

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18459

研究課題名(和文) 種間比較トランスクリプトーム解析に立脚したスプライシング操作薬の作用機序の解明

研究課題名(英文) Computational studies for molecular mechanism of splicing- modulators upon comparative transcriptome analysis

研究代表者

飯田 慶 (IIDA, Kei)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00387961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3年間の研究期間を通じて当初の目標として掲げたように、スプライシング操作化合物に対する応答を種間(ヒト・マウス)で比較トランスクリプトーム解析するという新しい手法を開発し、これによりスプライシング操作化合物の標的配列の推定や、組織特異性の解明につながる成果を得た。これらの解析成果は、本研究で扱ったTG003やRECTAS等の化合物が塩基配列依存的に特定のエキソン群に作用することを示しており、ヒトゲノム配列を入力とした「個人ゲノム配列 薬剤感受性スコアリングシステム」の構築につながった。さらに、種間比較情報はこのスコアリングシステムの精度の向上に寄与し得ることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)： I successfully established a new computational analysis method named “comparative transcriptome analysis” for the purpose of elucidating a molecular mechanism of “splicing modulators” like TG003 or RECTAS. It is a goal set at the day when this KAKENHI study has been started at 2015. With this method, we found sequence properties shared among TG003-skip-enhanced exons (Sakuma, IIDA, and Hagiwara. 2015), also found that sets of TG003 sensitive exons are clearly different between differentiated and un-differentiated muscle cells. The most importantly, these results suggested that TG003 or RECAS can target exons in nucleotide sequence dependent manners. Based on this finding, I developed a new system for predicting therapeutic potentials of the splicing modulates against personal genome sequences or entries on genome mutation databases. Outcome from the current studies can contribute on improvement of this predicting system.

研究分野：情報生物学

キーワード：スプライシング ケミカルバイオロジー 比較ゲノム 比較トランスクリプトーム 筋ジストロフィー
バイオインフォマティクス 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

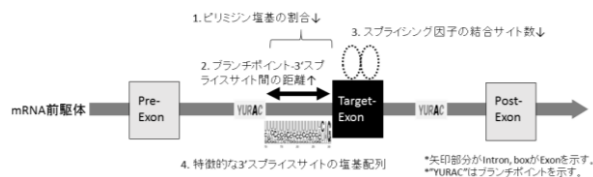
ヒトゲノムの全ゲノム配列が解読された現在、さまざまな研究により疾患とゲノム配列との関係が明らかになってきた。遺伝子に起因する疾患は原理的にはゲノム塩基配列を書き換えることで治療することができる。近年 iPS 細胞や CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術の進展が著しく、このような治療が将来的には可能になるかもしれない。しかし、技術的、倫理的、あるいはコスト的な問題のためゲノム塩基配列編集による治療の実現は当面、困難であると予想される。

申請者の所属する京都大学・萩原正敏グループは RNA スプライシングに介入することで遺伝子変異による悪影響を回避(変異塩基を含んだエキソンのスキップ、異常スプライシングの是正など)する薬剤、すなわちスプライシング操作薬の開発において、分野をリードする研究グループの 1 つである。2014 年現在、このようなコンセプトの薬剤は萩原グループが開発した *Duchenne* 型筋ジストロフィーの治療薬候補である TG003 (Nishida A. *et al.* 2011. *Nat Commun.*) と、ロシュ社が発表した脊髄性筋萎縮症の治療薬候補 (Naryshkin N. A. *et al.* 2014. *Science.*) の 2 例が報告されているのみであり、今後研究の進展が待たれる分野である。

これらのスプライシング操作薬は主に細胞を用いたアッセイ系で標的エキソンに対する高い選択性を有することが示されている。しかし一方で、どのような分子メカニズムによってこのような選択性が生じているかの理解には至っていない。TG003 はスプライシング因子である SR protein をリン酸化する Clk (CDC-like kinase) ファミリーのタンパク質を阻害することでスプライシング介入活性を持つと考えられている。しかし、具体的にどの SR protein のリン酸化の変化が重要なのか、そして標的エキソンの全体像については依然として不明のままである。

申請者である飯田慶は理化学研究所に所属していた 2011 年より萩原グループとの共同研究を開始し、TG003 の作用機序について解析を行ってきた。TG003 処理を施したマウス培養細胞から RNA-seq データを取得し、バイオインフォマティクス解析をした結果、TG003 処理によりスキッピングが促進されるエキソンを約 100 個同定し、これらにおいては Exonic Splicing Enhancer (ESE) が少ないことや、直前のイントロンのポリピリミジントラクトが短い傾向にあるという結果を得ている (図 1)。しかしこれらの傾向は非常に弱く、実際にこれらの特徴が TG003 の作用メカニズムを説明するのに必要十分なものであるかはいまだ解明できていない

