

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860803

研究課題名(和文)ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物の探索

研究課題名(英文)Screening for small chemicals that induces skipping of exon in the dystrophin gene.

## 研究代表者

西田 篤史(Nishida, Atsushi)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・研究員

研究者番号：80640987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、Duchenne型筋ジストロフィーに対し、低分子キナーゼ阻害剤であるTG003を使用したエクソンスキッピング誘導治療法の可能性を報告した。本研究は、より優れた低分子化合物の探索を行うものである。

。探索の結果、タンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミドがエクソンスキッピング作用を持ち、TG003との同時投与により、エクソンスキッピングが相乗的に増加することを見出した。また、キナーゼ阻害薬であるスタウロスポリンがTG003と比し強力にエクソンスキッピングを促進し、ジストロフィンの発現を改善することが明らかになった。これらの化合物は、臨床応用可能な化合物のリード化合物となり得る。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common inherited muscle disease caused by a mutation in the dystrophin gene. In our previous report, we showed a possibility of DMD therapy using a small chemical kinase inhibitor TG003, via enhancing a nonsense mutated exon skipping. In this study, we tried to find superior small chemicals. As a result of screening, we found that cycloheximide (CHX) has the exon skipping activity, moreover CHX enhanced the exon skipping synergistically with TG003. However, CHX is not suitable for clinical use for its toxicity. Then, we tested other compounds that have been reported to modify the splicing, and found staurosporine (STS), a kinase inhibitor. STS was shown to enhance mutated exon skipping more efficiently compared to TG003. Furthermore, STS was shown to increase the dystrophin protein expression in the immortalized cells derived from DMD patient's muscle. CHX and STS could be nominated as candidates for leading compounds.

研究分野：分子生物学

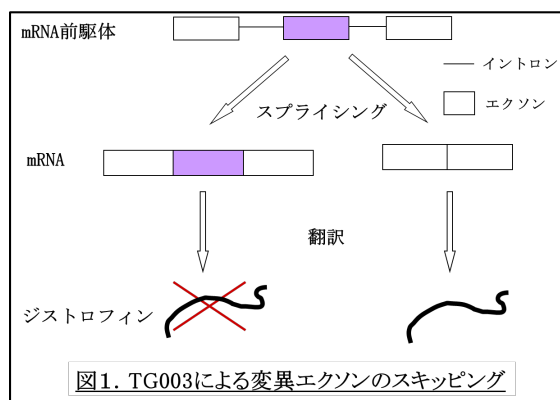
キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー エクソンスキッピング スプライシング操作

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って発症する頻度の高い遺伝性筋疾患であり、出生男児 3500 人の 1 人に発症する。DMD 患者はジストロフィンの欠損により進行性の筋萎縮を示し、心不全あるいは呼吸不全により 20 歳代で死に至る。DMD では多くの場合ジストロフィン遺伝子のエクソン単位での欠失によってジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠がずれ、早期終止コドンが出現する結果、ジストロフィンが欠損し発症する。またナンセンス変異により早期に終止コドンが出現する場合も同様である。

研究協力者である松尾らにより提唱された、核酸医薬であるアンチセンスオリゴヌクレオチド (AO) を用いてスプライシングの際にエクソンスキッピングを誘導することによりアミノ酸読み取り枠の修復を行い、ジストロフィンタンパク質の発現を図る方法は、最も有望な DMD 治療法である (Takeshima et al, J Clin Invest. 95(2):515-20. 1995)。現在、数種類の AO が臨床試験の段階にある。しかしながら、AO の量産にはコストが掛かることや、巨大分子である AO のドラッグデリバリーが難しいことから、低分子化合物への期待は大きい。

申請者は、独自のスプライシング解析系を用い、エクソンスキッピングを誘導する低分子化合物を探索した。その結果、キナーゼ阻害薬である TG003 がナンセンス変異を持つエクソンのスキッピングを誘導することを発見した。さらに、患者由来の筋培養細胞での検証を行った結果、TG003 が患者培養筋細胞において変異エクソンのスキッピングを促進し、機能的なジストロフィンタンパク質の発現を促すことを見出した (図 1)。この成果は Nature communications 誌に掲載され、各種メディアにも取り上げられるなど、世界中に数多く存在する DMD 患者に新たな治療法として希望を与えた (Nishida et al, Nat Commun. ncomms1306, 2011)。



2. 研究の目的

本研究では、新たな候補化合物の作用機序を解明し、その結果に基づき臨床応用が可能な、より優れた候補化合物の探索を行う。そ

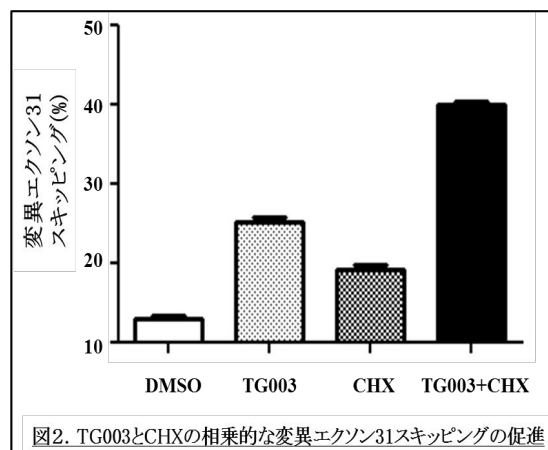
して候補化合物の薬効、および TG003 との併用効果を検証する。TG003 を超える化合物の発見、あるいは TG003 の増強剤を発見することは、DMD 治療を飛躍的に発展させるものとして、全世界の DMD 患者に朗報となる。

