

<研究課題> ウエルナー症候群の病態解明と治療法の開発

研究代表者 千葉大学大学院医学研究院 准教授 清水 孝彦
研究分担者 千葉大学大学院医学研究院 教授 横手幸太郎

【まとめ】

代表的な遺伝的早老症 Werner 症候群(以下、WS)は、思春期以降 全身性に老化徴候を示し、糖尿病や動脈硬化、がんを好発し、40 歳代で死亡する。WS には一部の患者にナンセンス変異が知られている。近年、読み飛ばし活性を持つリードスルー薬が開発され、遺伝子欠損の改善例が報告されている。ナンセンス変異を持つ WS 由来線維芽細胞に対し、リードスルー薬の保護効果を調べ、治療薬としての可能性を考察した。

1. 研究目的

1996 年に WS の原因遺伝子として DNA ヘリケース (WRN) が同定されたが、個体・細胞レベルで早老をきたすメカニズムの解明は国内外を通じて進んでいない。理由の一つとして、WRN 遺伝子のノックアウトマウス (KO) が早老の表現型を示さず、健常に生育するため、有用な動物モデルが無い点にある。また WS の皮膚由来線維芽細胞は、通常、数代の継代培養により老化関連 β ガラクトシダーゼ活性上昇などの細胞老化形質を示し、分裂を停止する。そのため、患者由来細胞を用いた発症メカニズムの解明も容易ではない。WS 患者の遺伝子変異の中に、ナンセンス変異が知られている。ナンセンス変異を有する異常 mRNA

は、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) と呼ばれる mRNA 分解機構により通常の mRNA 分解と異なる経路で即座に分解される。本研究は、異常な終止コドンを読み飛ばす (リードスルー) 薬を WS 患者細胞に投与し、機能的 WRN タンパク質の産生が認められ、細胞表現型が可逆的に改善するかどうか調べ、治療薬としての有効性を明らかにする。また *Wrn* 遺伝子欠損マウスと *Tert* 遺伝子欠損マウスを交配し、2 重欠損マウスを作成し、早老症の表現型を調べる。

2. 研究方法と経過

2-1. リードスルー薬の効果検証

ナンセンス変異を持つ WS 患者 (889 残基目の Arg 残基が TGA 終止コドンとなった変異 6 型のホモ接合体) 由来線維芽細胞 (WS130131) に対し、mRNA 上の異常な UGA 終止コドン読み飛ばし活性のあるリードスルー薬 (PTC124, Selleck 社) を添加して、ウエスタンブロット方で WRN タンパク質の検出を行った。PTC124 のリードスルー活性を評価する陽性対照として、pGL3 ベクター (Promega 社) の Luciferase 遺伝子の 190 番目の Thr 残基に TGA, TAA, または TAG の 3 種類の終止コドンを変異導入したベクターを別々に遺伝子導入した細胞抽出物の

Luciferase 活性を Luciferase Assay キットで (Promega 社) 測定することで評価した。

2-2. WSモデルマウスの作出

WS モデルマウスを作出するために、*Wrm*^{-/-}マウス (米国 MMRRRC より購入) と *Tert*^{-/-}マウス (理研 BRC より購入) を交配し、2重欠損マウスを作出した。4世代以上交配した場合のみ早老症候をきたすことが報告されているため、*Wrm*^{-/-}、*Tert*^{-/-}同士の交配を進め4世代以上の2重欠損マウスを作出する。

(倫理面への配慮)

WS 患者由来繊維芽細胞と iPS 細胞の樹立については ヒト幹細胞を用いる臨床研究と遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づいてこれを実施する。また WS モデルマウスの作出も千葉大学実験動物委員会、および組換えDNA 実験委員会で承認された実験計画で施行している。

3. 研究の成果

3-1. リードスルー薬の効果検証

ナンセンス変異を有するWS患者に対するリードスルー薬の治療応用を検討するために、TGAコドンを読み飛ばす活性を持つPTC124に着目し、*in vitro*の添加実験を行った (図1)。

