

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09984

研究課題名（和文）網膜色素変性に対するリードスルー薬の開発

研究課題名（英文）Readthrough drugs for treating retinitis pigmentosa

研究代表者

前田 亜希子 (Maeda, Akiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員

研究者番号：40776423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リードスルー効果を有する26の化合物を同定した。そのうちの12は、コントロールPTC124よりも有意に高い活性を示した。ウエスタンブロッティングにより、RP細胞モデルにおいて変異により生成が停止されていたPR2タンパク質の発現回復が確認された。これらの化合物でのタンパク質の発現レベルは、PTC124での発現レベルよりも高く、既存のリードスルー薬よりも効果的な化合物を同定できた可能性がある。

今回同定されたリードスルー化合物は、PTC124よりも強いリードスルー効果を持っていることが示唆され、良好な容量依存性を示し、細胞への安全性も確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性網膜疾患である網膜色素変性（RP）は現在のところ治療法のない難病で治療開発が急務である。タンパク質のできないナンセンス変異（premature termination codon; PTC）は遺伝性疾患の20%を占め、RPにおいても重要な病因となっている。現在までに80を超える多くの遺伝子がRPの原因遺伝子となることが知られており、それらすべての遺伝子に対する治療をそれぞれに開発することは現実的でない。本研究では汎用性の高いRP治療開発に貢献するため、原因遺伝子に関係なくPTCナンセンス変異を治療ターゲットとする薬物治療の可能性を探求し、リードスルー治療候補薬を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We have identified 26 compounds which had luciferase activity higher than 1.8-fold compared with the negative control. Twelve of them induced significantly higher luciferase activity than PTC124. Furthermore, Western blotting confirmed that full-length PR2 protein was translated from RP2 R120X in RP cell models. The expression level of the protein with those compounds was higher than that with PTC124.

In conclusion, the readthrough compounds identified in this study have stronger readthrough effect than PTC124. Further study will help develop readthrough-based therapeutics for nonsense mutation-derived RP.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素変性 iPS細胞 薬物治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜疾患である網膜色素変性(RP)は現在のところ治療法のない難病で治療開発が急務である。タンパク質のできないナンセンス変異(premature termination codon; PTC)は遺伝性疾患の20%を占め、RPにおいても重要な病因となっている。現在までに80を超える多くの遺伝子がRPの原因遺伝子となることが知られており、それらすべての遺伝子に対する治療をそれぞれに開発することは現実的でない。タンパク質合成を中断するPTC変異を読み飛ばしタンパク質合成を再開させる治療候補薬(リードスルー薬)が知られており、筋ジストロフィーなど他疾患領域において既存のリードスルー薬(PTC124/Ataluren)を用いた臨床試験が行われているが、PTC124のリードスルー効果は弱く、十分な治療効果は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では汎用性の高いRP治療開発に貢献するため、原因遺伝子に関係なくPTCナンセンス変異を治療ターゲットとする薬物治療の可能性を探求することを目的とした。

- (1) 既存薬の中からRP病因であるタンパク質合成を中断するPTC変異を読み飛ばしタンパク質合成を再開させる治療候補薬(リードスルー薬)を化合物ハイスルーブットスクリーニング法を用いて同定するドラッグリパーパッシングを行うこと。
- (2) iPS細胞由来ヒト疾患モデルを用いることにより、同定された候補薬の前臨床試験を施行すること。

3. 研究の方法

リードスルー効果が強く副作用の少ない新規候補薬の同定には既存薬ライブラリー(2320種類)を用いた化合物ハイスルーブットスクリーニングを行った。特定の疾患に有効で安全性の確立されている治療薬から、別の疾患に有効な新たな薬効をみつけだすことはドラッグリパーパッシングやドラッグリポジショニングと呼ばれていて、有効薬をいち早く治療に用いることが可能なことから、創薬研究において最も有用なアプローチのひとつになっている。

