

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：25201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11074

研究課題名（和文）ナンセンス変異リードスルー治療のための栄養学（NMD栄養学）の確立

研究課題名（英文）Role of nutrition in the readthrough therapy for nonsense diseases

研究代表者

原田 永勝（Harada, Nagakatsu）

島根県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：40359914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ナンセンス型遺伝子変異疾患では、異所性の翻訳停止コドン（PTC）を有するナンセンス型mRNAが細胞内のmRNA品質管理機構（NMD）により分解されるため、必要なタンパク質が作られず病気が発症する。リードスルー治療は、このPTCを読み飛ばす技術であり、その効率はNMDの活性に影響される。本研究では、Duchenne型筋ジストロフィーのリードスルー治療効率に対する食生活の影響を解析した。Duchenne型筋ジストロフィーモデルマウスであるmdxマウスにゲンタマイシンによるリードスルー治療と高脂肪食の給餌を併用したところ、リードスルー治療効果が上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Duchenne型筋ジストロフィーに対するリードスルー治療において、食生活の変化（高脂肪食）が治療効果に影響することを明らかにした。高脂肪食は健康に良い食事とは言えないが、リードスルー治療期間専用の食事としての可能性が示唆された。本研究結果は、ナンセンス型遺伝子変異疾患のリードスルー治療のための栄養基盤の創生につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Cellular nonsense-mediated mRNA decay (NMD) degrades mRNAs carrying a premature termination codon (PTC). Readthrough therapy can suppress PTC and generate full-length protein from aberrant mRNAs. NMD activity affect efficiency of the readthrough therapy. Here we investigate whether nutritional status influences the efficiency of readthrough therapy for Duchenne muscular dystrophy. Our results show that high-fat diet feeding potentiated gentamicin-mediated readthrough therapy for the mdx mice, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy.

研究分野：分子栄養学

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー リードスルー治療 mdxマウス ScNマウス ゲンタマイシン mRNA品質管理機構 高脂肪食 小胞体ストレス

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

ヒトの遺伝子変異疾患の約 30%はナンセンス変異型(ナンセンス型)である。DNA 上の遺伝子座から転写される pre-mRNA は、スプライシングによるエキソン部分の連結によって成熟 mRNA を産生するが、ほぼ全ての mRNA では最終エキソン上に翻訳停止コドンがコードされている。これら正規の mRNA から翻訳により正規のタンパク質が合成される。一方、遺伝子変異(たとえば塩基の置換)が原因で最終エキソンより上流に異所性の翻訳停止コドン(premature termination codon; PTC とよばれる)が出現するものがナンセンス型の mRNA である。私たちの細胞は nonsense-mediated mRNA decay (NMD) とよばれる mRNA の品質管理機構によって、このようなナンセンス型 mRNA を直ちに分解しアミノ酸鎖長の短い変異タンパク質の産生を防いでいる(詳細として、PTC とその下流のエキソン-エキソン接合部との距離あるいは 3' 側非翻訳領域の長さが NMD の標的となるか否かを決定する)。このことがナンセンス型遺伝子変異疾患の根本原因であり、たとえば、Duchenne 型筋ジストロフィーではナンセンス変異したジストロフィン mRNA が NMD によって分解されるため、筋線維の形態や機能を維持するジストロフィンが産生できず筋肉が変性または壊死する。Duchenne 型筋ジストロフィーの他にも、ナンセンス型遺伝子変異疾患は 2,000 種以上存在する。

ナンセンス型遺伝子変異疾患に対して、リードスルー治療の研究が行われている。これは、mRNA 上でリボソームが PTC を読み飛ばすことで mRNA の翻訳を続行させる技術であり、ナンセンス型 mRNA から全長タンパク質を合成することができる。現在までにアミノグリコシド系抗生物質(ゲンタマイシンなど)や合成化合物 PTC124 などのリードスルー薬が発見、開発されている。たとえば、ゲンタマイシンによって健常の数%~20%量の全長タンパク質を発現できる。しかし、リードスルー効率は NMD 活性が決定する。つまり、NMD が活性化すればナンセンス型 mRNA 発現量が低下するためリードスルー効率は低下する。逆に、NMD 活性が抑えられればナンセンス型 mRNA 発現量は増加するためリードスルー効率は上昇する。このことから、NMD を活性化させない、あるいは抑制するような細胞内分子環境を構築することがリードスルー治療を成功へと導く。しかし、ヒトの日常生活の中で、どのような状況で NMD 活性が制御されているのか、さらにはそのメカニズムについてこれまで明らかにされてこなかった。また、日常生活の変化が、Duchenne 型筋ジストロフィーなどナンセンス型遺伝子変異疾患のリードスルー治療効率に影響を及ぼすのかについて明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Duchenne 型筋ジストロフィー筋組織のリードスルー治療効率に対する食生活(高脂肪食)の影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) mdx マウスの給餌およびリードスルー治療

