

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 古戎道典

筋強直性ジストロフィー (DM) は、成人が罹患する筋ジストロフィーとしては患者数が最も多く、10 万人あたり 5-6 人の患者がいると推計されており、治療法が確立されていない遺伝性疾患である。DM の病理学的特徴として多数の選択的スプライシングが異常となることが知られており、これらのうちのいくつかは DM の症状との関連が示されている。例えば、塩化物イオンチャネル遺伝子 *CLCN1* は、エクソンの異常な挿入により転写産物が NMD によって分解され、遺伝子産物の発現量が減少するが、これにより DM の主症状であるミオトニアが生じると考えられており、こうしたスプライシング異常を改善することが DM の有効な治療法となりうると期待される。

スプライシングを制御する方法として、pre-mRNA に相補的なオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴ、AON) を用いる手法がある。人工核酸分子種のひとつである phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) は、電荷をもたず、細胞内タンパク質とほとんど相互作用をしないため、生体内で非常に安定に存在し、毒性もきわめて低く、安全な核酸医薬となりうるが、細胞の取り込み効率が低いため、PMO の使用に当たっては目的組織に効率的に輸送する薬剤デリバリー法が必要である。

血管内に超音波造影剤のマイクロバブル (バブルリポソーム) を投与し外部から超音波を照射すると、微小な泡が破裂し、そのときの衝撃によって抗がん剤などの薬剤分子を細胞に導入することができることが報告されている (バブルリポソーム法)。超音波は医療現場でも診断・治療目的で使用されており、このデリバリー法は外部から非侵襲的に薬剤の導入を促進できる利点がある。本論文は、PMO の効果的なデリバリー法としてバブルリポソームの適用可能性を検討したものである。

本論文提出者の所属研究室では、培養細胞系において、マウス *Cln1* 遺伝子のエクソン 7A の選択的スプライシングを正常化する最適な AON 配列 (+1+25) を同定していることから、本論文提出者は、DM モデルマウスである *HSA<sup>LR</sup>* マウスに +1+25 の配列をもつ PMO を、バブルリポソーム法を用いて投与し、PMO が生体内でもスプライシング異常を改善し、症状の改善を引き起こすかどうかについて検討した。また、ヒトとマウスで *CLCN1/Cln1* 遺伝子のゲノム構造が異なり、ヒト *CLCN1* 遺伝子に対して同様の戦略でスプライシングを正常化できるかどうかを検証する必要があることから、ヒト *CLCN1* のミニ遺伝子を作製して、AON によるスプライシング改善効果を調べた。

バブルリポソーム法による投与では、6 週齢の *HSA<sup>LR</sup>* マウスの前頸骨筋 (TA 筋) に、20  $\mu\text{g}$  の PMO を含む溶液または生理食塩水をバブルリポソームと混合して筋肉内投与し、1 MHz、2.0 W/cm<sup>2</sup> の超音波を経皮的に 1 分間照射した。PMO は毎週 1 回、3 週間にわたって投与し、最後の投与から 3 週間後に表現型の変化を観察した。まず、バブルリポソーム

と超音波によるデリバリー効率への影響を調べるため、バブルリポソーム、超音波それぞれを単独に用いた場合と、両方を用いた場合とで、PMOのデリバリー効率に違いがあるかを、*Cln1*の選択的スプライシングがどの程度改善するかを指標に観察した。

バブルリポソーム法により同様の投与を行った後、*Cln1*の選択的スプライシング変化をRT-PCRにより解析し、*Cln1*の遺伝子産物量の変化を抗*Cln1*抗体によるTA筋の免疫組織化学染色で観察した。また、こうした*Cln1*の選択的スプライシングにより *HSA<sup>LR</sup>*マウスのミオトニアが改善するかどうかを検証するため、TA筋の筋電図によるミオトニア検出系を確立し、ミオトニアの持続時間および総放電量を測定した。

ヒト *CLCN1* 遺伝子に対する AON の効果の検証では、ヒト *CLCN1* 遺伝子のエクソン 5 からエクソン 7 までのゲノム領域をクローニングし、ミニ遺伝子を作製した。ヒト *CLCN1* 遺伝子は、エクソン 6B と 7A が挿入されるため、それぞれのエクソンに対する AON を設計し、ミニ遺伝子とともに HEK293 細胞にトランスフェクションした。ミニ遺伝子の選択的スプライシングを RT-PCR により観察した。

その結果、マウス *Cln1* の選択的スプライシングが、バブルリポソームまたは超音波を単独で用いた場合よりも、これらを同時に用いた場合の方が、より改善する傾向が観察されたことから、アンチセンス法の治療効果をバブルリポソーム法が向上させることを初めて明らかにした。また、20  $\mu\text{g}$  の PMO を投与した *HSA<sup>LR</sup>* の TA 筋では、生理食塩水を投与したものと比較して、異常なスプライシング産物が減少し、野生型で見られるような *Cln1* タンパク質の細胞膜への局在が回復することを示した。さらに、筋電図を用いた測定により、*HSA<sup>LR</sup>* の骨格筋において、電気刺激によって誘発されたミオトニアを検出する系を確立し、PMO 投与によってミオトニアによる総放電量が減少していることを明らかにした。これらのことから、マイクロバブルと超音波によるデリバリー法により PMO を効率的に導入でき、表現型を回復できることを示した。

一方、ヒト *CLCN1* 遺伝子に対する AON の検証では、マウスで用いたものと同様、エクソン 7A の 5'端の 25 塩基に相補的な配列をもつ AON が最も効果的にスプライシングを改善し、正常なスプライシング産物の発現量を増加させることを明らかにした。これは、ヒト *CLCN1* 遺伝子に対しても AON による治療法が効果をもつ可能性を示す結果である。

以上の結果は、アンチセンス法およびバブルリポソーム法が筋強直性ジストロフィーの有効な治療法になりうることを示すものであり、したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。