

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤(C)  
 研究期間：2010～2013  
 課題番号：22603002  
 研究課題名（和文）筋ジストロフィーにおけるスプライシング異常機構の解析と治療への応用  
 研究課題名（英文）Analysis of abnormal splicing mechanism and application for the treatment of Muscular Dystrophy  
 研究代表者  
 片岡 直行 (KATAOKA NAOYUKI)  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：60346062

## 研究成果の概要（和文）：

筋ジストロフィー患者において、変異を持ったエクソンをスキップすることで、内部が少し短い機能的なジストロフィンタンパク質を作らせ、症状の改善を目指す方法を目指し、いくつかの患者では TG003 というリン酸化酵素阻害剤が有用であることを見出した。また TG003 によるエクソンスキッピングの影響を網羅的に解析し、TG003 がスプライシングに影響を与える遺伝子についても情報を得た。

## 研究成果の概要（英文）：

We have tried to set up the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy by promoting mutated exon skipping by using a chemical compound. We found that TG003, a specific inhibitor for Clk kinases, promotes exon skipping in the patient cells. We also comprehensively analyzed the effect of TG003 in pre-mRNA splicing and detected the introns whose excision is affected.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

高等真核生物では、核にコードされている遺伝子のほとんどはイントロンによって分断化されています。そこで mRNA からイントロンを除く反応であるスプライシングは遺伝子発現に必須な過程となっています。スプライシングには、すべてのエクソンを順序通り

に連結する構成的スプライシングの他に、途中のエクソンをとばしたり、複数から一つを選択したりする選択的スプライシングが存在します。ヒトゲノムの解析の結果、スプライシングを受ける遺伝子の約95%は、選択的スプライシングを受けることが明らかになりました。選択的スプライシングは、一つの

mRNA前駆体から複数種のmRNAを産生することができるため、真核生物における遺伝子発現の多様性を担う重要な過程の一つとなっています。スプライシングは重要な過程であるが故に複雑で精巧な制御が必要になります。このような精巧な調節過程が存在することは同時に、その制御に異常をきたした場合、重篤な疾患として現れる可能性を示しています。実際、現在までに知られている遺伝病の多くが、スプライシング異常に起因していることが報告されています。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy) は、X染色体上に存在するDystrophin 遺伝子に変異が生じたためDystrophin 蛋白質が全く欠損した疾患です。Dystrophin蛋白質は筋細胞骨格の維持に関与しているため、この蛋白質が欠損した場合、筋細胞は筋繊維の収縮、弛緩に伴って容易に壊れるようになり、その再生過程を繰り返す結果、筋力低下や筋萎縮を引き起こすことが知られています。Dystrophin 遺伝子は79個のエクソンからなる約14kbのmRNAを発現しています。Dystrophin 蛋白質のN末側にはアクチン結合ドメインがあり、真ん中にはspectrin様の繰り返しが存在しています。そしてC末側にはシステインに富んだ領域が存在し、筋形質膜上に存在する複合体と結合していると考えられています。このような構造から、真ん中のspectrin様の繰り返しのいくつかを欠いても、両端の部分を持っていればある程度は活性を持つと予想されていました。実際ベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy) では、真ん中の部分が大きく欠損しているにもかかわらずほぼ正常な機能を持つ蛋白質を発現している患者が見つかっています

## 2. 研究の目的

本研究では、筋ジストロフィー患者に見出されたDystrophin 遺伝子変異とそれに伴うスプライシング異常の解析を通して、筋肉におけるスプライシング調節機構の解明を目指します。また、この患者では、変異がみられるDystrophin 遺伝子のエクソンをスキップさせることで、ある程度の活性を持つタンパク質が産生されていると考えられますが、申請者らはこのエクソンスキップを促進させることができる低分子化合物を見出しており、その作用機序の解明を行う

