

## 2-6 疾患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  
青木 吉嗣

### 総括研究報告

#### 1. 研究目的

希少神経・筋難病の Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、全身の骨格筋と心筋のみならず、末梢および中枢神経系も障害される疾患であり、全身的な治療法を開発することが最も重要である。核酸医薬品を用いたエクソン 53 スキップ薬(ビルトラルセン) については、精神・神経疾患研究開発費（武田班）を活用して過去 10 年に渡り、有効性と安全性を検証し、治療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、2020 年 3 月に、国産初の核酸医薬品として条件付き承認を達成することが出来た。今後は心筋も治療可能な次世代エクソン・スキップ薬の開発に加えて、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療、RNA あるいはゲノム編集治療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、倫理的問題についても充分な検証を進めながら、新規治療モダリティー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尿由来細胞や 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. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発
  - a. エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発（青木、宮田、越後谷、堀田、岡田、中村、千葉）
  - b. 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立（林、深田、上住）
  - c. 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究（野口、村松、関、川内、金川、山田、進藤、森）
2. 筋ジストロフィーモデル動物の維持（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

青木 吉嗣

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
分担研究者

関口 正幸

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
村松 里衣子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
関 和彦

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
川内 大輔

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
林 晋一郎

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
森 まどか

国立精神・神経医療研究センター病院  
堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所  
上住 聰芳

東京都健康長寿医療センター  
深田 宗一朗

大阪大学 大学院薬学研究科  
宮田 完二郎

東京大学大学院工学系研究科  
稻田 全規

東京農工大学大学院工学研究院  
岡田 尚巳

東京大学 医科学研究所  
越後谷 祐介

日本大生物資源科学部  
金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科  
山田 崇史

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科  
中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター  
進藤 英雄

国立国際医療研究センター研究所

千葉 峻太郎  
理化学研究所計算科学研究センター  
保田 昌彦  
実験動物中央研究所  
貝谷 久宣  
日本筋ジストロフィー協会

(<https://eskip-finder.org/cgi-bin/input.cgi>)を実現した。

マルチエクソンスキップについては、エクソン 3-9 あるいは 45-55 スキップを検出可能なレポーター・アッセイ系の作出を進め、並行してエクソン 45、46、55 の 3 つのエクソンを標的にエクソン 45-55 スキップを誘導する研究を進めた(青木班員、横田俊文協力班員、中村班員)。さらに、筋ジストロフィー犬を対象にペプチド付加モルフオリノ核酸の高い心筋治療効果を明らかにした。これらの成果はオックスフォード大学と NCNP との施設間 MoU 締結につながった。宮田班員は、核酸医薬の筋デリバリーを可能とするナノ粒子の開発を進めた。筋指向性のある脂質付加 siRNA についても研究を開始し、マウスモデルを対象に骨格筋と心筋指向性を示す事に成功した。東大医科研の岡田班員らは、筋ジストロフィー犬を対象に、間葉系細胞の投与によりアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療後の免疫応答を抑えられることを明らかにした。京大 CiRA の堀田班員らは、筋ジストロフィー犬を対象にナノ粒子とクリスパー技術の融合により、骨格筋でのゲノム編集治療の可能性を示す事に成功した。

#### b. 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立(林、深田、上住)

本研究班は、幹細胞、筋再生分野の領域トップ研究者が多数参加している。都健康長寿医療センター・上住班員は、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が、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。阪大の深田班員は、自らが報告した Calcitonin Receptor の生理的な意義(*Nature*, 2018)を基に、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について研究を継続している。一方で、我が国発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。NCNP の林班員と CiRA の櫻井協力班員と共に、TGF $\beta$  シグナル抑制による誘導方法の確立を基盤に(*Sci Rep*, 2018)、移植効率を上げるための研究を進めた。

#### c. 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究(野口、村松、関、川内、金川、山田、進藤、森)

山田班員は、DMD モデルマウス骨格筋を対象にした伸長性収縮の評価、マウスおよびイヌの筋トルクの精密測定を可能にする機器の設計を行った。越後谷

### 3. 研究成果

初年度班であるが、2020 年度研究班会議を 12 月 1 日～2 日にかけてウェビナーで開催し、参加登録者数は 250 名を超えた。班会議では、京都大学大学院医学研究科の奥野恭史教授と、国際医療センター研究所の清水孝雄教授から、「創薬シミュレーション・ビッグデータ創薬」と「脂質膜の多様性から解き明かす生命と疾患」の題で特別講演を企画した。いずれも領域のトップ研究者であり、班員と班員の研究室に所属する若手にとって刺激的かつ教育的な講演であり、班研究の質の更なる向上に資すると考えられた。さらには、開発費班会議との合同開催として、産官学患の連携を促し希少難病の治療法開発を促進させる取り組みである希少疾患カンファランスを、多数のアカデミアに加えて 8 つの製薬会社と 80 名程度の企業人の参加を得て行った。同カンファランスは、希少難病に対する課題と明らかにし解決策を探る良い機会となり、本研究班が筋ジストロフィーを出発点として神経・筋難病の克服に向こう本気度の高さを明示する象徴的な会となった。

#### 1. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

##### a. エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発(青木、宮田、越後谷、堀田、岡田、中村、千葉)

本研究班の中心的な課題であるエクソン・スキップに関しては、エクソン 53 スキップ薬(ビルトランゼン)の開発成功を踏まえ、DMD 遺伝子欠失変異のホットスポットに位置する、シングル・エクソンスキップ薬の開発を進める。エクソン 51, 45, 50 については、2020 年度中に特許出願あるいは特許取得をしたことから、エクソン 51 スキップ薬、エクソン 50 スキップ薬、エクソン 45 スキップ薬等の効果と安全性の検証を DMD 患者由来の MyoD 変換筋細胞を用いて行った。特記すべき事として、千葉班員は、エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸オリゴマーデータベースである eSkip-Finder を作成し、論文出版(*Nucleic Acids Res.* 2021:gkab442)およびクラウドサーバーを活用した Web 公開

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。稲田班員は、筋萎縮治療剤の開発を目的に、筋量制御における PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 の役割の解明研究を行っている。関班員と野口班員は、トリプレット・リピート伸長を有する脊髄小脳変性症マーモセットを対象に運動機能評価および筋病理評価を行い、筋特異的な表現型を見つける事に成功した。村松班員、川内班員、鈴木直輝協力班員らは、神経筋疾患の血管内皮細胞に発現する細胞接着分子あるいは軸索病態に着目し、神経・筋ネットワーク解明ならびに低分子薬開発を進めている。金川班員は、ジストログリカン異常症に関係する糖鎖の修飾機序の解明と生理活性の治療応用に関する研究を進めた。関口班員と森班員は基礎研究者と臨床家の立場から、DMD マウスを対象にジストロフィン欠損症で自閉症様症状が生じる分子機序の解明研究を行い、ジストロフィン欠損症患者の中枢神経症状の解析を実施した。

**4. 筋ジストロフィーモデル動物の維持（保田）**  
本研究班は、筋ジストロフィーモデルマウス、筋ジストロフィー犬を含めて、新たなモデル動物を開発する一方で、その供給も行なってきた実績を持つ。筋ジス犬については、呼吸開始による機械的負荷がかかる以前から、骨格筋でオステオポンチンの発現が増加していた (Sci Rep, 2013)。更に筋ジストロフィー犬の病態の検討から、初期の再生筋線維に発現していることが明らかとなり、オステオポンチンが筋再生のマーカーとなることを示すことができた (Am J Pathol, 2016,)。その後、特に、走行時の加速度に着目して研究を進めている。筋ジス犬の胸部及び腹部に小型加速度計を装着して、継時に検討したところ、筋ジス犬の示す加速度及び角加速度は、胸部では発症の 2 ヶ月齢から顕著に低下しており、一方腹部では経過に従って次第に低下が進むこと、更に、これらの低下には筋ジス骨格筋にかかる力の負担との関係が予想されること、しかも加速度、角速度を MRI で観察した筋障害度との関係が考えられるとの結果を得ている (Kuraoka et al., Exp Anim. 2021 Jun 16.)。

**5. 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）**  
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。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。

### 今後の研究の進め方

DMD に対しては exon, 51, 50, 45 スキップ、プロスタグランジン合成酵素阻害剤などの first in human 試験を進めることが重要である。今後、NCNP を中心とした研究基盤を強化することが本研究班の mission であるが、本研究班で構築してきた筋ジストロフィーモデル動物については、形態的・生理的指標を中心とした表現型の解析に関する標準的なプロトコルを確立すると共に、臨床に応用可能なバイオマーカーを確定することが目標となる。

最後に、学際性、国際性、公平性、倫理性、公開性を原則として、筋ジストロフィーに対して治療を開発するための筋ジストロフィー研究班（武田伸一班）を引き継ぐ機会を頂いたことに深く感謝したい。



Fiscal Year 2020 Annual Report, National Center of Neurology and Psychiatry:  
Grants-in-Aid for Research on Nervous and Mental Disorders 2-6

**Development of Molecular Therapies for Muscular Dystrophy using cellular and animal models**

**Principal Investigator: Yoshitsugu Aoki, MD, PhD**

Director, Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology and Psychiatry

**Project period: FY2020-FY2022**

Human genetic therapies have come of age in curing rare neuromuscular diseases. The nationwide research group aims to better understand and improve the treatment of fatal and currently untreatable muscular dystrophies, including Duchenne muscular dystrophy (DMD). We are dedicated to elucidating the molecular pathogenesis of muscular dystrophies, especially Duchenne muscular dystrophy, and the development of advanced gene- and stem cell-based therapeutics for the diseases. For this purpose, we integrate molecular, pharmacologic, proteomic, and genomic methodologies using various types of unique animal models, including dystrophic dogs, mice, rats, and common marmosets. We are combating these diseases through research aimed at implementing promising novel therapeutic strategies, including oligonucleotide-based exon-skipping therapy and induced pluripotent stem cell (iPSC)-based cell therapy, into clinical practice. One of the significant achievements of our research group is the approval of our antisense oligonucleotide-based exon 53-skipping drug, viltolarsen (NS-065/NCNP-01), for muscular dystrophy in Japan, following a successful investigator-initiated trial of NS-065/NCNP-01 (Sci Transl Med. 2018;10).

**RESEARCH & RELATED Senior/Key Person Profile**

Principal Investigator

National Center for Neurology and Psychiatry

Yoshitsugu Aoki, Director

Co-Investigators

National Center for Neurology and Psychiatry

Masayuki Sekiguchi, Section Chief

Satoru Noguchi, Section Chief

Rieko Muramatsu, Director

Kazuhiko Seki, Director

Daisuke Kawauchi, Section Chief

Shin'ichiro Hayashi, Section Chief

Madoka Mori, Section Chief

Kyoto University

Akitsu Hotta, Lecturer

Tokyo Metropolitan Health and Longevity Medical Center

Akiyoshi Uezumi, Associate Director

Osaka University

    Soichiro Fukada, Associate Professor

Tokyo University

    Kanjiro Miyata, Associate Professor

IMSUT, Tokyo University

    Takashi Okada, Professor

Tokyo University of Agriculture and Technology

    Masaki Inada, Associate Professor

Nihon University

    Yusuke Echigoya, Lecturer

Ehime University Graduate School of Medicine

    Motoi Kanagawa, Professor

Sapporo Medical University

    Takashi Yamada, Associate Professor

National Hospital Organization Matsumoto Medical Center

    Akinori Nakamura, Director

National Center for Global Health and Medicine

    Hideo Shindo, Associate Professor

RIKEN

    Shuntaro Chiba, PhD

Central Institute for Experimental Animals

    Masahiko Yasuda, PhD

Japan Muscular Dystrophy Association

    Hisanobu Kaiya, President

Tohoku University

    Naoki Suzuki, Assistant Professor

Alberta University

    Toshifumi Yokota, Professor

## **STATEMENT OF WORK**

### Specific Aim 1

Development of new therapeutic interventions using animal models of neuromuscular diseases

a. Development of genetic therapies for muscular dystrophies

    Investigators: Aoki, Miyata, Echigoya, Hotta, Okada, Nakamura, Chiba, Yokota

b. Development of stem cell-based therapies for muscular dystrophies

    Investigators: Hayashi, Fukada, Uezumi

c. Discovery of new pathological mechanisms in neuromuscular diseases

    Investigators: Noguchi, Muramatsu, Seki, Kawauchi, Kanagawa, Yamada, Shindo, Mori, Suzuki N

### Specific Aim 2

Quality Control of Experimental Animals

    Investigator: Yasuda

### Specific Aim 3

Ethical and social studies to develop new treatments for muscular dystrophies

    Investigator: Kaiya

## Dp427 欠損マウスの行動と脳シナプス異常：発達依存性について

関口正幸

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所疾病研究第4部

### 緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では、比較的高頻度で中枢症状（自閉症、精神遅滞等）の併発が報告されている<sup>1)</sup>。昨今の医療技術の進歩により DMD 患者の寿命は伸びつつあるが、中枢症状の存在は患者やその家族の QOL を損なう要因となっている場合も少なくない。このような現状を考慮すると、当該中枢症状の病態理解とそれに根ざした治療法考案の必要性は増大しつつある。

DMD 遺伝子からは、脳において、全長ジストロフィン (Dp427)、及びより短い遺伝子産物 (Dp140 や Dp71 等) が産生されるが、我々はこれまでに Dp427 の中枢機能解明に焦点を絞って研究を行ってきた。その結果、Dp427 単独欠損マウス (*mdx23* マウス) においては、  
(1) 短時間の身体拘束に対する防御行動応答の著増、  
(2) 脳部位偏桃体におけるノルアドレナリン誘発 GABA 作動性シナプス電流不全、を見出し論文報告している<sup>2)</sup>。また、(1) に関してはエキソンスキッピングによる当該行動フェノタイプのレスキーについても報告した<sup>2)</sup>。

本年度の研究では、上記行動と脳シナプス伝達の異常に關して生後発達依存性を比較することにより、これら異常の関係について検討した。

### 方法

*Mdx23* マウスを用いた行動とシナプス機能解析：すべての実験には交配によって作出した同腹兄弟ペアを用いた (B10 系統遺伝背景、生後 20、35、40、45、60、120 日齢)。これらマウスについて、急性拘束実験（防御行動）、偏桃体錐体細胞におけるノルアドレナリン誘発 GABA 作動性シナプス電流計測（脳スライス

パッチクランプ法）を行った。

### 結果

急性拘束実験：すべての *mdx23* マウスは短時間の急性拘束に過剰反応し、野生型では見られない特徴的な防御行動を起こす<sup>2)</sup>が、この行動異常は生後 20 日齢と 40 日齢の間で顕著となった。

シナプス伝達：*mdx23* マウスでのノルアドレナリン誘発 GABA 作動性シナプス電流不全は生後 20 日齢から 35 日齢の間で顕著となった。

### 考察と結論

本年度の検討で、*mdx* マウスにおける行動異常と脳 GABA 作動性シナプス電流異常がほぼ同じ日齢から見られることが明らかとなった。この結果は、この二つの異常の因果関係を示すものではないものの、両者が 20 日齢から 35–40 日齢の間という共通するタイムウインドウで発生することが示唆された点は興味深い。この点に関してラット脳における Dp427 発現は、生後 10 日過ぎから始まり生後 60 日齢程度まで徐々に増加していくと報告されており、今後マウスでの同様な検討は必要と考える。

### 参考文献

- 1) Hendriksen JG, Vles JS: Neuropsychiatric disorders in males with Duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol* 23:477-81, 2008.
- 2) 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: 124-35, 2009.



