

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15367

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いたダイヤモンド・ブラックファン貧血の創薬スクリーニング

研究課題名(英文)Drug screening for Diamond-Blackfan anemia using zebrafish as a model animal

研究代表者

剣持 直哉 (Kenmochi, Naoya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：00133124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)は赤血球造血のみが障害される先天性の造血不全症である。リボソームの異常が原因と考えられているが、発症機構は不明で有効な治療法もない。本研究では、ゼブラフィッシュのDBAモデルを用いて、薬剤候補となる低分子化合物を探索した。1,280種類の化合物をスクリーニングし、造血の回復を示す4種類の化合物を同定した。これらはDBA治療薬の有望なシーズと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a congenital bone marrow failure syndrome characterized by red blood cell aplasia. Although the ribosomal dysfunction is implicated in this disease, the molecular pathogenesis remains unknown, thereby no effective treatment exists. In this study, we performed in vivo screening of 1,280 small compounds using zebrafish to identify the drug candidates for DBA. We found that four compounds effectively rescued the anemia phenotype in zebrafish, suggesting that these are the promising pharmaceutical seed materials for DBA treatment.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ダイヤモンド・ブラックファン貧血 先天性貧血 リボソーム 化合物ライブラリー 創薬 ゼブラフィッシュ 疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

リボソームの異常が造血不全を示す様々な疾患（総じてリボソーム病）の原因になることが明らかとなった。その代表例であるダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) では、リボソームタンパク質 S19 遺伝子 (*RPS19*) をはじめとして、多数のリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子に変異が同定されていた。しかし、ユビキタスに存在するリボソームの異常がなぜ造血不全を引き起こすのか、発症機序は不明であり、有効な治療法も開発されていない状況であった。DBA の治療は現在でもステロイド療法と輸血が基本となり、多くの患者がいずれステロイド不応性を示すようになり輸血依存となる。輸血は 4~8 週毎に必要となり患者の負担は大きい。骨髄移植の成功例もあるが、必ずしもすべての患者に行われるわけではない。革新的な技術による新たな薬剤の開発は喫緊の課題であった。

新薬の創出はさわめて厳しい状況にあり、様々な技術革新にもかかわらずその成功確率は低迷していた。その理由として、現在も主流の標的ベースの創薬（ターゲットスクリーニング）では、そもそも良質の標的タンパク質の数が限られていたこと、一方、薬効を指標としたフェノタイプスクリーニングでは、薬効が得られてもその多くは培養細胞を用いたスクリーニングであるため、その後の動物実験や臨床試験で期待された効果が得られなかったことなどが挙げられる。

本研究では、ゼブラフィッシュを用いることでこれらの問題を解決することを試みた。ゼブラフィッシュは、魚類ではあるが脊椎動物であるためヒトとほぼ同様な遺伝子セットを持ち、基本的な発生システムも共通であることが知られていた。受精後 24 時間までにほとんどの器官原器を形成するが、赤血球がほとんど存在しない状態でも 1 週間程度は生存すること、胚が透明で観察が容易であることなどから、造血系疾患の優れたモデルとして重用されていた。私達は、ゼブラフィッシュの *rps19* 遺伝子をノックダウンすることで、DBA に特徴的な骨格異常や貧血を示す疾患モデルの作製に成功していた。このモデルを活用したフェノタイプスクリーニングを行うことで、DBA に有効な化合物を同定できると考え、本研究を提案した。

## 2. 研究の目的

DBA は赤血球造血のみが障害される先天性の造血不全症である。発症頻度は 100 万人当たり 10 名程度で、本邦では難病に指定されている。前述の通り、タンパク質合成に働くリボソームの異常が原因と考えられているが、発症機構は明らかではなく、また有効な治療法もない。本研究では、ゼブラフィッシュの DBA モデルを用いて化合物ライブラリーを *in vivo* スクリーニングすることで、薬効と毒性を同時に検定し、迅速かつ経済的な化合物の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) DBA モデルの作製

ゼブラフィッシュの DBA モデルを作製するために、ゼブラフィッシュ *rps19* 遺伝子をノックダウンした。そのために、まず *rps19* のモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を一細胞期の受精卵にインジェクションし、24 時間まで通常の飼育水で飼育した。次に、これらの胚の形態を観察し、尾部の屈曲など特徴的な発生異常を示す胚を DBA モデルとして選抜した。これらの胚が DBA 様の貧血を示すことはすでに報告している。

