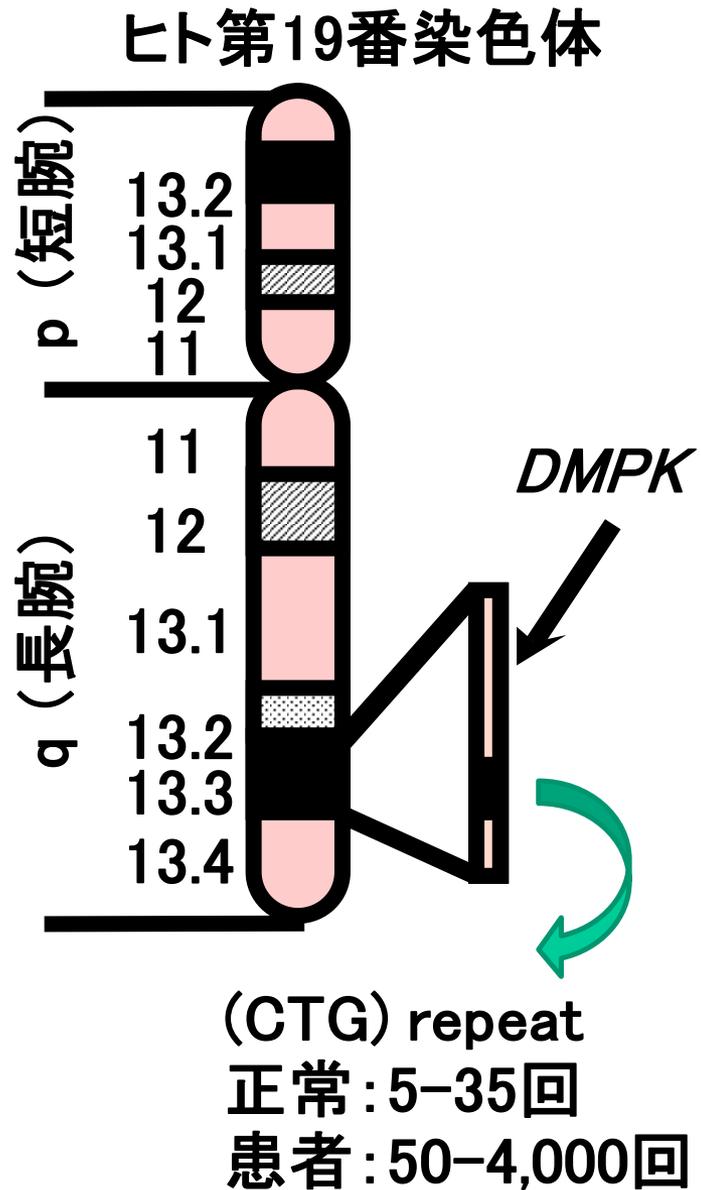
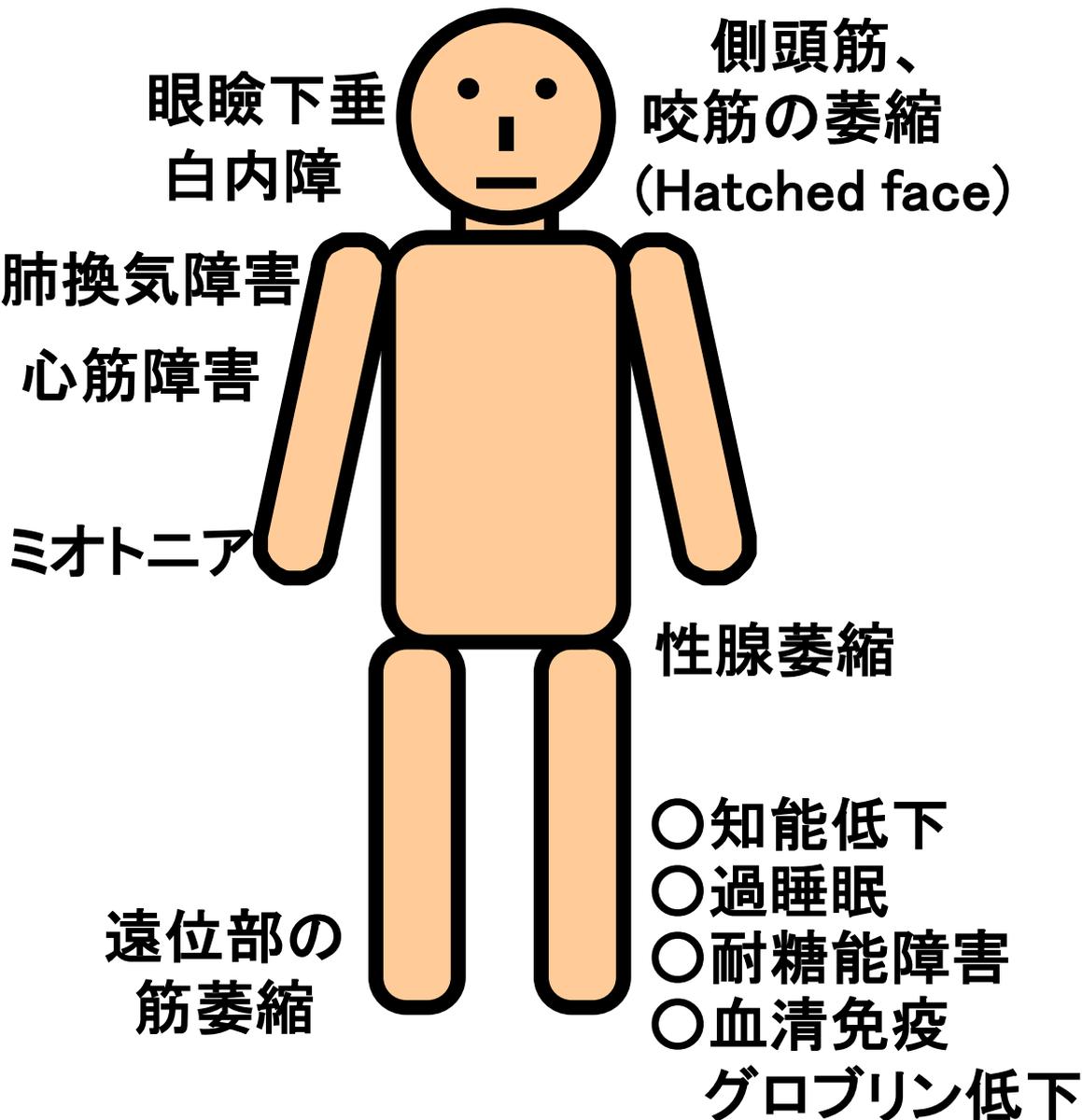


スプライシングと筋強直性ジストロフィー

石 浦 章 一

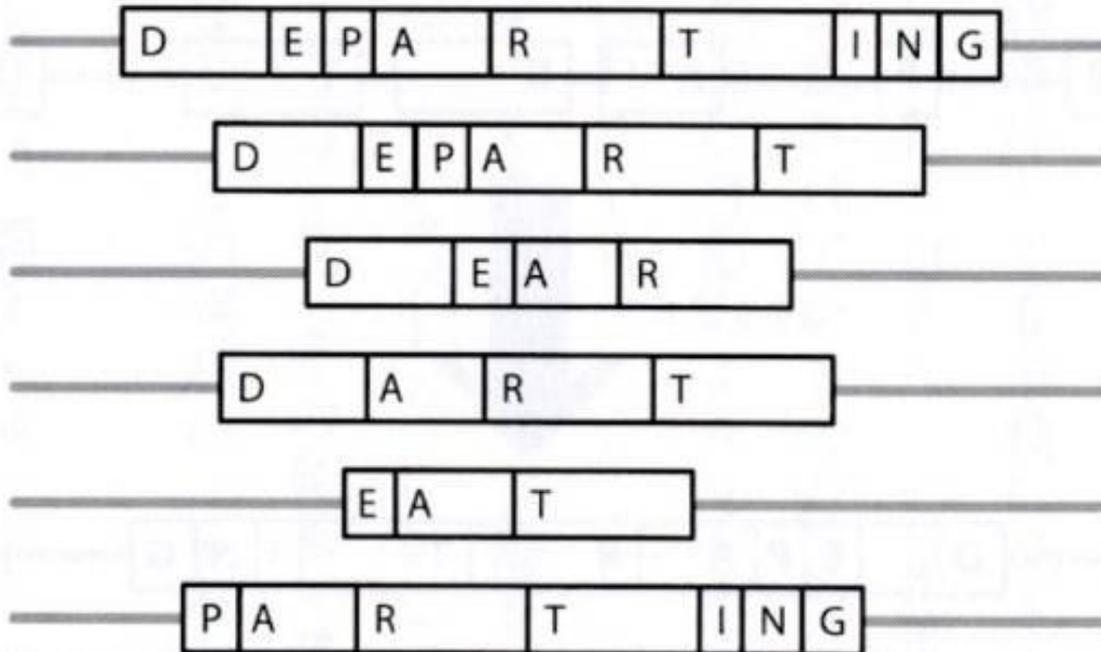
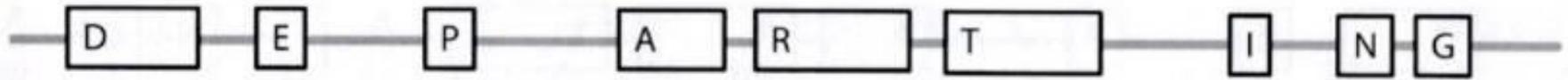
筋強直性ジストロフィー1型 (*Dystrophia Myotonica* 1: DM1)