ポリグルタミン病モデルマーモセットの骨格筋分子病態解析  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
所疾病研究第一部  
野口 悟

### 緒言

ポリグルタミン病は、遺伝子のコーディング領域にある CAG 反復配列の伸長によって引き起こされる遺伝性の神経疾患である。ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性の脊髄小脳失調症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症）などが知られており、不随意運動や認知症（ハンチントン病）、歩行障害（遺伝性脊髄小脳変性症）などの症状が引き起こされる。このうち、ハンチントン病や球脊髄性筋萎縮症では、骨格筋にも障害が起こることが知られている。これまで、モデルマウスが作製され、骨格筋の分子病態が解析されてきた。それらの研究から、①CAG が伸長した RNA の核内蓄積により引き起こされる遺伝子発現変化、②ポリグルタミン発現による細胞毒性、③末梢神経障害による脱神經の 3 つの病態機序が提唱してきた。

### 方法

#### マーモセット骨格筋

CMV プロモーターサークル下に CAG リピートが 120 回伸長したヒト Atxn3 ORF を発現するトランスジェニックマーモセット (PQD11 (1y4m) 及び PQD16 (1y5m)) から骨格筋を採取した。同齢の正常個体 (2y3m) から骨格筋を同様に採取し、実験に供した。

#### 組織染色、電子顕微鏡観察

定法に従って、凍結組織から切片を作製し、化学染色、抗体染色を行った。グルタルアルデヒド固定サンプルを用いて、定法に従って透過型電子顕微鏡により超微細構造を解析した。

#### RT-PCR

RNA の発現は、筋原線維タンパク質遺伝子、解糖系酵素遺伝子、アトロフィー関連遺伝子、カルシウム関連遺伝子について、TaqMan probe を用いて定量した。

### 結果

ポリグルタミン病モデルマーモセットの骨格筋の分子病態解析を行った。下肢骨格筋病理解析では筋壊死／再生ではなく、速筋線維に高度な萎縮が見られた。また、筋線維型の割合も type 2B 優位から 2X 優位に変化していた。萎縮線維の筋核にはポリグルタミンタンパク質の蓄積が、また筋線維内にはアミロイドタンパク質蓄積やオートファジー活性化も観察された。遺伝子発現及び活性化シグナルの解析から、denervation による筋萎縮が強く疑われ、筋内神経の脱落も観察された。

#### 考察

これまで、モデルマウスにて提唱されてきたように、ポリグルタミン病モデルマーモセット骨格筋でも、3 つの病態機序を示唆する可能性が観察された。筋病理からは、脱神經による筋萎縮が最も筋力低下に寄与するものと考えられた。実際、筋内神経の解析から神経線維の脱落が観察されたが、末梢神経側の障害が骨格筋変化を引き起こしているものと考えられた。

また、これまでのポリグルタミン病モデルマウスに比べ、マーモセットではいくつかの利点が考えられる。筋力、行動解析での表現型の解析しやすさに加え、骨格筋変化の顕在化、筋線維タイプやサイズがヒトに比較的近いことも、解析の容易さを示した。このように、ポリグルタミン病モデルマーモセットは、ポリグルタミン病の分子病態を解析するうえでとても有用であることが示された。

### 結論

ポリグルタミン病モデルマーモセット骨格筋では、CAG 伸長 RNA の核内蓄積、ポリグルタミンによる細胞毒性、末梢神経障害による脱神經の 3 つの病態機序を示唆する可能性が観察された。

### 参考文献

Tomioka et al. Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. *eNeuro* I0250-16, 2017.



# 神経筋疾患の臓器間ネットワーク解明ならびに低分子薬開発

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 神経薬理研究部  
村松 里衣子

## 緒言

筋萎縮性側索硬化症などの神経筋疾患の研究は、病巣周囲の細胞や分子がいかにして病態形成にかかわるかを中心に知見が蓄積されている。従来の研究成果を基にした薬剤開発が進められているが、現時点では根本的な治療薬は上市されていない。筋萎縮性側索硬化症患者の一部は家族性であり、疾患の原因遺伝子が同定されている。この原因遺伝子による病態解明研究は、病巣を構成する細胞の機能解析を中心に進められたが、近年では、グリア細胞による病因論など神経・筋細胞以外の細胞も病態形成を制御する可能性が示唆されている。

我々はこの原因遺伝子が病巣のみならず全身に発現する点に着目し、全身での遺伝子変異が病態形成に寄与する可能性について検討を進めている。筋萎縮性側索硬化症では病巣周囲で血管のバリア機能が脆弱になっており、血液が病巣に暴露しやすい状態になっている。また病巣を構成する細胞群には、血中ホルモンに対する受容体を発現する細胞が存在する。筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の一つ、SOD1 変異体を過剰発現させた細胞では、二次的に様々な分子の発現が変動することが知られる。これらのことから、筋萎縮性側索硬化症では、正常時と血中ホルモンの含有量に差があり、その差が病巣形成を制御する可能性を推察している。本研究では、筋萎縮性側索硬化症における血中成分を比較し、正常と差がある分子の機能解析を実施すること目標とした。本年度は、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスとして SOD1<sup>G93A</sup> マウスを用いて、血中成分を暴露した際の非神経系へ与える作用を *in vitro* で解析するとともに、血中成分の網羅的な解析を中心に行った。

## 方法

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの発症前、

発症後ならびに対象群のマウスから採血を行い、血中分子量を網羅的に検出した（メタボロミクス、サイトカインアレイ）。変動する分子が複数存在したため、pathway 解析を行い、病態発症と関連する細胞内情報伝達経路を探索中である。また、一部の分子に関しては validation のために ELISA による含有量の比較検討を行った。

血中分子が病態形成に寄与する可能性を検討するため、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス由来の血液を培養細胞系に添加し、マウス大脳皮質より調製した初代細胞系を用いて、細胞の応答性を検討している。

## 考察

今回、メタボローム解析では biomarker analysis と enrichment analysis を中心に行い、筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスでは症状発症に先立ち、対照群と分子発現が大きく変動していることが示唆された。変動する分子の一部は、サンプルを採取した日が遅く症状が進行しているほど、対照群と含有量に差があることから、症状の悪化と相關するバイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。

サイトカイン解析についても、一部のサイトカインで症状進行時期とサイトカイン含有量に正の相関がみられたことから、バイオマーカーの可能性が推察される。

また上記 2 つの網羅的解析で変動を検出した分子は、その分子の作用により病態形成を制御する可能性も推察できる。今後、それら分子を培養細胞系などに添加した際の細胞の機能変化を検討することで、見出した血中分子の病態形成への寄与を検討していきたい。

## 結論

筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスの血液において、対照群と比較し含有量が異なる分子が複数存在することが示唆された。これらの分子がバイオマーカーになりうるか、病態形成に寄与するか、今後検討していきたい。

## 参考文献

なし



ラットやマウスを対象とした筋電図記録や神経 マーカーとして機能するはずである。  
刺激の技術供与

分担研究者 関 和彦  
(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所モデル動物開発研究部

### 緒 言

本研究班では筋疾患の病態解明や治療法解明が主目的であるが、筋機能の発現や維持は中枢神経系からの持続的な制御、及び運動感覚連関によって実現している。従って、上記の包括的な理解のためには、骨格筋だけでなく、骨格筋活動を左右する中枢神経系機能の評価が必要となる。そこで本研究では、筋電図計測・誘発電位計測などヒト患者においても行われている電気生理学的診断技術をモデル動物においても確立することを目的とする。確立された技術を、本研究班で用いられる様々な動物モデルにおいて適用することにより、筋疾患病態やその遺伝子治療戦略について、より広い視点からの理解が得られる。

### 方法と結果

ラットの下肢筋群にワイヤー電極を外科的手術によってインプラントし、無線で自由行動下の筋電図活動を記録する実験系を構築した。具体的にはラット腓腹筋と前脛骨筋に、ステンレスワイヤー(cooner wire)を外科的手術によって慢性的に埋め込み、電極中枢端についているコネクタをラット頭部に固定した。固定にはデンタルセメントを用いた。ラットを麻酔から覚醒させた後、頭部コネクタに Multichannel Systems 社の無線記録装置のトランスミッターを頭部に接続し、歩行時の筋活動を非拘束下で記録した。両者の筋には交代性の活動が認められた。従って、自由行動下の筋の機能的な評価系を確立できた。

### 考察

本研究によって確立されたシステムは、歩行運動のみでなく、本研究班で用いられている様々な実験モデルに適用可能である。筋ジストロフィーなどの筋疾患はそれを支配する中枢神経系における筋制御システムにも影響を与える筈であり、筋電図活動記録は中枢神経系活動の間接

### 結論

げつ歯類を対象とした、慢性的筋電図記録システムが確立した。

### 今後の展望

筋疾患病態などの評価のためには、歩行だけでなく、より多くの部分を用いるタスクが必要である。また、筋萎縮などの形態面の評価との相関を確認するためには、最大筋力に近い筋力発揮様式(ジャンプ)や、低重力下での計測(tail suspension)などが筋病態研究では用いられているので、そのようなタスク下でも筋活動記録が可能なように、技術を発展させる。さらに予定していた電気刺激系を用いた評価系確立も行う。

### 研究発表

1. Koizumi M, Nogami N, Owari K, Kawanobe A, Nakatani T, Seki K (2021): Motility profile of captive-bred marmosets revealed by a long-term in-cage monitoring system. *Front. Syst. Neurosci.* 10.3389/fnsys.2021.645308, 15 April 2021. 査読有
2. Yaron A, Kowalski D, Yaguchi H Takei T, Seki K (2020): Forelimb force direction and magnitude independently controlled by spinal modules in the macaque. *PNAS* 117(44): 27655 - 27666, 15 October 2020, <https://doi.org/10.1073/pnas.1919253117> 査読有
3. Oya T, Takei T, Seki K (2020): Distinct sensorimotor feedback loops for dynamic and static control of primate precision grip. *Communications Biology* 3 (156), <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0861-0>, April 2020. 査読有

知的所有権の出願・取得状況

なし

# モデル動物を基盤とした脳腫瘍の新しい治療法開発に関する研究

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所・病態生化学研究部

川内大輔

## 緒言

上衣腫は小児脳腫瘍のうち主要な悪性脳腫瘍の一つであり、腫瘍発生部位と分子解析データを元に分類されている。大脑皮質に生じるテント上上衣腫のうち約7割を占めるRELA型上衣腫は、上衣腫の中でも悪性度が高く、効果的な治療法がなく、主に外科的手術の成功率に依存する形になっている。そこでRELA型上衣腫の腫瘍形成メカニズムを理解することにより、腫瘍増殖シグナルを見出し、それらを基盤とした新規の治療法の確立を目指す。

## 方法

RELA型上衣腫では腫瘍特異的な融合遺伝子が発現することが知られている。これらの腫瘍における共通のがんシグナルを同定するために、まずヒトテント上上衣腫>1000検体から融合遺伝子を同定するとともに、共通して発現する遺伝子群を解析する。一方で、同定されたがん融合遺伝子をマウス脳内に誘導することで、発がん性を検討し、形成された腫瘍で共通して働く細胞増殖シグナルを調べ、最終的にヒト・マウスで共通して働くシグナルを絞り込むことで実際の腫瘍で標的となり、かつモデル動物で解析可能な腫瘍標的分子を同定する。

## 結果

ヒト上衣腫検体のRNAseqより>10の新規融合遺伝子が同定され、多くの融合遺伝子がZFTA/C11orf95遺伝子との融合したタンパク質を発現するものであった。これらの遺伝子の発がん性をマウス胎仔脳に発現させることにより検証したところ、ZFTA-RELA, ZFTA-MAML2, ZFTA-MAML3, ZFTA-NCOA2とこれら全ての遺伝子発現により脳腫瘍が誘導された。生じたこれらの腫瘍のRNAseqを行うことにより、腫瘍に共通した細胞増殖を担うことが知られる分子群が同定され、ヒト検体の遺伝子発現と比較することで、GLI2遺伝子が腫瘍標的候補遺伝子として同定さ

れた。GLI2遺伝子のshRNAによる遺伝子発現阻害やドミネガ体、三酸化ヒ素による機能阻害はいずれも腫瘍細胞の増殖を阻害したことから、GLI2がRELA型テント上上衣腫の増殖阻害に効果的であることが明らかとなった。

## 考察

現存する治療に使用可能なGLI2阻害剤は一般的に副作用が多く特異性が低いが、より副作用の少ない薬剤あるいは効果的なDDSを開発することで治療につなげることが可能になると思われる。

## 結論

悪性度の高いRELA型テント上上衣腫において新規の腫瘍標的分子GLI2を同定した。

## 参考文献

Zheng T, Ghasemi DR, Okonechnikov K, Korshunov A, Sill M, Maass KK, Benites Goncalves da Silva P, Ryzhova M, Gojo J, Stichel D, Arabzade A, Kupp R, Benzel J, Taya S, Adachi T, Shiraishi R, Gerber NU, Sturm D, Ecker J, Sievers P, Selt F, Chapman R, Haberler C, Figarella-Branger D, Reifenberger G, Fleischhack G, Rutkowski S, Donson AM, Ramaswamy V, Capper D, Ellison DW, Herold-Mende CC, Schüller U, Brandner S, Driever PH, Kros JM, Snuderl M, Milde T, Grundy RG, Hoshino M, Mack SC, Gilbertson RJ, Jones DTW, Kool M, Deimling AV, Pfister SM, Sahm F\*, Kawauchi D\*, Pajtler KW\*. Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas. *Cancer Discov.* (IF:29.497) In press. (2021) \*Co-corresponding author.

