

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) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Mutation analysis and development of readthrough therapy for nonsense mutations in hereditary skin disorders
- 研究開発担当者 (日本語) 長崎大学 病院 皮膚科・アレルギー科 講師 原 肇秀  
所属 役職 氏名： (英語) Nagasaki University Hospital, Department of Dermatology and Allergology, Senior Assistant Professor, Toshihide Hara
- 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) 患者収集ならびに ABCC6 遺伝子変異解析、読み飛ばし試薬の効果判定  
開発課題名： (英語) The data collection, ABCC6 gene analysis, and evaluation of readthrough effects in PXE patients
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授 宇谷厚志  
長崎大学 病院 皮膚科・アレルギー科 講師 原 肇秀  
所属 役職 氏名： (英語) Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Professor, Atsushi Utani  
Nagasaki University Hospital, Department of Dermatology and Allergology, Senior Assistant Professor, Toshihide Hara
- 分担研究 (日本語) 遺伝性皮膚疾患の読み飛ばし試薬の合成  
開発課題名： (英語) The synthesis of readthrough compounds for hereditary skin disorder
- 研究開発分担者 (日本語) 東京薬科大学薬学部医療衛生薬学科 教授 林 良雄  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Medicinal Chemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Professor, Yoshio Hayashi

分担研究 (日本語) XP/CS 患者遺伝子変異への読み飛ばし試薬の効果判定  
開発課題名: (英語) Effect evaluation of stop codon read-through drugs for XP /CS patients  
研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学環境医学研究所 教授 荻 朋男  
所属 役職 氏名: (英語) Nagoya University Research Institute of Environmental Medicine,  
Professor, Tomoo Ogi

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

Pseudoxanthoma elasticum (PXE)は、発症頻度は低いものの、一度発症すれば皮膚や眼のみでなく心臓血管病変が進行し致命的な病態に至る、治療法がない疾患である。研究開発代表者である宇谷教授/原講師ら(長崎大学 皮膚科)のグループは、全国から収集したその難治性皮膚疾患患者の遺伝子変異からナンセンスコドン抽出した。我々は site-directed mutagenesis を用いて、その変異 ABCC6 遺伝子をもつベクターを作成、293T 細胞に導入し、リードスルーされた際にのみ発現する GFP を標識に、試薬の効果を確認する in vitro の系を確立した。

そして我々は、林教授(東京薬科大学 薬学部)らのグループとともに、ネガマイシン誘導体 TCP-169 が PXE ナンセンス読み飛ばし効果判定検出系にて、活性を示すことを見出した。この結果からより詳細な生物活性評価を実施するため、林グループは本誘導体のスケールアップ合成を行った。また一方で、ネガマイシン新規誘導体の効率的合成法の確立を目指し、種々検討を行った結果、新規合成経路の開発に成功した。

日本で比較的発症頻度の高い色素性乾皮症 (XP)の約 75%の症例は、ヌクレオチド除去修復機構 (NER)と呼ばれる DNA 修復機構の先天性な欠損が疾患原因とされる。また、早期老化症状を特徴とするコケイン症候群 (CS)も NER 欠損性の遺伝性疾患である。荻教授(名古屋大学 環境医学研究所)らのグループは、NER の活性を指標として XP および CS の臨床診断を実施しており、我々はこの技術を応用して、読み飛ばし効果を判定する方法を確立し、疾患緩和薬を探索することを計画した。

これらのアッセイを用いて、これまでに TGA 変異に対し、2 試薬の効果を確認している。これらの結果は、リードスルー試薬が遺伝性疾患に対して効果があるかもしれないことを示唆している。

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is a rare hereditary disease that there exists no treatment, and once it developed, it attacks not only their skin and eyes, but also their cardiovascular systems, leading to death. We Prof. Utani / Dr. Hara group, research representatives (Nagasaki University Hospital, Department of Dermatology and Allergology), extracted nonsense codons information in patients with the intractable skin disease from the all over Japan. We established in vitro assay system by using site-directed mutagenesis, in which cultured 293T cells are transfected with expression vector consists of ABCC6 with the mutated nonsense codon and followed by GFP as tag at C-terminus. When readthrough compounds are effective, GFP is expressed as a fusion protein with ABCC6.

