

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22604

研究課題名（和文）Jagged1遺伝子発現を制御する筋ジストロフィー治療薬の探索

研究課題名（英文）Therapeutic screening drug to control the expression of jag1 gene for muscular dystrophies

研究代表者

川原 玄理（Kawahara, Genri）

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40743331

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）：本研究課題によって、jag1遺伝子発現をモニターできるjag1-EGFPトランスジェニックゼブラフィッシュを開発し、それらを用いた薬剤スクリーニングによりjag1遺伝子の発現を亢進する薬剤を同定した。これらの薬剤を骨格筋障害を示すデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）モデルフィッシュへ投与することにより候補薬剤のうち1つの薬剤が筋障害を改善する効果を示した。この候補薬剤の効果や、DMDモデルフィッシュにおいてどのようにして筋障害を改善させるのかについて、さらに研究を進めることにより、筋ジストロフィーの治療薬の開発への結びつく可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患の治療方法は限られており、その治療薬の発見は社会に大きく貢献すると考えられる。本研究ではトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、jag1遺伝子発現を亢進する薬剤をスクリーニングし候補薬剤を得ることができた。それらの候補薬の一つは、DMDモデルフィッシュで見られる筋障害を改善することがわかった。この薬剤に関連する分子機序の解明は、筋疾患の新規治療薬の開発のヒントとなると考えられ、学術的、社会的に意義のある研究成果を得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We generated jag1-EGFP transgenic (Tg) zebrafish and screened drugs that upregulate the expression of jag1. We found some drugs that increasing zebrafish jag1 expression from 1,280 drugs in the chemical library. We assayed these candidate drugs to sapje (a DMD model zebrafish) and identified one candidate drug that can improve the abnormal structure of skeletal muscle observed in sapje. Further studies on the effect and mechanism of this candidate drug to improve skeletal muscle structures in sapje may contribute for treatments of muscular dystrophies.

研究分野：病態生理学

キーワード：筋ジストロフィー ゼブラフィッシュモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長年、筋ジストロフィーの病態、治療方法について様々な研究が行われている。その中でもデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、特に患者数が多く、重篤な症状を伴うことが知られ、X染色体に存在するジストロフィン遺伝子の変異が原因である。限定的にエクソスキッピングによる治療方法が開発されているが、治療方法は限られている。最近の報告で、ジストロフィンを完全欠損するDMDのモデル犬のうち、突然変異により *Jag1* 遺伝子の発現が亢進している系統では、症状が極めて軽度であること、さらにDMDゼブラフィッシュモデルでも、特徴的に見られる異常な筋線維構造が *jag1* 遺伝子の強制発現により改善することが示された (Vieira et al. 2015. Cell)。

JAG1 遺伝子によってコードされる Jagged1 分子は Notch シグナル活性化時にその発現が亢進する分子である。Notch 経路は、様々な組織の発生、恒常性に関与し、Notch 受容体が隣接する細胞膜リガンド、Delta や Jagged1 と結合し活性化され、標的遺伝子を転写活性化することが知られる。Notch 経路は、筋組織では筋再生時に活性化される筋衛星細胞の増殖、維持に関与しているとされる。この Notch シグナル活性化が、DMD の治療への手がかりになると考え、*jag1* トランスジェニックゼブラフィッシュを開発し *jag1* の遺伝子発現を亢進する薬剤を同定するため本研究課題を計画した。

小型魚類であるゼブラフィッシュは様々な疾患研究のモデル動物として、現在広く用いられている。ゼブラフィッシュは多産で、初期胚、稚魚の組織が透明で観察しやすいこと、その初期発生のスピードの速さから遺伝子改変動物作製の大きな利点となっている。特にゼブラフィッシュは筋疾患モデルとして有用であり、我々もこれまでに様々な筋疾患モデルフィッシュを作製し、研究に用いてきた。また、DMD のモデルゼブラフィッシュを用い、治療薬候補を見つけるための薬剤スクリーニングの方法を確立し、DMD モデルフィッシュの表現型を改善するのに有効な薬剤を見いだしている。このようにゼブラフィッシュモデルを用いることで、筋組織での薬物治療効果を簡便に評価することが可能である。