Kupp R, Ruff L, Terranova S, Nathan E, Ballereau S, Stark R, Sekhar Reddy Chilamakuri C, Hoffmann N, Wickham-Rahrman K, Widdess M, Arabzade A, Zhao Y, Varadharajan S, Zheng T, Murugesan MK, Pfister SM, Kawauchi D, Pajtler KW, Deneen B, Mack SC, Masih KE, Gryder BE, Khan J, Gilbertson RJ. ZFTA-translocations constitute ependymoma chromatin remodeling and transcription factors. *Cancer Discov.* (IF:29.497) In press. (2021)

Arabzade A, Zhao Y, Varadharajan S, Chen HC, Jessa S, Rivas B, Stuckert AJ, Solis M, Kardian A, Tlais D, Golbourn BJ, Stanton AJ, Chan YS, Olson C, Karlin KL, Kong K, Kupp R, Hu B, Injac SG, Ngo M, Wang PR, De Leon LA, Sahm F, Kawauchi D, Pfister SM, Lin CY, Hodges HC, Singh I, Westbrook TF, Chintagumpala MM, Blaney SM, Parsons DW, Pajtler KW, Agnihotri S, Gilbertson RJ, Yi J, Jabado N, Kleinman CL, Bertrand KC, Deneen B, Mack SC. ZFTA-RELA Dictates Oncogenic Transcriptional Programs to Drive Aggressive Supratentorial Ependymoma. *Cancer Discov.* (IF:29.497) In press. (2021)



## 2020 (R2) 開発費青木班 分担研究 報告書

分担研究課題名：骨格筋幹細胞の未分化性維持機構の解明と筋ジストロフィー治療への応用

分担研究者 林 晋一郎

所属 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

筋ジストロフィーの根治療法として骨格筋幹細胞を用いた移植療法が期待されている。移植された筋幹細胞は、増殖した後に分化・融合して筋再生に寄与するだけでなく、一部は休止状態に入り、組織幹細胞として定着することができる。しかしながら、生体外で培養した筋幹細胞の多くは移植後に融合も幹細胞としての定着もせず、その寄与率の低さが問題となっている。一方、単離直後の筋幹細胞は高い寄与率を示すが、筋幹細胞の未分化な状態を維持したまま長期培養することが難しく、移植に必要な数の未分化性を維持した筋幹細胞の確保が本治療法の課題となっている。そこで本研究では骨格筋幹細胞の未分化性維持および分化制御機構を解明することを目的とした。

筋幹細胞の未分化性を維持する試みは、Notch リガンド (PLoS One, 2017) や p38 阻害剤 (Stem Cell Rep, 2015)、翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$  の阻害剤 (Cell Stem Cell, 2016) などを用いたの先行研究があるが、長期培養後の移植が有効であるものは殆ど報告されていない。我々は、レチノイン酸受容体アゴニストとラミニン E8 フラグメントを用いた培養法により、骨格筋幹細胞の未分化性を高く保持したまま長期間培養可能であることを新たに見出している。これらの作用機序を明らかにすることにより筋幹細胞の未分化性維持機構が解明され、移植効率の向上が期待される。

### 方法

野生型 C57BL/6J (6-8 週齢) マウスよりセルソーターを用いて筋幹細胞を単離した。単離した筋幹細胞およびマウス筋細胞株 C2C12 におけるおけるレチノイン酸受容体 (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) の発現をウェスタンプロットにより解析した。次に RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,

$\gamma$ , RXR のそれぞれのリガンドを筋幹細胞に添加し、筋管形成を指標に RAR リガンドの筋分化抑制効果を解析した。さらに、RAR $\alpha$ のリガンドであるレチノイン酸と Am80 を C2C12 および筋幹細胞に添加し、筋管形成および筋関連遺伝子の発現、さらにレチノイン酸シグナルのターゲットである RAR $\beta$ の発現を qRT-PCR によって解析した。

### 結果

ウェスタンプロットによる解析の結果、筋幹細胞では主として RAR $\alpha$ が発現していた。RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) と RXR のリガンドを分化誘導培地へ添加し、筋管形成能を評価したところ、RAR $\alpha$ のリガンドのみ筋分化抑制効果を示した。興味深いことに C2C12 と初代筋幹細胞では RAR $\alpha$ のリガンドに対して異なる反応を示した。筋幹細胞においては、これまで申請者が見出したとおり、レチノイン酸および Am80 は共に筋管の形成を抑制し、Myogenin や Ckm といった筋分化マーカーの発現を抑制した。一方、C2C12 においてはこれらのレチノイン酸受容体リガンドの添加によって逆に筋管形成は促進し、筋分化マーカーの発現も上昇した。また、レチノイン酸シグナルのターゲットとして知られる RAR $\beta$ と Gpx3 の筋幹細胞における発現変動を qRT-PCR によって解析した結果、添加 2 時間後から発現上昇を認め、36 時間後をピークとすることが明らかとなった。

### 考察

これまで、レチノイン酸はヒト筋幹細胞において RAR $\beta$ , および RAR $\gamma$ を介して分化を抑制する事が報告されている (Cell. Mo. Life Sci. 2016)。しかしながら本研究によってこの作用は RAR $\alpha$ を介していることが明らかとなった。

C2C12 と初代筋幹細胞でレチノイン酸に対する効果が全く異なることは非常に興味深い。2009 年に Zhu らによって同様にレチノイン酸が C2C12 の分化を促進することが報告されている (Differentiation, 2009)。今後、RAR $\alpha$ の抗体を用いた ChIP-seq および RNA-seq によってことにより、筋幹細胞の未分化性維持機構におけるレチノイン酸による作用機序の詳細が明らかになると考えられる。

## 結論

本研究によってレチノイン酸による筋幹細胞未分化維持培養法が確立され、その分子機序についても明らかになりつつある。しかしながら筋細胞に対するレチノイン酸の作用はいまだ不明な点が多く、今後の研究の進展によって骨格筋幹細胞の未分化維持機構のさらなる解明が進み、未分化維持培養法が改良できると期待される。

## 参考文献

Sakai H, Fukuda S, Nakamura M, Uezumi A, Noguchi Y, Sato T, Morita M, Yamada H, Tsuchida K, Tajbakhsh S, Fukada SI. Notch ligands regulate the muscle stem-like state ex vivo but are not sufficient for retaining regenerative capacity. PLoS One. 12(5):e0177516, 2017.

Charville GW, Cheung TH , Yoo B, Santos PJ, Lee GK , Shrager JB, Rando TA. Ex Vivo Expansion and In Vivo Self-Renewal of Human Muscle Stem Cells. Stem Cell Reports. 5(4):621-32, 2015

Zismanov V, Chichkov V, Colangelo V, Jamet S, Wang S, Syme A, Koromilas AK, Crist C. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. Cell Stem Cell. 18(1):79-90, 2016

Haddad ME, Notarnicola C, Evano B, Khatib NE, Blaquiere M, Bonnici A, Tajbakhsh S, Hugon G, Vernus B, Mercier J, Carnac G. Retinoic acid maintains human skeletal muscle progenitor cells in an immature state. Cell Mol Life Sci. 74(10):1923-1936, 2017.

Zhu GH, Huang J, Bi Y, Su Y, Tang Y, He BC, He Y, Luo J, Wang Y, Chen L, Zuo GW, Jiang W, Luo Q, Shen J, Liu B, Zhang WL, Shi Q, Zhang BQ, Kang Q, Zhu J, Tian J, Luu HH, Haydon RC, Chen Y, He TC. Activation of RXR and RAR signaling promotes myogenic differentiation of myoblastic C2C12 cells. Differentiation. 78(4):195-204, 2009

## 新規治療開発に有用な臨床情報の抽出

国立精神・神経医療研究センター病院

脳神経内科 森まどか

### 緒言

Dystrophinopathy は筋骨格を担う dystrophin 遺伝子変異によって生じる筋疾患で、重症な Duchenne 型 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) と軽症な Becker 型 (Becker Muscular Dystrophy, BMD) 、および中間型 (Intermediate Muscular Dystrophy, IMD) とそれぞれの保因者から成る。近年、DMD の骨格筋・心筋障害に対する新規および既存集学的治療が導入され、筋障害に対する予後は改善していくことが期待出来る。しかし、dystrophinopathy は中枢神経障害も伴っておりこちらも治療が必要な可能性があるが、病態・病状や自然歴が十分解明されているとは言えない。Dystrophinopathy の中枢神経障害について現状・背景因子を調査することを目的とした。今年度は、DMD の画像異常と関連する要因を精査した。

### 方法

頭部画像検査を行ったことのある当院脳神経内科の DMD 患者を抽出し、偶発症を除外した頭部画像所見の特徴と臨床像との関連を探った。歩行喪失年齢・人工呼吸器装着年齢、遺伝子診断、発達障害歴、IQ が利用出来る患者についてはこれらの臨床情報との関連を検討した。

### 結果

当院脳神経内科受診歴のある dystrophinopathy 患者のうち 12 歳以下で歩行喪失した 92 名のうち、画像検査が行われたのは 41 名、うち脳血管障害の合併があった 2 名を除外し 39 名だった。画像検査の平均年齢  $24.9 \pm 76.6$  (13-38, median 24)、歩行喪失年齢  $9.8 \pm 1.6$  (7-12, 10) 歳、37 名が人工呼吸器利用しており導入年齢  $19.9 \pm 4.8$  (12-32, 19) であった。

検査人数は頭部 MRI 13 名、頭部 Single Photon Emission CT (SPECT) 17 名、頭部 CT 32 名、SPECT は全例 CT と同時撮影されていた。MRI では 13 名中 7 名、CT では 32 名中 20 名に前頭葉優位の脳萎縮が見られたが、萎縮と IQ や発達障害の間に有意な関連は見られなかった。12 例で 3 年以上の間隔を開けて CT が撮像され、6 名で萎縮の悪化が見られた。SPECT では全例に局所の血流低下を認め、18 例中 17 名は前頭葉だった。同時撮像

CT では血流低下部位主体の軽度の脳萎縮を 18 例中 9 例に認めた。CT と MRI の間に所見の乖離は見られなかった。1 名のみ経時に SPECT が検索され、17 歳から 22 歳の間で血流低下の増悪が見られた。

遺伝子変異との関係で、dystrophin の isoform である Dp140 を欠くことが想定される変異を持っている患者は、CT で有意に萎縮を呈した。

### 考察

DMD 患者の SPECT 検査では全例、CT 検査では 32 例中 20 例、MRI では 13 名中 7 例に脳萎縮を認め、進行性が示唆された。Dp140 は CT 萎縮例で発現していない割合が高かったが、全例ではなく萎縮を説明する要因は他にも存在する。

DMD に対する画像検査は通常の T1, T2 画像等で波異常を認めず、拡散テンソル MRI [Doorenweerd 2014] や MRI 脳血流画像 [Doorenweerd 2017]、PET [Lee 2002] など臨床の場では使用しにくい方法だった。過去に DMD に対し保険収載されているこれらの検査方法で異常を検出した研究はない。本研究で異常の頻度が高かった理由として、対象患者が成人であり年齢が高かった可能性がある。今後は機能との関係や経時的变化を精査する予定である。

研究の限界として、検査バイアス、高次機能評価が不十分であること、進行につれ MRI や SPECT 検査が困難になることから再検が難しいことがある。CT は比較的拘束時間が短く人工呼吸器を利用しながら検査できるため継続検査法として有用と考えた。

### 結論

DMD 患者の過半数に前頭葉優位の脳萎縮・脳血流低下が見られ、進行性である可能性がある。

### 参考文献

1. Lee JS, Pfund Z, Juhász C, et al. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. Muscle Nerve. 2002;26:506-12
2. Doorenweerd N, Straathof CS, Dumas EM, Spitali P, Ginjaar IB, Wokke BH, et al. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. Ann Neurol. 2014;76:403-11.



