

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-3

課題名：SAMD9 関連疾患の臨床像解明と分子標的療法の開発

主任研究者 国立成育医療研究センター

分子内分泌研究部・基礎内分泌研究室長 鳴海 覚志

(研究成果の要約) SAMD9 機能亢進型変異は MIRAGE 症候群および非症候性の小児骨髄異形成症候群に関連するが、その臨床像の幅(表現型スペクトラム)の理解は不十分であり、また分子標的療法も確立していない。本研究は3年計画で SAMD9 関連疾患の臨床像解明と分子標的療法開発へ向けた基礎的知見の取得を目標としており、1年目にあたる2020年度は下記の課題に取り組んだ(括弧内は担当者)：①小児消化管疾患患者における SAMD9 および関連分子の解析(新井勝大)、②小児消化管疾患生検検体における SAMD9 免疫組織染色(義岡孝子)、③SAMD9 を標的とする機能性抗体の作出(鳴海覚志)。これらにより、2年目以降の研究展開へと向けた基礎を固めることができた。

1. 研究目的

本研究の目的は、SAMD9 関連疾患(機能亢進型 SAMD9 変異により惹起される先天性疾患)の臨床像の解明および SAMD9 分子標的技術の開発である。具体的には、小児消化管疾患における SAMD9 の関与を検証し、SAMD9 の質的異常(SAMD9 変異)のみならず量的異常(野生型 SAMD9 の過剰発現)についての検証を行うこと、SAMD9 関連疾患(MIRAGE 症候群、小児骨髄異形成症候群、小児消化管疾患など)の分子標的療法に応用可能なエンジニア抗体を創成し知財取得を目指すものである。

2. 研究組織

研究者	所属施設
鳴海覚志	国立成育医療研究センター
新井勝大	国立成育医療研究センター
義岡孝子	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

(1) 小児消化管疾患患者における SAMD9 および関連分子の解析

MIRAGE 症候群は本来、様々な全身症状を呈する“症候群”であるが、部分的な症状のみが認められる非典型例が存在する可能性がある。本分担研究では主目的として「消化器症状を主体とする SAMD9 異常症」の同定のため多様な小児消化器疾患患者で SAMD9 を解析し、副目的として SAMD9 以

外の遺伝子についても変異を検索し、分子機能解析を行うものである。2020年度は炎症性腸疾患小児患者で同定した DUOX2 変異(R1212H、F1490Y)の分子機能解析を行った。

DUOX2 タンパク質の細胞膜発現には共役因子の DUOXA2 の共発現が必要であるため DUOX2 と DUOXA2 の両分子を安定的に発現する細胞株を樹立した。ウェスタンブロットによるタンパク質発現量の評価では R1212H-DUOX2 は野生型とほぼ同等のタンパク質発現量であったが F1490Y-DUOX2 のタンパク質発現量はやや減少していた。蛍光免疫染色法で DUOX2 の細胞内局在に与える2つの変異の影響を検討し、野生型 DUOX2 は DUOXA2 共発現下で細胞膜へと局在したが、R1212H 変異では野生型と比較し細胞膜における局在が軽度減少、F1490Y では明確に細胞膜発現量が減少していた。細胞膜上で発現した DUOX2 による過酸化水素合成能を AmplexRed 試薬で定量評価し、R1212H 変異、F1490Y 変異ともに過酸化水素合成能は野生型 DUOX2 の50%以下に減少していたが、空ベクターと比較すると有意な残存活性を認めた。

DUOX2 は近年、炎症性腸疾患への関与が指摘された分子である。SAMD9 と DUOX2 の機能的な関連については現在までに報告はない。2021年度以降に炎症性腸疾患を含む小児消化器疾患患者の生検検体で SAMD9 の免疫組織染色を予定しており、局

在部位の異同などを検討予定である。

(2) 小児消化管疾患生検検体における SAMD9 免疫組織染色 (義岡孝子)

粘膜病変のない外科切除消化管検体 (小腸閉鎖、メッケル憩室、鎖肛など) を用いて SAMD9 組織染色を検討した。国立成育医療研究センター病院で上記疾患に対する手術を受けた患者の養育者に対し研究計画の説明書と返信用はがきを送付し、保管済みの病理検体の研究目的での利用を希望しない場合にその意思を示すことができるオプトアウトを行った (国立成育医療研究センター倫理審査課題「小児消化管疾患の病態形成における SAMD9 の役割に関する検討」承認番号 2155)。免疫組織染色にウサギ抗 SAMD9 ポリクローナル抗体 (HPA021319、Sigma Aldrich) を用いた。抗原賦活化、染色、対比染色などには自動免疫染色装置を用いた。上述の基準を満たすコントロール3症例につき SAMD9 染色を実施し、部位によって染色性の強弱の差が若干みられるものの、回腸、結腸での陽性部位は概ね同じであることであった。2021 年度は疾患患者由来生検試料での検討へと進むことを予定している。

(3) SAMD9 を標的とする機能性抗体の作出

本年度は、重井医学研究所 (研究協力施設) で樹立されていた SAMD9 の N 末端側 90 アミノ酸残基を抗原として認識するモノクローナル抗体を産生するラットハイブリドーマを解析し、その配列情報の取得を目指した。抗体の配列決定にはペプチドシーケンシングによる方法、ハイブリドーマの mRNA を解読する方法の2種があるが、前者は委託解析で数百万円のコストがかかることから後者を選択することとした。通常は VDR 組み換えを考慮した複数プライマーの混合物を使用するマルチプレックス PCR による解析を行うものであるが、技術的な難易度の高い方法であると判断し、代替方

法として、ハイブリドーマが産生する mRNA のうち約 10% が抗体関連遺伝子と成ることに着目し、網羅的な mRNA の配列決定法である RNA シーケンシングを用いることにした。

5 クローン分のハイブリドーマ由来 RNA を解読した結果、いずれにおいてもトップヒット RNA は抗体関連遺伝子 (Igh-1a、Igkc、Ighm など) であり、この方法での配列決定の妥当性が支持された。実際に、5 クローン全てにおいて IgG 軽鎖、重鎖をコードする cDNA を決定することができた。2021 年度以降はこの情報をもとに単鎖抗体 [single-chain variable fragment (scFv)]; 重鎖可変領域 VH と軽鎖可変領域 VL を連結した小型の抗体] のデザインおよび作出へと進むことを予定している。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究はヘルシンキ宣言、およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、人を対象とする医学研究に関する倫理指針に準拠して行った。

本登録システムの中で、患者の個人情報を取り扱うのは、事務局と研究班班員のみである。また、電子化された患者リストは、スタンドアローンのコンピューターに保存する。紙媒体の情報は、カギのかかるキャビネット内に保管した。同意は全て患者本人もしくは両親から書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者により厳重に保管された。

(本研究に関連した倫理審査委員会承認課題の一覧)

1. MIRAGE 症候群および関連疾患の自然歴と表現型スペクトラムに関する臨床研究 (受付番号 1677)
2. 小児消化管疾患の病態形成における SAMD9 の役割に関する検討 (受付番号 2155)
3. 小児難治性消化器疾患の分子病態に関する研究 (受付番号 2020-077)