

## 28-6 ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター  
武田 伸一

### 総括研究報告

#### 1. 研究目的

原因が解明されたにもかかわらず進行を抑制する治療法が確立していない Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)については、全身の骨格筋と心筋が障害される疾患であることを考慮すると、全身的な治療法を開発することが最も重要である。そこで、これまで進めてきた研究のうち、DMD に対するアンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療法の有効性と安全性を検証し、治験のプロトコルやマニュアルの準備を進めて、社会的、倫理的问题についても充分な検証を進めながら、同治療法を臨床応用することを目標とする。また、筋前駆細胞への分化誘導法を確立する必要がある iPS 細胞を用いた幹細胞移植治療ならびに筋ジストロフィーの病態解明に基づく薬物治療についてもこれまで研究班で開発してきたモデル動物を駆使して研究を進めて臨床に展開することを目標に、以下の構成で研究を進める。

#### 1. 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

##### 1-1.エクソン・スキップなど遺伝子発現制御法の開発

(武田、松尾、青木、岡田、堀田、萩原、清尾)

##### 1-2.幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立

(梅澤、櫻井、深田、上住、橋本)

##### 1-3.新たな発想、技術に基づく分子病態、薬物治療研究 (橋戸、野口、北條、裏出、湯浅、岩田、田中)

#### 2. 筋ジストロフィーのモデル動物の維持 (保田)

#### 3. 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究 (貝谷)

#### 2. 研究組織

##### 主任研究者

武田 伸一

国立精神・神経医療研究センター

##### 分担研究者

青木 吉嗣

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

岩田 裕子

国立循環器病研究センター研究所

上住 智芳

東京都健康長寿医療センター

梅澤 明弘

国立成育医療研究センター

裏出 良博 筑波大学→

(2018. 4～) 東京大学 医学部附属病院

岡田 尚巳 日本医科大学→

(2019. 4～) 東京大学 医科学研究所

貝谷 久宣

日本筋ジストロフィー協会

櫻井 英俊

京都大学 iPS 細胞研究所

清尾 康志

東京工業大学 生命理工学院

田中 廣壽

東京大学 医科学研究所

野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

萩原 正敏

京都大学 大学院医学研究科

橋戸 和夫

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

橋本 有弘 (～2018 年 3 月まで)

国立長寿医療研究センター

深田 宗一朗

大阪大学 大学院薬学研究科

北條 浩彦

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

松尾 雅文

神戸学院大学 総合リハビリテーション学部

保田 昌彦

実験動物中央研究所

湯浅 慎介

慶應義塾大学 医学部循環器内科

### 3. 研究成果

#### a. エクソン・スキップ等の遺伝子発現制御法の開発

(武田、松尾、青木、岡田、堀田、萩原、清尾)

本研究班の中心的な課題として追究してきたエクソン・スキップに関しては、ヒト・ジストロフィン遺伝子のエクソン 53 スキップに有効なアンチセンス配列を同定した上で、靈長類とげっ歯類を用いた安全性試験を行い PMDA からの承認を受けて、DMD 患者に対する早期探索的臨床試験を実施した。投与全例で、エクソン 53 スキップが観察され、しかも薬物の最高血中濃度 (Cmax) と mRNA レベルでのエクソン・スキップ効率が相関していた。更に、投与例の多くでジストロフィンの発現が確認され、特にその 1 例では、正常対照の 8.1% に達していた。*(Sci Transl Med, 2018)*。この結果、厚労省による「先駆け審査制度」、米国 FDA による fast track 制度の指定を受け、我が国と米国で企業による次相試験が行われ、我が国の I / II 相試験では、40 mg/kg あるいは 80 mg/kg の週 1 回 24 週の投与を安全に終了したばかりでなく、全例で RT-PCR 上エクソン 53 スキップを認め、80 mg/kg の 24 週投与の後に行われた筋生検で顕著なジストロフィン発現量を達成することができた。同様な結果は、米国での投与例でも得られている他、DMD の自然歴と比較して、良好な臨床評価指標の改善結果も得られている。そこで我が国(2019 年 9 月)と米国(同年 10 月)において当局(PMDA と FDA)に対する承認申請が行われ、同 11 月には厚労省により条件付き早期承認制度の対象とする旨発表があり、承認の日が待ち望まれている(NSNP 武田主任研究者)。NCNP の武田・青木班員は、エクソン 44 スキップについても開発を進め小牧班とも協力して NCNP 病院における医師主導治験(first in human 試験)が開始された。一方、従来のモルフォリノ核酸では、効果が得られなかつた心筋でのエクソン・スキップについて、ペプチドを付加した PPMO を用いて、高い導入効果が得られる 것을明らかにした(*Proc Natl Acad Sci USA, 2017*)。又、尿中由来細胞を MyoD 遺伝子の導入により筋細胞に変換し、従来の方法よりも迅速かつ簡便にエクソンスキップのスクリーニングが可能であることを明らかにした(*Sci Rep, 2019*)他、DMD における遺伝子変異の hotspot を丸ごと skip し、しかも病状の改善が期待できる exon45-55 について、細胞モデルで大きな進展があった(*Mol Ther, 2019*)。

一方、日本医科大学から東京大学に異動した岡田班員は、長年アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発に携わってきたが、同ベクターは遺伝子導入効率は極れているものの、免疫反応性を解決しなければ筋ジストロフ

ィーのような進行性の疾患に応用することは難しいと考え、免疫寛容誘導の方法に着目し、歯髄由来間葉系幹細胞を用いて、着実な成果を挙げている。さらに、遺伝子治療とは近縁の方法論であるゲノム編集に関して、京大 CiRA の堀田班員は、CRISPR-Cas9を中心とするゲノム編集効率及びエクソンスキップ効率の劇的な向上に成功すると共に、国内研究者と共に新規 CRISPR-Cas3 を用いたエクソンスキップ効率及びジストロフィンの発現にも成功している(*Nat Commun, 2019*)。

#### b. 幹細胞を用いた研究 (梅澤、櫻井、深田、上住、橋本)

本研究班は、幹細胞、筋再生の分野でも画期的な成果を世界に発信してきた歴史を持つ。一つは、筋再生の鍵を握っている筋衛星細胞の遺伝子発現パターンを明らかにしたことであり、もう一つは骨格筋の新しい幹細胞としての間葉系前駆細胞の提唱である。前者に関しては、筋衛星細胞の増殖と分化における Calcitonin Receptor の生理的な意義を阪大の深田班員が共同研究者と共に明らかにした(*Nature, 2018*)他、本年度は筋衛星細胞の増殖と MyoD 遺伝子の発現を分離したことが特筆される。新たな移植細胞源として注目されるからである。後者の細胞を発見した都健康長寿医療センター・上住班員は、レチノイン酸シグナルが筋の脂肪化、線維化を担う間葉系前駆細胞の機能抑制に重要であることを見出し、レチノイン酸に比べ脂肪分化を数百～千倍の強さで抑制するレチノイン酸受容体作動薬の開発に成功した。更に、間葉系前駆細胞こそが加齢に伴なう筋委縮において決定的な因子であることを明らかにしている。一方で、我が国で世界をリードする科学技術として開発された iPS 細胞に関しては、筋細胞系譜の幹細胞を誘導しにくいという大きな限界があった。CiRA の櫻井班員は京都府立大学の佐藤博士と協力して研究を進め、筋細胞系譜幹細胞を誘導する上で重要な転写因子群を明らかにした(*Stem Cell Reports, 2019*)。NCNP の武田班員は中胚葉誘導法と EG sphere 法に加え、TGFβ シグナルを抑制することにより、誘導方法を確立することができた(*Sci Rep, 2018*)。今後の課題は、移植法を確立することにある。

#### c. 新たな病態、薬物治療研究 (橋戸、野口、北條 裏出、福田、岩田、田中)

プロスタグランジン合成酵素阻害剤については、長年に渡る東京大学・裏出班員の基礎研究成果を下に DMD 患者における尿中代謝産物の検索を出発点として、健

常者における first in human 試験に引き続き、DMD 患者における第2相企業治験が行なわれたが、2019年12月、RCT を行うための AMED-Cycle 事業への採択をみた。また、NCVC の岩田班員が長年に渡って進めてきた  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネル (TRPV2) 阻害についての基礎研究に引き続き、NHO 刀根山病院の松村先生を中心として既存の阻害薬による DMD の心筋障害に対する先進医療 B が開始された。又、岩田班員は TRPV2 阻害抗体の開発を継続した。

一方、武田班員は、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45～55 欠失例が例外的に軽微な症状を示すことに着目して研究を進めてきた。殊に 45～55 欠失ジストロフィンのトランスジェニックマウスを作出して mdx マウスと交配して検討を進めたところ、同マウスでは外部膜のぜい弱性は改善していた。一方で筋小胞体膜のリアノジン・レセプターは細胞内の nNOS により産出された NO により、過剰にニトロシル化していた。そのため、細胞内に Ca が漏出していたが、Ca イオンを小胞体に取り込む Ca ポンプ (SERCA) の働きがよく保たれており、それがジストロフィン欠損状態では増加していた Sarcolipin の発現低下によることを突きとめた。現在、Sarcolipin はジストロフィン欠損の新たな治療ターゲットとして注目されている (BBRC, 2018)。

#### d. モデル動物の開発（保田）

本研究班では筋ジストロフィー犬等のモデル動物の開発を介して、ジストロフィンのバイオマーカの提唱を目指してきた。特に本研究班は筋ジストロフィー犬血清の解析をいとぐちとして、miR-1, 133a, 206 が筋ジストロフィーの血清で特異的に増加していることを世界に先駆けて報告した。本年、miR-1 が筋ジス犬の血清で特異的に増加していることを見出し、再生筋及び C2C12 細胞を用いた研究から筋分化制御がそのターゲットであることを明らかにした (Plos One, 2019)。また筋ジス犬の走行時の加速度/角速度の変化を継時的に測定し、その低下と MRI でみた筋障害度との間に相関を示すことを見い出した (特許申請中) (Plos One, 2019)。更にその後の研究で加速度のフーリエ解析を行うことにより、加速度の変化量の上で、健常犬と筋ジス犬の間で大きな隔たりがあることに初めて気付いた。このことはフィジオロジカルなマーカとして日常診療に応用できる可能性を示している。一方、DMD 患者尿中のタイチン高値を認めた神戸学院大の松尾班員 (Sci Rep, 2016) の研究は小牧班に引き継がれ、福山型など他の病型でも検討が行われている。

#### e. 倫理的、社会的研究（貝谷）

エクソン・スキップなどの新たな治療を DMD 患者に対して行なうためには、患者、家族の皆さんに、病気の理解を高めて頂くことが極めて重要である。その意味では貝谷班員(筋ジストロフィー協会)が長年続けてきたピアカウンセラー養成講座は高く評価される。2019 年度、20 回目を迎えた同養成講座では、参加者の多くが高い満足度を示していた。

### 4. 倫理面における配慮の状況

DNA 組換え実験に関しては、各施設の組換え DNA 実験安全委員会による審査、承認を受けた上で実施した。動物実験については、各施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。ヒトを対象にした研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理方針」及び「ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。

### 5. 今後の研究の進め方に関する希望事項

筋ジストロフィー難病に指定され、AMED にも治療研究が採択をみている中、本研究班を開発費により継続する根拠はどこにあるのだろうか。1 つは本研究班の努力により NCNP に筋ジストロフィーモデル動物施設が維持され、治療研究の Platform として、内外の研究者により使用されていることが挙げられる。又、治療効果を実証する上での基盤技術においては、ジストロフィンの検出からマウスの運動負荷に至るまで共有化し、我が国のスタンダードとなっている (実験医学, 増刊号 2019)。特にこの研究班ではエクソン・スキップ、幹細胞移植をはじめとして同じ方法論について、複数の研究者を立てて、競合的かつ協調的に研究を進めてきた。また、複数の治療法について同じ研究班の中で長所と短所を比較しながら相補的に研究を進める事ができた。このような点は、本研究の成立の意義を提供していると考えられる。今後、同趣旨の研究班の継続を強くお願いしたい。



Activity Report of a National Research Group Organized by National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)  
: Development of New Therapy for Muscular Dystrophy, Based on Animal Models of Dystrophin Deficiency

Shin'ichi Takeda, M.D., Ph.D. (Principal Investigator)  
National Center of Neurology and Psychiatry

The causative genes of muscular dystrophies have been largely identified, however neither essential molecular pathogenesis nor curative treatment of the diseases has been found in clinical level. To apply results of laboratory research to clinical medicine, we organized a research group and I briefly summarize the progress between 04/2016 and 03/2020 pursued by our group.

### **1. Exon skipping toward muscular dystrophies**

Dr. Takeda's research group (NCNP) developed exon 53 skipping drug using newly synthesized antisense oligo nucleotides (AOs), NS-065/NCNP-01, Viltolarsen, made by Nippon Shinyaku, Co. Ltd. (NS) and challenged the early phase clinical trial among Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients at the NCNP hospital. This trial was finished without a severe adverse events, moreover exon 53 skipping was found in muscle biopsy specimens from all DMD patients treated. Among them, one particular patient who received intravenous injection of 20 mg/kg of the drug once a week for 12 weeks, showed considerable amounts of dystrophin expression detected by immunohistochemistry and Western blotting after the treatment (*Sci Transl Med*, 2018). This drug was designated as fast track in approval process both in Japan and in US, and this drug was also treated as "Orphan drug" in both countries. Next phase trials have been done in both counties without serious adverse events. We found enough expression of dystrophin and favorable improvement in clinical phenotypes after the treatment. After the careful discussion and preparation, NS submitted this drug to PMDA and its daughter company in US, NS-pharma, asked to FDA. Now, we are waiting for the final approval of the drug in both countries.

### **2. Stem cell transfer for muscle diseases**

Stem cell transfer is very important as a future treatment of muscular dystrophies. These days, inducible Pluripotent Stem (iPS) cells evoked a lot of attention, since these cells can be applicable to regenerative medicine. Dr. Sakurai and his colleagues in iPS cells Research Institute (CiRA), Kyoto University challenged to establish iPS cells from DMD patients. Dr. Takeda's research group in NCNP tried to differentiate human iPS cells into myogenic precursor cells by using modified EG-sphere method and their attempt was successful (*Sci Rep*, 2018). His group also tried to further establishes the method to induce myogenic cells from human iPS cells.

### **3. Development of new drug therapy based on elucidation of molecular pathogenesis of muscular dystrophy**

Dr. Urade's research group (Tokyo University) is particularly interested in involvement of Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) synthase in dystrophic process. Initial Phase PGD<sub>2</sub> Synthase inhibitors trials has been done among DMD patients at the NCNP hospital. Then, Taiho Co. Ltd, has challenged 2nd phase trial of the drug (TAS-205) in DMD patients. The results were not so favorable, but the company still has a great interest in their drug and has gotten large amounts of grants to carry PhaseIII trial in Japan. Dr. Iwata (National Center of Cardiovascular Disorders) has identified involvement of mechanosensitive TRPV2 channel in dystrophic process. Her research group examined the effectiveness of TRPV2 inhibitor, such as Tranilast known as anti-allergic drug. In DMD patients, a clinical study of Tranilast was conducted in Toneyama National Hospital by Dr. Matsumura, and his attempt was accepted by the

agency as “Advanced Medical Treatment B”.

#### **4. Development of new animal models for therapeutic approach to muscle diseases**

Dystrophic dog (CXMD) reveals severe and progressive phenotypes seen in DMD patients. The research group in NCNP, measured acceleration of movement of dystrophic dogs. The acceleration was decreased, when detected at thorax level at the onset stage of the disease, 2-months-old. On the other hand, the acceleration was slowly decreased, when detected at lumbar level after the onset of the disease, and the group is trying to get relationship between the acceleration of movement and the muscle damage detected by MRI. The acceleration might be useful to measure the progression of the disease, or to measure the improvement of symptoms by the treatment (*PLoS One*, 2018). The research group also pointed out MiR-188 has been participated in the regulation mechanism of muscle regulatory factors such as MRF4 and MEF2 (*PLoS One*, 2019). Very interestingly, the expression of MiR-188 was increased in the serum of dystrophic dogs and regenerating skeletal muscle after the injection of cardiotoxin.

#### **5. Social and medical aspects of muscular dystrophies**

Dr. Kaiya (President of Muscular Dystrophy Association of Japan) promoted a research regarding socio-medical issues of Gene Medicine of patients suffering from muscular dystrophy and their families. Dr. Kaiya organized the meeting for peer counselors for patients and families who will make advice for genetic analysis and newly developed diagnostic ways and treatment. It is amazing that patients and their families themselves tried to be peer counselors. It is not so easy for the patients and families to understand the progress of research these days, but their efforts certainly facilitate the understandings of new development. It is obviously very important for researchers, doctors, patients and families to cooperate together and this cooperation have been greatly enhanced by the association of participants from Regulations and Biopharma(s).

