

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06883

研究課題名(和文) クラスAスカベンジャー受容体を介した、アンチセンス核酸の筋細胞内取り込み制御

研究課題名(英文) Scavenger receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotides into muscle cells

研究代表者

青木 吉嗣 (AOKI, YOSHITSUGU)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：80534172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異により生じる、難治性遺伝性筋疾患である。現在DMDを対象に、アンチセンス・モルフォリノ核酸医薬を用いたエクソン・スキップ治療の開発が有望視されている。申請者らは、電気的中性のモルフォリノ核酸は、陽性電荷を有するペプチド付加モルフォリノ核酸と同様に、スカベンジャー受容体クラスA1(SR-A1)を介して筋管細胞に取り込まれること、モルフォリノ核酸の細胞内取り込みは細胞膜流動性低下と関連する可能性を見出した。加えて、計画通りSR-A1/ジストロフィン・ダブル欠損マウスを作成し、詳細な筋病理、各種分子生物学解析などを実施した。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an incurable, X-linked progressive muscle degenerative disorder that results from the absence of dystrophin protein. Here, we study the uptake mechanism of phosphorodiamidate morpholino (PMO), which has been optimized to induce exon skipping in models of DMD. We show that the uptake of PMO is mediated by class A scavenger receptor subtypes (SCARAs) as demonstrated by competitive inhibition *in vitro*. Also, we newly developed SCARA1 and dystrophin double knockout mice to further confirm the uptake mechanism of PMO *in vivo*. These results suggest receptor-mediated uptake for PMO.

研究分野：分子生物学、筋病学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー アンチセンス核酸 モルフォリノ スカベンジャー受容体

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の変異により、骨格筋膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損して生じる、難治性の遺伝性疾患である。現在、これまで治療法がほとんど無かった同疾患を対象に、アンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療の開発が有望視されている。本治療法は、アンチセンス核酸と呼ばれる単鎖で約 25 塩基程度の DNA に似た核酸を用いて、ジストロフィン mRNA のスプライシングを調整し、DMD の筋膜にジストロフィンを発現回復させる手法である。

アンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療の最大の課題は、効率的に核酸を筋細胞 (核内) に送達するシステムがなく、骨格筋と心筋に対する治療効果が不十分な事である。アンチセンス核酸の筋膜からの取り込みについては、ジストロフィンを欠いた骨格筋膜が漏れやすい可能性が議論されているが、筋膜からアンチセンス核酸が取り込まれる機序は、詳細に検討されていない。申請者は DMD の治験に使用されているモルフォリノ核酸 (PMO) は、再生初期の筋線維に非常に高率に取り込まれることを明らかにした (Hum Mol Genet. 2013)。さらに、治療応用が可能なペプチド付加モルフォリノ、トリシクロ DNA 等のアンチセンス核酸は、血清中でミセル様のナノ粒子を形成すること、同ナノ粒子は主としてクラス A スカベンジャー受容体 (SR-A) を介したエンドサイトーシスにより筋細胞内に取り込まれる事を解明している (Nano Letters, 2015)。

2. 研究の目的

筋収縮と SR-A1 受容体に焦点を当て、当センターで開発が進む PMO からなるエクソン・スキップ薬が、筋細胞に取り込まれる分子機序を細胞およびマウス個体を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

H2K-mdx52 筋管を対象に、ミオシン II の特異的阻害剤である N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて 48 時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施する。

SR-A1/ジストロフィン・ダブル欠損 (DKO) マウスを新規作出する。DKO マウスにおける SR-A1 の役割を、分子生物学的および病理学的手法により詳細に解析する。

4. 研究成果

分担研究者の研究成果を発展させる形で (Hum Mol Genet. 2013, Nano Letters, 2015)、H2K-mdx52 筋管の自発性筋収縮が PMO の細胞内取り込みに及ぼす影響について、検討を行った。H2K-mdx52 筋管では、SR-A1 受容体の発現レベルが亢進すること、SR-A1 受容体は非修飾型 PMO の筋管への取り込みにも極めて重要な働きをすることが判明した。