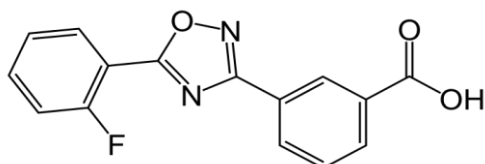


図1: PTC124の化学構造。

HEK293細胞に3種類の終止コドンを変異導入したLuciferase遺伝子を持つレポーターベクターpGL3を別々に遺伝子導入し、PTC124添加24時間後のLuciferase活性を測定した。その結果、TGA終止コドンを持つ遺伝子導入株のみ有意なLuciferase活性を示した。本薬剤のリードスルー活性を確認した (データは示さない)。さらに、TGA終止コドン変異を持つ変異6型のホモ接合体WS患者由来繊維芽細胞 (WS130131) に5 μM PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法で解析した。その結果、正常ヒト繊維芽細胞抽出物には、WRNタンパク質が検出されたが、WS細胞には認められなかった (図2)。

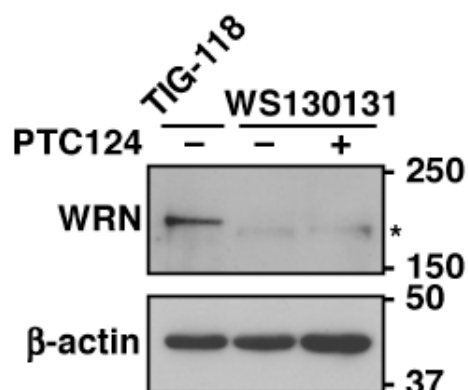


図2: 変異6型のホモ接合体WS患者由来繊維芽細胞 (WS130131) に5 μM PTC124を添加し、10日後のWB。WRNタンパク質は認められない。TIG-118はヒト正常皮膚繊維芽細胞、★印は非特異的バンド。

次に、ナンセンス変異はNMDを惹起し、WRN mRNAの顕著な低下をもたらすことが考えられた。変異4型と6型の複合ヘテロ接合体を持つWS由来繊維芽細胞 (WSCU01) のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、16%に減少していることが明らかとなった。一方、WS

iPS細胞は増殖能が回復し、細胞老化表現型が改善していることが明らかとなっている（データは示さない）。そこで、WS iPS細胞 (WSCU iPS02) のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、7.5倍増加していることが明らかとなった（図3）。

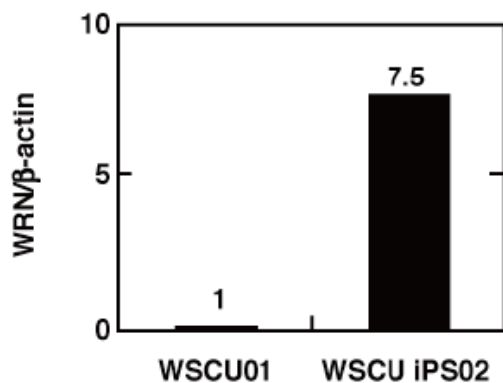


図3：WS iPS細胞（右：WSCU iPS02）はもとのWS由来線維芽細胞（左：WSCU01）に比較して、WRNの発現が7.5倍増加していた。

次に、本WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μM PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法でWRNタンパク質を検出した。その結果、正常ヒト線維芽細胞抽出物に認められるWRNタンパク質はWS iPS細胞 (WSCU iPS02) には認められなかった（図4）。

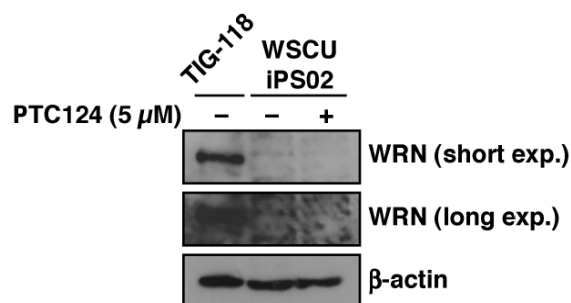


図4：変異4型/6型の複合ヘテロ接合体WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μM PTC124を添加し、10日後のWB。