# ジストロフィン欠損の病態を標的とした治療法の開発

武田 伸一  
国立精神・神経医療研究センター

## 1. microRNA に関する検討

### 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子変異によるジストロフィンの欠損を原因とする重篤な筋疾患である<sup>1)</sup>。DMD の病態に関わる重要な因子として、筋特異的な microRNA (miRNA) が挙げられ、筋原性因子として特徴付けられている<sup>2)</sup>。これまでに DMD 患者とそのモデル動物の血清中において、顕著に増加する miRNA が報告されており、これらは筋分化に関わる制御因子であることが明らかになっている<sup>3)</sup>。これらの所見は、筋形成に関連する血清 miRNA の探索が、筋障害における骨格筋の病理学的状態を反映するマーカーの確立をもたらし得ることを示唆している。本研究ではイヌ筋ジストロフィーモデル Canine X-linked Muscular Dystrophy (CXMD<sub>J</sub>) の血清中において高値を示す miRNA、miR-188 を発見し、これが筋分化調節因子として機能する可能性について検討した。また、この miR-188 がその遺伝子座で 4 つの miRNA とクラスターを形成することに注目し、これらと協調して機能する可能性についても検討した。

### 方法

#### 1) CXMD<sub>J</sub> における特異的な miRNA の探索

筋ジストロフィーを発症する 2 か月齢の CXMD<sub>J</sub> と対照となる正常犬から採取した血清を用いて、miRNA マイクロアレイ解析を行った。CXMD<sub>J</sub> において特異的に高発現する miRNA を検出した後、定量的 PCR で結果を再現できたものを CXMD<sub>J</sub> の発症に特異的な miRNA とした。これにより同定された miRNA については、さらにその由来を調べるために組織発現解析を行った。

#### 2) CXMD<sub>J</sub> の筋組織における miR-188 の発現

正常犬及び CXMD<sub>J</sub> から採材した血清及び前脛骨筋 (Tibialis cranialis: TC) における miR-188 発現量を経年的に測定した。測定時の犬の年齢は、0 日齢、3 週齢、2 か月齢、6 か月齢、9 か月齢及び 1 年

齢とした。また、各年齢時の TC を、HE 染色による筋病理像を観察し、miR-188 発現と筋形成との関連性について検討した。また、正常犬の TC、或いは正常マウスの前脛骨筋 (TA) にカルジオトキシン (CTX) を筋注し、筋再生誘導による miRNA の発現の変化を、投与後 3、5 及び 7 日後に、測定した。

#### 3) 筋分化における miR-188 の機能の解析

マウス筋芽細胞 (C2C12 細胞) を用いて骨格筋分化における miRNA の発現変化と筋分化制御因子である MyoD、Myf5、myogenin、myogenic regulatory factor 4 (MRF4)、myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) 及び筋分化マーカーのクレアチンキナーゼとミオシン重鎖-1、-2、-4 の発現パターンを解析した。また、miR-188 がこれらの筋分化制御因子に与える影響を評価するため、C2C12 細胞に対し、miR-188 の機能を抑制、或いは増強させる合成 RNA (アンチセンス miR-188 と mimic miR-188) を導入し、それぞれの制御因子の mRNA 発現量を測定した。

#### 4) miR-188 とクラスターを形成する miRNA 群の発現の解析

*Cln5* クロライドチャネル遺伝子のイントロン 3 で miR-188 とクラスターを形成するイヌの miR-532、miR500、miR-362、miR-660、miR-502 について CXMD<sub>J</sub> の血清及び骨格筋を含む組織での発現を調べた。またマウスではマウスのクラスター構成メンバー (miR-532、miR500、miR-362、miR-501) について組織での発現を調べた。更に CTX による筋再生誘導での発現を調べると同時に、C2C12 の筋分化における発現の変化を解析した。

### 結果

#### 1) CXMD<sub>J</sub> における発症特異的な miRNA の探索

291 のイヌ miRNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、CXMD<sub>J</sub> での発現量が正常犬の 2 倍以上増加しており、定量的 PCR での再現性が確認されたものの中で、DMD 患者及びそのモデル動物血清での増加が未だ報告されていない miRNA は 2 種類 (miR-188 と -500) 検出された。そこでこれら miRNA の組織における発現量を比較したところ、前脛骨筋及び横隔膜において miR-188 のみに有意な増加が認められた。このため miR-188 に焦点を当

て、骨格筋の病態との関連性について検討を進めた。

## 2)筋再生における miR-188 の発現上昇

血清と筋組織それぞれで経齢的に miR-188 の発現を調べたところ、いずれの場合も筋線維変性と再生が顕著になる 2 ヶ月齢、6 ヶ月齢及び 9 ヶ月齢で CXMD<sub>j</sub>での miR-188 発現量が有意に増加していた。また、正常犬を用いたカルジオトキシン (CTX) 処置による再生筋誘導においても miR-188 の発現が上昇するのが認められた。この結果は CTX 処置したマウス骨格筋においても再現され、更に、マウスの筋細胞株 C2C12 では分化誘導後 2-3 日で著しく上昇するのが認められた。

## 3)miR-188 による筋分化制御因子の調節

C2C12 細胞の筋分誘導時における miR-188 と筋分化制御因子の発現を調べたところ、MRF4 及び MEF2C は、miR-188 と共に分化誘導後 3 日から 5 日において有意に増加しており、また、アンチセンス RNA で miR-188 の機能を阻害すると、MRF4、MEF2C、クレアチンキナーゼ、ミオシン重鎖-1、-2、-4 の発現が減少した。これとは逆に、mimic miR-188 を導入し miR-188 の機能を増強すると、これらの分子の発現も増加した。これらの結果は、miR-188 が筋分化における転写制御因子及び筋分化マーカーの発現調節を担うことを強く示唆していた。

4)miR-188 を含む miRNA 群の筋分化における発現 miR-188 の遺伝子座は *Clcn5* クロライドチャンネル遺伝子のイントロン 3 にあり、ここで他の 4 種類の miRNA とクラスターを形成している。そのメンバーである miR-500 はマイクロアレイ解析において CXMD<sub>j</sub>特異的血清 miRNA として検出されており、また、miR-501 は筋分化調節に関わることが報告されている<sup>7)</sup>。そこでこのクラスターを形成する miRNA 全てについて筋分化に関わる可能性を検証した。これら 4 種類の miRNA の組織発現パターンを調べたところ、miR-188 に酷似しており、また骨格筋では CTX による筋再生誘導において顕著な発現上昇を示した。FACS 解析ではいずれも主に筋芽細胞に発現していることが確認され、C2C12 細胞を用いた解析では、全てが筋分化誘導開始後 2 日から 3 日にかけて有意な発現上昇が認められ、3 日から 4 日で最大になるという

miR-188 と類似したパターンを示していた。

## 考察

我々は、CXMD<sub>j</sub> 血清中において、特異的に増加する miRNA、miR-188 を発見した。これが、骨格筋の再生が盛んな時期に対応して上昇すること、また、正常犬への CTX 投与による骨格筋再生誘導においても上昇すること、更には培養筋細胞の分化誘導後に上昇することから、miR-188 は筋再生において、分化過程にある筋細胞に強く発現するものと考えられた。この知見は、miR-188 が筋ジストロフィー病態において、筋再生マーカーとして有用となる可能性を示していた。一方、C2C12 細胞を用いた解析では、筋分化に伴う miR-188 の上昇が複数の筋分化制御因子を正に調節することが示された。miRNA は mRNA の翻訳を抑制し、その機能を負に調節することから<sup>4),5)</sup>、この分化制御因子に対する miR-188 の効果は間接的なものである。このため今後は直接の標的分子同定が重要な課題になると考えられた。また、これと同時に miR-188 が *Clcn5* 遺伝子のイントロン 3 で形成する miRNA クラスターについて解析したところ、他の 4 種類の miRNA (miR-532、miR-362、miR-501、miR-500) も miR-188 と同様に筋細胞に発現し、筋分化に伴って発現上昇するのが認められた。このうち miR-501 は筋分化におけるミオシン発現の調節因子として報告されており<sup>7)</sup>、他の miRNA の機能についても注目される。これら複数の miRNA が協調し、筋分化を調節する可能性があるため更なる検討が必要である。

## 結論

我々は miR-188 が筋ジストロフィーイヌモデルの血清において顕著に増加し、筋再生に応答して発現が増加することを明らかにした。また、これが筋分化転写因子及び筋分化マーカーを制御する分子であることを示した。これらの結果は、miR-188 が筋分化における新規の調節因子であり、血清における発現量の上昇は筋再生の分子マーカーとして有用となる可能性を示していた<sup>6)</sup>。これに加え、*Clcn5* クロライドチャンネル遺伝子の同一イントロンで miR-188 とクラスター形成をする miRNA が骨格筋分化において互いに酷似した発現パターンを示すことを明らかにし、これら 5 種類の miRNA が協調的に筋分化調節に関与する可能性を示唆した。

## 参考文献

- 1) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. *Genomics*. 2(1): 90-95, 1988.
- 2) Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. *Dev Biol*. 410(1): 1-13, 2016.
- 3) Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, et al., *PloS One*. 6: e18388, 2011.
- 4) Bartel DP. *Cell*. 116(2):281-97, 2004.
- 5) Ambros V. *Nature*. 431(7006):350-5, 2004.
- 6) Shibasaki H, Imamura M, Arima S, et al. *PloS One*. 14(1):e0211597, 2019
- 7) Mizbani A, Luca E, Rushing EJ, et al. *Development* 143: 4137-4148, 2016

## 2. 筋ジストロフィー犬の加速度に関する検討 緒言

DMD 患者は進行性の歩行障害を呈するが、新規治療の開発と共に、治療効果を鋭敏に判定する臨床評価指標が求められている。これまで用いられてきた運動機能評価法は、DMD 患者の努力を反映している可能性が高く、定量性、再現性に欠ける可能性が高い。一方加速度・角速度パラメータによる運動機能評価は、運動の定量化や身体活動性のモニタリングに優れ、近年では計測デバイスの小型・軽量化により DMD 患者の身体活動性の評価に用いられ始めている<sup>1,2)</sup>。そこで、加速度・角速度センサを用いて、イヌ筋ジストロフィーモデル Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan (CXMD<sub>j</sub>) の走行時の運動機能の評価した。<sup>3)</sup>

## 方法

### 1) 走行時の加速度・角速度による運動機能評価

前回、検討した筋ジストロフィー患犬 5 頭を第一群とし、今回新規に設定した患犬 5 頭を第二群とした。第二群の患犬と対照健常犬 3 頭の走行時における運動を評価するために、加速度・角速度センサ (TSND121; ATR-Promotions) を用いて、3 方向 (X;前後, Y;左右, Z;鉛直) の広範囲な加速度 ( $\pm 8G$ )、角速度 ( $\pm 1000 \text{ dps}$ ) を検出した。イヌ個体の背側の胸・腰部 2箇所にセンサを装着し、15 m 走行を連続 4 回実施した。発症時期の 2 ヶ月齢から病態進行が停滞する 12 ヶ月齢まで、各月齢で測定を行った。また 12 カ月齢のみに限り、頸部にもセンサを装着して、同時に加速度・角速度を測定

した。

2) 加速度・角速度パラメータと臨床症状の関連解析  
上記の患犬で認められる 8 項目の臨床症状（歩様、運動障害、大腿筋萎縮、側頭筋萎縮、流涎、巨舌、嚥下障害、座位姿勢）の 5 段階によるスコア評価<sup>4,5)</sup>（正常；1、重症；5）を 2 ケ月齢から 12 ケ月齢まで各月齢で実施した。経過における加速度・角速度パラメータとグレーディング・スコアとの関連について、トレンド推定により評価した。

## 結果

### 1) 臨床症状と歩様パターンの評価

患犬のグレーディング・スコアは、8 ケ月齢前後まで重症化による増加を示した。各個体間において重症度に違いが認められたが、第一群の患犬と比較して差異は小さかった。また、8 カ月齢のグレーディング・スコアについて、5 頭の内の 4 頭は、第一群の患犬 3 頭よりも低い値を示した。2 カ月齢から 12 カ月齢までの走行試験における歩様パターンを分類すると、5 頭の内の 4 頭は全速力で走るギャロップで 7 割以上を占め、速足のトロットは 2 割以下であった。1 頭はギャロップとトロットで 5 割近くを占めた。一方、第一群の患犬では、5 頭の内の 2 頭のみでギャロップが約 7 割を占め、3 頭はトロットあるいは常歩が 5 割前後を占めた。第二群の患犬は、第一群よりも重症度がやや緩和され、歩様機能を比較的保持すると考えられた。

### 2) 走行時の加速度・角速度による運動機能評価

患犬の 3 方向軸の加速度・角速度パラメータは、健常犬よりも全体的に低い値を示した。3 方向全体の加速度を指示する加速度マグニチュードは、胸・腰部共に患犬と健常犬の差は 2 ケ月齢で既に認められた。一方、第一群の患犬でみられた経過に従った減弱は、明確にみられなかった。加速度マグニチュードに対する Y 軸加速度の割合について、患犬では腰部で 5-10 カ月齢まで増加する傾向がみられ、腰帶部に左右方向の動搖が生じる可能性が考えられた。また Z 軸加速度の割合については、8-12 ケ月齢まで患犬で増加していた。12 カ月齢の頸部での患犬の 3 方向軸の加速度、加速度マグニチュード、Y 軸、Z 軸の角速度は、健常犬と比較して有意に減

少した。一方、加速度マグニチュードに対する Z 軸加速度の割合は有意に増加した。

### 3) 加速度・角速度パラメータと臨床症状の関連解析

トレンド推定において、グレーディング・スコアの増加にともなう加速度・角速度パラメータの変化量の減少を認めた。ただし、第一群で減少が確認された胸・腰部の Z 軸加速度および Z 軸角速度と腰部の Y 軸角速度では変化しなかった。また、胸・腰部の加速度マグニチュードに対する Z 軸加速度の割合で増加がみられた。

### 考察

加速度・角速度は、重症化にともなう運動機能の低下を検出する有効な評価であるといえる。本研究では、歩様機能が比較的に保持された患犬群において、ギャロップの影響が強く反映された加速度・角速度パラメータの傾向が検出された。特に第一群の患犬でみられた経過に従った減弱は、胸・腰部の加速度マグニチュードで明確にみられなかった。胸部は主として前肢の、腰部は主として後肢の影響を受けると考えられる。本研究の対象とした第二群の患犬では、前後肢の筋機能障害が発症時期である 2 カ月齢には明確に現れるものの、経過に従った段階的な進行が緩徐であった可能性がある。また、頸部の加速度・角速度は、胸・腰部と類似した減少を示すが、左右方向の動搖による影響は少ないと考えられた。臨床症状との関連解析では、重症化に応じて鋭敏に変化しやすいパラメータを呈示出来る可能性がある。今後は、歩様パターンに従った加速度・角速度パラメータの特徴を慎重に検討する必要がある。

### 結論

加速度・角速度は、多様な情報を提供するアウトカム・メジャーとなる可能性がある。筋ジストロフィーを始めとする神經筋疾患患者での応用を検討するとともに、重症化と密接に連動して変動する有用な評価法として病態解明に役立てたい。

### 参考文献

- 1) Jeannet PY, Aminian K, Bloetzer C, et al., *Eur J Paediatr Neurol.* 15: 40-47, 2011.
- 2) Le Moing AG, Seferian AM, Moraux A, et al.,

*PLoS One.* 11: e0156696, 2016.

- 3) Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Tachimori H, et al., *PLoS One.* 13:e0208415, 2018.
- 4) Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, et al., *Acta Myol.* 24: 145-154, 2005.
- 6) Kuraoka M, Kimura E, Nagata T, Am J Pathol. 186:1302-1312,2016.

# エクソン・スキップ治療の効果向上を目的とした、骨格筋・心筋への核酸取り込み機序の解明

青木 吉嗣  
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

## 緒言

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の変異により、骨格筋膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損して生じる、重篤な遺伝性筋疾患である。これまでステロイド剤以外の治療法がほとんどなかった同疾患を対象に、アンチセンス・モルフォリノ核酸を用いた“エクソン・スキップ治療”的開発が有望視されている。我々は、同疾患のマウスおよび犬モデルを対象に、エクソン・スキップの基盤的研究を実施し、モルフォリノ核酸の用量依存的な効果と高い安全性を実証してきた<sup>1,2</sup>。こうした状況を背景に本手法の臨床応用への期待が高まったことから、DMD 患者を対象にしたエクソン 53 スキップの早期探索的臨床試験が、国立精神・神経医療研究センター病院で実施され、DMD 治療剤 NS-065/NCNP-01（エクソン 53 スキップ薬）の治療効果を予測するジストロフィンタンパク質の発現を確認出来た。この有望な結果を受けて、NS-065/NCNP-01 は厚生労働省の先駆け審査指定制度の対象に初指定され、2019 年 9 月に製造販売承認申請を完了している。

しかしながら、アンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療の課題は、効率的にモルフォリノ核酸を骨格筋線維（核内）および心筋（核内）に送達するシステムがない事であった。本研究では、筋ジストロフィーを対象にしたエクソン・スキップ治療の効果向上のため、ジストロフィン欠損モデル動物を対象に、骨格筋線維・心筋細胞へのアンチセンス・モルフォリノ核酸分子の取り込み分子機序を解明する。

## 方法

### 1. 筋管収縮時におけるモルフォリノ核酸の取り込み分子機序

1-1. H2K 筋管および H2K-mdx52 筋管を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて持続的に筋管収縮をさせた状況で、アンチセンス核酸の取り込み効率

に変化が生じるかどうかを検討する。

1-2. mdx52 マウスを対象に、下肢懸垂し、片側のみの前脛骨筋をペーシングシステムにより持続的に筋収縮させた状態で、モルフォリノ核酸を経静脈全身投与し、エクソン・スキップ誘導効率を指標に PMO の取り込み効率を比較する。

1-3. H2K-mdx 筋管の N-benzyl-p-toluene sulphonamide 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて 48 時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施する。

### 2. バイオイメージングを用いた PMO の細胞内局在の詳細な検討

2-1. C2C12 あるいは H2K-mdx52 筋管を対象に、蛍光標識モルフォリノ核酸の細胞質内での局在を、蛍光顕微鏡を用いて明らかにする。

2-2. C2C12 あるいは H2K-mdx52 筋管を対象に、蛍光標識モルフォリノ核酸の細胞質内での挙動を time-lapse microscopy により解析する。

2-3. モルフォリノ核酸トランسفェクション後の細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて検討する。

### 3. H2K-mdx52 筋管の自発収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに与える影響の解析

3-1. H2K-mdx52 および H2K（野生型）筋管を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて持続的に筋管収縮をさせた状況で、モルフォリノ核酸の筋管への取り込み効率に変化が生じるかどうかを検討する。

3-2. H2K-mdx52 筋管を対象に、自発性筋収縮阻害剤である N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて 48 時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施する。

## 結果

H2K-mdx52 筋管の自発性筋収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに及ぼす影響について、検討を行った。結果は、ミオシンⅡの特異的阻害剤である N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) を用いて筋の自発収縮を阻害すると、阻害剤を添加しなかった時と比べて、モルフォリノ核酸をトランسفェクション後のエクソン・スキップ誘導高率が有意に低下した。本結果は、筋管の収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに関与している可能性を示唆していると考えられた。そこで、H2K-mdx52 筋管を対象に、

自発性筋収縮阻害剤である BTS 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて 48 時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施した。この結果、筋収縮と関連するモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに、カベオラ関連タンパク質であるカベオリン 3 に加えて、caveolae associated protein が関与する可能性が判明した<sup>5</sup>。

## 考察

本研究によりモルフォリノ核酸が筋管および筋線維に取り込まれる機序が明らかになり、安全性が高いモルフォリノ核酸を、標的臓器である骨格筋や心筋に効果的に薬物送達できるシステムの開発につながると考えられる。これにより、DMD に対するモルフォリノ核酸を用いたエクソン 53 スキップの治療効果の向上が出来ると期待される。将来的には、DMD 以外の筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症を含めた神経筋疾患を対象に、モルフォリノ核酸を用いた治療を広く応用できる様になる。

## 結論

モルフォリノ核酸が細胞内に取り込まれる分子機序の解明を基に、モルフォリノ核酸の最適な薬物送達法を開発した。さらに DMD の骨格筋および心筋障害の治療可能性を示した。

## 参考文献

1. Aoki Y, Yokota T, Nagata T, et al., Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109:13763-8.
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; 18:1995-2005.
3. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, et al., Highly Efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin  $\alpha$ 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet*. 2013; 22:4914-28
4. Ezzat K, Aoki Y, Koo T, et al., Self-Assembly into Nanoparticles Is Essential for Receptor Mediated Uptake of Therapeutic Antisense Oligonucleotides. *Nano Lett*. 2015; 15:4364-73
5. Miyatake S, Mizobe Y, Takizawa H, et al., Exon Skipping Therapy Using Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers in the mdx52 Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol*. 2018; 1687:123-141.

