

博士論文

論文題目 筋強直性ジストロフィーモデルマウスの
新規治療法に関する研究

氏 名 古戎 道典

目次

略語	3
第1章 序論	5
第2章 材料と方法	15
第3章 結果	24
第4章 考察	37
第5章 参考文献	45
謝辞	52

略語

2OMePS	2'-O-methylated ribonucleotides with phosphorothioate linkage
BIN1	bridging integrator 1
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CELF	CUGBP, Elav-like family
CLCN1	chloride channel 1
CNBP	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
DM	myotonic dystrophy/dystrophia myotonica
DMD	dystrophin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase
DNA	deoxyribonucleotide
DPPC	1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSPE	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESE	exonic splicing enhancer
FBS	fetal bovine serum
Fw	forward
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
iEMG	integrated electromyography
IgG	immunoglobulin G
INSR	insulin receptor
KO	knockout
Ldb3	LIM domain binding 3
MBNL	muscleblind-like
mRNA	messenger RNA
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
nt	nucleotides

PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PMO	phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide
QOL	quality of life
RNA	ribonuclease
RT	reverse transcription
Rv	reverse
RyR1	ryanodine receptor 1
Serca1	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1
UTR	untranslated region
ZNF9	zinc finger protein 9

第 1 章 序論

1.1 はじめに

遺伝性筋疾患のひとつである筋強直性ジストロフィーは、根本的な治療法が存在しない難病である。本研究の目的は、アンチセンスオリゴを用いた筋強直性ジストロフィーの効果的な治療法の開発である。本章では、筋強直性ジストロフィーの病態および発症機構の概略について説明する。

1.2 筋強直性ジストロフィー

筋強直性ジストロフィーは、常染色体性優性遺伝疾患で、筋ジストロフィーの中では成人の患者数が最も多いタイプである。ラテン語の疾患名 *Dystrophia Myotonica* の頭文字をとって DM と称されるため、本稿でも以降 DM と略すことにする。DM の発生率（生涯有病率）は少なくとも 7500 人に 1 人と推定されているが (1)、軽度の患者は症状に自覚がなく診断が難しいため、実際の発生率はこれより高いと考えられる。全世界では現在のところ 10 万人あたり 5~6 人の患者がいると言われている。

DM は、進行性の筋萎縮・筋力低下とミオトニア（筋強直）を呈することからこの名がつけられたが、その他にも全身の多様な臓器に症状を呈することが DM の大きな特徴である (2)。具体的には、精神遅滞、無気力・無関心、日中過眠などの中枢神経系の障害、糖尿病、精巣萎縮などの内分泌器官の異常、白内障、心伝導障害・不整脈、腹痛などが挙げられる。また、これらの症状のうち、どの症状が顕著に表れるかということや、症状の程度、発症年齢に個人差が大きいのも、DM の特徴である。

DM は、ゲノム上の単純なリピート配列が異常に伸長することによって発症し、原因となるリピートによって、DM1 と DM2 に分類される (図 1-1 A)。DM1 は、*DMPK* 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に存在する CTG リピートが伸長して発症する (1, 3-5)。リピート数は、健常者では 5~37 回であるが、DM1 患者では 50 回以上の繰り返しが見られる。リピートの長さは患者の症状の程度や発症年齢と相関が見られ、リピートが長いほど発症年齢が早まり症状が重篤になる傾向がある。また、同一家系内で世代を経るごとにリピート数が増え、症状が重くなるという表現促進現象が認められる。先天的に筋力低下などの症状を示す患者の多くは、1000 回以上の長いリピートをもっている。一方、DM2 は *CNBP/ZNF9* 遺伝子のイントロン 1 に存在する CCTG リピートが伸長して発症する (6)。患者で見られるリピート数は、75~11,000 回と多いが、概して DM1 よりも症状は軽度で、先天性の患者

も見られない。

1.3 RNA 機能獲得仮説

このように、DM は 3'UTR もしくはイントロンのリピートが伸長することで発症するのだが、非翻訳領域のリピートの伸長がどのように DM の発症に結びつくのかというのは未だに議論のあるテーマである。しかしながら、リピートの伸長によって、リピートから転写された RNA が何らかの機能を獲得し、DM を発症させているのは間違いなさそうである (7)。「RNA 機能獲得仮説」と呼ばれるこの見方は、3'UTR に(CTG)₂₅₀ リピートをもつヒト骨格筋アクチン遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスによって裏付けられた (8, 9)。このマウスは、*DMPK* や *CNBP* とは全く関連のない遺伝子上にリピートをもつにも関わらず、ミオトニアなどの DM 様の症状を再現したのである。

興味深いことに、DM 患者細胞においては伸長した CUG/CCUG リピート RNA が核内で凝集体を形成している様子が確認される (10, 11)。さらに、この凝集体には RNA 結合タンパク質である MBNL ファミリーが共局在しており (12)、伸長した CUG/CCUG リピート RNA が獲得した「機能」とは、MBNL ファミリーの捕捉と機能阻害ではないかと考えられている (図 1-1 B)。実際、*Mbnl1* や *Mbnl2* のノックアウト (KO) マウスがミオトニアなど DM の症状を再現することから、CUG/CCUG リピート RNA による MBNL ファミリーの機能阻害が少なくとも一部の症状を引き起こしているらしい (13, 14)。一方で、DM1 患者細胞では、CUG リピート RNA により、別の RNA 結合タンパク質である CELF1 の活性化が引き起こされているという報告もあり、さまざまな RNA 結合タンパク質の挙動の異常が DM 発症の原因とされている (15)。

1.4 DM における選択的スプライシング異常

MBNL ファミリーは骨格筋、心筋や脳において発生に伴う選択的スプライシングの制御に関与することが示されているが (16-18)、これと一致するように、DM 患者では、選択的スプライシングが胎児型から成人型へ完全に移行しないという異常が多数見つかっている (図 1-1 C)。すでに 40 以上の遺伝子でそうした異常が見られることが明らかにされており、そのうちのいくつかは症状との関連が指摘されている (表 1-1)。

例えば、DM の特徴的な症状であるミオトニアは、塩化物イオンチャンネルをコードする *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシング異常により引き起こされると考えられている (図 1-2) (19)。DM 患者の骨格筋では、*CLCN1* 遺伝子のエクソン 6B、エクソン 7A の挿入率が上昇

するなどの選択的スプライシング異常が見られるが、こうした異常は、フレームシフトにより停止コドンを生じさせてしまうため、転写産物が nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって分解されてしまう。したがって、この選択的スプライシング異常が *CLCN1* の発現量の低下を招くと考えられる。*CLCN1* 遺伝子は先天性ミオトニアの責任遺伝子であるため (20)、この選択的スプライシング異常がミオトニアの原因であるとされているのである。実際、DM モデルマウスにおいて *Clcn1* 遺伝子の選択的スプライシングを操作した結果、ミオトニアが改善することが確かめられている (21)。

その他にも、DM 患者ではインスリン受容体をコードする *INSR* 遺伝子のエクソン 11 の挿入率が低下している (22)。エクソン 11 を含まない胎児型のスプライスバリエントがコードする受容体は、成人型に比べてインスリンへの応答性が低いため、この選択的スプライシング異常が耐糖能異常の原因ではないかとみられている。あるいは、DM 患者で見られる *BINI* 遺伝子のエクソン 11 の挿入率の低下と、筋肉の T 管形成や筋力低下との関係が指摘されているなど (23)、近年、DM の症状を説明する選択的スプライシング異常が同定されつつある。

1.5 アンチセンス法による DM 治療

こうしたことから、症状の原因となる選択的スプライシング異常を改善することで DM の症状を改善することが可能であると考えられる。人為的にスプライシングを操作することによる治療法はデュシェンヌ型筋ジストロフィーや福山型筋ジストロフィーなど、他の筋ジストロフィーなどでも研究されている (24-28)。この治療法では、ターゲットとなるエクソンや周辺配列に相補的なオリゴヌクレオチドが pre-mRNA に結合することで、そのエクソンのスプライシングを阻害しうることを利用している (図 1-3 A)。このように相補的なオリゴヌクレオチドを用いた方法は「アンチセンス法」と呼ばれる。

アンチセンス法は 20 年以上前から研究されてきた手法で、ウイルス RNA の発現抑制などに応用されてきた (29)。当初はアンチセンスオリゴとして天然型のオリゴ DNA を用いていたが、天然型 DNA は生体内に投与すると、内在性のヌクレアーゼで分解されてしまうことや、免疫応答を活性化させるという問題点があり (30)、こうした性質を克服すべく DNA/RNA とは異なる骨格や種々の修飾基をもつ人工核酸が多数開発されてきている (図 1-3 B) (31)。こうした人工核酸のひとつであるモルフォリノオリゴ (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide; PMO) は、ヌクレアーゼ耐性や RNA への高い親和性に加えて、生体毒性が極めて低いという特性をもち (32-35)、マウスに 3 g/kg という高用量で投与しても明らかな毒性が生じないという大変優れた性質をもつことから (26)、治療薬としての応

用が期待されている。

1.6 アンチセンス法の課題

しかしながら、一般的に、アンチセンスオリゴには細胞内への取り込み効率が低いという問題点があり、生体への応用を阻む要因となっている。この問題を克服するため、さまざまな核酸デリバリー法が開発されてきている。主なデリバリー法として、第一に、核酸に膜透過性を高める修飾を施す方法、第二に、物理的に細胞膜に穴をあけて透過性を高める方法が挙げられる。

第一の方法としては、例えば、膜透過性ペプチドを利用した核酸デリバリーが挙げられる (36)。これは、HIV-1 ウイルスの Tat タンパク質が細胞内に侵入するにはたらくことを利用し、このタンパク質に類似した、アルギニンなどの塩基性アミノ酸を多く含むペプチドをオリゴヌクレオチドに共有結合することで (37, 38)、細胞内への取り込みを促進させるものである。この手法は、静脈注射などで全身にデリバリーできるという利点があるが、修飾基が毒性を示す場合があることや、核酸がエンドソームを抜け出せないこと、特定の臓器へのターゲティングが難しいことなどの難点がある (39)。

1.7 超音波によるデリバリー法

第二の方法は、電場や磁場などの物理的な力により細胞膜透過性を高めようとする手法であり (40, 41)、エレクトロポレーション法 (電気穿孔法) がよく知られているが、近年、こうしたデリバリー法のひとつとして、超音波を利用したデリバリー法の開発が進められている (42, 43)。超音波照射は、エコー画像診断などですでに医療応用されている技術であり、皮膚の上から照射することができるため、非侵襲的かつ効果的なデリバリー法となりうると期待される。

以下では簡単に、超音波が膜透過性を高める仕組みについて説明したい。まず、超音波を液体に照射すると液体中に小さな気泡が生じ、超音波の音圧にしたがって膨張と収縮を繰り返す (図 1-4 A)。膨張、収縮に耐え切れなくなった気泡は慣性キャビテーションと呼ばれる崩壊を引き起こし、その際、衝撃波と微小なジェット水流を生じる。こうした現象が細胞の近傍で起こった場合、気泡の振動や衝撃波で細胞膜に一次的な小孔が形成されるのである (図 1-4 B, C)。培養細胞やアフリカツメガエル卵を用いた実験では、形成される小孔は数十秒から数分で閉じられることが示されており (43-49)、個体においてはエレクトロポレーション法よりも少ない組織ダメージで遺伝子が導入可能であることが示されてい

る (50)。

超音波によるエコー画像診断などでは、血管内に造影剤と呼ばれる微小な泡（マイクロバブル）を投与し、この泡が超音波を反射することを利用して、血管を可視化する (51)。この造影剤の泡は、十分な強度の超音波を照射することによって慣性キャビテーションを起こすため、超音波による細胞膜上の小孔形成の効率を高めることができる (52-54)。さまざまなマイクロバブルが開発されているが (42, 55)、本研究では、超音波造影剤のパーフルオロプロパンを封入した PEG 修飾リポソームであるバブルリポソームを用いた (図 1-4 D) (56, 57)。Optison (GE ヘルスケア社) などの市販のマイクロバブル造影剤が数~数十 μm の大きさであるのに対し、バブルリポソームは約 200 nm と小さいため細胞膜に致命的な小孔を形成する可能性が少ないことや、均一な大きさであるために小孔形成の制御がしやすいことなどの利点が考えられる (58)。

1.8 本研究の概要

これまで、超音波によるデリバリー法はプラスミドの遺伝子導入では検討されてきたものの (53, 59-61)、アンチセンスオリゴのデリバリーへの適用は報告がない。そこで本研究では、超音波によるデリバリー法が、アンチセンス法による DM 治療に適用可能かどうかを検討した。まず、用いるアンチセンスオリゴについての検討を行った。当研究室の先行研究では、ミオトニアの原因とされるマウス *Clcn1* 遺伝子の選択的スプライシングを改善するアンチセンスオリゴの探索を行ってきたが (62)、このアンチセンスオリゴがマウス筋芽細胞でも効果を発揮するかどうかについて調べた。次に、このアンチセンスオリゴを DM モデルマウスに超音波デリバリー法を用いて投与し、その効果を、RNA、タンパク質、表現型の各レベルで観察した。また、図 1-2 で示したように、ヒトとマウスでは *CLCN1/Clcn1* 遺伝子のエクソン-イントロン構造が若干異なるため、本研究で用いたオリゴがヒトの遺伝子でも効果を発揮するかどうかを検証した。

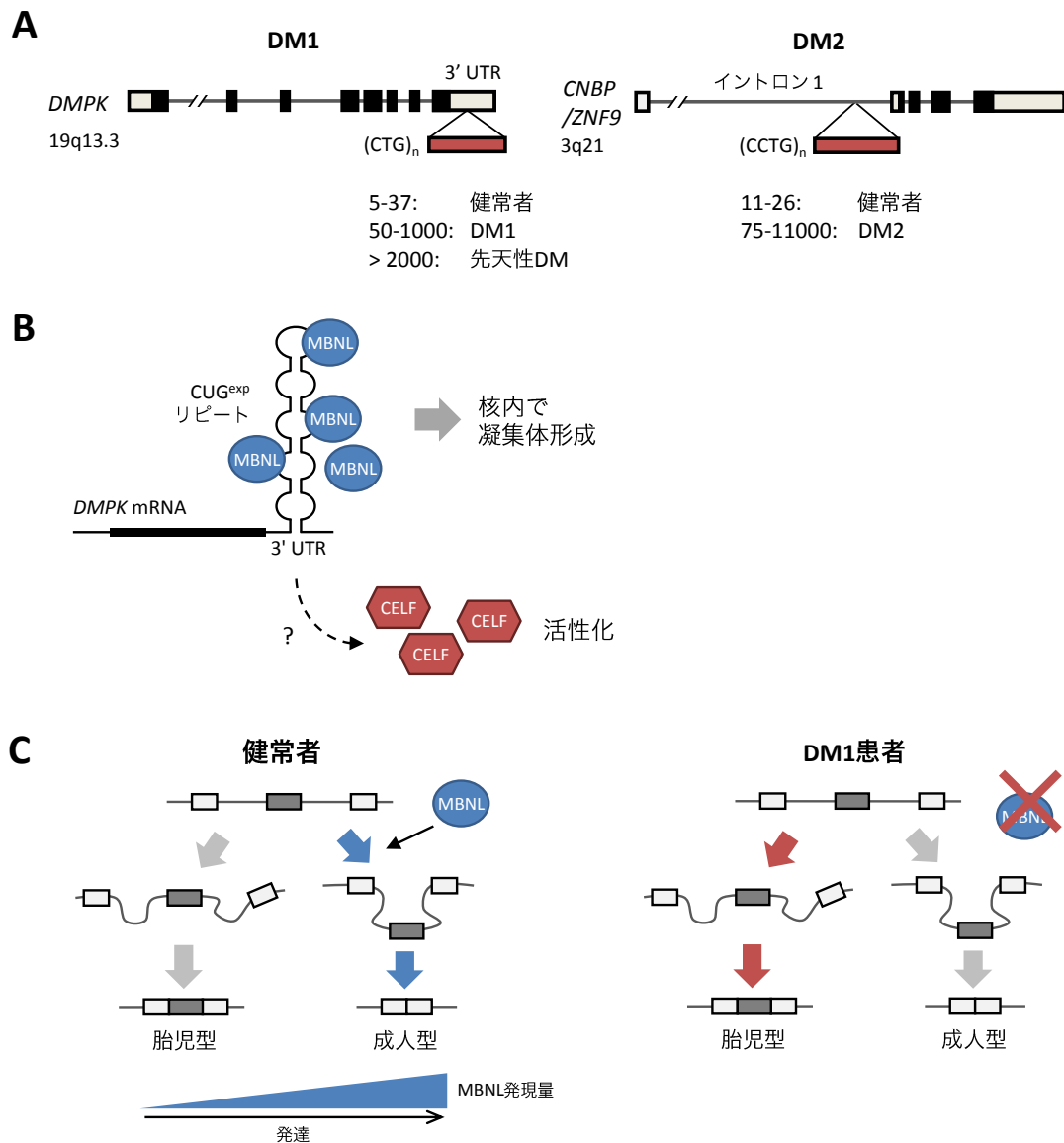


図1-1. DMの発症機序

A) DMの原因となるリピートとそのゲノム上の位置。DM1は、*DMPK*遺伝子の3'非翻訳領域（UTR）に存在するCTGリピートが50リピート以上に伸長すると発症する。一方、DM2は*CNBP/ZNF9*遺伝子のイントロン1に位置するCCTGリピートの伸長が原因である。B) DM1におけるCUGリピートRNAの機能獲得。伸長したCUGリピートRNAは、ヘアピン構造を形成し、RNA結合タンパク質であるMBNLファミリーを捕捉する。また、経路は不明ながら、伸長リピートRNAの発現が別のRNA結合タンパク質であるCELF1/2を活性化する。C) 選択的スプライシングにおけるMBNLの機能と、その異常。MBNLファミリーは様々な臓器で、発生に伴って発現量が増加し、選択的スプライシングを胎児型から成人型へとシフトさせる。DM1患者では、リピートによりMBNLファミリーが機能しなくなることで、この選択的スプライシングのシフトが起こらない。