[図 1]



2. 研究の目的

本研究では「スプライシング操作薬 TG003 が作用する cis 配列およびそれに対応する trans 因子を同定すること」を第一の目標とする。計画の最終年度までには「個人ゲノム配列から薬剤の効果をスコアリングするシステム」の構築を目指す。この「システム」は初年度・次年度では低い予測精度しか発揮できない状況も考えられる。しかし、RNA-seq データの積み重ねや、研究室内外の共同研究者との連携、さらには個人ゲノムデータベースを利用した解析を行うことで改善を行い、精度の向上を目指す

3. 研究の方法

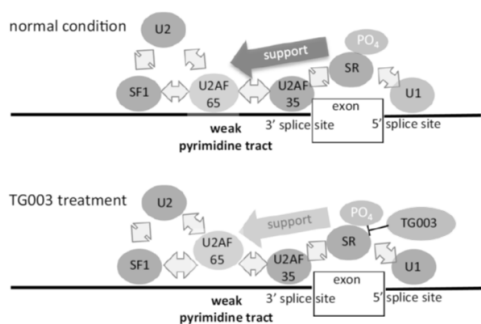
ヒト骨格筋細胞 SkMC およびマウス筋芽細胞 C2C12 それぞれに対してスプライシング操作薬 TG003 による処理を行う。これらの細胞を対象に RNA-seq データを取得し比較解析することで、種間で TG003 の影響が類似/別様である相同エキソン群を得る。これらについてエキソン周辺の特徴についてバイオインフォマティクス解析を行い、TG003 が標的とする cis 配列およびこれに対応する trans 因子の候補を得る。この解析結果に基づき、TG003 の作用メカニズムモデルの構築、さらには個人ゲノム配列を入力として TG003 の効果を推定するプログラムを作成する。これらの結果の妥当性は追加の RNA-seq 実験により検証する。検証研究には、ルール作成に使ったものとは異なる遺伝バックグラウンドを持つ培養細胞や、利用可能ならばデータベースに登録されているゲノム塩基配列が既に解読済みの細胞を用いる。

4. 研究成果

平成 27 年度は、「種間比較トランスクリプトーム解析」を行う対象として、マウス骨格筋培養細胞 C2C12, およびヒト骨格筋細胞 SkMC を材料に選んだ。これらの細胞に対して *Duchenne* 型筋ジストロフィーの治療薬候補である TG003 を 20 μ M, 4 時間の処理を行い、その前後において RNA を取得し Ion Proton で RNA-seq 解析を行った。これらの RNA-seq データに対して、MISO (Mixture-of-Isoforms) と呼ばれる手法を独自に修正した手法を用い、マウス、ヒトそれぞれにおいて TG003 処理によりスプライシングの変化 (スキップの促進) が起こるエキソ

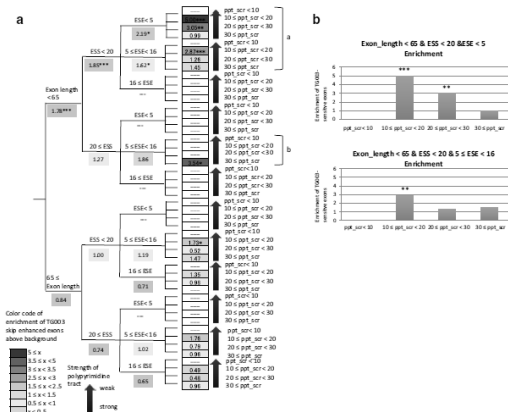
ンを特定した。特に、ヒトでは TG003 応答を示すが、マウスの相同エクソンでは TG003 応答性がない 21 組のエクソンについて、塩基配列の特徴を解析したところ、マウスのエクソン上流のイントロンではコンセンサスに近い形のポリピリミジントラクト配列を有していることが分かり、この強弱が TG003 の効果の有無を作用する要素の 1 つであることが予測された (図 2)。

[図 2(Sakuma *et al.* 2015 より)]



さらに、解析で見つかった TG003 の標的エクソンの特徴を用い、決定木分析を行うことで、全ゲノムから TG003 の標的エクソンを多く含んだエクソン群を抽出できることを確かめることができた (図 3)。これは、スプライシング操作化合物で治療可能性のある遺伝病をゲノム塩基配列から見出すという大きな目標につながる成果である。