# ストレッチ感受性チャネルを標的とした筋変性新規治療薬の開発

岩田 裕子

国立循環器病研究センター研究所

## 研究協力者

松村 剛 国立病院機構 刀根山病院  
裏出 良博 東京大学アイソトープ総合センター  
若林 繁夫 大阪医科大学 薬理学部  
北風 政史 国立循環器病研究センター

## 緒 言

私達は筋ジストロフィー(筋ジス)、心筋症など筋細胞変性疾患全般に有効な治療薬の開発を目指している。そのため筋変性疾患に共通のリスクファクターを見つけることは重要な課題である。筋ジスにおける筋細胞内は恒常に  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇した状態になり、その要因の 1 つとして TRPV2 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入が重要であることをモデル動物を用いて明らかにしてきた(1-3)。チャネル機能を持たない TRPV2 の変異体を過剰発現することにより筋変性病態で観察される内在性の TRPV2 チャネルの活性化を抑制する(2)、あるいはアミノ末端ドメイン(N 末端ドメイン)を過剰発現することにより内在性 TRPV2 の形質膜濃縮を抑制する(3)、それらの結果として筋ジス、心筋症が改善されることを報告してきた。しかしながら利用できる TRPV2 特異的阻害剤がないのが現状であり、ヒト筋変性疾患治療のためには TRPV2 阻害薬の開発が必須である。今回の研究では、以下のことを行った。①TRPV2 阻害剤をスクリーニングする方法を見いだし、それを用いた TRPV2 阻害化合物の同定と心筋症モデル動物に対する改善効果の検討を行った。②TRPV2 阻害作用を有する市販薬トラニラストによる筋ジストロフィー心筋障害患者 2 名を対象としたパイロット試験を実施した。③筋ジス心筋変性モデル動物の開発と TRPV2 阻害の効果の検討を行った。④新規作成した TRPV2 阻害抗体のエピトープの同定及び阻害抗体の安全性と病態治療効果の検討を行った。

## 方 法

### 阻害薬の開発

TRPV2 発現 HEK293 細胞を用いて TRPV2 アクチベーター(2-APB) 刺激時の条件検討を行い阻害剤スクリーニングに適した活性化法を検討した(4)。

TRPV2 に対する阻害モノクローナル抗体は TRPV2 発現 HEK293 細胞を自己免疫疾患マウスに免疫することにより作成した。抗体のエピトープは TRPV2 の細胞外ドメインペプチドを用いたドットプロットにより同定した(5)。

### 動物実験関連

ジストロフィン複合体構成因子の 1 つ、デルタ-

サルコグリカン欠損の心筋症ハムスター (J2N-k) とコントロールハムスター (J2N-n)、糖鎖異常の心筋症マウス (4C30)、5-6 か月齢のジストロフィン欠損マウス (*mdx*) マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin (T3) を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した心筋変性マウスモデル、及びコントロールとして正常マウスを用いて TRPV2 阻害剤及び阻害抗体の安全性と病態改善効果を検討した。阻害抗体は週 1 回で腹腔内投与 (0.25-2 mg/kg) し 2 週間後、安全試験では 8 週間後非投与群と比較検討した。血圧を血圧計、心収縮能、心機能を心超音波・心電図により測定した。生化学的指標として血清 CK 活性、心不全マーカー (ANP, BNP)、心筋傷害マーカー (心筋トロポニン I (cTnI)) の血清中含量を測定した。摘出心筋の形態的評価・線維化評価は切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソントリクローム (MT) 染色像より解析した。心筋細胞の微細構造の解析は電子顕微鏡により行った。分子生物学的手法を用いて DNA アレイ及びその解析を行った。ヒト及び動物抹消血より单核球分画を調製し、单核球における TRPV2 の局在を共焦点顕微鏡により解析した。動物実験及びヒト検体を用いる実験は国立循環器病研究センターの指針に基づき規定に従い承認を受け行つた。

## 結果

### 1) TRPV2 阻害剤スクリーニング法の開発と阻害剤による心筋症、重症心不全モデル動物治療

マウス TRPV2 発現細胞を用いて新規 TRPV2 活性化法を見出しそれをを利用して阻害剤のスクリーニングを実施し TRPV2 阻害作用をもつものとしてトラニラスト及びトラニラストより低濃度で阻害活性を持つ阻害化合物の同定とそれらの心筋症モデル動物に対する改善効果を報告した(3, 4)。TRPV2 阻害化合物は心筋症ハムスター (J2N-k) 心機能を改善した。4C30 マウスは 28 週令で約半分が拡張型心筋症、重症心不全で死に至るが、その 2 週間前にトラニラストを投与することにより、心機能の悪化の防止と延命効果が認められた。トラニラストとベータブロッカーとの併用によってさらに効果が上昇することが判明した。

### 2) TRPV2 阻害作用を有する市販薬トラニラストの筋ジストロフィー心筋障害患者に対する効果

上記のように心筋症動物を用いた実験より、抗アレルギー薬トラニラストが TRPV2 阻害作用を有し、心機能の改善に有効であることが認められた(3)。筋ジス併発心筋障害患者 2 例でのトラニラスト内服による 1 から 3 か月後の効果を調べるパイロット試験の結果を報告した(6)。その後、1 年以上にわたるトラニラスト服用後の結果を調べたところ、心不全マーカーである血漿中 BNP 値は低値を維持した。さらに心エコー検査による心機能の改善が 2 例とも観察された(1 例は Fractional Shortening (FS) が 4 から 9%、もう 1 例は 6 から 11% にそれぞれ上昇した)(7)。

### 3) T3 誘導性心筋変性マウスモデルを用いた TRPV2 阻害による心筋変性治療効果の検討

*mdx*に甲状腺ホルモン (T3) を3週間連続投与することにより、心拍数増加に伴う心筋変性が誘発され、心機能低下と著しい血漿中心筋トロポニンI (cTnI) 濃度の増加が認められた。*mdx*におけるT3 誘導性心筋では TRPV2 の心筋細胞形質膜発現の増加が認められ、TRPV2 阻害薬投与により心筋及び単核球表面の TRPV2 発現の減少と心筋変性が抑制された。また約半分の *mdx*マウスが T3 投与 2 週後に心機能悪化により死亡したが TRPV2 阻害により死亡率が減少した。筋ジス心筋障害のよいモデルとなること、TRPV2 阻害により改善されることが明らかになった。

### 4) TRPV2 阻害抗体作製とエピトープ決定、心筋症・心不全に対する効果の検討

TRPV2 特異的阻害の筋変性に対する有効性を実証するため、細胞外からチャネルを阻害できるモノクローナル抗体を作成した。抗体が認識するエピトープを同定し、チャネルの結晶構造解析の結果を基にその局在を確定した(5)。エピトープは細胞外ループ 3 番目のチャネルボア付近 (Large pore turret) にあり、その部位はボアの開閉に密接に関与する部位であることが判明した。また TRPV2 特異的阻害抗体は細胞形質膜 TRPV2 を内在化すること、拡張型心筋症心筋細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度異常を是正すること、4C30 マウス、J2N-k ハムスター、上記 T3 誘導性心筋変性マウスモデルの心機能低下を改善することが判明した。作製した抗体はげっ歯類 TRPV2 特異的でイヌ及びヒト TRPV2 に対する反応は認められなかった。

### 考察

見出した阻害剤スクリーニング法及びトラニラストをはじめとする TRPV2 阻害作用を有する既存薬の実用化、新たな TRPV2 阻害薬の開発を進めていく予定である。トラニラストの作用機序の解析及び現在実施中の先進医療 B による「筋ジストロフィー心筋障害に対する TRPV2 阻害薬の多施設共同非盲検単群試験」をさらに進めていく予定である。また T3 誘導性 *mdx* 心筋変性モデルはヒト筋ジス併発心筋障害に類似しており、TRPV2 の細胞形質膜発現が亢進していること、TRPV2 阻害により心筋変性が軽減でき延命効果があることが明らかになり、筋ジス心筋障害における TRPV2 の関与が再確認できた。今回明らかになったマウス TRPV2 に対する機能性抗体のエピトープを利用して心筋症・心不全治療を目指したヒト TRPV2 に対する機能性抗体作製に繋げていく予定である。

### 結論

筋ジストロフィー、心筋症・心不全の治療標的として TRPV2 は有望である。

### 参考文献

- 1) Iwata Y., Katanosaka Y., Arai Y. et al.: A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca<sup>2+</sup>-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol.* 161:957-67, 2003
- 2) Iwata Y., Katanosaka Y., Arai Y. et al.: Dominant-negative inhibition of Ca<sup>2+</sup>influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Gen.* 18:824-34, 2009
- 3) Iwata Y., Ohtake H., Suzuki O. et al.: Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 99:760-8, 2013
- 4) Iwata Y., Katayama Y., Okuno Y. et al.: Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model. *Oncotarget* 9:14042-57, 2018
- 5) Iwata Y., Wakabayashi S., Ito S. et al.: Production of TRPV2-targeting functional antibody ameliorating dilated cardiomyopathy and muscular dystrophy in animal models. *Lab Invest* 100 324-337, 2020
- 6) Matsumura T., Matsui M., Iwata Y. et al.: A pilot study of tranilast for cardiomyopathy of muscular dystrophy. *Intern Med* 57:311-8, 2018
- 7) Iwata Y., Matsumura T.: Blockade of TRPV2 is a novel therapy for cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Int J Mol Sci* 20:E3844, 2019

# 筋ジストロフィー治療のための間葉系前駆細胞制御法開発

上住聰芳  
東京都健康長寿医療センター研究所

## 緒言

筋ジストロフィーでは、骨格筋の脂肪化・線維化が起こる。脂肪化・線維化はそれ自体が筋力・筋機能低下の要因となるだけでなく、他の治療法（細胞移植治療や遺伝子治療）の効率を低下させることにもつながり問題となる。骨格筋の脂肪化・線維化の原因は長らく不明であったが、分担研究者らは筋間質に存在し筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞の同定に成功し、この細胞が脂肪化・線維化の起源となることを世界で初めて明らかにした<sup>1, 2)</sup>。間葉系前駆細胞は病態に寄与するだけでなく、再生過程では筋衛星細胞を支持するニッチ細胞として機能し、筋再生を促進することも明らかとなってきている<sup>3)</sup>。このことから、脂肪化・線維化の抑制を目的とする場合、単に間葉系前駆細胞の死滅を図るだけでは、筋再生をも抑制する事態を招きかねない。よって、真に効率的な筋ジストロフィーの治療には間葉系前駆細胞の二面性を理解し、制御することが必要になる。本研究では、脂肪化・線維化の原因となる間葉系前駆細胞を制御する手法の開発に取り組む。脂肪化・線維化の責任細胞に焦点を当て、研究開発を行うことで、これまで不可能であった脂肪化・線維化を抑制する画期的治療が可能になると期待される。また、間葉系前駆細胞による筋衛星細胞支持機能を明らかにできれば、筋再生促進療法へ発展することも期待できる。さらに、原因遺伝子の発現回復を図る他の根本的治療法の治療効果を向上させることにもつながるため、本研究は筋ジストロフィー治療の実現に向け、欠くことのできない有益な成果をもたらすと考えられる。

## 方法

本研究では、間葉系前駆細胞を制御することで脂肪化・線維化を抑制し、筋再生を促進する筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。間葉系前駆細胞の病態に寄与する側面と再生を促進する側面の、それぞれに特徴的に発現する遺伝子を同定する。それらの遺伝子の機能的な解析を行い、その機能に基づいた間葉系前駆細胞の制御法開発を行う。

## 結果

間葉系前駆細胞の再生を促進する特性に関連する遺伝子としてレチノイン酸シグナル制御因子を同定した。レチノイン酸シグナルは間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制し、再生促進特性を付与する重要なシグナル経路であることを明らかにした。さらに、ヒト間葉系前駆細胞を用いた薬剤探索システムにより、間葉系前駆細胞に効率的に作用する作動薬を同定した。その作動薬を重篤なDMDモデルマウスであるD2-mdxに投与した結果、筋病理像が劇的に改善された。作動薬投与D2-mdxでは、異所性脂肪の形成、線維化が顕著に抑制された。また、作動薬投与により筋再生が促進される傾向にあった。作動薬の投与量を調整することで体重の低下を防ぐことはできたが、治療効果は低減した。

## 考察

作動薬投与により、脂肪化・線維化が抑制されるだけでなく、筋再生が促進されたことから、作動薬によるレチノイン酸シグナルの刺激は間葉系前駆細胞の二面性をコントロールすることで治療効果を発揮したと考えられる。筋再生促進効果は細胞移植治療やエクソンスキップなどの他の治療法の効率を改善させると考えられ、併用治療への応用の期待が持てる。

## 結論

レチノイン酸シグナルの刺激は間葉系前駆細胞の二面性制御機構に作用し、脂肪化・線維化を抑制するとともに筋再生を促進し、筋ジストロフィーの治療に有効と考えられた。

## 参考文献

- 1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2):143-52. 2010.
- 2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-64. 2011.
- 3) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol* 5: 68. 2014.



# 筋ジストロフィーに対する ES 細胞由来再生医療等製品の開発

梅澤明弘

国立研究開発法人国立成育医療研究センター

## 緒言

筋ジストロフィーは筋線維の変成・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下の遺伝子性疾病であり、病因はジストロフィンの形成不全である。 Duchenne 型筋ジストロフィーの薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。そこで我々は筋ジストロフィーの新たな治療法として『細胞移植』に着目しその有効性・安全性のバリデーションシステムの構築を念頭に研究を実施した。本研究では今までの基礎研究成果をさらに応用・発展させ、筋ジストロフィーに対する ES 細胞由来再生医療等製品の開発を行った。本年度は特に、細胞加工施設において管理文書、製造手順書、記録の整備、プロセスバリデーション等のドライランを行い、ES 細胞由来再生医療等製品の製造体制の見直しを図った。

## 方法

1. ES 細胞由来再生医療等製品の調整を行うにあたり、個々のヒト細胞において発現している遺伝子を網羅的に解析する。ES 細胞由来再生医療等製品の分化形質発現システムを通じた情報収集を行う。また、新たな細胞リソースとして、ES 細胞由来分化細胞について、再生医療等製品としての可能性を模索していく。特に、細胞加工施設において管理文書、製造手順書、記録の整備、プロセスバリデーション等のドライランを行い、ES 細胞由来再生医療等製品の製造体制のレビューフィードバック体制を構築

する。

2. ヒト ES 細胞由来再生医療等製品の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討した。本年度は特に ES 細胞由来分化細胞を用いた増殖能および分化能に関する検討を行っていく。ES 細胞から分化誘導した間葉系幹細胞を用いて、筋細胞疾患への新たな治療法の検討を行った。

## <倫理面への配慮>

### 1. ES 細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒト ES 細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。

承認番号： 国立成育医療センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）文部科学大臣確認番号：18 諸文科振第 832 号

## **2. iPS 細胞を含めたヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮**

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。

## **3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮**

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## **結果**

ES 細胞から分化させた 4 ロットの細胞を準備し、各々の増殖能を解析した。細胞表面マーカーによる特性解析を行ったところ、CD90, CD105 陽性であったことから間葉系幹細胞であることが示唆された。染色体核型は、正常であった。また継代数が 1, 6, 11 の細胞を用意し Gene chip 解析を行ったところ、継代数やロットに依存せず安定した発現パターンを示した。次に骨格筋細胞への分化誘導を試みた。その結果、線維芽細胞様形態を示し、骨格筋細胞の特徴である多核体を認め、骨格筋分化

能を有することが示唆された。ES 細胞が不死であることで原料を無制限に提供できることから、ES 細胞由来間葉系幹細胞が筋ジストロフィーの再生医療製剤となる可能性が考えられた。ヒト ES 細胞の取り扱いに関するバリデーションシステムを確立した。特に、高度な清浄性を維持した細胞加工施設のなかで ES 細胞から再生医療等製品を製造する際のプロセスバリデーションに注力した。細胞治療の安全性、有効性の基準の確立に向けた基盤研究を実施した。具体的には、形態観察、増殖性、奇形腫形成、in vitro での三胚葉への分化、染色体検査、RNA シークエンス、エクソーム解析およびエピゲノム解析を行い、細胞治療の原材料となる細胞の安全性にかかる特性解析項目について検討した。

## **考察**

再生医療において使用する細胞は、移植に必要な充分な量の細胞数の獲得と細胞移植後 in vivo での生存率の低下の限界がある。そのためこれらの細胞の分化能を研究する際、必要な細胞数を得ることや、再現性の確認が重要な課題であった。近年、多能性幹細胞を用いた骨格筋の再生が注目されており、細胞源として ES 細胞、iPS 細胞などがあげられている。我が国において、再生医療に関するガイドライン、指針が相次いで成立、施行されており（再生医療等安全性確保法、再生医療推進法、医薬品医療機器等法）、当該研究の特色としては、高い安全性を有した施設でヒト細胞の分化能を有する状態を保つ培養条件、方法などを確立することにある。最適な培養条件を模索することにより、従来、困難であった安全で質の高い細胞治療に必要な細胞の確保が可能になる。

## 結論

本研究において、ES 細胞由来再生医療等製品を筋ジストロフィー治療に用いることに関するバリデーションシステムを確立し、細胞治療の安全性、有効性に対する前臨床研究の精度向上が期待出来る。高い安全性を有し、標準化された培養システムによって培養を行うことで、ヒト細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになる。これらのプロセスの明確化は、筋ジストロフィーの細胞治療の臨床研究を行う上で大きな礎となる。

## 参考文献

Sung TC, Li HF, Higuchi A, Kumar SS, Ling QD, Wu YW, Burnouf T, Nasu M, Umezawa A, Lee KF, Wang HC, Chang Y, Hsu ST.  
Effect of cell culture biomaterials for completely xeno-free generation of human induced pluripotent stem cells. Biomaterials. 2019 ;119638.

Chen LH, Sung TC, Lee HH, Higuchi A, Su HC, Lin KJ, Huang YR, Ling QD, Kumar SS, Alarfaj AA, Munusamy MA, Nasu M, Chen DC, Hsu ST, Chang Y, Lee KF, Wang HC, Umezawa A. Xeno-free and feeder-free culture and differentiation of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin-grafted hydrogels. Biomater Sci. 2019 ;7(10):4345-4362.



