

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012年1月5日(05.01.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/001941 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) C07D 277/64 (2006.01)
A61K 31/428 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01) C12N 9/99 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/003655
- (22) 国際出願日: 2011年6月27日(27.06.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-146699 2010年6月28日(28.06.2010) JP
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 萩原 正敏(HAGIWARA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP). 松尾 雅文(MATSUO, Masafumi) [JP/JP]; 〒6512180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬5 1 8 神戸学院大学内 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 直行 (KATAOKA, Naoyuki) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP). 西田 篤史 (NISHIDA, Atsushi) [JP/JP]; 〒6780082 兵庫県相生市若狭野町下土井2 7 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2012/001941 A1

(54) Title: PROPHYLACTIC OR AMELIORATING AGENT FOR GENETIC DISEASES

(54) 発明の名称: 遺伝性疾患の予防・改善剤

(57) Abstract: Disclosed is a prophylactic or ameliorating agent for a genetic disease which is induced by the mutation of an exon in a gene and in which an exon that contains the mutation is skipped so as to produce a functional truncated protein. Specifically disclosed is a prophylactic or ameliorating agent for a genetic disease which is induced by the mutation of an exon in a gene and in which an exon that contains the mutation is skipped so as to produce a functional truncated protein, wherein the prophylactic or ameliorating agent is characterized by comprising a compound having a molecular weight of 1500 or less.

(57) 要約: 本発明は、遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤を提供することを目的とする。遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物を含有することを特徴とする予防・改善剤を用いる。

明 細 書

発明の名称： 遺伝性疾患の予防・改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物を含有することを特徴とする予防・改善剤に関する。

背景技術

[0002] 筋ジストロフィーは、筋繊維の破壊・変性（筋壊死）と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称であり、中でも、進行性筋ジストロフィーがよく知られている。進行性筋ジストロフィーの1種であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy：DMD）は、筋ジストロフィーの中でも最も一般的であり、X染色体上のジストロフィン遺伝子の変異によって発症する（非特許文献1参照）。幼少期から発症する進行性筋萎縮により、DMD患者は通常20歳代で、心不全又は呼吸器不全により死亡するとされている。

[0003] ジストロフィンタンパク質（以下、単に「ジストロフィン」とも表示する。）は、筋細胞の細胞膜の内側に存在して、アクチン-ミオシンによる筋肉の収縮により生じる機械的なエネルギーを、細胞膜や周りの結合組織、腱などにバランス良く伝え、過度の衝撃が加わらないように調節することによって、筋細胞の構造を保つ役割等を果たしている。DMD患者の場合、そのジストロフィン遺伝子の変異のため、筋繊維の中に全く、あるいはほんの少ししかジストロフィンが存在しないので、筋肉の収縮により筋細胞の細胞膜が壊れて、通常より多量のカルシウムイオンが筋繊維中に流入してしまう。過度のカルシウムは、カルペインやプロテアーゼ等の、筋肉を壊したりアポトーシスを誘導する酵素を活性化し、その結果、線維芽細胞が活性化されて繊維化が生じ、組織が癒痕化して、筋細胞が再生されにくくなり、筋萎縮が進

行していく。

[0004] 一方、進行性筋ジストロフィーの1種であるベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy : BMD) も、ジストロフィン遺伝子の変異により発症するが、その発症時期は通常成人であり、症状の進行もDMDと比較して緩徐である。DMDとBMDは、いずれもジストロフィン遺伝子の変異により発症するにもかかわらず、症状の程度や進行速度が異なっている。DMDとBMDのこの違いは、読み枠ルールによって説明される。ジストロフィンmRNAにおいて中途終止コドン (premature termination codon : PTC) を生じる変異 (ナンセンス変異) では、重篤なDMD表現型 (デュシェンヌ型) を通常もたらずが、ジストロフィンmRNAの元々の読み枠が維持される変異 (インフレームの変異) では、より軽症のBMD表現型 (ベッカー型) となる (非特許文献2参照)。しかし、意外なことに、いくつかの軽症BMD患者では、ジストロフィン遺伝子上にナンセンス変異を有しているにもかかわらず、そのナンセンス変異を含むエクソンがスキッピングされることによって、新規なインフレームのジストロフィンmRNAが産生されているとの報告がされている (非特許文献3~6参照)。スキッピングにより一部のエクソンを欠いたこのジストロフィンmRNAがコードするジストロフィン (トランケート型ジストロフィン) は、正常なジストロフィンよりも短いですが、筋細胞の構造を保つ機能がある程度残存しているため、筋ジストロフィーの症状は比較的軽く、また、筋萎縮の進行速度も緩やかとなる。

[0005] 筋ジストロフィーの根本的な治療法は未だ確立されておらず、従来、機能訓練や関節拘縮予防のためのストレッチのほか、心不全・呼吸障害に対する対症療法が行われていたに過ぎなかった。しかし、近年、本発明者らや、他の研究者らによって、DMDに対する新たな治療法が開発され、期待が集まっている。この治療法は、ジストロフィンmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を用いて、エクソンスキッピングを誘導することによって、DMD表現型からBMD表現型への転換を図り、症状を軽減させる方法 (非特許文献3) である。DMD患者の細胞でエクソンスキッピン

グを誘導するために、スプライス部位又はスプライシング促進エレメントのいずれかに対して何種類かの異なるAONがデザインされた。これらのAONは、ジストロフィンmRNAの読み枠を修復することができた。例えば、エクソン19のエクソンスプライシングエンハンサー（ESE）に対するAONによって、前述のDMD患者細胞におけるエクソン19のスキッピングが生じ、トランケート型ジストロフィンの生成が観察された（非特許文献3～5参照）。また、エクソン51に対するAONもまた患者細胞に対して多く使用され、現在、これらのAONは臨床研究段階にある（非特許文献6～8参照）。

[0006] しかしながら、AONは、定期的に筋肉注射又は静脈注射しなければならず、患者にとって煩わしいという問題点や、多量の調製には高額な費用がかかるという問題点があった。さらに、筋ジストロフィーモデルマウスであるmdxマウスにAON処理を行ったところ、骨格筋ではジストロフィンの発現がある程度回復したが、心臓におけるジストロフィン発現の回復は困難であった（非特許文献9）。したがって、エクソンスキッピングを調節する低分子が临床上非常に望まれている。低分子の非アミノグリコシドナンセンス変異サプレッサー化合物であるPTC124（登録商標）（3-[5-(2-フルオロフェニル)-1,2,4-オキサジアゾル-3-イル]安息香酸）が、ナンセンス変異を持つ一部のDMD患者を治療し得ることが報告されており（非特許文献10や11）、現在、米国等において、フェーズ2bの臨床試験が行われている。PTC124は、リボゾームが翻訳時に中途終止コドン（PTC）を読み飛ばす（read-through）ように誘導することにより、全長の機能的なジストロフィンの発現をある程度回復させる治療薬であるが、他の遺伝子のナンセンス変異依存mRNA分解機構に与える影響については、まだ不明である。

[0007] ところで、本発明者らは、Cdc-likeキナーゼ（Clk）特異的なキナーゼ阻害剤として、TGO03（後述の一般式（1）において、R₁及びR₂がメチル基であり、R₃がメトキシ基である化合物）を同定した。TGO

03は、インビトロとインビボの両方でスプライシングに影響を及ぼす化合物であり（非特許文献12及び13参照）、本発明者らが関わる特許出願（特許文献1参照）には、TGO03がSRタンパク質のリン酸化反応を介して、オルタナティブスプライシングを調節する作用を有していることや、かかる作用を利用して、がん等の疾患の予防や治療を行いうることが記載されている。しかし、TGO03が、ジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングを促進し得ることはこれまで知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：米国特許出願公開第20050171026号明細書

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Cell (1988) 53, 219-228.

非特許文献2：Genomics (1988) 2, 90-95.

非特許文献3：Pediatr Res (2006) 59, 690-694.

非特許文献4：Biochem Biophys Res Commun (1996) 226, 445-449.

非特許文献5：J Clin Invest (1995) 95, 515-520.

非特許文献6：Lancet neurology (2009) 8, 873-875.

非特許文献7：The New England journal of medicine (2007) 357, 2677-2686.

非特許文献8：Lancet neurology (2009) 8, 918-928.

非特許文献9：Nature medicine (2006) 12, 175-177.

非特許文献10：J Clin Pharmacol (2007) 47, 430-444.

非特許文献11：Nature (2007) 447, 87-91.

非特許文献12：The Journal of biological chemistry (2004) 279, 24246-24252.

非特許文献13：Genes Cells (2008) 13, 233-244.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物を含有することを特徴とする予防・改善剤を提供することを課題とする。

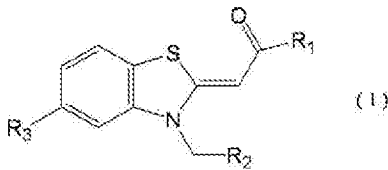
課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、筋ジストロフィー患者400名以上について、そのジストロフィン遺伝子の変異を解析したところ、背景技術記載の読み枠ルールでは、重篤なDMD表現型となることが予想されるナンセンス変異をエクソン31に有するものの、症状はBMD型である患者を発見した。かかる患者のジストロフィン遺伝子のmRNAを分析したところ、エクソン31におけるそのナンセンス変異が、エクソン31のスキッピングを誘導し、それによって、機能性トランケート型ジストロフィンをコードする成熟mRNAを一部生成していることが判明した。そこで、本発明者らは、エクソンスキッピングを促進する低分子化合物を探し求め、Cdk特異的阻害剤であるTG003が、内在性ジストロフィン遺伝子のエクソン31やエクソン27のスキッピングを用量依存的に促進し、患者の細胞において機能性トランケート型ジストロフィンの産生を増強させ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0012] すなわち、本発明は、(1) 遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物を含有することを特徴とする予防・改善剤や、(2) 前記化合物が、スプライシング調節作用を有する化合物であることを特徴とする上記(1)に記載の予防・改善剤や、(3) 前記化合物が、変異が含まれるエクソンのスキッピングを誘導・促進させる効果を有する化合物であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の予防・改善剤や、(4) 前記化合物が、Cdc-likeキナーゼ阻害化合物であることを特徴とする上記(1)

～（３）のいずれかに記載の予防・改善剤や、（５）前記 Cd c - l i k e キナーゼ阻害化合物が、一般式（１）

[化1]



[式中、 R_1 及び R_2 は各々独立に、直鎖状、分岐鎖状の C_1-C_{10} 炭化水素基を示し； R_3 はメトキシ基、エトキシ基、アセトキシ基又はハロゲン原子を示す。]

で表される化合物であることを特徴とする上記（４）に記載の予防・改善剤や、（６）前記変異が、ナンセンス変異であることを特徴とする上記（１）～（５）のいずれかに記載の予防・改善剤や、（７）前記ナンセンス変異が、前記遺伝子におけるエクソンスプライシングエンハンサー活性を抑制し、及び／又は、前記遺伝子におけるエクソンスプライシングサイレンサー活性を上昇させる、ナンセンス変異であることを特徴とする上記（６）に記載の予防・改善剤や、（８）前記遺伝子がジストロフィン遺伝子であり、前記機能性トランケート型タンパク質が機能性トランケート型ジストロフィンタンパク質であり、前記遺伝性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーであることを特徴とする上記（１）～（７）のいずれかに記載の予防・改善剤や、（９）前記ジストロフィン遺伝子のエクソンが、ジストロフィン遺伝子のエクソン 31 又はエクソン 27 であることを特徴とする上記（８）に記載の予防・改善剤や、（１０）前記ジストロフィン遺伝子のエクソン 31 の変異が、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 4303 におけるグアニンのチミンへのナンセンス変異であり、エクソン 27 の変異が、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3613 におけるグアニンが欠失したアウトオブフレーム変異であることを特徴とする上記（９）に記載の予防・改善剤に関する。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、遺伝性疾患の要因となる変異が含まれる遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導・促進させることによって、機能性トランケート型タンパク質の発現を誘導・上昇させ、その結果、該遺伝性疾患を予防・改善することができる。また、本発明で用いる分子量1500以下の化合物は低分子であり、組織移行性等に優れているため、高分子である従来のAONでは十分な効果が得られなかった心臓等の臓器においても、十分な予防・改善効果が期待できる。さらに、本発明が対象とする変異はナンセンス変異に限らないため、遺伝性疾患の要因となる多様な変異への適用も期待できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]患者のジストロフィン遺伝子のエクソン31における点変異によりエクソンスキッピングが生じ、トランケート型ジストロフィン遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)が修復される様子を示す図である。(a)患者番号KUCG797のジストロフィン遺伝子で見い出された点変異を示す。エクソン31のc. 4303G>T (p. Glu1435X)変異の位置をバーで示す。隣接するイントロン領域のDNA配列、並びに変異で変わったコドンを示す。(b)パネルe~gは、前記患者におけるジストロフィン発現を免疫組織化学法で調べた結果を示し、パネルb~dは、健常者におけるジストロフィン発現を免疫組織化学法で調べた結果を示す。パネルe及びbはDYS2で染色した結果を示し、パネルf及びcはDYS3で染色した結果を示し、パネルg及びdはMANDYS1で染色した結果を示す。スケールバー=60μM。(c)コントロール及び患者筋肉から得たRT-PCR産物についてアガロースゲル分析を行った結果を示す。左レーン(M)は、φX174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを用いた結果を表し、中央レーン(Control)は、健常者由来のトータルRNAをテンプレートした結果を表し、右レーン(Patient)は、KUCG797由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表す。これらのバンドのDNA配列を解析し、これらPCR産物の構造をそのヌクレオチド長と共にパネル右側に概略的に示した。番号付きボックスはジストロフィンの

