

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591223  
 研究課題名(和文) 筋ジストロフィーのアンチセンス治療におけるシグナル伝達因子の動態に関する研究  
 研究課題名(英文) Research of signal transduction system in antisense therapy for muscular dystrophy  
 研究代表者 竹島 泰弘 (TAKESHIMA YASUHIRO)  
 神戸大学・大学院医学研究科・特命教授  
 研究者番号：40281141

研究成果の概要(和文)： 私達は、Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 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（以下 AS-oligo）によってエクソン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治療法の有効性を、世界で初めて臨床的に明らかにした。本研究では、その治療法の有効性をさらに高めるために、日本人でみられる遺伝子異常を明らかにし、それに基づき AS-oligo 治療のモデルシステムを構築した。さらにそのシステムにおいて、シグナル伝達因子などを解析した。AS-oligo 治療の有効性を検討するうえで、個々の症例における解析が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We have shown the clinical effectiveness of antisense therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD) which converts out-of-frame to in-frame mutation by inducing the exon skipping by antisense oligonucleotide. To enhance the effect of this therapy, we developed the in vitro model system of antisense therapy based on the mutation spectrum of Japanese DMD cases. Furthermore, the effect of antisense oligonucleotide on dystrophin production and signal transduction system was investigated. The effect of this therapy was different among DMD cases, and it is important to examine the effect of antisense therapy using individual in vitro system of each case.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：アンチセンスオリゴヌクレオチド、筋ジストロフィー、シグナル伝達因子、  
エクソンスキッピング

#### 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー

(Duchenne muscular dystrophy 以下 DMD) は、ジストロフィン遺伝子異常によって発症する、最も頻度の高い遺伝性筋疾患である。本症は 10 歳前後で車いすが必要となり、10 歳台後半から 20 歳前後で呼吸

不全・心不全を呈する重篤な疾患であるが、根治治療法は確立していない。DMD のおよそ 60% はジストロフィン遺伝子の 1 ないし数エクソンの欠失によって発症する。DMD では、ジストロフィン遺伝子のエクソン欠失によってアミノ酸読み取り枠にずれが生じているため (out-of-frame 欠失)、ジスト

ロフィン蛋白が産生されない。一方、同じジストロフィン遺伝子の異常であっても、欠失によりアミノ酸読み取り枠にずれを生じない場合は (in-frame 欠失)、不完全ながらジストロフィン蛋白が産生され、軽症型である Becker 型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy 以下 BMD) となる。このことより、スプライシングの過程でエクソンスキッピングを誘導し、DMD でみられる out-of-frame 欠失を in-frame 欠失に変換することにより、ジストロフィン蛋白の産生を促し、軽症化することが可能となる。

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 (以下 AS-oligo) によってエクソン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治療法の有効性を、世界で初めて臨床的に明らかにした (Takeshima Y. et al. 2006. *Pediatr Res.* 59: 690-4)。すなわち、エクソン 20 (242 塩基) が欠失している DMD 症例では out-of-frame 欠失のためアミノ酸読み取り枠にずれが生じておりジストロフィン蛋白が産生されない。しかし、この症例に AS-oligo を静脈内投与しエクソン 19 (88 塩基) のスキッピングを誘導することによって、in-frame 欠失 (242 塩基+88 塩基=330 塩基) となり、ジストロフィン蛋白が産生されるようになることを明らかにした。

しかし、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の臨床応用を広げるためには、その効果をさらに高めることが不可欠である。近年、MyoD、myogenin などの筋分化に関与するシグナル伝達因子のみならず、炎症・アポトーシスなどに関与するシグナル伝達因子が筋細胞の壊死・再生に関与し DMD の進行に大きな影響を与えていることが注目されている。このことから、

本治療の過程における炎症などに関与するシグナル伝達因子の動態を明らかにすることによって、アンチセンス治療の効果をさらに高めることができる可能性が考えられる。本研究では、このような可能性を検討するために、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の in vitro におけるモデルシステムを確立し、検討を行った。

## 2. 研究の目的

AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療は、欠失しているエクソンに隣接しているエクソンのスキッピングを誘導する治療であり、各症例の遺伝子異常に依存している。そのため、症例の遺伝子変異の同定が不可欠である。そこで、本研究では初めに日本人ジストロフィン遺伝子異常症の遺伝子解析を行い、日本人の変異スペクトラムを解明することを目的として検討を行った。

次に、適応症例の多いエクソンスキッピング誘導治療に関する基礎検討を行うことが必要である。そのため、ジストロフィン遺伝子異常症の変異スペクトラム解析の結果に基づき、適応症例の多いエクソンスキッピング誘導治療のモデルを筋培養細胞系ならびに DMD モデルマウス系を確立し、AS-oligo の有効性を検証した。

そして、これらのシステムにおいてシグナル伝達因子の動態を検討し、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の有効性をさらに高める治療戦略を見出すことを目指した。

## 3. 研究の方法

はじめに、日本人のジストロフィン遺伝子変異スペクトラムを明らかにするために、ジストロフィン遺伝子解析を行った。対象はジストロフィン異常症 480 例 (DMD および BMD) で、遺伝子解析については、当

