

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15271

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎を標的とする環状RNA医薬の基盤構築と最適化

研究課題名（英文）Circular RNA therapeutics targeting atopic dermatitis

研究代表者

信田 理沙（Nobuta, Risa）

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30930292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではアトピー性皮膚炎の原因として報告されているFLG遺伝子のナンセンス変異症例において不足したフィラグリンタンパク質を環状RNAによって補う手法を探索した。環状化を効率よく行うため特殊な配列によるRNAの環状化を行い、IRES配列挿入によって環状化RNAからのタンパク質合成を確認した。これら環状RNAをコントロールとして細胞内で翻訳されるRNAの濃縮方法を検討し、精製方法を確立した。その後、表皮細胞からのRNA抽出、そして環状RNAだけを濃縮する酵素処理を行った上で、RNA-seqによる解析を行い、効率的な環状化配列、翻訳開始配列の候補として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎は疾病負荷が大きく、皮膚疾患の中でも最も生活の質を損なう疾患のひとつである。原因となるFLG遺伝子の機能喪失変異（多くはナンセンス変異）は人口の約1割が保有していることから、その治療薬による疾病負荷の軽減は重要な課題の一つである。アトピー性皮膚炎の治療法は対症療法がメインであり、遺伝的な要因に目を向けた根本的な治療法はこれまで確立されていない。本研究によって遺伝子変異の結果不足したフィラグリンを補填することが可能となればアトピー性皮膚炎の新たな治療の選択肢となることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nonsense mutations in the FLG gene are well known to cause atopic dermatitis (AD). Previous studies have revealed that patients carrying FLG mutations have greatly decreased profilaggrin/filaggrin expression. This decreased filaggrin expression results in a disorder of the skin barrier function. Therefore, we considered using circular RNA to supplement filaggrin and examined sequences that are efficiently circularized and efficiently translated. As a result, we have established a method for the enrichment of RNA that is circularized and translated in the cell.

研究分野：分子生物学

キーワード：環状RNA 翻訳 IRES

1. 研究開始当初の背景

人体を覆う皮膚は層状の構造で構成されており、大きく分けて表皮・真皮・皮下組織から成り立っている。このうち外界と接する表皮の最表層において機能しているのが角層であり、皮膚のバリア機能を担う。この角層形成に異常をきたすアトピー性皮膚炎は疾病負荷が大きく、皮膚疾患の中でも最も生活の質を損なう疾患の一つである。アトピー性皮膚炎の遺伝的要因として角層形成に重要な役割を果たすフィラグリンの発現低下が報告されており、これは *FLG* 遺伝子の機能欠失変異(多くはナンセンス変異)に起因することが知られている。ナンセンス変異を持つ mRNA は Nonsense mediated mRNA Decay (NMD) により分解されることが知られている。遺伝性疾患に対する治療法として、その原因が機能性タンパク質の発現量減少や、ミスセンス変異、フレームシフト変異による機能欠失の場合、不足している機能性タンパク質の補填が治療に有効となる。しかしながら、タンパク質そのものを補填する方法は、細胞への導入やデリバリーの観点からも困難であることから、mRNA 医薬による細胞内での目的タンパク質の発現は実用的かつ理想的な治療法と考えられる。

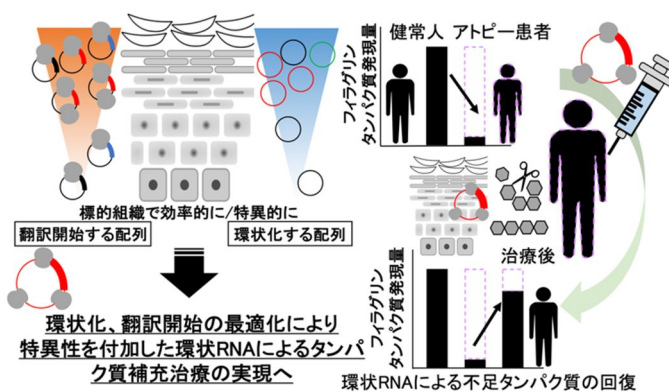


図 1. 本研究の目的

内在性環状 RNA の配列を用いたフィラグリンタンパク質の補填

2. 研究の目的

本研究では標的組織で効率的な環状化、そして翻訳を行うことが可能な配列を同定する。そのため、環状 RNA の濃縮と合わせて高効率で翻訳される RNA サンプルの精製法の確立をまず行う。確立した手法を用いて RNA-seq を行うことで目的配列を同定し、その後分子生物学的な解析によって最適化を図る(図 1)。

3. 研究の方法

本研究では内在性の環状化効率、翻訳効率の高い RNA を精製するための条件検討を行った。既知の環状化配列と翻訳開始に必要な Internal ribosome entry site (IRES) を組み合わせたポジティブコントロールを用いることで精製条件を細かく検討した。細胞内に存在する環状 RNA の同定手法として RNase R を用いた手法が知られている。RNase R は RNA を末端から分解するエキソヌクレアーゼであり、末端を持たない環状 RNA は理論的に RNase R に耐性である。そのため、抽出した RNA を RNase R で処理することで環状 RNA を濃縮する。また、翻訳されている RNA の濃縮は Sucrose cushion 法またはリボソーム抗体を用いた免疫沈降法で行い、RNase R の処理と合わせて目的の RNA を精製する。これをヒト表皮角化細胞でカルシウム添加により角化を模倣したサンプルで行うことで分化に応じた環状 RNA の挙動を明らかにする。

