

い。したがって、リードスルー活性の定量的検出系としてmdxマウスは問題が多い。

そこで、われわれはデュアル・レポーター遺伝子 (β -ガラクトシダーゼ遺伝子にmdxマウスにおけるエキソン23のPTC周辺配列27塩基をつなぎ、さらにルシフェラーゼ遺伝子をつないだ融合遺伝子)を導入した、リードスルー活性定量用のトランスジェニックマウスを新たに開発した。このマウスは通常、 β -ガラクトシダーゼ活性のみを発現し、リードスルーがおきるとルシフェラーゼ活性も同時に発現する。そのため、両酵素の活性の比によってリードスルー活性を定量できるものである。

われわれはオリエンタル酵母工業株式会社の協力を得て3種のPTC (TGA,TAG,TAA) ごとに有するトランスジェニックマウス3系統をそれぞれ作出することに成功した。これらのト

ランスジェニックマウスを検出系として用い、先にコンピュータ・サーチで特定された28種類のうち入手できた17種類の化合物についてそのリードスルー活性を調べたところ、5種類の候補分子を見いだした。そのうちの1種、化合物#2は皮下投与だけでなく胃内に注入しても骨格筋内でリードスルー活性を示し、患者に負担をかけない経口薬として有望であることがわかった。さらに、この化合物#2は経皮的にも投与可能であることから、患者QOLの維持に優先度が高い筋肉に近い皮膚からの投与ができることから、DMD治療への応用が期待できる⁽¹²⁾。

新薬PTC124の可能性

一方、アメリカ・ペンシルベニア大学のLee H. Sweeneyらは、PTC Pharmaceuticals というバイオベンチャー会社と協力して、80万種類以上の低分子化合物ライブラリーのなかからゲンタマイシンとは異なる新たなリードスルー化合物の探索をおこない、ゲンタマイシンより活性が高く、毒性が低い化合物PTC124を見いだした。

構造的にはアミノグリコシド系抗生物質とは類似性がなく、水に対しては難溶性で分子量は284.24ダルトン。853ng/mLで最適リードスルー活性を示し、経口投与でも効果を表すなど、臨床薬として適した性質をもつことがわかった。これを用いた健常人へのフェーズI試験では有意な毒性は示されず、続いてジストロフィン遺伝子のナンセンス突然変異に起因するDMD患者に対するフェーズIIの臨床試験がおこなわれており、その結果が注目されている^(13, 14)。

エキソン・スキップ療法とは？

リードスルー療法と並んで注目されているのがエキソン・スキップ療法である。点突然変異により一塩基の挿入や欠失がおこると、翻訳のフレームがずれてしまい(アウトフレーム)タンパク質の機能を喪失したりPTCが出現し翻訳が頓挫する。同様にいくつかのエキソンを欠失しア

COLUMN 1

リードスルー療法の弱点

ここでリードスルー療法の問題点について述べよう。まず、リードスルーによって新たに合成されたタンパク質は、治療効果を発揮するために十分量あるかという問題である。酵素補充療法が適応可能な遺伝子疾患ではリードスルー療法は有望と思われる。DMDの場合、健常者の20%のジストロフィン量が必要とされている⁽¹⁶⁻¹⁷⁾。

ネガマイシンの場合、リードスルーによって合成蓄積されたジストロフィン量は健常者の10%程度⁽¹²⁾。リードスルー効率をより高める方策が必要である。さらにリードスルー物質がゲンタマイシンやネガマイシンのように抗生物質である場合は、耐性菌の出現が問題になる。抗菌剤としての短期間使用ではなく、遺伝子疾患の患者に恒常的に投与し続けなければならないためである。

また、翻訳終止点における正常な終止コドンにリードスルーしないか、翻訳忠実度の減少がミスセンス突然変異と同様に異常なタンパク質を合成しないか、などが懸念される。ゲンタマイシンやネガマイシンによりリードスルーして生じたジストロフィン、対照ジストロフィンと同じ分子量をもつことから正常な終止コドンにリードスルーはいまのところ認められていない。しかも、PTC124はPTCを選択的にリードスルーし、正常な翻訳終止コドンのリードスルーは認められないことなどから、これらの懸念は回避できそうである。

