

muscular dystrophy with rod domain deletions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30(5):540-5.

- (13) Hodgson SV, Abbs S, Clark S, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy, with special reference to mental ability. *Neuromuscul Disord.* 1992;2(4):269-76.
- (14) Covone AE, Lerone M, Romeo G. Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Human genetics.* 1991;87(3):353-60.
- (15) Trimarco A, Torella A, Piluso G, et al. Log-PCR: a new tool for immediate and cost-effective diagnosis of up to 85% of dystrophin gene mutations. *Clin Chem.* 2008;54(6):973-81.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

【欧文原著】

- 1) Yamashita S, Kimura E, Tawara N, Sakaguchi H, Nakama T, Maeda Y, Hirano T, Uchino M, Ando Y : Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39:406-16, 2013
- 2) Uchino M, Yamashita S, Uchino K, Mori A, Hara A, Suga T, Hirahara T, Koide T, Kimura E, Yamashita T, Ueda A, Kurisaki R, Suzuki J, Honda S, Maeda Y, Hirano T, Ando Y : Muscle biopsy findings predictive of malignancy in rare infiltrative dermatomyositis. *Clin Neurol Neurosurg.* 115:603-6, 2013
- 3) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H : Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy *In Vitro.* ***PLoS One.*** 8:e61540, 2013
- 4) Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda SI, Kawai M : Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). ***Orphanet J Rare Dis.*** 8:60, 2013
- 5) Yamashita S, Uchida Y, Kojima S, Sakaguchi H, Kimura E, Maeda Y, Uchino M : Heatstroke in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 33:685-687, 2012
- 6) Yamashita S, Sakaguchi H, Mori A, Kimura E, Maeda Y, Hirano T, Uchino M : Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. ***Muscle & nerve.*** 45:426-428, 2012
- 7) Sakaguchi H, Yamashita S, Hirano T, Nakajima M, Kimura E, Maeda Y, Uchino M : Myasthenic crisis patients who require intensive care unit management. ***Muscle & nerve.*** 46:440-442, 2012
- 8) Ikeda T, Kimura E, Hirano T, Uchino M : The association between dermatomyositis and papillary thyroid cancer: a case report. ***Rheumatol Int.*** 32:959-961, 2012
- 9) Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S: Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. ***Hum Mol Genet.*** 2013 Dec 15;22(24):4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
- 10) Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T, Tanihata J, Nozohourmehrabad A, Panesar

D, Miskew B, Aoki Y, Yokota T. :Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic *mdx* and *mdx52* mice. *PLoS One*. 2013 Jul 24;8(7):e69194. doi: 10.1371/journal.pone.0069194. Print 2013.

2) 武田伸一, 永田哲也, 他 :「アンチセンス核酸」(日本新薬と共願) 2013 年 9 月 5 日出願 出願番号 : 特願 2013-184193 (特願 2012-531987 の分割出願)

<和文>

【和文著書】

- 1) 木村 円, 武田伸一: 進行性筋ジストロフィー (ジストロフィノパチー) 『今日の神経疾患治療指針 第 2 版』医学書院, 2013
- 2) 木村 円: Remudy による患者登録『筋疾患のみかた, 考えかた』中外医学社, 2013

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

II 学会発表

1. 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏文, 武田伸一 : Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験. 第 31 回日本神経治療学会総会, 文京区, 11.22, 2013
2. 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一 : Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin の機能的役割の解明. 第 68 回日本体力医学会, 東京. 9.21-23, 2013
3. 永田哲也, 青木吉嗣, 武田伸一 : モルフォリノ・アンチセンス核酸が筋形質膜から取り込まれる機序についての検討. 第 14 回運動器科学研究会, 東京, 9.13, 2013

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

【登録】

- 1) 武田伸一, 永田哲也, 渡辺直樹, 佐藤洋平, アンチセンス核酸, 特許第 5363655 号、平成 25 年 9 月 13 日登録

【出願】

厚生労働科学研究費補助金
(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))
平成 25 年度 分担研究報告書

ヒト骨格筋検体におけるジストロフィン発現の
二重蛍光免疫染色による定量的評価

研究分担者 小牧 宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
病院 小児神経診療部 医長

研究要旨

エクソン 53 スキップ治療薬 NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験 (NCNP/DMT01) ではジストロフィンタンパク質の発現を副次的評価項目に設定している。その検査方法の一つであるジストロフィン蛍光免疫染色に関して、治験薬投与前後における発現量の変化を定量的に解析すること目的とした、ジストロフィン/スペクトリン二重蛍光免疫染色法とその解析手法について検討した。得られた画像を画像解析ソフトウェアで解析し、正常、BMD、DMD それぞれの検体を評価したところ、目視で認められるジストロフィン蛍光強度とほぼ同様のジストロフィン/スペクトリン蛍光強度比を算出することが可能であった。今後は本臨床試験を通して得られる被験者検体への適用を見据え、本手法の最終的な調整を行いながら、適切な定量的解析の実施に向けた検討を進めていく。

A. 研究目的

NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験 (NCNP/DMT01) における評価項目は、1) 主要評価項目:安全性(有害事象及び副作用)、2) 副次的評価項目 ① ジストロフィンタンパク質の発現 ② エクソン 53 をスキップしたジストロフィン mRNA 検出 ③ 血漿中 NS-065/NCNP-01 濃度 ④ 尿中 NS-065/NCNP-01 濃度 と設定されている。このうち①ジストロフィンタンパク質の発現については、ジストロフィン蛍光免疫染色及びウェスタンブロットで評価を行い、治験薬投与前後におけるジストロフィン発現量の変化を解析することとしている。特に蛍光免疫染色については、筋線維膜にジストロフィンとともに局在するスペクトリンなど、病態に左右されず定常的に発現するタンパク質と二重染色を行い、スペクトリンの蛍光強度を基準としてジストロフィン蛍光強度の比率を算出して定量を行うこととしている。本研究では

昨年度までに、本手法によるジストロフィン発現の定量的評価手法についてマウスモデルを用いて検討を行い、マウスにおけるエクソン・スキップに反応したジストロフィン発現量の変化を検出可能であることを報告した。今年度は、本手法が実際にヒト検体においても適用可能であるかを検証するために、国立精神・神経医療研究センター(以下、当センター) バイオバンクに保存されているヒト凍結骨格筋検体を用いて、染色及び画像解析を行い、定量的解析が実施可能性について検討したので報告する。

B. 研究方法

本研究は当センター倫理委員会において、ヒト検体を用いたジストロフィン発現解析に関する研究として承認を受けた実験計画に従って実施した。研究利用の同意が得られた上でバイオバンクに保存されている健常者、DMD または BMD の凍結骨格筋ブロックを用いた。

スライドの作製

観察対象となるスライドは当センタートランスレーショナルメディカルセンターにおいて、凍結骨格筋検体を 10 μm の厚さに薄切して作製した。また本手法は同一スライド上で同一染色条件下における、ジストロフィン/スペクトリン比を比較するものであるため、比較対象となる切片同士は同一のスライド上に、また正常組織におけるスペクトリン及びジストロフィンの蛍光強度を設定するために、正常切片 1 枚以上を同じスライドに配置した。

染色方法

昨年度報告したマウス切片の染色法を改変し、Taylor らの方法に従った⁽¹⁾。

一次抗体：スペクトリン(NCL-SPEC1, Leica Microsystems)、ジストロフィン (ab15277, Abcam)

二次抗体：Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A11017, Molecular Probes)、Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (A11036, Molecular Probes)

封入剤：ProLong Gold antifade reagent (P36934, Life technologies)

