

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34509
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K10077
 研究課題名(和文) SMN2遺伝子のイントロン・リテンションを応用した脊髄性筋萎縮症新規治療法の開発

研究課題名(英文) New Treatment Strategy for SMA: Intron-retention of the SMN2 gene

研究代表者
 西尾 久英(Nishio, Hisahide)
 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：80189258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、SMN1遺伝子異常によって生じる運動ニューロン病である。今回、新規治療法を開発する目的で、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)によってSMN2イントロン7のリテンションを誘導する実験を行った。しかし、SMA線維芽細胞に、SMN2イントロン7のスプライス部位を標的とするAOを投与すると、イントロン・リテンションは誘導されず、かえってエクソン7はSMN2 mRNAに組み込まれた(スプライシング増強機能)。また、ヌシネルセン類似AO(Nusi)の実験も行ったが、高用量のNusiを投与すると、潜在エクソンを有する転写産物を生成した(オフターゲット効果)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(学術的意義) SMN2遺伝子エクソン7において、スプライス部位を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)がスプライシングを阻止しないで、かえってスプライシング増強機能を示したことは、スプライシング装置が遺伝子によって異なることを示している。

(社会的意義) ヌシネルセンは、SMA治療薬として、2016年米国で、翌年わが国で薬事承認を受けた。わが国では、400人を超えるSMA患者が本薬剤で治療を受けている。本薬剤のオフターゲット効果は報告されていないが、今回の実験結果はオフターゲット効果の存在を示唆している。ヌシネルセンの投与に際しては、今後も慎重な観察が必要である。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is a motor neuron disease caused by SMN1 gene abnormality. We planned to develop a new treatment strategy for SMA in this project. To produce a higher amount of full-length SMN2 protein in SMA fibroblasts, we designed experiments in which SMN2 intron 7-retention should be induced by antisense oligonucleotide agents (AO). However, when SMA fibroblasts were transfected with AOs targeting the splice sites of SMN2 intron 7, unexpected results were obtained; retention of intron 7 was hardly introduced, but exon 7 was rather incorporated into SMN2 mRNA. Our study revealed that AO, which targeted the splice sites of intron 7, might induce SMN2 exon 7 inclusion, suggesting that our AOs might have splicing-enhancing function. We also did experiments with Nusinersen-like AO (Nusi). High dose of Nusi produced a new transcript with a cryptic exon in SMN2 intron 6, suggesting the possibility of Nusinersen's off-target effect.

研究分野：小児神経学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 SMN1遺伝子 SMN2遺伝子 イントロン・リテンション スプライス部位 アンチセンスオリゴヌクレオチド ヌシネルセン オフターゲット効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄性筋萎縮症(SMA)は、全身性筋力低下を主徴とする運動ニューロン病である。本疾患は1万人に1人の割合で発生する常染色体劣性遺伝病で、保因者の頻度は50人に1人である。患者は、乳児期に、二次的に合併する呼吸不全症のために死亡することが多い。本疾患は、染色体5q13に存在するSMN1遺伝子の欠失あるいは変異によって引き起こされる。ヒトにおいては、SMN1遺伝子と相同なSMN2遺伝子の存在が知られている。SMN1遺伝子、SMN2遺伝子はともにSMN蛋白をコードしていて、SMN2遺伝子はSMN1遺伝子の欠失を完全には補償できない。

(2) 私たちは既に200例を超えるSMA患者についてSMN1遺伝子とSMN2遺伝子解析を行ってきた。その過程で、SMN1遺伝子を欠失している脊髄性筋萎縮症患者については、SMN2遺伝子のコピー数が多いほどSMAは軽症化することが明らかになった。この知見は世界中で確認されていて、ここから、SMAの病態の改善にはSMN2遺伝子発現の促進が有効であると考えられるようになった。そして、SMN2遺伝子の発現促進を目指す治療戦略のもとに、治療薬の開発が進められてきた。

(3) 私たちも、SMN2遺伝子のプロモーターを活性化することを企図して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸による治療を開始した。しかし、ここで、私たちは、バルプロ酸によって転写が促進されているにもかかわらず、エクソン7を含む転写産物(FL-SMN)が増加している症例(症例1)と増加していない症例(症例2)が存在することを見出した。エクソン7を含まない転写産物は、症例1で減少し、症例2で増加していた。症状の改善が認められたのは、やはり症例1であった。この事実は、エクソン7の塩基配列が転写産物に組み込まれるかどうかは治療の成否を決めることを示している。

