

201446028A

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業
(障害者対策総合研究開発事業(神経・筋疾患分野))

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の
臨床開発に資するバイオマーカーの探索

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 武田 伸一

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業
(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する
エクソン・スキップ治療薬の
臨床開発に資するバイオマーカーの探索

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 武 田 伸 一

平成27 (2015) 年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業 障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野））による委託業務として、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターが実施した平成26年度「デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療薬の臨床開発に資するバイオマーカーの探索」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソ ン・スキップ治療薬の臨床開発に資するバイオマー カーの探索 - 平成26年度の総括について - 武田 伸一	----- 1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. DMD患者由来血清のマイクロRNA発現の解析 橋戸 和夫	----- 7
2. イメージング解析によるジストロフィン定量測定法 の検討 小牧 宏文	----- 11
3. バイオマーカーの変動に影響を与える因子の検討 永田 哲也	----- 19
III. 学会等発表実績	----- 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31

厚生労働科学研究委託費
(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))
平成 26 年度 委託業務成果報告 (総括)

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療薬の
臨床開発に資するバイオマーカーの探索
-平成 26 年度の総括について -

業務主任者 武田 伸一 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・メディカルセンター
センター長

研究要旨

本研究課題では、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対するエクソン・スキップ治療薬の臨床開発に資するバイオマーカーの探索研究として、ジストロフィン関連マイクロ RNA の解析、及びイメージング解析によるジストロフィン定量測定法の開発を中心として実施するものである。本研究で検討した解析方法及びバイオマーカー候補は、最終的に開発中の DMD 治療薬 NS-065/NCNP-01 の早期探索的臨床試験で得られた被験者由来検体を用いて評価することとしている。平成 26 年度は概ね研究計画に沿った成果を得るとともに、次年度に向けた課題の抽出を完了することができた。平成 27 年度はこれまでの成果を踏まえて、NS-065/NCNP-01 を投与された被験者由来検体を用いた解析を進めることとしている。

業務項目担当責任者

橋戸 和夫

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 ラジオアイソトープ管理室 室長

業務項目：DMD 患者由来血清のマイクロ RNA 発現の解析

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

業務項目：イメージング解析によるジストロフィン定量測定法の検討

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 客員研究員

業務項目：バイオマーカーの変動に影響を与える因子の検討

A. 研究目的

ジストロフィン欠損で発症する致死性の遺伝性筋疾患デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対する新規医薬品として、エクソン 53 スキップを作用機序とするモルフォリノ核酸医薬品としては世界初の DMD 治療薬 (NS-065/NCNP-01) の first-in-human 試験が、平成 25 年より医師主導による早期探索的臨床試験として本センターにおいて開始された。しかし本薬のように、ジストロフィンの発現回復を機序とする DMD 治療薬の歴史は浅く、試験デザイン及び有効性評価手法については模索が続いている状況である。このような中、エクソン・スキップ治療薬の効果の直接的な指標となるジストロフィン発現量、またジストロフィン関連マイクロ RNA の発現状態と臨床症状の相関などが、DMD 治療薬の有効性評価における重要な要素として認識されつつある。本研究事業では全実施期間

を通して、DMD 治療薬の臨床開発に貢献しうる上記のバイオマーカー、また未だ見出されていない新規バイオマーカーについて、実施中の早期探索的臨床試験、及び今後計画されている次相試験プロトコルの立案作業と連動しつつ、被験者由来検体及びモデル動物等も用いた解析を通して、その発現プロファイル等を明らかにし、本治療薬を含めたDMD 治療薬の有効性評価に資するバイオマーカーの活用についての知見を明らかにすることを目的としている。平成 26 年度は概ね研究計画に沿った成果を得るとともに、次年度に向けた課題の抽出を完了できたと考えられ、その概要について以下に総括する。

B. 研究方法

①DMD 患者由来血清のマイクロ RNA 発現の解析

DMD 患者では、血清中のマイクロ RNA レベルが運動能力と負の相関を示し、さらに BMD, LGMD, FSHD 患者においても健常者と比べて有意な上昇がみられることから、筋疾患に対するバイオマーカーとなることが示唆されている。本年度はヒト DMD 患者検体の定量的 RT-PCR を行い、これらの患者におけるマイクロ RNA 発現量の予備的解析を行った。

②イメージング解析によるジストロフィン定量測定法の検討

ジストロフィン及びコントロールタンパク質の二重蛍光免疫染色を行い、画像解析ソフトウェアを用いた解析により、正常対照検体に対する相対的なジストロフィンの定量を試みる。本年度は被験者から得られた骨格筋生検検体への同手法の適用を目指し、最適な蛍光色素の選択について検討した。

③バイオマーカーの変動に影響を与える因子の検討

DMD 患者のバイオマーカーに影響を与える因子の一つとして、エクソン・スキップ治療

薬に係る免疫反応、即ち治療薬自身に対する抗体、及び発現したジストロフィンに対する抗ジストロフィン抗体の出現が懸念されている。今年度は抗ジストロフィン抗体を検出する手法の検討を行った。

(倫理面への配慮) 実施中の早期探索的臨床試験 (UMIN000010964, NCT02081625) にて得られた検体を用いる場合は、国立精神・神経医療研究センター治験審査委員会の承認を得た方法で実施した。その他の実験においても各種研究指針を遵守して実施した。

C. 研究結果

①DMD 患者および健常者の血清をエクソソーム分画およびエクソソーム欠失上清分画に分け、miR-1, miR-133a, miR-206 レベルを定量的 RT-PCR によって測定しところ、両分画において3つのマイクロ RNA レベルが健常者と比べて有意に上昇していた。また BMD, DM1, LGMD, FSHD, 及び DMRV 患者血清のマイクロ RNA 発現レベルを健常者と比較したところ LGMD, FSHD, BMD 患者血清において miR-1 レベルが、また BMD 患者血清において miR-133a 及び miR-206 レベルが健常者と比べて有意に上昇していた。以上のように本項目については患者由来血清を用いた解析を予定どおり実施し、病態との関連について知見を得ることができたため、所期の目的は達したものと考えられる。

②これまでの予備検討の結果、ジストロフィン及びコントロールタンパク質の二重蛍光免疫染色のイメージング解析により、正常対照、BMD 患者、及び DMD 患者由来の骨格筋由来検体間で、スペクトリン/ジストロフィン二重蛍光免疫染色画像における、ジストロフィン輝度の相対定量が可能であったことから、同手法の被験者由来検体への適用を試みた。一方、二重免疫蛍光染色においてジストロフィンを検出する蛍光のバックグラウンドが