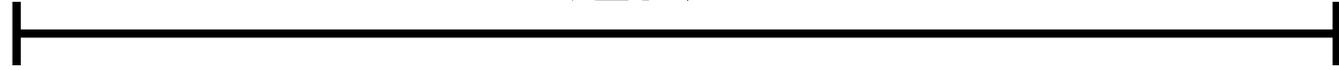
ヒトの遺伝子は約2.1万個

1つの遺伝子からいくつもの
スプライシング産物

スプライシングとは:



遺伝子



調節領域

転写領域

転写因子

エクソン

stop

DNA



イントロン

AATAAA

プレmRNA

⁷mG ppp
キャップ

AAAAA...A
ポリA

AAUAAA

mRNA

⁷mG ppp

AAAAA...A

タンパク質



筋強直性ジストロフィー1型 (DM1)



Harper, P.S. *Myotonic Dystrophy*. (1979)より引用

C.Thornton

芦澤哲夫

P.Harper

J.Gusella



Therapeutic Strategies for Myotonic Dystrophy Workshop

August 13-16, 2008

Banff, Alberta, Canada

トリプレット・リピート(三塩基繰り返し)病

ヒトDNA



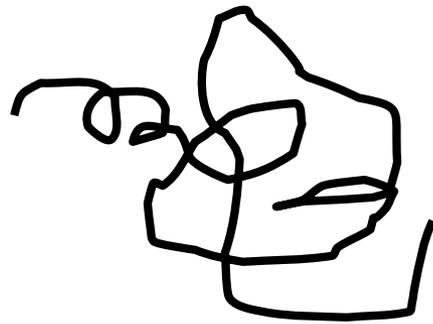
CTG/CAGリピート配列の異常伸長

・親よりも子、子より孫の症状が重く、早く発病する
(表現促進現象)

