

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

デュシェンヌ型筋ジストロフィーのアンチセンス治療法の開発

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 松尾 雅文

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
デュシェンヌ型筋ジストロフィーのアンチセンス治療法の開発	-- 1
松尾 雅文	
II. 分担研究報告	
デュシェンヌ型筋ジストロフィーのアンチセンス治療法の開発に関する研究	-- 2
松尾 雅文	
竹島 泰弘	
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 7
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総合）研究報告書

デュシェンヌ型筋ジストロフィーのアンチセンス治療法の開発

I 総括研究報告

主任研究者：松尾 雅文 （神戸大学大学院医学系研究科 教授）

（研究要旨）

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の治療法としてジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングをスプライシング時に誘導する方法が注目されている。これは、DMD患者にみられるジストロフィンmRNAのアミノ酸読み取り枠のずれをエクソンのスキッピングを誘導することにより修正し、ジストロフィンを発現させるものである。私達はアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソン19のスキッピングを誘導する治療を世界で初めて実施し成功した。さらに、新しく開発された修飾核酸(ENA)からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドのRNA/ENAキメラの実用化を世界に先駆けて図り、ジストロフィン遺伝子の欠失のホットスポット領域にあるエクソンのスキッピングを誘導するRNA/ENAキメラの同定に成功した。また、エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドをデザインするのに際して最も重要な情報であるジストロフィン遺伝子のスプライシング制御機構の解明においては、エクソン内の配列のスプライシングに關与する塩基の解明に成功するなど、多くの成果をあげた。

II 研究報告

(分担研究者)

松尾 雅文

神戸大学大学院医学系研究科
教授

竹島 泰弘

神戸大学大学院医学系研究科
助教授

本研究は神戸大学大学院医学系研究科の松尾雅文と竹島泰弘が共に分担研究者として共同して研究を推進してきた。本報告書は重複を避けるため2名の研究内容をまとめて記したものである。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患である。しかし、未だ有効な治療法は確立されていない。私たちは、「ジストロフィン神戸」に関する分子病態の詳細な解析結果を基盤としてエクソンのスキッピングを誘導することを応用する「DMDをmRNAレベルで治療する」という独自の治療法を着想した。そして、ジストロフィン遺伝子のエクソン19にスプライシング促進配列があること、このスプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドがエクソン19のスキッピングを有効に誘導することなどの世界的成果をあげてきた。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして新しい修飾核酸であるENAを用いたより安定性の高いRNA/ENAキメラが強いエクソンスキッピング誘導能を有することを

明らかにしてきた。

本研究は、①エクソン19のエクソンスキッピング誘導治療を実践に移すこと②ジストロフィン遺伝子の欠失のホットスポット領域内にあるエクソンを対象として、そのスキッピングを誘導するRNA/ENAキメラの同定とそのDMD患者由来培養筋細胞への導入によるジストロフィンの発現③ジストロフィン遺伝子のスプライシングの制御機序解明に関する研究として、スプライシングに必須のエクソン配列の同定などについて研究を実施した。

B. 研究方法

①エクソン19のスキッピング誘導治療
ジストロフィン遺伝子のエクソン20を欠失したDMD患者にエクソン19のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを点滴静注し、骨格筋におけるジストロフィンmRNAのエクソンスキッピング誘導とジストロフィンの発現を確認する。

②RNA/ENAキメラの同定とDMD由来培養筋細胞でのジストロフィン発現
欠失のホットスポットにあるエクソンのスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを同定するため、各種RNA/ENAキメラを合成する。そして、それらを導入した培養筋細胞のmRNAを解析することにより、エクソンスキッピングを誘導するRNA/ENAキメラを同定する。さらに、ジストロフィン遺伝子の欠失のホットスポットにあるエクソンの欠失を有するDMD患者から培養筋細胞株を樹立し、これに先に同定したRNA/ENAキメラを導

入する。導入筋細胞におけるmRNAの修正ならびにジストロフィン発現をそれぞれRT-PCRおよびモノクローナル抗体を用いた免疫染色法により確認する。

③スプライシング制御機序の解明

1) スプライシングに必須のエクソン内の一塩基の同定

DMD患者の遺伝子診断を実施し、そのジストロフィンmRNAを解析することにより遺伝子の異常から2次的に発生するスプライシング異常を明らかにする。そして、スプライシングの異常の発生機序を明らかにするため、*in vitro*のスプライシング解析系を用いた解析を行う。

スプライシング異常を来たしたジストロフィン遺伝子のエクソン内の異常をハイブリッド型ミニ遺伝子に挿入し、*in vitro*のスプライシング反応系を用いてスプライシングに必須エクソン内の塩基を同定する。

2) エクソン19のスプライシング制御機序の解明

ジストロフィン遺伝子のエクソン19内にスプライシング促進配列があり、その機能を阻害することによりエクソンスキッピングが有効に誘導された。そこで、このエクソン19のスプライシング促進配列(ESE19)の機能的特徴を明らかにする。HeLa細胞を用いたスプライシングレポーター系を利用し、ESE19の有無と5'上流側のポリピリミジントラクトの配列の関係を解析する。

3) 潜在エクソンの解析

ジストロフィン遺伝子のイントロン内には正常では使用されない潜在的エクソ

ンが存在している。今回さらに多くの潜在的エクソンを見出したのでそのエクソンとしての特徴をスプライシングアクセプター及びドナーサイトのShapiroのスコア、スプライシング促進配列などから検討する。

(倫理面への配慮)

エクソンスキッピングを誘導する治療については神戸大学医学部医学倫理委員会での審査を経て承認されており、DMD患者の遺伝子診断並びに患者細胞でのジストロフィン発現の検討についても同様に承認されている。

C. 研究成果

①エクソン19のスキッピング誘導治療

ジストロフィン遺伝子のエクソン20を欠失したDMD患者に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソン19スキッピング誘導治療を実施した。治療後の患者骨格筋でジストロフィンmRNAのエクソン19スキッピングを確認するとともに、ジストロフィンの発現をも確認した。