高いという問題点が認められたことから、これを改善するために、二重染色に用いる蛍光色素の最適な組み合わせを探索した。その結果、使用する共焦点レーザー顕微鏡に装備されている励起レーザー波長の種類を踏まえた蛍光色素の選択が重要であることが明らかとなった。さらに画像解析ソフトウェア上での解析アルゴリズム最適化を行うことで、バックグラウンドのレベルを低減することが可能であった。現在、同アルゴリズムの最適化作業を継続しており、本項目については被験者検体の解析完了という所期の到達目標には至らなかったものの、次年度に向けての課題と解決すべき検討事項が明らかとなった。

③本年度は抗ジストロフィン抗体の検出を目的としたウェスタンブロットによる解析手法の確立を目指した。抗ジストロフィン抗体の出現が想定される被験者の血清を一次抗体、さらに標識された抗ヒトIgG抗体を二次抗体とする系を構築し、正常ヒト由来サンプルに含まれるジストロフィンが検出されるかを検討したところ、正常ヒト由来血清を用いた場合、構築した系ではジストロフィン検出されなかった。抗ジストロフィン抗体そのものの検出は技術的に克服すべき点が多いが、本項目については目的とする解析系の構築についてほぼ達成できたと考えられる。

D. 考 察

達成度について、本年度はイメージング解析によるジストロフィン定量測定において、画像解析アルゴリズムの最適化の必要性が生じた点を除いて、計画全体としてはほぼ所期の目標を達成できたと考えられる。平成27年度はこれまでの成果を踏まえて、主に被験者由来検体を用いた上記バイオマーカーの解析に取り組むこととしている。研究成果の学術的意義については、DMD、BMD、DM1、LGMD、FSHD、及びDMRV患者の血清マイクロRNA解析は、種々の筋疾患におけるマイクロRNA

の動態について報告したもので、これまでの本分野における先行研究と比較しても最も包括的な研究の一つであり、DMDのみならず多くの筋疾患に対する治療研究の今後の展開に繋がる学術的に重要な成果である。さらに今年度はバイオマーカー探索手法として注目されるプロテオーム解析の有用性について、DMDモデルマウスを用いた検討結果を報告することができた。また研究成果の行政的意義については、対象疾患であるDMDは難治性・希少性疾患であり、本疾患に対する治療薬の開発は、我が国の医療水準の向上、また新たな治療薬の普及という医療経済的効果が期待できる。本研究で開発を進めるDMD治療剤NS-065/NCNP-01は、PMDAとの薬事戦略相談を通じた、当局との綿密な相談に基づいており、画期的なシーズの実用化を目指す政府の「健康・医療戦略」とも整合性を有していると考えられた。またその他特記すべき事項として、現在実施中のNS-065/NCNP-01の早期探索的臨床試験は、試験デザイン検討、被験者組み入れ、監査・モニタリング、データマネジメント等の治験関連業務を、医療技術実用化総合研究事業(H24-臨研推-一般-010)の支援を受け、本研究課題と連携しつつ実施している。

E. 結 論

本研究課題では、エクソン・スキップ治療薬の臨床開発に資するバイオマーカーの探索研究として、ジストロフィン関連マイクロRNA解析と蛍光免疫染色とイメージングによるジストロフィン定量測定を中心として、被験者由来検体を用いた評価により検討することとしている。平成26年度は概ね研究計画に沿った成果を得るとともに、次年度に向けた課題の抽出を完了することができた。平成27年度はこれまでの成果を踏まえて、NS-065/NCNP-01を投与された被験者由来検体を用いた解析を進めることとしている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

- 1 Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, Motomura M, Yoshida N, Beeson D, Takeda S, Yamanashi Y. Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science*. 2014;345(6203):1505-1508.
- 2 Hathout Y, Marathi RL, Rayavarapu S, Zhang A, Brown KJ, Seol H, Gordish-Dressman H, Cirak S, Bello L, Nagaraju K, Partridge T, Hoffman EP, Takeda S, Mah JK, Henricson E, McDonald C. Discovery of serum protein biomarkers in the mdx mouse model and cross-species comparison to Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet*. 2014;23(24):6458-6469.
- 3 Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, Takeda S, Hashido K. Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med*. 2014;19(6):452-458.
- 4 Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda S, Nishino I, Kimura E. Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:150.
- 5 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;23(15):3990-4000.
- 6 Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Ikemoto T, Matsuda R, Takeda S. alpha1-Syntrophin-deficient mice exhibit impaired muscle force recovery after osmotic shock. *Muscle Nerve*. 2014;49(5):728-735.
- 7 Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S. Intra-Amniotic rAAV-Mediated Microdystrophin Gene Transfer Improves Canine X-Linked Muscular Dystrophy and May Induce Immune Tolerance. *Mol Ther*. 2015.
- 8 Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. *Free Radic Biol Med*. 2015.
- 9 Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development*. 2015;142(1):51-61.
- 10 Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T. Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci Rep*. 2015;5:8316.

