

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

**完全型ジストロフィンを発現させる**

**Duchenne型筋ジストロフィーの治療法の開発**

**(H22-神経・筋-一般-015)に関する研究**

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成25(2013)年 4月

## 目 次

I . 総括研究報告		
完全型ジストロフィンを発現させるDuchenne型筋ジストロフィーの 治療法の開発 (H22-神経・筋-一般-015) に関する研究	-----	1
松尾雅文		
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	7
III . 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総括研究報告書

完全型ジストロフィンを発現させる Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法の開発

研究代表者：松尾 雅文（神戸学院大学総合リハビリテーション学部・教授）

【研究要旨】

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患である。しかし、未だ有効な治療法は確立されていない。私達は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正する DMD 治療法を着想し、着想通りに骨格筋にジストロフィンを発現させることに世界で初めて成功した。しかし、この方法で発現させるジストロフィンは一部領域を欠失した不完全なもので、完全な発現とはいえない。その為、完全型ジストロフィンを発現させる治療の確立が緊急課題となっている。

本研究では、スプライシング時に mRNA を修正して完全型ジストロフィンの発現させる治療の開発を目指し、スプライシングを制御する化学物質の探索を行った。完全型ジストロフィンの発現が期待されるジストロフィン遺伝子の異常を組み込んだスプライシングレポーター系を構築し、シュードエクソンスキッピングを誘導する化合物の探索を行った。そして、1部の患者については、シュードエクソンスキッピングの誘導を可能にするアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功した。また、このスプライシングを制御する化学物質の探索時に、他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常を修正する化学物質の同定にも成功した。

【分担研究者】

松尾 雅文  
神戸大学大学院医学研究科・教授

竹島 泰弘  
神戸大学大学院医学研究科・特命教授

八木 麻理子  
神戸大学大学院医学研究科・助教

栗野 宏之  
神戸大学大学院医学研究科・特命助教

る。しかし、未だ有効な治療法は確立されていない。私達は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正する DMD 治療法を着想し、着想通りに骨格筋にジストロフィンを発現させることに世界で初めて成功した。その成果は DMD の最も有望な治療法として世界中から大きな注目を集め、現在では世界標準の治療法となりつつある。

しかし、この方法で発現させるジストロフィンは一部領域を欠失した不完全なもので、完全な発現とはいえない。その為、完全型ジストロフィンを発現させる治療の確立が緊急課題となっている。

本研究では、スプライシング時に mRNA を修正して完全型ジストロフィンの発現させる治療の開発を目指し、スプライシングを制御

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患であ

する化学物質の探索を行った。また、このスプライシングを制御する化学物質の探索時に、他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常の修正についても検討できたので報告する。

## B. 研究方法

本研究では、以下の研究を計画した。1) 完全型ジストロフィンの発現が可能なジストロフィン遺伝子の異常の DMD 患者での同定。巨大なジストロフィン遺伝子のイントロン内の異常で、新たなエクソンを形成する遺伝子異常の探索をジストロフィン mRNA のシーケンス解析により行った。2) スプライシングレポーター評価系の構築と完全長ジストロフィン mRNA の産生を導く化学物質のスクリーニング。ミニ遺伝子スプライシング解析系に、イントロン配列がエクソン化した遺伝子異常を有する配列を組み込み、ハイブリッドミニ遺伝子を作成した。このミニ遺伝子を HeLa 細胞に導入し、そのスプライシング産物を RT-PCR 法で解析した。そして、この解析系に様々な化学物質を加え、化学物質によるシュードエクソンスキッピング効果などスプライシングへの影響を解析した。3) 患者由来培養筋細胞の確立。完全型ジストロフィンの発現が可能な患者から培養筋細胞株の樹立をはかった。4) 他のジストロフィーのスプライシングを修正する化学物質の探索。

### (倫理面への配慮)

本研究の Duchenne 型筋ジストロフィー患者の遺伝子診断並びに患者細胞でのジストロフィン発現の検討については、神戸大学医学部附属病院においてインフォームドコンセントを得て実施した。こうした診断を実施すること及び筋バイオプシーから得た患者筋細胞の細胞株の樹立及びそのジストロフィン mRNA の解析などの実施については神戸大

