

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02577

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたDMD遺伝子エクソン3-9スキップ治療の開発

研究課題名（英文）Development of DMD exon 3-9 skipping therapy using iPSc

研究代表者

中村 昭則（Nakamura, Akinori）

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10303471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000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（DMD）はDMD遺伝子変異により発症する致死性筋疾患である。近年、DMDを軽症ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）に変換するエクソン・スキップ治療開発が進んでいる。DMD遺伝子エクソン3-9欠失が無症候であり、DMDの約10%がエクソン3～9に変異を持つことからエクソン3-9スキップ治療開発のためiPS細胞を用いて検討した。ゲノム編集で作製したエクソン3-7（DMD型）および3-9欠失型（無症候型）iPS細胞から心筋細胞を分化誘導し比較したところ、エクソン3-7欠失に比しエクソン3-9欠失では成熟化因子及び心筋負荷マーカー関連遺伝子の発現異常が改善していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では多くのジストロフィン異常症患者を無症候性にまで改善させることが可能なエクソン3-9スキップ治療の基盤研究を行うことである。エクソン・スキップ治療はアンチセンス核酸やゲノム編集を用いて行うことができるが、特に心筋細胞についてはエクソン・スキップ治療後に細胞の機能や遺伝子発現がどの程度正常化するかに関する検証はほとんどない。そこで、健康男性iPS細胞からゲノム編集を用いてDMD型と無症候性型のiPS細胞作製し、さらに各細胞から分化誘導した心筋細胞について分子レベルにおける有効性を検証した成果である。エクソン3-9スキップ治療の臨床応用に向けた基盤となるデータを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal muscular disease caused by mutations in the DMD gene. In recent years, the development of exon skipping therapy for converting DMD to mild Becker muscular dystrophy (BMD) has been progressing. Since the DMD exon 3-9 deletion is asymptomatic and about 10% of DMDs have mutations in exon 3-9 region, we investigated using iPSc cells for the development of exon 3-9 skipping therapy. Myocardial cells were induced to differentiate from exon 3-7 (DMD type) and 3-9 deleted (asymptomatic type) iPSc cells prepared by gene editing. Abnormal expressions of genes of maturation factors and myocardial loading markers were improved in exon 3-7-deleted myocardium compared with exon 3-9 deleted myocardium.

研究分野：脳神経内科学、筋肉病学、分子生物学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、DMD遺伝子、エクソン・スキップ治療、アンチセンス薬、ゲノム編集、iPS細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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 (DMD) は、DMD遺伝子の変異によりジストロフィンが完全に欠損し、その結果全身の骨格筋・心筋の変性・壊死が進行性に起こり、最終的には呼吸不全または心筋障害 (心不全・不整脈) により30代半ばで死亡する致死性疾患である。最近、DMDを軽症のベッカー型筋ジストロフィー (BMD) に転換を目指したアンチセンス核酸によるエクソン・スキップ治療の臨床応用が進んでいる。

現在、DMD/BMDでは呼吸器管理などの進歩により寿命が延長しているため、心筋障害が生命予後を規定する重要なファクターになってきた。エクソン・スキップ治療はアンチセンス核酸またはゲノム編集を用いて可能であるが、アンチセンス核酸の細胞導入効率が骨格筋に比して心筋細胞で著しく低いために、より導入効率の高いアンチセンス核酸の開発が進められている。しかし、細胞毒性やオフターゲットなどの課題も少なくない。将来的にはウイルスベクターやゲノム編集も導入手段として用いられる可能性があり、導入効率の課題は改善される可能性がある。一方でエクソン・スキップ後の遺伝子型へ修正することで本当に症状が改善し得るかの問題については十分に検討されていない。

