

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名 : (日本語) ジュベール症候群およびジュベール症候群関連疾患の病態解明と科学的診断・治療法の開発
(英語) A study of pathogenesis and development for biological diagnosis and treatment of Joubert syndrome and its related diseases.
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名 : (日本語) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部
室長 伊藤雅之
(英語) National Center of Neurology and Psychiatry, National Institute of Neuroscience, Department of Mental Retardation and Birth Defect Research. Division Head, Masayuki Itoh.
- 実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) ジュベール症候群およびジュベール症候群関連疾患の診療ガイドライン作成のための研究
開発課題名 : (英語) A study for clinical guideline of Joubert syndrome and its related diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学大学院小児科学 教授 岡明
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Pediatrics, University of Tokyo, Professor, Akira Oka.
- 分担研究 (日本語) ジュベール症候群およびジュベール症候群関連疾患の病態解明のための細胞生物学研究
開発課題名 : (英語) Cell biological study of pathophysiology of Joubert syndrome and its related diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 山梨大学大学院解剖細胞生物学 教授 竹田扇
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Anatomy and Cell Biology, University of Yamanashi, Professor, Sen Takeda.

分担研究 (日本語) 疾患モデルマウスの作成と病態解明
開発課題名: (英語) Development and pathological analysis of model mice of Joubert syndrome and its related diseases
研究開発分担者 (日本語) 国立医薬基盤・健康・栄養研究所 疾患モデル小動物研究室
プロジェクト研究員 佐々木光穂
所属 役職 氏名: (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Project researcher, Mitsuho Sasaki

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、以下臨床研究を中心的に進めた。疫学調査の結果から診療ガイドライン作成のためのクリニカルクエスション (CQ) とシステマチックレビューを開始した。また、遺伝子診断を確立した。あわせて、患者細胞を用いた細胞生物学的研究とモデルマウスの作成と病理学的解析を行った。

(1) 臨床研究

1. 診断基準と診療ガイドライン作成 (伊藤雅之、岡明、岩崎裕治): 前年度のアンケート調査をもとに、診断基準案を作成した。また、Minds の基準にしたがって、診療ガイドライン作成に取り掛かった。小児科、小児神経科、小児腎臓内科、小児眼科、小児消化器科、障害児医療、リハビリテーション医学、遺伝医学の専門家よりなる診療ガイドライン作成委員会を構築し、CQ の選定とシステマチックレビュー体制を作った。NCBI の PubMed から 577 論文を、医学中央雑誌刊行会 (医中誌) より 151 論文を抽出し、レビューを行なっている。
2. 遺伝子診断の確立 (伊藤雅之): JS/JSRD の既知 24 原因遺伝子に対して、次世代シーケンサー (Ion Torrent PGM, Life Technologies 社) とサンガー法 (ABI 3130 Genetic Analyzer, ABI 社) による遺伝子解析を行った。これまで、17 家系 20 例の解析を行い、6 例の遺伝子異常を同定した。また、ジュベール症候群関連疾患の最重症型である有馬症候群は 4 家系 5 例で解析し、4 例に共通の遺伝子異常と、1 例で新規遺伝子異常を発見した。

(2) 病態研究

1. 細胞生物学的研究 (竹田扇): (A) レンチウイルスを用いた遺伝子治療の試み: 全長 7440 kb のヒト Cep290 cDNA をレンチウイルスベクター CD-CDF-CG-PRE に組み込むことで C 末端に EGFP 融合した Cep290 タンパク質 (Cep290-EGFP) の発現系を作出した。また同様の方法を用いて、有馬症候群患者の変異型 Cep290 の EGFP 融合タンパク質 (Cep290-AS-EGFP) の発現系も作出した。293FT 細胞に Cep290-EGFP 発現プラスミドと VSVG、HIVgag-pol 発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を蛍光顕微鏡で観察した。ポジティブコントロールの GFP 発現ベクターでは 293FT 細胞内で発現ウイルスが効率良く産生され周辺の細胞に伝播するため、48 時間後には観察視野のほぼ全ての細胞が GFP 陽性となった。それに対して Cep290-EGFP 発現プラスミドを用いたサンプルでは GFP 陽性との細胞はごく僅かに留まり、その効率を概算するとポジティブコントロールの 1/1,000 程度であった。(B) 有馬型 Cep290-EGFP 発現ベクターの構築による変異 Cep290 の挙動解析: 野生型もしくは有馬症候群型 Cep290-EGFP の発現プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションして一過性に発現させ、その細胞内局在を検討した。野生型 Cep290-EGFP は発現量が低い場合は細胞の中心小体に局在し、発現量が多くなると主に ER-Golgi に蓄積する傾向が見られた。一方、有馬症候群