タンパク質を作らない部分(3'UTR)で
繰り返しが増えていた！

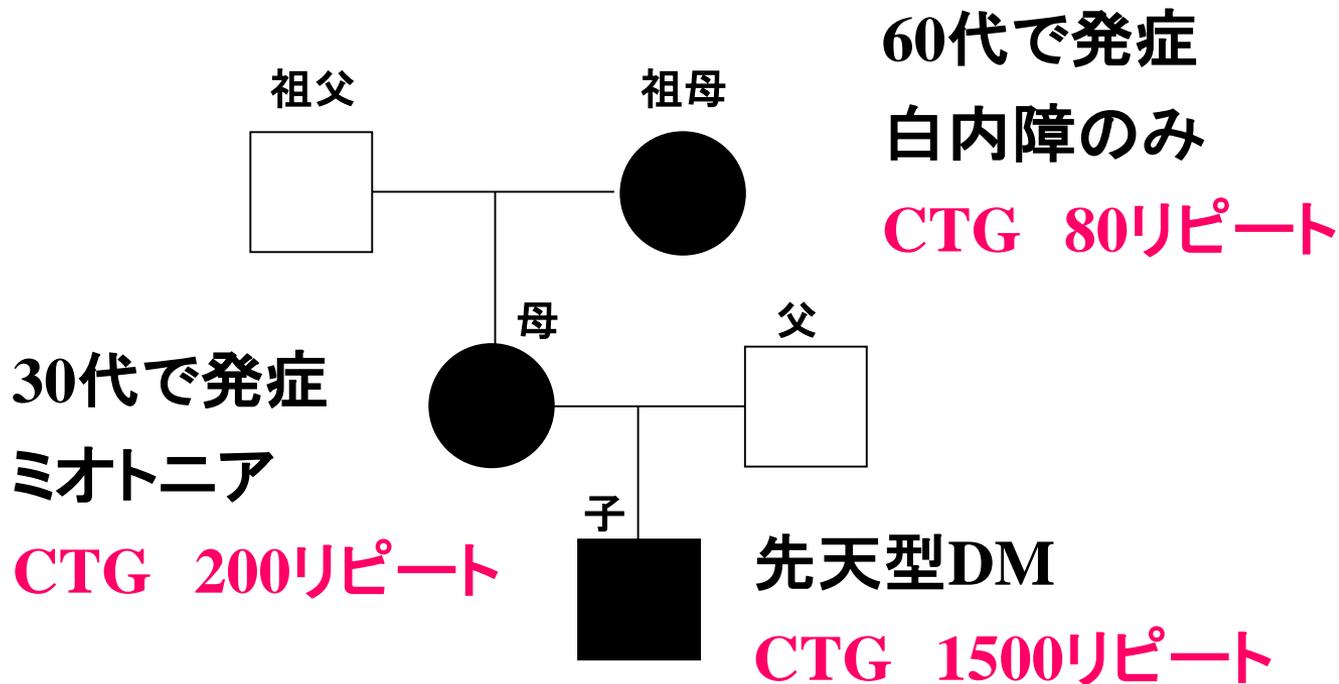
DMPK遺伝子の構造

ここが伸びている



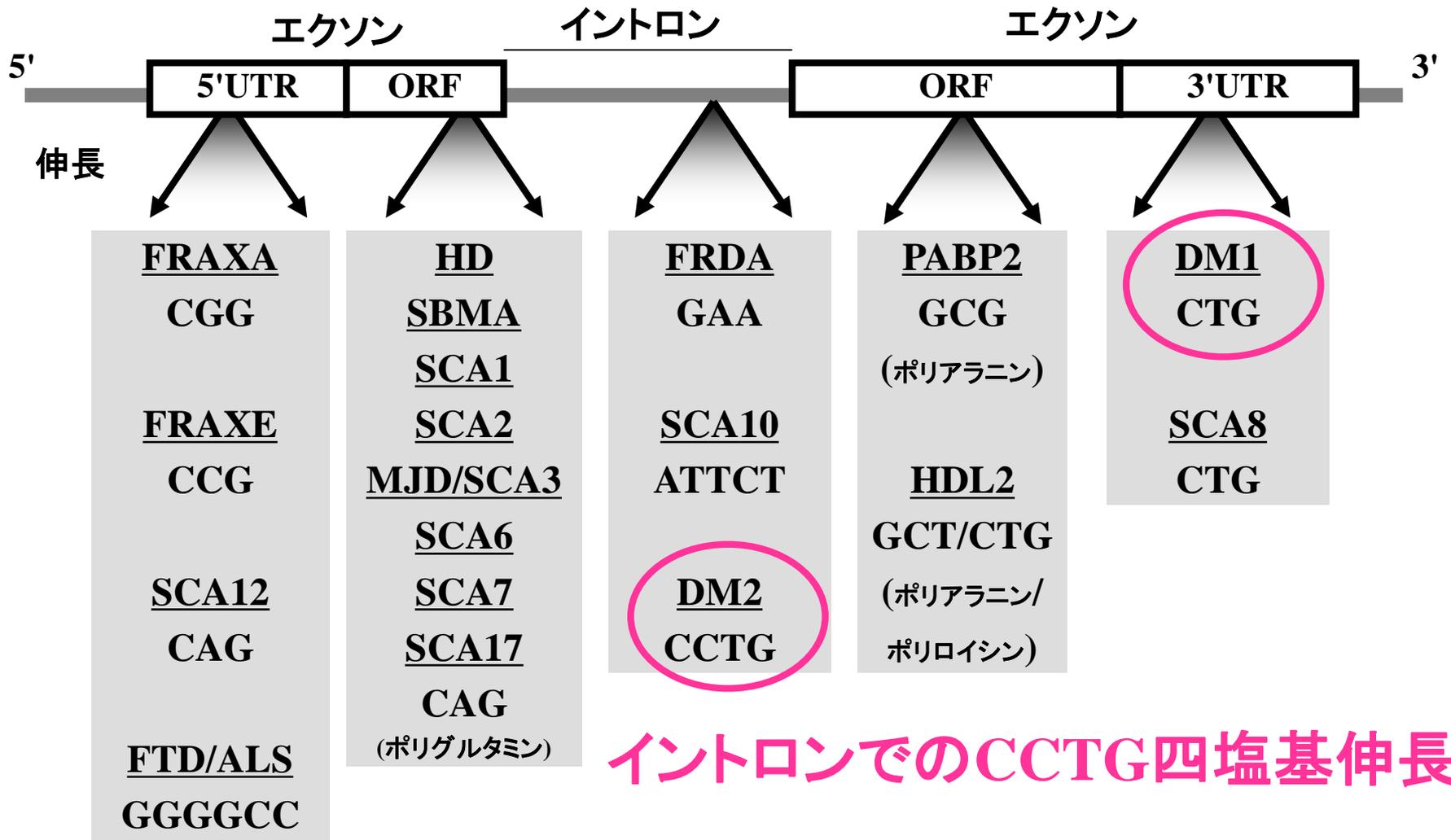
タンパク質

DM1家系における表現促進現象の例

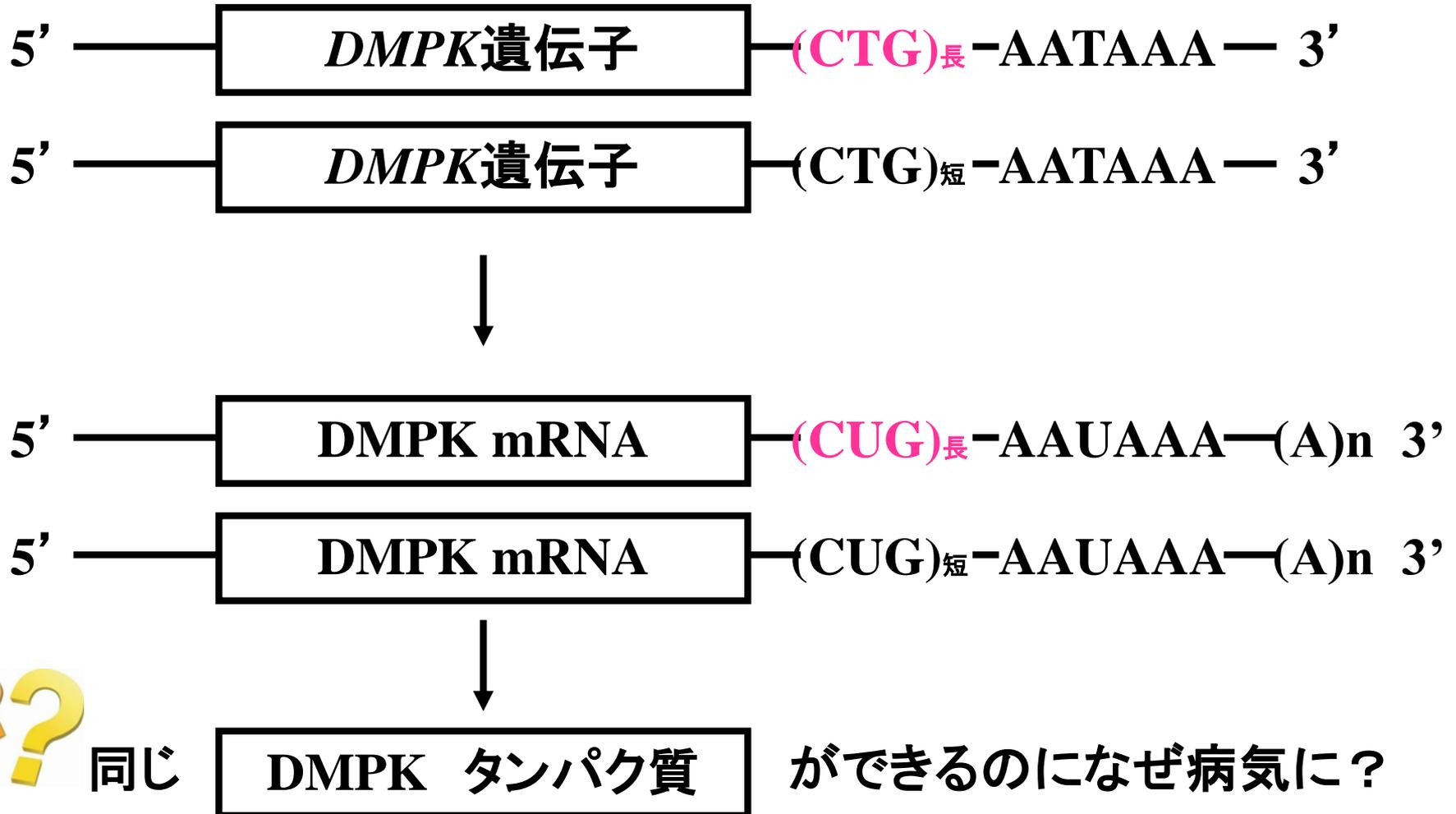


- ・白は正常(非患者)、黒が患者を示す
- ・先天型は、母親から伝わりやすい

よく似た症状のDM2も見つかった



繰り返しはタンパク質に影響しない

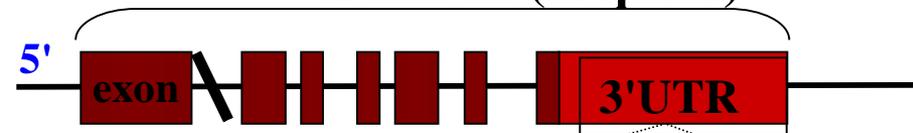


なぜ病気になるのか？

伸長したRNAに何かが結合するらしい

DM1

DMPK (19q13.3)



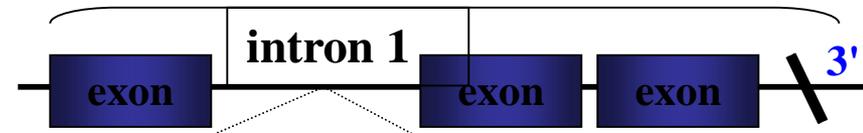
CTGリピート伸長



伸長CUGリピート

DM2

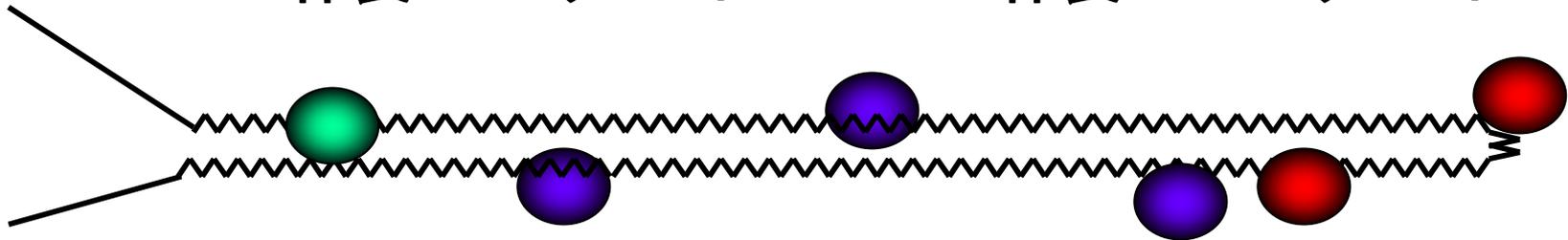
CNBP/ZNF9 (3q21)



CCTGリピート伸長



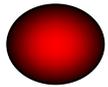
伸長CCUGリピート



→ 伸長したリピートRNAが
タンパク質を捕捉する

CUG/CCUG リピートに結合する因子！

CUG-BP (CUG repeat binding protein, CELF1)

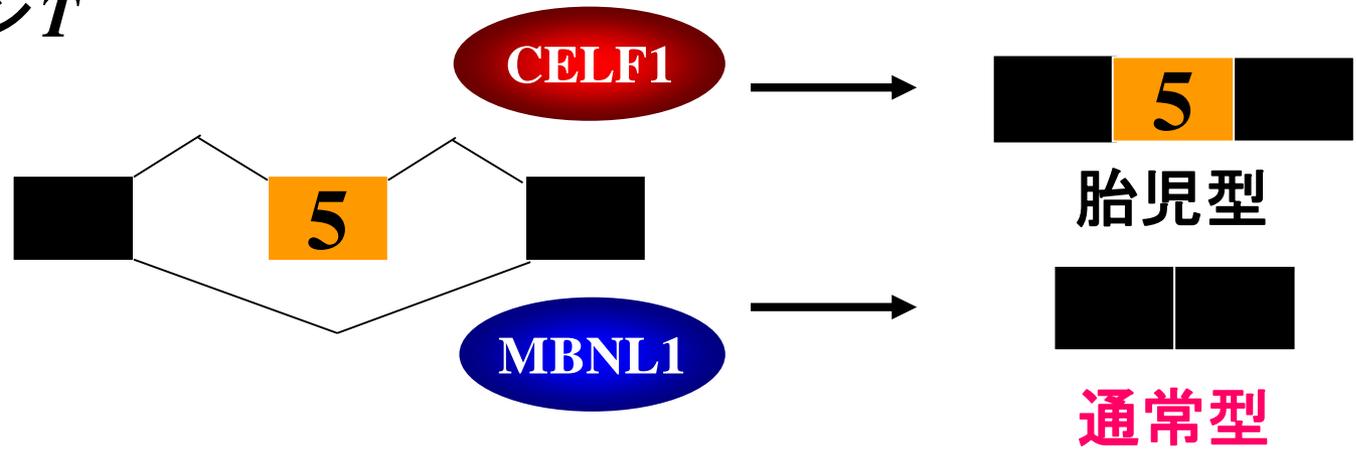


MBNL1 (*muscleblind-like*)