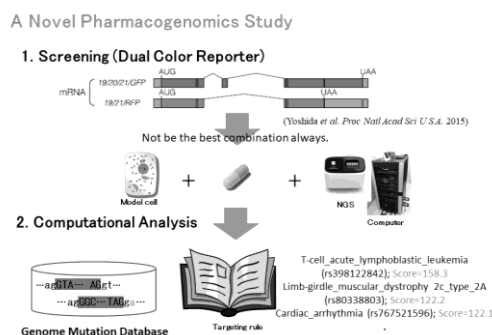
[図 3(Sakuma *et al.* 2015 より)]



平成 28 年度は前年度までの成果に基づき、「個人ゲノム配列—薬剤感受性スコアリングシステム」の開発に取り組んだ。mRNA-seq 解析を行い、スプライシング操作化合物 TG003 でスプライシングが変化するエクソンを同定し、それらのエクソンの持つ塩基配列の特徴を、SpliceAID, SVM-BPfinder 等のツールを使い定量化した。種間比較解析で得られた、TG003 の作用に重要な要素であるポリピリミジントラクトの強さの影響を反映できることに配慮しつつ、TG003 感受性エキソ

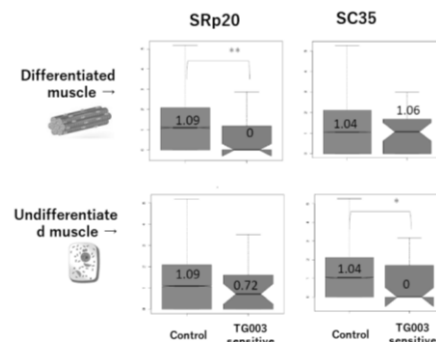
ンと非感受性エクソンを区別できるアルゴリズムを作成し、「個人ゲノム配列—薬剤感受性スコアリングシステム」の試作版とした (図 4、論文投稿準備中のため、詳細は省いた)。システムでは遺伝子塩基配列を入力として、TG003 処理時におけるエクソンスキッピングのおきやすさをスコアリングすることを可能とした。様々な原因ミューテーションが報告されている、筋ジストロフィーを対象とした解析を行ったところ、いくつかの TG003 感受性エクソンを予測し、共同研究者による解析結果と一致するケースが存在することが確認できた。また公的データベース (NCBI Clinvar) を対象に、TG003 感受性エクソンのリスト化もできることを確認した。

[図 4]



さらに、組織条件が異なる場合のスプライシング操作化合物の作用機序の違いを明らかにするために、未分化状態のマウス骨格筋培養細胞 C2C12、およびヒト骨格筋細胞 hSkMC を対象に mRNA-seq を行い、「種間比較トランスクリプトーム解析」を試みた。この結果、分化状態の筋肉細胞での解析結果とは部分的に異なるスプライシング制御が生じていることが明らかになった (図 5)。

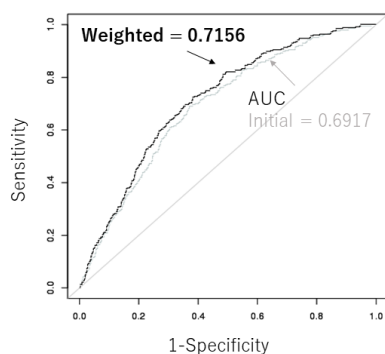
[図 5]



3 年計画の最終年度となった平成 29 年度は、これまでに得られた、「スプライシング操作化合物 TG003 標的エクソンの種間比較解析 (平成 27 年度、Sakuma, IIDA and Hagiwara, 2015)」の成果、および「個人ゲノム配列—

薬剤感受性スコアリングシステム」(平成 28 年度)を組み合わせ、TG003 標的エクソンの予測精度の向上に取り組んだ。これまで、ヒト骨格筋細胞を対象とした mRNA-seq 解析結果から 253 個の TG003-スキッピング誘導エクソンが見つかっており、それらのエクソンの持つ塩基配列の特徴を、SpliceAID, SVM-BPfinder 等のツールを使い定量化、さらにこれらの定量化情報をもとに、エクソン周辺の塩基配列を入力として個々のエクソンの TG003 感受性を予測・スコアリングするツールの試作を進めてきた(本ツールで遺伝性疾患データベースから TG003 で治療可能性のある疾患群の予測を可能としている、平成 28 年度)。このツールを用いて、TG003 感受性エクソン群の再予測を試みたところ、予測正答率(Area Under the Curve)0.69 を得ていた。これに対し種間比較解析で得られた個々のエクソン周辺の配列要素における TG003 感受性への寄与の大きさを示す値を重み係数として導入した結果、予測正答率は 0.71 へと改善された(図 6)。

