

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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成25(2013)年 4月

## 目 次

I . 総合研究報告	
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 -----	11
III . 研究成果の刊行物・別刷 -----	18

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総合研究報告書

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、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是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た。その候補となるジストロフィン遺伝子の異常によりシュードエクソンを形成する例の探索を行った。ジストロフィン cDNA の解析から 5 種の遺伝子異常を同定した。そして、同定した 5 種類の遺伝子異常配列をそれぞれ組み込んだミニ遺伝子を構築し、HeLa 細胞を用いたスプライシングレポーター系を構築した。これらの細胞培養液に様々な化合物を添加し、スプライシングを制御する化学物質の探索を行った。その結果、1 部の遺伝子異常については形成されたシュードエクソンのスキッピングを誘導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。今後、本アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた完全型筋ジストロフィンの発現をはかることが可能となった。

【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

男児 3500 人に 1 人が発症する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なく、DMD 患者は 20 歳台に長い闘病生活のはてに死亡する。そのため世界中の数万の患者とその家族が治療法の確立を待望している。

本研究は、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スプライシング時にエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィン mRNA を修正して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、「Pediatric Research」誌の表紙に紹介され、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た（Takeshima, 2006）。現在では、このジストロフィン mRNA を修正する治療は世界標準の手法となりつつある。しかしなが

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は

ら、この手法では発現するジストロフィンには1部領域を欠失した不完全なタンパクで、完治とはいえない。そのため、完全型ジストロフィンを発現させる方法の確立が世界の研究者の解決すべき課題となっている。

また、本研究者は、スプライシング時にジストロフィン mRNA を修正することにより完全型ジストロフィンの発現が期待できる遺伝子の異常を発見してきた。本研究は、スプライシング時に mRNA を修正して、こうした異常例で完全型ジストロフィンの発現させる DMD 治療の開発を世界に先駆けてはかるものである。

本研究では以下の研究を実施した。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をさらに多くの DMD 患者での同定。2) 同定した遺伝子の異常を対象としてスプライシングレポーター評価系を構築。3) 完全長ジストロフィンの産生を導くシュードエクソンスキッピングを誘導する化学物質のスクリーニング。その結果、スプライシング時にエクソンスキッピングを誘導して完全型ジストロフィンの発現させるアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功した。

## B. 研究方法

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 (担当: 竹島・八木・栗野)

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は、ジストロフィン遺伝子の 79 ヶのエクソン全てが正常で、イントロンの異常によるものである。そのため、DMD 患者を対象として MLPA 法とジストロフィン cDNA 解析を用いた遺伝子診断を実施した。そして、イントロン内にシュードエクソンの形成をもたらす遺伝子異常の同定をはかった。ジストロフィン cDNA の全長解析法の概略図と PCR に用いたプライマーの位置および配列を添付資料 1 とした。

2) ジストロフィン遺伝子のエクソンのスプライシング制御特性の解析

エクソンスキッピングを誘導するにはスプライシングを制御する機構の解明が貢献する。そこで、ジストロフィン遺伝子のエクソンのスプライシング制御因子を 26 コのパラメーターとして利用して、決定木の手法を用いて、76 のエクソンのグループ化を行った。

3) 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

イントロン内の点突然変異によりシュードエクソンが形成され、DMD の原因となっている例がある。これらでは、シュードエクソンのスキッピングが誘導されれば、全く正常なジストロフィン mRNA が産生され、完全型ジストロフィンの発現が期待される。

スプライシングレポーター評価系の構築

申請者が既に構築している H492 ミニ遺伝子に、イントロン配列がシュードエクソン化した遺伝子異常配列あるいはその正常配列を組み込み、ハイブリッドミニ遺伝子を作成する。添付資料 2 に H492 の構造を記した。

化学物質存在下でのスプライシング解析

先に構築したハイブリッドミニ遺伝子を 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。この解析系にアンチセンスオリゴヌクレオチドをはじめとした様々な化学物質を加え、化学物質によるスプライシングへの影響を解析した。そして、スプライシングを変化させ、シュードエクソンのスキッピングを誘導する。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの同定

シュードエクソンのスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドについてその作用時間・作用濃度などに検討を加えた。

4) 治療対象となる症例の筋細胞株の樹立

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により、筋培養細胞株の樹立をはかった。

(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、ジストロフィン mRNA の全長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ストップコドの形成がされた。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生が期待された。

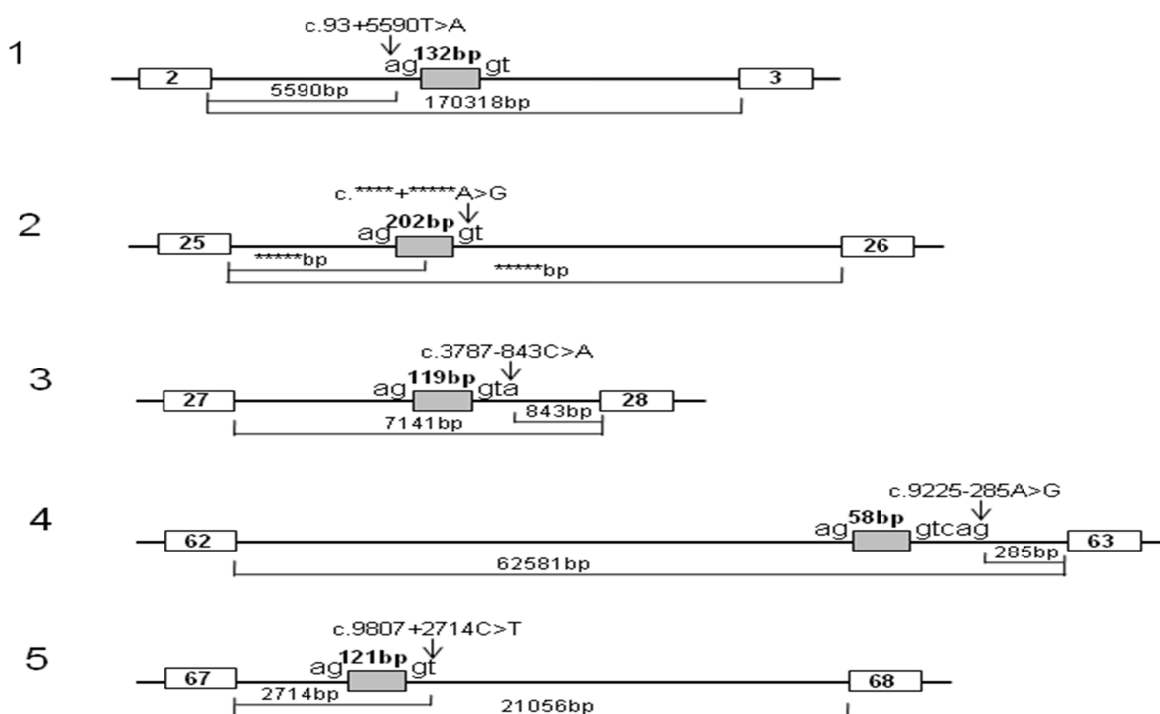
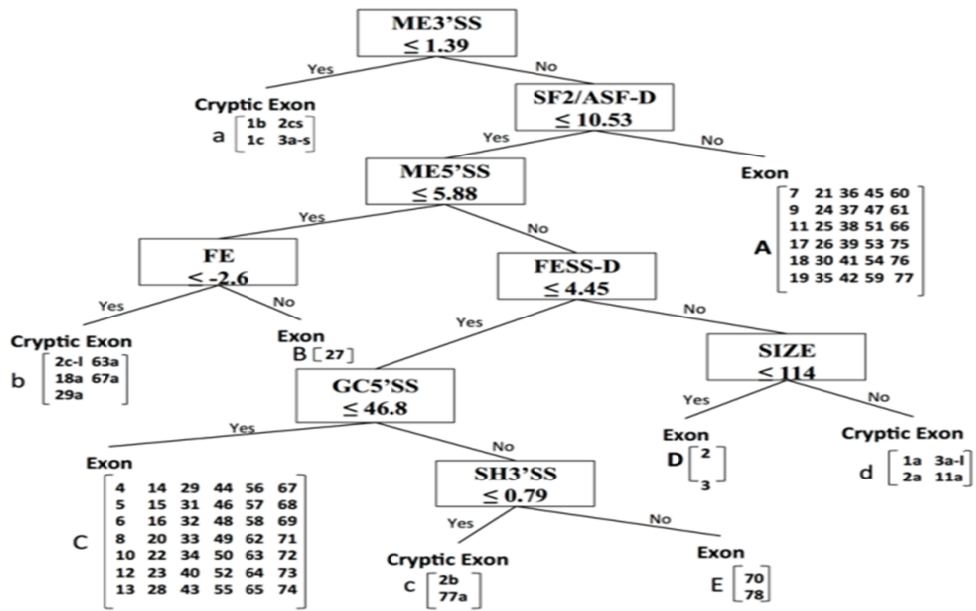


図 1 5 種のシュードエクソン形成異常

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。



Malueka et al. 2012

図2 決定木の手法を用いた77ジストロフィンエクソンのグループ分け

## 2) ジストロフィン遺伝子のエクソンのスプライシング制御特性の解析

ジストロフィン遺伝子の77個のエクソンは、そのスプライシング制御因子の26種のパラメーターを用いて決定木の手法で5つのグループに分類することが出来た(図2)。スプライシング部位のコンセンサス配列の強い保存性に依存しているグループから、多くのスプライシング制御因子の関与が必要なグループまで多岐が存在した。

各エクソンのスプライシング制御因子の関与度を26のパラメーターにして、ジストロフィン遺伝子に同定されている15ケのクリプチックエクソンを区別する決定木を作成した。その結果、77ケのエクソンはAからEの5つのグループに分類された。

この決定木を用いて、先に同定した5つのシュードエクソンについてそのグループ分けをおこなった。その結果、すべてのシュードエクソンは正常のエクソングループのA・C・Dに分類された(表1)。このことはシュードエクソンであってもスプライシングの制御機構は正常のエクソンからそれほど偏位しているものではないことを示した。

	intron	mutation	size (nt)	group
1	2	c.93+5590 T>A	132	<b>C</b>
2	25	c.3432+2240 A>G	202	<b>C</b>
3	27	c.3787-8436 > A	119	<b>C</b>
4	62	c.9225-285 A > G	58	<b>D</b>
5	67	c.980+2714 C > T	121	<b>A</b>

## 3) 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、ハイブリットミニ遺伝子を構築した。そして、それらのスプライシングを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に加え細胞培養を行った。生じ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。用いる修飾核酸を変更し、RNA/ENA キメラを用いた。その結果、シュードエクソンのスキッピングを誘導する配列が得られた。今後、このアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、完全型ジストロフィンの発現をはかるものである。

#### 4) 患者由来培養筋細胞の樹立

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した。

### 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。特に化学物質スクリーニングにおいて一部で弱いながらもシュードエクソンスキッピング誘導作用を発現する化学物質が見つかった。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドへ探索の比重を移したところ、RNA/ENA キメラが有効なことを明らかにした。

#### 2) 研究成果の学術的意義について

スプライシングの制御機構はかなり解明されてきた。今回、決定木で得られた個々のエクソンのスプライシング制御の特徴によるグループ化は、まだまだ未知の因子によるスプライシングが制御を示唆しており、今後の本領域の発展が期待される。また、イントロン内の配列が一塩基の異常によってエクソン化しても、そのスプライシング制御機能はほぼ普通のエクソンと同じであることが決定木の

手法を用いることにより判明した。このことは逆に、イントロン内にはエクソン様構造を形成した塩基異常を獲得しても、そのままイントロンである遺伝子異常が存在するものもあると考えられた。

#### 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。これは、現在治験が実施されているジストロフィン発現治療が一部の領域を欠いたジストロフィンを発現させるものであることから、両治療法の効果を比較するで、よりよい治療法を開発する評価判定法を提示するものと期待される。

#### 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ようになった。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。

一方、完全型筋ジストロフィンの発現が期待されており、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において完全型ジストロフィンの発現を可能とするシュードエクソンを形成する遺伝子異常についてハイブリッドミニ遺伝子の構築にすべての異常で成功した。また、エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功し、DMD治療の確立へ新しい世界を切り開いた。

## 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

### 添付資料1

ジストロフィン cDNAの解析

### 添付資料2

H492ベクターの構造





## 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 , M.Matsuo	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
<u>Nishida A</u> , <u>Kataoka N</u> , <u>Takeshima Y</u> , <u>Yagi M</u> , <u>Awano H</u> , <u>Ota M</u> , <u>Itoh K</u> , Hagiwara <u>M</u> , Matsuo <u>M</u> .	Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the <i>dystrophin</i> gene.	4th International Congress of Myology	2011
<u>Matsuo M</u>	Duchenne muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy	The 61st Autumn Annual Meeting of the <b>Korean pediatric Society</b>	2011

