

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08243

研究課題名(和文)筋ジストロフィーにおける血管作動性因子のスプライシング動態の解明と治療応用

研究課題名(英文) Splicing dynamics of vasoactive factors in muscular dystrophy and therapeutic application in muscular dystrophy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮増殖因子(VEGF)、VEGF受容体などの血管作動性因子のスプライシングアイソフォームがDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)の病態に関与している可能性、さらに、スプライシングをアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)で制御する治療の可能性を検討することを目的とし、VEGF-Aスプライシングアイソフォーム解析系を確立した。また、修飾核酸である2'-0,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENAs)が、生体組織への取り込みが他の修飾核酸より優れていることを明らかにするとともに、DMDの運動・呼吸・心機能の自然歴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMD症例の運動・呼吸・心機能などの自然歴を明らかにした。個々の症例における臨床症状の経過と血管作動性因子のスプライシングアイソフォームとの関連を十分に検討するには至らなかったが、本研究で確立したスプライシングアイソフォーム解析システムにより、今後、DMD症例ごとのスプライシング型と臨床経過の関連を解明することにより、血管作動性因子の病態への関与が明らかになることが期待される。また、修飾核酸ENAの有効性を明らかにできたことにより、AS-oligoによる血管作動性因子のスプライシング型を制御する治療の検討を、大きく促進することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：The splicing isoforms of vasoactive factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor may be involved in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy (DMD). We established a VEGF-A splicing isoform analysis system with the aim of investigating the possibility of treatment by controlling splicing with an antisense oligonucleotide (AS-oligo). In addition, we found that the modified nucleic acids, 2'-0,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENAs), have better uptake in biological tissues than other modified nucleic acids, and also revealed the natural history of motor, respiratory, and cardiac functions in DMD. Although we were unable to fully examine the relationship between the splicing isoforms of vasoactive factors and the course of clinical symptoms in individual cases, the splicing isoform analysis system established in this study is expected to clarify the relationship between the splicing type and the clinical course in each DMD case in the future.

研究分野：小児科学

キーワード：筋ジストロフィー スプライシング 血管作動性因子 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 (**Duchenne muscular dystrophy: DMD**) はジストロフィン遺伝子変異による遺伝性進行性の筋疾患であり、**10** 歳前後で歩行不能となり、**10** ~ **20** 歳台で心不全・呼吸不全を呈する重篤な疾患であるが、その治療は対症療法に限られていた。近年、**DMD** の病態における血管作動性因子の重要性が報告され、その発現を調整することによる **DMD** 治療法開発が注目されている (**Podkalicka P. et al. Cell Mol Life Sci. 2019; 76: 1507-28.**)。そして、基礎的検討において血管内皮増殖因子 (**Vascular endothelial growth factor: VEGF**)、**VEGF** 受容体、一酸化窒素合成酵素 (**Nitric oxide synthase: NOS**) などの血管作動性因子を制御する治療法の有用性が示唆されているものの、従来の方法では臨床応用への糸口は見出されていない。

一方、申請者らは **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 (**Antisense oligonucleotide: AS-oligo**) によってエクソンスキッピングを誘導し、**out-of-frame** 欠失を **in-frame** 欠失に変えて遺伝情報を修正する「エクソンスキッピング誘導治療」の有効性を、世界で初めて臨床的に明らかにした (**Takeshima Y. et al. Pediatr Res. 2006; 59: 690-4.**)。この成果を受け、現在、世界各地で種々の修飾核酸による「エクソンスキッピング誘導治療」の臨床応用の検討が進められている。しかし、「エクソンスキッピング誘導治療」は特定の遺伝子変異を対象とした治療であるため、より多くの **DMD** 症例を対象とした新たな治療戦略が切望されている。

申請者は、自らが見出した **AS-oligo** によるスプライシング制御を、**DMD** の病態に関与する血管作動性因子に応用することにより、**DMD** に対する新たな治療法を開発し得ることを着想した。**VEGF**、**VEGF** 受容体、**NOS** などの血管作動性因子には多くのスプライシングアイソフォームが存在しており、さらにアイソフォームごとに多彩な作用を有することが報告されている (**Bowler E, et al. Int J Mol Sci. 2019; 20: 2067.**)。 **DMD** の病態における、血管作動性因子スプライシングアイソフォームの意義を解明し、筋再生に関与するアイソフォームの発現を促進するように **AS-oligo** によりスプライシングを制御することが、新たな治療法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

**VEGF**、**NOS** は、血管新生促進のみではなく筋組織再生にも促進的に作用し、可溶性 **VEGF** 受容体はその作用を阻害することが報告されている。これらの因子の発現調節による **DMD** 治療法の検討は行われているものの、ロックアウト動物あるいは遺伝子強制発現などによる検証などであり、容易に臨床応用できるものではなかった。申請者らは、これらの因子が複数のスプライシングアイソフォームを有すること、さらにアイソフォームによりその作用が大きく異なることに注目した。そして、スプライシングアイソフォームを、より筋再生促進作用の強いアイソフォームに変換することにより、**DMD** に対する有効な治療法になり得ることを着想した。本研究では、これらの血管作動性因子における筋再生促進作用に関与するスプライシングアイソフォームを検証し、そのアイソフォーム優位にスプライシングを変換する **AS-oligo** による新規治療法を開発を目指して、基礎的な検討を行う。**AS-oligo** による治療はすでに臨床応用されており、本研究の成果は速やかに臨床応用されることが期待される。