エクソン番号を示す。パネル左側には、DNAサイズマーカーの長さをヌクレオチド長として示す。(d) 前述の(c)における小さいサイズの増幅産物の配列決定を行った結果を示す。(e) ジストロフィン遺伝子の野生型(WT)又は変異型(c. 4303G>T)のいずれかのエクソン31を含むハイブリッドミニ遺伝子プラスミドの概略図を示す。パネル右側のボックス及びラインはそれぞれエクソン及びイントロンを示す。(f) H492-dys Ex31m/HeLaから回収した変異型mRNAや、H492-dys Ex31w/HeLaから回収した野生型mRNAのRT-PCR産物などをアガロースゲル上で電気泳動した結果を示す。一番左のレーン(M)は、 ϕ X174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを用いた結果を表し、左から2番目のレーン(w)は、H492-dys Ex31w/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表し、左から3番目のレーン(m)は、H492-dys Ex31m/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表す。これらPCR産物の構造をパネル右側に概略的に示す。また、DNAサイズマーカー及びPCR産物のヌクレオチド長を、それぞれパネルの左側及び右側に示す。また、右から2番目及び3番目のレーンは、逆転写酵素(RT)を添加しないこと以外は同様にRT-PCR処理したものをアガロースゲル上で電気泳動した結果を表し、右から2番目のレーン(w)はH492-dys Ex31w/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表し、一番右のレーン(m)はH492-dys Ex31m/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表す。

[図2] スプライシングを調節するRNA結合タンパク質に対するエクソン31中の結合配列を予測する図である。(a) ジストロフィン遺伝子の野生型エクソン31(左パネル)又はc. 4303G>Tのエクソン31(右パネル)に結合できるRNA結合候補タンパク質をSpliceAidプログラムにより予測した結果を示す。エクソンであるとの定義を容易にするESE(エクソンスプライシングエンハンサー)モチーフ等の配列にはポジティブなスコアを付

与した。同じ基準により、イントロンであるとの定義を容易にする標的配列、すなわちESS（エクソンスプライシングサイレンサー）モチーフにはネガティブなスコアを付与した。左右両方のパネルにおいて、c. 4303G>Tで変異したヌクレオチドを強調表示している。かかる変異の有無によってスコアが大きく変わった2種類のタンパク質（SRp30c/SRSF9及びhnRNPA1）を白抜きボックスで示す。SRp30c/SRSF9（左パネル）又はhnRNPA1（右パネル）のSELEXコンセンサス配列と高い相同性を示す周辺配列には下線を付与した。（b）SRp30c/SRSF9又はhnRNPA1のSELEXコンセンサス配列とエクソン31配列とのアラインメントを示す。左パネルには、野生型エクソン31RNAとSRp30c/SRSF9SELEXコンセンサス配列との相同性を示す。Rはプリン残基を示す。右パネルには、c. 4303G>T変異型エクソン31とhnRNPA1SELEXコンセンサス配列とのRNA配列相同性を示す。Wは、A又はUを示す。両パネルにおける垂直のバーは、同じ残基を結びつけている。両パネルにおいて、c. 4303G>Tで変異しているヌクレオチドは白抜きボックスで強調している。

[図3] 患者遺伝子で見いだされたジストロフィンエクソン31の点変異により、インビトロ及びインビボの両方においてhnRNPA1との結合性が増大し、エクソンスキッピングが増大する様子を示す図である。（a）GST-hnRNPA1及びジストロフィンエクソン31RNAに対するゲルモビリティシフトアッセイの結果を示す図である。レーン3~5は、GST-hnRNPA1をそれぞれ100、200及び400ng用い、かつ、ジストロフィンの野生型エクソン31RNAを用いた結果を表し、レーン8~10は、GST-hnRNPA1をそれぞれ100、200及び400ng用い、かつ、ジストロフィンの変異型エクソン31RNAを用いた結果を表し、レーン2及び7はGSTのみを用いた結果を表す。レーン1及び6は、RNA自体がゲル上のどの位置に移動したかを示す（パネル右側に“Free RNA”として示す）。hnRNPA1とRNAとの複合体は“Bound

RNA”として示す。(b) ジストロフィンエクソン31を含むmRNA前駆体のインビトロでのスプライシングアッセイの結果を示す。レーン1~5は、pCDC-dys Ex31wを線状化したものをインビトロ転写の鑄型とし、かつ、インキュベート時間をそれぞれ0、15、30、60、90分間とした結果を表し、レーン6~10は、pCDC-dys Ex31mを線状化したものをインビトロ転写の鑄型とし、かつ、インキュベート時間をそれぞれ0、15、30、60、90分間とした結果を表す。また、mRNA前駆体と、2つの異なるmRNAの構造をパネル右側に示す。番号付きボックスはエクソンを表し、ボックス間のラインはイントロンを表す。エクソン14及び15は、CDCmRNA前駆体に由来するニワトリ δ -クリスタリンエクソンである。ジストロフィンエクソン31を含むmRNA(黒丸)は、CDC-dys Ex31 c. 4303G>T mRNA前駆体よりもCDC-dys Ex31 WT mRNA前駆体によって、より効率的に産生された。(c) いくつかのRNA結合タンパク質の過剰発現が変異型エクソン31のスキッピング及びインクルージョンにどのような影響を及ぼすかを調べるために、ミニ遺伝子を利用して行った、細胞におけるスプライシング解析の結果を示す。一番左のレーン(M)は、 ϕ X174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを表し、左から2番目のレーン(mock)は、H492-dys Ex31m/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表し、左から3番目のレーン(SRp30c/SRSF9)は、H492-dys Ex31m・Flag-SRp30c/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表し、右から2番目のレーン(SRp75/SRSF4)は、H492-dys Ex31m・Flag-SRp75/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表し、一番右のレーン(hnRNPA)は、H492-dys Ex31m・Flag-hnRNPA1プラスミド/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を表す。なお、DNAサイズマーカー及びPCR産物のヌクレオチド長を、それぞれパネルの左側及び右側に示

す。(d) 図3(c)の結果から算出したエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示す。グラフには、個別に3回行った実験のレシオの平均値及び標準偏差を示す。*P<0.005

[図4] TG003が、HeLa細胞において用量依存的に変異型エクソン31のスキッピングを促進する様子を示す図である。(a) 各種化合物がエクソン31スキッピングにどのような影響を及ぼすかを調べるために、H492-dys Ex31m/HeLaを利用して行った、細胞におけるスプライシング解析の結果を示す。一番左のレーン(M)は、 ϕ X174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを表し、左から2番目のレーン(DMSO)は、H492-dys Ex31m/HeLaをDMSO処理した場合の結果を表し、左から3番目のレーン(TG003)は、H492-dys Ex31m/HeLaをTG003処理した場合の結果を表し、一番右のレーン(SRPIN340)は、H492-dys Ex31m/HeLaをSRPIN340処理した場合の結果を表す。なお、DNAサイズマーカー及びPCR産物のヌクレオチド長を、それぞれパネルの左側及び右側に示す。(b) 図4(a)の結果から算出したエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示す。グラフには、個別に3回行った実験の該レシオの平均値及び標準偏差を示す。*P<0.0001 (c) 変異型エクソン31のスキッピングを促進するTG003が、野生型エクソン31のスキッピングを促進するかを調べるために、H492-dys Ex31m/HeLaに加えて、H492-dys Ex31w/HeLaを利用して行った、細胞におけるスプライシング解析の結果を示す。左から1番目から6番目のレーンは、H492-dys Ex31w/HeLaをパネル上部の濃度(μ M)のTG003で処理した場合の結果を表し、右から1番目から6番目のレーンは、H492-dys Ex31m/HeLaをパネル上部の濃度(μ M)のTG003で処理した場合の結果を表し、中央のレーン(M)は、 ϕ X174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを表す。(d) 図4(c)の結果から算出したエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示す

。グラフには、個別に3回行った実験の該レシオの平均値及び標準偏差を示す。

[図5] T G O O 3 が、H e l a 細胞において用量依存的に変異型エクソン27のスキッピングを促進する様子を示す図である。(a) H 4 9 2 - d y s E x 2 7 m / H e l a、及び、H 4 9 2 - d y s E x 2 7 w / H e l a を利用して行った、細胞におけるスプライシング解析の結果を示す。左から1番目から6番目のレーンは、H 4 9 2 - d y s E x 2 7 w / H e l a をパネル上部の濃度 (μ M) の T G O O 3 で処理した場合の結果を表し、右から1番目から6番目のレーンは、H 4 9 2 - d y s E x 2 7 m / H e l a をパネル上部の濃度 (μ M) の T G O O 3 で処理した場合の結果を表し、中央のレーン (M) は、 ϕ X 1 7 4 - H a e I I I で消化したDNAサイズマーカーを表す。(b) 図5 (a) の結果から算出したエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示す。グラフには、個別に3回行った実験の該レシオの平均値及び標準偏差を示す。

[図6] T G O O 3 は、変異型エクソン31のスキッピングを促進するだけでなく、患者細胞におけるトランケート型ジストロフィン(エクソン31欠失ジストロフィン)の発現も促進することを示す図である。(a) 種々の量の T G O O 3 で処理した、患者筋肉の初代培養細胞を利用して行った、細胞におけるスプライシング解析の結果を示す。左から1番目のレーン (M) は、 ϕ X 1 7 4 - H a e I I I で消化したDNAサイズマーカーを表し、左から2番目~7番目のレーンは、初代培養細胞を、パネル上部に記載した数値の濃度 (μ M) の T G O O 3 で処理した場合の結果をそれぞれ表す。なお、DNAサイズマーカーをパネルの左側に示し、PCR産物のヌクレオチド長及び構造の概略をパネルの右側に示す。パネル右側の番号ボックスはジストロフィンのエクソン番号を示す。(b) 図6 (a) の結果から算出したエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示す。グラフには、個別に2回行った実験の該レシオの平均値及び標準偏差を示す。(c) T G O O 3 で処理した患者細胞におけるジストロフィンの発現についてウエスタンブロッティング

解析を行った結果を示す。上パネル (Dystrophin(G-terminal)) は、ジストロフィンのC末端に対する抗体を用いた結果を表し、中央パネル (Dystrophin(Exon 31/32)) は、ジストロフィンのエクソン31に対応する部分に対する抗体を用いた結果を表し、下パネル (Desmin) は、抗デスミン抗体を用いた結果を表す。また、左のレーン (Control) は、ポジティブコントロールの結果を表し、真ん中のレーン (0) は、TG003で処理しなかった患者細胞を用いた結果を表し、右のレーン (7) は、TG003で処理した患者細胞を用いた結果を表す。なお、下パネルの結果から、このウエスタンブロッティング解析にはほぼ同数の細胞を使用したことが示された。

[図7]ヒトのジストロフィンの79個のエクソン配置を示す図である。また、この図により、エクソン同士の境目がコドンの何文字目に該当するかも読み取れることもできる。

発明を実施するための形態

[0015] 1. 本発明の予防・改善剤

本発明の予防・改善剤は、遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソン（以下、単に「変異型エクソン」とも表示する。）をスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患（以下、「本発明が対象とする遺伝性疾患」とも表示する。）の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物（以下、「本発明における化合物」とも表示する。）を含有している限り特に制限されないが、分子量1000以下の化合物であることが好ましく、分子量700以下の化合物であることがより好ましく、分子量500以下の化合物であることがさらに好ましく、分子量300以下の化合物であることがさらに好ましい。また、本発明の予防・改善剤には、本発明における化合物を2種類以上併用してもよい。

[0016] 本発明における化合物としては、本発明が対象とする遺伝性疾患に対して予防効果及び／又は改善効果（以下、「本発明における予防・改善効果」とも表示する。）を発揮する化合物である限り特に制限されないが、好適には