# ゲノム編集技術を用いた筋ジストロフィー治療法の開発研究

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根治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、従来の遺伝子治療用ベクターでは導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴ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ことが知られており、世界中で研究開発と臨床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ンスキッピングを誘導する事を目指す。特に、DNA の二本鎖切断を伴わない Base Editor 技術は、より安全性の高いシステムとして注目されており、実際ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングへの応用についても研究報告があるが、どのように細胞や生体組織へ送達するかが鍵である [Chemello F et al., Sci Adv., 2021]。

世界的には AAV ベクターを用いて CRISPR-Cas9 ヌクレアーゼや Base editor の送達が行われているが、AAV ベクターは数年以上にも渡って外来遺伝子が発現するため、Cas9 を発現させた場合にはオフターゲット変異導入やベクター断片挿入のリスクが高まる。我々はウイルス様粒子を用いた独自の一過性導入技術 [Gee P et al., Nat Commun, 2020] の開発を進めており、安全性の高い治療法開発を目指す。特に、Base Editor は Cas9 単独と比較しても更にサイズが大きく、通常のウイルスベクター (AAV 等) での送達は困難である。そこで、我々が以前開発したウイルス様粒子を用いたタンパク質送達システム NanoMEDIC を活用し、Base Editor の搭載および送達を目指す。

## 方法

Base Editor にはアデニンを変換する Adenine Base Editor と、シトシンを変換する Cytosine Base Editor に大別されるが、融合するドメインやリンカー構造などに応じて複数のタイプが知られている。我々は複数の Base Editor を入手し、ヒトジストロフィンのエクソンに対して gRNA を設計した。標的エクソンのスキッピングが誘導されるとルシフェラーゼが発光するレポーター細胞に対して、Base Editor と gRNA の組合せを検証し、最も効率的にエクソンスキッピング活性を持つ物を検証した。また、Base editing 活性については、標的部位を PCR で増幅し、Sanger シーケンスで解析することで標的塩基の改変効率を測定した。

## 結果

まずは NanoMEDIC に搭載する Base Editor の形式および gRNA 標的を決定するために、複数の gRNA の検証を行った。その結果、Base editor gRNA の標的に応じて、Base editing 活性およびエクソンスキッピング活性に大きな差が見られた。Base Editor 用の gRNA デザインは、PAM の位置と塩基改変が可能な部位に制約があり、標的となるエクソンのスプライシングアクセプターやスプライシングドナー配列に対して適切な位置に gRNA をデザインすることが困難な場合も多くみられた。

## 考察

Base Editor はヌクレアーゼタイプの Cas9 と比較して安全性が高いと言われているが、我々が検証した限りではオンターゲットの編集活性も低く、様々な設計上の制約があることも分かった。

## 結論

従来のヌクレアーゼタイプ Cas9 との比較を通じて、より適切なエクソンスキッピング誘導方法について検証を深める必要がある。

## 参考文献

- Chemello F et al., Sci Adv., 2021  
Gee P et al., Nat Commun, 2020



# 間葉系前駆細胞を標的とした新たな筋ジストロフィーの治療法開発

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一方、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<sup>3)</sup>。さらに、分担研究者らは定常状態の筋の維持に間葉系前駆細胞が必須の役割を果たしていることも明らかにしている<sup>4)</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、間葉系前駆細胞の良性の機能を阻害することにつながりかねない。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資する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。

すでに、間葉系前駆細胞の二面性の解析、および、ヒト骨格筋由来の高品質な間葉系前駆細胞を利用した薬剤スクリーニングからレチノイン酸シグナルが間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制することを見出している。また、間葉系前駆細胞に効率よくレチノイン酸シグナルを活性化させる化合物を同定している。そこで、筋ジストロフィーモデルマウスを用いて本化合物の治療効果を検討するとともに、筋再生におけるレチノイン酸シグナルの機能的意義を追究し、本シグナルに基づいた筋ジストロフィー治療のさらなる効率化を図る。

## 結果

筋再生におけるレチノイン酸シグナルの作用機序を精査するため、レチノイン酸シグナルのレポーターマウスを用いて筋再生過程を精査した。その結果、レチノイン酸を産生する間葉系前駆細胞自身にシグナルが伝わる *cell autonomous* シグナル経路と、間葉系前駆細胞以外にシグナルが伝わる *non-cell autonomous* シグナル経路が存在することが明らかとなった。

## 考察

筋再生過程で *cell autonomous*、および、*non-cell autonomous* なレチノイン酸シグナルの経路が明らかとなり、レチノイン酸シグナルが複雑かつ巧みに筋再生を制御していると考えられた。今後、これらの知見を基に、*cell autonomous* シグナル経路と *non-cell autonomous* シグナル経路のそれぞれにおける下流標的因子の解析に取り組み、レチノイン酸シグナルによる筋再生制御メカニズムの解明を目指す。

## 結論

レチノイン酸シグナルの *cell autonomous* シグナル経路と *non-cell autonomous* シグナル経路の存在を明らかにした。

## 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.

4) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H et al., Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J Clin Invest.* 131(1):e139617. 2021.

# 筋サテライト細胞を用いた筋ジストロフィー治療開発の基盤研究 一運動依存的に筋サテライト細胞が活性化・増殖する分子機構一

深田 宗一朗

大阪大学大学院薬学研究科

筋幹細胞創薬プロジェクト

張 磯丹\*, 中村 彩沙\*, 久保田 愛美\*,

上住 聰芳\*\*

\*大阪大学大学院薬学研究科

筋幹細胞創薬プロジェクト

\*\*東京都健康長寿医療センター研究所

筋老化再生医学研究

## 緒言

筋ジストロフィー治療開発において「遺伝子・核酸・ゲノム治療」、「薬物治療」、「幹細胞・再生治療」が3本柱としてあげられる。他の治療法にはない「幹細胞・再生治療」の最大の利点は、失った筋線維を新たに作ることができる点である。逆に「幹細胞・再生治療」は局所の細胞移植が想定されており、全身性の疾患である筋ジストロフィーにおいては常に問題となっている。筋サテライト細胞の機能低下は筋ジストロフィーの病態進行と密接に関わっているため、人為的に全身の筋サテライト細胞の再生能力を改善することができれば、新しい幹細胞・再生治療に資することが期待される<sup>1)</sup>。申請者はマウス筋肥大モデルや運動モデルなどにおいて、負荷筋の筋サテライト細胞が実質的に増殖することを見出している<sup>2)</sup>。実験的な筋再生モデルと比較してこれらモデルの筋サテライト細胞の周辺環境の変化は劇的には変化しないため、筋サテライト細胞の増殖・自己複製機構解明において非常に優れたモデルと考えた<sup>3)</sup>。本年度は、自発運動モデルにおける筋サテライト細胞の増殖と静止期シグナルであるカルシトニン受容体シグナル<sup>4)-7)</sup>の関係について検討を行い、カルシトニン受容体シグナル低下と運動依存的な因子の存在により、全身性の筋サテライト細胞の増殖が可能となることを発見した。

## 方法

### 自発運動モデル

10週齢以上の筋サテライト細胞特異的カルシトニン受容体欠損マウス(CalcR-cKO: *Pax7*<sup>CreERT2+</sup> :: *Calcr*<sup>fl/fl</sup>)にtamoxifenを投与し、その二週間後にrunning wheelを装着したケージ(140 mm in diameter, MELQUEST, Toyama, Japan)で二週間飼育した(+Ex群)。走行距離は、CNT-10(MELQUEST)にて計測した。その間、通常ケージで飼育したCalcR-cKOをnon-exercise群(-Ex群)とした。*Pax7*<sup>CreERT2+</sup> :: *Calcr*<sup>+/+</sup>をコントロールマウスとして用い、CalcR-cKOと同様の群分けをした。また、全てのマウス群にEdUを運動期間処置する(-Ex群にも処置)ことで、増殖筋サテライト細胞および、筋サテライト細胞由来筋核をEdUで標識した。

## 筋サテライト細胞の増殖・活性化

各群のマウスより長趾伸筋(EDL)を単離し、一本の筋線維上の筋サテライト細胞数を計測した。1匹のマウスあたり30本の筋線維を測定し、平均値を求めた。また、各群のマウスより前脛骨筋(TA)を単離・固定し、切片を作成後に染色することで、EdU陽性筋サテライト細胞数や、EdU陽性筋核数を定量解析した。Ki67の発現により、筋サテライト細胞の静止期状態も観察した。

## 結果

### 1. 走行距離・負荷筋

コントロールマウスとCalcR-cKOマウスの二週間の総走行距離には違いがなかった。また、running wheelによる運動で負荷のかかるsoleusやplantarisでは、コントロールおよびCalcR-cKOとも、筋サテライト細胞は増殖し核を供給していた。以上の結果より、両グループ間で運動能力の違いはないことが明らかとなった。

### 2. Running wheelによる自発運動では、コントロールマウスのEDLやTAは非負荷筋であり、筋サテライト細胞は静止期を維持する

Running wheelによるexerciseにおいて、EDLやTAの筋サテライト細胞は増殖しないことが知られている。実際に我々の検討においてもコントロールマウスのEDLやTAでは筋サテライト細胞の増殖やEdU陽性の筋線維核は-Ex群と違いがなかった。また、増殖マーカーであるKi67の発現も-Exと+Ex群の筋サテライト細胞で違いがないことか

ら、+Ex 群のコントロールマウス EDL や TA の筋サテライト細胞は静止期状態を維持していることが確認された。

### 3. カルシトニン受容体欠損筋サテライト細胞は EDL や TA の非過負荷筋でも増殖を開始し、筋線維核を供給する

-Ex 群の CalcR-cKO では、これまでの報告通り、筋サテライト細胞数の減少および、EdU 陽性筋線維核はほとんど検出できなかった。しかし、+Ex 群の CalcR-cKO の EDL では、筋サテライト細胞数の増加が観察され、さらに TA においては EdU 陽性の筋核が多数観察できた。

### 考察

コントロールマウスの EDL や TA 内の筋サテライトは、運動依存的な因子が存在しても、カルシトニン受容体からのシグナルにより静止期を維持できる。しかし、CalcR-cKO の筋サテライト細胞は運動に応答したと考察できる。EDL や TA には運動負荷がかからないため、局所的な変化は起こっておらず、運動依存的な全身性の因子に起因していると予想された。以上の結果は、カルシトニン受容体発現抑制と運動依存的な可溶性因子のわずか二つのシグナル経路の制御で、全身性の MuSC の増殖誘導が可能であることを示唆している。

### 結論

カルシトニン受容体の静止期シグナルはマウスの活動量の多い条件で、その重要性がさらに顕著になった。そして、カルシトニン受容体シグナル抑制経路と運動性因子の同定により、全身の筋サテライト細胞の増殖を誘導することは理論上可能となる。本成果は、筋サテライト細胞の活性化・増殖機構解明にも資すると期待される。

### 参考文献

- 1) Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, et al.: Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am. J. Pathol.* 176:2414-2424. 2010
- 2) Fukada S, Kaneshige A, Kaji T, et al.: Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. *eLife* 8. pii: e48284. 2019
- 3) Fukada S, Akimoto T, Athanassia: Role of damage and management in muscle hypertrophy: different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *BBA-Mol Cell Res.*, (Review) 1867(9):118742. 2020
- 4) Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, et al.: Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Reports*, 13(2):302-14. 2015
- 5) Baghdadi MB, Castel D, Machado L, et al.: Reciprocal signalling by Notch–Collagen V–CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature*, 557:714-718. 2018
- 6) Zhang L, Noguchi YT, Nakayama H, et al.: The CalcR-PKA-Yap1 axis is critical for maintaining quiescence in muscle stem cells. *Cell Reports*, 29(8):2154-2163. 2019
- 7) Zhang L, Kubota M, Nakamura A, et al.: Dlk1 regulates quiescence in calcitonin receptor-mutant muscle stem cells. *Stem Cells*. 39(3):306-317. 2021

# 筋組織を標的化する核酸医薬デリバリーシステムの開発

宮田 完二郎

東京大学大学院工学系研究科

## 緒言

近年、核酸医薬による難治性筋疾患の新たな治療法の開発に期待が集まっている。実際に、2020年には初の国産の核酸医薬として、Viltolarsen がデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬として承認されている。その一方で、核酸医薬単体の骨格筋および心筋への集積量は十分とは言い難く、治療効果の向上に向けて、筋組織指向性を有する核酸医薬デリバリーシステムの開発が望まれている。このような背景のもと、本分担研究では、核酸医薬の筋組織集積性を高める核酸医薬デリバリーシステムを創製することを目的とした。具体的には、高分子材料を基盤とする核酸医薬デリバリーシステムを調製し、筋組織に対する核酸医薬の集積量や生理活性の改善を試みた。

## 方法

カチオン性ポリペプチド鎖を含む高分子材料と核酸医薬を緩衝液中で混合し、核酸医薬デリバリーシステムを調製した。狙った物性を有する核酸医薬デリバリーシステムが形成されたことを、アガロースゲル電気泳動、動的光散乱測定 (DLS)、電気泳動光散乱測定 (ELS)、蛍光相関分光法 (FCS)、およびフィールドフローフラクショネーション (FFF) などにより確認した。レポーター遺伝子を発現する培養細胞を用いて核酸医薬の導入効率および活性を評価した。蛍光標識核酸医薬を用いることで、マウス静脈内投与後の核酸医薬の体内動態を評価した。また、ステムループ RT-PCR により、非蛍光標識核酸医薬の筋組織集積量を評価した。核酸医薬デリバリーシステム投与後の筋組織を摘出し、ホモジナイズした筋組織懸濁液に対して qRT-PCR をを行うことで、核酸医薬の活性を評価した。