TIG-118ヒト正常皮膚線維芽細胞 (TIG-118) で認められるWRNタンパク質がWS iPS細胞では認められない。

3-2. WSモデルマウスの作出

W^{rn}^{-/-}マウスと T^{ert}^{-/-}マウスを交配した。得られた産仔の Genotyping を行い、W^{rn}^{-/-}, T^{ert}^{-/-} 2重欠損マウスを選別した。一般にマウスはテロメア長がヒトより長いことが知られており、T^{ert} 遺伝子が欠損ホモ接合体であれば、テロメア伸長が起こらず、生殖細胞のテロメアが短縮する。世代を4世代以上経ることで、テロメア長がヒト並みに短縮し、W^{rn} 遺伝子欠損の表現型を呈すると予想される。本研究期間内での交配では、G3世代までの2重欠損マウスの作出に成功した。個体数が少ないが、外見上、形態学的な異常は認められていない。また妊孕性も認められることから、WSで認められる早老症の表現型は4世代以上の世代交配が必要と思われた。

4. 今後の課題

遺伝性疾患の中で、ナンセンス変異による遺伝子欠失 (タンパク質欠損) は、遺伝子治療による遺伝子補充や組換えタンパク質の補充による治療法の開発が進められている。しかし、個々の遺伝子やタンパク質の特性の問題、遺伝子導入の臨床的課題等が開発の障害となっている。一方で、ナンセンス変異をリードスルーする活性で、翻訳時に終止コドンを読み飛ばし、機能性タンパク質を回復させる薬剤は、有望な治療薬として期待される。PTC124 (Ataluren) は、TGA 終止コドン選択的リードスルー薬ではあるが、基礎研究レベ

ルで多くの改善例が報告され、臨床試験に供されている。本研究では、TGA 変異となる 6 型変異ホモ接合体 WS 患者線維芽細胞に対し、PTC124 添加試験を行ったが、タンパク質の検出には至らなかった (図 2)。WS 患者細胞では NMD 亢進による WRN mRNA の減少が想定され、実際に 16% まで減少している例を明らかにした。リードスルー薬は十分な mRNA が細胞内に存在しなければ、タンパク質として翻訳できないため、WRN mRNA 量が高めることが同時に必要かもしれない。そのため、WRN mRNA が有意に増加した WS iPS 細胞に対する添加実験を行ったが、WRN タンパク質は検出できなかった (図 4)。この結果は、WRN mRNA の 2 次構造や WRN 遺伝子特有な問題、本研究に用いた WS 患者細胞の特有な問題などが影響した可能性がある。今後、TGA ナンセンス変異を有する別の WS 患者細胞を複数系統調べることや、WRN 遺伝子の遺伝子発現を高める薬剤との併用などの検討が必要と考えられる。

遺伝性早老症患者由来細胞では、活性酸素産生の亢進が共通して認められることが知られている。実際、複数の WS 由来線維芽細胞で細胞内活性酸素の産生亢進を明らかにしている (データは示さない)。また、抗酸化剤による治療の可能性を検討するために、安全性の高い抗酸化剤の添加実験を行った。その結果、活性酸素産生の低下とともに、細胞老化マーカー SA- β -Gal 活性の顕著な低下が認められた (データは示さない)。別な抗酸化剤でも同様の結果を得たことから、WS 細胞で発生する活性酸素は細胞老化の一部の表現型の出

現に関わっており、抗酸化剤処理により、部分的な改善が期待出来るかもしれない。

Wrn^{-/-}マウスと *Tert*^{-/-}マウスを交配することで *Wrn*^{-/-}, *Tert*^{-/-}2 重欠損マウスの作出に成功した。外見上の形態学的な異常は認められず、また妊孕性が認められことから、WS で認められる早老症の表現型は未発症と考えられた。当初の計画通り、4 世代以上、特に 6 世代目の 2 重欠損マウスがテロメア長の短縮に伴う早老症表現型の発現が期待され、WS モデルマウスとしての確立が望まれる。WS モデルマウスが確立されれば、抗酸化剤などの薬剤を投与することで、早老症表現型に対する表現型改善を指標に、レスキュー効果を個体レベルで検証できると期待される。

5. 研究成果の公表方法

得られた研究成果は、学会発表や英文科学雑誌に掲載を目指し、広く研究成果を公表する。