

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790980

研究課題名（和文） 福山型先天性筋ジストロフィーの病態機序に基づいた治療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of radical therapy for Fukuyama Muscular Dystrophy

研究代表者

谷口 真理子 (TANIGUCHI MARIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：00410738

研究成果の概要（和文）：申請者が見出した、「福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）がレトロトランスポゾンの挿入変異がもたらすエクソントラッピングと名付けられるスプライシング異常症であること」をもとに、この異常スプライシングを是正する治療法の実現を目的とし、核酸化合物であるアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)による治療を開始し FCMD モデルマウスに対する AON のモデル動物への局所及び全身投与、ヒト患者由来細胞系への投与を行い成功し、不治の病の初の治療法の可能性を示した (Taniguchi-Ikeda et.al. Nature 2011)。

研究成果の概要（英文）：Fukuyama muscular dystrophy (FCMD), one of the most common autosomal recessive disorders in Japan, was the first human disease found to result from ancestral insertion of a SINE-VNTR-*Alu* retrotransposal element (SVA) into a causative gene. Here we show that aberrant mRNA splicing, induced by SVA exon trapping, underlies the molecular pathogenesis of FCMD. Introduction of antisense oligonucleotides (AONs) targeting the splice acceptor, the predicted exonic splicing enhancer, and the intronic splicing enhancer prevented pathogenic exon trapping by SVA in FCMD patient cells and model mice, rescuing normal fukutin mRNA expression and protein production. AON treatment also restored fukutin functions, including as O-glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) and laminin binding by  $\alpha$ -DG. We have demonstrated the promise of splicing modulation therapy as the first radical clinical treatment for FCMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アンチセンス治療、先天性筋ジストロフィー、RNA 創薬、ゲノム創薬、スプライシング異常、ドラッグデリバリーシステム

## 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)。日本で2番目に多い小児の筋疾患であり、10代で死に至る重篤な疾患だが未だ治療法がない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。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) の挿入型変異を認める

(Kobayashi, et. al., *Nature* 1998)。こがその病態機序は不明であった。

近年、FCMD患者の骨格筋では、細胞膜と基底膜を繋ぐ糖蛋白  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$  DG) のO-マンノース型糖鎖に異常があり、この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻する為に重度の筋ジストロフィーが発症することが示された (Michele DE, et. al., *Nature* 2002)。FCMDと類似の臨床症状を来たす muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群等においても、 $\alpha$  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、 $\alpha$  ジストログリカノパチー ( $\alpha$  DGpathy) と総称する新しい疾患概念が確立した

(Muntoni, et. al., *Lancet* 2002, Toda, et. al., *Congenit Anom* 2003)。*fukutin* の機能は未知であるが、上記の事実や既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性より、 $\alpha$  DG の糖鎖修飾に関わっていると考えられている。

患者では *fukutin* の mRNA の発現がノザンプロット解析で検出されなかった。この機構については、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等の制御

を受けやすく、*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、SVA 配列はグアニン、シトシンが豊富で解析が難しく、疾患機序は未解明のままであった。ごく最近、SVA がいくつかの遺伝子内に挿入し、選択的スプライシングや PTC (premature termination codon) を引き起こし、遺伝子の機能に多様性を与え生物の進化、選択、多様性に関与していることが報告された (Hancks, et. al., *Genome Res* 2009)。

申請者はこれまでに、FCMDの病態が、SVAの挿入により、*fukutin* 蛋白をコードする最終エクソン内に新たなスプライシング部位が生じ、新生エクソン由来の異常タンパクが産生されることで発症する、スプライシング異常症である事実を証明した (未発表)。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る。そこで、この標的配列に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を pre-mRNA レベルにおいて結合させ、異常スプライシングを阻止し、正常なスプライシングパターンに是正させる治療法が有効との着想に至った。

我々はすでにヒト正常型及び患者型 SVA 挿入型 *fukutin* 配列をマウス *fukutin* に導入したノックインモデルマウス (KI マウス) 系を構築し (Kanagawa, et. al., *Hum Mol Genet* 2009)、患者同様のスプライシング異常を示すことを確認した。そこで、申請者は標的配列に対する AON (Octa- Guanidine Morpholino vivo-Morpholino, vMO) を設計し、KI マウスより樹立した ES 細胞系に投与したところ、mRNA レベルでのスプライシン

グの是正が確認された。更にマウス骨格筋への局所注射では、mRNAの回復に加え正常 fukutin 蛋白の回復や、機能的回復を示唆するαDGの糖鎖修飾の回復に成功した。これらの事実はFCMDがスプライシング異常症であるとの仮説を再度支持する結果であった。

スプライシング異常に着目した治療法として、現在DMDに対しAONを用いたエクソンスキッピング法が臨床適用になっており、また脊髄性筋萎縮症に対するスプライシング制御の研究も進んでいる。従ってFCMDに対する、スプライシング制御を目指したヒトへの治療は実現可能であると考えている。

