

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))
分担研究報告書

「自己貪食空胞性ミオパチーの原因解明」
～候補遺伝子変異の病因性の証明のためのプラットフォームの確立と方法論の
検討～

研究分担者 野口悟 国立精神・神経医療研究センター神経研究所
研究協力者 遠藤ゆかり 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナルメディカルセンター
研究協力者 西村洋昭 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

研究要旨

次世代シーケンサーにより得られる変異候補情報から、真の変異を探しだすこと、変異の病因性を証明することが課題となっている。本研究では□-dystroglycanopathyを対象に、効率的な変異の病因性の証明をするための方法の確立を目的とした。半数体株化細胞を用いて、調べたい遺伝子が欠損した細胞の表現型を解析する、変異遺伝子または野生型遺伝子を導入することで、細胞の表現型が回復出来るのかを指標に、用いた遺伝子変異が真変異か、偽変異を判断した。さらに、半数体株化細胞にて、短期間に遺伝子欠損細胞を作製する方法を検討した。

A. 研究目的

次世代シーケンサー解析によって□-dystroglycanopathyの様々な原因遺伝子に見いだされた候補変異の病原性を、短期間にて簡単に評価しうる単一プラットフォームを作製すること。

B. 研究方法

遺伝子欠失HAP1 (KO) 細胞の作製

HAP1細胞は(野生型、GTDC2-KO, DAG1-KO)は、Netherlands Cancer InstituteのDr. Brummelkampより供与を受けた。

ISPD、FKTN、FKRP、GMPPB遺伝子KO細胞の作製は野生型HAP1細胞にCRISPR/Cas9システムを用いて行った。同一エクソン内に2カ所のgRNA標的配列をデザインした。デザイン配列を含むCRISPR/Cas9ベクターはblasticidin発現プラスミドとともに、lipofectamine-plus試薬を用いて、野生型HAP1細胞に導入した。Blasticidinによる薬剤耐性の後、各遺伝子あたり200細胞株

をクローン培養した。変異株のスクリーニングは、ラミニン上で培養した生細胞を□-dystroglycanの糖鎖に対する抗体11H6にて染色することで行った。蛍光染色された蛍光陽性クラスターの強度と大きさにより検定した。蛍光染色陰性クローンよりゲノムDNAを調整後、変異予想部位を含む領域をPCR/配列解析に供した。

変異機能試験

全エクソーム解析により見いだされた□-dystroglycanopathy患者に見いだされた複合ヘテロ変異：DAG1遺伝子c.220G>A(予測アミノ酸変異p.V74I)及びc.331G>A(p.D111N); GTDC2変異c.494T>C(p.M165T)及びc.785C>T(p.P253L)を対象に行った。ヒトDAG1 cDNAとGTDC2 cDNAは、ヒト骨格筋cDNAプールからPCRにて増幅・クローニングした。PCRエラーにて生じた変異は、site-directed mutagenesisにて参照配列に矯正し、野生型cDNAを得た。変異の導入にはさらに、

site-directed mutagenesis を用いた。野生型及び変異 cDNA は、pLVSIN-IRES-ZsGreen にクローニングし、レンチウイルスベクタークローンを得た。レンチウイルスベクターの作製は定法を用いた。

変異の病因性の評価は、HAP1 生細胞を α -dystroglycan の糖鎖に対する抗体 11H6 にて染色することで行った。今回用いた変異は劣性遺伝変異が予想されたため、もし変異タンパク質が「真の変異」をもち、機能を失っていた場合には、欠損細胞は変異遺伝子の導入で蛍光染色が陽性とならない。もし、変異が”多型“であって、依然として機能タンパク質が作られる場合には、蛍光染色が陽性となると考えられた。そこで、ZsGreen 陽性細胞にて、11H6 染色の回復の有無を調べることで、変異を評価した。同様に、DAG1 変異に関しては、変異タンパク質導入による α -dystroglycan の細胞膜での発現回復も同様に解析した。

(倫理面への配慮)

すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認(筋疾患関連遺伝子のクローニング: 25-01)を得ている。

C. 研究結果

野生型 HAP1 細胞は、ラミニン上で培養することで、 α -dystroglycan は集積し、クラスター形成した。これにより、11H6 抗体での染色感度が著明に上がった。一方、GTDC2-KO、DAG1-KO 細胞では α -dystroglycan の染色はほぼ、見られなかった。

HAP1 細胞は半数体であり、同一エクソン内に異なる標的配列をデザインした 2 種類の CRISPR/Cas9 ベクターを cotransfection することで、大きな遺伝子欠失株の作製を試みた。11H6 抗体スクリーニングにより、40-60 個程度の染色陰性クローンが得られた。しかしながら、10%程度のクローンは増殖が悪く、株の樹立には至らなかった。増