1. 室温で風乾
2. 一次抗体反応（室温、60 分、スペクトリン 1:100, ジストロフィン 1:400）
3. PBS で洗浄（5 分、3 回）
4. 二次抗体反応（室温、30 分、Alexa 488 1:500, Alexa 568 1:500）
5. PBS で洗浄（5 分、3 回）
6. 封入（室温、遮光、24 時間、ProLong Gold antifade reagent）

画像の取得

TCS-SP5(Leica microsystems)を以下のように設定した。

Argon laser: on, HeNe 543 laser: on, HeNe 633 laser: off, Bit depth: 12 bit, Pinhole: airy 1, Bidirectional: on, Phase correction: 0.0, Scan area: 2048 \times 2048, Speed: 40 Hz, CH488 Smart

gain:正常切片のスペクトリン観察時に飽和しない最大値, CH568 Smart gain:正常切片のジストロフィン観察時に飽和しない最大値

1. 最初に正常切片を観察して smart gain 値を設定したら、当該スライドの撮影において、同値は変更しないで撮影する。
2. スペクトリン染色像を観察しながら、重複しない視野を最低 4 領域撮影する。
3. 各画像についてスペクトリン画像(ch00)、ジストロフィン画像(ch01)を 12 bit tif フォーマットで保存する。

画像の解析

以下のソフトウェアを使用した。

Adobe Photoshop CS (version 10 以上, Adobe)

MetaMorph (version 7.8, Molecular Devices)

Microsoft Excel 2010 (version 14.0, Microsoft)

SAS Enterprise Guide (version 5.1, SAS institute)

以下、*は任意の数字として ch*0: スペクトリン、ch*1: ジストロフィンの画像を表す。

1. Adobe Photoshop でスペクトリン画像(ch00)を開き、クイックマスク機能を用いて非特異的と認められる領域をマスクする。
2. クイックマスクにて作成されたレイヤーを二値化して保存し、スペクトリン/ジストロフィン両画像に適用するマスク画像(ch02)として保存する。
3. MetaMorph で ch00/ch01/ch02 画像を開き、ジャーナル機能を用いて以下の処理を実行する。
4. ch00 及び ch01 それぞれに対し ch02 の画像演算 Subtract を実行し、マスク領域の蛍光強度 0 とした ch20, ch21 を作成する。
5. ch20 に対して順に、Morphological Gradient \rightarrow Threshold \rightarrow Binarize \rightarrow Morphological Center Filter \rightarrow Euclidean Distance \rightarrow Morphological Invert \rightarrow Morphological Watershed Lines \rightarrow Morphological Dilate を実行して、筋線維

の膜構造のみを抽出した画像を作成し、ch20 及び ch21 それぞれにこの画像の画像演算 AND を実行した ch30, ch31 を作成する。ch30 及び ch31 は、抽出された筋線維膜領域以外はすべての蛍光強度が 0 となる。

6. Threshold のパラメータに複数の値を設定して上記の演算をループさせる
7. ch30 及び ch31 に対し Integrated Morphometry Analysis を実行し、蛍光強度が 0 でないピクセルの面積、並びにスペクトリン及びジストロフィンの蛍光強度を測定する。
8. Microsoft Excel で記録したデータを開き、記録した視野毎のジストロフィン／スペクトリン比を計算する。
9. SAS Enterprise Guide に上記で保存した .xlsx ファイルをインポートする。上記のファイルには、画像毎に以下の情報が記録されているものとする。
 - analyzed_image: 解析対象となったファイル名
 - total_area: 総ピクセル数
 - int_ratio: ジストロフィン／スペクトリン蛍光強度比
 - threshold: 閾値情報 (t***)
 - subject: 検体記号・被験者記号

※閾値情報 (t***) は Threshold で設定したパラメータ値

※total_area = 0 の画像は、int_ratio = 0 としして解析から除外する。

10. バーの高さを total_area, バーを subject, グループ化する基準を threshold に設定して棒グラフウィザードを起動する。
11. 棒グラフの結果より、total_area が最大となる時の閾値 (t***) を解析に用いる閾値として決定する。ただし当該閾値にて筋線維膜が抽出された画像 (_t***_ch30 及び _t***_ch31) を確認し、これらの画像において正しく筋線維膜が抽出されていない場合、当該閾値よ

りも高い閾値を採用する (例: t100 の画像において筋線維膜が正しく抽出されていない場合、t200 を採用する。

12. 特定した閾値における subject 毎の int_ratio について統計量を求める。int_ratio の平均値が解析した検体のジストロフィン／スペクトリン比となる。

C. 研究成果

ヒト由来切片 (正常対照、BMD、DMD) に対して上記の方法を適用して検討した。いずれの検体についても、ひとつの切片から撮影した重複しない 4 領域の画像を演算に用いた。目視で認められるジストロフィン蛍光強度とほぼ同様のジストロフィン／スペクトリン蛍光強度比が得られた。

検体の種類	ジストロフィン ／ スペクトリン 蛍光強度比 (平均)	標準偏差
正常対照	0.915	0.013
BMD	0.483	0.023
DMD	0.179	0.018

D. 考 察

本手法の適用により、目視で得られるジストロフィンの蛍光強度を、正常対照を基準とした相対定量値で表すことが可能と考えられた。DMD 検体でも組織片から検出される自家蛍光により、蛍光強度比率は 0 と等しくならぬが、本手法はエクソン・スキップによるジストロフィン発現量の変化を検出することを目的とするため、投与前後で認められる変化の検出には大きな支障とはならないと考えられる。また各検体の蛍光強度比の標準偏差は 0.013~0.023 の間であったが、仮に標準偏差 0.050 の画像セットの場合、蛍光強度比の差 0.1 を有意水準 0.05, 検出力 0.8 で検出するために必要な画像セットの合計枚数は 12 枚となり、今後取得すべき画像数を決定する上で考慮すべき点と思われた。なお今回の検討で、BMD と DMD の差について検出することは可

能であったが、ヒトにおけるエクソン・スキップの評価に対する適用可能性は、臨床試験における検体が採取されるまでは実際のところ判断が困難である。今後は本臨床試験を通じて得られる被験者検体を用いて、本手法の最終的な調整を行いながら、適切な定量的解析の実施に向けた検討を進めていく必要がある。また本研究課題の代表者である武田らは、DMD モデルマウスに関して、プロテオーム解析に用いる SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 法と質量分析計を活用したタンパク質定量法が、病態関連タンパク質の解析に有用であることを報告しているが⁽²⁾、今後はこのような手法をエクソン・スキップの有効性評価に応用することも検討していく必要がある。

E. 結論

NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験 (NCNP/DMT01) におけるジストロフィン定量解析への適用を目的とした、ジストロフィン/スペクトリン二重蛍光免疫染色法とその解析手法について検討した。正常、BMD、DMD それぞれの検体を評価したところ、目視で認められるジストロフィン蛍光強度とほぼ同様のジストロフィン/スペクトリン蛍光強度比を算出することが可能であった。今後は本臨床試験を通して得られる被験者検体への適用を見据え、本手法の最終的な調整を行いながら、適切な定量的解析の実施に向けた検討を進めていく。

参考文献

- (1) Taylor LE, et al., *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012, 38:591-601
- (2) Rayavarapu, et al., *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013, 12 (5): 1061-73

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

【欧文原著】

1. Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S: Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients. *J Neurol*. 2013 Dec;260(12):3023-9. doi: 10.1007/s00415-013-7104-y. Epub 2013 Sep 22.
2. Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda S, Kawai M: Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Apr 19;8(1):60. [Epub ahead of print]
3. Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I. Rapidly progressive scoliosis and respiratory deterioration in Ullrich congenital muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(9):982-988.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他、特記事項
なし