## 分担研究課題名

筋ジストロフィーの進行軽減療法の開発

—造血器型プロスタグランジン D 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減療法の開発—

裏出良博

東京大学アイソトープ総合センター

## 緒言

我々は、①現在も治療法の無い難病であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の筋変性領域に、炎症物質であるプロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub> の產生を行う造血器型 PGD<sub>2</sub> 合成酵素 (hematopoietic PGD<sub>2</sub> synthase, HPGDS) が発現することを見出し (1)、② DMD 患者の尿中 PGD<sub>2</sub> 代謝物を測定して、筋萎縮の進行が亢進する 4 歳から 10 歳にかけて、患者の体内的 PGD<sub>2</sub> 產生が上昇することを証明し (2)、③様々な HPGDS 阻害剤 (HQL79, TFC007, TAS204, TAS205) を開発して、それらを DMD モデル動物 (*mdx* マウス、筋ジストロフィー犬) に投与すると、筋壊死と運動機能低下が顕著に抑制されることを証明した (3, 4)。そして、④最新の HPGDS 阻害薬 TAS205 の国内の DMD 患者を対象とした第 1 相臨床安全性試験 (5) と探索的第 2 相臨床試験が終了した。

DMD の急激な筋萎縮に HPGDS による PGD<sub>2</sub> 產生が関係するという我々の研究成果は、PGD<sub>2</sub> 產生の上流や下流にも筋萎縮抑制の標的が存在することを示す。そこで、①2 種類の PGD<sub>2</sub> 受容体 (Gs 蛋白質共役型 DP 受容体と Gi 蛋白質共役型 CRTH2 受容体) に対する拮抗薬、及び、②PGD<sub>2</sub> 產生と連動する炎症性サイトカインの情報伝達を遮断する IκB キナーゼ阻害薬を、DMD モデルマウスに投与して、これらの薬剤による骨格筋の障害抑制効果を検討した。さらに、③DMD 患者の主な死因である心筋障害に対する保護作用を調べるために、高週齢 *mdx* マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルを用いて、HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬の心筋障害保護効果を調べた。

## 方法

*mdx* マウスへの HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬、IκB キナーゼ阻害薬投与による骨格筋障害の抑制効果の測定

雄 *mdx* マウス (C57BL/6 系統) に生後 4 週齢から 8 週齢までの 4 週間、溶媒 (7%DMSO を含む生理食塩水、10 ml/kg)、HPGDS 阻害薬 (TFC-007、30 mg/kg/day)、DP 受容体拮抗薬 (ONO-AE6-265、1.0 mg/kg/day)、CRTH2 受容体拮抗薬 (OC000459、1.0 mg/kg/day) を 1 日 1 回皮下投与し、IκB キナーゼ阻害薬 IMD2560 は 3%含有混餌の投与を行なった。

骨格筋変性の指標として、薬物投与終了時にイソフルラン麻酔下に採血した血清を用いて、骨格筋からの逸脱酵素であるクレアチニン・キナーゼの酵素活性を測定した。

高週齢 *mdx* マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルにおける HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬による心筋障害の抑制効果の測定

生後 8 ヶ月齢の雄 *mdx* マウスに、甲状腺ホルモン T<sub>3</sub> (2 mg/ml) を 1 週間飲水投与して T<sub>3</sub> 負荷心筋障害モデルを作成した。T<sub>3</sub> 投与と同時に、溶媒 (7%DMSO を含む生理食塩水、10 ml/kg)、HPGDS 阻害薬 TFC007 (30 mg/kg/day)、CRTH2 受容体拮抗薬 Cay10471 (3.0 mg/kg/day)、あるいは、DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265 (1.0 mg/kg/day) を毎日 1 回、皮下投与した。

心筋変性の指標として、薬物投与終了時にイソフルラン麻酔下に採血した血清を用いて、心筋からの逸脱蛋白質である心筋トロポニン I 量を ELISA により測定した。

## 結果

*mdx* マウスの骨格筋障害に対する HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬、IκB キナーゼ阻害薬の効果

骨格筋障害マーカーである血清クレアチニン・キナーゼ活性は、溶媒投与コントロール群 (8, 326 ± 1, 613

unit/l, n = 11) に比べ、HPGDS 阻害薬 TFC-007 (30 mg/kg/day) 投与群は 5,181±1,025 (n = 8) であり、統計学的に有為な低下を示さなかった (p=0.08)。DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265 (1.0 mg/kg/day) 投与群は 7,277±1,325 (n = 8) であり、統計学的に有為な低下を示さなかった (p=0.21)。

一方、CRTH2 受容体拮抗薬 OC000459 (1.0 mg/kg/day) の投与群は 4,364±529 (n = 8, p=0.03)、IkB キナーゼ阻害薬 IMD2560 (3%含有混餌) の投与群は 3,259±537 (n = 7, p=0.01) であり、共に、統計学的に有為な低下を示した。

#### 高週齢 *mdx* マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルにおける HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬による心筋障害の抑制効果

心筋障害マーカーである心筋トロポニン I の血清中濃度は、溶媒投与コントロール群 (9.9±5.4, n = 8) に比べ、HPGDS 阻害薬 TFC007 (30 mg/kg/day) 投与群では 3.3±1.5 ng/ml (n = 7, p=0.008)、CRTH2 受容体拮抗薬 Cay10471 (3.0 mg/kg/day) 投与群では 2.8±3.0 (n = 7, p=0.009)、DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265 (1.0 mg/kg/day) 投与群では 2.8±2.5 (n = 7, p=0.007) であり、共に、統計学的に有為に抑制した。

#### 結論

- ①CRTH2 受容体拮抗薬は HPGDS 阻害薬より低用量で DMD の骨格筋障害を抑制する。
- ②DP 受容体拮抗薬は DMD の骨格筋障害を抑制しない。
- ③IkB キナーゼ阻害薬も HPGDS 阻害薬と同等、あるいは、より低用量で DMD の骨格筋障害を抑制する。
- ④HPGDS 阻害薬は、T3 負荷心筋障害モデルにおいて、DMD の心筋障害を抑制する。
- ⑤CRTH2 受容体拮抗薬は、HPGDS 阻害薬より低用量で、DMD の T3 負荷心筋障害を抑制する。
- ⑥DP 受容体拮抗薬は、HPGDS 阻害薬より低用量で、DMD の T3 負荷心筋障害を抑制する。

#### 考察

HPGDS 阻害剤と CRTH2 受容体拮抗薬、IkB キナーゼ阻害薬の併用により、DMD の筋萎縮を大幅に抑制する治療法が開発できる可能性がある。

HPGDS 阻害剤と CRTH2 受容体拮抗薬、DP 受容体拮抗薬を併用することで、DMD の心筋障害を大幅に抑制する治療法が開発できる可能性がある。

#### 参考文献

1. Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J, Urade Y, Taniike M. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. *Acta Neuropathol.* 2002; 104:377-384.
2. Nakagawa T et al. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta* 2013; 23:10-14
3. Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, Sato Y, Kamauchi S, Nagata N, Maruyama T, Taniike M, Urade Y. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *Am J Pathol*, 2009, 174:1735-1744.
4. Urade Y. Proceedings of 67th International Astronautical Congress (IAC) 2016, IAC-16, B. 3. 3. 6.
5. Eri Takeshita E, Hirofumi Komaki H, Yuko Shimizu-Motohashi Y, Akihiko Ishiyama A, Sasaki M, Takeda S. A phase I study of TAS-205 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2018; 5 (11) : 1338-1349.

# 分担研究課題名：DMD に対する遺伝子細胞治療の基盤技術開発

氏 名：岡田尚巳  
所 属：東京大学医科学研究所  
遺伝子・細胞治療センター  
分子遺伝医学分野

## 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対する根治療法は未だ開発段階で薬物治療による対症療法が主であるが、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた遺伝子治療の開発が期待される。本研究では、*mdx* マウスや筋ジストロフィー犬 CXMD<sub>1</sub> に対しマイクロ・ジストロフィン発現 AAV ベクター(AAV-μDys)を用いたマイクロ・ジストロフィン補充療法の開発を進めることを目的とする。AAV を用いた遺伝子治療において、transgene に対する免疫応答が問題となっている。この課題を克服するために、1) 免疫寛容誘導法の検証、2) 治療遺伝子の配列最適化、3) カニクイザルでの検討を行った。

## 方法

- 間葉系幹細胞(MSCs)を AAV と併用投与することで免疫寛容誘導が可能かどうかの検討を行った。11 週齢の正常犬と同腹の CXMD<sub>1</sub> 1 頭に対し、MSCs を AAV9-Luc もしくは AAV9-μDys と共に経静脈投与した。7 日後に MSCs を再度経静脈投与し、その翌日に AAV9-Luc/AAV9-μDys を経静脈投与することで、免疫寛容を誘導した。上記のイヌについて、病態評価および剖検後サンプルについて免疫組織染色による検討を行った(論文投稿中)。
- mdx/B10* に対し、情動行動解析系を構築し、新生仔に rAAV9-μDys を経静脈投与を行った。処置群について情動行動を解析した。
- カニクイザルに対して体性幹細胞と AAV8-LacZ を併用投与して免疫寛容を誘導した個体について、筋生検・剖検を行った。

## 結果

- AAV-μDys の経静脈投与を行った CXMD<sub>1</sub> 1 頭(11805MA)の剖検後の骨格筋と心筋のサンプルについて、免疫染色で確認を行った。前脛骨筋については AAV-μDys 由来のジストロフィンの発現が確認出来た(論文投稿中)。
- mdx/B10* を用いて、短時間拘束後の Freezing を Smart 3.0 (Panlab, Harvard Apparatus) を用いて解析し、*mdx* マウスでは既存の報告<sup>1), 2)</sup> と同様に野生型と有意差があることを確認した。さらに AAV-μDys 投与群で Freezing が改善することを証明した(論文投稿準備中)。
- 臨床用ベクターの規格決定に向けた取り組みとして、これまで検討を行ってきた SPc5-12<sup>3)</sup> に加え、CK7, 8, 9 プロモーター<sup>4)</sup>を検討した。

- カニクイザル成体に DPCs と AAV8-LacZ を併用投与し免疫寛容を誘導した個体 2 頭と、コントロールとして AAV8-LacZ のみを投与した個体 2 頭について、8 週、16 週、24 週、48 週後に筋生検を行い、48 週後の時点で剖検し、主要臓器についてサンプリングを行った。また、同様にカニクイザル成体 1 頭に対し、体性幹細胞と AAV9-LacZ を併用投与し、免疫寛容を誘導した。コントロールとして AAV9-LacZ のみを投与した個体を作成し、AAV8-LacZ 投与個体と同様のタイムスケジュールで筋生検と剖検を行った。病理組織解析にて発現を確認した。

## 考察

- 正常犬、CXMD<sub>1</sub> とともに MSC と AAV の併用投与により transgene の発現が保たれることが示唆された。CXMD<sub>1</sub> については、μDys の治療効果が観察された。
- ヒトにおける発現を最適化した AAV-μDys を作製するための準備が整った。
- カニクイザルにおいて DPC と AAV を併用することで免疫寛容が誘導された。

## 結論

CXMD<sub>1</sub> に対し MSC と AAV の併用投与により免疫寛容誘導を行った個体については治療効果が示された。また、AAV-μDys の規格について再度筋特異的プロモーターの検討を行い、構築、精製後のベクターについて *in vitro*, *in vivo* における発現を確認する。AAV8-LacZ, AAV9-LacZ 投与に際し免疫寛容を誘導したカニクイザルの剖検終了分のサンプルについて病理学的解析および発現確認などの解析を行う予定である。

## 参考文献

- 1) Sekiguchi M., Zushida K., Yoshida M., et al: A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice, *Brain*, 132:124-135, 2009
- 2) Yamamoto K., Yamada D., Kabuta T., et al: Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient *mdx* mice, *Neuromuscular Disorders*, 20, 505-511, 2010
- 3) Li X., Eastman E. M., Schwartz R. J., et al: Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nature Biotech.*, 17:241-245, 1999
- 4) Hauser M. A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., et al: Analysis of Muscle Creatine Kinase Regulatory Elements in Recombinant Adenoviral Vectors, *Mol. Ther.*, 2:16-25, 2000



## 遺伝子医療とピアカウンセラーの役割

貝谷 久宣

一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会

### 研究協力者

矢澤健司<sup>1)</sup>、貝谷嘉洋<sup>1)</sup>、井原千琴<sup>1)</sup>、福江裕子<sup>1)</sup>、松元智美<sup>2)</sup>、川崎奈緒子<sup>2)</sup>

1) 社団法人 日本筋ジストロフィー協会

2) 医療法人和楽会 心療内科・神経科 赤坂クリニック

### ＜緒言＞

(社)日本筋ジストロフィー協会は、「一日も早く」をスローガンとして筋ジストロフィーの根治療法の実現を願い活動している。本研究班における我々の主な任務は、遺伝子治療をはじめとする本研究班の成果が実現するための社会的環境を作ることである。

### 1. 筋ジストロフィー・ピアカウンセラー養成講座

#### ＜はじめに＞

重要な要素として、遺伝子医療を円滑に進めるために医療や家族計画における不安や悩みを解決する手助けとなり、情報提供や心理的サポートを行うことのできるピアカウンセラーの養成が必要であると考える。

またピアカウンセラー養成講座は、筋ジストロフィーの遺伝子医療に主体的に関わるために基盤整備として必要であると共に、同じ障害をもつ当事者や家族が交流を深める機会を得るきっかけとしても有効であると考える。実際、遺伝子医療に関する意識調査(H23年度武田班分担研究)では遺伝に関する悩みを誰に相談するかという設問において、ピアカウンセラーという回答が複数認められた。

ピアカウンセラーの活動により、当事者や

家族が遺伝子医療に対する理解を深めることが期待される。また、当事者や家族がピアカウンセリングの知識や技術を習得することにより、他の当事者や家族は、有益な情報を得られ、さらには心理的なサポートが得られることで不安感や孤独感が解消できると考えられる。加えて、ピアの精神のもとで、当事者や家族の交流が深まることで、より細やかな意識や要望の聞き取り、そして課題や解決策の具現化につなげていくことも可能となると期待される。

ピアカウンセラー養成講座は、平成16年度から毎年開催されている。第5回までの参加者数は100人以上、第6回は19人、第7回は29人、そして第8回は24人である。平成24年度は初めて1年間に複数回の開催をしたところ、沖縄、福島、東京の3か所で合計63人の参加があった。

本年度は2019年10月13日(日)に山口県で開催予定であったが、台風のため延期となつた。以下は、今まで行われたピアカウンセラー養成講座の概要(一部抜粋)と、2010年度以降に実施しているアンケート結果を示す。

#### ＜方法＞

年	開催地	内容
2010	東京	筋ジストロフィーの子どもを持つということ DMD筋ジストロフィーの最新治療・遺伝の基礎 カウンセリングの心得と演習
2012	沖縄・福島・東京	福祉サービスの受け方 遺伝カウンセリングの基礎 沖縄型筋萎縮症の遺伝形式と形状 福山型筋ジストロフィーの遺伝子治療 遺伝子登録の実際 カウンセリングの心得と演習

		習
2014	新潟・三重	私が受けている在宅福祉 福山型医学情報登録について 筋ジストロフィーの遺伝子 医学および遺伝カウンセリング カウンセリングの心得と演習
2015	熊本・岐阜	心の健康法 私が受けている在宅福祉 筋ジストロフィーの遺伝子 医学および遺伝カウンセリング カウンセリングの心得と演習
2016	東京	筋ジストロフィーの医学 難病患者に対する医療法 ピアカウンセリングのため の心理学 電話応対の基礎知識・ロールプレイ
2018	山口	遺伝相談 自立生活について ピアカウンセリングの基礎・ロールプレイ

#### 【対象】

2010 年以降、社団法人日本人ジストロフィー協会会員と関係者のうち、受講を希望した患者家族や患者本人合計 228 名（平均年齢 46.7 歳、男性 46%、女性 54%）。参加者のうち、患者本人の参加は全体の 28% であった。

#### ＜結果＞

養成講座終了後に実施したアンケート（2010 年以降）の結果を示す。

患者家族の方々の養成講座参加のきっかけは、「カウンセリングに興味があった」、「家族が不安定になった時に、助けになるのではないかと思った」、「同じ悩みを持つ人の支えになりたい」というものがあり、患者家族以外の関係者の中にも「話を聞くことが好きで、自分の勉強になる」、「筋ジストロフィーの児

童と関わることがある」というピアカウンセリングへの動機づけの高い方が多かった。また、「以前受講してとても良かった」という意見もあり、繰り返して受講してくれる方もいることが分かった。

それぞれの講演に関しての理解度は、「とてもよく分かった」 41%、「よく分かった」 39%、「なんなく分かった」 15%、「よく分からなかった」 3% と理解度は概ね高かったが、遺伝カウンセリングの講演では専門的な話が入っていたため、理解するのが難しく感じられた可能性があった。しかし、遺伝相談のメリット・デメリットや、近くの相談実施施設がまとめられていた点などから、今回の情報を活用できそうだと感じた方が多かった。また、自立生活についての講演では、自立生活をする上で心構えの部分や、日々受けている支援やサポート、便利なツール等、実際の経験から得られた情報が共有された。日常の細かい困りごとや工夫点等も聞けたことから、参加者には非常に好評であった。

カウンセリングの演習では、参加者がグループに分かれて順番に「話し手」、「聞き手」、「観察者」という役割を経験し、実際に話を聞く時の心構えや技術などを実践した。演習中は、話を聞くことの難しさを感じた方々も多かったようだが、今回学んだことをカウンセリング以外の日常会話の場でも活かしたいという感想を多くいただいた。

ピアカウンセラー養成講座全体の満足度としては、「とても満足」 64%、「やや満足」 27%、「どちらでもない」 5%、「あまり満足していない」 1% という結果となった。改善すべき点はまだあると感じるが、養成講座自体が、患者家族で話す機会になったということも満足度を高める要因になったと思われる。

#### ＜考察＞

平成 16 年から開始されたピアカウンセラ

一養成講座は、2018年で20回目を終了したが、参加の動機づけは非常に高く、その活用の場や相手も広く、家族以外の他者にも向けてきた。アンケートの結果から満足度は高いことが示されたが、「自分自身の不安やストレスにどう対処したらいいかも教えて欲しかった」などの意見もあり、患者本人や家族のストレスマネジメントなどにも焦点を当てた情報提供の必要性を感じられた。また、治療や福祉的サポートについても、より情報を得たいと希望している声がみられ、全般的な情報提供・交流の場として活用していくことも考えられる。ニーズに沿った情報を提供できるよう、内容を改善しながら今後もこのよくな取り組みを続けていきたい。

## 2. 筋ジストロフィー協会講演会

### <はじめに>

筋ジストロフィーの遺伝子治療が、特定の病型、病変において開始されはじめた。今後、様々な病型においても適用されると予想される。

その様な中、治験や遺伝子情報の提供など、治療法確立に向けて患者の協力が重要となってきた。

そこでこの度、患者家族会の一般社団法人日本筋ジストロフィー協会の東京支部の呼びかけで、「一般社団法人日本筋ジストロフィー協会講演会」と題して、筋ジストロフィーの当事者、家族を対象にして勉強会を行い、様々な病型についての正確な知識を学び、各病型の患者さんの経験や考え方について情報を共有した。

### <方法>

#### 【期間】

2020年2月2日（日）東京都千代田区（JA共済ビルカンファレンスホール）

### 【対象】

講演会に参加した一般社団法人日本筋ジストロフィー協会会員と家族、関係者の22家族計36名。

講演内容は、前半は「筋ジストロフィーの治験を前にして家族が知っておくべきこと（貝谷久宣）」、後半は「～家族のレジリエンス（立ち直る力）を高めるために～マインドフルネスで感情を整え、癒す（東京大学医学系研究科グローバルナーシングリサーチセンター特任助教 戸部浩美）」、さらに討論・意見交換の時間を設けた。

### <結果>

前半の講演では筋ジストロフィーの新しい治療法や治験の説明、ウェアラブル機器を利用した臨床治験研究モデルや新薬が市販されるまでのプロセスを紹介した。治験は現在目白押しであること、筋ジストロフィー薬は承認の際に他の薬剤よりは早く審査してもらえること、治験の実施は患者団体からの要求が大切であることなどを紹介した。