施設の倫理委員会の承認を受け、本人あるいは家族に文書によって説明し同意を得ている。エクソン単位の欠失・重複はゲノムを用いてサザンブロット法、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification assay (MLPA 法)、およびキャピラリー電気泳動による半定量 PCR 法によって同定した。ナンセンス変異・スプライシング変異などの微小変異は筋あるいはリンパ球の mRNA を鋳型とした RT-PCR 法およびゲノムあるいは cDNA を用いた直接塩基配列解析法によって決定した。

この結果に基づき、適応の多いエクソンスキッピング誘導治療に関して、DMD 筋培養細胞初代培養系ならびに DMD モデルマウス系における AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療システムを構築した。DMD 筋培養細胞初代培養系構築に関しては、当施設の倫理委員会の承認を受け、文書によって説明し同意を得ている。エクソンスキッピングは RT-PCR 法によってジストロフィン mRNA を解析し、検討した。また、ジストロフィンタンパク発現に関しては、免疫組織染色法およびウエスタンブロット法によって検討した。さらに、このシステムにより、本治療の有効性をさらに高める方法の検討を行った。

#### 4. 研究成果

遺伝子解析の結果、DMD388 例中、エクソン単位の欠失・重複をそれぞれ 226 例 (58%)、35 例 (9%) に、ナンセンス変異を 75 例 (19%)、微小欠失・挿入変異を 29 例 (7%)、スプライシング変異を 19 例 (5%)、ディープイントロン変異を 2 例 (0.5%) に認め、2 例 (0.5%) では X 染色体の構造異常がみられた。一方、BMD92 例では、エクソン単位の欠失・重複をそれぞれ 63 例 (68%)、8 例 (9%) に、ナンセンス変異

を 3 例 (3%)、微小欠失・挿入変異を 7 例 (8%)、スプライシング変異を 8 例 (9%)、ディープイントロン変異を 2 例 (2%) に認めた。

次に、エクソンスキッピング誘導治療の適応について検討した。エクソン単位の欠失を有する 226 例中 185 例は隣接する 1 エクソンの、30 例は 2 ないし 3 エクソンのスキップを誘導することにより治療が可能な変異であった。エクソン 51 のスキッピング誘導によって 43 例が、エクソン 53 のスキッピング誘導によって 40 例が、エクソン 45 のスキッピング誘導によって 34 例が、治療可能であり、これら 3 エクソンのスキッピング誘導により 106 例 (欠失症例の 47%) の治療が可能であった。

微小欠失挿入変異・スプライスサイト変異中 12 例はスプライシング異常により mRNA 上でエクソンが消失しており、これらの症例も隣接するエクソンのスキップを誘導することにより治療が可能な変異であった。また、deep intron の変異によりイントロン内配列が pseudoexon として mRNA に挿入された 2 例もエクソンスキッピング誘導治療の適応であった。

これらの結果から、適応症例の比較的多いエクソンのスキッピングに関して、モデルシステムの構築を行った。DMD 症例の筋培養細胞初代培養系を構築し、AS-oligo を導入したところ、ジストロフィン mRNA におけるエクソンスキッピングの誘導がみられ、in-frame の mRNA が認められた。さらにジストロフィンタンパク発現を、免疫組織染色およびウエスタンブロット法によって検討したところ、タンパクの発現が確認された。また、DMD モデルマウスにおいても有効性が確認できた。DMD 症例の筋培養細胞初代培養系における AS-oligo 治療に

関して、複数例の検討を行ったが、その有効性は症例によって差がみられた。そのため、AS-oligo 投与することによる効果は、個々の症例において検討することが必要と思われた。また、シグナル伝達因子の変動に関して解析したところ、AS-oligo による治療効果によって変動している可能性が示唆され、これらに関しても症例ごとの検討が重要と思われた。

今回の検討において、日本人ジストロフィン遺伝子変異スペクトラムを明らかにした。そして、適応症例の多いエクソンスキッピング治療のモデルシステムを構築し、AS-oligo 治療の有効性を検証し、さらにそれに伴うシグナル伝達因子の動態を検討した。同じ AS-oligo であっても筋培養細胞における効果は症例によって差がみられたため、個々の症例ごとの検討が重要である。今後、個々の症例において、シグナル伝達因子のみではなく、炎症や線維化のマーカールも含めて検討することにより、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の有効性を高める治療戦略を見出すことができる可能性がある。

