

平成 28 年 6 月 27 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：25461303

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスを用いた筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療の開発

研究課題名(英文) Development of AAV-induced exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

永田 哲也 (Nagata, Tetsuya)

国立研究開発法人国立精神・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ジストロフィン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、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて、エクソン・スキップの治療法の開発を検討した。U7 snRNAとアンチセンス配列を組み込んだAAVを構築し、細胞において、その効果が確認された。さらにマウスにおいてもエクソン・スキップと蛋白の発現が認められた。また長期持続性も確認された。この方法は、DMDに対するエクソン・スキップ療法を更に発展させる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Antisense-mediated exon skipping is one of the most promising therapeutic tools for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD), which is caused by mutations in the dystrophin gene. Here, we tried to develop the adeno-associated virus (AAV)-induced exon skipping therapy for DMD. U7 snRNAs harboring antisense motifs induce skipping of exon 51, and thus restore dystrophin expression. Furthermore, we show the efficacy of these constructs in vivo in mdx. Our constructs are promising for the optimization of therapeutic exon skipping for DMD.

研究分野：神経内科

キーワード：エクソン・スキップ トランスレーショナルリサーチ アンチセンス・オリゴヌクレオチド アデノ随伴ベクター デュシェンヌ型筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子 (DMD) の変異によるジストロフィン (dystrophin) の欠損のため、筋線維の変性・壊死きたし進行性の筋力低下をみる致死性の遺伝性筋疾患である。筋ジストロフィーの中で最も頻度が高い。小児期に発症し、20~30 歳代で呼吸不全あるいは心不全で死亡する。現在、根本的な治療法は存在しないが、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AON) によるエクソン・スキップ療法は、研究および臨床開発の進展がめざましい。AON は pre-mRNA のスプライシング制御領域に相補的な約 25 塩基対程度の一本鎖ヌクレオチド配列で、人工核酸医薬品である。AON は、標的エクソンのスプライシングを抑制し、mRNA からスキップさせる。エクソン欠失によるフレームシフト変異の場合、欠失領域に隣接するエクソンがスキップされると mRNA 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。エクソン 51 スキップでインフレームとなるエクソン欠失変異患者の割合は最多 (DMD 患者の 13%) であることから、エクソン 51 スキップの治療が先行しており、dystrophin の発現と歩行機能の改善などが報告され、有望視されている。我々は、これまでに、筋ジストロフィー犬やマウスなどの DMD モデル動物を対象にエクソン・スキップの基盤研究を実施してきた。一方で AON を用いたエクソン・スキップ療法には、その心臓への移行性や反復投与が必要など限界も明らかになりつつある。このような背景を踏まえ、DMD の治療法としてアデノ随伴ウイルス (9 型 AAV) / 改変 U7 snRNA /

マルチ・カセットシステムを用いた、エクソン・スキップ治療の開発を目指す。我々は 9 型 AAV ベクターでは静脈内投与で、心筋において一年半以上発現する持続や、線維化の予防を確認しており、心筋でのスキップが期待出来る。(Shin et al, *Gene Ther*, 2011) また AAV はウイルスの中では唯一、欧州医薬品評価委員会が販売承認を推奨した Glybera があるなど、臨床応用の可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

エクソン・スキップは AON を用いてジストロフィンの発現を回復させる治療法として、これまでに我々は、その安全性と有効性を示してきた。今回は従来技術をさらに発展させ、心筋にも効果的な 9 型 AAV を応用し、エクソン・スキップ治療の臨床応用に向けた治療法の開発を目的とする。アンチセンスの担体として、9 型 AAV ベクターを応用し、改変 U7 snRNA によるアンチセンス送達システムを検証する。AAV ベクターを応用したエクソン・スキップは、心筋にも長期的に作用し、複数のエクソンを一度に標的とした次世代のエクソン・スキップ治療法として期待出来る。

3. 研究の方法

AAV/改変U7snRNA/マルチ・カセットの構築および投与実験

すでに、エクソン・スキップに最適なアンチセンス配列は決定しており、それに基づき 9 型 AAV/改変 U7 snRNA を構築し、ウイルスを作成する。その後、マウス由来細胞を用いて、そのスキップ効果

を確認する。効果確認後、このアンチセンス配列でスキップ後にジストロフィンの発現が確認できるマウスの前脛骨筋に局所投与し、効果を検討する。その後、全身投与を検討する。

ヒト由来細胞株を用いたエクソンごとの配列の設計と組み合わせのスクリーニング

より効果的なスキップを目指すために dmd 遺伝子のエクソン 45-55 領域にあるエクソンで最適配列が得られていないエクソンに対して、エクソン内スプライシング促進配列近傍、スプライス・アクセプターおよびドナーを標的に 25 mer のアンチセンス配列を 5-10 種類ずつ設計し、モルフォリノ人工核酸を合成する。その後、ヒト細胞を用いて各エクソンを最も効率良くスキップする配列をスクリーニングし、配列を決定する。その後、様々な組み合わせを検討して、エクソン 45-55 を同時にスキップさせる最も効率的な組み合わせを決定する。

