

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09621

研究課題名(和文) 福山型筋ジストロフィーの臨床評価法の確立と核酸治療の適応拡大を目指した包括的研究

研究課題名(英文) Research on Fukuyama muscular dystrophy towards clinical trial using antisense oligonucleotids

研究代表者

池田 真理子(谷口) (Taniguchi-Ikeda, Mariko)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：00410738

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)：福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は、乳幼児発症の重度の筋ジストロフィーに滑脳症等の先天性の脳奇形・重度知的障害を伴う、本邦特有の常染色体劣性の遺伝性難病である。申請者はFCMDが、原因遺伝子フクチンに挿入されたトランスポゾン配列により引き起こされるスプライシング異常症であることを見出し、核酸医薬による骨格筋に対する初の根治療法の可能性を報告した。現在前臨床試験が進行中である。一方福山型筋ジストロフィーは中枢性疾患であり中枢神経症状の治療が必須である。本研究で申請者は臨床研究として患者の運動機能評価やバイオマーカー検索をおこない、基礎研究として中枢神経系への核酸送達について研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD) is a second common, severe childhood muscular dystrophy in Japan. All patients have ancestral insertion of a SINE-VNTR-Alu retrotransposon element (SVA) into a causative gene fukutin. We show that aberrant mRNA splicing, induced by SVA exon-trapping caused FCMD (Taniguchi-Ikeda M et al, Nature 2011). Introduction of three cocktail antisense oligonucleotides (AONs) targeting around these splice sites prevented pathogenic splicing in FCMD patient cells and model mice, and normalized protein production and functions of Fukutin as well as O-glycosylation of α -dystroglycan. Here we show the results of an optimization of the best, single AON for clinical trial. We tested if these AONs are effective in Central Nervous System (CNS). We could successfully deliver AONs to CNS in model mice.

研究分野：神経・筋疾患

キーワード：スプライシング異常 筋ジストロフィー RNA創薬

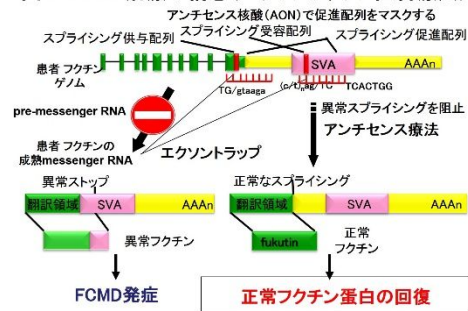
1. 研究開始当初の背景

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、福山により報告・確立された先天性筋ジストロフィーの一型であり、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である (Fukuyama, et. al., Brain Dev 1981)。日本で 2 番目に多い小児の筋疾患で 10 代のうちに死に至る重篤な疾患である。原因遺伝子 fukutin: 1998 年に FCMD の疾患責任遺伝子である fukutin 遺伝子 (fukutin, 9q31) が同定された。殆どの FCMD 患者は、fukutin の 3' 非翻訳領域に約 3kb のレトロトランスポゾン (SVA) 挿入型変異を認める (Kobayashi, et al, Nature 1998)。この変異は約 100 世代前の祖先の 1 人に生じ、日本人の 90 人に 1 人が保因者であり患者は 2000 名弱いるとされる。FCMD 患者の骨格筋では細胞膜と基底膜を繋ぐ糖蛋白 α -dystroglycan (α DG) のあり、この糖鎖を介する細胞膜 - 基底膜間の結合が破綻する O-マンノース型糖鎖修飾に欠損がに重度の筋ジストロフィーが発症する (Michele DE, et al, Nature 2002)。類縁疾患の muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群等においても、 α DG の O-マンノース型糖転移酵素の遺伝子異常が次々と同定され、 α ジストログリカノパチー (α DGopathy) と総称される新しい疾患概念が確立された。

申請者は、FCMD が SVA 挿入変異により最終エクソン内部が生じ、新生が産生される新たなスプライシングクソン由来の異常蛋白イシグ異常症であることを見出した (Taniguchi-Ikeda et al, Nature, 2011)。この標的配列にアンチセンス核酸 (AON) を pre-mRNA レベルで結合させ異常スプライシングを阻止し正

常なスプライシングを誘導する治療法 (エクソントラップ阻害法、図 1) が有効と考え、異常スプライシング標的配列に対する AON を設計し、モデルマウスより樹立した ES 細胞系、患者由来筋管細胞へ投与、マウス骨格筋への局所投与及び経尾静脈での全身投与のすべてにおいて正常型 fukutin mRNA の回復、正常 fukutin 蛋白の回復、そして機能的回復を示唆する DG の糖鎖修飾の回復、患者筋管ではラミニン結合能の回復に成功した (Taniguchi-Ikeda et al, Nature 2011、図 1)。しかしながら報告の内容では、毒性が危惧される膜透過型モルフォリノ核酸を使用していたことや、3 種類の配列の AON によるカクテル療法であり通常より多くの臨床試験が必要となる等の題点が存在した。その後、エクソントラップ阻害剤の臨床応用に向け製薬企業と共同研究をおこない至適薬剤の選択を行った。