表1-1. DM1患者における選択的スプライシング異常

脳				
遺伝子	エクソン	DM1*	表現型との関連	参考文献
<i>APP</i>	7	-		Jiang et al., 2004
<i>MAPT</i>	2	-		Sergeant et al., 2001
<i>MAPT</i>	3	-		Sergeant et al., 2001
<i>MAPT</i>	10	-		Jiang et al., 2004
<i>MAPT</i>	6d	+		Leroy et al., 2006
<i>NMDAR3</i>	5	+		Jiang et al., 2004
心臓				
遺伝子	エクソン	DM1*	表現型との関連	参考文献
<i>ALP/PDLIM3</i>	5b	-		Mankodi et al., 2005
<i>KCNAB1</i>	2c	+		Mankodi et al., 2005
<i>MTMR1</i>	2.1	-		Ho et al., 2005
<i>m-TTN</i>	Mex5	+		Mankodi et al., 2005
<i>TNNT2</i>	5	+		Philips et al., 1998
<i>SCA5A</i>	6A	+	不整脈 (?)	Fernande et al., 2013
骨格筋				
遺伝子	エクソン	DM1*	表現型との関連	参考文献
<i>ALP/PDLIM3</i>	5b	-		Lin et al., 2006, Ohsawa et al., 2011
<i>ALP/PDLIM3</i>	5a	+		Lin et al., 2006, Ohsawa et al., 2011
<i>BIN1</i>	7	+		Michel et al., 2013
<i>BIN1</i>	11	+	筋力低下 (?)	Fugier et al., 2011
<i>CAPN3</i>	16	-		Lin et al., 2006
<i>CLCN1</i>	Int2	+		Charlet et al., 2002
<i>CLCN1</i>	6b	+	ミオトニア	Charlet et al., 2002
<i>CLCN1</i>	7a	+	ミオトニア	Charlet et al., 2002
<i>DMD</i>	78	-	筋力低下 (?)	Nakamori et al., 2007
<i>DMD</i>	71	-		Nakamori et al., 2007
<i>FHOS</i>	11a	-		Lin et al., 2006
<i>GFAT1</i>	10	-		Lin et al., 2006
<i>IR</i>	11	-	耐糖能異常 (?)	Savkur et al., 2001
<i>MBNL1</i>	7	+		Lin et al., 2006
<i>MBNL2</i>	7	+		Lin et al., 2006
<i>MEF2D</i>	beta	-		Lee et al., 2010
<i>MTMR1</i>	2.1	-		Buj-Bello et al., 2002
<i>m-TTN</i>	Mex5	+		Lin et al., 2006
<i>MYOM1</i>	17a	+		Koebis et al., 2011
<i>NRAP</i>	12	-		Lin et al., 2006
<i>RYR1</i>	70	-		Kimura et al., 2005
<i>SERCA1</i>	22	-		Kimura et al., 2005
<i>SERCA2</i>	Int19	+		Kimura et al., 2005
<i>TNNT2</i>	5	+		Philips et al., 1998
<i>TNNT3</i>	Fetal	+		Kanadia et al., 2003
<i>ZASP</i>	9	+		Machuca-Tzili et al., 2006
<i>ZASP</i>	5	+		Vihola et al., 2010
<i>ZASP</i>	11	+		Lin et al., 2006
<i>z-TTN</i>	Zr5	+		Lin et al., 2006
<i>z-TTN</i>	Zr4	+		Lin et al., 2006
<i>SRA</i>	Int1	-		Hube et al., 2010

* 「+」および「-」はそれぞれ、DM1患者で挿入および脱落したスプライスバリエントが増加することを示す。

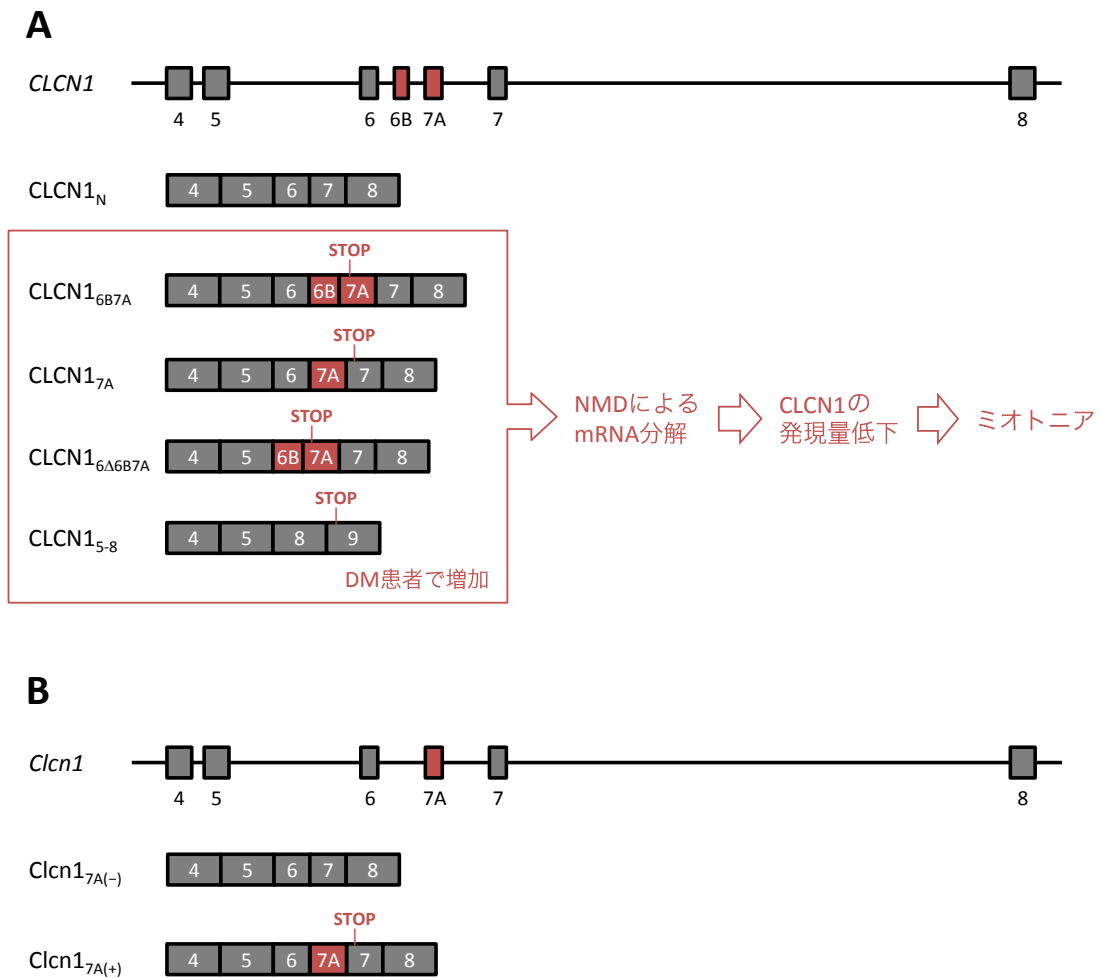


図1-2. DMにおけるCLCN1遺伝子の選択的スプライシング異常

A) DM患者におけるCLCN1遺伝子のスプライシング異常。CLCN1遺伝子は、エクソン6から7の領域が選択的スプライシングによる制御を受ける。DM患者では、エクソン6B、7Aが挿入されたスプライスバリエントや、エクソン6、7がスキップされたバリエントの発現が見られ、正常なスプライスバリエント (CLCN1_N) の発現量が低下している。異常なスプライスバリエントはフレームシフトにより停止コドンを生じ、NMDによって分解されてしまうため、CLCN1タンパク質の発現量が低下し、ミオトニアを引き起こすと考えられている。B) マウスにおけるClcn1遺伝子の選択的スプライシング。ヒトとマウスではエクソン、イントロン構造が異なる。

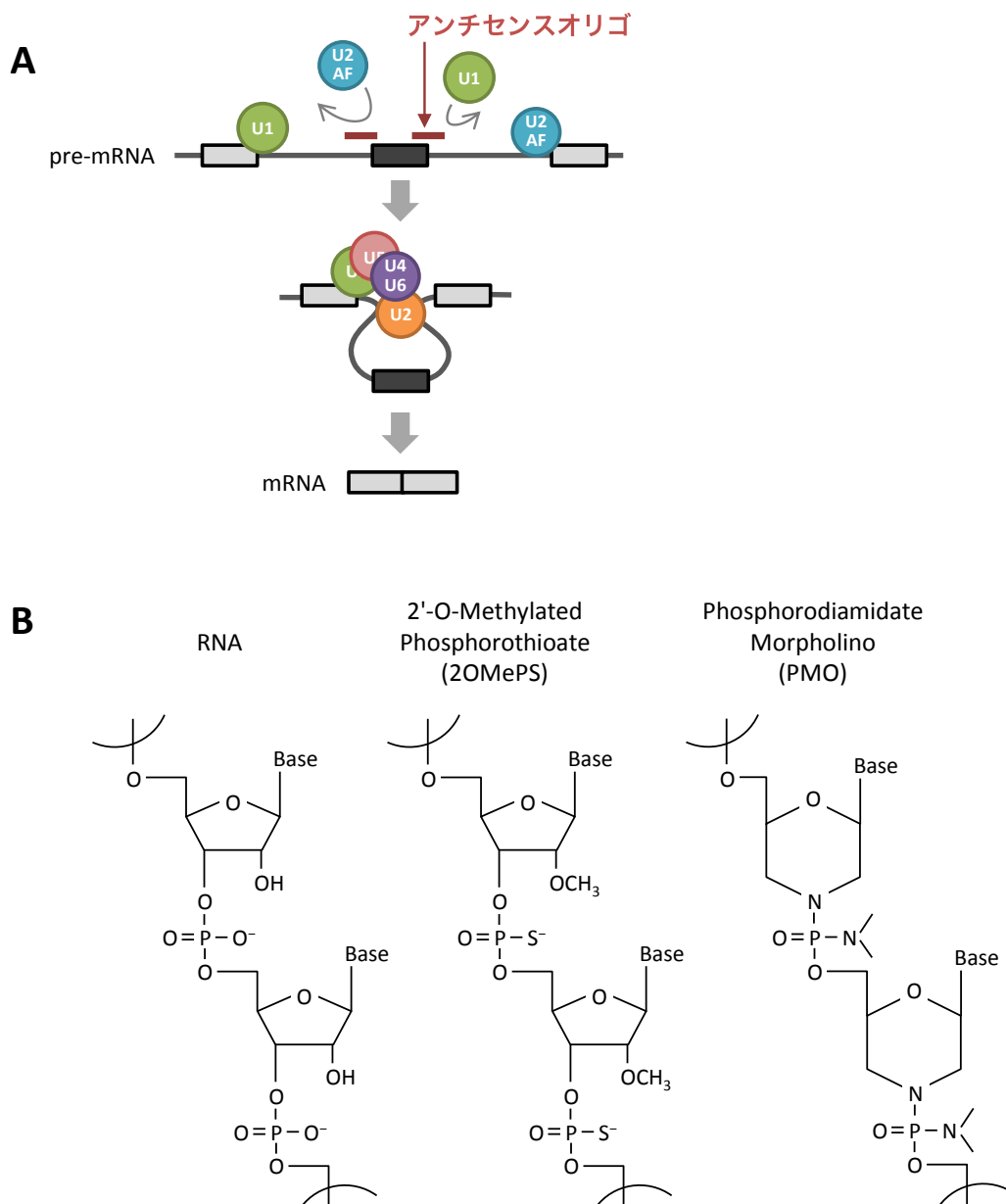


図1-3. アンチセンス法と人工核酸

A) アンチセンスオリゴによるエクソンスキッピングの概要。目的のエクソン（図では黒い四角）の周辺配列に相補的なアンチセンスオリゴ（赤線）により、スプライシングに重要なsnRNPなどがpre-mRNAに結合するのを阻害し、エクソンが認識されるのを防ぐことで、スキッピングを引き起こす。B) RNAおよび本研究で用いた2種類の人工核酸の構造式。

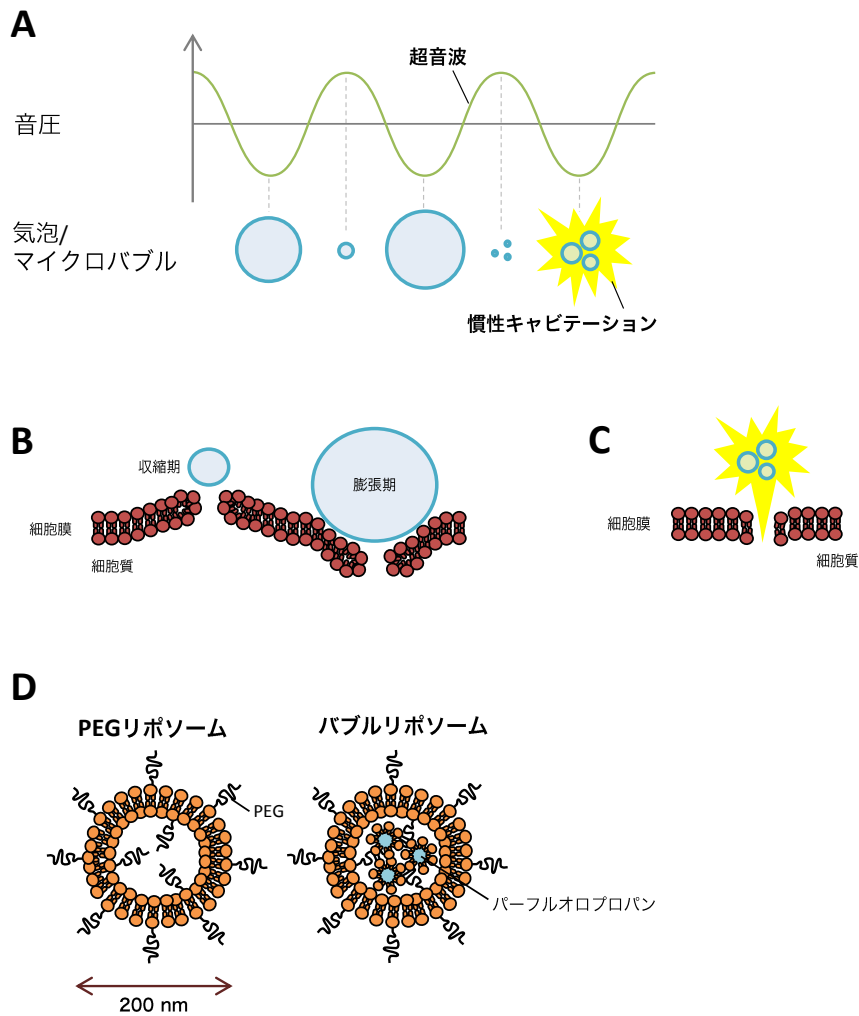


図1-4. バブルリポソーム法の原理

A) 超音波による慣性キャビテーション。超音波は、溶液中に新たに発生させた気泡や、すでに存在する気泡を振動させる。超音波の出力が十分に大きいと、気泡は振動に耐えきれず崩壊する（慣性キャビテーション）。この崩壊に伴って、衝撃波や微小なジェット流が生じる。B-C) マイクロバブルによる細胞膜での小孔形成モデル。気泡の振動や慣性キャビテーションが細胞膜の近くで生じると、気泡が細胞膜を押し込んだり、衝撃波が細胞膜を破壊したりして、細胞膜に一時的な小孔が生じる。D) PEGリポソームおよびバブルリポソームの模式図。PEGリポソームはリン脂質からなり、一部のリン脂質がPEG2000で修飾されている。このPEGリポソームをパーフルオロプロパンの高圧下で超音波処理すると、パーフルオロプロパンの気泡がリポソーム内部に取り込まれる。リポソームの直径は約200 nmである。

