

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 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：15K15394

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ創薬：ダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルを用いた化合物の探索

研究課題名(英文)Using zebrafish for screening of Diamond-Blackfan anemia drugs

研究代表者

吉浜 麻生 (Yoshihama, Maki)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員

研究者番号：00381103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュのダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルを用いた化合物の *in vivo* 検証系を構築した。(1)RPS19遺伝子ノックダウン胚を用いた化合物のスクリーニングを行なった。(2)薬物代謝の *in vivo* 実験系としてバイオラベリング法を開発した。(3)CRISPR-Cas9システムによりRPS19遺伝子に変異のあるゼブラフィッシュを作製した。この変異体は48時間胚の発生段階で重度の貧血を示した。(4)毒性試験では長期投与により致死率が増加する化合物を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an *in vivo* drug evaluation system that uses zebrafish as a tool for drug discovery for Diamond-Blackfan anemia (DBA). (1) We performed a compound screening as a pilot study to identify candidate drugs for DBA treatment. (2) A biolabeling method was developed to detect drug metabolism *in vivo*. (3) We used CRISPR-Cas9 system to generate DBA models that carry *rps19* gene mutation. The *rps19* homozygous mutants showed severe anemia at 48 hours post fertilization. (4) The toxicity test revealed an increased lethality depending on the time period of compound treatments.

研究分野：分子生物学

キーワード：創薬 ゼブラフィッシュ バイオラベリング 造血効果 毒性試験 薬物代謝

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾患とリボソーム構成因子の変異の関連が報告され、これらは総じてリボソーム病と呼ばれてきた。リボソームは遺伝情報の発現の場として生命現象の一翼を担っているため、細胞がタンパク質合成だけでなくリボソームの品質管理を制御することは必然と言えた。これらに関わる因子に変異がおきると細胞の正常性は失われ、増殖調節の破綻の例は細胞のがん化であり、老化した細胞ではリボソーム RNA の異常な蓄積が観察された。リボソーム病の代表例として先天性の赤芽球低形成であるダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) を挙げることができ、患者の 25% でリボソームタンパク質 (RP) S19 遺伝子の変異が確認された。しかし、全ての細胞に存在するリボソームの変異がなぜ造血系のみに影響するのか、DBA の発症機序の解明は進展していなかった。さらに、シュバツハマンダイヤモンド症候群、先天性角化不全症、軟骨毛髪低形成の患者では、リボソーム RNA の成熟や修飾に関わる因子の遺伝子に変異がみられた。これら疾患の共通項として骨髄形成不全があげられたが、当時の状況として、いずれの発症機序も不明であり、治療法や医薬品の開発は進んでいないという問題があった。私たちは、脊椎動物で初めて顕著な赤血球減少を呈するゼブラフィッシュの DBA モデルを確立していた。ゼブラフィッシュ DBA モデルは、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて rps19 遺伝子の発現を抑制することにより造血障害を示した。DBA モデルを、リボソームの合成を促進すると推測されている L-ロイシンや L-アルギニンなど、特定のアミノ酸を添加した培地で飼育すると 48 時間胚の赤血球の数が有意に回復することも確認した。さらに、造血系はヒトとの相同性が高いことから、初期胚の赤血球数を指標とすることで化合物の効果を評価できると考えるに至った。ゼブラフィッシュは成長が早く、受精後 24 時間ではほぼ全ての器官原器が形成される。このため、ゼブラフィッシュ創薬では、ヒット化合物の同定と同時に有効濃度や毒性を検定することが可能であり、また、一週間で 240 化合物というロースループットながらも、生体を用いて化合物の評価を行うことが可能であると考へた。また、これらの特徴により *in vivo* でありながら薬効の検証試験に関する多くの時間と費用における問題点を克服することができるのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本課題においてゼブラフィッシュ胚を用いることによる化合物の *in vivo* 評価系を構築できれば、DBA に有効な薬剤の開発の基盤となり、将来的には、他のリボソーム病の解明や治療において有効な対策になりうる。そこで、パイロット実験として、MO による

rps19 遺伝子ノックダウン胚について血球数を回復させる化合物のスクリーニングを行なった。さらに、発生段階に応じたリアルタイムな薬物代謝機構の解析を進めるためにバイオラベリング法の開発に取り組んだ。ゼブラフィッシュの培地に排出される薬物の代謝産物に着目することによる *in vivo* 解析系の構築を目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) DBA モデルを用いた化合物ライブラリーのスクリーニング

