

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591495

研究課題名(和文)筋ジストロフィーに対するアンチセンス治療における線維化因子の動態に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of fibrotic factors during the exon-skipping therapy using antisense oligonucleotide for muscular dystrophy

研究代表者

竹島 泰弘 (TAKESHIMA, Yasuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40281141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne型筋ジストロフィー(以下DMD)に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド(以下AS-oligo)によってエクソンスキッピングを誘導する治療法の有効性を高めるために、本疾患における線維化および炎症の関与を検討した。エクソン45のスキッピングを誘導するAS-oligoの薬効動態を検討し、EC50が58.0nMであることが明らかにした。さらに、DMD患者において炎症のマーカーである尿中のプロスタグランジンD代謝産物の排泄量が増加していることを明らかにした。これらの結果を踏まえ、DMD症例に対しAS-oligo投与を行い、一部の炎症性サイトカインにおいて改善傾向がみられることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To enhance the effectiveness of antisense oligonucleotide (AO)-mediated exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD), the relationship of fibrosis and inflammation to DMD was examined. At the beginning pharmacodynamics of the AO inducing the skipping of exon 45(AO85) was examined using cell-free splicing system, and the EC50 of AO85 was revealed to be 58.0 nM. Then, urinary tetranor PGDM which is major urinary metabolite of prostaglandin (PG) D2 were shown to be increased in DMD patients and became higher with advancing age. It was indicated that PGD2-mediated inflammation plays a role in the pathology of DMD. Furthermore, administration of AO85 to DMD cases resulted in the improvement of some inflammatory cytokines. These results indicated that fibrosis and inflammation were involved in the pathogenesis of DMD, and the modification of these factors was considered as one possible strategy for the enhancement of the effectiveness of AO-mediated exon skipping therapy.

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：アンチセンスオリゴヌクレオチド 筋ジストロフィー エクソンスキッピング 線維化因子

## 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(以下 DMD)はジストロフィン蛋白の欠損により発症し、その病態の主体は筋組織の壊死・再生であるが、近年、本疾患の進行において、筋組織における線維化および炎症が重要な役割を果たしていることが明らかにされ、TGF- $\beta$  などの線維化促進因子、プロスタグランジンなどの炎症に関わる因子、およびそれらを制御する因子の動態が注目されている。さらに、これらの分子を標的とした治療の可能性が報告されてきている。私たちは 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(以下 AS-oligo)によってエクソンスキッピングを誘導し、遺伝情報を修正する治療法の有効性を、世界で初めて明らかにした(Takeshima Y. et al. 2006, *Pediatr Res.* 59: 690-4)。すなわち、エクソン 20 (242 塩基)が欠失している DMD 症例では out-of-frame 欠失のためアミノ酸読み取り枠にずれが生じておりジストロフィン蛋白が産生されない。しかし、この症例に対し AS-oligo を静脈内投与しエクソン 19 (88 塩基)のスキッピングを誘導することによって in-frame 欠失 (242 塩基 + 88 塩基 = 330 塩基)となり、ジストロフィン蛋白が産生されることを明らかにした。その後、このアンチセンス治療への取り組みが欧米でも開始され、今日では DMD 治療の世界標準となりつつある。しかし、このアンチセンス治療の臨床応用を広げるためには、その効果をさらに高めることが不可欠である。

私達は、DMDにおける線維化あるいは炎症に関わる因子の動態を明らかにし、さらに、アンチセンス治療によってジストロフィンの発現が誘導される際のこれらの因子の動態を明らかにすることによって、以前より検討してい

るアンチセンス治療においてこれらの因子を制御し、アンチセンス治療の有効性をより高める新たな治療戦略を見いだせる可能性を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、in vitro スプライシングシステムあるいは DMD 症例において、AS-oligo によるエクソンスキッピングを誘導する際の、分子動態を明らかにするとともに、DMD 症例における炎症の関与に関して検証し、その結果をもとに、これらの因子を制御することによるアンチセンス治療効果を促進する戦略を見いだす。