II. 学会発表

- 1 Takeda S: Gene Therapy in DMD, Updates and Future Prospects.13th Annual Asean Oceanian Myology Center (AOMC) and 20th Philippine Neurological Association (PNA) Midyear convention, 5.16, 2014
- 2 Takeda S: Molecular mechanism of muscle hypertrophy; our current attempt to do exon skipping clinical trial.Seminar at The Ohio State University College of Medicine, 5.27, 2014
- 3 Takeda S: Making skeletal muscle from induced Pluripotent Stem (iPS) cells.Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells FASEB, 7.24, 2014
- 4 Saito T, Nagata T, Masuda S, Tanihata J, Ohata M, Tamaura A, Kanazawa M, Minami N, Goto K, Hayashi Y, Iwasawa K, Tatezawa K, Fukuda K, Mizutani T, Shimizu R, Suzuki M, Yamaguchi K, Tachimori H, Nishino I, Goto Y, Komaki H, Takeda S: Assessment of the Dystrophin Gene Exon 53 Skipping Using DMD Patient-Derived Fibroblasts for Exploratory Clinical Trial of Antisense Drug NS-065/NCNP-01.American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 5.21, 2014
- 5 Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada H, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S: Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy With rAAV9-Microdystrophin Transduction.American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 5.23, 2014
- 6 Kimura E, Nakamura H, Khayashi Y, Mori-Yoshimura M, Shimizu R, Komaki H, Nishino I, Kawai M, Takeda S: DMD/BMD patient registry in Japan: Remudy. 13th International Congress on Neuromuscular Diseases ICNMD, 7.7, 2014
- 7 Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Proteomic analysis shows that low intensity training reduces the carbonylation level and increases the expression of energy metabolism and muscle contraction proteins in mdx skeletal muscle.43th European Muscle Conference, 9.11, 2014
- 8 Takeuchi F, Nakamura H, Mitsuhashi S, Mori-Yoshimura M, Hayashi Y.K, Shimizu R, Komaki H, Nishino I, Kawai M, Takeda S, Kimura E: National registry of Japanese dystrophinopathy patients: Remudy.19th International Congress of the World Muscle Society, 10.9, 2014
- 9 Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Murata M, Takeda S, Nishino I, Kimura E: Nationwide Patient registry of GNE myopathy in Japan.19th International Congress of the World Muscle Society, 10.9, 2014
- 10 Tanihata J, Nagata T, Saito T, Ito N, Aoki Y, Nakamura A, Takeda S: Truncated dystrophin with exon 45–55 deletion induced muscle atrophy and fiber type change through the hyper-nitrosylation of the ryanodine receptor type-1 and constant release of Ca²⁺ to the cytosol.19th International Congress of the World Muscle Society, 10.8, 2014
- 11 Takeda S: The molecular mechanisms of skeletal muscle hypertrophy and atrophy -nNOS is a physiological regulator of muscle mass-.11th Meeting of Bone Biology Forum, Fuji Institute of Education and Training, 8.22, 2014

- 12 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ誘導療法.第55回日本神経学会学術大会, 5.23, 2014
- 13 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するNS-065/NCNP-01の早期探索的臨床試験.アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014, 9.8, 2014
- 14 武田伸一: ここまできた難治性筋疾患の治療法.平成26年度 愛知県医師会治験講演会, 9.23, 2014
- 15 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療.東邦大学薬学部 第33回生命科学シンポジウム, 10.29, 2014
- 16 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療法の現状.第6回東海神経筋疾患懇話会, 10.31, 2014
- 17 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療へ『筋ジストロフィー医療50周年記念シンポジウム「筋ジストロフィー医療の転換点をむかえて」』.第68回国立病院総合医学会, 11.15, 2014
- 18 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するアンチセンス核酸医薬品の開発を目指して.日本DDS学会創立30周年記念シンポジウム, 遺伝子医療・核酸医薬品とDDS, 12.15, 2014
- 19 武田伸一: 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンターにおける医師主導治験の実際.革新的医療研究開発で挑む神経変性疾患—プリオン病治験体制の確立に向けて—, 2.14, 2015
- 20 永田哲也, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン53スキップ治

療薬の早期探索的臨床試験.第55回日本神経学会学術大会, 5.24, 2014

- 21 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 伊藤尚基, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55を欠失した短縮型dystrophinはRyR1をニトロシル化し、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる.第69回日本体力医学会大会, 9.20, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
(出願予定) ジストロフィン陽性線維の計測方法
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費
(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))
平成 26 年度 委託業務成果報告 (業務項目)

DMD 患者由来血清のマイクロ RNA 発現の解析

担当責任者 橋戸 和夫 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 ラジオアイソトープ管理室 室長

研究要旨

DMD に対するエクソン・スキップ治療薬の有効性を評価するための指標となる新たなバイオマーカーの確率を目的として血清中の骨格筋特異的マイクロ RNA の定量を行い、患者血清で有意に高いことを明らかにした。DMD 治療薬の薬効評価を行う上で有用なマーカーとなることが期待される。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療薬の有効性を評価する上で、筋疾患の病態と相関が示唆される骨格筋特異的マイクロ RNA について、実施中の早期探索的臨床試験と連動しつつ、その発現プロファイルを明らかにすることにより、DMD 治療薬の臨床開発に資するバイオマーカーとしての有用性についての知見を得ることを目的とする。今年度は、DMD を含む各種筋ジストロフィー患者血清について定量的 RT-PCR を行い、マイクロ RNA 発現量の予備的解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

DMD 患者および健常者の血清をエクソソーム抽出キットを用いてエクソソーム沈殿分画とエクソソームを欠損する上清分画に分ける。それぞれの分画から RNA を抽出し、骨格筋特異的な 3 種類のマイクロ RNA についてリアルタイム PCR を行うことにより定量した。

また、DMD 以外の筋ジストロフィー患者 (BMD, DM1, LGMD, FSHD, および DMRV 患者) 血清から RNA を抽出し、リアルタイム PCR により骨格筋特異的マイクロ RNA の

発現レベルを健常者と比較した。

(倫理面への配慮)

筋ジストロフィー患者および健常者の血清を用いる場合は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得た方法で実施した。

C. 研究結果

1. DMD 患者および健常者の血清をエクソソーム分画およびエクソソーム欠失上清分画に分け、miR-1, miR-133a, miR-206 レベルを定量的 RT-PCR によって測定しところ、両分画において 3 種類のマイクロ RNA レベルが健常者と比べて有意に上昇していた (Fig. 1)。

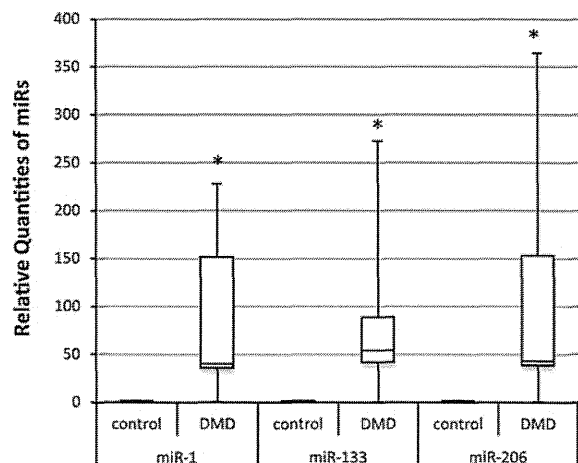


Fig. 1 DMD 患者および健常者血清のマイクロ RNA 発現レベル

さらに、DMD 患者の血清について、エクソソーム分画およびエクソソーム欠失上清分画における miR-1, miR-133a, miR-206 レベルを定量的 RT-PCR によって測定しところ、エクソソーム分画における miR-133a レベルがエクソソーム欠失上清分画と比べて有意に上昇していた (Fig 2)。

