

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390267

研究課題名(和文) 低分子化合物を用いたエクソンスキッピング誘導によるジストロフィン発現法の確立

研究課題名(英文) Expression of dystrophin via exon skipping with a small chemical

研究代表者

松尾 雅文 (Matsuo, Masafumi)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジストロフィン遺伝子のスプライシング時にエクソンスキッピングを誘導して、ジストロフィンを発現させることは、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の治療法となりつつある。本研究では、エクソンのスキッピング誘導する低分子化合物の探索を目指した。そして、エクソンスキッピングを誘導する低分子化合物の探索を行った。一部の化合物がエクソンスキッピング誘導作用を有することを見出した。さらに、エクソンスキッピング誘導治療の標的となる代表的エクソンについて多エクソン同時スプライシング解析系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Antisense-mediated exon skipping is the most promising treatment for Duchenne muscular dystrophy. Here, small chemicals that induce dystrophin exon skipping were searched using in vitro splicing system. Unfortunately, chemicals that can be applied for clinical use were not identified yet. Furthermore, a new splicing analysis system that enabled detection of skipping of 10 exons simultaneously was established to enhance screening of chemicals.

研究分野：小児科

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー エクソンスキッピング 低分子

## 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィン遺伝子の異常による骨格筋のジストロフィン欠損を主徴とする進行性の筋萎縮症である。出生男児 3500 人に 1 人が罹患する最も頻度の高い、かつ、20 歳代に心不全・呼吸不全で死亡する極めて重篤な疾患である。そのため、ジストロフィン発現を目指した DMD の治療法に関する様々な研究が世界中の研究者によってなされている。申請者は「AO (アンチセンスオリゴヌクレオチド) を用いてジストロフィン遺伝子のスプライシング時にエクソンスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を回復させてジストロフィンの発現をはかる DMD 治療法」を世界に先駆けて提唱した。そして、この方法の臨床への展開を推進し、世界で初めて AO を用いた DMD 治療を実施し、ジストロフィンを発現させることに成功した。この AO 用いた方法の有効性から、世界中の研究者がこの方法を追随するところとなった。現在、この DMD 治療法はジストロフィン遺伝子のエクソン欠失異常に対する世界標準として確立されつつある。

このように、申請者は AO を用いたエクソンスキッピング誘導治療の開発の世界のトップランナーとして、数多くの世界をリードする研究実績をこれまでに積み重ねてきた。その中で、高分子の核酸を用いる AO に代わって、投与方法が容易な低分子化合物を用いたエクソンスキッピング誘導法を世界に先駆けて着想した。そして、驚くべきことに変異エクソンではあるが塩基配列特異的にスキッピングを誘導する低分子化合物を見出し、それを用いてジストロフィンの発現を促進することに成功した。その成果は Nature Commun 誌に掲載され、世界中の研究者からそれまでの常識を打ち破るものとして数多くの驚嘆的賛辞を得た。

この変異エクソンで得られた事実は、正常エクソンでも低分子化合物を用いてエクソンスキッピング誘導が可能なることを強く示唆するものである。したがって、エクソンのスキッピングを誘導する低分子化合物の探索・同定は、世界中の患者が強く望んでいる DMD の画期的な治療法を確立するための喫緊の課題である。

本研究は、この事実を基盤として、DMD の治療の際に標的となるエクソンを対象として塩基配列特異的にスキッピング誘導する低分子化合物をそれぞれ探索・同定をはかるものである。

## 2. 研究の目的

申請者が提唱した「AO (アンチセンスオリゴヌクレオチド) を用いてジストロフィン遺伝子のスプライシング時にエクソンスキッピングを誘導して、ジストロフィンを発現させる Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の治療法」は、現在世界標準の治

療法となりつつある。一方、申請者はこれまでの研究実績から、高分子核酸の「AO」に代わり「低分子化合物」を用いる最先端手法を世界に先駆けて着想した。そして、低分子化合物が変異エクソンではあるがそのスキッピングを誘導し、ジストロフィン発現を促進する事実を明らかにした (Nature Commun、2011)。本研究は、正常のエクソンを塩基配列特異的にスキッピング誘導する低分子化合物を探索・同定し、優れた DMD 治療法の確立をはかるものである。