(4) さらに、私たちに、SMN1・SMN2遺伝子の選択的スプライシングやイントロン・リテンションに注目し、新たなSMN1・SMN2遺伝子のスプライス・アイソフォームを同定してきた実績がある。そこで、私たちは、SMN1遺伝子を欠失しているSMA患者に対して、SMN2遺伝子イントロン7のリテンションを誘導し、エクソン7イントロン7エクソン8を1つの最終メガ・エクソンに転換するという原理に基づく新規治療法を考案するに至った。

2. 研究の目的

(1) SMN2遺伝子イントロン7のリテンションが誘導されれば、その転写産物は必ずエクソン7の塩基配列を持つことになり、有効なSMA治療法の開発につながることを期待される。SMN2遺伝子エクソン7の3'端、イントロン7の5'端、イントロン7の3'端、エクソン8'端のスプライス部位を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)を投与し、SMN2遺伝子イントロン7のリテンションが誘導されるかどうかを検証することにした。

(2) さらに上記のAOによって、SMN2遺伝子エクソン7のインクルージョン(当該エクソンが、スプライシングを受けた結果、転写産物に組み込まれること)が生じる可能性もあることから、そのインクルージョンについても評価しようと考えた。そこで、SMA治療薬として薬事承認を受けているAO製剤(ヌシネルセン)の塩基配列を模したヌシネルセン類似AO(Nusi-AO)を合成し、上記のAOの効果とNusiの効果と比較検討することにした。

3. 研究の方法

(1) AO のデザインと合成

SMN2 遺伝子イントロン 7-エクソン 8 境界のスプライスサイトとエクソン 8 を標的とする AO を合成した。前者の AO は SSJ-IN7-EX8、後者の AO は ASO-EX8 と名付けた。また、対照 AO として、イントロン 7 の ISS-N1 領域[2011 Singh 文献 1]を標的とする AO (Nusi-AO) を合成した (Biofasmac, Japan)。これらの AO は、2'-O-methyl phosphorothioate (2OMe PS) RNA antisense oligonucleotides である。それぞれの AO の配列は、以下のものである。SSJ-IN7-EX8 : 5'-CUAGUAUUUCCUGCAAUGAG-3'、ASO-EX8 : 5'-AUCUUCUAUAACGCUU CACAUUCCA-3'、Nusi-AO : 5'-UCACUUUCAUAAUGCUGG-3'。

(2) 細胞培養と AO トランスフェクション

SMA type 1 線維芽細胞 (GM00232, Coriell Cell Repositories) を Eagle's minimum essential medium にて培養した。80-90% のコンフルエンス (細胞占有面積率) に達した時に、エレクトロポレーション装置 (Neon® Transfection System) を用いて、AO をトランスフェクションした。各培地における AO 濃度は 50、100、200nmol であった。トランスフェクションの後 48 時間培養を継続した。

(3) RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR 実験

トランスフェクション後の細胞から、Sepasol RNA I reagent (Nacalai Tesque) を用いて、total RNA を抽出した。その後、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて、cDNA を合成し、RT-PCR 実験を行った。プライマーは、*SMN2* 遺伝子エクソン 6 の塩基配列に基づくフォワード・プライマー (5'-TGGTACATGAGTGGCTATCATACT-3') と *SMN2* 遺伝子エクソン 8 の塩基配列に基づくリバーズ・プライマー (5'-GTGCTGCTCTATGCCAGCATT-3') を用いた。定量に当たっては、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 転写産物をレファレンスとして用いた。

4. 研究成果

4-1. 結果

(1) イントロン・リテンション誘導効果(図 1)

イントロン・リテンション誘導効果は、ASO-EX8 100/200nmol、SSJ-IN7-EX8 50/100nmol をトランスフェクションした時に認められた。しかし、そのイントロン・リテンションを有する転写産物量は非常に少なく、ゲル電気泳動でようやく確認できるほどであった。Nusi-AO では、イントロン・リテンション誘導効果は全く認められなかった。

(2) スプライシング促進効果(図 1)