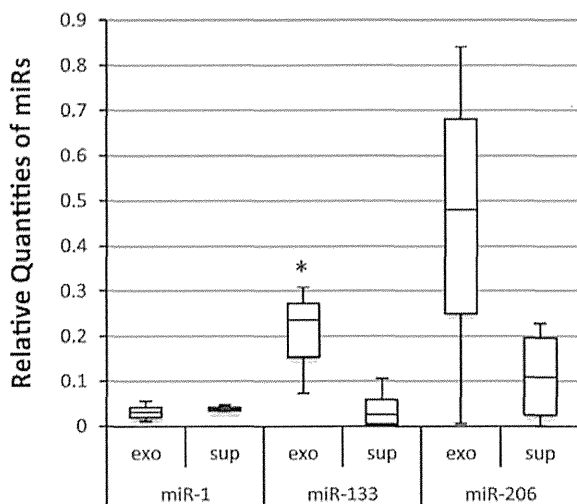


Fig. 2 エクソソーム分画およびエクソソーム欠失上清分画におけるマイクロ RNA 発現レベル

2.. BMD, DM1, LGMD, FSHD, および DMRV 患者血清のマイクロ RNA 発現レベルを健常者と比較したところ LGMD, FSHD, BMD 患者血清において miR-1 レベルが、また BMD 患者血清において miR-133a 及び miR-206 レベルが健常者と比べて有意に上昇していた (Fig. 3)。

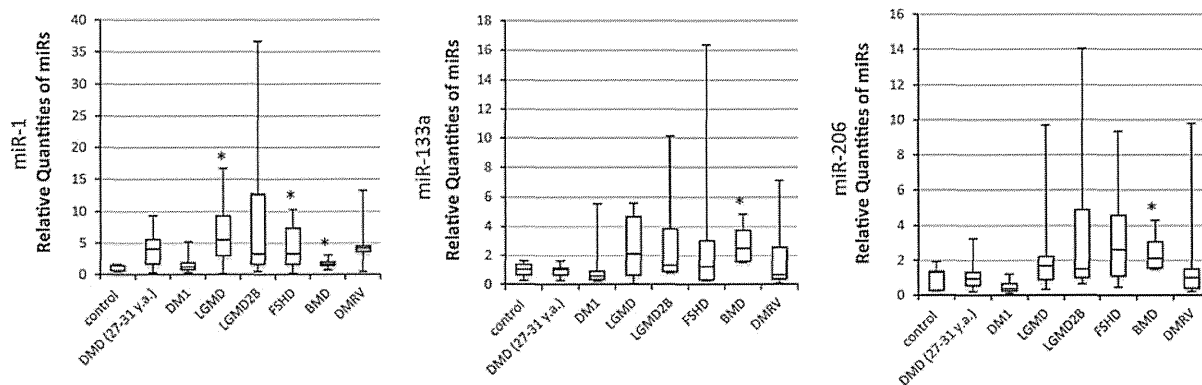


Fig. 3 BMD, DM1, LGMD, FSHD, および DMRV 患者間における, 血清マイクロ RNA (miR-1, miR-133a, miR-206) 発現レベルの比較

D. 考 察

これまでに、マウスやイヌを用いて筋ジストロフィーモデル動物の血清で骨格筋特異的マイクロ RNA が高値を示すことを報告してきたが、今年度はヒト患者由来血清を用いた解析を予定どおり実施することにより、同様に患者血清においては骨格筋特異的マイクロ RNA が上昇していることを明らかにした。さらに、DMD 以外の筋ジストロフィー患者血清においても病態を反映する有用なバイオマーカーとなりうることを明らかにした。今後は、血清マイクロ RNA が病態および病勢を反映しているのか、さらにはエクソン・スキップ治療薬の投与によって変動するのかについて検討が必要である。

E. 結 論

DMD, BMD, DM1, LGMD, FSHD, 及び DMRV 患者の血清マイクロ RNA 解析は、種々の筋疾患におけるマイクロ RNA の動態について報告したもので、これまでの本分野における先行研究と比較しても最も包括的な研究の一つであり、DMD のみならず多くの筋疾患に対する治療研究の今後の展開に繋がる学術的に重要な成果である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, Takeda S, Hashido K. Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med*. 2014;19(6):452-458.
2. Matsuzaka Y and Hashido K. Roles of miR-1, miR-133a, and miR-206 in calcium, oxidative stress, and NO signaling involved in muscle diseases, *RNA & DISEASE*, 2015 Feb. 2, e558. doi: 10.14800/rd.558.

II. 学会発表

1. 松坂恭成, 岸宗一郎, 小牧宏文, 大矢寧, 谷端淳, 青木吉嗣, 武田伸一, 橋戸和夫: 血清 microRNA およびエクソソームマーカータンパク質による筋ジストロフィー新規診断法の確立と治療への応用. 第37回日本分子生物学会, 横浜, 11.26, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費
(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))
平成 26 年度 委託業務成果報告 (業務項目)

イメージング解析によるジストロフィン定量測定法の検討

担当責任者 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、ジストロフィン蛍光免疫染色及びウェスタンブロットを用いて、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としている。本研究では今年度、蛍光免疫染色に関連したジストロフィン/スペクトリン蛍光二重免疫染色法の最適化に向けた取り組みの一つとして、当初予定していた蛍光色素の組み合わせでは、シグナルが陰性の検体においても偽陽性シグナルが生じるという問題点の改善に取り組んだ。偽陽性シグナルが生じる原因を特定した上で、これらを低減可能な新たな蛍光色素の組み合わせを検討したところ、同シグナルを低減可能な新たな組み合わせを同定できた。この検討過程においては、共焦点レーザー顕微鏡の励起レーザー波長等、撮像におけるシステム構成全体を踏まえた解析手法の構築が必要なることが示唆された。今後は上記の過程を経て最適化した蛍光二重免疫染色による解析を、本臨床試験を通して得られる被験者検体の測定に応用してゆく。

A. 研究目的

エクソン 53 スキップによる DMD 治療薬 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し病態によらず定常的に発現する

スペクトリンと二重免疫染色を行い、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。我々はこれまでに、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由来サンプル、及びヒト国立精神・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、定量的解析の実施可能性について報告をしてきたところである。その後、ジストロフィン/スペクトリン蛍光二重免疫染色の最適化について種々の検討を行ってきたが、その過程において当初計画していた蛍光色素の組み合わせでは、シグナルが陰性の検体においても偽陽性シグナルが生じるという問題点が明らかとなった。本研究ではこの原因の

