

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10087

研究課題名(和文)筋ジストロフィーエクソスキッピング誘導治療の非侵襲的効果予測系の構築

研究課題名(英文) Non-invasive system for predicting effectiveness of the exon skipping therapy for muscular dystrophy

研究代表者

竹島 泰弘 (Yasuhiro, Takeshima)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000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に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドによりスプライシングを制御する治療法の開発が進められ、その一部は保険適用になっている。しかし個々の症例において治療効果に差がみられる可能性が示唆され、この治療の推進の妨げになっている。本研究では、非侵襲的に治療効果を予測できるシステムを開発するために、症例で見られる遺伝子変異とスプライシング型を明らかにし、さらに培養細胞における再現を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、アンチセンスオリゴヌクレオチドによりスプライシングを制御する治療法において、事前に、非侵襲的にその有効性を予測するシステムを開発し得る可能性がある。このようなシステムを応用することにより、よりの確に本治療法を臨床応用できるようになり、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の開発をさらに推進できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Modulation of splicing with antisense oligonucleotide that convert out-of-frame dystrophin mRNA into in-frame has been developed as a novel therapy for Duchenne muscular dystrophy. However, the effectiveness is different among patients, which disturb the development of antisense oligonucleotide therapy. To establish the non-invasive system for predicting effectiveness of the splicing modulation therapy for muscular dystrophy, gene mutation and splicing pattern of patients were analyzed, and artificial mutant genes were introduced to the cultured cells.

研究分野：小児遺伝学

キーワード：muscular dystrophy molecular therapy splicing exon skipping

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) はジストロフィン遺伝子変異による遺伝性進行性の筋疾患であり、その予後は不良である。従来、本疾患に対しては対症療法しかなく、根治的な治療法が切望されていた。私たちは DMD に対する根治治療として、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-oligo) によってエクソスキッピングを誘導し、out-of-frame 欠失を in-frame 欠失に変えて遺伝情報を修正する「エクソスキッピング誘導治療」の有効性を、世界で初めて臨床的に明らかにした (Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, Sakaeda T, Saura R, Okumura K, and Matsuo M. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* 59: 690-694, 2006.)。この成果を受け、現在、世界各地で種々の修飾核酸による「エクソスキッピング誘導治療」の臨床応用の検討が進められている。そして、2016 年 9 月、モルフォリノ核酸によるエクソン 51 スキッピング誘導治療が米国 FDA において迅速承認を受けた。これは、世界で初めて「エクソスキッピング誘導治療」が承認を受けたものであり、申請者らの提唱した本治療法の開発がさらに加速されることを示すものである。

しかし、本治療法の治験・臨床研究を行う中、同じ遺伝子変異であっても症例により有効性が異なっていることが示唆されており、そのことが本治療法の有効性評価、さらに臨床応用において大きな妨げになっている。申請者らは、症例によって筋細胞における AS-oligo によるエクソスキッピング効率が異なり、そのことが本治療の有効性を左右している可能性を着想した。事実、基礎研究の過程で、私たちは、筋培養細胞における AS-oligo によるエクソスキッピング効率が、症例により異なることを見出している (Lee T, Awano H, Yagi M, Matsumoto M, Watanabe N, Goda R, Koizumi M, Takeshima Y, Matsuo M. 2'-O-Methyl RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acid Chimera Antisense Oligonucleotides to Induce Dystrophin Exon 45 Skipping. *Genes (Basel)*. 8: E67, 2017.)。

AS-oligo による治療を、今後、臨床の現場で展開していく上において、個々の症例における AS-oligo による治療の有効性を、事前に判定する系を確立することが、臨床上切望されている。

2. 研究の目的

エクソスキッピング誘導治療の治験を行う中において、同じ遺伝子変異であっても症例における有効性に差がみられることが示唆されている。しかし、個々の症例に対する有効性を事前にかつ非侵襲的に予測する方法は無く、このことが AS-oligo による治療を推進していく上で大きな妨げになっている。

本研究の目的は、筋ジストロフィー患者でみられるスプライシングを培養細胞において再現する系を確立し、さらに、その系において AS-oligo による治療の有効性を、非侵襲的に予測するシステムを構築することである。