この成果は世界で初めてエクソンスキッピング誘導治療が有効なことを示すものとして「Pediatric Research」誌の表紙を飾るなど世界の注目を集めた。一方、ジストロフィン遺伝子のエクソン20から24を欠失したDMD患者でも同じ治療を実施した。しかし、エクソン19スキッピング誘導には成功したが、骨格筋でのジストロフィンの発現は確認できなかった。

②欠失のホットスポット領域のエクソンのスキッピングを誘導するRNA/EN

Aキメラの同定

欠失のホットスポット領域にあるエクソンのスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドを同定するため、標的とするそれぞれのエクソンの全領域をカバーする様に18塩基からなる多数のRNA/ENAキメラを合成した。そして、それぞれを培養筋細胞に導入し、最も強くエクソンスキッピングを誘導するRNA/ENAキメラを同定した。

その結果、エクソン45、51、53など多数のエクソンのスキッピング誘導が可能となり、DMDを対象としたエクソンスキッピング誘導治療が大規模で実施可能となった。

③スプライシング制御機序の解明

1) スプライシングに必須のエクソン内の一塩基の同定

ジストロフィン遺伝子のエクソン38に4塩基欠失を有する例がエクソンスキッピングを誘発することを見出した。ハイブリッド型ミニ遺伝子の *in vitro* のスプライシング反応系を用いて4塩基中の1塩基が正常なスプライシングを決定する必須の配列であることを明らかにした。

この結果は、今後エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に当たってはその標的部位をこの必須の塩基に焦点を当てることにより容易に決定できることを示す極めて重要な知見であった。

2) エクソン19のスプライシング制御機序の解明

レポーター遺伝子内のESE19非存在下では、8塩基以上のウリジンを含むポ

リピリミジントラクトがエクソン19の正常なスプライシングに必要なことが判明した。一方、ESE19存在下では4塩基以上のウリジンが存在すれば十分であり、2塩基のウリジンでも正常にスプライスされることが判明した。この結果は、正常のスプライシングにはポリピリミジントラクトあるいはESEのどちらか一方が存在すれば良いことが示された。

3) 潜在エクソンの解析

潜在エクソンの特徴をShapiroスコアから解析すると、潜在性エクソンのスプライスドナーサイトでは0.61から0.92(平均0.79)であったのに対し、本来のエクソンでは0.67から1(平均0.83)であり、潜在性エクソンにおいて有意に低い値であった。

また、mRNAへのエクソンの組み込みはエクソン内のスプライシング促進および抑制配列によって制御されている。エクソン内のこれらの配列の分布密度を計算したところ、潜在性エクソンのスプライシング促進配列の密度は本来のエクソンより低く(平均7.4 vs 17, $p=0.004$)、抑制配列の密度は高かった(平均4.4 vs 2, $p=0.033$)。

スプライスアクセプターサイトとブランチポイントと推定されるサイトとの距離を比較した。その結果、潜在性エクソンでは平均60塩基(20-116塩基)であったが本来のエクソンでは平均38塩基(16-123塩基)であり、潜在性エクソンにおいて有意に長かった($p=0.018$)。

これらのすべての指標において、潜在性エクソンはエクソンとしての条件が本来のエクソンより劣っていることが示された。

D. 考察

1) 達成度について

①DMDの治療法の確立は世界の研究者の大きな目標であった。私達はエクソンスキッピング誘導によりジストロフィンmRNAを修正することによるジストロフィン発現法を提唱し、その実用化を目指してきた。これまでの基礎的研究成果をもとにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング誘導治療の臨床応用を試みた。その結果、本治療法が副作用もなく、骨格筋においてジストロフィン発現を誘導する効果を出すことを確認した。当初の目標としては、フェーズⅡ的に副作用なく投与できることを確認することを予定していたが、当初の予想を上回り安全に投与できるのみならず骨格筋においてエクソン19のスキッピングを誘導し新たなインフレームのジストロフィンmRNAの産生をもたらした。さらに、骨格筋でのジストロフィン発現を確認することに成功した。

このことは当初の予想をはるかに上回る好成果で、今後本治療の臨床応用推進の大きな引き金となるものと考えられる。

②エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドであるRNA/ENAキメラを同定することにおいては、多数の候補RNA/ENAキメラからベストのものを選択することができた。こうして選択されたRNA/ENAキメラは患者培養細胞で有効にジストロフィン発現を誘導することも確認された。今回同定したRNA/ENAキメラは、欠失のホットスポット領域に欠失を有するDMD患者に応

用し得るもので、多数のDMD患者が治療の対象となるため、臨床応用に際し極めて大きく期待された。

こうした成果は、当初の予定したものであり、世界をリードする最先端領域を切り開く優れた研究成果であった。

③スプライシング制御機序は徐々に解明されてき、エクソン内の配列がスプライシングに関与しているとの可能性が指摘されてきた。今回の研究では、欠失のホットスポット外にあるエクソンについてもエクソン内のわずかに1塩基の異常が複雑に制御されているスプライシング反応を乱し、エクソンスキッピングを誘導することを明らかにした。また、スプライシング時にエクソンを認識する機構については、ポリピリミジントラクト、スプライシングのコンセンサス配列が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

これらの成果はスプライシング制御機序の解明に大きな足跡を残すこととなった。また、この結果はエクソンスキッピング誘導治療法開発に極めて大きな貢献を示すものであった。

①②③のいずれの成果においても、目標とした成果は確実に得られ、達成度は100%であった。

2) 研究成果の学術的意義について

私達が提唱してきたDMDに対するエクソンスキッピング誘導治療の成功は、世界から大きな注目を集めた。そのため、この治療法の確立を目指した全世界的な研究が極めて活発化した。一方、私達は本研究において多数のDMD患者が治療できるRNA/ENAの同定に成功し、本分野

の世界のリーダーとしての地位を引き続き確保した。また、エクソン内の一塩基がスプライシングに関与することを明らかにし、基礎分子生物学の世界にも少なからずインパクトを与えた。

3) 研究成果の行政的意義について

DMD患者は12歳で歩行不能になるなど、長期にわたり社会から介護などの支援を受けなければならない。本治療法の確立により行政の方向がDMD患者の支援から治療へと大きく転換するものと期待される。その結果、従来支出されてきた介護などの行政的負担が大幅に解消することが期待される。