厚生労働科学研究費補助金
(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))
平成 25 年度 分担研究報告書

エクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの機能解析

研究分担者 岡田 尚巳 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
遺伝子治療技術開発室 室長

研究協力者 谷端 淳 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 流動研究員

研究要旨

アンチセンス核酸を用いたヒトジストロフィンのエクソン 51 スキップ療法に引き続き、今年度より当センターにおいてエクソン 53 スキップの医師主導臨床試験も開始しているが、治療対象は欠失変異を有する Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者のそれぞれ 13%, 8%にすぎない。一方で、ジストロフィン遺伝子の変異集積領域であるエクソン 45-55 全てのエクソンをスキップさせることができれば欠失変異を有する DMD 患者の 60%以上が治療の対象となるだけでなく、臨床例より症状の劇的な改善が期待される。我々はこれまでに *mdx52* マウスを用いてエクソン 45-55 のマルチエクソン・スキップによりエクソン 45-55 がスキップされた短縮型のジストロフィンの発現が認められ、筋機能も有意に回復することを明らかにした。一方でエクソン 45-55 スキップは有効な治療戦略であるがエクソン 45-55 を欠失した短縮型ヒトジストロフィンの機能とその役割や長期的な働きは未解明である。そこでエクソン 45-55 を欠失させたヒトジストロフィン遺伝子が発現するトランスジェニックマウスを作出し、解析を行ったところ、この短縮型ジストロフィンの機能は全長ジストロフィンと同等の機能を有する一方でジストロフィン糖タンパク質複合体に含まれる nNOS の局在が筋細胞膜から細胞質に変化することでリアノジン受容体のニトロシル化を介して、Type2A 線維の増加と Type2B 線維の萎縮を惹起させることを明らかにした。

A. 研究目的

X 染色体連鎖性の遺伝形式をとり、致死性の筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する新規治療法としてエクソン・スキップ治療が注目されている。我々は *Dmd* 遺伝子エクソン 52 欠失モデルマウス (*mdx52*) を対象とした、モルフォリノ核酸の反復全身投与によるエクソン 51 スキップ、また DMD モデルイヌである *CXMD_J* を対象とした、同じくモルフォリノ投与によるエクソン 6 / 7 マルチスキップなどを通して、エクソン・スキップ治療の有効性を報告してきた。現在、アンチセンス核酸を用いたエクソ

ン 51 スキップ治療薬、及び本研究で開発を進めるエクソン 53 スキップ治療薬の臨床開発が進行しているが、治療対象は欠失変異を有する患者のそれぞれ 13%、8%に留まる。一方で、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45-55 は遺伝子変異の集積領域であり、この領域のマルチエクソン・スキップ治療が実現すれば、欠失変異を有する患者の 60%以上が治療対象となりうる。また臨床症状としてエクソン 45-55 が欠失している患者では若干の心筋症状が認められるものの、骨格筋ではほぼ無症状であることが報告されており、エクソン・スキップにより誘導される短縮形

ジストロフィンの欠失パターンとしては、臨床上の改善が期待できる理想的な欠失パターンであると予想される。これまでに我々は *mdx52* マウスを用いてエクソン 45-55 をスキップさせた場合、短縮型ジストロフィンの発現が回復し、筋機能も改善することを証明した。この様に、エクソン 45-55 スキップは有効な治療戦略であるが、同領域を欠失した短縮型ヒトジストロフィンの機能とその役割や長期的な働きは未解明である。この点を明確にすることはエクソン・スキップ療法の発展を考えるうえで極めて重要である。今回我々は、エクソン 45-55 を欠失させたヒトジストロフィン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、同遺伝子が産生する短縮型ジストロフィンの機能を検証した。

B. 研究方法

1. トランスジェニックマウスの作出

エクソン 45-55 を欠失させたヒトジストロフィン遺伝子が CAG プロモーター下に発現するように設計した発現カセットを作成し、トランスジェニックマウス (Tg) を作出し、2 系統得た。作出はユニテック株式会社に依頼した。同マウスと DMD モデルマウスの *mdx* マウスとを交配させることにより、短縮型ジストロフィンのみが発現するマウス ($\Delta 45-55Tg/mdx$) を作出し、以下の解析を行った。

2. 表現型・筋機能解析

表現型解析の為に体重、筋重量、HE 染色による筋病理所見を正常マウス、*mdx* マウスと比較検討した。また、腹部大動脈より採血を行い、筋損傷の指標である血清クレアチンキナーゼ値を測定した。さらに、TREAT-NMD の指標に則り、グリップテスト、トレッドミル、ロータロッドを行い、筋機能を評価した。

また、正常マウス、Tg/*mdx* マウス、*mdx* マウスを解剖して得た骨格筋は、RT-PCR 解析、

組織学的解析、免疫組織化学染色、ウエスタンブロット、NOS 活性測定サンプルとして用いた。さらに、正常マウス、Tg/*mdx* マウス、*mdx* マウスより得られた初代筋芽細胞を用いて caffeine 拘縮によるリアノジン受容体の機能を、また長趾伸筋より得られた single fiber を用いて恒常的な細胞内カルシウム濃度を測定した。

C. 研究成果

$\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは短縮型 dystrophin は細胞膜に一様に発現しており、*mdx* マウスでは消失していた dystrophin 糖タンパク質複合体の各分子の発現が細胞膜に回復していた。 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスの骨格筋機能を正常マウス、*mdx* マウスと比較したところ、 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスは正常マウスと同程度の機能を有していた。一方で、 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは成長に伴う体重の増加が正常マウス、*mdx* マウスと比較して緩やかで、10 週齢の前脛骨筋 (TA) 重量、筋線維数、平均筋断面積は正常マウスと同程度であったが、20 週齢 TA では筋線維数は 3 群間で差はないものの、重量、平均筋断面積は正常マウスと比較して有意な低下を認めた。Fiber type 解析では $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは Type 2A 線維の増加と、Type 2B 線維の萎縮が認められた。その背景として $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスでは、一部の神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の局在が細胞膜から細胞質に変化しており、細胞質で活性化された nNOS が筋小胞体の Ryanodine receptor (RyR1) をニトロシル化し、恒常的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで、筋萎縮を惹起する Atrogin-1, MuRF1、筋線維組成を変化させる PGC1 α といったシグナル経路を活性化させていることを明らかにした。一方で、 $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスの RyR1 はニトロシル化されているもののその機能は保持されており、このことが $\Delta 45-55Tg/mdx$ マウスの筋機能が維持されていることと関連

していると考えられた。

D. 考 察

これまで臨床例からエクソン 45-55 を欠失したジストロフィンが高い機能を有することが明らかとなっていたが、今回我々は Δ 45-55Tg/*mdx* マウスを用いることにより、より詳細にエクソン 45-55 を欠失したジストロフィンの生体における役割やその影響を検討することができた。実際、エクソン 45-55 が欠失した dystrophin は全長 dystrophin とほぼ同等の機能を有することが示され、エクソン 45-55 を標的としたマルチエクソン・スキップ療法の重要性が証明された。また、 Δ 45-55Tg/*mdx* マウスは短縮型のジストロフィンのみが発現していることから、DMD の軽症型である Becker 型筋ジストロフィー (BMD) のモデル動物となり得ると考えられる。今後、 Δ 45-55Tg/*mdx* マウスの細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常的な上昇は RyR1 のニトロシル化以外にどの Ca^{2+} チャネルが関与するか、さらに、なぜ、RyR1 がニトロシル化されているものの機能が保持されているのかも併せてより詳細に検討する必要がある。

