

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461545

研究課題名(和文)筋ジストロフィー分子治療の有効性に関する炎症性物質の動態に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of inflammatory factors affecting the efficacy of the molecular therapies for muscular dystrophy

研究代表者

竹島 泰弘 (Yasuhiro, Takeshima)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)によってエクソンスキッピングを誘導する治療法の有効性を高めるために、症例ごとの有効性を検討するとともに、本治療における炎症性物質等の関与を検討した。エクソン45のスキッピングを誘導するAS-oligoの筋培養細胞における有効性を解析し、エクソンスキッピング効率は症例により異なることを明らかにした。そして、DMD症例に対しAS-oligoの投与を行い、一部の炎症性物質に変動がみられることを見出した。治療効果が乏しい症例に対して、炎症に関する因子を制御することが新たな治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To enhance the efficacy of antisense oligonucleotide (AS-oligo)-mediated exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD), the difference of the efficacy of the same AS-oligo among DMD cases and the involvement of inflammatory factors to exon skipping therapy were examined. At the beginning the efficacy of the AS-oligo inducing the skipping of exon 45 (A085) was examined using cultured muscle cells of several DMD patients. In each case, exon 45 skipping was induced by A085, as expected; however, the skipping efficacy was different from patient to patient. Furthermore, administration of A085 to DMD cases resulted in the change of some serum inflammatory factors. These results suggested that exon skipping efficacy is modulated by some cis-element, and some inflammation factors may affect the efficacy of AS-oligo therapy.

研究分野：小児科学

キーワード：筋ジストロフィー 分子治療 炎症性物質 エクソンスキッピング アンチセンスオリゴヌクレオチド

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(以下 DMD)はジストロフィン蛋白の欠損により発症し、その病態の主体は筋組織の壊死・再生であるが、私たちは、筋組織で産生されるプロスタグランジン D を中心とする炎症が本疾患の進行に大きく関わっていることを明らかにした (Nakagawa T. et al. 2013. Clin Chim Acta. 423: 10-4)。そして、このことからプロスタグランジン D 産生を制御することによる DMD に対する新たな治療法の検討を進めている。一方、私たちは、DMD に対する根治治療としてアンチセンスオリゴヌクレオチド(以下 AS-oligo)によってエクソンスキッピングを誘導し遺伝情報を修正する治療法の有効性を、世界で初めて明らかにした (Takeshima Y. et al. 2006. Pediatr Res. 59: 690-4)。そして、このエクソンスキッピング誘導治療は、今日では DMD 治療の世界標準となりつつある。

私たちは、DMD に対する分子治療であるエクソンスキッピング誘導治療によってジストロフィンの発現が誘導される際のプロスタグランジン D を中心とする炎症に関わる因子の動態を明らかにすることにより、DMD の治癒過程における炎症の制御機構を明らかにすることができ、さらに、これらの因子を修飾することによって、以前より検討を進めている分子治療の有効性をより高める新たな治療戦略を見いだせる可能性を着想した。

現在、世界各地で AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の臨床研究・治験が行われ、その有効性が報告されているが、その有効性は個々の症例により異なっている可能性がある。そのた

め、非レスポnder に対し本治療法の効果を高める治療戦略が必要となる。本研究では、個々の症例におけるエクソンスキッピング誘導治療の効果の差を筋培養細胞を用いて検討する。さらに、DMD 症例に対して AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療を行った際の炎症に関与する因子の動態を明らかにする。

2. 研究の目的

DMD に対する AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の有効性を高める治療戦略を見出すために、個々の症例に筋培養細胞における AS-oligo の有効性の違いを検討する。さらに、DMD 症例に対して AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療を行った際の炎症に関与する因子の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

