援により、RNA 修飾に重点を置いた研究を継続して進める予定である。

一方、当初の研究計画にはなかったが、本研究の前提となる先行研究で予期せぬ結果を得たことから、研究計画を変更し、上記 RNA エピジェネティック解析と並行して進めてきた、構造から迫る *GBA* 遺伝子発現制御機構の解析については、新たな制御機構の存在を明らかにした。すなわち、2つのプロモーターによる Cap 非依存的、IRES 活性依存的な翻訳制御機構と、Cap 依存的・IRES 非依存的な翻訳開始機構の存在を明らかにするとともに、HL60 を用いたマクロファージ誘導系において、偽遺伝子である *GBAP1* と *miR223-3p* の発現が逆相関していることを発見した(現在、*Communications Biology* にリバイス投稿中)。本結果は、本来の目的である *GBA* 遺伝子発現調節機構と GD 発症機序の解明に新たな視点を提供するものであると同時に、まだ未解明な翻訳調節機構の存在を示唆している。

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	萩田 浩子 (HAGITA Hiroko) (30512123)	徳島大学・技術支援部蔵本技術部門・技術専門職員 (16101)	
研究分担者	野間 隆文 (NOMA Takafumi) (40189428)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	削除：2020年2月26日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関