## 3. 研究の方法

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) のエクソンスキッピング誘導治療では、ジストロフィン遺伝子の欠失したエクソンに隣接する正常なエクソンを標的として、そのスキッピングを誘導する必要がある。しかし、正常なエクソンのスキッピングを誘導することは極めて困難な課題と考えられる。そこで、各エクソンのスプライシング制御特性を解明し、各エクソンをその特性からグループに分類する。そして、グループごとの特性に従った探索を行うことにより、探索の効率化と確実性の向上を図ることをめざした。次いで、各エクソンを挿入したレポーター遺伝子を構築し、これを用いてスキッピングを誘導する低分子化合物を探索・同定する。さらに、同定した化合物の臨床応用性を検討するものである。この化合物探索において効率化を図るため多エクソン同時スプライシング解析系を確立した。

1) 各エクソンのスプライシング制御特性によるグループ化

ジストロフィン遺伝子の 79 ケあるエクソンのスプライシング制御特性をもとに、各エクソンをその特性に応じてグループ分けする。ジストロフィン遺伝子のスプライシングに關与するおびただしい数の制御因子について、各エクソンのスプライシングへの關与の度合いを数値化し、各エクソンの制御特性を明らかにする。その結果と、選択的スプライシングなどのスプライシング時の挙動を指標として decision tree を作成する。これで、すべてのジストロフィン遺伝子のエクソンをスプライシング制御特性に応じたグループに分類する。

2) エクソンスキッピングを誘導するリード低分子化合物の探索・同定

患者の遺伝子診断から明らかにしているエクソンスキッピング治療対象の頻度を考慮し、低分子化合物の探索対象となるエクソンの順位づけを行う。各標的エクソンを組み込んだレポーター遺伝子を構築し、それを培養細胞に導入する。そして、低分子化合物の存在下でスプライシング反応を進行させ、エクソンスキッピング誘導能を有する化合物の同定を図った。

(1) レポーター遺伝子の構築と評価

本研究では、各標的エクソンを組み込ん

だレポーター遺伝子を作成し、HeLa 細胞に導入して、そのスプライシング反応が正常に進むことを、転写産物を RT-PCR 解析して明らかにした。こうして、本レポーター遺伝子システムが正常に機能することを確認した。(2)レポーター遺伝子を用いたエクソンスキッピング誘導する低分子化合物の探索・同定

レポーター遺伝子を導入した HeLa 細胞培養の培地に各種の低分子化合物を添加する。さらに培養を続けたのち、挿入したエクソンのスキッピングを RT-PCR 解析により確認する。このような検討を繰り返し、エクソンスキッピング誘導作用を有する化合物を同定を図った。

### 3)多エクソン同時スプライシング解析系の構築

標的エクソンのスキッピング誘導を個別のエクソン毎にミニ遺伝子を構築し個々に探索するのでは非常に非効率である。そこで、標的となる 11 ケのエクソンのスキッピング同時に解析できる多エクソン同時解析率の構築をはかった。先に構築した 11 ケのミニ遺伝子を一挙に 1 つの細胞に導入、その細胞でスプライシング産物を解析する高性能化を行った。

## 4. 研究成果

### 1)ジストロフィン遺伝子のグループ化

ジストロフィン遺伝子のスプライシング制御特性によりグループ化を図った。ジストロフィン遺伝子の 79 ケのエクソンの内、5' と 3' 端のエクソン 1 と 79 を除いた 77 ケのエクソンについて、そのスプライシング特性を解析した。その結果 77 ケのエクソンは大きく A から E の 5 グループに分類された。各グループ毎のスプライシング制御特性から、それらのグループに属するエクソンのスキッピングを誘導するのに最適な特性について検討した。スプライシング促進配列に大きな特徴のあるエクソンは、この配列に対する A0 を用いることにより、エクソンスキッピング誘導されることが想定された。今回の検討では A0 に代わる低分子化合物の検索となるので、こうした配列に結合するスプライシング制御タンパクの機能をかえることが治療標的になるものと示唆された。

