

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25460666  
研究課題名(和文) 重複変異デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬品による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Antisense Mediated Therapy for Exons Duplication in Duchenne Muscular Dystrophy.

研究代表者  
齊藤 崇 (SAITO, Takashi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・遺伝子疾患治療研究部・客員研究員

研究者番号：40625969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DMD遺伝子の変異によりジストロフィンが欠損するデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて、患者の約10%は同遺伝子のエクソン重複変異により発症する。本研究では当該重複変異へのエクソン・スキップの応用可能性について検討した。エクソン8・9重複を有する細胞に対しエクソン6・7・8を標的としたAONを導入することで、同遺伝子のインフレーム化とジストロフィンの発現回復が認められ、エクソン重複変異に対するエクソン・スキップの応用可能性が示唆された。一方これらを高い再現性をもって安定的に誘導する手法の確立には至らず、今後さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy is a disorder with dystrophin deficiency caused by DMD gene mutation and its 10% patients have exon duplication mutation. This study explored the feasibility of exon-skipping therapy for exon duplication in DMD gene. Cells from DMD patient having exon 8/9 duplication were treated by antisense targeting exon 6/7/8. A restoration to the in-frame mutation and a recovery of dystrophin were observed; suggesting the feasibility of exon-skipping therapy for exon duplication. However, it was not identified what is the best method to achieve stable and reproducible results; and further studies are required.

研究分野：分子生物学

キーワード：応用薬理学 遺伝子診断・治療 筋ジストロフィー

## 1. 研究開始当初の背景

ジストロフィン遺伝子 (DMD 遺伝子) の変異によりジストロフィンが欠損して発症するデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対して、エクソン・スキップはアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AON) を用いてジストロフィンの発現を回復させる根治療法として研究が進められている。AON は pre-mRNA における標的エクソンのスプライシング制御領域に相補的に設計され、スプライシングに介入することで mature-mRNA から当該エクソンを省略 (スキップ) させる。本疾患は DMD 遺伝子の様々な変異形式により発症するが、エクソン欠失によるフレームシフトの場合、欠失領域に隣接するエクソンがスキップされると mature-RNA はインフレームとなり、一部短縮した機能的な dystrophin が発現する。これまでのところ研究の対象はおもにエクソン欠失変異であり、患者の約 10% を占めるエクソン重複変異に対する本手法の応用は十分には検討されていない。

## 2. 研究の目的

DMD 以外の遺伝子も含め、エクソン重複変異に対するエクソン・スキップの検討は少なく、Aartsma らは「単独エクソンの重複は、場合によってはインフレーム化可能。複数エクソンの重複は、インフレーム化できない」と結論づけている (引用文献 1)。しかしながら当該報告では、複数エクソンの重複に対しインフレーム化に必要な全てのエクソンをスキップしておらず、重複変異に対するエクソン・スキップの実現可能性が十分に検討されたとは言いがたい。このような背景を踏まえ、我々はインフレーム化には重複エクソン及び当該領域に隣接したエクソンを含めて、複数のエクソンを同時にスキップさせるマルチエクソン・スキップが有効であるという立場からアプローチすることを計画し、エクソン重複変異 DMD 遺伝子に対して、エクソン・スキップによる mRNA のインフレーム化と dystrophin 発現、ならびに治療法としての応用可能性を探索することを目的に本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム上のエクソン再配置を評価するアレイ CGH 解析

DMD 遺伝子の重複変異に伴うエクソンの挿入、反転等の再配置現象はスプライシングに影響を与えると考えられるため、イントロンに関する情報、重複領域のブレイクポイント等を明らかにすることを目的として、アレイ CGH を用いたブレイクポイント解析を行った。

### (2) スキップ標的エクソンに対する AON 配列の設計

本研究では、主に DMD 遺伝子のエクソン 3~11 に位置する変異を対象とした。既存データベースに基づく Exonic Splicing Enhancer 配列の情報等に基づき、候補配列をエクソンあたり数種類合成し、RT-PCR によるスクリーニングを経て有効な AON 配列を決定した。

### (3) 重複変異に対するエクソン・スキップ

DMD 遺伝子重複変異を有する患者由来線維芽細胞に対して、DMD 遺伝子の発現量を上昇させるために MYOD 遺伝子を導入して筋分化を誘導する。その後エクソン・スキップに必要な AON を細胞に導入し、DMD 遺伝子 mRNA のインフレーム化、ジストロフィン発現について評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム上のエクソン再配置を評価するアレイ CGH 解析