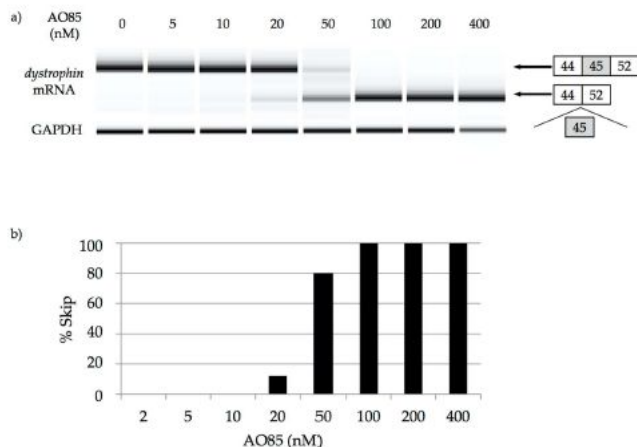
(1)DMD 筋培養細胞における AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の有効性の個々の症例による違いの検討 : DMD 筋培養細胞に対し、エクソン 45 のスキッピングを誘導する AS-oligo (AO85) を添加し、ジストロフィン mRNA を RT-PCR 法によって解析し、エクソン 45 のスキッピング効率を検討した。また、ジストロフィン蛋白発現は免疫組織染色によって解析した。これらの解析結果より、症例ごとの違いに関して検討を行った。

(2)DMD 症例に対する AS-oligo 投与における、有効性の検証および炎症に関与す因子の動態 : DMD 症例に対し AO85 の長期投与を行い、その有効性を検討した。また、治療期間中経時的に血

清の炎症に關与する因子の測定を行った。

4. 研究成果

(1)DMD 筋培養細胞における AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の有効性の個々の症例による違いの検討：筋培養細胞に AO85 (0~400nM) を添加したところ、濃度依存性にジストロフィン遺伝子エクソン 45 のスキッピングが誘導され、100nM では、100%の mRNA においてエクソンスキッピングが誘導された(下図：文献 1 より)。



さらに、13 症例由来の筋培養細胞に対し、100nM の AO85 を投与し、エクソンスキッピング効率とジストロフィン蛋白発現の検討を行った。その結果、下図(文献 1 より)に示すように、症例によりエクソンスキッピング効率に差がみられ(30~100%)、さらにジストロフィン蛋白発現も症例により異なることが明らかとなった。

No.	Age	Deleted Exon	Exon-45-Skipped mRNA (%)	Dystrophin Immunostaining
1	5		65	Positive
2	5	44	70	Positive
3	5		43	Positive
4	5	46-47	30	Positive
5	10		40	Positive
6	6	46-48	40	Positive
7	8		65	Positive
8	5	46-49	51	Positive
9	5		100	Positive
10	5	46-51	100	Positive
11	6		82	Negative
12	6		65	Positive
13	3	46-53	45	Negative

これらの結果から、AS-oligo によるエクソンスキッピング効率は症例により異なることが明らかとなった。その機構に一つに、症例ごとの欠失領域の断端が異なっており、そのため intronic splicing enhancer / silencer が症例ごとに異なっている可能性が考えられる。AS-oligo の効果が乏しい症例に対して、炎症に關与する因子を制御することなどによる新たな治療戦略により、その有効性を高める必要がある。

(2)DMD 症例に対する AS-oligo 投与における、有効性の検証および炎症に關与す因子の動態：DMD 症例に AO85 投与を行い、長期投与の有効性を明らかにした。さらに、炎症に關与する因子の、治療中の推移を検討し、Interleukin-16、MCP-1 などの因子が大きく変動していることが見出された。

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 9 件)

- (1) Lee T, Awano H, Yagi M, Matsumoto M, Watanabe N, Goda R, Koizumi M, Takehima Y, Matsuo M. 2'-O-Methyl RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acid Chimera Antisense Oligonucleotides to Induce Dystrophin Exon 45 Skipping. *Genes* (Basel). 査読有 8: E67, 2017. doi: 10.3390/genes8020067.
- (2) Niba ETE, Nishida A, Tran VK, Vu DC, Matsumoto M, Awano H, Lee T, Takehima Y, Nishio H, Matsuo M. Cryptic splice activation but not exon skipping is observed in

