

196. マクロライドを用いた遺伝性疾患の新規治療法の開発

乃村 俊史

Key words : 遺伝性疾患, マクロライド, リードスルー

北海道大学病院 皮膚科学分野

緒 言

遺伝性疾患はナンセンス変異, フレームシフト変異, ミスセンス変異, スプライス変異などといった遺伝子変異により発症する. 遺伝性疾患に対する治療として, 遺伝子治療, 細胞療法 (iPS を含む), タンパク質補充療法などの開発が行われているが, 一部の酵素欠損症に対するタンパク質補充療法などの例外を除けば, 現時点では, 遺伝性疾患に対し広く臨床で使用できる根治的な治療法は開発されておらず, ほとんどの場合, 生涯にわたり難治性で対症療法に終始せざるを得ない. 本研究は, 遺伝性疾患の約 5-70% の患者¹⁾が病因として保有するナンセンス変異をターゲットにした新規治療法の開発を目指すものである.

ナンセンス変異は, 塩基置換により本来の終止コドンよりも上流に TGA, TAG, TAA といった終止コドンを生じる変異である. 通常, ナンセンス変異により早期終止コドンができるとリボソームはそこで mRNA からタンパク質への翻訳を中止するため, 機能性タンパク質が産生されず, 疾患を発症する. 本研究では, リボソームによる mRNA 翻訳時にナンセンス変異を読み飛ばしタンパク質合成を続ける「リードスルー」という現象を使い, 遺伝子に生じたナンセンス変異を読み飛ばすことを目指す. 興味深いことに, アミノグリコシド系抗生剤である G418 やゲンタマイシンがリードスルー活性を持つことがすでに証明されている²⁾. しかし, アミノグリコシドは長期使用により腎障害や内耳障害が必発であるため, 遺伝性疾患の患者に対し極めて短期間しか使用することができない. 本研究では, アミノグリコシドと同様にリボソームに作用し, mRNA からタンパク質への翻訳に影響を与えるマクロライド系抗生剤に着目した. マクロライドは, 例えば, 重症の尋常性ざ瘡の患者では数年間継続的に内服することがあり, 臨床的に長期間安全に使用することが可能である. これまでマクロライドのリードスルー活性を詳細に検討した報告はほとんどないが³⁾, 本研究でマクロライドによるリードスルー治療の有効性を証明できれば, 遺伝性疾患に対する新たな治療戦略の確立が期待できる. 本研究では, *in vitro*でのレポーター遺伝子アッセイを用いたリードスルー活性の定量系を確立し, マクロライドのリードスルー活性を検討した.

方 法

pGL4.20 ベクターのルシフェラーゼ遺伝子 (luc2) 内に, site directed mutagenesis により, 人工的に早期終止コドン (TAA) を作製した (Y179X). 制限酵素を用い, 同変異を有する luc2 遺伝子を pcDNA5/FRT ベクター内の CMV プロモーターの下流にクローニングした. 変異 luc2 遺伝子を挿入した同ベクターと pOG44 を 293FlpIn 細胞に co-transfection し, ハイグロマイシンで選択後に得られたコロニーから, stable cell line を作製した.