BTS を用いて筋の自発収縮を阻害すると、阻害剤を添加しなかった時と比べて、PMO をトランスフェクション後のエクソン・スキップ誘導高率は有意に低下した。本結果は、筋管の収縮が PMO の細胞内取り込みに関与している可能性を示唆していると考えられた。そこで、H2K-mdx52 筋管を対象に、BTS 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて 48 時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、筋細胞膜分画を用いたクマシーブリリアントブルー・ゲル染色と、比較定量タンパク質同定解析 (プロテオミクス) を実施した。この結果、カベオラ関連タンパク質の 1 つが、筋収縮と関連する PMO のエンドサイトーシスに関与している可能性が判明した。

SR-A1 ノックアウトマウスと mdx52 マウスの交配により、SR-A1 とジストロフィンの両方を欠いたダブル欠損 (DKO) マウスを作出した。DKO マウスを対象にした解析では、骨格筋病理で筋ジストロフィー病態を呈し、筋線維の成熟不全 (筋径が小さい) が生じる可能性が示唆された。

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 6 件)

1: Maruyama R, Echigoya Y, Caluseriu O, Aoki Y, Takeda S, Yokota T. Systemic Delivery of Morpholinos to Skip Multiple Exons in a Dog Model of Duchenne

Muscular Dystrophy. Methods Mol Biol. 2017;1565:201-213.

2: Suzuki H, Aoki Y, Kameyama T, Saito T, Masuda S, Tanihata J, Nagata T, Mayeda A, Takeda S, Tsukahara T. Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-Splicing at the DMD Mutation Hotspot. Int J Mol Sci. 2016 Oct 13;17(10).

3: Miyatake S, Shimizu-Motohashi Y, Takeda S, Aoki Y. Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. Drug Des Devel Ther. 2016;10:2745-58.

4: Shimizu-Motohashi Y, Miyatake S, Komaki H, Takeda S, Aoki Y. Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: from discovery to clinical trials. Am J Transl Res. 2016;8(6):2471-89.

5: Miskew Nichols B, Aoki Y, Kuraoka M, Lee JJ, Takeda S, Yokota T. Multi-exon Skipping Using Cocktail Antisense Oligonucleotides in the Canine X-linked Muscular Dystrophy. J Vis Exp. 2016;(111).

6: Nakamura A, Fueki N, Shiba N, Motoki H, Miyazaki D, Nishizawa H, Echigoya Y, Yokota T, Aoki Y, Takeda S. Deletion of exons 3-9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. J Hum Genet. 2016;61(7):663-7.

[学会発表] (計5件)

1. 青木吉嗣: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する RNA 治療薬開発の現状と課題. 第2回日本筋学会学術集会, 東京, 8.6, 2016
2. 青木吉嗣, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するアンチセンス核酸医薬品開発の試み. 第2回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会, 東京, 8.26, 2016
3. 青木吉嗣, 武田伸一: エクソンスキッピング

グ・核酸医薬の研究開発の状況と今後の展望. 第15期バイオフィナンスギルド第3回セミナー「核酸医薬の離陸は本当か?」, 東京, 10.26, 2016

4. 青木吉嗣: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療法開発の現状と課題. 国立国際医療研究センター先進医療開発部門セミナー (医学研究セミナー/NCGM 病院-研究所連絡会), 東京, 10.25, 2016

5. 青木吉嗣: 特別企画 AMED 後援 核酸医薬の創出に向けた産官学連携シンポジウム - 核酸化学の希少・難治性疾患への応用-. パネルディスカッション, 日本核酸医薬学会 第2回年会, 東京, 11.17, 2016

[図書] (計3件)

青木吉嗣, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーとエクソン・スキップ治療. EBM に基づく脳神経疾患の基本治療指針 第4版. 編集 田村晃, 松谷雅生, 清水輝夫, 辻貞俊, 塩川芳昭, 成田善孝, 株式会社メディカルビュー社, 東京, pp688-694, 2016

2. 宮武正太, 青木吉嗣, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソンスキップ治療 - 有効性と安全性を併せもつモルフォリノ核酸の開発に向けて. 実験医学, 羊土社, 東京, 34: 19, 3151-3158, 2016

3. 青木吉嗣, 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン51および53スキップ薬開発の現状. 週刊医学のあゆみ, 259: 5-10, 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 青木吉嗣

(Yoshitsugu AOKI)

神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・

室長

研究者番号：80534172