

平成 30 年 10 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06161

研究課題名(和文) スプライシング新規定量システムを利用した筋強直性ジストロフィーの治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapy for myotonic dystrophy by analyzing splicing mechanism using new splicing quantitative system

研究代表者

吉田 奈摘 (YOSHIDA, NATSUMI)

東京大学・生命科学ネットワーク・特任助教

研究者番号：10760069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋強直性ジストロフィーにみられる筋強直の原因は、クロライドチャンネル(CLCN1)の選択的スプライシング異常であり、これを正常化することは治療に重要である。しかし、マウスとヒトのCLCN1のゲノム構造がかなり異なること、ヒトで新たに異常なスプライシング型が存在することが分かり、ヒトのCLCN1を用いて、新しい方法でスプライシングを定量する必要があった。そこで、正常なスプライシングだけを定量するシステムを構築し、ヒトCLCN1のスプライシングを効率よく正常化するアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列の同定と、正常化に重要なスプライシング因子を同定することで、治療法開発に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Muscle hyper-excitability (myotonia) in patients with myotonic dystrophy is caused by the abnormality in alternative splicing of chloride channel (CLCN1). It is important for the treatment to normalize CLCN1 splicing. However, it was found that the genomic structures of mouse and human CLCN1 are considerably different, and we newly detected the abnormal splicing isoform exists in human CLCN1. So, it was necessary to quantify CLCN1 splicing by a new method using human CLCN1 genome. Therefore, we constructed a system to quantify only normal splicing, identify the sequence of antisense oligonucleotide that efficiently normalizes splicing of human CLCN1, and identify the splicing factor for the normalization. We expect that these results will be contributed to development of the treatment.

研究分野：分子細胞生物学、生化学、疾患生物学、核酸治療

キーワード：myotonic dystrophy (DM) chloride channel (CLCN1) MBNL CELF antisense oligonucleotide Tat peptide

1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィーは常染色体優性遺伝する筋疾患であり、成人で最も多くの患者を有する。症状としては、筋強直、筋萎縮を伴う筋力低下、心伝導障害、白内障、耐糖能障害、精神遅滞など全身で様々な症状を呈することが特徴的である。これは、常染色体にある *DMPK* 遺伝子の 3' 非翻訳領域に CTG の繰り返し配列が異常に伸長し、転写された CUG リピート領域に MBNL という RNA 結合タンパク質が捕捉され、MBNL の機能低下によって、様々な遺伝子の選択的スプライシングが異常になることが主な原因だと考えられている。また、一方で、同じく RNA 結合タンパク質である CELF1 は、患者の筋肉で活性が高くなっていることが分かっており、これも選択的スプライシング異常の原因であると考えられている。

選択的スプライシング異常遺伝子の中で、クロライドチャンネル遺伝子 (*CLCN1*) のスプライシング異常は、筋強直の原因であることが示されており、疾患モデルマウスの *Cln1* のスプライシングをアンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) で正常化すると、筋強直が正常化する。したがって、ヒトにおいても、*CLCN1* の AON によりスプライシングを正常化することは、筋強直の有力な治療方法になる。しかしながら、マウスとヒトでは *CLCN1* 遺伝子のゲノム構造がかなり異なっており、マウスではエクソン 7a だけをスキップさせれば正常なアイソフォームになるが、ヒトの場合は、エクソン 6B と 7A の 2 つのエクソンをスキップさせなければならない。したがって、ヒトを治療する AON 配列は、ヒトのゲノム構造で効率的にスプライシングを正常化する配列を探索する必要がある。

さらに、当研究室の研究より、ヒト *CLCN1* エクソン 7 の 5' 側に余分に TAG の 3 塩基が入っている異常なアイソフォームが新たに検出され、それは従来の RT-PCR の検出方法では正常のアイソフォームとして定量されていた。これまで、*CLCN1* のスプライシングに対して正常化を促進する AON の効果は、従来の方法で検出していることが多く、これらの研究についても再度検討し、効果を検証し直す必要がある。また、*CLCN1* のスプライシングがどのスプライシング因子によって制御されているか検証する際にも、従来の検出方法が用いられており、*CLCN1* のスプライシング制御機構を正確に調べるためには、新しい方法で検証し直す必要がある。