#### 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)

1. Kubokawa I, Takeshima Y, Ota M, Enomoto M, Okizuka Y, Mori T, Nishimura N, Awano H, Yagi M, Matsuo M. Molecular characterization of the 5'-UTR of retinal dystrophin reveals a cryptic intron that regulates translational activity. *Mol Vis.* 16: 2590-7. 2010.
2. Awano H, Malueka RG, Yagi M, Okizuka Y, Takeshima Y, Matsuo M. Contemporary retrotransposition of a novel non-coding gene induces exon-skipping in dystrophin mRNA. *J Hum Genet.* 55: 785-90. 2010.
3. Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, Awano H, Zhang Z, Yamauchi Y, Nishio H, Matsuo M. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet.* 55: 379-88. 2010.
4. Okizuka Y, Takeshima Y, Itoh K, Zhang Z, Awano H, Maruyama K, Kumagai T, Yagi M, Matsuo M. Low incidence of limb-girdle muscular dystrophy type 2C revealed by a mutation study in Japanese patients clinically diagnosed with DMD. *BMC Med Genet.* 30; 11: 49. 2010.
5. Zhang Z, Yagi M, Okizuka Y, Awano H, Takeshima Y, Matsuo M. Insertion of the IL1RAPL1 gene into the duplication junction of the dystrophin gene. *J Hum Genet.* 54: 466-73. 2009.
6. Okizuka Y, Takeshima Y, Awano H, Zhang Z, Yagi M, Matsuo M. Small mutations detected by multiplex ligation-dependent probe amplification of the dystrophin gene. *Genet Test Mol Biomarkers.* 13: 427-31. 2009.
7. Takami Y, Takeshima Y, Awano H, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M. High incidence of electrocardiogram abnormalities in young patients with duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol.* 39: 399-403. 2008.
8. Habara Y, Takeshima Y, Awano H, Okizuka Y, Zhang Z, Saiki K, Yagi M,

- Matsuo M. In vitro splicing analysis showed 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.* 46: 542-7. 2009.
9. Nishiyama 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: 717-24. 2008.
  10. Zhang 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: 215-9. 2008.
  11. Habara 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.* 143:303-10. 2008.
- [学会発表] (計 13 件)
1. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, Matsuo M. Chemical treatment of muscular dystrophy that enhances skipping of the mutated exon in the dystrophin gene. The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting. 2010.11.2-6. Washigton, DC.
  2. Takeshima Y, Yagi M, Ota M, Awano H, Yamauchi Y, Malueka RG, Dwianingsih EK, Nishio H, Matsuo M. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 456 Duchienne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. 15th International Congress of The World Muscle Society. 2010.10.12-16. Kumamoto.
  3. Yagi M, Ota M, Awano H, Takeshima Y, Matsuo M. Antisense RNA/ethylene-bridged nucleic acids chimera induces exon 45 skipping and restores dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy. 15th International Congress of The World Muscle Society. 2010.10.12-16. Kumamoto
  4. Yagi M, Takeshima Y, Awano H, Ota M, Malueka RG, Dwianingsih EK, Nishida A, Lee T, Matsuo M. Antisense RNA/ENA chimera against dystrophin exon 45 leads exon 45 skipping followed by dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy. 6th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. 2010.10.20-23. Southern California
  5. Matsuo M, Takeshima Y, Yagi M, Awano H. Long-term administration of antisense oligonucleotide against dystrophin exon 19 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy with exon 20 deletion. XII International Congress on Neuromuscular Diseases. 2010.7.17-22. Naples.
  6. Yagi M, Ota M, Awano H, Takeshima Y, Matsuo M. Antisense RNA/ethylene-

- bridged nucleic acid chimera induces exon 45 skipping and restores dystrophin expression in DMD muscle cells. XII International Congress on Neuromuscular Diseases. 2010.7.17-22. Naples.
7. Awano H, Takeshima Y, Yagi M, Yamauchi Y, Malueka RG, Dwianingsih EK, Matsuo M. Genotype-phenotype correlation of the dystrophinopathy cases with small mutations in the dystrophin gene. Pediatric Academic Societies' 2010 Annual Meeting. 2010.5.1-4. Vancouver.
8. Yagi M, Yamauchi Y, Awano H, Takeshima Y, Matsuo M. Antisense RNA/ethylene-bridged nucleic acids chimera induces exon skipping and restores dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting. 2009.10.20-24. Hawaii.
9. Matsuo M, Habara Y, Takeshima Y, Awano H, Okizuka Y, Zhang Z, Yagi 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. 14th International Congress of The World Muscle Society. 2009.9.9-12. Geneva.
10. Yagi M, Awano H, Okizuka Y, Takeshima Y, Matsuo M. High incidence of outlier from the reading-frame rule in dystrophinopathy patients with duplication mutations in the dystrophin gene. Pediatric Academic Societies' 2009 Annual Meeting. 2009.5.2-5. Baltimore.
11. Takeshima 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. 2008.11.11-15. Philadelphia.
12. Okizuka Y, Awano H, Yagi M, Takeshima Y, Matsuo M. Splicing errors caused by small mutations in the dystrophin gene are different between lymphocytes and muscle tissues. Pediatric Academic Societies' 2008 Annual Meeting. 2008.5.2-6. Hawaii.
13. Awano 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. Joint 7th Human Genome Organization (HUGO)-Pacific Meeting and the 8th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. 2008.4.2-5. Cebu.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
竹島 泰弘 (TAKESHIMA YASUHIRO)  
神戸大学・医学研究科・特命教授  
研究者番号：40281141
- (2) 研究分担者  
松尾 雅文 (MATSUO MASAFUMI)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10157266
- 八木 麻理子 (YAGI MARIKO)  
神戸大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60362787