図1 FCMD治療の構想(エクソントラップ阻害療法)



スプライシング受容部位・供与部位及び促進配列に網羅的に AON を設計した結果、スプライシング調節部位に設計した 1 剤の AON で十分なエクソントラップ阻害効果を認めることが判明、これらをモデルマウス及び患者由来細胞系に投与したところ、正常フクチン蛋白の回復及び DG の糖鎖修飾の改善が確認され、現在臨床応用に向けて大型動物を用いて薬剤の安全性や投与量、薬物動態の検討が進んでいる

2. 研究の目的

この研究では 臨床試験を成功させるための臨床検査評価法の確立を目指す臨床研究 骨格筋以外の罹患組織である脳・心筋、胎生期の形成異常に対する胎児治療を含めた治療法の適応拡大をめざした、核酸のドラッグデリバリーシステム、応用的治療法を用いた括的治療法の確立を目指す基礎的研究を3年間で行う。

3. 研究の方法

前方・後方式に FCMD 患者の自然歴調査を行う。運動機能評価・画像評価を行う。メタボロミクス・バイオマー検索を行う。基礎研究では中枢への核酸デリバリー方法の確立をおこなう。

運動機能評価（後ろ向き 過去 10 年の FCMD 患者（20 名）について後方視的に臨床データを収集する。日常生活活動（歩行・寝返り・上肢残存機能など）の運動機能を遠城寺式・乳幼児分析的発達検査法や 8 段階の運動能力スコア（Osawa et al, Brain Dev 1981）を用い運動機能を 値化し、

継時的なマイルストーンを作成する。心機能、てんかん・側彎症等合併症の有無や CK・ALD などの血清中の筋由来逸脱酵素のデータ収集も行う。

運動機能評価（前向き）：研究開始時点から 2 年間における FCMD 患者全 20 名の、日常生活活動における運動機能評価を定期的に行いデータの収集を進める。画像解析や筋量測定と合わせ、最終年度でバイオマー探索研究と複合し総合的に

評価する。運動機能評価には、歩行不能な

神経・筋疾患患者での機能評価に適するいわゆる Gross Motor Functional Measurement 使用。運動機能検査に習熟したリハビリ医師による客観的評価を行う。と同様の評価も平行して行う。

画像評価による筋・脂肪量の評価系の構築は MRS 法や超音波エラストグラフィ法による評価（上肢・下肢）を用い、FCMD における運動機能の重症度の相関性を評価する。病状の進行

や治療の評価として測定に適した部位を検討し、運動機能評価と合わせて評価系を構築する。また合併症に関する心筋の評価も定期的に行う。

病状を反映するバイオマーカの探索：FCMD では血清中 CK や ALD の上昇は認めるが病状との相関はない。近年、癌などのバイオマーカとして注目される血清エソソーム内 microRNA について、筋疾患特異的に上昇する myomiR の存在が注目されている（Vignier et al, PLoS One. 2013）。FCMD では miR206, 133a が患者特異的に上昇している（未発表データ）。

4. 研究成果

20名のFCMD患者より、運動機能評価、画像評価・臨床症状の自然歴の調査をおこなった。運動機能評価ではリハ医師による詳細な評価（ハマスミス法、Gross motor function measurement）を行い、スコア化し、患者年齢及び筋エラストグラフィや筋量計値との相関を定量化した。また、血清由来バイオマーカ（血液由来のマイクロRNA）との相関を検討

した。それぞれにおいて、特異的バイオマーカーを検出した(投稿準備中)。福山型では特異度、感度ともに高く、今後この結果が臨床症状と相関するバイオマーカーになり得る可能性がある。

またバイオマーカー検索については、血液より、バイオマーカー検索のためのメタボロミクスを行った。筋量を反映する代謝物でFCMDがDMDに対し有意に低下する化合物を抽出し、運動機能評価との相関を検討した(投稿準備中)。この結果も勘弁に定量化できる指標があれば、病状の相関や症状の重症度との相関を示すバイオマーカーとなり得ると考えている。

また、血清由来マイクロRNAでは206が非常に感度・特異度の高いバイオマーカーになりうるということがわかった(投稿準備中)。これらは、今後より定量性の高い方法で、臨床現場で定量化できるようさらに評価方法を検討する予定にしている。