### 2. 研究の目的

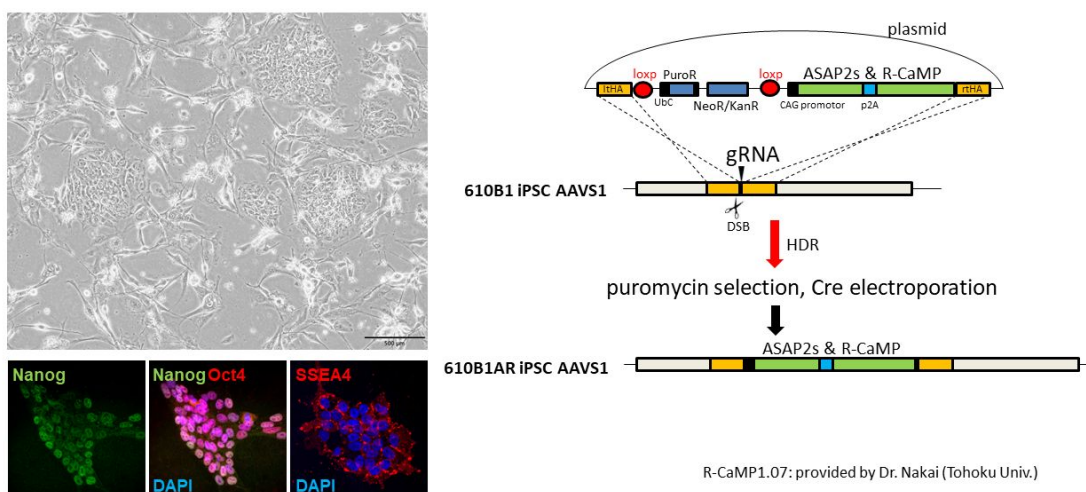
我々は DMD 遺伝子エクソン 3 - 9 欠失患者が無症候であること、DMD の約 10% がエクソン 3 - 7 の領域に変異が集積していることに注目し、エクソン 3 - 9 内に変異を有する DMD および重症 BMD 患者に対してエクソン 3 - 9 スキップが極めて有効な治療法になる可能性があることを提案してきた。本研究では、エクソン 3 - 9 スキップ治療の効果検証についての基盤的研究を行うため、細胞への導入効率が安定しないアンチセンス核酸よりも先にゲノム編集技術を用いて検討を行った。

### 3. 研究の方法

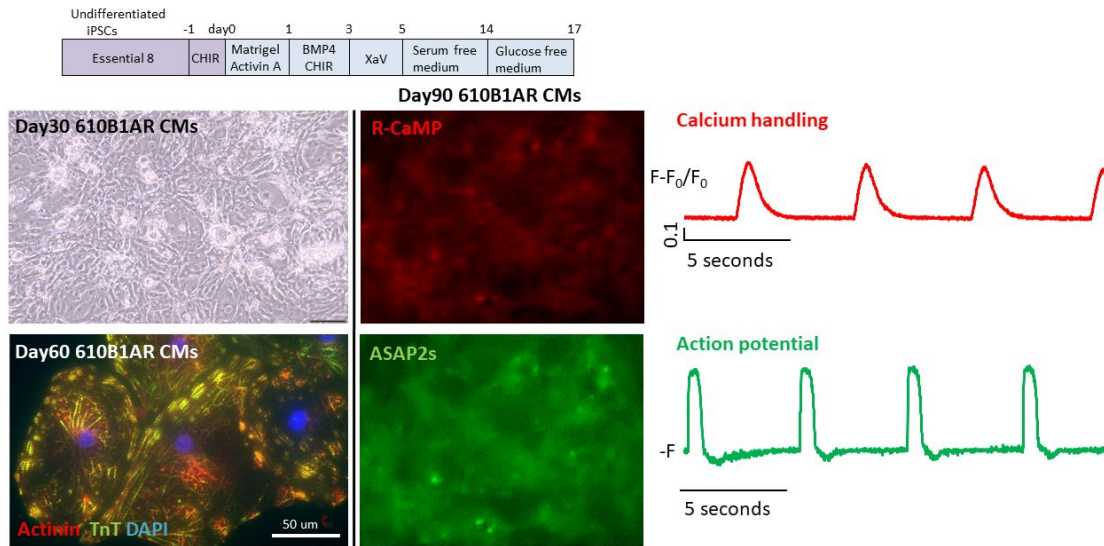
理研バイオリソースセンターから入手した健常男性 iPS 細胞 (610B1) を用い、ゲノム編集技術により iPS 細胞への蛍光カルシウム (R-CaMP) および活動電位 (ASAP2s) インジケータ遺伝子 (東北大学中井教授より供与) を導入した。次にこの iPS 細胞から分化誘導した心筋の  $Ca^{2+}$  の動態及び活動電位を検討した。さらに、無症候型となるエクソン 3 - 9 欠失および DMD 型となるエクソン 3 - 7 欠失 iPS 細胞を作製し、それぞれ分化誘導した心筋細胞を用いて、細胞機能および遺伝子網羅的発現解析を行った。