ことで、現在治療法がない筋ジストロフィーについて、スプライシング変異を持った患者の治療薬開発につなげたいと考えました。

## 3. 研究の方法

神戸大学医学部の松尾雅文教授の研究室との共同研究により、Dystrophin 遺伝子内に変異を持つ患者の遺伝子の一部分を細胞内発現ベクターにつなげ、その異常スプライシングが再現できることを確認し、レポーターとして用いました。また、いくつかのスプライシング因子のcDNAや低分子化合物をこのレポーターとともに用い、エクソンの包含、スキップに与える影響を解析しました。また、われわれが見出した低分子化合物について、筋肉組織様に分化可能な細胞を用いて、その化合物がスプライシングに与える影響を網羅的に調べ、その機構の解析を試みました。

## 4. 研究成果

我々はDystrophin遺伝子の31番目のエクソン中にナンセンス変異を持っている患者を見出しました。この患者では、その変異のため機能のある蛋白質ができないと予想されましたが、患者組織を用いた免疫染色像より、Dystrophin タンパク質がある程度発現しているのが観察されました。そこでRNAを解析したところ、変異を持ったエクソン31を含むmRNAの他に、このエクソンを含まないmRNAが発現していることが明らかになりました。この患者にみられる変異は、第31エクソン内のGAGがUAGに変化したものです。このことにより第31エクソン内のExonic Splicing Enhancer (ESE)が活性を失い、エクソンとして認識されない結果、とばされるものと考えられます。このことをより詳細に解析するため、第31エクソン付近の配列を別のレポーター遺伝子コンストラクト中に挿入し、同様のエクソンがとばされる現象がみられるかどうかを検討しました。その結果、HeLa細胞内においても、変異を持った第31エクソンがある頻度でとばされるのが観察されました。このことより、この患者にみられる変異は、一般的なESEを壊す変異であり、generalなスプライシング因子が関与していることを強く示唆しています。同時に、このエクソンをとばすスプライシングを促進してやれば、野生型に近い活性を持つ、変異型Dystrophinを増やすことができ、現在治療法のない筋ジストロフィーにおいて、

少なくともこの患者については治療につながる可能性が考えられます。また、他のエクソンにナンセンス変異を持つ他の患者も知られており、同様の治療法を用いることができると考えました。そこで、これまでにスプライシングに影響を与えることが報告されているいくつかの低分子化合物を細胞に添加し、このレポーター遺伝子のスプライシングを調べました。その結果、TG003 という化合物が濃度依存的に、そして変異体のみで第31エクソンをとばしたmRNAの産生を促進しました。以上のことから、この遺伝子の変異によるスプライシング異常の機構や、エクソンをとばすような薬剤の作用機序を解析することは筋ジストロフィーの治療に道を開くと考えました。Clk (Cdc2 like kinase)の特異的阻害剤であるTG003が、第31エクソンのスキップを促進することを見出しました。さらに他の患者でのスプライシングを解析したところ、少なくとも2例についてTG003は終止コドンを持った患者の遺伝子においてもエクソンスキップを促進することが明らかになりました。また、TG003によるエクソンのスキップ機構、および他の遺伝子のスプライシングに与える影響について明らかにするため、また、TG003による副作用を検討するため、筋芽細胞であるマウスC2C12細胞をTG003処理し、細胞内mRNAのスプライシングパターンの網羅的解析を行いました。その結果、200個程度のイントロンのスプライシングが影響を受けることが明らかになりました。TG003によるスプライシングの影響は、エクソンのスキップ、包含の両方向が存在していましたが、それらのイントロンはピリミジントラクトと呼ばれる、3' スプライス部位認識に重要な配列の長さが短いことがわかり、TG003はピリミジントラクトを認識し、3' スプライス部位認識を補助する因子に影響を与えることが強く示唆されました。

#### 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4件)

1) Kataoka, N.\*.#, Dobashi, I., Hagiwara, M. and Ohno, M#. (2013)

hDbr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a protein phosphatase-like motif essential for debranching activity (\*Corresponding author, #Equally contributed authors)

*Scientific Reports* 3, 1090; DOI:10.1038/srep01090

2) Ninomiya, K., Kataoka, N. and Hagiwara, M.  
Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor  
*Journal of Cell Biology* 195: 27-40 (2011)

