

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791060

研究課題名(和文) 脊髄性筋萎縮症のSMN2遺伝子のスプライシングを正常化させる新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of spinal muscular atrophy treatment by SMN2 gene splicing modification

研究代表者

中川 卓(Nakagawa, Taku)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症はSMN1遺伝子の異常から発症する致死的な遺伝性神経疾患である。現在、有効な治療法は確立されていない。治療法として、SMN1遺伝子とわずか5塩基のみが異なるSMN2遺伝子の活用、つまり「SMN2遺伝子エクソン7のスプライシング正常化」を目指した治療法が有望とされている。我々は、ミニ遺伝子を用いた解析系において、低分子化合物Aが濃度依存性にSMN2遺伝子のエクソン7スプライシングを正常化する驚くべきデータを得た。この結果をもとに化合物Aに類似した脊髄性筋萎縮症の治療薬となりうる化合物を探索した。しかしながら、研究期間内に化合物Aより治療効果が高く毒性が低い化合物は発見できなかった。

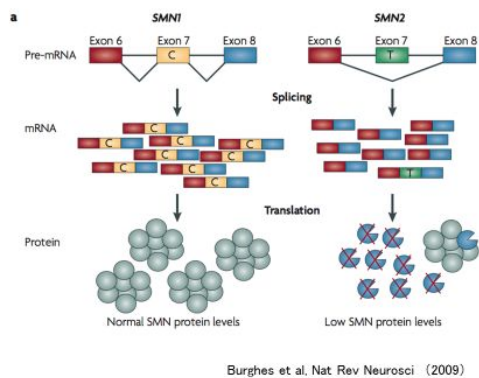
研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy is a fatal congenital neuromuscular disease caused by SMN1 gene mutation. Effective treatment has not established yet. As a strategy of the treatment, modification for SMN2 splicing is thought to be a promising approach. We previously discovered compound A is effective to modify the SMN2 splicing using mini gene system. Subsequently, we tried to search for similar compound that would modify the SMN2 splicing safely. However, we didn't find the effective compounds for SMN2 splicing correction during the study period.

研究分野：小児科学

キーワード：spinal muscular atrophy SMA splicing SMN2

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy: SMA) は世界で何万人もの小児が罹患する常染色体劣性遺伝性疾患である。SMA では SMN1 遺伝子異常によって SMN 蛋白が減少し脊髄前角細胞が選択的に変性する。重症例では呼吸筋力低下により 1 歳前後で呼吸不全を呈する重篤な疾患であるが、いまだ有効な治療法は確立されていない。一方、SMN1 遺伝子とわずか 5 塩基のみが異なる SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシングを正常化して SMN 蛋白の発現を誘導する方法が、本疾患に対する最も有望な治療戦略として注目され、この治療法の確立が世界的な競争となっている (図 1)。



(図 1)

この全く新たな治療法の開発は、何万人もの世界中の SMA 患者の治療を大きく推進するもので、社会に計り知れない利益をもたらすものと期待される。

2. 研究の目的

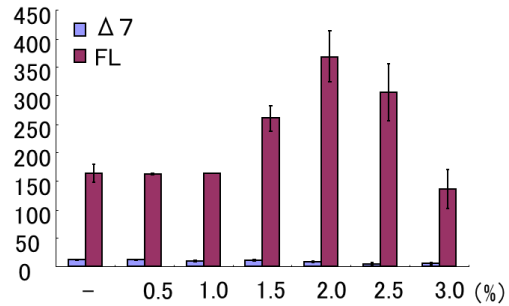
- (1) SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシング正常化効果の高い低分子化合物を探索する。
- (2) 候補となる低分子化合物で、水溶性、脂溶性、揮発性、毒性等の評価を行い、SMA の治療薬として臨床的応用が可能か検討する。
- (3) SMA の治療薬として臨床応用できる低分子化合物を抽出し、効果発現に必要な投与量を見出す。

3. 研究の方法

申請者は、SMN2 遺伝子エクソン 7 近傍の配列を組み込んだミニ遺伝子を作成した。ミニ遺伝子の作成にあたっては Habara Y et al. J Biochem 2008.143. 303-10 の方法を用いた。申請者は、このミニ遺伝子と HeLa 細胞を用いた in vitro スプライシング解析系において、「SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシング正常化」する薬剤の探索を試みた。その結果、低分子化合物 A が、濃度依存性に SMN2 遺伝子のエクソン 7 スプライシングを

正常化する驚くべきデータを得た (図 2)。

この結果をもとに、コンピュータを用いて化合物 A に類似しており「SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシング正常化」効果が期待される候補化合物を理論的に割り出した。この中から、常温で安定している数十種類の候補薬を選定した。ミニ遺伝子の in vitro スプライシング解析、および SMA 患者の線維芽細胞を用いた 2 つの系で、最終的な候補薬の「SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシング正常化」効果を測定した。



(図 2 FL は正常蛋白、Δ7 が異常蛋白)