さらに治療効果と毒性試験にはこれまでは技術的に困難であったRP患者iPS細胞由来網膜細胞をヒト疾患モデルとして用いた。iPS細胞や立体網膜の作製法は近年確立された技術であり、研究分担者の所属する理化学研究所を含めた限られた研究室でのみ施行可能である。

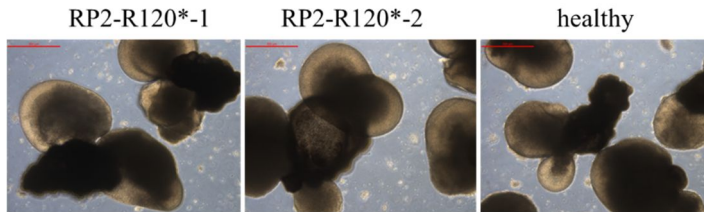
4. 研究成果

ハイスルーブットスクリーニング

- (1) ハイスルーブットスクリーニングのためのレポーターアッセイシステムを構築した。このシステムを用いて既存薬ライブラリー(2320種類)を用いた化合物ハイスルーブットスクリーニングを行い、リードスルー効果のある26化合物を同定した。
- (2) リードスルー効果の高かった5化合物のリードスルー効果をタンパク質発現の回復をウェスタンブロットにて確認した。
- (3) これら化合物のリードスルー効果の容量依存性を確認した。

iPS細胞を用いたモデル作製

- (1) 患者由来iPS細胞(RP2変異をもつRP患者より)を用いて立体網膜と網膜色素上皮細胞の分化誘導を行った。
- (2) 予想に反し、患者細胞から得た立体網膜と網膜色素上皮細胞は網膜症のないヒトから作製したiPS細胞を用いた立体網膜や網膜色素上皮細胞と違いがみられなかった。

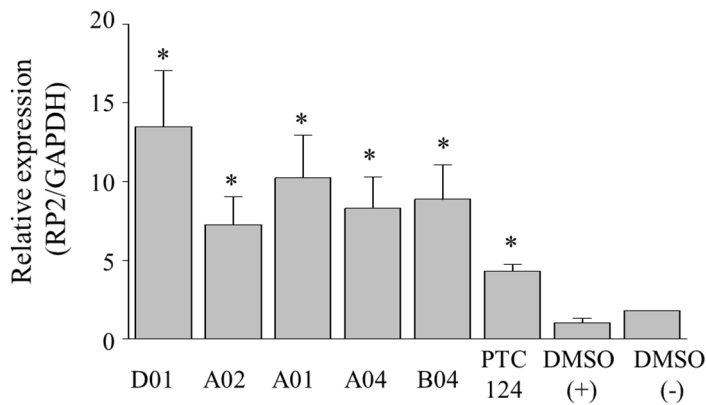


マウスモデル作製

(1) 患者由来 iPS 細胞 (RP2 変異をもつ RP 患者より) と同じ変異を持つトランスジェニックマウスを作製した。

(2) 6 か月齢以降においても網膜変性は確認されなかった。

(3) トランスジェニックマウス網膜を用いて、本研究で同定されたリードスルー候補薬存在下で培養したところ培養 24 時間で、RP2 タンパク質の発現回復がウェスタンプロットにて確認できた。



以上の結果から、目的とする網膜変性における遺伝子変異に対するリードスルー候補薬を同定することができた。トランスジェニックマウス網膜を用いた検討から、おそらく生体内でもタンパク質発現を回復させることが推測できるものの、網膜変性を表現型にもつモデル作製には至らなかったことから、前臨床試験を施行することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田亜希子
2. 発表標題 High throughput screening found new readthrough compounds for RP
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田亜希子
2. 発表標題 High throughput drug screening found novel readthrough compounds for RP
3. 学会等名 Retina workshop (国際学会)
4. 発表年 2019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	大西 暁士 (Onishi Akishi) (70569102)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員 (82401)	
研究分担者	万代 道子 (Mandai Michiko) (80263086)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・副プロジェクトリーダー (82401)	

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