実験には Duchenne 型筋ジストロフィーモデルである mdx マウス(ジストロフィン遺伝子のエキソン 23 にナンセンス変異をもつ)を使用した。mdx マウスを 6 群に分け飼育した。内訳は次のとおりとした。一般飼料飼育, 高脂肪食飼育, 一般飼料飼育+リードスルー治療, 高脂肪食飼育+リードスルー治療。対照として同系統の健常マウス(ScN; 一般飼料飼育のみ)を用いた。リードスルー治療には研究例が最も多いリードスルー薬ゲンタマイシンを用いた。ゲンタマイシンは 30 mg/kg の連日皮下投与とした(Keeling et al. PLoS One, 8, e60478, 2013)。高脂肪食は、高パーム油食とした。飼育期間中のマウスの体重、血糖値(尾血)を測定した。飼育期間終了後に、筋組織(腓腹筋、前頸骨筋)を採取し秤量後凍結した。

### (2) マウス筋組織からの RNA 抽出

マウス筋組織からの Total RNA の抽出には TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。筋組織 50 ~ 100 mg に対して 1 ml の TRIzol reagent を加え、ホモジナイザーで均一化した。2、3 分室温放置後、chloroform(0.2 ml)を加えて 30 秒間激しく攪拌した。その後 15,000 rpm で 15 分間遠心し、RNA を含む水層(上層)を得た。水層に isopropanol を加え混和した後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を除去し、得られた沈殿を 70%エタノールで洗浄・乾燥後に DEPC 処理水を加えた。RNA の濃度および純度は紫外線吸収度 A260 および A280 の値を用いて算出した。

### (3) 定量的リアルタイム PCR

マウス筋組織から抽出した RNA を、TaKaRa PrimeScript® RT reagent kit(TaKaRa, Kyoto, Japan) を用いて逆転写した。その後、TB green Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いて定量的リアルタイム PCR (Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite, TaKaRa) を行った。標的遺伝子の mRNA 発現量は、18s リボソーム RNA (rRNA)(内部コントロール)の発現量に対する相対値として任意の単位で表した。

### (4) マウス筋組織からのタンパク質抽出

マウス筋組織 50 ~ 100 mg に対して 2 ml の RIPA バッファー(20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Nonidet-P40, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM -glycerophosphate, および 1 mM PMSF)を加え、ホモジナイズした。遠心分離(15,000 rpm, 20 分, 4 °C)後、上清をタンパク質サンプルとした。各サンプルのタンパク質濃度は BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, Rockford, IL) を用いて測定した。

### (5) ウェスタンブロット

抽出したタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて分離した。SDS-PAGE 後のタンパク質は Immobilon-P メンブレン (Millipore, Bedford, MA) にトランスファーした。メンブレンは 5%スキムミルク入りの TBST (Tris-buffered saline, 0.05% Tween20) で 1 時間ブロッキングした後、標的タンパク質に対する一次抗体を用いて 4 °C にてひと晩ハイブリダイズした。TBST で洗浄後、抗ウサギあるいは抗マウス IgG-HRP conjugate 二次抗体 (Medical & Biological Laboratories CO., LTD., Aichi, Japan) を反応させ(室温 1 時間) 発光基質を用いて検出した。

### (6) 統計

群間の有意差は Student's t tests および Holm 補正により検定し、p 値<0.05 を有意と判定した。

## 4. 研究成果

### (1) マウスの体重、組織重量、血糖値

飼育終了後の mdx マウス(一般飼料飼育)の体重は、ScN マウス(一般飼料飼育)よりも高い傾向を示した。mdx マウスの体重において、高脂肪食投与やゲンタマイシンによるリードスルー治療の有意な影響はみられなかった。mdx マウス(一般飼料飼育)の骨格筋(腓腹筋)重量は、ScN マウス(一般飼料飼育)のものとは比べ有意な変化を示さなかった。また、mdx マウスの骨格筋(腓腹筋)重量に対して、高脂肪食投与やゲンタマイシンによるリードスルー治療の有意な影響はみられなかった。mdx マウス(一般飼料飼育)の内臓脂肪(副睾丸周囲脂肪)重量は、ScN マウス(一般飼料飼育)のものとは比べ有意な差はなかった。一方、高脂肪食の投与は、mdx マウスの内臓脂肪重量を有意に増加させた。ゲンタマイシンによるリードスルー治療の内臓脂肪重量に対する有意な影響は認められなかった。mdx マウス(一般飼料飼育)の血糖値は、ScN マウス(一般飼料飼育)と比べ有意な差はなかった。一方、高脂肪食の投与は、mdx マウスの血糖値を増加させる傾向にあった(有意差はなかった)。ゲンタマイシンによるリードスルー治療は、mdx マウ

