

エキスパートに聞く その9



「福山型筋ジストロフィーの治療最前線」

戸田達史先生

(神戸大学大学院 医学研究科 教授)

聞き手 埜中征哉

(公益財団法人 精神・神経科学振興財団 常務理事)

福山型筋ジストロフィーの治療にエクソンスキッピング

福山型筋ジストロフィーはほとんどすべて日本人に限られ、外国では極めてまれです。先天性のお子さんでは筋肉の力が弱だけでなく、言葉の遅れなど中枢神経系の異常もみられます。この病気の遺伝子異常を見つけられたのは神戸大学大学院教授の戸田先生の研究グループです（詳しくは本財団のニュースレター No.7* を参照してください）。遺伝子の異常がわかったけれど、どうしてフクチンというタンパクに異常がきて病気になるのか、さらにどのようにしたら治療が可能になるのか、分からないことだらけでした。今回、戸田先生の研究グループは、異常なフクチンタンパクができるのはエクソンとエクソンを結び付けるスプライシングの異常であることを見つけられました。さらに、そのスプライシングの異常をエクソンスキッピングという方法で治療できる可能性を示されたのです。治療への期待が膨らんできています。内容的にはちょっと難解な部分が多いと思います。でも何回かお読みいただければ、難解なところもご理解いただけると思います。

* ニュースレターは、財団 HP (<http://www.jfnm.or.jp>) に掲載されています。

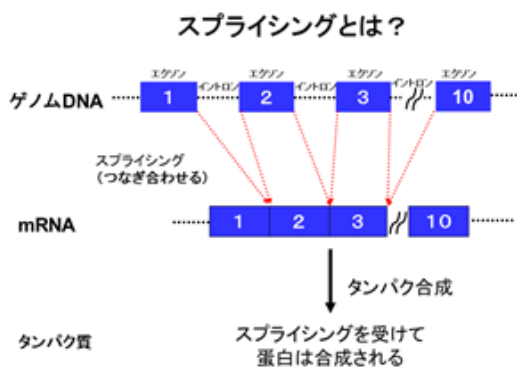


図 1

スプライシング

染色体にあるゲノム DNA は RNA にコピーされ、遺伝情報に欠かせない部分エクソンと、ほとんど必要とされない部分イントロンに分けられ、エクソンーイントロンーエクソンーイントロンと交互に配列している。フクチン遺伝子は 10 個のエクソンからなっている。ゲノム DNA を鋳型としてメッセンジャー RNA (mRNA) ができる（転写と呼ばれる）過程で、イントロンは取り除かれエクソンだけになる。このイントロンが取り除かれエクソンがつなぎあわされる過程をスプライシング (splice = つなぎ合わせる) という。mRNA からアミノ酸が読み取られる（翻訳と呼ばれる）過程を経て、フクチン蛋白質が合成される。

埜中：今日のご多忙な中、時間を割いていただきありがとうございます。今回は福山型筋ジストロフィーのことについて、遺伝子の異常を中心に話を聞きました（Newsletter 第7号）。今回は先生方の研究がさらに発展し、治療への目途がついたということで（世界一権威がある雑誌 Nature 2011年10月6日号に掲載され、テレビ報道もされました）、再度お話しをお聞きすることにしました。

先生の今回のお話しの中にはエクソンとかイントロンとか、スプライシングとか、難しい言葉が盛んにでてきます。それを理解しないと、先生のお話しを十分に理解できないので、復習をさせていただきます。まず、エクソンとイントロンについてお話いただけますか。

遺伝情報でタンパク合成に必要な場所がエクソン、不必要なところがイントロン。イントロンを切り離し、エクソンを結びつけるのがスプライシング（図1）

戸田：細胞の核の中にある遺伝子から最終的にタンパク質ができて、細胞は生き生きと活躍し、人間の生体が維持されているのです。ただ、遺伝子からすぐにタンパク質が出来るわけではなく、タンパク合成までに複雑なプロセスがあるのです。まずDNAが写しとられて、未熟なメッセンジャーRNAというか、プレメッセンジャーRNAという長いものができます。ただし、それはDNAのコピーにすぎません。次にメッセンジャーRNAがより成熟したものになるときに、未熟な不必要な部分が切り取られます。タンパクを作るのに不可欠で、成熟したメッセンジャーRNAになる部分をエクソンとよびます。エクソンの部分がアミノ酸—タンパク質を作るのに欠かせないということです。切り取られた不必要な部分はイントロンとよばれています。