残念ながら、マウスモデルをもちいたマイクロRNA研究では新しいマイクロRNAの検出はできなかったため、新規のマイクロRNAにおけるバイオマーカーは現時点ではみつかっていない。今後人細胞系や筋分化させた細胞由来の組織系でのマイクロRNAの解析も行ってゆきたいと考えている。

一方基礎研究では、中枢神経系へのアンチセンス核酸の効果検討・デリバリーの検討を行った。また胎児に対する核酸の通達方法などの条件検討を行った。(投稿準備中)今後、

核酸のみならず、低分子や酵素等の検討も行ってゆきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

研究代表者 池田真理子

〔雑誌論文〕(計8件)

1. **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding Author)**, Morisada N, (3名略) Tachikawa M, Satake W, Kobayashi K(11名略分担者8番目) Iijima K. Two patients with PNKP mutations presenting with microcephaly, seizure, and oculomotor apraxia *Clinical Genetics*, 2017 in press
2. **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding Author)**, Yamamoto T, Awano H, Lee T, (6名略), Kazumoto I, Saegusa J, Toda T. Cardiac involvement in Fukuyama muscular dystrophy is less severe than in Duchenne muscular dystrophy. *Brain Dev.*, 2017 in press
3. **Kobayashi K**, Kato R, Kondo-Iida E, **Taniguchi-Ikeda M**, Osawa M, Saito K, Toda T. Deep-intronic variant of fukutin is the most prevalent point mutation of Fukuyama congenital muscular dystrophy in Japan. *J Hum Genet* 2017 doi:10.1038/jhg.2017.71.
4. **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding Author)**, Nagasaka M, (9名略) Morioka I, Toda T, Kurahashi H, Iijima K. Novel missense mutation in DLL4 in a Japanese sporadic case of Adams-Oliver syndrome. *J Hum Genet* doi: 10.1038/jhg.2017.48.
5. Sato T, Adachi M, Nakamura K, Zushi M, (8名略), Nagata S, **Ishigaki K (Corresponding author)**. The gross motor function measure is valid for Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 27:45-49. 2016

6. **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding Author)**, Morioka I, Iijima K, Toda T. Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review. *Mol Aspects Med* 2016 51:115-24. Review.
7. **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding Author)**, Takeshima Y, Lee T, (6名略) 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* 61(4):351-5, 2016
8. Nakagawa T, **Taniguchi-Ikeda M (Corresponding author)**, (12名略) Kurahashi H, Toda T, Kinoshita T and Iijima K, PIGN Mutation and Prenatal Diagnosis of Inherited Glycosyl-phosphatidy inositol Deficiency. *Am J Med Genet A* 170A (1):183-8, 2016

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 希少遺伝性難病の出生前診断の現状 **池田真理子** 口頭 周産期学シンポジウム 2017 2.11 大阪
2. 遺伝性難病に対する出生前診断 **池田真理子** 口頭 第41回日本遺伝カウンセリング学会 シンポジウム 2017 6.23 大阪
3. 核酸医薬を用いた福山型筋ジストロフィーの治療 **池田真理子** 戸田達史 小児医療におけるDDS シンポジウム 口頭 日本DDS学会 第33回大会 2017 7.6 京都
4. 福山型筋ジストロフィーの核酸を用いた治療 **池田真理子** シンポジウム 第23回日本遺伝子細胞治

療学会 2017.7.21 岡山

5. 「アンチセンス核酸を用いた福山型筋ジストロフィーの治療法の開発」 **池田真理子** Thermo Next Forum 2017 7 19 東京
6. 「小児難病の治療法開発とその実現にむけて～福山型筋ジストロフィー」**池田真理子**平成 29 年度神戸大学 2017 年 10 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称： 福山型筋ジストロフィー治療用医薬組成物

発明者：戸田達史 池田真理子 小林千浩

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：2012-86891

取得年月日：平成 28 年 6 月 3 日

国内外の別： 国内

名称：福山型筋ジストロフィー治療用アンチセンス核酸

発明者：日本新薬 神戸大学

権利者：日本新薬 神戸大学

種類：特許

番号：2013-209576

取得年月日：

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 真理子 (IKEDA Mariko)

神戸大学大学院医学研究科

特命准教授

研究者番号：00410738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

石垣 景子 (KEIKO Ishigaki)

東京女子医科大学

医学部 医学科 講師

研究者番号：10366304

(4)研究協力者

原田 理沙 (HARADA Risa)

神戸大学大学院医学研究科

医員

研究者番号：30736864

吉田 優 (YOSHIDA Masaru)

神戸大学大学院医学研究科

准教授

研究者番号：10583750

高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)

富山大学 医学研究科 教授

研究者番号：80420397

根岸 洋一 (NEGISHI, Youichi)

東京薬科大学 准教授

研究者番号：50286978