

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04756

研究課題名(和文) DMDエクソン46-55欠失iPS細胞を用いたエクソン45スキップ治療の検討

研究課題名(英文) Exon 45 skipping therapy using iPS cells deleted exons 46-55 in the DMD gene

研究代表者

中村 昭則 (Akinori, Nakamura)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10303471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：DMD遺伝子エクソン45-55欠失患者の骨格筋障害は極めて軽微であるため、我々は、エクソン45-55領域全体をスキップすれば、同領域内に変異を有する多くのDMD患者が治療対象となることを提案してきた。そこで、エクソン46-55欠失を持つDMD患者の末梢Tリンパ球からiPS細胞を樹立し、心筋細胞への分化後にアンチセンスモルフォリン(PMO)を用いてエクソン45スキップ治療を行った結果、エクソン45スキップの効率はPMO用量依存性に起こり、ジストロフィンの発現回復を確認した。さらに、cDNAマイクロアレイ解析では治療前後の遺伝子発現に差はなく、本治療が安全に行うことができることを示した。

研究成果の概要(英文)：A deletion of exons 45-55 in the DMD gene is associated with mild skeletal muscle involvement. Many DMD patients having a mutation within exons 45-55 region could be treated if we were able to skip the entire exon 45-55 region. We established iPS cell lines from T lymphocytes donated from DMD patient with a deletion of exon 46-55, and differentiated iPS cells toward cardiomyocytes. The cardiomyocytes supplemented with phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) to skip exon 45. The efficiency of exon 45 skipping was occurred with dose-dependent manner. We confirmed a recovery of short length dystrophin proteins. The microarray showed there was no significant difference in the profiling of gene expression between before and after the therapy. The exon skipping therapy using PMO was little affecting other gene expression, and it was possible for exon skipping therapy safely.

研究分野：神経内科学

キーワード：ジストロフィン エクソン・スキップ治療 アンチセンスオリゴヌクレオチド iPS細胞 心筋細胞 網羅的遺伝子発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性の筋萎縮と筋力低下を来す X 連鎖性の致死性筋疾患である。2 歳頃から起立歩行の障害が起こり、10 歳代で車椅子生活、30 歳前後で心不全または呼吸不全で死亡する難病である。DMD の骨格筋は変性壊死と再生を繰り返すが、進行に伴い線維や脂肪に置換される。DMD に対する根本治療として短縮型 DMD 遺伝子とウイルス・ベクターを用いた遺伝子治療、アンチセンス薬を用いたエクソン・スキップ治療、骨格筋の幹細胞を用いた細胞移植治療などが検討されている。中でもエクソン・スキップ治療は遺伝子変異に伴うアミノ酸の読み枠を修正して、短縮型であっても機能を有するジストロフィンを発現させることで、臨床症状の改善が期待される。我々は、DMD モデル動物である筋ジストロフィー犬の DMD 遺伝子変異に対してアンチセンス薬 (人工核酸モルフォリノ) を用いたエクソン・スキップ治療により筋変性が軽減し、筋機能も改善することを報告した<sup>1</sup>。また、モデルマウスを用いた検討でも、モルフォリノは強力なエクソン・スキップの効果と高い安全性を持つことが示され<sup>2</sup>、DMD 患者に対する治療として臨床応用が進められている。DMD 遺伝子は 79 個のエクソンを有しているが、DMD 遺伝子の変異がエクソン 3~7 とエクソン 45~55 に多く集積している<sup>3</sup>。最近、本邦における筋ジストロフィー登録システム (Registry of muscular dystrophy) を基にした調査研究から、日本人 DMD 患者の遺伝子変異がエクソン 45~54 に多く集中していることが報告された<sup>4</sup>。我々は、以前に DMD 遺伝子エクソン 45 55 欠失した複数の患者が、例外なく極めて軽症であることを報告してきた<sup>5</sup>。また、海外からも同様の成果が報告された<sup>6</sup>。その後も、無症状であるもの的高CK血症を示したエクソン 45 55 欠失患者を多数見出している。このことは、エクソン 45 55 が欠損したジストロフィンが正常に近い機能を有していることを示唆している。多数の DMD 患者がエクソン 45 55 内に変異を有していることから、エクソン 45~55 内に変異を持つ DMD 患者に対してアンチセンス薬 (人工核酸) を用いたエクソン 45 55 スキップ治療を行うことで、機能的なジストロフィンの発現が回復し、臨床病型を最軽症型に変換出来る可能性がある。そこで我々は、エクソン 45 55 スキップ治療が、DMD に対しても極めて有効かつ幅広い適応を有することを提案してきた<sup>7</sup>。我々は、既にエクソン 52 が欠失した DMD モデルマウスを用いたエクソン 45 55 スキップ治療によりジストロフィンの発現と筋機能の改善に成功した<sup>8</sup>。DMD の死因は心不全や不整脈によることが多くなっていることやエクソン・スキップ治療は心臓に対しては骨格筋に比べてより限定的であった。モデル動物を用いた場合に、その分子機構を解明することは困難であり、

