

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策研究事業）
（総合）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

モデルマウスを用いて筋強直性ジストロフィー 1 型(DM1)の治療法の開発とその最適化を行った。まず、塩素チャンネル遺伝子のアンチセンスを効率よく筋肉内に導入するバブル・リポソーム法を確立した。その結果、超音波照射によりアンチセンスの筋細胞内への導入が促進され、塩素チャンネル遺伝子のスプライシングが正常化した。次に、低分子化合物によってスプライシングを正常化することに成功した。最後に、究極の治療法であるリピートに対するアンチセンスの効果も検討し、良好な結果を得た。

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)は筋強直、耐糖能異常、精神遅滞、精巣萎縮、白内障、などを伴う全身性症状を呈する疾患である。原因は、第19染色体にあるDMPK遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長で、その結果、数多くの遺伝子のスプライシングが異常になって全身症状が出現すると考えられている。その理由は、スプライシング因子MBNL1がリピートRNAに結合し、本来のスプライシング機能が果たせないためである。

また本症は我が国の筋ジストロフィーの中では一番多く、筋力低下やミオトニアなどの治療法の開発が望まれており、QOL改善が最大の目標である。

平成 23 - 25 年度の目標は、ヒト DM1 治療を見据えて、アンチセンスの効率の良い取り込み法の開発と、アンチセンス自体の改変、そして併用する低分子化合物の選択であった。

まず平成 23 年度は、塩素チャンネル遺伝子を用いて、スプライシングを正常化させるアンチセンス配列を同定し、それを効率良く筋肉に導入する方法の開発に力を注いだ。平成 24 年度には、塩

素チャンネル遺伝子のスプライシングを正常化させる低分子化合物を、化合物ライブラリーからスクリーニングし、マニユマイシン A を同定した。最後の平成 25 年度には、治療の最適化ということで、CTG に対するアンチセンスを修飾し、最適な投与方法を確認した。

これらは、モデル動物（CTG リピートを 300 含むトランスジェニックマウス HSA-LR）に導入して *in vivo* で検討した。

B．研究方法（倫理面の配慮含む）

細胞でのスプライシングアッセイは以下のように行った。まず、塩素チャンネルのミニ遺伝子（エクソン 6、7a、7 でできている短い遺伝子）を用いて、エクソン 7a の有無を PCR とゲル電気泳動で行った。エクソン 7a を持たない正常型と、エクソン 7a を含む異常型の比率は、正常筋では圧倒的に前者が多く、DM 筋では後者が増加している。エクソン 7a0~25 をコードするモルフォリノアンチセンスオリゴを、塩素チャンネルのミニ遺伝子とともに CTG300 を持つトランスジェニックマウス HSA-LR の tibialis anterior (TA)筋に 1 回注射した。最後の注射から 2 日後に、mRNA を抽出し、スプライシング頻度を測定した。

このとき、モルフォリノオリゴ(10 μ g)はバブル・リポソームとともに筋注した（全 30 μ l）。その後、0-3 Wの出力で超音波を 0.5-3 分照射し、

筋内にアンチセンスを導入した。

CTG リピートに対するアンチセンス導入に際しては、アンチセンスを vivo-モルフォリノ化して実験に用いた。

(倫理面への配慮)

今回の実験は、DM 患者生検筋からの mRNA スプライシング異常から派生した研究である。生検筋は、インフォームドコンセントを得て取得し、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会承認を受けたものを用いた。また、動物実験については、東京大学の規定に従って行った。

C. 研究結果

(1) バブル・リポソーム法の検討

バブル・リポソームを用いるデリバリー法は比較的新しく、条件検討が必要であった。本研究では、出力、時間を変化させ、1 Wの出力で超音波を1分間照射させることが最適条件であることが分かった。

(2) 塩素チャンネル遺伝子のスプライシング正常化に關するアンチセンス配列

いくつかの配列を検討した結果、最適なアンチセンス配列は、エクソン 7a の 0~25 に対するものであり、これを用いると細胞系では最もエクソン 7a スキッピングが起りやすくなった。アンチセンスによる内因性の塩素チャンネル遺伝子のスプライシング正常化機能を PCR 法で定量した結果、異常型塩素チャンネルのパーセンテージが 18% から 11% に低下した。これは対照(正常)マウスの 10% に近い値であった。またこの時に、筋強直性ジストロフィーでスプライシング異常が指摘されている SERCA1 と Pdim3 遺伝子の異常型スプライシングの比率は変化させなかった。以上の事実は、アンチセンスが特異的に塩素チャンネル遺伝子に作用したことを示していた。

(3) アンチセンス投与による表現型の改善

エクソン 7a の 0~25 に対するアンチセンスを HSA-LR に投与したところ、ミオトニアが軽減した。動物実験で、初めて表現型改善効果が得られた。

(4) 低分子化合物のスクリーニング

塩素チャンネルミニ遺伝子を用いたスプライシング系を使って、正常スプライシングを起こすとルシフェラーゼが発現するコンストラクトを作成した。この系に、Bioactive compounds 400 種を添加し、光を指標に化合物を探索したところ、マニユマイシン A がスプライシングを正常化することがわかった。また、H-Ras をノックダウンするとスプライシングが正常化することから、H-Ras がこの系に関わっていることが判明した。

(5) CTG に対するアンチセンスの効果

まず長さを検討した結果、CAGCAG...と続くアンチセンス 15mer が最も効果が高かった。そこで、vivo モルフォリノ化した 15mer アンチセンスを、1週間おきに3回に分けてマウスに投与したところ、塩素チャンネルだけでなく SERCA 1 遺伝子のスプライシングも正常化することが分かった。

D. 考察

この3年間の研究で、塩素チャンネルスプライシングを正常化させるアンチセンスの最適配列を同定し、バブル・リポソーム法を確立してアンチセンスオリゴを効率よく導入することに成功した。加えて、低分子物質マニユマイシン A による塩素チャンネルスプライシングの正常化がうまくいき、アンチセンスと併用する可能性が示唆された。

本症は、CTG 伸長に伴う各種スプライシング異常によっておこる。そこで、CTG に対するアンチセンスが、全症状を改善する可能性が考えられた。そのため、組織浸透性が良い vivo モルフォリノ誘導体を用いて治療実験を行ったところ、塩素チャンネルだけではなく SERCA1 のスプライシングも正常化していた。

以上の結果は、アンチセンスによる治療の最適化という意味では、十分に目的を達したと言える。

E. 結論

筋強直性ジストロフィーのモデルである CTG

リポートを 300 含むトランスジェニックマウス HSA-LR に対して、私たちが新しく開発したアンチセンスモルフォリノオリゴ配列 + バブル・リポソーム法は劇的な治療効果をもたらした。また、併用可能な低分子化合物も見つかった。今後は、CTG に対するアンチセンスの効きを高める修飾法の開発と、どれだけ低分子化合物併用の効果があるか、を検討したい。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- (1)Ishiura, S., Kino, Y., Oma, Y., Sasagawa, N. & Nukina, N. (2011) MBNL proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *In Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of serum creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy.* (Takeda, S. ed.) pp.18-25, Igaku-shoin, Tokyo, 2011.
- (2)Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 409, 64-69
- (3)Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes to Cells*, 16, 961-972
- (4) Zhao, Y., Koebis, M., Suo, S., Ohno, S. & Ishiura, S. (2012) Regulation of *SERCA1* alternative splicing by PMA through PKC pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 423,212-217
- (5) Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P.,

Nishino, I., Takeda, S. & Ishiura, S. (2013) Manumycin A corrects aberrant splicing of *Cln1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Scientific Reports* 3, 2142

(6)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

(7)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