

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15395

研究課題名(和文) 2本鎖形成ピレン修飾核酸の蛍光発光によるジストロフィンmRNAの可視化

研究課題名(英文) Fluorescent detection of dystrophin mRNA with bispyrene labeled probe

研究代表者

松尾 雅文 (Matsuo, Masafumi)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療としてエクソンスキッピング誘導が最も有力なものとして注目されている。この方法では、ジストロフィン遺伝子内の79ヶのエクソンの中で、11のエクソンがスキッピング誘導の有力な対象となる。これら11のエクソンを対象としてそれらのスプライシングを一挙に解析できる高性能スプライシングアッセイ系では、スプライシング産物の解析に労力と費用を要した。本研究は、エクソンスキッピングしたmRNAを蛍光を用いて直接検出する高性能の方法の確立をはかるものである。本検出系の有効性は確認されたので、本研究については今後も引き続き行い、mRNAの蛍光検出系を確立するものである。

研究成果の概要(英文)：Induction of exon skipping of the dystrophin gene is the most promising treatment of Duchenne muscular dystrophy. For this 11 out of 79 dystrophin exons are target of exon skipping. It is the best to induce exon skipping by a small chemical. To search for chemical, in vitro splicing system has been established. However, it takes time and cost to analyze splicing product. In this study it was aimed to establish the method to detect exon skipped mRNA. The validity of this splicing system was confirmed, but it is still on the way to establish efficient detection of skipped mRNA.

研究分野：小児科学

キーワード：エクソンスキッピング ジストロフィン遺伝子 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

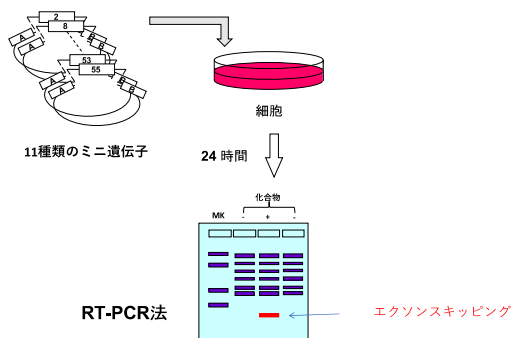
デュシェンヌ型筋ジストロフィー

(Duchenne muscular dystrophy:DMD)は、世界で数万人が罹患する小児の最も頻度の高い進行性の筋萎縮症である。長く根本治療法が無かったが、申請者の提唱したエクソンスキッピングを誘導する DMD 治療が根本治療として世界の標準治療となりつつある。この治療法は、ジストロフィン遺伝子のスプライシング時にアンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)を用いてエクソンスキッピングを誘導し、mRNA の機能を回復させてジストロフィンを発現させるものである。本治療法の効果判定は、エクソンスキッピングを評価するためジストロフィン mRNA の解析が必須である。ところが、mRNA の解析は、RT-PCR 法という莫大な費用・時間・労力を必要とする古典的な手法で実施するため、日常的に行うことは不可能である。そのため、エクソンスキッピング誘導治療の普及の大きな障害となっている。現在、簡単・容易でベッドサイドに近い形で実施可能な mRNA の画期的解析法の開発が、世界中の研究者から強く期待されている。

2. 研究の目的

申請者が提唱した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ピング誘導治療は、世界の数万の患者から大きく期待されている。この治療効果の評価にはジストロフィン mRNA の解析を必須としている。しかし、その解析は、RT-PCR 法という古典的手法しかなく、莫大な費用・時間・労力を費やす(図1)。

スプライシング解析系



そのため、mRNA の画期的解析法の開発が強く期待されている。本研究は、ピレン修飾核酸が 2 本鎖を形成しさらに特異的 2 次構造をとった時にのみ蛍光発光することに着眼して、ジストロフィン mRNA の可視化超簡略化解析法を確立するものである。本研究は、DMD の治療法の開発研究に従事してきた申請者のみが着想しうる極めて独創性に富んだ、しかも、新手法を開拓しようとする挑戦的研究である。

3. 研究の方法

(1) 検出対象モデル系の構築

DMD に対するエクソンスキッピング治療では、エクソンスキッピングを誘導して治療しうるエクソンが限定され、また、エクソンを限定したとしても治療対象となる患者数でさらに限定される。こうしたことから、ジストロフィン遺伝子の 79 ケの中で 11 ケのエクソンが治療標的エクソンの候補となる。この 11 エクソンについては AO の探索が進んでいる。また、実用化として低分子化合物が重要な候補となっている。そこで、こうした 11 ケのエクソンスキッピングを一挙に検出できる系を構築する。ジストロフィンの 11 エクソンをそれぞれ組み込んだプラスミドを構築し、これらのエクソンのどれか 1 つにでもスキッピングがあれば特異的な mRNA の検出で可能とする。