後半の講演では、身近な人の関わり、そこから来る困難や強いストレスに振り回されないよう、「しなやかに生きる力＝レジリエンス」を身につけ方について説明した。また、感情マネジメント法として、怒りのコントロール方法（怒りの客観視、見方・考え方を変えるなど）、今ここを大切にする・呼吸に意識を向けるといったマインドフルネスも紹介した。参加者でペアになり、天使のささやき・悪魔のささやきの練習も実施した。「ゆっくり進んでいけばいい」「そんなに頑張らなくて大丈夫」「弱さがあるから人の痛みがわかる」などの考え方を見つけ、認知の変容方法を学んでいただく機会となった。

最後に、討論・意見交換会では、参加者が様々な立場から体験談や意見を積極的に交換することができ、大変貴重な機会となった。

特に治療法への質問が多く、「新薬（ビルトルセン）がいつ発売となるか」が患者や家族にとっての最大の関心事であることが分かった。他のエクソン・スキッピングについての質問も多く、新しい治療方法を期待している様子も見受けられた。

筋ジストロフィーの治験に対しては、患者の負担が少しでも軽くなるよう求める声が聞かれた。

患者家族からは、障がい者を抱える患者家族のメンタルヘルスケアが課題であるという声が多く、戸部浩美先生による家族のメンタルケアに関するお話に興味を持ち、今後の生活の参考にされた方が多いようであった。

#### ＜考察＞

一般社団法人日本筋ジストロフィー協会の標語「1日も早く」は、早期の根本治療を目指すことを意味しているので、その東京支部においても患者当事者、家族の治療法研究に対する期待も大きく、基本的には先端の遺伝子治療には協力的である。

しかし、遺伝子治療に関する倫理観、実際の治療の際の患者の負担(痛み、ストレス、時間)、副作用の可能性についての不安は、病気の種類や病型によって不安があるだけでなく、患者の個人的な思い、年齢、立場などによっても大きなばらつきがあることは、確かのようである。また、患者とそれを取り巻く親族においても、遺伝子治療に対する捕らえ方が違うことも伺える。さらにこれらの遺伝子治療や遺伝に対する思いは、各個人において確固としたものがあるわけではなく、時の経過や立場の変遷を通じて揺れ動くものであることも、忘れてはならない。

したがって今回のように、単に専門の医師から最新の情報を得るだけではなく、よく似た病変や症状の当事者やその家族が集まり、生活の様子について情報を共有する事は、各

個人が遺伝子治療に対してどのように向き合っていけばいいのか考えるきっかけとなり、また治験や遺伝子診断も含めて患者が何らかの意思決定をする際の、考慮に入れる材料になる可能性もあるので、非常に有意義であったと考える。(考察は貝谷嘉洋の記述による)。

#### ＜結論＞

当事者、家族全体としては根本治療に期待を寄せている事は間違いない、またその治療に最も近いのが遺伝子治療であるという認識があるのは確かであり、その分野での研究者の成果に期待は非常に強い。

今回、筋ジストロフィー治療法の開発に関連し、治験実態や必要性を患者当事者や家族に伝えたことで、今後の研究活動に結び付き、新たな成果がでることを期待したい。

#### ＜参考文献＞

なし

## iPS細胞由来骨格筋幹細胞を用いた細胞移植治療法の開発

分担研究者 櫻井 英俊  
京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

### 【緒 言】

DMD への治療法として、エクソン・スキッピングはいくつかの製剤で治験が進行し、臨床応用が最も期待されている治療分野である。しかしながらその適応は、特定の遺伝子変異を持った DMD 患者に限られるため、変異部位に限定されない新規治療法の開発が切望されている。

骨格筋幹細胞であるサテライト細胞を用いた細胞移植治療法は、モデルマウスでは治療効果を発揮している。しかしながらヒトでは治療に十分な量のサテライト細胞を得ることは困難である。そこで iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し、これを移植細胞のソースとすることで、再生医療製剤の開発も可能であると期待されている。我々は再生医療用 iPS 細胞ストックから骨格筋幹細胞を分化誘導し、効率よく安全な方法で移植治療可能な培養法・移植法を確立することを目指す。

### 【方 法】

前年度までに我々が作製した Myf5-tdTomato ノックイン・ヒト iPS 細胞を用いて、骨格筋幹細胞を分化誘導、純化し、細胞移植時の骨格筋再生能を評価する。Myf5-tdTomato ノックイン・ヒト iPS 細胞からの Myf5 陽性細胞分化誘導、Myf5 陽性細胞の FACS による純化と、再培養実験。細胞外マトリックスや成長因子・阻害剤の添加、低酸素培養の実施によって、Myf5 陽性率の変化や Pax7・MyoD 陽性率の検証、再培養後の DMD モデルマウスへの移植を行い、有効性と安全性を検証する。

### 【結 果】

分化誘導法のプロトコール化を進め、iMatrix-511 と StemFit AK02N を用いたフィーダーフリー維持培養系からの分化誘導プロトコールを確立した。そこから得られた Myf5 陽性・骨格筋系譜幹細胞を分離し、約 50% がサテライト細胞マークターである Pax7 を発現していることが明らかとなった。また大阪大学タンパク質研究所の関口教授との共同研究により、ヘパラン硫酸鎖結合型のラミニン 421E8 フラグメントの使用により、Myf5 陽性細胞の出現率を 4 倍程度上昇させることに成功した。

免疫不全 DMD モデルマウス<sup>1)</sup>への移植実験では、移植後 12 週までのジストロフィン陽性筋線維の存在を確認し、移植後 8 週までの Pax7 陽性サテライト細胞、MyoD 陽性筋芽細胞としての筋再生への寄与を確認した。ジストロフィン陽性率は、移植後 4 週で約 4% であった。

移植後の筋収縮力の改善効果の検証では、移植後 4 週で易疲労性の改善を認め、移植後 6 週で非移植側と比較し、統計学的に有意な筋張力の改善を確認した。これは現在報告されている細胞移植治療研究の報告でも見られていないデータであり、我々の細胞移植治療法の有効性を示すものである。一方、3 例中 1 例で移植 12 週後に腫瘍の形成を認めた。腫瘍細胞の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Oct3/4 の発現が極めて高いという事が明らかとなった。そこでレトロウイルスベクターの再活性化を疑い、PCR にてベクター由来遺伝子の発現を定量したところ、移植する前の細胞では発現していなかったのに対し、形成された腫瘍ではレトロウイルスベクター由来の Oct3/4 の発現が極めて高く上昇していることが分かった。

### 【考 察】

本年度は主に Myf5-tdTomato ノックイン iPS 細胞を用いた検討を行い、移植により統計学的に移植後の筋張力が改善することを明らか

にした。これまで組織学的にジストロフィン陽性線維の出現を持って治療効果を述べた論文がほとんどであったが、我々のデータは運動能力の改善にも寄与するという初のデータであると考える。またヘパラン硫酸鎖結合型のラミニン421E8 フラグメントでの分化誘導効率上昇は、幹細胞を効率よく純化するために重要であるとともに、将来の臨床応用に向け、GMP 基準で合瀬可能なマテリアルである点からも、極めて大きな成果であると考える。腫瘍化が見られた点については、現段階ではレトロウイルスベクターの再活性化によるものが考えられる。エピゾーマルベクターを用いて樹立された臨床用の iPS 細胞ストックを用いての検証を進め、エピゾーマルベクターであれば腫瘍化が起きないのかどうかを早期に判定する必要がある。

### 【結 論】

iPS 細胞由来骨格筋幹細胞を移植することで、DMD モデルマウスの骨格筋にジストロフィン陽性線維が再生され、移植後 6 週で筋張力が改善した。培養基材にマトリゲルに変えてヘパラン硫酸鎖結合型のラミニン E8 フラグメントを用いることで、骨格筋幹細胞の分化誘導効率が 4 倍になった。Myf5 陽性細胞移植では、移植後 12 週で腫瘍形成を認めてしまったが、その原因是 iPS 細胞樹立に用いられたレトロウイルスベクターの再活性化である可能性がある。

### 【参考文献】

- 1) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K et al: Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Myoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* 8(4), e61540, 2013

## 化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発

氏名 清尾康志

所属 東京工業大学生命理工学院

### 諸言

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のナンセンス変異を原因とする重篤な疾患である。DMD の治療法として、アンチセンス核酸(ASO)を用いたエキソンスキッピング法が注目されており、エキソン 51 をスキップする Eteplirsen が 2016 年に FDA に認可されている。Eteplirsen はホスホロジアミデートモルホリノオリゴスクレオチド(PMO)骨格を有する人工核酸であり、投与量が 30 mg/kg/週と多く、その薬価も高額である。従い、より活性が高くかつ持続性の長い新たな化学修飾 ASO の開発が必要である。

そこで、新たな ASO として、2'-O-メチルカルバモイルエチル(MCE)核酸をはじめ、様々なカルバモイルエチル型骨格を有する人工核酸(XCE 核酸)<sup>1-5)</sup>を開発し、in vitro および in vivo の実験系で、新規 ASO としての性質を明らかにした。

### 方法

新たな修飾核酸の開発に向け、様々な修飾基を有する誘導体を効率よく合成するための共通中間体として、新たな合成法を開発した。また、その中間体を用いて新たな修飾基 X を有する XCE 核酸を合成した。さらに、これら XCE 核酸と LNA、ENA など架橋型核酸を組み合わせた ASO を合成し、そのエキソンスキッピング活性を評価した。

### 結果

リボチミジンから合成した共通中間体 2'-ベンジルオキシカルボニルエチル誘導体を用いて、種々の修飾基をもつ XCE 核酸のホスホロアミダイトを合成することに成功した。修飾基の特性としては親水性基、脂溶性基、アミノ酸など様々な物性を有するものを導入した。この手法を利用して、10 種類の XCE 核酸ユニットを合成し、修飾基 X の構造多様性の拡[ここに入力]

張に成功した。また、これら XCE 核酸と LNA または ENA を組み合わせた ASO を合成した。

### 活性評価

新規 XCE 核酸を含む人工核酸の標的 RNA に対する結合能を二重鎖の熱融解曲線を用いて評価し、XCE 核酸の構造に関わらず高い結合のうを示すことが分かった。また、架橋型核酸とこれら XCE 核酸を組み合わせた ASO について、exon23 のスキッピング効率を評価したところ、in vitro および mdx マウスに対する筋肉内投与いずれの評価系においてもエキソンスキッピング活性を示すことが分かった。

### 結論

今回の研究により様々な物理化学特性を有する XCE 核酸の合成法を開発し、それら XCE 核酸を含む ASO や XCE と標的 RNA への高い親和性を有する架橋型核酸を組み合わせた ASO の性質を明らかにすることができた。既に報告しているように XCE 核酸を含む ASO は高い ASO 活性を維持したまま、毒性低減効果などの望ましい性質を有することが期待されている。今後、様々な物性を有する XCE 核酸の開発を続けるとともに、架橋型核酸との組み合わせた効果などもより詳細に解明し、化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発につなげることができると期待される。

### 参考文献

- 1) Masaki Y, Yamamoto K, Yoshida K, Maruyama A, Tomori T, Iriyama Y, Nakajima H, Kanaki T, Seio K. *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17, 4835-4842.
- 2) Masaki Y, Yamamoto K, Inde T, Yoshida K, Maruyama A, Nagata T, Tanahata J, Takeda S, Sekine M, Seio K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019, 29, 160-163.
- 3) Masaki Y, Iriyama Y, Nakajima H, Kuroda Y, Kanaki T, Furukawa S, Sekine M, Seio K. *Nucleic Acid Ther.* 2018, 28, 307-311.
- 4) Tomori T, Nagaoka K, Takeshita L, Shiozawa T, Miyatake Y, Masaki Y, Sekine M, Seio K. *J. Org. Chem.* 2018, 83, 8353-8363.
- 5) Inde T, Masaki Y, Maruyama A, Ito Y, Makio N, Miyatake Y, Tomori T, Sekine M, Seio K. *Org. Biomol. Chem.* 2017, 15, 8371-8383.



## メカノ-メタボ カプリングに関する研究- 骨格筋量とエネルギー代謝制御の性差の解明と筋萎縮医療への応用

田中廣壽

東京大学医科学研究所附属病院

抗体・ワクチンセンター

### 緒言

サルコペニアに肥満が合併すること、性差が存在すること、が示唆されているが、その実態は不明であり、筋萎縮やエネルギー代謝異常疾患の臨床には反映されていない。そこで、かかる骨格筋量制御と個体レベルのエネルギー代謝における性差の分子基盤を解明することを目的とした。

### 方法

骨格筋量とエネルギー代謝を複雑系として捉えて数理科学的に理解することをめざし、以下の(A)-(C)の研究から、モデルマウス個体の代謝学的データを臓器・血液のマルチオミクスデータと併せて数理解析し、関連因子を絞り込む。候補因子の機能を分子生物学的に検証し、その結果を数理解析にフィードバックする。

- (A) マウスのマルチオミクスデータ取得
- (B) データ解析および数理モデル構築とシミュレーション
- (C) 骨格筋量、脂肪量などの体組成の制御とエネルギー代謝への関連が示唆される因子について分子生物学的検証

### 結果

独自に作成した骨格筋特異的グルココルチコイド受容体(GR)欠失マウスにおいて、骨格筋肥大の程度に「オス>メス」の性差を見いだした。腓腹筋トランスクriptオーム解析により、オス、メス各々に特有のGR感受性遺伝子群があり、とくに Foxo、GR標的遺伝子はメスで多く発現していた。GO解

析では、オスではオートファジー、ユビキチン-プロテアソーム経路、メスでは脂肪酸合成経路の遺伝子群の発現が多い傾向があった。腓腹筋と血漿のメタボローム解析では、骨格筋代謝物プロファイル、血漿脂肪酸プロファイルに顕著な性差が存在し、骨格筋 GR の有無によっても変動した。

### 考察

今まで骨格筋量制御に関わる遺伝子として GR を含む 47 遺伝子が同定されているとともに(1)、ICU 患者の骨格筋トランスクriptオーム解析でも GR が上流因子として抽出されていることからも(2)、骨格筋 GR は骨格筋萎縮に対する治療法開発の標的分子として重要である。さらに、本研究から、GR の下流の遺伝子発現プロファイルには顕著な性差が存在した。メタボローム解析の結果と合わせ、性によって骨格筋 GR の下流のシグナルが異なり、骨格筋のみならず全身の代謝の性差の形成に関与していることが示唆された。したがって、骨格筋 GR は骨格筋一代謝連関を制御する分子としても新たな治療標的分子の候補となり得る。

### 結論

マウス骨格筋量・代謝と個体レベルの代謝には性差が存在し、その少なくとも一部は骨格筋 GR を介した遺伝子発現調節による。

### 参考文献

1. Verbrugge SAJ, et al. Genes Whose Gain or Loss-Of-Function Increases Skeletal Muscle Mass in Mice: A Systematic Literature Review. *Front Physiol.* 2018; 9: 553
2. Llano-Diez M, et al. RNA-sequencing reveals altered skeletal muscle contraction, E3 ligases, autophagy, apoptosis, and chaperone expression in patients with critical illness myopathy. *Skeletal Muscle* 2019 9:9



## 発表論文リスト

Hirotoshi Tanaka, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa

Role of skeletal muscle glucocorticoid receptor in systemic energy homeostasis.

Exp Cell Res. 2017 Nov 1;360(1):24-26. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.049

Naoki Ito, Isao Kii, Noriaki Shimizu, Hirotoshi Tanaka and Shin'ichi Takeda

Direct reprogramming of fibroblasts into skeletal muscle progenitor cells by transcription factors enriched in undifferentiated subpopulation of satellite cells.

Sci Rep. 2017 Aug 14;7(1):8097. doi:10.1038/s41598-017-08232-2

Toshiki Eri, Kimito Kawahata, Takeyuki Kanzaki, Mitsuru Imamura, Kazuya Michishita, Lisa Akahira, Ei Bannai, Noritada Yoshikawa, Yasumasa Kimura, Takeshi Satoh, Satoshi Uematsu, Hirotoshi Tanaka, and Kazuhiko Yamamoto

Intestinal microbiota link lymphopenia to murine autoimmunity via PD-1+CXCR5-/dim B-helper T cell induction.

Sci Rep. 2017;7:46037. doi:10.1038/srep46037

Ono T, Kamimura N, Matsuhashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, Hishiki T, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, Ieda M, Sano M, Fukuda K, Kaneda R.

The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure.

Sci Rep. 2017 Jan 4;7:39752. doi:10.1038/srep39752

Erika Matsubara, Noritada Yoshikawa, Osamu Hosono, Hiroyuki Baba, Toshiki Eri, Masaaki Uehara, Aya Oda, Chieko Sekita, Atsuo Taniguchi, Hirotoshi Tanaka

A rheumatoid arthritis patient complicated with adenine phosphoribosyltransferase deficiency and unilateral renal agenesis: a first case report.

Modern Rheumatology Case Reports. 2017 Jan;1:1. 15-19. doi:10.1080/24725625.2016.1266729

Yoshikawa N, Shimizu N, Uehara M, Oda Y, Matsumiya R, Matsubara E, Kobayashi H, Hosono O, Kuribara-Souta A, Baba H, Nagamura F, Kiryu S, Tanaka H.

The effects of bolus supplementation of branched-chain amino acids on skeletal muscle mass, strength, and function in patients with rheumatic disorders during glucocorticoid treatment.

Mod Rheumatol. 2017 May;27(3):508-517. doi: 10.1080/14397595.2016.1213480

Hiroki Yamazaki, Akifumi Kushiyama, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Takeshi Yamamotoya, Yusuke

Nakatsu, Takako Kikuchi, Sunao Kaneko, Hirotoshi Tanaka and Tomoichiro Asano

Protective effect of sex hormone-binding globulin against metabolic syndrome: in vitro evidence showing anti-inflammatory and lipolytic effects on adipocytes and macrophages.

Mediators Inflamm. 2018 Jun 25;2018:3062319. doi: 10.1155/2018/3062319

Kotaro Anan, Shinjiro Hino, Noriaki Shimizu, Akihisa Sakamoto, Katsuya Nagaoka, Ryuta Takase, Kensaku Kohrogi, Hirotaka Araki, Yuko Hino, Shingo Usuki, Shinya Oki, Hirotoshi Tanaka, Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo, Mitsuyoshi Nakao

LSD1 mediates metabolic reprogramming by glucocorticoids during myogenic differentiation.

Nucleic Acids Res. 2018 Jun 20;46(11):5441-5454. doi:10.1093/nar/gky234

Yuki Usui Yasumasa Kimura Takeshi Satoh Naoki Takemura Yasuo Ouchi Hiroko Ohmiya Kyosuke Kobayashi Hiromi Suzuki Satomi Koyama Satoko Hagiwara Hirotoshi Tanaka Seiya Imoto Gérard Eberl Yukio Asami Kosuke Fujimoto Satoshi Uematsu

Effects of long-term intake of a yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 and *Streptococcus thermophilus* 1131 on mice

Int Immunol. 2018 May 15;dxy035. doi: 10.1093/intimm/dxy035

Uehara M, Yamazaki H, Yoshikawa N, Kuribara-Souta A, Tanaka H.

Correlation among body composition and metabolic regulation in a male mouse model of Cushing's syndrome.

Endocr J. 2019 Sep 7. doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0205. [Epub ahead of print]

Yamamoto M, Takahashi H, Tanaka H.