## 結果と考察

物性評価の結果より、核酸医薬を 100%近く内包した粒子径数十 nm、ゼータ電位が中性に近い核酸

医薬デリバリーシステムが調製されたことが確認された。また、体内動態評価を通じて、本核酸医薬デリバリーシステムは、核酸医薬単体と比べ、30 倍近く血中半減期を延長できることが示された。さらに、骨格筋への核酸医薬集積量に関しては、最適化されたデリバリー条件では、核酸医薬単体に比べ、約 30 倍の増加を達成した。最終的に、約 75%の遺伝子ノックダウンを筋組織に誘導できることが明らかになった。以上より、本核酸医薬デリバリーシステムは、腎臓からの排泄を回避しつつ、骨格筋（および心筋）に集積することで、有意なノックダウン活性を示すことができたと考えられる。

## 結論

本分担研究を通じて、核酸医薬デリバリーシステムにより核酸医薬の筋組織集積性と活性を改善できることが示された。今後は、筋疾患モデルマウスを用いた実験、治療用核酸医薬を含む多様な核酸医薬を用いた実験、および治療効果の有無を判定する実験を行う計画である。



研究課題名：疾患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：筋量制御におけるプロスタグラニンの関与  
東京農工大学 工学研究院 稲田 全規

## 緒言

本研究の目的は、筋量制御におけるプロスタグラニンファミリー因子の機能を解析し、廃用性筋萎縮、筋ジストロフィー、サルコペニアなどの筋萎縮性疾患の治療法の開発につなげることである。プロスタグラニンである PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 $\alpha$  の產生動態と機能解析を行い、筋萎縮の主因となっているプロスタグラニンを明らかにする。さらに、標的となるそれぞれのプロスタグラニンの產生阻害剤を用い、筋萎縮性疾患の治療薬開発を目指す。

## 検討項目：

### プロスタグラニンへのマトリクス選択

プロスタグラニン（PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 $\alpha$ ）のイオン化に適するマトリクスを決定するために、ドライドドロップレット分析を行った。各プロスタグラニンとマトリクス溶液を混合し、イメージングプレート上に滴下した液滴が乾燥した後に、MALDI-TOF-MS によりポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモードで分析した。これら予備検討結果を活用し、複数種のマトリクスを用いてプロスタグラニンのイオン化最適条件の決定と質量分析イメージングへの適用を検討した。

### 質量分析と酵素抗体法を用いた筋組織におけるプロスタグラニンの解析

下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を用い、これまでに確立した、LC-MS および ELISA 法により、各プロスタグラニンの比較定量解析を行った。質量分析の検出感度に影響する測定ポイントの設定について、最適な条件検討を進めた。ELISA の測定はサンプル希釈点、反応時間を複数点設け、検量線を作成し、LC-MS の解析結果との比較検討を実施した。

## 結論

本研究課題では、筋萎縮における PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 $\alpha$  ファミリー因子の產生動態を LC-MS 質量分析を駆使して、その検出法の予備検討と測定を行った。これらの結果、複数種のマトリクスを用いてプロスタグラニンのイオン化最適条件の決定と質量分析イメージングへの適用が可能となった。MALDI-TOF-MS によりポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモードで分析の結果、筋試料における精度構築が可能となった。

一方、下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を用い、LC-MS および ELISA 法の比較検討を行った結果、両解析においてプロスタグラニンの定量性は相關した。これらはプロスタグラニンの測定実験において、各種の分解性や代謝による誤差を補正するための新たな手段として今後の課題実施において有効なツールとなることが明らかとなった。

次年度では、今年度の結果を受け、マイルストーン 3において、筋組織におけるプロスタグラニンの解析とその機能解析実験を遂行する。

下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を用い、今年度確立した、LC-MS および ELISA 法を用いた定量解析法を用い、筋萎縮で影響する測定ポイントの設定について、最適な条件検討を進め、筋組織におけるプロスタグラニン產生を検出・同定する。

さらに、これら同定されたプロスタグラニンの阻害剤を用いて、筋細胞分化の機能性実験を進め、将来の廃用性筋萎縮治療薬の開発につなげる。

## 参考文献

1. Ricciotti E and FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. (2011) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 986-1000.
2. Tominari T, Ichimaru R, Taniguchi K, Yumoto A, Shirakawa M, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Itoh Y, Shiba D, Miyaura C and Inada M. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. (2019) *Sci. Rep.* 9: 6614.



# 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

岡田 尚巳  
東京大医学研究所  
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>J</sub>に対しマイクロ・ジストロフィン発現 AAV ベクター(AAV- $\mu$ Dys)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>J</sub> 1 頭に対し、MSCs を AAV9-Luc もしくは AAV9- $\mu$ Dys 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- $\mu$ Dys 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(Hayashita-Kinoh et al., 2020)。
- mdx/B10* に対し、情動行動解析系を構築し、新生仔に rAAV9- $\mu$ Dys 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。また、マイクロ・ジストロフィン配列の最適化を検討した。
- 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- $\mu$ Dys の経静脈投与を行った CXMD<sub>J</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- $\mu$ Dys 由来のジストロフィンの発現が確認出来た(Hayashita-Kinoh et al., 2020)。
- mdx/B10* を用いて、短時間拘束後の Freezing を Smart3.0(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- $\mu$ Dys 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。マイクロ・ジストロフィン配列についても、ル

ープ構造を取りにくい配列に最適化し、発現ベクターを構築した。

- 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>J</sub>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>J</sub>については、 $\mu$ Dys の治療効果が観察された。
- ヒトおよびイヌにおける発現を最適化した AAV- $\mu$ Dys 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 を併用した個体について、有害事象は認められなかった。

## 結論

CXMD<sub>J</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- $\mu$ Dys の規格について検討を行い、構築した。今後、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 および 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の解析と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



## 筋ジストロフィーモデル動物の病態に基づいたアンチセンス療法の開発

越後谷 裕介

日本大学生物資源科学部 獣医学科

### 緒言

遺伝子変異に伴う RNA スプライシングまたは RNA 発現の異常が原因で発症する筋ジストロフィーに対して、エクソン・スキップや RNA 分解メカニズムを利用したアンチセンス核酸(ASO)は有効な治療薬になると期待されている<sup>1</sup>。これまで筋ジストロフィーに対しては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であるジストロフィン(DMD)遺伝子のアミノ酸の読み替修正(エクソン・スキッピング)を目的とした 3 種類のスプライシング制御型 ASO が上市されている。一方、RNA 分解型 ASO (ASO gapmer)については効率的な mRNA 発現抑制が前臨床試験において報告されているが、治療薬としての応用については骨格筋細胞での効果や安全性の改善に関する課題があり、動物モデルを用いたより詳細な解析が求められている。

そこで本研究では、筋ジストロフィーモデルマウスの病態を基盤として、RNA 分解型核酸による新規治療法の開発を試みる。筋ジストロフィーの発症時期および骨格筋病変の重症度は患者の年齢、全身状態および遺伝的背景と関連していることは、多数の症例と疾患修飾遺伝子の存在によって示されている。また、ASO は骨格筋細胞に直接作用するため、その治療効果は患者骨格筋の状態に大きく依存する。すなわち、より効果的な ASO 療法の開発には、加齢や遺伝的背景に影響される骨格筋の病態と ASO の効能との関係性を明らかにする必要がある。遺伝的に統制された筋ジストロフィーモデルマウスを用いる本研究からの成果は、患者骨格筋の状態に応じたアンチセンス療法プロトコルを確立するための基盤情報となることが期待される。

### 方法

現在、臨床応用に近いと考えられている修飾核酸 Locked nucleic acid (LNA) または 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) を用いて、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)および筋強直性ジストロフィー1型(DM1)の原因 mRNA に対する発現抑制効果を調べる。試験では核酸分解酵素 RNaseH を誘導し標的 RNA の分解

を可能にする gapmer 型 ASO を用いる。FSHD では DUX4 mRNA を標的とした ASO の効果を患者由来細胞およびモデルマウスを用いて調べる。

DM1 において ASO の治療効果が骨格筋の病態に影響を受ける可能性を明らかにするため、DM1 モデルマウス骨格筋における加齢病態を特徴付ける。解析のため、FVB/N 系統を遺伝的背景に持ち、3'非翻訳領域(UTR)に患者類似の異常 CTG リピート(~220 回)が付加されたヒト骨格筋アクチン遺伝子をトランシージンとして有する HSA\*LR マウスを導入し、骨格筋病態の解析を行う。

### 結果

DUX4 mRNA を標的とした ASO gapmer の薬理学的効果について報告した。FSHD 患者由来の不死化骨格筋細胞・モデルマウスを用いて、ASO gapmer による DUX4 mRNA の発現抑制効果を調べた。ASO gapmer は DUX4 の 3'UTR を標的として設計した。筋管細胞へ分化させた FSHD 骨格筋細胞を修飾核酸 LNA または 2'-MOE を有する ASO gapmer で処置したところ、いずれも標的 mRNA の発現レベルの有意な低下が確認された<sup>2,3</sup>。

DM1 において病態および治療効果に対する加齢の影響を明らかにするため、米国 Rochester 大学の Charles A. Thornton 教授、大阪大学医学系研究科 高橋正紀 教授および中森雅之 准教授らの協力のもと、DM1 モデルの FVB/N-HSA\*LR マウスを導入し病態解析を行った。筋電図の解析から HSA\*LR マウスにおける筋強直症状は骨格筋の部位で異なる可能性、すなわち治療効果の評価に適切な骨格筋部位が存在する可能性が示唆された。さらに HSA\*LR マウスの病態は成長期のメスでより影響を受ける可能性が示唆された。

### 考察

ASO gapmer が患者由来細胞・動物モデルにおいて DUX4 mRNA の発現を有意に抑制できたことは、FSHD 治療薬の候補としてだけではなく、変異 mRNA の発現抑制が必要な他の遺伝性筋疾患に対しても有望な治療薬になる可能性が期待される。DM1 においてはこれまで 2'-MOE gapmer による第 II 相臨床試験が実施されてきたが、筋組織における十分な治療学的効果が得られず、新たな修飾核酸またはデリバリーシステムの開発が

望まれている。核酸自体の開発と共に、その効果を評価するためにはモデル動物の詳細な特徴付けは不可欠である。しかし、DM1 の代表的モデル動物である HSA\*LR マウスの加齢に伴う骨格筋病態は不明な点が多い。HSA\*LR マウスの加齢病態と ASO の治療効果を明らかにすることで、DM1 に対する効果的な ASO 療法の開発に繋がると考えられる。今回観察された週齢・性別における DM1 モデルマウスの病態の違いは、HSA\*LR マウス骨格筋のより詳細な解析を支持する重要な結果であると考えられる。我々が以前に報告した複数の *mdx* マウス系統を用いた研究では、加齢と遺伝子変異が異なる骨格筋病態を誘導することが明らかになっている<sup>4</sup>。すなわち、DM1においてもモデルマウスを用いた加齢病態の解析は ASO の治療効果の適切な判定と治療法開発に有益な情報を提供できると考えられる。

## 結論

ASO による RNA 分解作用が FSHD の原因 pre-mRNA の発現抑制に効果的であることが明らかとなり、ASO gapmer の改良により DM1 をはじめ他の遺伝性筋疾患に対する治療薬へ応用できる可能性が考えられる。また HSA\*LR マウスは DM1 の加齢病態に応じた ASO gapmer の効果を解析するための有用なツールになる可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Echigoya, Y, Lim, KRQ, Melo, D, Bao, B, Trieu, N, Mizobe, Y, et al. (2019). Exons 45-55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*.
2. Lim, KRQ, Bittel, A, Maruyama, R, Echigoya, Y, Nguyen, Q, Huang, Y, et al. (2021). DUX4 Transcript Knockdown with Antisense 2'-O-Methoxyethyl Gapmers for the Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **29**: 848-858.
3. Lim, KRQ, Maruyama, R, Echigoya, Y, Nguyen, Q, Zhang, A, Khawaja, H, et al. (2020). Inhibition of DUX4 expression with antisense LNA gapmers as a therapy for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**: 16509-16515.
4. Echigoya, Y, Lee, J, Rodrigues, M, Nagata, T, Tanihata, J, Nozohourmehrabad, A, et al. (2013). Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic *mdx* and *mdx52* mice.

