

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19457

研究課題名（和文）次世代遺伝子編集システムを用いたFCMDに対するスプライシングスイッチ療法の確立

研究課題名（英文）Splicing switch therapy for FCMD by utilizing genome editor system

研究代表者

池田 真理子（谷口真理子）（IKEDA-TANIGUCHI, MARIKO）

藤田医科大学・大学病院・准教授

研究者番号：00410738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は本邦特有の胎児期発症の神経・筋疾患であり治療法がない。本邦のほぼ全患者がスプライシング異常を惹起するトランスポゾン配列の挿入変異がもたらすスプライシング異常症である。次世代遺伝子編集システムによる傷跡を残さないスプライシング異常に対する治療基盤の確立と、ゲノム編集効率とその効果を独自に開発した疾患モデルを用いて検討した。本研究ではCRISPRを使用せずにゲノム編集を行うことを試み、効率は低いものの、スプライシング誘導配列のサイレント変異を細胞系及び動物モデルマウスにおいて誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

福山型先天性筋ジストロフィーはスプライシング異常であり現時点では治療法がない。今後遺伝子治療や核酸治療が発展すると考えられるが、本研究では、高価な医薬品や核酸医薬、遺伝子を用いずにスプライシングを是正することが可能となる。未だに効率は低いものの本研究の成果は医療経済的にもメリットが大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) is a prenatally-onset neuromuscular disease unique to Japan for which there is no cure. Almost all patients in Japan have splicing abnormalities caused by insertional mutations in transposon sequences that induce splicing abnormalities. We established a therapeutic platform for scarless splicing aberrations using a next-generation gene editing system, and investigated the efficiency of genome editing and its effects using an originally developed disease model. In this study, we attempted to perform genome editing without CRISPR and were able to induce silent mutations of splicing-inducing sequences in cellular systems and animal mouse models, although the efficiency was low.

研究分野：小児発達医学

キーワード：スプライシングスイッチ RNA 福山型筋ジストロフィー ゲノム編集 アンチセンス核酸

1. 研究開始当初の背景

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は本邦特有の胎児期発症の神経・筋疾患であり治療法がない。本邦のほぼ全患者がスプライシング異常を惹起するトランスポゾン配列の挿入変異がもたらすスプライシング異常症である。ゲノム編集技術は遺伝子治療の概念を覆す画期的新技術として着目されるが、DNA 二本鎖切断のオフターゲット作用による転座や破壊が懸念され、*in vivo* でのゲノム編集には課題が多い。近年 CRISPR/dCAS9 での遺伝子発現調節 (CRISPR activation/inhibition, CRISPRa/i, Martella et al, *ACS Synthetic Biology* 2019) や base editor システムを用いた遺伝子を切断しない次世代ゲノム編集法が開発され注目されている (Gaudelli et al, *Nat* 2017)。本研究は次世代遺伝子編集システムによる傷跡を残さないスプライシング異常に対する治療基盤の確立と、ゲノム編集効率とその効果を独自に開発した疾患モデルを用いて検討する。

(1) FCMD 研究の学術的背景とこれまでの申請者・共同研究者の実績

1. **疾患概念**：FCMDは本邦特有の筋ジストロフィー、II型滑脳症、眼奇形を示す胎児期発症の常染色体劣性疾患。本邦において小児で2番目に多い重篤な神経難病である。
2. **原因遺伝子フクチン**：FCMDの疾患責任遺伝子はフクチン遺伝子で、**FCMD患者は全員フクチンの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**。FCMD患者の骨格筋や脳・眼には細胞膜と基底膜を繋ぐのに不可欠な**糖蛋白α-ジストログリカン(αDG)のO-マンノース型糖鎖が欠損する**。DG糖鎖の糖鎖修飾に関する遺伝子の欠損はジストログリカパチーと総称される。本糖鎖修飾の程度が重症度と相関する。
3. **疾患発症機構、アンチセンス治療法の発見とゲノム編集研究**：申請者は、FCMDがSVAの非翻訳領域への挿入変異により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ことを見出した。標的配列にアンチセンス核酸を用いて正常なスプライシングを誘導するエクソントラップ阻害法 (図1)が有効と考え、モデル動物や細胞系で**正常型のフクチンタンパク質の回復や機能的回復を示唆するDGの糖鎖修飾の回復に成功した**(Taniguchi-Ikeda et al, *Nat*, 2011)。その後製薬会社との共同研究でヒトの治療にむけた前臨床試験が進行中である。**一方核酸医薬は高額な医療費、中枢・胎児移行がないこと、クリアランスの問題、生涯連続静脈注射での投与が必要であること、アンチセンス核酸のオフターゲット作用の懸念など課題がのこる**。
4. **CRISPR/Cas9によるゲノム編集のオフターゲット研究** 筋強直性ジストロフィーのゲノム編集研究で共同研究者及び申請者はDNA二本鎖切断によるオフ