殖クローンの遺伝子解析にて、部分欠失が確認されたクローンは、ISPD 遺伝子を欠失した 2 クローンのみであった。他のクローンは、点変異により、11H6 抗体陰性になると考えられ、配列検索を進めている。

DAG1-KO 細胞への p.V74I 変異及び p.D111N 変異 DAG1 cDNA の導入により、11H6 抗体陰性であった。野生型 cDNA では 11H6 抗体陽性となった。興味深いことに、それぞれの変異 DAG1 cDNA が導入された HAP1 細胞での α -dystroglycan の発現はほぼ完全に回復していた。このことは、DAG1 変異が、dystroglycan の発現に影響を及ぼすものではなく、 α -dystroglycan の糖鎖合成に関わるものであることを示唆していた。また、各々の変異 DAG1 cDNA 導入細胞で、 α -dystroglycan のコアタンパク質の発現は確認された。以上の結果から、これらの変異により α -dystroglycan は糖鎖不全をおこすことが予測された。

さらに、GTDC2-KO 細胞への p.M165T 変異及び p.P253L 変異 GTDC2 cDNA の導入についても、野生型 cDNA で見られるような 11H6 抗体での染色性は回復しなかった。以上の結果から、これらの変異は GTDC2 の機能不全を引き起こすことが予測された。

D. 考察

α -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、現在 18 種類以上が同定されている。 α -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、糖鎖合成に関わる酵素をコードしているものが大半であり、患者で同定された変異の証明には変異遺伝子産物の酵素活性を測定する方法が一般的である。しかしながら、変異遺伝子毎に異なるアッセイ系を構築せねばならず、かつ、放射性同位体を用いる方法が一般的のため、十分に証明されていないままに報告されることもある。また、機能が同定されていない遺伝子に関しては、証明の方法もないのが現状である。Jae らによって報告された HAP1 細胞を用いた α -dystroglycanopathy の候補遺伝子を予測、実証した方法は、理論上、すべての候補遺伝子、遺伝子変異に応用可能な方法である。この方法では、HAP1 細胞での

□-dystroglycan の糖鎖合成を指標として、調べたい変異遺伝子のノックアウト株に、同定した変異をもつ遺伝子を導入し、相補性試験を行う。相補出来れば変異ではなく、相補出来なければ機能不全変異と考えられる。すべての原因遺伝子のノックアウト株を持てば、すべて同じ系で評価出来るはずである。また、HAP1 細胞は半数体であり、現在のゲノムエディティングの方法によりノックアウト株が容易に取得出来る。この方法が広く整備されれば、非常に容易く、短期間に、□-dystroglycanopathy の変異評価が出来るものと考えている。

骨格筋分化細胞はラミニン上で培養することで □-dystroglycan が集積し、□-bungarotoxin 陽性の疑似 NMJ を形成することが報告されている。今回の HAP1 細胞でも、筋細胞と同様に、野生型細胞はラミニン上で培養することで、□-dystroglycan は集積し、クラスター形成した。Jae らの原著では、Flow cytometry を用いて、□-dystroglycan の 2H6 染色を評価していた。確かに、HAP1 細胞での □-dystroglycan の染色は薄く、顕微鏡下の観察ではバックグラウンドとの差がとれなかった。しかしながら、クラスター形成をさせることで、明瞭に染色の強度を評価できることがわかった。

今回の研究では、*DAG1* 及び *GTDC 2* 遺伝子に応用したが、非常に明瞭かつ短期間にて、見出された変異が機能消失変異であることを示すことが出来た。実際にすでに cDNA を持っていれば、2 週間足らずで、その変異の病因性を知ることが可能となった。

今回開発した方法は、Flow cytometry などの装置のない一般的な施設でも行うことが出来る方法と考えている。今後は □-dystroglycanopathy のすべての原因遺伝子欠損細胞株を作製するとともに、その測定法の詳細なパラメーターを標準化することで、世界中の研究者が標準的に使用するシステムへと発展させたいと考えている。

E. 結論

□-dystroglycanopathy を対象に、効率的

な変異の病因性の証明をするための方法をした。短期間に遺伝子変異の病因性の証明が可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I, Hayashi YK: Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations. *J Neurol Sci*. [Epub 2014 Mar] ahead of print

doi: [10.1016/j.jns.2014.02.036](https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.02.036).

PMID: 24642510

Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the *GNE* gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (*GNE* myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub 2013 Sep] ahead of print. doi: [10.1136/jnnp-2013-305587](https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305587) PMID

2. 学会発表

Endo Y, Motomura K, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Nishino I: Exome analysis on tubular aggregate myopathy. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA (Boston Convention & Exhibition Center), 10.23, 2013 (10.22-10.26)

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: High prevalence of hepatitis C virus infection in a Japanese inclusion body

myositis cohort. 18th International
Congress of the World Muscle Society,
Asilomar, USA (Asilomar Conference
Grounds), 10.3, 2013 (10.1-10.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし