

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

**「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」
に関する研究**

**平成 25 年度 総括研究報告書
研究代表者 石浦 章一
平成 26 (2014) 年 4 月**

目次

.総括研究報告

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

石浦 章一 1

.分担研究報告

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

西野 一三 3

.研究成果の刊行に関する一覧表

. 5

.研究成果の刊行物・別刷

. 7

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策研究事業）
総括研究報告書

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

筋強直性ジストロフィー 1 型(DM1)は、CTG トリプレットの伸長によって多くの遺伝子のスプライシング異常が起こる全身性の疾患である。多様な症状には、筋強直、白内障、耐糖能異常、精神遅滞、精巣萎縮などがある。私たちはモデルマウスを用いて、アンチセンス投与により筋強直症状を治療することに成功した。また、低分子化合物や CTG に対するアンチセンスも効果があった。これらの結果から、アンチセンス治療に低分子化合物を加えた複合療法が最も効率の良い治療法であることが示唆された。

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)の症状は多様で、筋強直、白内障、耐糖能異常、精巣萎縮、などが典型的なものである。これらの症状は、スプライシングが異常になって出現すると考えられている。DM1は、我が国の筋ジストロフィーの中では一番多く、QOLの観点から筋力低下やミオトニアなどの治療法開発が望まれている。

本症の責任遺伝子は第19染色体にあるDMPKであり、その3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が病気の直接の原因である。また、筋強直性ジストロフィー 2 型(DM2)も発見されたが、これは第3染色体にあるZNF9遺伝子中のイントロン 1 にあるCCTGリピートの伸長である。また海外の研究結果によれば、伸長したリピートだけを発現させたHSA-LRマウスでも同じ症状が見られることもわかった。その結果、現在では、本症が、伸長したRNAに特定のスプライシング因子が結合し、スプライシング因子本来の機能が果たせないことで起こるといふ「RNA機能獲得説」が唱えられている。これは、私たちの以前の結果「スプライシング因子MBNL1がDM1とDM2の2つの異なる型の塩基リピートに結合することの発見」が証拠の1つ

となっている。

以前より、バブル・リポソームを用いた導入効率の高いアンチセンス法によって疾患モデル動物のミオトニアを軽減することができていたが、最近、低分子化合物を用いてスプライシングを正常化することも可能になった。最終年度の平成25年度は、アンチセンス治療の最適化に的を絞り、モデル動物を用いた究極の治療法を開発することを目的とした。この目的のために、CTGに対するアンチセンスを用いることにした。

B．研究方法

マウス塩素チャンネルミニ遺伝子と CTG480 コンストラクトを発現させたマウス細胞株 Neuro2a に、CTG に対するモルフォリノアンチセンス CAG を、長さを変えて発現させた。この場合、アンチセンスの塩基数は、15、20、25 とした。

次に、バブル・リポソームを用いて HSA-LR マウス TA 筋にモルフォリノアンチセンス 10 μ g を筋注射し（1 週間おきに 3 回）、最後の筋注射後 1 週間で TA 筋を摘出した。

最後に、vivo-モルフォリノ修飾を施した CAG15 を同様に、バブル・リポソームとともに HSA-LR マウス TA 筋に 10 μ g を筋注射して効果を調べた。投与回数は 3 回とした。

(倫理面への配慮)

今回の実験は、東京大学・動物実験委員会の指

針通りに行った。

C . 研究結果

Neuro2a 細胞を用いたアンチセンス実験では、アンチセンスの塩基数が短いほど、塩素チャンネル遺伝子のスプライシング正常化効果が認められた。また、HSA-LR マウスに投与する実験でも、CAG15 に一番良好な効果が認められた。

そこで、生体内への浸透性が高いと考えられる CAG15 vivo-モルフォリノを 3 回、バブル・リポソームとともに筋注した結果、塩素チャンネル遺伝子のみならず、SERCA 1 遺伝子エクソン 22 のスキップを減少させ正常化する効果が認められた。

D . 考察

本年度は、長く伸びた CTG に対するアンチセンスの効果調べた。その結果、アンチセンスの長さが短いほど、細胞とマウス組織で塩素チャンネル遺伝子のスプライシングを正常化する効果が認められた。

本症は、全身性に多くの遺伝子のスプライシングが異常になる病気である。正常化することが必要なのは塩素チャンネルのみならず、多くの遺伝子である。私たちは、典型的なスプライシング異常が見られる SERCA 1 を調べたところ、この遺伝子のスプライシングも正常化することが分かった。

本研究で用いた CTG に対するアンチセンス CAG は、抜本的に本症の症状を改善する可能性がある。また、前年度までに明らかにした低分子化合物マニマイシン A と併用することにより、スプライシング正常化効果が増進する可能性があることが示唆された。

E . 結論

筋強直性ジストロフィーのモデルである CTG リピートを 300 含むトランスジェニックマウス HSA-LR に対して、CAG アンチセンス vivo-モルフォリノオリゴは、バブル・リポソームと併用することで効果的な治療法になることがわかった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P., Nishino, I., Takeda, S. & Ishiura, S. (2013) Manumycin A corrects aberrant splicing of *Cttn1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Scientific Reports* 3, 2142
- (2) 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
- (3) 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

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 西野 一三 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長

研究要旨

先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）は、先天性ミオパチーの一種であるX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）と臨床的、病理学的に類似の所見を呈することがある。従って、XLMTMとの鑑別診断を十分に検討することが、CDMの正確な診断に繋がる。本年度、遺伝学的にCDMもしくはXLMTMと確定した例において、病理学的に鑑別可能であるかどうかを検討した。その結果、タイプ2C線維数とperipheral halo線維数の比率で両疾患が鑑別可能であることを明らかにした。

A．研究目的

先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）とX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）とは遺伝学的に全く異なる疾患である。CDMは、染色体19q13上の*DMPK*遺伝子の3'非翻訳領域にある三塩基（CTG）反復配列が伸長（1000リピート以上）することで発症し、XLMTMは染色体Xq28上の*MTM1*遺伝子の機能喪失型変異により発症する。しかしながら、両疾患はしばしば臨床的、筋病理学的に極めて類似しており、鑑別が困難なことがある。ともに、臨床的には出生前に胎動減少、羊水過多を、出生後は重度の筋緊張低下、呼吸不全を呈し、筋病理学的には中心核とperipheral haloを呈することが知られている。

筋疾患が疑われる際には伝統的に筋生検が考慮されることに加えて、本邦では一部に遺伝子解析に対する慎重な考え方があることなどもあり、遺伝子診断に選考して筋生検が行われることが少なからずある。従って、筋病理から両疾患を鑑別する必要性は少ない。そこで、CDMとXLMTMの病理学的鑑別方法を十分に検討することによってCDMおよびXLMTMの正確な診断に寄与したいと考え、本年度は、両疾患の筋病理学的鑑別に有用なマーカーを探索するため各種組織学的検討を行った。

B．研究方法

国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリに登録されている症例のうち、遺伝学的に*DMPK*遺伝子の三塩基配列伸長が示唆された31例（CDM群）及び*MTM1*変異の同定されている37例（XLMTM群）を対象とし、タイプ2C線維とperipheral haloを有する線維の割合を計算し、生検時年齢との関係を比較検討した。

（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。国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、検体の研究利用に対するインフォームドコンセントを取得している。

C．研究結果

CDM、XLMTM両疾患において、タイプ2C線維とperipheral haloを有する筋線維の割合を計算し、筋生検時の年齢と比較した。CDMにおいてはタイプ2C線維、peripheral halo線維共に、出生直後は高い割合を占めた。この割合は、筋生検時の年齢が高くなるに従い低下した。一方、XLMTMにおいては、出生直後はタイプ2C線維、peripheral halo線維共に割合は少ないが、年齢が高くなるにつれて、peripheral halo線維のみ顕著な増加を認めた。これらの結果は、両疾患におけるperipheral haloの成因の違いを示唆している。

D . 考察

CDM において、特に出生直後に多数のタイプ 2C 線維を認めたのは、近年指摘されている筋線維の成熟遅延、すなわち未熟性の遷延を反映したためと推測された。一方、XLMTM においてはタイプ 2C 線維は少なく、peripheral halo が筋未熟性によるものではなく、近年の研究で明らかにされている筋構造維持の欠陥により筋障害が起こるといふ説を支持する結果であると考えられた。

E . 結論

CDM と XLMTM は病理学的にタイプ 2C 線維と peripheral halo を有する筋線維の割合から鑑別可能であると考えられる。この結果は両疾患の疾患発症メカニズムの違いを反映していると考えられる。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

Motoki T, Fukuda M, Nakano T, Matsukage S, Fukui A, Akiyoshi S, Hayashi YK, Ishii E, Nishino I: Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatitis in X-linked myotubular myopathy: A case report. *Neuromuscul Disord.* 23(11): 917-921, 2013

Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, Nishino I, Jong YJ: Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan. *Neuromuscul Disord.* 23(8): 675-681, 2013

Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi YK, Negishi Y,

Endo-Takahashi Y, Yanagihara D, Matsuda R, Takahashi MP, Nishino I, Ishiura S: Ultrasound-enhanced delivery of Morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep.* 3: 2242, 2013

Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S: Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep.* 3: 2142, 2013

Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, Nishino I, Nonaka I, Nagai T: Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood. *Neuromuscul Disord.* 23(5): 441-444, 2013

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

特になし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P., <u>Nishino, I.</u> , Takeda, S. & <u>Ishiura, S.</u>	Manumycin A corrects aberrant splicing of <i>Cln1</i> in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice.	Scientific Reports	3	2142	2013
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., <u>Nishino, I.</u> & <u>Ishiura, S.</u>	Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice.	Scientific Reports	3	2242	2013
Suo, S. & <u>Ishiura, S.</u>	Dopamine modulates acetylcholine release via octopamine CREB signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	PLoS ONE	8	e72578	2013
Sasagawa, N., Koebis, M., Yonemura, Y., Mitsuhashi, H. & <u>Ishiura, S.</u>	A high-salinity solution with calcium chloride enables RNase-free, easy plasmid isolation within 55 minutes.	Bioscience Trends	7	270-275	2013
<u>石浦章一</u> 、小穴康介、古戎道典	筋強直性ジストロフィー	臨床神経学	53	1109 - 1111	2013
Motoki T, Fukuda M, Nakano T, Matsukage S, Fukui A, Akiyoshi S, Hayashi YK, Ishii E, <u>Nishino I</u>	Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: A case report.	Neuromuscul Disord.	23(11)	917-921	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, <u>Nishino I</u> , JongYJ	Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan.	Neuromuscul Disord.	23(8)	675-681	2013
Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, <u>Nishino I</u> , Nonaka I, Nagai T	Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood.	Neuromuscul Disord.	23(5)	441-444	2013
Kanno, K., Kokubo, H., Takahashi, A., Koide, T. & <u>Ishiuira, S.</u>	Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in <i>Hesr1</i> -knockout mice.	J.Neurosci. Res.	92	287-297	2014
Yoshida, M., Oami, E., Wang, M., <u>Ishiuira, S.</u> & Suo, S.	Non-redundant function of two highly homologous octopamine receptors in food deprivation-mediated signaling in <i>C. elegans</i> .	J.Neurosci. Res.	92	671-678	2014
大澤奈摘、趙一夢、 <u>石浦章一</u>	筋強直性ジストロフィー	周産期医学	44	237-239	2014
趙一夢、 <u>石浦章一</u>	筋強直性ジストロフィー研究の現在	BRAIN and NERVE	66	259-264	2014