

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591496

研究課題名(和文)エクソンスキッピング誘導効率を規定するシス因子の解明

研究課題名(英文)Correlation between cis-acting elements and effects on inducing exon skipping

研究代表者

八木 麻理子(Yagi, Mariko)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60362787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、私達が確立した、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子エクソン45のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、異なる欠失変異を有するDMD由来の培養筋細胞に導入し、エクソン45のスキッピングの誘導効率に変異によって異なることを明らかにした。さらに、エクソン45スキッピング誘導効率を検討した変異の欠失断端を同定し、欠失断端領域のintronic splicing enhancer、intronic splicing silencer等のシス因子とエクソンスキッピング誘導効率について検討したが、その関連は明らかにはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Antisense oligonucleotides that induce exon skipping is now attracting much attention to express internally deleted-dystrophin in Duchenne muscular dystrophy(DMD). Previously, we identified antisense oligonucleotides(A085) that could induce exon 45 skipping efficiently. We examined the ability of A085 to induce exon 45 skipping and dystrophin expression in DMD patient-derived myocytes carrying different types of deletion mutations, as follows:exon 46-47, 46-48, 46-49, 46-51 or 46-53. The skipping efficiency was different from patients to patients. We identified the junction site of each patient with deletion mutation and examined the intronic splicing enhancers/silencers (ISEs/ISSs) in the junction site. In this study, we could not clarify the correlation between ISEs/ISSs in the junction site and exon 45 skipping efficiency.

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：スプライシング

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(以下、DMD)は、ジストロフィン遺伝子の変異によって発症し、多くは20歳代で死に至る疾患だが、まだ確立された治療法はない。私達はDMDに対する治療法として、「エクソンスキッピング療法」を世界に先駆けて提唱してきた。さらに、エクソン45を標的とするエクソンスキッピング療法の臨床応用へ向けた予備検討を進める中で、同じエクソン46-51欠失変異症例でもエクソンスキッピング誘導効率が異なるという知見を得た。これは症例によって、イントロン領域の欠失範囲が異なり、エクソンスキッピング誘導を修飾していることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、DMD患者の欠失断端を同定し、その結果を元に、欠失断端周辺、イントロン領域の欠失範囲あるいは残存範囲に位置する、intronic splicing enhancers/ intronic splicing silencers(ISEs/ISSs)等を解析し、エクソンスキッピング誘導効率を規定するシス因子を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DMD患者由来の筋細胞を用いたエクソン45スキッピング誘導効率の検討

DMD患者より書面による同意を得て、筋生検組織より筋培養細胞を樹立。培養液を変更することにより筋培養細胞から筋管細胞へと分化誘導した後、エクソン45のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入。48時間後にmRNAを抽出し、1µgのmRNAを用いて、cDNAを作成。半定量PCRによりエクソンスキッピング誘導効率を検討した。

(2) DMD患者由来の筋細胞におけるエクソン45スキッピング誘導によるジストロフィン蛋白の発現の検討

DMD患者由来の筋培養細胞を筋管細胞へ文化誘導した後、エクソン45のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入。7日後に回収し、免疫組織染色およびウエスタンブロット法によりジストロフィン蛋白の発現の有無を検討した。

(3) 欠失変異を有するDMD患者の欠失断端の同定

欠失領域の5'端、3'端のイントロン内にプライマーを設定し、PCRによる各部位の増幅の有無の確認を繰り返し、直接シーケンス法により欠失断端を同定した。

(4) 断端領域の配列内のISEs、ISSs、ESEsの解析

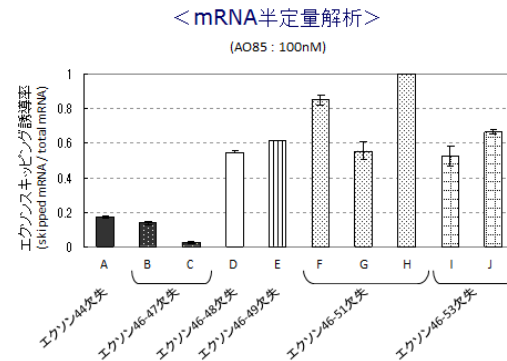
断端領域の配列内のISEs、ISSs、ESEsについて解析ソフトを用いて検索し、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソン45ス