、スプライシング調節作用を有する化合物を例示することができ、より好適には、変異型エクソンのスキッピングを誘導及び／又は促進させる効果（以下、「本発明におけるスキッピング誘導・促進効果」とも表示する。）を有する化合物を例示することができ、さらに好適には、変異型エクソンのスキッピングを誘導及び／又は促進させて、機能性トランケート型タンパク質の発現を誘導及び／又は上昇させる効果（以下、「本発明における機能性トランケート型タンパク質の発現誘導・上昇効果」とも表示する。）を有する化合物を例示することができ、さらにより好適には、C1k阻害化合物を例示することができる。かかるC1k阻害化合物の中でも、上記一般式（1）〔式中、R₁及びR₂は各々独立に、直鎖状、分岐鎖状のC₁－C₁₀炭化水素基を示し；R₃はメトキシ基、エトキシ基、アセトキシ基又はハロゲン原子を示す。〕で表される化合物を好適に例示することができ、中でも、TG003（上記一般式（1）において、R₁及びR₂がメチル基であり、R₃がメトキシ基である化合物）を特に好適に例示することができる。上記一般式（1）で表される化合物は、前述の特許文献1に記載の方法等により合成することができる。

[0017] 本発明が対象とする遺伝性疾患に対する予防効果（以下、「本発明の予防効果」とも表示する。）とは、その遺伝性疾患の発症を抑制する効果や、発症を遅延させる効果を含み、本発明が対象とする遺伝性疾患に対する改善効果（以下、「本発明の改善効果」とも表示する。）とは、その遺伝性疾患の症状を改善する効果の他、本発明の予防・改善剤を投与しない場合と比較して症状の悪化の速度を遅延させる効果を含む。

[0018] ある化合物が、本発明の予防・改善効果を有しているかどうかは、例えば、本発明が対象とする遺伝性疾患のモデル哺乳動物（すなわち、本発明が対象とする遺伝性疾患の要因となる変異を有するモデル哺乳動物（好ましくはモデル非ヒト哺乳動物））にその被検化合物を投与する工程A；そのモデル哺乳動物における前記遺伝性疾患の症状を確認する工程B；前記工程Bにおける遺伝性疾患の症状の程度と、被検化合物を投与しなかった場合の症状の

程度とを比較する工程 C；前記工程 Bにおける遺伝性疾患の症状の程度が、被検化合物を投与しなかった場合の症状の程度と比較して低い場合に、該被検化合物を本発明の予防・改善効果を有する化合物と評価する工程 D；を有する方法により、確認することができる。

[0019] また、ある化合物が、本発明におけるスキッピング誘導・促進効果を有しているかどうかは、例えば、変異型エクソンと、該エクソンに隣接する領域（エクソン領域又はイントロン領域）を含む DNA 断片（ミニ遺伝子）を適当な哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んで組換えベクターを作製する工程；かかる組換えベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクションする工程；トランスフェクションにより得られた形質転換細胞（以下、「本発明における形質転換細胞」とも表示する。）と、被検化合物とを接触させた状態で、該形質転換細胞を培養する工程；培養した形質転換細胞から RNA を単離し、RT-PCRによりミニ遺伝子に対応する RNA を増幅する工程；増幅産物を解析（例えば電気泳動や配列決定）することによって、変異型エクソンのスキッピングが誘導及び／又は促進されているかどうかを確認する工程；変異型エクソンのスキッピングが誘導及び／又は促進されている場合に、その被検化合物を、本発明におけるスキッピング誘導・促進効果を有する化合物と評価する工程；を含む、本発明におけるスキッピング誘導・促進効果を有する化合物の判定方法により、確認することができる。

[0020] さらに、ある化合物が、トランケート型タンパク質の発現誘導・上昇効果を有しているかどうかは、本発明における形質転換細胞と、被検化合物とを接触させた状態で、該形質転換細胞を培養する工程；培養した形質転換細胞中に発現するタンパク質を解析することによって、トランケート型タンパク質の発現が誘導及び／又は上昇しているかどうかを確認する工程；トランケート型タンパク質の発現が誘導及び／又は上昇している場合に、その被検化合物を、トランケート型タンパク質の発現誘導・上昇効果を有する化合物と評価する工程；を含む、トランケート型タンパク質の発現誘導・上昇効果を有する化合物の判定方法により、確認することができる。トランケート型タ

ンパク質の検出は、変異型エクソンにコードされるペプチドに対する抗体や、それ以外のエクソンにコードされるペプチドに対する抗体を用いたウエスタンブロッティング解析において、変異型エクソンにコードされるペプチドに対するシグナルが検出されず、かつ、それ以外のエクソンにコードされるペプチドに対するシグナルが検出されることを確認すること等によって行うことができる。また、そのトランケート型タンパク質が機能性トランケート型タンパク質であるかどうかは、本発明が対象とする遺伝性疾患のモデル哺乳動物においてそのトランケート型タンパク質を発現させたときに、その遺伝性疾患の症状が改善されること等を指標にして確認することができる。なお、本発明における「機能性トランケート型タンパク質」とは、遺伝性疾患の要因となる遺伝子のエクソンが少なくとも1つ欠失した成熟mRNAによりコードされたトランケート型タンパク質であって、かつ、その遺伝子に対応する正常遺伝子の全長タンパク質の機能（特に、遺伝性疾患に関連する機能）が少なくともある程度残存しているタンパク質を意味する。

[0021] また、ある化合物が、C I k阻害化合物であるかどうかは、被検化合物の存在下で、C I kのリン酸化活性を測定する工程；測定の結果得られたリン酸化活性の値を、被検化合物の非存在下におけるC I kのリン酸化活性の値と比較する工程；被検化合物の存在下におけるC I kのリン酸化活性の値が、被検化合物の非存在下におけるC I kのリン酸化活性の値より低い場合に、その被検化合物をC I k阻害化合物と評価する工程；を有する方法により、容易に確認することができる。上記のC I kは、公知のC I kの配列情報に基づいて、所望の哺乳動物からC I k遺伝子を単離し、該遺伝子を適当な発現ベクターにインテグレートして発現させた後、そのC I kを単離することによって容易に入手することができる。C I kのリン酸化活性は、C I kの基質であるSRタンパク質がリン酸化されたリン酸化SRタンパク質に特異的に結合する抗体等を用いて測定することができる。また、C I k遺伝子の由来となる前述の哺乳動物としては、特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒ

ツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を好適に例示することができ、中でもヒトをより好適に例示することができる。

[0022] 本発明が対象とする遺伝性疾患における「変異」の種類としては、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る限り特に制限されず、ナンセンス変異、スプライシング異常の他、正常な野生型の遺伝子と比較してアミノ酸の読み枠がずれる（アウトオブフレーム）変異などを例示することができ、中でも、ナンセンス変異やアウトオブフレーム変異を好適に例示することができ、中でも、該遺伝性疾患の要因となる遺伝子におけるエクソンスプライシングエンハンサー活性を抑制し、及び／又は、該遺伝子におけるエクソンスプライシングサイレンサー活性を上昇させる、ナンセンス変異やアウトオブフレーム変異をより好適に例示することができ、中でも、そのナンセンス変異やアウトオブフレーム変異が含まれるエクソンのスキッピングが誘導・促進されるようなナンセンス変異やアウトオブフレーム変異を特に好適に例示することができる。なお、前述のアウトオブフレーム変異としては、遺伝子の欠失、重複又は逆位であって、かつ、正常な野生型の遺伝子と比較してアミノ酸の読み枠がずれる変異を例示することができる。

[0023] 本発明においてスキッピングさせる対象となる「該変異が含まれるエクソン」とは、かかる変異が含まれる1個のエクソンに限らず、そのエクソンを含む隣接した複数個（好ましくは2～8個、より好ましくは2～5個、さらに好ましくは2～3個、より好ましくは2個）のエクソンであってもよく、かかるエクソンの好ましい個数や範囲は、かかるエクソンをスキッピングさせたときに残りのエクソンがインフレームとなるように連結されることや、残りのエクソンにより構成される成熟mRNAがコードするトランケート型タンパク質が機能性トランケート型タンパク質となることを指標にして、当業者であれば適宜選択することができる。例えば、遺伝子がジストロフィン遺伝子である場合は、公知のエクソン情報（図7）に基づいて、スキッピングさせるエクソンの個数や範囲を決定することができる。この図7において

、2つのエクソンの境目が垂直な直線（例えばエクソン3とエクソン4の間の直線を参照）であればエクソンの境目はコドンの境目と一致しており、2つのエクソンの境目が角度の緩い斜線（例えばエクソン1とエクソン2の間の斜線を参照）であればエクソンの境目はコドンの1文字目と2文字目の間にあり、2つのエクソンの境目が角度の急な斜線（例えばエクソン6とエクソン7の間の斜線を参照）であればエクソンの境目はコドンの2文字目と3文字目の間にあることを示している。したがって、例えばアウトオブフレーム変異がエクソン51中に存在する場合は、エクソン51と52をスキッピングさせたり、エクソン50と51をスキッピングさせれば、残りのエクソンはインフレームとなり、また、アウトオブフレーム変異がエクソン53に存在する場合は、エクソン53～58をスキッピングさせたり、エクソン52と53をスキッピングさせれば残りのエクソンはインフレームとなる。

[0024] 本発明における「エクソンのスキッピング」あるいは「エクソンをスキッピングさせる」とは、遺伝子から転写されて生成したmRNA（mRNA前駆体）から成熟mRNAにプロセッシングされる際に、mRNA前駆体からそのエクソンが消失すること、あるいは、そのエクソンを消失させることを意味する。

[0025] 本発明が対象とする遺伝性疾患の種類としては、遺伝子のエクソン中の変異に起因する遺伝性疾患であって、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患である限り特に制限されないが、中でも、遺伝子のエクソン中の変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンがスキッピングされ、機能性トランケート型タンパク質を一部に生成している遺伝性疾患を好適に例示することができ、より具体的には、前述の遺伝性疾患において、遺伝子がジストロフィン遺伝子であり、前述の機能性トランケート型タンパク質が機能性トランケート型ジストロフィンであるデュシェンヌ型筋ジストロフィーをより好適に例示することができ、中でも、前述のデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて、ジストロフィン遺伝子のエクソンがジストロフィン遺伝子のエクソン

31やエクソン27であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーをより好適に例示することができ、中でも、前述のデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて、ジストロフィン遺伝子のエクソン31中の変異が、配列番号1のポリヌクレオチド配列（ジストロフィンcDNA配列）のヌクレオチド番号4303におけるグアニンのチミンへのナンセンス変異であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーや、ジストロフィン遺伝子のエクソン27中の変異が、配列番号1のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド番号3613におけるグアニンが欠失したアウトオブフレーム変異であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーを特に好適に例示することができる。

[0026] 本発明の予防・改善剤の投与対象となる哺乳動物としては、特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を好適に例示することができ、中でもヒトをより好適に例示することができる。また、本発明の予防・改善剤にCdk阻害化合物を用いる場合において、かかるCdk阻害化合物が阻害作用を発揮するCdkの由来は、本発明の予防・改善剤の投与対象となる哺乳動物の種類と一致していることが、本発明の予防効果や改善効果をより多く享受し得ることから好ましい。

[0027] 本発明における化合物が有する本発明におけるスキッピング誘導・促進効果の好ましい程度としては、前述の本発明における形質転換細胞と、本発明における化合物（30 μ M）とを接触させた状態で、該形質転換細胞を培養する工程：培養した形質転換細胞からRNAを単離し、RT-PCRによりミニ遺伝子に対応するRNAを増幅する工程：増幅産物を解析（例えば電気泳動や配列決定）することによって、変異型エクソンがスキッピングされていない増幅産物に対する、変異型エクソンがスキッピングされている増幅産物の割合を算出する工程：により算出されるエクソンスキップ／インクルージョンレシオが、本発明における化合物を用いなかった場合のエクソンスキップ／インクルージョンレシオに対して、2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、さらに好ましくは5倍以上に上昇していることを

好適に例示することができる。また、本発明における化合物を用いなかった場合のエクソンスキップ／インクルージョンレシオが0であったときに、エクソンスキップ／インクルージョンレシオを0より大きい正の値に誘導する効果は、本発明におけるスキッピング誘導・促進効果の特に好ましい程度として例示することができる。

[0028] 本発明の予防・改善剤は、本発明の予防・改善効果が得られる限り、前述の本発明における化合物の他に、他の遺伝性疾患予防・改善剤等の任意成分を含んでいてもよい。

[0029] 本発明の予防・改善剤に含有される本発明における化合物は、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、本発明のより優れた予防・改善効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。前述の液剤の製造方法としては、例えば本発明における化合物を溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができる。以上のように、本発明における化合物を製剤とする場合には、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、吸着剤、甘味剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。