スプライシング促進効果は、Nusi-AO 50/100/200nmol、ASO-EX8 50/100nmol、SSJ-IN7-EX8 50nmol をトランスフェクションした時に認められた(図 1)。ゲル電気泳動で確認する限り、ASO-EX8 50/100nmol、SSJ-IN7-EX8 50nmol のスプライシング促進効果は、それらのイントロン・リテンション誘導効果よりも大きいと判断できた。Nusi-ASO のスプライシング促進効果については、用量依存性が認められた。

(3) 潜在エクソン活性化効果(図 1)

Nusi-AO 200nmol、ASO-EX8 200nmol、SSJ-IN7-EX8 200nmol をトランスフェクションした時に、新たに別の転写産物が産生された。シーケンス解析の結果、潜在エクソン(エクソン 7a)[2016 Yoshimoto 文献 2]を含む転写産物であることが確認された。

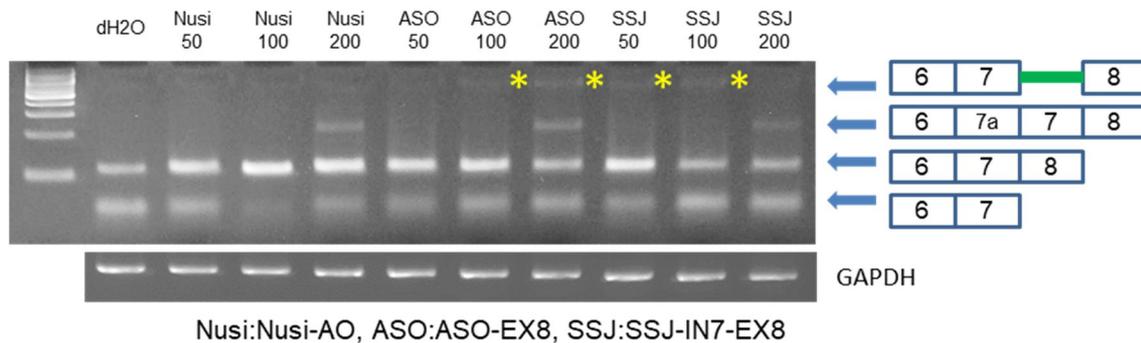


図1. AOがSMN2遺伝子エクソン7のスプライシングに及ぼす影響

4 - 2 . 考察

上記の結果より、SMN2 遺伝子イントロン7-エクソン8境界のスプライスサイトとエクソン8を標的とするAOは、イントロン・リテンションをわずかし誘導せず、かえってエクソン7のスプライシングを誘導したことになる。またヌシネルセン類似AO(Nusi-AO)の実験も行ったが、高用量のNusi-AOを投与すると、潜在エクソン(エクソン7a)を有する転写産物を生成した。エクソン7aには早期終止コドンが含まれていることから、高用量のヌシネルセン投与によってSMN蛋白の産生が増加するとは限らないことが明らかになった。エクソン7aを有する転写産物の生成もヌシネルセンのオフターゲット効果とみなすことができ、ヌシネルセンによるSMA治療の際には留意すべきことである。

<引用文献>

(1) Natalia N. Singh & Ravindra N. Singh. Alternative splicing in spinal muscular atrophy underscores the role of an intron definition model, RNA Biology, (2011) 8: 4, 600-606; DOI: 10.4161/rna.8.4.16224

(2) Satomi Yoshimoto, Nur Imma Fatimah Harahap, Yuko Hamamura, Mawaddah Ar Rochmah, Ai Shima, Naoya Morisada, Masakazu Shinohara, Toshio Saito, Kayoko Saito, Poh San Lai, Masafumi Matsuo, Hiroyuki Awano, Ichiro Morioka, Kazumoto Iijima and Hisahide Nishio. Alternative splicing of a cryptic exon embedded in intron 6 of *SMN1* and *SMN2*. Human Genome Variation (2016) 3, 16040; doi:10.1038/hgv.2016.40

