総括研究報告書

１．研究開発課題名：遺伝性皮膚疾患における変異同定並びにナンセンス変異読み飛ばし試薬による治療法開発

２．研究開発代表者：　宇谷厚志（国立大学法人長崎大学）

３．研究開発の成果

遺伝性疾患は、診断は近年の DNA シーケンスの技術の進歩により診断を確定できるものが多くなっている。しかしその遺伝子変異情報をもとに治療に応用できているとは言いがたいのが現状である。変異による発現が消滅している分子の発現を回復させるリードスルー薬剤の開発に取り組み、根本的治療をめざす。

PXE 症例集積と *ABCC6* 遺伝子変異の同定は順調に進んでおり、PXE、表皮水疱症のナンセンス読み飛ばし試薬効果判定検出系の開発に関しては、以下の検出系を確立した。すなわち C 末端にタグをつけた皮膚遺伝性疾患の原因遺伝子（*ABCC6* 遺伝子、*COL7A1* 遺伝子など）に患者と同じ終止コドンを挿入し、それをリポトランスフェクション法にて HEK293T 細胞に導入する。読み飛ばし試薬を添加し、リードスルーが起こるとタグを検出でき、その強さにより試薬効果を判定する *in vitro* 効果判定系を作成した。*in vitro* の系で高いと判定した試薬に関して、*ex vivo/in vivo* での解析を行う準備段階に入っている。PXE に関しては複数変異に対して、下記の化合物を用いてリードスルー効果を判定した。表皮水疱症に関しては、現在 plasmid の作成中である。

読み飛ばし試薬（高リードスルー化合物）の合成を実施し、4 種類のネガマイシン誘導体を用いて PXE 当該タンパク質の発現が確認できた。中でもエステル型プロドラッグ TCP-182 が TGA 変異に対し、顕著な活性を示したため TCP-182 の大量化学合成を実施し約 60 mg を供給した。この量は、まず *ex vivo/in vivo* での解析系の検討をするには十分といえる。さらに新規誘導体の分子設計ならび合成経路の検討を行い、12 種類の誘導体の合成が完了しているため、次年度への準備は完了している。

XP/CS の遺伝子変異情報を用いた研究に関して、国内の色素性乾皮症（XP）やコケイン症候群（CS）あるいは、XP と CS を併発した症例を収集した。DNA 修復活性の測定、ウイルス相補性試験、ゲノム解析（次世代ゲノム解析）を行い、疾患責任遺伝子変異の同定に取り組んだ。XP/CS ナンセンス読み飛ばし試薬効果判定検出方法の開発として、DNA 修復活性測定法を応用するとともに、自動蛍光画像取得装置を活用することで、ナンセンス変異の読み飛ばし効果を検証する手法を構築/改良した。XP/CS ナンセンス読み飛ばし試薬効果判定では、既存の症例の中から、読み飛ばし試薬の効果が期待される症例を抽出し、より可能性の高い症例を中心に読み飛ばし効果の検証を実施した。本研究の最も重要な点でもあるが変異の異なる症例では、読み飛ばし効果に差が見られた。

個々症例の変異情報を元にリードスルー効果を検定する必要があると再認識したが、全体としてマイルストーンの達成は良好である。

４．　その他　　なし