- minigene assays of dystrophin c.9361+1G>A mutation identified by NGS. *J Hum Genet.* 査読有 62: 531-537, 2017.
- (3) Nishida A, Yasuno S, Takeuchi A, Awano H, Lee T, Niba ET, Fujimoto T, Itoh K, Takeshima Y, Nishio H, Matsuo M. HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab. *Histochem Cell Biol.* 査読有 146: 301-9, 2016.
- (4) Nishida A, Oda A, Takeuchi A, Lee T, Awano H, Hashimoto N, Takeshima Y, Matsuo M. Staurosporine allows dystrophin expression by skipping of nonsense-encoding exon. *Brain Dev.* 査読有 38: 738-45, 2016.
- (5) Taniguchi-Ikeda M, Takeshima Y, Lee T, Nishiyama M, Awano H, Yagi M, Unzaki A, Nozu K, Nishio H, Matsuo M, Kurahashi H, Toda T, Morioka I, Iijima K. Next-generation sequencing discloses a nonsense mutation in the dystrophin gene from long preserved dried umbilical cord and low-level somatic mosaicism in the proband mother. *J Hum Genet.* 査読有 61: 351-5, 2016.
- (6) Matsuo M, Takeshima Y, Nishio H. Contributions of Japanese patients to development of antisense therapy for DMD. *Brain Dev.* 査読有 38: 4-9, 2016.
- (7) Yamamoto T, Tanaka H, Takeshima Y, Hayashi N, Hirata K, Kawano S. Combining passive leg-lifting with transmural myocardial strain profile for enhanced predictive capability for subclinical left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J Cardiol.* 査読有 66: 212-7, 2015.
- (8) Nishida A, Minegishi M, Takeuchi A, Niba ET, Awano H, Lee T, Iijima K, Takeshima Y, Matsuo M. Tissue- and case-specific retention of intron 40 in mature dystrophin mRNA. *J Hum Genet.* 査読有 60: 327-33, 2015.
- (9) Dwianingsih EK, Malueka RG, Nishida A, Itoh K, Lee T, Yagi M, Iijima K, Takeshima Y, 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 59: 423-9, 2014.
- [学会発表](計6件)
- (1) Niba ETE, Nishida A, Tran VK, Vu DC, Matsumoto M, Awano H, Lee T, Takeshima Y, Nishio H, Matsuo M. Cryptic splice site activation by a splice donor site mutation of dystrophin intron 64 is determined by intronic splicing regulatory elements. 21st INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD MUSCLE SOCIETY. Granada, Spain. 2016. 10. 4-8.
- (2) Matsumoto M, Awano H, Lee T, Shimomura H, Takeshima Y, Matsuo M, Iijima K. Height is significantly shorter in Duchenne muscular dystrophy than Becker muscular dystrophy and the incidence of short stature is highest in Dp71 mutated subgroup. 21st INTERNATIONAL CONGRESS OF

- THE WORLD MUSCLE SOCIETY.
Granada, Spain. 2016. 10. 4-8.
- (3) Takeshima Y, Lee T, Shimomura H,
Tanaka Y, Awano H, Nishida A,
Ojima I, Minami S, Nakagawa A,
Iijima K, Matsuo M. RNA/ENA
chimera antisense oligonucleotide
(AO85) was safely administered and
shown to induce dystrophin exon 45
skipping in Duchenne muscular
dystrophy patient: the first clinical
study. The 13th International
Congress of Human Genetics. Kyoto,
Japan. 2016. 4. 3-7.
- (4) Unzaki A, Taniguchi-Ikeda M,
Takeshima Y, Lee T, Awano H, Yagi
M, Kurahashi H, Morioka I, Toda T,
Matsuo M, Iijima K. Advantage of
next generation sequencing in
molecular diagnosis in DMD
-mutation screening with long
preserved dried umbilical cord and
detection of mosaicism- The 13th
International Congress of Human
Genetics. Kyoto, Japan. 2016. 4. 3-7.
- (5) Takeshima Y, Lee T, Shimomura H,
Tanaka Y, Awano H, Nishida A,
Ojima I, Minami S, Nakagawa A,
Iijima K, Matsuo M. A new antisense
oligonucleotide composed of
RNA/ENA chimera (AO85) against
dystrophin exon 45 significantly
increased six-minute walk distance
in Duchenne muscular dystrophy. 5th
International Congress of Myology.
Lyon, France. 2016. 3. 14-18.
- (6) Lee T, Awano H, Yagi M, Iijima K,
Matsuo M, Takeshima Y. Cardiac
investigation using chronological
change of left ventricular fractional
shortening (%FS) in 143 DMD

patients. The 13th Asian and
Oceanian Congress of Child
Neurology. Taipei, Taiwan. 2015. 5.
14-17.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹島 泰弘 (TAKESHIMA, Yasuhiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：40281141

(2)研究分担者

下村 英毅 (SHIMOMURA, Hideki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30441273

李 知子 (LEE, Tomoko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：10596042