

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15734

研究課題名（和文）イントロン内配列制御による筋ジストロフィーエクソンスキッピング治療効率化の検証

研究課題名（英文）Enhancement of exon skipping therapy by controlling intronic sequences

研究代表者

李 知子（Lee, Tomoko）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10596042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000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)に対するエクソンスキッピング誘導治療では、治療効果を増強する新たな戦略の開発が急務となっている。研究者らは、イントロン内スプライシング制御配列を同定し、同領域を制御することでエクソンスキッピング効率を増強し得ることを検証した。まず欠失変異を有するDMD患者の末梢血より抽出したgDNAを用いてイントロン配列を解析した。さらに末梢血または筋由来mRNAを用いてスプライシングパターンを解析する系を確立した。イントロン配列とスプライシングパターンを検討し、イントロン内スプライシング制御配列の同定およびエクソンスキッピング治療効果へ与える影響について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はイントロン制御部位を新たな標的とするAS-oligoを開発しエクソン内とイントロン内の両方の制御部位を抑制することでさらに効率よくエクソンスキッピングを誘導することを目的とする独創的な研究であり、エクソンスキッピング治療の有効性を高め、DMDの根治治療に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Exon skipping therapies for Duchenne muscular dystrophy (DMD) require new strategies to enhance the effect. We have identified intronic splicing control sequences and verified that exon skipping efficiency can be enhanced by controlling the region. First, the intron sequences were analyzed using gDNA extracted from the peripheral blood of DMD patients with deletion mutations. Furthermore, we established a system to analyze splicing patterns using peripheral blood or muscle-derived mRNA. By examining the intron sequences and splicing patterns, we investigated the intronic splicing control sequences and the effect on the exon skipping therapy.

研究分野：小児神経、遺伝学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー エクソンスキッピング治療 スプライシング イントロン内スプライシング制御配列 アンチセンスオリゴヌクレオチド

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

(1) デュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: DMD)に対してアンチセンスオリゴヌクレオチド(As-oligo)によりエクソンスキッピングを誘導する治療が注目されている。エクソン内スプライシング制御配列を標的とし、スプライシングを変化させる治療であり、近年世界各国で治験が進められている。しかし、明確な臨床効果を示すには至っておらず、治療効果を増強する新たな戦略の開発が急務となっている。

(2) 研究者らは、ジストロフィン遺伝子内において、イントロン内にスプライシングを制御し得る配列があることを明らかにしており(Dwianingsih EK.et al. J Hum Genet. 59: 423-9, 2014)、さらにエクソンスキッピング治療研究の中で、スキッピング効率が症例によって異なり、その差異がESE以外のイントロン内スプライシング制御部位に由来する可能性を見出していた。

2. 研究の目的

エクソンスキッピング治療研究では様々な AS-oligo の開発が行われてきたが、いずれもエクソン内スプライシング促進配列(exonic splicing enhancer: ESE)を標的としたものであった。本研究は、ジストロフィン遺伝子のイントロン内スプライシング制御配列を明らかにし、AS-oligo により ESE だけでなくイントロン内スプライシング制御配列をも抑制することにより、さらに効率的にスプライシングを制御し得ることを検証するという新たな視点からの独創的なアプローチであり、エクソンスキッピング治療の有効性を増強する新たな治療法を創造するものである。

3. 研究の方法

(1) ジストロフィン遺伝子のイントロン内スプライシング促進配列(intronic splicing enhancer: ISE)を明らかにする。

DMD 症例の gDNA を用いて欠失変異の解析を行うとともに、mRNA を解析し、スプライシング異常を同定する。さらに、これらの症例における欠失断端などイントロンの塩基配列を PCR 法、およびダイレクトシーケンシング法により詳細に解析していくことにより、イントロン内スプライシング制御配列を同定する。

(2) DMD 患者由来培養筋細胞 mRNA において、DMD 遺伝子の ISE を AS-oligo を用いて抑制し、スプライシングの変化を検証する。

同定した ISE に相補的に結合する AS-oligo を作成する。AS-oligo を添加した培養筋細胞より mRNA を抽出し、スプライシング産物を解析し、スプライシングの変化を確認する。

(3) DMD 患者由来培養筋細胞において、DMD 遺伝子の ESE および ISE の両方を AS-oligo を用いて抑制することによる、スプライシングの変化およびジストロフィン蛋白発現の増加を検証する。

ESE を標的とした AS-oligo、ISE を標的とした AS-oligo、さらにその両者を DMD 患者由来培養筋細胞に添加し、その効果を検証する。mRNA 解析によりエクソンスキッピング誘導を確認する。リアルタイム PCR 法によりエクソンスキッピング誘導を認めた mRNA 量を測定し、ISE を標的とした AS-oligo によるエクソンスキッピング増強効果を検証する。また、その結果発現するジストロフィン蛋白量についても免疫組織化学法およびウエスタンブロット法により発現量を測定し比較する。