スの血糖値に有意な影響を及ぼさなかった。

## (2) ジストロフィンの発現解析

mdx マウスの変異ジストロフィン mRNA は、異所性の翻訳停止コドン (PTC) を有するため、細胞内の mRNA 品質管理機構 (NMD 機構) により分解される。本研究においても、mdx マウス (一般飼料飼育) のジストロフィン mRNA 発現量は、健常の ScN マウスのジストロフィン mRNA 発現量に比べて有意に減少した (しかし、本研究の mdx マウスでは、ジストロフィン mRNA 発現量の低下は 40% 程度であった)。細胞内の NMD 機構が阻害されると、変異ジストロフィン mRNA の発現量は増加する。このため、変異ジストロフィン mRNA 発現量の解析は、NMD 機構の活性をみるツールとして用いることもできる。本研究において、高脂肪食やゲンタマイシンの単独投与は mdx マウスの変異ジストロフィン mRNA 発現量に有意な変化を与えなかった。一方、高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与で、mdx マウスの変異ジストロフィン mRNA 発現量は有意に増加し、ScN マウスのジストロフィン mRNA 発現量に近いレベルとなった。高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与で NMD 活性が制御された可能性が示唆された。

各群マウスの全長ジストロフィンタンパク質発現量を解析したところ、ScN マウスでは、ジストロフィンタンパク質が強く検出されたのに対し、mdx マウス (一般飼料飼育) では、同タンパク質は全く検出されなかった。また、高脂肪食やゲンタマイシンの単独投与では、mdx マウスのジストロフィンタンパク質に有意な変化を与えなかったことから、本研究で用いたゲンタマイシンによるリードスルー治療の効率が低いことが示唆された。一方、高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与群では、mdx マウスの全長ジストロフィンタンパク質の発現が検出された。

## (3) mdx マウス筋組織の小胞体ストレスの解析

申請者はこれまで、肝臓では小胞体ストレスが NMD 活性を制御していることを報告した (Harada et al. J Cell Biochem, 2017)。実験に用いた mdx マウス ( ~ 群) および健常マウス ( 群) の筋組織サンプルにおける小胞体ストレス反応の変化を検討した。小胞体ストレス負荷によって増加する活性型 XBP1 転写因子の mRNA 発現量を解析したところ、mdx マウス筋組織では、ScN マウスに比べてわずかな発現量の増加 (有意差なし) が確認された。高脂肪食やゲンタマイシンの単独投与は mdx マウス筋組織の XBP1 発現量に有意な影響を及ぼさなかったが、高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与群では、XBP1 発現量の有意な増加 (ScN マウスに比べて) が認められた。同じく小胞体ストレス応答のマーカーとなる GRP78 のタンパク質発現量をウエスタンブロットにて解析したところ、mdx マウス筋組織では、ScN マウスに比べて GRP78 発現量がわずかに増加した。一方、高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与によって、GRP78 発現量はわずかに減少した。