キッピング誘導効率との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) アンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソン45スキッピング誘導効率の検討
ジストロフィン遺伝子エクソン44、46-47、46-48、46-49、46-53の欠失を有するDMD患者由来の筋培養細胞を用いてエクソンスキッピング誘導効率について検討した結果、エクソン44欠失1例、エクソン46-47欠失2例における、エクソン45スキッピング誘導効率は20%未満と低かったのに対し、エクソン46-48欠失1例、エクソン46-49欠失1例、46-53欠失3例では、50~70%のエクソン45スキッピング誘導効率を示した(図1)。これまでに得ていたエクソン46-51欠失の3例と合わせて、10例のDMD患者由来の筋培養細胞におけるエクソン45スキッピング効率を検討した。エクソン45のスキッピングを誘導する同じ配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入してもエクソンスキッピング効率はそれぞれ異なることが明らかとなった。

<図1>



(2) エクソン45スキッピング誘導によるジストロフィン蛋白発現の検討

エクソン45スキッピング誘導により蛋白の発現を認めたのは、免疫組織染色、ウエスタンブロット法ともに、エクソン44欠失例(A)、エクソン46-49例(E)、エクソン46-51例(H)の3例であった。mRNAにおけるエクソンスキッピング効率とジストロフィン蛋白発現には相関は見られなかった。

(3) 欠失変異の欠失断端の同定

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用い、エクソン45スキッピング誘導効率を検討した10例中、エクソン44欠失例(A)以外の9例、および、エクソンスキッピング誘導効率を検討していないエクソン46-49欠失例1例の計10例について欠失断端を以下のように同定した。

- ・エクソン46-47欠失例
(B) c.6614+20554_c.6913-5511
- (C) c.6614+13448_c.6913-18406
- ・エクソン46-48欠失例
(D) c.6614+22395_c.7099-1375

- ・エクソン 46-49 欠失例
(E) c.6614+18560_c.7201-12736
(スキッピング誘導効率未検)
c.6614+23492_c.7201-16568
- ・エクソン 46-51 欠失例
(F) c.6614+35997_c.7543-41747
(G) c.6614+7406_c.7543-30227
(H) c.6614+11854_c.7543-44005
- ・エクソン 46-53 欠失例
(I) c.6614+5698_c.7873-8547
(J) c.6614+18658_c.7873-12655

欠失断端は 10 例すべてで異なっていることが明らかになった。イントロン 45 内の欠失断端が比較的近傍に位置する例で比較した結果、(E)と(J)、(G)と(I)ではエクソン 45 のスキッピング誘導効率が同程度であったのに対し、(B)と(D)、(C)と(H)では誘導効率は明らかに異なっており、本研究ではイントロン 45 内の断端の位置とエクソン 45 スキッピング誘導効率との関連は明らかにならなかった。

(4) 欠失断端領域の配列内の ISEs, ISSs, ESEs の解析

欠失断端領域の配列について、解析ソフト (SpliceAid, RescueESE) を用いて解析したが、エクソンスキッピング誘導効率の違いを説明できる候補となる配列を挙げる事ができなかった。

本研究では、DMD 症例由来の筋培養細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソン 45 スキッピング誘導効率は、症例により異なることを、明らかにした。しかし、欠失断端配列とエクソンスキッピング誘導効率との関連を検討したが、エクソンスキッピング誘導効率を規定するシス因子を明らかにすることはできなかった。本研究で検討した症例数が十分ではなかったことが、エクソンスキッピング誘導効率を規定するシス因子を明らかにできなかった原因である可能性が考えられる。エクソンスキッピング療法は、DMD に対する有力な治療法として注目されており臨床試験が進められている。今回の研究成果は、症例によってエクソンスキッピング療法の効果が大きく異なる可能性を示すものである。エクソンスキッピング誘導効率が異なるメカニズムを解明することは、臨床試験を進める上でも重要と考えられることから、さらに症例数を増やして検討するべきであると考えられる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計9件)

Dwianingsih EK, Malueka R, Nishida A, Lee T, Yagi M, Iijima K, Takehima Y, Ito K, Matsuo M. A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies

dystrophinopathy. *J Hum Genet* (査読有) 2014 (in press)

Lee T, Takehima Y, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Matsuo M, Iijima K. Differences in carrier frequency between mothers of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *J Hum Genet* (査読有) 2014, 59(1):46-50, doi: 10.1038/jhg.2013.119.

Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takehima Y, Urade Y, Matsuo M. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta* (査読有) 2013, 423:10-14, doi: 10.1016/j.cca.2013.03.031.

Tran TH, Zhang Z, Yagi M, Lee T, Awano H, Nishida A, Okinaga T, Takehima Y, Matsuo M. Molecular characterization of an X(p21.2;q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28. *J Hum Genet* (査読有) 2013, 58(1):33-9. doi: 10.1038/jhg.2012.131.

Malueka RG, Takaoka Y, Yagi M, Awano H, Lee T, Dwianingsih EK, Nishida A, Takehima Y, Matsuo M. Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers. *BMC Genet.* (査読有) 2012,13:23. doi: 10.1186/1471-2156-13-23.

Takehima Y, Yagi M, Matsuo M. Optimizing RNA/ENA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing. *Methods Mol Biol.* (査読有) 2012;867:131-41. doi: 10.1007/978-1-61779-767-5_9.

Ota M, Takehima Y, Nishida A, Awano H, Lee T, Yagi M, Matsuo M. A G-to-T transversion at the splice acceptor site of dystrophin exon 14 shows multiple splicing outcomes that are not exemplified by transition mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* (査読有) 2012;16(1):3-8. doi: 10.1089/gtmb.2010.0276.

Malueka RG, Yagi M, Awano H, Lee T, Dwianingsih EK, Nishida A, Takehima Y, Matsuo M. Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low half-maximal effective concentration in a cell-free splicing system. *Nucleic Acid Ther.* (査読有) 2011;21(5):347-53. doi: 10.1089/nat.2011.0310.

Nishida A, Kataoka N, Takehima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, Matsuo M. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun.* (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

李知子、楠典子、八木麻理子、竹島泰弘、松尾雅文、飯島一誠 . ジストロフィン遺伝子スプライシングコンセンサス配列内変異によるスプライシング型の変化に関わる因子の検討 . 日本人類遺伝学会第58回大会 . 2013年11月20日-23日、宮城県仙台市 .

Nishida A, Takeshima Y, Kataoka N, Yagi M, Awano H, Lee T, Iijima K, Hagiwara M, Matsuo M. A small chemical, TG003, enhances skipping of mutated dystrophin exons: the third example revealing a decrease of exonic splicing enhancer density in common. The American Society of Human Genetics, the 62th Annual Meeting. 2012年11月06日-10日、San Francisco .

李知子、楠典子、粟野宏之、八木麻理子、竹島泰弘、松尾雅文、飯島一誠 . Duchenne/Becker 型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン遺伝子の微小変異の割合は増加傾向にある . 日本人類遺伝学会 57 回大会 . 2012年10月24日-27日、東京 .

Awano H, Lee T, Yagi M, Takeshima Y, Matsuo M, Iijima K. Dystrophin gene mutations in three dystrophinopathy patients with severe cardiomyopathy. Pediatric Academic Societies Annual Meeting. 2012年4月28日-5月1日、Boston .

Yagi M, Lee T, Awano H, Takeshima Y, Matsuo M. Antisense RNA/Ethylene-bridged nucleic acid chimera induces exon 45 skipping in cultured myocytes from DMD patients with 6 different deletion mutations. The American Society of Human Genetics 61th Annual Meeting. 2011年10月11-15日、Montreal .

八木麻理子、李知子、粟野宏之、伊東恭子、竹島泰弘、松尾雅文 . ジストロフィン遺伝子エクソンスキッピングを誘導する低分子化合物の同定と治療への応用 . 第53回日本小児神経学会総会 . 2011年5月26日-28日 . 横浜 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

粟野 宏之 (AWANO Hiroyuki)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号 : 30437470