Differences in clinical features of IgG4-related disease between elderly and younger patients.

Geriatr Gerontol Int. 2019 Jun; 19(6): 564-565. doi:10.1111/ggi.13662.

Tomohiro Matsuhashi, Jin Endo, Yoshinori Katsumata, Tsunehisa Yamamoto, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Masaharu Kataoka, Sarasa Isobe, Hidenori Moriyama, Shinichi Goto, Keiichi Fukuda, Hirotoshi Tanaka, Motoaki Sano

Pressure overload inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity in cardiomyocytes and promotes pathological cardiac hypertrophy

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2019 May 130:122-130. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.019. Epub 2019 Apr 1.

Zentaro Kiuchi, Yukino Nishibori, Satoru Kutsuna, Masashi Kotani, Ichiro Hada, Toru Kimura, Toshiyuki Fukutomi, Daisuke Fukuhara, Noriko Ito-Nitta, Akihiko Kudo, Takanobu Takata, Yasuhito Ishigaki,

Naohisa Tomosugi, Hirotoshi Tanaka, Satsuki Matsushima, Shinya Ogasawara, Yoshiaki Hirayama,  
Hiromu Takematsu, and Kunimasa Yan

GLCCI1 is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells

FASEB J. 2019 Mar 12:fj201800344RR. doi: 10.1096/fj.201800344RR.



## 遺伝性筋疾患の病態解明と治療法の開発

分担研究者	野口 悟 室長、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部
研究協力者	小川恵、外来研究補助員、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部 西野一三、部長、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

### 緒言

VI型コラーゲン遺伝子の変異により、関節異常を伴った遺伝性筋疾患が引き起こされる。この疾患に対する治療法は未だ確立されていない。我々は今までに、患者筋で観察されるVI型コラーゲンの分布には完全に欠損している例と筋鞘膜のみで欠損している例があることを報告してきた<sup>1), 2)</sup>。興味深いことにVI型コラーゲン分子は筋線維で合成されるのではなく、間質に存在する間質細胞によって作られることが報告されている。患者筋での筋病理解析により、本疾患の筋病理学的特徴は筋線維大小不同と線維化および進行例での脂肪化の亢進であることを明らかにしている。2010年、上住らにより、骨格筋に存在する間質前駆細胞が、骨格筋疾患で見られる線維化と脂肪組織の起源であることが示された<sup>3), 4)</sup>。このことから、この骨格筋に存在する間質前駆細胞が本疾患の病態に深くかかわっているのではないかと考えられた。*Col6a1KO*マウスの解析では、本疾患の病態に関わる2つの重要なイベントを見出した<sup>5)</sup>。骨格筋発達における筋線維数増加の不全と間質前駆細胞の増加、形態変化を伴う線維化である。本研究では、優性遺伝型VI型コラーゲン欠損症のモデルマウスを作製し、表現型の解析を通して、疾患病態の解明に迫るとともに、治療法作製のための基礎研究として、変異アレル選択的遺伝子サイレンシングの研究を行った。さらに、ヒト患者由来細胞での治療法評価系作製を目指し、VI型コラーゲン関連ミオパチーの患者の遺伝子変異解析を進めた。

### 方法

優性型モデルマウス (*Del50*マウス)  
マウス受精卵へ Zinc finger nuclease の導入により、*Col6a1* 遺伝子が部分欠失した c.809\_855+3del 変異マウスを得た。モデルマウスとして、変異ヘテロ接合性マウスを用い、すべての実験を行った。

### 生理学的解析

ホイールケージにて一週間単独飼育により、自発運動量を測定した。また、四肢握力測定を行った。

骨格筋の *ex vivo* での筋力測定は前脛骨筋、腓腹筋を用いて、定法に基づき、トランスデューサーにて単収縮と強縮を測定した。

### 筋病理解析

筋病理解析には前脛骨筋を用いた。筋線維数および線維径測定では、筋線維細胞膜タンパク質 caveolin3 に対する抗体染色、基底膜ラミニンα2 に対する抗体染色を行った。また、間質細胞の染色には PDGF 受容体 α 抗体を用いた。計測には Image-J にて短径を測定した。

siRNA による遺伝子サイレンシング  
既報のとおり、ルシフェラーゼアッセイによって測定した<sup>6)</sup>。

AAV ベクターは、定法に従って調製した。初代細胞でのノックダウン効果は、RT-PCR およびパールカンと VI型コラーゲン染色により評価した。

### シングルセル RNAseq

*Del50*マウスおよび野生型マウスの後肢筋から、酵素処理により間質細胞を調製した。生細胞を得るために、プラスチックディッシュへの接着細胞を単離した。RNAseq は、10xGenomics の Chromium システムにてライブラリーを作製した。作製したライブラリーをイルミナ社 Hiseq システムを用いて、150bp ペアエンド法によりシーケンシングした。1 検体あたり 3,000 細胞程度、合計 100 ギガ塩基の配列データを取得した。解析には、10xGenomics の Cell Ranger と Loupe Cell Browser を用いた。

## 変異解析

遺伝子解析は、患者ゲノムを用いて、サンガーフラスチックまたは次世代シーケンサーにより解析した。患者検体を対象とした研究では、遺伝子解析の結果を含む情報を登録、患者検体の研究使用することについてのインフォームド・コンセントを同意書として得ることを必須とするとともに、研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるよう十分に配慮した。取り扱う情報は遺伝子解析の結果を含む個人情報であり、個人情報管理については十分な配慮を行った。

## 結果

得られたヘテロ接合性 *Del50* マウスは、メンデル遺伝率で算出された。発現した転写物の解析では、exon 9 が全長にわたり欠失していた。生後 3 週から生涯にわたり、野生型の 90% 程度の低体重を示したが、致死個体はなく、外見上の異常は認められなかった。ヘテロ接合体マウスの筋力は、生後 3 ケ月齢、7 ケ月齢ともに単収縮に著明な低下が見られた。握力は 4 ケ月齢から低値を維持していた。骨格筋の収縮力は *Col6a1KO* マウスと同様に単収縮力のみが著明に低下し、進行性ではなかった。以上の観察から、*Col6a1* 遺伝子の部分欠失遺伝子産物はドミナントネガティブの効果により、低体重・筋力低下を引き起こすことが示唆された。*Del50* ヘテロ接合性マウスの前頸骨筋の筋病理像は、筋壊死・再生ではなく、筋線維の大小不同、間質の線維化が著明であった。また、*Col6a1KO* マウスと同様に、骨格筋は、筋線維の平均径は野生型マウスと同様であり、筋線維の総数が約 2/3 程度に減少していた。また、線維化に伴って、間質前駆細胞の増殖と VI 型コラーゲンのデポジットの蓄積が認められた。さらに電顕観察では、野生型マウス骨格筋では間質前駆細胞周囲に VI 型コラーゲンが存在するのに対し、*Del50* マウス骨格筋では、間質前駆細胞周囲から離れて VI 型コラーゲンが会合し、I 型コラーゲンなどのコラーゲン線維と相互作用している像が認められた。

siRNA による変異アレル特異的な遺伝子サイレンシングによる治療法の検討を行

った。欠失部位の近傍に 10 種類の siRNA をデザインし、ルシフェラーゼアッセイにて遺伝子サイレンシング効果を調べた。その結果、1 種類の siRNA に、変異配列特異的な発現低下効果が認められた。さらに、同定した効果の認められる siRNA 配列に基づき、shRNA をデザインし、AAV2 ベクターにて細胞への導入を試みた。変異マウス骨格筋由来間質前駆細胞に導入したところ、変異アレル由来の RNA だけが有意に選択的発現低下が観察された。また、VI 型コラーゲンの細胞周囲への結合性とパールカンとの共局在が定量的に示された。

VI 型コラーゲン関連ミオパチー患者を 100 名以上同定した。その 9 割以上が片アレル性の変異であり、残り 1 割弱が両アレル性であった。片アレル性変異の患者骨格筋では VI 型コラーゲンの蓄積が観察された。また、異常スプライシングによる配列挿入を引き起すディープイントロン変異が 5 例認められた。このようなエクソン単位の欠失・挿入は総計 25% の患者に認められた。このうち 6 つの変異について、上述の変異アレル特異的な遺伝子サイレンシングを目指し、siRNA のデザインを行った。その結果、検討したすべての変異 mRNA 構造変化に対して、特異性を示す siRNA をデザインすることが出来た。

シングルセル解析では、約 3000 個の細胞の解析ができた。*Del50* マウス、野生型マウスとともに、7 種類、9 グループの細胞集団を同定できた。このうち野生型では、約 6 割を間質前駆細胞が占めていた。*Del50* マウスでは、その間質前駆細胞と組織マクロファージの細胞数は、倍加していた。間質前駆細胞の遺伝子発現プロファイルでは、サイトカインの産生遺伝子の発現低下とともに、線維化に関連した細胞骨格と成長因子、サイトカイン産生、細胞外マトリックス成分遺伝子の有意な発現上昇が認められた。これらの線維化への変化は、免疫組織染色でも確認され、線維化マーカー陽性細胞は形態変化も伴っていた。さらに、10T1/2 細胞を用いて細胞モデリングを試みた。VI 型コラーゲン上で培養した細胞は、I 型コラーゲン上で培養した細胞に比べ、細胞のサイズは低下し、focal adhesion の形態も小さく、ビンキュリンの局在も低下していた。*Del50* マウ

スやヒト VI 型コラーゲン関連ミオパチー患者の骨格筋で見られた間質前駆細胞の形態を再現したものと考えられた。

### 考察

*Col6a1KO* マウスと同様に、優性遺伝型モデルマウス (*DeJ50*) 骨格筋の筋線維数は、野生型の 6 割程度しかなく、筋力低下、骨格筋サイズの低下は、筋線維萎縮によるものではなく、むしろ、筋線維数が少ないせいであると考えられた。また、*DeJ50* マウス骨格筋は *Col6a1KO* マウスより顕著な線維化の亢進を示した。これに関連して間質前駆細胞数の増加と VI 型コラーゲンデポジットが認められた。このことから、変異をもつ VI 型コラーゲン分子がミクロフィラメントに取り込まれることで、蓄積デポジットを形成し、VI 型コラーゲン分子が間質全体から失なわれることにより、病態が引き起こされているのではないかと考えられた。上記の結果から、この *DeJ50* マウスが優性変異型 VI 型コラーゲン関連ミオパチーのマウスモデルであると考えられた。

シングルセル解析により、間質細胞を中心には、7 種類 9 グループの細胞集団を特定し、それらの遺伝子発現の特徴づけを行った。疾患モデルでは間質前駆細胞の増加し、線維化マーカーの発現が亢進していた。ただし、この線維化マーカーの発現はすべての間質前駆細胞全体で一様ではなく、とても不均一であった。これと一致して、一部の細胞に線維化マーカー遺伝子産物の発現が免疫染色でも確認された。このことは、この間質前駆細胞の線維化への変化は *Col6a1* 遺伝子変異が直接規定するものではなく、進行性の二次的なものであると思われた。また、細胞実験の結果を考えあわせ、間質から VI 型コラーゲンが失われた結果、間質細胞はコラーゲン線維との相互作用により、テンションを受け、形態変化をきたすとともに、線維化遺伝子の発現が引き起こされ、線維化に陥るものと考えられた。

細胞レベルではあるが、変異アレル特異的に遺伝子発現をサイレンシングすることにより、細胞でのコラーゲン VI の発現回復が引き起こされた。このことは、変異とタンパク質の局在変化が直接関連しているこ

とを示している。siRNA の導入法を検討したが、AAV2 にて細胞に導入することで、より安定的な結果を得られることが可能になった。今後はこの方法を *in vivo* (マウス) で展開したいと考えている。

ヒト患者の変異解析から *in vitro* での細胞での試験、siRNA のデザインに関する基盤となる情報を収集することが出来た。今後は、これらの情報を活用していきたい。

### 結論

*Col6a1* 部分欠失マウスは、優性遺伝型コラーゲン VI 欠損症を十分再現しうるマウスマルモデルであるシングルセル解析から、分子病態を描画することが出来た。ヒト患者では、片側アレル変異がほぼ 9 割を占めし、エクソン欠失した変異 mRNA については、特異的な siRNA のデザインが可能であった。

### 参考文献

- 1) Ishikawa H., Sugie K., Murayama K., et al. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology*, 62, 620-3, 2004.
- 2) Kawahara G., Okada M., Morone N., et al. Sarcolemma specific collagen VI deficiency in UCMD is associated with diminished cell anchorage. *Neurology* 69, 1042-9, 2007
- 3) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12, 143-52, 2010.
- 4) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 124, 3654-64, 2011.
- 5) Noguchi S, Ogawa M, Malicdan MC, et al. Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy.

*EBioMedicine*. 15, 193-202, 2017.

- 6) Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, et al. Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 3, e171, 2014.

## マウス筋肉組織におけるエキソンスキップを誘導する低分子化合物の開発研究

萩原 正敏

京都大学大学院 医学研究科

### 【緒言】

Duchenne型筋ジストロフィーは最も頻度の高い筋ジストロフィーで、遺伝子の変異によるタンパク質発現低下が原因であり、有効な治療法は未だ確立されていない。

*Dystrophin(DMD)*遺伝子はその遺伝子が非常に長く、タンパク質も巨大な構造タンパク質であり、省略可能なエキソンが存在する。そのことを利用し、遺伝子変異の存在するエキソンをスキップさせるエキソンスキップ誘導療法が有効である。また、その非常に長い遺伝子の転写を成立させるにあたり、特殊な制御機構の存在が示唆される。そのため、我々はエキソンスキッピングと転写伸長制御の2つの観点から *DMD* 研究を行っている。

CLK 阻害剤によるエキソンスキップ誘導は現在、いくつかの特異的な患者由来の変異のみで確認されており、その臨床応用のため、CLK 阻害剤の作用配列の法則性の解析による適応拡大を行いながら、より効果の高いエキソンスキップ低分子化合物の取得・より体内動態の良い化合物の取得を進めている。さらに、我々は非常に長い遺伝子である *DMD* の転写伸長の制御機構を発見したので、転写伸長という観点からの治療応用も検討している。

### 【方法】

### TG003 によりスキッピング誘導可能なエキソンの予測

筋芽細胞 C2C12 を用いて、RNA-seq 解析より CLK 阻害剤 TG003 でスキッピング誘導される内在性の遺伝子のエキソンの配列やその周囲のイントロンの配列から、TG003 によってスキッピングされる配列に共通の特徴を見つけ、スコア化を行った。そのスコアから、TG003 でスキッピング可能なエキソンにある変異を NCBI の ClinVar データベースの変異から予測し、変異エキソンが 3 の倍数の塩基・疾患との関連が強い変異・ナンセンスまたはフレームシフト変異などの条件でさらに絞り込みを行った。

### *Sfpq* 骨格筋特異的ノックアウトマウス(KO)の作成

*Sfpq floxed* マウスを用いて、*myosin light chain If (MlcIf)* プロモーターで制御される Cre を発現するマウスと交配させ、骨格筋特異的 *Sfpq*-KO マウスを作成した。

### 筋芽細胞の初代培養と遺伝子発現解析

*Sfpq*-KO マウスとそのコントロールマウスの骨格筋から筋芽細胞の初代培養を行、分化誘導し、遺伝子発現解析を行った。

### 【結果】

- ・経口投与可能な CLK 阻害剤 TG693 を取得 TG693 のマウス経口投与 30mg/kg で、筋肉組織において TG693 を LC/MS で検出でき、1.5h に 4.5μM の頂値が得られた。マウス経口投与において頂値が見られた投与後 1.5h において筋肉組織を単離し、ウエスタンプロットにて SR 蛋白質リン酸化を検証すると SRp75 の有

意なリン酸化阻害を示した。また、この時、Clk 活性阻害によって誘導されることが知られている Clk1 成熟型スプライシング産物の増加も確認できた。<sup>1)</sup>これらの実験から TG693 が経口投与可能なスプライシング操作 CLK 阻害剤であることが示唆された。

#### ・ CLK 阻害剤の適応拡大

低分子リン酸化酵素阻害剤によるエキソンスキップ療法による筋ジストロフィー関連疾患治療の適応拡大のため、化合物の作用点から作用配列の法則性の解析を行った。CLK 阻害剤は、SR タンパク質のリン酸化を行っている CLK のキナーゼ活性を阻害するために、SR タンパク質依存性の高いエキソンを標的として、エキソンスキッピングをさせると考えられる。このような制御標的の特徴から、どのようなエキソンならスキップ可能か、予測することが可能である。そこで、スキップ可能なエキソンの特徴を解析するために C2C12 筋芽細胞を用いて、TG003 投与下でスキッピングを生じる内在性のエキソンを RNA-seq を行うことで抽出した<sup>2)</sup>。抽出したエキソンの配列や周囲の配列をスプライス部位の強さ、スプライスサイト付近のピリミジン塩基の含有率、スプライシング因子の結合予測などを指標として使用し、エキソンの TG003 によるスキッピングのしやすさをスコア化し、そのスコアからエキソンスキップ可能な疾患変異をスクリーニングし、DYSF(Dysferlin) IVS31DS A>G -33 変異など新たな標的が見つかった。

#### ・ より効果の高いエキソンスキップ効果を持つ化合物 CaNDY を取得

スプライシングレポーターを用いた化合物ス

クリーニングを行い、CaNDY というキナーゼ阻害薬を取得し、(Shibata et al., Manuscript in preparation) DMD の c. 4303G>T および c.3613delG 変異においても TG003 より低濃度で、より多くエキソンをスキップさせることを発見した。

#### ・ RNA 結合タンパク質 SFPQ が DMD の転写伸長に必須であることを発見

RNA 結合タンパク質 SFPQ が脳において、100 kbp を超える非常に長い遺伝子特異的に転写伸長を制御することを発見した。<sup>1)</sup>骨格筋における SFPQ の機能・制御標的を解明するため *Sfpq* の骨格筋特異的欠損マウスを作成し、骨格筋や Primary myotube による大規模遺伝子発現解析を行い、SFPQ は骨格筋において *Dmd* を始めとする超長鎖遺伝子の発現を制御していることを見出した<sup>2)</sup>。

#### 【考察】

TG003 の作用配列の法則性の解析により作成した TG003 によるエキソンスキップのしやすさのスコア化から、新たにスキッピング効果を示した病因性の変異が見つかったことからスコアリングシステム自体はうまく機能していると考えられる。しかし、未だ患者数の少ない変異が多く、臨床応用という点では課題が残る。そこで、TG003 とは異なる kinase profile を持つ化合物や別の作用点を持つスプライシング操作化合物で、同様の予測実験を行うことで、より多くの患者の治療ができると考えられる。例えば、よりエキソンスキップ効果の高い化合物である CaNDY などを対象とした解析が進行中である。

また、*Dmd* 遺伝子の転写伸長機構については、

SFPQ の発現を人為的に増加させることで、長鎖遺伝子の発現を増やせることが解析から明らかになってきた。現在、詳細な分子機序を解析中であり、これが解けることによって、転写伸長機序に介入し、*Dmd* 発現を上昇させることが期待できる。また、転写伸長活性とスプライシングはよくカップリングしていることが知られているので、TG003 との併用療法などを検討することで、新しいジストロフィー治療を提案できると考えている。

