

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22601

研究課題名(和文) 希少遺伝性疾患モデルマウスを用いた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(YAMASHITA, AKIO)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・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)：遺伝性疾患における変異のうち、約三分の一において異常な終止コドンを生じる。この変異遺伝子由来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もつmRNA由来のタンパク質が機能を有する症例由来の細胞では、mRNA監視機構阻害は細胞機能回復へつながる。本研究では、独自に樹立した嚢胞性線維症疾患モデルマウス(mCFTR_W1278X)を用いたmRNA監視機構阻害による治療の可能性について検討を行うべく研究を行った。マウスモデルによる解析は、繁殖の失敗により成果が得られなかった。一方で、既存薬からmRNA監視機構を抑制する化合物の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた、複数のmRNA監視機構を阻害する臨床薬は、これまで、NMDとの関わりがわかっていなかった化合物であり、培養細胞レベルではあるが、新たなNMD阻害法の発見となった。このmRNA監視機構阻害法は、臨床で用いられる薬剤によるものであるため、安全性などの情報が得られている。今後、動物モデルを用いたmRNA監視機構抑制の検証後、早期に人における応用へつなげられる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is an mRNA surveillance mechanism that eliminates aberrant mRNAs containing premature termination codons (PTCs). NMD inhibits the production of aberrant proteins that still retain, at least in part, wild-type function as well as dominant-negative peptides. Therefore, the selective inhibition of NMD has the potential to ameliorate NMD-exacerbated mutant phenotypes. However, we do not have sufficient knowledge of how to effectively suppress NMD with minimum cytotoxic effects. In present study, we identified several approved drugs which can repress NMD activity in cells. These drugs are previously not linked with NMD.

研究分野：分子細胞生物学

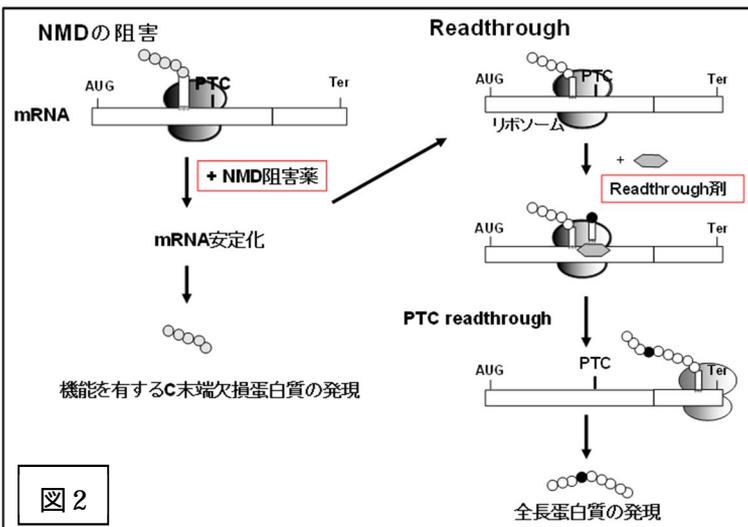
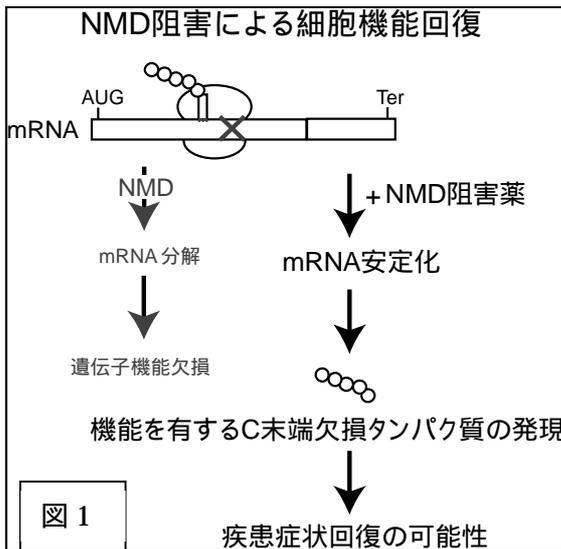
キーワード：mRNA分解 mRNA翻訳 ナンセンス変異 mRNA監視機構 嚢胞性線維症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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もつ mRNA 由来のタンパク質が機能を有する症例由来の細胞では、mRNA 監視機構阻害は細胞機能回復へつながることをこれまでに明らかとしてきた (Usuki F, Yamashita A ら Ann Neurol, 55:740-744, 2004; Usuki F, Yamashita A ら Mol Ther, 14:351-60, 2006; Usuki F, Yamashita A ら Proc Natl Acad Sci USA, 110:15037-42, 2013) (図1)。