## 3. 研究の方法

(1) in vitro 無細胞スプライシング系におけるエクソン 45 スキッピング誘導アンチセンスオリゴヌクレオチドの分子動態の解明：ジストロフィン遺伝子エクソン 45 および隣接するイントロンの塩基配列を組み込んだ、3 エクソン・2 イントロンよりなるミニジーンを作成し、in vitro 転写系において mRNA 前駆体を作成する。HeLa 細胞核抽出液において、この mRNA 前駆体のスプライシングを誘導する際に、エクソン 45 スキッピングを誘導するアンチセンス RNA/ENA (2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acid)キメラオリゴである AO85 を添加し、分子動態を検討した。

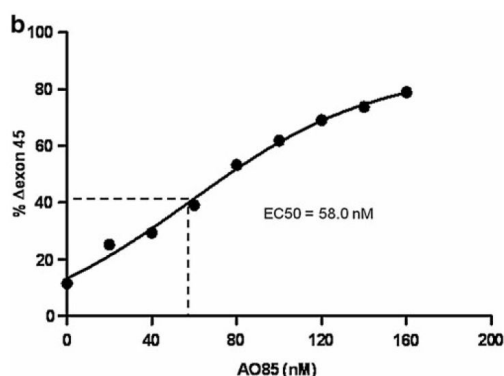
(2) DMD 症例における、プロスタグランジン D2 代謝物(尿中 PGDM)の解析：筋組織における炎症に関与するプロスタグランジン D2 産生を評価するために、191 例の DMD 症例および 79 例の健常児を対象として、プロスタグランジン D2 代謝物である尿中 11, 15-dioxo-9 $\alpha$ -

hydroxy-, 2,3,4,5- tetranorprostan- 1,20- dioic acid (tetranor PGDM)の測定を行なった。

(3) DMD 症例に対する AO85 投与における、有効性の検証および線維化に関する炎症性サイトカインの動態：AO85 を DMD 症例に投与し、その有効性を三次元歩行解析装置によって検討した。また、治療後経時的に血清の各種サイトカインの測定を行った。

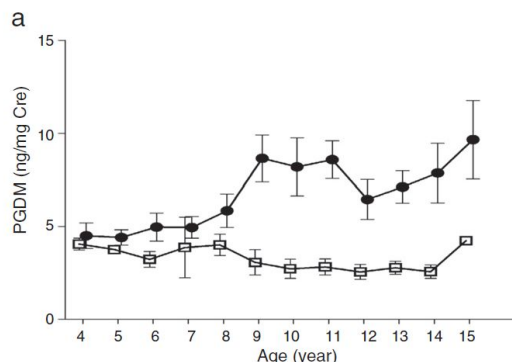
#### 4. 研究成果

(1) in vitro 無細胞スプライシング系におけるエクソン 45 スキッピング誘導アンチセンスオリゴヌクレオチドの分子動態の解明：AO85 投与により、本システムにおいてエクソン 45 のスキッピングが誘導され、全転写物の 80% に及んだ。さらに、EC50 は 58.0 nM であることが明らかとなった(下図)。



(2) DMD 症例における、プロスタグランジンD2代謝物(尿中PGDM)の解析：DMD 患者では対象に比べて尿中のプロスタグランジンD代謝産物の排泄量が増加しており(対象  $3.08 \pm 0.15$ 、DMD  $6.90 \pm 0.35$  ng/mg creatinine (mean  $\pm$  SE))、さらに、病状の進行する8歳以降において、より著しく増加することが明らかとなった(4-7歳DMD  $4.75 \pm 0.32$ 、8-15歳

DMD  $7.69 \pm 0.44$  ng/mg creatinine (mean  $\pm$  SE)) (下図。黒丸がDMDで、白四角が献上対照)。



このことは、線維化に関わる炎症、中でもプロスタグランジンDの関与する炎症が、DMDの病態に関与していることを示唆しており、線維化あるいは炎症を制御することによる治療の可能性が考えられた。

(3) DMD 症例に対する AO85 投与における、有効性の検証および線維化に関する炎症性サイトカインの動態：投与前後の重心の動揺性および関節トルクにおいて改善が見られ、本治療の有効性が示唆された。さらに治療経過における炎症性サイトカインの変動を検討した。その結果、Interferon- $\gamma$ 、Interleukin-6、Interleukin-12 などにおいて継時的な改善傾向がみられた。

#### 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8件)

- 1) Lee T, Takeshima Y, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Matsuo M, and Iijima K. Differences in carrier frequency between mothers of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. J Hum Genet. 査読有, 59: 46-50, 2014.

