

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年 3月 20日現在

CRISPRによるRNA病モデル：iPS細胞・動物の構築と病態解明・治療薬創製
Therapeutic Drug Discovery and Elucidation of RNA Disease Pathogenesis
by
Use of CRISPR-Based Disease iPS Cells and Animal Models

課題番号：15H05721

萩原 正敏 (Hagiwara Masatoshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

遺伝性疾患と関連する変異の約3割は、RNA スプライシング制御異常との関連が指摘されている。本研究ではスプライシング異常に起因する「RNA病」に対して、低分子化合物によるRNA スプライシング制御への介入から治療薬の創製を目指す。さらに、CRISPR/Cas9 技術等で作製したモデル iPS 細胞・モデル動物を使い、その介入様式の解明や有効性の実証を行い、ポストゲノム治療薬を創製する新しいケミカルバイオロジー研究を推進する。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：遺伝性疾患、スプライシング制御、ポストゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

萩原研究室ではジストロフィノパチーの原因となる遺伝子変異を含むエクソンに対してスキップを促進させる（成熟 mRNA への異常なエクソン含有を抑制する）ことで治療効果が期待できる低分子化合物 TG003 を開発しこれを報告していた (Nishida *et al.* 2011. *Nature Com.*)。一方で TG003 の作用機序の解明や、モデル動物でのスプライシング操作の実証、適用可能疾患の拡大などの問題が未解決であった。

2. 研究の目的

本研究では以下の3点を目標とする。①スプライシング操作化合物 TG003、および新たに見いだした RECTAS(発表論文 4)についてスプライシング変動を受けるエクソンの特徴の解明(スプライシング操作化合物介入ルールの解明)、②疾患に対して適切な化合物の予測と合成展開、③ CRISPR/Cas9 法等で作製した疾患モデル iPS 細胞やモデル動物を用いた化合物の作用様式の解明や有用性の実証、の3点である。これらの取り組みを通じて、ポストゲノム治療薬を創製する新しいケミカルバイオロジー分野の創出を目指す。

3. 研究の方法

【スプライシング操作化合物介入ルールの解明】

高速シーケンサーを用いてディープに mRNA-seq データを取得し（～億リード/サンプル）、エクソン-エクソンジャンクショ

ンに対応する mRNA-seq reads を解析することでスプライシングの状況を明らかにできる。スプライシング操作化合物の処理前後の培養細胞を対象にこの解析を行い、化合物に反応してスプライシングが変動するエクソン群を同定した。これらのエクソン群と化合物に反応を示さないエクソン群に対して、エクソン周辺の塩基配列の特徴(GC 含量やスプライシング制御配列の強さ、スプライシング制御タンパク質の配列の有無など)を定量化、比較することで、化合物が作用するエクソンの塩基配列特徴を記述した。

【疾患に対して適切な化合物の予測と合成展開】

スプライシング操作化合物の介入ルールを遺伝性疾患データベースである ClinVar および Human Genome Mutation Database(HGMD)に適用することで、特定の遺伝子変異に対して TG003 等が治療効果を有するかどうかの予測を行った。また介入ルールにおける知見を手掛かりに文献からの探索も実施した。化合物の合成展開は主に2つの観点から実施した。1つは新たに見出された治療対象候補である嚢胞性線維症の原因となる変異に対してリード化合物 TG003 からの合成展開、もう1つは TG003 の生体内での動態の安定向上を目指した合成展開を行った。

【疾患関連変異を有するモデル細胞の樹立】

スプライシング操作化合物が作用し得る塩基変異を持った細胞を構築するため、HEK293細胞、MyoD-hiPS細胞を対象にCRISPR/Cas9による遺伝子編集を行った。変異導入には変異配列とゲノム相同領域を含む single strand DNA (ssDNA)を鋳型として用いた。

4. これまでの成果

1) mRNA-seq データ解析の結果、TG003 処理によりヒト骨格筋細胞で 253 個、マウス C2C12 細胞で 166 個のエキソンにおいてスキップ誘導が生じていることがわかった。これはヒトやマウスゲノムが持つ約 20 万個のエキシンのうち 0.1%程度であり、低分子化合物で特定のエキシンのスプライシング制御に介入するという本研究課題のコンセプトの正しさを確認することができた。TG003 に応答してスプライシングが変動するエクソンの特徴を解析した結果、エクソン長が短い、上流のポリピリミジントラクトが弱い、少数のスプライシング因子結合配列を持つ、などの特徴を見出すことができた (発表論文 3)。これらの結果に基づき、変異型の遺伝子塩基配列を入力情報として、TG003 への応答の有無を予測するコンピュータープログラムの構築を行い、新たに 119 個の遺伝性疾患が TG003 を用いた治療の対象になりうることを見出した。これらの疾患関連変異に対して、遺伝子変異ベクターを導入した HeLa 細胞を用いて検証実験を行った結果、実験を行った 7 例中、4 例において変異型エクソンのスキップ促進が確認された (論文準備中)。