Cystic Fibrosis やデュシャンヌ型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る (図2)。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、真の NMD 阻害剤が待ち望まれていた。



2. 研究の目的

本研究では、NMD 阻害による遺伝性疾患治療の可能性について個体レベルで検討・検証することを目的とする。初期対象疾患として選定した嚢胞性線維症患者由来細胞を用い、新規に同定した SMG1 阻害剤、リードスルー剤、CFTR 安定化剤 (VX-770) による遺伝性疾患治療の in vitro レベルでの POC を取得する。同時に、新たに樹立した嚢胞性線維症モデルマウス [mCFTR-W1278X] を用いて、リードスルー剤、CFTR 安定化剤 (VX-770)、SMG1 阻害剤投与による遺伝性疾患治療の in vivo レベルでの POC を取得する。これらの解析により、希少遺伝性疾患治療の in vitro レベル、in vivo レベルでの POC (概念実証) を取得し研究を加速させる事を目的とした。

3. 研究の方法

研究では、独自に開発したシーズ技術である 高精度転写後制御モニタリングシステム、新規 SMG1 阻害剤、mCFTR-W1278X ノックインマウスを用いる。培養細胞 (hCFTR-W1283X) を用いた分子生物学的解析を担当する。研究協力者である横浜市立大学高血圧腎臓内科学 教室員が薬剤投与、組織解析を担当する。これらの解析を通じ、SMG1 阻害剤同定後の in vitro レベル、in vivo レベルでの POC 取得を目指す。また、hCFTR-W1283X 細胞、mCFTR-W1278X マウスに対し、リードスルー剤、

CFTR 安定化剤 (VX-770) を用いた解析を進める予定であった。

4. 研究成果

(1) NMD 活性ハイスループットスクリーニングシステムの樹立

これまで、NanoLuc や Firefly Luciferase ベースのレポーターを作成してきた。本研究では、これに加え、蛍光タンパク質 GFP ベースの高精度 NMD 感受性レポーターベクターシステムを構築した。さらに、CRISPR-CAS9 system を用いたスクリーニング系を導入し、新たな NMD 制御因子のスクリーニングの実施準備を整えた。しかし、海外の研究室から、蛍光タンパク質と CRISPR-CAS9 system を用いた NMD スクリーニングの報告が相次いだため、この方向での研究の実施を中断した (PMID: 32668236, PMID: 34665823)。

(2) 簡易な NMD 阻害法 の発見

これまでの基礎研究の成果を基に独自に開発した高精度転写後制御モニタリングシステムを用い、臨床に使われている既存薬の中から NMD を阻害する分子の探索を行った。具体的には、SMG1 が関わる新たな細胞機能 (未発表) を阻害する分子により、培養細胞レベルで、簡易に NMD を阻害できる可能性について検討を行った。その結果、複数の臨床薬が NMD を阻害することを発見した。同定された臨床薬は、これまで、NMD との関わりがはっきりしなかった化合物であり、培養細胞レベルではあるが、新たな NMD 阻害法の発見となった。この NMD 阻害法は、臨床で用いられる薬剤による物であるため、今後、動物モデルを用いた NMD 抑制の検証後、早期に人における応用へつなげるべく解析を進める。

