

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：ゲノム不安定性疾患に対するスプライシング異常を引き起こす VUS の人工核酸を用いた網羅的検証と創薬ターゲットの導出

Comprehensive validation of VUSs that cause aberrant splicing identified in the genome instability syndrome cases by artificial antisense oligonucleotides

研究開発実施期間：令和2年12月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：中沢 由華

Yuka Nakazawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学環境医学研究所 生体適応・防御研究部門 講師
Tokai National Higher Education and Research System, Nagoya University, Research Institute of Environmental Medicine, Division of Stress Adaptation and Protection, Associate professor

II 研究開発の概要

本研究班では、ゲノム不安定性疾患群の中でも特に、色素性乾皮症とコケイン症候群を対象として、次世代ゲノム解析にて抽出される意義が不明な変異 (Variants of Uncertain Significance: VUSs) を解消し、疾患原因となっている変異を特定するとともに、治療薬候補を得ることを目指し研究を推進した。

次世代ゲノム解析が広く普及してきたことにより、遺伝性疾患を含む様々な疾患発症に関係する遺伝子変異が多数同定されてきている。しかし、特定される変異の多くは、その病原性の確定が比較的容易である蛋白質コード領域、あるいは、蛋白質コード領域と非コード領域の境界に存在する変異である。その一方で、膨大な量のゲノムデータが蓄積されてきたことにもともない、意義不明変異 (VUSs) も多数検出されるようになってきている。しかし、これら VUS の疾患発症への関与を評価する調査や病原性の検証などは、十分には行われていない。中でも、同義置換変異やイントロンバリエーションに関する評価はほとんど行われてこなかった。

我々はこれまで、ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患の発症原因の特定と分子病態解明を目指して、継続した研究を行ってきている。ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患とは、遺伝情報を安定に維持し伝達するために必要な、DNA 修復機構や DNA 損傷応答機構の異常により発症する様々な疾患を指し、これらを総称してゲノム不安定性疾患群と呼ぶ。ゲノム不安定性疾患群には、本研究班の対象である、色素性乾皮症やコケイン症候群のほか、ゼッケル症候群やウェルナー症候群、ロスマンド・トムソン症候群、ファンconi貧血、ブルーム症候

群など多種類の難治性遺伝性疾患が含まれている。我々は、このゲノム不安定性疾患群について、国内外の臨床医・研究者と連携して症例収集と解析を行い、臨床現場への情報の還元を行ってきた。その中で、ゲノム解析のみでは疾患発症に関わる遺伝子変異が特定されず、VUS の情報が蓄積される症例が多数出てきた。そこで、本研究班では、ゲノム不安定性疾患群の中でも特に、色素性乾皮症とコケイン症候群を対象として、VUS の疾患発症への関与を評価するスクリーニング系とそれを応用した創薬ターゲット特定法の構築に取り組んだ。

まず、VUS の疾患発症への関与を評価する蛍光標識を活用したスクリーニング系の開発を進めた。患者由来細胞を使用することで、より正確な評価結果を得ることを目指したが、ゲノムデータのみ保有しており患者由来細胞の入手が困難なケースでは、遺伝子編集細胞を作製することで評価を行うこととした。また、マルチウェルプレートと蛍光画像自動取得装置を用いることで、多検体にて抽出される多数の VUS 評価に対応可能であり、かつ客観的な結果が得られる解析法とするなど、将来的に一般的な検査技術として応用することも考慮し開発を進めた。さらにこの VUS 評価法を応用して、人工核酸 (アンチセンスオリゴ:ASO) をもちいた創薬ターゲットの特定も可能であった。加えて、予定外の成果として、創薬ターゲットの特定に際して、細胞数による毒性評価も同時に可能な技術とすることができた。そこで、本技術をさらに応用させ、より効能の高い ASO の選択を試みた。現在、様々な種類の ASO が知られており、種々の分野で創薬開発に用いられているが、本研究班では 3 種類の ASO に関して、同一疾患原因変異に対する回復効果 (治療薬としての効用) および影響を患者由来細胞を用いて比較検討した。その結果、ASO の種類によって、蛋白質の発現回復は良好であるものの細胞機能の回復率が悪い、あるいは細胞機能の回復率は良いものの細胞毒性がやや高いなど、それぞれの特徴を評価することが可能であった。これらにより、本技術は単に疾患原因変異の特定や治療ターゲットの決定にて活用できるだけでなく、その後の治療薬の選別など、個々の変異、個別の患者に対応した個別化医療にも適用可能な技術となったと考えられる。

次に、本技術を用いて、実際の疾患原因不明症例にて VUS の評価と創薬ターゲットの特定に取り組んだ。これまでに次世代ゲノム解析 (全 exome 解析) を実施したものの疾患原因が特定されていない症例について、本研究班の対象となる症例の選別を行い、さらなるゲノム解析 (全ゲノム解析とトランスクリプトーム解析) を実施し、VUS を抽出したのち、上記のスクリーニング法による病原性の評価と創薬ターゲットの探索を試みた。

