

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591510

研究課題名(和文) 福山型先天性筋ジストロフィーの治療法の確立に関する研究

研究課題名(英文) Antisense oligonucleotide therapy for Fukuyama type congenital muscular dystrophy

研究代表者

池田 真理子(谷口真理子)(Taniguchi-Ikeda, Mariko)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00410738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：FCMD患者の治療実現を目標としスプライシング異常を標的とするアンチセンス療法確立に向け薬剤の至適化、毒性の検討や薬剤修飾、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築をモデル動物及び患者由来細胞系を用い行う研究を計画した。アンチセンス治療法を発見、発表した当時は3剤での投与が必要であったが、さらに詳しくスクリーニングをすることで、一剤での投与の効果が確認することができた。また、その一剤につき安全性の確認やオフターゲット効果の検討を行った。レトロトランスポゾンの配列にあるスプライシング異常が原因であり、安全性の検討は今後も慎重に行う必要があるが、臨床治験を目指す可能性のある成果だと考える。

研究成果の概要(英文)：Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD) is a second common, severe childhood muscular dystrophy in Japan. All patients have ancestral insertion of a SINE-VNTR-Alu retrotransposal element (SVA) into a causative gene fukutin. We previously showed that aberrant mRNA splicing, induced by SVA exon-trapping caused FCMD. In this study, we optimized the best, single AON for clinical trial. We re-designed AONs precisely around the splice sites and assessed the efficacy for exon trap inhibition of these AONs in FCMD patient cells and model mice. By testing on normal Fukutin production and functional analysis, we finally selected one best candidate AON termed AON-F. We also succeeded in improvement on production efficacy for AON-F. We show the promise of splicing modulation therapy as the first radical clinical treatment for FCMD in the near future.

研究分野：小児神経

キーワード：先天性筋ジストロフィー 分子標的治療 RNA創薬 アンチセンス治療

1. 研究開始当初の背景

1. FCMD 研究の学術的背景

(1) 疾患概念

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は日本に特有の疾患であり先天性筋ジストロフィー、II型滑脳症、眼奇形の3症状を示す常染色体劣性遺伝疾患である(Fukuyama, et al., *Brain Dev* 1981). 日本で2番目に多い小児の筋疾患で10代のうちに死に至る重篤な疾患だが治療法がない。

(2) 原因遺伝子 *fukutin* の発見

1998年にポジショナルクローニング法によりFCMDの疾患責任遺伝子である *fukutin* 遺伝子(*fukutin*, 9q31)が同定された。殆どのFCMD患者は、*fukutin* の3'非翻訳領域に約3kbのレトロトランスポゾン(SVA)の挿入型変異を認める(Kobayashi, et al., *Nature* 1998)。この変異は約100世代前、日本人祖先の1人に生じ、日本人の90人に1人が保因者で約3万出生に1人発症する。

(3) 現在わかっている病態機構 (α ジストログリカノパチーと *fukutin* の機能)

FCMD患者の骨格筋では細胞膜と基底膜を繋ぐ糖蛋白 α -dystroglycan(α DG)のO-マンノース型糖鎖修飾に欠損があり、この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻する為に重度の筋ジストロフィーが発症する(Michele DE, et al., *Nature* 2002)。類縁疾患の muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群等においても、 α DG の O-マンノース型糖転移酵素の遺伝子異常が次々と同定され、 α ジストログリカノパチー(α DGopathy)と総称される新しい疾患概念が確立された(Muntoni, et al., *Lancet* 2002)。 *fukutin* はゴルジに局在し既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性より α DGの糖鎖修飾に関する糖転移酵素あるいはOマンノース型糖鎖にリン酸化された糖残基を転移するヌクレオチジルトランスフェラーゼではないかとされているが機能を含め未知な点が多い。