2. 研究の目的

本研究課題では、*jag1* の遺伝子発現を亢進し、DMD モデルフィッシュで認められる筋構造異常を緩和する薬剤を明らかにすることを目的として、次の2つのプロジェクト(1)ゼブラフィッシュ *jag1* プロモーター領域を用いた *jag1*-EGFP トランスジェニックフィッシュの作製。(2)トランスジェニックフィッシュを用いて、*jag1* の発現を亢進する薬物のスクリーニング を遂行した。

3. 研究の方法

1. *jag1*-EGFP トランスジェニックフィッシュの作製

jag1 遺伝子の翻訳開始領域の上流部領域についてゼブラフィッシュゲノム DNA から遺伝子クローニングをおこない *jag1* プロモーター領域の遺伝子配列を EGFP c DNA 配列がある Tol2 ベクター (国立遺伝研究所 川上先生から供与していただいた) に導入した。作製した *jag1* プロモーター配列を含む Tol2 ベクターをゼブラフィッシュ受精卵の1細胞期に直接注射し、ゼブラフィッシュのゲノム DNA にこのコンストラクトが組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。この *jag1* 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだトランスジェニックフィッシュは *jag1* 遺伝子発現に対応して、EGFP シグナルが変化することから、*jag1* 遺伝子発現を可視化することが可能となる。

インジェクションにより Tol2 ベクターを導入し EGFP の発現による蛍光が観察された個体を第一世代 (F0) として、これらの個体を用いて次世代 (F1) を作成し、神経細胞や筋組織において EGFP のシグナルが観察されるかどうか確かめ、*jag1* トランスジェニックフィッシュの系統を作製し確立した。

3. *jag1*-EGFP トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた薬剤スクリーニング

jag1-EGFP トランスジェニックフィッシュを用いて、EGFP シグナルを促進するような、つまり *jag1* 遺伝子発現を亢進する薬剤を、市販のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングした。ゼブラフィッシュの受精後 4 日目の稚魚を薬剤を含む飼育水に入れ投与を開始後、5 日目で EGFP 発現を確認する。ゼブラフィッシュの稚魚は小さいため、96 穴プレート内での薬剤処理が可能であり、EGFP シグナルを検出可能な InCell Analyzer (GE Healthcare 社) を用いることにより、1,280 種類の化合物について、その発現の抑制、促進への効果を検出した。

4. スクリーニングによる *jag1* 遺伝子発現制御薬剤の効果の検証

スクリーニングによって得られた *jag1* 遺伝子発現を亢進する薬剤の効果を確認するために、生後 4 日目の野生型ゼブラフィッシュに、薬剤スクリーニングした際に用いた濃度 (10 μ M) でそれぞれの候補薬剤を投与し、24 時間薬剤処理した後の個体から、RNA を抽出、cDNA 合成を行った。それらを鋳型に用いて定量的 PCR を行ない、薬物による *jag1* 遺伝子発現の亢進を確認した。

5. DMD モデルフィッシュへの候補薬剤の投与

DMD 疾患モデルゼブラフィッシュであるジストロフィンを完全欠損している *sapje* は、骨格筋線維の異常構造が観察され、特に偏光フィルターを用いた観察で、その表現型が明確に観察される。本研究で得られた候補薬剤のうち、入手可能な 7 種類について DMD モデルフィッシュに投与して、その筋組織の異常の緩和に効果があるかについて調べた。