DBA モデル胚を作成するために、まず rps19 遺伝子に対する MO を一細胞期の受精卵に注入した。rps19 ノックダウン胚が受精後 24 時間において特徴的な形態異常 (尾部の屈曲、頭部の矮小など) をもつことを確認した後、化合物を含む培地で 24 時間、飼育した。48 時間胚にヘモグロビン染色を施し、赤血球数の密度をコントロールの DBA モデル胚と比較することにより造血効果のある化合物を探索した。化合物の絞り込みでは、赤血球数の他にも形態・行動観察による検定も行った。一次スクリーニングにおける全ての化合物は終濃度 40  $\mu$ M と胚 3 個で検討した。二次スクリーニングでは化合物の終濃度 40  $\mu$ M と胚 10 個で検証した。三次スクリーニングでは胚 20 個を用いて終濃度 10 nM から 80  $\mu$ M について再現性と効果的な濃度について検討した。

### (2) CRISPR-Cas9 技術を用いた rps19 遺伝子変異体の作成

ゼブラフィッシュの rps19 遺伝子のエクソン 4 をターゲットとした gRNA と Cas9 タンパク質複合体を一細胞期の受精卵に注入した。24 時間胚のゲノム配列を解析し、rps19 遺伝子への変異導入について挿入/欠失の内容と作成効率を確認した。次に胚を繁殖可能な月齢まで飼育し、次世代に相当する受精卵を取得するために野生型と掛け合わせを行った。得られた 24 時間胚のゲノム配列を解析することで、rps19 遺伝子に変異をもつ個体を選択した。

### (3) 野生型を用いた毒性試験

スクリーニングにより得られた化合物が発生に与える影響を検証するための毒性試験として、30 個の野生型 (MO 注入無し) の 48 時間胚を化合物が含まれる 200 ml の培地で 11 日間飼育した。終濃度は、造血効果のある濃度、および、造血効果のある濃度の 5 倍から 10 倍を用いて検証実験を行った。毒性については、致死性、発生の遅れ、形態形成の異常、摂食などの行動の異常の有無について観察を行った。

### (4) バイオラベリングを用いた薬物の代謝解析

培地 200  $\mu$ l にバイオラベリングとして放射性同位体  $^{33}\text{S}$  と化合物を加え、8 個の 48

時間胚を5日間、飼育した。24時間毎に培地を回収し、培地中に排出された代謝産物について薄層クロマトグラフィーを展開した。パイロット実験として複数の化合物を検討し、また、培地に添加する化合物の終濃度および放射性同位体  $^{35}\text{S}$  は予め毒性がないことを確認した量を用いた。*in vivo* 実験の比較対象とするためにトータル RNA とトータルタンパク質を発生段階に応じて回収し、それぞれを用いて RT-PCR による硫酸転移酵素 (SULT) の遺伝子発現の確認と *in vitro* 条件の下で酵素活性の測定を行った。

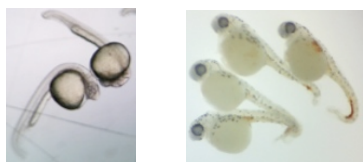
#### 4. 研究成果

##### (1) DBA モデルと化合物スクリーニング

ライブラリーに含まれる化合物の約半数にあたる600種類の化合物では DBA モデルの表現型が悪化する一方で、三次スクリーニングでは血球数の回復に有効な化合物は、当初の約100分の1 (400 nM) という低濃度で効果が得られる可能性があった。また、MO による rps19 ノックダウン胚は表現型に個体差が出る傾向があり、バイアスを吸収するために試験数を増やす必要があることが問題点としてあがった。そこで、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集に着手した。