4) その他特記すべき事項について

私達が世界に先駆けて提唱してきたエクソンスキッピング誘導治療は、現在では世界の研究者が注目するところとなり、その確立は大競争となっている。本研究成果により、引き続き日本が世界のリーダーであることの基盤が整備された。

E. 結論

DMDの治療として最も有望視されて

いるエクソンスキッピング誘導治療について、臨床応用研究あるいは基盤整備研究において世界の最先端の成果を挙げることができた。今後、今回の成果をより一層臨床に展開することにより、DMDのより多くの患者の治療が可能となり、DMDの治療が夢から現実へと進むものと大きく期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
一覧表参照
2. 学会発表
一覧表参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

和文

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
片山義規, 竹島泰弘, 松尾雅文	進行性筋ジストロフィーのDNA診断	出月康夫	からだの科学増刊『高度先進医療』	日本評論社	東京	2005	8-12
松尾雅文	医療の立場からのアンチセンス法	関根光雄, 多比良和誠	RNAi法とアンチセンス法—新しいRNAの科学と応用	講談社	東京	2005	160-167

欧文

松尾雅文	クレアチンキナーゼ(CK)	五十嵐 隆, 水口 雅	小児臨床検査ガイド	文光堂	東京	2006	155-157
Matsuo M	Becker Muscular Dystrophy	J Fuchs M Podda	Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics.	Marcel Dekker	New York	2005	111-113
Matsuo M	Duchenne Muscular Dystrophy	J Fuchs M Podda	Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics.	Marcel Dekker	New York	2005	370-373

雑誌

和文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
八木麻理子, 松尾雅文	ジストロフィン転写産物のエクソンススキッピング誘導療法	Molecular Medicine	41	324-330	2004
松尾雅文, 竹島泰弘, 八木麻理子, 石橋和人, 和田博子	Duchenne型筋ジストロフィーのgentamicin治療	脳と発達	36	125-129	2004

森沢猛, 八木麻理子, 竹島泰弘, 松尾雅文	デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝相談	小児科	45	1133-1139	2004
森沢猛, 八木麻理子, 吉井勝彦, 竹島泰弘, 松尾雅文	在胎35週まで血清クレアチンキナーゼ値が正常範囲内であったDuchenne型筋ジストロフィーの超低出生体重児	脳と発達	36	342-343	2004
西山敦史, 竹島泰弘, 松尾雅文	Duchenne型筋ジストロフィーの発症機構と治療への展望	神経治療学	21	495-502	2004
武田匡史, 川合宏哉, 上領博, 山本正嗣, 井上信孝, 江本憲昭, 吉川糧平, 平田健一, 川嶋成乃亮, 近藤武史, 竹島泰弘, 前田盛, 松尾雅文, 横山光宏	臨床経過を長時間観察し得た、高度の心筋病変を有するBecker型筋ジストロフィーの1例	心臓	37	44-50	2005

欧文

Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M	C-terminal Truncated Dystrophin Identified in Skeletal Muscle of an Asymptomatic Boy with a Novel Nonsense Mutation of the Dystrophin Gene.	Pediatr Res	56	739-743	2004
Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Suro A, Matsuo M, Koizumi M	Design of 2'-O-Me RNA/ENA TM chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA.	Nucleic Acids Symp Ser	48	297-298	2004
Nakayama Y, Nara N, Kawakita Y, Takeshima Y, Arakawa M, Kato M, Morita S, Iwatsuki K, Tanaka K, Okamoto S, Kitamura T, Seki N, Matsuda R, Matsuo M, Saito K, and Hara T	Cloning of cDNA Encoding a Regeneration-associated Muscle Protease Whose Expression is Attenuated in Cell Lines Derived from Duchenne Muscular Dystrophy Patients.	Am J Path	164	1773-1782	2004

Yagi M, Takeshima Y, Surono A, Takagi M, Koizumi M, Matsuo M	Chimeric RNA and 2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids have stronger activity than phosphorothioate oligodeoxynucleotides in induction of exon-19 skipping in dystrophin mRNA.	Oligonucleotides	14	33-40	2004
Surono A, Khanh T, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Takagi M, Koizumi M, Matsuo M:	Chimeric RNA/ethylene bridged nucleic acids promote dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy by inducing skipping of the nonsense-mutation-encodi ng exon.	Hum Gene Ther	15	749-757	2004
Tran V.K., Zhang, Z., Yagi, M., Nishiyama, A., Habara, Y., Takeshima, Y., and Matsuo, M.	A novel cryptic exon identified in the 3' region of intron 2 of the human dystrophin gene.	J Hum Genet	50	425-433	2005
Takeshima, Y., Yagi, M., Wada, H., Matsuo, M.	Intraperitoneal administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide against splicing enhancer sequence induced exon skipping in dystrophin mRNA expressed in mdx skeletal muscle.	Brain Dev	27	488-493	2005
Matsuo, M., and Takeshima, Y.	Rescue of dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy by inducing exon skipping.	Acta Myologica	X X IV	110-114	2005
Kimura, S., Ito, K., Miyagi, T., Hiranuma, T., Yoshioka, K., Ozasa, S., Matsukura, M., Ikezawa, M., Matsuo, M., Takeshima, Y., Miike T	A novel approach to identify Duchenne muscular dystrophy patients for aminoglycoside antibiotics therapy.	Brain Dev	27	400-405	2005
Hoai T. T.T., Takeshima, Y., Surono, A., Yagi, M., Nishiyama, A., Wada, H., and Matsuo, M.	A G-to-A transition at the fifth position of intron 32 of the dystrophin gene inactivates a splice donor site both in vivo and in vitro.	Mol Gen Metab	85	213-219	2005