第2章 材料と方法

2.1 材料

2.1.1 トランスジェニックマウス

HSA^{LR} マウスは、University of Rochester の Charles A. Thornton 教授の研究室で作製されたトランスジェニックマウスであり (9)、大阪大学大学院医学系研究科の高橋正紀助教の研究室を経て、当研究室に導入されたものである。 HSA^{LR} マウスは、ヒト骨格筋アクチン (HSA) プロモーターの制御下で、3'UTR に(CTG)₂₅₀をもつ HSA 遺伝子を発現する。交配の過程で CTG リピートが縮小する傾向があり、本研究で用いたマウスはおよそ 200 リピートを保持していた。野生型としては FVBn/Jcl (日本クレア株式会社、東京) を用い、 HSA^{LR} マウスはトランスジーンをホモ接合でもつマウスを使用した。動物実験に際しては、「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守した。

2.1.2 バブルリポソーム

バブルリポソームは東京薬科大学薬学部薬物送達学教室において調製された (56)。手順を以下に示す。まず、1,2-ジパルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC) (日油株式会社、東京) および 1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-ポリエチレングリコール (DSPE-PEG2000-OMe) (日油) をモル比 94:6 で含む PEG リポソームを逆相蒸発法により調製した。ここでは、すべての試薬を 1:1 (v/v) のクロロホルム/ジイソプロピルエーテル溶媒に溶解し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えた後、混合物を超音波処理して、47°Cで溶媒を蒸発させた。有機溶媒を完全に除去した後、リポソームのサイズを 200 nm 以下に揃えるために孔径 200 nm のフィルター (Nuclepore Track-Etch Membrane、Whatman 社、Maidstone、Kent、UK) に通した。脂質濃度は Phospholipid C 試験 (和光純薬工業株式会社、大阪) により計測した。バブルリポソームは、リポソームとパーフルオロプロパンガス (高千穂化学工業株式会社、東京) を用いて調製した。まず、2 ml 容量の滅菌済みバイアルに 0.8 ml のリポソーム懸濁液 (脂質濃度 1 mg/ml) を加え、バイアルをパーフルオロプロパンガスで満たした。バイアルの蓋を閉め、さらに 3 ml のパーフルオロプロパンガスを注入して加圧した。このバイアルを、超音波洗浄機 (30 kHz、250 W) (SONO-CLEANER CA-4481L、海上電機株式会社、東京) で 1 分間超音波処理し、バブル

リポソームを形成させた。

2.1.3 アンチセンスオリゴおよびプライマー配列

本研究で用いたオリゴヌクレオチドの配列は、表 2-1 および表 2-2 にまとめた。

2.1.4 患者生検筋

DM1 患者 2 名 (4 歳の女性および 31 歳の男性)、および軽度の筋疾患を示すものの診断のつかなかった患者の生検筋を用いた。DM1 患者は、いずれも CTG リポートが伸長していることを確認している。生検筋は、インフォームドコンセントを得て採取され、国立精神・神経医療研究センターで保存されていたものである。

2.2 方法

2.2.1 生検筋からの total RNA 抽出

クリオスタットによって DM 患者および対照となる人の生検筋から 10 μm 厚の筋薄片 50 枚を切り出し、すみやかに 500 μl の TRIzol Reagent (ライフテクノロジーズ株式会社、Carlsbad, CA, USA) を加え、ペッスルでホモジナイズした。さらに 300 μl TRIzol Reagent を加えて混ぜ合わせ、室温で 5 分間静置した後、12000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心して上清を回収した。この上清にクロロホルム 160 μl を加えて 15 秒間激しく混合し、室温で 3 分間放置した。12000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心後、上層を回収し、2-プロパノール 400 μl 、グリコーゲン 10 μg を加えて転倒混和し、室温で 10 分間放置した。12000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心して、核酸をペレットにした。その後、75%エタノール 500 μl 加えて 5 分間遠心し、上清を取り除く作業を 2 回繰り返した。ペレットを風乾してから、12 μl の RNase フリーの純水に懸濁した。このうち 0.5 μl を用いて total RNA の濃度を決定した。

2.2.2 培養細胞からの total RNA 抽出

培養細胞からの total RNA 抽出には GenElute Mammalian Total RNA Extraction Kit (Sigma-Aldrich 社、St. Louis, MO, USA) を用いた。使用法は取扱説明書に従ったが、total RNA 溶出の際の Elution buffer 量を 20 μl に変更した。また、抽出の際には DNase I 処理は行わなかった。

2.2.3 RNA の逆転写

PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社、大津) を用いた。生検筋から抽出した total RNA は、500 ng をテンプレートとし、20 μ l スケールで逆転写した。プライマーには Random 6mers (50 μ M) を 2 μ l 用いた。逆転写産物は純水で 5 倍に希釈して cDNA サンプルとした。培養細胞から抽出した total RNA は、HEK293 細胞については 1000 ng、C2C12 細胞については 100 ng をテンプレートとし、10 μ l スケールで逆転写した。プライマーには oligo dT primer (50 μ M) を 0.5 μ l 用いた。逆転写産物は、基本的に純水で 5 倍に希釈して cDNA サンプルとした。

2.2.4 スプライシングパターンの検出

PCR には *Ex taq* (タカラバイオ) を用い、以下の組成の反応液で行った。

純水	6.15 μ l
10 \times <i>Ex taq</i> buffer	1 μ l
cDNA サンプル	1 μ l
dNTP	0.8 μ l
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ l
<i>Ex taq</i>	0.05 μ l
計	10 μ l

サイクル数は PCR 産物が指数関数的に増幅される範囲に設定した。PCR 産物は 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色液で 20 分間染色した。泳動像は LAS-3000 (富士フイルム株式会社、東京) で観察・記録し、Multi Gauge でそれぞれのバンドの輝度を定量した。*Clcn1* のエクソン 7A の挿入率は、*Clcn1*_{7A(+)} と *Clcn1*_{7A(-)}由来の PCR 産物の輝度の合計に対する *Clcn1*_{7A(+)}由来の PCR 産物の輝度の割合で算出した。

2.2.5 遺伝子発現ベクターの構築

マウス *Clcn1* ミニ遺伝子 p*Clcn1* は、当研究室の先行研究において構築された (63)。また、ヒト *CLCN1* ミニ遺伝子 p*CLCN1* は、当研究室の紀によって構築されたミニ遺伝子を改変し

て用いた。pClen1 および改変前の CLCN1 ミニ遺伝子は、*Cln1/CLCN1* 遺伝子のエクソン 6 から 7 のゲノム領域を pEGFP-C1 の *BgIII-SalI* サイトに挿入したものである。エクソン 5 から 7 までの領域をもつ pCLCN1 は、*BgIII* およびエクソン 6 上の *XapI* サイトを利用して上記ミニ遺伝子にエクソン 5 およびイントロン 5 を挿入した。

挿入する DNA 断片は nested PCR 法により増幅した。まず、プライマーセット 1 (表 2-2 No. 1) を用いてヒトゲノムからエクソン 5 からエクソン 6 までを含む DNA 断片を増幅し、この PCR 産物を鋳型としてプライマーセット 2 (No. 2) により挿入する DNA 断片を増幅した。DNA 断片の増幅には、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用い、アガロースゲル電気泳動で目的の DNA 断片を単離した。アガロースゲルからの DNA の抽出には MinElute Gel Extraction Kit (株式会社キアゲン、東京) を用いた。プライマーセット 2 により増幅した PCR 産物は、ZERO Blunt PCR Cloning Kit (ライフテクノロジーズ) を用いてクローニングした後、制限酵素処理を行った。クローニングした PCR 産物と CLCN1 ミニ遺伝子は Rapid DNA Ligation Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) でライゲーションを行った。ライゲーション産物のクローニングには XL-10 Gold コンピテントセルを用いた。作製したコンストラクトはすべてシーケンス解析を行った (株式会社ファスマック、厚木)。DNA コンストラクションおよびシーケンス解析に用いるプラスミドの精製には、GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を、また、培養細胞へのトランスフェクションに用いるプラスミドの精製には QIAGEN Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いた。すべての試薬およびキットは、それぞれの取扱説明書に従って使用した。

2.2.6 細胞培養

すべての細胞株は 37 °C、5% CO₂ の環境下で培養した。HEK293 細胞および C2C12 細胞はそれぞれ 10% および 20% の仔ウシ血清 (FBS、ライフテクノロジーズ) を加えた DMEM 培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。また、それぞれの細胞株は細胞密度が 90~100% (HEK293)、50~70% (C2C12) コンフルエントに達した段階で、培養液を除いて PBS で洗い、2.5% トリプシン (Sigma-Aldrich) を加えて室温で 5~10 分間、細胞の形が丸くなるまで放置し、ディッシュをたたいて細胞をはがした。37°C の DMEM (10% または 20% FBS) を適量加えて細胞を懸濁し、約 10 分の 1 量を継代した。

2.2.7 トランスフェクション

HEK293 細胞は、24 ウェルプレート (IWAKI サイテック、AGC テクノグラス株式会社、

静岡)に 1.2×10^5 細胞/ウェルの濃度でまき、翌日、50 ng の pCLCN1 を 0.6 μ l の FuGENE 6.0 (プロメガ株式会社、東京)を用いて導入した。12~16 時間後に培地交換し、0~100 pmol の 2OMePS オリゴを 2 μ l の Lipofectamine 2000(ライフテクノロジーズ)を用いて導入した。C2C12 細胞は、24 ウェルプレートに 3.5×10^4 細胞/ウェルの濃度でまき、翌日、500 ng の pClcn1 と 0~20 pmol の 2OMePS オリゴを 1.5~2.0 μ l の Lipofectamine 2000 で導入した。Total RNA 抽出はオリゴの導入した 48 時間後に行った。

2.2.8 超音波による PMO の投与

PMO は PBS (pH 7.4) に溶解して使用した。投与前にマウスはイソフルランで麻酔し、TA 筋を覆う体毛を市販の除毛剤で除毛しておいた。投与は 30 ゲージ注射針 (ニプロ株式会社、大阪) を使用し、2 mg/ml の PMO 溶液 10 μ l をバブルリポソーム懸濁液 30 μ l と混合して TA 筋に筋肉内注射した。注射後すぐに超音波ゲル (ゲルソニック H、日本光電株式会社、東京) を皮膚に塗り、1 MHz、2.0 W/cm² の超音波を 50% の負荷サイクルで 1 分間照射した。超音波の照射には SONITRON 1000 (Rich Mar 社、Chattanooga、TN、USA) を用いた。

2.2.9 筋電図測定

筋電図測定は、針電極またはワイヤ電極を用いて測定した。ワイヤ電極を用いる場合は、記録電極にテフロン電線 (No. 79100、A-M Systems 社、Sequim、WA、USA) の双極電極を使用し、1~2 mm 間隔を空けて TA 筋に埋め込んだ。また、TA 筋を覆う皮膚に、筋肉の軸方向に沿って 2 本の刺激用電極を差し込んだ。筋電図電極および刺激電極の取り付けは 2% イソフルラン吸引麻酔下で行った。麻酔下では、恒温ヒートパッド (バイオリサーチセンター株式会社、名古屋) を用いてマウスの体温を 37~38°C に維持した。マウスは後肢が出るようにした筒状の拘束器具に固定し、麻酔が完全に冷めてから筋電図の測定を行った。筋電図シグナルはアンプとバンドパスフィルター (15 Hz~1 kHz) (日本光電) を通し、アナログデジタル変換器 (PowerLab 16/30、ADInstruments 社、Oxford、UK) でデジタル化して、記録レート 10 kHz でコンピューターに記録した。TA 筋は、100 Hz、1 ms の矩形波パルス 20 回で電気刺激した。パルスは、パルス発生器 (SEN-3401、日本光電) からアイソレーションアンプ (SS-202J、日本光電) を介して伝達した。刺激強度は、足首の屈曲が十分に見られる強さとし、過剰な屈曲が生じたりマウスが嫌がったりするような刺激は避けるようにした。筋電図測定は一重盲検法で行った。針電極での測定では、TA 筋に電極を刺

入する際に生じるミオトニアの発生率を算出した。

2.2.10 免疫組織染色

摘出したTA筋は、クリオモルド(2号、サクラファインテックジャパン株式会社、東京)中でO.C.Tコンパウンド(サクラファインテックジャパン)に包埋し、液体窒素で速やかに凍結した。クリオスタットマイクローム(CM3050s、ライカマイクロシステムズ株式会社、東京)で6µm厚に切り出した凍結切片を、MASコートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社、大阪)に貼り付け、45分間風乾させた。5%ヤギ血清(VECTOR LABORATORIES社、Burlingame、CA、USA)、2%BSAを含むPBS(ブロッキング液)で、37°Cで15分間ブロッキングした後、ブロッキング液で1:50に希釈した抗Clcn1抗体(CLC-11A、Alpha Diagnostic International社、TX、USA)を4°Cで一晩反応させた。氷冷したPBSで5分間の洗浄を12回繰り返し、PBSで1:600に希釈したAlexa Fluor 488抗ウサギIgGヤギ抗体(ライフテクノロジーズ)を室温で45分間、遮光しながら反応させた。氷冷したPBSで5分間の洗浄を6回繰り返し、Fluoromount/Plus(Diagnostic BioSystems社、Pleasanton、CA、USA)で封入した。観察は倒立型蛍光顕微鏡(IX70、オリンパス株式会社、東京)で行い、露光時間および閾値はすべての観察で一致させた。

2.2.11 エバンスブルー色素による組織ダメージの検証

9週齢のHSA^{LR}マウスの後肢を除毛し、TA筋に0、1.0、1.5、2.0 W/cm²の超音波を50%の負荷サイクルで1分間照射した。超音波処理直後に1%エバンスブルー溶液(ナカライテスク株式会社、京都)を5ml/kgで腹腔内投与し、24時間後にTA筋を摘出して凍結切片を作製した。凍結切片はMASコートスライドガラスに貼り付けて風乾させた後、エバンスブルーの蛍光を倒立型蛍光顕微鏡で観察した。

2.2.12 PCR産物の定量

Clcn1_{7A(-)}およびClcn1_{7A(+)}の発現量は、StepOne PlusリアルタイムPCRシステムおよびPower SYBR Green PCR Master Mix(ともにライフテクノロジーズ)を用い、 $\Delta\Delta C_t$ 法によって定量した。リアルタイムPCRのために、10µlの反応液あたり250ngのtotal RNAを用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。PCR反応は20ngのcDNAを用い、20µl容量で行った。それぞれのプライマーの濃度は表2-2にまとめた。内部標準遺伝子には*Gapdh*遺伝子を用い、野生型を1として算出した。

pCLCN1 のスプライシング産物の定量は 2.2.4 と同様の方法で行った。定量に際して、pCLCN1 の PCR は CLCN1 ex6-7 (表 2-2 No.7) を用いて行い、それぞれのスプライシング産物の輝度を定量した。これらを pCLCN1 の発現量で補正するため、No.5 のプライマーセットを用いて GFP を増幅し、定量した。それぞれのスプライシング産物の発現量は、GFP の発現量で割った値として算出した。