(4) FCMD の分子レベルの発症機序に関する従来の説

FCMDの発症機序はSVAの挿入変異が3'非翻訳領域にある為、*fukutin* の mRNA が不安定化し分解される、あるいはトランスポゾンの反復配列の影響でDNAメチル化やヒストン脱アセチル化等の制御を受け *fukutin* 周辺がエピジェネティックな不活性化を受け、発現抑制や転写伸長障害が起こる、と考えられてきたが、SVA配列はグアニン、シトシンが豊富で解析が難しく疾患機序は未解明のままであった。最近、SVAがいくつかの遺伝子内に挿入し選択的スプライシングや中途終始コドン

を引き起こし、遺伝子の機能に多様性を与え生物の進化、選択、多様性、あるいは疾患の発生に關与している可能性が報告された(Hancks, et al., *Genome Res* 2009)。

(5) 申請者による新しい疾患発症機構の発見、治療法の構想、及びアンチセンス治療の成功

申請者は、FCMDがSVA挿入変異により *fukutin* 蛋白をコードする最終エクソン内に新たなスプライシング部位が生じ、新生エクソン由来の異常蛋白が産生される **スプライシング異常症**であることを見出した(Taniguchi-Ikeda, et al., *Nature*, 2011)。つまり患者にみられるSVA挿入配列内の強力なスプライシング受容部位が、*fukutin* の蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的スプライシング供与部位を活性化させ生じる。この標的配列にアンチセンス核酸(AON)を pre-m RNA レベルで結合させ異常スプライシングを阻止し正常なスプライシングを誘導する治療法(図1)が有効であると考えた。我々はすでにヒト正常型及び患者型SVA挿入型 *fukutin* 配列をマウス *fukutin* に導入したノックインモデルマウス系を構築し(Kanagawa, et al., *Hum Mol Genet* 2009) 患者同様のスプライシング異常を確認した。そこで、申請者は異常スプライシング標的配列に対するAONを設計し、モデルマウスより樹立したES細胞系及び患者由来筋管細胞に投与したところ、mRNAレベルでのスプライシング是正が誘導された。更にAONのマウス骨格筋への局所投与及び経尾静脈での全身投与において正常型の *fukutin* mRNA の回復、正常 *fukutin* 蛋白の回復、そして機能的回復を示唆する α DGの糖鎖修飾の回復、また患者筋管ではラミニン結合能の回復に成功した(図2 Taniguchi-Ikeda et al., *Nature* 2011)。これらの結果は不治の病であるFCMDに対する初の根治治療の可能性を示唆する。スプライシング異常を標的とする治療法は現在デュシャン型筋ジストロフィーに対しAONを用いたエクソンスキッピング法の臨床治験が進行しており最も臨床応用可能な治療法の一つとして注目されている。FCMDに対するアンチセンス療法も治療実現の可能性が高いと考える。

2. 研究の目的

本研究では上述の成果を進展させFCMD患者の治療実現を目標とし初年度にはスプライシング異常を標的とするアンチセンス療法の確立に向け薬剤の至適化、毒性の検討や薬剤修飾、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築をモデル動物及び患者由来細胞系を用い行う。AONには人体投与可能なアンチセンス核酸化合物(モルフォリノ(PMO)、2O'メチルRNA(2OMePS))及び新型のペプチド架橋型モルフォリノ(PPMO)を使用しmRNA、*fukutin* 蛋白及び α DG糖化レベルでの治療効果や毒性を検討し核酸配列の至適

化も行う。次年度には 現時点で進行中の研究である、スプライシング治療及び α DG の糖化を評価するアッセイ系よりの低分子化合物のライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを進展させ、有効であった化合物のモデル動物を用いた詳細な検討を行う。次年度には 高分子ナノ粒子(ポリメチルメタクリレート)やポリエチレングリコール(PEG)を AON と混合投与することにより治療効果の向上化を図り、副作用の軽減、組織移行の改善等の検討も含めた最適な DDS の構築(現在進行中)を人体投与可能な酸性核酸化合物(2OMePS, ENA, LNA)と複合させモデル動物への治療実験を行う。次年度、最終年度は フクチンの機能解明にもつなげるフクチン(酵素)補充療法の開発を試みる。ゴルジに局在するフクチン蛋白を膜より分離、可溶化させ超遠心し分離精製し、fukutin のアミノ酸配列より高次構造や機能を予測した上で、酵素として予測された酵素の転移活性を確認し細胞系、モデル動物系を用い酵素活性を測定する。これによりアンチセンス療法による治療効果の判定が可能となりまた至適な DDS を構築し骨格筋、心筋に対するフクチン酵素補充療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