3. 研究の方法

筋ジストロフィー症例における責任遺伝子変異の同定

ジストロフィン遺伝子変異の同定は、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法によりエクソン単位の欠失・重複変異の解析を行った。MLPA 法によって欠失・重複変異が同定されなかった症例に対し、ダイレクト・シーケンシング法あるいは次世代シーケンサーにより点変異、1 ないし数塩基の欠失・重複変異などの微小変異の同定を行った。従来、ダイレクトシーケンシング法で行っていたが、ジストロフィン遺伝子が 2.4Mb に及ぶ巨大な遺伝子であるため、次世代シーケンサーによる解析を導入し、微小変異解析の効率化を図った。ジストロフィン異常症以外の筋ジストロフィー症例においても、ゲノム変異のスプライシングに及ぼす影響を明らかにするため、ゲノムおよび mRNA の解析を行った。ゲノム変異の同定は次世代シーケンサー法およびサンガー法によって行った。

筋・血液組織などにおける mRNA の解析

微小変異による DMD/BMD 症例および肢帯型筋ジストロフィー症例の筋生検組織あるいはリンパ球より RNA を抽出、その後 RT-PCR 法により mRNA の解析を行い、エクソンスキッピングなどのスプライシング異常の検討を行った。

培養細胞における、スプライシングシステムの構築

症例で認められた変異を有するミニジーンを作成し、HeLa 細胞へ導入して症例で見られたスプライシングを再現できることを確認する。さらに、AS-oligo を導入し、スプライシングを制御し得ることを検証する。

4 . 研究成果

DMD 症例のジストロフィン遺伝子解析により、スプライスサイト変異 c.3603+1G>T (intron26)を同定、mRNA の解析を行った。その結果、mRNA ではエクソン 26 と 27 の間にイントロン 26 の 5'側 116 塩基が挿入されていた。*in silico* 解析ではイントロン 26 のスプライスドナーサイトの変異によりイントロン 26 内の潜在的スプライスドナーサイトが活性化したため、mRNA において 116 塩基の挿入 (アウト・オフ・フレーム挿入) を認め、表現型が重症の DMD となったことが明らかになった。スプライスドナーサイトの変異の場合、潜在的スプライスドナーサイト活性化あるいはエクソンスキッピング誘導が想定される。エクソン 26 が 171 塩基であるため、イントロン 26 内の潜在的スプライスドナーサイトを AS-oligo により不活化し、エクソン 26 のスキッピングが誘導させると、イン・フレーム欠失 mRNA が産生され、表現型が軽症化する可能性がある。

他の DMD では、ジストロフィン遺伝子解析により、イントロン 68 のスプライスドナーサイト変異 (c.9974G>C) を同定、mRNA ではエクソン 68 のスキッピングを認めた。エクソン 68 は 167 塩基であり、アウト・オフ・フレーム欠失となるため、表現型が重症の DMD となったことが明らかになった。また、イントロン 10 のスプライスアクセプターサイト変異 (c.1150-2A>T) の症例では、mRNA ではエクソン 11 のスキッピングを認めた。エクソン 11 は 182 塩基であり、同様にアウト・オフ・フレーム欠失となるため、DMD の表現型を呈した。これらの症例において、各エクソンに対するスプライシングサイレンサーを AS-oligo により不活化し、エクソンのスキッピングを阻害させると、潜在的スプライシングサイトが活性化され、イン・フレーム mRNA が産生されることにより、表現型が軽症化する可能性がある。

一方、型コラーゲン遺伝子変異によるミオパチーは、重症型の Ullrich 型筋ジストロフィー

(Ullrich congenital muscular dystrophy: UCMD) と軽症型の Bethlem ミオパチーの表現型を取り得る。UCMD 症例を解析したところ、一方のアレルにイントロン 17 のスプライスアクセプターサイト変異(c.6238-1G>T)、およびイントロン 18 のスプライスアクセプターサイト変異(c.6310-2A>T)を認め、mRNA の解析では、前者はエクソンスキッピングを、後者は潜在的スプライスサイトの活性化を誘導した(Shimomura H, Lee T, Tanaka Y, Awano H, Itoh K, Nishino I, Takeshima Y. Two Closely Spaced Mutations *in cis* Result in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy. Hum Genome Var 26: 21, 2019.)。型コラーゲン遺伝子変異によるミオパチーにおける遺伝子型・表現型の関連は明らかにされていないが、明らかにすることができると、スプライシングを制御する治療法を確立できる可能性がある。