4. 研究成果

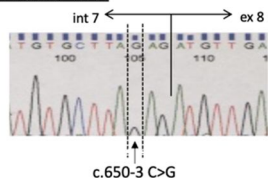
まず欠失変異を有するDMD症例において欠失領域近傍のイントロン配列を解析した。ジストロフィン遺伝子は巨大であるためそのイントロン配列解析は容易ではない。我々は、欠失変異を有しているDMD患者の末梢血より抽出したgDNAを用いて、PCR法・直接塩基配列解析法などによりイントロン配列を解析した。次に、末梢血もしくは筋由来のmRNAを用いてスプライシングパターンを解析する系を確立した。イントロン配列とmRNA解析より得られたスプライシングパターンをあわせて検討し、イントロン内のスプライシング制御配列の同定およびそれらの配列がエクソンスキッピング治療効果へ与える影響について検討した。

その結果、gDNAにおいてイントロン10のスプライスサイト変異(c.1150-2A>T)を同定したDMD症例ではmRNA解析ではエクソン11のスキップを認めた。また、イントロン64のスプライスサイト変異(c.9361+1G>A)を同定した症例では、mRNA解析によりエクソン64と65の間にイントロ

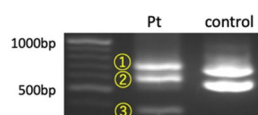
ン64内の57塩基が挿入されているスプライスパターンを示すことが明らかとなった。イントロン7内にスプライスサイト変異 (c.650-3C>G) を同定したDMD症例についてのmRNA解析結果の詳細を図1に示す。この症例では、リンパ球由来のcDNA解析により3つのスプライス産物が明らかになった。さらにサブクローニング解析を追加で行った結果、イントロン7内の52塩基が挿入されたパターン、エクソン8内の一部(63塩基)が欠失しているパターン、エクソン8全体が欠失しているパターンの3種類が確認された。

図1：mRNAを用いたスプライシングパターンの解析

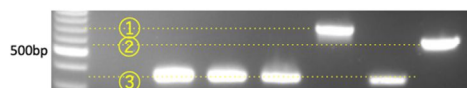
➤ gDNA (リンパ球より抽出) 解析



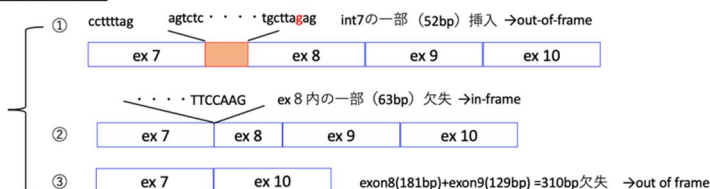
➤ cDNA (リンパ球より抽出) 解析



➤ サブクローニング解析



シーケンス解析



これらの結果より、イントロン内の変異により様々なスプライシングパターンが生じることが明らかとなり、イントロン内配列がスプライシングに影響を及ぼしていることが検証できた。この成果は、イントロン内スプライシング制御配列を標的とした AS-oligo によりエクソンスキッピング治療の効果をより強力にする新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。

。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 片山 慈之(兵庫医科大学 小児科学), 李 知子, 徳永 沙知, 谷口 直子, 下村 英毅, 柴田 暁男, 峰 淳史, 石井 良樹, 藤坂 方葉, 吉井 勝彦, 奥田 真珠美, 竹島 泰弘	4. 巻 125
2. 論文標題 Duchenne型筋ジストロフィーにおける生後早期の血清クレアチンキナーゼ値の推移	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1301-1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tomoko Lee, Sachi Tokunaga, Naoko Taniguchi, Maiko Misaki, Hideki Shimomura, Ichizo Nishino, Kyoko Itoh, Yasuhiro Takeshima	4. 巻 519
2. 論文標題 Underlying diseases in sporadic presentation of high creatine kinase levels in girls	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 198-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2021.05.003.	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 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 李 知子, 下村英毅, 谷口直子, 徳永沙知子, 牟禮慎子, 柴田暁男, 峰淳史, 石井良樹, 藤坂方葉, 吉井勝彦, 奥田真珠美, 竹島泰弘
2. 発表標題 Duchenne型筋ジストロフィーにおける生後早期のCK値の推移
3. 学会等名 第123回日本小児科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李知子, 徳永沙知, 牟禮慎子, 三崎真生子, 下村英毅, 西野一三, 伊東恭子, 竹島泰弘
2. 発表標題 家族歴のない高CK血症女児の臨床背景の検討
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 知子、底田 辰之、三崎真生子、下村英毅、奥野美佐子、竹島泰弘
2. 発表標題 ジストロフィン遺伝子内に切断点を有するX染色体 常染色体均衡型転座によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー女兒
3. 学会等名 第64回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 知子、谷口直子、徳永沙知、下村英毅、奥野美佐子、竹島泰弘
2. 発表標題 高CK血症を契機に受診した男児例の検討
3. 学会等名 筋ジストロフィー研究小牧班班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李知子、徳永沙知、牟禮慎子、三崎真生子、下村英毅、西野一三、伊東恭子、竹島泰弘
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 李 知子、底田 辰之、三崎真生子、下村英毅、竹島泰弘
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 李 知子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 4
3. 書名 MDフロンティア	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------