表2-1. アンチセンスオリゴ配列

		配列 (5' → 3')
マウス <i>Clcn1</i> 用	-10+15	CUGCCCAGGCACGGUCUGCAACAGA
	+1+25	GGAGAUCAAGCUGCCCAGGCACGGU
ヒト <i>CLCN1</i> 用	6B(+30+54)	UCCAUGUGGGGCCACAGGUGAAAGA
	6B(-8+17)	UGGAGGACAGGCACAGGCUAAACAG
	7A(+1+25)	GGAGGUCAAGCUGCCCAGGCACGGU
	7A(-14+11)	CCAGGCACGGUCUGCAACAGAGAAG
	7A(+63-8)	CAACUUGCCUCCGACAGGGGCUGCA
コントロール	2OMePS	AGACAACGUCUGGCACGGACCCGUC
	PMO	TGGCACGGACCCGTGGAAGTAGAGG

表2-2. PCRプライマー配列

No.	ターゲット		配列 (5' → 3')	備考	
1	CLCN1 nested	Fw	AGAACTTGCCACCAGACTCG	プライマーセット1	
		Rv	TGGACTAGCAGGGAGAGCAT		
2	CLCN1 ex5-6	Fw	AAAGATCTGGAATCCCCGAAATGAA	プライマーセット2	
		Rv	TGGACTAGCAGGGAGAGCAT		
3	pClcn1	Fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG		
		Rv	CTCCAAGTGGTGTCCAAAACAGC		
4	pCLCN1	Fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG		
		Rv	CTCCAAGTGGTGTCCAAAACAAC		
5	GFP	Fw	CAACAGCCACAACGTCTATATCATG		
		Rv	ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG		
6	CLCN1 ex5-7	Fw	TGAAAGCCTTTGTGGCCAAGGT		
		Rv	CTCCAAGTGGTGTCCAAAACAAC		
7	CLCN1 ex6-7	Fw	CATCTGTGCTGCTGCCTCA		
		Rv	CTCCAAGTGGTGTCCAAAACAAC		
8	Clcn1 ex6-8	Fw	GTCCTCAGCAAGTTTATGTCC	マウス骨格筋cDNAからのPCR用	
		Rv	GAATCCTCGCCAGTAATTCC		
9	Ldb3	Fw	GGAAGATGAGGCTGATGAGTGG		
		Rv	TGCTGACAGTGGTAGTGCTCTTTC		
10	Mbn1	Fw	GCTGCCAATACCAGGTCAAC		
		Rv	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC		
11	Ryr1	Fw	GACAATAAGAGCAAAATGGC		
		Rv	CTTGGTGCGTTCCTGATCTG		
12	Serca1	Fw	GCTCATGGTCTCAAGATCTCAC		
		Rv	GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG		
13	Clcn1 _{ex7A(+)}	Fw	TGTCTATGAGACCGTGCCTG		50 nMで使用
		Rv	GTGTAATAGTATGGCTGCTCCA		50 nMで使用
14	Clcn1 _{ex7A(-)}	Fw	GTTCTCTGGTGTCTATGAGCAGCC	300 nMで使用	
		Rv	AGCACTCCTCCAAGTGGTGTTT	300 nMで使用	
15	Gapdh	Fw	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	50 nMで使用	
		Rv	ACACATTGGGGTAGGAACA	50 nMで使用	

第3章 結果

序論でも述べた通り、DM患者では *CLCN1* 遺伝子の mRNA に異常なエクソンの挿入が生じることで、*CLCN1* タンパク質の発現量が低下し、ミオトニアを引き起こす (19)。この病理機構は、DM1 モデルマウス *HSA^{LR}* でも再現されており、*Clcn1* 遺伝子のエクソン 7A の選択的スプライシング異常によりミオトニアが生じる (8, 21)。当研究室では、*Clcn1* 遺伝子の選択的スプライシング異常を改善するアンチセンスオリゴの配列を最適化し、エクソン 7A の 5'端 25 塩基に相補的な配列 (+1+25) が最も効果的にエクソン 7A の挿入を抑制していることを見出していた (図 3-1 A)。しかし、最適化にはアフリカミドリザル腎臓由来の COS-7 細胞を用いており、マウスの細胞でも同様の効果をもたらすのか検討する必要があった。

そこでまず、マウス筋芽細胞 C2C12 およびマウス骨格筋において、先行研究で同定したアンチセンスオリゴが効果をもつかどうかについて検討した。

3.1 C2C12 細胞における効果の検証

C2C12 細胞において +1+25 の配列をもつアンチセンスオリゴがエクソン 7A をスキップさせるかどうかを以下の方法で調べた。C2C12 細胞は内在性の *Clcn1* 遺伝子を発現していないため、*Clcn1* のミニ遺伝子発現ベクター pClcn1 を用いて実験を行った (図 3-1 B)。pClcn1 は EGFP 遺伝子の下流に *Clcn1* 遺伝子のエクソン 6 から 7 までのゲノム領域をクローニングしたもので、培養細胞内でエクソン 7A の選択的スプライシングを再現することができる (図 3-1 C) (63)。この pClcn1 とともに、修飾オリゴである 2'-O メチル化ホスホロチオエートオリゴ (2OMePS) (図 1-3 B) を C2C12 細胞にトランスフェクションし、*Clcn1* ミニ遺伝子の選択的スプライシングを観察した。+1+25 2OMePS の比較対象として、エクソン 7A の 5'側のイントロン-エクソンの接合部をターゲットとする -10+15 2OMePS および、+1+25 のスクランブル配列をもつ Control 2OMePS を用いた。その結果、+1+25 2OMePS および -10+15 2OMePS は、Control と比較してエクソン 7A の挿入を抑制した (図 3-1 C 上)。また、トランスフェクションする 2OMePS の量を段階的に減らしていくと、+1+25 2OMePS の方がより低用量でエクソン 7A の挿入抑制効果を発揮することがわかった (図 3-1 C 下)。

3.2 骨格筋における効果の検証

次に、骨格筋におけるアンチセンスオリゴの効果を検証した。マウス個体への投与では、序論で述べた毒性や生体内安定性といった観点から、アンチセンスオリゴとして PMO を用

いることにした。 $+1+25$ PMO $60 \mu\text{g}$ を HSA^{LR} マウスの前脛骨筋 (TA 筋) に筋肉内投与する操作を 1 週間に 1 度、計 4 回行い、最後の投与から 1 週間後に針電極による筋電図測定を行った。また、その 2~3 日後に TA 筋を摘出し、RT-PCR により *Cln1* の選択的スプライシングを観察した (図 3-2)。その結果、対照のモルフォリノオリゴを投与した群と比較して、*Cln1* 遺伝子のエクソン 7A の挿入率は減少したが、自発的に生じるミオトニアの発生率は変化しなかった。また、このとき生じたミオトニアの持続時間や周波数などについても解析したが、有意な差は得られなかった。

以上の結果は、 $+1+25$ の配列をもつアンチセンスオリゴは細胞内に導入されれば機能するものの、筋肉内投与だけでは十分な量のオリゴが細胞内にデリバリーされないことを示唆している。そこで、次に、PMO の導入効率を高めるための方法として、バブルリポソームと超音波を用いたデリバリー法 (以下、バブルリポソーム法) を検討した。

3.3 PMO 投与におけるバブルリポソーム法の効果

まず、PMO を投与する前に、照射する超音波強度を検討するため、0 から 2.0 W/cm^2 の強度の超音波を 50% の負荷サイクルで 1 分間、経皮的に野生型マウスの TA 筋にあて、直後に 1% エバンスブルー色素溶液を 5 ml/kg の容量で腹腔内注射した。注射から 24 時間後に TA 筋の凍結切片を作製し、色素の取り込みを観察した。 1.5 W/cm^2 までの超音波強度では色素の取り込みは一切見られなかったが、 2.0 W/cm^2 ではいくつかの筋線維で色素の取り込みが観察された (図 3-3 A)。エバンスブルーは損傷した筋線維に取り込まれることから (64)、 2.0 W/cm^2 の超音波は組織内で慣性キャビテーションを引き起こすには十分な強度であると考えられる。そのため、以下の実験では 2.0 W/cm^2 の超音波を用いた。

次に、バブルリポソーム法の効果を検証するため、以下の 5 つの条件で $+1+25$ PMO 溶液または生理食塩水を HSA^{LR} マウスの TA 筋に投与した。

- ① 生理食塩水を筋肉内投与
- ② 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、超音波を照射
- ③ $+1+25$ PMO を生理食塩水と混合して筋肉内投与し、超音波を照射
- ④ $+1+25$ PMO をバブルリポソームと混合し、筋肉内投与
- ⑤ $+1+25$ PMO をバブルリポソームと混合して筋肉内投与し、超音波を照射

なお、1 回の投与で用いる $+1+25$ PMO は $20 \mu\text{g}$ とし、超音波は 50% の負荷サイクルで、1 分間照射した。1 週間に 1 回の投与を 3 週間にわたって行った後、3 週間後に TA 筋を摘出して、*Cln1* の選択的スプライシングの解析を行った。

結果を見ると、まず、生理食塩水を投与した場合 (①、②) よりも、 $+1+25$ PMO を投与

した場合 (③、④、⑤)の方がエクソン7Aの挿入率は低下していた。エクソン7Aの挿入率の低下は、+1+25 PMOが細胞内に取り込まれていることを示唆している。さらに、その中でも超音波とバブルリポソームを組み合わせたデリバリー法が最もスプライシングが改善する傾向にあったことから、バブルリポソーム法がPMOの筋細胞への取り込みを促進することが示された (図3-3 B)。

3.4 +1+25 PMOのデリバリーと表現型への効果

そこで、上記の投与と同様に、+1+25 PMO 20 µgを、バブルリポソーム法で週1回、3週間にわたってHSA^{LR}マウスのTA筋に投与し、最後の投与から3週間後に筋電図測定を行った。またその後、TA筋を摘出し、タンパク質発現量および選択的スプライシングの解析を行った。なお、対照群としては生理食塩水を投与したものをを用いた。

まず、ミオトニアを測定するため、TA筋を電氣的に刺激して誘発された筋活動を測定した (図3-4 A)。HSA^{LR}マウスでは、+1+25 PMO投与群および生理食塩水投与群ともに、電気刺激後にミオトニアの特徴であるバースト状の筋活動が観察されたが、こうしたバースト状の筋活動は、野生型マウスでは観察されなかった (図3-4 B)。このことから、このバースト状の筋活動はHSA^{LR}に特徴的なミオトニアであると判断した。

加える電気刺激の強度を0 Vから最大10 Vまで変化させて筋活動を測定すると、ミオトニアの持続時間および積分筋電図 (iEMG)は刺激強度に比例して増加した (図3-4 C)。このとき、刺激強度に対してミオトニア持続時間およびiEMGの線型近似を行うと、生理食塩水投与群と比較して、+1+25 PMO投与群ではミオトニアの持続時間およびiEMGは低い傾向にあった。ただし、刺激電極に同じ電圧をかけても、電極の取り付け方によって、実際に筋肉に到達する電気刺激の強度は異なる可能性があったため、電気刺激時の筋肉の収縮を指標に、十分な収縮が見られる刺激強度が加えられた試行のみを収集した。具体的には、TA筋が足首の屈曲を支配する筋肉であることから、電気刺激時にマウスの足首が十分に屈曲する刺激強度を選んだ。これはいずれのマウスでも、4 Vから7 Vの強度であった。このような強度で電気刺激を行った試行の、ミオトニアの持続時間および単位時間当たりの積分筋電図 (iEMG/sec)について、それぞれのマウスで平均し、さらに群ごとにマウスの成績を平均した。その結果、持続時間には有意な差は見られなかったものの ($P = 0.17$)、単位時間当たりの積分筋電図については+1+25 PMO投与群で低下していた ($P < 0.05$ 、図3-4 D)。

次に、摘出したTA筋からtotal RNAを抽出し、RT-PCRによりスプライシング変化を観察した。+1+25 PMO投与群では、*Clcn1*遺伝子のエクソン7Aの挿入率は野生型と同程度まで

低下していたが、*HSA*^{LR} マウスで選択的スプライシング異常が同定されている他のエクソン、*Ldb3* 遺伝子のエクソン 11、*Mbnl1* 遺伝子のエクソン 5、*RyR1* 遺伝子のエクソン 70、*Serclal* 遺伝子のエクソン 22 については、生理食塩水を投与した群と変わらなかった(図 3-5 A, C)。また、リアルタイム PCR により *Clcn1* 遺伝子のエクソン 7A を含むスプライスバリエント (*Clcn1*_{7A(+)}) と、含まないスプライスバリエント (*Clcn1*_{7A(-)}) の発現量を測定したところ、+1+25 PMO の投与により *Clcn1*_{7A(+)} の発現量は低下したものの、*Clcn1*_{7A(-)} の発現量は回復していなかった (図 3-5 B)。

次に、上記と同様の投与を行った後、摘出した TA 筋から、凍結切片を作製し、抗 *Clcn1* 抗体を用いて免疫組織染色を行った (図 3-6)。まず、野生型マウスの TA 筋の凍結切片の免疫組織染色像では、細胞膜に特に強いシグナルが観察された。*Clcn1* は塩化物イオンチャネルであり、細胞膜への局在は先行研究と一致する (21, 65)。一方、*HSA*^{LR} の生理食塩水を投与した群では、細胞膜が染色される筋線維はまばらで、またその染色像も野生型と比較して、ぼんやりしていた。+1+25 PMO 投与群では、染色のシグナル強度が上昇し、野生型と同様に細胞膜がはっきりと染色される様子が観察された。

以上のことから、+1+25 PMO をバブルリポソーム法で投与することで、マウス生体内においても *Clcn1* 遺伝子のスプライシングを改善させて正常 *Clcn1* が細胞膜に移行し、ミオトニアを回復させることが可能であることが明らかとなった。

3.5 ヒト *CLCN1* に対するアンチセンスオリゴの設計

+1+25 PMO により DM モデルマウス *HSA*^{LR} のミオトニアが改善されたことから、DM 患者のミオトニアの治療法としても、アンチセンスオリゴによるスプライシングの改善は効果があるのではないかと考えられる。しかしながら、図 1-2 に示したように、マウスとヒトではエクソン-イントロン構造が異なり、ヒトの場合、エクソン 6B が挿入されたり、エクソン 6 がスキップされたりしたスプライシング産物が産生される。また、+1+25 アンチセンスオリゴがターゲットとする領域でも、わずかながら塩基配列の違いが見られることから (図 3-7 A)、ヒト *CLCN1* 遺伝子に対して、+1+25 アンチセンスオリゴが有効に作用するかどうかは明らかではなかった。

そこで、DM1 患者および対照となる人の生検筋由来 cDNA を、*CLCN1* 遺伝子のエクソン 5 から 7 までを増幅するプライマーで PCR を行ったところ、DM1 患者では正常な *CLCN1*_N の発現量がほとんど見られず、代わりに異常な選択的スプライシングの産物である *CLCN1*_{6B7A}、*CLCN1*_{7A}、*CLCN1*_{6Δ6B7A} が発現していた (図 3-7 D)。このことから、マウス *Clcn1* 遺伝子のスプライシングの改善と同様に、ヒトにおいても、エクソン 6B およびエクソン 7A

の異常な挿入を抑制する戦略により、CLCN1_Nの発現量、ひいてはCLCN1タンパク質の発現量を回復させることができると考えられた。そこで、図 3-7 B に示すように、エクソン 6B および 7A をターゲットとする複数の 2OMePS オリゴを設計し、その効果を検証することにした。

培養細胞において *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシングを再現するため、EGFP 遺伝子の下流に *CLCN1* 遺伝子のエクソン 5 から 7 までの領域をクローニングしたミニ遺伝子 pCLCN1 を作製した (図 3-7 C)。pCLCN1 をヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞にトランスフェクションすると、CLCN1_{6B7A}、CLCN1_{7A}、CLCN1_{6Δ6B7A}、CLCN1_N 様のスプライスバリエントが観察された (図 3-7 D)。このミニ遺伝子からは同時に CLCN1_{5,7} という生検筋由来 cDNA では見られないスプライシング産物が生じるが、ヒト骨格筋では CLCN1_{5,8} というスプライスバリエントが生じることから (図 1-2) (19)、これに相当する産物だと考えられる。