一方、PTCを有するmRNAを選択的に分解除去するNMD (nonsense-mediated mRNA decay)機構により、翻訳系に達する前にmRNAが積極的に分解される可能性が高い。それではリードスルー薬によるPTCの回復が有効に機能できない。今後、より性能が高いリードスルー薬物の開発とともに、併用できる安全なNMD阻害剤の出現も待たれるところである。

ウトフレームになってしまう場合もある。これらを克服するにはどんな戦略があるだろうか。

それぞれの患者の塩基配列から、どのエクソンをスプライシング除去すれば翻訳のフレームを維持(インフレーム)できるかを見極め、人為的にスプライシングを制御することで遺伝子機能を回復できる可能性がある。この戦略は除去するエクソンに重要な機能ドメインをもつ場合には使えないが、もたない場合には有効になる。これはエクソン・スキップ療法とよばれている。

ゲノムDNAから転写されたmRNA前駆体は、ゲノム遺伝子と同様にエクソンとイントロンから構成されている。タンパク質をコードしたエクソンだけからなる成熟mRNAになるためには、イントロンの切り出しとエクソン同士の結合(スプライシング)をおこなう必要がある。イントロンを切り出す際には、エクソンとイントロンの境界部に存在するコンセンサス配列とイントロンの3'端に存在するブランチポイント、さらにエクソン内に存在するスプライシング促進配列の3者が協調して、正確にイントロンを認識する機構が存在している。とくに指定するエクソン内に存在するスプライシング促進配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、あるいはモルフォリーノとよばれる低分解性合成DNAを加えることで、特定エクソンのスプライシングをスキップさせる。これがうまくいけば、いくつかのエクソンをスプライシング除去することができる。その結果、翻訳フレームが保たれ、機能的タンパク質の合成がおこり疾患の治療が可能となる。

神戸大・松尾グループによる進展

エクソン・スキップは、神戸大学小児科の松尾雅文教授グループが先鞭をつけた。彼はジストロフィン遺伝子のエクソン19にはスプライシング促進配列があり、この配列の機能を阻害することによりエクソン19のスキッピングを誘導することが可能なことを明らかにした。さら

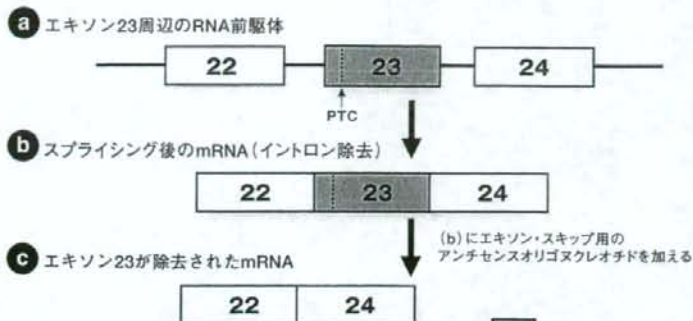


図3

エクソン・スキップの概略

mdxマウスのジストロフィン遺伝子のエクソン23にはPTCがある。エクソン23を選択的に除去してエクソン22と24をつなげるとPTCは除去でき、かつ翻訳フレームはずれない。そこで、エクソン23内にあるスプライシング促進領域をアンチセンスオリゴヌクレオチドにより阻害するとエクソン23が除去されエクソン22と24がつながり、ほぼ正常な全長(エクソン23の部分だけ欠失した)タンパク質が合成される。このタンパク質が機能を有していれば、治療手段として有効である。

にエクソン20が欠失してmRNAのアミノ酸配列読み取り枠にずれを有するDMD患者から筋細胞を分離し、その細胞にエクソン19のスプライシング促進配列の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。するとエクソン19のスキッピングが誘導されて、アミノ酸配列読み取り枠のずれが修正されるとともに、この修正されたジストロフィンmRNAからジストロフィンが産生されることを確認した。