# 糖鎖の修飾機序の解明と生理活性の治療応用

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

## 緒言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、重度の筋ジストロフィーに加え、脳奇形や精神発達遅滞等の中核神経障害、心筋症を伴う常染色体性劣性遺伝性疾患で、フクチン遺伝子の変異によって発症する。FCMD では基底膜ラミニンの受容体であるジストログリカン (DG) の糖鎖に異常が生じている。同様の糖鎖異常を示す筋ジストロフィーも世界的にみられ、DG 異常症と総称される。分担者らは、DG 糖鎖にはリビトールリン酸という修飾体が含まれており、フクチンは糖鎖にリビトールリン酸を組み込む酵素、DG 異常症遺伝子のひとつ ISPD はリビトールリン酸の糖鎖前駆体 CDP-リビトールの合成酵素であることを解明した(1)。つまり、リビトールリン酸糖鎖の欠落によって、ラミニン結合性の糖鎖が伸長できず、基底膜-細胞膜の連携が破綻することが発症要因となる。本分担課題においては、糖鎖修飾の分子機序に着目し、糖鎖異常の解消を基盤とする DG 異常症の治療法を開発する。

## 方法

DG 異常症、特に ISPD 欠損型に対する治療法の開発を目指し、ISPD 酵素反応に基づく糖鎖補充療法の基礎研究を実施する。具体的には、①ISPD 欠損および点変異マウスを作出し、②CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法の有効性を明らかにする。ISPD はリビトール 5 リン酸から CDP-リビトールを合成する酵素である。従って、ISPD 欠損型には CDP-リビトールの補充が有効と考えられる。また、リビトール 5 リン酸への親和性が低下するような病原性変異体では、リビトール 5 リン酸の投与も有効と考えられる。本計画では、ISPD の骨格筋特異的 conditional KO (cKO) マウスと点変異のゲノム編集マウスを作出し、その病態を解析する。次いで、これらのマウスへの CDP-リビトールやリビトール 5 リン酸の投与で治療効果が認められるか検証する。

## 結果

本年度は、骨格筋選択性的 ISPD-cKO マウスと、

患者点変異をゲノム編集法でノックインしたマウスを作出した。骨格筋 ISPD-cKO マウスは、ISPD FLOX マウス(2)と Myf5-Cre マウスを掛け合わせて得た (Myf5-ISPD-cKO)。このマウスは、組織内 CDP-リビトール量の低下と DG 糖鎖異常をみとめ、典型的な筋ジストロフィー病変を示した(投稿中)。一方、リビトール補充療法が有効と考えられる ISPD 病原性変異を検討したところ、複数の候補を見出した。今年度は、その中から X 変異をゲノム編集にてマウス受精卵にノックインし、点変異マウスを得た。この変異をホモにもつマウスは得られなかった。そこで、X 変異マウスと Myf5-ISPD-cKO マウスを掛け合わせ、複合ヘテロ変異マウスの作出を進めた。現在まで、2匹の個体が得られているが、いずれも DG 糖鎖異常を示し、うち 1 個体は典型的な筋ジストロフィー病変を示すことを確認している。

## 考察

Myf5-ISPD-cKO マウスは DG 異常症に特徴的な筋ジストロフィー病変を再現しており、今後の遺伝子治療や CDP-リビトール補充療法に有効なモデルとなる。一方、X 変異マウスについては、ホモマウスは、他の DG 異常症遺伝子 KO マウス同様に胎生致死であり、リビトール補充療法を検証するための優れたモデルとは言い難い。母体へのリビトール補充療法などは今後の課題といえる。一方で、複合ヘテロマウスでは病態を示すことが予想されるため、今後は、複合ヘテロマウスを用いたリビトール療法を進めていく予定である。

## 結論

ISPD 欠損型筋ジストロフィーに対する CDP-リビトール補充療法の有効性を検証するために必要なモデルマウスの作出に成功した。

## 参考文献

- (1) Kanagawa, M., et al. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.* 14, 2209-2223 (2016).
- (2) Lee, A.Y. and Lloyd, K.C. Conditional targeting of Ispd using paired Cas9 nickase and a single DNA template in mice. *FEBS Open Bio* 4, 637-642 (2014).



# ジストロフィン欠損モデル動物における伸張性収縮に対する表現型解析

山田 崇史  
札幌医科大学

## 緒言

近年、エキソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など、遺伝子発現制御法の開発が進められ、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対する治療法は目覚ましい発展を遂げている。しかしながら、疾患モデル動物において、これらの治療法の効果を高い信頼性のもと再現性良く評価する有効な手段は未だ十分に確立されていない。

筋が引き伸ばされながら収縮する伸張性収縮は、筋に強い機械的負荷が加わる収縮様式として知られており、これまで、DMD 筋では、伸張性収縮に対する感受性が増大することが報告されている（Allen *et al.*, 2016）。そこで、本研究では、DMD 治療法の効果を短期にかつ臨床外挿性をもって評価しうる評価系の確立を目指し、ジストロフィン欠損モデル動物において、小動物用トルク測定システムを用い、伸張性収縮（ECC）に対する生理学的表現型について詳細に検討した。

## 方法

本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け実施した（承認番号：20-084）。実験には、14-15 週齢の野生型 C57BL/6J (WT, n=6) および mdx52 マウス (n=6) を用いた。マウスの飼育は、12 時間の明暗サイクルの照明下で室温 24 ± 2°C を常時維持した飼育室にて行い、水および試料は自由摂取とした。

麻酔下にてマウスを背臥位とし、予め剃毛した左後肢を小動物用トルク測定器（竹井機器工業社製）に、足関節角度が底背屈 0 度となるように固定した。その後、表面電極を下腿後面と下腿内側面の皮膚上から下腿三頭筋を挟むように貼付した。等尺性収縮（ISO）トルクは、最大上刺激強度 (45V)、パルス幅 0.5 ms の電気刺激を、1-200 Hz の刺激頻度で 600 ms 間負荷することで測定した。また、ISO による疲労耐性を評価するために、70 Hz, 350 ms の強縮刺激を、3 秒毎に 200 回負荷し、初期値に対する低下率

を比較した。一方、ECC トルクは、最大上刺激強度 (45V) の電気刺激をパルス幅 0.5 ms、刺激頻度 50 Hz で与えると同時に、足底板と連結したモーターによって、マウスの足関節を角速度 150° / s で背屈させることで測定した。なお、関節の運動範囲は、底背屈 0° から背屈 40° とし、20 秒おきに 10 回の ECC を負荷した。

## 結果

### 1. 等尺性収縮 (ISO) トルクおよび疲労耐性

WT マウスに比べ、mdx52 マウスでは、特に 50 Hz 以上の刺激頻度において、ISO トルクの低下が顕著に認められ、最大 ISO トルクは約 30% 低下した（Fig. 1）。

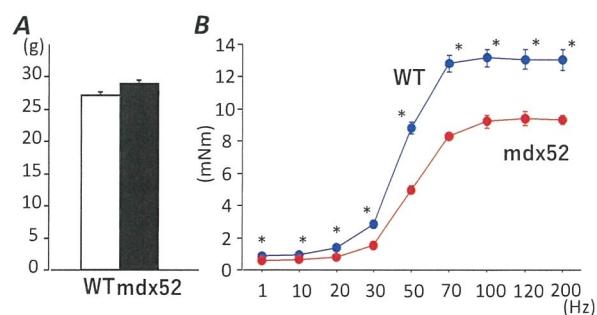


Fig. 1. Isometric torque production is lower in plantarflexor muscles from mdx52 mice. Body weight (A) and isometric torque production (B) in WT and mdx52 mice. Mean (± SE). Data from 4 muscles per group. \*P < 0.05 vs. mdx52.

一方、反復性の ISO により測定した疲労耐性に、両群間で差異は認められなかった（Fig. 2）。また、興味深いことに、疲労刺激後 24 時間における最大 ISO トルクは、両群とも、刺激前の値まで回復していた（Fig. 3）。

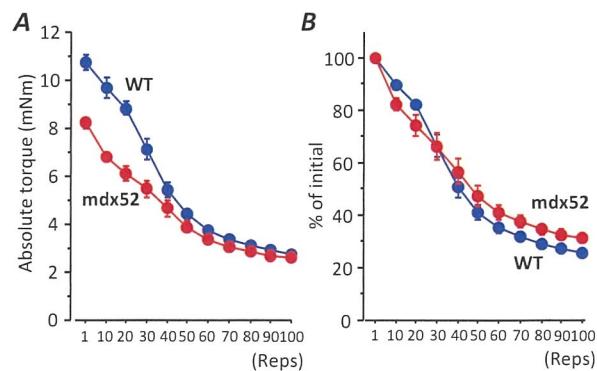
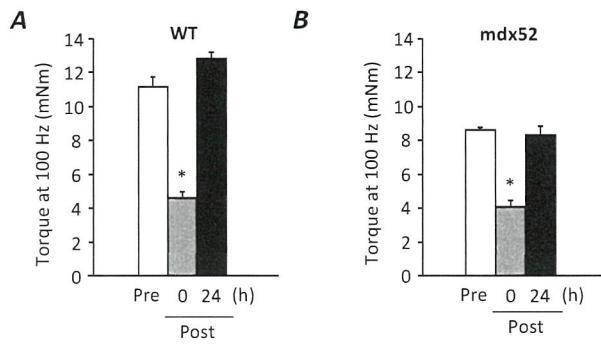


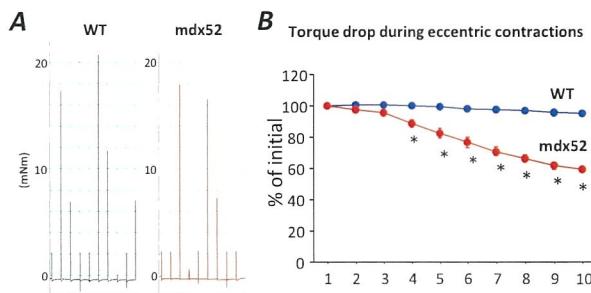
Fig. 2. Fatigue resistance is not altered in plantarflexor muscles from mdx52 mice. Absolute isometric torque (A) and percentage of initial torque (B) during fatiguing tetanic stimulations in WT and mdx52 mice. Mean (± SE). Data from 5-6 muscles per group.



**Fig. 3. Isometric torque production is recovered 24 h after isometric fatiguing stimulation in plantarflexor muscles from mdx52 mice.** Isometric torque production at 100 Hz stimulation frequency immediately and 24 h after fatiguing stimulation. Mean ( $\pm$  SE). Data from 5-6 muscles per group. \* $P < 0.05$  vs. pre.

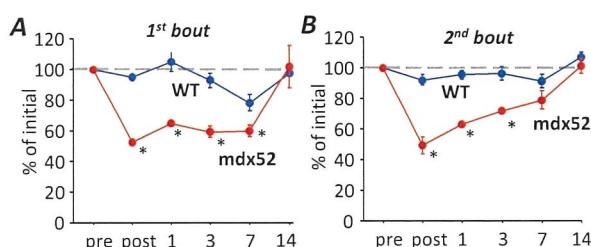
## 2. 伸張性収縮 (ECC) に対する感受性

WT マウスでは、ECC を 10 回負荷しても、トルクの低下はほとんど認められなかった。一方、mdx52 マウスでは、10 回の ECC 負荷により、発揮トルクが 40% 低下した (Fig. 4)。



**Fig. 4. Torque drop during eccentric contractions in plantarflexor muscles from mdx52 mice.** Representative torque traces during eccentric contractions in WT and mdx52 mice (A). Percentage of initial torque (B). Mean ( $\pm$  SE). Data from 5 muscles per group. \* $P < 0.05$  vs. WT.

また、ECC 負荷により低下したトルクが完全に回復するためには 14 日間を要した (Fig. 5)。さらに、トルクが回復した後に、再び ECC を 10 回負荷したことろ、1 度目と同程度のトルク低下が認められるとともに、その回復には同程度の期間 (14 日間) を要した。



**Fig. 5. Torque recovery is not facilitated by repeated bout of eccentric contractions in plantarflexor muscles from mdx52 mice.** Percentage of initial torque after 1<sup>st</sup> (A) and 2<sup>nd</sup> bout (B) of 10 eccentric contractions in WT and mdx52 mice. Mean ( $\pm$  SE). Data from 5 muscles per group. \* $P < 0.05$  vs. WT.

## 考察

先行研究において、10 週齢の mdx マウスにおける体重当たりの最大 ISO 足関節底屈トルクは、WT マウスに比べ、約 20% 低値を示すことが報告されている (Call *et al.*, 2011)。本研究において、14-15 週齢の mdx52 マウスの最大 ISO トルクの低下率 (30%) は、やや高いものの、ほぼ同程度の値を示した。一方、Scott ら (Scott *et al.*, 1990) は、正常な男児において、足関節背屈筋力は、年齢とともに増大するが、DMD 児では、増加するどころかやや低下することを報告している。彼らの報告によれば、5 歳の時点における DMD 児の背屈筋力は、比較的正常に近い値を示すが、10 歳の時点における DMD 児の背屈筋力は、正常の約 20% 程度まで低下し、その差異は、年齢とともに増大することが示されている。これらの知見から、ジストロフィン欠損モデル動物における ISO トルクの低下率は、DMD 患者に比べ軽度であると考えられる。

DMD 患者において、最大随意収縮の 60-70% での ISO 持続可能時間は、健常者の約 20% 程度であることが報告されている (Frascarelli *et al.*, 1988)。また、mdx マウスにおいて、繰り返し収縮による握力の低下が顕著に生じること (Messina *et al.*, 2006)，さらに、mdx マウスから採取したヒラメ筋および横隔膜 (Selsby, 2011)，長趾伸筋 (Wineinger *et al.*, 1998) において、疲労耐性が低下することが示されている。一方、本研究では、in vivo での反復性の強縮刺激により、下腿三頭筋において誘発された疲労の程度に、WT と mdx52 の間で差異は認められなかった。これらの結果の違いがなぜ生じたかは不明であるが、疲労耐性の評価法の違いが関係するかもしれない。

多くの先行研究では (Call *et al.*, 2013; Pratt *et al.*, 2013; Godfrey *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2016)，足関節背屈筋を対象に ECC を負荷しているが、本研究では、臨床的観点から、日常生活において ECC 負荷を受けやすいと考えられる底屈筋に焦点をあて検討した (Brussee *et al.*, 1997)。その結果、足関節背屈筋と同様に、反復性の ECC 負荷中のトルクが再現性高く、顕著に低下した。これらの変化は、WT マウスでは観察されなかったことから、mdx52 マウスでは、ECC に対する感受性が増大することが確かめられた。さらに、mdx52 マウスでは、ECC 負荷後のトルクが完全に回復するまでに長期間を要することが示されたことから、そのメカニズムには、興奮収縮連関にお

ける主要な構成タンパク質の分解など、不可逆性の高い要因が関与することが示唆された。一方、興味深いことに、mdx52 マウスでは、疲労耐性の検討のために、ほぼ最大強度 (70 Hz) の ISO を 200 回負荷したにも関わらず、24 時間後の発揮トルクが完全に回復した。本研究で用いた ECC 条件による負荷強度は、ISO (70 Hz) よりも高いと考えられるが (Ashida *et al.*, 2018), ECC による損傷が、負荷強度が高いために生じたのか、あるいは、収縮様式の違いに起因するのかは不明である。この点に関して、Lindsay ら (Lindsay *et al.*, 2020) は、mdx マウスにおいて、ストレッチや最大下条件での ECC 負荷では、ECC 負荷中のトルク低下が生じないことから、負荷強度が、ECC による感受性の増大の重要な因子であることを示唆している。

前述の通り、ECC を伴う運動は、他の収縮様式と比べ、筋の損傷を引き起こしやすく、さらに、その後の張力の低下は数日から数週間継続する (Lavender & Nosaka, 2006)。一方、一度 ECC 負荷を受けた筋において、筋機能が回復した後に二度目の ECC を負荷すると、その回復が顕著に促進される。この現象は、繰り返し効果と呼ばれている。驚くべきことに、Call ら (Call *et al.*, 2011) は、ECC を用いたトレーニングを mdx マウスに負荷し、筋力増強が引き起こされること、また、その背景には、繰り返し効果の獲得が関与する可能性を示している。しかしながら、本研究では、mdx52 の骨格筋において、繰り返し効果は獲得されなかった。mdx52 マウスにおいて繰り返し効果が獲得されないとすれば、これが病態の進行に関与する可能性があることから、今後、さらなる検討によるメカニズムの解明が期待される。

## 結論

我々が確立した *in vivo* ECC 負荷系および刺激条件を用いることで、DMD モデル動物である mdx52 マウスの下腿三頭筋において、ECC に対する損傷感受性の亢進が高感度に検出できることが確認された。さらに、mdx52 マウスでは、ECC 後の繰り返し効果が獲得されないこと、一方、ISO に対する損傷感受性が亢進しないことが示唆された。本研究において得られたこれらの知見は、モデル動物を用いた DMD 治療法の簡便かつ有効な評価系の確立に寄与するものであると考えられる。

## 参考文献

Allen DG, Whitehead NP & Froehner SC. (2016). Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca<sup>2+</sup>, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* 96, 253-305.