埜中：DNAの中で遺伝情報を持っている一番大切なところが、エクソンですね。

戸田：大切なところというか、最終的にタンパク質を作るのに必要な部分がエクソンで、その中でタンパクを確実に作る場所は翻訳（コーディング）領域と呼ばれています。遺伝情報に必要な場所がエクソン、不必要な場所がイントロン、イントロンを取り除き、エクソンをつなぎ合わせることをスプライシング（splice=つなぎ合わせる）といいます。スプライシングには後でお話するような複雑な過程を必要とします。

埜中：イントロン、エクソン、スプライシングという言葉の意味がよく分かりました。もう一度復習なのですが、ども、フクチン遺伝子ではエクソンがいくつあって、どのような働きをしているか教えてください。

福山型の遺伝子フクチンは10個のエクソンからなる

戸田：福山型筋ジストロフィーの責任遺伝子、フクチン遺伝子というのは、第9番染色体の長腕にあります。我々健常者がもっているフクチン遺伝子は10個のエクソンからなっています。その最後のエクソン10はものすごく長くて、6000塩基もあり、エクソン2から10まででアミノ酸になる部分が、1200塩基位あるのです。

埜中：福山型の場合は、そのフクチン遺伝子に3000個の塩基（3kb）の、余計なDNAが入りこんでいるのですね。その3kbの遺伝子って人の体の外から入り込んできて、DNAの中をあちこち移動する可能性があるかと聞きました。それはフクチン遺伝子のどこに入り込んでいるのですか？

戸田：第10エクソンの後ろの方に入り込んでいます。

埜中：福山型でも、エクソン1から10まできちっと並んでいますから、正常なフクチンタンパクはできるはずですが、しかし、エクソン10の後に3kbのトランスポゾンという余計なものの挿入がある。その存在のため、なぜフクチンタンパクができなかったか、長いことわからなかったわけです。まずそれを今回あたらしく解明されたというわけですね。

戸田：1998年にフクチン遺伝子に3kbのトランスポゾンの挿入があると発表した時に、エクソン1から10までであるので、その分のRNAはできていると思っていたのです。ところが、それが出来ていない。動く遺伝子が入っているために、RNAの段階で不安定となり、RNAもできなければ、フクチンタンパクもできないと思ったのです。

埜中：3kbの余分なものが入っているということが、どうして不安定さを引き起こすのですか？



3kbのトランスポゾンの挿入がスプライシングの異常をきたし、新しいエクソン11が誕生(図2)

戸田：RNAの一番後ろは安定性に関係すると言われてたので、そこに3kbのトランスポゾンの挿入があれば、不安定になるだろうと単純に考えていたのです。

埜中：先生が今回見つけられたのは、RNAは実際には存在していたということですね。

戸田：そうなのです。RNAがあるのですけども、違うのです。

埜中：どのように違っていたのですか？

戸田：正常ではRNAは7000塩基です。3kbの挿入があると $7,000+3,000=10,000$ 塩基のRNAのはずですけども、今回初めてRNAを検出することができて、よくみたらそれは短くなっていました。正常の7000よりももっと短くなっていました。

埜中：ということは、何を意味するのですか

戸田：RNAが短くなったということは、成熟したRNAができてくる間に、どこかではぎ取られてしまったということになります。すなわち、RNAのつなぎ(スプライス)、に異常があるのではないかと、ということです。

もうちょっと詳しく言えば、フクチンタンパクのアミノ酸になる配列部分のRNAは正常な人でも患者さんでも同じ量あるのです。ところが、患者さんでは3kbの挿入が入っている前位に到達すると、RNAは全然作られなくなる。さらに挿入部の後ろになったら、またRNAが復活したのです。RNAが一度ストップして、また復活したということは、RNAが一度途切れて、またつながったということです。

埜中：そこをもう少し詳しくお話をください。

戸田：エクソン10には、次のRNAと結びつく場所(スプライスサイトといいます)が配列上にあるわけです。持っているけども、スプライスサイトが2個揃わないと

エクソン10の切り取りは起きないのです。健常人ではエクソン10のスプライスサイトは1ヶ所なのでなにも起こりません。エクソン10はそのままです。ところが、3kbの挿入遺伝子がスプライスサイトをもっている。そのために、いままで眠っていたエクソン10のスプライスサイトも目覚めて、エクソン10のスプライスサイトと挿入遺伝子が新しい結合を作るのです。すなわち、エクソン10の途中までいって、RNAがいきなり切り取られて、動く遺伝子の中に入り込んでしまう。

埜中：そうすると、その結果として、エクソン10のところに、さらに挿入遺伝子が入り込んだので、余分なエクソン11が出てきたということになるのです。

戸田：そうですね。

治療は新しく出来た余分なエクソン11をアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて取り除く

埜中：そうすると、エクソン11は余分です。それを先生方は取り除けば福山型は治療ができると考えた。それを実験して成功されたわけですね。では余分なエクソンを取り除くにはどういう方法があるのですか？