### 4. 研究成果

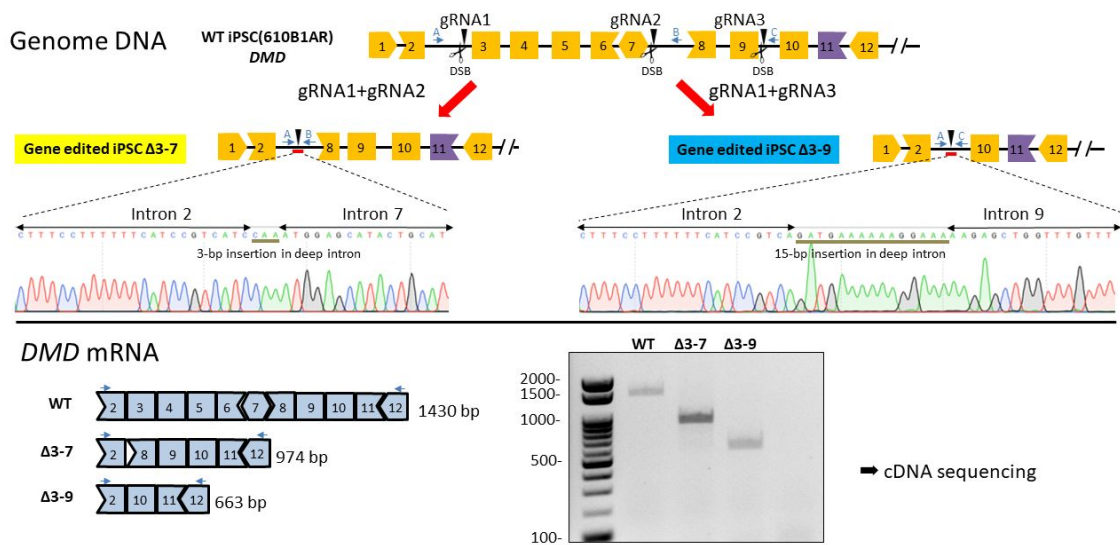
- (1) 健常男性 iPS 細胞 610B1 の AAVS1 領域に ASAP2s および R-CaMP が組み込まれたインジケータ遺伝子をゲノム編集技術を用いて相同組み換え修復を行った。さらに puromycin セレクションおよび Cre エレクトロポレーションを用いて薬剤選択を行い、目的とする iPS 細胞 (610B1AR iPS と命名) を得た。



- (2) 610B1AR iPS細胞に対してActivin A、DMP4、CHIR、XaVにより心筋細胞に分化誘導し、day 30で心筋特異的なCa<sup>2+</sup>の動態と活動電位を確認できた。



- (3) 610B1AR iPS細胞に対してゲノム編集を用いてエクソン3 - 7および3 - 9欠失型iPS細胞を樹立した。



- (4) エクソン3 - 7および3 - 9欠失型iPS細胞を各々心筋細胞に分化誘導し、正常心筋細胞と比較した結果、成熟化因子（ミオシン軽鎖やトロポニンI）の遺伝子、心筋負荷マーカー（心房性、脳型ナトリウム利尿ホルモン）の遺伝子、イオンチャネル（ナトリウム、カリウム、カルシウムの各イオンチャネル）の遺伝子の発現異常を見出した。また、DMD型のエクソン3 - 7欠失心筋細胞に比べ無症候型のエクソン3 - 9欠失心筋細胞においてこれらの遺伝子の発現異常は改善していた。