色素性乾皮症 (XP, 指定難病 159) は、DNA 修復機構の 1 つであるヌクレオチド除去修復機構あるいは損傷乗り越え修復の先天的な異常により発症するゲノム不安定性疾患で、疾患原因となる変異を持つ遺伝子の種類によって、A~G および V 群に分類される。日光過敏や皮膚がんを好発し、本邦では有病率が高い (2 万 5 千人に 1 人の割合とも言われている) ことも特徴的である。根本的な治療法はなく、日常的な紫外線防護や皮膚がんの外科的除去などの対応が中心であり、患者 QOL は決して高く無い。これまでの解析で、色素性乾皮症が疑われたものの疾患原因が特定されていない症例を対象として評価・解析を実施した。まず、対象症例について全ゲノム解析、トランスクリプトーム解析を行い、異常なスプライシングや mRNA の不安定化が原因となり疾患発症している可能性のある症例を選出するとともに、VUS の抽出と候補遺伝子の絞り込みを行った。この情報をもとに、本研究班にて開発を行った蛍光標識を活用したスクリーニング法を用いて VUS の病原性の評価を行ったところ、新規のイントロン深部の原因変異を複数同定した。さらに、これらの変異について、治療薬候補の探索を実施したところ、有力な候補を得ることができた (一部の変異についてはスクリーニングを継続中である)。

コケイン症候群 (CS, 指定難病 192) は、DNA 修復機構の 1 つである転写と共役したヌクレオチド除去修復機構の先天的な異常により発症するゲノム不安定性疾患で、有病率は 100 万人に 1~2 名程度と言われている。早期老化や進行性の神経変性、小頭症・発育異常など全身性の重篤な症状を示すことが知られている。転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に関連する遺伝子、CSA、CSB、XPB/D/F/G に異常がある場合に発症し、稀に色素

性乾皮症やファンconi貧血を併発するケースもある。根本的な治療法は無く、典型的な例では 20 歳までに亡くなることが多い。これまでの解析で、コケイン症候群が疑われていたものの疾患原因が特定されなかった症例を対象としてスクリーニングを実施した。その結果、複数の新規疾患原因変異を同定し、一部の症例では ASO による創薬の可能性が高まったため、創薬ターゲット特定に向けてより詳細な解析を実施した。

ゼッケル症候群 (SS)は、小頭症・小人症、発育異常を示し、DNA 複製・細胞周期チェックポイントの異常により発症することが知られている、世界でも非常に稀なゲノム不安定性疾患である。ゼッケル症候群疑いで疾患原因変異不明の症例について、上記と同様のスクリーニング法を用いて解析した結果、イントロン深部の新規疾患原因変異 (1 塩基置換変異)を同定し、合わせて創薬ターゲットの特定を達成した。本ケースでは、1 症例 (1 家系)の解析であっても、疾患原因変異の同定はもちろん、創薬ターゲットの選定も可能であることが明らかになった。これにより、本研究班にて開発した技術は、超希少疾患の創薬開発にも有効であることが十分に示されたと考えられる。

以上のように、種類の異なる複数の遺伝性疾患に対して有効な ASO による VUS 評価法/創薬ターゲット特定法を開発した。本技術により、様々な理由でこれまで疾患原因変異不明とされていた症例の治療薬創出の可能性を広げたと考えられる。さらに、本研究班で開発に取り組んだ ASO による VUS の評価法と治療薬候補の導出原理は、疾患の種類に関わらず、イントロン内変異やスプライシング異常を引き起こす変異をもつ種々の症例に対して広く有効であると考えられる。このため単なる VUS の評価にとどまらず、症例数の不足から治療薬開発が進まない、様々な希少難治性疾患への応用が期待され、希少疾患に対する創薬アプローチとして将来有望なシステムであると考えられる。今後、全ゲノム解析が更に普及してくる (AMED 難病全ゲノム解析班-国土班などの取り組み)ことで、VUS の蓄積が加速してゆくと考えられるほか、イントロン内変異を対象とした ASO による治療が期待できる疾患数・症例数は更に増加すると予想される。本研究班にて開発した評価系を様々な疾患に応用することで、引き続き、VUS の解消とともに、希少疾患の創薬分野に貢献してゆきたいと考えている。

In this research and development, we focused on Genomic Instability Diseases, particularly Xeroderma Pigmentosum (XP) and Cockayne Syndrome (CS), aiming to resolve Variants of Uncertain Significance (VUSs) identified through next-generation genome analysis. Our goal was to identify the mutations that contribute to the diseases and obtain potential therapeutic candidates (ASO-based therapies). With the widespread adoption of next-generation genome analysis, numerous genetic mutations related to the onset of various diseases, including genetic disorders, have been identified. However, many of the identified mutations are located in the protein-coding regions or boundaries between protein-coding and non-coding regions, where determining their pathogenicity is relatively straightforward. On the other hand, with the accumulation of a vast amount of genomic data, a large number of VUSs are also being detected. However, the validation of the involvement and pathogenicity of these VUSs in disease onset has not been fully conducted.

We have been conducting continuous research aiming to identify the causes of intractable genetic disorders that demonstrate genomic instability and to elucidate their molecular pathogenesis. Genomic instability refers to various diseases that occur due to abnormalities in DNA repair mechanisms and DNA damage response mechanisms, which are necessary for maintaining and transmitting genetic information in a stable manner. Collectively, these diseases are referred to as a group of genomic instability disorders. The XP and CS, which is the subject of this research proposal, falls under the category of genomic instability disorders. With genomic analysis alone, many cases (XP and CS) have emerged where the genetic mutations related to disease onset have not been identified, leading to the accumulation of VUS. Therefore, in this research project, our team has focused on developing a screening system to assess the involvement of VUS in disease onset and an associated method for identifying potential drug targets.

The research has resulted in the development of effective methods for evaluating VUS and identifying potential drug targets for multiple different genetic disorders. This breakthrough has expanded the possibilities for drug discovery in cases that were previously considered to have unknown disease-causing mutations. In the future, it is anticipated that the wider adoption of whole-genome analysis will lead to an increase in the number of diseases and cases that can benefit from ASO-based therapies targeting intronic mutations. We aim to further contribute to the field of drug discovery for rare diseases by applying the evaluation system developed by our research team.