様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 6 月 25 日現在

機関番号： 22701
研究種目： 挑戦的研究（萌芽）
研究期間： 2017～2018
課題番号： 17K19665

研究課題名（和文）希少遺伝性疾患治療薬開発基盤技術創出

研究課題名（英文）Development of basic technology for intractable and rare diseases

研究代表者
山下　暁朗（Akio, Yamashita）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20405020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの遺伝性疾患における変異のうち、全体の約三分の一において異常な終止コドンを生じる。このような変異遺伝子由来mRNAは品質管理機構であるNMDにより分解排除される。この異常終止コドンを有するmRNA由来のタンパク質が機能を有する症例では、mRNA監視機構阻害は疾患症状回復へつながることをこれまでに明らかとしてきた。本研究では、独自に樹立した高感度・高精度のmRNA監視機構評価システムの改良に成功した。さらに、in vivoにおけるNMD抑制依存的な遺伝性疾患の症状回復モデルとして、 不死化Ullrich disease患者由来細胞と嚢胞性線維症PTCマウスの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により、異常終止コドンを生じる遺伝子変異による遺伝性疾患について、NMDを抑制することにより治療するための薬剤開発基盤技術創出に成功した。具体的には、薬剤スクリーニングのための改良型高精度NMD検出技術、in vivo POC取得のための、遺伝性疾患患者由来不死化細胞、嚢胞性線維症PTCマウスである。これらの技術を基に得られる薬剤により、これまで治療法のなかった遺伝性疾患について、異常終止コドンまでのタンパク質が機能を有するものについては治療が可能となることが期待される。また、NMD阻害剤とリードスルー薬を組み合わせることにより、多くの遺伝性疾患についても治療可能となることも期待される。

研究成果の概要（英文）：NMD is an mRNA surveillance mechanism that eliminates aberrant mRNAs carrying premature termination codons (PTCs). NMD degrades not only proteins that show dominant-negative function but also aberrant proteins that retain at least some aspect of their normal cell function. If mutant proteins are still functional, the selective inhibition of NMD provides a strategy to ameliorate disease phenotypes in patients with PTC-related conditions. Another strategy to inhibit NMD for the rescue of intractable diseases involves drugs causing translational readthrough. In this project we developed accurate reporter system of NMD and translational readthroug. Using this system, we demonstrated that translational readthrough has little effect on PTC-mRNA decay, NMD inhibition resulted in a synergistic effect on read-through efficiency. We also developed the immortalized cells from Ullrich disease patient and CF model mice with PTC mutation.

研究分野： 分子生物学

キーワード： nonsense mutation　mRNA decay　translation　small compound　screening

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

ヒトの遺伝性疾患における変異のうち、全体の約三分の一において異常な終止コドンを生じる。このような変異遺伝子由来 mRNA は品質管理機構である NMD により分解排除される。この異常終止コドンを有する mRNA 由来のタンパク質が機能を有する症例では、mRNA 監視機構阻害は疾患症状回復へつながることをこれまでに明らかとしてきた（2004 Annal Neuro, 2006 Mol. Therapy, 2013 PNAS)。

Cystic Fibrosis やデュシャンヌ型（Duchenne）筋ジストロ フィーを初めとする遺伝子変異の10%を占める点変異による異常終止コドンについては､終止コドンリードスルー剤の開発が進められているが、リードスルー剤は NMD をほとんど阻害しないため、これに mRNA 監視機構阻害を組み合わせることで相乗効果があることも期待されている。このような状況の中、近年、転写制御レポーターアッセイを元にした NMD 阻害薬スクリーニングの報告が相次いでいる。しかし、NMD 阻害活性を追試できない「擬陽性」が含まれていることが大きなボトルネックとなっており、適切なスクリーニングシステムの構築が急務となっていた。