### 【結論】

CLK 阻害剤の適応拡大および *Dmd* 転写伸長制御機構の解明をさらに進めていくことで、より広範囲の筋ジストロフィー患者に対し、より効果の高い治療を提供できると考えられる。

### 【参考文献】

- 1)Sakuma M,Iida K,Hagiwara M, Deciphering targeting rules of splicing modulator compounds: case of TG003. *BMC Mol. Biol.* 2015,16(1),16
- 2)Sako Y, Ninomiya K et al: Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports.* 2017, 46126
- 3) Takeuchi A, Iida K, Tsubota T et al: Loss of *Sfpq* causes long-gene transcriptopathy in the brain. *Cell Rep.* 2018,1,23(5):1326-1341
- 4) Hosokawa M, Takeuchi A, Tanihata J et al: Loss of RNA-Binding Protein *Sfpq* Causes Long-Gene Transcriptopathy in Skeletal Muscle and Severe Muscle Mass Reduction with Metabolic Myopathy. *iScience.* 2019,13,229-242



血清中のエクソソームを介した骨格筋特異的 microRNA による筋再生および脳神経保護作用に着目した筋ジストロフィー新規治療法の開発

橋戸 和夫

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 ラジオアイソトープ管理室

### 緒言

これまでに我々は血清中の骨格筋特異的 microRNA 量に着目し、筋疾患におけるバイオマーカーとして microRNA の定量についての有用性について報告した（1）。さらに、エクソソーム合成経路の阻害剤である GW4869 を投与、さらにエクソソーム合成酵素遺伝子をノックアウトすることによる *mdx* マウスの病態についてすることにより血清の CK が低下し筋組織へのエバンスブルー色素の取り込みが低下することを報告した（2）。本研究において我々はエクソソーム合成酵素遺伝子をノックアウトすることによる *mdx* マウスの病態について検討するとともに、ジストロフィン欠損による中枢神経系への影響を BDNF 遺伝子に着目し、DMD 筋ジストロフィー患者の約 30 パーセントにおいて見られる精神症状（抑鬱・自閉傾向等）が筋ジストロフィー患者血清中の筋特異的 microRNA が原因となっている可能性について検討した。

さらに、筋ジストロフィーの病態の特徴である骨格筋の壊死に着目し、アポトーシス・ネクロトーシスに影響を与える TNF- $\alpha$  の受容体製剤であるエタネルセプトを幼弱マウスに連続投与し、血清中へのエクソソーム放出・

microRNA 放出に関して定量を行った。

### 方法

1. CRISPR/Cas9 の系により、エクソソーム合成の Key enzyme である Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 遺伝子 (*Smpd3*) をゲノム編集したノックアウトマウスを作出し、*mdx* マウスと交配することにより、*mdx* マウスの脳内における BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) の発現量をウエスタンプロットによりタンパク量を定量した。

2. *Smpd3* knock out マウスと *mdx* マウスを交配したマウスについてグリップテスト・トレッドミル等の運動試験を行い、評価した。

3. エタネルセプトを 2 週齢 *mdx* マウス腹腔に週 3 回、4 週間にわたって投与し、血清中のエクソソームおよび microRNA に関して定量した。

### 結果

1. 脳内の BDNF タンパク量は *mdx* マウスではおよそ 1/3 程度に低下していたが *Smpd3* knock out mouse (-/-) と *mdx* マウスとの交配によって得られた F1 マウスにおいては、脳内における BDNF タンパク量はコントロールマウスと同程度に回復していた。

2. *Smpd3* knock out マウスと *mdx* マウスを交配したマウスについてグリップテスト・トレッドミル等の運動試験を行った結果、運動機能の有為な回復が見られた。

3. エタネルセプト 20mg 投与群において血清中のエクソソームおよび骨格筋特異的 microRNA 量の低下が認められ、呼吸筋機能の回復傾向が認められた。

## 考察

セラミド合成酵素遺伝子である *Smpd3* をノックアウトすることにより生体内でのエクソソームの合成および放出を抑制した結果、*mdx* マウスにおける脳内の BDNF タンパク量の回復が見られたこと、および運動機能の回復がみられたことからエクソソームに包括された分泌型 microRNA の血液中への過剰放出が DMD の中枢神経系の病態の一部である可能性を示唆している。*Smpd3* 遺伝子のノックダウンにより、エクソソーム分泌抑制を標的とする筋再生機能の改善を利用した新たな薬物治療法への応用・開発が期待される。さらに、エクソソーム分泌を抑制し、血流中の筋特異的 microRNA の循環量を減少させることにより、脳内の BDNF 発現量を回復させることによって筋ジストロフィー患者の抑鬱・自閉傾向といった精神症状が改善される可能性がある。

また、エタネルセプトの投与により、抗炎症作用のみならずエクソソームの放出抑制に起因すると考えられる DMD の病態の改善が認められた。

## 結論

生体内において、セラミド合成酵素 *Smpd3* 遺伝子のノックダウンにより、1) *mdx* マウスの脳内における BDNF タンパク量が統計学的に有為に回復し、2) 運動機能の有為な回復が見られた。3) エタネルセプト投与により呼吸機能の改善が認められた。

これらの結果は、エクソソーム合成経路が DMD の筋再生および精神症状に対する新たな薬物治療の標的となりうることを示している。

## 参考文献

- 1) Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, et al.: Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.* ; 19(6):452-8.: 2014
- 2) Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, et al.: Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One.* 15;11(12):e0167811. doi: 10.1371/journal.pone.0167811. eCollection 2016
- 3) 炎症と免疫 Vol. 26 No. 4, 2018. 「エクソソーム最前線」 神経筋疾患 筋ジストロフィーとエクソソーム

## 骨格筋幹細胞研究を起点とした移植細胞創成技術の開発

分担研究者：深田宗一朗

分担研究者所属：大阪大学大学院薬学研究科  
筋幹細胞創薬プロジェクト

### ＜緒言＞

骨格筋は優れた再生能力を保持しており、それを可能としているのが骨格筋幹細胞—筋衛星細胞—である。筋衛星細胞は通常、静止期・未分化状態で維持されており、骨格筋が傷害を受けると速やかに活性化・増殖を行い新たな筋線維を再構築する。一方で、骨格筋が肥大する際にも、筋衛星細胞は活性化・増殖し、最終的に筋線維に新しい核を供給する事で、効率的な筋肥大に貢献する。一般的に、筋肥大時の筋衛星細胞の関与も、過負荷による筋線維の損傷を修復するためと考えられている。そのため、筋肥大時の筋衛星細胞の分化機構・動態を、筋再生モデルと区別して検討を行なった報告は存在しない。我々は、Notch シグナルのエフェクター遺伝子である Hey1 と HeyL の研究を通して、Hey1 と HeyL が筋衛星細胞の維持、再生、筋肥大において特徴的な役割を担う事を明らかにした。さらに、筋衛星細胞の増殖様式が筋再生と筋肥大では異なる事を本事業で明らかにする事ができた。

### ＜方法＞

#### 1. Hey1, HeyL 欠損マウス

Hey1 欠損、HeyL 欠損、Hey1-floxed, Pax7<sup>CreERT2</sup>、マウスを交配する事で、筋衛星細胞特異的な欠損マウスを作成した。

#### 2. 筋肥大モデル

マウス右後肢足首の皮膚を一部切開し同筋の共働筋である腓腹筋およびヒラメ筋の遠位腱であるアキレス腱をイソフルラン麻酔下にて約 1 mm 切除した後に皮膚を縫合した。また、同マウス左後肢には Sham 処置として皮膚の切開および縫合のみを実施した。

#### 3. RNA-seq

筋肥大誘導 4 日目の *Pax7<sup>CreERT2</sup>;Rosa<sup>YFP</sup>* マウス足底筋から単離したサテライト細胞を Lysis Buffer の入ったチューブに回収し、 Illumina HiSeq 1500 system を用いた解析を実施した。

#### 4. 再生実験

マウス前脛骨筋に蛇毒カルジオトキシンを投与し、筋再生を誘導した。投与後 3、4 日目に筋肉を固定し、M-cadherin および embryonic Myosin Heavy Chain (eMyHC) に対する抗体を用いて再性能を評価した。

### ＜結果＞

#### 1. 筋衛星細胞維持における Hey1 と HeyL の役割

我々は、Hey1 と HeyL の単独欠損マウスは正常である一方、二重欠損させると成体型の筋衛星細胞ができてこない事を明らかにしていた[1]。また、HeyL の発現は筋衛星細胞特異的であるため[2]、Pax7<sup>CreERT2</sup> を用いて筋衛星細胞特異的に Hey1 を欠損させた結果、筋衛星細胞の数が激減し、その結果筋再生能力を失われた。

2. 筋肥大における HeyL 欠損マウスの表現系  
筋肥大誘導足底筋および Sham 群から筋衛星細胞を単離し、RNA-seq 解析を行なった結果、Notch シグナルの標的遺伝子の発現が高い事が明らかとなった。その中で、HeyL の発現は顕著に高い発現を示した一方、Hey1 の発現は低下していた。そこで、Hey1 と HeyL 欠損マウスに筋肥大を誘導した結果、Hey1 マウスには異常はなかったが、HeyL 欠損マウスでは、筋衛星細胞が分化方向に傾いており、新しい筋核数の減少・肥大効率の低下が観察された[3]。

#### 3. 筋再生における HeyL の役割

HeyL の発現は、静止期の筋衛星細胞で検出されるが、活性化・増殖した細胞ではその発現は認められない。そこで、筋肥大で異常の観察された HeyL 欠損マウスの筋再生能力を詳細に検討したところ、これまでの結果同様、HeyL 欠損マウスの再生能力はコントロールマウスと

違いはなかった。

#### 4 HeyLによる筋分化抑制

C2C12 細胞に *HeyL* を遺伝子導入しても筋分化抑制作用は殆ど示さない。一方で、筋肥大モデルでは *HeyL* 欠損により *MyoD* の発現が増加し、さらに筋衛星細胞の静止期維持においては *Hey1* と *HeyL* が補完的に *MyoD* の発現抑制に働いている。そこで、*HeyL* による筋分化抑制作用を検討した結果、*HeyL* は別の Notch エフェクター分子である *Hes1* とヘテロダイマーを形成し機能している事が明らかとなった [4]。

#### ＜考察＞

筋衛星細胞の未分化性維持において、Notch シグナルのエフェクターとして *Hey1* と *HeyL* は本質的に働く分子である。また、Notch シグナルで直接誘導される Collagen V は Calcitonin Receptor (CalcR) の局所的リガンドとして働く事を国際共同研究で発表した [5]。CalcR シグナルは分化制御への寄与は殆どなく、活性化を抑制するのが主たる機能である [6, 7]。つまり、Notch-Hey1/HeyL と Notch-Collagen V-CalcR が筋衛星細胞の未分化性および静止期維持に、それぞれ主たる経路として働く事が予想される。

筋再生と筋肥大での筋衛星細胞の *HeyL* の要求の違いは驚くべき結果であった。緒言に記載した通り、筋再生と筋肥大時の筋衛星細胞の動態を比較した研究はこれまで存在しない。また、筋肥大の筋衛星細胞の活性化・増殖には筋損傷は必要でないことから、何が筋肥大で起きる変化（メカニカルストレスなど）を感じ、筋衛星細胞の活性化・増殖を制御しているのかは今後の大きな課題である。サルコペニアを含む筋萎縮を伴う疾患では、筋損傷は見られないため、筋損傷非依存的な筋衛星細胞活性化・増殖メカニズムの研究は、これら疾患の新規治療法開発に繋がると確信している。

#### ＜結論＞

*Hey1* と *HeyL* は補完的に機能する事で筋衛星細胞の維持に働き、筋損傷の場合にはそれら発

現は低下するために必要でない。一方で、筋肥大時の筋衛星細胞の増殖には *HeyL* のみが必要である。

#### ＜参考文献＞

1. Fukada, S. Yamaguchi, M. Kokubo, H. et al. Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. (2011), *Development*, 138, (21), 4609-19.
2. Fukada, S. Uezumi, A. Ikemoto, M. et al. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. (2007), *Stem Cells*, 25, (10), 2448-59.
3. Fukuda, S. Kaneshige, A. Kaji, T. et al. Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. (2019), *Elife*, 8.
4. Noguchi, Y. T. Nakamura, M. Hino, N. et al. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. (2019), *Development*, 146, (4).
5. Baghdadi, M. B. Castel, D. Machado, L. et al. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. (2018), *Nature*, 557, 714-718.
6. Yamaguchi, M. Watanabe, Y. Ohtani, T. et al. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. (2015), *Cell reports*, 13, (2), 302-14.
7. Zhang, L. Noguchi, Y. T. Nakayama, H. et al. The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells. (2019), *Cell reports*, 29, (8), 2154-2163 e5.

## 28-6 「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」

分担研究課題名：

「筋分化を促進させる機能性 RNA の解析」

分担研究者：北條浩彦

所属:国立精神・神経医療研究センター神経研究所

### 諸言

筋再生は、平常時の筋肉量維持や筋損傷時の回復そして加齢に伴う筋肉量低下にも関わっている。我々は、若齢マウスと老齢マウスの血液に存在するエクソソームの解析から従来の筋肉特異的マイクロ RNA よりも筋分化・筋再生を強く誘導するマイクロ RNA (miRNA) を発見した。本研究は、このマイクロ RNA を起点に筋分化・筋再生の分子メカニズムを明らかにする。本研究から得られる成果は、機能性 RNA の観点から見た新しい筋分化・筋再生の実態を明らかにし、さらに筋疾患治療においても新しい治療戦略や治療薬候補を提供すると考える。

### 方法

#### マウス初代筋芽細胞を用いた筋分化誘導効果の検討：

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞に加えて、マウス個体から単離した筋芽細胞を用いて当該 miRNA の筋分化誘導効果を検討した。合成した miRNA を C2C12 細胞または単離した初代筋芽細胞に導入し、筋分化マーカーである Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現が誘導されるか調べた。

#### 作用機序解明のための下流遺伝子ターゲットの解析：

①マイクロ RNA(miRNA)が制御する下流遺伝子を同定するため、TargetScan などの予測ターゲット遺伝子データベースを利用して筋分化に関係す

るターゲット遺伝子候補を抽出。②予想される miRNA の認識配列を化学合成（オリゴ DNA 合成）し、それをルシフェラーゼレポーター遺伝子の 3'UTR に挿入したレポータープラスミドを構築。③合成 miRNA と共に構築したレポータープラスミドを C2C12 細胞に導入し、翌日、レポーター遺伝子の発現を解析した。④上記に加え、合成 miRNA または阻害用アンチセンスオリゴ核酸を C2C12 細胞に導入し、内在性ターゲット遺伝子の発現変化を qRT-PCR 法やウエスタンプロット法を用いて解析した。

#### 筋損傷モデルマウスを用いた効果の検討

8 週齢マウスの前脛骨筋に塩化バリウム溶液を投与し筋損傷を与え、その翌日に当該 miRNA を筋損傷部に投与した。miRNA 投与後 9 日目に再生した筋肉の標本を作成、免疫組織化学的染色を行い、顕微鏡観察、そして筋線維の断面積を測定した。

#### 老齢マウスを用いた効果の検討

2 年齢マウスの前脛骨筋に当該 miRNA そしてコントロールの miRNA(miCont)を直接投与し、miRNA 投与数日後の筋組織に対して上記と同じ処理を行い、顕微鏡観察、そして筋線維の断面積を測定した。

### 結果・考察

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞だけでなくマウス個体から単離した筋芽細胞を用いて当該 miRNA の筋分化誘導効果を検討した。その結果、C2C12 細胞と同様に単離したマウス初代筋芽細胞でも、当該 miRNA によって筋分化マーカー遺伝子である Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現が強く誘導されることが分かった。さらに、筋肉特異的な miRNA である miR-1 の発現も誘導されることがわかった。

当該 miRNA のターゲット遺伝子探索から、

Suz12 遺伝子と Lin28b 遺伝子がターゲット遺伝子として抽出された。Lin28b は RNA 結合タンパク質であり、miR-1 前駆体と結合して miR-1 の機能性 RNA としての成熟を抑制している。当該 miRNA によってターゲットの Lin28b が抑制されることで、miR-1 前駆体に対する成熟抑制が外れ、その結果として成熟した機能性の miR-1 が増加したと考えられる。

筋損傷モデルマウスを用いた *in vivo* の実験から、当該 miRNA の投与によって再生した筋線維に有意な肥大化が起こることが観察された。

さらに、老齢マウスの筋組織に当該 miRNA を直接投与した場合でも顕著な筋線維の肥大化が観察された。面白いことに、肥大化した筋線維は、再生した筋線維の特徴を有していなかった。

## 結論

我々が発見した miRNA は、従来の myogenic miRNAs よりも強い筋分化・筋再生能を有していた。そして、ターゲット遺伝子の一つである Lin28b の抑制を介して代表的な myogenic miRNA である miR-1 の発現をコントロールし、筋分化・筋再生に関わっていると考えられる。また、老齢マウスに当該 miRNA を投与した場合でも筋線維の肥大化が観察されたが、その老齢マウスの肥大化には上記以外のターゲット遺伝子が関わっていると予想される。

## 参考文献

Shima A, Matsuda R. The expression of myogenin, but not of MyoD, is temperature-sensitive in mouse skeletal muscle cells. *Zoolog Sci*, 25: 1066-1074. 2008.

Ito N, Ruegg UT, Kudo A, et al. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrile as a key trigger of skeletal hypertrophy. *Nat Med*, 19: 101-106. 2013.

Fukuoka M., and Hohjoh H. Comprehensive measurement of gene silencing involving endogenous microRNAs in mammalian cells. In MicroRNA Protocols. *Methods Mol Biol*, 1733: 181-192. 2018.

