

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/001941

発行日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)

(43) 国際公開日 **平成24年1月5日 (2012. 1. 5)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/428 (2006. 01)	A 6 1 K 31/428	4 B 0 5 0
A 6 1 P 21/00 (2006. 01)	A 6 1 P 21/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
C O 7 D 277/64 (2006. 01)	C O 7 D 277/64	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2012-522455 (P2012-522455)	(71) 出願人	506180969 萩原 正敏
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/003655		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
(22) 国際出願日	平成23年6月27日 (2011. 6. 27)	(71) 出願人	505190116 松尾 雅文
(31) 優先権主張番号	特願2010-146699 (P2010-146699)		兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬5 1 8番 神戸学院大学総合リハビリテーション学部 医療リハビリテーション学科
(32) 優先日	平成22年6月28日 (2010. 6. 28)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	萩原 正敏 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
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 遺伝性疾患の予防・改善剤

(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。

【特許請求の範囲】

【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。

10

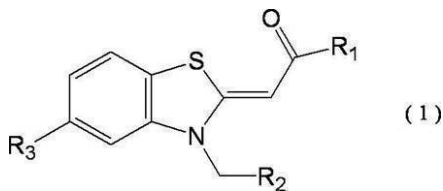
【請求項 4】

前記化合物が、C d c - l i k e 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 C d c - l i k e キナーゼ阻害化合物が、一般式 (1)

【化 1】



20

[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。

30

【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。

40

【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。

【発明の詳細な説明】

【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

50

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、筋線維の破壊・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。

10

【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、組織が瘢痕化して、筋細胞が再生されにくくなり、筋萎縮が進行していく。

20

【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）を通常もたすが、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。

30

40

【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

50

なる A O N がデザインされた。これらの A O N は、ジストロフィン m R N A 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 (E S E) に対する A O N によって、前述の D M D 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 A O N もまた患者細胞に対して多く使用され、現在、これらの A O N は臨床研究段階にある (非特許文献 6 ~ 8 参照) 。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、A O N 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 m d x マウスに A O N 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 P T C 1 2 4 (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 D M D 患者を治療し得ることが報告されており (非特許文献 1 0 や 1 1) 、現在、米国等において、フェーズ 2 b の臨床試験が行われている。P T C 1 2 4 は、リボゾームが翻訳時に中途終止コドン (P T C) 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 m R N A 分解機構に与える影響については、まだ不明である。

10

20

【 0 0 0 7 】

ところで、本発明者らは、C d c - l i k e キナーゼ (C l k) 特異的なキナーゼ阻害剤として、T G 0 0 3 (後述の一般式 (1) において、 R_1 及び R_2 がメチル基であり、 R_3 がメトキシ基である化合物) を同定した。T G 0 0 3 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 1 2 及び 1 3 参照) 、本発明者らが関わる特許出願 (特許文献 1 参照) には、T G 0 0 3 が S R 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うことが記載されている。しかし、T G 0 0 3 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。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 1 7 1 0 2 6 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 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.

40

【 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 1 0 】 J Clin Pharmacol (2007) 47, 430-444.

【 非特許文献 1 1 】 Nature (2007) 447, 87-91.

【 非特許文献 1 2 】 The Journal of biological chemistry (2004) 279, 24246-24252.

【 非特許文献 1 3 】 Genes Cells (2008) 13, 233-244.

50

【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。

10

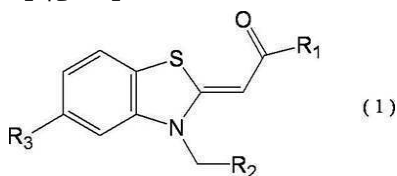
20

【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Cdc-likeキナーゼ阻害化合物が、一般式(1)

30

【化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

40

50

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。

10

【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、X174-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、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。

20

30

40

50

【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。

10

【図3】患者遺伝子で見い出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鋳型とし、かつ、インキュベーション時間をそれぞれ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鋳型とし、かつ、インキュベーション時間をそれぞれ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-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前駆体でよりも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、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

20

30

40

50

のレーン (h n R N P A) は、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m ・ F l a g - h n R N P A 1 プラスミド / H e l a 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 . 0 0 5

