

平成 22 年 05 月 01 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790725

研究課題名 (和文) 福山型先天性筋ジストロフィーの発症分子機構解明と創薬への応用

研究課題名 (英文) New pathomechanism and the application of the treatment for Fukuyama-type congenital muscular dystrophy

研究代表者

谷口 真理子 (TANIGUCHI MARIKO)

大阪大学・医学研究科・特任助教 (常勤)

研究者番号：00410738

研究成果の概要 (和文)：福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の責任遺伝子 *fukutin* の発現解析より、FCMD は SVA 型レトロトランスポゾン由来の挿入配列がもたらすスプライシング病であることを発見し、患者由来細胞系、疾患モデルマウスでスプライシング由来の異常 *fukutin* 蛋白を検出した。この発症機序に基づく治療法確立のため、標的配列を同定し、20 メチル RNA やモルフォリノ等を用いアンチセンス核酸化合物を設計した。

研究成果の概要 (英文)：

1, We revealed that FCMD is caused by splicing abnormality which is induced by pathogenic exon trapping of SVA retrotransposal insertion. 2, We also detected the abnormal *fukutin* protein in FCMD. 3, We checked that the same abnormal splicing pattern was seen in FCMD model mice. 4 We adopted phosphorothioate-linked 2'-O-methyl RNA (2'OMePS) and Morpholino oligonucleotides to design several 25 mer AONs to search the best target sequences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児科

キーワード：・先天性筋ジストロフィー・ゲノム創薬・スプライシング異常・アンチセンス治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 疾患概念

福山型先天 FCMD は先天性筋ジストロフィー、II 型滑脳症、及び眼奇形の 3 症状を示す常染色体劣性遺伝疾患である (Fukuyama, et. al.,

Brain Dev 1981)。

(2) 原因遺伝子の発見

1998 年にポジショナルクローニング法により FCMD の疾患責任遺伝子である *fukutin* 遺

伝子 (*fukutin*, 9q31) が同定された。約 9 割の 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) の挿入型変異を認める (Kobayashi, et. al., *Nature* 1998)。この変異は約 100 世代前、日本人祖先の 1 人に生じ、日本人の 90 人に 1 人が保因者で、約 3 万出生に 1 人発症する、本国特有の疾患でもある (Watanabe, et. al., *Am J Med Genet* 2005)。

(3)FCMD の発症機構

患者では *fukutin* の正常サイズの mRNA の発現がノーザンブロット解析では検出されなかった。この機構については、患者にみられる SVA の挿入部位及びトランスポゾンの性質より以下のように考えられてきた。①挿入変異が 3' 非翻訳領域にある為、*fukutin* の mRNA が急速に不安定化し分解される。②トランスポゾン等の反復配列周辺は、DNA メチル化やヒストン脱アセチル化などの制御を受けやすいため、*fukutin* 周辺がエピジェネティックな不活性化を受け、発現抑制や転写伸長障害が起こる。しかしながら、その SVA 配列はグアニン、シトシンが豊富で解析が非常に難しく、疾患機序は未解明のままであった。

2. 研究の目的

当初原因遺伝子 *fukutin* の mRNA の不安定化あるいは転写障害が病態と考えられていた。目的申請者が最近、定量的 RT-PCR 法を用いて、*fukutin* 内各領域での発現を調べたところ、患者初代線維芽細胞系において、SVA 挿入変異周辺で発現が激減している部分が見つかった。一方、挿入変異から離れた *fukutin* の 5' 側及び 3' 側部分では、患者と健常者で発現量の差が全く無い領域もあった。このことから、従来説とは異なり、FCMD の挿入変異がスプライシングパターンを変化させ、周辺領域が新たなスプライシングを受け脱落したのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、FCMD 患者由来初代線維芽細胞およびリンパ芽球の mRNA の塩基配列を調べたところ、スプライシング異常由来の産物が確認された。この産物はコンピューター予測で見出された潜在性スプライシングサイト由来の産物と一致した。さらに患者線維芽細胞を用いたノーザンハイブリダイゼーションにおいて、新たなスプライシングによるサイズのバンドが確認され、この仮説の正当性が確認された。