Tran, V.K., Takeshima, Y., Zhang, Z., M, Y., Nishiyama, A., Habara, Y., and Matsuo, M.	Splicing analysis disclosed a determinant single nucleotide for exon skipping caused by a novel intra-exonic four-nucleotide deletion in the dystrophin gene.	J Med Genet	43	924-930	2006
Takeshima, Y., Yagi, M., Wada, H., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Kakumoto, M., Sakaeda, T., Saura, R., Okumura, K., and Matsuo, M.	Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy.	Pediatr Res	59	690-694	2006
Katayama, Y., Tran, V.K., Hoan, N.T., Zhang, Z., Goji, K., Yagi, M., Takeshima, Y., Saiki, K., Nhan, N.T., and Matsuo, M.	Co-occurrence of mutations in both dystrophin- and androgen-receptor genes is a novel cause of female Duchenne muscular dystrophy.	Hum Genet	119	516-519	2006
Ishibashi, K., Takeshima, Y., Yagi, M., Nishiyama, A., and Matsuo, M.	Novel cryptic exons identified in introns 2 and 3 of the human dystrophin gene with duplication of exons 8-11.	Kobe J Med Sci	52	61-75	2006
Beroud, C., Tuffery-Giraud S, Matsuo M., Hamroun, D., Humbertclaude V., Monnier, N., Moizard, M.P., Voelckel, M.A., Calemard, L.M., Boisseau, P., Blayau, M, Philippe, C, Cossee, M, Pages, M, Rivier, F, Danos, O, Garcia, L, Claustres, M	Multi-exon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne Muscular Dystrophy.	Hum Mutat	28	196-202	2007
Tran, V.K., Takeshima, Y., Zhang, Z., Habara, Y., Haginoya, K., Nishiyama, A., Yagi, M., and Matsuo, M.	A nonsense mutation-created intraexonic splice site is active in the lymphocytes, but not in the skeletal muscle of a DMD patient.	Hum Genet	120	737-742	2007

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発表年
竹島泰弘, 八木麻理子, 石橋和人, 佐浦隆一, 角本幹夫, 栄田敏之, 奥村勝彦, 和田博子, 石川幸辰, 石川悠加, 南良二, 松尾雅文	アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるDuchenne型筋ジストロフィー症例におけるジストロフィン蛋白の発現	第46回日本小児神経学会総会	2004
八木 麻理子, 石橋和人, 高木美帆, 小泉 誠, 竹島泰弘, 松尾雅文	RNA/ENAキメラによるジストロフィン遺伝子エクソン44, 50, 51, 53, 55に対するスキッピングの誘導	第46回日本小児神経学会総会	2004
藤井達哉, 竹島泰弘, 松尾雅文, 宮嶋智子, 伊藤正利, 奥野武彦	同一家系内で重症度の異なる進行性筋ジストロフィー症男児のジストロフィン遺伝子解析	第46回日本小児神経学会総会	2004
八木 麻理子, 石橋和人, 西山敦史, 高木美帆, 小泉 誠, 竹島泰弘, 松尾雅文	RNA/ENAキメラを用いたエクソンススキッピング誘導によるジストロフィン蛋白のDMD由来の筋培養細胞での発現	第47回日本先天代謝異常学会	2004
石橋和人, 西山敦史, 八木麻理子, 竹島泰弘, 和田博子, 西尾久英, 松尾雅文	神戸大学におけるジストロフィン異常症324家系の遺伝子解析のまとめ	第108回日本小児科学会学術集会	2005
石橋和人, 八木 麻理子, 竹島泰弘, 和田博子, 西尾久英, 松尾雅文	ジストロフィン遺伝子異常患児の母親における保因者率の検討	第47回日本小児神経学会	2005
松尾雅文	Duchenne型筋ジストロフィー治療の臨床応用	第47回日本小児神経学会	2005
石橋和人, 西山敦史, 八木麻理子, 竹島泰弘, 和田博子, 西尾久英, 松尾雅文	ジストロフィン遺伝子における微小変異解析	日本人類遺伝学会第50回大会	2005
竹島泰弘, 西山敦史, 石橋和人, 八木麻理子, 松尾雅文, 前田貢作, 和田博子	高CK血症あるいは軽度の筋症状を契機に診断されたDuchenne型筋ジストロフィー保因者女性4例における遺伝子異常の同定	第38回 日本小児神経学会近畿地方会	2005

八木麻理子, 張竹君, 西山敦史, 石橋和人, 高木美帆, 小泉誠, 木村重美, 三池輝久, 竹島泰弘, 松尾雅文	DMD由来線維芽細胞の筋細胞への形質転換と、RNA/ENAキメラによるジストロフィン発現評価への応用	第48回 日本先天代謝異常学会	2005
八木麻理子, 西山敦史, 石橋和人, 和田博子, 前田貢作, 竹島泰弘, 松尾雅文	高CK血症を呈し筋生検を施行した女性13例の検討	第19回近畿小児科学会	2006
西山敦史, 親里嘉展, 石橋和人, 八木麻理子, 竹島泰弘, 和田博子, 松尾雅文	ジストロフィン遺伝子ナンセンス変異例のスプライシングパターンに関する検討	第48回 日本小児神経学会総会	2006
親里嘉展, 西山敦史, 石橋和人, 八木麻理子, 竹島泰弘, 松尾雅文	Duchenne型筋ジストロフィーの合併症に関するゲノム因子のアレイCGHを用いた探索—第一報	第48回 日本小児神経学会総会	2006
羽原靖晃, 堂下真梨, 八木麻理子, 竹島泰弘, 松尾雅文	ジストロフィン遺伝子エクソン19のスプライシング:エクソンスプライシング促進配列と上流側ポリピリミジントラクトとの関係	第8回RNAミーティング	2006
Zhang Z, Takeshima Y, Nishiyama A, Habara Y, Oyazto Y, Yagi M, Matsuo M.	Seven novel cryptic exons in human dystrophin gene	第8回RNAミーティング	2006
八木麻理子, 西山敦史, 張竹君, トランティホアイトウ, 羽原靖晃, 和田博子, 西尾久英, 竹島泰弘, 松尾雅文	ジストロフィン遺伝子スプライシングコンセンサス配列内の微小変異とスプライシングパターンの変化についての検討	日本人類遺伝学会 第51回大会	2006
親里嘉展, 西山敦史, 八木麻理子, 竹島泰弘, 松尾雅文	Duchenne型筋ジストロフィーの合併症に関するゲノム因子のアレイCGHを用いた探索 -第二報-	第29回日本小児遺伝学会学術集会	2006
Hoai Thu TT, Surono A, Yagi M, Takeshima Y, Wada H, Matsuo M.	Both in vivo and in vitro evidence of inactivation of splice donor site by G to A nucleotide change at 5th nucleotide of intron 32 of the dystrophin gene.	The American Society of Human Genetics 54th Annual Meeting	2004

Matsuo M, Takeshima Y, Wada H, Koizumi M, Yagi M.	Chimeric RNA/ ethylene bridged nucleic acids promote dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy by including exon skipping.	6th French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies	2005
Takeshima Y, Yagi M, Ishibashi K, Nishiyama A, Katayama Y, Wada H, Kakumoto M, Sakaeda T, Ishikawa Y, Okumura K, Matsuo M.	Intravenous Infusion of Antisense Oligonucleotide Induces Dystrophin Protein Expression in the Muscle of a Duchenne Muscular Dystrophy.	Pediatric Academic Societies' 2005 Annual Meeting	2005
Zhang Z, Takeshima Y, Yagi M, Matsuo M.	Dystrophin expression in myogenic converted fibroblasts from Duchenne muscular dystrophy using antisense RNA/ ENA chimera.	The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting	2005
Oyazato Y, Nishiyama A, Ishibashi K, Yagi M, Takeshima Y, Uemukai K, Matsuo M.	Detection and mapping of chromosome aberrations in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients using array CGH.	11th International Congress of Human Genetics	2006
Yagi, M., Takeshima, Y., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Tran Van, K., Tran Thi, HT., Zhang, Z., Habara, Y., and Matsuo, M.	Maturation errors of dystrophin pre-mRNAs in 26 cases with mutations in dystrophin gene.	The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM)	2006
Habara Y, Doshita M, Yokono Y, Yagi M, Takeshima Y, Matsuo M.	Splicing analysis cassette vector system showed that either a polypyrimidintract or an exonic splicing enhancer is essential for correct splicing of dystrophin exon 19.	The American Society of Human Genetics 56 th Annual Meeting	2006
Nishiyama A, Takeshima Y, Yagi M, Tran H. T. T., Habara Y, Matsuo M.	Splicing products of dystrophin pre-mRNA in 49 cases with intraexonic small mutations in the dystrophin gene.	The American Society of Human Genetics 56th Annual Meeting	2006
Takeshima Y, Ishibashi K, Nishiyama A, Zhang Z, Tran Thi HT, Habara Y, Yagi M, Matsuo M.	Comprehensive mutation analysis of the dystrophin gene in Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophies.	2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research	2006

Becker Muscular Dystrophy

Masafumi Matsuo

Kobe University Graduate School of Medicine, Chuo, Kobe, Japan

INTRODUCTION

Becker muscular dystrophy (BMD) is an X-linked recessive inherited disease with a worldwide incidence of 1 in 35,000 male births. Becker muscular dystrophy is characterized by progressive muscle wasting but is distinguished by delayed onset, later dependence on wheelchair support, and longer life span from Duchenne muscular dystrophy (DMD) that follows severe progressive muscle wasting.

Dystrophin, the gene defective in not only BMD but also DMD, was isolated in 1986. Since then, genetic diagnosis of BMD has been done leading to better understanding of the disease process, and the difference between DMD and BMD can be explained at the molecular level by the reading frame rule.

CLINICAL DIAGNOSIS

Becker muscular dystrophy patients show normal growth and development in their early childhood. In BMD, affected men start to show disturbance of walking due to muscle weakness at 20s or over. He maintains to walk but his muscle strength gradually decreases. Dilated cardiomyopathy is sometimes an initial clinical sign for the diagnosis of BMD. The muscle weakness involved in BMD follows a mild downward course with patients living near normal lives.^[1]

Serum creatine kinase (CK) is markedly increased. This marked elevation of serum CK is the most important hallmark for the diagnosis of BMD, but the level of elevation of serum CK is not so high compared to DMD. During the asymptomatic period, elevation of serum CK is the sole sign for BMD. Some BMD patients are identified accidentally because of elevations of AST or ALT which are commonly examined for liver function as serum CK elevation is accompanied with elevations of AST and ALT.

Becker muscular dystrophy should be included in the differential diagnosis of moderately elevated serum CK in males. Pathological examination of biopsied muscle consolidates the diagnosis of BMD.

GENE DIAGNOSIS

Becker muscular dystrophy is caused by mutations of the dystrophin gene that is also mutated in DMD.^[2] Therefore, both DMD and BMD are sometimes called as dystrophinopathy. Furthermore, not only types but also locations of mutations identified in both BMD and DMD are quite similar.^[3] For gene diagnosis of BMD both multiplex PCR and Southern blot analysis have been employed as in the genetic diagnosis of DMD.^[4-6] Nearly two-thirds of mutations identified on the dystrophin gene are deletions or duplications occupying a single or multiple exons. Every mutation identified in BMD cases would be examined based on the following reading frame rule.^[3] In the rest of the BMD cases it is rather difficult to identify the responsible mutations on the dystrophin gene as a single nucleotide change is supposed to be present. However, some point mutations that induced exon skipping have been reported.^[7,8]

READING-FRAME RULE OF DMD/BMD

Although both DMD and BMD patients have been shown to have deletion or duplication mutations of the dystrophin gene, the extent of the deletion does not always correlate with the severity of the disease: some BMD patients with mild symptoms have deletions encompassing numerous exons, whereas some DMD patients with severe symptoms lack only a few exons. In some cases, the long deletions resulting in BMD and the short deletions resulting in DMD may even overlap. The reading-frame rule explains the difference between DMD and BMD as follows: in DMD the translational reading frame of the dystrophin mRNA is shifted after a deletion or duplication mutation whereas it is maintained in BMD.^[3] According to the reading-frame rule, BMD patients with long deletions are able to produce dystrophin mRNA that would still direct the production of an internally truncated semifunctional protein. Shorter deletions harbored by severe DMD patients, on the other hand, would bring together exons that, when spliced, would change the translational reading frame in the mRNA, such that a

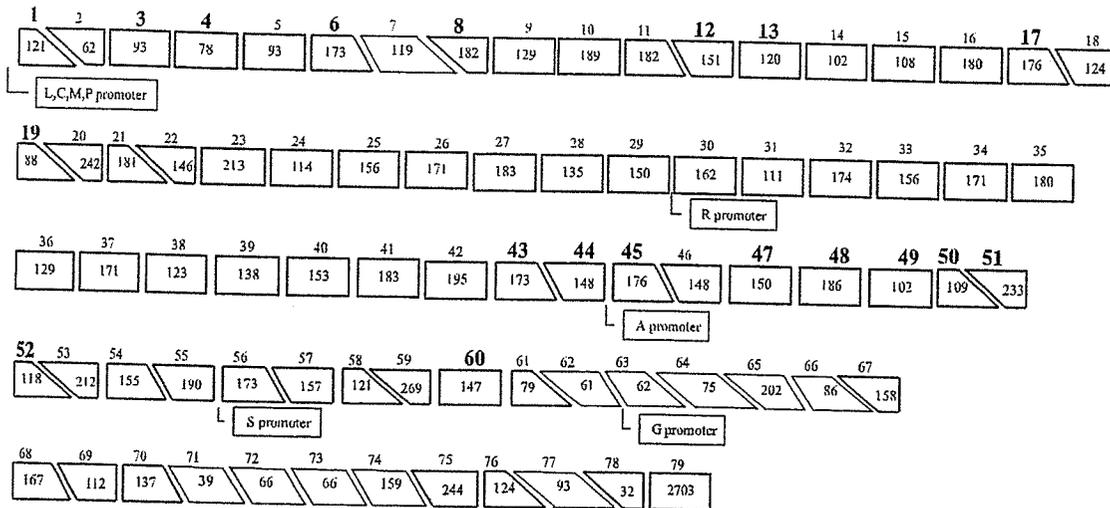


Fig. 1 Schematic description of the exon structure of the dystrophin gene. The dystrophin gene consisting of 79 exons (boxes) and at least eight alternative promoters (boxes under the lined boxes) is schematically described. Numbers over the box indicate exon number, the bold numbers being the exons that are examined by multiplex PCR. Quadrilaterals and parallelograms indicate in-frame exons (type 0 exons). Trapezoids indicate out-of-frame exons (type 1 or type 2 exons).

premature stop codon is created. This rule predicts that milder BMD patients would produce a smaller semifunctional protein whereas DMD patients would either produce a severely truncated dystrophin lacking the entire C-terminal region or would not produce dystrophin at all.

Subsequent gene analyses have shown that over 90% of the deletion–duplication mutations that cause BMD maintain the dystrophin mRNA reading frame whereas those causing DMD are frameshifts.^[9] Accordingly, point mutations identified in DMD are nonsense mutations^[10] except in rare DMD cases with missense mutations.^[11,12]

Considering that molecular therapy for DMD to change the reading frame from out-of-frame to in-frame has been proposed,^[13,14] it is important to see the resulting translational reading frame of dystrophin mRNA after the identification of a deletion or duplication mutation. Exons of the dystrophin gene are classified into three types according to the number of nucleotides encoded in the exon (Fig. 1): 1) in-frame exon that encodes nucleotides of multiples of 3 (type 0 exon); 2) two out-of-frame exons that have nucleotides of multiples of 3+1 or 2 (type 1 exon or type 2 exon, respectively). Among the 79 exons, 40, 18, and 21 exons are classified into types 0, 1, and 2 exons, respectively. In cases with deletion/duplication of the dystrophin gene the reading frame can be determined as described in Fig. 1. Cases having a deletion of a type 2 exon, e.g., exon 45, should be DMD based on the reading frame rule. Although gene diagnosis of DMD/BMD has been conducted, not all DMD/BMD cases have been examined for its reading frame.

In other types of mutations, nonsense mutations are expected to be identified in DMD. However, nonsense

mutation that should result in DMD phenotype has been identified in BMD cases,^[8,15] where exon skipping is shown as a mechanism that modified clinical phenotype. Furthermore, BMD has been shown to have a nonsense mutation in in-frame exons.^[16–18] Detailed analysis of genotype–phenotype correlation would lead a better understanding of molecular mechanism of dystrophinopathy.

PATHOLOGICAL DIAGNOSIS

The pathological examination of biopsied skeletal muscle confirms the diagnosis of BMD. Immunohistochemical analyses of normal muscle demonstrate that dystrophin is present along with muscle cell membranes. Muscle from BMD patients contains reduced amounts of dystrophin that is stained discontinuously and patchy along the muscle cell membranes.^[19] Western blot analysis using dystrophin antibody reveals a band corresponding to 427 kDa, close to the predicted size of dystrophin, in extracts of normal muscle tissue. Shorter or lower amount of dystrophin is detected in muscle extracts from patients with BMD.

Dystrophin contains 3685 amino acids organized in four domains: N-terminal actin binding, triple helical rod, cystein-rich, and C-terminal domains. The internally truncated dystrophin identified in BMD maintains both N-terminal and C-terminal domains, but lacks some of the 24 repeat sequences of triple helical rod domain. Therefore, dystrophin is stained when antibody recognizing either N-terminal or C-terminal domains is used, but in



some cases no dystrophin is stained as in DMD when antibody recognizing rod domain is employed.^[20]

TREATMENT

For BMD patients, supportive therapies such as rehabilitation or ventilator support are clinically employed, but no effective way to improve the clinical course is available. Gene therapy has been considered a cure for BMD but no clinically applicable way has been established.

CONCLUSION

Becker muscular dystrophy is a mild muscle wasting disease and characterized by dystrophin abnormality in skeletal muscle. Currently, no effective treatment is available although a molecular understanding of BMD developed well.