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harahap NIF, Niba ETE, Ar Rochmah M, Wijaya YOS, Saito T, Saito K, Awano H, Morioka I, Iijima K, Lai PS, Matsuo M, Nishio H, Shinohara M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Intron-retained transcripts of the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain & Devlopment	6. 最初と最後の頁 670, 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuo M, Shirakawa T, Awano H, Nishio H.	4. 巻 486
2. 論文標題 Receiver operating curve analyses of urinary titin of healthy 3-y-old children may be a noninvasive screening method for Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 110, 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2018.07.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshioka M, Morisada N, Toyoshima D, Yoshimura H, Nishio H, Iijima K, Takeshima Y, Uehara T, Kosaki K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel BICD2 mutation in a Japanese family with autosomal dominant lower extremity-predominant spinal muscular atrophy-2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain & Devlopment	6. 最初と最後の頁 343, 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niba Emma Tabe Eko, Yamanaka Ryo, Rani Abdul Qawee Mahyoob, Awano Hiroyuki, Matsumoto Masaaki, Nishio Hisahide, Matsuo Masafumi	4. 巻 17
2. 論文標題 DMD transcripts in CRL-2061 rhabdomyosarcoma cells show high levels of intron retention by intron-specific PCR amplification	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Cell International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12935-017-0428-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ar Rochmah Mawaddah, Awano Hiroyuki, Awaya Tomonari, Harahap Nur Imma Fatimah, Morisada Naoya, Bouike Yoshihiro, Saito Toshio, Kubo Yuji, Saito Kayoko, Lai Poh San, Morioka Ichiro, Iijima Kazumoto, Nishio Hisahide, Shinohara Masakazu	4. 巻 39
2. 論文標題 Spinal muscular atrophy carriers with two SMN1 copies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 851 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ar Rochmah Mawaddah, Harahap Nur Imma Fatimah, Niba Emma Tabe Eko, Nakanishi Kenta, Awano Hiroyuki, Morioka Ichiro, Iijima Kazumoto, Saito Toshio, Saito Kayoko, Lai Poh San, Takeshima Yasuhiro, Takeuchi Atsuko, Bouike Yoshihiro, Okamoto Maya, Nishio Hisahide, Shinohara Masakazu	4. 巻 39
2. 論文標題 Genetic screening of spinal muscular atrophy using a real-time modified COP-PCR technique with dried blood-spot DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 774 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takarada Toru, Ar Rochmah Mawaddah, Harahap Nur Imma Fatimah, Shinohara Masakazu, Saito Toshio, Saito Kayoko, Lai Poh San, Bouike Yoshihiro, Takeshima Yasuhiro, Awano Hiroyuki, Morioka Ichiro, Iijima Kazumoto, Nishio Hisahide, Takeuchi Atsuko	4. 巻 39
2. 論文標題 SMA mutations in SMN Tudor and C-terminal domains destabilize the protein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 606 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niba Emma Tabe Eko, Nishida Atsushi, Tran Van Khanh, Vu Dung Chi, Matsumoto Masaaki, Awano Hiroyuki, Lee Tomoko, Takeshima Yasuhiro, Nishio Hisahide, Matsuo Masafumi	4. 巻 62
2. 論文標題 Cryptic splice activation but not exon skipping is observed in minigene assays of dystrophin c.9361+1G>A mutation identified by NGS	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 531 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2016.162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西尾久英
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症の新生児マススクリーニング
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本真里、佐久間肇、相場佳織、戸田泰子、横地健治、西尾久英
2. 発表標題 SMNハイブリッド遺伝子を有する脊髄性筋萎縮症2/3型の一例
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisahide Nishio
2. 発表標題 Genetic diagnosis of spinal muscular atrophy in Japan
3. 学会等名 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Emma Niba, Ryo Yamanaka, Abdul Qawee Mahyoob Rani, Hiroyuki Awano, Masaaki Matsumoto, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo
2. 発表標題 Dystrophin Dp427 is lost due to multiple DMD intron retentions in rhabdomyosarcoma CRL-2061 cells.
3. 学会等名 22nd INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Emma Niba, Ryo Yamanaka, Rani Adbul, Hiroyuki Awano, Masaaki Matsumoto, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo.
2. 発表標題 Multi-intron retentions in DMD transcripts in CRL-2061 rhabdomyosarcoma cells identified by intron-specific RT-PCR
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 SNP検出方法	発明者 西尾久英、篠原正和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-196967	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>神戸学院大学 教員総覧 総合リハビリテーション学部 https://www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/rehabilitation/nishio.html 神戸大学大学院医学研究科 地域社会医学・健康科学講座 疫学分野 http://www.med.kobe-u.ac.jp/pbheal/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠原 正和 (Shinohara Masakazu) (80437483)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	