これらの 11 ミニ遺伝子が、エクソンスキッピングにより共通した mRNA を産生するようにデザインする。この共通した mRNA の検出法の確立をはかる。

(2) 解析モデルの有効性の検討

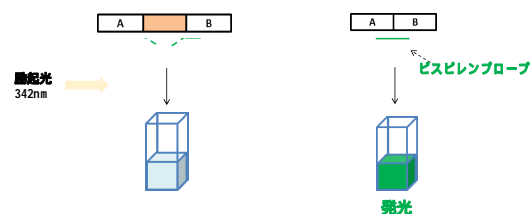
エクソンスキッピング検出系が有効に機能することを、低分子化合物の候補化合物をスクリーニングすることで検討する。

(3) 蛍光検出系の構築

エクソンスキッピング誘導対象となるエクソンが 11 もあり、患者で検出すべき mRNA の種類も多様となる。そこで、mRNA の蛍光検出系の構築については焦点を絞るため、11 エクソンをそれぞれ組み込んだプラスミドからの産生産物を検出する。

そのため、プラスミドから産生される mRNA 配列と一致する RNA の合成とそれに相補的なプローブの合成を行い、最大の出力となるプローブの探索を行う(図2)。

ビスピレンプローブによる 2 本鎖 RNA の蛍光

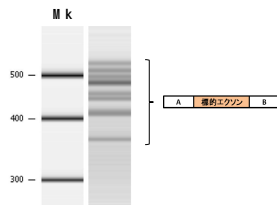


4. 研究成果

(1) 検出モデル系の構築

ジストロフィン遺伝子の 11 エクソンそれぞれを H492 ベクターに挿入したプラスミドを構築した。そして、11 種のプラスミドを同時に細胞に導入し、すべてが発現し、スプライシングを受けることを RT-PCR 法で確認した(図3)。

11種のミニ遺伝子の同時スプライシング解析



さらに、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45 については、すでに確立したエクソン 45 のスキッピングを誘導する A0 を用いて、その効果があることを 11 プラスミド導入系で検討した。その結果、RT-PCR 産物の中の 1 つの産生バンドが予想通りに薄くなり、同時にサイズの小さな産物が出現した。このことから、今回構築した 11 エクソンのスキッピング解析系が良く機能することが明らかとなった。

(2) 解析系の有用性の確認

このスプライシングアッセイ系の実用性について証拠を得るために、候補となる化合物についてそのエクソンスキッピング誘導能を既確立の RT-PCR 法により解析した。その結果、この系を用いることにより、エクソンスキッピング誘導能を有する化合物のみならず、スプライシングを抑制する化合物の同定が可能なが判明した。現在、エクソンスキッピング誘導化合物とスプライシング抑制化合物を探索中である。

(3) 蛍光検出系の構築

先に構築したモデル系においてエクソンスキッピングの結果生じる mRNA の検出をはかる蛍光検出系の構築をはかった。細胞内に導入したミニ遺伝子から産生される標的 mRNA の蛍光による検出については、標的となる RNA の人工合成、プローブとなる ENA 核酸配列の選択と合成などを行った。そして、検出のためのレーザー波長の検討、検出能の分析、検出システムの再構築などの検討を実施した。

試験管内で合成プローブと作成 mRNA を様々な濃度の組み合わせで混合し、励起光を照射して、蛍光発光を観察した。蛍光発光観察時には、さらにその温度条件についても検討した。次いで、細胞内に導入したプラスミ

ドからエクソンスキッピングの結果生じる mRNA の検出を invivo で検討した。試験管内よりも蛍光が最大限に検出できる系の確立をはかった。そのために出力装置と検出装置について検討を行った。こうした蛍光検出系の基盤の整備を進め、蛍光検出システムの確立をはかってきたが、予想外に蛍光が弱く、システムの改良をはかっている。

考察

本検出系を用いたスプライシングアッセイ系の有効性は確認されたので、本研究については今後も引き続き行い、早急にエクソンスキッピングしたジストロフィン mRNA の蛍光検出系を確立するものである。一方、スプライシングを抑制する化合物も見い出されたので、本化合物についてその DMD 治療の応用について検討を続ける。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾雅文 (Matsuo Masafumi)

神戸学院大学・

総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()