[0030] 本発明の予防・改善剤に含有される本発明における化合物の量としては、本発明の予防・改善効果が得られる限り特に制限されないが、例えば、本発明の予防・改善剤の全量に対して例えば0.0001～99.9999質量%、好ましくは0.001～80質量%、より好ましくは0.001～50質量%、さらに好ましくは0.005～20質量%を好適に例示することができる。

[0031] 本発明の予防・改善剤の投与方法としては、本発明の予防・改善効果が得られる限り特に制限されず、静脈内投与、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、経肺投与等を例示することができる。また、本発明

の予防・改善剤の投与量は、投与対象の遺伝性疾患の状態や投与対象の体重等に応じて、適宜調節することができるが、本発明における化合物換算で成人1人1日当たり、例えば0.1 μg ~ 10000 mg、より好ましくは1 μg ~ 3000 mg、さらに好ましくは10 μg ~ 1000 mg を好適に例示することができる。

[0032] なお、本発明における化合物を含有する本発明の予防・改善剤は、遺伝性疾患の要因となる変異が含まれる遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導・促進させるエクソンスキッピング誘導・促進剤としても使用することができる。また、本発明の他の態様として、本発明の予防・改善剤の製造における、本発明における化合物の使用：や、本発明における化合物を、本発明の予防・改善剤に使用する方法：や、遺伝性疾患の要因となる変異が含まれる遺伝子のエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質の発現を誘導・上昇することにおける、本発明における化合物の使用：や、本発明が対象とする遺伝性疾患の予防・改善における、本発明の化合物の使用：や、本発明の予防・改善剤を対象に投与することにより、本発明が対象とする遺伝性疾患を予防・改善する方法や、本発明におけるエクソンスキッピング誘導・促進剤を対象に投与することにより、遺伝性疾患の要因となる変異が含まれる遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導・促進する方法も例示することができる。これらの使用や方法における文言の内容やその好ましい態様は、前述したとおりである。

[0033] 以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0034] [筋ジストロフィー患者のジストロフィン遺伝子の変異解析]

筋ジストロフィー患者400名以上について、以下の方法により、そのジストロフィン遺伝子の変異を解析した。

[0035] (変異解析)

標準的なフェノールクロロフォルム抽出法により、患者の血液試料から

DNAを単離した。フィコールパーク密度勾配法（Amersham Biosciences AB社製）を用いて全血から回収した末梢リンパ球から、或いは凍結筋試料を薄片化した筋切片から、トータルRNAを単離した。逆転写PCR（RT-PCR）及びRT-nested PCR法により、骨格筋で発現したジストロフィンmRNAを分析した。骨格筋由来のジストロフィンmRNAについて、内側プライマーセット（フォワードc27f：CCTGTAGCACAAAGAGGCCTTA（配列番号2）、及び、リバーズ2F：TCGACACTGTTTGTTCGAATG（配列番号3））を使用してエクソン27～32を含む領域を増幅した。増幅産物を精製し、そのまま、或いはpT7 Blue-Tベクター（Novagen社製）にサブクローニングしてから、増幅産物の配列を決定した。この配列の決定には、自動DNA配列決定装置（モデル310；Applied Biosystems社製）を用いた。

[0036] 解析した筋ジストロフィー患者の一人（KUCG797）の症例は以下のとおりである。この患者は5歳の男児である。この男児の両親は健常な日本人で筋肉疾患の家族歴はなかった。1歳4ヶ月で一人歩きを始め、運動発達は正常だったが、2歳のときの定期血液検査で血清クレアチンキナーゼ（CK）値が2567IU/l（正常値は169IU/l未満）を示し、入院した。神戸大学病院で診察を受け、ジストロフィン遺伝子の変異について調べられた。CK値はその後、緩やかに上昇し続けた（1331～4740IU/l）が、筋力低下や歩行異常は認められなかった。5歳のときに筋バイオプシーを行った。以上の研究は神戸大学倫理委員会の承認を得て実施した。

[0037] 前述のKUCG797のジストロフィン遺伝子には、エクソン31に点変異が認められた。この変異は、ジストロフィンcDNAの4303番目のヌクレオチドがGからT（RNAではGからU）に置き換わったものである（c. 4303G>T：図1a）。このヌクレオチドの変更は、グルタミン酸をコードするGAGコドンからストップコドン（TAG）への置換だったため（p. Glu1435X）、背景技術に記載の読み枠ルールにしたがえば、この症例ではジストロフィンが産生されず、重篤なDMDとなることが予想された。

[0038] (骨格筋バイオプシー、及び、ジストロフィン免疫染色)

次に、以下の方法で、前記患者(5歳)に骨格筋バイオプシーを行い、ジストロフィン免疫染色を行った。

[0039] KUCG797について、大腿直筋のバイオプシーを行い、骨格筋試料を得た。この骨格筋試料を、液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結した。凍結した骨格筋試料から、厚さ10 μ mの凍結連続切片を作製し、かかる切片を免疫組織化学染色により分析した。具体的には、前述の厚さ10 μ mの凍結連続切片を冷却アセトン中に5分間入れて固定した。この切片をヤギ正常血清でブロッキングし、抗ジストロフィン抗体(一次抗体)の共存下、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。抗ジストロフィン抗体としては、DYS2(Novocastra社製)、DYS3(Novocastra社製)、及び、MANDYS1(Glenn E. Morris教授・博士からの寄贈)の3種類を用いた。DYS2は、ジストロフィン遺伝子のエクソン77~79(C末端側)のエピトープを認識し、DYS3は、ジストロフィン遺伝子のエクソン10~12(N末端側)のエピトープを認識し、MANDYS1は、ジストロフィン遺伝子のエクソン31/32(rodドメイン)のエピトープを認識する。インキュベート後の切片をPBSで6回洗浄した後、二次抗体としてAlexa Fluor 488で標識したヤギ抗マウス抗体又はヤギ抗ウサギ抗体の共存下、室温で90分間インキュベートした。切片を洗浄した後、蛍光顕微鏡で切片を観察した。その結果を図1bに示す。図1bのパネルeはDYS2で染色した結果を示し、図1bのパネルfはDYS3で染色した結果を示し、図1bのパネルgはMANDYS1で染色した結果を示す。

[0040] KUCG797のジストロフィン遺伝子の遺伝子型からすると、重篤なDMDが予想されたが、免疫組織化学染色の結果はその予想に反し、BMDにおける場合と同じように、N末端又はC末端のジストロフィンドメインを認識する抗体に対するまばらで不連続なシグナルが認められた(図1bのパネルeやパネルf)。また、ジストロフィン遺伝子のエクソン31/32を認識するMANDYS1抗体に対するシグナルは認められなかった(図1bの

パネルg)。なお、ポジティブコントロールとして、健常者由来の骨格筋試料について同様の免疫組織科学染色を行ったところ、DYS2、DYS3、MANDYS1のいずれの抗体に対してもシグナルが確認された(図1bのパネルb、パネルc、パネルd)。

[0041] (RT-PCR増幅産物の解析)

KUCG797のジストロフィン遺伝子の遺伝子型(DMD型)と、免疫染色パターンとの間のこの矛盾を説明するため、本発明者らは、ジストロフィン遺伝子のエクソン31におけるナンセンス変異がエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)を破壊し、変異型エクソン(変異を含むエクソン)のスキッピングをもたらしたと推定した。この推定の可能性を証明するため、KUCG797の骨格筋のジストロフィンmRNAをRT-PCR増幅法で解析した。

[0042] 具体的には、KUCG797から単離したトータルRNAをテンプレートとし、プライマーとして前述のフォワードc27f及びリバース2Fを使用してエクソン27からエクソン32に至る領域を増幅した。その増幅産物を、Tris-ホウ酸塩/EDTA緩衝液中、2%アガロースゲル上で電気泳動した結果を図1cに示す。一番右のレーン(Patient)は、KUCG797由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示し、中央のレーン(Control)は、健常者由来のトータルRNAをテンプレートした結果を示す。コントロールでは、エクソン27からエクソン32に及ぶ領域の増幅産物は1種類であったが、KUCG797では、驚いたことに、2種類のほぼ同量の増幅産物が得られた。この2種類のうちの一方の増幅産物は予想通りのサイズであり、他方の増幅産物はより小さいサイズであった(図1c)。この小さいサイズの増幅産物の配列決定を行ったところ、エクソン31がスキッピングされていることが確認された(図1d)。一方、予想通りのサイズの増幅産物の配列決定を行ったところ、エクソン31のTAGストップコドンを含む、エクソン27~32の配列(793nt)が示された。他方、小さいサイズの増幅産物ではエクソン31の配列が完全に欠失してい

たが、他のエクソンは完全なまま残った配列（682 nt）となっており、変異型エクソン31がスキッピングされたことが示唆された（図1c）。KUCG797のジストロフィン遺伝子の他のイントロンのスプライシングも調べたが、他のイントロンは全て正しくスプライシングされていた（データは示さず）。エクソン31（111 nt）を欠失するジストロフィンmRNA（682 nt）はインフレームであり、ランケート型ではあるが機能は残存するジストロフィン（ランケート型ジストロフィン）を産生する。前述の免疫染色では、N末端又はC末端のジストロフィンドメインを認識する抗体を用いたので、前述のランケート型ジストロフィンも染色されるはずであった。そこで、エクソン31を含む領域に対するモノクローナル抗体であるMANDYS1を用いて免疫染色を行ったところ、かかるランケート型ジストロフィンはMANDYS1には認識されなかった（図1bのパネルg）。

[0043] 以上の結果より、c. 4303G>T (p. Glu1435X) の点変異をそのジストロフィン遺伝子にもつ前記患者は、完全長のジストロフィンmRNAと、エクソン31を欠失（Δエクソン31）したジストロフィンmRNAの2種類を発現することが示された。また、これらの結果からは、この点変異がジストロフィン遺伝子のORFを破壊するだけでなく、エクソン31のスプライシングシグナルも破壊することも示唆された。

[0044] （ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析1）

この仮説をさらに分析するため、細胞におけるスプライシング解析に用いられているH492ベクター（Mol Genet Metab (2005) 85, 213-219., J Med Genet (2006) 43, 924-930., Hum Genet (2007) 120, 737-742.）に、変異型エクソン31とその両側の隣接イントロンとを含むジストロフィン遺伝子断片（変異型ミニ遺伝子）を挿入したプラスミド（H492-dys Ex31プラスミド）を構築し、かかるプラスミドをトランスフェクトしたHeLa細胞において、その遺伝子断片のmRNAを調べることにした。なお、H492ベクターは、2つのカセットエクソン（A及びB）とマルチクロー

ニングサイトを含むイントロン配列とをコードしている。

[0045] H492-dys Ex31プラスミドは以下のような方法で構築した。KUCG797のゲノムDNAから、ジストロフィン遺伝子の変異型エクソン31とその両側の隣接イントロン領域とを含む断片をPCRで増幅した。プライマーとして、イントロン30f-NheI (GCGGCTAGCGTGATCCACCTGCCTCGA C : 配列番号4)、及び、イントロン31r-BamHI (GCGGGATCCTCAAATCCAATC TTGCCAAT : 配列番号5) を使用した。前述の増幅産物をNheI及びBamHI (New England Biolabs社製) で消化した断片を、両酵素で消化したH492に挿入した。これにより、KUCG797由来の変異型エクソン31とその両側の隣接イントロン領域とを含む断片(変異型ミニ遺伝子)を含むプラスミド(H492-dys Ex31mプラスミド)を構築した(図1e)。また、健常者のゲノムDNAを利用した同様の方法により、ジストロフィン遺伝子の野生型エクソン31とその両側の隣接イントロン領域とを含む断片(野生型ミニ遺伝子)を含むプラスミド(H492-dys Ex31wプラスミド)を構築した(図1e)。H492-dys Ex31mプラスミド及びH492-dys Ex31wプラスミドのいずれも、プラスミドの全配列の決定を行い、目的断片が含まれていることを確認した。

[0046] H492-dys Ex31mプラスミド、H492-dys Ex31wプラスミドを、HeLa細胞にそれぞれトランスフェクションし、H492-dys Ex31m/HeLa及びH492-dys Ex31w/HeLaを得た。トランスフェクションは、リポフェクタミン2000(インビトロジェン社製)を製造者マニュアルに従って使用して行った。トランスフェクションにより得られたこれらの細胞内では、CMVプロモーター(CMVp)からmRNA前駆体が転写される。

[0047] H492-dys Ex31m/HeLa又はH492-dys Ex31w/HeLaから単離したトータルRNAをテンプレートとし、プライマーとして前述のイントロン30f及びイントロン30rを使用してミニ遺伝子を含む領域をRT-PCRで増幅した。その増幅産物を、Tris-ホウ酸塩