２．研究の目的

本研究では、独自に樹立した高感度･高精度の mRNA 監視機構（Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)）評価システムの改良を行い、NMD 阻害活性を有する新規化合物のスクリーニング・バリデーションを行う。同時に、得られたリード化合物による希少遺伝性疾患治療の in vitro レベルでの POC(概念実証)を取得し、研究を加速させる。

３．研究の方法

これまでに開発・発表されている技術では、転写制御や翻訳抑制を誘導する薬剤を排除できなかった。これまでの方法は、安定なコントロールレポーターが蓄積してしまい、偽陽性が多く認められる。実際に、独自に再現性を確認した結果、既報の NMD 阻害剤のほとんどが転写活性化剤であり、mRNA 分解を指標にした場合に再現が得られない理由となる。

1) NMD-リードスルー協調効果レポーターの樹立

本研究ではこれまでに培った基礎研究成果を元に、翻訳抑制を排除するとともに、転写後制御を積極的にモニタリングする技術を改良する。これまでのレポーターは NMD 阻害に特化した構造を有している。一方で、実際の疾患では、タンパクコード領域に終止コドンが生じ、NMD 阻害だけでは機能タンパク質が発現しない。そこで、本研究では、新たに、リードスルーと NMD 阻害の協調効果を積極的に検出するレポーター及びその安定発現細胞株を樹立する。

2) 低分子化合物スクリーニング

新たに樹立するレポーター細胞を用いて、化合物ライブラリーをスクリーニングにかかわる POC を取得する。また、化合物ライブラリーをスクリーニングする。

3) NMD 阻害剤の細胞内ターゲット分子の同定

これまでの基礎研究により全ての NMD 制御因子精製タンパク質を取得している。NMD 制御因子は SMG1 (400kDa)を筆頭に UPF1(140kDa), UPF2 (170kDa), SMG5(150kDa), SMG6(180kDa), SMG7 (130kDa), SMG8(130kDa)と高分子量であり、大腸菌などを用いたリコンビナントタンパク質取得が困難であった。これについて、独自に動物細胞を用いた数十～数百μg のタンパク質の取得法を開発し、新規に同定する化合物の作用点を探索することを可能としている（実験医学 2016 年 11 月号)。この技術に加え、横浜市立大学共用機器として、2017 年度に熱泳動を用いた簡便・高精度な分子間相互作用測定装置 monolith を導入する。Monolith は ribosome などの巨大分子と低分子化合物との相互作用解析にも用いることができる。Monolith を用いて、精製した NMD 制御タンパク質と、新たに同定する NMD 阻害化合物の相互作用を定量的に解析することにより、阻害化合物の分子標的の同定を可能とする。

4) 疾患モデル細胞の樹立と、POC 取得

in vitro レベルでの POC 取得のため、疾患モデル細胞を樹立する。方法として、複数の不死化因子(p16 shRNA,HPV-E7, hTERT)を一つのレンチウイルスベクターで発現させるシステムを新たに構築し使用する。疾患モデル細胞として、これまで初代培養細胞を用いてきた Ulrich’s disease 患者由来繊維芽細胞について不死化を行う。また、治療ターゲットとなる疾患を検討し、CRISPR-CAS9 system による遺伝子ノックインにより疾患モデルマウスの樹立を行う。

４．研究成果

1) NMD-リードスルー協調効果レポーターの樹立

翻訳リードスルーと NMD 阻害を区別して検出可能な 2 つのレポーターシステムを構築した。これらを用いて、両者が独立に作動する機構である事を明らかとした。また、翻訳リードスル

ー誘導効率は最大で約 0.2%であり、NMD をほとんど阻害できないことも明らかにした。これらの結果から、新たなナンセンス変異に起因する遺伝性疾患の症状緩和の戦略として、翻訳リードスルー誘導剤と NMD 阻害剤の併用が効果的であると考えられる。これに加え、NMD-リードスルー協調効果を解析するレポーターの樹立に成功した。これを用いた解析により、翻訳リードスルー阻害と NMD 阻害を同時に行うことにより、ナンセンス mRNA 由来タンパク質が効率的に蓄積できることを確認した。