### 2)標的エクソンの特定化

DMD の患者はジストロフィン遺伝子の特定のエクソンの欠失を有する例が多い。そのため、DMD の治療の標的となるエクソンは絞られてくる。さらに、同じエクソン欠失パターンを有する患者数が頻度の高いものから低いものまで多様である。DMD 患者の治療への応用を考えると、より頻度高く治療対象の多いエクソンを標的としたエクソンスキッピング誘導できれば理想的である。こうした検討から、ジストロフィン遺伝子のエクソンのうちの 11 エクソンのスキッピングを誘導する

化合物の探索が急がれることが判明した。

### 3)エクソンスキッピングを誘導する化合物の同定

各標的エクソンを組み込んだレポーター遺伝子を構築し、それを培養 HeLa 細胞に導入した。そして、低分子化合物の存在下でスプライシング反応を進行させ、エクソンスキッピング誘導能を有する化合物の同定をはかった。その中で、エクソンスキッピング誘導能を呈する化合物が少なからず見いだされた。現在、それらの化合物についてその臨床応用性を主眼とした検討を加えている。

ある一つの化合物は、研究者らが既に報告した TG003 という低分子化合物によるエクソンスキッピング誘導作用をさらに増強するという特異な作用を示した。この化合物を TG003 とともに使用することにより、より治療効果が促されるものと大きく期待された。しかし、この見出した化合物は細胞毒性を有しており、実際の臨床応用に際しては慎重であらねばならない。そこで、現在この化合物と類似化合物で毒性の低い化合物を探索中である。

### 4)多エクソン同時解析システムの構築

ジストロフィン遺伝子の 11 のエクソンを H492 ペクターに挿入し、11 種のミニ遺伝子を構築した。そして、各ミニ遺伝子が正常スプライシングを進めることを確認した後、11 種のミニ遺伝子を同時に不死化筋細胞に導入し、スプライシング産物の解析を行った。11 種スプライシング産物が電気泳動により分離され、同時多エクソンスプライシング系が機能することが明らかとなった。

さらに、この系のエクソンスキッピング検出能の有効性を明らかにするために、エクソン 45 のスキッピングの誘導を促進する A0 をこの反応系に導入した。その結果、予想通りエクソン 45 のスキッピング産物の検出と正常スプライシング産物の減少を確認し、この系の有用性を明らかにした。現在この系を用いた低分子化合物の探索を進めている。

## 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 9 件)

Thu Tran, TH., Zhang, Z., Yagi, M., Lee, T., Awano, H., Nishida, A., Okinaga, T., Takeshima, Y., Matsuo, M. 2012. 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, 2012.

DOI: 10.1038/jhg.2012.131

Solyom, S., Ewing, AD., Hancks, DC.,

Takeshima,Y., Awano,H., Matsuo,M., Kazazian,HH,Jr. 2012 Pathogenic orphan transduction created by a non-reference LINE-1 retrotransposon. Hum Mutat ,査読有,33:369-371.

DOI:10.1002/humu.21663

Ota, M., Takeshima, Y., Nishida, A., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., Matsuo, M. 2012. 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,

DOI: 10.1089/gtmb.2010.0276

Malueka,R.G., Takaoka,Y., Yagi,M., Awano,H., Lee,T., Dwianingsih,E.K., Nishida,A., Takeshima,Y., Matsuo,M. 2012. Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers. BMC Genetics. 査読有,31:13-23, DOI: 10.1186/1471-2156-13-23.

Maleuka,R.G., Dwianingsih,E,K., Yagi.M., Lee.T., Nishida.A., Iijima.K., Takeshima.Y., Matsuo.M., 2014 Phosphorothioate Modification of Chimeric 2'-O-Methyl RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acid Oligonucleotides Increases Dystrophin Exon 45 Skipping Capability and Reduces Cytotoxicity Kobe J Med Sci ,査読有,60:E86-94,

Dwianingsih,E,K., Malueka,R.G., Nishida.A., Itoh.K., Lee.T., Yagi.M., Iijima.K., Takeshima.Y., Matsuo.M., 2014. A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy J Hum Genet 査読有,59:423-9,

DOI: 10.1038/jhg.2014.36.