特定し、偽陽性シグナルを低減する新たな色素の組み合わせを検討することを目的とした。

B. 研究方法

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

Taylor⁽¹⁾らの方法に従うとともに、抗ウサギ IgG 抗体については 2 種類の蛍光色素について検討した。

- 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, life technologies)、Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (A11036, life technologies)、Alexa Fluor 647 goat anti rabbit IgG (A21245, life technologies)
- 封入剤: ProLong Gold antifade reagent (P36934, Life technologies)

画像の取得

共焦点レーザー顕微鏡 TCS-SP5(Leica microsystems)を以下のように設定した。

- Bit depth: 12 bit
- Pinhole: airy 1
- Bidirectional: on
- Phase correction: 0.0
- Scan area: 2048 \times 2048
- Speed: 40 Hz,

また励起レーザーの設定は、用いる蛍光色素

に応じて以下のいずれかを用いた

- Argon laser: on, HeNe 543 laser: on, HeNe 633 laser: off
- Argon laser: on, HeNe 543 laser: off, HeNe 633 laser: on

取得の概要は以下のとおりである

- (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のみを観察しながら、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, Adobe)
 - MetaMorph (version 7.8, Molecular Devices)
- 解析の概要は以下のとおりである

- (1) Adobe Photoshop でスペクトリン画像 (ch00) を参照しながら非特異的染色領域マスク画像 (ch02) を作成する
- (2) MetaMorph でジストロフィン画像及びスペクトリン画像から非特異的染色領域マスク画像を用いて画像演算処理 (subtract) を施す。
- (3) 画像演算処理後のスペクトリン及びジストロフィン画像について、それぞれの蛍光輝度を測定する。
- (4) ジストロフィン蛍光輝度をスペクトリン蛍光輝度で除した値をジストロフィン/スペクトリン比とする。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

まず偽陽性シグナルが生じる要因について検討を行った。ジストロフィンの発現が認められない DMD 患者サンプルでは、理論的にはジストロフィンの蛍光強度は 0 になる。しかし一次抗体スペクトリン/二次抗体 Alexa 488, 一次抗体ジストロフィン/二次抗体に Alexa 568 の組み合わせでは、ジストロフィン/スペクトリン比が正常対照において 1.0 となる設定において、DMD 由来検体が 0.03~0.17 の間に分布し、結果としてジストロフィンの輝度が相対的に上昇している可能性が疑われた。この設定について Fluorescence SpectraViewer (Life technologies)を用いて検討を行った。スペクトリン撮像用の 488nm レー

ザーで励起した場合、本波長は Alexa 488 を励起するのに適した波長であることから、Alexa 488 由来の蛍光は約 75%の強度を発する。さらに Alexa 568 の励起波長域には 488nm も一部含まれているため、488nm レーザーで励起された Alexa 568 由来の蛍光もわずかに検出される (Fig.1)。一方ジストロフィン撮像用の 543nm レーザーで励起した場合、本波長は Alexa 568 の励起に適した波長ではあるが最大励起波長 (580nm 付近) よりも短いため、Alexa 488 よりも弱い約 50%の強度であることがわかる (Fig.2)。そのためスペクトリンよりもジストロフィンの蛍光強度が相対的に低くなり、共焦点レーザー顕微鏡のゲイン設定においても、ジストロフィンのゲイン設定を相対的に上げる必要性が生じる。我々