さらに、新たに発表された、HiBit(Split-NanoLuc ペプチド)にいくつかのアミノ酸を含まない mutant-T4-Lysozyme (mT4L)を融合させたレポーターを作成した。3'UTR に beta-globin イントロン 2 を配置し、レポータータンパク質の終止コドンからエクソンジャンクションまでの距離が 21 塩基のコントロールレポーターと 179 塩基の NMD レポーターを設計し、NMD の抑制が特異的に検出できることを確認した。さらに、HiBit と結合し NanoLuc を形成する LgBit を外部から供給する方法と、共発現させる方法を施行し、どちらの場合も良好な応答を示すことを確認した。

2) 低分子化合物スクリーニング

新たに樹立したレポーター細胞を用いることで、化合物ライブラリースクリーニングをより高感度に行えることを既存の SMG1 阻害剤を用いて確認した。化合物ライブラリースクリーニングは実施しなかった。

3) NMD 阻害剤の細胞内ターゲット分子の同定

NMD 制御因子の精製に成功した。このうち、SMG1 について、独自に取得した SMG1 阻害剤との相互作用を、SMG5,SMG7 について既報の NMD 阻害剤である NMDI-1 類似化合物（VG-1)、NMDI-14 との相互作用を、SMG9（GTP 結合タンパク質）について GTP との相互作用を分子間相互作用測定装置 monolith を用いて解析した。その結果、それぞれについて、分子間相互作用及び、Kd 値の取得に成功した。NMDI-1 類似化合物（VG-1)、NMDI-14 については、我々のレポーターシステムとノーザンブロット法による半減期解析において、既報の NMD 阻害活性を示す濃度では NMD 阻害活性が観察されなかった。さらに、どちらの分子についても、レポーターの転写促進活性を有していることを新たに発見した。一方で、SMG5 と VG1、SMG7 と NMDI-14 の Kd 値は既報の NMD 阻害活性の 10~100 倍濃度で結合が観察された。

以上の結果より、今後同定する、新たな NMD 阻害剤について、その細胞内ターゲット分子の同定を行うことが可能となったと。

4) 疾患モデル細胞の樹立と、POC 取得

NMD 抑制による遺伝性疾患治療モデルとして、ColVI にナンセンス変異を有する Ullrich 病患者由来細胞を HPV-E7/TERT 高発現により不死化し、蛍光染色法により新規 SMG1 阻害剤依存的な変異 ColVI タンパク質蓄積を証明した。さらに、動物モデルとして、嚢胞性線維症原因遺伝子である mCFTR の変異のうち、ヒトで 5 番目に多い変異である CFTR-W1282X に相当する mCFTR-W1278X ノックインマウスを CRISPR-CAS9 system により作成した。mCFTR-W1278X マウスは、mCFTR ノックアウトマウスと同様、生後 6~9 週での致死であることが観察されたが、これについて、凍結受精卵の作成を行った。これらの形跡により、、モデル細胞やモデルマウスを用いた、NMD 阻害剤による遺伝性疾患治療の POC 取得が現実的なものとなった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 11 件）、全て査読あり

1. Yamashita A*, Takeuchi O*: Translational control of mRNAs by 3'-Untranslated region binding proteins. BMB Rep. 50(4):194-200. 2017
2. Usuki F*, Fujimura M, Yamashita A: Endoplasmic reticulum stress preconditioning modifies intracellular mercury content by upregulating membrane transporters. Sci Rep 7(1):12390, 2017
3. Ohki K, Wakui H*, Azushima K*, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Maeda A, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K*: ATRAP Expression in Brown Adipose Tissue Does Not Influence the Development of Diet-Induced Metabolic Disorders in Mice. Int J Mol Sci 18(3): E676, 2017
4. Uneda K, Wakui H*, Maeda A, Azushima K*, Kobayashi R, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Atobe Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K*: Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. J Am Heart Assoc 6(8): e006120, 2017
5. Haruhara K, Wakui H*, Kishio N, Azushima K*, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K*: Angiotensin receptor-binding

molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. Atherosclerosis 269:236-244, 2018
6. Ohki K, Wakui H*, Kishio N, Azushima K*, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Imajo K, Nakajima A, Tamura K*: Angiotensin II Type 1 Receptor-associated Protein Inhibits Angiotensin II-induced Insulin Resistance with Suppression of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Tissue. Sci Rep 8(1):2846, 2018
7. Yamashita A*: Serine/Threonine-Protein Kinase SMG1. Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition. Springer. 4855-4893, 2018
8. Haku S, Wakui H*, Azushima K*, Haruhara K, Kinguchi S, Ohki K, Uneda K, Kobayashi R, Matsuda M, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Ohashi K, Tamura K*: Early Enhanced Leucine-Rich α-2-Glycoprotein-1 Expression in Glomerular Endothelial Cells of Type 2 Diabetic Nephropathy Model Mice. Biomed Res Int. 2018:2817045, 2018
9. Usuki F*, Yamashita A, Fujimura M: Environmental stresses suppress nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and affect cells by stabilizing NMD-targeted gene expression. Sci Rep. 9(1) 1279, 2019
10. Kinguchi S, Wakui H*, Azushima K*, Haruhara K, Koguchi T, Ohki K, Uneda K, Matsuda M, Haku S, Yamaji T, Yamada T, Kobayashi R, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Fujikawa T, Tamura K*: Effects of ATRAP in Renal Proximal Tubules on Angiotensin-Dependent Hypertension. J Am Heart Assoc. 8(8):e012395, 2019
11. Azushima K*, Uneda K, Wakui H*, Ohki K, Haruhara K, Kobayashi R, Haku S, Kinguchi S, Yamaji T, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Tamura K*: Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice. Sci Rep. 9(1):6201, 2019

〔学会発表〕（計　7件）
1. 藤川 由美子, 山下 暁朗, 大貫 哲男, 鈴木 香絵, 青柳 杏子, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 永井 陽子, 上村 博司, 吉田 稔, 大野 茂男:　PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 阻害による抗腫瘍効果の解析:SMG1 による NRF2 活性制御の発見.　2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017, 12.
2. 佐々木 和教, 麹谷 典子, 廣瀬 博子, 吉濱 陽平, 高柳 亜由美, 山下 暁朗, 平野 久, 大野 茂男: 新規 aPKC 結合タンパク p200 による上皮細胞極性の調節機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会）, 神戸ポートアイランド, 2017, 12
3. 山下 暁朗, 佐藤 由典, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 青柳 杏子, 永井 陽子, 大野 茂男: PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 による新たな転写後制御機構の発見. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017, 12.
4. 山下 暁朗: PI3-kinase related protein kinase SMG1 and DNA-PKcs directory phosphorylates and regulate NRF2 in response to oxidative stress, 大津市, 2018.8
5. 山下 暁朗: SMG1 による NMD とストレス応答統御機構の解析. 第 7 回さきがけ「RNA と生体機能」研究会, 守山市, 2018.11
6. 山下 暁朗: PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 によるアミノ酸飢餓応答依存的遺伝子発現制御. 第 41 回日本分子生物学会, 横浜, 2018.11
7. 藤川 由美子, 山下 暁朗, 大貫 哲男, 鈴木 香絵, 青柳 杏子, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 永井 陽子, 上村 博司, 吉田 稔, 高橋 秀尚, 大野 茂男:　PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 阻害による酸化ストレス応答制御:SMG1 による NRF2 活性制御の解析. 第 41 回日本分子生物学会, 横浜, 2018.11

〔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
http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/Japanease/indexJ.html

６. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：臼杵扶佐子
ローマ字氏名：Fusako Usuki