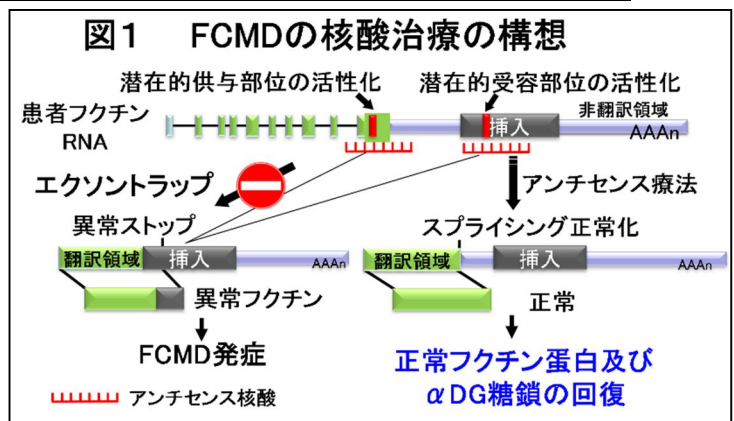
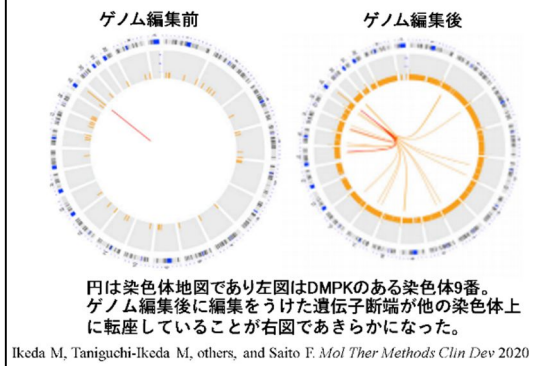


図2 筋強直性ジストロフィーの異常リピートのゲノム編集



ターゲットによる染色体切断・転座が予想以上に高いことを次世代シーケンスとバイオインフォマティクス法による解析で証明した (Ikeda M et al, *Mol Ther Meth Clin Dev* 2020 図 2)。

2. 研究の目的

本研究は、二本鎖 DNA を「切らない」次世代型ゲノム編集技術を応用したスプライシングスイッチ療法を確立する目的でその基盤研究を細胞系・マウスモデル系および大脳皮質モデル系をもちいて検討する。以下 ~ の方法を3年間で試す。研究遂行の実現性が高い理由は以下3つである。1) 申請者と共同研究者によるゲノム編集研究の実績、2) 申請者が樹立した患者由来 iPS 細胞や疾患モデル ES 細胞を用いた FCMD 疾患モデル、ヒト型挿入配列のノックインモデルマウスがあり研究環境が完備3) 評価系 (スプライシングは正評価系・タンパク質検出系、DG の糖鎖評価系、疾患モデルマウス、次世代シーケンスデータ解析系) がある。dCas9 によるフクチン発現調節系の設計・検討 (,) は経験豊富な帝京大学齊藤准教授が、base editor システム (,) ・モデルでの検討、RNA 解析 (,) は藤田医大池田が中心に行う。

3. 研究の方法

共同研究として産業総合研究所の間世田英明先生を迎え、CRISPR を用いないゲノム編集方法を試みた (未発表)。標的としてはスプライシング供与部位のサイレント変異を誘導することを試みた。

4. 研究成果

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は本邦特有の胎児期発症の神経・筋疾患であり治療法がない。本邦のほぼ全患者がスプライシング異常を惹起するトランスポゾン配列の挿入変異がもたらすスプライシング異常症である。次世代遺伝子編集システムによる傷跡を残さないスプライシング異常に対する治療基盤の確立と、ゲノム編集効率とその効果を独自に開発した疾患モデルを用いて検討した。本研究では CRISPR を使用せずにゲノム編集を行うことを試み、効率は低いものの、スプライシング誘導配列のサイレント変異を細胞系及び動物モデルマウスにおいて誘導することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Taniguchi-Ikeda Mariko, Koyanagi-Aoi Michiyo, Maruyama Tatsuo, Takaori Toru, Hosoya Akiko, Tezuka Hiroyuki, Nagase Shotaro, Ishihara Takuma, Kadoshima Taisuke, Muguruma Keiko, Ishigaki Keiko, Sakurai Hidetoshi, Mizoguchi Akira, Novitch Bennett G., Toda Tatsushi, Watanabe Momoko, Aoi Takashi | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model of Fukuyama muscular dystrophy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 103140 ~ 103140 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103140 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Bonora E, Chakrabarty S, Kellaris G, Tsutsumi M, Bianco F, (他58名)Katsanis N,Duijkers F.A.M, Taniguchi-Ikeda M(Corresponding author), and Giorgio DR. | 4. 巻 144 |
| 2. 論文標題 Biallelic variants in <i>LIG3</i> cause a novel mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1466 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awab056 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 福山型筋ジストロフィーの中樞神経系の疾患モデル構築と低分子化合物を用いたレスキュー |
| 3. 学会等名 CNS障害研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 筋疾患と生殖医療の課題-単一遺伝性疾患に対する着床前診断～PGT-Mの倫理審議会 |
| 3. 学会等名 筋ジストロフィー研究班合同班会議（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 福山型筋ジストロフィーの根治療法の発見とiPS細胞を用いた疾患モデル化 |
| 3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model of Fukuyama muscular dystrophy |
| 3. 学会等名 ISSCR2021 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 Mutations in DNA ligase III cause mitochondrial neuro gastrointestinal encephalomyopathy, |
| 3. 学会等名 ASHG 2021 American Society of Human Genetics |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 Mutations in LIG3 cause mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by mtDNA depletion |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 Biallelic variants in LIG3 cause a novel mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy |
| 3. 学会等名 WMS 2021 World Muscle Society |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田真理子 |
| 2. 発表標題 Mutations in LIG3 cause mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by mtDNA depletion |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 斉藤 史明 (SAITO YOSHIAKI) (40286993) | 帝京大学・医学部・教授 (32643) | |

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究協力者 | 間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI) (10372343) | 産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員 (82626) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|