2. 研究の目的

ヒトの *CLCN1* のスプライシング異常を効率よく正常化する AON 配列を同定すること。また、*CLCN1* のスプライシングを制御するスプライシング因子を、従来の方法より正確に同定することで、正確なスプライシング制御機構を明らかにし、治療に応用できるようにすることを目指した。

3. 研究の方法

当研究室ではヒト *CLCN1* が正しくスプライシングされたアイソフォームのみを特異的に検出できる正確な定量系を構築した。この系は、エクソン 7 の前方に余分に TAG が入っていない、正常なエクソン 7 とエクソン 6 のジャンクションにプライマーを設計し、検量線を用いたリアルタイム PCR によって正常なアイソフォームのみを検出できる系 (qRT-PCR) である。なお、検量線には、エクソン 7 とエクソン 6 が正常にスプライシングされた配列をベクター (pGEM-TEasy) に挿入したものを精製して用いた。

この正確な定量系を用いて、ヒト *CLCN1* ゲノムよりエクソン 5~7 のエクソン-イントロン構造をベクター (pEGFP-C1) に挿入したミニジーンと、脱落させたいエクソン 6B、7A の付近に設計した AON (25mer, 2'-O'-MS 化 AON; 図 3-1) をヒトの培養細胞 (HEK-293) に遺伝子導入し、スプライシングを効率よく正常化する AON 配列の同定を試みた。

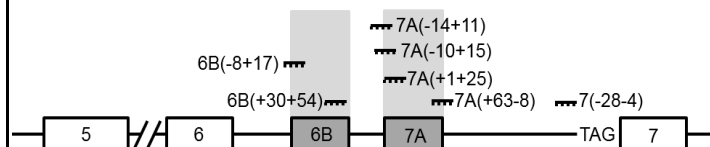


図 3-1、ヒト *CLCN1* に対する AON 設計図

次に、ヒト *CLCN1* のスプライシングがどのスプライシング因子によって制御されているか検証するために、ヒト *CLCN1* ミニジーンと MBNL ファミリータンパク質 (MBNL1-3) と CELF ファミリータンパク質 (CELF1-6) を過剰発現するベクターをヒトの培養細胞に遺伝子導入し、正確に定量する qRT-PCR を行った。なお、ミニジーンのエ GFP の発現量によって遺伝子導入効率の違いを補正している。

MBNL1 に細胞膜透過性ペプチドである TAT 配列とタンパク質分解を阻害するペプチドである GAr 配列を付加した TAT-GAr-MBNL1 融合タンパク質を大腸菌 (BL21 株) より精製し、これをヒト培養細胞 (HeLa) の培養液に添加、または膜透過性ペプチド試薬の Xfect protein transfection reagent と共に培養液に添加し、内在性の様々な遺伝子で選択的スプライシングが正常化するか、簡易的な RT-PCR によって測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト *CLCN1* 選択的スプライシング

異常を正常化する AON 配列の同定

患者の筋強直の原因である *CLCN1* のスプライシング異常を、効率よく正常化する AON 配列を同定するために、qRT-PCR を行ったところ、エクソン 7A の後半に設計した 7A(+63-8) の AON 配列で最も正常なアイソフォー