／EDTA緩衝液中、2%アガロースゲル上で電気泳動した結果を図1fに示す。左から3番目のレーン(m)は、H492-dys Ex31m/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示し、左から2番目のレーン(w)は、H492-dys Ex31w/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示す。野生型ミニ遺伝子を含む形質転換細胞(H492-dys Ex31w/HeLa)では、エクソンA、31及びBを含む1つのRT-PCR産物が認められた。他方、変異型ミニ遺伝子を含む形質転換細胞(H492-dys Ex31m/HeLa)では2つのPCR産物が検出された(図1f)。配列決定の結果、小さい方のDNA産物はエクソン31を含まないことが確認された(データは示さず)。なお、ネガティブコントロールとして、逆転写酵素(RT)を添加しないこと以外は同様にRT-PCR処理したものをアガロースゲルに電気泳動した結果を図1fの一番右のレーン(m)及び右から2番目のレーン(w)に示す。以上の結果から、この患者における点変異がジストロフィンのエクソン31のスキッピングを引き起こし、H492ベクターにクローニングしたジストロフィン遺伝子の一部が、患者の筋肉で観察されたエクソン31のスキッピングの再現能力を有することが明らかになった。

実施例 2

[0048] [エクソン31スプライシングに関与するスプライシング調節因子の解析]

前述の実施例1の結果から、KUCG797のジストロフィン遺伝子のエクソン31の点変異が、エクソンスキッピングを引き起こすことが示されたので、エクソン31のスキッピングやインクルージョン(inclusion)を調節する候補因子の同定を試みた。

[0049] (SpliceAidプログラムによる配列解析)

ジストロフィン遺伝子の野生型エクソン31と、変異型エクソン31のRNA配列をSpliceAidプログラム(<http://www.introni.it/splicing.html>) (Bioinformatics (2009) 25, 1211-1213.)で解析したところ、この変異型エクソン31の点変異は、SRタンパク質のメンバーであるSRp30c/

SRSF9 (SF9) との結合力を低下させることが分かった (図 2 a)。SRタンパク質は、プリンリッチであることが多いエクソンスプライシングエンハンサー (ESE) と結合することが知られている。エクソン 31 の配列は、SELEX で同定された SRp30c/SRSF9 に対する高親和性結合配列と高い類似性を有する (図 2 b) (Rna (2007) 13, 1287-1300.)。上記変異型エクソン 31 の変異は、SRp30c/SRSF9 に対する結合部位を破壊するだけでなく、hnRNP A1 高親和性結合部位をも生じさせる (図 2 a)。つまり、上記変異型エクソン 31 の変異は、hnRNP A1 の SELEX winner 配列と高い相同性をもつ RNA 配列を生じさせる (図 2 b) (Embo J (1994) 13, 1197-1204.)。hnRNP A1 がエクソンスプライシングサイレンサー (ESS) と結合し、エクソンスキッピングを生じさせることはよく知られている。SpliceAid プログラムでの結果から、ジストロフィン遺伝子のエクソン 31 の ESE は SRp30c/SRSF9 に認識され、変異により ESE が hnRNP A1 に結合する ESS に変わることが示唆された。

[0050] (ゲルモビリティシフトアッセイ)

ジストロフィン遺伝子のエクソン 31 の ESE は SRp30c/SRSF9 に認識され、変異により ESE が hnRNP A1 に結合する ESS に変わるという仮説を検証するため、まず、ゲルモビリティシフトアッセイにより、hnRNP A1 に対する結合活性を、変異型エクソン 31 RNA と野生型エクソン 31 RNA とで比較した。具体的には以下の方法で行った。

[0051] ヒト hnRNP A1 cDNA について PCR 増幅を行い、得られた増幅断片を、GST-pCDNA3 の BamHI 部位と NotI 部位との間に挿入して、GST-hnRNP A1 プラスミドを作製した。このプラスミドの全配列の決定を行い、目的断片が含まれていることを確認した。この GST-hnRNP A1 プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、得られた形質転換細胞を培養した。回収した形質転換細胞から、文献 (Methods Mol Biol (2008) 488, 357-365.) 記載の方法にしたがって全細胞溶解

物を調製した。カラムから溶出する前に緩衝液E（20mMHepes-KOH pH7.9、1000mMKCl、0.2mMEDTA、10%グリセロール、及び1mMDTT）で樹脂を2回洗浄すること以外は基本的に文献（The Journal of biological chemistry (2002) 277, 7540-7545.）記載のとおり、抗GST親和性樹脂（SIGMA社製）を使用して、前述の全細胞溶解物からGST-hnRNPA1タンパク質を精製した。次いで、³²Pで標識した変異型エクソン31RNA又は野生型エクソン31RNAを、前述のGST-hnRNPA1タンパク質と混合し、20°Cで30分間インキュベートして得られた複合体についてゲルモビリティシフトアッセイを行った。具体的には以下の方法を用いた。

[0052] ゲルモビリティシフトアッセイは基本的に文献（Nucleic acids research (1995) 23, 3638-3641.）記載の方法のとおりに行った。すなわち、前述の各複合体を、8%天然ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することによってアッセイを行った。バンドの分析は、オートラジオグラフィーにより行った。このアッセイで使用した結合緩衝液は、16mMHepes-KOH（pH7.9）、80mMKCl、0.16mMEDTA、0.8mMDTT、8%グリセロール、100ng/μlのBSA、50ng/μlのE. coli tRNA（Sigma Chemical Co.社製）、5×10⁴cpmのRNA（³²Pで標識したジストロフィン遺伝子の変異型エクソン31RNA又は野生型エクソン31RNA）、及び、1U/μlのRNasin（登録商標）（Promega社製）を含有していた。このゲルモビリティシフトアッセイの結果を図3aに示す。

[0053] 図3aに示すように、hnRNPA1が低濃度のときは、野生型エクソン31RNAと変異型エクソン31RNAの両方にほぼ同様に結合した（図3aのレーン3、4及びレーン8、9）。これは恐らく、共通のhnRNPA1結合部位が、野生型及び変異型の両方のエクソン31上に存在するからであると考えられる（Hum Mol Genet (2006) 15, 999-1013.）。しかし、hnRNPA1がより高濃度のときは、hnRNPA1は、野生型エクソン31

RNAよりも変異型エクソン31 RNAにより効率的に結合し、hnRNP A1マルチマーを含む、より大きな複合体を形成した（図3aのレーン5及びレーン10）。これらの結果より、前記の患者でみられるエクソン31の点変異は、hnRNP A1に対する新たな高親和性結合部位をエクソン31上に生じさせ、その結果、変異型エクソン31 RNA上のhnRNP A1がより多く分布することを容易にしていることが示唆される。この結果から、変異型エクソン31は、hnRNP A1とより強い結合親和性を持つようになったことで、スプライシングの際に、エクソンとして効率的に認識されなかった可能性が強く示唆された。この可能性を調べるため、次に、インビトロでのスプライシングアッセイを行った。

[0054]（インビトロでの転写及びスプライシングアッセイ）

変異型エクソン31は、hnRNP A1とより強い結合親和性を持つようになったことで、スプライシングの際に、エクソンとして効率的に認識されなかった可能性が考えられたので、この可能性を検証するために、インビトロでのスプライシングアッセイを行った。

[0055] まず、かかるアッセイのために、ニワトリ δ クリスタリン（CDC）mRNA前駆体（Molecular cell（2000）6, 673-682.）のイントロン領域に、ジストロフィン遺伝子の野生型エクソン31又は前述の変異型エクソン31を含むmRNA前駆体を調製した（図3bのパネルの右側の構築物参照）。具体的には、PCRで増幅した野生型エクソン31を、pCDC（Molecular cell（2000）6, 673-682.）のSacI部位とStyI部位との間に挿入することにより、pCDC-dys Ex31wを作製した。また、野生型エクソン31に代えて変異型エクソン31を用いて、同様の方法でpCDC-dys Ex31mを作製した。pCDC-dys Ex31w及びpCDC-dys Ex31mを、それぞれSmaIで線状化し、インビトロ転写の鋳型とした。文献（Molecular cell（2000）6, 673-682.）記載の方法にしたがって、mRNA前駆体が 32 Pで標識されるようにインビトロで転写を行い、次いで、転写されたmRNA前駆体の精製を行った。また、インビトロス

プライシングアッセイは、文献 (Molecular cell (2000) 6, 673-682.) 記載の方法にしたがって、 $10\ \mu\text{l}$ スケールでこれらのmRNA前駆体 (CDC-dys Ex 31w mRNA前駆体又はCDC-dys Ex 31m mRNA前駆体) とHeLa細胞核抽出物 (Gibco社製) を混合し、次いで、 30°C 下でパネル上部に示す時間 (0、15、30、60、90分)、インキュベートすることにより行った。インキュベートして得られたmRNA産物を、6%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、次いで、オートラジオグラフィーによりRNAバンドの分析を行った。その結果を図3bに示す。

[0056] 野生型エクソン31を含むCDC-dys Ex 31w mRNA前駆体を用いた結果 (図3bのレーン3~5) と、変異型エクソン31を含むCDC-dys Ex 31m mRNA前駆体を用いた結果 (図3bのレーン8~10) を比較したところ、前者と比較して後者では、エクソン31を含むmRNA産物 (図3bのパネルの右側に黒丸が付された位置の構造のmRNA産物) の生成効率が低かった。他方、エクソン31を含まないmRNA産物 (エクソン14及び15からなるmRNA産物) については、変異型エクソン31を含むCDC-dys Ex 31m mRNA前駆体を用いた場合の方がより効率的に生成していた。

[0057] (ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析2)

次に、前述の実施例1で作製したH492-dys Ex 31m/HeLa (変異型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションしたHeLa細胞) において、RNA結合タンパク質 (SRp30c/SRSF9又はSRp75/SRSF4) をさらに過剰発現させることによって、変異型ミニ遺伝子のスプライシングパターンにどのような影響が生じるかを調べることにした。

[0058] SRp30c/SRSF9の過剰発現に用いたプラスミド (Flag-SRp30cプラスミド) は、PCRで増幅したヒトSRp30cのcDNAを、Flag-pCDNA3 (The Journal of biological chemistry (2004

) 279, 7009-7013.) の BamHI 部位と XhoI 部位との間に挿入して作製し、SRp75/SRSF4の過剰発現に用いたプラスミド (Flag-SRp75プラスミド) は、PCRで増幅したマウスSRp75のcDNAを、Flag-pCDNA3のBamHI部位とXhoI部位との間に挿入して作製した。

[0059] また、Flag-hnRNPA1プラスミドは以下のような方法で作製した。ヒトhnRNPA1cDNAについてPCR増幅を行い、得られた増幅断片を、Flag-pCDNA3 (Nucleic acids research (2009) 37, 6515-6527.) のBamHI部位とNotI部位との間に挿入して、Flag-hnRNPA1プラスミドを作製した。このプラスミドの全配列の決定を行い、目的断片が含まれていることを確認した。このFlag-hnRNPA1プラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションし、得られた形質転換細胞を培養した。回収した形質転換細胞から、文献 (Methods Mol Biol (2008) 488, 357-365.) 記載の方法にしたがって全細胞溶解物を調製した。カラムから溶出する前に緩衝液E (20mM HEPES-KOH pH7.9、1000mM KCl、0.2mM EDTA、10%グリセロール、及び1mM DTT) で樹脂を2回洗浄すること以外は基本的に文献 (The Journal of biological chemistry (2002) 277, 7540-7545.) 記載のとおり、抗Flag-M2親和性樹脂 (SIGMA社製) を使用して、前述の全細胞溶解物からFlag-hnRNPA1タンパク質を精製した。

[0060] H492-dys Ex31mプラスミド及びFlag-SRp30cプラスミドを、リポフェクタミン2000 (インビトロジェン社製) を用いてコトランスフェクションし、H492-dys Ex31m・Flag-SRp30c/HeLaを得た。また、H492-dys Ex31mプラスミド及びFlag-SRp75プラスミドを、リポフェクタミン2000 (インビトロジェン社製) を用いてコトランスフェクションし、H492-dys Ex31m・Flag-SRp75/HeLaを得た。さらに、H492-dys Ex31mプラスミド及びFlag-hnRNPA1プラス

ミドを、リポフェクタミン2000（インビトロジェン社製）を用いてコトランスフェクションし、H492-dys Ex31m・Flag-hnRNPA1プラスミド/HeLaを得た。

[0061] これらの各形質転換細胞について、前述の実施例1の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析1」と同様のスプライシング解析を行った結果を図3cに示す。図3cの一番左のレーンはマーカを示し、左から2番目のレーン（mock）は、H492-dys Ex31m/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示し、左から3番目のレーン（SRp30c/SRSF9）は、H492-dys Ex31m・Flag-SRp30c/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示し、右から2番目のレーン（SRp75/SRSF4）は、H492-dys Ex31m・Flag-SRp75/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示し、一番右のレーン（hnRNPA1）は、H492-dys Ex31m・Flag-hnRNPA1プラスミド/HeLa由来のトータルRNAをテンプレートとした結果を示す。また、図3cのバンド濃度を定量して、エクソン31を含むmRNAに対するエクソン31がスキッピングされたmRNAの割合（Exon skip/inclusion ratio：エクソンスキップ/インクルージョンレシオ）を算出した結果を図3dに示す。