【図 4】 T G 0 0 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 3 1 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 3 1 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、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / 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。一番左のレーン (M) は、 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 番目のレーン (D M S O) は、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / H e l a を D M S O 処理した場合の結果を表し、左から 3 番目のレーン (T G 0 0 3) は、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / H e l a を T G 0 0 3 処理した場合の結果を表し、一番右のレーン (S R P I N 3 4 0) は、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / H e l a を S R P I N 3 4 0 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 . 0 0 0 1 (c) 変異型エクソン 3 1 のスキッピングを促進

10

する T G 0 0 3 が、野生型エクソン 3 1 のスキッピングを促進するかを調べるために、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 m / H e l a に加えて、 H 4 9 2 - d y s E x 3 1 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 3 1 w / H e l a をパネル上部の濃度 (μ M) の T G 0 0 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 3 1 m / H e l a をパネル上部の濃度 (μ M) の T G 0 0 3 で処理した場合の結果を表し、中央のレーン (M) は、 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。(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。

20

【図 5】 T G 0 0 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 2 7 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 0 0 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 0 0 3 で処理した場合の結果を表し、中央のレーン (M) は、 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。

30

【図 6】 T G 0 0 3 は、変異型エクソン 3 1 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 3 1 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 0 0 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、 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 0 0 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 0 0 3 で

40

50

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(C-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ることができる。

【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、 R_1 及び R_2 は各々独立に、直鎖状、分岐鎖状の C_{1-10} 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、 R_1 及び R_2 がメチル基であり、 R_3 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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 1 9 】

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。

10

20

【 0 0 2 0 】

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。

30

40

【 0 0 2 1 】

また、ある化合物が、Clk 阻害化合物であるかどうかは、被検化合物の存在下で、Clk 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 Clk 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 Clk のリン酸化活性の値が、被検化合物の非存在下における Clk のリン酸化活性の値より低い場合に、その被検化合物を Clk 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 Clk は、公知の Clk の配列情報に基づいて、所望の哺乳動物から Clk 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 Clk を単離することによって容易に入手すること

50

ができる。C1kのリン酸化活性は、C1k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、C1k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。

10

20

【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。

30

40

【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

50

、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る。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る。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る。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。

10

20

30

40

50

【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る。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C1k阻害化合物を用いる場合において、かかるC1k阻害化合物が阻害作用を発揮するC1k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 μ g～10000mg、より好ましくは1 μ g～3000mg、さらに好ましくは10 μ g～1000mgを好適に例示することができる。

10

【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。

20

【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。

30

【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:CCTGTAGCACAAGAGGCCTTA(配列番号2)、及び、リバーズ2F:TCCACACTCTTTGTTTCCAATG(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。

40

50

【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をコードする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10μm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10μm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化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）

10

20

30

40

50

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(682nt)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(111nt)を欠失するジストロフィンmRNA(682nt)はインフレームであり、ト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(ト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、前述のト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、かかるト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(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のスプライシング信号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 (GCGGCTAGCGTGATCCACCTGCCTCGAC: 配列番号4)、及び、イントロン31r - BamHI (GCGGGATCCTCAAATCCAATCTTGCCAAT: 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。

10

【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。

20

30

【実施例2】

【0048】

[エクソン31スプライシングに關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。

40

【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(SFSR9)との結合力を低下させるこ

50

とが分かった(図2a)。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2b)(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、hnRNPA1高親和性結合部位をも生じさせる(図2a)。つまり、上記変異型エクソン31の変異は、hnRNPA1のSELEX winner配列と高い相同性をもつRNA配列を生じさせる(図2b)(Embo J(1994)13, 1197-1204.)。hnRNPA1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hnRNPA1に結合するESSに変わることが示唆された。

10

【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hnRNPA1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、hnRNPA1に対する結合活性を、変異型エクソン31RNAと野生型エクソン31RNAとで比較した。具体的には以下の方法で行った。

【0051】

ヒトhnRNPA1 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-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GST-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, 100mM 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。

20

30

【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、16mM HEPES-KOH(pH7.9)、80mM KCl、0.16mM EDTA、0.8mM DTT、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。

40

【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

50

のエクソン 3 1 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 3 1 RNA よりも変異型エクソン 3 1 RNA により効率的に結合し、hnRNPA1 マルチマーを含む、より大きな複合体を形成した (図 3 a 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 3 1 の点変異は、hnRNPA1 に対する新たな高親和性結合部位をエクソン 3 1 上に生じさせ、その結果、変異型エクソン 3 1 RNA 上の hnRNPA1 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 3 1 は、hnRNPA1 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。