ムが増加していた(図4-1)。なお、Controlはヒト *CLCN1* とは関係のない AON 配列である。

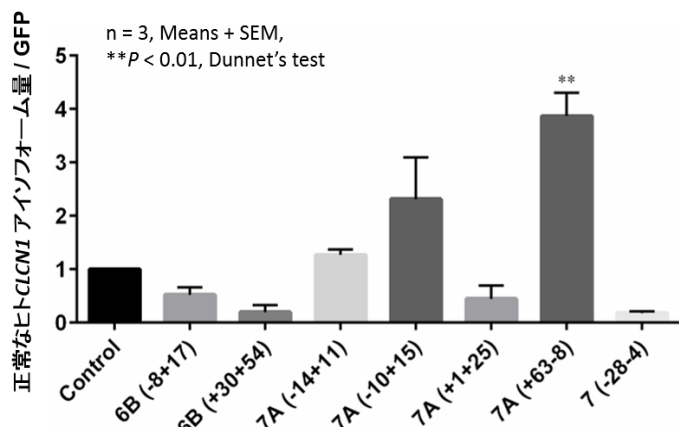


図4-1, ヒト*CLCN1*スプライシングを正常化するAON配列

この結果は、マウス *Clcn1* ではエクソン 7a (ヒトの 7A に相当) +1+25 で最も効果的に正常なスプライシングを促進していたが、ヒト *CLCN1* では効果的な AON 配列がマウスとは異なることが示唆された。この知見は、ヒトの筋強直の治療の応用に役立つことが期待できる。

(2) ヒト *CLCN1* 選択的スプライシング制御機構の解析

より正確なスプライシング定量系において、ヒト *CLCN1* のスプライシングを制御する因子を測定したところ、MBNL1 を過剰発現させると正常なスプライシングが有意に促進されていた(図4-2)。なお、MBNL1 はエクソン 7 の前方に TAG が入るスプライシング制御には関与していないことも示した。

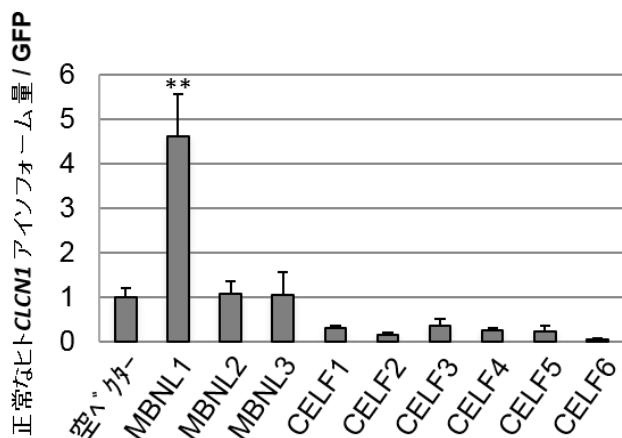


図4-2, ヒト*CLCN1*スプライシング制御因子の同定

一方で、患者で活性化されている CELF1 を過剰発現しても、正常なスプライシングアイソフォームの減少傾向はみられるものの、有意な減少は見られなかった。以上の結果は、先行研究のマウス *Clcn1*、ヒト *CLCN1* においても同様である①。しかし、マウス *Clcn1*

の場合 CELF3-6 を、ヒト *CLCN1* の場合 CELF4-6 を過剰発現させると、正常なアイソフォームが減少することが報告されているが、今回の系では減少傾向は見られるものの、有意な減少は見られなかった。以上の結果の違いは、マウスとヒトでスプライシング制御機構が異なっていること、また定量性の高い qRT-PCR でスプライシングを定量化したことによるものと考えられる。

(3) 細胞膜透過性ペプチド TAT を付加した MBNL1 の細胞導入法の検討

スプライシング因子の MBNL1 の過剰発現による *CLCN1* スプライシングの正常化は、AON の最も効果が高い配列に比べてもやや高い傾向であった。したがって、ヒト *CLCN1* の正常化には、AON より MBNL1 のほうが効果的だと考え、カチオン試薬による遺伝子導入法より低侵襲性で体への負担が少ない方法で MBNL1 を細胞内に入れる方法を模索することにした。また、MBNL1 は、*CLCN1* 以外の他の遺伝子のスプライシング異常も正常化することが報告されているので、*CLCN1* だけをターゲットにしている AON に比べ、筋強直以外の症状の治療にも応用できると考えられる。