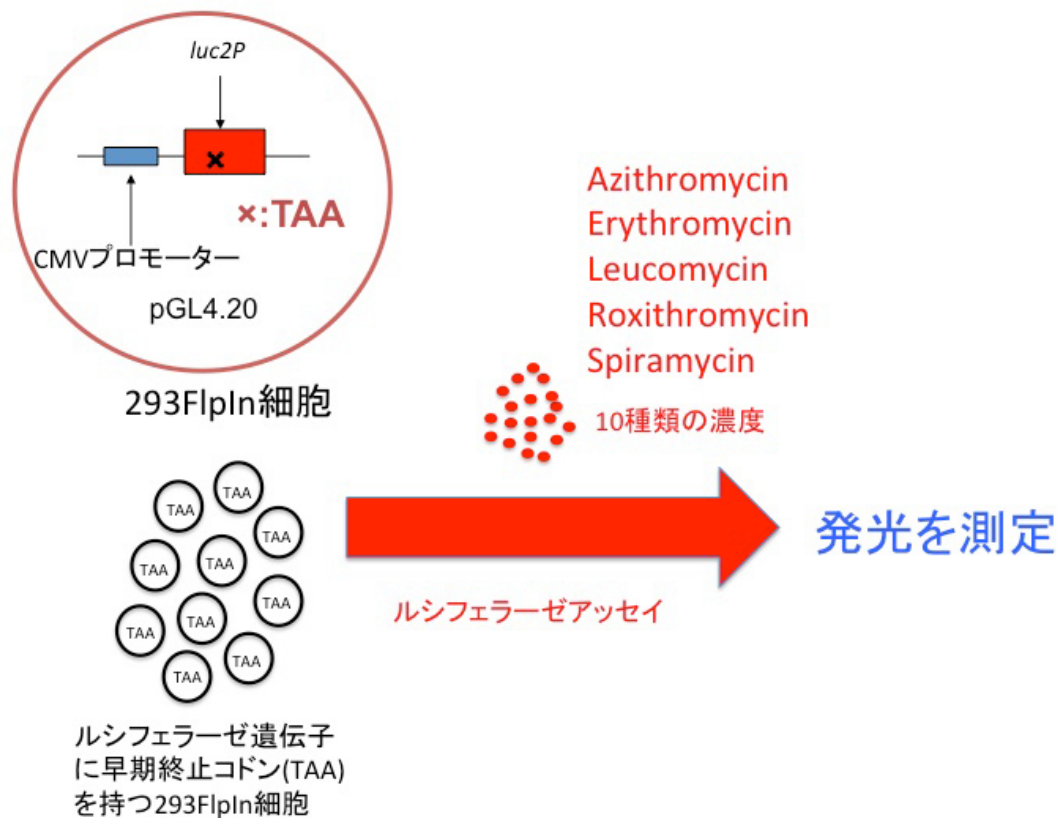


図1. 使用したコンストラクトと本研究の概略.

ルシフェラーゼ遺伝子に TAA 終止コドン的人工的に作製し, stable cell line を作製ののち, 種々のマクロライド系抗生剤で治療した.

それぞれのコロニーから得られたクローンについて, ルシフェラーゼアッセイによる characterization を行った. 次に, 変異 luc2 遺伝子を持つ stable cell line を, 種々のマクロライド系抗生剤 (アジスロマイシン, ロキシスロマイシン, エリスロマイシン, ロイコマイシン, スピラマイシン) で 24 時間治療し (治療には 11 種類の濃度を用い, 3 mg/ml から 1/2 ずつ sequential dilution を行った), 発光量を計測した.

ルシフェラーゼアッセイ

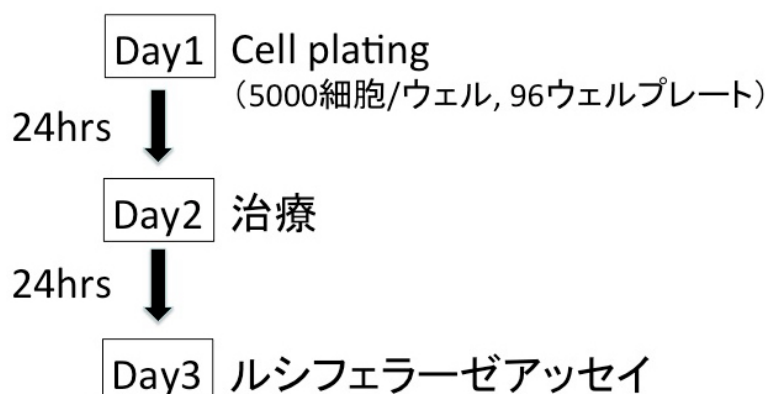


図 2. 治療実験の流れ.

1 日目に細胞を plating し, 2 日目に細胞の治療を行い, 3 日目にルシフェラーゼアッセイを行った.

なお, アミノグリコシド系抗生物質の一つである G418 (注: 重大な副作用を持ち, 人体には投与不可能) を用いた治療によりこの細胞株は強い発光を示したため, G418 を陽性コントロールとして用い, 陰性コントロールには, DMSO (1%) を用いた. また, すべての実験で細胞数自動カウント装置や分注機を用いることなるべくマニュアルでの作業を減らし, 再現性の高い実験になるよう工夫を凝らした.

結 果

ダイレクトシーケンスにより, luc2 遺伝子内に Y179X が作製されていることを確認した. 変異 luc2 遺伝子を持つ stable cell line は, 無治療ではルシフェラーゼアッセイにおいて極めて低い発光しか示さないのに対し, 強力なリードスルー薬である G418 (ヒトには使用不可能なアミノグリコシド系抗生剤) で 24 時間治療後には強い発光を示した. その後, 変異 luc2 遺伝子を持つ stable cell line を用いて, 細胞数など種々の条件を変えてルシフェラーゼアッセイを行い, 96 ウェルプレートに 5,000 個の細胞を播き, 500 μ g/ml の G418 で 24 時間治療した場合に, 最も精度の高いデータ (%CV, Z' factor) が得られることを確認した.