10

【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 3 1 は、hnRNPA1 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 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 3 1 又は前述の変異型エクソン 3 1 を含む mRNA 前駆体を調製した (図 3 b 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 3 1 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 Ex 3 1 w を作製した。また、野生型エクソン 3 1 に代えて変異型エクソン 3 1 を用いて、同様の方法で pCDC - dys Ex 3 1 m を作製した。pCDC - dys Ex 3 1 w 及び pCDC - dys Ex 3 1 m 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 ³²P 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 µl スケールでこれらの mRNA 前駆体 (CDC - dys Ex 3 1 w mRNA 前駆体又は CDC - dys Ex 3 1 m mRNA 前駆体) と HeLa 細胞核抽出物 (Cilbiotech 社製) を混合し、次いで、30 分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 3 b に示す。

20

30

【0056】

野生型エクソン 3 1 を含む CDC - dys Ex 3 1 w mRNA 前駆体を用いた結果 (図 3 b のレーン 3 ~ 5) と、変異型エクソン 3 1 を含む CDC - dys Ex 3 1 m mRNA 前駆体を用いた結果 (図 3 b 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 3 1 を含む mRNA 産物 (図 3 b 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 3 1 を含まない mRNA 産物 (エクソン 1 4 及び 1 5 からなる mRNA 産物) については、変異型エクソン 3 1 を含む CDC - dys Ex 3 1 m 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。

40

【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 3 1 m / 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

50

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

10

【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 hnRNPA1 cDNA 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 (20 mM HEPES - KOH pH 7.9、1000 mM KCl、0.2 mM EDTA、10% グリセロール、及び 1 mM 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。

20

【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。

30

【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ーを示し、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。

40

【0062】

50

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SRp75/SRSF4)は、コントロールの場合(図3c及びdのmock)とエクソスキップ/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。

10

【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。

20

【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Clkキナーゼの阻害剤である。TG003は、アデノウイルスE1A、SC35、及びClk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。

30

【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、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。

40

【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

50

合(図4 a及びbのTG003)は、コントロールの場合(図4 a及びbのDMSO)と比較して、エクソンスkip/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HeLa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TG003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kip/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。

10

【0069】

図4 c及びdの結果から分かるように、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)では、TG003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、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HeLa細胞)では、TG003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、TG003は、野生型エクソン31ではエクソンスkip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。

20

【実施例4】

【0070】

[H492-dys Ex27m/HeLaの変異型エクソン27のスキッピングに対するTG003の効果]

30

TG003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、KUCG797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.3613delG)。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。

40

【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26f-NheI(GCGGCTAGCAAATTTATGGAAGAGACTGGAGTTCA:配列番号6)、及び、イントロン27r-BamHI(GCGGGATCCCAAGTTAAGCAAATGGCCAAA: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

50

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。

10

【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5aに示す。また、図5a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5bに示す。

【0074】

図5a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50µMであっても、エクソン27のスキッピングを起こさず、図5b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。

20

【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]

30

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%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、種々の濃度(1µM、2µM、5µM、7µM、10µM)のTG003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TG003は2日毎に入れ替えた。

40

【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30f-NheI、及び、イントロン31r-BamHIの両プライマーに代えて、前述のフォワードc27f及びリバース2F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

50

述のフォワード c 2 7 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 2 7 から 3 2 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。

【 0 0 7 8 】

図 6 a 及び b の結果から分かるように、K U C G 7 9 7 由来の筋細胞を用いた場合であっても、T G 0 0 3 はエクソン 3 1 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、T G 0 0 3 は、患者細胞の変異型エクソン 3 1 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。

10

【 0 0 7 9 】

(K U C G 7 9 7 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 K U C G 7 9 7 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ティング解析を行った。

【 0 0 8 0 】

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 (D M E M) (Sigma 社製) において、前述の K U C G 7 9 7 由来の初代筋細胞を、7 μ M の T G 0 0 3 の存在下又は不在下で 2 週間培養した。培地と T G 0 0 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、1X Cell 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 ~ 1 0 % 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 0 0 3 (0 μ M) については 2 0 μ g、変異 T G 0 0 3 (7 μ M) については 6 0 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 3 1 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 : 1 0 及び 1 : 1 0 0 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ティング解析を行った。デスミン抗体 (H - 7 6、Santa Cruz 社製) は希釈倍率 1 : 5 0 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。