学医学部医学倫理委員会および神戸学院大学倫理委員会で審議され承認された。

## C. 研究結果

### 1) 完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子異常の探索

完全型ジストロフィンの発現が期待されるジストロフィン遺伝子のイントロン内の点変異からシュードエクソンを形成する異常を有する例を探索した。DMD 患者で通常の遺伝子解析では異常の同定されなかった例で、mRNA の塩基配列解析を追加で行い、mRNA に取り込まれたシュードエクソンの検出をはかった。これまでに合計 5 種のイントロン内の塩基異常の蓄積をはかることができた(図 1)。5 種うち 4 種はアウトオブフレームのエクソンであり、このシュードエクソンの挿入がよりナンセンス変異が形成された。1 種は、イントロン 2 内のインフレームエクソンであった。これらのシュードエクソンをエクソンスキッピングにより mRNA から除くと全く正常の完全型ジストロフィン産物が期待された。

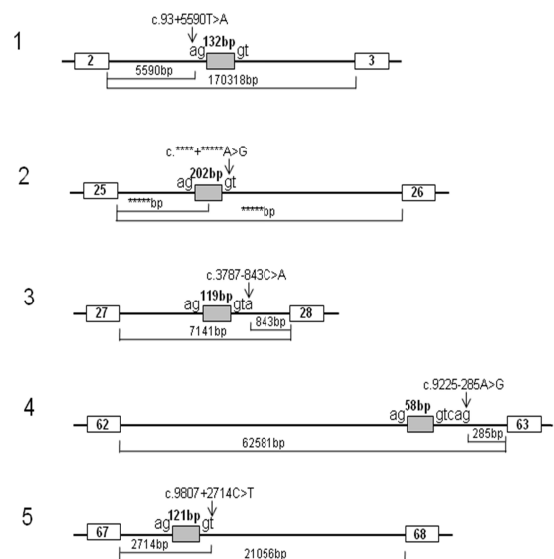


図 1 ; 5 種のシュードエクソン形成異常イントロンの内部に存在する 1 塩基異常がスプライスサイトを新たに形成し、そこが認識されてエクソン化していた。

2) スプライシングレポーター評価系を用いた化学物質スクリーニング

5 個のシュードエクソンについて、異常を有したものと有されないもののそれぞれを H492 ベクターに挿入し、スプライシング解析を HeLa 細胞に導入して行った。さまざまな化学物質あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養液中に加え培養を行った。スプライシング産物を RT-PCR 法で解析した。一部の化学物質でシュードエクソンのスキッピング効果が得られた。しかしながら、その効果は以前得た TG003 によるエクソンスキッピング誘導効果と比較すると弱く、臨床応用するに十分な活性ではないと判断した。アンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソンスキッピングについても検討した。シュードエクソンの配列全体をカバーする様に 1 個のエクソンにつき 10 個近くの S-オリゴを作成し、それぞれのエクソンスキッピング誘導効果を解析した。しかしながら、有効なエクソンスキッピング誘導作用を得ることは出来なかった。そこで、修飾核酸を変更し、ENA を用いたところ、有効にシュードエクソンのスキッピング効果を得た。

### 3) 患者由来培養筋細胞の確立

治療対象となる症例の筋細胞株の樹立をはかった。完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子の異常を持つ患者を対象として筋生検し、生検組織から筋培養細胞株を樹立をはかった。

### 4) 他の型の筋ジストロフィーでスプライシング異常を修正する化学物質の探索

他の型の筋ジストロフィーの中には、病態として遺伝子のスプライシング異常を合併する例がある。本研究のスプライシングを修飾する化学物質の探索時に、同時に他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常の修正の可能性を検討していった。驚くべきことに、スプライシング異常を修正する有力な化合物の同定に成功した。本化合物については今後

臨床応用をはかってゆく予定である。

## D. 考察

### 1) 達成度について

本研究全体では、完全型ジストロフィンを発現させる治療法への道筋が示せた。修飾核酸を新しい型のものに変更することにより、シュードエクソンスキッピング誘導作用を発現することに成功した。今後、これを臨床応用することを検討する。