戸田：取り除くというか、余分なものの切り取りというか、そのことについてお話ししましょう。福山型ではエクソン10と動く遺伝子の間にスプライシングが起きるので、それを起こさないようにすることが必要です。スプライシングにはエクソンとエクソンを結び付ける特別な配列というのが必要なのです。それはイントロンの中にあることもあるし、エクソン内にあることもあります。スプライシングの起きる場所(スプライスサイト)が分かって、その配列が分かったとします。スプライシングを起こさないようにするには、簡単に言えばスプライスサイトに蓋をすればよいのです。スプライシングの配列と逆向きな(相補的な)核酸(アンチセンスオリゴ

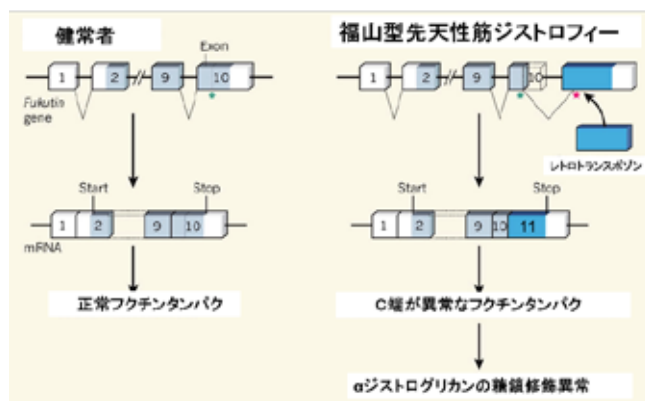


図2 健常人ではフクチン遺伝子のエクソン2の途中からタンパク合成が始まり(start)、エクソン10の途中で終わり(stop)、フクチンタンパクが合成される。星印は健常では機能していない(眠れる)スプライスサイト。

福山型では3kbのレトロトランスポゾンがあるので、機能していないスプライスサイト(星印)が働き、エクソン11が出来る。タンパク合成はエクソン2の途中から始まり、エクソン11で終わる。C端(右端)のフクチンは異常で、フクチンタンパクの重要な働きである糖鎖をつくることができない。

ヌクレオチドといいます)を人工的に作って、加えればスプライシングは起こらず、標的となるエクソンのスプライシングは無視されて、エクソンはそのまま残ります。現在、デュシェンヌ型筋ジストロフィーでエクソンスキッピング治療というのが実用化されようとしています。それも取り除きたいエクソンのスプライスサイトに人工的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを作って働かせているのです。

梶中:では、先生たちはどのようにしてアンチセンスオリゴヌクレオチドを作られたのですか?やみくもにというわけにはいかなかったと思います。

戸田:アンチセンス AED 療法と名づけましょうか。それには、うちの池田真理子特命助教、小林千浩准教授達がアイデアを出して頑張ってくれたのです。

今、たとえに出てきた切り取りが起こる場所(スプライスサイト)には、まずはどのようにして蓋をするか、連結しやすい場所もどのようにして蓋をするか決めました。それ以外に、スプライスを促進させる配列も分かっているので、そういうところを選んで、いくつものアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製しました。各場所に5種類くらいずつ作って、トータルで15から20個くらい作ったのです。それを1個ずつやってもいいし、さらには混ぜてやってもいいし、とにかく効果があるかどうか試してみたのです。

梶中:先生方はそのアンチセンスオリゴヌクレオチドにAとか、Eとか、Dとか、番号をつけられていますね。

戸田:Aの中にもA1からA5までであるのです。Aはアクセプター、Dはドナー、Eはエンハンサーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドです。先ほどお話したようにAではA1からA5まであってEでも4種類くらい。それを組み合わせたら、A3、E3、D5のミックスが一番効率的だったのです。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、モデルマウスにフクチンタンパクが発現

梶中:先生はそのアンチセンスオリゴヌクレオチド AED をモデルマウスに局所注射をし、さらに静脈注射でも試され、フクチンタンパクが発現してきて治療効果があったと発表されました。では、AED を人に与えたらすぐに治療できるのではないかと単純に考えたくりますが、それは無理なのですか?