神戸大学では倫理委員会の承認を得て、その患者にアンチセンスオリゴヌクレオチドを静脈内注射し、患者骨格筋にジストロフィンの合成を認めている。また、症状の改善には至っていない。また、生体内でより安定性が高い2'-O⁴-C-ethylene-bridged nucleic acid (ENA)によるアンチセンスRNAの開発にも成功しており、今後の展開を注目したい^(18,19)。

いまや世界中でしのぎを削るエクソンスキップ研究

オーストラリアのS. Wiltonら^(20,23)およびイギリスのT. Partridgeら⁽²⁴⁾のグループは、2-O-methylated phosphorothioated antisense oligoribonucleotide (2OMeAO)をmdxマウス前頸骨筋に注入し、エクソン23をスキップさせることに成功している。さらにPartridgeらは、DMD患者由来の培養筋細胞においてエクソンスキッピングの有効性を証明し、そのDMD患者に対してフェーズII試験を実施中である。また、アメリカのE. Hoffmanらは、Partridgeおよび日本の国立精神・神経センター神経研究所の武田伸一らと

国際共同研究グループを作り、DMDのモデル動物犬を用いてエキソン・スキップ療法をおこなっている。そのDMDモデル犬はエキソン7のスプライシング促進配列に異常があり、エキソン7のスキップがおきてそれ以降の翻訳フレームにずれが生じてPTCを生じることで機能的ジストロフィンが合成できないため筋ジストロフィー様の症状を呈する。この場合、エキソン7、8、9の三つのエキソンをスキップさせてフレームを回復できれば機能的なジストロフィンを作ることができると予想される。

武田、横田とHoffmanらは、エキソン7、8、9をスキップさせるようにデザインされたモルフォリーノを静脈内注射することで、全身の筋肉にジストロフィンの発現回復を認め、症状の改善を報告している^[20]。今後のDMD患者への展開が期待される。

終わりに

本稿では、筋ジストロフィーの治療法として注目される遺伝子導入や幹細胞移植に代わる第三の方法としての薬物治療、とくにリードスルー療法とエキソン・スキップ療法について紹介した。DNA塩基配列の決定法も高速化し、ヒトゲノム計画が成就した。いまやゲノム情報に関するノウハウは、ジストロフィンが発見された20年前に比べ長足の進歩を遂げている。患者ごとにジストロフィン遺伝子のゲノム情報を得ることも容易になってきた。それぞれの患者にどの治療法が最適であるかを決めたい

えで、テーラーメイドの治療戦略を立てることもできる。ジストロフィン発見後の20年間は筋ジストロフィー治療の基盤確立に費やされたが、これからの数年間はまさに治療実現のときといえる。

筋ジストロフィーの治療はがん治療に比べ適

応例数がきわめて少ない。そのため、商業的利益が得られないために製薬企業の注目を引きにくい。しかし、その高い発生率（新生男児3500人に一人）を示すこと、発症例の3分の1は家族歴のない孤発例であること、発症年齢の低いこと、悲惨な症状と致死性から鑑みて治療法の開発は常にトップスピードで取り組んでいかなければならない課題である。

Profile

まつだ・りょういち

1981年東京都立大学大学院中退。筋発生に興味をもち、カリフォルニア大学バークレー校博士研究員となる。その後、東京都立大学理学部助手、ニューヨーク州W. オルトン・ジョンズ細胞科学センター主任研究員、バーモント大学兼任助教授、東京大学教養学部助教授を経て、2007年東京都立大学大学院総合文化研究科准教授。筋ジストロフィーの発症メカニズムの研究とリードスルー薬物の開発をおこなっている。高校と大学の生物学教育にも関心をもっている。