そこで着目したのが、HIV 由来膜透過性ペプチド TAT を MBNL1 に融合させたタンパク質を細胞に導入する方法である。この方法の原理は諸説あるが、細胞が元々保持しているエンドサイトーシスの機序を利用してタンパク質が細胞内に取り込むため、細胞の損傷が少ないことが知られている。また、TAT 配列だけでなく、タンパク質分解による機能低下を低くするために、タンパク質分解を抑制させるペプチド GAr 配列をさらに付加した TAT-GAr-MBNL1 融合タンパク質も用いた。しかしながら、これらタンパク質を培養液に添加しても、MBNL1 によって制御されていることが知られている細胞内在性の遺伝子 *ABLIM1* と *SRECA1* のスプライシングは正常化しなかった。この結果は、細胞内に入るタンパク質量が不足していることに起因すると考え、膜透過性ペプチド試薬と共に MBNL1 融合タンパク質を培養液に加え、より多くのタンパク質が細胞内に入りやすくしたが、スプライシングは変化しなかった。以上の結果より、スプライシングは細胞の核内で起こっていることから、エンドサイトーシスで細胞質に取り込まれたタンパク質が核内まで輸送される必要があり、積極的に核輸送されるためのペプチドも付加させる必要があると考えられる。今後も、これら工夫により、様々な遺伝子のスプライシング異常を正常化させるような MBNL1 を細胞内に導入する方法を確立することができれば、治療方の発展に大きく貢献できると考えられる。

<引用文献>

① Yoshihiro Kino, Yoko Oma, Hayato Onishi,

Yuriko Nezu, Noboru Sasagawa and Shoichi Ishiura MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel *CLC-1/CLCN1*. *Nucleic Acids Res.* 37(19):6477-90, 2009

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 2 件)

- ① Takumi Nakamura*, Natsumi Ohsawa-Yoshida*, Yimeng Zhao, Michinori Koebis, Kosuke Oana, Hiroaki Mitsuhashi, and Shoichi Ishiura. Splicing of human chloride channel 1. *Biochemistry and Biophysics Reports* (Elsevier), Vol.5, pp63-69. 2016. *Equal contribution. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.11.006
- ② Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Qu W, Ichikawa K, Yurino H, Higasa K, Shibata S, Mitsue A, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Kanda J, Nakamoto FK, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kuroha Y, Hasegawa N, Kanesawa N, Kondo T, Hitomi T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Yasuda T, Sakiyama Y, Otsuka M, Ueki A, Kaida KI, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Inomata-Terada S, Hamada M, Shirota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Yamasaki R, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 50(4):581-590. 2018. DOI: 10.1038/s41588-018-0067-2. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Natsumi Ohsawa-Yoshida, Takumi Nakamura, Michinori Koebis, Shoichi Ishiura. The optimization of antisense oligonucleotide therapy for the abnormality of *CLCN1* alternative splicing in DM. BMB2015, Japan, Kobe, 2015
- ② Natsumi Ohsawa-Yoshida, Josephine GALIPON, Shoichi Ishiura, Kunihiro Ohta. Identification of interactions between repeat RNAs and RNA binding proteins by the Yeast Three Hybrid system. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2016
- ③ 土屋一郎、石井智子、吉田(大澤)奈摘、太田邦史. lncRNA-related regulation of gene expression induced by starvation in

MIN6 pancreatic β cells. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2016

- ④ 土屋一郎、荒木海人、石井智子、吉田奈摘、太田邦史. lncRNA-related regulation of gene expression induced by starvation in MIN6 pancreatic β cells. ConBio2017, Japan, Kobe, 2017

[図書] (計 2 件)

- ① 佐藤直樹、嶋田正和、杉山宗隆、寺田透、長棟輝行、福田裕穂、道上達男、矢島潤一郎、吉田奈摘、他 羊土社、演習で学ぶ生命科学第2版、2017、198
- ② 大西康夫、久保健雄、多羽田哲也、津本浩平、水島昇、村上善則、谷内江望、吉田奈摘、渡邊雄一郎、他、羊土社、理系総合のための生命科学第4版、2018、342

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 奈摘 (YOSHIDA, Natsumi)
東京大学・生命科学ネットワーク・
特任助教
研究者番号：10760069

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

該当者なし