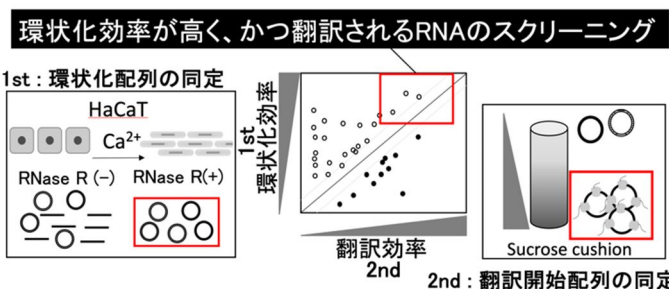


図 2. 研究の方法

標的組織で効率よく環状化、翻訳が行われる RNA 配列を明らかにする

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

環状化 RNA の濃縮方法の確立

1) 環状化 RNA の作成

人体を覆う皮膚は層状の構造で構成されており、大きく分けて表皮・真皮・皮下組織から成り立っている。表皮はさらに細かく下から順に基底層、有棘層、顆粒層、角層から構成されており、基底層から分化した細胞が成熟に伴い上層へ移行していく。この分化段階でカルシウムなどの

濃度勾配に伴い、ダイナミックなタンパク質の発現変動が生じる。RNA の発現変動に伴い環状 RNA の挙動も変化することが想定されるが、これまで解析はされてこなかった。本研究は内在性環状 RNA の発現変動を知ること目的の一つであり、精製条件検討のため、ポジティブコントロールとして既存のスプライシングに依存した手法で環状 RNA を作成した。環状化した RNA は Linear の RNA よりも泳動が早くなるため、Northern blotting により、環状化した RNA を判別した(図 3)。さらに RNA が環状化した時のみタンパク質が産生されるため、Western blotting を行ったところ、タンパク質発現が確認され、このバンドはスプライスサイトの変異体で消失したことから、スプライシングによって環状化した RNA からのタンパク質産生が確認された(図 3)。

2) 翻訳される環状化 RNA の濃縮

細胞内で環状化され、かつ翻訳される RNA を同定するため、サンプルの濃縮方法の検討を行った。mRNA の翻訳効率は各 mRNA 上に存在するリボソーム量と相関する。つまり活発に翻訳される mRNA 上には複数のリボソームが存在する。この特性を利用し、翻訳伸長阻害剤であるサイクロヘキシミド処理によってリボソームを mRNA 上に固定し、ショ糖溶液中で超遠心を行うことで、リボソームと結合した mRNA を精製した。さらに精製した RNA を RNase R で処理することで環状 RNA の濃縮を行い、Northern blotting で確認した(図 4)。

(2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまで遺伝病の治療は倫理的な問題から遺伝子自体の改変ではなく、対症療法に限定されてきた。ウイルスベクターなどによる DNA 治療はゲノム中への組み込みなどの問題もあり、使用は限定的である。そこで、ゲノムへの組み込みの心配がなく、不足タンパク質の補填に RNA が注目されるようになった。これまで人工的な配列を用いた環状 RNA は存在したが、組織特異性を持たせるような内在性の配列を改良したような例は知られていない。本研究によって明らかになった配列を応用することで今後の遺伝子治療の発展にもつながることが想定される。

(3) 今後の展望

今後は表皮の分化状態を再現したカルシウム分化誘導条件で環状 RNA の濃縮方法を用いて解析を行なっていく。環状化だけではなく、翻訳開始効率の高い IRES 配列の同定も目指しており、本解析から得られた条件と合わせて使用する薬剤を変えることで検証が可能と考えられる。また、効率的な環状化配列と組み合わせる形で様々な IRES 配列を用いることで、タンパク質産生の最適化を図っていく予定である。最終的に *FLG* 遺伝子にナンセンス変異をホモ接合性に有するアトピー性皮膚炎患者から樹立した不死化細胞を用いて環状 RNA によるフィラグリンの発現を誘導し、皮膚症状の改善を評価する。

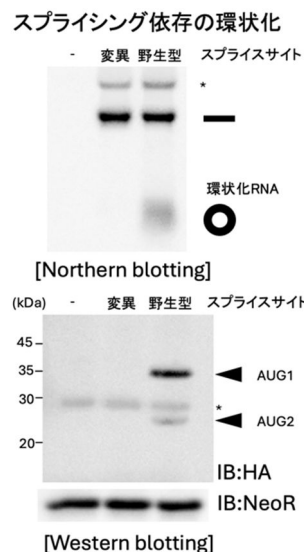


図 3. スプライシング依存の環状化と環状化 RNA からの翻訳産物

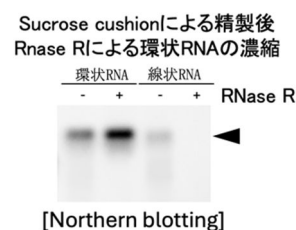


図 4. RNase R によるサンプルの濃縮

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 信田理沙
2. 発表標題 Mutant mRNAs resulting from loss-of-function mutations in the gene encoding profilaggrin/filaggrin is degraded by nonsense-mediated mRNA decay
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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