E. 結 論

Δ 45-55Tg/*mdx* マウスを用いたエクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの解析により、エクソン 45-55 を標的としたマルチエクソン・スキップ療法の重要性が証明されただけでなく、初めて BMD のモデル動物が作出できたと考えている。さらに、RyR1 等の細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する Ca^{2+} チャネルが DMD の治療標的となり得る可能性を示したと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

< 英文 >

【欧文原著・総説】

- 1) Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nishiyama A, Okada H, Takeda S, Okada T: Dystrophic *mdx* mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Hum Mol Genet.* 2014 Mar 24. [Epub ahead of print]
- 2) Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Initial Pulmonary Respiration Causes Massive Diaphragm Damage and Hyper-CKemia in Duchenne Muscular Dystrophy Dog. *Sci Rep.* 2013 Jul 15;3:2183. doi: 10.1038/srep02183.
- 3) Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-kasahara Y, Baba Y, Watanabe S, Takeda S, Okada T: Robust Long-term Transduction of Common Marmoset Neuromuscular Tissue With rAAV1 and rAAV9. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013 May 28, 2e95. Doi: 10.1038/mtna.2013.21.
- 4) Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Fukada SI, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Ohtsuka Y, Katanosaka Y, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T: Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 1;22(15):3003-15. doi: 10.1093/hmg/ddt157. Epub 2013 Apr 4.
- 5) Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T, Tanihata J, Nozohourmehrabad A, Panesar D, Miskew B, Aoki Y, Yokota T. :Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic *mdx* and *mdx52* mice. *PLoS*

【欧文著書】

なし

【和文原著・総説】

なし

【和文著書】

なし

II 学会発表

<国外>

【特別講演・シンポジウム】

なし

【国際学会】

1. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with Trans-Placental rAAV9-Microdystrophin Transduction. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013
2. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells That Can Differentiate To Form Myogenic Cells Is Enhanced by Expressing IL-10 in Dog with Duchenne Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013
3. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Effective Transduction of Cannon Marmoset with rAAV1 and 9 To Generate NHP Model of Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt Lake City, Utah, 5, 16, 2013

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

なし

【一般学会】

1. 古庄 知己, 岳 鳳鳴, 坂 翔太, 積田 奈々, 笠原 優子, 岡田尚巳, 水本 秀二, 小林 身哉, 中山 淳, 三宅 紀子, 野村 義宏, 江良 択実, 篠持 淳, 石川 真澄, 涌井 敬子, 福嶋 義光, 松本 直通, 菅原 一幸, 佐々木 克典, 武田伸一: デルマタン 4-O- 硫酸基転移酵素 (D4ST1) 欠損による Ehlers-Danlos 症候群 (DDEDS) の疾患モデルの構築と検証. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会, 仙台, 11.20, 2013
2. 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 青木 吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin の機能的役割の解明. 第 68 回日本体力医学会, 東京. 9.21-23, 2013
3. 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 岡田尚巳, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 9.21, 2013
4. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一郎, 千代智子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一, 戸田達史: 2 種類のフクチン欠損マウス用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 9.13, 2013
5. 坂 翔太, 笠原優子, 積田奈々, 山本和弘, 水本秀二, 千代智子, 谷端 淳, 三宅紀子, 岳 鳳鳴, 小林身哉, 中山淳, 佐々木克典, 福嶋義光, 松本直通, 菅原一幸, 野村義宏, 古庄智己, 武田伸一, 岡田尚巳: デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素 1 欠損型エーラスダンロス症候群モデルマウスの病態解析. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 9.13, 2013
6. 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 岡田尚

巳, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 第一回 MatriCell フォーラム, 三重, 9.7, 2013

7. 笠原優子, 喜納裕美, 千代智子, 岡田浩典, 岡田尚巳, 武田伸一: 骨髄間質細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の基盤研究. 第 34 回日本炎症・再生医学会, 京都, 7.3, 2013

【その他】

1. 岡田尚巳: AAV ベクター製造法の開発と臨床展開に向けた課題. 医薬品医療機器総合機構セミナー, 東京, 1.14, 2014
2. 武田伸一, 永田哲也, 齊藤 崇, 谷端 淳, 増田 智, 福田昂一, 清水玲子, 小牧宏文: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費平成 25 年度筋ジストロフィー合同班会議, 東京, 1.10, 2014
3. 関根光雄, 正木慶昭, 石井陽大, 山本恵士, 宮坂隆太, 岡庭夏己, 山田剛史, 大窪章寛, 清尾康志, 谷端 淳, 永田哲也, 武田伸一: 化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発—塩基部位と糖部位を同時に化学修飾した 2'-O-MCE RNA を用いる筋ジストロフィー治療薬の開発—. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.10, 2013
4. 横田俊文, 越後谷裕介, Joshua Lee, Joshua Kim, 永田哲也, 齊藤 崇, 谷端 淳, 増田 智, 青木吉嗣, William Duddy, Vincent Mouly, 武田伸一: ヒト DMD 遺伝子に対するエクソン 45-55 スキッピング. 国立精神・神経医療研究センタ

一精神・神経疾患研究開発費 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.10, 2013

5. 武田伸一, 永田哲也, 齊藤 崇, 谷端 淳, 増田 智, 福田昂一, 清水玲子, 小牧宏文: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.10, 2013
6. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 岡田尚巳: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.10, 2013
7. 武田伸一, 笠原優子, 喜納裕美, 倉岡睦季, 千代智子, 岡田浩典, 今川究, 藪田啓之, 立花克彦, 岡田尚巳: 骨髄間質細胞を応用した DMD に対する細胞移植治療の基盤研究. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5 「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸一) 平成 25 年度班会議, 東京, 12.9, 2013
8. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一郎, 千代智子, 鈴木友子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一: 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/細胞病態および治療に関する研究—2 種類のフクチン欠損マウスを用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 23-5 「筋ジストロフ

ーおよび関連疾患の診断・治療開発を
目指した基盤研究」(主任研究者：西野
一三)平成25年度班会議，東京，12.6,
2013

9. 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 弓削田直子, 千代智子, 増田千明, 岡田尚巳, 武田伸一: AAVベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療と免疫寛容誘導. 第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
10. 倉岡睦季, 木村円, 永田哲也, 岡田尚巳, 今村道博, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデルCXMDJを用いた血清オステオポンチンの解析. 第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
11. 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55を欠失した短縮型dystrophinの機能的役割の解明. 第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
12. Janek Hyzewicz, 倉岡睦季, 谷端 淳, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: Proteomic and carbonylation profile analysis of *mdx* mouse skeletal muscle following light endurance exercise. 第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
13. 金川 基, 游 智傑, 伊藤千代美, 深田宗一朗, 千代智子, 鈴木友子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一, 戸田達史: 2種類のフクチン欠損マウスを用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療. 第8回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
14. 岡田尚巳: AAVベクター作製法の開発と神経筋疾患遺伝子細胞治療への応用. タカラバイオ研究所所内セミナー, 滋賀, 9.20, 2013

登録

- 1) 武田伸一, 谷端 淳, 鈴木直樹, 鈴木友子, ユートロフィン遺伝子発現増強物質のスクリーニング, 特許第5250810号, 平成25年4月26日登録
- 2) 岡田尚巳, 小澤敬也, Gene introduction efficiency enhancer, 米国特許第US7988957 B2号, 平成23年8月2日登録

出願

- 1) 岡田尚巳, 笠原優子, 武田伸一: 移植用幹細胞及びその製造方法(MSC調整方法と移植効率向上に関する特許)特願2013-108408, 2013年5月22日出願
2. 実用新案登録
なし
3. その他、特記事項
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

厚生労働科学研究費補助金
(障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野))
平成 25 年度 分担研究報告書

メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップの検討

研究分担者 永田 哲也 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
遺伝子治療モデル動物開発室 室長

研究要旨

アンチセンス人工核酸を用いたエクソン・スキップ治療は DMD に対する新規治療法として期待されているが、その筋線維への取り込み機構はこれまで不明であった。昨年度、我々はジストロフィンの有無に関わらず、再生初期の筋線維ではアンチセンス人工核酸が高効率に取り込まれることを明らかにした。本年度はこの機序を他の遺伝性筋疾患であるメロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (MDC1A) に応用し、エクソン・スキップ治療の可能性について検討した。MDC1A モデルマウスは、LAMA2 遺伝子エクソン 4 の変異により、同遺伝子がコードするラミニン $\alpha 2$ 鎖が欠損して発症する。同モデルマウス由来の細胞を用いて、エクソン 4 をスキップさせるアンチセンス配列をスクリーニングし、最適な配列とその組み合わせを明らかにした。更にこの配列で合成したモルフォリノを同マウスに投与することにより、短縮型のラミニン $\alpha 2$ 鎖の回復を確認した。このことにより、MDC1A に対するエクソン・スキップを応用した治療の可能性が示された。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の治療方法としてエクソン・スキップは非常に有望視されており、国内外で治験が行われている。一方これまで、エクソン・スキップに使われているアンチセンス人工核酸は、正常な筋線維にはほとんど取り込まれず、ジストロフィン欠損の筋線維にのみ取り込まれる特性を持つと考えられてきた。しかし昨年度我々が報告したとおり、アンチセンス人工核酸は再生初期の正常筋線維にも取り込まれることが明らかになった。そこで、本年度は、DMD 以外の遺伝性筋疾患へのエクソン・スキップ治療の適応拡大を目的として研究を行った。今回、対象としたのはメロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (MDC1A) である。MDC1A は「非福山型先天性筋ジストロ

フィー」の 10~50% を占める重篤な遺伝性筋疾患である。LAMA2 遺伝子の異常により、筋肉の細胞膜の外側を覆う基底膜を構成するメロシン (ラミニン $\alpha 2$ 鎖) タンパク質が欠損し発症する。乳幼児期からの発育・発達遅延があり、座位は可能だが歩行は獲得できないことが多い。比較的進行は緩徐だが、呼吸不全により乳幼児期に死亡することがある。現在、有効な治療法は存在しておらず、新たな治療法の開発が期待されている。そこで MDC1A に対するエクソン・スキップの応用可能性について、本疾患のモデルマウスである dy3k/dy3k マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

今回、使用した dy3k/dy3k マウスは、ラミニ

ン $\alpha 2$ 鎖変異モデルマウスの中でも、同鎖の発現が骨格筋および末梢神経に全く認められないため症状は非常に重く、体重増加不良、筋力低下を呈し、生後 6-8 週で死亡する。筋病理所見では骨格筋の基底膜が欠落し、筋線維の壊死が認められる。筋線維は再生するがその程度は不良であり、結合組織の増加が認められる。しかしジストロフィンが発現しており、筋再生も認められることから、アンチセンス人工核酸の取り込み、およびエクソン・スキップの評価には適していると考えられた。本マウスは LAMA2 遺伝子のエクソン 4 にネオマイシン耐性遺伝子の挿入があるためフレームシフトが生じ停止コドンが出現する。アンチセンス人工核酸としてモルフォリノ (PMO) を用いて、LAMA2 遺伝子のエクソン 4 スキップを誘導できれば、エクソン 4 に相当する領域は欠損するが、不完全ながらも短縮型のラミニン $\alpha 2$ 鎖が産生される可能性がある。はじめに LAMA2 遺伝子のエクソン 4 に対して 7 種類の PMO をデザインした。その PMO を用いて dy3k/dy3k 由来の線維芽細胞で最も効果的にスキッピングを誘導する配列、およびその組み合わせを検討した。最も効果的な配列を用いて、生後 10 日目の前脛骨筋 (TA) に筋注 (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を行い、投与 15 日後に筋を回収し、スキッピングとラミニン $\alpha 2$ 鎖の発現を RT-PCR、シークエンスおよび蛍光免疫染色で解析した。さらに生後 10 日目のマウスに対して 150 mg/kg で腹腔内投与を行い、全身の筋での発現回復と生存に対する影響について検討した。

C. 研究成果

7 種類の PMO を作成し、dy3k/dy3k 由来線維芽細胞を用いてスクリーニングを行った。単独 PMO 投与および 15 種類の PMO の組み合わせで検討したところ、4B と 4D の PMO による組み合わせで、非常に効率的にエクソン 4 がスキップすることが明らかとなった。下記にその配列

を示す。

4B +45+69 TTCCAAAATCCAGTTTCCAGGCCGA

4D +96+120 TGTCACCCGCATGATACTGCCAGGGT

更に、この PMO の組み合わせを dy3k/dy3k の TA に投与したところ、同部位においてスキッピングが確認され、蛍光免疫染色でもラミニン $\alpha 2$ 鎖の発現が 20% 以上の線維で確認できた。また同マウスに対して PMO の腹腔内全身投与を行ったところ、RT-PCR によって標的としたエクソン 4 スキップが確認され、統計的な有意差はないが生存期間の延長を認めた。

D. 考察

今回の結果から、dy3k/dy3k マウスをモルフォリノ人工核酸により治療できる可能性が示された。ラミニン $\alpha 2$ 鎖は 6 つの domain からなるタンパク質であり、エクソン 4 に相当する領域は domain VI とされている。この部位を欠損させたマウスでは非常に表現型が軽いことが知られており、このことから、同マウスに対するエクソン 4 スキップは、治療手法としての理論的根拠を有していると考えられる。また、患者においてもエクソン 4 の点変異が報告されており、これらの患者に対しては本手法が応用可能と考えられる。今後、筋再生が活発な DMD 以外の遺伝性筋疾患を対象に、広くモルフォリノ人工核酸を用いた治療法を応用できる可能性が示された。

E. 結論

今回の研究成果により、DMD 以外の遺伝性筋疾患にも、モルフォリノ人工核酸を用いた新しい治療法が応用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

【欧文原著・総説】

1. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S: Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 15;22(24):4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
2. Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T, Tanihata J, Nozohourmehrabad A, Panesar D, Miskew B, Aoki Y, Yokota T. :Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic *mdx* and *mdx52* mice. *PLoS One.* 2013 Jul 24;8(7):e69194. doi: 10.1371/journal.pone.0069194. Print 2013.
3. Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Morita H, Nakajima T, Ozawa T, Aida I, Yonemochi Y, Higuchi S, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Ishihara T, Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Yatomi Y, Nagai R, Komuro I: Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy - Prospective multicenter cohort study. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 3;168(3):1900-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.12.058. Epub 2013 Jan 17.