型 Cep290-EGFP は発現量が低い場合は中心小体に局在したが、発現量が多くなると ER-Golgi への蓄積に加え、細胞質内に広く拡散したり、核内に移行したりすることがあった。これらの知見により、有馬症候群の患者で失われている Cep290 の C 末端配列が、中心小体・基底小体への細胞内局在に寄与していることが示唆された。

2. モデル動物の作成と解析 (伊藤雅之、佐々木光穂) : 患者 JS/JSRD 遺伝子変異と同様の変異を CRISPR/Cas9 技術を用いて疾患モデルマウスを作成した。しかし、ヘテロマウスの一定数の確保はできているが、ホモマウス個体の確保が困難なため、人工授精による再生繁殖を試みた結果、病理学的解析を行うことができた。4 週齢のホモマウスの形態学的解析から、網膜の菲薄化など形態学的異常があることがわかった。

当該施設の倫理問題等検討委員会において、ヒト臨床研究および遺伝子診断、実験動物研究に関する承認を得ている。

We performed studies for making a clinical guideline of Joubert syndrome (JS) and its related diseases (JSRD), and for understanding biological mechanism of the diseases.

(1) Clinical studies

1. Clinical diagnosis and guideline (by Masayuki Ito, Akira Oka, Yuji Iwasaki): Based on the previously obtained data from the questionnaires, we made a tentative diagnostic criteria and set clinical questions (CQ) for guideline under the manual of Minds (Medical Information Network Distribution Service). In this year, we established the committee of JS and JSRD clinical guideline, consisted of specialists of Pediatrics, Neurology, Nephrology, Ophthalmology, hepatology, Care of disabled children, Rehabilitation and Medical genetics. Moreover, we have reviewed 577 English and 151 Japanese reports.
2. Establishment of JS/JSRD genetic diagnosis (by Masayuki Ito): We performed genetic analysis for 24 JS/JSRD genes with a next generation sequencer (Ion Torrent PGM, Life Technologies) and Sanger sequencer (ABI 3130 Genetic Analyzer, ABI). We identified 5 causative gene mutations of 6 patients, but unidentified genetic abnormalities of 14 patients. In addition, we discovered a novel causative gene in patients with Arima syndrome, the most severe form of JSRD.

(2) Biological studies

1. Cell biological study (by Sen Takeda): We have conducted the following three sets of experiments: (A) Establishment and assessment of lentiviral vector for treatment of Arima disease: In order to try to alleviate the clinical manifestations in patients, especially those suffered from hepatic and renal dysfunction, we have prepared lentiviral vector harboring the wild type Cep290 sequence tagged with EGFP. While the infection and expression of positive control vector containing EGFP sequence was successfully induced to propagate the virus to neighbor cells, Cep290 vector was able to infect very few cells, being almost equivalent to one thousandth. Therefore, it is necessary to improve the infectivity of lentiviral vector for achieving treatment. (B) We have transfected HeLa cells with vector expressing either wild type or mutant Cep290 being identical to those in patients, and observed the subcellular localization these molecules. Wild type Cep290 tended to be

concentrated on the basal body, whereas mutant one inclined to be dispersed in the cytoplasm, particularly in overexpressed cases. Therefore, the deleted C- terminus is assumed to be responsible for proper localization of molecule to basal body.

2. Analysis of a model mouse (by Mitsuho Sasaki, Masayuki Ito): We established one strain of JS/JSRD model mouse, using CRISPR/Cas9 genetic technology. We kept a small colony of the mouse and revealed thinning of the mutant retina.

All studies were approved by the ethical committees of each institute.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Joubert 症候群および類縁疾患に関する全国調査. 口頭. 高木真理子, 真野ちひろ, 岩崎裕治, 岡明, 伊藤雅之. 第 39 回日本小児遺伝学会学術集会. 平成 28 年 12 月 9 日. 国内.

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ジュベール症候群とその関連疾患の臨床の現状. 伊藤雅之, 岡明, 岩崎裕治. シンポジウム 2016: ジュベール症候群とその関連疾患. 2016/ 6/ 26. 国内.
2. ジュベール症候群とその関連疾患の研究報告. 伊藤雅之, 岡明, 岩崎裕治. ジュベール症候群家族会総会. 2016/12/ 4. 国内.

- (4) 特許出願

なし。