このように、本研究で行ったゲンタマイシン単独投与によるリードスルー治療は、mdx マウス筋組織の全長ジストロフィンの発現を増加させる大きな効果を示さなかった。一方、リードスルー治療に高脂肪食投与を併用したマウス群では、変異ジストロフィンの mRNA 発現量が増加したとともに、全長ジストロフィンタンパク質が検出された。これにより、リードスルー治療の効果が低い場合でも、高脂肪食を併用することでリードスルー治療効率を高めることができる可能性が示唆された。一方、リードスルー治療効率の増加の分子メカニズムはいまだ明らかでない。本研究において、筋組織の小胞体ストレス応答を検討したところ、高脂肪食+ゲンタマイシンの併用投与群では、XBP1 の発現では上昇が認められたのに対し、GRP78 の発現では低下が認められた。つまり、高脂肪食投与でみられたリードスルー効率の上昇に、小胞体ストレスによる NMD 活性制御の関与は小さいのではないかと考えられた。リードスルー治療に対する食事の影響とその分子メカニズムをさらに研究することで、リードスルー効率を最適化する治療手段の基盤確立につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuroda M, Onoyama R, Sasaki W, Sebe M, Kitamura T, Masumoto S, Tsutsumi R, Harada N, Sakaue H.	4. 巻 525
2. 論文標題 DNA Methylation Status Influences Insulin-Induced Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes by Mediating p53 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.038	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 Kagawa T, Kozai M, Masuda M, Harada N, Nakahashi O, Tajiri M, Yoshikawa R, Nakao M, Takei Y, Iwano M, Takeda E, Taketani Y, Yamamoto H.	4. 巻 500
2. 論文標題 Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D3 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 275-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.04.058	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 Chikugo M, Sebe M, Tsutsumi R, Iuchi M, Kishi J, Kuroda M, Harada N, Nishioka Y, Sakaue H.	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of Janus kinase inhibition by tofacitinib on body composition and glucose metabolism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 166-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.65.166	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 Harada N, Hatakeyama A, Okuyama M, Miyatake Y, Nakagawa T, Kuroda M, Masumoto S, Tsutsumi R, Nakaya Y, Sakaue H.	4. 巻 502
2. 論文標題 Readthrough of ACTN3 577X nonsense mutation produces full-length $\alpha$ -actinin-3 protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 422-428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.193	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 Tentak A, Shimohata T, Hatayama S, Kido J, Nguyen AQ, Kanda Y, Fukushima S, Uebanso T, Iwata T, Mawatari K, Harada N, Takahashi A	4. 巻 13
2. 論文標題 Host cellular unfolded protein response signaling regulates <i>Campylobacter jejuni</i> invasion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0205865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205865	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 Harada N, Gotoda Y, Hatakeyama A, Nakagawa T, Miyatake Y, Kuroda M, Masumoto S, Tsutsumi R, Nakaya Y, Sakaue H	4. 巻 41
2. 論文標題 Differential regulation of Actn2 and Actn3 expression during unfolded protein response in C2C12 myotubes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Muscle Res Cell Motil	6. 最初と最後の頁 199-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-020-09582-7	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 Kuroda M, Nishiguchi M, Ugawa N, Ishikawa E, Kawabata Y, Okamoto S, Sasaki W, Miyatake Y, Sebe M, Masumoto S, Tsutsumi R, Harada N, Sakaue H	4. 巻 15
2. 論文標題 Interferon regulatory factor 7 mediates obesity-associated MCP-1 transcription.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0233390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233390	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 香川知博、山本浩範、中橋乙起、原田永勝、増田真志、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 ステロール調節エレメント結合蛋白質SREBP はビタミンD 代謝酵素CYP24A1の発現を調節する
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水澤典子, 原田永勝, 岩田武男, 吉本勝彦
2. 発表標題 膵beta細胞機能に関するPrss53の解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武由美子, 末政直哉, 丹波洋介, 大谷環樹, 黒田雅士, 原田永勝, 堤理恵, 阪上浩
2. 発表標題 運動時の骨格筋エネルギー代謝へロイシン摂取が与える影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹波洋介, 竹尾仁良, 坂東正浩, 福田大受, 宮原裕子, 黒田雅士, 升本早枝子, 原田永勝, 堤理恵, 佐田政隆, 阪上浩
2. 発表標題 魚油由来の一価不飽和脂肪酸は動脈硬化を抑制する
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 別府香名, 堤理恵, 梶川美百合, 松島里那, 森博康, 平野春美, 土田健司, 松久宗英, 武田憲昭, 原田永勝, 阪上浩
2. 発表標題 透析患者における味覚障害と味覚受容体T1R3遺伝子の発現の関連
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水澤典子, 原田永勝, 岩田武男, 吉本勝彦
2. 発表標題 Prss53は腓 細胞のミトコンドリア機能を介した細胞維持に関与する
3. 学会等名 第22回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 [編] 木戸康博、桑波田雅士、原田永勝 [著]原田永勝他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 207
3. 書名 基礎栄養学第4版	

1. 著者名 [編] 木戸康博、小倉嘉夫、眞鍋祐之、青井渉 [著]原田永勝他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 287
3. 書名 応用栄養学第6版	

1. 著者名 [編] A・キャサリン・ロス, ベンジャミン・カバレロ, ロバート・J・カズンズ, キャサリン・L・タッカー, トーマス・R・ジューグラー [総監訳] 稲垣暢也, 中屋豊 [訳]原田永勝他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 西村書店	5. 総ページ数 1368
3. 書名 ロス医療栄養科学大事典	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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