Matsuo.M., Takeshigima, Y., Nishio, H, Contributions of Japanese patients to development of antisense therapy for DMD. Brain Dev in press,査読有,2015

Matsuo, M., Investigational treatments and therapeutic targets in Becker muscular dystrophy . Expert Opin Orphan Drugs in press,査読有,2015,

Nishida.A., Minegishi.M., Takeuchi.A., Niba.ET., Awano.H., Lee.T., Iijima.K., Takeshima.Y.,Matsuo.M., 2014 Tissue and case-specific retention of intron 40 in mature dystrophin mRNA, J Hum Genet in press,査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

尾田綾香、竹内敦子、西田篤史、松尾雅文、スタウロスポリンのジストロフィン遺伝子の変異型エクソン 31 スキッピングの促進、日本薬学会第 135 年会、平成 27 年 3 月 26 日、

「デザイン・クリエイティブセンター 神戸 (兵庫県・神戸市)」

松尾雅文、竹島泰弘、 Duchenne 型筋ジストロフィーの治験推進の新しい枠組みについて、第 57 回日本小児神経学会近畿地方会、平成 27 年 3 月 7 日、「薬業年金会館(大阪府・大阪市)」

西田篤史、松尾雅文、エクソンスキッピング誘導薬の多エクソン同時スクリーニングシステムの確立、日本ゲノム薬理学会第 1 回 学術集会、平成 27 年 2 月 14 日、「三宮コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)」

松尾雅文、分子スイッチとしてのアンチセンスオリゴヌクレオチド：デュシェンヌ型筋ジストロフィー治療への応用、主催・運営ダイアログ株式会社オープンイノベーションを指向した次世代バイオ医薬品創出に向けた Strategy、平成 26 年 12 月 4 日、「品川コクヨホール (東京都・品川区)」

松尾雅文、西田篤史、Niba Tabe Emma Eko、高性能プライシング解析家の確立と新しい DMD 治療法の確立-ジストロフィンプライシング産物の多様性-、精神神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」班会議、平成 26 年 12 月 3 日(水)~4 日(木)、「JA 共済ビルカンファレンスホール (東京都・千代田区)」

松尾雅文、西田篤史、高性能プライシング解析家の確立と新しい DMD 治療法の確立-エクソンスキッピング誘導薬の多エクソン同時スクリーニングシステムの確立-、精神神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」班会議、平成 26 年 12 月 3 日(水)~4 日(木)、「JA 共済ビルカンファレンスホール (東京都・千代田区)」

R.G.Malueka., E.K.Dwianingshi., M.Yagi., H.Awano., T.Lee., A.Nishida., Y.Takeshima.,M.Matsuo., Phosphorothioate modification increases capability of dystrophin exon 45 skipping and reduces cytotoxicity of RNA/ENA chimera、8th International, Congress of the World Muscle Society Asilomar、1-5 October,2013、「California (USA)」

R.G.Malueka., N.Yagi., H.Awano., T.Lee., E.K.Dwianingshi.,A.Nishida., Y.Takeshima., M.matsuo., Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low EC50 in a cell-free splicing system,17th International Congress of the World Muscle Society. 9-13 October 2012, [Western

Australia( Perth)]

〔図書〕(計 1 件)

Takeshima, Y., Yagi, M., Matsuo, M., Optimizing RNA/ENA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing. In Exon skipping: Methods and protocols. A. Aartsma-Rus, . editor Methods 2012, Mol Biol .867:131-141, Human Press New Jersey, DOI:10.1007/978-1-61779-767-5\_9

〔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：  
出願年月日：  
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

松尾雅文 (MATSUO, Masafumi)

神戸学院大学・

総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号 10157266