CytoSure DMD array (Oxford Gene Technology) を用いて、エクソン 8・9 重複変異が同定されている DMD 患者のゲノム DNA についてアレイ CGH を行った。その結果、当該検体の変異はエクソン 8・9 がタンデムかつ順方向に接続していることが確認された。また本来のイントロン 9 から重複したイントロン 7 に接続している箇所では、イントロンの合計が最長で 162 kb になることがリファレンス配列から予測されたが、実際には 52 kb であり 110 kb の欠失を伴うことが明らかになった。ブレイクポイントにはイントロン 9 から 7 の接続箇所に 25 base の挿入を伴っていた (図 1)。以上の解析から当該検体がタンデム重複変異であり、エクソン 6・7・8・9 の同時スキップによりインフレームに修正可能であることが予測された。

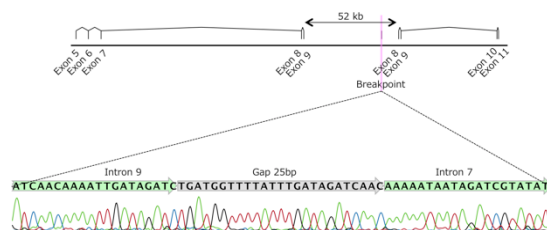


図 1. DMD 遺伝子エクソン 8・9 重複変異のアレイ CGH の解析結果

### (2) スキップ標的エクソンに対する AON 配列の設計

正常ヒト由来線維芽細胞及び横紋筋肉腫由来細胞株を用いた検討、並びに既報告より、モルフォリノ核酸 (Gene Tools) として合成

した AON を、エクソン 6 について 2 配列 (6A, h6B)、エクソン 7 について 2 配列 (7A, 7D)、エクソン 8 について 2 配列 (8G, 8A) 用ずついた。またモルフォリノ核酸にオクタグアニジンデンドリマーを結合させ、細胞透過性を向上させた vivo-morpholino 核酸 (Gene Tools) についても、エクソン 6 について 2 配列 (v6A, v6B)、エクソン 7 について 1 配列 (v7B)、エクソン 8 について 2 配列 (v8G, v8A)、エクソン 9 について 1 配列 (v9A) を合成した。エクソン 9 についてはオルタナティブ・スプライシングにより自発的なスキップの生じることが知られているため、当該エクソンをスキップ対象に含む場合と含まない場合の両方について検討することとした。

### (3) 重複変異に対するエクソン・スキップ

エクソン 8・9 重複変異を有する DMD 患者由来線維芽細胞に MYOD 遺伝子を導入して筋分化を誘導し、ジストロフィン遺伝子の発現量を上昇させた後に、エクソン 6・7・8 を標的とするモルフォリノ AON6 種類を導入した。導入には Endo-Porter (Gene-Tools) を用いた。RT-PCR で解析した結果、重複を有する PCR 産物の全長 1006 bp に対して、エクソン 6・7・8 がスキップされた 221 bp、またオルタナティブ・スプライシングによりエクソン 6・7・8・9 がスキップされた 92 bp の PCR 産物が検出された (図 2)。以上よりエクソン重複変異に対して複数スキップを標的とした AON の投与により、mRNA レベルでのインフレーム化を誘導することが可能であった。

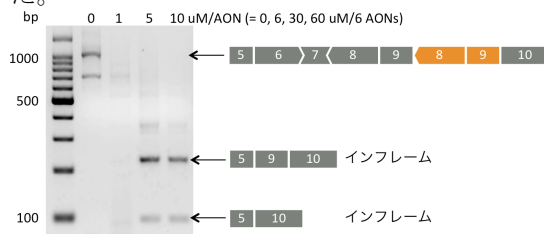


図 2. エクソン 6・7・8・9 スキップ後の RT-PCR

またこれらの細胞についてウェスタンブロットによるジストロフィンの検出を試みたところ、AON を投与した細胞ではジストロフィンのバンドが検出され、これらは正常ジストロフィン 427 kDa に対して理論的に予想される短縮形ジストロフィン 408 kDa のバンドと考えられた (図 3)。

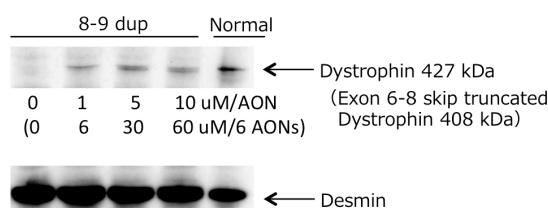


図 3. エクソン 6・7・8・9 スキップ後の WB (Desmin は筋分化マーカーの指標として呈示)

