

平成30年6月14日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19641

研究課題名(和文)ナンセンス変異依存性mRNA分解制御による筋ジストロフィー分子治療効率化の検証

研究課題名(英文)Improvement of the nonsense read-through therapy for muscular dystrophy by controlling nonsense mediated mRNA decay

研究代表者

李 知子(LEE, TOMOKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10596042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナンセンス変異を有するDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)患者において、ナンセンス変異依存mRNA分解(nonsense-mediated mRNA decay:NMD)機構を制御し得ることを明らかにし、リードスルー誘導治療の有効性を高めることを目的とした。まず、ジストロフィン遺伝子微小変異を非侵襲的に同定するシステムを構築し、多数例の解析を行いナンセンス変異症例を同定した。さらに蛍光シーケンサーを用いて筋組織mRNAを半定量するシステムを構築した。現在これらのシステムを用いてナンセンス変異を同定したDMDにおけるNMD制御の検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to control nonsense-mediated mRNA decay(NMD) mechanism and improve the efficacy of read-through therapy for Duchenne muscular dystrophy(DMD). First, the system of identifying small mutations in DMD gene was constructed. Using this system, many DMD cases with nonsense mutation have been identified. Furthermore, the analysis system using fluorescent sequencer was developed for semi-quantitative analysis of mRNA from muscle. Based on these established systems, analysis to reveal and control NMD mechanism has been performed.

研究分野：遺伝性筋疾患

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー ナンセンス変異依存性mRNA分解 リードスルー治療

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 (Duchenne muscular dystrophy: DMD) は、ジストロフィン遺伝子異常により発症し、進行性の筋力低下のため 12 歳までに歩行不能となり、心不全あるいは呼吸不全を合併し、20~30 歳代で死に至る。これまで根治的な治療法はなく、根治的治療法の確立が切望されてきた。リードスルー誘導治療は、DMD のうち約 20% を占めるナンセンス変異に対する治療法であり、mRNA 上のナンセンス変異を読み飛ばし、ジストロフィン産生を誘導する治療である。研究者らは日本医師会治験推進研究事業に採択され「DMD に対するアルベカシンによるナンセンス変異リードスルー誘導治療の第 II 相試験」を医師主導治験として 2013 年より実施した。

一方で、生体内にはナンセンス変異が存在する mRNA を積極的に分解するシステムとしてナンセンス変異依存性 mRNA 分解 (nonsense-mediated mRNA decay: NMD) という機構が備わっている。これは、異常終止コドンをもつ mRNA を分解することで異常な mRNA とタンパク質を排除する生体の防御機能の一つであると考えられている。しかし、リードスルー誘導治療の標的であるナンセンス変異を有する mRNA に対する NMD の影響は、リードスルー誘導治療の効果という面においては、その有効性を妨げている可能性がある。研究代表者は NMD を阻害することにより、ナンセンス変異を有する mRNA 量を増加し、リードスルー誘導治療において、より高いジストロフィン蛋白発現効果が得られることの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、ナンセンス変異を有する DMD 患者において NMD を制御し得るこ

とを明らかにし、さらにリードスルー誘導治療に NMD 制御を導入することにより、より高いジストロフィン発現効果が得られることを目的とする。この成果は現在治験を行っているリードスルー誘導治療の有効性をさらに促進するものである。

リードスルー誘導療法は、これまで対症療法しかなかった DMD において、患者および家族が長らく切望してきた根治的治療の一つである。本研究は、リードスルー誘導療法の有効性をより高めるためには必須の研究であり、その成果はこれまで不治の病であった DMD の根治治療の確立において大きく貢献するものであると確信している。

3. 研究の方法

研究の方法は具体的には以下の 1) ~4) のように予定した。

1) ジストロフィン遺伝子の微小変異を同定するため、次世代シーケンサーおよび直接塩基配列解析を用いた解析システムの構築を行う。

2) 筋組織 mRNA の発現量を定量するためのシステムを構築する。

3) ナンセンス変異を有する DMD 患者由来培養筋細胞および対照培養筋細胞におけるジストロフィン mRNA を real time PCR 法により定量し、NMD の影響を明らかにする。

4) caffeine などを用いて NMD を制御することにより mRNA 量が増加することを検証する。また、DMD 患者由来培養筋細胞におけるアルベカシンによるナンセンス変異リードスルー誘導治療に、NMD 制御を導入し、ジストロフィン蛋

白発現が増加することを検証する。さらに、ナンセンス変異を有する DMD モデルマウスである mdx マウスにおいて、ナンセンス変異リードスルー治療に NMD 制御を導入し、その有効性を検討する。

4. 研究成果

本研究において、初めにジストロフィン遺伝子微小変異を同定するシステムを構築した。本研究を遂行するためにはナンセンス変異症例を同定することが不可欠であるが、ジストロフィン遺伝子が巨大であるため、ナンセンス変異などの微小変異を同定することが困難である。研究代表者は、次世代シーケンサーおよび直接塩基配列解析法により、非侵襲的に微小変異を同定するシステムを構築した。

そして、このシステムを用いて、多数例の解析を行った結果、その中からナンセンス変異を有する DMD 症例を同定することが可能であった。

次に、筋組織における mRNA の定量に関して検討を行った。蛍光シーケンサーによって半定量するシステムを構築した。ナンセンス変異を有する DMD 症例の培養筋細胞から mRNA を抽出し、定量することが可能となった。

現在、これらのシステムを用いて、当初の計画のように NMD を制御しうる物質を検討しており、NMD の制御によるリードスルー治療の有効性の改善について研究を継続している。

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 1 件)

1. **2'-O-Methyl RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acid Chimera Antisense Oligonucleotides to Induce Dystrophin Exon 45 Skipping.**

Lee T, Awano H, Yagi M, Matsumoto M, Watanabe N, Goda R, Koizumi M, Takeshima Y, Matsuo M. Genes (Basel). 2017 Feb 10;8(2). pii: E67. doi: 10.3390/genes8020067. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 李知子, 下村英毅, 栗野宏之, 飯島一誠, 荻寛志, 伊東恭子, 松尾雅文, 竹島泰弘. **Duchenne 型筋ジストロフィーに対する ENA アンチセンスオリゴヌクレオチド (A085) によるジストロフィン発現効果. 第 59 回日本小児神経学会、大阪、2017**

2. 李知子, 下村英毅, 栗野宏之, 飯島一誠, 松尾雅文, 竹島泰弘. Duchenne 型筋ジストロフィーに対する ENA アンチセンスオリゴヌクレオチド (A085) 全身投与による 6 分間歩行距離の延長効果. 第 58 回日本小児神経学会、東京、2016

〔図書〕(計 1 件)

1. 李知子, 竹島泰弘. 小児の筋疾患 update 筋疾患における遺伝子診断の実際. 小児内科 48 巻 12 号、1893-97、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：李 知子 (LEE, Tomoko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：10596042

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()