Ashida Y, Himori K, Tatebayashi D, Yamada R, Ogasawara R & Yamada T. (2018). Effects of contraction mode and stimulation frequency on electrical stimulation-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) 124, 341-348.

Brussee V, Tardif F & Tremblay JP. (1997). Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord* 7, 487-492.

Call JA, Eckhoff MD, Baltgalvis KA, Warren GL & Lowe DA. (2011). Adaptive strength gains in dystrophic muscle exposed to repeated bouts of eccentric contraction. *J Appl Physiol* (1985) 111, 1768-1777.

Call JA, Warren GL, Verma M & Lowe DA. (2013). Acute failure of action potential conduction in mdx muscle reveals new mechanism of contraction-induced force loss. *J Physiol* 591, 3765-3776.

Frascarelli M, Rocchi L & Feola I. (1988). EMG computerized analysis of localized fatigue in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 11, 757-761.

Godfrey C, Muses S, McClorey G, Wells KE, Coursindel T, Terry RL, Betts C, Hammond S, O'Donovan L, Hildyard J, El Andaloussi S, Gait MJ, Wood MJ & Wells DJ. (2015). How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the mdx mouse. *Hum Mol Genet* 24, 4225-4237.

Lavender AP & Nosaka K. (2006). Changes in fluctuation of isometric force following eccentric and concentric exercise of the elbow flexors. *Eur J Appl Physiol* 96, 235-240.

Lindsay A, Baumann CW, Rebbeck RT, Yuen SL, Southern WM, Hodges JS, Cornea RL, Thomas DD, Ervasti JM & Lowe DA. (2020). Mechanical factors tune the sensitivity of mdx muscle to eccentric strength loss and its protection by antioxidant and calcium modulators. *Skelet Muscle* 10, 3.

Messina S, Altavilla D, Aguennouz M, Seminara P, Minutoli L, Monici MC, Bitto A, Mazzeo A, Marini H, Squadrito F & Vita G. (2006). Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. *Am J Pathol* 168, 918-926.

Pratt SJP, Shah SB, Ward CW, Inacio MP, Stains JP & Lovering RM. (2013). Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J Physiol* 591, 559-570.

Roy P, Rau F, Ochala J, Messeant J, Fraysse B,

Laine J, Agbulut O, Butler-Browne G, Furling D & Ferry A. (2016). Dystrophin restoration therapy improves both the reduced excitability and the force drop induced by lengthening contractions in dystrophic mdx skeletal muscle. *Skelet Muscle* 6, 23.

Scott OM, Hyde SA, Vrbová G & Dubowitz V. (1990). Therapeutic possibilities of chronic low frequency electrical stimulation in children with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 95, 171-182.

Selsby JT. (2011). Increased catalase expression improves muscle function in mdx mice. *Exp Physiol* 96, 194-202.

Wineinger MA, Abresch RT, Walsh SA & Carter GT. (1998). Effects of aging and voluntary exercise on the function of dystrophic muscle from mdx mice. *Am J Phys Med Rehabil* 77, 20-27.

# iPS 細胞を用いた DMD に対するマルチエクソン・スキップ治療の開発に関する研究

中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター

臨床研究部、脳神経内科

## 緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、*DMD* 遺伝子変異によりジストロフィンが欠損する致死性筋疾患である。最近、我々は exon 3-9 欠失患者が無症状であることを報告した<sup>1</sup>。*DMD* 遺伝子変異の約 10%が exon 3~7 の領域に集積しているため、exon 3~9 内に変異を有するジストロフィン異常症に対して、exon 3-9 skip 治療が極めて有望な治療法になる可能性を提案してきた。そこで、健常者の iPS 細胞を用いて DMD の表現型を示し発生頻度の高い exon 3-7 欠失型 iPS 細胞と我々が治療後の表現型として目指している exon 3-9 欠失型 iPS 細胞をゲノム編集技術を用いて作製し、各々の iPS 細胞から分化誘導した骨格筋、心筋細胞を誘導することを目的とする。

## 方法

理研バイオリソースセンターから入手した健常男性 iPS 細胞 (610B1) を用い、ゲノム編集技術により iPS 細胞への蛍光カルシウム (R-CaMP) および活動電位 (ASAP2s) インジケーター遺伝子（東北大学中井教授より供与）の導入した。次にこの iPS 細胞から分化誘導した心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  の動態及び活動電位を検討した。また、この iPS 細胞を用いてゲノム編集技術により exon 3-7 欠失型および exon 3-9 欠失型 iPS 細胞の作製を試みた。

## 結果

健常男性 iPS 細胞 610B1 の AAVS1 領域に ASAP2s および R-CaMP が組み込まれたインジケータ遺伝子をゲノム編集技術を用いて相同組み換え修復を行った。さらに puromycin セレクションおよび Cre エレクトロポレーションを用いて薬剤選択を行った。この iPS 紹介 (610B1AR iPS と命名) から樹立した iPS 紹介に対して Activin A、DMP4、CHIR、XaV により心筋細胞に分化誘導し、

day 30 で評価したところ心筋特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  の動態と活動電位を確認した。そこで、610B1AR iPSs 紹介を用いてゲノム編集により exon 3-7 欠失型および exon 3-9 欠失型 iPS 紹介を各々作製し、シークエンス法で両者の遺伝子変異を確認した。

## 考察

*DMD* 遺伝子 exon 3-9 skip 治療のアイデアは我々が提案してきた<sup>1</sup>。このアイデアをもとに Eric Olson らのグループがゲノム編集技術により心筋細胞で成功したことを報告している<sup>2</sup>。しかし、現在まで AO とゲノム編集技術による治療効果の比較・検討は行われていない。また、スキップ効率はゲノム編集が AO を上回ると予想されるものの、技術的な問題、成功率、効果及び安全性についての検証も必要である。

今回我々は新たに R-CaMP と ASAP2s 遺伝子が導入された健常男性 iPS 紹介を作製に成功したが、この紹介により  $\text{Ca}^{2+}$  の動態と活動電位といった細胞機能を評価することが可能となった。また、exon 3-7 欠失型および exon 3-9 欠失型 iPS 紹介の作製にも成功したことから、次に健常心筋細胞、3-7 欠失型および exon 3-9 欠失型細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することを目標にしている。さらには exon 3-7 欠失型心筋細胞に対して AO およびゲノム編集技術で exon 8、9 skip を行い、両者の治療効果の比較を行うことを目標にしている。

## 結論

$\text{Ca}^{2+}$  の動態と活動電位が評価可能な正常型、exon 3-7 欠失型、exon 3-9 欠失型の iPS 紹介の作製に成功した。これらの紹介により DMD 及び BMD の病態の違いのみならず、multiexon skip 治療の開発に極めて有用なツールになることが期待される。

## 参考文献

1. Nakamura A., et al. Deletion of exons 3-9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. J Hum Genet 2016; 61:663-7.
2. Kyrychenko V., et al. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing JCI Insight 2017; 2(18):e95918.



# 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

筋ジストロフィーの要因究明や治療研究のために、我々は継続して、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を微生物学的および遺伝学的統御のもとで維持し、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ってきた。

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を継続的に実施してきた。2として、モデルマウスおよびコントロール系統マウスを永続的に維持し、国内研究機関へ継続的な供給を行った。3として、モデルマウスならびに各コントロール系統の血液生化学検査を中心とした背景データの測定・解析を行った。4として、新規モデルマウスの作出を行った。

## 方法・結果

### 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学的および遺伝学的な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ヶ月もしくは3ヶ月に1回の頻度で、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目を実施し、全項目陰性であることを確認した。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、STR マーカーによる遺伝的プロファイルを作成し、遺伝学的品質を管理してきた。

### 2. 筋ジストロフィーモデルマウスの維持とタネ動物の供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J (B6)-*dy*、C57BL/10ScSn-*mdx* (B10-*mdx*)、C57BL/6J-*mdx*、B10-*mdx*.utrophin K0、NOG-*mdx*、DBA/2N (D2)-*mdx* およびこれらのコントロール系統マウスを 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班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給してきた。令和2年の供給実績は、国内 17 機関に 46 回供給し、B10-*mdx* を 558 匹、D2-*mdx* を 72 匹、B6-*dy* を 10 匹の累計 686 匹を分与・供給した。

### 3. 筋ジストロフィーモデルマウスの背景データ解析

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 D2-*mdx* マウスにおける体重変動、血漿 Creatine phosphokinase (CPK) 値ならびに四肢筋力 (Wire-hanging test) を測定・解析した。解析動物は D2-*mdx* と背景系統の D2 の 2 系統マウスにおける 3 週齢から 10 週齢において、各雄 5 匹を使用した。3 週齢から 10 週齢の体重変動は、D2-*mdx*において成長に伴った体重上昇を認めたが、D2 と比較して常に低値を示した。CPK 値は、D2-*mdx*において離乳直後 3 週齢から異常で有意な上昇が見られ。特に 6 週齢において CPK 値の顕著な異常 (約 4,000 IU/L) を認めた。四肢筋力は、D2 において経週齢的に上昇を認めたのに対して、D2-*mdx*において D2 と比較して有意的に低いだけでなく、6 週齢以降の上昇は認められなかった。

#### 4. 新規筋ジストロフィー・モデルマウスの作出

筋ジストロフィーの免疫不全モデルである NOG-*mdx* に加え、再生医療研究により有用な筋ジストロフィー・モデル動物を作出することを目的として、上記の通り筋力低下を呈する D2-*mdx* を背景とした免疫不全モデルを CRISPR/Cas9 法を用いて作出し (D2.B10-Dmd $\times$ mdx>Rag2 $\times$ em1>I12rg $\times$ em1>/Jic) 、供給体制の整備を始めた。

#### 考察・結論

筋ジストロフィーモデル動物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、再現性ある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、再生医療を含めた筋ジストロフィー治療の基礎研究に寄与することができた。その供給実績は、機関数および匹数ともに高水準を維持した。近年の特徴として国内製薬メーカーへの供給数の増加が挙げられる。若週齢の D2-*mdx* マウスの背景データ解析の結果、D2-*mdx* マウスは若週齢から Duchenne/Becker 型筋ジストロフィーの診断基準である Cpk の顕著な異常値を示すだけでなく、背景系統と比較して、体重ならびに筋力の低下が認められることから、より有用な筋ジストロフィー・モデルであることが確認された。また、この D2-*mdx* を背景にした免疫不全マウスの作出に成功し、筋ジストロフィーの再生医療等研究に寄与するための供給体制整備を開始した。

#### 参考文献

なし

# 筋ジストロフィー患者のピアカウンセラー養成講座 「ピアカウンセラーの基礎知識—筋ジストロフィーと遺伝子(DNA)教育講座」

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>2)</sup>、池上 香織<sup>1)</sup>、  
石浦 章一<sup>3)</sup>、川崎 奈緒子<sup>4)</sup>  
1)一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会  
2)NPO 法人 日本バリアフリー協会  
3)同志社大学 特別客員教授、東京大学名誉教授  
4)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。

## 【はじめに】

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。

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 年度から全 20 回開催。様々な場所で開催しており、参加者は計約 400 名に至る。内容は、筋ジストロフィー治療や福祉体制、社会的サポート情報提供、当事者の体験談の講演や、ピアカウンセラーとして話を聞くまでのスキルや心得の学習、ロールプレイ演習などを実施している。

## 【方法】

令和 2 年度は COVID-19 感染拡大防止のため、従来通りの開催が困難と判断し、オンラインにて筋ジストロフィーに関する教育講座「筋ジストロフィーと遺伝子(DNA)養成講座」を開催した。

実施方法 : Zoom(参加無料、人数制限なし)