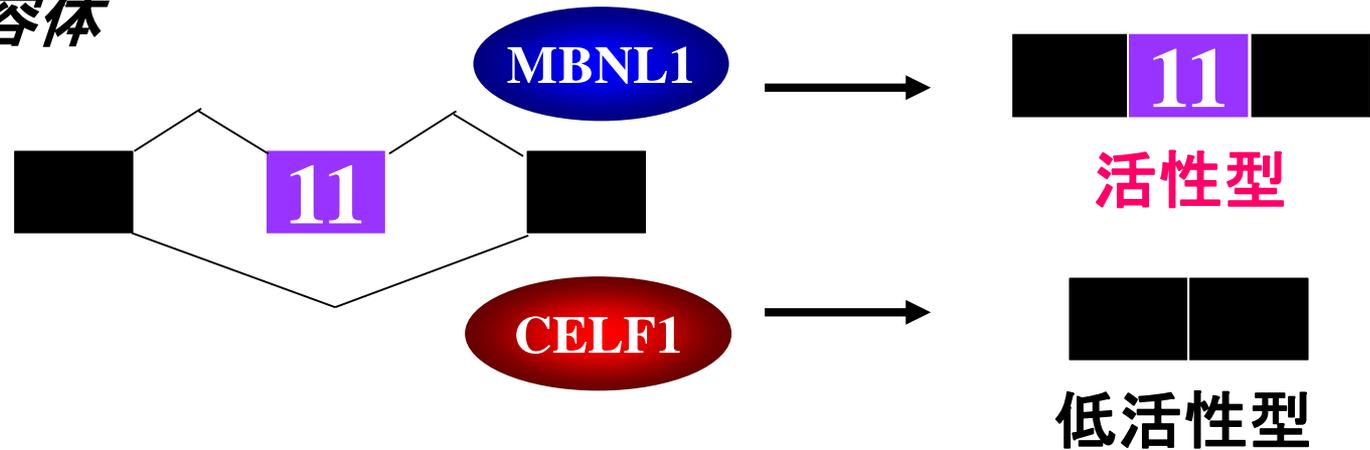
実は、スプライシングを調節する因子！

CELF1 & MBNL1によるスプライシング制御

心筋トロポニンT



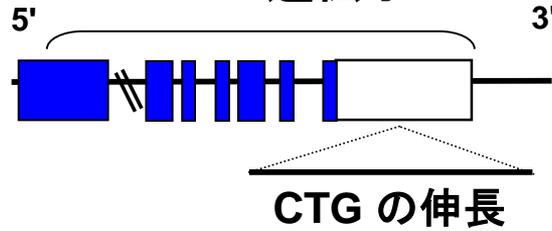
インスリン受容体



スプライシングの異常だった

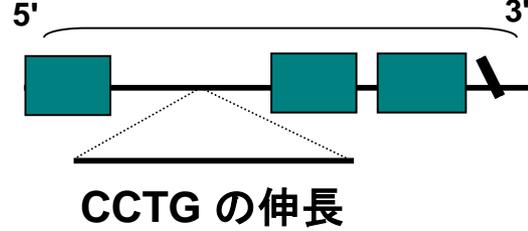
DM1型

DMPK 遺伝子



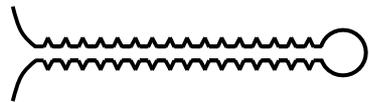
DM2型

CNBP/ZNF9 遺伝子



mRNA前駆体

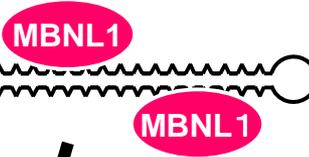
CUGが長くのびる



CCUGが長くのびる



そこにMBNL1が結合



MBNLが本来働くべき
ところで働くことができ
ない

スプライシングがおかしくなる

塩素チャンネル

インスリン受容体

いくつかの筋遺伝子

?