また本研究期間中に、家族性自律性神経失調症の原因となる *IKBKAP* 遺伝子の遺伝子変異によるエクソン 20 の認識不全を是正できる低分子化合物として RECTAS を見出した (発表論文 4, 1)。RECTAS についても mRNA-seq データを取得し、介入ルールの解明・対象疾患の拡大を進めている。

2) TG003 が特定の条件を持ったエクソンのスキップを促進するという解析結果から、当化合物は遺伝子変異によりイントロン配列中に本来はなかったエクソン (偽エクソン) が生じこれが疾患の原因となるケースに対して特に有効な治療手段になることが推測された。本知見から対象疾患を探索した結果、嚢胞性線維症の一群がこれに該当することがわかった。遺伝子変異ベクター・スプライシングレポーターを用いた実験で TG003 が偽エクソンのスキップに効果を持つことを明らかにした。スプライシング変動により GFP/RFP の発現が切り替わる dual reporter システム (SPREADD, 発表論文 4, [Takeuchi A. et al. 2010](#)) を利用し、構造展開した化合物の評価を行い、嚢胞性線維症の偽エクソン抑制に対して TG003 と同等もしくはそれ以上の活性を持つ化合物の取得に成功した。また、嚢胞性線維症患者 B 細胞から iPS 細胞の樹立に成

功し、偽エクソン病態モデルとしての解析を進めている。

3) ジストロフィノパチーを引き起こす遺伝子変異である [DMD_c.4303G>T] を対象として、CRISPR/Cas9 法による遺伝子の導入に取り組んだ。本変異は TG003 により変異含有エクソンのスキップ誘導が確認された系であるため、手法構築の対象として選別した。CRISPR/Cas9 法による 1 塩基変異の導入は難易度が高く、現在は条件検討に取り組んでいる。TG003 の標的疾患候補として新たに見つかった嚢胞性線維症の一群については患者由来の細胞から樹立した iPS 細胞を研究に用いる準備を進めている。また、生体内での動態の良い化合物を得る目的でも構造展開を行い、マウスに対して経口投与で TG003 と同様のスプライシング変動を引き起こす化合物である TG693 を取得した (発表論文 2)。

5. 今後の計画

TG003 の介入ルールについて研究を進め、特に嚢胞性線維症の例でみられたような偽エクソンのスキップ誘導が治療効果を有する疾患の探索、および化合物の効果の確認を進めていく。また RECTAS において介入ルールの解明をさらに進め、TG003 との効果の相違点を見出し、対象疾患の拡大につなげていく。また、iPS 細胞やモデルマウスを用いた解析を進め、ヒト個体においてスプライシング介入によるポストゲノム創薬が成立することの実証を進める計画である。

6. これまでの発表論文、受賞等

- (1) [Ohe K](#), [Yoshida M](#), [Nakano-Kobayashi A](#), [Hosokawa M](#), [Sako Y](#), [Sakuma M](#), [Okuno Y](#), [Usui T](#), [Ninomiya K](#), [Nojima T](#), [Kataoka N](#), [Hagiwara M](#). *RNA*, **9**: 1393-1403, 2017
- (2) [Sako Y](#), [Ninomiya K](#), [Okuno Y](#), [Toyomoto M](#), [Nishida A](#), [Koike Y](#), [Ohe K](#), [Kii I](#), [Yoshida S](#), [Hashimoto N](#), [Hosoya T](#), [Matsuo M](#), [Hagiwara M](#). *Scientific Reports*, **7**: 46126, 2017
- (3) [Sakuma M](#), [Iida K](#), [Hagiwara M](#). *BMC Molecular Biology*, **16**: 16, 2015
- (4) 平成 29 年 江橋節郎賞 受賞
- (5) 平成 29 年 FAOBMB Entrepreneurship 賞 受賞
- (6) 平成 27 年 京都新聞大賞「文化学術賞」受賞

ホームページ

京都大学 萩原正敏研究室;

<http://www.anat1dadb.med.kyoto-u.ac.jp/>