

## 筋強直性ジストロフィー

石浦 章一<sup>1)</sup> 小穴 康介<sup>1)</sup> 古戎 道典<sup>1)</sup>

**要旨：**現在まで、筋強直性ジストロフィーの完璧な治療法はない。私たちは、ミオトニアを指標とする塩化物イオンチャンネルのスパライシングの正常化に関して、モデル動物をもちいて2つのアプローチをおこない、効果をしらべた。1つはアンチセンス法で、バブルリポソームという新しい方法で効率的に骨格筋にアンチセンスを導入し、ミオトニアを正常化することに成功した。もう1つは低分子化合物で、塩化物イオンチャンネルのスパライシングを正常化する物質マヌマイシンAを同定し、効果を明らかにした。

(臨床神経 2013;53:1109-1111)

**Key words：**筋強直性ジストロフィー、スパライシング、塩化物イオンチャンネル、ミオトニア、治療

## はじめに

筋強直性ジストロフィー (DM) は成人型の筋ジストロフィーで、筋萎縮のみならず、筋強直、精巣萎縮、白内障、耐糖能異常などを特徴とする全身性疾患で<sup>1)2)</sup>、我が国の発病率は約8千人に1人である。また、家系には重篤な症状の先天型がみられることがある。DMのほとんどを占める1型 (DM1) の責任遺伝子は第19染色体にあるDMPKで、その3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が病気の直接の原因である。また筋強直性ジストロフィー2型 (DM2) も発見されたが、これは第3染色体にあるZNF9 (CNBP) 遺伝子中のイントロン1にあるCCTGリピートの伸長であることが明らかになった。その後、DMPK mRNAが核にfociを作ることが判明し、そこにRNA結合タンパク質が集積していることがわかってきた。また、伸長したリピートだけを発現させたマウスでもヒトと同じ症状がみられたり<sup>3)</sup>、DMPKのヘテロでは症状がまったくみとめられないことから、RNAリピートが発症にかかわっているという説が有力になってきた。本研究では、ミオトニアの原因である塩化物イオンチャンネル (*Clcn1*) 遺伝子のスパライシングを正常化することを目的に研究をおこなった。

## アンチセンスオリゴによるスパライシングの正常化

以下の実験には、HSA<sup>LR</sup>マウスをもちいた。このマウスは骨格筋アクチンプロモーターの下流に約CTG200リピートをつないだトランスジェニックマウスで、ロチェスター大学のC.A. Thornton教授から供与されたものである。

Fig. 1Aにはマウス *Clcn1* 遺伝子のエキソン6～7の模式図を示す。まず、エキソン6, 7A, 7をふくむミニ遺伝子を作

成し、COS-7をもちいた培養細胞系でエキソン7Aをスキップする正常型スパライシングの割合を高めるアンチセンス配列を検討した。その結果、エキソン7Aの5'側1-25のアンチセンスがもっとも効率よくエキソン7Aをスキップさせることがわかった。そこで次に、1-25モルフォリノオリゴ20 µgを6週令のHSA<sup>LR</sup>マウスの前脛骨筋 (TA) に筋注した。このとき、モルフォリノは30 µlのバブルリポソームに懸濁してもちいた。注射後すぐに超音波を患部に与え、試薬の筋への浸透を図った。この工程を1週間おきに3回おこない、最後の照射から3週間後に筋電図を測定し、その後、筋を採取してスパライシングアッセイをおこなった。

Fig. 1B左はスパライシングの結果である。これは筋からmRNAを抽出しcDNAにしたあと、PCRによってしらべたもので、上のバンドがエキソン7Aをふくむ異常型、下のバンドがエキソン7Aをスキップした正常型である。モルフォリノ処理した筋 (PMO) では異常型が減少していることがわかる。それを定量化したのがFig. 1B右の図である。

次に、筋電図によりミオトニアが改善されたかどうかについて検討をおこなった。Fig. 1C左は実測図で、HSA<sup>LR</sup>マウスの片方の足に生理食塩水を、もう片方の足にモルフォリノオリゴ (PMO) を導入したものである。この結果から明らかのように、PMO処理によってミオトニアが減弱したことがわかる。Fig. 1C右はミオトニア量を定量化したもので、単位時間当たりの積分量で表した<sup>4)</sup>。

以上の結果から、新しく調製したアンチセンスオリゴをバブルリポソームと共に投与して超音波処理することにより、筋へアンチセンスが効率よく取り込まれ、ミオトニア症状を改善することができることがわかった。しかし、スパライシングを完全に正常化することはできず、ミオトニアも少し残ることから、投与の最適化にはもう少し時間がかかることがわかった。