- 2) Tran TH, Zhang Z, Yagi M, Lee T, Awano H, Nishida A, Okinaga T, Takeshima Y, and Matsuo M. Molecular characterization of an X(p21.2;q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28. *J Hum Genet.* 査読有, 58: 33-9, 2013.
  - 3) Yamamoto T, Tanaka H, Matsumoto K, Lee T, Awano H, Yagi M, Imanishi T, Hayashi N, Takeshima Y, Kawai H, Kawano S, and Hirata K. Utility of transmural myocardial strain profile for prediction of early left ventricular dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiol.* 査読有, 111: 902-7, 2013.
  - 4) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K, Takeshima Y, Urade Y, and Matsuo M. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta.* 査読有, 423: 10-4, 2013.
  - 5) Ota M, Takeshima Y, Nishida A, Awano H, Lee T, Yagi M, and Matsuo M. A G-to-T transversion at the splice acceptor site of dystrophin exon 14 shows multiple splicing outcomes that are not exemplified by transition mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* 査読有, 16: 3-8, 2012.
  - 6) Takeshima Y, Yagi M, and Matsuo M. Optimizing RNA/ENA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing. *Methods Mol Biol.* 査読有, 867: 131-41, 2012.
  - 7) Malueka RG, Takaoka Y, Yagi M, Awano H, Lee T, Dwianingsih EK, Nishida A, Takeshima Y, and Matsuo M. Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers. *BMC Genet.* 査読有, 13: 23, 2012.
  - 8) Malueka RG, Yagi M, Awano H, Lee T, Dwianingsih EK, Nishida A, Takeshima Y, and Matsuo M. Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low half-maximal effective concentration in a cell-free splicing system. *Nucleic Acid Ther.* 査読有, 21: 347-53, 2011.
- {学会発表}(計6件)
- 1) Lee T, Kusunoki N, Yagi M, Takeshima Y, Matsuo M. and Iijima K., The carrier frequency in the mothers of 158 Japanese cases with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *European Human Genetics Conference 2013, Paris, France, 2013.* 6. 8-11.
  - 2) Takeshima Y, Yagi M, Lee T, Kusunoki N, Ojima I, Minami S, Asai T, Nakagawa A, Iijima K, and Matsuo M. Three-dimensional gait analysis of Duchenne muscular dystrophy; a trial to evaluate the therapeutic effect of RNA/ENA chimera antisense oligonucleotide that induces dystrophin exon 45 skipping. *18th International Congress of the World Muscle Society, California, USA, 2013.* 10. 1-5.
  - 3) Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M, Awano H, Iijima K,

Takeshima Y, Urade Y, and Matsuo M. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine samples of patients with Duchenne muscular dystrophy. 18th International Congress of the World Muscle Society, California, USA, 2013. 10. 1-5.

- 4) Matsuo M, Dwianingsih EM, Malueka RG, Nishida A, Lee T, Yagi M, Iijima K, and Takeshima Y. A novel splicing silencer generated by dystrophin exon 45 deletion could explain exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy. American Society of Human Genetics, the 63<sup>rd</sup> Annual Meeting, Boston, USA, 2013. 10. 22-26.
- 5) Nishida A, Takeshima Y, Kataoka N, Yagi M, Awano H, Lee T, Iijima K, Hagiwara M, and Matsuo M. A small chemical, TG003, enhances skipping of mutated dystrophin exons: the third example revealing a decrease of exonic splicing enhancer density in common. The American Society of Human Genetics, the 62<sup>nd</sup> Annual Meeting, San Francisco, USA, 2012. 11. 6-10.
- 6) Yagi M, Lee T, Awano H, Takeshima Y, and Matsuo M. Antisense RNA/ethylene-bridged nucleic acid chimera induces exon skipping in cultured myocytes from DMD patients with 6 different deletion mutations. The American Society of Human Genetics 61st Annual Meeting, Montreal, Canada, 2011. 11. 11-15.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹島 泰弘 (TAKESHIMA Yasuhiro)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：40281141

### (2)研究分担者

八木 麻理子 (YAGI Mariko)

神戸大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60362787