## 分担研究課題名：ゲノム編集技術を用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療法開発

分担研究者：堀田秋津 京都大学 iPS 細胞研究所

### 緒言

Duchenne 型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子のアウトオブフレーム変異が原因となって引き起こされる。したがって、この原因たる遺伝子変異を修復できれば、病気の根本治療に繋がると期待される。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は巨大であり、従来の遺伝子治療用ベクターで細胞外部より導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴ核酸を利用してジストロフィン遺伝子の特定のエクソンをスキッピングさせることによりジストロフィンの蛋白質読み枠を回復できるエクソنسキッピング法が世界中で開発研究が進められている。しかしながら、アンチセンスオリゴは mRNA に作用するため、効果は一過性であり、治療効果を生涯にわたって継続させるためには、頻回繰り返し投与が必要となる。そこで我々は、新たに登場した CRISPR ゲノム編集技術に注目し、ゲノムレベルでエクソنسキッピングを誘導する事を目指している。

### 方法

我々は以前、DMD 患者由来 iPS 細胞において、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いることによって、ゲノムレベルでエクソنسキッピング誘導により、ジストロフィンのタンパク質発現を回復できることを報告した<sup>1</sup>。さらに、修復 iPS 細胞を骨格筋に分化させた後、mRNA 発現プロファイルを調べると、健常人のそれに近づいていることも確認できた<sup>2</sup>。

ゲノム編集によるエクソنسキッピング効率を向上させるために、ルシフェラーゼ活性を指標とするレポーター系を作製し、エクソنسキッピング効率の高い候補 gRNA を同定し特許出願を行った。

さらに、これらの gRNA と Cas9 タンパク質を骨格筋細胞や組織へと導入するために、ウイルスが細胞へと進入する機構に着目した。レンチウイルスは脂質二重膜を持ち、外皮タ

ンパク質(VSV-G 等)を介して効率的に細胞内部へと進入する。我々はこのレンチウイルスの空粒子を利用して、内部に Cas9 タンパク質および gRNA を封入することにより、一過性に Cas9/gRNA を細胞内に効率的に導入できる VLP 送達システム NanoMEDIC を開発した。Cas9/gRNA の作用時間が一過性のため、オフターゲット切断リスクが少ないにも関わらず、遺伝子導入が困難な患者由来 iPS 細胞でも非常に高効率でゲノム編集およびエクソنسキッピングが誘導可能であることを確認した。また、前述のルシフェラーゼレッポーターをノックインしたマウス系統を樹立し、NanoMEDIC を筋注することにより生体内筋組織でもゲノム編集およびエクソنسキッピングが誘導可能であることを示すことに成功し、論文が近日出版予定である<sup>3</sup>。

### 結論

エクソنسキッピングを誘導する CRISPR-sgRNA を標的細胞や組織に送達するため、ウイルスの外皮を用いた新規送達技術を開発した。今後、更なる治療効果向上に向けた各種検討を継続していく予定である。

### 参考文献

1. Li, H. L. et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 4, 143–154 (2015).
2. Ifuku, M. et al., Restoration of Dystrophin Protein Expression by Exon Skipping Utilizing CRISPR-Cas9 in Myoblasts Derived from DMD Patient iPS Cells. *Methods Mol Biol* 1828, 191–217 (2018).
3. Gee P et al., Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature Communications*, in press.



# ジストロフィン遺伝子産物の多様性の解明とその治療への応用

松尾 雅文

神戸学院大学 総合リハビリテーション学部

## 緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の責任遺伝子であるジストロフィン(DMD)遺伝子は、ヒト最大の遺伝子で、X 染色体に 4200kb に亘って存在している。この巨大な遺伝子は、79ヶのエクソンから構成され、14kb の cDNA にコードしたジストロフィンを产生する。一方、この遺伝子はジストロフィンを発現するプロモーターを含めて少なくとも 8 種の選択的プロモーターをコードし、組織あるいは発生時期特異的なジストロフィンアイソフォームを产生する。

DMD は進行性の筋萎縮を特徴とし、筋力低下を主症状とするが、DMD は様々な筋外症状を合併し DMD 症候群ともされる。しかし、筋外症状の発症と DMD 遺伝子の異常との関連についての解析はその途上である。DMD の主要死因は心不全で、心筋障害の克服が DMD のケアにおいて主要課題となっている。心筋障害は骨格筋と同様にジストロフィンが欠損するために発生すると理解されている。しかし、DMD 患者の中でも心筋障害を合併する年齢は様々で、ジストロフィン欠損に加え、他の因子が関与していることが強く示唆される。

本研究では、ジストロフィン遺伝子のアイソフォームに関する様々な研究を実施した。そして、骨格筋には発現しないとされてきた、DMD 遺伝子の最小アイソフォームの Dp71 が、ヒト骨格筋組織で発現することを mRNA 解析とキャピラリー電気泳動によるタンパク解析により明らかに検出することに成功した(1)。

DMD 患者の中に低身長例があることから、身長とジストロフィン遺伝子の異常との関連を解析した。その結果 Dp71 を欠損する DMD は身長が低いことを明らかにした(2)。さらに、神経膠芽腫に発現する、Dp71 と Dp116 の詳細な解析を行った。Dp71 には 6 種のスプライシングバリエントと最小サイズの Dp40 を同定した(3)。また、Dp116 にも同様に 6 種のスプライシングバリエントを同定した(4)。

一方、選択的ポリアデニレーションにより産出された全く新たな Dp427 のアイソフォームを同定し、Dpm234 とした。そして、DMD の心筋障害とこのア Dpm234 との関連を解析したところ、DMD 患者的心電図の異常と Dpm234 が関係することを明らかにした（投稿準備中）。全く新しい Dpm234 をクローニングしたことは、巨大なジストロフィン遺伝子にまだ未発見のアイソフォームの存在の可能性を強く示唆した。しかし、新規の Dpm234 は iPS 由来心筋細胞で発現するがヒト心筋では発現しておらず、アイソフォームの発見には適切な組織を使用する必要があることが示唆された。

DMD 患者の心筋障害とジストロフィンアイソフォームの欠損との関係を解析したところ、DMD の心機能障害の促進因子として Dp116 が関与する結果を得た。しかし、DMD 遺伝子から產生されるアイソフォームの中で、Dp116 はシュワン細胞に特異的に発現すると考えられていた。そのため、この臨床データ解析結果に疑問符がつけられた。そこで、シュワン細胞特異的とされてきた Dp116 の発現を検討したところ、心筋細胞にも発現することを見い出した。本報告では、この Dp116 と心機能障害の発症との関連に関する研究(5)について記す。

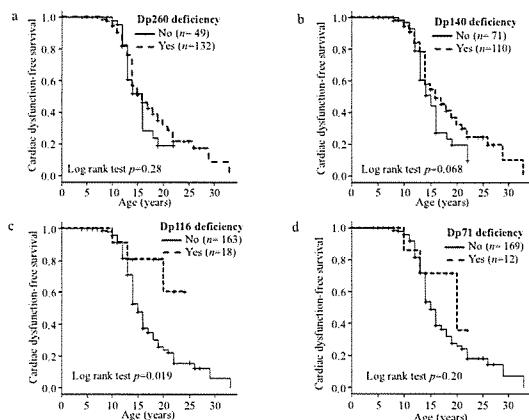
## 方法

神戸大学小児科を受診中の DMD 患者について、その DMD 遺伝子異常によるアイソフォーム欠損と心臓エコー検査所見について検討した。また、ヒト心筋 RNA を購入し、Dp116mRNA を RT-PCR 解析した。

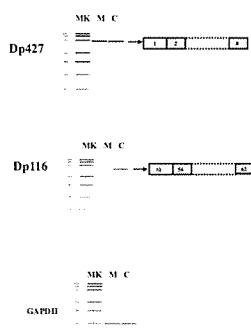
## 結果

292人の DMD 患者で、初回のエコー検査で異常がなくその後も神戸大学でフォローできた 181人の患者を、アイソフォームの欠損状況により 5つのグループに分けて検討した。患者全体でみると心エコー検査での Ejection fraction (EF) は年齢とともに低下する傾向にあった。それを年次毎に分解してみると、十代半ばに大きな低下がみられ、その後はそれ程変化しないとの結果が得られた。また、カプランマイヤー解析により、心機能障害 (EF < 53%) の発生をみると、15歳で半数が心機能不全となった。これをさらに、アイソフォームの欠損タイプでみた（図 1）。Dp260、

Dp140、Dp71 では心機能障害とアイソフォームの欠損には関係がなかった。しかし、Dp116 では Dp116 (+) と (-) の 2 群では心機能障害に陥る割合に明らかに差があった。Dp116 (+) 群で有意に高く、しかも年齢も若いことから明らかとなつた（図 1）。



この結果は、シュワン細胞特異的とされた Dp116 が心臓にも発現することを強く示唆した。そこで、ヒト心筋 RNA 中に Dp116 が発現していることをエクソン S1 からエクソン 62 までを RT-PCR 増幅することにより検討した。その結果、標的サイズの PCR 增幅断片を得た（図 2）。



この結果は、Dp116 が心臓に発現することを証明し臨床で得られた結果を支持した。

## 考察

DMD に合併する心筋障害は、DMD 遺伝子の異常によるジストロフィンの欠損により発生する。しかし、心筋障害はその発生時期あるいは表現において様々で、ジストロフィン欠損以外の因子の関与が強く示唆された。本研究では Dp116 の発現の有無が心筋障害の発生に関わっていること、すなわち Dp116 の発現が心筋障害を加速することを

明らかにした。この結果はアイソフォームはジストロフィンの機能を補完するものであるとの概念をくつがえすものである。また、この結果はジストロフィンのアイソフォームがそれ自体で特有な機能を営んでいることを示した。心筋障害の解明には Dp116 の作用秩序の解明が必須と考えられる。一方、Dp116 の発現が心筋障害を促進する因子であるなら、Dp116 の発現を阻害することが DMD の心筋障害発生の予防法になることが示された。

## 参考文献

- Kawaguchi T, and Matsuo M, et al. Detection of Dystrophin Dp71 in Human Skeletal Muscle Using an Automated Capillary Western Assay System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
- Matsumoto M, and Matsuo M, et al. Patients with Duchenne muscular dystrophy are significantly shorter than those with Becker muscular dystrophy, with the higher incidence of short stature in Dp71 mutated subgroup. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(11):1023-8.
- Rani AQM, and Matsuo M, et al. Identification of the shortest splice variant of Dp71, together with five known variants, in glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2019;508:640-5.
- Rani A, and Matsuo M, et al. Schwann cell-specific Dp116 is expressed in glioblastoma cells, revealing two novel DMD gene splicing patterns. *Biochem Biophys Rep.* 2019;in press.
- Yamamoto T, and Matsuo M, et al. Cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy is less frequent in patients with mutations in the dystrophin Dp116 coding region than in other regions. *Circ Genome Precis Med.* 2018;11(1):e001782.

# 筋ジストロフィー関連モデルマウスの生産・供給システムの検討

保田昌彦

公益財団法人実験動物中央研究所

## 緒 言

筋ジストロフィー症の要因解明や治療研究のために、我々は 50 年間継続して、筋ジストロフィー関連モデルマウスならびにそのコントロール系統マウスを微生物学的および遺伝学的統御のもとで維持し、当研究班をはじめとする多くの研究グループに供給してきた。また、筋ジストロフィー研究に適したモデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術ならびに生殖工学技術の開発に努め、これらの技術を応用した実験動物学的改良を行うとともに、これら筋ジストロフィーモデルマウスの背景データ解析を実施してきた。1. として、より高い精度と再現性を得られる動物実験のために維持動物の品質管理について継続的に行ってきました。2. として、筋ジストロフィーモデルマウスおよびコントロール系統を維持し、2016（平成 25）年度から 2019（令和元）年度の 4 年間にわたり、継続して各研究機関に供給を行った。3. として、新たな筋ジストロフィーモデルマウスの導入と開発を行った。4. として、筋ジストロフィーモデルマウスならびに各コントロールマウスの背景データの測定・解析を行った。

## 結 果

### 1. 維持動物の品質管理

維持動物の品質管理のため、ビニールアイソレーター（VI）装置内で管理している維持動物の定期的な微生物・遺伝モニタリング検査を定期的

に実施した。微生物モニタリングは、VI あたり 1 ケ月もしくは 3 ヶ月に 1 回の頻度で、8 週齢以上のマウス 2 匹を用い、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目を実施してきた。結果、全項目陰性であることを確認し、免疫不全マウス相当の微生物学的品質を保証している。遺伝モニタリングは、年 1 回もしくは 2 - 3 世代に 1 回の頻度で、8 週齢以上の次世代の親 3 匹を用い、STR マーカーによる遺伝子プロファイル解析を実施し、遺伝学的品質を管理している。

### 2. 筋ジストロフィー関連モデルマウスおよびコントロール系統マウスの維持と供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J-*dy* (B6-*dy*)、C57BL/10ScSn-*mdx* (B10-*mdx*)、DBA/2N-*mdx* (D2-*mdx*)、重度免疫不全 NOG-*mdx* およびこれらのコントロール系統を VI 内での交配ならびに胚の凍結保存によって維持し、原則として繁殖用タネ動物を当研究班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給した。2016 年度から 2019 年度の 4 年間における供給実績は、のべ 82 機関にのべ 190 回、総計 2,357 匹の分与・供給を実施した。供給数の系統別の内訳は、B6-*dy* が 5 匹、B10-*mdx* が 1,546 匹、ならびにコントロール系統の B10 が 340 匹、D2-*mdx* が 424 匹、NOG-*mdx* が 42 匹であった。

### 3. 新たな筋ジストロフィー関連モデルマウスの導入と開発

2013 年に大阪大学から導入した D2-*mdx* マウス [1] の維持生産体制ならびに頒布体制の構築、2019 年に国立精神・神経医療研究センターから導入した C57BL/6J-*mdx* (B6-*mdx*) マウスの維持生産体制の構築、そして D2-*mdx* の重度免疫不全化マウスの作製を目指した。*mdx* マウスの維持生産体制は、兄妹交配を継続実施し、各背景系統マウ

すなわち D2-*mdx* は DBA/2Ncrl と、B6-*mdx* は C57BL/6JJcl とのバッククロスで系統保存胚ストックを構築し、10 世代で種更新を実施してきた。その中で、D2-*mdx* は 2016 年度に確実な頒布体制の構築が完了した。B6-*mdx* は 2019 年度に凍結保存胚からの動物復元を行い、維持生産体制の構築を開始した。また、B10-*mdx* とは異なり筋力低下ならびに筋萎縮を呈する D2-*mdx* の免疫不全化は再生医療研究等にも適するモデルマウスとなり得ると考え、現在 wild-type D2 の Rag2/I12rg double knockout マウスを作製し、D2-*mdx* との交配を開始した。

#### 4. 筋ジストロフィーモデルマウスの背景データ解析

*mdx* マウスおよびコントロール系統マウスにおける背景データ解析のため、骨格筋にダイナミックな変化が認められるとされる若週齢時の体重測定、血液生化学検査ならびに筋力測定を実施した。動物は B10-*mdx* と B10 ならびに D2-*mdx* と D2 の 4 系統マウスの 3 週齢から 10 週齢を使用した。体重変動は、wild の B10 マウスと同等の変動を示す B10-*mdx* マウスとは異なり、D2-*mdx* マウスは wild の D2 マウスと比較して、3 から 10 週齢において常に低い体重値を示した。血液生化学検査の結果、B10-*mdx* ならびに D2-*mdx* マウスにおいて離乳直後の 3 週齢から骨格筋障害に反映した血漿 creatine phosphokinase (CPK) 値の異常で有意な上昇が見られ、特に 5 - 6 週齢において CPK 値の顕著な異常値 (30,000 - 40,000 IU/L) を認めた。Four limb hang test による筋力測定の結果、D2-*mdx* マウスは顕著な筋力低下を示し、且つ、6 週齢以降の筋力増加を示さなかった。

#### 結論

筋ジストロフィーモデルマウスの品質管理に

ついては、高い水準の微生物・遺伝モニタリング検査を定期的に実施することで、確かな品質のモデル動物を研究班の班員を含めた筋ジストロフィー研究者に継続的に供給した。その動物の供給実績は、供給機関および供給数は高い水準を維持し、2016 年度から 2019 年度の 4 年間にて 2,357 匹を分与・供給した。この 4 年間を含めた近年の特徴は供給先として、国内製薬ならびに受託試験企業の増加が挙げられる。新たな筋ジストロフィー関連モデルマウスの導入・開発については、筋力低下をみるであろう D2-*mdx* の Rag2/I12rg double knockout マウスが再生医療等研究に重要な役割を果たしていくことを期待し、作製を急ぎたい。最後に、*mdx* マウスの背景データは、特に D2-*mdx* マウスにおいて、若週齢から血漿 CPK 値の異常高値を伴った筋力低下を示し、筋ジストロフィーモデルマウスの表現型を反映させる結果であった。

#### 参考文献

1. Fukada S., Morikawa D., Yamamoto Y., Yoshida T., Sumie N., Yamaguchi M., Ito T., Miyagoe-Suzuki Y., Kakeda S., Tsujikawa K., Yamamoto H. 2010. Genetic background affects properties of satellite cells and *mdx* phenotypes. *Am J Pathol* 176: 2414-2424.

# 筋ジストロフィー治療方法開発へ向けた骨格筋再生療法の開発

氏名 湯浅 慎介

所属 慶應義塾大学医学部循環器内科

## 緒言

我々は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体がマウス胎仔筋芽細胞において、また成獣における再生筋芽細胞において発現しており、G-CSFは筋芽細胞の増殖を促す作用を有することを報告してきた<sup>1,2)</sup>。本研究は、様々な筋肉疾患の中でも特に重篤で治療方法がないデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて、G-CSFを投与することにより筋肉再生を促し、筋力回復および生命予後の回復を目指した骨格筋再生療法の開発を目的としている。

## 方法

マウス筋ジストロフィーモデルとして mdx マウスを用いて、G-CSF の作用を検証する。mdx マウスにおいて骨格筋傷害時における筋衛星細胞の挙動を検証し、G-CSF 受容体の発現を時間空間的に明らかにする。G-CSF 受容体が発現している時期に G-CSF を投与することにより再生に対する影響を検証する。具体的には再生骨格筋の数の変化、筋肉の大きさの変化、筋力の変化を検証していく。また G-CSF 受容体欠損マウスを用いることにより、G-CSF シグナルが無い場合の骨格筋の作用を検討することが可能となる。G-CSF 受容体欠損 mdx マウスは各々のマウスを交配することにより得ることが可能であり、G-CSF シグナルが筋ジストロフィーモデルマウスにおいて必須な因子であるかどうかを検討する。さらに臨床で用いられている持続型 G-CSF に関しても、通常の G-CSF と同様に、その効果と最適な投与量・投与間隔を検討していく。

## 結果

我々は mdx マウスを用いて、通常の G-CSF に加えて持続型 G-CSF の検討を行った。持続型 G-CSF の投与により、再生骨格筋数が増え、骨格筋量が増していた。持続型 G-CSF を用いることで注射回数を減らしても従来の G-CSF と同様に骨

格筋再生促進作用を有することを明らかにした。

## 考察

我々は、これまで G-CSF の骨格筋再生促進作用と、筋ジストロフィーモデルに対する有効性を示してきた。G-CSF は化学療法後の白血球低下や末梢血へ造血幹細胞動員などの目的で、臨床で広く使用されている。現在は、PEG 化製剤である持続型 G-CSF が主流となり、単回投与でも長時間作用するように加工されている。患者の立場を考えると注射の頻度が減るので利便性は高まるので、その効果を検証する意義はある。我々は、骨格筋に対する G-CSF の新たな作用を発見しているが、持続型 G-CSF が同様に骨格筋再生促進作用を有するのかを検証する必要があり、本研究により確認された。今後、G-CSF を筋ジストロフィー患者に臨床応用する際には、G-CSF を長期にわたり投与する必要があるが、その投与頻度を減らすことが可能になることが示唆された。

## 結論

本研究により、持続型 G-CSF を用いることにより、従来型 G-CSF にくらべて注射回数は少なくとも、筋ジストロフィーモデルマウスにおいて骨格筋再生促進作用を有することが確認された。より詳細な条件検討を行い、臨床応用を推し進めることが望まれる。

## 参考文献

- 1) Hara M, Yuasa S, Shimoji K, et al. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med.* 2011 Apr 11;208(4):715-27.
- 2) Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, et al. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015 Apr 13;6:6745.

