

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07149

研究課題名(和文) 希少疾患マウスモデルを用いた新規分子創薬標的の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel drug target for rare disease using murine model of cystinosis

研究代表者

岡村 匡史 (Okamura, Tadashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長

研究者番号：00333790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シスチノーシスは常染色体劣性遺伝疾患であり、原因遺伝子であるCtns遺伝子を欠損したマウスでは、ヒトと同様に全身性にシスチンが蓄積する。しかしながら、組織におけるシスチン量はマウスの遺伝的背景に大きな影響を受けることが報告されている。本研究の成果により、その原因遺伝子はマウス第12番染色体上に存在し、候補領域に存在する芳香族炭化水素受容体遺伝子の“G”から“A”の置換が原因である可能性を示した。さらに、Ctns遺伝子欠損細胞を用いたメタボローム解析により、Ctns遺伝子を欠損すると細胞内のグルタチオン量が有意に減少し、細胞の抗酸化作用が低下することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾患はこれまで、発症頻度の低さから数少ない患者を救済する慈善医療で、収益性がないと考えられていた。しかし、希少疾患研究から新たな分子創薬標的が発見され、「頻度が高い病気」(common disease)に対する新薬開発への手がかりを提供することがいくつかの疾患で示されている。本研究により、細胞内のシスチン蓄積とダイオキシンの受容体である芳香族炭化水素受容体遺伝子との関連が示唆され、新たな創薬標的となり得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cystinosis is a rare progressive lysosomal storage disorder characterized by the accumulation of cystine in lysosomes, which is caused by a defect of cystine transporter called cystinosis (CTNS). It has been reported that renal dysfunction in Ctns deficient mice was dependent on their genetic background. The renal cystine levels of C57BL/6 Ctns deficient mice were much higher than those of FVB/N and the mixed 129Sv Ctns deficient mice. To clarify the genetic basis of cystine accumulation, we performed genetic association study using backcross progeny. A recessively acting locus responsible for the marked cystine accumulation (cysa) was mapped on mouse chromosome 12. The sequence analyses on the C57BL/6 and FVB/N genome detected a C57BL/6 specific variant leading stop gain within the cysa locus; the variant in Ahr was predicted to disrupt the protein function. Thus, Ahr is a potential candidate gene for the cysa locus. This will be the focus of future studies in both mice and humans.

研究分野：実験動物学

キーワード：希少疾患 マウス シスチノーシス 相関解析 シスチン

## 1. 研究開始当初の背景

シスチノーシス(シスチン蓄積症)は、リソソーム膜に存在するシスチントランスポーターである *CTNS* 遺伝子変異によって、リソソームにシスチンが蓄積する常染色体劣性遺伝疾患である。10~20 万人に 1 人の割合で発症し、全体の約 95%をしめる最も重篤な腎障害型では、生後約 6 ヶ月で腎尿細管症を呈し、未治療で経過すると 10 歳程度で腎不全により死亡する。シスチンは細胞質で還元されるとシステインとなり、抗酸化物質の一つであるグルタチオン(GSH)の合成に利用される。GSH は 3 つのアミノ酸(リシン, グルタミン酸, システイン)で構成されるが、GSH の合成は合成酵素活性と共に、細胞内のシステイン濃度が律速段階になっている[1]。細胞外のシスチンはグルタミン酸との交換により、シスチン/グルタミン酸トランスポーターである xCT により細胞内に取り込まれる。また、正常細胞およびシスチノーシス患者由来尿細管上皮細胞株に、リソソームから細胞質にシスチンを排出させる薬剤を添加すると、細胞内 GSH の濃度が顕著に増加することから[2]、細胞質へのシスチンの供給は xCT のみでなく、*CTNS* によるリソソームからの供給も重要であると考えられる。つまり、細胞内に豊富に存在する GSH の生合成は、xCT と *CTNS* から供給されるシスチン濃度に依存し、何らかの理由により細胞外からシスチンが取り込めない場合は、リソソームからの供給に依存することが推測される。

シスチノーシスの原因遺伝子である *Ctms* 遺伝子を欠損したノックアウトマウスでは、ヒトと同様、全身性にシスチンが蓄積するが、興味深いことに蓄積量およびその病態はマウスの遺伝的背景に大きく影響を受けることが報告されている[3]。C57BL/6 系統に *Ctms* 遺伝子欠損を導入したコンジェニック系統では、加齢と共に顕著にシスチン濃度が増加し、生後約 9 ヶ月齢で腎尿細管上皮細胞変性像が観察される。一方、129 系統および FVB/N 系統に導入した場合は、腎尿細管上皮細胞変性像は観察されず、腎臓におけるシスチン量は、C57BL/6 背景に比べ約 1/20 であった。すなわち、C57BL/6 系統には *Ctms* 遺伝子の機能を代替、あるいは補う遺伝子の機能が欠損していることが示唆される。