3) Kataoka, N.\*.#, Diem, M.D., Yoshida, M., Hatai, C., Dobashi, I., Dreyfuss, G., Hagiwara, M. and Ohno, M#. Specific Y14 domains mediate its nucleo-cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA (\*Corresponding author, #Equally contributed authors)  
*Scientific Reports* 1, 92; DOI: 10.1038/srep00092 (2011)

4) Nishida, A.#, Kataoka, N.#, Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, M. and Matsuo, M.  
Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene (#Equally contributed first authors)  
*Nature Communications* 2:308  
DOI: 10.1038/ncomms1306 (2011)

[学会発表] (計7件)

1) Kataoka, N., Yoshida, M., Usui, T., Sakuma, M. and Hagiwara, M.  
Modulators for splicing of IKBKAP gene, a responsible gene for Familial dysautonomia  
Cold Spring Harbor Asia 2012  
Conference on RNA Biology,  
Suzhou, China (2012)

2) Kataoka N., Nojima, T., Oshiro-Ideue, T., Takeuchi, A., Kii, I. and Hagiwara, M.  
PUF60 is a Differentiation-Dependent Splicing Regulator Required for Myogenesis  
The 22nd CDB meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II"  
Riken CDB, Kobe Japan (2012)

3) Kataoka N., Nishida A., Takeshima Y., Yagi M., Awano H., Ota M., Itoh K., Hagiwara M. and Matsuo M.  
Chemical treatment of muscular dystrophy that enhances skipping of the mutated exon in the dystrophin gene  
17th Annual Meeting of the RNA Society,  
Kyoto, Japan (2011)

4) 片岡直行、吉田真弓、薄井知美、佐久間真紀、萩原正敏  
家族性自律神経失調症原因遺伝子 IKBKAP の異常スプライシング機構の解析  
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡  
12 月 11 日-14 日 (2012)

5) 片岡直行、野島孝之、大城一井手上杜子、武内章英、喜井勲、萩原正敏  
PUF60は筋分化特異的な選択的スプライシングの調節因子であり、筋発生に必要である  
第 14 回日本 RNA 学会年会、 仙台  
7 月 18 日-20 日 (2012)

6) 片岡直行、西田篤史、飯田慶、松尾雅文、萩原正敏 (2012)  
Clk特異的阻害剤TG003を用いたジストロフィン遺伝子におけるエクソンスキッピング促進機構の解析  
第 7 回日本ケミカルバイオロジー学会 京都  
6 月 7 日-9 日

7) 片岡直行、西田篤史、竹島泰弘、八木麻理子、栗野宏之、大田光徳、伊東恭子、松尾雅文、萩原正敏  
Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene  
第 6 回日本ケミカルバイオロジー学会 東京  
5 月 23 日-25 日 (2011)

[図書] (計 4 件)

片岡直行  
総論 RNA プロセシングに起因する疾患「RNA 病」  
細胞・特集「RNA バイオロジーの最先端」44:  
14, 2-4 (2012)

片岡直行、萩原正敏  
mRNA を標的とした新しい疾患治療戦略  
細胞・特集「RNA バイオロジーの最先端」44:  
14, 5-8 (2012)

片岡直行、萩原正敏  
RNA を標的とした新しい創薬戦略  
実験医学・増刊「疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー」  
30: 1064-1070 (2012)

片岡直行、萩原正敏  
RNA スプライシング操作による RNA 病治療戦略  
細胞工学・特集「RNA プロセシング異常」29:  
175-180 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 遺伝性疾患の予防・改善剤  
発明者: 萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、  
西田篤史  
権利者: 国立大学法人神戸大学 国立大学  
法人東京医科歯科大学

種類: 特許  
番号: 特願 2010-146699  
PCT/JP2011/003655

出願年月日: 日本出願日 2010 年 6 月 28 日  
PCT 出願日 2011 年 6 月 27 日  
国内外の別: 国内および国外  
○取得状況 (計 1 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 直行 (KATAOKA NAOYUKI)  
京都大学医学研究科 メディカルイノベーションセンター  
研究者番号: 60346062

### (3) 連携研究者

萩原 正敏 (HAGIWARA MASATOSHI)  
京都大学医学研究科形態形成機構学講座  
研究者番号: 10208423