

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策研究事業）
総括研究報告書

アンチセンスによる筋強直性ジストロフィーの治療の最適化

総括研究者 石浦章一 東京大学大学院 総合文化研究科 教授

研究要旨

筋強直性ジストロフィー 1 型(DM1)は、CTG トリプレットの伸長によって多くの遺伝子のスプライシング異常が起こる全身性の疾患である。多様な症状には、筋強直、白内障、耐糖能異常、精神遅滞、精巣萎縮などがある。私たちはモデルマウスを用いて、アンチセンス投与により筋強直症状を治療することに成功した。また、低分子化合物や CTG に対するアンチセンスも効果があった。これらの結果から、アンチセンス治療に低分子化合物を加えた複合療法が最も効率の良い治療法であることが示唆された。

分担研究者：西野一三（国立精神・神経医療研究センター神経研究所・部長）

A．研究目的

筋強直性ジストロフィー 1 型(DM1)の症状は多様で、筋強直、白内障、耐糖能異常、精巣萎縮、などが典型的なものである。これらの症状は、スプライシングが異常になって出現すると考えられている。DM1は、我が国の筋ジストロフィーの中では一番多く、QOLの観点から筋力低下やミオトニアなどの治療法開発が望まれている。

本症の責任遺伝子は第19染色体にあるDMPKであり、その3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が病気の直接の原因である。また、筋強直性ジストロフィー 2 型(DM2)も発見されたが、これは第3染色体にあるZNF9遺伝子中のイントロン 1 にあるCCTGリピートの伸長である。また海外の研究結果によれば、伸長したリピートだけを発現させたHSA-LRマウスでも同じ症状が見られることもわかった。その結果、現在では、本症が、伸長したRNAに特定のスプライシング因子が結合し、スプライシング因子本来の機能が果たせないことで起こるといふ「RNA機能獲得説」が唱えられている。これは、私たちの以前の結果「スプライシング因子MBNL1がDM1とDM2の2つの異なる型の塩基リピートに結合することの発見」が証拠の1つ

となっている。

以前より、バブル・リポソームを用いた導入効率の高いアンチセンス法によって疾患モデル動物のミオトニアを軽減することができていたが、最近、低分子化合物を用いてスプライシングを正常化することも可能になった。最終年度の平成25年度は、アンチセンス治療の最適化に的を絞り、モデル動物を用いた究極の治療法を開発することを目的とした。この目的のために、CTGに対するアンチセンスを用いることにした。

B．研究方法

マウス塩素チャンネルミニ遺伝子と CTG480 コンストラクトを発現させたマウス細胞株 Neuro2a に、CTG に対するモルフォリノアンチセンス CAG を、長さを変えて発現させた。この場合、アンチセンスの塩基数は、15、20、25 とした。

次に、バブル・リポソームを用いて HSA-LR マウス TA 筋にモルフォリノアンチセンス 10 μ g を筋注し（1 週間おきに 3 回）、最後の筋注後 1 週間で TA 筋を摘出した。

最後に、vivo-モルフォリノ修飾を施した CAG15 を同様に、バブル・リポソームとともに HSA-LR マウス TA 筋に 10 μ g を筋注して効果を調べた。投与回数は 3 回とした。

(倫理面への配慮)

今回の実験は、東京大学・動物実験委員会の指

針通りに行った。

C . 研究結果

Neuro2a 細胞を用いたアンチセンス実験では、アンチセンスの塩基数が短いほど、塩素チャンネル遺伝子のスプライシング正常化効果が認められた。また、HSA-LR マウスに投与する実験でも、CAG15 に一番良好な効果が認められた。

そこで、生体内への浸透性が高いと考えられる CAG15 vivo-モルフォリノを 3 回、バブル・リポソームとともに筋注した結果、塩素チャンネル遺伝子のみならず、SERCA 1 遺伝子エクソン 22 のスキップを減少させ正常化する効果が認められた。

D . 考察

本年度は、長く伸びた CTG に対するアンチセンスの効果調べた。その結果、アンチセンスの長さが短いほど、細胞とマウス組織で塩素チャンネル遺伝子のスプライシングを正常化する効果が認められた。

本症は、全身性に多くの遺伝子のスプライシングが異常になる病気である。正常化することが必要なのは塩素チャンネルのみならず、多くの遺伝子である。私たちは、典型的なスプライシング異常が見られる SERCA 1 を調べたところ、この遺伝子のスプライシングも正常化することが分かった。

本研究で用いた CTG に対するアンチセンス CAG は、抜本的に本症の症状を改善する可能性がある。また、前年度までに明らかにした低分子化合物マニマイシン A と併用することにより、スプライシング正常化効果が増進する可能性があることが示唆された。

E . 結論

筋強直性ジストロフィーのモデルである CTG リピートを 300 含むトランスジェニックマウス HSA-LR に対して、CAG アンチセンス vivo-モルフォリノオリゴは、バブル・リポソームと併用することで効果的な治療法になることがわかった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P., Nishino, I., Takeda, S. & Ishiura, S. (2013) Manumycin A corrects aberrant splicing of *Cttn1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Scientific Reports* 3, 2142
- (2) Koebis, M., Kiyatake, T., Yamaura, H., Nagano, K., Higashihara, M., Sonoo, M., Hayashi, Y., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Yanagihara, D., Matsuda, R., Takahashi, M.P., Nishino, I. & Ishiura, S. (2013) Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Scientific Reports* 3, 2242
- (3) Sasagawa, N., Koebis, M., Yonemura, Y., Mitsuhashi, H. & Ishiura, S. (2013) A high-salinity solution with calcium chloride enables RNase-free, easy plasmid isolation within 55 minutes. *BioScience Trends*, 7, 270-275

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし