

氏名	Sarantuya Enkhjargal
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1342号
学位授与の日付	2023年9月21日
学位論文題名	Antisense oligonucleotide induced pseudoexon skipping and restoration of functional protein for Fukuyama muscular dystrophy caused by a deep-intronic variant 「アンチセンスオリゴ核酸によって偽エクソンのスキップを誘導し、深部イントロン変異による福山型筋ジストロフィー症の機能的タンパク質を回復させる」 Human Molecular Genetics. 2023;32:1301-1312
指導教授	倉橋浩樹
論文審査委員	主査 教授 吉川哲史 副査 教授 土田邦博 教授 前田明

### 論文内容の要旨

#### 【Introduction】

Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) is the second most common form of childhood muscular dystrophy in Japan, and is characterized by muscle weakness, brain malformation, and altered O-mannosyl glycosylation of alpha-dystroglycan ( $\alpha$ -DG). In most cases, FCMD is caused by a homozygous retrotransposal SINE-VNTR-Alu (SVA) insertion in the 3'-untranslated region of *fukutin* (*FKTN*) gene. A deep-intronic variant (DIV) is the second most common loss-of-function variation in Japanese patients. This DIV leads to aberrant splicing, resulting in a truncated and non-functional protein. Patients with FCMD carrying the DIV suffer from more severe symptoms than those without, and there is currently no radical therapy available. Antisense oligonucleotide (ASO)-based splice modulation therapy shows promise as a potential treatment approach.

#### 【Purpose】

The study aims to assess the potential of ASO therapy as a treatment approach for FCMD patients carrying the DIV. The purpose of the study is to evaluate the effectiveness of ASOs in pseudoexon skipping caused by the DIV.

#### 【Subject】

The subject of the study is FCMD patients carrying the DIV in the *FKTN*. Fibroblast, lymphoblast and myoblast cell lines were both derived from a healthy control and from a patient with FCMD (KG-105) carrying a compound heterozygous

SVA insertion and DIV.

#### 【Method】

To identify splicing regulatory elements affected by the DIV in *FKTN*, online tools were utilized. Subsequently, ASOs were designed to target these elements and synthesized with 2'-O-methyl ribose chemistry. The efficacy of the ASOs was evaluated using RNA analysis (RT-PCR, quantitative RT-PCR) on patient-derived cell lines (fibroblasts, lymphoblasts, myoblasts) and minigene splice assay. Additionally, protein analysis (western blot, immunoprecipitation, immunohistochemistry) was conducted to assess the restoration of functional protein. Data analysis was performed using Prism software.

#### 【Results】

ASO 15, targeting the exonic splice enhancer region, was found to be the most effective in inducing significant pseudoexon skipping and increasing the expression of normal mRNA in fibroblasts and minigene splicing assay. Additionally, this ASO was able to rescue FKTN protein production in lymphoblast cells and restore functional O-mannosyl glycosylation of  $\alpha$ -DG in patient-derived myotubes.

#### 【Discussion】

The potential of ASOs to correct splicing defects in genetic disorders is promising, yet their specificity makes them only suitable for certain variations. To assess the therapeutic benefits of using ASOs to cause pseudoexon skipping for FCMD, further investigation is essential, including in vivo studies and clinical trials.

#### 【Conclusion】

Our study has demonstrated that administering specifically designed ASOs to FCMD patient-derived fibroblasts, lymphoblasts, and myotubes successfully skips the pseudoexon and restores the functional protein expression.

### 論文審査結果の要旨

福山型筋ジストロフィー症(FCMD)は、我が国における筋ジストロフィー症の中で二番目の頻度を占める難病である。遺伝子変異の中では、*Fukutin*遺伝子内へのレトロトランスポゾン挿入により、正常のフクチン蛋白質が欠損し発症する症例が最も多い。申請者は、我が国のFCMD患者の中で二番目の頻度で認められる、イントロン内部の変異(DIV; deep-intronic variant)による本疾患症例へのアンチセンスオリゴ核酸(ASO)を用いた治療法を開発するため、患者遺伝子配列を基に16種類のASOを合成し*in vitro*でその効果を検討した。初めに患者由来の繊維芽細胞を用いて各ASOによる偽エクソン挿入の抑制、異常mRNA合成阻害効果を検討した結果、3種類のSR蛋白質特異的なスプライシング促進配列に対合すると予想されたASO-15が最も高効率であることを見出した。さらに、ミニ遺伝子を用いたルシフェラーゼ解析においても、同様にASO-15が疾患特異的なスプライシング異常の抑制効果が最も高いことを証明した。さらに患者の筋管細胞を用いた検討で、ASO-15投与により正常フクチン蛋白質の機能である $\alpha$ -ジストログリカンのグリコシル化も回復できることを見出した。本研究は、良く計画された実験系で治療効果を検証し、DIVによるFCMDに対するASO治療の可能性を証明した極めて重要な研究成果で、既にHuman Molecular Genetics誌に受理され公開されている。審査委員会での口頭発表も周到に準備され、非常にわかりやすく、質疑応答も的確になされたことから、博士論文として十分に値すると判断した。