[0062] 図3c及びdの結果から分かるように、SRp30c/SRSF9が過剰発現している場合（図3c及びdのSRp30c/SRSF9）は、コントロールの場合（図3c及びdのmock）と比較して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオが有意に低下した。他方、hnRNPA1が過剰発現している場合（図3c及びdのhnRNPA1）は、コントロールの場合（図3c及びdのmock）と比較して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオが有意に上昇した。なお、他のコントロールとして、SRタンパク質の他のメンバーであるSRp75/SRSF4（Molecular and cellular biology (1993) 13, 4023-4028.）を用いた場合（図3c及びdのSRp7

5/SRSF4)は、コントロールの場合(図3c及びdのmock)とエクソンスキップ/インクルージョンレシオは変わらず、スプライシングパターンに変化はなかった。

[0063] 以上の結果から、ジストロフィンエクソン31は、SRp30c/SRSF9依存性ESEを含み、このESEが変異し、hnRNPA1に結合するESSに変わることによって、エクソン31スキッピングが起きていることが強く示唆された。

実施例 3

[0064] [H492-dys Ex31m/HeLaの変異型エクソン31のスキッピングに対するTG003の効果]

本発明者らは、ジストロフィン遺伝子のエクソン31のスキッピングを促進し得る低分子化合物を見つけるために、様々な低分子化合物を探索した。その代表例として、以下には、TG003とSRPIN340についての結果を記載する。

[0065] TG003及びSRPIN340はいずれも、オルタナティブスプライシングに影響する低分子化合物として知られている。SRPIN340は、SR蛋白キナーゼ(SRPKs)(Proc Natl Acad Sci U S A (2006) 103, 11329-11333.)に対する特異的阻害剤であり、恐らくSRPKによるSRタンパク質のリン酸化阻害を通じて、オルタナティブスプライシングを調節することができる(Biochem J (2009) 417, 15-27., Genome Biol (2009) 10, 242.)。もう一つは、TG003と命名したCikキナーゼの阻害剤である。TG003は、アデノウイルスE1A、SC35、及びCik自体(非特許文献12及び13)のオルタナティブスプライシングに影響することも明らかにされている。

[0066] (ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析3)

H492-dys Ex31m/HeLa(変異型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションしたHeLa細胞)を、30µMのTG003を含むDMSO溶液又は30µMのSRPIN340を含むDMSO溶液

中で24時間インキュベートした。ネガティブコントロールとしてDMSO溶液を用いて同様にインキュベートした。インキュベートした各細胞について、前述の実施例1の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析1」と同様のスプライシング解析（細胞抽出したトータルRNAを用いたRT-PCR解析）を行った結果を図4aに示す。図4aの一番左のレーンは、 ϕ X174-HaeIIIで消化したDNAサイズマーカーを示し、左から2番目のレーン（DMSO）は、H492-dys Ex31m/HeLaをDMSO処理した場合の結果を示し、左から3番目のレーン（TG003）は、H492-dys Ex31m/HeLaをTG003処理した場合の結果を示し、一番右のレーン（SRPIN340）は、H492-dys Ex31m/HeLaをSRPIN340処理した場合の結果を示す。また、図4aのバンド濃度を定量して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオを算出した結果を図4bに示す。

[0067] 図4a及びbの結果から分かるように、SRPIN340処理した場合（図4a及びbのSRPIN340）は、コントロールの場合（図4a及びbのDMSO）とほとんど変わらないエクソンスキップ/インクルージョンレシオを示したが、TG003処理した場合（図4a及びbのTG003）は、コントロールの場合（図4a及びbのDMSO）と比較して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオが有意に上昇した。すなわち、SRPIN340はエクソン31のスキッピングには殆ど影響しないが、TG003は、エクソン31のスキッピングを有意に促進することが示された。

[0068] （ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析4）

「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析3」の結果からは、TG003が、変異型エクソン31のスキッピングだけでなく、野生型エクソン31のスキッピングをも促進する可能性もあった。そこで、H492-dys Ex31m/HeLa（変異型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションしたHeLa細胞）と共に、H492-dys Ex31w/HeLa（野生型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェク

ションしたH e l a細胞)を用いて、前述の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析3」と同様の方法でスプライシング解析を行った。なお、細胞を処理する溶液としては、種々の濃度(0 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、50 μ M)のT G 0 0 3を含むDMSO溶液を用いた。その結果を図4 cに示す。また、図4 cのバンドの濃度を定量して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオを算出した結果を図4 dに示す。

- [0069] 図4 c及びdの結果から分かるように、H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / H e l a (変異型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションしたH e l a細胞)では、T G 0 0 3はエクソン31のスキッピングを用量依存的に促進した。一方、H 4 9 2 - d y s E x 3 1 w / H e l a (野生型ミニ遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションしたH e l a細胞)では、T G 0 0 3が50 μ Mであっても、エクソン31のスキッピングを起こさず、図4 dのグラフでは横軸にほとんど沿う結果となった。これらの結果より、T G 0 0 3は、野生型エクソン31ではエクソンスキッピングを促進せず、変異型エクソン31のエクソン31のスキッピングを特異的に促進することが示された。

実施例 4

- [0070] [H 4 9 2 - d y s E x 2 7 m / H e l aの変異型エクソン27のスキッピングに対するT G 0 0 3の効果]

T G 0 0 3が、ジストロフィン遺伝子のエクソン31以外のエクソンの変異に対してもスキッピングを促進させる効果を発揮するか否かを確認するために、K U C G 7 9 7の患者とは別の筋ジストロフィー患者由来のジストロフィン遺伝子の変異を解析した。この患者のジストロフィン遺伝子の変異はエクソン27に認められた。この変異は、ジストロフィンcDNA(配列番号1)の3613番目のグアニンヌクレオチドが欠失したものである(c. 3613 d e l G)。この変異は、ジストロフィンcDNA(配列番号1)の読み枠をシフトさせるアウトオブフレーム変異であり、その結果、その変

異の少しC末端側（ジストロフィンcDNA（配列番号1）の3641番目から3643番目のヌクレオチド部分）にストップコドン（終止コドン）を生じさせる。本明細書の背景技術に記載の読み枠ルールにしたがえば、この症例ではジストロフィンが産生されず、重篤なDMDとなることがその遺伝子型から予想されたが、実際の症状はそれより軽症であった。

[0071] この患者のゲノムDNAから、ジストロフィン遺伝子の変異型エクソン27とその両側の隣接イントロン領域とを含む断片をPCRで増幅した。プライマーとして、イントロン26 f-NheI（GCGGCTAGCAAATTTATGGAAGAGACTGGAGT TCA：配列番号6）、及び、イントロン27 r-BamHI（GCGGGATCCCAAGTTAAGCA AATGGCCAAA：配列番号7）を使用した。この増副産物をNheI（New England Biolabs社製）、及び、BamHI（New England Biolabs社製）で消化した断片を、それら両酵素で消化したH492ベクターに挿入した。これにより、この患者由来の変異型エクソン27とその両側の隣接イントロン領域とを含む断片を含むプラスミド（H492-dys Ex27m）を構築した。また、健常者のゲノムDNAを利用した同様の方法により、ジストロフィン遺伝子の野生型エクソン27と、その両側の隣接イントロン領域とを含む断片を含むプラスミド（H492-dys Ex27w）を構築した。H492-dys Ex27mプラスミド及びH492-dys Ex27wプラスミドのいずれも、プラスミドの全配列の決定を行い、目的断片が含まれていることを確認した。

[0072] 前述の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析1」における方法と同様の方法で、H492-dys Ex27m、及び、H492-dys Ex27wを、HeLa細胞にそれぞれトランスフェクションし、H492-dys Ex27m/HeLa、及び、H492-dys Ex27m/HeLaを得た。

[0073] H492-dys Ex31m/HeLa、及び、H492-dys Ex31m/HeLaに代えて、H492-dys Ex27m/HeLa、及び、H492-dys Ex27m/HeLaをそれぞれ用いたこと以外

は、前述の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析4」における方法と同様の方法でスプライシング解析を行った。その結果を図5 aに示す。また、図5 aのバンドの濃度を定量して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオを算出した結果を図5 bに示す。

- [0074] 図5 a及びbの結果から分かるように、変異型エクソン27を利用したH492-dys Ex27m/HeLaでは、TG003はそのエクソン27のスキッピングを用量依存的に促進した。一方、野生型エクソン27を利用したH492-dys Ex27w/HeLaでは、TG003が50 μ Mであっても、エクソン27のスキッピングを起こさず、図5 bのグラフでは横軸にほとんど沿う結果となった。すなわち、TG003は、野生型エクソン27ではエクソンスキッピングを促進せず、変異型エクソン27のエクソン27のスキッピングを特異的に促進することが示された。これらの結果より、TG003は、変異型エクソン31だけでなく、変異型エクソン27のスキッピングも促進することが明らかとなった。

実施例 5

- [0075] [KUCG797由来の細胞における、変異型エクソン31のスキッピングに対するTG003の効果]

次に、ジストロフィン遺伝子のスプライシングに対してTG003が及ぼす影響を、患者(KUCG797)由来の筋細胞において調べることにした。

- [0076] (KUCG797由来の筋細胞におけるスプライシング解析)

まず、KUCG797から採取した筋細胞について初代培養を行った。具体的には、以下のような方法で行った。6ウエルプレート(Gelatin-Coated micro plate 6 well with Lid; IWAKI社製)中に、20%のFBS(Gibco社製)、4%のUltrosor(登録商標)G(PALL社製)及び1%のAntibiotic-Antimycotic(Gibco社製)をコンフルエントになるまで添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Sigma社製)にて、患者由来の筋細胞を培養した。筋細胞を筋管に分化させるため、2%ウマ血清(Gibco社製)及び1%Anti

biotic-Antimycotic (Gibco社製) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Sigma社製) において、種々の濃度 (1 μ M、2 μ M、5 μ M、7 μ M、10 μ M) のTGO03の存在下又は不在下で、前述の初代筋細胞を2週間培養した。培地とTGO03は2日毎に入れ替えた。

[0077] 培養したこれらの筋細胞を用いて、スプライシング解析を行った。その方法としては、イントロン30 f-NheI、及び、イントロン31 r-BamHIの両プライマーに代えて、前述のフォワードc27 f及びリバーズ2 Fの両プライマーを用いたこと以外は、前述の「ミニ遺伝子を利用した、細胞におけるスプライシング解析3」と同様の方法を用いた。前述のフォワードc27 f及びリバーズ2 Fの両プライマーは、ジストロフィン遺伝子のエクソン27から32に至る領域を増幅するプライマーセットである。かかるスプライシング解析の結果を図6 aに示す。また、図6 aのバンドの濃度を定量して、エクソンスキップ/インクルージョンレシオを算出した結果を図6 bに示す。

[0078] 図6 a及びbの結果から分かるように、KUCG797由来の筋細胞を用いた場合であっても、TGO03はエクソン31のスキッピングを用量依存的に促進した。これらの結果から、TGO03は、患者細胞の変異型エクソン31のスキッピングを促進し得ることが示唆され、さらには、ジストロフィンの機能がある程度残存したトランケート型ジストロフィンの発現を増加させ得ることも強く期待された。

[0079] (KUCG797由来の筋細胞におけるトランケート型ジストロフィンの発現解析)

前述のKUCG797由来の筋細胞において、実際にトランケート型ジストロフィンが発現しているかどうかを確認するために、以下のウエスタンブロットリング解析を行った。

[0080] 2%ウマ血清 (Gibco社製) 及び1%Antibiotic-Antimycotic (Gibco社製) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Sigma社製) において、前述のKUCG797由来の初代筋細胞を、7 μ MのTGO03の存在下