### (2) 化合物の *in vivo* スクリーニング

選抜した胚 (DBA モデル) を用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを行った (図 1)。ライブラリーは東京大学の創薬オープンイノベーションセンターが提供する 1,280 種類の化合物を含むものを使用した。化合物の処理は 96 穴のプレートを用い、一種類の化合物あたり 3 匹の胚を 40  $\mu\text{M}$  で 24 時間処理した。化合物の効果 (造血能力の回復) は *o*-dianisidine を用いたヘモグロビン染色にて検定した。評価は染色の強度を目視で数値化することで実施し、3 人による検定結果の平均値を採用した。化合物未処理のコントロールと比較して造血に回復が見られたものを次の解析に進めた。

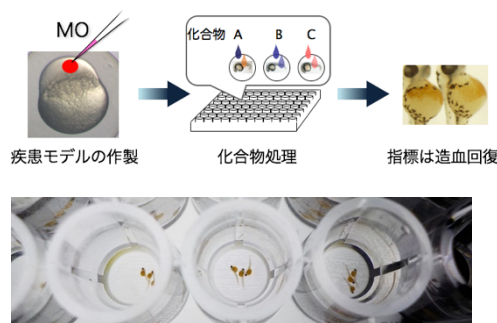


図 1. 化合物の *in vivo* スクリーニング

### (3) 化合物の絞り込みと薬効の検証

1 次スクリーニングで単離した 181 種類の化合物の絞り込みを行うために、ヘモグロビン染色を再度実施し (2 次スクリーニング)、23 化合物を選抜した。さらに、3 次スクリーニングでは、各々の化合物を 10 匹以上の胚に処理し、造血能を評価した。これにより、最終的に 4 種類のヒット化合物を同定した。これらの化合物の薬効をさらに検証するために、0.4~40  $\mu\text{M}$  の濃度で各々の化合物を処理した。スクリーニングと同様に、24 時間後にヘモグロビン染色を行い、造血の程度を目視で数値化し評価した。

### (4) 化合物の毒性試験

ヒット化合物の毒性を評価するために、野生型のゼブラフィッシュ胚 20 匹を 40  $\mu\text{M}$  の

化合物を含む飼育水で 5 日間飼育し、発生異常や行動異常などを観察するとともに致死個体を数えた。

#### (5) 類似化合物の探索

薬効が認められた 1 つのヒット化合物 (化合物 B) について、その構造をもとに 6 種類の類似化合物を同定した。また、文献の探索から DBA に対する効果が期待される 2 種類の化合物、およびゼブラフィッシュで造血促進効果が示された 1 種類の化合物を見出した。これら 9 種類の化合物についても、ヘモグロビン染色を指標とした造血能の回復効果を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒット化合物の単離

ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いて、1,280 種類の化合物からなるライブラリーの *in vivo* スクリーニングを行った。使用したライブラリーは、既存薬を含む薬理活性が不明な化合物で構成されているため、ゼブラフィッシュのモデル系で薬効が確認できれば、ドラッグリポジショニングにより迅速な薬剤の開発が期待される。各々 3 匹のモデル胚を用いた 1 次スクリーニングでは、約 1/3 の化合物でなんらかの効果が認められた。このうち 181 種類の化合物を選んで 2 次スクリーニングへと進めた。一方で、発生毒性を示す化合物が 657 種類あった。2 次スクリーニングで 23 化合物に絞り込み、最終的に 3 次スクリーニングで 4 種類の化合物 (化合物 A、化合物 B、化合物 C、化合物 D) をヒット化合物として同定した (図 2)。これら 4 種類の化合物に構造上または機能的な類似性は認められなかった。

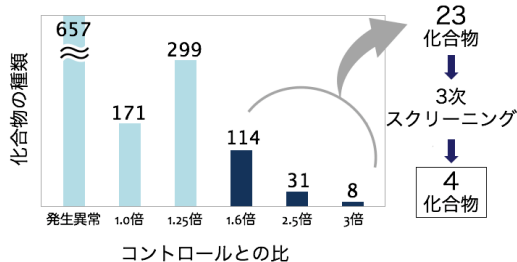


図 2. スクリーニングの結果

#### (2) ヒット化合物の薬効・毒性の検証

スクリーニングで同定した 4 種類の化合物について、薬効と毒性を検証した。まず、造血回復効果の濃度依存性について調べた。各々の化合物を 0.4~40  $\mu\text{M}$  の濃度で処理し効果を調べた。その結果、化合物 B と化合物 D ではより低濃度 (1  $\mu\text{M}$  以下) の処理でも効果があることを確認した。濃度依存性については、有意な結果を得るために個体数をさらに増やして検討する必要がある。