【和文著書】

- 1) 永田哲也, 武田伸一: エクソン・スキップ. 筋疾患診療ハンドブック, 中外医学社, pp187-191, 2013

II 学会発表

1. 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏文, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験. 第 31 回日本神経治療学会総会, 文京区, 11.22, 2013

2. 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin の機能的役割の解明. 第 68 回日本体力医学会, 東京. 9.21-23, 2013
3. 永田哲也, 青木吉嗣, 武田伸一: モルフォリン・アンチセンス核酸が筋形質膜から取り込まれる機序についての検討. 第 14 回運動器科学研究会, 東京, 9.13, 2013

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

【登録】

- 1) 武田伸一、永田哲也、渡辺直樹、佐藤洋平, アンチセンス核酸, 特許第 5363655 号、平成 25 年 9 月 13 日登録

【出願】

- 2) 武田伸一, 永田哲也, 他: 「アンチセンス核酸」(日本新薬と共願) 2013 年 9 月 5 日出願 出願番号: 特願 2013-184193 (特願 2012-531987 の分割出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aoki Y, <u>Nagata T</u> , Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, <u>Takeda S</u>	Highly efficient <i>in vivo</i> delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice.	<i>Hum Mol Genet</i>	22	4914-28	2013
Rayavarapu S, Coley W, Cakir E, Jahnke V, <u>Takeda S</u> , Aoki Y, Grodish-Dressman H, Jaiswal JK, Hoffman EP, Brown KJ, Hathout Y, Nagaraju K	Identification of disease specific pathways using <i>in vivo</i> SILAC proteomics in dystrophin deficient <i>mdx</i> mouse	<i>Mol Cell Proteomics</i>	12	1061-73	2013
Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, <u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u>	Initial Pulmonary Respiration Causes Massive Diaphragm Damage and Hyper-CKemia in Duchenne Muscular Dystrophy Dog.	<i>Sci Rep.</i>	3	Online doi:10.1038/srep04914	2013

Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice

Yoshitsugu Aoki^{1,2}, Tetsuya Nagata^{1,*}, Toshifumi Yokota^{3,4}, Akinori Nakamura^{5,6},
Matthew J.A. Wood², Terence Partridge^{7,8} and Shin'ichi Takeda^{1,*}

¹Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Ogawa-Higashi 4-1-1, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan, ²Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QX, UK, ³Department of Medical Genetics, School of Human Development, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, 829 Medical Sciences Building, Edmonton, Canada AB T6G 2H7, ⁴The Friends of Garrett Cumming Research & Muscular Dystrophy Canada HM Toupin Neurological Science Endowed Research Chair, 829 Medical Sciences Building, Edmonton, Canada AB T6G 2H7, ⁵Department of Medicine (Neurology and Rheumatology), Shinshu University School of Medicine, 3-1-1, Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan, ⁶Division of Intractable Disease Care Center, Shinshu University Hospital, Matsumoto, 3-1-1, Asahi Matsumoto 390-8621, Japan, ⁷Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, 111 Michigan Avenue, NW, Washington, DC 20010, USA and ⁸Department of Integrative Systems Biology, George Washington University School of Medicine, 111 Michigan Avenue, NW, Washington, DC 20010, USA

Received April 10, 2013; Revised and Accepted July 12, 2013

Phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO)-mediated exon skipping is among the more promising approaches to the treatment of several neuromuscular disorders including Duchenne muscular dystrophy. The main weakness of this approach arises from the low efficiency and sporadic nature of the delivery of charge-neutral PMO into muscle fibers, the mechanism of which is unknown. In this study, to test our hypothesis that muscle fibers take up PMO more efficiently during myotube formation, we induced synchronous muscle regeneration by injection of cardiotoxin into the tibialis anterior muscle of *Dmd* exon 52-deficient *mdx52* and wild-type mice. Interestingly, by *in situ* hybridization, we detected PMO mainly in embryonic myosin heavy chain-positive regenerating fibers. In addition, we showed that PMO or 2'-*O*-methyl phosphorothioate is taken up efficiently into C2C12 myotubes when transfected 24–72 h after the induction of differentiation but is poorly taken up into undifferentiated C2C12 myoblasts suggesting efficient uptake of PMO in the early stages of C2C12 myotube formation. Next, we tested the therapeutic potential of PMO for laminin- α 2 chain-null *dy^{3K}/dy^{3K}* mice: a model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy (MDC1A) with active muscle regeneration. We confirmed the recovery of laminin- α 2 chain and slightly prolonged life span following skipping of the mutated exon 4 in *dy^{3K}/dy^{3K}* mice. These findings support the idea that PMO entry into fibers is dependent on a developmental stage in myogenesis rather than on dystrophinless muscle membranes and provide a platform for developing PMO-mediated therapies for a variety of muscular disorders, such as MDC1A, that involve active muscle regeneration.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD), the most common form of muscular dystrophy, involves progressive deterioration of muscle function. DMD is caused mainly by a frameshift

deletion, nonsense or duplication mutations in the *DMD* gene, which encodes the protein dystrophin (1). The milder Becker muscular dystrophy (BMD) typically results from in-frame deletions in the *DMD* gene that allows the expression of limited amounts of an internally truncated but functional protein (2).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 423461720; Fax: +81 423461750; Email: takeda@ncnp.go.jp (S.T.); nagatat@ncnp.go.jp (T.N.)

In recent years, RNA-targeted splice-correction therapy by antisense oligonucleotide (AO) in DMD muscle with the object of restoring an in-frame, Becker-like transcript is among the more promising therapeutic approaches to treating DMD (3,4). To this end, systemic administration of AO, such as phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs), targeting specific exon(s) in the *Dmd* gene has been shown to restore the reading frame and induce body-wide production of partially functional BMD-like dystrophin in mouse and dog models of DMD (5–8). Currently, this method was shown to be promising and safe in phase II trials with PMO (9) or 2'-*O*-methyl phosphorothioate (2'OMePS), which is also the most common AO (10), targeting exon 51 for DMD.

PMO, which has a neutral chemistry, provides outstanding safety characteristics and excellent *in vivo* efficacy and is suitable for human use. Moreover, PMO is being used extensively as a tool for selective inhibition of gene expression in cell culture models. However, the poor delivery of the PMO limits the application of PMO-mediated therapy for DMD or other muscular dystrophies. At present the precise mechanism of PMO entry into dystrophin-deficient muscle fibers is still unknown (11,12). A dominant hypothesis is that PMO enters dystrophin-deficient muscle fibers as a result of abnormal membrane permeability, a so-called 'leaky membrane' (13,14).

Here, we show that embryonic myosin heavy chain (eMHC) and dystrophin double-positive regenerating myotubes can incorporate PMO efficiently into *Dmd* exon 52-deficient *mdx52* (15) and wild-type (WT) mice. Our *in vitro* studies of C2C12 myoblasts suggest that PMO or 2'OMePS is taken up preferentially into muscle cells during the process of myotube formation. We also tested the therapeutic potential of PMO treatment on the *dy^{3K}/dy^{3K}* mouse (16): a model of laminin- α 2 chain (merosin)-deficient congenital muscular dystrophy (MDC1A) (MIM156225) with active muscle regeneration. Our results support the idea that PMO entry into muscle fibers is dependent on a developmental stage in myogenesis rather than on an intrinsic defect in the membrane of dystrophinless muscle fibers: the 'leaky-membrane' hypothesis. As such it provides a platform for developing PMO-mediated therapies for a variety of muscular disorders, such as MDC1A, that involve active muscle regeneration.

RESULTS

Induction of exon 51 skipping in dystrophin-deficient *mdx52* but not in WT mice after systemic PMO injection, suggesting abnormally high membrane permeability in *mdx52* mice

To examine the effect of systemic PMO-mediated exon 51 skipping (Supplementary Material, Fig. S1A), we injected 5-week-old *mdx52* and BL6 WT mice with a single dose of 51Do (Table 1), which targets the splice donor site of exon 51

of the *Dmd* gene, at a range of doses 80, 160, 320 or 640 mg/kg. Two weeks after the injection, the gastrocnemius muscles were isolated and analyzed by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR). We could detect no skipped bands in WT mice but exon 51 skipping was induced in a highly dose-dependent manner with the range of 80–640 mg/kg doses, showing approximately up to 90% skipping efficiency in *mdx52* mice by RT–PCR (Supplementary Material, Fig. S1B).