## 2. 研究の目的

申請者が見出した、「FCMDがレトロトランスポゾンの挿入変異がもたらすエクソントラッピングと名付けられるスプライシング異常症であること」をもとに、この異常スプライシングを是正する治療法の実現を目的とし、核酸化合物であるアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)による治療を開始しFCMDモデルマウスに対するAONのモデル動物への局所及び全身投与、ヒト患者由来細胞系への投与、薬剤毒性の検討、核酸配列や化合物分子の至適化、ドラッグデリバリーシステムの構築及び低分子化合物からの有効薬剤の探索を行った。

## 3. 研究の方法

1. Octa-Guanidine Morpholino (vMO)、及び2' OメチルRNA等の有効な核酸化合物(AON)  
①FCMDモデル動物への全身投与：FCMDモデルマウス(KIマウス)に対するアンチセンス化合物の全身投与による治療

有効なAONをKIマウスの尾静脈経由または腹腔内にAONを投与(20mg/Kg~200mg/Kg)し骨格筋、心筋、各組織での治療効果を検討する。FCMDでは・DGのO-マンノース型糖鎖に異常がみられ、そのリガンドである laminin

との結合能が落ちるため、その回復を機能的な治療効果の指標とする。

②ヒト患者由来細胞系(リンパ芽球、初代筋芽細胞)に対する治療：vivo-Morpholinoは濃度依存的に効果が上昇する(Yokota, et. al., Ann Neurol 2009)。正常、FCMD患者由来リンパ芽球の培地内にAON(800nM~5μM)を投与し、96時間後に細胞を回収し、正常 fukutin 蛋白の回復を解析する。③薬剤毒性の検討及び④有効なAON薬剤の至適化

2. 高分子ナノ化合物(ポリメチルメタクリレート；メタクリル樹脂：PMMA)等を用いたDDSの構築アンチセンス核酸の高機能化を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築：ヒトへの臨床応用の実現化には、薬剤の治療効果を高めるだけでなく、副作用の軽減、投与経路、血液脳関門の通過への検討、組織移行の効率化等の工夫は必須の要素である。最適な薬物輸送システムの構築の為に、AONの高機能化を目指す。3. 低分子化合物ライブラリーからのスクリーニングによる、FCMDに対する有効治療薬剤の探索：・

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 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。このアッセイ系を用い、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。有効な化合物について、患者由来細胞系、モデル動物を用い治療効果、濃度依存性、毒性を検討する。

## 4. 研究成果

この2年間において申請者はモルフォリノオリゴを用い核酸化合物であるアンチセンスオリゴヌクレオチドカクテル(AON-AED)に

よる異常スプライシングに対する分子標的治療を開始した。その結果 FCMD モデルマウスへの局所投与および尾静脈を介した全身投与、及び患者由来細胞系において、AON が RNA レベルにおいて劇的に効果のあることを示した(図1)。

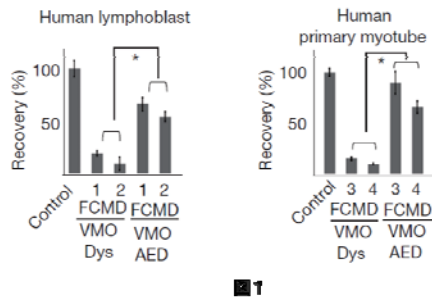


図1

この AED カクテルの効果は RNA レベルにとどまらず、蛋白レベルでの回復(図2)、及び疾患の機能的改善を示すαジストログリカンの糖鎖修飾の回復に対しても有効であることを示した(図3)。