野生型の胚を用いて化合物の毒性を調べた。

約 20 匹の胚に化合物を 40  $\mu\text{M}$  で処理し、5 日間に渡って観察した。4 種類の化合物すべてにおいて致死性や発生異常は認められなかった。今後はさらなる安全性の確認のために、種々の濃度で処理するとともに、より長期間の観察が必要と考えられる。

#### (3) ヒット化合物の最適化

より効果の高い化合物を同定するために、類似化合物の探索と評価を行った。まず、化合物 B の構造をもとに類似化合物を探索し、6 種類の既存化合物を同定した。これらの化合物の薬効を各々約 20 匹のモデル胚を用いて検討した結果、2 種類の化合物で造血回復の効果があることを確認した。化合物 B とともに DBA の治療に有望な薬剤候補であると考えられる。

論文などで DBA の治療薬候補として発表された化合物および造血促進効果のある化合物についても、ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いて造血能の回復を検討した。DBA 治療薬の候補として報告された化合物 E と化合物 F、またゼブラフィッシュで造血促進効果が報告された化合物 G について、前述と同様な検定を行い造血能を評価した。その結果、化合物 E と化合物 G で造血回復の効果が確認された。一方、化合物 F を処理しても造血促進の効果は認められなかった。

今後はより効果の高い化合物を取得するために、更なる類似化合物の検討を進め最適化を図る。また、有望な化合物はヒト細胞等を用いた検証を加えることで、リード化合物の開発へと繋げる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Chakraborty, A., Uechi, T., Nakajima, Y., Gazda, H.T., O'Donohue, M.F., Gleizes, P.E., Kenmochi, N. Cross talk between TP53 and c-Myc in the pathophysiology of Diamond-Blackfan anemia: Evidence from RPL11-deficient *in vivo* and *in vitro* models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 1839-1845, 2018. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.019
- ② Bao, H.L., Ishizuka, T., Sakamoto, T., Fujimoto, K., Uechi, T., Kenmochi, N., Xu, Y. Characterization of human telomere RNA G-quadruplex structures *in vitro* and *in living cells* using 19F NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 45, 5501-5511, 2017. 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gkx109
- ③ Kurogi, K., Yoshihama, M., Horton, A., Schiefer, I.T., Krasowski, M.D., Hagey, L.R., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Kenmochi, N., Suiko, M., Liu, M.C. Identification and characterization of 5  $\alpha$ -cyprinol-sulfating cytosolic sulfotransferases (Sults) in the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 174, 120-127, 2017. 査読有

DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.08.005

- ④ Ikeda, T., Nakahara, A., Nagano, R., Utoyama, M., Obara, M., Moritake, H., Uechi, T., Mitsui, J., Ishiura, H., Yoshimura, J., Doi, K., Kenmochi, N., Morishita, S., Nishino, I., Tsuji, S., Nunoi, H. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. *J. Hum. Genet.* 62, 473-480, 2017. 査読有 DOI: 10.1038/jhg.2016.149
- ⑤ Ikeda, F., Yoshida, K., Toki, T., Uechi, T., Ishida, S., Nakajima, Y., Sasahara, Y., Okuno, Y., Kanezaki, R., Terui, K., Kamio, T., Kobayashi, A., Fujita, T., Sato-Otsubo, A., Shiraishi, Y., Tanaka, H., Chiba, K., Muramatsu, H., Kanno, H., Ohga, S., Ohara, A., Kojima, S., Kenmochi, N., Miyano, S., Ogawa, S., Ito, E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* 102, e93-e96, 2017. 査読有 DOI:10.3324/haematol.2016.153932
- ⑥ Ikeda, T., Nakahara, A., Nagano, R., Utoyama, M., Obara, M., Moritake, H., Uechi, T., Mitsui, J., Ishiura, H., Yoshimura, J., Doi, K., Kenmochi, N., Morishita, S., Nishino, I., Tsuji, S., Nunoi, H. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. *J. Hum. Genet.* 62, 473-480, 2017. 査読有 DOI:10.1038/jhg.2016.149
- ⑦ Patil, P., Uechi, T., Kenmochi, N. Incomplete splicing of neutrophil-specific genes affects neutrophil development in a zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. *RNA Biol.* 12, 426-434, 2015. 査読有 DOI: 10.1080/15476286.2015.1017240

〔学会発表〕 (計 43 件)

- ① Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Ito, E., Suzuki, Y., Kenmochi, N. Analysis of the translational efficiencies of mRNAs in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 15th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference. 2018.
- ② 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 菅野純夫, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたダイヤモンド・ブラックファン貧血発症機構の解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017.
- ③ 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病発症機構の解析および創薬スクリーニング. 第3回ゼブラフィッシュ創薬研究会. 2017.
- ④ Kenmochi, N. Zebrafish as a tool for studying disease pathogenesis and drug discovery: A zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. International Meeting on

Non-Mammalian models in Biomedical Research. 2017.