申請者は従来の説を覆し、レトロトランスポゾンの *fukutin* への非翻訳領域への挿入変異により引き起こされる、'スプライシング異常症'であることを新たに見出した。この事実は、スプライシングをターゲットにしたゲノム創薬による治療が可能であることを示す。申請者はこの研究を進展させることに

より、発症機構に基づいた FCMD の治療法開発の実現化を目指す。

3. 研究の方法

1. FCMD 患者での *fukutin* 異常スプライシングに関する配列の同定及び結合因子の同定

(1) ノーザンハイブリダイゼーション法による異常 mRNA の検出

SVA 挿入変異をホモ接合で持つ患者、他の点変異との複合ヘテロ接合の患者、保因者、健常者のリンパ芽球、また疾患モデルマウスの脳、骨格筋、心筋患者組織より polyA-RNA を抽出する。以前の報告との改善点として以下の点を工夫する。

- mRNA 量を 5 倍に増やし、RNA プローブを用い感度を上げる。
- ホルマリン変性ゲルではなく、変性力が強いグリオキサールを用いる。
- リボスクレアーゼ保護アッセイも検討する。

(2) RT-PCR 法によるスプライシング異常の検討

SVA 挿入変異をホモ接合で持つ患者、他の点変異との複合ヘテロ接合の患者、保因者、健常者のリンパ芽球、線維芽細胞、また疾患モデルマウス、患者組織から全 RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行う。患者型 *fukutin* 由来の得られた cDNA の塩基配列を決定し、スプライシング異常由来であるか、またその部位の同定を行う。疾患モデルマウス各組織 (脳、骨格筋、心筋)、また FCMD 患者組織においても検討する。以下の点を考慮して実験を行う。

- RNA 中の他遺伝子由来の SVA 配列を含む転写物の影響を避けるため、逆転写酵素反応の際に *fukutin* 特異的プライマーを用い特異化を図る。
- グアニン・シトシン豊富な配列の対策として、SVA 挿入配列全長が増幅できるような至適 PCR 条件の設定を試み、非特異的 PCR 産物を抑制しスプライシング異常を検出する。

2. スプライシングに関する部位を治療標的としたアンチセンス核酸化合物を用いた治療の *in vitro* 及び *in vivo* における検討

最終エクソンの非翻訳領域に SVA 配列が挿入された *fukutin* ミニ遺伝子発現コンストラクトを作成する (SVA 挿入型 *fukutin*)。これまでの実験より、このコンストラクトを動物細胞内に導入すると、異常スプライシングが誘導されることが期待される。このスプライシング供与部位、受容部位、シスエレメントに特異的に変異を導入し、異常スプライシング

が阻止されるかを確認し、治療標的の可能性を検討する。スプライシングの是正は、RT-PCR 法及びノザンハイブリダイゼーションで確認する。

(1) スプライシングアッセイ系の確立

SVA 挿入型 *fukutin* コンストラクトの、正常 *fukutin* をコードする翻訳領域下流にレポーター遺伝子を導入したコンストラクトを作成し、安定発現細胞株を構築する。この細胞株に標的化合物を投与し、異常スプライシングが是正され、正常の *fukutin* の翻訳が回復すると、細胞はレポーターと融合し正常 *fukutin* を発現するようになる。このアッセイ系を用い化合物の治療効果を評価する。

(2) アンチセンス核酸化合物の設計とスプライシングアッセイ系を用いた治療効果検討

アンチセンス核酸化合物の塩基配列間の結合特異性や、素材（架橋人工核酸、ペプチド核酸、モルフォリノ核酸等）、を充分考慮し、治療標的の可能性を検討する。スプライシング供与部位、受容部位、シスエレメントの3部位を標的にアンチセンス核酸化合物を設計、合成する。構築したスプライシングアッセイ系を用い、感受性及び特異性の高い有効な核酸化合物を探索する。

