

| | | | |
|---|--|----|-------|
| 京都大学 | 博士（医学） | 氏名 | 大原 寛明 |
| 論文題目 | Branchpoints as potential targets of exon-skipping therapies for genetic disorders (ブランチポイントは遺伝性疾患に対するエクソンスキッピング療法の有望な標的である) | | |
| (論文内容の要旨) 偽エクソンとは、遺伝的変異によって一部のイントロン配列がエクソンとして誤認識される RNA スプライシング異常であり、異常なアミノ酸の挿入や未成熟終止コドンによって遺伝子産物の構造や機能を変え、疾患の原因となる。近年、大規模ゲノムシーケンス技術の発展により、神経筋疾患にも多数の偽エクソン型変異が報告されてきた。福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は <i>FKTN</i> 遺伝子の機能不全によって起こる難治性の遺伝性疾患で、出生時からの重度の筋力低下を特徴とする。c.647+2084G>T は 64 塩基対の偽エクソンを生じ、重度の FCMD を発症する。 RNA スプライシングは 3' スプライス部位 (SS)、5' SS、ブランチポイント (BP) といった重要な制御配列や、それらの強度を調節するエクソン内スプライシング促進配列 (ESE) などによって制御される。エクソンスキッピングはこれらの制御・調節配列を阻害することで達成される。c.647+2084G>T 変異に起因する偽エクソンに対して最適なエクソンスキッピング戦略を見つけるために、高感度発光スプライシングレポーターを作成し、RNA スプライシング制御に焦点を当てた化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行った。その結果、偽エクソンを効率的にスキップする化合物として、BP を認識するスプライシング因子 3B サブユニット 1 (SF3B1) 阻害剤を見出した。SF3B1 阻害剤はエクソンを広くスキップさせることが知られており、 <i>FKTN</i> 遺伝子の他のエクソンに対する影響を確認したところ、偽エクソン以外のスプライシングにも変化がみられた。より特異的な方法で BP を標的とするために、BP を標的とした AON (BP-AON) を設計し、偽エクソンを特異的にスキップすることで、エクソンスキッピングの標的としての BP の有効性を確認することとした。 FCMD 患者由来の筋芽細胞から分化させた筋管において、BP-AON は <i>FKTN</i> mRNA を回復させ、 <i>FKTN</i> の機能回復を示す、糖化型 α ジストログリカンタンパク質を増加させた。従来、BP には冗長性があることが報告されてきたが、スプライシング中間体の検出や、 <i>FKTN</i> レポーター遺伝子で BP に変異を導入することにより、機能的な BP を同定し、AON がこの部位を阻害することで有効なエクソンスキップが生じることを証明した。これらの結果は、機能的 BP を同定し、過不足なく阻害することで、効率的なエクソンスキップを誘導出来ることを示唆した。次に、この戦略の一般性を確認するため、FCMD を引き起こす別の変異、3'-非翻訳領域の SINE-VNTR-Alu 型レトロトランスポゾン挿入変異に対して BP-AON を設計した。FCMD 患者由来筋芽細胞から分化させた筋管において、BP-AON はこの変異でも <i>FKTN</i> mRNA と糖化型 α ジストログリカンの産生を回復させた。 以上の結果から、BP が遺伝性疾患の治療としてのエクソンスキッピング戦略において有望な標的となりうることを示した。エクソンスキッピングの AON の開発は ESE または SS を標的としており、BP を標的とする AON は開発されていない。BP は塩基配列からの予測が難しいとされ、AON によるエクソンスキッピングの良い標的とはされてこなかったが、近年の AI 技術の発展により BP 予測精度も向上している。本研究のように機能的な BP を予測・同定することができれば、その阻害は効果的なエクソンスキッピングにつながる可能性がある。この新しい AON 設計戦略は、多くの遺伝性疾患に対しての新規治療法開発につながるものと期待される。 | | | |

(論文審査の結果の要旨)

FKTN の変異は福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の原因となり、c.647+2084G>T 変異は 64 塩基対の偽エクソンを生じる。この偽エクソンをモデルとしてより効果的なエクソンスキッピング戦略を検証した。まず、高感度発光スプライシングレポーターを用いて RNA スプライシング制御関連化合物ライブラリーをスクリーニングし、SF3B1 阻害剤を特定してブランチポイント (BP) が治療標的となりうることを見出した。アンチセンス核酸 (AON) による BP の阻害 (BP-AON) が治療戦略として有用かを検証するため、当該偽エクソンの BP と推定される部位に設計した AON で FCMD 患者の筋管を処理し、mRNA と下流のタンパク質の糖化産物の増加を確認した。スプライシング中間体と *FKTN* レポーター遺伝子を用いた変異体解析により、BP-AON が確かに機能的に BP を阻害していることを確認した。この知見を応用して、FCMD の別変異である SINE-VNTR-Alu 型レトロトランスポゾン挿入変異においても、*FKTN* の mRNA と下流のタンパク質の糖化産物を増加させる BP-AON を設計することに成功した。
 以上の研究は、新たなエクソンスキッピングの標的となりうるスプライシング制御配列の有用性の解明に貢献し、遺伝性疾患の治療戦略の拡大に寄与するところが多い。
 したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。
 なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 12 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降