Yagi M, Lee T, Awano H, Takeshima Y, <u>Matsuo</u> <u>M.</u>	Antisense RNA/Ethylene bridged nucleic acid chimera induces exon 45 skipping in cultured myocytes from DMD patients with 6 different deletion mutations.	<i>The American Society of Human Genetics 61th Annual Meeting</i>	2011
Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Yamauchi, Y., Malueka, R.G., Dwianingsih, E.K., Nishio, H., <u>Matsuo, M.</u>	Mutation spectrum of the dystrophin gene in 456 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center	<i>15th International Congress of the World Muscle Society</i>	2010
Yagi, M., Ota, M., Awano, H., Takeshima, Y., <u>Matsuo, M.</u>	Antisense RNA/ethylene-bridged nucleic acids chimera induces exon 45 skipping and restores dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy	<i>15th International Congress of the World Muscle Society</i>	2010
Yagi, M., Takeshima, Y., Awano, H., Ota, M., Malueka, R.G., Dwianingsih, E. K., Nishida, A., Le, e, T., <u>Matsuo, M.</u>	Antisense RNA/ENA chimera against dystrophin exon 45 leads exon 45 skipping followed by dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy	<i>6th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society</i>	2010
Nishida, A., Kataoka, N., Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, Y., <u>Matsuo, M.</u>	Chemical treatment of muscular dystrophy that enhances skipping of the mutated exon in the dystrophin gene	<i>The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting</i>	2010

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
Takehima, 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
Mtasuo, M., Takehima, Y., Yagi, M.	Treatment of Duchenne muscular dystrophy by induction of exon skipping with antisense oligonucleotides	Takeda S.	Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy.	IGAKU-SHOIN Ltd.	Tokyo	2011	103-109.

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			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
Malueka, R., Yagi, M., Awano, H., Lee, T., Dwianingsih, E.K., Nishida, A., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low half-maximal effective concentration in a cell-free splicing system.	Nucleic Acid Therapeutics .	21	347-353.	2011
Nishida, A., Kataoka, N., Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, M., Matsuo, M.	Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene.	Nat Commun	2	308.	2011
Rani, A.Q., Malueka, R.G., Sasongko, T.H., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., Zilfalil, B.A., Salmi, A.B., Takeshima, Y., Zabidi-Hussin, Z.A., Matsuo, M.	Two closely spaced nonsense mutations in the DMD gene in a Malaysian family.	Mol Genet Metab	103	303-304.	2011
Takeshima, Y., Yagi, M., Okizuka, Y., Awano, H., Zhang, Z., Yamauchi, Y., Nishio, H., Masuo, M.	Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center.	J Hum Genet	55	379-388.	2010

Okizuka, Y., Takeshima, Y., Itoh, K., Zhang, Z., Awano, H., Maruyama, K., Kumagai, T., Yagi, M., Matsuo, M.	Low incidence of limb-girdle muscular dystrophy type 2C revealed by a mutation study in Japanese patients clinically diagnosed with DMD.	BMC Med Genet	11	49.	2010
Kubokawa, I., Takeshima, Y., Ota, M., Enomoto, M., Okizuka, Y., Mori, T., Nishimura, N., Awano, H., Yagi, M., Matsuo, M.	Molecular characterization of the 5'-UTR of retinal dystrophin reveals a cryptic intron that regulates translational activity.	Mol Vis	6	2590-2597.	2010
Dwianingsih, E.K., Takeshima, Y., Itoh, K., Yamauchi, Y., Awano, H., Malueka, R.G., Nishida, A., Ota, M., Yagi, M., Matsuo, M.	A Japanese child with asymptomatic elevation of serum creatine kinase shows PTERF-CAVIN mutation matching with congenital generalized lipodystrophy type 4.	Mol Genet Metab	101	233-237.	2010
Awano, H., Malueka, R.G., Yagi, M., Okizuka, Y., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Contemporary retrotransposition of a novel non-coding gene induces exon-skipping in dystrophin mRNA.	J Hum Genet	55	785-790.	2010
李知子 松尾雅文	RNAを利用する新しい 医薬・医療 Duchenne型筋ジストロフィーに対するエクソンスキッピング誘導治療	医学のあゆみ	238	537-541	2011



松尾雅文	Duchenne型筋ジストロフィーのエクソスキッピング誘導治療とリードスルー誘導治療	小児科	52	1750-1756	2011
松尾 雅文	Duchenne型筋ジストロフィーの新しい治療戦略	医学のあゆみ	235	955-956	2010