様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 １２ 日現在

機関番号：８２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０７７８７

研究課題名（和文）乳児に発症する炎症性腸疾患と造血不全の原因となる新たな単一遺伝子疾患の確立

研究課題名（英文）Research for a novel single gene disorder with inflammatory bowel disease and congenital anemia in infancy.

研究代表者
竹内　一朗（Takeuchi, Ichiro）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児内科系専門診療部・医員

研究者番号：３０７９００００

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：原因不明の先天性貧血と生後早期に発症した炎症性腸疾患、および低身長と発達遅滞を呈する女児から検出されたPOLE遺伝子変異は、ポリメラーゼε　(Polε）を構成する4量体のひとつであるPOLE1タンパクの発現低下と核内移行障害の原因となり、TP53の発現亢進につながることが明らかとなり、動物実験でも貧血が再現された。本研究によって検出されたPOLE遺伝子変異が機能喪失型変異であることが解明され、Polε異常によるDNA合成障害と強い細胞ストレスの結果として各症候が生じたことが明らかとなった。本結果を元にPOLE遺伝子を原因とする先天性貧血と炎症性腸疾患を呈する新たな症候群を提唱すべく論文化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
患者から同定されたPOLE遺伝子変異はこれまでに報告のないエクソン部位に位置する変異であり、Polεに重度の機能障害をもたらした結果、生体内では造血障害と腸の恒常性破綻につながることが初めて明らかになった。POLE遺伝子異常による疾患スペクトラムの重症型として先天性貧血とIBDが生じ得ることが報告されたため、POLE遺伝子が同様の表現型を呈する患者の遺伝子検査の対象となり、本症候群の早期診断につながる可能性がある。さらに、患者の先天性貧血と炎症性腸疾患が造血幹細胞移植によって根治されたことから、早期診断によって予後の向上につながることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mutations in the POLE gene coding POLE1 protein, one of the polymerase ε (Polε) tetramers, were detected in patients with congenital anemia, inflammatory bowel disease, short stature, and developmental delay. Our study revealed that the mutations lead to decreased expression of POLE1 protein and impaired nuclear translocation, resulting in increased TP53 expression. In experiments using animal models, anemia was also reproduced. In our study, the POLE gene mutations were clarified to be a loss-of-function mutation, and it became clear that each symptom occurred due to impaired DNA synthesis and cellular stress caused by Pol ε dysfunction. These results have been reported to propose a new syndrome with congenital anemia and inflammatory bowel disease caused by the POLE mutations.

研究分野：小児科

キーワード：遺伝性疾患　先天性貧血　炎症性腸疾患　ポリメラーゼε　TP53

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

小児の慢性疾患を克服することを目指した成育医療では、複数の器官に異常が生じる「症候群」の臨床像と病態解明が求められている。近年の遺伝学の発展に伴い、小児期発症の症候群の中には単一遺伝子異常による遺伝性疾患が存在することが明らかとなり、診断によって治療が最適化されることで予後が改善する疾患も含まれている。網羅的な遺伝子解析を行っても既知の遺伝性疾患の診断率は 2 割以下に留まると報告されている一方で、遺伝子解析によって Variant of Uncertain Significance が同定された遺伝子と、患児の症候を照会することで原因候補遺伝子が同定され新規の遺伝性疾患が確立されることも稀ではない。私たちは、小児の炎症性腸疾患（IBD）患者に全エクソーム解析を行う中で、IBD・先天性貧血・成長障害を呈する同胞例から、DNA ポリメラーゼεの 4 量体を構成する POLE1 をコードする *POLE* 遺伝子の両アリル性変異を同定した。

<u>IBD と先天性貧血を呈する同胞例から検出された *POLE* 遺伝子変異</u>

(1)表現型

姉妹ともに胎児期に発育不全が指摘され、初回の採血で先天性貧血と診断後、定期的に輸血が行われた。骨髄検査や遺伝子検査では既知の原疾患は特定できなかったが、TP53 が過剰に発現していた。姉は生後 2 か月で血便を発症して IBD と診断されたほかに、低身長・顔貌異常と多系統の異常が認められている。姉は 1 歳 10 か月時に造血幹細胞移植が施行されて以降は IBD と貧血のいずれも再燃なく経過しており、妹も 1 歳 5 か月時に造血幹細胞移植が施行され、貧血の改善を維持している。

(2) 遺伝型

姉妹の *POLE* 遺伝子に報告のない母由来の p.D1131fs と、父由来の p.Thr1892del が認められた。両親が発症していないことから、複合ヘテロ接合によって POLE1 異常が生じている可能性が考えられる。

２．研究の目的

POLE 遺伝子は臨床像に異同がある「IMAGEI 症候群」との関連が報告されているが、POLE 異常による染色体の不安定性は様々な症候を生じる可能性がある。本研究は、IBD と先天性貧血の原因候補遺伝子として検出された *POLE* 遺伝子変異の病的意義を明らかにして、新たな症候群を確立することを目的とする。本研究で得られた結果を元に、IBD と先天性貧血の鑑別疾患に *POLE* 遺伝子変異を加えることを社会に提言して、次なる患者の早期診断と早期治療を目指す。また本疾患の症例を蓄積して、IBD と先天性貧血の病態の理解を更に深めることで、将来の新たな治療薬やドラッグリポジッションなどの治療開発につながることが期待される。このことは、小児慢性疾患の克服を目指した成育医療において意義が大きいと考える。