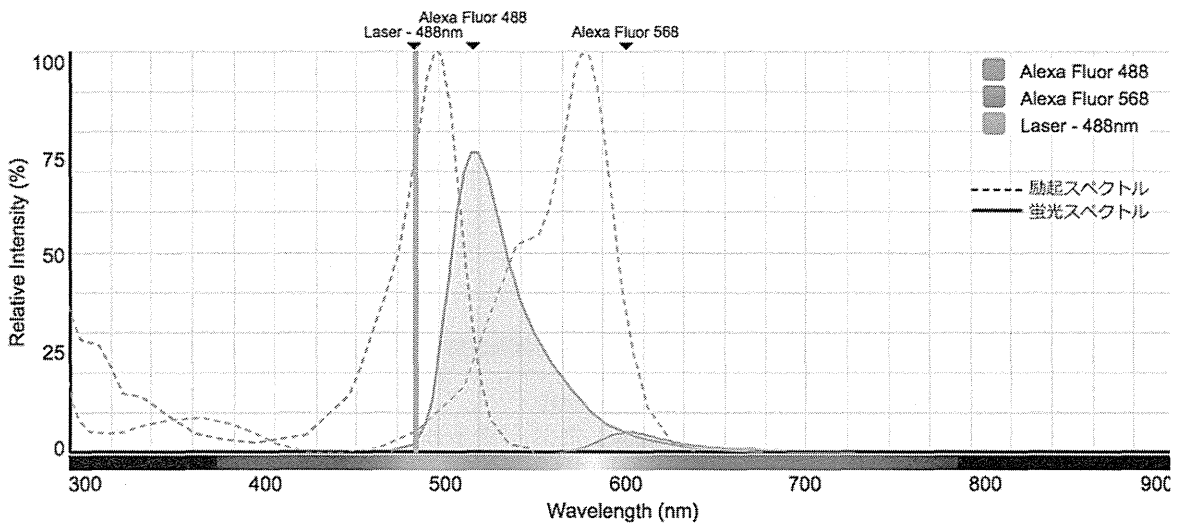


Fig.1 Alexa 488/568 色素を 488nm レーザーで励起したスペクトル

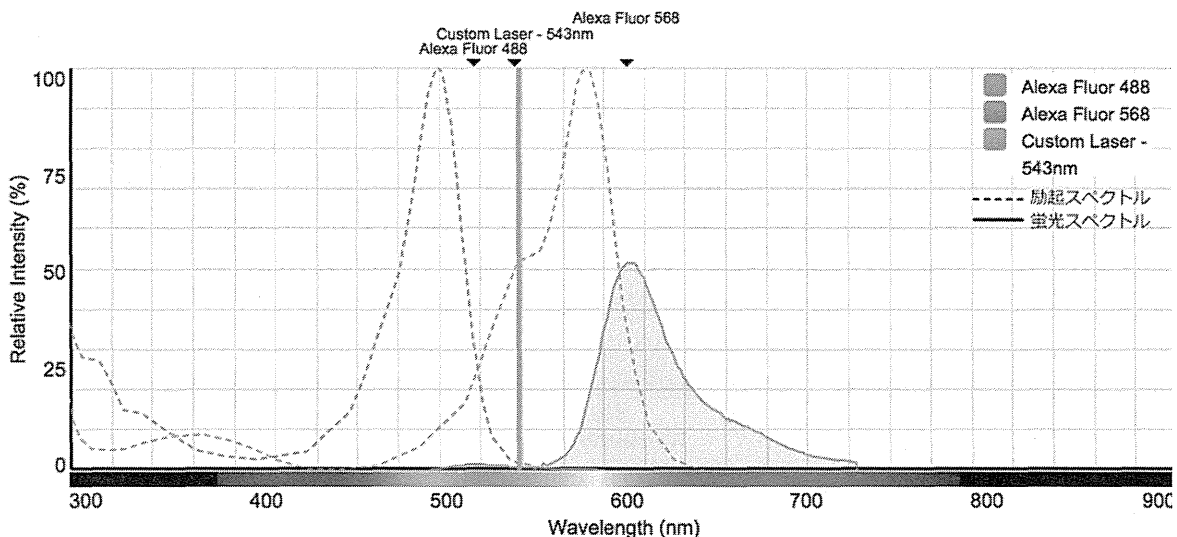


Fig.2 Alexa 488/568 色素を 543nm レーザーで励起したスペクトル

は実際に Alexa 488 と Alexa 568 の組み合わせで染色した場合、ゲイン設定がジストロフィン (Alexa 568) の方が高くなることをしばしば経験していたことから、この結果は妥当と考えられた。ゲインの上昇は微弱な蛍光の検出力を増大させる一方で、陰性サンプルにおいてはノイズとしての偽陽性シグナルが上昇する原因となり、最終的にはジストロフィン陰性サンプルにおいてもジストロフィン/スペクトリンシグナル比を上昇させる要因となりうる。そこでジストロフィンの蛍光強度がスペクトリンと同程度になるような蛍光色素

として、543nm レーザーが最大励起波長に近い Alexa 532 を検討した。その結果、488nm レーザーで励起した Alexa 488 と 543nm レーザーで励起した Alexa 532 の蛍光強度は、いずれも 75%程度となり、スペクトリンとジストロフィンそれぞれについてほぼ等しい蛍光強度が得られることが予想された (Fig.3,4)。しかし Alexa 532 は、488nm レーザーで励起した際にも約 20%程度の蛍光を放つことがわかった (Fig.3)。これはスペクトリンと結合した Alexa 488 の検出時に、ジストロフィンに結合した Alexa 532 のシグナルも同時に