1. モルフォリノ (PMO)、2' O メチル RNA(2OMePS)及びペプチド架橋型モルフォリノ (PPMO) を用い疾患モデル動物、ヒト患者由来細胞系での治療効果判定や毒性の検討、至適な投与時期の検討：

A FCMD のモデル動物系及び細胞系を用いたアンチセンス療法の臨床応用実現に向けての検討

FCMD 患者由来筋芽細胞に AON(PMO, 2OMePS, RNA, PPMO)を投与し最も有効なアンチセンス核酸を選択する。至適な核酸配列やカクテルを同定しモデルマウスの尾静脈経路または腹腔内に投与(20mg/Kg~400mg/Kg, 毎週、2~8 回投与)し骨格筋、心筋を中心に各組織での治療効果を検討する。FCMD では α DG の O-マンノース型糖鎖に欠損がみられそのリガンドである laminin との結合能が低下するため、その回復を機能的な治療効果の指標とする。FCMD モデルマウスには患者に見られる特徴的な臨床的所見(脳奇形や筋弱力)は見られない。よってモデルマウスにおいて臨床症状の改善の指標となるパラメーターの検索や、患者で見られる臨床症状を呈するモデルマウスの創出も試みる。さらにマーマセットを用いた、霊長類に対するアンチセンス核酸投与を行いアンチセンス薬剤の毒性試験も行う。

B 患者由来細胞に対する AON 治療効果の判定やモデル動物に対する治療評価は骨格筋より抽出した mRNA を定量的 RT-PCR 法によりスプライシングは正率を測定し、正常な fukutin 蛋白の回復は fukutin 抗体の免疫沈降実験及びウエスタンブロットを行い判定す

る。 α DG の糖鎖修飾の改善はウエスタンブロット解析により行う。具体的には、レクチンである WGA(wheat germ agglutinin、小麦胚芽凝集素)ビーズにより糖蛋白を回収し、 α DG の蛋白を認識する抗体(AP-074G-C)にて疾患群において低下している α DG の分子量が治療により正常の分子量まで回復するか、また α DG の糖鎖を認識する抗体(IIH6C、A41)を用い疾患群で低下している抗体への反応性が治療により正常まで上昇するかを検討する。 α DG と laminin の結合能回復は外来性ラミニンをウエスタンブロットの膜上で結合させ、結合した laminin を検出するラミニンオーバーレイアッセイで検討し α DG の機能改善の生化学的指標とする。筋ジストロフィーの病理組織及び臨床症状の改善を総合的に評価するために、臨床症状を呈するモデルマウスを作成するため骨格筋に対する負荷実験を計画する。具体的にはトレッドミルによる持続運動負荷、低リン食による筋力低下の誘発、カルジオトキシン等、筋破壊を誘導する薬剤の投与を行いモデルマウス特異的に表現型が出現した系において薬剤治療を観察し対照と比較する。

C 薬剤の組織移行や骨格筋、心筋への組織親和性や毒性の検討

モデル動物に対し全身投与後の肝、腎毒性の有無(血清中クレアチニン、尿素窒素、肝機能(AST,ALT, γ GTP))を検討。効果の濃度依存性に加え薬剤による抗体原性の検討も行う。組織間(心筋、骨格筋)での治療効果の比較、病理組織の検討(HE 染色)を行う。治療群、対照群及び無治療群において薬剤による他遺伝子への発現の影響を DNA マイクロアレイ(GeneChip, Affimetrix 社)を用いてモデル動物に対し発現解析を行う。