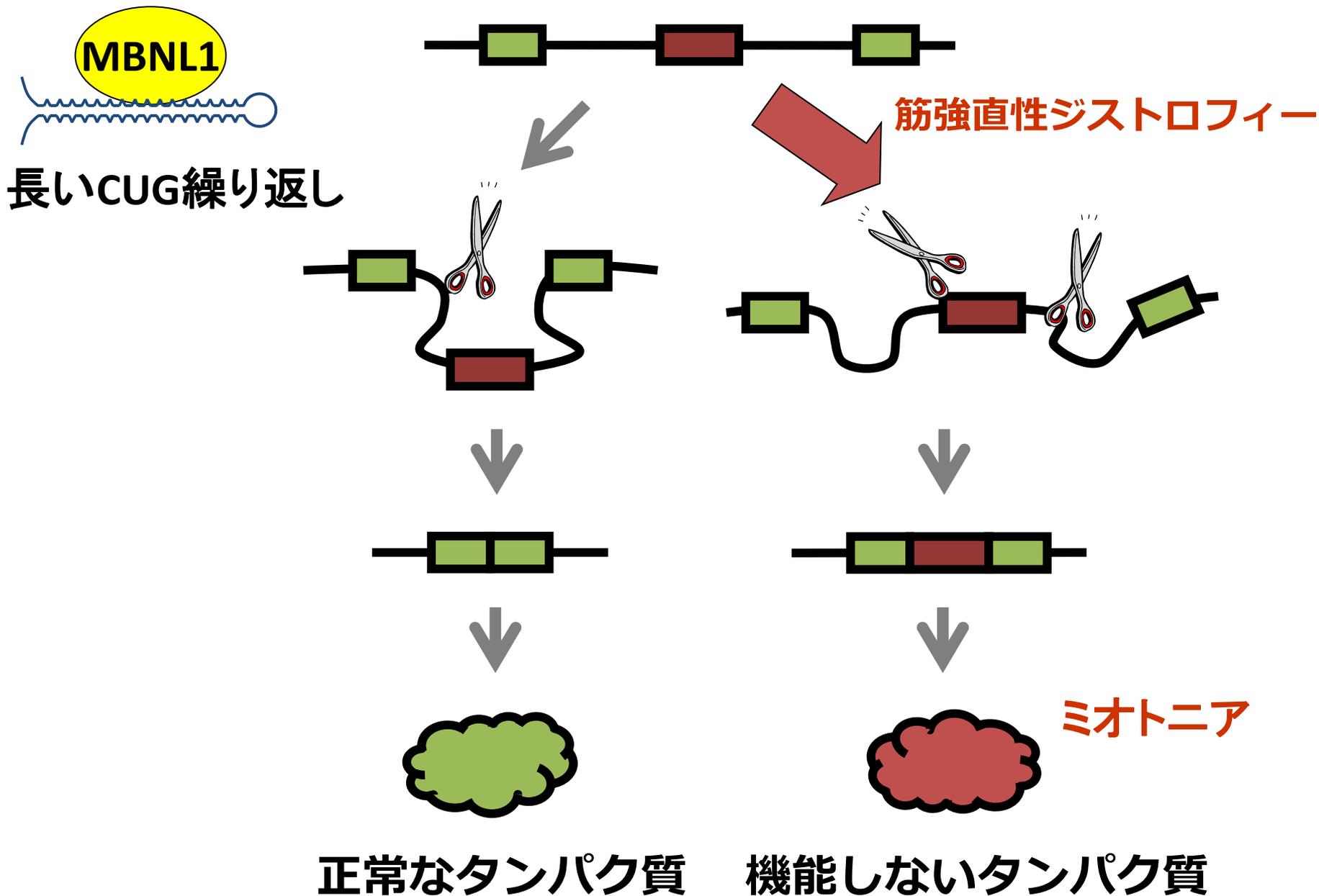
ミオトニア

インスリン耐性上昇

筋萎縮、心筋障害

白内障

塩素チャンネル(塩化物イオンチャンネル)遺伝子

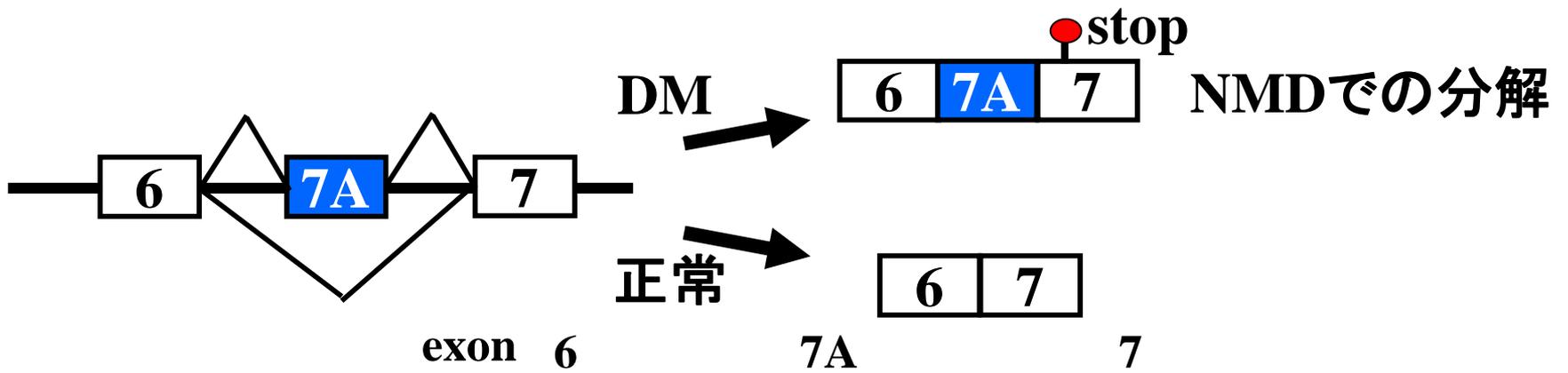


- **MBNL1(muscleblind 1)によく似たタンパク質は、ヒトで9種類ある。**

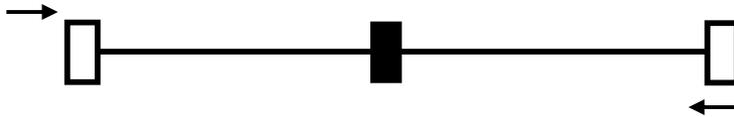
- **それが、**

MBNL1-3

CELF1-6

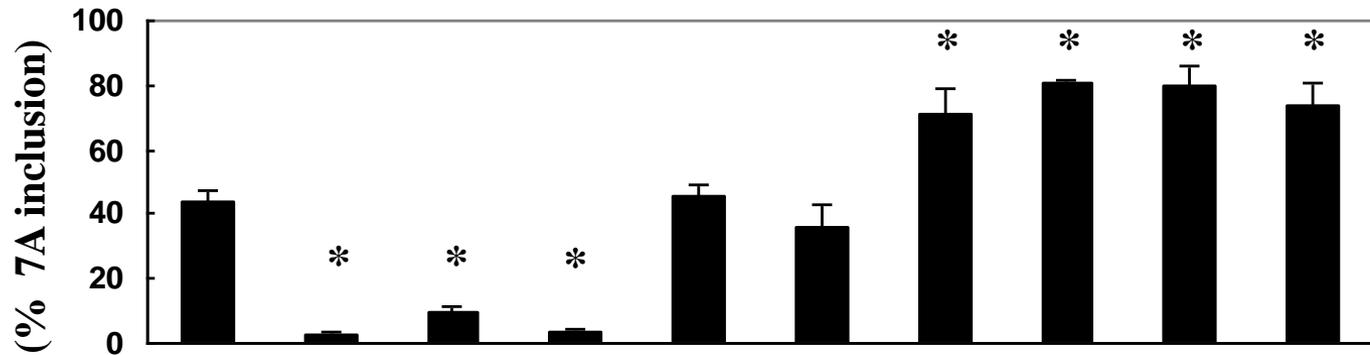
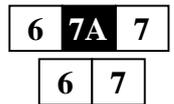
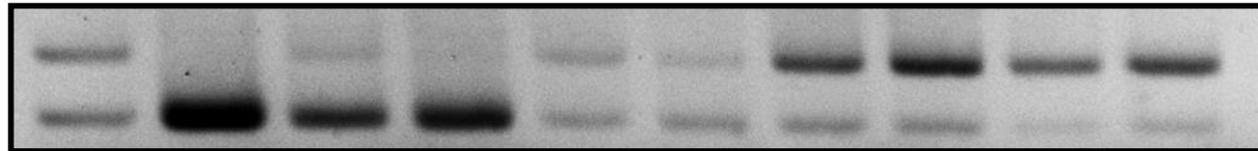


マウス *Clcn1*



Vector MBNL1 MBNL2 MBNL3 CELF1 CELF2 CELF3 CELF4 CELF5 CELF6

Clcn1



- MBNL1(muscleblind 1)によく似たタンパク質は、ヒトで9種類ある。

一番重要と考えられるMBNL1
を標的にした治療が考案された

- **それが、**

MBNL1-3 ⇒ それぞれ似た機能

CELF1-6 ⇒ それぞれ似た機能

これらは機能は似ているが、発現している臓器が違う

DMの症状はスプライシング異常で説明できる。残った問題は治療。

**1. スプライシングを変える
(アンチセンス、薬剤)**

2. 長いリピートRNAを分解する

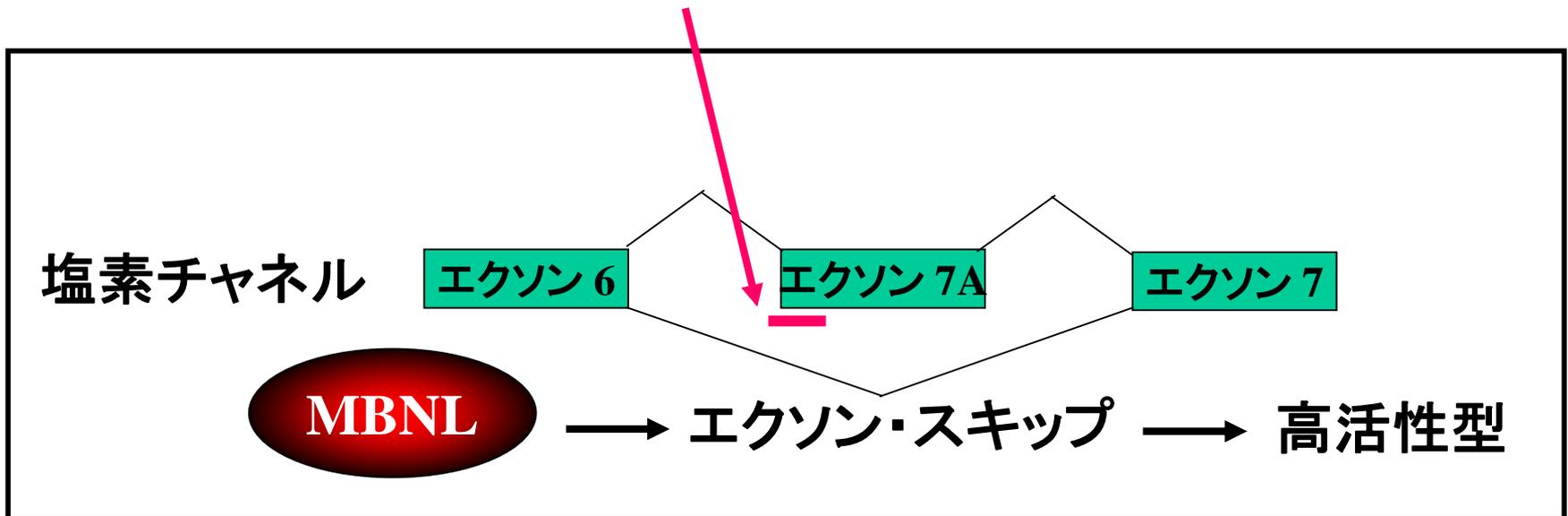
3. MBNL1を働かせる

**--- リピートRNAからはずす、
増量する**

治療の可能性(スプライシングを変える)

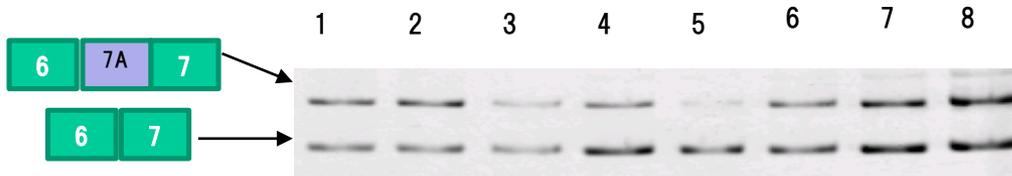
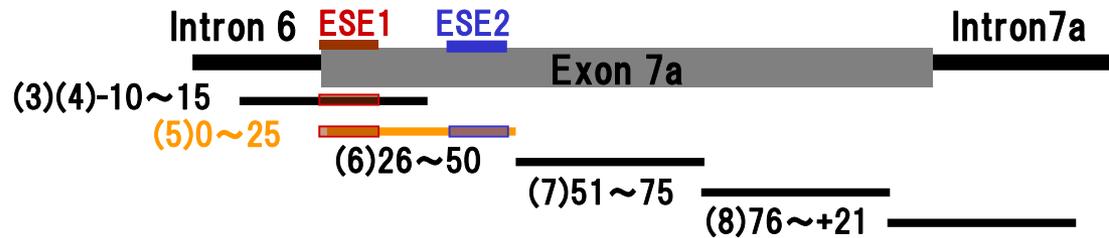
人工的にエクソン・スキップを起こす