### 2) 研究成果の学術的意義について

完全型ジストロフィンの発現が可能となれば、従来手法によるジストロフィン発現との治療効果の差を明らかにすることができる。この両者の分子病態を明らかにすることにより、より一層明確な DMD の病態の解明となる。

### 3) 研究成果の行政的意義について

DMD で完全型ジストロフィンを発現させる方向性が見出せた。このことが完成された時には、DMD 患者が救われることとなる。DMD への医療・療育費の大幅な削減が期待される。

### 4) その他特記すべき事項について

本研究者が世界初めて提唱し、その効果を報告していたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング誘導治療が外国製薬メーカーの手で治療される様になった。また、その効果が実証されてきており、本治療法により利益を受ける患者は多い。本研究の成果をもとに早急に患者さんの利益へと具体化に結びつけたい。

## E. 結論

DMD で欠損しているジストロフィンを完全な形で発現させる方法について道筋がつけられた。探索され、臨床応用されることが期待される。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエ

クソンスキッピング誘導による完全型ジストロフィンを発現させる治療法を確立することが可能となった。また、他の型のジストロフィーでもスプライシングを修正する治療法が応用可能なことが示され、明るい光明を見出した。

#### F．研究発表

1. 論文発表  
一覧表参照
2. 学会発表  
一覧表参照

#### G．知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他



## **II . 研究成果の刊行に関する一覧表**



学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年
<u>R.G. Malueka</u> , M.yagi, H.Awano, T.Lee, E.K. Dwianingsih, A.Nishida, Y.Takeshima, <u>M.Matsuo</u>	Antisense oligonucleotide induced <i>dystrophin</i> exon 45 skipping at a low EC50 in a cell-free splicing system	17th International Congress of the World Muscle Society	2012
<u>R.G. Malueka</u> , Y.Takaoka, M.yagi, H.Awano, T.Lee, E.K. Dwianingsih, A.Nishida, Y.Takeshima, M.Matsuo	Categorization of 77 <i>dystrophin</i> exons into five groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors	17th International Congress of the World Muscle Society	2012
<u>Matsuo M</u>	Identification of mutations in a mammoth size gene	14th Asia Pacific Congress of Pediatrics and 4th Asia Pacific Congress of Paediatric Nursing	2012
<u>Matsuo M</u>	Modulation of splicing to restore a gene function	14th Asia Pacific Congress of Pediatrics and 4th Asia Pacific Congress of Paediatric Nursing	2012

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takeshima, Y., Yagi, M., Matsuo, M.	Optimizing RNA/ENA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing.	Aartsma-Rus A.	Exon skipping: Methods and protocols. Methods Mol Biol.	Human Press.	New Jersey	2012	131-141.
松尾雅文	筋ジストロフィー	松尾雅文	今日の治療指針 私はこう治療している V. 54	医学書院	東京	2012	1196

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rani Sasongko Sarina David Salmi Zilfalil Matsuo, M Zabidi-Hussin	Mutation Spectrum of Dystrophin Gene in Malaysian Patients with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy	Journal of Neurogenetics		in press	2013
Thu Tran, TH., Zhang, Z., Yagi, M., Lee, T., Awano, H., Nishida, A., Okinaga, T., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Molecular characterization of an X(p21.2; q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28.	J Hum Genet	58	33-39	2012
Solyom S, Ewing AD, Hancks DC, Takeshima Y, Awano H, Matsuo M, Kazazian HH Jr.	Pathogenic orphan transduction created by a non-reference LINE-1 retrotransposon.	Hum. Mutat.	33	369-371	2012
Ota, M., Takeshima, Y., Nishida, A., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., Matsuo, M.	A G-to-T transversion at the splice acceptor site of dystrophin exon 14 shows multiple splicing outcomes that are not exemplified by transition mutations.	Genet Test Mol Biomarkers.	16	3-8	2012
Malueka, R.G., Takaoka, Y., Yagi, M., Awano, H., Lee, T., Dwianingsih, E. K., Nishida, A., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers.	BMC Genetics.	31	13-23	2012