## 2. 研究の目的

希少疾患はこれまで、発症頻度の低さから数少ない患者を救済する慈善医療で、収益性がないと考えられていた。しかし、希少疾患研究から新たな分子創薬標的が発見され、「頻度が高い病気」(common disease) に対する新薬開発への手がかりを提供することがいくつかの疾患で示されている。本研究では、希少疾患であるシスチノーシスモデルマウスを用いて、マウス系統差を利用した連鎖解析により、新たなシスチン代謝関連遺伝子座を同定する。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析により、新たな分子創薬標的の遺伝子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Ctms* 遺伝子欠損マウスおよび交雑群の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Ctms* 遺伝子のエクソン 7 からエクソン 12 を欠失させた *Ctms* 遺伝子欠損マウスを C57BL/6 および FVB/N 系統にて作製した。さらに、これらの系統を交配した F1 マウスを作製した後、C57BL/6 背景 *Ctms* 遺伝子欠損マウスに戻し交配することで、バッククロス群を 105 匹作製した。すべての動物実験は、国立国際医療研究センター研究所の動物実験施設の審査を受けた後に機関の長の承認を受け、『国立国際医療研究センター動物実験等に関する規則』に従って行った。

### (2) 遺伝型解析

C57BL/6 および FVB/N 系統に多型が確認できたマイクロサテライトマーカー (SSLP マーカー) について、マウス全染色体を網羅するように 102 個を選択した。マウス尾より DNA を抽出

し、選択した SSLP マーカーを用いて遺伝型判定を行なった。

### (3) 各組織におけるシスチン測定

マウスの各組織をホモジネートした後、スルホサリチル酸を加えて除タンパクし、得られた抽出液を用いて質量分析装置 (LCMS-8040, 島津製作所) にてシスチン濃度を測定した。同時にホモジネート液のタンパク質濃度を測定し、シスチン濃度のタンパク質補正に用いた。

### (4) *Ctms* 遺伝子欠損マウスのマウス胎児線維芽細胞 (MEF) の作製

*Ctms* 遺伝子欠損および遺伝背景の違いによる影響を調べるツールとして、マウス胎児線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast; MEF) を作製した。妊娠 13.5 日目のマウス子宮から胎児を摘出し、常法に従い胎児由来線維芽細胞を作製した。正常系統についても同様に MEF を作製した。

### (5) *Ctms* 遺伝子欠損細胞を用いたメタボローム解析

*Ctms* 遺伝子欠損ラット (F344-*Ctms*<sup>ugl</sup>) (発表論文) および F344 系統から樹立した作製したラット胎児由来線維芽細胞をメタノールで処理し代謝物を抽出した。抽出した代謝物は、CE-TOFMS (アジレント・テクノロジー) を用いて解析し、検出された物質の相対値を算出した。約 900 物質が対象であり、アミノ酸、ヌクレオチド類、核酸塩基、CoA 累、有機酸およびニコチンアミド補酵素などを主な分析対象とした。メタボローム解析はヒューマンメタボローム (HMT) 社に外部委託した。

## 4. 研究成果

### (1) 交配実験による遺伝様式の解析

24 週齢の C57BL/6、FVB/N 背景およびその F1 の *Ctms* 遺伝子欠損マウス (以下、それぞれ B6\_KO、FVB\_KO および F1\_KO) の肝臓、脾臓および腎臓のシスチン量を、質量分析装置を用いて測定した。その結果、FVB\_KO に比べ B6\_KO の肝臓および脾臓は、それぞれ約 75 倍および約 35 倍シスチンが蓄積していた (図 1)。一方、腎臓においては有意な差はなかった。B6\_KO の肝臓および脾臓のシスチン量は、F1\_KO と比較しても顕著に増加していることから、B6\_KO が有するシスチン代謝関連遺伝子は、常染色体上の単一遺伝子による劣性遺伝であることが明らかとなった (図 1)。