戸田:このアンチセンスオリゴヌクレオチド AED をマウスのモデルに局所注射をし、静脈注射もしました。さ

らに人の患者さんからの細胞を培養して、その培養液に AED を加えました。すると、フクチンのタンパクが回復し、フクチンタンパクについている糖鎖も出現して(福山型ではジストログリカンというタンパクについている糖鎖が欠損しています。それが筋細胞の破壊に結びつくと考えられています)、フクチンの機能も回復してきました。以上の結果をみれば、分子標的というかターゲットを縛った治療ができるのではないかと、期待できるわけです。

臨床応用には安全性確認の壁がある

戸田:AED を使えばなんとなくうまくいきそうだという感触はあります。しかしまず人の薬の開発には、安全性試験というか、毒性検査をやらなきゃいけないし、どのくらいの量が適量かの用量試験もしなければなりません。単純に、マウスに使った量と比較はできないのです。さらに人に応用する前には、大型のサルとかで安全性試験もやらなきゃいけない。人への応用はそう単純ではないのです。

マウスには AED の3つだったけど、医薬品になるとすると3種類の承認が必要になるでしょう。2種類でできないかとか、ほかにもっといい配列がないかとか、そっちの方もやらなきゃいけない。この A3、E3、D5 の配列をそのまま人に応用するにはまだまだ乗り越えなければならぬ壁があるのです。

梶中:たとえば、アクセプターサイトだけの A3 だけでは、効果は期待できないのでしょうか。

戸田:単独だといまいちでしょうね。やっぱり2個は必要でしょう。

梶中:まだ、いろいろと解決すべき研究は必要でしょうが、理論的には治療が可能になる見通しがでてきた。そしたら患者さんたちは、いったいつ頃できるのかとか、その間のステップで何が問題かなどをお知りになりたいと思うのです。

まず安全性ですが、先生が使われた AED ではマウスは元気なのですか?

戸田:すぐには死ななかったけれど毒性はありました。マウスに使ったビボモルフォリノ、これは人には使えません。普通のモルフォリノじゃないとだめです。すると複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを作るのには限界があります。

梶中:先生が使われた福山型のモデルマウスはヒト福山型と症状が大きく違うことも治療実験に差しさわりがありませんか。

福山型筋ジストロフィーの治療法が開発され、患者さん家族のQOL(生活の質)が改善されればと思っています。

戸田達史 先生



戸田: そのとおりで、福山型マウスは、ヒト福山型とちょっと違うんですね。動く遺伝子が入っても筋肉は意外と正常に近いのです。ただし、ジストログリカンの糖鎖形成は悪いので、モデル動物としての価値は十分あると思います。ただ筋肉は正常ですね。

埜中: 症状がないので、治療実験での限界はありますね。

戸田: 筋力が増えたとか、そこの効果をみるのは難しい。福山型マウスというのは、自然発症ではないのです。自然発症のものがあったとしても、育てるのは不可能ではないでしょうか。

埜中: 人間だから、重症だったら人工呼吸器をつけたりするけれど、マウスだったら、そういうわけにいかないで死亡してしまうでしょうね。よいモデル動物が欲しいですね。

戸田: 福山型の犬でもいればいいのですが、マウスから人に直接いかざるを得ないので、安全性とか、用量などを決めるのが難しいと思うのです。

埜中: 先生の研究を発表した新聞やテレビでは数年後には人に応用できるとのことですが、いかがですか。

戸田: 大事なのは、GMP基準に達するように医薬品として使える安全性が担保されること、大量生産でき、比較的安価で使用できるようになることだと思うのです。希少疾患ですから、製薬会社が開発に協力して下さるようなところがあるかどうか分かりません。開発には莫大なお金がかかると思います。

埜中: それと、よく聞かれるのは、この治療というのは、あくまでも筋肉が主目的で、中枢神経系にはあまり影響はないのかと言われるのですよ。中枢神経系の改善ということは望めないですか。

戸田: その点に関しては2ポイントあって、まずモルフォリノ自身が脳にあまり入らないのです。脳に入りやすいようなアンチセンス核酸の開発研究をしないといけないのではないかというのが一つです。もう1つのポイントは、福山の脳の障害というのは、実は胎児期というか、

お腹の中にいるときにすでに起きてると言われてるんです。だから胎盤を通して治療できるかという、技術的な問題もあるし、さらに倫理的問題もあると思うんです。そういう意味では脳には難しいと思います。ただ、お母さんとかご家族とかみなさんが一番困っていらっしゃるの、動けないということではないでしょうか。夜中に何回も起きて体位交換もしなくちゃいけないし、まず動けないというのが一番困るので、そこをまず改善してあげるのが第一だと思っています。動けるようになれば、視野も広がるし、二次的に脳の機能改善に結びつくと思います。

埜中: いずれにしても、先生方のご研究で、福山型の原因がわかり、さらに治療開発への希望が出てきたことは素晴らしいことだと思います。先生方の研究のさらなる発展を期待して本日の“エキスパートに聞く”を閉じたいと思います。戸田先生、お忙しい中、本当にありがとうございました。

収録 2012年1月13日