培養細胞系での解明が求められている。最近、induced pluripotent stem 細胞を用いて各種細胞に誘導することで、再生治療や創薬に大きな発展をもたらしている。皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞から心筋細胞を効率的に作り出す技術も確立された<sup>9</sup>、ことから本モデルを用いて、DMD 患者心筋細胞を用いたエクソン・スキップ治療の効果について検討できると考えられる。

### 2. 研究の目的

DMD の薬物治療開発では、ジストロフィンが発現している細胞での評価が必要であること、iPS 細胞が創薬に極めて有用であることから、本研究では DMD 患者の末梢 T リンパ細胞由来の iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導を行い、エクソン・スキップ治療によるジストロフィンの発現回復の確認と網羅的遺伝子発現について検討することを目的とする。具体的には、信州大学医学部附属病院に通院中のエクソン 46 55 欠失を持つ DMD 患者の末梢 T リンパ細胞から iPS 細胞を作成する。この iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導し、ジストロフィンの発現や分化細胞における遺伝子発現について検討を行う。さらに、エクソン 46 55 欠失 DMD 患者由来の分化細胞に対しアンチセンス薬を用いたエクソン 45 スキップを行い、人工的にエクソン 45 55 欠失を誘導し、ジストロフィンの発現を確認する。また、網羅的遺伝子発現解析を行い、他遺伝子へのアンチセンス薬によるオフターゲット効果について検討を行う。

### 3. 研究の方法

アンチセンス PMO によるエクソン 45 55 スキップの効果検証のため以下の実験を行った。

- (1) エクソン 46 55 欠失変異を持つ DMD 患者から採血より T リンパ球を分離する。
- (2) T リンパ球細胞から OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC の各遺伝子をエレクトロポレーション法で導入して iPS 細胞へ誘導する。
- (3) iPS 細胞から CHIR、MG+ActivinA、CHIR+BMP4、Xav により心筋細胞への分化誘導を行う
- (4) iPS 細胞由来心筋細胞に対し、新たに設計したエクソン 45 を標的とするアンチセンス PMO を投与してエクソン 45 スキップさせてエクソン 45 55 欠失型に誘導する。
- (5) エクソン 45 55 欠失を誘導した心筋細胞について治療前後において RT-PCR 法を用いてエクソン・スキップの効率、免疫組織化学およびウエスタンブロット法を用いてジストロフィンタンパク質の発現について検討する。
- (6) マイクロアレイを用いてエクソン・スキップ治療前後における網羅的遺伝子発現解析を行い、オフターゲット効果について検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では、iPS細胞を心筋細胞への分化誘導実験を中心に行った。これは、筋ジストロフィーのモデルマウスやモデルイヌを用いた*in vivo*実験では、骨格筋に比して心筋ではアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入効率が極めて悪かったこと、さらに従来、培養初代心筋細胞を用いた*in vitro*でのエクソン・スキップ実験が不可能であったためである。また、DMDを示す遺伝子変異を無症候性の表現型となるエクソン45-55欠失型に変換できることを前提としていたことから、今回はエクソン46-55が欠失したDMD患者を対象として研究を行った。

はじめに、DMD患者の末梢Tリンパ球からiPS細胞を作製し、SCIDマウスへの皮下投与によりteratomaが発生したことから、多分化能を有する細胞であることが確認できた。また、karyotypeに異常がないこと、OCT4、SSEA-4、NANOGの発現も確認した。心筋特異的分化誘導因子により心筋細胞へ分化誘導したところ、心筋細胞の拍動、トロポニンIの発現を免疫組織化学で確認した。

iPS細胞化から分化誘導した心筋細胞に対してアンチセンスPMO（5および10 $\mu$ M）によりエクソン45スキップ治療を行ったところ、細胞から抽出したmRNAを用いたRT-PCR法によりPMOの用量依存性にエクソン45スキップが起こることが分かった。スキップされたPCR産物はシークエンス法によりエクソン45が欠失したことを確認しえている。ジストロフィンタンパク質の発現については免疫組織化学ではジストロフィンタンパク質が細胞膜に発現を認め、ウエスタンブロット法では正常よりもやや短縮している約380 kDaのジストロフィンタンパク質の発現回復を確認した。

治療に用いたPMOによるオフターゲット効果についてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行ったが、発現量が2倍を超える遺伝子がなかったことから、オフターゲット効果は極めて少ないと考えられた。