- ⑤ 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉. リボソーム病モデルにおける mRNA の翻訳制御と疾患発症の分子機構. 第19回日本RNA学会年会. 2017.
- ⑥ Uechi, T., Yoshihama, M., Nakajima, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Ito, E., Kenmochi, N. Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society. 2017.
- ⑦ 上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病発症機構の解析. 平成29年度日本生化学会九州支部例会. 2017.
- ⑧ Uechi, T., Yoshihama, M., Nakajima, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Decreased translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. Gordon Research Conference on "Translation Machinery in Health & Disease". 2017.
- ⑨ Patil, P., Palaksha, K.J., Uechi, T., Kenmochi, N. Zebrafish: an in vivo model for human congenital disorders. 9th Karnataka Science and Technology Academy (KSTA) Conference. 2016.
- ⑩ 上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 菅野純夫, 剣持直哉. リボソームによる翻訳制御と疾患: ゼブラフィッシュを用いた解析. 第39回日本分子生物学会年会. 2016.
- ⑪ 吉浜麻生, 上地珠代, 中島由香里, 引間園美, 剣持直哉. ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いた創薬のための in vivo スクリーニング. 第39回日本分子生物学会年会. 2016.
- ⑫ 吉浜麻生, 上地珠代, 黒木勝久, 鈴木穰, Ming-Cheh Liu, 剣持直哉. ノックダウン胚を用いた化合物スクリーニングおよび薬物代謝の in vivo 解析. 第2回ゼブラフィッシュ創薬研究会. 2016.
- ⑬ 上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 菅野純夫, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたダイヤモンド・ブラックファン貧血の発症機構の解析. 第89回日本生化学会大会. 2016.  
剣持 口頭発表とポスター
- ⑭ 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたダイヤモンド・ブラックファン貧血発症機構の解析および創薬スクリーニング. 第4回 RIBOSOME MEETING. 2016.

- ⑮ 石田詩織, 上地珠代, 池田史圭, 土岐力, 吉田健一, 小川誠司, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ダイヤモンド・ブラックファン貧血で同定された新たな原因候補遺伝子 RPS15A に関するゼブラフィッシュモデルを用いた解析. 第 4 回 RIBOSOME MEETING. 2016.
- ⑯ Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Selected mRNA translation and ribosomopathies: analyzing the zebrafish model of congenital pure red-cell aplasia. The 21th Annual Meeting of the RNA Society. 2016.
- ⑰ Kenmochi, N., Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S. Ribosomal dysfunction leads to erythropoiesis failure in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016.
- ⑱ Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Ishida, S., Toki, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Etsuro Ito, E., Kenmochi, N. Aberrant translation and ribosomopathies: studying the molecular pathogenesis of human diseases using zebrafish as a model animal. The International Meeting on Aquatic Model Organism for Human Disease and Toxicology Research. 2016.
- ⑲ Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Toki, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Ito, E., Kenmochi, N. Decreased translation efficiency of mRNAs required for hematopoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 14th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference. 2016.
- ⑳ 石田詩織, 上地珠代, 池田史圭, 土岐力, 吉田健一, 小川誠司, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたダイヤモンド・ブラックファン貧血の新たな原因遺伝子の同定. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015.
- ㉑ 上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 菅野純夫, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病発症メカニズムの解明. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015.
- ㉒ 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 上米良美香, 剣持直哉. リボソーム病モデルを用いた発症機序の解明と化合物スクリーニング. 第 1 回ゼブラフィッシュ創薬研究会. 2015.
- ㉓ Prakash Patil, P., Tamayo Uechi, T., Kenmochi, N. Loss of U6 biogenesis protein causes incomplete splicing of neutrophil-specific genes in a zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. RNP and Disease. 2015.
- ㉔ Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Selected mRNA translation and ribosomopathies: studying the molecular pathogenesis of congenital anemia using zebrafish as a model system. International Conference on Ribosome Synthesis. 2015.

[図書] (計 1 件)

- ① 上地珠代, 剣持直哉. 宮日文化情報センター, 大・中・小動物実験プロトコル, pp.65-68, 2016.

[その他]

ホームページ等

- ① RP 遺伝子データベース (RPG)  
<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp>
- ② 研究室ホームページ  
<http://ribosome-labo.med.miyazaki-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

剣持 直哉 (KENMOCHI, Naoya)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号 : 00133124