対象 : 筋ジストロフィーの当事者、家族、支援者等

募集方法 : 日本筋ジストロフィー協会より会員の方

向けにメール、協会ホームページや SNS での案内

講師 : 石浦章一先生

(同志社大学 特別客員教授、東京大学名誉教授)

日時 : 全 5 回 土曜 10 時~10 時 50 分

(講義 40 分+質疑応答 10 分)

日程	内容
1 10月 31 日	遺伝子診断と遺伝子治療／ゲノム編集
2 11月 14 日	デュシェンヌ型筋ジストロフィーと治療
3 12月 5 日	肢帶型、先天型筋ジストロフィーの発症と治療
4 12月 19 日	遠位型、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、および脊髄性筋萎縮症の発症と最新治療
5 1月 16 日	スプライシングと筋強直性ジストロフィー

## 【結果】

参加者数は第 1 回 76 名、第 2 回 74 名、第 3 回 72 名、第 4 回 74 名、第 5 回 67 名。うち約半数は当事者であり、次いで家族、支援者、その他(学生、研究者、遺族など)であった。

以下、講座終了後に毎回実施したアンケートの結

果を示す。全5回の回答数は計287名。

各講座の結果を平均すると、理解度は「とてもよく理解できた」33.1%、「大体理解できた」55.4%、「あまりよく分からなかった」11.2%、「分からなかった」0.3%であった。活用度は「とても役立ちそう」88.6%、「役立ちそう」57.5%、「あまり役立ちそうにない」3.9%、「役立ちそうにない」0%であった。満足度は「とても満足」44.6%、「満足」48.4%、「あまり満足していない」4.4%、「満足していない」0.7%であった。

次に、遺伝子介入治療に対する意見について、アンケート結果を以下に示す。

『将来受けられる可能性のある遺伝子介入治療の理解が深まりましたか？』の質問に対して、「理解できた」と回答した者は80%以上であり、特に初心者向けの具体的で図解や絵を用いた説明、専門用語の解説が好評価を得た。一方、「もっと詳しく聞きたい」「一度聞いただけでは難しい」など、講義時間が足りないという意見も得られた。

『将来受けられる可能性のある病型の遺伝子介入治療薬が市販されたら、あなた(または家族)の治療を希望しますか？』の質問に対して、「希望する」が70%で、「少しでも改善が期待できるなら、全ての可能性を試したい」の言葉に称されるように、当事者の期待や希望が強く感じられた。一方、「どちらともいえない」意見も多く(26%)、「有効性とリスクのバランス次第」「本人の希望次第」など、現状では不明な事柄が多い点も指摘された。

『遺伝子介入治療に対する危惧がありますか？』の質問には「ある」50%、「どちらともいえない」46%、「ない」4%であり、「長期的な効果が不明」「リスクマネジメントをしっかり把握したい」「実績を見てから検討したい」と、可能性ある治療を受けたい希望はありつつも未知な部分が多いことから、治療の安全性を懸念する声が多かった。

参加者の声として、本年度は初のオンライン開催となったが、「自宅で患者、家族と一緒に学べることは貴重だった」など、普段遠方で講座に参加出来ない方も気軽に参加出来ることにメリットを感じられている参加者が多かった。

遺伝子治療に関しては、アンケート結果と同様、期待は高いが安全性を危惧する声が多く、副作用や費用など先進医療に対する研究結果や情報提供を望む声が多かった。

### 【考察】

平成16年から開始されたピアカウンセラー養成講座は、全20回開催された。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られてきた。

令和2年度開催の教育講座において、全体的に理解度・満足度は高い評価を得られ、症状や治療の基礎的な知識、最新治療に対する関心の高さが確認出来た。

開催方法に関して、オンラインでの開催となったことで、例年より多くの参加者が集まった。今後の開催においては、今回の意見を参考に、広報の範囲も広げつつ、より多くの方が参加しやすい方法を検討したい。初心者向けに分かりやすい内容や資料も好評だったため、今後にも活かしていきたい。

また、遺伝子介入治療に対する危惧や情報不足による不安の声も聞かれ、今後も定期的に情報提供の機会を設ける必要性が感じられた。他にも、患者本人や家族のストレスマネジメント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た。本講座が当事者や家族の交流の場としても役立つよう検討し、今後も主に当事者や家族、支援者を中心ニーズに沿った情報を提供できるよう、改善しながら取り組みを続けていきたい。

### 【結論】

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、

確かにようである。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、忘れてはならない。

したがってピアカウンセラー養成講座や今回のような教育講義のように、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こと、意見を交わすことは、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があるので、非常に有意義であったと考える。

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。  
新たな成果がでることを期待したい。

#### 【参考文献】

なし



# リン脂質組成による筋機能調節に関する研究

進藤 英雄

国立国際医療研究センター

## 緒言

生体膜リン脂質はグリセロール骨格に一つの極性基と二種の脂肪酸が結合している。脂肪酸は結合様式や炭素数、二重結合数が様々で組み合わせから1000種程度のリン脂質が存在する。これらは各組織機能に影響すると考えられているが、分子レベルでの研究は未解決である。また、膜成分だけなくリン脂質メディエーター、その貯蔵、他にも肺サーカクタント成分など様々な役割がある。

多様なリン脂質の生合成最終ステップを担う酵素はリゾリン脂質アシル転移酵素であり、近年13種同定された。我々は8種同定し欠損マウスも複数保有している。骨格筋機能や Duchenne muscular dystrophyなどの筋疾患とリン脂質組成の関連を研究できる。

今回、リゾリン脂質アシル転移酵素の中で、リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素(LPCAT2)の構造予測を行った。LPCAT2は炎症性の細胞に強く発現するが骨格筋にも発現している。また、*in vitro* 解析において、膜リン脂質でホスファチジルコリン(PC)やリン脂質メディエーターである血小板活性化因子(PAF)も合成する。

LPCAT2の生体機能調節の理解や阻害剤開発において構造解明は有益であるが、現在未解決である。LPCAT2は1-acyl-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase(AGPAT)ファミリーに属する。同じファミリーの高熱菌LPCAT2ホモログPlsCは結晶構造が報告されている。今回、PlsC情報よりLPCAT2構造予測を行った。

## 方法

- (1) PlsCの情報よりLPCAT2のホモジーモデリングを行った。
- (2) AGPATモチーフ領域の点変異解析を行った。

## 結果

ホモジーモデリングより、LPCAT2は膜表在性の酵素であることがわかった。また、基質である

アシルCoAと結合すると考えられるポケットが確認された。次に活性に必須なAGPATモチーフの各アミノ酸をアラニンに置換した変異体解析を行った。LPCAT2は他の酵素同様に、AGPATモチーフ1から4を保有していることがわかった。また、このモチーフはアシルCoA結合ポケットを囲うように配置されていた。

## 考察

今回、構造予測ではあるがLPCAT2は膜表在性タンパク質であり、基質であるアシルCoAの結合ポケットも明らかとなった。さらに、このポケットは活性に必須なAGPATモチーフの1-4に囲まれていた(Hamano et al FASEB J. 2021)。しかしながら今回のモデルではLPCAT2のN末端とC末端が除かれている。N末端は活性化に必要なリン酸化部位Ser34があり、C末端にはCa結合のためのEF handモチーフがある。今後、これらの情報を含めた構造解明が重要になる。

今回の結果からLPCAT2だけでなく、他のAGPATファミリーのリン脂質性合成酵素(リゾリン脂質アシル転移酵素)の構造も予測できる。今後、阻害剤開発に有益な情報となる。リゾリン脂質アシル転移酵素の阻害剤から筋疾患の新たな創薬へ発展できる可能性がある。

## 結論

LPCAT2の構造予測から基質結合ポケットを予測できた。活性に必須なモチーフで囲まれており、今後阻害剤開発に有益な情報となった。また、筋組織における膜リン脂質生合成解析にも貢献できる。

## 参考文献

- Hamano, F., Matoba, K., Hashidate-Yoshida, T., Suzuki, T., Miura, K., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., Kita, Y., Noda, N., Shimizu, T., Shindou, H. Mutagenesis and homology modeling reveal a predicted pocket of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 to catch Acyl-CoA. FASEB J. 2021 in press



# エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースの構築およびスキッピング予測に関する研究

千葉 峻太朗

理化学研究所

## 緒言

スプライシング制御（エクソンスキッピング）を利用した疾患の治療のためのアンチセンス核酸は、新しい創薬モダリティとして期待されている。スキップの対象とする mRNA 前駆体上のエクソンを、効率よくスキップさせるアンチセンス核酸の標的部位や長さは、通常、網羅的な実験によって決定されている。そこで、本研究では、この網羅的実験による開発期間とコストの増大を抑制するため、高効率アンチセンス核酸のデザインを補助する計算ツールを開発した。先行研究<sup>1</sup>によりアンチセンス核酸および対象エクソンの記述子化と、記述子を利用した 2 次回帰モデルによって、スキップ効率の予測可能性が示されていた。本研究では学習データの拡充および機械学習を利用して、予測モデルの正確度向上を目指した。

## 結果

論文及び特許などの文献からエクソンスキッピングに関連する情報を収集およびマニュアルキュレーションすることで、配列情報、スキップ効率、実験条

件などをデータベースとしてまとめた（表 1）。

データベースから phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) および 2'-O-methyl oligonucleotides (2OMe) を利用したスキップ効率のデータを、標的遺伝子が DMD でありかつ実験条件がある程度揃うように抽出した。PMO と 2OMe のデータは、426 個（固有配列数 109 個）と 228 個（固有配列数 124 個）となった。全データのうち 90% を学習データ、10% をテストデータとして、同一配列が学習データとテストデータで共有されないように分割した。標的エクソンおよびアンチセンス核酸の配列情報から、エクソンとアンチセンス核酸の予測結合スコアや GC 含有率などの記述子を作成した。これらに実験時のアンチセンス核酸の濃度を加えた記述子を説明変数に設定し、スキップ効率を予測する回帰モデルを support vector regressor によって構築した。テストセットでの決定係数  $R^2$  は 0.6 (PMO の予測モデル) と 0.7 (2PMo の予測モデル) であった。

データベースおよび予測モデルをウェブサーバーに実装・公開 (<https://eskip-finder.org>) するとともに、論文としても公開した<sup>2</sup>。データベース機能として、遺伝子名、種名、標的エクソン番号、アンチセンス核酸配列での検索機能を提供している。予測機能として、標的エクソン配列、その上流と下流の 200 塩基、利用する化学種 (PMO または 2OMe)、アンチセンス核酸の塩基長を入力すると、図 1 に示すようにスキップ効率の相対値を出力する機能を提供している。

表 1. データベース登録済みのスキップ効率のデータ数および固有配列数（2021 年 4 月 15 日現在。文

献 2 より一部改変して転載。Licensed under CC BY 4.0.)

Available genes					
DMD, MSTN, DYSF, SCN1, COL7A1, LAMA2, MAPT, USH2A, DMPK, MS4A2, ATM, ALK2/ACVR1, NF1, PMM2, NPC1, NF2, MLC1, MFSD8					
DMD	MSTN	DYSF	SCN1	COL7A1	LAMA2
5137 (1809)	674 (230)	69 (35)	57 (48)	42 (15)	23 (23)
MAPT	USH2A	DMPK	MS4A2	ATM	ALK2/ACVR1
18 (13)	7 (1)	7 (7)	4 (2)	4 (4)	4 (1)
NF1	PMM2	NPC1	NF2	MLC1	MFSD8
3 (3)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)

## 結論

本研究で公開したエクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースおよびアンチセンス核酸デザインのための予測ツールが、エクソンスキッピングの研究開発を加速するために有用であると期待している。現在もデータベースに収載すべき特許などの文献から情報抽出を継続しており、より多様な遺伝子、スキップデータを登録する予定である。データベースに、より多くの情報が蓄積された時点で、再度予測モデル構築を行う予定である。このときに、今回の報告で予測モデル構築に利用したDMDのデータに加えて、他の遺伝子の情報も学習に取り組むことで、予測モデルの適用範囲を広げていきたい。

## 参考文献

1. Y. Echigoya, V. Mouly, L. Garcia, T. Yokota, W. Duddy, In silico screening based on predictive algorithms as a design tool for exon skipping oligonucleotides in Duchenne muscular dystrophy, Plos One, 10, e0120058 (2015).
2. S. Chiba, K. Lim, N. Sheri, S. Anwar, E. Erkut, M.N.A. Shah, T. Aslesh, S. Woo, O. Sheikh, R. Maruyama, H. Takano, K. Kunitake, B. Duddy, Y. Okuno, Y. Aoki, T. Yokota, eSkip-Finder: a machine learning-based web application and database to identify the optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping, Nucleic Acids Res (2021) (accepted).

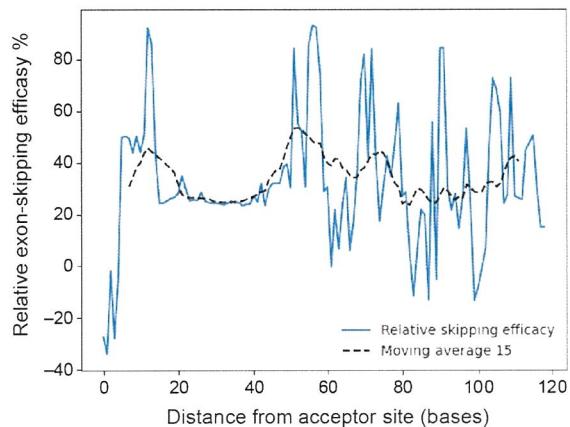


図1. アンチセンス核酸を、標的エクソン上の位置を一塩基ずつ移動させてデザインした場合の相対的なスキップ効率の予測値。DMD のエクソン 44、PMO の塩基長 30 を入力とした例。文献2より一部改変して転載。Licensed under CC BY 4.0.