<sup>1)</sup> 東京大学大学院総合文化研究科 [〒153-8902 東京都目黒区駒場3丁目8-1]

(受付日：2013年5月30日)

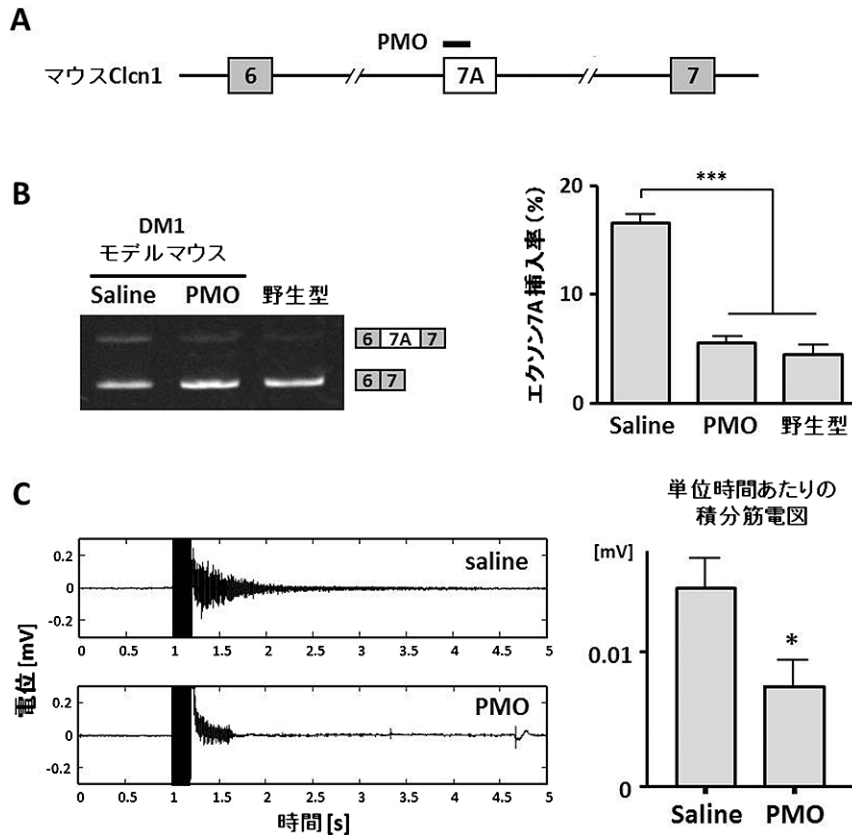


Fig. 1 アンチセンスによるミオトニアの軽減.

### 低分子化合物によるスプライシングの正常化

私たちは筋への浸透性が高い低分子化合物によってスプライシングを正常化することも試みた。Fig. 2Aには、そのスクリーニング手法を示す。まず Fig. 1 のミニ遺伝子の後方にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを作った。マウス C2C12 細胞にこのミニ遺伝子を導入して、正常にスプライシングがおこったばあいには (エクソン 7A が抜ける) ルシフェラーゼが発現し、異常スプライシングがおこったばあいには途中で停止コドンが入るようにしてルシフェラーゼが発現しないように工夫した。MBNL1 のようなエクソン 7A をスキップさせるようなスプライシング因子が存在すると正常スプライシングがおこるが、MBNL1 がいないと異常の方に傾く。この系によって 400 種類以上の化合物を試した結果、Fig. 2C に示すマニユマイシン A という化合物がヒットした<sup>5)</sup>。

Fig. 2B のようにマニユマイシン A は確かに CTG480 リピートの存在下で、正常スプライシングを促進した。そこで、マニユマイシン A を先ほどの HSA<sup>LR</sup> マウスの TA 筋に 3  $\mu$ g 投与し、5 日後に筋肉を回収してスプライシングをみたのが Fig. 2D である。対照 (反対足) には 0.1% DMSO を同量投与した。Fig. 2D の定量結果から、マニユマイシン A は実際のマウス筋においてもスプライシングを正常化することがわかった。

興味深いことに、このマウス *Clcn1* 遺伝子のスプライシング正常化には H-Ras が関与していることがわかった (Fig. 2E)。マニユマイシン A はファルネシル化の阻害剤である。そこで、ファルネシル化されることで有名な Ras ファミリーを siRNA によってノックダウンしたところ、H-Ras をノックダウンしたときにマウス *Clcn1* 遺伝子のスプライシングが正常化することがわかった。H-Ras 以外の Ras はファルネシル化の他にゲラニルゲラニル化を受けることが知られている。マニユマイシン A はファルネシル化特異的な阻害剤であるため、マウス *Clcn1* 遺伝子のスプライシングには H-Ras が関係している可能性が示唆された。