Then we cooperated with Prof. Hayashi group (School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences) and found that a negamycin derivative, TCP-169, exhibited a good

readthrough activity in the assay readthrough system for the PXE nonsense mutations. From this result, in order to evaluate more detailed biological activity of TCP-169, Hayashi group carried out scale-up synthesis of this derivative. Hayashi group also succeeded in developing an efficient synthetic route for novel negamycin derivatives.

Also, xeroderma pigmentosum (XP) is a rare inherited skin disorder with an increased risk of cancer. XP occurs with relatively high incidence in Japan, and approximately 75% of patients are with defects in the nucleotide-excision repair (NER). Cockayne syndrome (CS) is another hereditary disorder with NER deficiency, which is characterized by premature aging. Prof. Ogi group (Nagoya University Research Institute of Environmental Medicine) has established a rapid measurement method for detecting NER activities, which provided us a useful tool for clinical diagnosis of XP and CS. In this research proposal, we set out to develop an evaluation system for the stop codon read-through effects based on the abovementioned method and set up a screen for putative drugs used in palliative care of XP and CS patients.

With these assays, we recognized the efficacy of two reagents in TGA mutation so far. These results suggest that readthrough reagents may have potency against hereditary diseases with nonsense mutations.

### 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 1 件、国際誌 3 件）

1. 宇谷厚志: 本邦弾性線維性仮性黄色腫の重症度判定ならびにガイドライン作成. 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究 平成 27 年度総括・分担研究報告書 (天谷雅行編, 東京), 2016, pp. 57-64.
2. Iwanaga A, Okubo Y, Yozaki M, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tomimura S, Yamamoto Y, Tamura H, Ikeda S, Maemura K, Tsuiki E, Kitaoka T, Endo Y, Mishima H, Yoshiura KI, Ogi T, Tanizaki H, Wataya-Kaneda M, Hattori T, \*Utani A. Analysis of clinical symptoms and ABCC6 mutations in 76 Japanese patients with pseudoxanthoma elasticum. *Journal of Dermatology*, 2017, in press, doi: 10.1111/1346-8138.13727.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Severe acne scar of the neck in pseudoxanthoma elasticum: Acne as a modifier? Oral, Naoki Oiso, Yumi Okubo, Atsushi Utani, Akira Kawada: The 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, 2016/4/3~4/7, 国内
2. 弾性線維性仮性黄色腫診療ガイドラインの策定に向けて. 第Ⅲ報, 口頭, 岩永 聡、大久保佑美、築城英子、北岡隆、池田聡司、前村浩二、遠藤雄一郎、田村寛、山本洋介、谷崎英昭、金田眞理、三長孝輔、荻朋男、宇谷厚志, 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業) 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成 28 年度第 1 回総会, 東京, 2016/5/20, 国内
3. ハイコンテンツイメージングシステムを利用した難治性遺伝性疾患の臨床診断, 口頭, 荻 朋男, 2016 HCA ユーザーミーティング, 2016/5/26,31, 国内.