３．研究の方法

<u>(1) 患者由来の iPS 細胞作製</u>

POLE 遺伝子が先天性貧血の原因であることを証明するために、解析に必要な患者由来の iPS 細胞樹立を計画した。ウェスタンブロット解析および RNA 解析に加えて、赤血球への分化誘導実験を行う計画も立案していたが、患者由来の iPS 細胞は増殖性が不安定であり赤血球分化誘導試験の実施が困難であったため、患児の骨髄では TP53 が過剰に発現していることから、Fanconi

貧血や Diamond-blackfan 貧血といった既知の先天性貧血の病態に関与する TP53 の過剰発現を間接的に証明した。

(2) 患者由来の線維芽細胞樹立とタンパク発現の確認

患者検体から皮膚線維芽細胞を樹立して、ウェスタンブロット解析で当該遺伝子のタンパク発現の有無を確認する計画を立案したが、上記のように当該遺伝子変異の影響と考えられる細胞増殖性の不安定性によって実験に使用可能な患者由来の線維芽細胞を樹立することが出来なかった。代替として樹立した患者由来の iPS 細胞、および当該遺伝子変異を導入した HEK293 細胞を用いた解析を行った。

(3) トランスクリプトミクス解析、プロテオミクス解析を含む多層オミックス解析

当該遺伝子変異による生物学的パスウェイの変化を解析するために、樹立した患者由来の iPS 細胞を用いた RNA 解析を行い、前述の TP53 や他のサブユニットタンパクの発現動態の変化を解析した。

４．研究成果

(1) タンパク発現

遺伝子変異を導入した HEK293 細胞を用いたウェスタンブロット解析では、当該タンパクが核内ではなく細胞質に偏在することが判明した（図 1）。免疫組織染色では、p.Asp1131fs と p.Thr1891del は POLE1 の核内移行障害が確認されたことに加えて、p.Thr1891del では POLE2 も細胞質に偏在していることが分かり、p.Thr1891del は POLE2 の核内移行も障害をもたらすことが示された（図 2）。

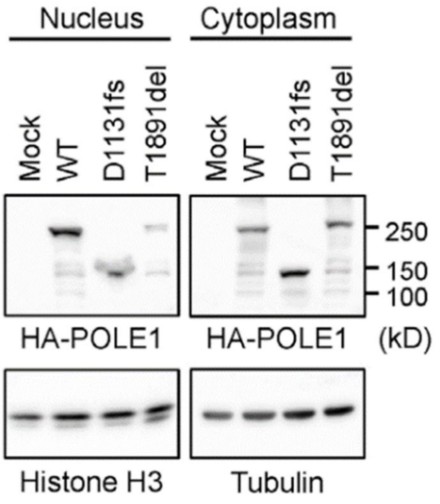

図 1: POLE1 のタンパク発現

(2) RNA 解析

姉の腸検体および妹の血液検体から樹立された患者由来の iPS 細胞を用いて、RNA 解析を施行した。患者 iPS 細胞では Pol ε の異常によって他のレプリソームコンポーネントの転写が亢進していることが分かった(図 3)。POLE1 の mRNA 転写も亢進していたが、p.Asp1131fs の mRNA は著明に低下していた(図 4)。このことから、p.Asp1131fs から転写された mRNA はタンパク発現に至る前に分解される一方で、p.Thr1891del は通常と比較して転写が亢進していることが示唆された。