2. スプライシング是正薬及び α DG 増強薬の低分子化合物を用いた薬剤スクリーニング 患者モデルマウス由来のマウス ES 細胞系を用い、 α DG のマンノース型糖鎖を認識する抗体(IIH6C, VIA41)を用い、投与薬剤による糖化増強を認識するハイスループットな ELISA アッセイ系を作成する。このアッセイ系を用いて薬剤化合物のケミカルスクリーニングを行う。

3. 高分子ナノ化合物、ポリメチルメタクリレート(PMMA)等を用いた DDS の構築

ヒトへの臨床応用の実現化には、薬剤の治療効果を高めるに加え副作用の軽減、投与経路、血液脳関門の通過への検討、組織移行の効率化等の工夫が必須である。最適な薬物輸送システムの構築の為に、AON の高機能化を目指す。

4. 研究成果

研究 1 に関しては、現実的にヒトへの投与が可能かつ安全性が世界的にも証明されている PMO に絞り、薬剤のスクリーニングを行った。結果 1 剤で効果的な薬剤を決定することができた。この 1 剤で動物及び患者由来筋芽細胞をもちい、スプライシング阻害活性を

測定したところ、濃度依存的なスプライシング制御を確認できた。動物実験での至適投与濃度の検討も行き、治療効果の持続期間についての検討も行った。薬剤のデリバリーに関しては、現在検討中であるが、脳、胎盤への移行に関するマウス実験を行っている。今後効果薬剤を用いて更なる DDS の検討を行う予定である。薬剤スクリーニングに関しては、アッセイ系の立ち上げを行い、今後スクリーニングを予定している。iPS 細胞樹立などの技術の発展にともない、そのつど最適な方法を用い実験を継続したいと考えている。また、効果のみられた薬剤に関しては、今後安全性試験、毒性試験を行い臨床治研を目指したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Tsutsumi M, Kowa-Sugiyama H, Bolor H, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Yamada K, Taniguchi-Ikeda M, Toda T, Kurahashi H. Screening of genes involved in chromosome segregation during meiosis I: in vitro gene transfer to mouse fetal oocytes. *J Hum Genet*, 2012, 57:515-22.
 2. Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, Ohtake A. Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy. A case report. *Brain Dev*, 2013, 13:286-6.
 3. Divya M, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K, Fukushima Y, Emanuel BS, Kurahashi H. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. *Mol Cytogenet*, 2014, 7:55. doi: 10.1186/s13039-014-0055-x.
 4. Morisada, N Fu X J, Hashimoto F, Taniguchi-Ikeda M, Hashimura Y, Ohtsubo H, Ninchoji T, Kaito H, Nozu K, Takahashi E, Nakanishi K, Kurahashi H, Iijima K. A patient of Autosomal Recessive Alport syndrome due to Segmental Maternal Isodisomy. *Hum Gen Var*, 2014, in press
 5. Hayashi R, Bito T, Taniguchi-Ikeda M, Farooq, Ito Masaaki, Shimomura Y. Japanese case of oculodentodigital dysplasia caused by a mutation in the GJA1 gene. *J Dermatology*, 2014, 41(12):1109-10.
 6. Katayama Y, Yokota T, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK, Taniguchi-Ikeda M, Nakamura H, Iijima K, Morioka I. Association of HMOX1 gene promoter polymorphisms with hyperbilirubinemia in the early neonatal period. *Pediatr Int*, 2015, doi: 10.1111/ped.12591. [Epub ahead of print].
 7. Nishiyama M, Nagase H, Tanaka T, Fujita K, Maruyama A, Toyoshima D, Nakagawa T, Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Morisada N, Takada S, Iijima K. Demographics and outcomes of patients with pediatric febrile convulsive status epilepticus. *Pediatr Neurol*, 2015, 52(5):499-503.
 8. Tairaku S, Taniguchi-Ikeda M, Okazaki Y, Noguchi Y, Nakamachi Y, Mori T, Kubokawa I, Hayakawa A, Shibata A, Emoto T, Kurahashi H, Toda, T, Kawano S, Yamada H, Morioka I, Iijima K. Prenatal genetic testing for familial severe congenital protein C deficiency. *Human Genome Variation*, 2015, in press
 9. Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Matsumura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Somatic mosaicism and variant frequency detected by next generation sequencing in X-linked Alport syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 2015, in press
 10. 池田真理子, 小林千浩, 戸田達史
福山型筋ジストロフィーのスプライシング異常に対するアンチセンス治療
The Lung Perspective 20(2):186 -192 2012
 11. 池田真理子, 小林千浩, 戸田達史
福山型筋ジストロフィーの病的スプライシング異常とアンチセンス療法
実験医学 30(6): 950 -953 2012
池田真理子, 戸田達史
 12. 池田真理子, 小林千浩, 戸田達史
福山型先天性筋ジストロフィーの発症機序と治療戦略 *細胞* 44(14): 22 - 26 2012
- 〔学会発表〕(計 9 件)
- 1 第 117 回日本小児科学会学術集会 名古屋 2014.4.11-13
福山型先天性筋ジストロフィーにおける血清中 miRNA の発現解析
池田真理子、小林千浩、李知子、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史
 - 2 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会 名古屋 2014.4.10
福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス治療における至適薬剤の選択
池田真理子 小林千浩 佐藤洋平 若山達志 増田博文
竹島康弘 飯島一誠 戸田達史
 - 3 第 56 回日本小児神経学会学術集会 浜松
福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス治療における至適薬剤の選択
池田真理子 小林千浩 佐藤洋平 若山達志 増田博文 竹島康弘 飯島一誠 戸田達史
 - 4 第 59 回日本人類遺伝学会 東京