参考文献

- [1] Davies J et al: "Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics" *Mol Pharmacol* 1 (1965) 93-106
- [2] Wilhelm J M et al: "Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: structure-function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system" *Biochem J* (1978) 1143-1149
- [3] Wilhelm J M et al: "Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells" *Biochem J* (1978) 1149-1153
- [4] Singh A: "Phenotypic suppression and misreading in *Saccharomyces cerevisiae*" *Nature* 277 (1978) 146-148
- [5] Palmer E et al: "Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics" *Nature* 277 (1979) 148-150
- [6] Bockwell D et al: "Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line" *Nat Med* 2 (1997) 1280-1284
- [7] Barton-Davis E R et al: "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice" *J Clin Invest* 104 (1999) 375-381
- [8] Uehara Y et al: "Nagamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phase II RNA in vitro" *Biochem Biophys Res Commun* 374 (1974) 92-95
- [9] Arakawa M et al: "Nagamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscle of mdx mice" *J Biochem* 134 (2003) 751-758
- [10] Allamand V et al: "Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin $\alpha 2$ chain mRNA in CMD myotubes" *J Gene Med* 10 (2008) 217-224
- [11] Hayashi Y et al: "Efficient total synthesis of (-)-Nagamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases" *J Royal Soc Chem in Press* (2008)
- [12] Shozuka M et al: (2007) in preparation
- [13] Winard A V et al: "Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy" *Human Mol Genet* 2 (1993) 737-744
- [14] Phelps S F et al: "Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice" *Human Mol Genet* 4 (1995) 1251-1258
- [15] Engel A G et al: "Muscular dystrophy in 'Myology'" pp1150-1187 (1996) McGraw-Hill, New York Engel A G and Franzini-Armstrong C ed
- [16] Phelps S F et al: "Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice" *Human Mol Genet* 4 (1995) 1251-1258
- [17] Engel A G et al: "Muscular dystrophy in 'Myology'" pp1130-1187 (1996) McGraw-Hill, New York Engel A G and Franzini-Armstrong C ed
- [18] Takeshima Y et al: "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin" *Kobun J Clin Invest* 95 (1995) 515-520
- [19] Surono A et al: "Chimeric RNA/ethylene-bridged nucleic acids promote dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy by inducing skipping of the nonsense mutation-encoding exon" *Human Gene Therapy* 15 (2004) 749-757
- [20] Mann C et al: "Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse" *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 42-47
- [21] Wilton S D et al: "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript" *Am Soc Gene Ther* 15 (2007) 1288-1296
- [22] Lu Q L et al: "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse" *Nature Med* 9 (2003) 1009-1014
- [23] Harding P L et al: "The influence of antisense oligonucleotide length on dystrophin exon skipping" *Mol Ther* 15 (2007) 157-166
- [24] Lu Q L et al: "Systemic delivery of antisense oligonucleotides restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles" *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005) 198-203
- [25] Archavala-Gomez V et al: "A phase III clinical trial in Duchenne muscular dystrophy using TM and IV delivered antisense oligonucleotides: The MDEX consortium" *Neuromuscul Disord* 16 (2006) 885
- [26] Takeda S et al: "Systemic delivery of morpholino oligonucleotides to skip mutations in the dystrophic gene of the mouse and dog" *Neuromuscul Disord* 17 (2007) 898

COLUMN 2

エキソン・スキップ療法の弱点

エキソン・スキップ療法では、全身の筋肉にアンチセンスオリゴヌクレオチドやモルフォリーノを投入するために静脈内注射が用いられている。これを長期間続けた場合に懸念されるのが、抗核抗体の出現である。抗DNA抗体は全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) など自己免疫疾患において認められる自己抗体であり、抗RNA抗体はシェーグレン症候群患者の血清中に認められる。エキソン・スキップ療法が実用化された場合、適応例における抗核抗体のモニタリングが重要となる。さらにアンチセンスオリゴヌクレオチドやモルフォリーノの価格がきわめて高く、長期間にわたる有効な治療の実施には経済負担が大きな課題となっている。筋肉にターゲットした効率の高い分子分配法の開発とともに治療費の負担軽減策の運動が不可欠である。