例えば、**VEGF-A** は **8** エクソンより成り、全エクソンを有する **VEGF-A206**、エクソン **6** を

欠く **VEGF-A165** など複数のアイソフォームが存在する。さらにエクソン **8** のスプライスアクセプターサイトの違いにより **a** と **b** に分けられ、アイソフォームごとに作用が大きく異なることが報告されている。近年、**DMD** モデルマウスに **VEGF-A165a** を過剰発現させることで筋力・筋病理所見が改善することが報告された (**Song X. et al. Exp Ther Med. 2018; 15: 1825-30.**)。このことは、**AS-oligo** によりスプライシングを制御し、アイソフォーム発現パターンを **VEGF-A165a** 優位にすることが、**DMD** に対する新たな治療戦略になり得ることを示している。

### 3. 研究の方法

**AS-oligo** により血管作動性因子のスプライシングを制御し、筋再生促進作用優位のスプライシング型に変換する治療法の開発を目指した。**AS-oligo** による血管作動性因子のスプライシング制御の検証には至らなかったが、**DMD** 症例の臨床所見の評価、血管作動性因子スプライシングアイソフォーム解析系の確立、**AS-oligo** 体内動態の評価などを行った。

**DMD** 症例の臨床経過に関しては、診療録を用いて後方視的に検討を行った。スプライシングアイソフォーム解析は、筋組織・血液組織などより **RNA** を抽出し、**Reverse Transcription (RT)-PCR** 法により **mRNA** の解析を行い、スプライシング型を決定した。**AS-oligo** の体内動態は、モデル動物を用いて検討を行った。

### 4. 研究成果

血管内皮増殖因子(**VEGF**)、**VEGF** 受容体、一酸化窒素合成酵素などの血管作動性因子のスプライシングアイソフォームが **Duchenne** 型筋ジストロフィー(**DMD**)の病態に関与している可能性、さらに、スプライシングをアンチセンスオリゴヌクレオチド (**AS-oligo**) で制御する治療の可能性を検討することを目的とし、**VEGF-A** スプライシングアイソフォーム解析系を確立した。また、修飾核酸である **2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENAs)**が、生体組織への取り込み が他の修飾核酸より優れていることを明らかにした (**Ito K, et al. Renadirsen, a Novel 2'OMeRNA/ENA® Chimera Antisense Oligonucleotide, Induces Robust Exon 45 Skipping for Dystrophin In Vivo. Curr Issues Mol Biol. 2021 Sep 25;43(3):1267-1281.**)。さらに、**DMD** の運動・呼吸・心機能の自然歴を明らかにした (**Awano H. et al. Longitudinal data of serum creatine kinase levels and motor, pulmonary, and cardiac functions in 337 patients with Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve. 2024 May;69(5):604-612.**)。

個々の症例における臨床症状の経過と血管作動性因子のスプライシングアイソフォームとの関連を十分に検討するには至らなかったが、本研究で確立したスプライシングアイソフォーム解析システムを用いて、今後、**DMD** 症例ごとのスプライシング型と臨床経過の関連を解明することにより、血管作動性因子の病態への関与が明らかになることが期待される、また、修飾核酸 **ENA** の有用性を明らかにできたことにより、**AS-oligo** による血管作動性因子のスプライシング型を制御する治療の検討を、大きく促進することが可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Awano Hiroyuki, Nambu Yoshinori, Itoh Chieko, Kida Akihiro, Yamamoto Tetsushi, Lee Tomoko, Takeshima Yasuhiro, Nozu Kandai, Matsuo Masafumi	4. 巻 69
2. 論文標題 Longitudinal data of serum creatine kinase levels and motor, pulmonary, and cardiac functions in 337 patients with Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 604 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.28073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Kentaro, Takakusa Hideo, Kakuta Masayo, Kanda Akira, Takagi Nana, Nagase Hiroyuki, Watanabe Nobuaki, Asano Daigo, Goda Ryoya, Masuda Takeshi, Nakamura Akifumi, Onishi Yoshiyuki, Onoda Toshio, Koizumi Makoto, Takeshima Yasuhiro, Matsuo Masafumi, Takaishi Kiyosumi	4. 巻 43
2. 論文標題 Renadirsen, a Novel 2' OMeRNA/ENA? Chimera Antisense Oligonucleotide, Induces Robust Exon 45 Skipping for Dystrophin In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1267 ~ 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb43030090	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	李 知子 (Lee Tomoko)  (10596042)	兵庫医科大学・医学部・准教授  (34519)	
研究分担者	下村 英毅 (Shimomura Hideki)  (30441273)	兵庫医科大学・医学部・准教授  (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------