[図 6]



これにより、本研究課題において提案したように、「種間比較解析」が「個人ゲノム配列—薬剤感受性スコアリングシステム」の精度向上に寄与することを示すことができた。さらに、京都大学萩原正敏研究室における研究により得られた新規スプライシング操作化合物である RECTAS (Yoshida *et al.* 2015) についても、ヒト—マウス間で種間比較解析を進め、本研究計画で確立した研究手法が他の化合物においても有用であることを示しつつある。

全体を統括して、平成 27 年度から平成 29 年度までの 3 年間の研究期間において、スプライシング操作化合物に対する応答を種間(ヒト—マウス)で比較トランスクリプトーム解析するという新しい手法を開発し、これによりスプライシング操作化合物の標的配列の推定や、組織特異性の解明につながる成果を得ることができた。またこれらの解析成果は、本研究で扱った TG003 や RECTAS 等のスプライシング操作化合物が塩基配列依存的に特定のエクソン群に作用することを示

しており、ヒトゲノム配列を入力とした「個人ゲノム配列—薬剤感受性スコアリングシステム」の構築につながった。さらに、種間比較情報はこのスコアリングシステムの精度の向上に寄与し得ることを示すことができた。

一方、「個人ゲノム配列—薬剤感受性スコアリングシステム」の精度は改良後でも AUC=0.71 程度であり実用に資するシステムにするためにはさらなる精度向上が要求される。今後は、RNA 結合タンパク質の結合情報の取り込みやアルゴリズムの高度化(場合によっては機械学習の導入も検討する)により、精度向上を目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sakuma M, Iida K, Hagiwara M (2015) Deciphering targeting rules of splicing modulator compounds: case of TG003. *BMC Mol Biol.* **16**:16. <https://doi.org/10.1186/s12867-015-0044-6>

[学会発表] (計 7 件)

- ① 日本ケミカルバイオロジー学会 第10回 年会(2015年6月10日~12日、仙台) エクソン認識を変化させる化合物の標的塩基配列同定のためのバイオインフォマティクス研究 (ポスター発表) 飯田慶、萩原正敏
- ② 第17回日本RNA学会年会(2015年7月15日~17日、札幌) スプライシング操作化合物の作用エクソンの特徴を発見するためのバイオインフォマティクス研究 (口頭発表) 飯田慶、萩原正敏
- ③ The RNA Society of Japan 18th Annual Meeting and THE 21st Annual Meeting of THR RNA Society (2016年6月28日~7月2日、京都) Computational characterization of targeting rules of splicing-modulating small molecule: TG003 in differentiated and undifferentiated muscle cells. (Poster) Kei Iida, Maki Sakuma, Hiromi Toyoshima, Masatogu Denawa, Masatoshi Hagiwara

- ④ 第39回日本分子生物学会 (2016年11月15日～17日、横浜) 分化状態の異なる筋肉細胞におけるスプライシング操作化合物TG003の効果の違い (ポスター発表) 飯田慶、佐久間真紀、豊島裕美、出縄政嗣、萩原正敏
- ⑤ 第19回日本RNA学会年会 (2017年7月19日～21日、富山) 種間比較解析に基づく、スプライシング操作化合物標的エクソン探索アルゴリズムの改良 (口頭発表) 飯田慶、豊島裕美、佐久間真紀、出縄政嗣、萩原正敏
- ⑥ 日本進化学会第19回大会 (2017年8月24日～26日、京都) 化合物応答スプライシング変動の種間比較に基づくスプライシング制御配列の保存性の解析 (ポスター発表) 飯田慶、佐久間真紀、豊島裕美、出縄政嗣、萩原正敏
- ⑦ ConBio2017 (第39回日本分子生物学会, 2017年12月6日～9日、神戸) スプライシング操作化合物TG003の標的エクソン探索アルゴリズムの開発、および改良 (ポスター発表) 飯田慶、佐久間真紀、豊島裕美、出縄政嗣、萩原正敏

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 慶 (IIDA Kei)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：00387961

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐久間 真紀 (Sakuma Maki)
京都大学・医学研究科・博士前期課程