

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390284  
 研究課題名（和文） デュシェンヌ型筋ジストロフィーのエクソンスキッピング誘導治療に関する研究  
 研究課題名（英文） Study on treatment of Duchenne muscular dystrophy by inducing exon skipping  
 研究代表者  
 松尾 雅文（MATSUO MASAFUMI）  
 神戸大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：10157266

## 研究成果の概要：

私達のデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の治療結果により、DMD骨格筋では「タンパク合成システムの早期破綻」が想定された。しかし、リボソームRNAのサイズの分布には年齢による明確な違いは見い出せなかった。一方、リボソームで利用されるジストロフィンmRNAの量を決定するnonsense mediated RNA decayの年齢差あるいは、核タンパクの寿命ならびに挙動が「タンパク合成システムの早期破綻」に結びついている可能性も示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

## 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）は最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性進行性筋萎縮症で、その治療法の確立を目指して世界中で多くの研究者が精力的な研究を行っている。私たちは、「ジストロフィン神戸」に関する分子病態の詳細な解析結果から、エクソンスキッピングを誘導してアミノ酸読み取り枠を修正する DMD の独自の治療法を着想した。そして、その治療法の開発に関する世界をリードする数多くの成果を挙げてきた。その結果、私達はアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する

臨床治験を実施し、DMD 患者の骨格筋でジストロフィンを発現させることに見事世界で初めて成功した。その成果は「Pediatric Research」誌の表紙を飾るなど世界から大きな注目を集めた。

現在では、このエクソンスキッピングを誘導する方法が DMD の最も有望な治療法として大きく脚光を浴びている。そのため、この領域の研究成果が世界中ですさまじい勢いで集積されつつある。その中で、私達は常に世界をリードする成果を挙げてきた。

ところが、私たちが先駆けて実施した本治療の治療結果から新たな課題が浮上してき

た。すなわち、年長 DMD 患者においてはジストロフィン発現効果が得られなくなるということである。年齢を重ねると本治療によるエクソンスキッピング誘導効果が認められるにも関わらず、ジストロフィンの発現は得られなかった。このことは、筋萎縮の進行した年長 DMD 児の骨格筋においては、スプライシング機能は維持されているにも関わらず、ジストロフィンタンパク合成システムは破綻を来していることを示した。これは、DMD の骨格筋における「タンパク合成システムの早期破綻」を示唆するものであった。しかし、その詳細な機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

私たちは、これまでに世界に先駆けて実施した DMD のエクソンスキッピング誘導治療の結果から DMD 骨格筋では「タンパク合成システムの早期破綻」が想定されることを世界で初めて示した。本研究は、DMD 骨格筋のタンパク合成システムについてリボソームに焦点を当てて分子生物学的手法を用いて解析し、「タンパク合成システムの早期破綻」を分子レベルで明らかにしようとするものである。

## 3. 研究の方法

- ①タンパク合成システムの早期破綻に関与するリボソーム RNA の解析
  - ②デュシェンヌ型筋ジストロフィーの分子病態の解明
- を実施するため以下の方法を用いた。

### 1) RNA 抽出

私たちは、多数の DMD 患者の経過を観察している。その中で、筋生検を多数の DMD 例で実施しており、多くの筋組織を凍結保存している。その中から、5~6 歳の幼若児と 11~12 歳の年長児を選択した。そして、それらの患者の冷凍保存された骨格筋組織をクライオスタットを使い薄切片にし、この薄切片からキットを用い RNA を抽出した。

### 2) 抽出 RNA サイズ分布の年齢差の解析

抽出 RNA のサイズ分布に年齢による差があるか否かを検討するために、抽出した RNA をキャピラリー電気泳動を用いてサイズによる詳細な分離とそれぞれのサイズについての量を測定した。そして、リボソーム RNA のサイズの分布の年齢差について検討した。

### 3) デュシェンヌ型筋ジストロフィーの分子病態の解明

タンパク合成システム早期破綻の手懸りを得るために、神戸大学小児科を受診中のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の分子病態の解明を行った。患者のゲノムあるいは mRNA などを総合的に解析した。

### 4) ジストロフィン遺伝子のスプライシング制御機序の解明

エクソンスキッピング誘導治療においては、スプライシング時に有効にエクソンスキッピングを誘導する方策の確立が必須である。そのために、*in vitro* のスプライシング系を用いてスプライシング制御機構の解明を行った。

## 4. 研究成果

「タンパク合成システムの早期破綻」の原因を明らかにするため、幼若 DMD 患者と年長 DMD 患者の筋肉中のリボソーム RNA の解析を行った。抽出した RNA をキャピラリー電気泳動を用いて、その移動度と分布様式を解析した。両群間で 2 つのパラメーターを比較したが大きな差はみられなかった。「タンパク合成システムの早期破綻」はリボソーム RNA の量的な差により説明できるものでないことが明らかとなった。

このことから、リボソームでタンパク合成のテンプレートとなる mRNA の差により「タンパク合成システムの早期破綻」が誘導されたものと示唆された。DMD のジストロフィン mRNA にはストップコドンが存在しており、NMD により早期に分解を受ける可能性がある。NMD によるジストロフィン mRNA の崩壊に関する検討はなく、この面から解析を進めることが今後重要と考えられた。

私達が世界で初めて実施している DMD のエクソンスキッピング誘導治療では治療効果を一層挙げる事が期待されている。エクソンスキッピング誘導効果を得るためスプライシング制御機構の解明が重要である。ジストロフィン遺伝子のスプライシングにはエクソン配列内のスプライシングエンハンサー配列の強さも関わっていることを *in vitro* のスプライシング反応系を用いて明らかにした。この結果は、「タンパク合成システムの早期破綻」に、スプライシングエンハンサーに結合する核タンパクの寿命も関与することを示唆するものであった。

DMD 患者の分子病態解析を行ったところ様々な結果を得た。その中で、ジストロフィ

ン mRNA の解析することにより、ナンセンス変異を有していてもジストロフィン mRNA のスプライシング挙動にはそれぞれの変異の質により差があることが判明した。こうしたジストロフィン mRNA の挙動の差が「タンパク合成システムの早期破綻」に結びついている可能性が示唆された。

## 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 11 件)

- ①Habara, Y., Takeshima, Y., Awano, H., Okizuka, Y., Zhang, Z., Saiki, K., Yagi, M., Matsuo, M. In vitro splicing analysis reveals that availability of a cryptic splice site is not a determinant for alternative splicing patterns caused by +1G>A mutations in introns of the dystrophin gene. J Med Genet. in press. 2008. 査読有
- ②Awano, H., Takeshima, Y., Okizuka, Y., Saiki, K., Yagi, M., Matsuo, M. Wide ranges of serum myostatin concentrations in Duchenne muscular dystrophy patients. Clin Chim Acta. 391:115-117. 2008. 査読有
- ③Nishiyama, A., Takeshima, Y., Zhang, Z., Habara, Y., Tran, TH., Yagi, M., Matsuo, M. Dystrophin nonsense mutations can generate alternative rescue transcripts in lymphocytes. Ann Hum Genet. 72:717-724. 2008. 査読有
- ④Takami, Y., Takeshima, Y., Awano, H., Okizuka, Y., Yagi, M. and Masuo, M. High incidence of electrocardiogram abnormalities in young patients with duchenne muscular dystrophy. Pediatr. Neurol. 39:399-403. 2008. 査読有
- ⑤Kimura, S. Ito, K. Ueno, H. Ikezawa, M. Takeshima, Y. Yoshioka, K. Ozasa, S. Nakamuara, K. Nomura, K. Matsukura, M. Mitsui, K. Matsuo, M. Miike, T. A 2-bp deletion in exon 74 of the dystrophin gene does not clearly induce muscle weakness. Brain & Development. 18:672-677. 2008. 査読有
- ⑥Zhang, Z. Takeshima, Y. Awano, H. Nishiyama, A. Okizuka, Y. Yagi, M. Matsuo, M. Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne

muscular dystrophy. J Hum Genet. 53:215-219.2008. 査読有

⑦Habara, Y. Doshita, M. Hirozawa, S. Yokono, Y. Yagi, M. Takeshima, Y. Matsuo, M. A Strong Exonic Splicing Enhancer in Dystrophin Exon 19 achieve proper splicing without an upstream polypyrimidine tract. J Biochem. 143:303-310.2008. 査読有

⑧Sahashi K, Masuda A, Matsuure T, Shinmi J, Zhang Z, Takeshima Y. Matsuo M. Sobue G, Ohno K. In vitro and silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites. Nucleic Acids Res. 1-9.2007. 査読有

⑨Nishiyama A, Takeshima Y. Saiki K, Narukage A, Ouazato Y, Yagi M. Matsuo M. Two novel missense mutations in the myostation gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. BMC Medical Genetics. 254:624-630.2007. 査読有

⑩Tran VK. Takeshima Y. Zhang Z, Habara Y, Haginoya K, Nishiyama A, Yagi M. Matsuo M. A nonsense mutation-created intraexonic splice site is active in the lymphocytes, but not in the skeletal muscle of a DMD patient. Hum Genet. 120:737-742.2007. 査読有

⑪Beroud C, Giraud TS, Matsuo M. Hamroun D., Humbertclaude V, Monnier N, Moizard MP, Voelckel MA, Calemard LM, Boisseau P, Blayau M, Philippe C, Cossee M, Pages M, Rivier F, Danos O, Garcia L, Claustres M. Multi-exon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne Muscular Dystrophy. Hum Mutat. 28:196-202.2007. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ①Takeshima, Y. Yagi, M. Okizuka, Y. Awano, H. Zang, Z. Saiki, K. Matsuo, M. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 433 Japanese dystrophinopathy cases. The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting. 2008.11.14
- ②Awano, H. Yagi, M. Okizuka, Y. Zhang, Z. Takeshima, Y. Matsuo, M. A novel retrotransposon that was recently inserted into

exon 67 of the dystrophin gene. 57<sup>th</sup> The American Society of Human Genetics. 2007.10.26

③Zhang,Z. Takeshima,Y. Yagi,M. Nishiyama,A. Okizuka,Y. Awano,H. Matsuo,M. A complex insertion event produced a chimeric dystrophin-IL1RAPL1 transcript in the dystrophin gene. 57<sup>th</sup> The American Society of Human Genetics. 2007.10.26

④Okizuka,Y. Takeshima,Y. Yagi,M. Oyazato,Y. Awano,H. Zhang,Z. Matsuo,M. Chronological changes of serum creatine kinase(CK)levels in molecularly confirmed Duchenne muscular dystrophy cases and examination of the cases with deviated CK levels. 57<sup>th</sup> The American Society of Human Genetics. 2007.10.26

⑤Yagi,M. Tran Thi,H.T. Zhang,Z. Nishiyama,A. Oyazato,Y. Okinaga,T. Takeshima,Y. Matsuo,M. The Xq28 inversion breakpoint interrupted a novel noncoding gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation. 57<sup>th</sup> The American Society of Human Genetics. 2007.10.24

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 雅文 (MATSUO MASAFUMI)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10157266

### (2) 研究分担者

竹島 泰弘 (TAKESHIMA YASUHIRO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40281141

八木 麻理子 (YAGI MARIKO)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60362787

### (3) 連携研究者