又は不在下で2週間培養した。培地とT G O O 3は2日毎に入れ替えた。培養したこれらの筋細胞をP B Sで2回洗浄し、1XCell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology社製)を用いて回収した。回収した細胞から抽出した総タンパク質を3~10%勾配ポリアクリルアミドゲル(PAGEL、ATTO社製)にアプライした。なお、総タンパク質のアプライ量としては、コントロールについては4 μ g、変異T G O O 3 (0 μ M)については20 μ g、変異T G O O 3 (7 μ M)については60 μ gとした。ポリアクリルアミドゲルで泳動したタンパク質画分をHYBOND-Pメンブレン(GE Healthcare社製)にトランスファーした。ECL advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare社製)を製造者マニュアルに従って使用し、前述のメンブレンについてウエスタンブロットティング解析を行った。ジストロフィンのC末端に対する抗体(N C L - D Y S 2、Leica社製)、又は、ジストロフィンのエクソン31に対応する部分に対する抗体(8 H 1 1、Santa Cruz社製)を、それぞれ1:10及び1:100の希釈倍率にて使用し、前述のメンブレンのインキュベーションを行った。ジストロフィン抗ジストロフィン免疫複合体の検出には、抗マウスI g G抗体(GE Healthcare社製)を用いた。上述したものと同一プロトコールによって、デスミンのウエスタンブロットティング解析を行った。デスミン抗体(H-76、Santa Cruz社製)は希釈倍率1:50で使用した。デスミン抗デスミン免疫複合体の検出には、抗ウサギI g G抗体(GE Healthcare社製)を用いた。

[0081] 以上のウエスタンブロットティング解析の結果を図6cに示す。ジストロフィンのC末端に対する抗体を用いた結果(Dystrophin(C-terminal))から分かるように、T G O O 3を投与すると、ジストロフィンの発現が増加することが示された。ただし、このジストロフィンは、エクソン31に対応する部分に対する抗体では検出できなかったことから(図6のDystrophin(Exon 31/32)の結果)、このジストロフィンでは、エクソン31に対応する部分(エクソン31にコードされるペプチド)が欠失していると考えられる。以上の結果から、T G O O 3は、c. 4303G>T変異を有するK U C G 7 9 7由来

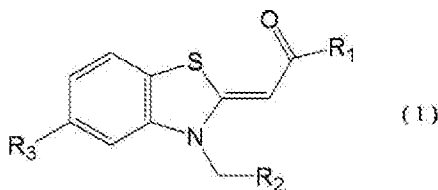
の細胞においてエクソン3 1スキッピングを促進することにより、トランケート型ジストロフィンの発現を促進することが示された。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明は、遺伝性疾患の予防・改善の分野に好適に利用することができる。より詳細には、遺伝子のエクソンの変異に起因し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善の分野に好適に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 遺伝子のエクソンの変異に起し、かつ、該変異が含まれるエクソンをスキッピングさせて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善剤であって、分子量1500以下の化合物を含有することを特徴とする予防・改善剤。
- [請求項2] 前記化合物が、スプライシング調節作用を有する化合物であることを特徴とする請求項1に記載の予防・改善剤。
- [請求項3] 前記化合物が、変異が含まれるエクソンのスキッピングを誘導・促進させる効果を有する化合物であることを特徴とする請求項1又は2に記載の予防・改善剤。
- [請求項4] 前記化合物が、Cdc-likeキナーゼ阻害化合物であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の予防・改善剤。
- [請求項5] 前記Cdc-likeキナーゼ阻害化合物が、一般式(1)



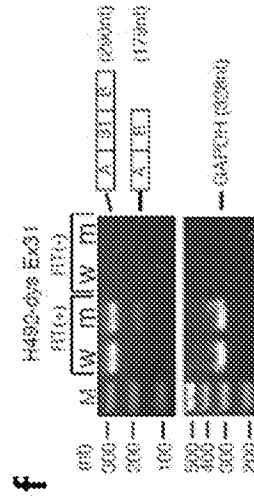
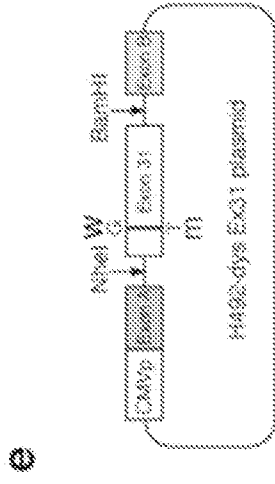
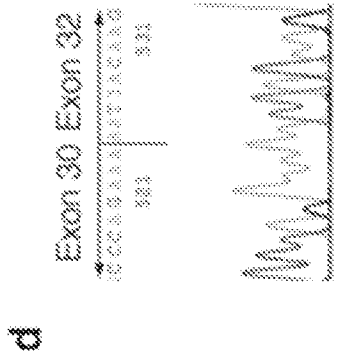
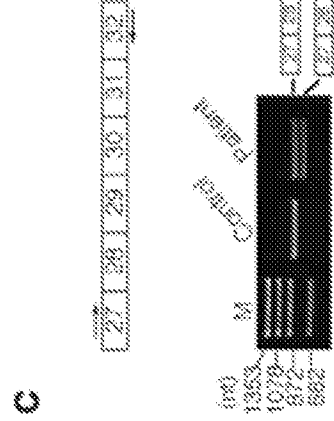
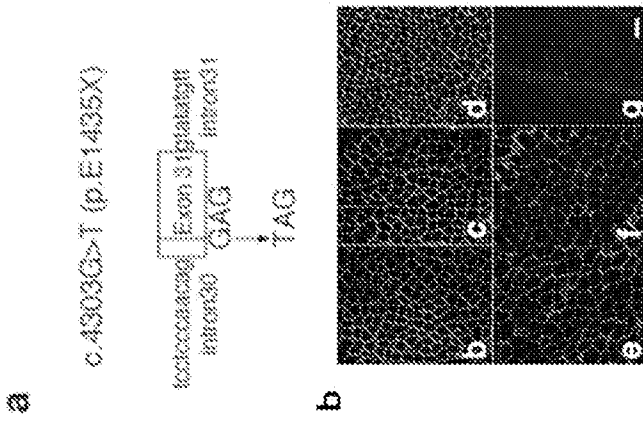
[式中、R₁及びR₂は各々独立に、直鎖状、分岐鎖状のC₁－C₁₀炭化水素基を示し；R₃はメトキシ基、エトキシ基、アセトキシ基又はハロゲン原子を示す。]

で表される化合物であることを特徴とする請求項4に記載の予防・改善剤。

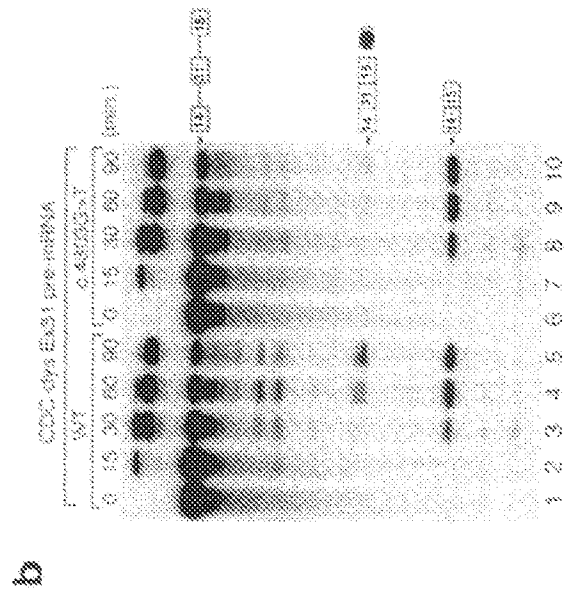
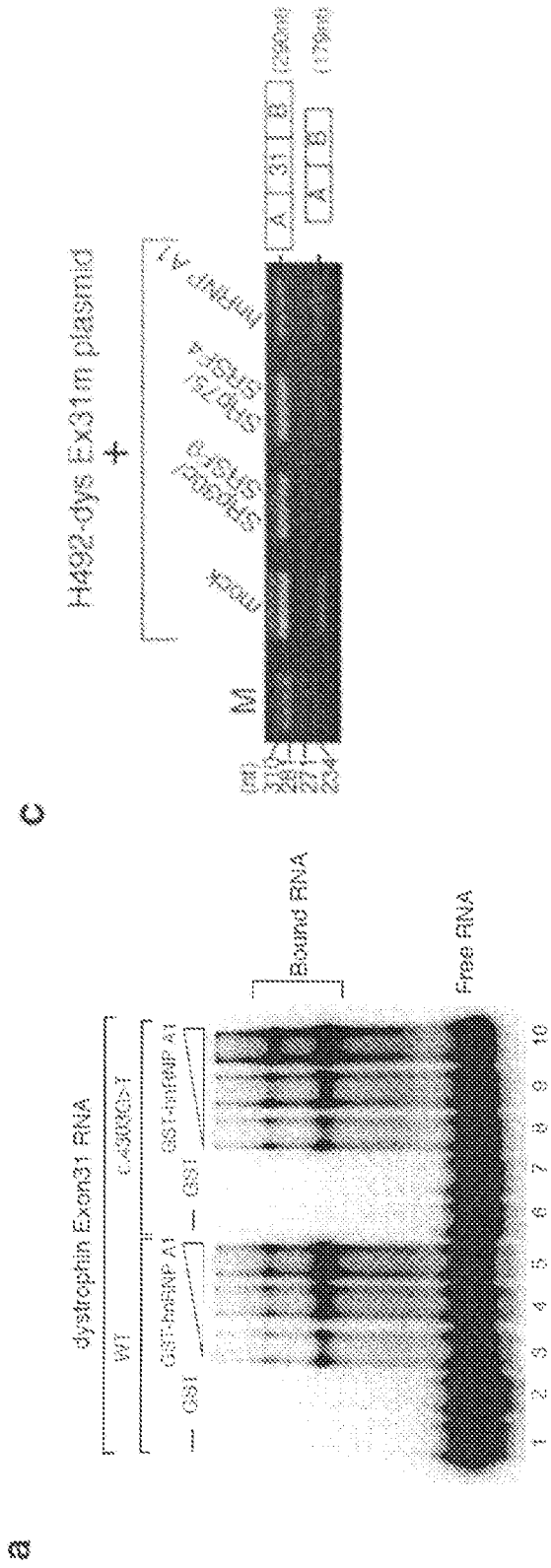
- [請求項6] 前記変異が、ナンセンス変異であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の予防・改善剤。
- [請求項7] 前記ナンセンス変異が、前記遺伝子におけるエクソンスプライシングエンハンサー活性を抑制し、及び／又は、前記遺伝子におけるエクソンスプライシングサイレンサー活性を上昇させる、ナンセンス変異であることを特徴とする請求項6に記載の予防・改善剤。

- [請求項8] 前記遺伝子がジストロフィン遺伝子であり、前記機能性トランケート型タンパク質が機能性トランケート型ジストロフィンタンパク質であり、前記遺伝性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーであることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の予防・改善剤。
- [請求項9] 前記ジストロフィン遺伝子のエクソンが、ジストロフィン遺伝子のエクソン31又はエクソン27であることを特徴とする請求項8に記載の予防・改善剤。
- [請求項10] 前記ジストロフィン遺伝子のエクソン31の変異が、配列番号1のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド番号4303におけるグアニンのチミンへのナンセンス変異であり、エクソン27の変異が、配列番号1のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド番号3613におけるグアニンが欠失したアウトオブフレーム変異であることを特徴とする請求項9に記載の予防・改善剤。

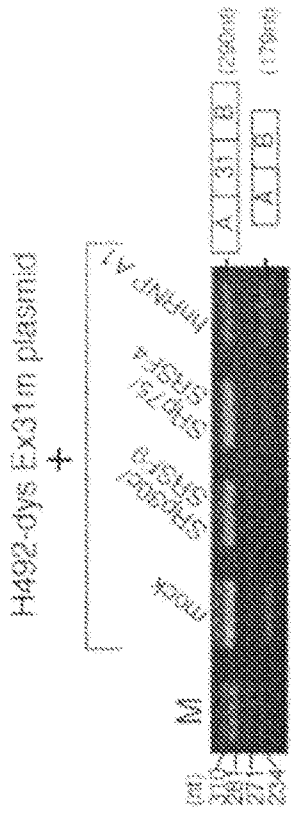
[1]



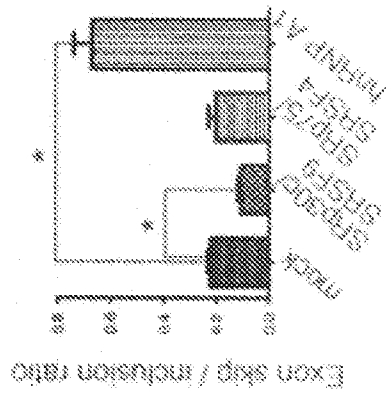
[3]