HEK293 細胞に FuGENE6.0 を用いて pCLCN1 をトランスフェクションし、12~16 時間後に Lipofectamine 2000 を用いて 0、5、20、100 pmol の 2OMePS オリゴをトランスフェクションした。その 48 時間後に total RNA を抽出し、RT-PCR によって pCLCN1 のスプライシングを解析した。まず、EGFP からエクソン 7 までの領域を増幅するプライマーで PCR を行ったところ、図 3-8 A の結果を得た。100 pmol 用量ではコントロールを除くいずれのオリゴでも、CLCN1_{6B7A} の発現が低下していたが、マウスの実験で用いたのと同様の領域をターゲットとする 7A(+1+25)は、5 pmol 用量ですでに CLCN1_{6B7A} および CLCN1_{7A} の発現量を抑制しており、他のオリゴと比較してスプライシング改善効果が高い様子が見られた。

次に、エクソン 6B およびエクソン 7A の選択的スプライシングを詳しく観察するため、エクソン 6 からエクソン 7 までの領域を増幅するプライマーで PCR を行った (図 3-8 B)。また、オリゴ 20 pmol を用いた場合のそれぞれの PCR 産物の発現量について、ミニ遺伝子全体の発現量で補正した値を求めた (図 3-8 C)。それによると、検討した 5 種類のオリゴはいずれも CLCN1_{6B7A} の発現量を抑制したが、CLCN1_{7A} の発現量を抑制したのはエクソン 7A をターゲットとする 7A(+1+25)および 7A(-14+11)のみであった。また、7A(+1+25)はエクソン 7A の挿入を抑制すると同時に、CLCN1_N の発現量を有意に増加させた。CLCN1_{6B7A} に対してエクソン 7A の挿入を抑制すると、エクソン 6B のみが挿入されたスプライシング産物が生じる可能性もあったが、これに相当する PCR 産物は検出されなかった (図 3-8 B)。以上より、エクソン 7A の最初の 25 塩基に相補的なアンチセンスオリゴは、マウスのみならずヒトの *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシング異常に対しても、改善効果を示すことが明らかとなった。

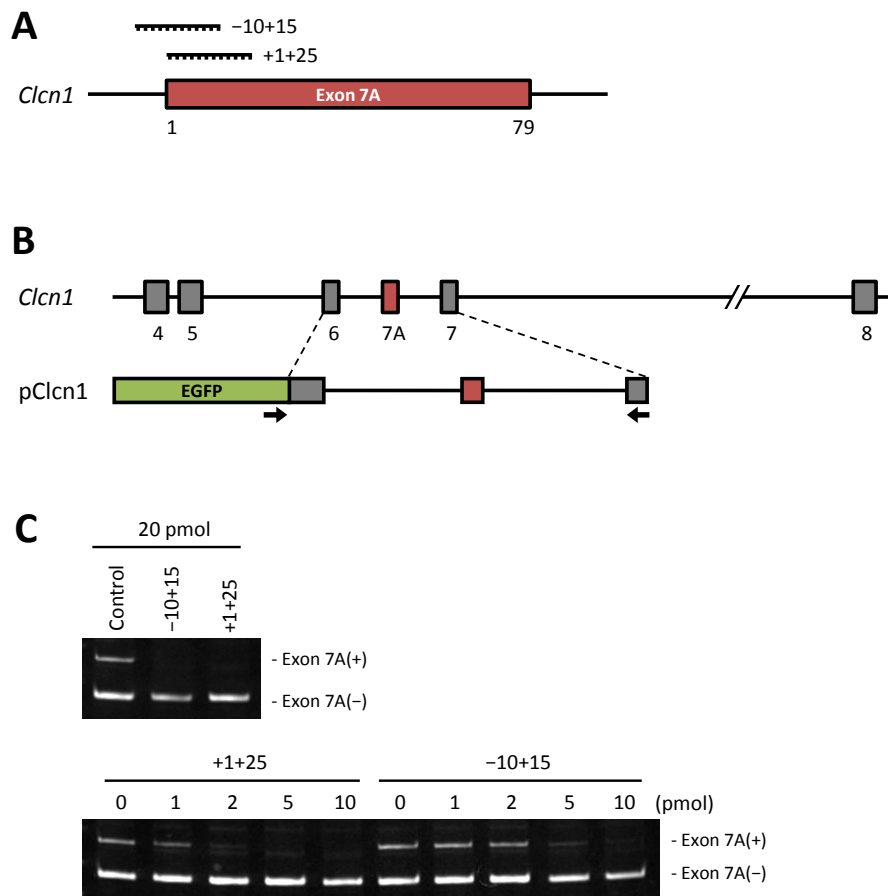


図3-1. C2C12細胞におけるアンチセンスオリゴの効果の検討

A) アンチセンスオリゴのターゲット領域。+1+25は当研究室の先行研究で明らかになった配列である。B) pClcn1ミニ遺伝子の構造。スプライシング産物の検出には矢印で示すプライマーを用いた。C) 2OMePSの*Clcn1*の選択的スプライシングに対する効果。C2C12細胞にpClcn1および2OMePSをトランスフェクションし、pClcn1の選択的スプライシングを解析した。

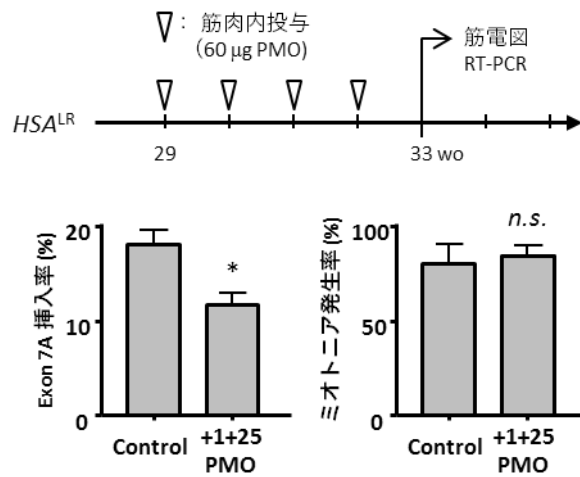


図3-2. 筋肉内投与による+1+25 PMOの効果

60 μgの+1+25 PMOを筋肉内投与により4回投与し、1週間後に筋電図測定およびRT-PCRによるスプライシングバターの解析を行った(上)。その結果、エクソン7Aの挿入率は低下したが、針電極を刺した際のミオトニアの発生率に改善効果は見られなかった。Studentの検定(Control, n = 4; PMO, n = 5; *, $P < 0.05$; *n.s.*, 有意差なし)。エラーバーは標準誤差範囲を示す。

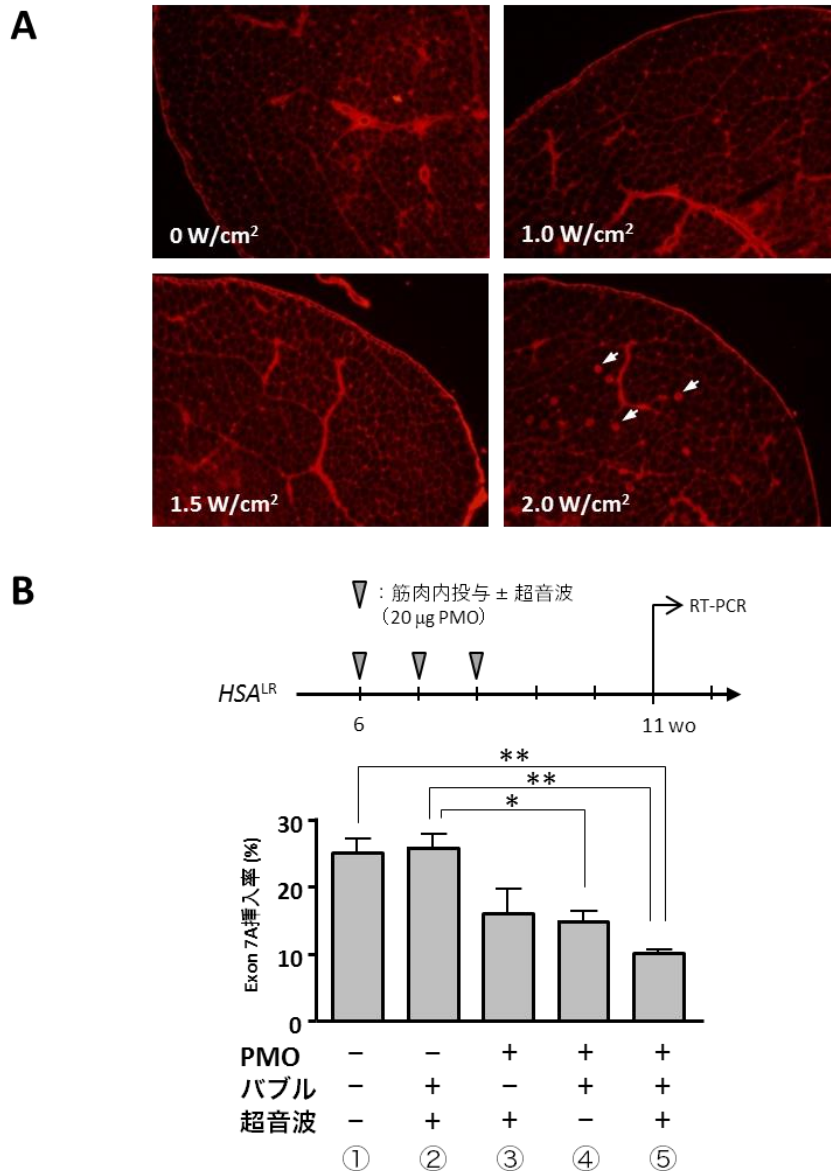


図3-3. バブルリポソーム法の条件検討

A) 超音波強度と組織ダメージの関係。野生型マウスのTA筋に異なる強度の超音波を1分間、50%の負荷サイクルで経皮的に照射した。その後、1% エバンスブルー溶液を腹腔内に投与し、24時間後に色素の取り込みを観察した。0、1.0、1.5 W/cm²の強度では、細胞間隙に色素が見られるものの、細胞内への色素の取り込みは見られない。2.0 W/cm²の強度ではいくつかの筋線維で色素の取り込みが見られる (矢印)。B) バブルリポソーム法の効果の検討。バブルリポソームおよび超音波の有無による効果の判定を行うため、図に示す条件で、20 μgの+1+25PMOを週に1回、3週間にわたって投与し、3週間後にRT-PCRによって*Cln1*遺伝子の選択的スプライシングを観察した。バブルリポソームおよび超音波を両方用いた条件で、エクソン7Aの挿入率は最も低下する傾向が見られた。Tukeyの多重検定 (n = 3; **, P < 0.01; *, P < 0.05)。エラーバーは標準誤差範囲を示す。

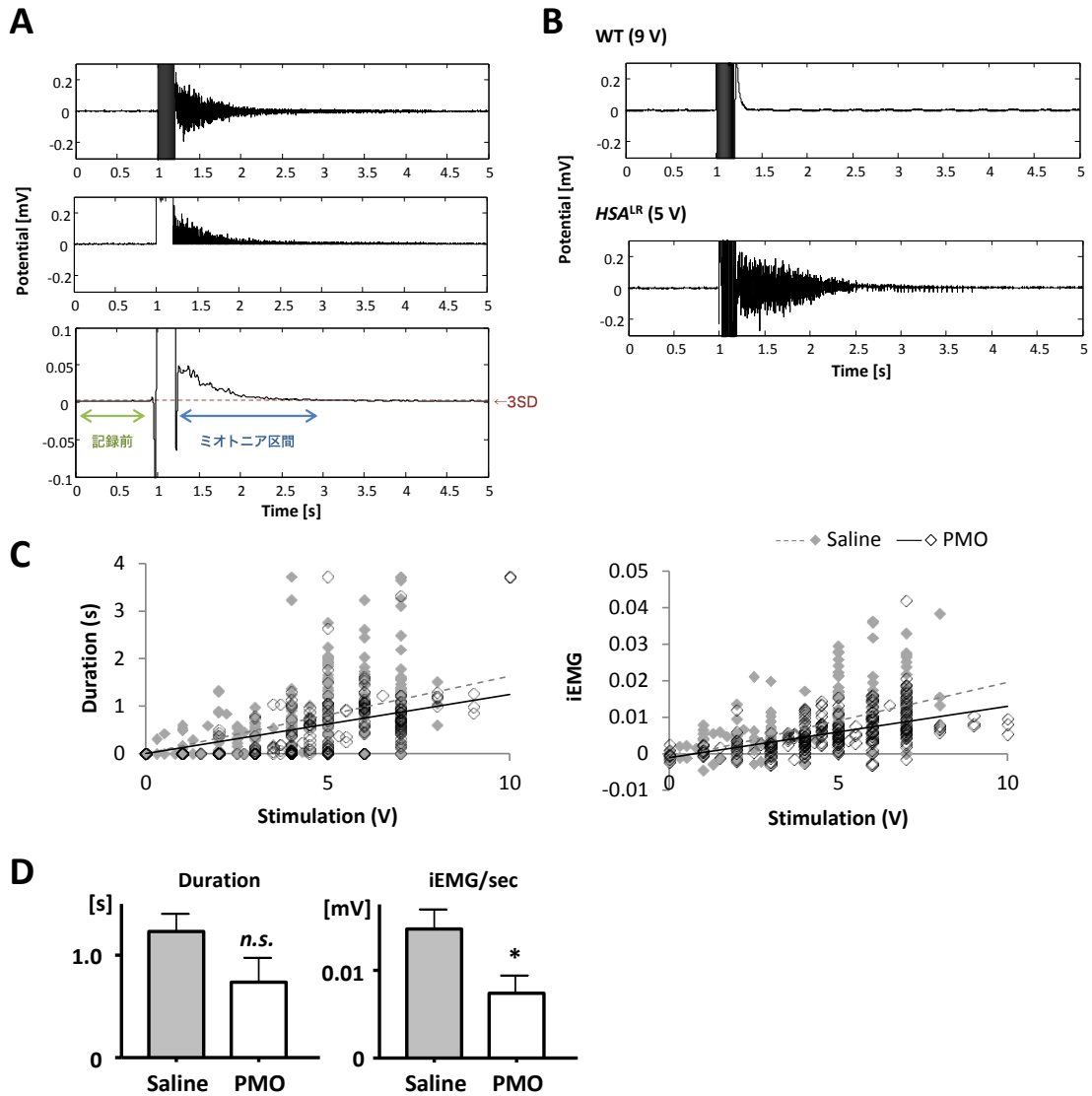


図3-4. +1+25 PMOのデリバリーとミオトニアの改善

A) HSA^{LR}マウスのTA筋の代表的な筋電図。記録開始から1秒後に200ミリ秒間、電気刺激を行うと、その後にバースト状の筋活動が見られる（上段）。この筋電図を全波整流し（中段）、スムージングを行った後（下段）、記録前の筋電図の分散の3倍（3SD）以上の筋活動を示す区間をミオトニアの持続時間として算出した。また、ミオトニア放電中の筋電図の積分値を積分筋電図（iEMG）として算出した。B) 野生型（WT）マウスのTA筋では、刺激強度を9 Vに上げても、ミオトニアは観察されない。C) 刺激強度とミオトニア持続時間（左）および積分筋電図（右）についての全データのプロット。D) 持続時間と単位時間当たりの筋電強度。Cのデータより、足首の屈曲が十分に見られる刺激強度での筋電図を個体ごとに平均し、2群間で比較した。+1+25 PMO投与群では、単位時間当たりの筋電強度（iEMG/sec）が低下した。Studentのt検定（Saline, n = 6; PMO, n = 7; *, $P < 0.05$; n.s., 有意差なし）。エラーバーは標準誤差範囲を示す。