REFERENCES

1. Emery, A.E.H. *Duchenne Muscular Dystrophy*; Oxford University Press: Oxford, 1993.
2. Kunkel, L. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **1986**, *322* (6074), 73–77.
3. Monaco, A.P.; Bertelson, C.J.; Liechti-Gallati, S.; Moser, H.; Kunkel, L.M. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* **1988**, *2*, 90–95.
4. Chamberlain, J.S.; Gibbs, R.; Ranier, J.; Caskey, C. Multiplex PCR for the Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*; Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T., Eds.; Academic Press: San Diego, 1990; 272–281.
5. Beggs, A.H.; Koenig, M.; Boyce, F.M.; Kunkel, L.M. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* **1990**, *86*, 45–48.
6. McCabe, E.R.B.; Towbin, J.; Chamberlain, J.; Baumbach, L.; Witkowski, J.; van Ommen, G.J.B.; Koenig, M.; Kunkel, L.M.; Seltzer, W.K. Complementary DNA probes for the Duchenne muscular dystrophy locus demonstrate a previously undetectable deletion in a patient with dystrophic myopathy, glycerol kinase deficiency, and congenital adrenal hypoplasia. *J. Clin. Invest.* **1989**, *83*, 95–99.
7. Hagiwara, Y.; Nishio, H.; Kitoh, Y.; Takeshima, Y.; Narita, N.; Wada, H.; Yokohama, M.; Nakamura, H.; Matsuo, M. A novel point mutation (G-1 to T) in a 5' splice donor site of intron 13 of the dystrophin gene results in exon skipping and is responsible for Becker muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **1994**, *54*, 53–61.
8. Shiga, N.; Takeshima, Y.; Sakamoto, H.; Inoue, K.; Yokota, Y.; Yokoyama, M.; Matsuo, M. Disruption of the splicing

enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2204–2210.

9. Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M.; Scherpf, S.; Heindrich, K.; Bettecken, T.; Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M.; Scherpf, S.; Heindrich, K.; Meng, G.; Muller, C.R.; Lindlof, M.; Kaariainen. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**, *45*, 498–506.
10. Mendell, J.R.; Buzin, C.H.; Feng, J.; Yan, J.; Serrano, C.; Sangani, D.S.; Wall, C.; Prior, T.W.; Sommer, S.S. Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* **2001**, *57*, 645–650.
11. Prior, T.W.; Papp, A.C.; Snyder, P.J.; Burghes, A.H.M.; Bartolo, C.; Sedra, M.S.; Western, L.M.; Mendell, J.R. A missense mutation in the dystrophin gene in a Duchenne muscular dystrophy patient. *Nat. Genet.* **1993**, *4*, 357–360.
12. Lenk, U.; Oexle, K.; Voit, T.; Ancker, U.; Hellner, K.A.; Speer, A.; Hubner, C. A cysteine 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy, mental retardation and absence of the ERG b-wave. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 973–975.
13. Matsuo, M. Duchenne/Becker muscular dystrophy: From molecular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev.* **1996**, *18*, 167–172.
14. van Deutekom, J.C.; van Ommen, G.J. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4* (10), 774–783.
15. Ginjaar, I.B.; Kneppers, A.L.; vd Meulen, J.D.; Anderson, L.V.; Bremmer-Bout, M.; van Deutekom, J.C.; Weegenaar, J.; den Dunnen, J.T.; Bakker, E. Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur. J. Hum. Genet.* **2000**, *8*, 793–796.
16. Prior, T.W.; Bartolo, C.; Papp, A.C.; Snyder, P.J.; Sedra, M.S.; Burghes, A.H.; Mendell, J.R. Nonsense mutations in a Becker muscular dystrophy and an intermediate patient. *Hum. Mutat.* **1996**, *7*, 72–75.
17. Melis, M.A.; Muntoni, F.; Cau, M.; Loi, D.; Puddu, A.; Boccone, L.; Mateddu, A.; Cianchetti, C.; Cao, A. Novel nonsense mutation (C→A nt 10512) in exon 72 of dystrophin gene leading to exon skipping in a patient with a mild dystrophinopathy. *Hum. Mutat.* **1998**, *Suppl. 1*, S137–S138.
18. Fajkusova, L.; Lukas, Z.; Tvrdikova, M.; Kuhrova, V.V.; Hajek, J.; Fajkus, J. Novel dystrophin mutations revealed by analysis of dystrophin mRNA: Alternative splicing suppresses the phenotypic effect of a nonsense mutation. *Neuromuscul. Dis.* **2001**, *11*, 133–138.
19. Arahata, K.; Ishiura, S.; Ishiguro, T.; Tsukahara, T.; Suhara, Y.; Eguchi, C.; Ishihara, T.; Nonaka, I.; Ozawa, E.; Sugita, H. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* **1988**, *333*, 861–863.
20. Helliwell, T.R.; Ellis, J.M.; Mountford, R.C.; Appleton, R.E.; Morris, G.E. A truncated dystrophin lacking the C-terminal domains is localized at the muscle membrane. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *50*, 508–514.



Duchenne Muscular Dystrophy

Masafumi Matsuo

Kobe University Graduate School of Medicine, Chuo, Kobe, Japan

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common inherited disease with a worldwide incidence of 1 in 3500 male births. DMD is a lethal disorder of childhood characterized by progressive muscle wasting. Affected individuals are wheelchair-bound by the age of 12 and succumb to cardiac or respiratory failure in their mid to late 20s.

Dystrophin, the gene defective in DMD was isolated in 1986. Since then, genetic diagnosis of DMD has been done leading to better understanding of the disease process. Based on the molecular pathogenesis of DMD, molecular therapies for DMD have been proposed.

CLINICAL DIAGNOSIS

Patients with DMD show normal growth and development in their early childhood. In DMD, affected boys start to show disturbance of walking and frequently fall because of muscle weakness at 4 to 5 years of age. Patients are shown to have a positive Gower's sign wherein the child climbs up his thighs to extend the hips and push his trunk up. He manages to walk but his muscle strength gradually decreases. He loses the ability to climb up stairs. Lumbar lordosis becomes more exaggerated and the waddling gait increases. Patients usually are wheelchair-bound by the age of 12. Muscle wasting progresses as the patients get older until finally respiratory or cardiac failure develops due to muscle wasting.

Serum creatine kinase (CK) is markedly increased 50 times more than the normal range in infantile DMD. This marked elevation of serum CK is the most important hallmark for the diagnosis of DMD. During the asymptomatic period, elevation of serum CK is the sole sign for DMD. Some DMD patients are accidentally identified due to elevations of AST or ALT, which are commonly examined for liver function, because serum CK elevation is accompanied with elevations of AST and ALT.