20

30

【 0 0 8 1 】

以上のウエスタンブロッティング解析の結果を図 6 c 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 0 0 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 3 1 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 3 1 に対応する部分 (エクソン 3 1 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 0 0 3 は、c . 4 3 0 3 G > 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。

40

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 2 】

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

50

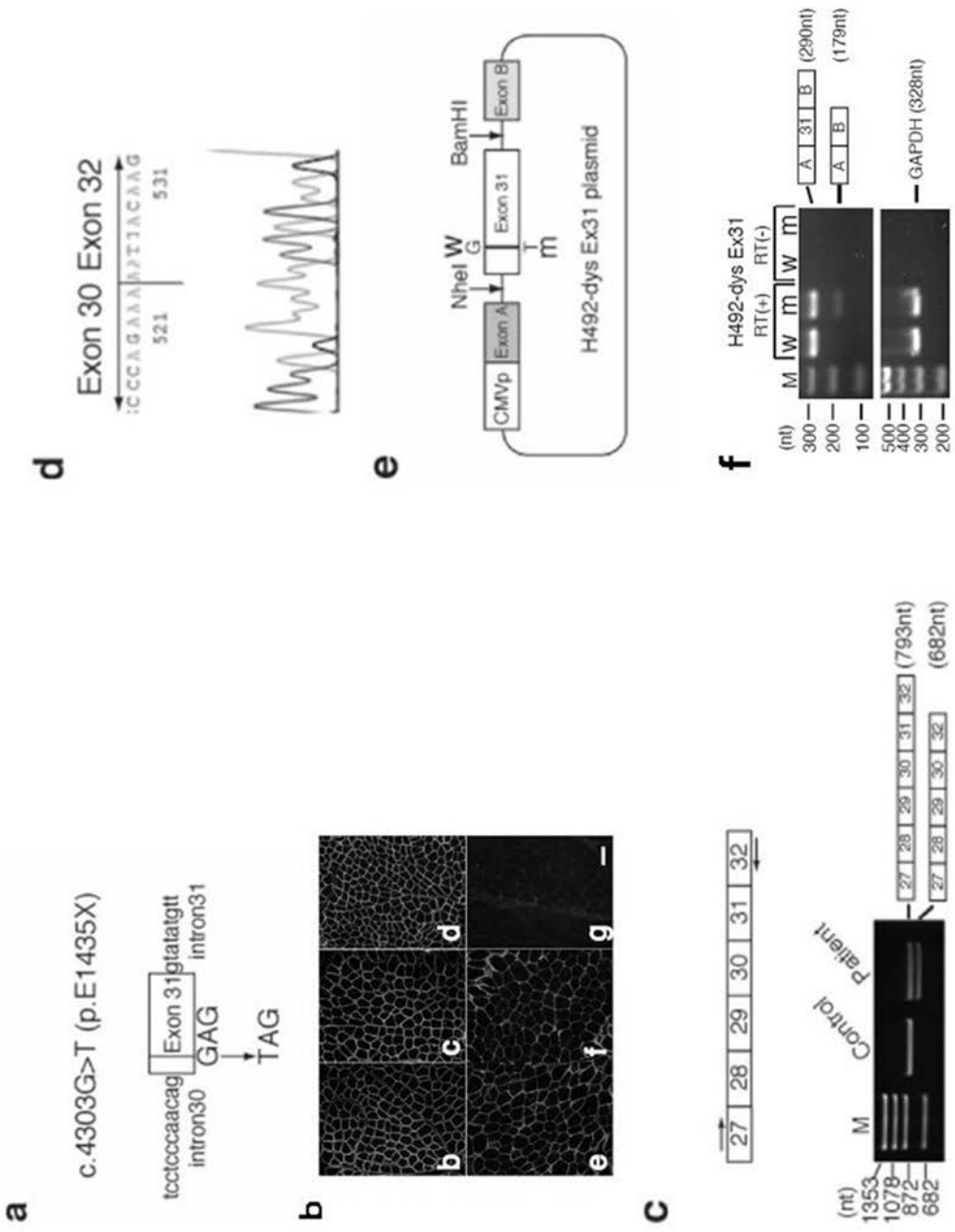
させて機能性トランケート型タンパク質を生成させ得る遺伝性疾患の予防・改善の分野に好適に利用することができる。