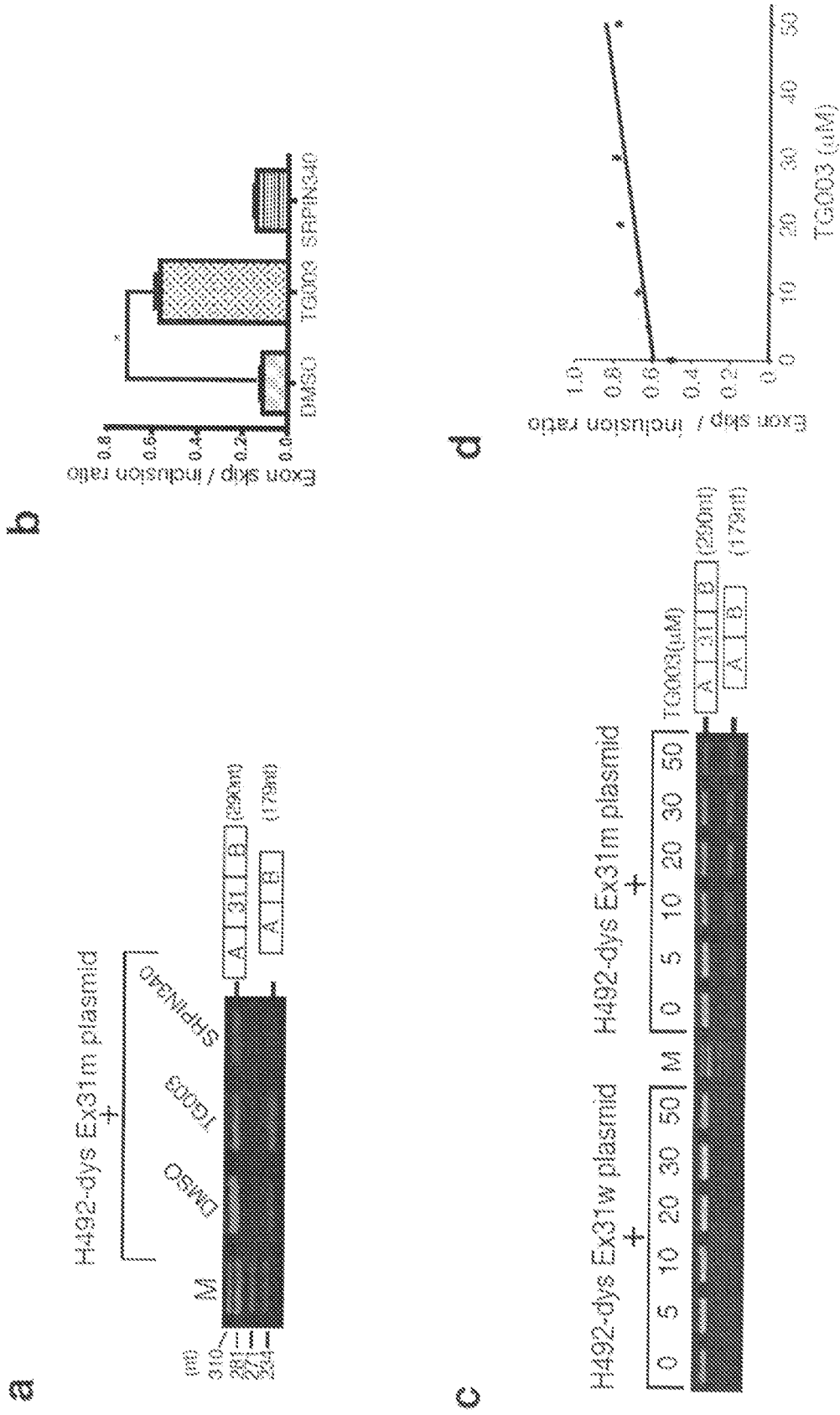
c



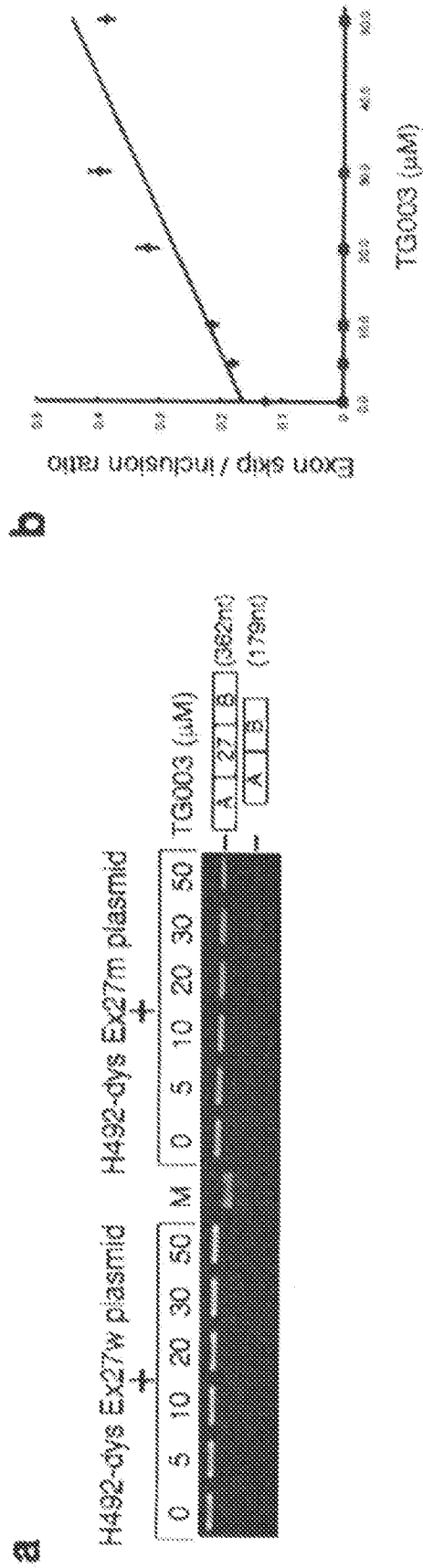
d



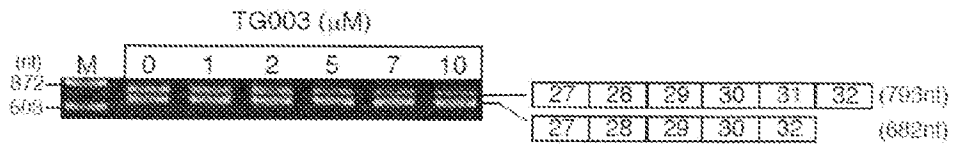
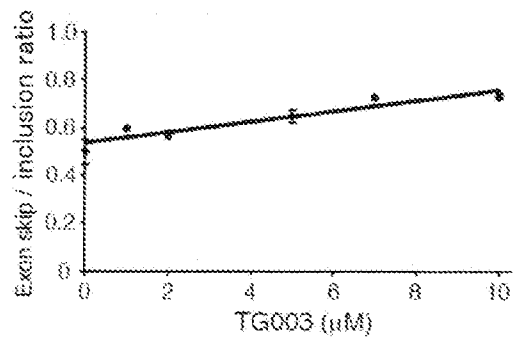
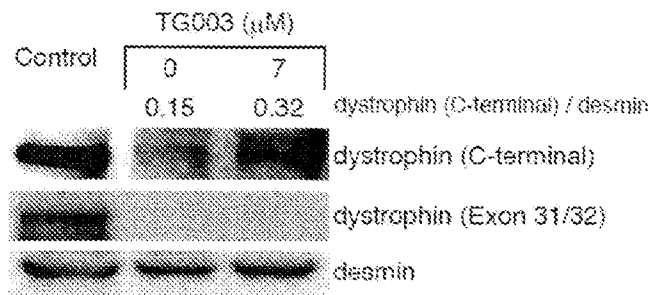
[図4]



[圖5]

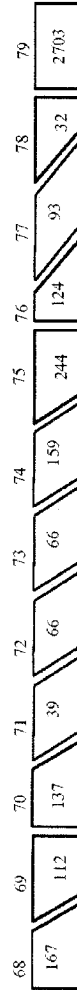
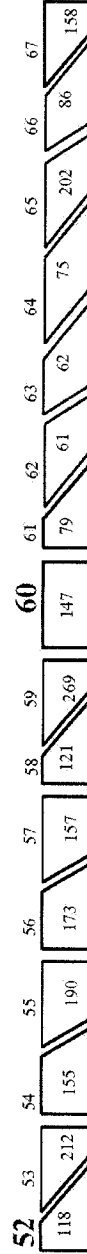
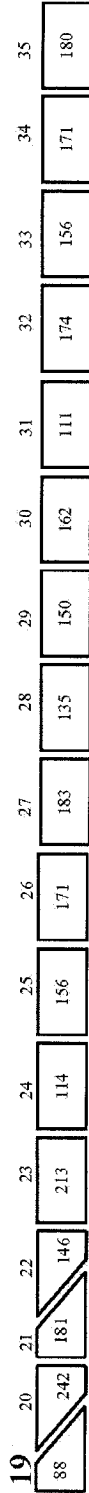
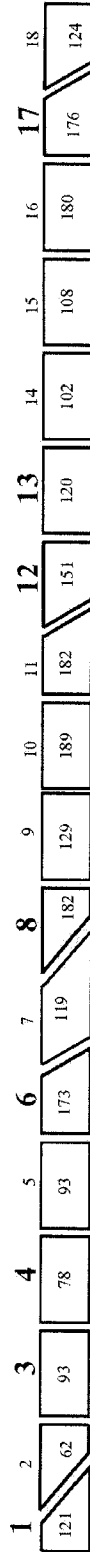


[6]

a**b****c**

[図7]

ジストロフィン遺伝子



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/003655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/428(2006.01)i, A61P21/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D277/64(2006.01)n, C12N9/12(2006.01)n, C12N9/99(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K31/428, A61P21/04, A61P43/00, C07D277/64, C12N9/12, C12N9/99, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPplus/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2009/087238 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), 16 July 2009 (16.07.2009), & US 2011/0053975 A1 & EP 2235000 A & JP 2011-509280 A	1-3, 6-8/4, 5, 9, 10
X	JP 2009-521408 A (Sirtris Pharmaceuticals), 04 June 2009 (04.06.2009), & WO 2007/102861 A2 & US 2007/0248590 A1 & EP 1957109 A	1-10
Y	Masatoshi HAGIWARA, "Chemical Biology ni yoru Nanji Shikkan eno Chosen", The Japanese Pharmacological Society Kanto Bukai Koen Yoshishu, 2009, vol.120th, page 14	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 July, 2011 (20.07.11)

Date of mailing of the international search report
02 August, 2011 (02.08.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/003655

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masafumi MATSUO, "Becker muscular dystrophy resulted from exon skipping that removes nonsense mutation", Gene & medicine, 1999, vol.3, no.2, pages 86 to 90	1-10
Y	DISSET A, et al., An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements., Hum. Mol. Genet., 2006, Vol.15, No.6, pp.999-1013	1-10
P,X	NISHIDA A, et al., Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene., Nat. Commun., 2011.05.10, Vol.2, pp.308:1-8	1-10
A	YOMODA J, et al., Combination of Clk family kinase and SRp75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A., Genes Cells., Vol.13, No.3, 2008, pp.233-244	1-10
A	MURAKI M, et al., Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks., J. Biol. Chem., 2004, Vol.279, No.23, pp.24246-24254	1-10
A	O'LEARY DA, et al., Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening., PLoS One, 2009, Vol.4, No.12, pp.e8348:1-15	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/428(2006.01)i, A61P21/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D277/64(2006.01)n, C12N9/12(2006.01)n, C12N9/99(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/428, A61P21/04, A61P43/00, C07D277/64, C12N9/12, C12N9/99, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	WO 2009/087238 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 2009.07.16 & US 2011/0053975 A1 & EP 2235000 A & JP 2011-509280 A	1-3, 6-8/ 4, 5, 9, 10
X	JP 2009-521408 A (サートリス ファーマシューティカルズ) 2009.06.04 & WO 2007/102861 A2 & US 2007/0248590 A1 & EP 1957109 A	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.07.2011

国際調査報告の発送日

02.08.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 大輔

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3962

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	萩原正敏, ケミカルバイオロジーによる難治疾患への挑戦, 日本薬理学会関東部会口演要旨集, 2009, Vol.120th, p.14	1-10
Y	松尾雅文, ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異にもかかわらずエクソンのスキッピングにより Becker 型筋ジストロフィーとなった例, 遺伝子医学, 1999, Vol.3, No.2, pp.86-90	1-10
Y	DISSET A, et al., An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements., Hum. Mol. Genet., 2006, Vol.15, No.6, pp.999-1013	1-10
P, X	NISHIDA A, et al., Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene., Nat. Commun., 2011.05.10, Vol.2, pp.308:1-8	1-10
A	YOMODA J, et al., Combination of Clk family kinase and SRp75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A., Genes Cells., Vol.13, No.3, 2008, pp.233-244	1-10
A	MURAKI M, et al., Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks., J. Biol. Chem., 2004, Vol.279, No.23, pp.24246-24254	1-10
A	O' LEARY DA, et al., Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening., PLoS One, 2009, Vol.4, No.12, pp.e8348:1-15	1-10