今回、iPS細胞を用いた*in vitro*実験が確立したことに加えて、従来の*in vivo*実験の報告とは異なり培養心筋細胞でのエクソン・スキップ効率は十分に高いことが分かった。この結果から、*in vivo*と*in vitro*のエクソン・スキップ効率に関する差異を解明することが、核酸治療開発における重要な示唆を与える可能性があると考えられる。

今後の方針として、共焦点顕微鏡およびカルシウム感受性蛍光プローブ（Fluo-4 AM）を用いた高速Ca<sup>2+</sup>濃度測定法を用いて、各々の心筋細胞における自発性Ca<sup>2+</sup>を調べ、イソプロテレノールの添加による心筋の陽性変力負荷での変化を評価する。心筋細胞の収縮力評価としてゲル上に心筋細胞を培養し、心

筋の収縮によって生み出されるゲルの歪みについて、ゲルに包埋された蛍光ナノビーズの変位場を蛍光顕微鏡による撮像（75フレーム/s）イメージからparticle image velocimetry（PIV）プログラムを用いて計算し、抽出されたデータをFourier transform traction cytometry（FTTC）法を用いて検討する。心筋細胞における導入効率についてスカベンジャー受容体の関与の検討を行うことを検討している。

本研究から、iPS細胞より誘導した心筋細胞を用いた実験のノウハウとエクソン・スキップ治療の成功から、骨格筋、平滑筋、神経細胞に対しても応用展開していきたいと考えている。

#### <引用文献>

1. Yokota T, Lu QL, Partridge T, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 2009; 65(6): 667-676.
2. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, et al. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther* 2010; 18(11): 1995-2005.
3. Passos-Bueno MR, Barker E, Kneppers AL, et al. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; 51(5): 1150-1155.
4. Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, et al. Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet J Rare Dis* 2013; 19: 18: 60.
5. Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, et al. Follow-up three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD9) gene. *J Clin Neurosci* 2008; 16(7): 757-763.
6. Beroud C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat* 2007; 28(2): 196-202.
7. Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathol* 2009; 29(4): 494-501.
8. Aoki Y, Yokota T, Nagara T, et al. Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *PNAS* 2012; 09(34): 13763-13768.
9. Tohyama S, Hattori F, Sano M. et al. Distinct metabolic flow enables large scale purification of mouse and human pluripotent

stem-cell derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 2013; 12(1): 127-137.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

佐藤充人、宮崎大吾、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則：DMD 遺伝子 del. 46-55 変異を持つ DMD 患者の iPS 細胞より誘導した心筋細胞に対する exon 45 skip 治療に関する研究。第 11 回筋ジストロフィー治療研究会、2016 年 10 月 29 日、松島

宮崎大吾、佐藤充人、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則：DMD 遺伝子 del.46-55 変異を持つ DMD 患者の iPS 細胞由来心筋細胞の作製と網羅的遺伝子発現解析。第 3 回日本筋学会学術集会 2017 年 8 月 4 日、小平

佐藤充人、宮崎大吾、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則：DMD 遺伝子 del. 46-55 変異を持つ DMD 患者の iPS 細胞より誘導した心筋細胞に対する exon 45 skip 治療。第 3 回日本筋学会学術集会 2017 年 8 月 4 日、小平

佐藤充人、宮崎大吾、柴祐司、越後谷裕介、横田俊文、青木吉嗣、武田伸一、中村昭則：DMD 患者 iPS 細胞由来の心筋細胞に対する網羅的遺伝子発現解析を用いた心筋障害の発症機序に関する研究。第 12 回筋ジストロフィー治療研究会 2017 年 11 月 11 日、熱海

Miyazaki D, Sato M, Shiba Y, Echigoya Y, Yokota T, Aoki T, Takeda S, Nakamura A: Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from Duchenne muscular dystrophy-specific induced pluripotent stem cells carrying the deletion of exon 46-55 in the *DMD* gene. XXIII World Congress of Neurology, Sep 20, 2017, Kyoto.

Sato M, Miyazaki D, Shiba Y, Echigoya Y, Yokota T, Aoki Y, Takeda S, Nakamura A: The exon 45 skipping therapy of induced pluripotent stem cells from the DMD patient with exon 46-55 deletion. XXIII World Congress of Neurology, Sep 21, 2017, Kyoto.

〔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〕

ホームページなし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 昭則 (NAKAMURA Akinori)

信州大学・医学部・第三内科・特任教授

研究者番号：10303471

(2)研究分担者

宮崎 大吾 (MIYAZAKI Daigo)

信州大学・医学部・附属病院・難病診療センター・講師(特定雇用)

研究者番号：80596370

(3)研究分担者

柴 祐司 (SHIBA Yuji)

信州大学・医学部・再生医科学教室・教授

研究者番号：70613503

(4)研究分担者

武田 伸一 (TAKEDA Shin'ichi)

独立研究開発法人・国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・所長

研究者番号：90171644