2014.11.19-22

福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス治療における至適薬剤の選択

池田真理子 小林千浩 佐藤洋平 若山達志 増田博文 竹島康弘 飯島一誠 戸田達史

5 American Society of Human Genetics 2012 Annual Meeting San Francisco 2012.10.6-10

Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. M. Taniguchi, K. Kobayashi, M. Kanagawa, CC. Yu, T. Oda, A. Kuga, H. Kurahashi, H. O. Akmen, S. DiMauro, T. Yokota, S. Takeda, T. Toda

6 第 54 回日本小児神経学会総会 札幌 2012.5.17-19

7 Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy

池田真理子, 竹島泰弘, 戸田達史

8 日本人類遺伝学会 第 57 回大会 東京 2012.10.24-27

福山型筋ジストロフィーのスプライシング異常の発見とアンチセンス治療法に関する研究

池田(谷口) 真理子

9 第 35 回日本分子生物学学会 2012 年 12 月 福岡

SVA 型レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングとアンチセンス核酸を用いた福山型筋ジストロフィーの治療

池田 真理子

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

発明の名称：福山型筋ジストロフィー治療用医薬組成物、発明者：戸田達史、小林千浩、池田真理子、出願番号：2013-216595、発明の種類：特許 出願人：国立大学法人神戸大学、出願日：平成 24 年 4 月 5 日 国内

発明の名称：「福山型筋ジストロフィー治療用アンチセンス核酸 発明者：戸田達史、小林千浩、池田真理子(神戸大学)、増田博文、若山達志、佐藤洋平(日本新薬)」出願人：国立大学法人神戸大学、日本新薬株式会社 種類：特許 出願番号：2015-091229、出願日：平成 26 年 10 月 3 日 (優先日：平成 25 年 10 月 4 日) 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田(谷口) 真理子 (TANIGUCHI-IKEDA Mariko) 神戸大学大学院医学研究科 小児急性疾患学 特命講師

研究者番号：00410738

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林 千浩 (KOBAYASHI, Kazuhiro) 神戸大学大学院医学研究科 分子脳科学

准教授 研究者番号：90324780