	1%DMSO						G418 500μg/ml					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	39	65	74	61	56	46	5354	6477	5926	4803	5396	4185
B	51	55	63	44	54	63	5616	6284	5177	4743	4617	4252
C	57	59	68	51	40	61	6365	6353	6283	5066	4908	3973
D	20	42	57	37	57	68	4912	5737	5882	5529	4604	4453
E	25	42	59	60	44	61	5808	6379	5570	4319	4630	4372
F	38	43	59	34	45	73	5796	5881	4764	4748	4437	4416
G	32	34	66	40	33	47	5585	5090	4984	3669	4577	3926
H	28	32	48	34	46	43	5313	5206	4663	4698	4276	4185



1%DMSOで治療した群と比べ、G418で治療した群では、強い発光を認めており、我々の作製したルシフェラーゼアッセイで薬剤のリードスルー活性を評価することが可能である

図3. リードスルーアッセイ系の確立：G418は強力なリードスルー作用を呈する。
G418で治療すると強い発光を示した。

変異 luc2 を持つ stable cell line を用いて、種々のマクロライド系抗生剤で治療したところ、アジスロマイシンで治療した場合に陰性コントロールと比べ約8倍弱の発光を示した。その他、エリスロマイシンとロキシスロマイシンで陰性コントロールと比べ約4倍以上の発光が認められた。

リードスルー効果の最大値(5種類のマクロライド)

Fold increase: DMSOとの比較

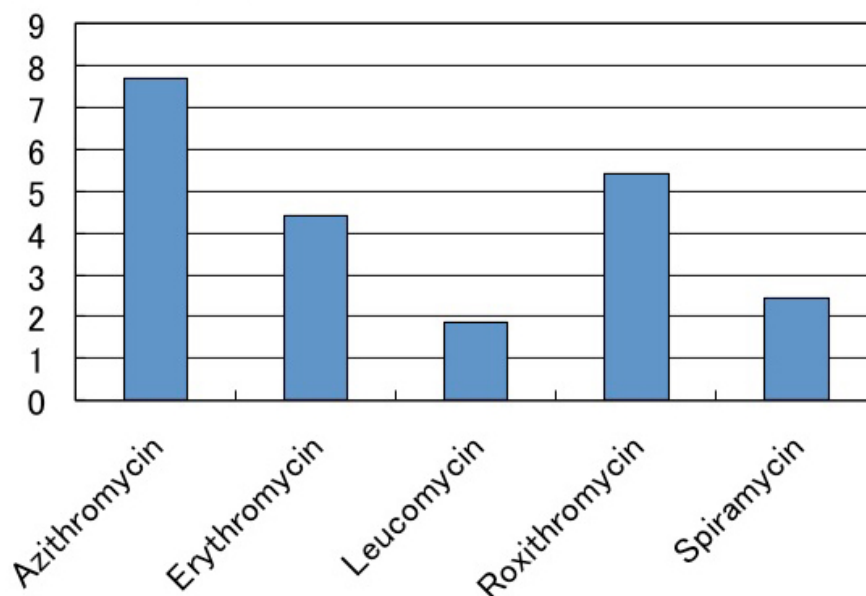


図4. マクロライド系抗生剤のリードスルー活性.

アジスロマイシンが最も高いリードスルー活性を示し、ロキシスロマイシンやエリスロマイシンも陰性コントロールと比べて約4倍以上のリードスルー活性を示した。

考 察

我々はリードスルー治療の開発を目指し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポーター遺伝子アッセイシステムを構築した。今回のスクリーニングで、%CV, Z' factor とともに良好な値を示し、今回我々が確立したアッセイがリードスルー活性測定において精度と質の高いものであることを確認した。この良質なアッセイシステムを用い、マクロライド系抗生剤で治療したところ、アジスロマイシン、ロキシスロマイシン、エリスロマイシンでリードスルー作用を認めた。これらの薬剤は、リードスルー活性を持つため、種々の遺伝性疾患への臨床応用につながる事が期待される。また、今後、これらのヒット化合物について、GFP など他のレポーター遺伝子アッセイを用いた評価を進めるとともに、遺伝性疾患患者由来の培養細胞を治療し、タンパク質の発現量が回復するか検討を行う予定である。遺伝性疾患の中でも、特に TGA 終止コドンを持つ常染色体劣性遺伝性疾患がリードスルー治療の良いターゲットと考えられるため、現在掌蹠角化症の一型である長島型掌蹠角化症(常染色体劣性遺伝性疾患であり、かつ患者の 90%以上が TGA 終止コドンを持つ⁴⁾ 患者の表皮角化細胞を不死化し、現在、治療実験を行っている。

文 献

- 1) Mendell, J. T. & Dietz, H. C. : When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell*, **107** : 411-414, 2001.
- 2) Manuvakhova, M., Keeling, K. & Bedwell, D. M. : Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*, **6** : 1044-1055, 2000.
- 3) Zilberberg, A., Lahav, L. & Rosin-Arbesfeld, R. : Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut*, **59** : 496-507, 2010.

- 4) Mizuno, O., Nomura, T., Suzuki, S., Takeda, M., Ohguchi, Y., Fujita, Y., Nishie, W., Sugiura, K., Akiyama, M. & Shimizu, H. : Highly prevalent SERPINB7 founder mutation causes pseudodominant inheritance pattern in Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Br. J. Dermatol.*, **171** : 847-853, 2014.