【 図 7 】

ジストロフィン遺伝子

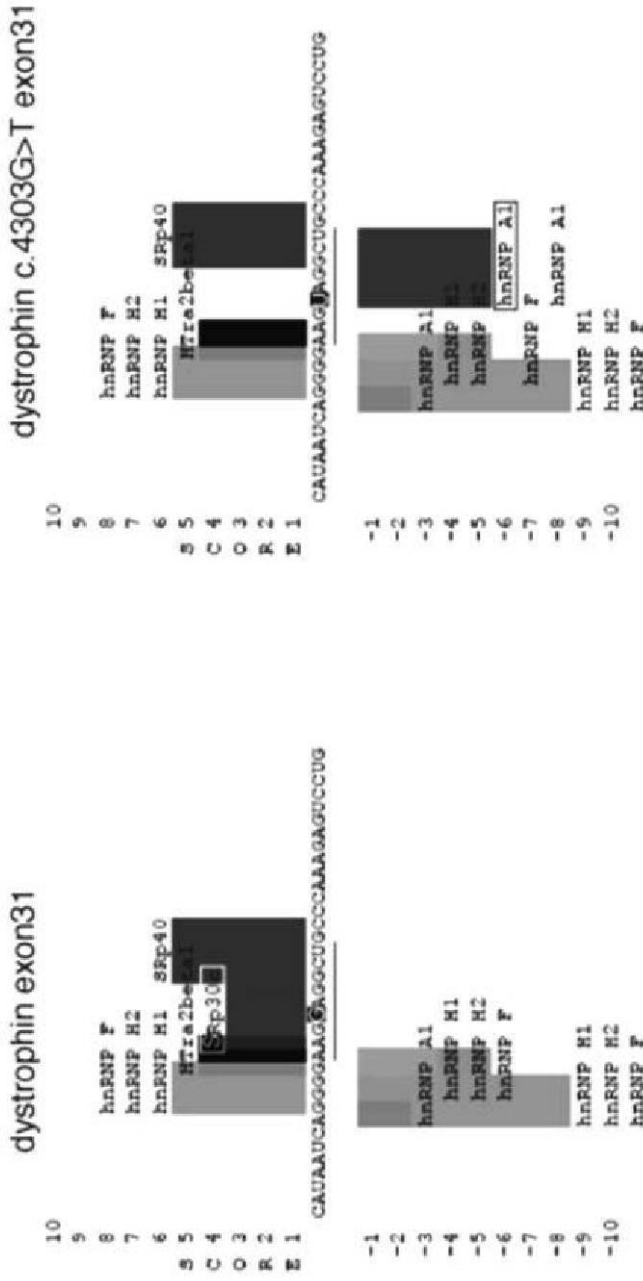


【 図 1 】



【 2 】

a



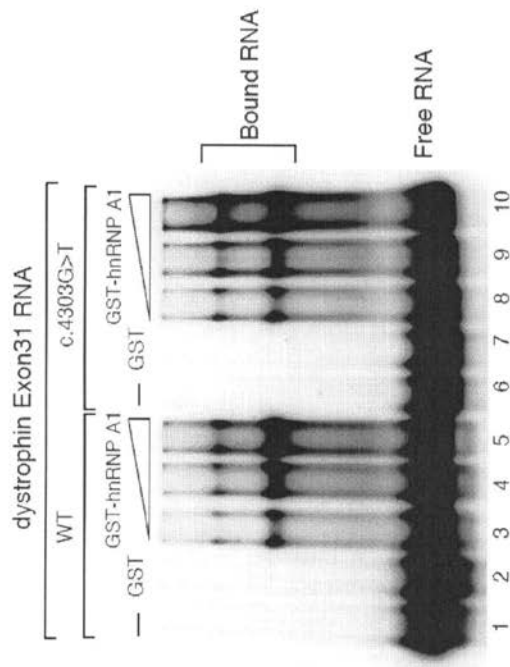
dystrophin c.4303G>T exon31

b

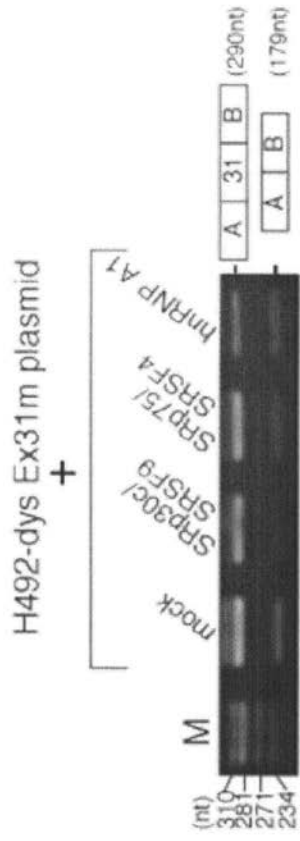


【 3 】

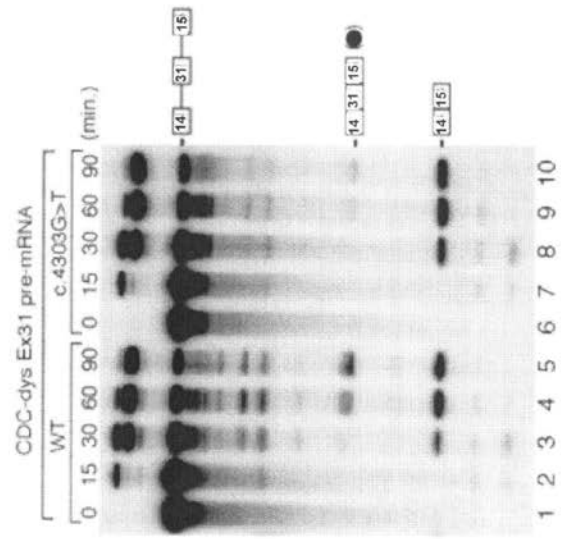
a



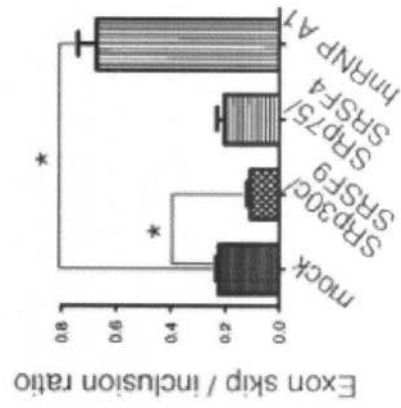
c



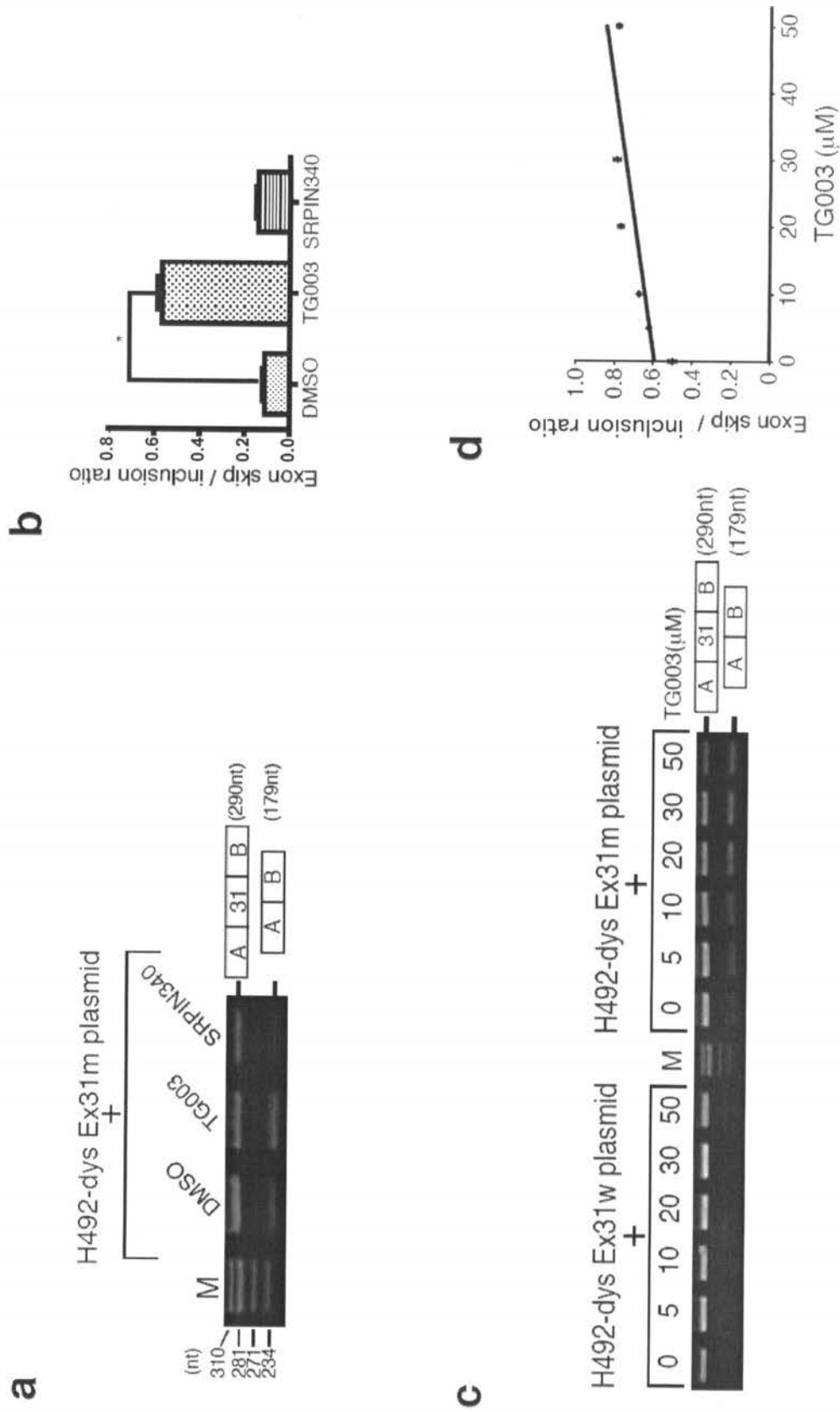
b



d



【 図 4 】

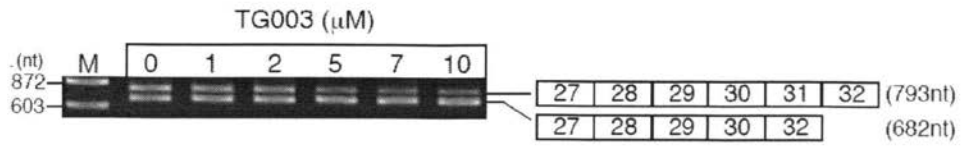


【 図 5 】

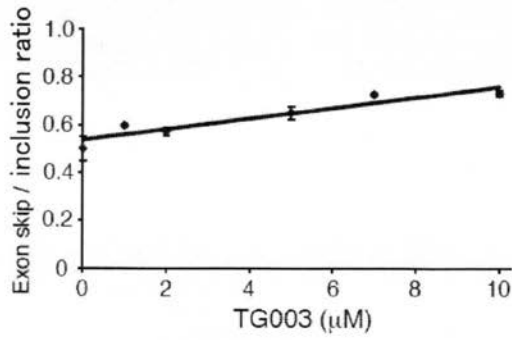


【 図 6 】

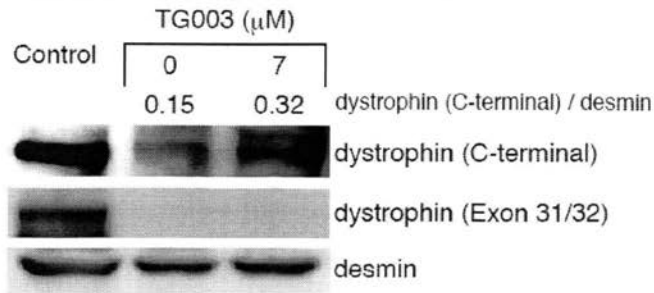
a



b



c



【 配 列表 】

2012001941000001.app

【国際調査報告】

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/CaPlus/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
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/003655									
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				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
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									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
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/JP) 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	4C 3962								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 0 3 6 5 5
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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(72) 発明者 松尾 雅文
兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 5 1 8 神戸学院大学内

(72) 発明者 片岡 直行
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

(72) 発明者 西田 篤史
兵庫県相生市若狭野町下土井 2 7

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA80 CA02 CA20 HA11
4B050 CC10 DD11 LL01
4C084 AA17 NA14 ZA942 ZC202 ZC412
4C086 AA01 AA02 BC84 MA01 MA04 NA14 ZA94 ZC20

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。