

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬基盤推進研究事業  
(英語) Research on Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) tRNA 修飾異常に起因した2型糖尿病のコンパニオン診断薬  
開発を目指した臨床研究  
(英語) Clinical Study on Companion Diagnostics for Type 2  
Diabetes caused by Aberrant tRNA Modifications

研究開発担当者 (日本語) 熊本大学大学院生命科学研究部・教授・富澤 一仁  
所属 役職 氏名： (英語) Kazuhito Tomizawa, Professor, Faculty of Medical  
Sciences, Kumamoto University

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) エペリゾンの2型糖尿病治療薬としての有効性・安全性を検  
証する臨床試験

開発課題名： (英語) Clinical Study to Verify the Efficacy and Safety of  
Eperisone as a antidiabetic

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学大学院生命科学研究部・教授・荒木 栄一  
所属 役職 氏名： (英語) Eiichi Araki, Professor, Faculty of Medical Sciences,  
Kumamoto University

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学医学部附属病院・特任助教・瀬ノ口 隆文  
所属 役職 氏名： (英語) Takafumi Senokuchi, Assistant Professor, Kumamoto  
University Hospital

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学医学部附属病院・客員教授・角間 辰之  
所属 役職 氏名： (英語) Tatsuyuki Kakuma, Visiting Professor, Kumamoto  
University Hospital

分担研究 (日本語) tRNALys(UUU)チオメチル化修飾を診断するコンパニオン診断  
キットの開発

開発課題名: (英語) Development of Companion Diagnostics Kit to detect  
Methylthio Modification of tRNALys(UUU)

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学大学院生命科学研究部・准教授・魏 范研

所属 役職 氏名: (英語) Fan-Yan Wei, Associate Professor, Faculty of Medical  
Sciences, Kumamoto University

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学大学院医学教育部・非常勤講師・井上 謙吾

所属 役職 氏名: (英語) Kengo Inoue, Adjunct Professor, Graduate School of  
Medical Sciences, Kumamoto University

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・エペリゾンの2型糖尿病治療薬としての有効性・安全性を検証する臨床試験

荒木栄一教授、瀬ノ口隆文特任助教（熊本大学大学院代謝内科学分野）らの臨床グループおよび生物統計専門家である角間辰之教授（熊本大学医学部附属病院）とともに、エペリゾンの2型糖尿病治療薬としての有効性・安全性を検証する臨床試験を行った。PMDAとの薬事相談後、臨床試験プロトコルを作成し、学内臨床研究倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会ならびにCOI委員会に本臨床研究を申請し、承認を得た。熊本大学医学部附属病院に通院している2型糖尿病患者をCdkal1遺伝子に関してリスクアレル群とノンリスクアレル群に分け、エペリゾン50mgを1日3回毎食後12週間経口投与し、安全性および有効性について検討した。48名が本臨床試験にエントリーし、その内の46名に対して試験を完遂した。安全性に関しては、重篤な副作用を示す被験者はいなかった。HbA1cは、リスクアレル群とノンリスクアレル群のいずれの群においてもエペリゾン服用開始前と3か月間服用後で差は認められなかった。tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)のチオメチル化修飾率は、エペリゾンの服用により有意に上昇した。エペリゾン服用開始前の修飾率を低い群と高い群に区分し、修飾率変化を検討した結果、修飾率が低い群ではエペリゾンの服用により修飾率が上昇したが、高い群では差は認められなかった。また、エペリゾン服用によりCペプチド分泌（dCPR）が有意に上昇した。dCPRを修飾率が低い群と高い群で比較すると、修飾率が低い群でのみエペリゾンの服用によりdCPRが上昇した。

以上の結果より、エペリゾンはtRNAチオメチル化修飾を改善し、その結果プロインスリンが正しくプロセッシングされ、成熟インスリン分泌を促進する効果を有することが明らかになった。