これまで、心筋細胞についてはエクソン・スキップ治療後に細胞の機能や遺伝子発現がどの程度まで改善するかについての検証はほとんど行われていなかったが、本研究では健康男性iPS細胞からゲノム編集を用いたDMD型と無症候型の心筋細胞について分子レベルでその有効性について検討することができた。今回、スキップ効率が100%となるゲノム編集によるエクソン・スキップにより検討した結果である、アンチセンス核酸を用いた場合の対照データが得られたと考えている。今後はエクソン3 - 7欠失型心筋細胞に対しアンチセンス核酸によるエクソン8、9スキップを行った細胞とゲノム編集によるエクソン3 - 9欠失細胞の遺伝子発現について検討を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato M, Shiba N, Miyazaki D, Shiba Y, Echigoya Y, Yokota T, Takizawa H, Aoki Y, Takeda S, Nakamura A.	4. 巻 520
2. 論文標題 Amelioration of intracellular Ca <sup>2+</sup> regulation by exon-45 skipping in Duchenne muscular dystrophy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.09.095.	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 Sato M, Takizawa H, Nakamura A, Turner BJ, Shabanpoor F, Aoki Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Application of Urine-Derived Stem Cells to Cellular Modeling in Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2019.00297.	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 Echigoya Yusuke, Lim Kenji Rowel Q., Nakamura Akinori, Yokota Toshifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Multiple Exon Skipping in the Duchenne Muscular Dystrophy Hot Spots: Prospects and Challenges	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 41~41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm8040041	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Akinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Mutation-Based Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: From Genetic Diagnosis to Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 16~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm9010016	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura A.
2. 発表標題 Natural history study for preventative medicine for cardiac involvement of Becker muscular dystrophy.
3. 学会等名 60th Annual Meeting of The Japanese Society of Neurology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyazaki D., Sato M., Shiba N., Shiba Y., Echigoya Y., Yokota T., Aoki Y., Takeda S., Nakamura A.
2. 発表標題 Gene expression in cardiomyocytes from DMD with exon 46-55 deletion after exon 45 skipping therapy.
3. 学会等名 60th Annual Meeting of The Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤充人、宮崎大吾、柴直子、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則
2. 発表標題 DMD遺伝子exon46-55欠失変異を持つDMD患者iPSC由来心筋細胞に対するexon 45 skip治療に関する研究
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎大吾、柴直子、佐藤充人、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、溝部吉高、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則
2. 発表標題 DMD患者由来心筋細胞における分化・再生関連遺伝子の発現低下と心筋障害への影響に関する研究
3. 学会等名 第14回筋ジストロフィー治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村昭則
2. 発表標題 ベッカー型筋ジストロフィーの自然歴調査研究 先制医療に向けてー
3. 学会等名 第6回筋ジストロフィー医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村昭則
2. 発表標題 筋ジストロフィーの最新治療
3. 学会等名 第1回長野県筋ジストロフィー市民公開講座
4. 発表年 2019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	柴 直子 (Shiba Naoko)  (00639289)	信州大学・医学部・助教(特定雇用)  (13601)	
研究分担者	柴 祐司 (Shiba Yuji)  (70613503)	信州大学・学術研究院医学系・教授  (13601)	
研究分担者	青木 吉嗣 (Aoki Yoshitsugu)  (80534172)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・部長  (82611)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮崎 大吾  (Miyazaki Daigo)  (80596370)	信州大学・医学部附属病院・講師（特定雇用）    (13601)	
研究分担者	武田 伸一  (Takeda Shin'ichi)  (90171644)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・その他部局等・顧問    (82611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関