4. リードスルー活性を有する(+)-ネガマイシンの作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築、ポスター、濱田圭佑、田口晃弘、高山健太郎、薬師寺文華、臼井健郎、林 良雄、日本ケミカルバイオリロジー学会第11回年会、京都、2016/6/15～6/17、国内
5. ナンセンス変異読み飛ばし活性を有する(+)-ネガマイシンの作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築、ポスター、濱田圭佑、田口晃弘、村上沙織、小林美咲、高山健太郎、臼井健郎、林良雄、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、東京、2016/6/18、国内
6. Development of Leucyl-3-epi-deoxyngemaycin Derivatives with Potent Readthrough Activity, Poster, Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Misaki Kobayashi, Masataka Shiozuka, Kentaro Takayama, Ryoichi Matsuda, Yoshio Hayashi: 20<sup>th</sup> Kean Peptide Protein Symposium, Korea, 2016/6/24～6/25、国外
7. 日本人 PXE 患者 76 人における臨床症状と ABCC6 遺伝子変異, 口頭, 岩永 聡、大久保佑美、与崎マリ子、小池雄太、鎌塚 大、富村沙織、山本洋介、田村 寛、荻 朋男、宇谷厚志、第 48 回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016/6/24～6/25、国内
8. 弾性線維性仮性黄色腫患者のナンセンス変異に対するリードスルー治療, 口頭, 大久保佑美、岩永聡、中沢由華、荻 朋男、田口晃弘、林 良雄、宇谷厚志、第 48 回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016/6/24～6/25、国内
9. 古典型エーラス・ダンロス症候群のエクソンシーケンスによる遺伝子診断, 口頭, 神尾芳幸、清原龍士、山口道也、大久保佑美、与崎マリ子、臼井 文、武藤正彦、藤原作平、宇谷厚志、第 48 回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016/6/24～6/25、国内
10. Leucyl-3-epi- deoxynegamycin の 3 位アミノ基及びカルボン酸部位に着目した新規高活性リードスルー化合物の創製、ポスター、小林美咲、濱田圭佑、田口晃弘、村上沙織、塩塚政孝、高山健太郎、松田良一、林 良雄、創薬懇話会 2016 in 蓼科、長野、2016/6/30～7/1、国内
11. Modification of Carboxylic Acid Part in Negamycin Analogues and Its Effect on Readthrough Activity, Oral & Poster, Keisuke Hamada, Akihiro Taguchi, Saori Murakami, Misaki Kobayashi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi: The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium, China, 2016/7/4～7/7, Nanjing, 国外
12. コケイン症候群のゲノム診断, 口頭, 荻 朋男, CS 勉強会, 2016/7/9, 国内.
13. ネガマイシン誘導体 C 末端部の修飾による高活性リードスルー化合物の創製、ポスター、濱田圭佑、田口晃弘、村上沙織、小林美咲、高山健太郎、林 良雄、第二回日本筋学会学術集会、東京、2016/8/5～8/6、国内
14. DNA 損傷応答と遺伝病疾患, 口頭, 荻 朋男, 平成 28 年度 若手放射線生物学研究会 専門研究会, 東京, 2016/9/3, 国内.
15. 高活性リードスルー誘導体の獲得を目指したネガマイシン天然類縁体の構造活性相関研究、口頭、小林美咲、濱田圭佑、田口晃弘、村上沙織、新井実咲、塩塚政孝、高山健太郎、松田良一、林 良雄、第 60 回日本薬学会関東支部大会、東京、2016/9/17、国内
16. 新規高活性リードスルー化合物の創製を目指した leucyl-3-epi-deoxyngemaycin の構造活性相関研究、ポスター、濱田圭佑、田口晃弘、小林美咲、村上沙織、新井実咲、塩塚政孝、高山健太郎、松田良一、林 良雄、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、茨城、2016/11/30～12/2、国内

17. Construction of the multidrug-sensitive yeast strain for elucidating the mechanism of the readthrough activity of (+)-negamycin and its analogues, Poster, Keisuke Hamada, Akihiro Taguchi, Misaki Kobayashi, Kentaro Takayama, Takeo Usui, Yoshio Hayashi: 2016 ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA, 2016/12/3~12/7, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. DNA 修復機構の異常と疾患, 荻朋男, 太陽紫外線防御研究委員会第 27 回シンポジウム, 2017/3/17, 国内.

(4) 特許出願

該当なし