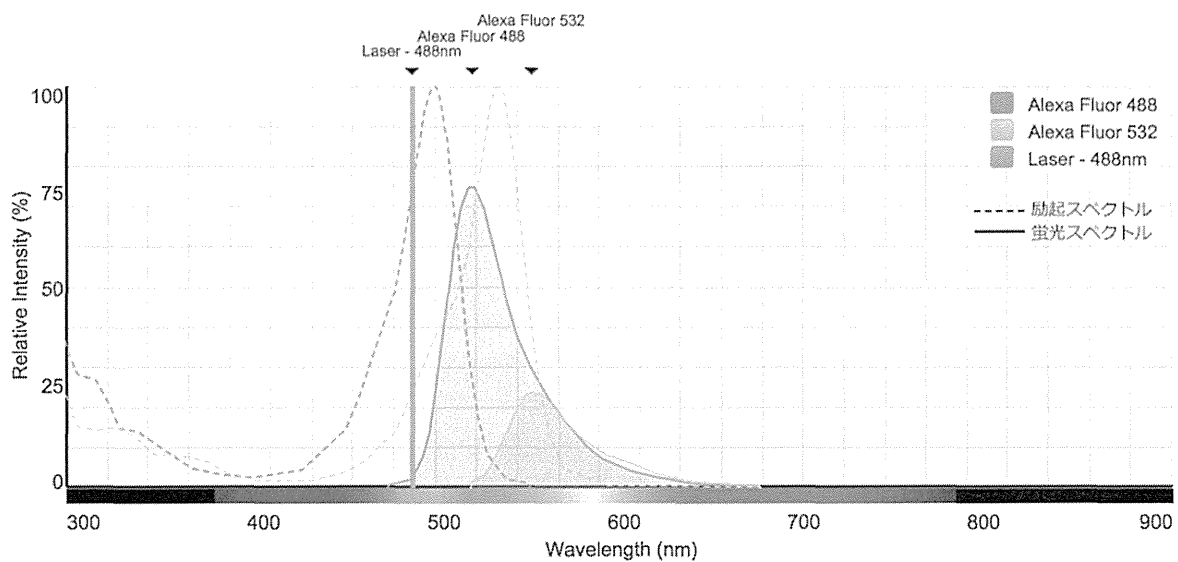


Fig.3 Alexa 488/532 色素を 488nm レーザーで励起したスペクトル

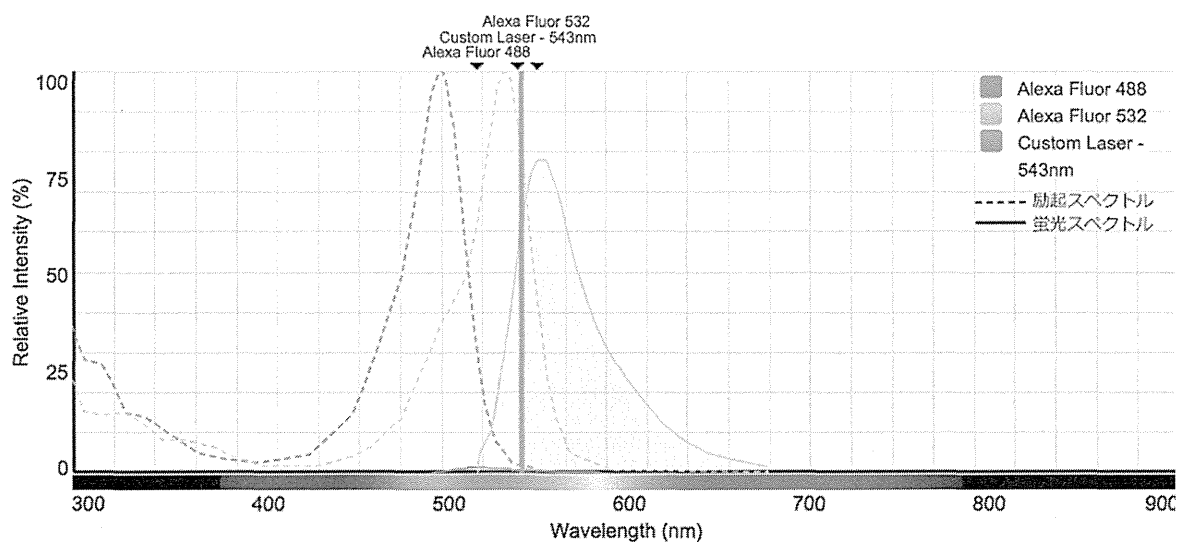


Fig.4 Alexa 488/532 色素を 543nm レーザーで励起したスペクトル

検出してしまうことを意味しており、特にジストロフィンを発現する正常対照サンプルの撮像時に、スペクトリンの蛍光強度が過大に評価されるおそれが生じる。またこのような励起スペクトルのオーバーラップは、治療によってジストロフィンが発現した被験者サンプルにおいても、スペクトリン撮像時に生じるジストロフィン由来のオーバーラップ蛍光がスペクトリンの蛍光に加算されることにより、ジストロフィン/スペクトリン比率が過小評価される方向に観測結果を歪める可能性がある。よってジストロフィンの蛍光強度をある程度スペクトリンと同じレベルまで引き上げつつ、488nm レーザーが同時に両方の蛍光色素を励起しない組み合わせを選択するこ

とが必要と考えられた。そこで励起レーザーの組み合わせを488nm と633nm に変更し、Alexa 488 と組み合わせる最適な色素としてAlexa 647を検討した。Alexa 647は励起スペクトルに488nm を含まないため、488nm レーザー励起時には蛍光を発しない (Fig. 5)。また633 nm レーザーによる励起時には約60%の蛍光強度を発し、Alexa 488 との蛍光強度の差を約10%まで縮小することができる (Fig. 6)。以上の検討を踏まえて、同一の正常対照サンプル及びDMD患者由来サンプルについてAlexa 488/568、及びAlexa 488/647の組み合わせによる二重染色を行い、ジストロフィン/スペクトリン蛍光強度比を比較したところ、Alexa 647はAlexa 568を用いた場合と比

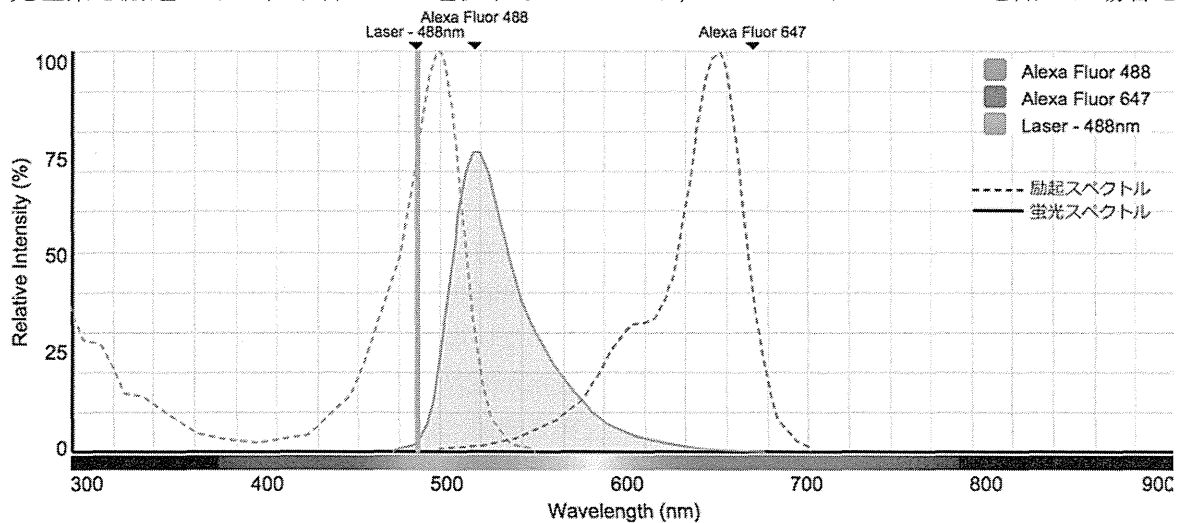


Fig.5 Alexa 488/647 色素を 488nm レーザーで励起したスペクトル

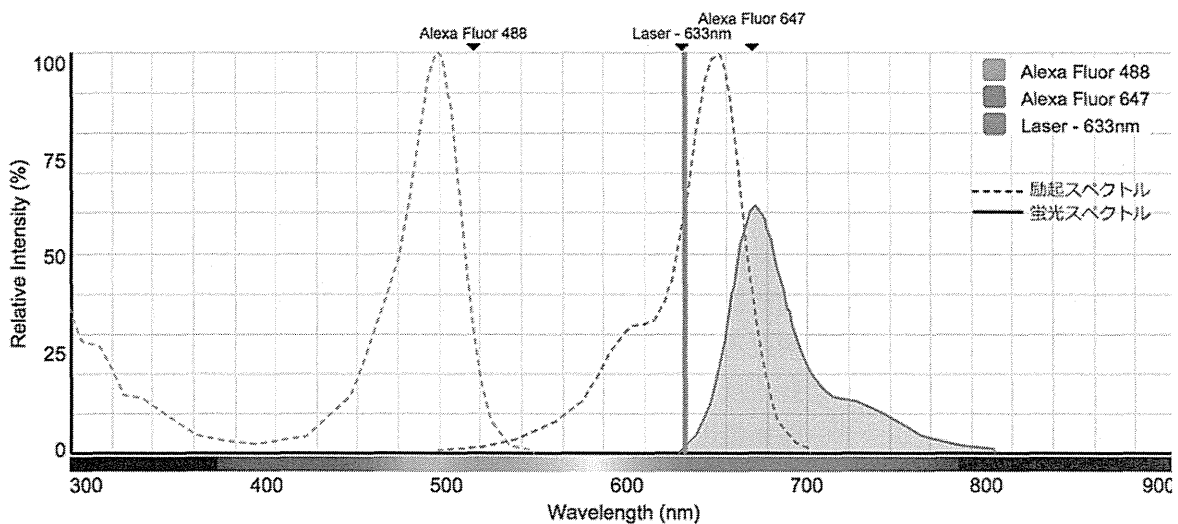


Fig.6 Alexa 488/647 色素を 633nm レーザーで励起したスペクトル

較して 10 分の 1 未満まで比率が低下した (Tab. 1)。以上のことから Alexa 647 の選択により、ゲインの上昇に起因するジストロフィン偽陽性シグナルを抑制することが可能であった。