##### (2) rps19 遺伝子変異体の作成

rps19 遺伝子のエキソン4に変異のあるゼブラフィッシュを作製することに成功した。rps19 遺伝子ホモ変異体は24時間胚において尾部の屈曲と頭部の矮小などの特徴的な形態異常をもつことを確認した。さらに、48時間胚で重度の貧血を示すこと、および、rps19 遺伝子の mRNA の発現量が減少していることを確認した。



24 時間胚      48 時間胚  
ヘモグロビン染色

図 1. rps19 遺伝子変異体

##### (3) 毒性試験

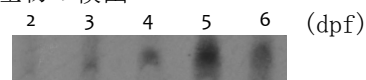
三次スクリーニングで選別された化合物に急性の毒性 (致死や形態形成) があるものは無かった。また、正常な飼育下にいる野生型は5日間胚から給餌行動をとることが観察されるが、本課題で選別された化合物は、11日間の処理において摂食を含む全ての行動に異常が無いことが確認された。一方で造血効果のある終濃度の5倍あるいは10倍を用いた毒性試験では、特定の化合物において飼育期間に依存した発生阻害が最終的に胚の致死につながることを観察された。今後は造血効果の濃度依存性と毒性の半数致死量を

求める必要があると考えた。

##### (4) バイオラベリング

放射性同位体  $^{35}\text{S}$  の添加によるバイオラベリングを検討したところ、硫酸転移酵素の基質である複数の化合物で代謝産物の検出が可能であった。硫酸転移酵素である SULT 遺伝子はファミリーを形成しているが、化合物 (A) を基質とした高い代謝活性を示す特定の SULT が存在したため、バイオラベリングにより得られた化合物 (A) の代謝産物の検出パターンを、SULT 遺伝子の mRNA の発現パターンと比較したところ高い相関性がみられた。また、ゼブラフィッシュ胚のトータルタンパク質を用いた *in vitro* 酵素活性解析でも同様の結果が得られた。これにより、ゼブラフィッシュは薬物代謝の *in vivo* 解析にも有用であることがわかった。さらに、胚の発生が早く体長が小さいため、用いる化合物が少量で済むという点においても創薬に適したツールであることを実証することができた。

TLC; バイオラベリングによる化合物 (A) 由来の代謝産物の検出



RT-PCR; SULT 遺伝子の発現パターン



図 2. 薬物代謝の *in vivo* 解析

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kurogi K, Yoshihama M, Horton A, Schiefer IT, Krasowski MD, Hagey LR, Williams FE, Sakakibara Y, Kenmochi N, Suiko M, Liu MC. 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.

[学会発表] (計 14 件)

- (1) Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Etsuro Ito, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi. 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アモン

- 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) Maki Yoshihama, Tamayo Uechi, Katstuhisa Kurogi, Yukari Nakajima, Ming-Cheh Liu, Naoya Kenmochi. in vivo analysis for drug screening using DBA zebrafish model and bio labeling to visualize drug metabolism. 第23回小型魚類研究会. 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) Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Etsuro Ito, Naoya Kenmochi. Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society. 2017
- (7) 吉浜麻生, 上地珠代, 黒木勝久, Ming-Cheh Liu, 剣持直哉. ゼブラフィッシュ貧血モデルを用いた創薬スクリーニングおよび薬物代謝の in vivo 解析. 平成29年度日本生化学会九州支部例会. 2017
- (8) 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
- (9) 吉浜麻生, 上地珠代, 黒木勝久, 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
- (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. 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
- (11) 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
- (12) Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Selected mRNA translation and ribosomopathies: analyzing the zebrafish model of congenital pure red-cell aplasia. The 21st Annual Meeting of the RNA Society. 2016
- (13) Naoya Kenmochi, Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano. Ribosomal dysfunction leads to erythropoiesis failure in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016
- (14) Katsuhisa Kurogi, Maki Yoshihama, Naoya Kenmochi, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Frederick Williams, Ming-Cheh Liu. Investigation of the cardiovascular toxicity of oxidized cholesterols using the zebrafish as an animal model. American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2016 Annual Meeting. 2016
- [その他]  
ホームページ等
- (1) リボソームタンパク質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  
吉浜麻生 (Maki Yoshihama)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員  
研究者番号：00381103
- (2) 研究分担者  
上地珠代 (Tamayo Uechi)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員  
研究者番号：00381104