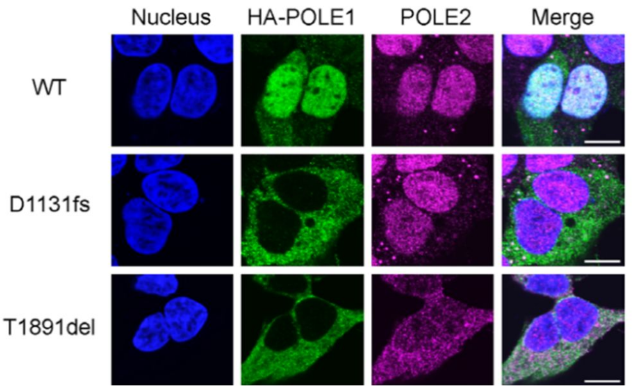

図 2: POLE1 と POLE2 の免疫染色

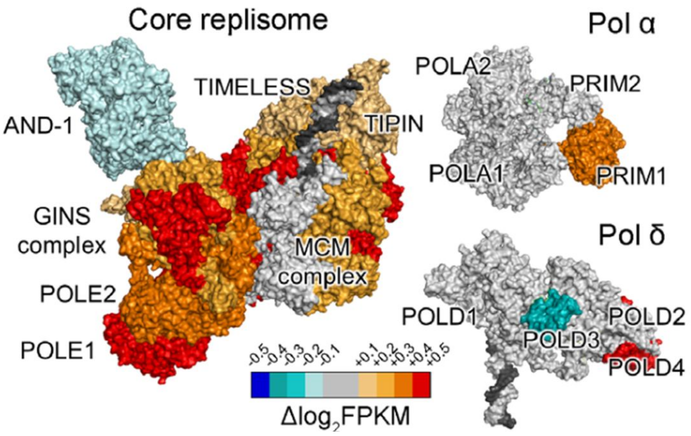

図 3: Pol ε, α, δおよび Core replisome の RNA 解析

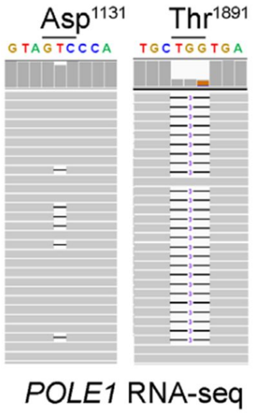

図 4: *POLE* バリアントの RNA 解析

(3) TP53 発現

貧血の病態に TP53 の過剰発現が関与していることを明らかにするために、患者 iPS 細胞を用いて RNA 解析とウェスタンブロット解析を行った。姉由来 iPS 細胞と妹由来の iPS 細胞の両方で、TP53 の mRNA 転写が亢進していることに加えて、ウェスタンブロット解析でも TP53 の発現が亢進していることが明らかになった(図 5, 6)。

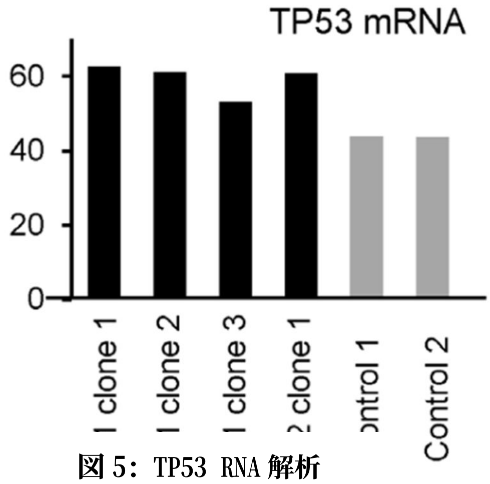

図 5: TP53 RNA 解析

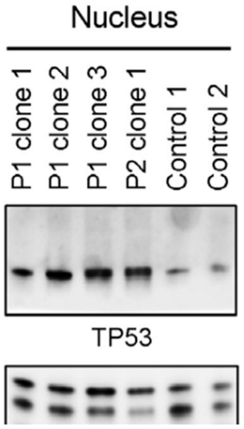

図 6: TP53 発現

上記の結果に加えて、*Pole* をノックアウトしたメダカを用いて in vivo で貧血が再現されたため、同定された *POLE* 遺伝子変異は Pol ε の発現低下と核内移行障害の原因となる機能喪失型変異であり、その結果 DNA 合成障害と強い細胞ストレスによる TP53 の過剰発現が生じることが患児の病態につながることが明らかとなった。本研究で対象となった *POLE* 遺伝子変異はこれまでに報告のないエクソン部位に位置する変異であり、Pol ε に重度の機能障害が生じた結果、生体内では造血障害と腸の恒常性破綻に至ることが示唆された。*POLE* 遺伝子を原因とする先天性貧血と炎症性腸疾患を呈する新たな症候群を提唱すべく、本研究結果を Journal of Medical Genetics に掲載された (Journal of Medical Genetics 2024;61:239-243) で発表した。*POLE* 遺伝子異常による疾患スペクトラムの重症型として先天性貧血と IBD が生じ得ることが報告されたため、今後、*POLE* 遺伝子が同様の表現型を呈する患者の遺伝子検査の対象となり、本症候群の早期診断と造血幹細胞移植による早期治療が実現する可能性が開かれた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名	４．巻
Takeuchi I, Tanase-Nakao K, Ogawa A, Sugawara T, Migita O, Kashima M, Yamazaki T, Iguchi A, Naiki Y, Uchiyama T, Tamaoki J, Maeda H, Shimizu H, Kawai T, Taniguchi K, Hirata H, Kobayashi M, Matsumoto K, Naruse K, Hata K, Akutsu H, Kato T, Narumi S, Arai K, Ishiguro A	61
２．論文標題	５．発行年
Congenital anaemia associated with loss-of-function variants in DNA polymerase epsilon 1	2024年
３．雑誌名	６．最初と最後の頁
Journal of Medical Genetics	239-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1136/jmg-2023-109444	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

〔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	鳴海　覚志 (Narumi Satoshi) (40365317)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究分担者	阿久津　英憲 (Akutsu Hidenori) (50347225)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長 (82612)	
研究分担者	秦　健一郎 (Hata Kenichiro) (60360335)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・シニアフェロー (82612)	
研究分担者	石黒　精 (Ishiguro Akira) (90222984)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・教育研修部・部長 (82612)	

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