アンチセンス・オリゴヌクレオチド

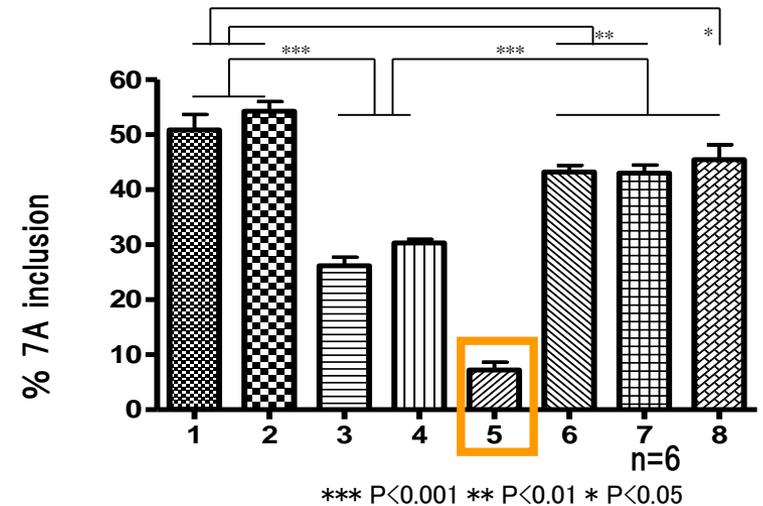


課題: アンチセンスを筋肉に効率よく導入する

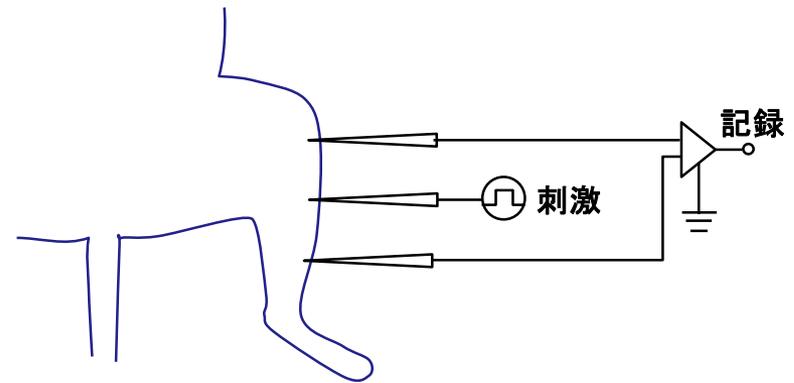
2-O-メチルアンチセンスの配列検討



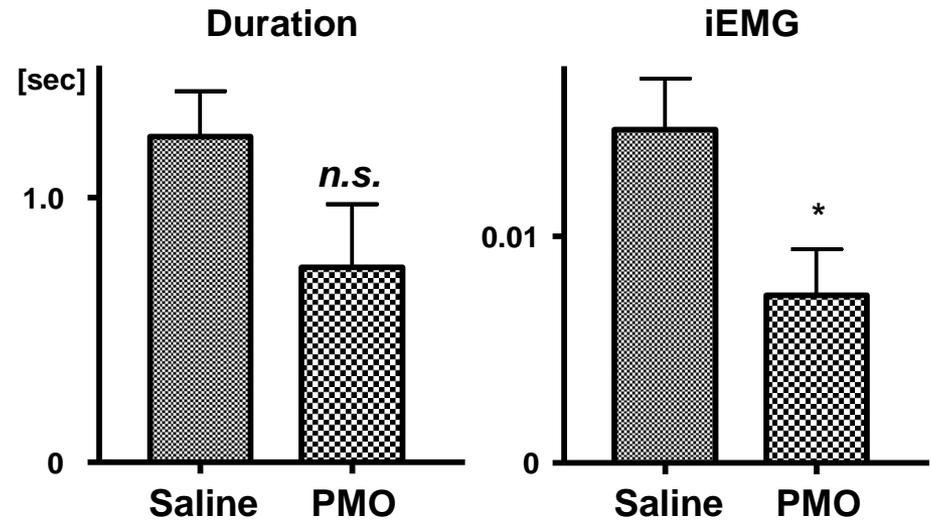
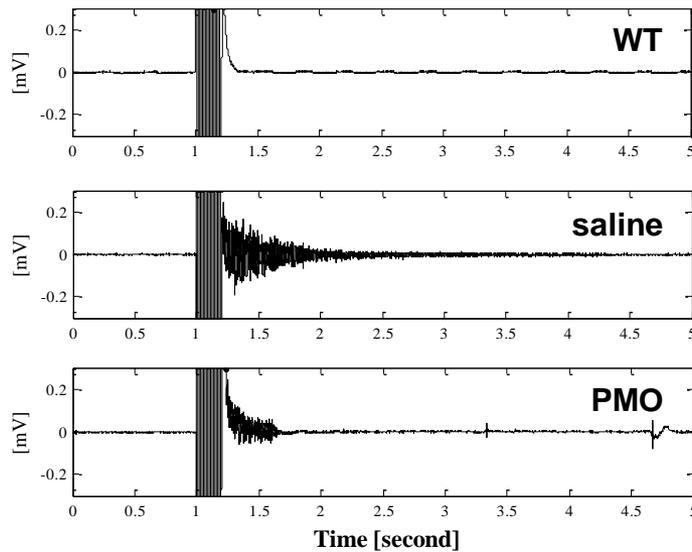
- 1 minigene only
- 2 minigene +control AON
- 3 minigene + -10 ~ 15 AON(greiner)
- 4 minigene + -10 ~ 15 AON(IDT)
- 5 minigene + 0 ~ 25 AON(IDT)
- 6 minigene + 26 ~ 50 AON(IDT)
- 7 minigene + 51 ~ 75 AON(IDT)
- 8 minigene + 76 ~+ 21 AON(IDT)



DMモデルマウスに アンチセンスPMO投与



EMG (筋電図)



選択的スプライシング、タンパク質発現、ミトニア表現型
についてPMO(モルフォリノ)による改善効果が見られた
(Koebis, Ishiura, *Sci.Rep.* 3:2242, 2013)

**この方法では、ミオトニアしか治らない。
根本治療は、どうすればいいだろうか。**

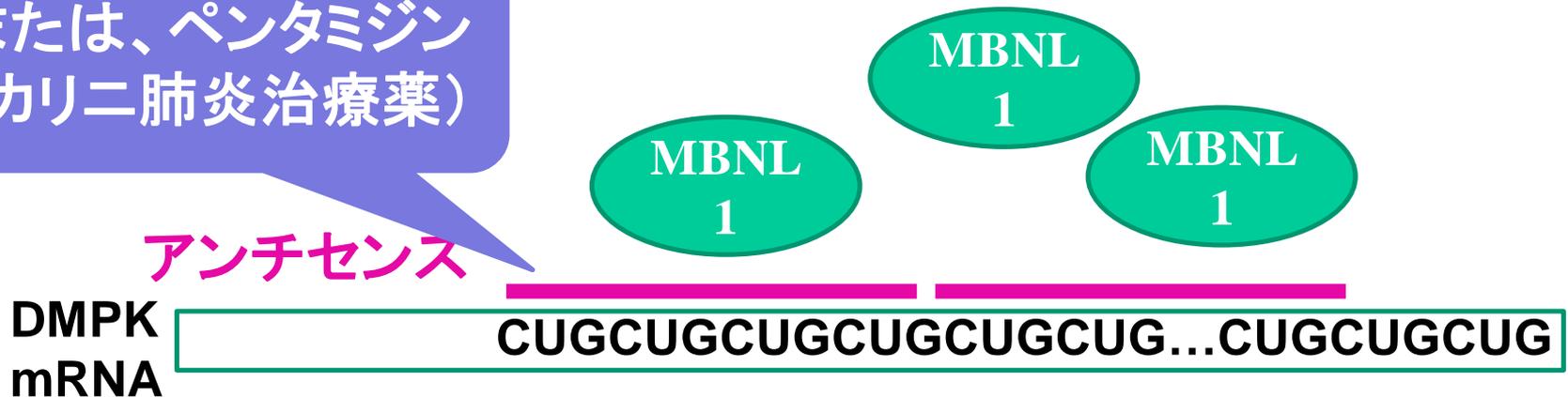
MBNL1をリピートからはずす

伸長CUGリピートRNAに対するアンチセンスオリゴによって
リピートに捕捉されたRNA結合タンパク質を解離させる



または、ペンタミジン
(カリニ肺炎治療薬)