3. 研究の方法

候補化合物あるいは TG003 に対し、次世代シーケンサーを用いて、分子レベルでの作用機序の解明を行う。この結果得られた作用機序の情報をもとに、さらに強力で特異性の高い化合物の探索を行う。そしてこれらの化合物に関し、独自の in vitro スプライシング解析系での評価を行う。さらに、in vitro で効果が確認された化合物に関し、患者由来の培養筋細胞を用いて、RT-PCR によるスプライシングの解析、そして western blot によるジストロフィンタンパク発現の検証を行う。

4. 研究成果

新たな候補化合物に対し、ジストロフィン遺伝子のハイブリッドミニ遺伝子プラスミドと HeLa 細胞を使用した解析を行った。その結果、タンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミド (CHX) が、TG003 と同様に、ナンセンス変異型エクソン 31 のスキッピングを誘導していることを見出した。さらに、TG003 と CHX を同時投与した場合、TG003 あるいは CHX を単独で投与した場合に比し、エクソンスキッピングが相乗的に増加することを見出した (図 2)。また、数種類のタンパク合成阻害薬を試したところ、エクソンスキッピング作用を持たないものが多く、エクソンスキッピング作用は、タンパク合成阻害作用に依存するものではないと考えられる。なお、上述の研究成果に関し、The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics において Cycloheximide enhances skipping of mutated DMD exons synergistically with TG003 と題したポスター発表を行った。



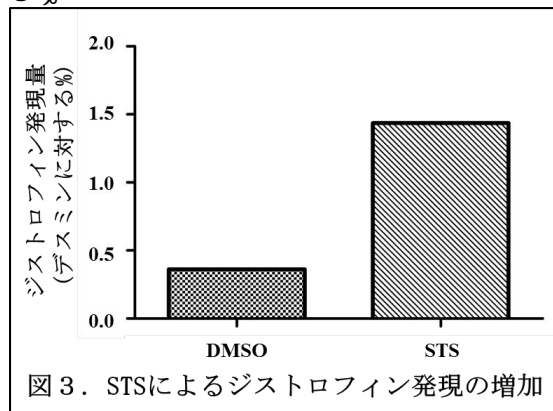
また、報告者は次世代シーケンサーを用いて、エクソンスキッピングの作用機序の解明を試みた。エクソン 31 にナンセンス変異をもつ患者由来の筋細胞を不死化した培養細胞

胞に TG003 を投与し、Ion Torrent PGM (Life Technologies) による解析を行った。対照には、TG003 の溶媒である DMSO を使用した。TG003 による遺伝子発現の変化を CLC-Bio work bench 7.0(Filgen)を用いて解析した結果、スプライシングに関連する遺伝子への影響は見いだせず、作用機序の解明には至らなかった。

次に、スプライシングに影響を及ぼすことが知られている新たな候補化合物に対し、ジストロフィン遺伝子のハイブリッドミニ遺伝子プラスミドと HeLa 細胞を使用した解析を行った。その結果、キナーゼ阻害薬であるスタウロスポリン(STS)が、TG003 と同様に、ナンセンス変異型エクソン 31 のスキッピングを誘導していることを見出した。また、TG003 は Clk1(CDC-Like Kinase 1)のエクソン4のスキッピングを阻害することが知られている。そこで、STS が Clk1 のエクソン4のスキッピングに及ぼす影響を調べたところ、TG003 とは逆に、スキッピングを促進することが分かった。このことから、TG003 と STS は異なるメカニズムで変異ジストロフィンエクソン 31 のスキッピングを促進していると考えられた。

STS の構造類縁体である、ミドスタウリン、エンザスタウリンについてもナンセンス変異型エクソン 31 のスキッピング誘導能を検証したが、これらの化合物はスキッピング能を持たないことが分かった。

さらに、エクソン 31 にナンセンス変異を持つ患者由来の不死化筋培養細胞を使用した解析を行った。内在性の変異ジストロフィンエクソン 31 のスキッピングを RT-PCR により解析したところ、5 nM の STS によりスキッピングが促進されていることが確認出来た。そして、ジストロフィン抗体を使用したウエスタンブロット法により、タンパクレベルでの薬効評価を行った。筋細胞の内在性コントロールであるデスミンとジストロフィンの発現比を計算した結果、5 nM の STS により、DMSO と比し、ジストロフィンタンパクの発現が約 3 倍増強することが明らかとなった(図 3)。



これらの結果に関する論文は Brain & Development に Staurosporine allows dystrophin expression by skipping of

nonsense-encoding exon”として受理された。(印刷中)

以上、エクソンスキッピング作用機序の解明には失敗したが、新たな候補化合物として、CHX および STS がジストロフィンの変異エクソンのスキッピングを誘導することを見出した。しかしながら、CHX および STS は毒性を持ち、臨床への応用は難しい。今後、これらの化合物をリード化合物として、より優れた化合物を探索することが必要である。

#### 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1件)

Atsushi Nishida, Ayaka Oda, Yasuhiro Takeshima, Atsuko Takeuchi, Hiroyuki Awano, Tomoko Lee, Arihiro Hashimoto, Masafumi Matsuo, Brain and Development, 査読有, Staurosporine expresses dystrophin by skipping of nonsense encoding exon 31, 2016, 印刷中, doi: 10.1016/j.braindev.2016.03.003

〔学会発表〕(計1件)

Atsushi Nishida, Yasuhiro Takeshima, Tomoko Lee, Toru Takarada, Masafumi Matsuo, Cycloheximide enhances skipping of mutated DMD exons synergistically with TG003, The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2014年10月19日, San Diego Convention Center (Exhibit Hall E)

〔図書〕(計0件)

〔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：  
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

西田 篤史 (NISHIDA, Atsushi)

神戸学院大学

総合リハビリテーション学部 研究員

研究者番号：80640987

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：