GENE DIAGNOSIS

Duchenne muscular dystrophy is caused by mutations of the dystrophin gene.^[1] The dystrophin gene is 3000 kb in

size and consists of 79 exons encoding a 14-kb mRNA.^[2,3] At least eight alternative promoters that are regulated in a tissue- or development-specific manner have been identified on the dystrophin gene. The unusually high incidence of DMD in all human populations could be simply a reflection of the enormous mutation target size of the gene, but the recombination rate is reported to be four times the rate expected for a gene of this size.^[4] Nearly two-thirds of mutations identified on the dystrophin gene are deletions or duplications occupying a single or multiple exons, with the rest of the DMD cases having other types of mutations including point mutations. Remarkably, deletion mutations have been localized to two deletion hot spots of the dystrophin gene, the 5' and the central regions.

Multiplex PCR Analysis

Currently, multiplex PCR analyses that amplify deletion-prone exons are used as the first step for gene diagnosis. Two sets of PCR amplification are used to screen 19 deletion-prone exons (exons 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43-45, 47-52, and 60).^[5,6] Using this method of examination, one finds that nearly half of the DMD cases are shown to have deletion mutations. Therefore, the rest of the cases need further examination to identify the responsible mutation in the dystrophin gene.

Southern Blot Analysis

To examine the deletion/duplication in every exon of the dystrophin gene, Southern blot analysis is used, using segments of the dystrophin cDNA as probes.^[7] Two-thirds of DMD patients are shown to have recombination events of deletions or duplications spread in one or more exons at the genomic DNA level.^[8] However, Southern blot analysis not only needs high-quality DNA and radioisotope, but it is also time-consuming.

Detection of Fine Mutation

In DMD cases that have no large recombination event, identification of the causative mutation remains a laborious goal because of the difficulty in detecting a single point mutation in the 3000-kb-sized gene. To

facilitate the identification of mutations in the dystrophin gene, more than 99% of which is made up of introns, dystrophin mRNA that is 100 times smaller than the dystrophin gene has been analyzed.^[9] Analysis of dystrophin mRNA expressed in lymphocytes leads to not only identification of rare genomic mutations, but also to disclosures of nonauthentic alternative splicing.^[10-12] In addition, several ways to identify small mutations have been proposed.^[13-17] In the advent of recent advances in mutation analysis techniques, more than 90% of DMD cases are shown to have mutations in the dystrophin gene.^[18,19]

PATHOLOGICAL DIAGNOSIS

The pathological examination of biopsied skeletal muscle confirms the diagnosis of DMD. Immunohistochemical analyses of normal muscle demonstrate that dystrophin is present along with muscle cell membranes. In DMD, dystrophin is missing from skeletal muscle.^[20] Western blot analyses using dystrophin antibody reveals a band corresponding to 427 kDa, close to the predicted size of dystrophin, in extracts of normal muscle tissue, whereas no protein can be detected in DMD.

TREATMENT

For DMD patients, supportive therapies such as rehabilitation or ventilator support are clinically employed but no effective way to improve the clinical course is available. Since the discovery of the dystrophin gene, gene therapy is now considered an attractive way to cure the disease. The main aim of DMD gene therapy is to establish a way to inject constructed dystrophin genes consisting of partial- or full-length cDNA joined to an appropriate promoter. Although much progress has been made in this field of study, we still seem to be a long way from achieving a clinically significant result. As an alternative for gene transfection, molecular therapies have been studied including antisense oligonucleotide treatment^[21-23] or translational readthrough treatment using gentamicin.

Antisense Oligonucleotide Treatment

An alternative strategy for DMD treatment is to retard the progression of the clinical symptoms, i.e., to convert DMD into the BMD phenotype. Theoretically, this therapy can be done by changing a frame-shift mutation causing DMD into an in-frame mutation characteristic of BMD by modifying the dystrophin mRNA. Artificial induction of exon skipping with antisense oligonucleo-

tides is a way to make the out-of-frame dystrophin mRNA in-frame. Artificial induction of exon 19 skipping using an antisense oligonucleotides against the splicing enhancer sequence has been reported,^[24] and this treatment was shown to produce dystrophin expression in exon-20-deleted DMD myocytes.^[23] Disruption of the splicing enhancer sequence to induce exon skipping was further evidenced by the fact that in the nonsense mutation of exon 27 the dystrophin gene resulted in exon 27 skipping, producing an in-frame dystrophin mRNA.^[25] In addition, another natural example causing conversion of DMD to BMD was identified in a nonsense mutation in exons 25 and 29.^[26,27] Furthermore, BMD has been shown to have a nonsense mutation in in-frame exons.^[28,29]

Antisense oligonucleotides against a purine-rich sequence have been used to induce skipping of exons 44, 45, 46, 49, 50, 51, or 53.^[22,30,31] In these studies, induction of exon skipping led to the expression of dystrophin in their respective dystrophin-deficient myocytes by correcting the translational reading frame. Recently, double exon skipping of exon 43 and 44 or exon 45 and 51 has been induced.^[32] This extends the application of the antisense oligonucleotide treatment to more varieties of deletion mutations of the dystrophin gene.

Phosphorothioate DNA has been the standard choice for the clinical application of antisense technology.^[33-37] However, phosphorothioate DNA is associated with a variety of potentially toxic non-antisense effects.^[38] In order to develop less toxic antisense oligonucleotides, nucleic acids have been modified in various ways.^[39,40] Recently, morpholino modified oligonucleotides were shown to be delivered to muscle cells efficiently.^[41] Furthermore, the chimera of 2'-*O*-methyl RNA and 2'-*O*, 4'-*C*-ethylene-bridged nucleic acid (ENA) was shown to induce exon 19 skipping of the dystrophin gene 40 times stronger than the conventional phosphorothioate oligonucleotides.^[42]

Translational Readthrough of Stop Codon

Aminoglycoside antibiotics have been suggested as possible therapeutic interventions for treating patients who carry a nonsense mutation because of the ability of these antibiotics to lead translational readthrough of stop codons. To evaluate whether aminoglycosides can be used to suppress the nonsense mutation in a human DMD case, four DMD/BMD cases with various stop codon sequences were tested once daily with intravenous gentamicin at 7.5 mg/kg/day for 2 weeks. However, the full-length dystrophin protein was not detected in posttreatment muscle biopsies.^[43] The possible reason for the failure of gentamicin treatment in human cases is the difference in efficiency of aminoglycoside-induced readthrough among the different types of nonsense mutations.