3. 低分子化合物治療薬のスクリーニング
2-(1)において作成したコンストラクトを用い、ケミカルライブラリーを用いたドラッグスクリーニングを行う。

4. 研究成果

1. FCMD におけるスプライシング異常の標的配列を決定するために、挿入変異をはさむPCR反応により、産生される患者由来のスプライシング産物を直接シーケンス法にて塩基配列を決定した。この結果によると、この異常スプライシングは、挿入配列内に存在する強力な潜在的スプライシング受容サイトが、蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的スプライシング供与サイトを新たに活性化することが原因となっていることが予測された。また、ノザンハイブリダイゼーションにより、FCMD 患者特異的な異常 mRNA を検出した。これらにより、FCMD はSVA 型レトロトランスポゾン挿入変異がもたらす、エクソントラップによるスプライシング異常症であることを証明した。

2. この挿入変異を有する *fukutin* cDNA コンストラクトに変異を導入し、異常スプライシングが阻止されることより、このスプライシング供与部位、受与部位およびスプライシン

グ促進配列が標的配列であるとの予測を立てた。これらの配列を標的とするアンチセンス治療化合物（20 メチル RNA やモルフォリノオリゴ）をその標的配列の周囲に網羅的に設計、合成し、細胞内（患者由来リンパ芽球や、線維芽細胞）へ核酸化合物を導入し、RT-PCR 法を用いて、スプライシング是正効果のある配列を選別し、至適な配列を同定中である。

3. SVA 挿入型 *fukutin* コンストラクトの、正常における翻訳領域の下流にレポーター遺伝子を導入したコンストラクトを作成し、その3'側に挿入変異を導入し、異常スプライシングのモデルを作成し、一過性強制発現において、患者同様の異常スプライシングが導入されることを確認し、細胞内安定発現細胞株を構築した。この細胞株に標的化合物を投与し、異常スプライシングが是正され、正常の *fukutin* の翻訳が回復すると、細胞はレポーターと融合し正常 *fukutin* を発現するようになる。このアッセイ系を用い、レポーター遺伝子の発現の程度を測定することで、今後は低分子化合物ライブラリーより、有効化合物の治療効果を評価する予定である。またそれぞれの核酸化合物の毒性の検討を細胞系を用い行っている。これらの結果を踏まえ、細胞レベル、動物レベルでのスプライシング是正効果（mRNA レベル及び蛋白レベル）を検討予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Fujikake, N., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Nagai, Y., Tashiro, F., Miyazaki, J., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 621-631 2009. 査読有
2. Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, T., Kato, T., Bolor, H., Taniguchi, M., Shaikh, T.H., Emanuel, B.S., and Kurahashi, H. Chromosomal instability mediated by non-B DNA: cruciform conformation and

not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. *Genome Res.* 19, 191-198. 2009. 査読有

〔学会発表〕(計5件)
国際学会

1. 谷口 真理子、小林 千浩、金川 基、戸田 達史 (2010)、福山型先天性筋ジストロフィーはスプライシング病である、筋ジストロフィー総合班会議、東京、1月15日
2. 谷口 真理子、小林 千浩、金川 基、戸田 達史 (2009)、福山型先天性筋ジストロフィーはスプライシング病である、砂田班班会議、東京、日本12月11~12日
3. Taniguchi, M., Kanagawa, M., (3) Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. 20th Glycobiology Joint Meeting, Köln, Germany 8th~10th, Nov. 2009.
4. Taniguchi, M., Kanagawa, M., (4), Campbell, K.P., Toda, T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. The American Society of Human Genetics, Hawaii, USA, 20th~24th, Oct. 2009.
5. Taniguchi, M., Kanagawa, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T. Residual laminin-binding

activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. The 15th World Muscle Society Genova, Switzerland, 9th~13th Sep, 2009.

〔図書〕(計2件)

1. 小児の症候群、cat eye 症候群、Coffin-Siris 症候群、Cohen 症候群、小児科診療、診断と治療社、増刊号 (2009)
2. 小児内科、小児科医のための遺伝学、先天性筋ジストロフィー8月号、東京医学社(2008)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/organelle-network/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 真理子 (TANIGUCHI MARIKO)

大阪大学・医学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号: 00410738