### ・tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を診断するコンパニオン診断キットの開発

魏 范研准教授、井上謙吾非常勤講師（熊本大学）らの基礎開発研究グループとともに、末梢血からtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)のチオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を診断するコンパニオン診断キットの開発を行った。ヒト末梢血から分離した血球成分からトータルRNAを精製し、ヒトtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)を直接逆転写し、その逆転写産物を定量PCRすることによりtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、逆転写酵素の最適化、定量PCR機器の設定を行った。

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾定量解析キットを作成した。キットの内容は、特異プライマーとコントロールプライマー、逆転写酵素、PCR酵素、PCR溶液、dNTP混合液から構成されるものとした。RNA精製には、RBC leucolysisキット®およびTotal RNA isolationキット®を用いることとした。さらに、本キットのバリデーションを行った。バリデーションとして、Cdkal1の各アレル保有者の末梢血からtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を解析した。感度、精度、データの安定性、簡便性などについて評価した。とくに感度と精度については、質量分析法のデータと比較検討し、PCRの温度や時間のバリデーションを行い、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾定量解析キットを完成させた。さらに、ヒト末梢血を用いて開発したキットの性能評価を実施した。ボランティア健康人から静脈血を2ml採血し、トータルRNAを精製し、上記キットを用いて、チオメチル化修飾について定量解析を行った。ポジティブコントロールとして、同一トータルRNAからtRNA<sup>Lys</sup>(UUU)を精製後、質量分析法にてチオメチル化修飾を解析し、解析結果が一致するか検討したところ、99%以上の一致率であった。

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- Clinical Study to Verify the Efficacy and Safety of Eperisone as a antidiabetic

I performed a clinical study on companion diagnostics for type 2 diabetes caused by aberrant tRNA modifications with Drs. Eiichi Araki, Takafumi Senokuchi and Tatsuyuki Kakuma. After consultation with PMDA about the clinical study, we wrote a protocol for the clinical study. The protocol was approved with the ethics committees and COI committee in Kumamoto University. The patients with diabetes attending to Kumamoto University hospital were classified into a risk allele group and a non-risk group by the SNPs in *Cdkal1*, and were then applied eperisone (150 mg/day) for 12 weeks. We examined the efficacy and safety of eperisone. Forty-eight patients were registered the clinical study and the forty-six patients finished the study and two patients dropped out. We observed no serious side effects in all patients during the clinical study. HbA1c in patients carrying both the risk and non-risk alleles before the clinical study was same as that after the application of eperisone for 12 weeks. The thiomethyl modification in tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) was increased after the treatment with eperisone for 12 weeks. The effect of eperisone was seen in patients with the low modification in tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) but not in the high modification group. Moreover, dCRP, an index of Insulin secretion, was increased in the patients after the application of eperisone for 12 weeks. In the patients with the low modification in tRNA<sup>Lys</sup>(UUU), dCRP was significantly increased after the treatment with eperisone, but not changed in the patients with the high modification.

These results suggest that Eperisone improved the thiomethyl modification of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU), resulting in induction of insulin secretion in patients with type 2 diabetes.

- Development of Companion Diagnostics Kit to detect Thiomethyl Modification of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)

I normalized the technique to quantify the thiomethyl modifications of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) from peripheral blood and developed companion diagnostics kit to examine the modifications with Drs. Wei Fan-Yan and Kengo Inoue (Kumamoto University). Briefly, we normalized the technique to quantify the thiomethyl modifications of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) by which total RNAs were purified in blood cells, tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) was directly reverse-transcribed from the total RNAs and the reverse transcripts were used for qPCR. We made the standard operating procedures (SOPs) for the preservation method of peripheral bloods, the application of reverse transcriptase, and qPCR machine.