Enhancement of dystrophin expression after intramuscular injection of PMO into very actively regenerating TA muscles of *mdx52* mice at 5 weeks of age

To investigate the mechanism of PMO uptake into muscle fibers, we first evaluated the percentage of centrally nucleated fibers, a marker of regenerated fibers, across a range of ages in *mdx52* ($n = 3$, each age group). Centrally nucleated fibers appeared around 3 weeks, dramatically increased around 4–5 weeks and reached 80% after 16 weeks in *mdx52* mice (Fig. 1A and B) (Supplementary Material, Fig. S2). Next, we injected PMO 51Do (400 μ g/kg body weight) into both tibialis anterior (TA) muscles of *mdx52* mice aged 3–32 weeks to induce exon 51 skipping (Fig. 1C) and evaluated the extent of dystrophin expression by immunohistochemistry. Two weeks after the injection, the TA muscles were isolated and analyzed by immunohistochemistry. The percentage of dystrophin-positive fibers was 45% on average when PMO was injected at 4 weeks and approximately 20% when PMO was injected from 6 to 32 weeks (Fig. 1D and E). We found that the percentage of dystrophin-positive fibers was highest when PMO was injected into *mdx52* mice at age 5 weeks when muscle regeneration was very active.

Classification of dystrophin-positive fibers into two types: Bromodeoxyuridine-positive small-caliber fibers and bromodeoxyuridine-negative normal-caliber fibers in *mdx52* mice

To further investigate the phase of PMO uptake, we administered bromodeoxyuridine (BrdU) in the drinking water (0.8 mg/ml) for 6 days after a single intramuscular injection of PMO 51Do (400 μ g/kg body weight) to label newly regenerated fibers. We injected into TA muscle of *mdx52* mice aged 5 and 32 weeks. Mice were killed 2 weeks after the PMO injection and TA muscles were removed and analyzed by immunohistochemistry for dystrophin, BrdU and DAPI (Fig. 2A). We found that dystrophin-positive fibers could be classified into two types: BrdU-positive small-caliber fibers with diameters of 30–40 μ m and BrdU-negative normal-caliber fibers with diameters of 40–60 μ m at 5 and 32 weeks in *mdx52* mice (Fig. 2B and C). The total numbers of dystrophin-positive fibers were significantly higher in the mice injected with PMO at 5 weeks than at 32 weeks

Table 1. AO sequence of PMO or 2'OMePS against exon 51 of the *Dmd* gene of mice used in this study

Name	Position	Sequence
51Do	+10–15	TTGTTTTATCCATACCTTCTGTTG

Table 2. Probe sequences against 51Do for *in situ* hybridization used in this study

Name	Sequence
Positive probe	CAAACAGAAGGTATGGATAAAACAA
Negative probe	TTGTTTTATCCATACCTTCTGTTG

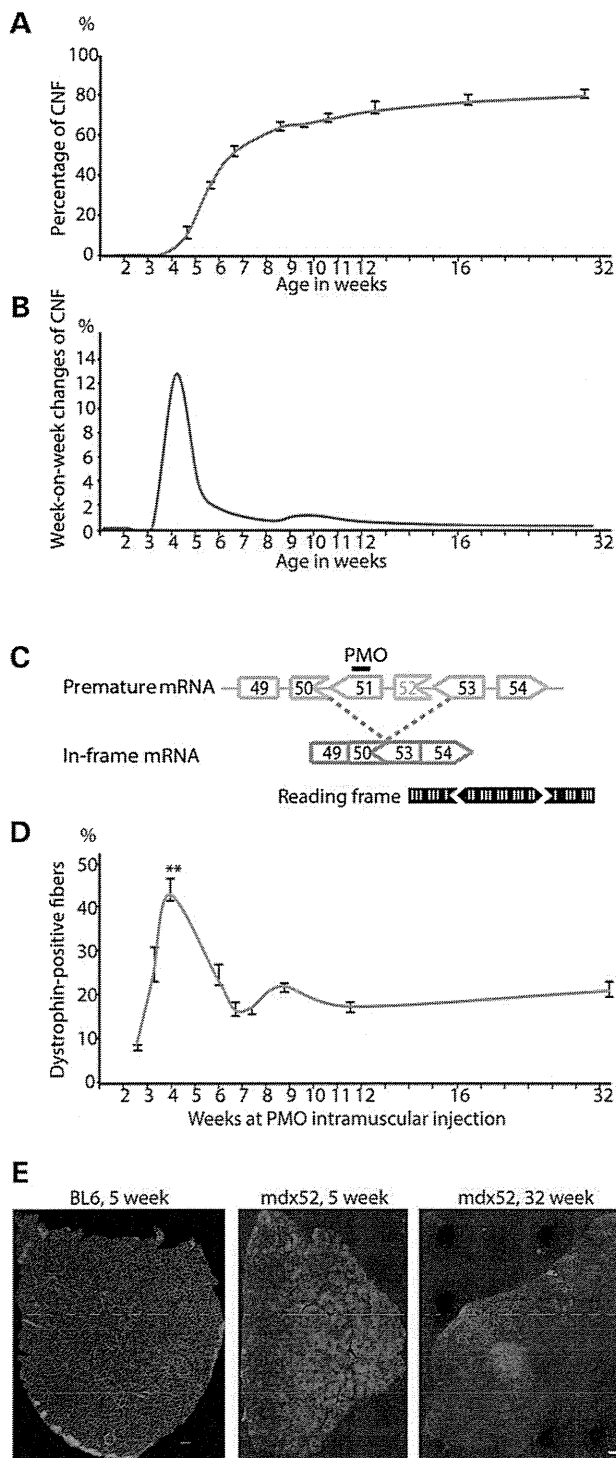


Figure 1. Evaluation of the optimal injection age of PMO into TA muscle in *mdx52* mice. (A) Percentage of centrally nucleated fibers (CNFs) in TA muscle of *mdx52* mice according to ages is calculated. The data ($n = 3-5$) are presented as mean \pm SD. (B) Week-on-week percentage changes of CNF in TA muscle of *mdx52* mice according to ages. $n = 3-5$. (C) Strategy for exon 51 skipping in *mdx52* mouse. Exon 51 skipping by appropriate phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO), indicated by a black line, can restore the reading frame of dystrophin in the *mdx52* mouse, which lacks exon 52 in the mRNA of the murine *Dmd* gene, leading to out-of-frame products. (D) Percentage of dystrophin-positive fibers according to the injection ages after intramuscular injection of PMO into

and the proportion that were of BrdU-positive, small-caliber fibers was also significantly greater (Fig. 2D). Then, we injected PMO (320 mg/kg) into the tail vein of *mdx52* mice at 5 weeks, which were administered of BrdU in the drinking water (0.8 mg/ml) for 6 days, and performed immunohistochemistry for dystrophin, BrdU and DAPI 2 weeks after the injection (Fig. 2E). A significantly large number of BrdU-positive fibers (303/314, 96.50%) exclusively expressed dystrophin compared with the BrdU-negative fibers (185/943, 19.62%) ($P < 0.001$ by Fisher's exact test) (Fig. 2F). These data suggest that immature regenerated fibers, which are called myotubes, could take up PMO more efficiently than mature fibers.