しかしながらこれらの結果を安定的に、かつ再現性をもって得ることは困難であったため、次に vivo-morpholino を用いた手法について検討を行った。しかし vivo-morpholino を用いた検討の結果、モルフォリノと比較して細胞への導入時における至適濃度の特定が困難であり、安定的なエクソン・スキップの誘導自体が困難であった。以上より本研究期間内では、重複変異 DMD 遺伝子に対する複数エクソン・スキップの適用可能性を示唆する結果が得られた。しかしながら安定性・再現性のある手法の確立までには至らなかった。

### <引用文献>

1. Aartsma-Rus A, et al. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy, *BMC Med Genet.* 2007;8:43.

### 5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計 7 件)

- ① Saito T, Ishigaki K, Murakami T, Sato T, Kajino S, Takeda S, Osawa M. Identification of a Duplication Breakpoint in the DMD gene Using Array Comparative Genomic Hybridization, *Journal of Tokyo Women's Medical College*, 査読有, 83(E1), 2013, E20-E24
- ② Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin-alpha2 chain-null congenital muscular dystrophy mice, *Human Molecular Genetics*, 査読有, 22, 2013, 4914-4928
- ③ Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda S, Kawai M. Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy), *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 査読有, 8, 2013, DOI:10.1186/1750-1172-8-60
- ④ Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S. Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients, *Journal of neurology*, 査読有, 260, 2013, 3023-3029, DOI: 10.1007/s00415-013-7104-y
- ⑤ Echigoya Y, Aoki Y, Miskew B, Panesar D, Touznik A, Nagata T, Tanihata J, Nakamura A, Nagaraju K, Yokota T. Long-term efficacy of systemic multiexon skipping targeting dystrophin exons 45-55 with a cocktail of vivo-morpholinos in mdx52 mice. *Molecular*

Therapy Nucleic Acids, 査読有, 4, 2015, e225, DOI:10.1038/mtna.2014.76.

- ⑥ Nakamura A, Fueki N, Shiba N, Motoki H, Miyazaki D, Nishizawa H, Echigoya Y, Yokota T, Aoki Y, Takeda S. Deletion of exons 3~9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy, J Hum Genet, 査読有, 61, 2016, AOP\_1-5, DOI:10.1038/jhg.2016.28
- ⑦ 齊藤 崇, 武田伸一. 選択的スプライシングを調節するアンチセンス医薬品の開発について, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 査読無, 45, 2014, 23-32

[学会発表] (計 3 件)

- ① Takeda S. Exon Skipping Approach To Duchenne Muscular Dystrophy, The 12th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC)Scientific Meeting, 2013 年 6 月, Xian China
- ② 永田哲也, 齊藤 崇, 清水玲子, 小牧宏文, 武田伸一. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン 53 スキップによる早期探索的臨床試験, 第 31 回日本神経治療学会総会, 2013 年 11 月, 東京
- ③ Saito T, Nagata T, Masuda S, Tanihata J, Ohata M, Tamaura A, Kanazawa M, Minami N, Goto K, Hayashi Y, Iwasawa K, Tatezawa K, Fukuda K, Mizutani T, Shimizu R, Suzuki M, Yamaguchi K, Tachimori H, Nishino I, Goto Y, Komaki H, Takeda S. Assessment of the Dystrophin Gene Exon 53 Skipping Using DMD Patient-Derived Fibroblasts for Exploratory Clinical Trial of Antisense Drug NS-065/NCNP-01, American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 2014 年 5 月, Marriott Wardman Park, Washington, DC, USA

[図書] (計 2 件)

- ① 永田哲也, 武田伸一 (内野 誠 監), 筋疾患診療ハンドブック, 中外医学社, 2013
- ② 齊藤 崇 (情報技術協会 編), 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発, 情報技術協会, 2014

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

齊藤 崇 (SAITO, Takashi)  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 客員研究員  
研究者番号: 40625969

### (2)研究分担者

永田哲也 (NAGATA, Tetsuya)  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 客員研究員  
研究者番号: 50362976

武田伸一 (TAKEDA, Shin'ichi)  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長  
研究者番号: 90171644

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

青木吉嗣 (AOKI, Yoshitsugu)  
谷端 淳 (TANIHATA, Jun)  
中村昭則 (NAKAMURA, Akinori)  
増田 智 (MASUDA, Satoru)  
本橋裕子 (MOTOHASHI, Yuko)  
横田俊文 (YOKOTA, Toshifumi)