We made a kit to quantify the thiomethyl modifications of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU). The kit consists of the specific and control primers, a reverse transcriptase, a PCR enzyme, solutions for PCR and dNCP mixtures. We used a RBC leucolysis kit and a total RNA isolation kit (Qiagen) to purify total RNAs. We validated the kit. For the validation, we analyzed the thiomethyl modifications of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) using peripheral blood in human carrying the risk and non-risk alleles in *Cdkal1*. We evaluated the sensitivity, accuracy, stability and convenience of the kit. We validated the temperature and time of PCR conditions. To evaluate the sensitivity and accuracy of the kit, we compared the data with those of mass spectrometric analysis. The data quantified by the developing kit agreed with those of mass spectrometric analysis with the concordance rate of more than 99 %.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 4件)

1. Zhou, B, Wei, F.-Y., Kanai, N., Fujimura, A., Kaitsuka, T., and Tomizawa, K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. **Hum. Mol. Genet.** 23, 4639-4650, 2014.
2. Locke, J.M., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Weedon, M.N., and Harries, L.W. A cautionary tale: The non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1. **Diabetologia** 58, 745-748, 2015.
3. 富澤一仁. CDKAL1 のバリエーションフォームと 2 型糖尿病発症機序。内分泌・糖尿病・代謝内科 40: 275-280, 2015.
4. Wei, F.-Y., and Tomizawa, K. Measurement of 2-methylthio Modifications in Mitochondrial Transfer RNAs by Reverse-transcription Quantitative PCR. **Bio-protocol** 6(1), e1695, 2016.
5. 魏 范研、富澤一仁. tRNA のチオメチル化修飾による翻訳制御と代謝疾患。生化学 88: 328-334, 2016.
6. Takahashi, N., Wei, F.-Y., Watanabe, S., Hirayama, M., Ohuchi, Y., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Sawa, T., Nakayama, H., Akaike, T. and Tomizawa, K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion. **Nucl. Acid Res.** 45, 435-445, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト tRNA の修飾と糖尿病、シンポジウム講演、富澤一仁、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪国際会議場)、2014 年 5 月 23 日、国内。
2. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs controls precise mitochondrial protein translation and contributes to myopathy、シンポジウム講演、富澤一仁、第 25 回国際 tRNA カンファレンス (キリ、ギリシャ)、2014 年 9 月 22 日、国外。
3. tRNA 修飾異常と代謝疾患、シンポジウム講演、富澤一仁、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸ポートピアホテル)、2015 年 12 月 3 日、国内。
4. Cdkal1 欠損マウスにおける抗糖尿病治療薬効果の検討、ポスター発表、渡部佐耶加、魏 范研、貝塚 拓、富澤一仁、第 93 回日本生理学会大会 (札幌コンベンションセンター)、2016 年 3 月 24 日、国内。
5. tRNA 修飾異常: 疾患発症機構から創薬まで、特別講演、富澤一仁、第 3 回代謝さきがけ領域会議 (福岡ガーデンパレス)、2016 年 5 月 24 日、国内。
6. Aberrant tRNA modifications and disease development、シンポジウム講演、富澤一仁、第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)、2016 年 11 月 30 日、国内。
7. tRNA 修飾を標的とした検査診断法および創薬、招待講演、富澤一仁、第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会 (熊本)、2016 年 12 月 4 日、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アジア型2型糖尿病の分子機構と治療戦略、富澤一仁、第31回天草生活習慣病研究会（天草地域医療センター、天草市）、2014年4月18日、国内。
2. 生理学的見地による各糖尿病治療薬の作用機序とその副作用、富澤一仁、熊本市医師会・リフレッシュコース（日医生涯教育講座）（熊本市）、2015年5月28日、国内。
3. 糖尿病ってどんな病気？、富澤一仁、SSH体験学習講座（熊本市）、2015年12月5日、国内。
4. 日本人に多い糖尿病ってどんな病気？、富澤一仁、SSH体験学習講座（熊本市）、2016年12月10日、国内。

(4) 特許出願

特願 2016-084467 号