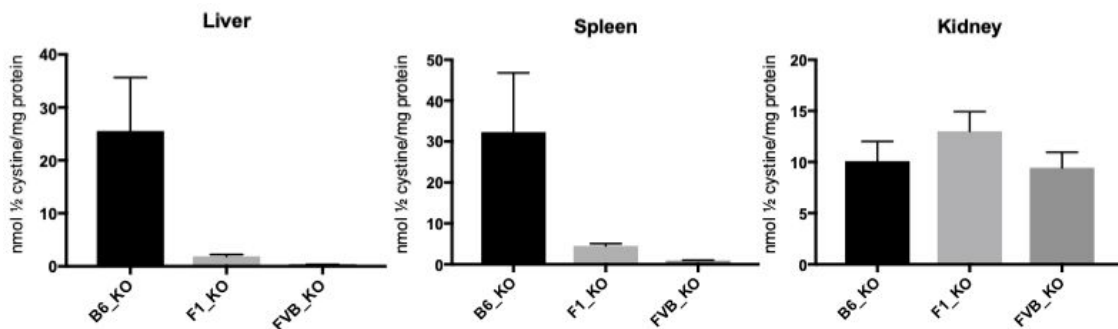


図 1. 24 週齢における肝臓、脾臓および腎臓のシスチン蓄積量

### (2) 戻し交雑群を用いた相関解析によるシスチン代謝関連遺伝子座の同定

交配実験により、C57BL/6 が有するシスチン代謝関連遺伝子は、劣性遺伝をすることが示されたため、F1\_KO を B6\_KO に戻し交配したバッククロス群 (N<sub>2</sub> 個体群) を 105 匹作製した。すべての N<sub>2</sub> 個体において、全染色体を網羅する 102 個の SSLP マーカーを用いて遺伝型を決定し、最もシスチン蓄積量の系統差が大きかった肝臓のシスチン量を表現型として、選択的遺伝子型解析を行った。その結果、マウス第 12 番染色体上の *D12Mit243* ( $P = 1.80E-0.5$ ) および *D12Mit34* ( $P = 3.40E-0.8$ ) に有意な相関が認められた。第 12 番染色体以外の SSLP マーカーについては、有意な相関は認められなかった。以上の結果から、シスチン代謝関連遺伝子 (*cysa*; cystine

accumulation) は、マウス第 12 染色体上の約 35Mb の領域に存在することが示された。

### (3) cysa 遺伝子変異の同定

遺伝子型とシスチン蓄積量に強い相関が見られた約 35Mb の領域には、117 個の遺伝子が存在した。この領域に存在する C57BL/6 と FVB/NJ のゲノム配列を比較したところ、タンパク質コード領域上にアミノ酸置換を伴う変異を有する遺伝子は存在しなかった。しかしながら、C57BL/6 の芳香族炭化水素受容体(*Ahr*)遺伝子はグアニン(G)からアデニン(A)の置換により、*Ahr* 遺伝子の途中で新たなストップコドンが生じ、タンパク質の C 末端が一部欠損していることが予想された。この 1 塩基置換 (SNP) は、129 系統、BALB/c、C3H および DBA/2 には存在せず、C57BL/6 系統のみが有する SNP であった (表 1)。さらに、*Ahr*、*170060O08Rik*、*Gm527*、*Pole2* および *Klhdc2* 遺伝子においても、スプライシング領域に C57BL/6 特有の SNP が存在した。

Chromosome	Position	Gene	dbSNP	Strains						SNP/Indel Consequences
				C57BL/6	FVB_NJ	129P2_OlaHsd	BALB_cJ	C3H_HeJ	DBA_2J	
12	35500691	<i>Ahr</i>	rs3021951	A	G	G	G	G	G	stop_lost
12	35511174	<i>Ahr</i>	rs3021647	G	A	A	A	A	A	splice_region_variant
12	54079305	<i>1700060O08Rik</i>	rs45869244	T	A	A	A	A	T	splice_region_variant
12	54079311	<i>1700060O08Rik</i>	rs51031107	C	G	G	G	G	C	splice_donor_variant
12	64923501	<i>Gm527</i>	rs29133154	C	T	T	T	T	C	splice_region_variant
12	69204274	<i>Pole2</i>	rs3704977	T	C	C	C	C	T	splice_region_variant
12	69304634	<i>Klhdc2</i>	rs37320317	C	T	T	T	T	C	splice_region_variant