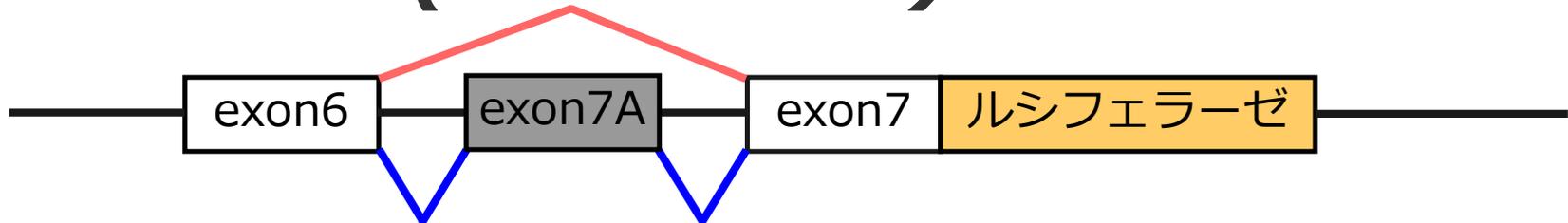
アンチセンス



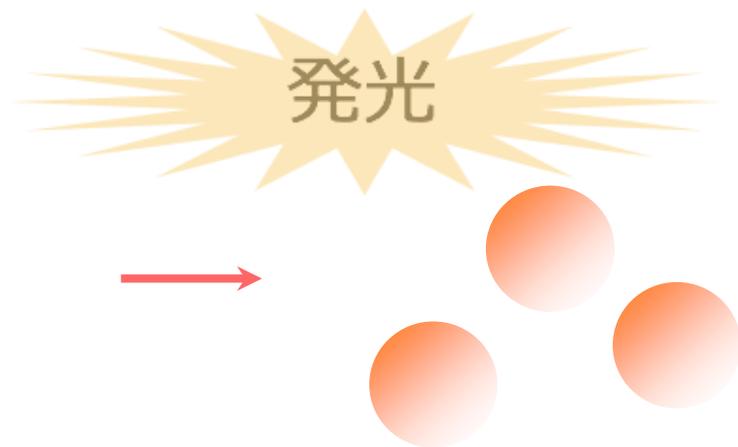
DMの症状はアンチセンスで治療可能

**筋肉への導入効率が鍵
(分子量が小さいもの)**

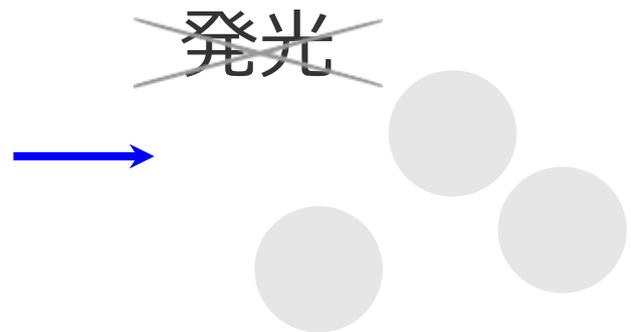
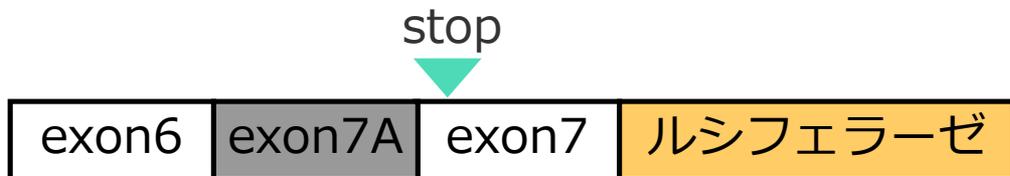
Clcn1-Luc(人工遺伝子)



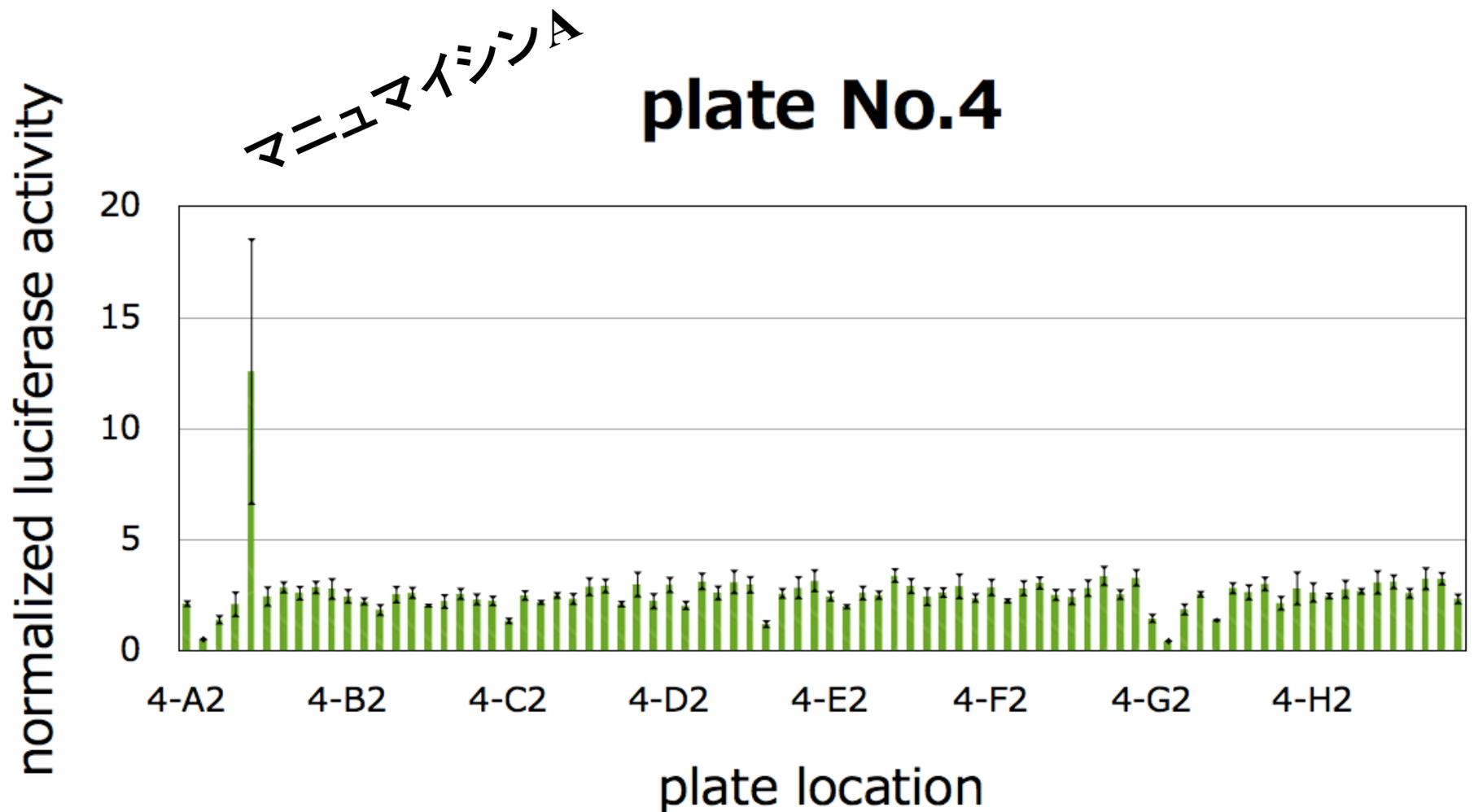
正常型スプライシング



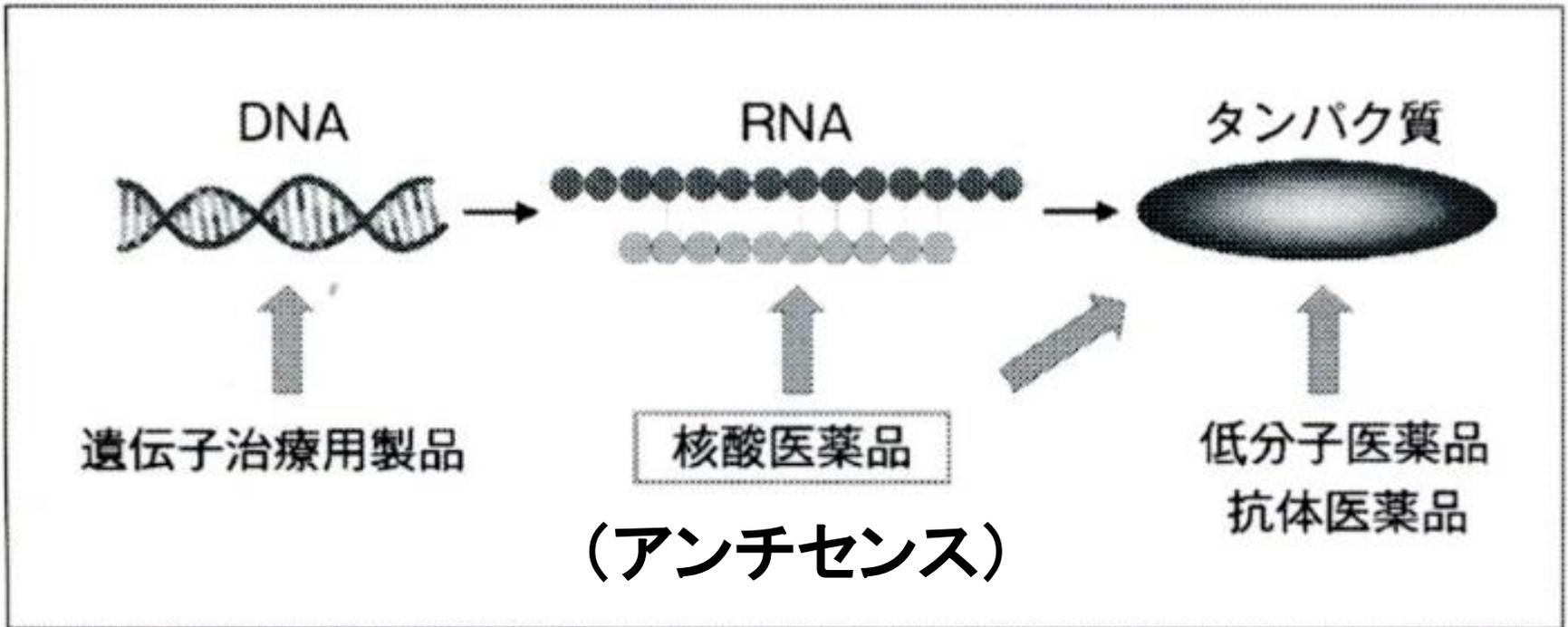
異常型スプライシング



480種類の薬剤スクリーニング結果

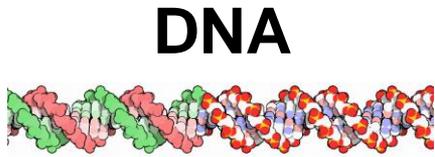


核酸医薬 --- 細胞膜を通りにくい

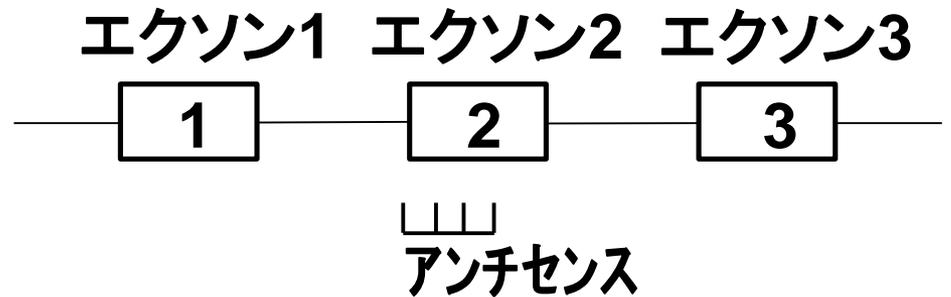
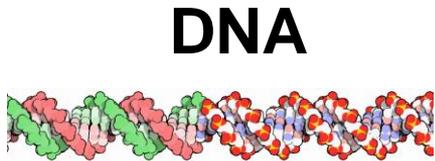