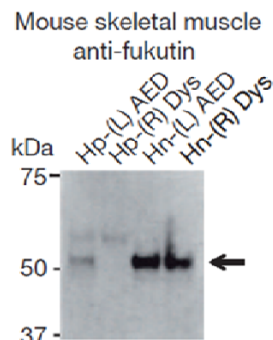


図2

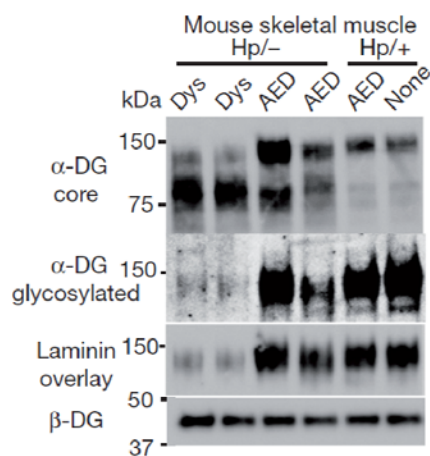


図3

また患者由来筋細胞にこの AON-AED を投与したところ機能的回復を示すラミニンクラスターリング能力の劇的改善も示した(図4)。

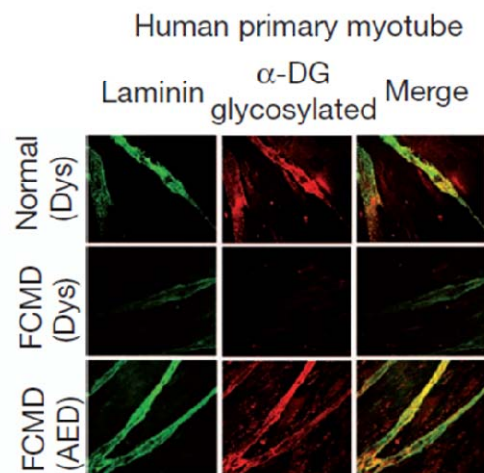


図4

このことより、FCMD はスプライシング異常であり、このスプライシング異常をアンチセンス核酸で治療する、という不治の病に対する初の治療法の可能性を示した(Taniguchi-Ikeda et.al. Nature 2011)。

また FCMD で引き起こされるスプライシング異常は人の疾患の原因になることを初めて示し、同様のレトロトランスポゾンの挿入を認める他の2疾患についても同様のスプライシング異常を発見し、またチンパンジーにはないヒト特異的な SVA 挿入を認める新規遺伝子 (AB627340) のエクソントラッピング由来の遺伝子産物をヒト脳において同定し、エクソントラッピングの病的意義だけでなく進化、多様性に関する可能性も示した(図5)。

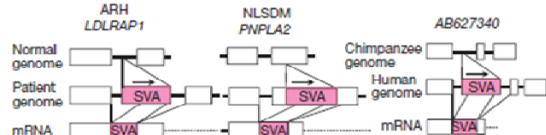


図5

われわれが目指す福山型筋ジストロフィーに対するアンチセンス療法は、デュシヤン

型筋ジストロフィーに対するエクソスキッピング療法と違い、完全なフクチン蛋白の回復を目指す根治療法であり、しかも日本のすべての福山型筋ジストロフィーの患者を対象に同一の方法で行えるものである。現時点では、このアンチセンス療法には脳や心筋組織への移行が困難である点、また先天性疾患であるため、脳の形成異常を治療するためには胎児治療が必要になる点など、解決すべき問題が多い。しかし、まずは筋力を回復する治療が実現され、患者及びその家族のQOLの上昇につながればと考えている。今後は臨床応用の実現にむけ、核酸化合物の最適化や毒性試験などを行ってゆきたい。この発表は国内でも各種新聞やテレビで報道され、患者家族に対しても公表され大きな反響をえた。この結果をもとに是非臨床応用の実現を目指して、核酸化合物の最適化や薬剤の毒性の検討などを行って行きたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)(総計4件)

① Taniguchi-Ikeda M., Kobayashi K., Kanagawa M., Yu CC., Mori K., Oda T., Kuga A., Kurahashi H., Akman HO., DiMauro S., Kaji R., Yokota T., Takeda S., Toda T. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy Nature 478, 127-131 (2011)

〔学会発表〕(計4件)

1. 谷口(池田)真理子、竹島泰弘、戸田達史 福山型筋ジストロフィーのSVA挿入によるスプライシング異常とレスキュー 第54回日本小児神経学会学術集会 2012. 5. 17~19

2. 谷口(池田)真理子、小林千浩、金川基、遊智傑、小田哲也、久我敦、倉橋浩樹、武田伸一、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史 福山型筋ジストロフィーのSVA挿入によるス

プライシング異常とレスキュー 第110回日本小児科学会学術集会 2012. 4. 20~22

3. 谷口(池田)真理子、小林千浩、金川基、遊智傑、小田哲也、久我敦、倉橋浩樹、横田俊文、武田伸一、戸田達史 福山型筋ジストロフィーにおけるSVAレトロトランスポゾン挿入による病的エクソントラッピングとアンチセンスオリゴヌクレオチドにおけるレスキュー 第56回日本人類遺伝学会 東京 2011. 11. 10~12

4. Mariko Taniguchi-Ikeda; Kazuhiro Kobayashi; Motoi Kanagawa; Chih-chieh Yu; Hasan O. Akman; Salvatore DiMauro; Toshifumi Yokota; Shin-ichi Takeda; Tatsushi Toda. Pathogenic exon trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. World Muscle Society 2011 16th International congress 10/18-22 Almeria, 2011.

〔図書〕(計3件)

1. 谷口真理子、小林千浩、戸田達史 福山型筋ジストロフィーのスプライシング異常に対するアンチセンス治療 THE LUNG perspectives Vol 20, No 2, 2012

2. 谷口真理子、小林千浩、戸田達史 福山型筋ジストロフィーの病的スプライシング異常とアンチセンス療法 実験医学 950~953 Vol30, No 6, 2012

3. 谷口真理子 戸田達史: 福山型筋ジストロフィー 症候群ハンドブック 福井次矢、辻省次: 編 68, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計1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(谷口)真理子、小林千浩

権利者: 神戸大学

種類: 特許権

番号: 特願 2012-86891

出願年月日：平成 24 年 4 月 5 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 真理子 (TANIGUCHI MARIKO)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号：00410738