本研究により C57BL/6 背景 *Ctns* 遺伝子欠損マウスにおける過剰なシスチン蓄積は、マウス第 12 番染色体上の *cysa* 遺伝子座によって引き起こされることが明らかとなった。その原因として、ダイオキシンの受容体である *Ahr* 遺伝子の部分的な機能喪失の可能性が示された。これまでに *Ahr* 遺伝子とシスチン代謝との関連を示す報告はないが、*Ctns* 遺伝子欠損細胞を用いたメタボローム解析により、*Ctns* 遺伝子を欠損すると細胞内のグルタオン(GSH)量が有意に減少し、細胞の抗酸化作用が低下することが示唆されている。引き続き、これらの候補遺伝子とシスチン代謝との関係を詳細に解析することで、シスチノーシスの病態メカニズムを解明すると共に、新たな分子創薬標的としての可能性を検討していく予定である。

### < 参考文献 >

1. Ishii, T., Sugita, Y. & Bannai, S., "Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine", *Journal of cellular physiology*, vol. 133, no. 2, pp. 330-336 (1987).
2. Wilmer, M.J. et al., "Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1812, no. 6, pp. 643-651 (2011).
3. Nevo, N. et al, "Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background", *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 25, no. 4, pp. 1059-1066 (2010).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimizu Yukiko, Ishii Chiharu, Yanobu-Takanashi Rieko, Nakano Kenta, Imaiike Akio, Mita Masashi, Hamase Kenji, Okamura Tadashi	4. 巻 1868
2. 論文標題 d-Amino acid oxidase deficiency is caused by a large deletion in the Dao gene in LEA rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140463 ~ 140463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140463	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 Nakano Kenta, Yanobu-Takanashi Rieko, Shimizu Yukiko, Takahashi Yuki, Hiura Koki, Watanabe Masaki, Sasaki Hayato, Okamura Tadashi, Sasaki Nobuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic locus responsible for diabetic phenotype in the insulin hyposecretion (ihs) mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234132	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 Sasaki H, Takahashi Y, Ogawa T, Hiura K, Nakano K, Sugiyama M, Okamura T, Sasaki N.	4. 巻 69
2. 論文標題 Deletion of the Tensin2 SH2-PTB domain, but not the loss of its PTPase activity, induces podocyte injury in FVB/N mouse strain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Anim.	6. 最初と最後の頁 135-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0101.	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 Shimizu Yukiko, Yanobu-Takanashi Rieko, Nakano Kenta, Hamase Kenji, Shimizu Toshiaki, Okamura Tadashi	4. 巻 30
2. 論文標題 A deletion in the Ctns gene causes renal tubular dysfunction and cystine accumulation in LEA/Tohm rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 23 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-018-9790-3	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 後藤 芳充, 笠置 俊希, 真島 久和, 笠原 克明, 武田 朝美, 加藤 紀子, 岡村 匡史, 清水 有紀子	4. 巻 61
2. 論文標題 ファンコニー症候群、腎機能低下から診断し、幼少期からシステアミン投与を開始したシスチノーシス症例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 36-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 赤平 百絵, 岡村 匡史, 清水 有紀子, 高柳 正樹	4. 巻 86
2. 論文標題 「全身性疾患と腎 update」シスチノーシス (シスチン症、シスチン蓄積症)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析2019	6. 最初と最後の頁 216-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 赤平 百絵, 岡村 匡史, 清水 有紀子, 大熊 喜彰, 高柳 正樹	4. 巻 50巻10号
2. 論文標題 【新薬が変える子ども医療-薬物の使い分けと作用機序】 新しく開発された薬 先天代謝異常 シスチノーシス(シスチン蓄積症) システアミン酒石酸塩、システアミン点眼薬	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 1585-1590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大熊喜彰、清水有紀子、岡村匡史、赤平百絵、七野浩之
2. 発表標題 シスチノーシス確定診断法の確立
3. 学会等名 第120回日本小児科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡村匡史
2. 発表標題 CRISPR/Casシステムを用いた効率的遺伝子改変マウスの作製とその応用
3. 学会等名 第28回東北実験動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水有紀子、大熊喜彰、赤平百絵、清水俊明、岡村匡史
2. 発表標題 新規モデルラットを用いたシスチノーシス確定診断法の確立
3. 学会等名 第12回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤平百絵、清水有紀子、大熊喜彰、岡村匡史、大浦敏博
2. 発表標題 日本におけるシスチノーシス患者の実態調査およびシステアミン治療の有用性
3. 学会等名 第59回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本先天代謝異常学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 80
3. 書名 シスチノーシス（シスチン蓄積症）診療ガイドライン2019	

〔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	清水 有紀子  (Shimizu Yukiko)		
研究協力者	中野 堅太  (Nakano Kenta)		