DMの症状はスプライシング異常で説明できる。残った問題は治療。

- 1. スプライシングを変える
(アンチセンス、薬剤)**
- 2. 長いリピートRNAを分解する**
- 3. MBNL1を働かせる
--- リピートからはずす、増量する**
- 4. 低分子量薬剤**
- 5. 運動プログラム**



↓ RNaseHで分解

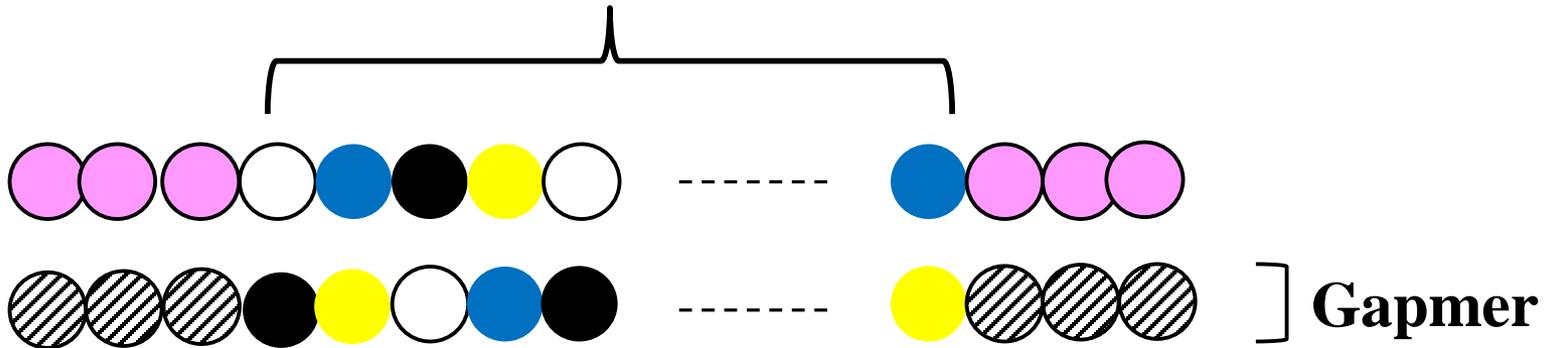


↓ スプライシング



Gapmer (RNA分解型アンチセンス)の構造

標的RNA

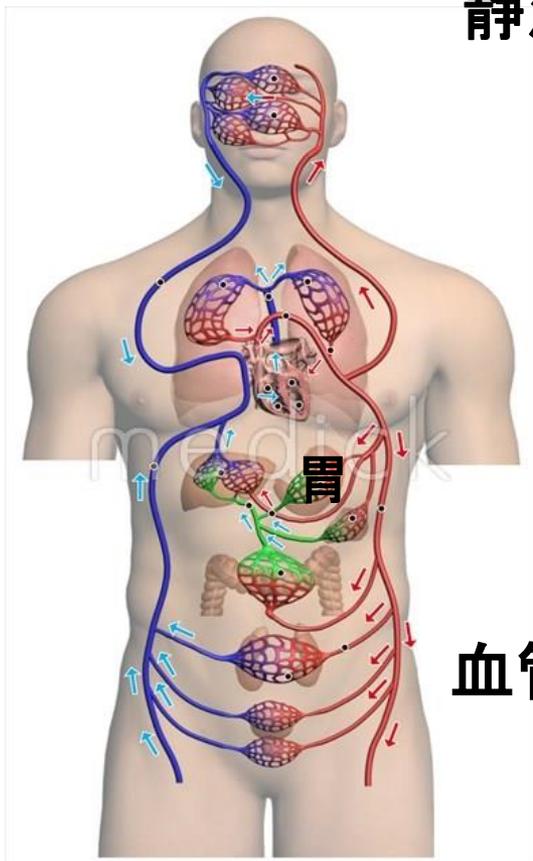


結合力が強い核酸



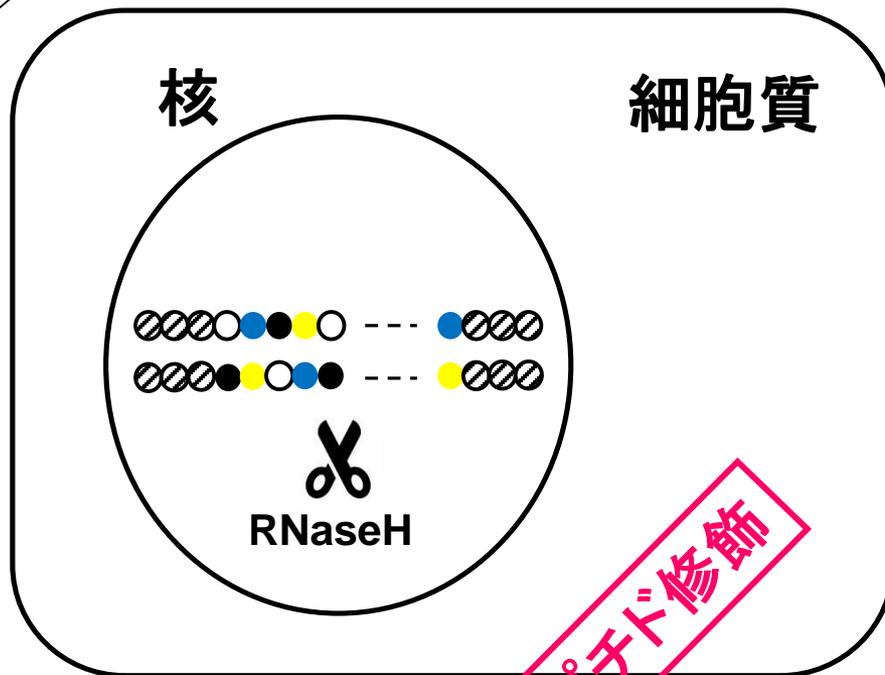
RNaseH

静注⇒臓器⇒細胞⇒核



骨格筋
心筋

骨格筋細胞



血管

低分子化合物
(分子量500以下)



アンチセンス
7,000~13,000

抗体
(150,000)

臨床試験中 (I/II)

タイドグループシブ AMO-002 (GSK3 β 阻害剤)

| Company | Drug/Approach | Status | | |
|---|--|-------------|-----------|---------|
| | | Preclinical | Phase 1/2 | Phase 3 |
|  | AMO-02 (ideglusib) small molecule inhibitor of GSK3 β | → | → | |
|  | ERK-963 | → | → | |
|  | antisense oligonucleotide | → | → | |
|  | RNA-targeted gene therapy | → | → | |
|  | antibody-oligonucleotide conjugate | → | → | |
|  | small molecule RNA inhibitor | → | → | |
|  | gene therapy | → | → | |
|  | antibody-oligonucleotide conjugate | → | → | |
|  | modular antisense peptide nucleic acid | → | → | |
|  | gene therapy | → | → | |
|  | gene editing | → | → | |
|  | WAY3 (paliperidone) histamine 3 receptor antagonist/inverse agonist for the treatment of excessive daytime sleepiness | → | → | |
|  | AT-66 AAV-antisense | → | → | |
|  | antisense oligonucleotide | → | → | |
|  | antisense oligonucleotide targeting microRNA | → | → | |

罹患筋でGSK3 β 活性上昇



AMO-002で活性を抑えると
リピートRNA低下

筋原性筋萎縮症(ミオパチー)

筋ジストロフィー

先天性ミオパチー

- ・X染色体性
(DMD,BMD)

- ・先天性
(福山型など)
- ・肢帯型

- ・FSHD
- ・遠位型

- ・DM

進行性

- ・ネマリン
ミオパチー

- ・セントラル
コア病

神経原性筋萎縮症

- ・ALS

- ・脊髄性
筋萎縮症

これからの筋疾患の根本治療

| | 特異性 | 効率 |
|-----------|-----|----|
| 1. アンチセンス | ○ | △ |
| 2. 遺伝子治療 | ○ | △ |
| 3. 低分子医薬 | △ | ○ |