これらの症例を含む、多数例の解析研究で得られたデータをもとにミニジーンを作成し、培養細胞においてスプライシングを制御する治療法の検討を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimomura Hideki, Lee Tomoko, Tanaka Yasuhiko, Awano Hiroyuki, Itoh Kyoko, Nishino Ichizo, Takeshima Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Two closely spaced mutations in cis result in Ullrich congenital muscular dystrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-019-0052-z	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 Lee Tomoko, Takami Yuichi, Yamada Kenji, Kobayashi Hironori, Hasegawa Yuki, Sasai Hideo, Otsuka Hiroki, Takeshima Yasuhiro, Fukao Toshiyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 A Japanese case of mitochondrial 3 hydroxy 3 methylglutaryl CoA synthase deficiency who presented with severe metabolic acidosis and fatty liver without hypoglycemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JIMD Reports	6. 最初と最後の頁 19 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmd2.12051	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 Yamamoto Takuma, Miura Aya, Itoh Kyoko, Takeshima Yasuhiro, Nishio Hajime	4. 巻 302
2. 論文標題 RNA sequencing reveals abnormal LDB3 splicing in sudden cardiac death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 109906 ~ 109906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.forsciint.2019.109906	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 Lee Tomoko, Misaki Maiko, Shimomura Hideki, Tanaka Yasuhiko, Yoshida Satoru, Murayama Kei, Nakamura Kimitoshi, Fujiki Ryoji, Ohara Osamu, Sasai Hideo, Fukao Toshiyuki, Takeshima Yasuhiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Late-onset ornithine transcarbamylase deficiency caused by a somatic mosaic mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-018-0022-x	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 Awano H, Itoh C, Takeshima Y, Lee T, Matsumoto M, Kida A, Kaise T, Suzuki T, Matsuo M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Ambulatory capacity in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 465-472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.02.011.	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 Matsumoto M, Awano H, Lee T, Takeshima Y, Matsuo M, Iijima K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Patients with Duchenne muscular dystrophy are significantly shorter than those with Becker muscular dystrophy, with the higher incidence of short stature in Dp71 mutated subgroup	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuromuscular disorders	6. 最初と最後の頁 1023-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmd.2017.06.007	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 Yamamoto T, Taniguchi-Ikeda M, Awano H, Matsumoto M, Lee T, Harada R, Imanishi T, Hayashi N, Sakai Y, Morioka I, Takeshima Y, Iijima K, Saegusa J, Toda T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Cardiac involvement in Fukuyama muscular dystrophy is less severe than in Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 861-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.05.008	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7件 (うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tomoko Lee, Sachi Tokunaga, Chikako Mure, Maiko Misaki, Hideki Shimomura, Ichizo Nishino, Kyoko Ito, Yasuhiro Takeshima
2. 発表標題 Clinical background of hyper-creatine-kinase-emia girls without a family history of genetic muscular diseases.
3. 学会等名 European Human Genetics Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Awano, Masashi Nagai, Taku Shirakawa, Kayo Osawa, Tomoko Lee, Yasuhiro Takeshima, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo, Kazumoto Iijima.
2. 発表標題 Urinary titin is elevated in spinal muscular atrophy.
3. 学会等名 24th International Annual Congress of the World Muscle Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Lee, Tasuyuki Sokoda, Maiko Misaki, Hideki Shimomura, Yasuhiro Takeshima.
2. 発表標題 A manifesting carrier of Duchenne Muscular Dystrophy with a balanced X-autosome translocation with a breakpoint in the dystrophin gene.
3. 学会等名 24th International Annual Congress of the World Muscle Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李知子、三崎真生子、下村英毅、伊東恭子、竹島泰弘
2. 発表標題 家族歴のない無症候性高CK血症女兒の検討
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李知子、西岡 隆文、三崎真生子、下村英毅、竹島泰弘
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によりCalpain-3遺伝子変異を同定した筋症状のない高CK血症女兒
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 知子、下村英毅、牟禮慎子、三崎真生子、香田 翼、柴田暁男、
2. 発表標題 新規変異を同定した重症型LMNA-related congenital muscular dystrophy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 李 知子、下村英毅、牟禮慎子、三崎真生子、香田 翼、柴田暁男、川本久美、岡田陽子、小泉真琴、伊東恭子、竹島泰弘
2. 発表標題 新規変異を同定した重症型LMNA-related congenital muscular dystrophyの一例
3. 学会等名 日本小児神経学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	李 知子 (Lee Tomoko) (10596042)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	下村 英毅 (Shimomura Hideki) (30441273)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	三崎 真生子 (Misaki Maiko) (50595048)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	