4. 研究成果

AAV/改変 U7snRNA/マルチ・カセットの構築および投与実験

これまでに我々が示したマウスのエクソン 51 スキップの有効配列であるエクソン 51 のアクセプターおよびドナーに対するアンチセンス配列を決定した。ssAAV には、それぞれ 5 個ずつのタンデムで発現するように作製した。また scAAV に対しては、それぞれ一種類ずつ導入している。その後、マウス由来細胞 C2C12 で感染させ、エクソン 51 のスキップを確認している。両者に skipping 効率に大きな違いを認めていない。

その後、mdx52 の前脛骨筋に対して、投与して検討した。その結果、筋肉においても 2 種類のベクターの両方で skipping が確認できた。ただ効果に関しては、ほぼ同等であったが充分 skipping が誘導できることが確認できた。6 および 12 か月投与でもスキッピングの持続が確認された。12 ヶ月では効果の減弱が認められた。全身投与に関しては skipping 効率が弱いために用量を増量して行った。用量の増加により効果は低い骨格筋・心臓での skipping が確認された。

ヒト由来細胞株を用いたエクソンごとの配列の設計と組み合わせのスクリーニング

これまでに有効なスキップを起こす配列を同定できていないエクソンに対して、ヒト由来細胞で検討を行った。具体的にはエクソン 47/48/49/52/54 について、skipping を起こす候補配列をモルフォリノで数種類ずつ合成した。その配列を用いて効率よく skipping を起こす最適配列を確定した。その後、エクソン 45 から 55 に対するスキップさせる 11 種類のモルフォリノを合成して、4 種類の DMD 患者線維芽細胞から myoD で分化させた筋芽細胞で検討した。対象としたのはエクソン 45-50 欠損、48-52 欠損、54 欠損、46-50 欠損の DMD 患者由来でいずれも 45-55 スキップで in-frame 化する。mRNA の解析では 45-55 スキップ一致するバンドが観察された。しかしながら、ウェスタン・プロットでは、45-51、48-53、54-55 スキップに一致するジストロフィンの発現は確認されたが、45-55 スキップに一致するジストロフィンは確認できなかった。こ

のことは 45-55 skipping は mRNA レベルでは起こるが、より長い in-frame した mRNA からのジストロフィン転写が細胞内で優先されており、今後、更なる配列の調整が必要と考えられた。

5. 主な論文発表等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kuraoka M, Kimura E, Nagata T, Okada T, Aoki Y, Tachimori H, Yonemoto N, Imamura M, Takeda S. Serum Osteopontin as a Novel Biomarker for Muscle Regeneration in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am J Pathol.* 57, 386-8, 2016 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2016.01.002.
2. Kimura K, Morita H, Daimon M, Kawata T, Nakao T, Lee SL, Hirokawa M, Ebihara A, Nakajima T, Ozawa T, Yonemochi Y, Aida I, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Komaki H, Segawa K, Takenaka K, Komuro I. Prognostic impact of venous thromboembolism in patients with Duchenne muscular dystrophy: Prospective multicenter 5-year cohort study. *Int J Cardiol.* 191, 178-80, 2015 査読有 doi: 10.1536/ihj.15-461.
3. Masaki Y, Inde T, Nagata T, Tanihata J, Kanamori T, Seio K, Takeda S, Sekine M: Enhancement of exon skipping in mdx52 mice by 2'-O-methyl-2-thioribothymidine incorporation into phosphorothioate oligonucleotides. *Med Chem Commun* 6: 630-633, 2014 査読有 doi: 10.1039/C4MD00468J
4. Echigoya Y, Aoki Y, Miskew B, Panesar D, Touznic 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. *Mol Ther Nucleic Acids* 4 :e225, 2015 査読有 doi: 10.1038/mtna.2014.76.
5. Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S. Necroptosis Drives Motor Neuron Death in Models of Both Sporadic and Familial ALS. *Neuron.* 5;81(5):1001-8, 2014 査読有 doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.011.
6. 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-2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 22(24):4914-28, 2013 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddt341.
7. Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Morita H, Nakajima T, Ozawa T, Aida I, Yonemochi Y, Higuchi S, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Ishihara T,

Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Yatomi Y, Nagai R, Komuro I. Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy - Prospective multicenter cohort study. Int J Cardiol. 2013 168(3):1900-4, 2013 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2015.04.244.

Aoki Y, Nakamura A, Takeda S: Truncated dystrophin with exon 45-55 deletion induced muscle atrophy and fiber type change through the hyper-nitrosylation of the ryanodine receptor type-1 and constant release of Ca²⁺ to the cytosol. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany, 10.8, 2014

[学会発表] (計3件)

1. Saito T, Nagata T, Masuda S, Aoki Y, Suzuki M, Nakamura H, Komaki H, Takeda S. First-in-Human Study of NS-065/NCNP-01; the Morpholino Based Antisense Oligonucleotide for Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 18th Annual meeting USA, 5.14, 2015
2. 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, Washington DC, USA, 5.21, 2014
3. Tanihata J, Nagata T, Saito T, Ito N,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 哲也 (Nagata, Tetsuya)
独立行政法人国立精神・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

(2) 研究分担者

1) 岡田 尚巳 (Okada, Takashi)
日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)
教授
研究者番号 00326828

2) 齊藤 崇 (Saito, Takashi)
独立行政法人国立精神・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・
流動研究員
研究者番号 40625969