4. 研究成果

今回の我々の研究では、低分子化合物 A 以上に、スプライシング修正効果が高く細胞毒性が低い治療薬として期待できる低分子化合物は見つけれなかった。

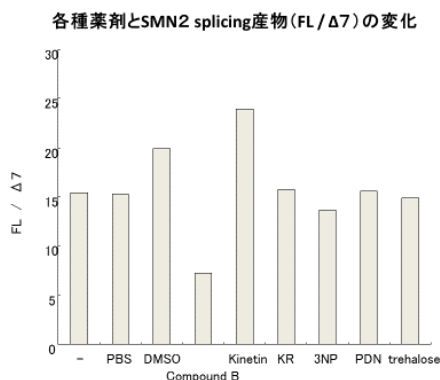
コンピュータを用いて化合物 A と類似の構造を持つ低分子化合物の探索を理論的に進めたが、揮発性、脂溶性、水溶性等の特性から治療薬候補とすることが困難な物質も多かった。

ミニ遺伝子と HeLa 細胞を用いた in vitro スプライシング解析系にて、カイネチン (Kinetin)、カイネチンリポシド (KR)、ブレドニゾロン (PDN)、トレハロース (Trehalose) 等、すでに何らかの薬効が認められている低分子化合物がスプライシング正常化作用を持つかどうかについても確認したが、スプライシング正常化効果を持つ低分子化合物は発見できなかった。

逆に、偶発的にはあるが、病的スプライシング産物の産生を助長する、いわば負のスプライシング修正効果がある低分子化合物 (Compound B) を発見した (図 3)。この発見は直接 SMA の治療につながるものではないが、スプライシングを修飾する低分子化合物が確かに存在する事実を示している。この発見はスプライシング全体のメカニズムを解明する上でも貴重な知見であると考えられる。

ミニ遺伝子の in vitro スプライシング解析系を用いた候補化合物の探索は、患者線維芽細胞を用いる系のそれと比べて、圧倒的に早く実験を進めることができた。SMA 患者線維芽細胞を増殖させるには月単位の時間が必要で、SMA 患者細胞を用いた実験は容易で

はなかった。この点は何らかの方策で改良していく必要がある。



(図3)

今回、候補薬を段階的に低濃度から高濃度で作用させて、スプライシング正常化効果を評価した。多くの例で濃度依存性に細胞毒性が出現し、スプライシング産物 (mRNA) の回収効率が低下した。コンピュータで類似構造の物質を割り出した後も、候補低分子化合物は膨大な種類があり、その中からどの低分子化合物を選択して、濃度依存性まで評価するのは、決定する指標が乏しかった。数多くの低分子化合物で試すには時間的、物理的制約があった。

SMA患者細胞のSMN2遺伝子のスプライシングでは、正常 mRNA (FL) および病的 mRNA (7) の2種類のスプライシング産物が産生される。このFLと7の2種類のスプライシング産物の割合は、実際の実験において、各SMA患者細胞により比較的大きな個体差が見られた。同じ低分子化合物を作用させて、スプライシング正常化効果をみる場合、細胞が違えば効果に差がでることが推定された。

2012年、MacKenzie Aらが、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたSMN2遺伝子のスプライシング修正が提唱し、動物実験でSMAの症状を軽減できたと報告した。今回我々はスプライシング正常化効果を持つ低分子化合物の探索を行い、治療薬となりうる物質を見出すことはできなかった。特異的治療としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるスプライシング正常化のほうが、低分子化合物によるスプライシング正常化よりも、より直接的なメカニズムで人為的にスプライシングを修飾することができる。安全性や投与量等の問題を解決し、治療法を確立する上でも、アンチセンスオリゴヌクレオチドのほうが優れているかもしれない。さらに今後、低分子化合物で治療法を開発する場合、MacKenzieらが報告したアンチセンスオリゴヌクレオチド以上に、スプライシング正常化効果があるものを発見しなければならない。世界的なSMAの治療薬開発の展望として、近年の分子生物学的技術の進歩によって、アン

チセンスオリゴヌクレオチド、低分子化合物、またはそれらの組み合わせによるスプライシング正常化をメカニズムとする治療開発は加速していくものと期待される。

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 7件)

1) Kato T, Morisada N, Nagase H, Nishiyama M, Toyoshima D, Nakagawa T, Maruyama A, Fu XJ, Nozu K, Wada H, Takada S, Iijima K, Somatic mosaicism of a CDKL5 mutation identified by next-generation sequencing. *Brain Dev.* 2015 Mar 27, doi: 10.1016/j.braindev.2015.03.002.

2) 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 May;52(5):499-503. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.001.

3) Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Koderia H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H. *Epilepsia.* 2013 Jul;54(7):1282-7. doi: 10.1111/epi.12200.

4) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima 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.* 2013 Aug 23;423:10-4. doi: 10.1016/j.cca.2013.03.031.

[学会発表](計 5件)

1) 中川卓, てんかん発作にビタミン B6 製剤が著効した先天性 GPI 欠損症の一男児例, 第48回日本てんかん学会学術集会, 2014.10.2, 東京

2) 中川卓, prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy. *World Muscle society 18th congress*

2013.10.1-2013.10.5, California, USA

3) 中川卓, Duchenne 型筋ジストロフィーにおける尿プロスタグランディン D2 代謝産物の排泄の増加, 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012.5.17-5.19, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 卓 (NAKAGAWA, TAKU)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457073

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

西尾 久英 (Nishio, Hisahide)

神戸大学大学院医学研究科 教授

研究者番号：80189258