4. 研究成果

1. *jag1*-EGFP トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

jag1 プロモーター領域を組み込んだ EGFP を含む Tol2 ベクターのコンストラクトを受精卵に直接注射し、ゼブラフィッシュのゲノム DNA にこのコンストラクトが組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。

jag1 翻訳開始点の上流の PCR 産物 500 bp を pEGFP ベクターに組み込み、ゼブラフィッシュの受精卵に注射したところ、体細胞において EGFP シグナルが観察された。これらの個体 (F0) を成魚になるまで飼育し、野生型ゼブラフィッシュ (AB) と交配して第一世代 (F1) を作製し、その個体群の中から EGFP のシグナルが観察される個体を確認した。それらの第 1 世代の個体を用いてトランスジェニックフィッシュの系統を作製した。この *jag1* プロモータートランスジェニックフィッシュは、稚魚で脳、脊髄などでの EGFP の発現が顕著であり、すでに報告されている *jag1* 遺伝子の発現パターンと同様であり、成魚においては各臓器での *jag1* 遺伝子の発現のパターンが EGFP 遺伝子の発現パターンと一致することを確認した。これらの結果から、*jag1* 遺伝子発現を EGFP の発現で間接的に検出し、可視化することができるトランスジェニックゼブラフィッシュを開発することができた。

3. *jag1* トランスジェニックフィッシュを用いた薬剤スクリーニング

jag1 トランスジェニックフィッシュを用いて、市販のケミカルライブラリーから *jag1* の遺伝子発現を亢進する化合物の薬剤スクリーニングを行った。ゼブラフィッシュ受精後 4 日目の稚魚を、一匹づつ 96 穴プレートの各ウエルに入れた。また、ケミカルライブラリーに含まれる

1,280 種類の化学物質それぞれを含む飼育水の中で (10 μ M) 24 時間薬剤投与後、EGFP シグナルを自動的に検出可能な InCell Analyzer (GE Healthcare 社)により、EGFP の蛍光を検出した。その結果、1,280 種類の薬剤の中から数種類の EGFP の発現を亢進する薬剤、つまり *jag1* 発現亢進を促進する薬剤を見つけることができた。

4. *jag1* 遺伝子の発現を亢進させる薬剤効果の検証

薬剤スクリーニングにより *jag1* 遺伝子発現を亢進させる薬剤 7 種類について、野生型ゼブラフィッシュの稚魚に投与し、*jag1* 遺伝子の発現レベルを定量的 PCR によって調べた結果、これらの 7 種類の候補薬剤それぞれの投与によって *jag1* 遺伝子の発現が亢進することが確認された。

5. DMD モデルフィッシュへの候補薬剤投与

DMD モデルフィッシュに対して生後 1 日目から生後 5 日目までの 4 日間、7 つの候補薬剤それぞれを 10 μ M で投与した結果、生後 5 日目において薬剤候補の 1 つを投与した個体群では、異常な筋構造を示す個体の割合が、有意に減少することが確認された。

本研究課題によって、*jag1* 遺伝子発現をモニターできる *jag1*-EGFP トランスジェニックゼブラフィッシュを開発し、それを用いた薬剤スクリーニングにより *jag1* 遺伝子を亢進する薬剤を同定した。これらの薬剤を筋組織異常を呈する DMD モデルフィッシュへ投与することにより候補薬剤のうち 1 つの薬剤が筋組織異常を改善する効果を示した。この候補薬剤の効果や、DMD モデルフィッシュにおいてどのようにして異常な筋組織を改善させるのかについて、さらに研究を進めることにより、DMD 疾患の治療薬の開発への結びつく可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川原玄理、中屋敷真未、林由起子
2. 発表標題 トランスジェニックゼブラフィッシュを用いたJagged1発現を亢進する薬剤探索
3. 学会等名 第9回日本筋学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川原玄理 埜藤宏一 荷見瑠樹 中屋敷真未 林由起子
2. 発表標題 fh11 遺伝子変異を有する筋疾患ゼブラフィッシュモデルの解析
3. 学会等名 第10回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川原玄理 清水祥彦 林由起子
2. 発表標題 公募シンポジウム「教育題材から最先端研究まで～小型魚類モデルの可能性」広範に活用される小型魚類
3. 学会等名 第101回 日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	林 由起子 (Hayashi Yukiko) (50238135)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

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
---------	---------