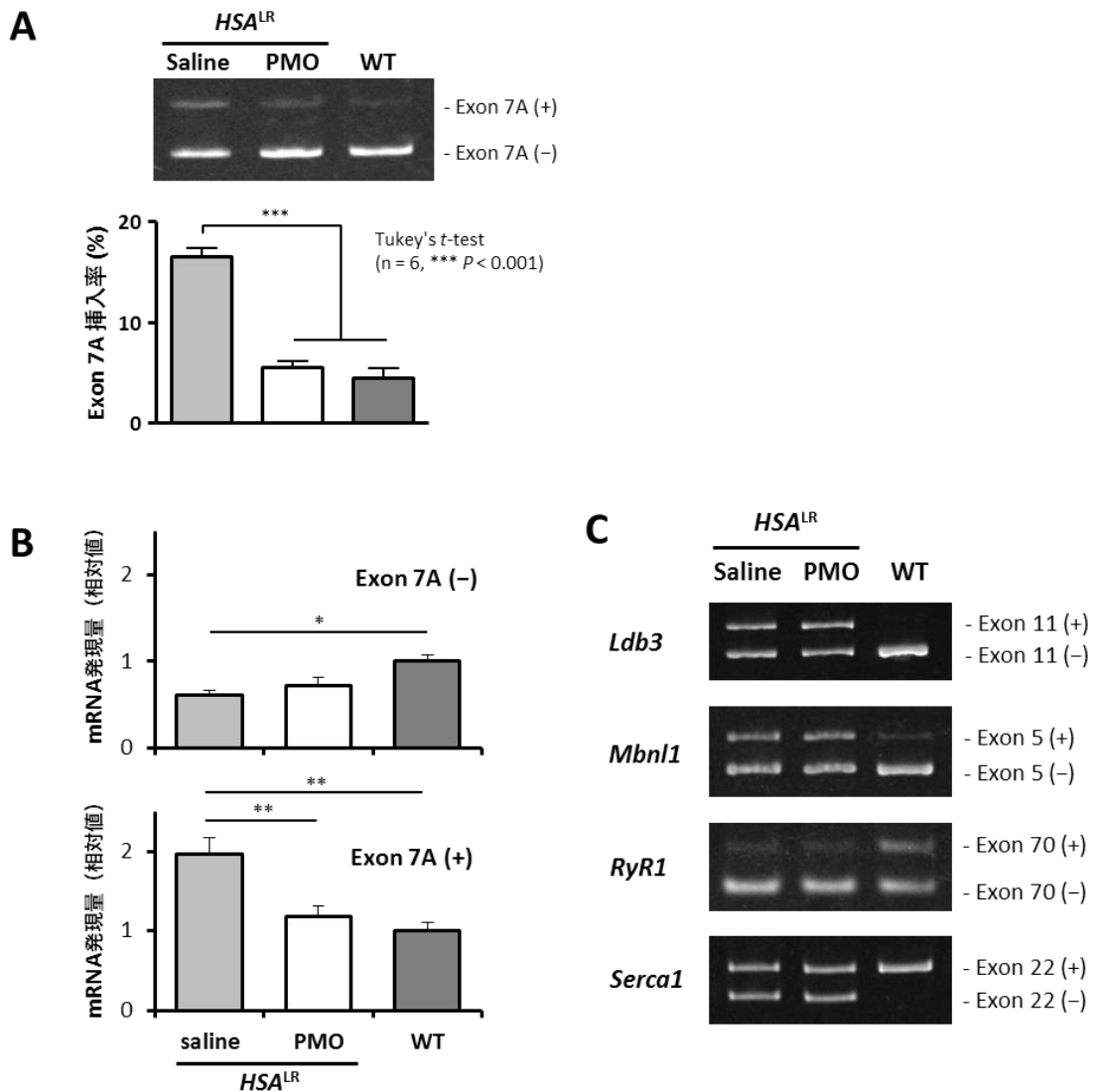


図3-5. +1+25 PMOのデリバリーと表現型への効果

A) RT-PCRによる*Clcn1*の選択的スプライシングの観察。+1+25PMO投与群におけるエクソン7Aの挿入率は、野生型 (WT) マウスと同程度にまで低下した。B) リアルタイムPCRによる*Clcn1*遺伝子の各スプライシングバリエーションの定量。+1+25PMO投与群では、エクソン7Aを含むバリエーションの発現量は低下したが (図下)、エクソン7Aを含まないバリエーションの発現量には有意な上昇はなかった (図上)。C) その他の遺伝子の選択的スプライシング。*HSA^{LR}*において同定されている*Clcn1*遺伝子以外の選択的スプライシング異常については、+1+25 PMO投与群と生理食塩水投与群 (Saline) とで変化はなかった。Tukeyの多重検定 ($n = 6$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差範囲を示す。

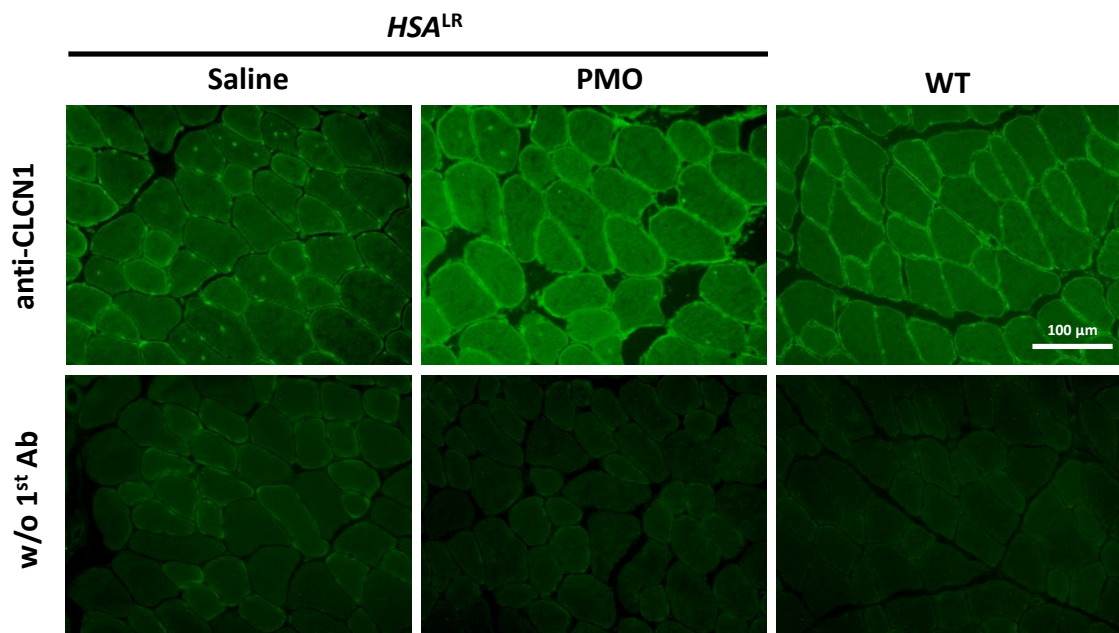


図3-6. +1+25 PMOのデリバリーとClcn1タンパク質の発現

野生型マウスおよび*HSA^{LR}*マウスのTA筋の抗Clcn1抗体による免疫組織染色像。野生型 (WT) では筋繊維の細胞膜が染色されているが、生理食塩水を投与した*HSA^{LR}*では、はっきりとした細胞膜の染色は見られない。+1+25PMO投与群ではClcn1タンパク質の細胞膜での発現が回復している。w/o 1st Abは、一次抗体を用いずに染色を行った像を示す。

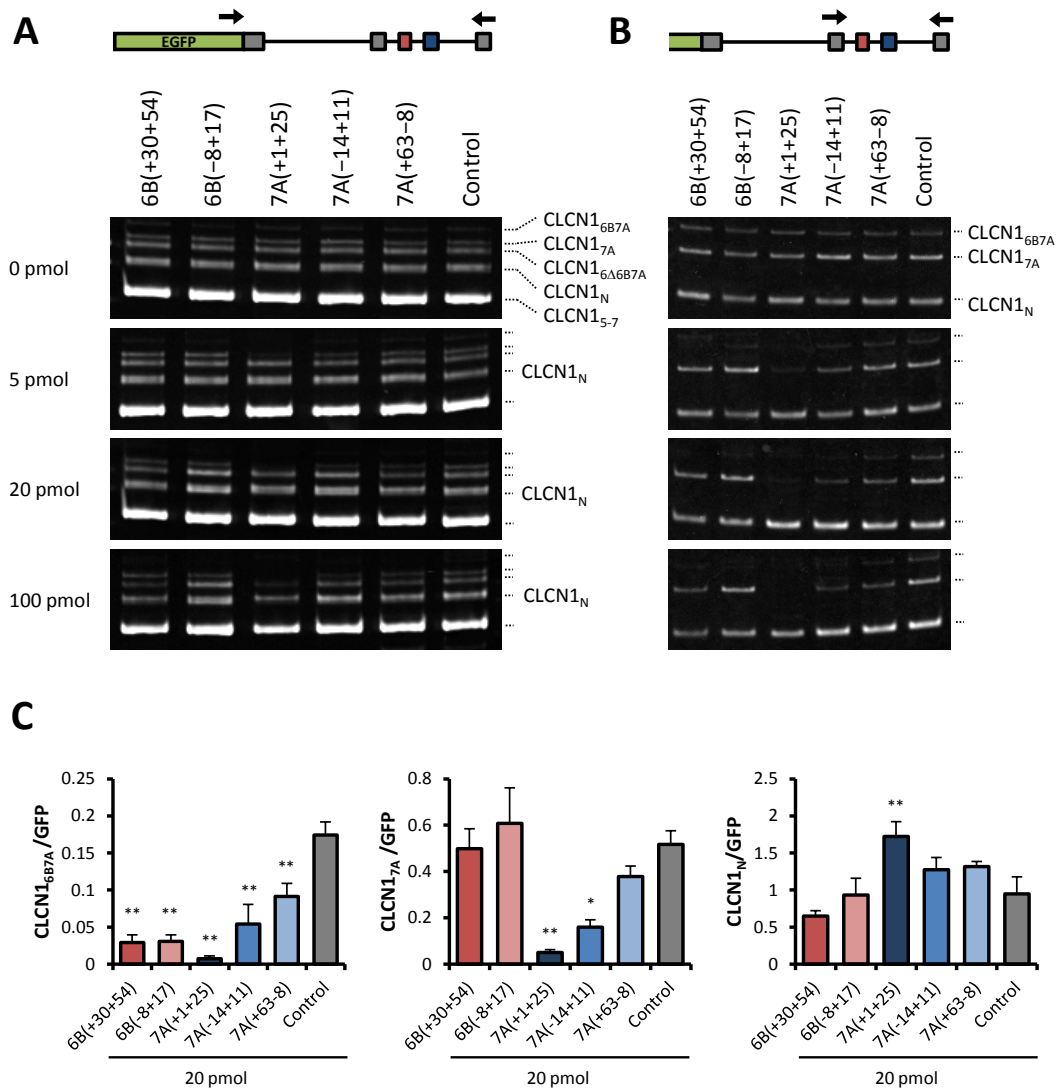


図3-8. ヒトCLCN1に対するアンチセンスオリゴの効果

A-B) HEK293細胞にpCLCN1および2OMePSをトランスフェクションした際のpCLCN1のスプライシングパターン。EGFPからエクソン7までの領域を増幅するプライマー (A) およびエクソン6からエクソン7までの領域を増幅するプライマー (B) でPCRを行った。C) 2OMePS 20 pmolをトランスフェクションした際の各スプライシング産物の発現量。(B)の結果からそれぞれのスプライシング産物の発現量を定量し、ミニ遺伝子全体(GFP)の発現量で補正した。7A(+1+25)が最も高いスプライシング改善効果を示した。Dunnettの多重検定 (n = 3; **, P < 0.01; *, P < 0.05)。エラーバーは標準誤差範囲を示す。

第4章 考察

4.1 アンチセンス法によるミオトニア治療

DMは全身性の症状を特徴とする疾患であり、病理機序においては様々な遺伝子の選択的スプライシングで異常が見られることから、選択的スプライシングの異常が多様な症状の原因なのではないかとみられている(66)。したがって、アンチセンス法による選択的スプライシング異常の改善は、DMに対する有効な治療法になることが期待される。DMの特徴的な症状であるミオトニアは *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシング異常で生じることから(19, 21)、本研究ではまずマウス *Clcn1* 遺伝子に対するアンチセンスオリゴを用いることで、DM1モデルマウスでのミオトニアの改善を試みた。アンチセンス法によるミオトニアの改善については先行研究があるが、本研究とは異なる配列のアンチセンスオリゴ(-14+11)とエレクトロポレーション法によるデリバリーを用いている(21)。本研究では、*Clcn1* のスプライシング異常の改善によりミオトニアが改善するという先行研究の結果を再現し、+1+25のアンチセンスオリゴとバブルリポソーム法がミオトニア治療に対して効果をもつことを明らかにした。

エレクトロポレーション法とバブルリポソーム法との違いについては後述するが、アンチセンスオリゴの配列の違いについては当研究室の先行研究で調べており、本研究で用いた+1+25 PMOが、Wheelerらが用いた-14+11 PMOと同等かより優れているという結果を得ている。同様に本研究では、ヒト *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシングに対しては、7A(+1+25)の方が7A(-14+11)よりも優れていることを明らかにした。7A(+1+25)がエクソンスキッピングを引き起こすことは、+1+25の領域に、エクソン7Aがエクソンとして認識されるために重要な *cis* 因子があることを示唆している。一般に、エクソンの認識にはSRタンパク質の結合が重要であり、SRタンパク質の認識部位を *exonic splicing enhancer* (ESE) と呼ぶ。7A(+1+25)はこのESEを覆い隠していると考えられるが、WEB上のESE検索ツールであるESEfinder 3.0(67)を用いてESEを検索したところ、7A(+1+25)の領域に特徴的なESEの分布は見られなかった(図4-1)。本研究で、アンチセンスオリゴが *Clcn1/CLCN1* の選択的スプライシングを改善した機構については不明であり、今後明らかにすべき課題である。現在のところ、最適なアンチセンス配列を予測するのは難しく、実験的に決定するしかないため、アンチセンスオリゴの作用機序の解明は、他の遺伝子のアンチセンスターゲットを決定する際に重要な情報を与えるものと期待される。

4.2 *Clcn1* 遺伝子のスプライシング異常とミオトニア

ところで、本研究で用いた *HSA*^{LR} マウスの TA 筋における *Clcn1*_{7A(-)} の発現量は野生型マウスの 6 割程度であった。*CLCN1* は確かに先天性ミオトニー症候群の責任遺伝子ではあるが (20)、*Clcn1* 遺伝子変異のヘテロ接合マウスはミオトニアを発症しないことや (68)、薬理的にミオトニアを引き起こすには 75% の *Clcn1* をブロックしなければならないことから (69)、*HSA*^{LR} マウスにおいてミオトニアが発症した原因は、*Clcn1* の発現量の低下だけでは説明がつかないように思われる。

これについては、以下の 3 通りの説明が可能である。第一に、異常なスプライスバリエントがドミナントネガティブにはたらく可能性がある。*CLCN1/Clcn1* 遺伝子の異常なスプライシング産物は、mRNA の途中で停止コドンを生じるため、もし翻訳されれば、尻切れのチャンネルタンパク質が産生される。Berg らは、ヒトの *CLCN1* 遺伝子の *CLCN1*_{6B7A} および *CLCN1*_{6A6B7A} がコードする尻切れタンパク質がチャンネルとしての機能を持たないばかりか、正常型のチャンネルタンパク質の機能を阻害することを示した (70)。この仮説に基づくと、アンチセンス法によるミオトニアの治療においては、いかに異常なスプライシングを減少させるかが重要となろう。この場合、本研究で検討したエクソンスキッピングだけではなく、異常スプライシング特異的な RNA 干渉や NMD の活性化といった方策も治療効果をもたらすかもしれない。

二つ目の仮説は、ミオトニアの原因は *Clcn1/CLCN1* の正常型スプライシングの発現量が低下することであるが、一部の筋線維でのみスプライシング異常が生じているために、筋肉全体で見ると異常なスプライスバリエントの割合は低いという可能性である。*HSA*^{LR} マウスの TA 筋の免疫組織染色像がモザイク状であることがこの見方を支持している。この場合には、異常を引き起こした筋線維にのみ薬剤をデリバリーできれば効率が良いが、現実的には、広範な筋線維にできるだけ多くのアンチセンスオリゴを導入することが必要であろう。後述するように、バブルリポソーム法によるデリバリー効果は限局的と考えられるため、デリバリー範囲をいかに拡大するかが課題である。

三つ目の仮説は、DM1 患者で見られるミオトニアが、*CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシング以外にも原因をもつ可能性である。ミオトニアを発症する疾患には、*CLCN1* 遺伝子の変異により発症する先天性ミオトニアの他に、先天性パラミオトニアやカリウム惹起性ミオトニア、高カリウム性周期性四肢麻痺が知られている (71)。これらは、ナトリウムイオンチャンネルをコードする *SCN4A* 遺伝子の変異により引き起こされることがわかっている。DM1 患者の骨格筋で *SCN4A* 遺伝子の選択的スプライシングが異常になるという報告はまだないが、骨格筋や心臓で他のナトリウムチャンネルの選択的スプライシング異常が見られて