(3) 疾患モデルマウスの解析

mCFTR-W1278X ノックインマウス解析については、子供殺しにより、解析に必要な数の子マウスを得ることが出来なかった。今後、繁殖条件を検討し、新たに発見した簡易な NMD 阻害法による解析を進める予定としている。マウス繁殖と並行し、ヒト CFTR 発現ベクター構築と W1283X 変異導入を実施し、シングルコピーのヒト CFTR 発現ベクターを作成した。今後、これを導入した培養細胞の樹立し、解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miyatake Satoko, Kato Mitsuhiro, Kumamoto Takuma, Hirose Tomonori, Koshimizu Eriko, Matsui Takaaki, Takeuchi Hideyuki, Doi Hiroshi, Hamada Keisuke, Nakashima Mitsuko, Sasaki Kazunori, Yamashita Akio, 、 、 、 Matsumoto Naomichi	4. 巻 7
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Guo Youjia, Kawaguchi Atsushi, Takeshita Masaru, Sekiya Takeshi, Hirohama Mikako, Yamashita Akio, Siomi Haruhiko, Murano Kensaku	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100346 ~ 100346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ura Takehiro, Yamashita Akio, Mizuki Nobuhisa, Okuda Kenji, Shimada Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 197 ~ 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2020.11.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Masaru, Yamashita Akio, Saito Manami, Ichino Motohide, Kinjo Takao, Mizuki Nobuhisa, Klinman Dennis M., Okuda Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71134-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Kazunori, Kojitani Noriko, Hirose Hiroko, Yoshihama Yohei, Suzuki Hidefumi, Shimada Miho, Takayanagi Ayumi, Yamashita Akio, Nakaya Masa-aki, Hirano Hisashi, Takahashi Hidehisa, Ohno Shigeo	4. 巻 31
2. 論文標題 Shank2 Binds to aPKC and Controls Tight Junction Formation with Rap1 Signaling during Establishment of Epithelial Cell Polarity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107407 ~ 107407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Kazunori, Kojitani Noriko, Hirose Hiroko, Yoshihama Yohei, Suzuki Hidefumi, Shimada Miho, Takayanagi Ayumi, Yamashita Akio, Nakaya Masa-aki, Hirano Hisashi, Takahashi Hidehisa, Ohno Shigeo	4. 巻 31
2. 論文標題 Shank2 Binds to aPKC and Controls Tight Junction Formation with Rap1 Signaling during Establishment of Epithelial Cell Polarity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107407 ~ 107407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakui H, Yamaji T, Azushima K, Uneda K, Haruhara K, Nakamura A, Ohki K, Kinguchi S, Kobayashi R, Urate S, Suzuki T, Kamimura D, Minegishi S, Ishigami T, Kanaoka T, Matsuo K, Miyazaki T, Fujikawa T, Yamashita A, Tamura K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Rikkunshito treatment on renal fibrosis/inflammation and body weight reduction in a unilateral ureteral obstruction model in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58214-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaji T, Yamashita A, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Fujikawa Y, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Ishii T, Yamada T, Urate S, Suzuki T, Abe E, Tanaka S, Kamimura D, Ishigami T, Toya Y, Takahashi H, Tamura K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Angiotensin II type 1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52566-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mino Takashi, Iwai Noriki, Endo Masayuki, Inoue Kentaro, Akaki Kotaro, Hia Fabian, Uehata Takuya, Emura Tomoko, Hidaka Kumi, Suzuki Yutaka, Standley Daron M, Okada-Hatakeyama Mariko, Ohno Shigeo, Sugiyama Hiroshi, Yamashita Akio, Takeuchi Osamu	4. 巻 47
2. 論文標題 Translation-dependent unwinding of stem-loops by UPF1 licenses Regnase-1 to degrade inflammatory mRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8838 ~ 8859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamasoba Daichi, Sato Kei, Ichinose Takuya, Imamura Tomoko, Koepke Lennart, Joas Simone, Reith Elisabeth, Hotter Dominik, Misawa Naoko, Akaki Kotaro, Uehata Takuya, Mino Takashi, Miyamoto Sho, Noda Takeshi, Yamashita Akio, Standley Daron M., Kirchhoff Frank, Sauter Daniel, Koyanagi Yoshio, Takeuchi Osamu	4. 巻 4
2. 論文標題 N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0460-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azushima Kengo, Uneda Kazushi, Wakui Hiromichi, Ohki Kohji, Haruhara Kotaro, Kobayashi Ryu, Haku Sona, Kinguchi Sho, Yamaji Takahiro, Minegishi Shintaro, Ishigami Tomoaki, Yamashita Akio, Tamura Kouichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42657-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinguchi Sho, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Haruhara Kotaro, Koguchi Tomoyuki, Ohki Kohji, Uneda Kazushi, Matsuda Miyuki, Haku Sona, Yamaji Takahiro, Yamada Takayuki, Kobayashi Ryu, Minegishi Shintaro, Ishigami Tomoaki, Yamashita Akio, Fujikawa Tetsuya, Tamura Kouichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of ATRAP in Renal Proximal Tubules on Angiotensin Dependent Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e012395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.012395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下暁朗
2. 発表標題 mRNA監視機構制御因子SMG1キナーゼによる酸化ストレス応答制御機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原俊伸, 山下暁朗
2. 発表標題 医学・生物学的観点からのmRNA翻訳制御の新展開
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下暁朗
2. 発表標題 PI3 kinase様タンパク質リン酸化酵素SMG1によるストレス応答統御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 PI3 kinase様タンパク質リン酸化酵素SMG1による酸化ストレス依存的なNRF2活性制御機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下暁朗
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤本明洋ら86名	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の 解析技術と創薬/診断技術への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田村 功一 (Koichi Tamura)	横浜市立大学・高血圧腎臓内科学講座・教授 (22701)	
研究協力者	涌井 広道 (Wakui Hiromichi)	横浜市立大学・高血圧腎臓内科学講座・准教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------