Efficient PMO entry into regenerated fibers at 4 days after cardiotoxin injection in *mdx52* mice

In this study, we evaluated the mechanism of PMO entry into small-caliber BrdU-positive fibers. To induce the synchronous regeneration of fibers, cardiotoxin (CTX) was injected intramuscularly into TA muscle of *mdx52* mice at age 5 weeks (Supplementary Material, Fig. S3). At 1–5 days after CTX injection, PMO (400 μ g/kg body weight) targeting the splice donor site of exon 51 was injected into each TA muscle followed by oral administration of BrdU (0.8 mg/ml) for 7 days (Fig. 3A). Two weeks later, TA muscles were obtained and analyzed by RT-PCR, immunohistochemistry and western blotting. The percentage of dystrophin-positive fibers by immunohistochemistry (Fig. 3B and C) and dystrophin expression level by western blotting (Fig. 3D and E) peaked in muscles where PMO had been injected at 4 days after CTX injection. On histology, the TA muscle BrdU and eMHC double-positive small-caliber fibers were seen at high levels at 4 days after CTX injection (Supplementary Material, Fig. S4). These results suggest that PMO was taken up very efficiently when eMHC-positive small-caliber fibers were mainly seen in *mdx52* mice.

Dramatic induction of exon 51 skipping following systemic PMO injection at 4 days after CTX injection into TA muscles of WT mice

Then we examined the localization of PMO in muscle cryosections using fluorescein-conjugated PMO (f-PMO). First, f-PMO (400 μ g/kg body weight) targeting the splice donor site of exon 51 was injected into each TA muscle of *mdx52* mice at age 5 weeks. Two weeks later, TA muscles were obtained and analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry. We found that both PMO and f-PMO could induce similarly efficient exon 51 skipping and dystrophin expression at the fiber membrane (Supplementary Material, Fig. S5A and B).

We next investigated whether the f-PMO is taken up into eMHC-positive regenerated fibers after CTX injection into

TA muscle of *mdx52* mice. The data ($n = 3-4$) are presented as mean \pm SD. ** $P < 0.01$. (E) Immunohistochemical staining for dystrophin, in the TA muscle of *mdx52* mice at 5 or 32 weeks of PMO injection age. The restoration of dystrophin in the TA muscles was examined 2 weeks after the injection of PMO (400 μ g/kg body weight). One representative out of three independent experiments is shown. BL6: TA muscle from a WT C57/BL6. *mdx52*, 5w: PMO-treated TA muscle from *mdx52* mice at 5 weeks. *mdx52*, 32w: PMO-treated TA muscle from *mdx52* mice at 32 weeks. Scale bar: 100 μ m.

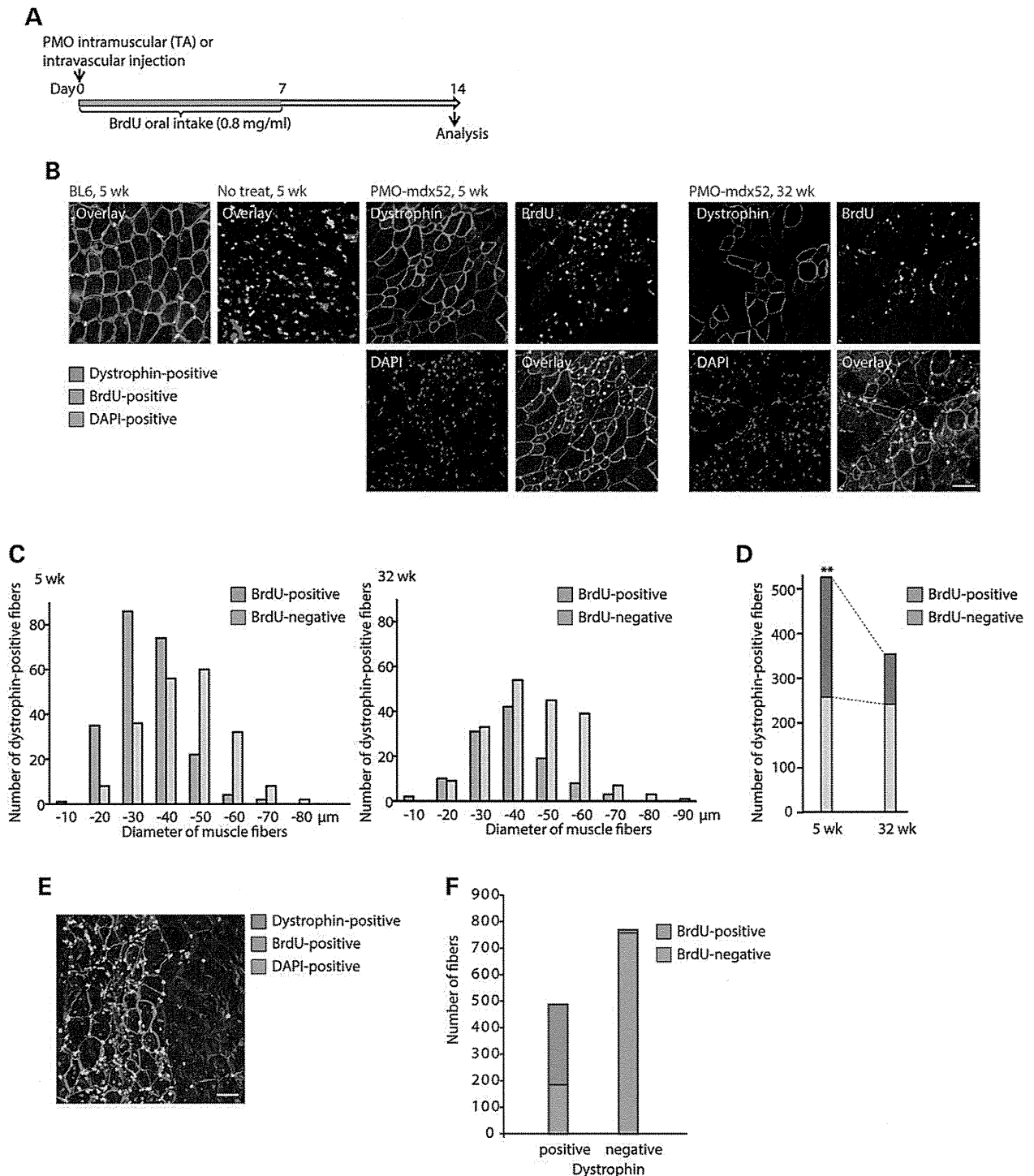


Figure 2. Evaluation of dystrophin-positive fibers using BrdU after intramuscular injection of PMO into the TA muscle of *mdx52* mice. (A) Experimental model of PMO injection into TA muscle of *mdx52* mice. PMO (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) was injected into the TA muscles of *mdx52* mice at 5 or 32 weeks and immunohistochemistry performed 2 weeks after the injection, respectively. (B) Triple immunohistochemical staining of cryosections in TA muscle of *mdx52* mice at 5 weeks or 32 weeks for dystrophin, BrdU and DAPI. BL6: TA muscle from a WT C57/BL6. No treat: Untreated TA muscle from *mdx52* mice. Data are representative of four independent experiments. Scale bar, 50 μm . (C) Histogram of BrdU-positive or BrdU-negative fibers among dystrophin-positive fibers in the TA muscle of *mdx52* mice at 5 or 32 weeks of injection age, $n = 4$. (D) Number of BrdU-positive or BrdU-negative fibers among dystrophin positive fibers at 5 or 32 weeks of injection age in *mdx52* mice. The data ($n = 4$) are presented as mean \pm SD, $**P < 0.01$. (E) Evaluation of dystrophin-positive fibers using BrdU after systemic injection of PMO (320 mg/kg) into *mdx52* mice at 5 weeks. Triple immunohistochemical staining of cryosections in TA muscle of *mdx52* mice for dystrophin, BrdU and DAPI. Data are representative of four independent experiments. Scale bar: 50 μm . (F) Statistical analysis of dystrophin-positive fibers using BrdU after systemic injection of PMO into *mdx52* mice. Fisher's exact test was used to test for the relationship between the BrdU and dystrophin expressions. $***P < 0.001$.