いることから、こうした遺伝子の異常が *CLCN1* 遺伝子の異常と協調して、DM1 におけるミオトニアの発症に寄与している可能性が考えられる。その場合には、*CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシングを改善するだけではミオトニアは十分改善しない。本研究において、アンチセンスオリゴの投与にもかかわらず、ミオトニアが完全に消失しなかったことの説明も可能である。

4.3 ヒト *CLCN1* 遺伝子に対するアンチセンス法

ヒト *CLCN1* 遺伝子の選択的スプライシングは、マウス *Clcn1* 遺伝子のものよりも複雑であるが、エクソン 6B および 7A の異常な挿入に関しては、7A(+1+25)のみで改善可能であることが明らかとなった。*CLCN1*_{6B7A} に対して 7A(+1+25)が作用した場合、エクソン 6B のみが挿入した *CLCN1*_{6B} が産生されることが予想されたが、そのようなスプライシング産物は検出されなかった。一方、エクソン 6B に相補的なオリゴ、特に 6B(-8+17)を用いた場合には、*CLCN1*_N の量は変化せず、むしろ *CLCN1*_{7A} が増加する傾向にあった。スプライシングは、転写産物の 5'側から順番に起こるのではなく、いくつかのエクソンがクラスター状にスプライシングされた後、クラスターごとに次のスプライシングが起こるといった段階を経る (72)。本研究の結果から、エクソン 6B の挿入はエクソン 7A の挿入に依存しており、その逆は当てはまらないことが明らかとなった。DM1 患者ではエクソン 6B および 7A の挿入だけでなく、エクソン 6 や 7 のスキップも見られることから、*CLCN1* のエクソン 6 から 7 の領域は複雑な選択的スプライシングの制御を受けると考えられる。例えば、エクソン 6B の挿入がエクソン 7A の挿入に依存するという事は、イントロン 6B のドナー (5'スプライス) 部位がイントロン 6B のアクセプター (3'スプライス) 部位としかスプライシングを行わないということを示している。こうしたドナー-アクセプターの組み合わせの選択性が明らかにできれば、効果的なアンチセンスオリゴのターゲットが同定できよう。

また、上記で提示した *Clcn1* の選択的スプライシング異常とミオトニアの関係についての 3 つの仮説は、ヒト *CLCN1* 遺伝子に対するアンチセンス法にとっても重大な問題である。ヒト *CLCN1* 遺伝子では、異常なスプライスバリエントの種類が多く、いずれの異常バリエントも尻切れのタンパク質をコードする。本研究で示したように、一部の選択的スプライシングを改善することで、正常なスプライシング産物の発現量を増加させることは比較的容易だが、すべての異常バリエントを消失させることは難しい。したがって、アンチセンス法によるミオトニアの改善の実現性を考えるためには、上記の仮説の判別が重要である。異常なスプライスバリエントは NMD によって分解されると考えられるため、尻切れの *CLCN1* タンパク質が実際に産生されているかどうかを明らかにすべきであろう。

4.4 バブルリポソーム法による PMO デリバリー効果

アンチセンスオリゴなどによる核酸医薬は、標的分子に対して特異的な薬剤の設計が容易であり、DMに限らず、感染症や他の遺伝性疾患への応用へ向けて研究が進められている。PMOは人工核酸の中でも極めて毒性が低く、オリゴのオフターゲット作用を除けば、副作用がほとんどない点で、医薬品として非常に優れた作用をもつが、本研究でも示したように、細胞への取り込み効率が非常に悪いため、生体への投与では十分な効果が発揮できない問題点がある。この問題を解決するデリバリー法の一つとして、本研究ではバブルリポソーム法を検討し、PMOのデリバリーを促進することを示唆する結果を得た。

本研究では、*Cln1* 遺伝子のエクソン 7A の挿入率を指標として PMO の細胞内への取り込み量を推測したが、バブルリポソームの投与と超音波照射のみ（図 3-3 B ②）では *Cln1* 遺伝子の選択的スプライシングに対する改善効果は見られないことから、バブルリポソーム法で +1+25 PMO を投与した場合にエクソン 7A の挿入率が低下したのは、+1+25 PMO の細胞内への取り込み量を増加させたためだと考えてよいと思われる。

4.5 超音波によるデリバリー法の先行研究との比較

バブルリポソームと超音波照射のどちらか一方を用いた場合と比較して（図 3-3 B ③と④）、両者を組み合わせたバブルリポソーム法によるデリバリー（同、⑤）を行った場合、確かにスプライシングが改善する傾向は見られたものの、劇的に導入効率が改善されたわけではなかった。ところが、マイクロバブルによる遺伝子デリバリーに関する先行研究では、プラスミド DNA をデリバリーした場合にレポーター遺伝子の発現が大きく向上している。この違いの一つの理由として、導入している物質の違いが挙げられる。先行研究においては、プラスミド DNA やウイルスベクター、あるいはデキストランなど、オリゴヌクレオチドと比較するとかなり大きい分子であった（47, 50, 53, 56, 59-61, 73）。こうした分子にとっては、超音波やマイクロバブルなどによる小孔の形成があってはじめて、細胞内に取り込まれると推察される。一方で、本研究でも示したように、PMO は筋肉内投与だけでもある程度、細胞への取り込みが観察される。そのため、バブルリポソーム法による PMO のデリバリー以前に、筋肉内投与によって PMO がすでに細胞に取り込まれているために、バブルリポソーム法の効果が実際よりも小さく出てしまった可能性がある。

したがって、今後はバブルリポソーム法によるデリバリー効果を、筋肉内投与によらない投与方法、例えば血管内投与などによって検証していくことが必要であろう。血管内投与の場合、薬剤は組織に到達するまでに血管内皮細胞の壁を越える必要があり、バブルリ

ポソームがこの壁を越えて薬剤をデリバリーすることができるかどうかはわからない。しかし、他のマイクロバブルを用いた先行研究では、血管内投与によりプラスミド DNA を非侵襲的に骨格筋にデリバリーすることに成功している (61)。バブルリポソーム法の利点のひとつは、超音波を経皮的に照射することで非侵襲的にデリバリー効率を高められる点にあり、血管内投与はその利点を最大限に生かすことができる。したがって、血管内投与を介したバブルリポソーム法によるデリバリーは検討の価値のある投与方法である。

4.6 本研究の治療法の改善点

一方で、バブルリポソーム法を用いてデリバリーを行ってもなお、選択的スプライシング異常およびミオトニアが完全に回復しなかった点は、今後改善すべき課題である。Wheeler らの先行研究では、エレクトロポレーション法を用いてアンチセンスオリゴを導入し、ミオトニアをほぼ完全に回復させていることから、現在のところ PMO の導入効率に関しては、バブルリポソーム法はエレクトロポレーション法に及ばないと言える (21)。免疫組織染色の結果、バブルリポソーム法による Clcn1 発現量の増加は TA 筋の中央部で顕著であったことから、筋肉内投与で注射針を刺した部位の周辺にしかアンチセンスオリゴが到達せず、TA 筋の辺縁部の筋線維の選択的スプライシングが改善されなかった可能性が考えられる。筋電図測定において、PMO の投与によりミオトニアの筋総放電量を示す積分筋電図が低下したことは、中央部の筋線維のみミオトニアが改善し、放電する筋線維数が減少したと考えることで説明できる。

バブルリポソーム法のデリバリー効率に影響するもっとも重要なパラメータは超音波である。特に、超音波の出力強度はマイクロバブルの挙動を決定するため重要であり、一般に強度が強いほど細胞膜の透過性も向上する。しかしながら、多くの物理的なデリバリー法と同様、超音波強度が強すぎると細胞膜に修復不可能な穴をあけてしまい、組織に著しいダメージを与えることになる。図 3-3 A に示すように、本研究で用いた 2 W/cm^2 の超音波ではバブルリポソームを用いない条件でもわずかながらエバンスブルーの取り込みを示す筋線維が見られた。このことから、超音波強度をこれ以上強めても、組織にダメージを与えてしまい、副作用が強まると予想される。したがって、超音波強度の増強以外の方法でバブルリポソーム法のデリバリー効率を向上させる必要がある。

バブルリポソーム法と同様に物理的に細胞膜の透過性を高めるエレクトロポレーション法では骨格筋の強固な細胞外マトリクスが遺伝子デリバリーに対する物理的な障害となっていると考えられており、実際、ヒアルロニダーゼやコラゲナーゼ処理によって細胞外マトリクスを分解するとデリバリー効率が高まるという報告がある (74, 75)。Wheeler らも先

行研究においてこの処理を行っている。バブルリポソーム法では、バブルリポソームが細胞膜の近傍で振動したり崩壊したりすることで細胞膜の透過性が高まるため、細胞外マトリクスは、バブルリポソームが細胞に近づくことを阻むことでデリバリー効率を抑制していることが考えられる。したがって、バブルリポソーム法においても、ヒアルロニダーゼやコラゲナーゼ処理により、デリバリー効率を高めることが可能かもしれない。

また、骨格筋は血管に富む組織であることから、もし血管を通じて薬剤を導入することが可能になれば、本研究で見られたようなデリバリー領域が狭いことで治療効果が上がらないという問題は解決できるはずである。その点でも、上述の血管内投与によるバブルリポソーム法の開発は意義があると思われる。

4.7 バブルリポソーム法の DM 治療法への応用

DM は、全身性の様々な症状を呈する疾患であるが、特に、筋力低下による運動能力の低下や心伝導障害による生命予後の不良は、患者にとってもっとも大きな問題である (76)。筋力低下や心伝導障害の原因はミオトニアと異なり長い間不明であったが、近年その候補となる選択的スプライシング異常が明らかにされつつあり、本研究で検討したバブルリポソーム法によるアンチセンスオリゴのデリバリーを応用して、これらの異常も改善できると考えられる。筋力低下への関与が示唆される選択的スプライシング異常としては、例えば、T管形成に関与する *BINI* 遺伝子のエクソン 11 や、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子 (*DMD*) のエクソン 78 のスキップが見出されている (23, 77)。アンチセンス法はエクソンスキッピングに有効な手法ではあるが、ターゲット配列を適切に選択することで、エクソンの挿入を促進することも可能である (78)。また、より根本的な治療法として、DM の原因となっている伸長したリピート RNA の毒性を抑えるアンチセンス法が研究されている (79)。これは、CUG/CCUG リピートに相補的なオリゴによりリピート RNA を覆うことで、MBNL などの RNA 結合タンパク質が捕捉されることを防ぐという戦略に基づいている。当研究室では、CUG リピート RNA に相補的な CAGCAGCAGCAGCAG という配列をもつ PMO を、バブルリポソーム法により *HSA*^{LR} マウスに投与し、TA 筋で複数の選択的スプライシング異常を改善することに成功している (永野、未発表データ)。

バブルリポソーム法は超音波照射部位でのみデリバリーを促進するため、DM 患者の全身の骨格筋に対するデリバリーには困難が予想される。しかし、特定の骨格筋へのデリバリーを促進し、より低用量で効果を上げることができれば、副作用の面でも、経済的な面でも利点があると考えられる。DM1 は遠位筋の筋力低下が特に顕著な疾患であり、足底筋の

筋萎縮により姿勢維持が困難になったり、指先の筋力低下により細かい作業が困難になったりすることで、患者の生活の質（QOL）が低下している（2）。したがって、骨格筋の中でも手先や足先にある筋肉にターゲットを絞ってデリバリーを行うことは、効果的に患者の QOL を高める治療法となろう。また、もっとも薬剤のデリバリーが難しい組織のひとつである心筋は、心不全などによる DM 患者の死因のひとつになっており、有効な治療法が求められる組織である。先行研究においては、他のマイクロバブルを用いて、心筋へのプラスミド DNA のデリバリーに成功しており（80, 81）、バブルリポソーム法はオリゴヌクレオチドの心筋への投与にも応用できるのではないかと期待される。

本研究で用いた *HSA*^{LR} マウスは、選択的スプライシング異常やミオトニアを再現するものの、骨格筋でのみ CUG リpeat RNA を発現することから骨格筋以外では症状を呈さず、また、骨格筋でも筋萎縮や筋力低下は再現しない。したがって、ここで述べたような筋力低下や心臓に対する治療法を開発するためには、まずこうした症状を再現する DM モデルマウスの確立が必要であろう。

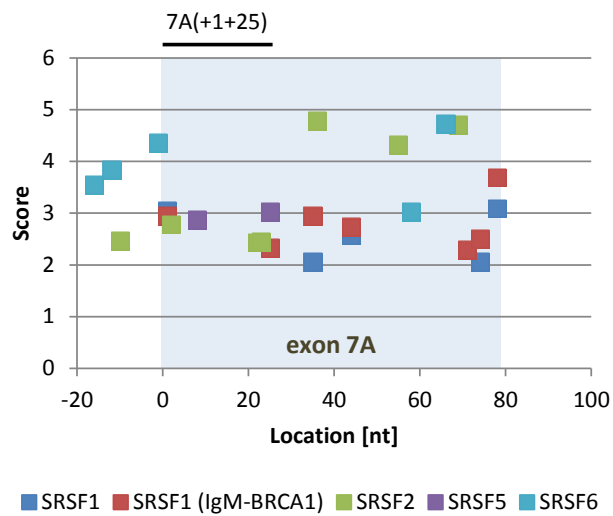


図4-1. *CLCN1*遺伝子のエクソン7AにおけるESE配列の分布

ESEfinder 3.0で予測したエクソン7A上のSRタンパク質の認識配列の分布を示す。それぞれの認識配列の予測確度 (Score) を縦軸にとっている。7A(+1+25)が結合する領域には、Scoreの高いESEが存在しない。

第 5 章 参考文献

1. Harley, HG, Brook, JD, Rundle, SA, Crow, S, Reardon, W, Buckler, AJ, Harper, PS, Housman, DE, and Shaw, DJ, Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 545-546.
2. Harper, PS, *Myotonic dystrophy*. 3rd ed. 2001, Philadelphia: W. B. Saunders. ix, 436 p.
3. Aslanidis, C, Jansen, G, Amemiya, C, Shutler, G, Mahadevan, M, Tsilfidis, C, Chen, C, Alleman, J, Wormskamp, NG, Vooijs, M, and et al., Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 548-551.
4. Brook, JD, McCurrach, ME, Harley, HG, Buckler, AJ, Church, D, Aburatani, H, Hunter, K, Stanton, VP, Thirion, JP, Hudson, T, and et al., Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 1992. **68**(4): p. 799-808.
5. Buxton, J, Shelbourne, P, Davies, J, Jones, C, Van Tongeren, T, Aslanidis, C, de Jong, P, Jansen, G, Anvret, M, Riley, B, and et al., Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 547-548.
6. Ranum, LP, Rasmussen, PF, Benzow, KA, Koob, MD, and Day, JW, Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 196-198.
7. Ranum, LP and Day, JW, Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet*, 2004. **74**(5): p. 793-804.
8. Mankodi, A, Takahashi, MP, Jiang, H, Beck, CL, Bowers, WJ, Moxley, RT, Cannon, SC, and Thornton, CA, Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 35-44.
9. Mankodi, A, Logigian, E, Callahan, L, McClain, C, White, R, Henderson, D, Krym, M, and Thornton, CA, Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1769-1773.
10. Taneja, KL, McCurrach, M, Schalling, M, Housman, D, and Singer, RH, Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol*, 1995. **128**(6): p. 995-1002.
11. Davis, BM, McCurrach, ME, Taneja, KL, Singer, RH, and Housman, DE, Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(14): p. 7388-7393.
12. Miller, JW, Urbinati, CR, Teng-Umnuay, P, Stenberg, MG, Byrne, BJ, Thornton, CA, and Swanson, MS, Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated

- with myotonic dystrophy. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4439-4448.
13. Kanadia, RN, Johnstone, KA, Mankodi, A, Lungu, C, Thornton, CA, Esson, D, Timmers, AM, Hauswirth, WW, and Swanson, MS, A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, 2003. **302**(5652): p. 1978-1980.
 14. Hao, M, Akrami, K, Wei, K, De Diego, C, Che, N, Ku, JH, Tidball, J, Graves, MC, Shieh, PB, and Chen, F, Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn*, 2008. **237**(2): p. 403-410.
 15. Roberts, R, Timchenko, NA, Miller, JW, Reddy, S, Caskey, CT, Swanson, MS, and Timchenko, LT, Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13221-13226.
 16. Lin, X, Miller, JW, Mankodi, A, Kanadia, RN, Yuan, Y, Moxley, RT, Swanson, MS, and Thornton, CA, Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(13): p. 2087-2097.
 17. Kalsotra, A, Xiao, X, Ward, AJ, Castle, JC, Johnson, JM, Burge, CB, and Cooper, TA, A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(51): p. 20333-20338.
 18. Charizanis, K, Lee, KY, Batra, R, Goodwin, M, Zhang, C, Yuan, Y, Shiue, L, Cline, M, Scotti, MM, Xia, G, Kumar, A, Ashizawa, T, Clark, HB, Kimura, T, Takahashi, MP, Fujimura, H, Jinnai, K, Yoshikawa, H, Gomes-Pereira, M, Gourdon, G, Sakai, N, Nishino, S, Foster, TC, Ares, M, Jr., Darnell, RB, and Swanson, MS, Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*, 2012. **75**(3): p. 437-450.
 19. Charlet, BN, Savkur, RS, Singh, G, Philips, AV, Grice, EA, and Cooper, TA, Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 45-53.
 20. Zhang, J, George, AL, Jr., Griggs, RC, Fouad, GT, Roberts, J, Kwiecinski, H, Connolly, AM, and Ptacek, LJ, Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) associated with dominant and recessive myotonia congenita. *Neurology*, 1996. **47**(4): p. 993-998.
 21. Wheeler, TM, Lueck, JD, Swanson, MS, Dirksen, RT, and Thornton, CA, Correction of ClC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest*, 2007. **117**(12): p. 3952-3957.
 22. Savkur, RS, Philips, AV, and Cooper, TA, Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 40-47.
 23. Fugier, C, Klein, AF, Hammer, C, Vassilopoulos, S, Ivarsson, Y, Toussaint, A, Tosch, V, Vignaud, A, Ferry, A, Messaddeq, N, Kokunai, Y, Tsuburaya, R, de la Grange, P, Dembele, D, Francois, V,

- Precigout, G, Boulade-Ladame, C, Hummel, MC, Lopez de Munain, A, Sergeant, N, Laquerriere, A, Thibault, C, Deryckere, F, Auboeuf, D, Garcia, L, Zimmermann, P, Udd, B, Schoser, B, Takahashi, MP, Nishino, I, Bassez, G, Laporte, J, Furling, D, and Charlet-Berguerand, N, Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med*, 2011. **17**(6): p. 720-725.
24. Taniguchi-Ikeda, M, Kobayashi, K, Kanagawa, M, Yu, CC, Mori, K, Oda, T, Kuga, A, Kurahashi, H, Akman, HO, DiMauro, S, Kaji, R, Yokota, T, Takeda, S, and Toda, T, Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*, 2011. **478**(7367): p. 127-131.
 25. Matsuo, M, Masumura, T, Nishio, H, Nakajima, T, Kitoh, Y, Takumi, T, Koga, J, and Nakamura, H, Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. *J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 2127-2131.
 26. Wu, B, Lu, P, Benrashid, E, Malik, S, Ashar, J, Doran, TJ, and Lu, QL, Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino. *Gene Ther*, 2010. **17**(1): p. 132-140.
 27. Yokota, T, Nakamura, A, Nagata, T, Saito, T, Kobayashi, M, Aoki, Y, Echigoya, Y, Partridge, T, Hoffman, EP, and Takeda, S, Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther*, 2012. **22**(5): p. 306-315.
 28. Rodino-Klapac, LR, Mendell, JR, and Sahenk, Z, Update on the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2013. **13**(3): p. 332.
 29. Agrawal, S, Ikeuchi, T, Sun, D, Sarin, PS, Konopka, A, Maizel, J, and Zamecnik, PC, Inhibition of human immunodeficiency virus in early infected and chronically infected cells by antisense oligodeoxynucleotides and their phosphorothioate analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(20): p. 7790-7794.
 30. Chu, RS, Targoni, OS, Krieg, AM, Lehmann, PV, and Harding, CV, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med*, 1997. **186**(10): p. 1623-1631.
 31. Lennox, KA and Behlke, MA, Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther*, 2011. **18**(12): p. 1111-1120.
 32. Hudziak, RM, Barofsky, E, Barofsky, DF, Weller, DL, Huang, SB, and Weller, DD, Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1996. **6**(4): p. 267-272.
 33. Stein, D, Foster, E, Huang, SB, Weller, D, and Summerton, J, A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-methyl RNA, DNA, and phosphorothioate DNA. *Antisense*

- Nucleic Acid Drug Dev*, 1997. **7**(3): p. 151-157.
34. Summerton, J and Weller, D, Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997. **7**(3): p. 187-195.
 35. Iversen, PL, Phosphorodiamidate morpholino oligomers: favorable properties for sequence-specific gene inactivation. *Curr Opin Mol Ther*, 2001. **3**(3): p. 235-238.
 36. Lindgren, M, Hallbrink, M, Prochiantz, A, and Langel, U, Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(3): p. 99-103.
 37. Moulton, HM, Fletcher, S, Neuman, BW, McClorey, G, Stein, DA, Abes, S, Wilton, SD, Buchmeier, MJ, Lebleu, B, and Iversen, PL, Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 4): p. 826-828.
 38. Leger, AJ, Mosquea, LM, Clayton, NP, Wu, IH, Weeden, T, Nelson, CA, Phillips, L, Roberts, E, Piepenhagen, PA, Cheng, SH, and Wentworth, BM, Systemic delivery of a Peptide-linked morpholino oligonucleotide neutralizes mutant RNA toxicity in a mouse model of myotonic dystrophy. *Nucleic Acid Ther*, 2013. **23**(2): p. 109-117.
 39. Lee, SH, Castagner, B, and Leroux, JC, Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? *Eur J Pharm Biopharm*, 2013. **85**(1): p. 5-11.
 40. Lakshmanan, S, Gupta, GK, Avci, P, Chandran, R, Sadasivam, M, Jorge, AE, and Hamblin, MR, Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013.
 41. Mellott, AJ, Forrest, ML, and Detamore, MS, Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 2013. **41**(3): p. 446-468.
 42. Escoffre, JM, Zeghimi, A, Novell, A, and Bouakaz, A, In-vivo gene delivery by sonoporation: recent progress and prospects. *Curr Gene Ther*, 2013. **13**(1): p. 2-14.
 43. Newman, CM and Bettinger, T, Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther*, 2007. **14**(6): p. 465-475.
 44. Zhou, Y, Shi, J, Cui, J, and Deng, CX, Effects of extracellular calcium on cell membrane resealing in sonoporation. *J Control Release*, 2008. **126**(1): p. 34-43.
 45. Fan, Z, Kumon, RE, Park, J, and Deng, CX, Intracellular delivery and calcium transients generated in sonoporation facilitated by microbubbles. *J Control Release*, 2010. **142**(1): p. 31-39.
 46. Deng, CX, Sieling, F, Pan, H, and Cui, J, Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*, 2004. **30**(4): p. 519-526.
 47. Mehier-Humbert, S, Bettinger, T, Yan, F, and Guy, RH, Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *J Control Release*, 2005. **104**(1): p. 203-211.

48. van Wamel, A, Kooiman, K, Hartevelde, M, Emmer, M, ten Cate, FJ, Versluis, M, and de Jong, N, Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*, 2006. **112**(2): p. 149-155.
49. Schlicher, RK, Radhakrishna, H, Tolentino, TP, Apkarian, RP, Zarnitsyn, V, and Prausnitz, MR, Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*, 2006. **32**(6): p. 915-924.
50. Saito, M, Mazda, O, Takahashi, KA, Arai, Y, Kishida, T, Shin-Ya, M, Inoue, A, Tonomura, H, Sakao, K, Morihara, T, Imanishi, J, Kawata, M, and Kubo, T, Sonoporation mediated transduction of pDNA/siRNA into joint synovium in vivo. *J Orthop Res*, 2007. **25**(10): p. 1308-1316.
51. Berwing, K and Schlepper, M, Echocardiographic imaging of the left ventricle by peripheral intravenous injection of echo contrast agent. *Am Heart J*, 1988. **115**(2): p. 399-408.
52. Lawrie, A, Brisken, AF, Francis, SE, Cumberland, DC, Crossman, DC, and Newman, CM, Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*, 2000. **7**(23): p. 2023-2027.
53. Taniyama, Y, Tachibana, K, Hiraoka, K, Namba, T, Yamasaki, K, Hashiya, N, Aoki, M, Ogihara, T, Yasufumi, K, and Morishita, R, Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1233-1239.
54. Korosoglou, G, Hardt, SE, Bekeredjian, R, Jenne, J, Konstantin, M, Hagenmueller, M, Katus, HA, and Kuecherer, H, Ultrasound exposure can increase the membrane permeability of human neutrophil granulocytes containing microbubbles without causing complete cell destruction. *Ultrasound Med Biol*, 2006. **32**(2): p. 297-303.
55. Wang, X, Liang, HD, Dong, B, Lu, QL, and Blomley, MJ, Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology*, 2005. **237**(1): p. 224-229.
56. Suzuki, R, Takizawa, T, Negishi, Y, Hagiwara, K, Tanaka, K, Sawamura, K, Utoguchi, N, Nishioka, T, and Maruyama, K, Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release*, 2007. **117**(1): p. 130-136.
57. Suzuki, R, Takizawa, T, Negishi, Y, Utoguchi, N, and Maruyama, K, Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non-viral system. *J Drug Target*, 2007. **15**(7-8): p. 531-537.
58. Suzuki, R, Takizawa, T, Negishi, Y, Utoguchi, N, Sawamura, K, Tanaka, K, Namai, E, Oda, Y, Matsumura, Y, and Maruyama, K, Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release*, 2008. **125**(2): p. 137-144.
59. Bekeredjian, R, Chen, S, Frenkel, PA, Grayburn, PA, and Shohet, RV, Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart.

- Circulation*, 2003. **108**(8): p. 1022-1026.
60. Lu, QL, Liang, HD, Partridge, T, and Blomley, MJ, Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther*, 2003. **10**(5): p. 396-405.
 61. Christiansen, JP, French, BA, Klivanov, AL, Kaul, S, and Lindner, JR, Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, 2003. **29**(12): p. 1759-1767.
 62. Koebis, M, Kiyatake, T, Yamaura, H, Nagano, K, Higashihara, M, Sonoo, M, Hayashi, Y, Negishi, Y, Endo-Takahashi, Y, Yanagihara, D, Matsuda, R, Takahashi, MP, Nishino, I, and Ishiura, S, Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2242.
 63. Kino, Y, Washizu, C, Oma, Y, Onishi, H, Nezu, Y, Sasagawa, N, Nukina, N, and Ishiura, S, MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(19): p. 6477-6490.
 64. Matsuda, R, Nishikawa, A, and Tanaka, H, Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem*, 1995. **118**(5): p. 959-964.
 65. Gurnett, CA, Kahl, SD, Anderson, RD, and Campbell, KP, Absence of the skeletal muscle sarcolemma chloride channel CIC-1 in myotonic mice. *J Biol Chem*, 1995. **270**(16): p. 9035-9038.
 66. Kuyumcu-Martinez, NM and Cooper, TA, Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Prog Mol Subcell Biol*, 2006. **44**: p. 133-159.
 67. Cartegni, L, Wang, J, Zhu, Z, Zhang, MQ, and Krainer, AR, ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(13): p. 3568-3571.
 68. Steinmeyer, K, Klocke, R, Ortland, C, Gronemeier, M, Jockusch, H, Grunder, S, and Jentsch, TJ, Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature*, 1991. **354**(6351): p. 304-308.
 69. Furman, RE and Barchi, RL, The pathophysiology of myotonia produced by aromatic carboxylic acids. *Ann Neurol*, 1978. **4**(4): p. 357-365.
 70. Berg, J, Jiang, H, Thornton, CA, and Cannon, SC, Truncated CIC-1 mRNA in myotonic dystrophy exerts a dominant-negative effect on the Cl current. *Neurology*, 2004. **63**(12): p. 2371-2375.
 71. Vicart, S, Sternberg, D, Fontaine, B, and Meola, G, Human skeletal muscle sodium channelopathies. *Neurol Sci*, 2005. **26**(4): p. 194-202.
 72. Takahara, K, Schwarze, U, Imamura, Y, Hoffman, GG, Toriello, H, Smith, LT, Byers, PH, and Greenspan, DS, Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a

- two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(3): p. 451-465.
73. Yang, SL, Mu, YM, Tang, KQ, Jiang, XK, Bai, WK, Shen, E, and Hu, B, Enhancement of recombinant adeno-associated virus mediated transgene expression by targeted echo-contrast agent. *Genet Mol Res*, 2013. **12**(2): p. 1318-1326.
74. Mennuni, C, Calvaruso, F, Zampaglione, I, Rizzuto, G, Rinaudo, D, Dammassa, E, Ciliberto, G, Fattori, E, and La Monica, N, Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum Gene Ther*, 2002. **13**(3): p. 355-365.
75. Cemazar, M, Golzio, M, Sersa, G, Escoffre, JM, Coer, A, Vidic, S, and Teissie, J, Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in various murine tumors. *Hum Gene Ther*, 2012. **23**(1): p. 128-137.
76. de Die-Smulders, CE, Howeler, CJ, Thijs, C, Mirandolle, JF, Anten, HB, Smeets, HJ, Chandler, KE, and Geraedts, JP, Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain*, 1998. **121 (Pt 8)**: p. 1557-1563.
77. Nakamori, M, Kimura, T, Fujimura, H, Takahashi, MP, and Sakoda, S, Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve*, 2007. **36**(2): p. 251-257.
78. Hua, Y, Sahashi, K, Rigo, F, Hung, G, Horev, G, Bennett, CF, and Krainer, AR, Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature*, 2011. **478**(7367): p. 123-126.
79. Wheeler, TM, Sobczak, K, Lueck, JD, Osborne, RJ, Lin, X, Dirksen, RT, and Thornton, CA, Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science*, 2009. **325**(5938): p. 336-339.
80. Chen, ZY, Liang, K, Qiu, RX, and Luo, LP, Ultrasound- and liposome microbubble-mediated targeted gene transfer to cardiomyocytes in vivo accompanied by polyethylenimine. *J Ultrasound Med*, 2011. **30**(9): p. 1247-1258.
81. Vannan, M, McCreery, T, Li, P, Han, Z, Unger, E, Kuersten, B, Nabel, E, and Rajagopalan, S, Ultrasound-mediated transfection of canine myocardium by intravenous administration of cationic microbubble-linked plasmid DNA. *J Am Soc Echocardiogr*, 2002. **15**(3): p. 214-218.

謝辞

本研究の遂行にあたり、数多くの方々にご協力やご助言を頂きました。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 西野一三部長には、DM 患者の生検筋サンプルをご供与頂いたり、実験設備を使用させていただくなど、大変お世話になりました。東京薬科大学薬学部 根岸洋一准教授、高橋葉子助教には、バブルリポソームを調整して頂きました。帝京大学医学部 園生雅弘教授、防衛医科大学校医学部 東原真奈助教、東京大学大学院総合文化研究科 柳原大教授、生理学研究所 山浦洋博士には筋電図測定で多大なるご協力を頂きました。東京大学大学院総合文化研究科 松田良一教授には、超音波発生装置やクリオスタットマイクロトームなどの使用をご快諾いただきました。厚く御礼申し上げます。

また、素晴らしい研究環境を与えてくださった東京大学大学院総合文化研究科 石浦章一教授に心より感謝申し上げます。学部 4 年次より 6 年もの長い間ご指導頂き、国際学会やその他の会議での研究発表、総説の執筆など数多くの貴重な機会を与えて頂きました。

石浦研の歴代の助教の方々と石浦研の OB のの方々には、幾多のご協力とご助言を頂きました。特に、東海大学工学部 笹川昇准教授、東北大学大学院農学研究科 二井勇人准教授、東京大学大学院総合文化研究科 周防諭助教、明治薬科大学 紀嘉浩講師、埼玉医科大学 大間陽子講師、東京大学生命科学ネットワーク 三橋弘明特任助教には、実験手法から研究の方向性に至るまで、多くのご指導とご助言を頂きました。重ねて御礼申し上げます。

この 6 年間の研究生生活が充実したものとなったのは、石浦研究室で同じ時間を過ごした先輩や同期、後輩たちのおかげです。たくさんの議論や雑談が日々の刺激となりましたし、実験では色々な面でご協力を頂きました。大変感謝しています。

最後に、これまで暖かく見守り支えてくれた家族と、永野花奈子に心からの感謝を寄せて、私の博士論文を締めくくりたいと思います。