### おわりに

本研究で明らかになったアンチセンス配列は、エクソン 7a の最初の部分であり、ここは MBNL1 応答配列と考えられているところである<sup>6)</sup>。私たちが対照に選んだのは、アンチセンス法をはじめてモデルマウスに適用した Rochester 大学の C.A. Thornton 教授が作った配列<sup>7)</sup> だが、比較検討の結果、今回私たちが新しく同定した配列をもちいたばあいに最大限のスプライシング正常化がみとめられた。また、アンチセンスの導入にバブルリポソームをもちいたのも新規な知見であり、今後は効率的投与方法としてもちいられるであろう。

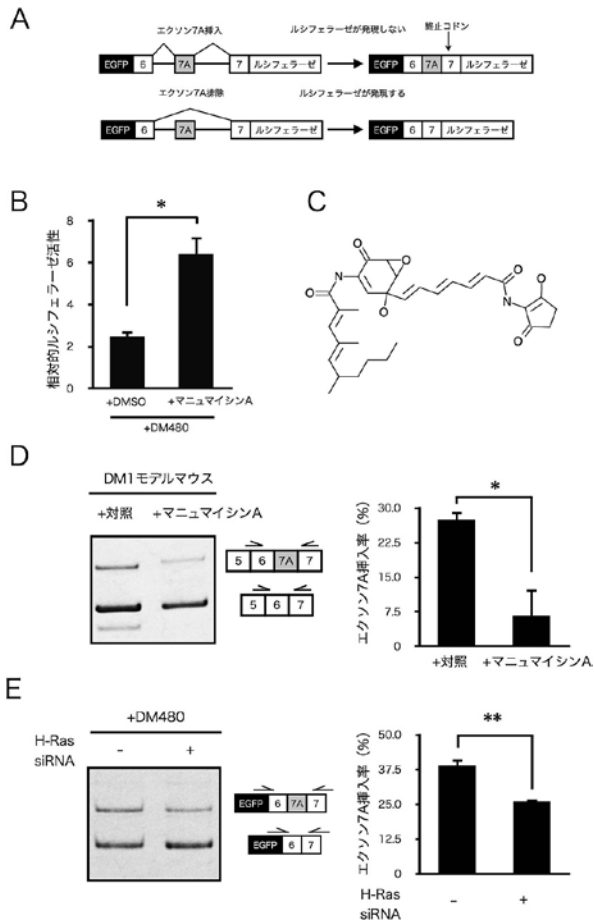


Fig. 2 マニユマイシンによるスプライシングの正常化。

しかしながら効果は限定的で、もう少し効率の良いものが求められる。マニユマイシンAはアンチセンスを補完するものであり、今後、投与方法が大きな問題になるものと思われる。

る。もっと重要なのは、DM患者のQOLに大切な筋力低下をどう改善するかという点であり、これについてはほとんど知見がえられていない。今後は、筋力低下の関係する遺伝子の同定やCTGに対するアンチセンス療法<sup>8)</sup>など、新しい治療法が期待されている。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

## 文献

- 1) Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophy: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurology* 2012;11:891-905.
- 2) Cho DH, Tapscott SJ. Myotonic dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:195-204.
- 3) Mankodi A, Logigian E, Callahan L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000;289:1769-1772.
- 4) Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, et al. Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep* 2013;3:2242.
- 5) Oana K, Oma Y, Suo S, et al. Manumycin A corrects aberrant splicing of *Cln1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep* 2013;3:2142.
- 6) Kino Y, Washizu C, Oma Y, et al. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel *CLCN1*. *Nuc Acids Res* 2009;37:6477-6490.
- 7) Wheeler T, Lueck JD, Swanson MS, et al. Correction of *CIC-1* splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 2007;117:3952-3957.
- 8) Wheeler T, Sobczak K, Lueck JD, et al. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 2009;325:336-339.

## Abstract

### Myotonic dystrophy

Shoichi Ishiura, Ph.D.<sup>1)</sup>, Kosuke Oana, M.S.<sup>1)</sup> and Michinori Koebis, M.S.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

No effective treatment was available for myotonic dystrophy, even in animal model. We have established a new antisense oligonucleotide delivery to skeletal muscle of mice with bubble liposomes, and led to increased expression of chloride channel (*CLCN1*) protein and the amelioration of myotonia. In other experiments, we also identified small molecule compounds that correct aberrant splicing of *Cln1* gene. Manumycin A corrected aberrant splicing of *Cln1* in mouse model.

(Clin Neurol 2013;53:1109-1111)

**Key words:** myotonic dystrophy, splicing, chloride channel, myotonia, therapy