	ジストロフィン/スペクトリン 蛍光強度比	
	正常対照 (標準化後)	DMD (標準化後)
Alexa 488/647	0.8300 (1.0000)	0.0046 (0.0056)
Alexa 488/568	1.0418 (1.0000)	0.0863 (0.0828)

Table 1 蛍光色素の組み合わせによるジストロフィン/スペクトリン蛍光強度比の比較

D. 考 察

ジストロフィン・スペクトリン二重免疫蛍光染色によるジストロフィン定量については Anthony らが 2014 年に、これまで報告されている Taylor⁽¹⁾, Arechavala⁽²⁾, 及び Beekman⁽³⁾ らの方法を、5 施設間で同一のリファレンスサンプルに対して適用し、検査施設間での変動及び測定手法間での変動について報告している⁽⁴⁾。この報告では対象となった 5 施設間において、同一のリファレンスサンプル間の変動は小さく、またそれぞれの測定手法の間で結果の一致性も認められたとしている。この報告では染色方法は Taylor の方法に従い、一次抗体スペクトリン/二次抗体 Alexa 488、一次抗体ジストロフィン/二次抗体に Alexa 568 の組み合わせを採用しており、また 5 施設全てが実施した基本の撮像方法は、機種及び光源を指定しない落射蛍光顕微鏡による撮影であり、励起フィルター等の選択についても各施設の任意とされていた。これには一般の研究室における共焦点レーザー顕微鏡の普及率はそれほど高いとは言えないため、全ての施設が実施可能な撮像方法として落射蛍光

顕微鏡による撮影が選択された背景があると考えられる。上述のように撮像方法には施設間でかなりの差異があったと想定されるが、結果として施設間の変動は許容できる程度と報告されているため、二重免疫蛍光染色による測定方法自体はある程度の頑健性を持った手法であるとみなすことは可能である。しかし同報告によれば、ジストロフィンの相対的発現量を正常対照で 100%とした場合、ウェスタンブロットではジストロフィン陰性とされた DMD サンプルを撮影した場合でも 10% 程度の発現が認められたとしている。この本来ありえない DMD サンプルのジストロフィン測定結果の原因について、同報告では詳しく考察していないが、今回の我々の検討からは二次抗体に Alexa 488/568 を選択したことはその一因ではないかと推測される。我々が Alexa 647 を選択した背景には、導入されている共焦点レーザー顕微鏡のシステムに 633 nm レーザーが装備されていたという前提条件に依存する部分が大きく、該当する励起波長を供給できる光源を現有システムが装備していない場合、初期投資コストの観点から、我々が報告した方法の一般の研究室あるいは検査機関における実施可能性については慎重である必要があるかも知れない。ジストロフィンの定量測定が必要な治験の件数は増加傾向にあると考えられ、また米国 FDA もエクソン 51 スキップによる DMD 治療薬 eteplirsen の第 2b 相試験において、客観性・定量性を満たしたジストロフィン測定方法について強い関心を示している。より多くの検査機関での実施可能性を重視した測定手法を選択するか、あるいは高度な機器を必要とするがより正確な測定手法を選択するかについては、その比較衡量を行いながら検討を継続していく必要があると考えられた。

E. 結 論

ジストロフィン/スペクトリン蛍光二重免疫染色法の最適化に向けた取り組みとして、

ジストロフィンのシグナルが陰性の検体においても偽陽性シグナルが生じるという問題の改善に取り組んだ。その結果、偽陽性シグナルを低減可能な新たな蛍光色素の組み合わせを同定できた。一連の検討を通して、共焦点レーザー顕微鏡の励起レーザー波長等、撮像系におけるシステム構成全体を踏まえた解析手法の構築が重要なことが示唆された。

参考文献

1. Taylor LE, Kaminoh YJ, Rodesch CK, Flanigan KM. Quantification of dystrophin immunofluorescence in dystrophinopathy muscle specimens. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012;38(6):591-601.
2. Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Brown SC, Sewry C, Morgan JE, Muntoni F. Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010;36(4):265-274.
3. Beekman C, Sipkens JA, Testerink J, Giannakopoulos S, Kreuger D, van Deutekom JC, Campion GV, de Kimpe SJ, Loubakos A. A sensitive, reproducible and objective immunofluorescence analysis method of dystrophin in individual fibers in samples from patients with duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2014;9(9):e107494.
4. Anthony K, Arechavala-Gomez V, Taylor LE, Vulin A, Kaminoh Y, Torelli S, Feng L, Janghra N, Bonne G, Beuvin M, Barresi R, Henderson M, Laval S, Loubakos A, Campion G, Straub V, Voit T, Sewry CA, Morgan JE, Flanigan KM, Muntoni F. Dystrophin quantification: Biological and translational research implications. *Neurology.* 2014;83(22):2062-2069.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Saito Y, Baba S, Takahashi A, Sone D, Akashi N, Koichihara R, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Otsuki T. Complex regional pain syndrome in a 15-year-old girl successfully treated with continuous epidural anesthesia. *Brain Dev.* 2015;37(1):175-178.
2. Irahara K, Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Saito T, Komaki H, Nakata Y, Sato N, Baba K, Yamamoto T, Chan WM, Andrews C, Engle EC, Sasaki M. Pontine malformation, undecussated pyramidal tracts, and regional polymicrogyria: a new syndrome. *Pediatric neurology.* 2014;50(4):384-388.
3. Endo Y, Saito Y, Otsuki T, Takahashi A, Nakata Y, Okada K, Hirozane M, Kaido T, Kaneko Y, Takada E, Okazaki T, Enokizno T, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Persistent verbal and behavioral deficits after resection of the left supplementary motor area in epilepsy surgery. *Brain Dev.* 2014;36(1):74-79.

II. 学会発表

1. 小牧 宏文, 永田 哲也, 齊藤 崇, 竹下 絵里, 立森 久照, 清水 玲子, 太幡 真紀, 玉浦 明美, 福田 昂一, 鈴木 麻衣子, 佐々木 征行, 武田 伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーを対象としたエクソン・スキップ (First-in-Human) 試験. 第41回日本小児臨床薬理学会, 大阪, 10.03, 2014
2. 松坂 恭成, 岸 宗一郎, 小牧 宏文, 大矢 寧, 谷端 淳, 青木 吉嗣, 武田 伸一, 橋戸 和夫: 血清microRNAおよびエクソソームマーカータンパク質による筋ジス