

Fig. 6 リードスルー誘導療法の原理

正常では mRNA が翻訳されて、ジストロフィンが産生される。しかし、ナンセンス変異があると、翻訳の途中で停止し、ジストロフィンが産生されない。リードスルー誘導薬があれば、ナンセンス変異の1部が読み飛ばされ、ジストロフィンが産生される。

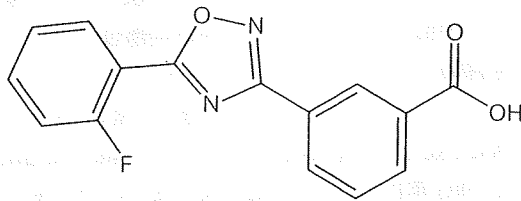


Fig. 7 PTC124 の構造

センス変異でも AO 治療の対象となり得ることが判明した¹⁴⁾。

VIII. リードスルー誘導薬

VII. ナンセンス変異でのエクソンスキッピング誘導治療

DMD ではジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つ例は、われわれのまとめでは約 1.5 割存在する。ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異のみられる場合は通常 DMD となるが、中に表現型が BMD となっている例が見出される。われわれが見出した BMD では、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有しているにもかかわらず、表現型は DMD となっていた。この症例のジストロフィン mRNA を解析するとナンセンス変異をコードするエクソンのスキッピングが自然に誘導され、インフレームの mRNA が産生されていることが明らかとなった¹³⁾。

こうしたことから、現在 AO を用いてナンセンス変異を有するエクソンのスキッピングを誘導することが治療の標的となっている。実際、ジストロフィン遺伝子のエクソン 49 内にナンセンス変異を有した例で AO を用いてナンセンス変異を持つエクソンのスキッピングの誘導を行い、患者培養筋細胞でジストロフィンの発現が確認されている⁹⁾。そこでわれわれは、ジストロフィンのエクソン 41 内に 1 塩基の置換を有したナンセンス変異例を対象として検討した。患者由来培養筋細胞に AO を導入したところ、ジストロフィン mRNA からエクソン 41 の消失した産物を得た。さらに、ジストロフィン陰性であった細胞がジストロフィン陽性となった。このようにナン

DMD ではジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有するが、mRNA 上のナンセンス変異を読み飛ばすリードスルーを誘導する治療が提唱されている。その作用を発揮するのが抗生物質のゲンタマイシンである。ゲンタマイシンは細菌の蛋白合成を阻害することにより抗菌作用を発揮する。蛋白合成は、細胞内のリボゾームで mRNA のコドンに対応した tRNA が新たなアミノ酸を運び、それが合成途上のペプチド鎖に結合することにより進行する。一方、mRNA 上にナンセンスコドンがあれば、tRNA ではなく終結因子がリボゾームに結合し、ペプチド鎖がリボゾームから遊離されて蛋白合成が停止する。ゲンタマイシンはリボゾーム RNA に結合し、ナンセンスコドンと終結因子の結合を弱め、ナンセンスコドンとどれかの tRNA との結合を促し、新たなアミノ酸の伸長が起こり蛋白の合成が最後まで進行する。これが、ゲンタマイシンのリードスルー効果と呼ばれているものである (Fig. 6)。

ヒト DMD のゲンタマイシンによる治療成績は、現在までに 2 つの報告にまとめられる^{15,16)}。ゲンタマイシンの有効性は両報告で異なり、その治療成績の差は治療対象の病型、患者、年齢、ゲンタマイシンの種類・投与量等あるいは変異の配列に違い (TGA, TAG あるいは TAA) があるためと考えられている¹⁷⁾。今後こうした違いなどを検討し、ゲンタマイシン治療のより有効性の高い治療法の確立が図られるものと考えられる。しかしながら、ゲンタマイシンは腎臓、聴神経に高い毒性を有しており、臨床の現場で応用するには課題が残されている。

一方、アメリカの PTC 社はゲンタマイシンと同様に

リードスルーを誘導する作用を有している化学物質の探索を行い、1つの化合物を見出した (Fig. 7)。この PTC124 と名づけられた化合物は、リードスルーを誘導する作用を有するものの、ゲンタマイシンとは異なり経口投与が可能で、しかも副作用も少ない。そのため、治療に応用しやすい化合物として大きな注目を集めている¹⁸⁾。PTC124 の臨床応用は既に始まり、臨床治験が行われている。PTC124 の治療効果が大きく期待され、臨床試験に参加できなかった患者から PTC124' を使用を認可するようという訴訟も起こるなど、期待の大きい治療法である¹⁹⁾。今後、この PTC124 の DMD 治療への展開が大きく期待される場所である。これとは別に、わが国でもリードスルー誘導薬の探索が行われてきており、その候補化合物がリストアップされてきている²⁰⁾。こうした領域の研究が進展することにより、強力にリードスルーを誘導する薬剤の開発も夢ではない。

一方で、こうした治療薬開発の進展に際し大きな臨床上の解決すべき問題も残されている。それは、遺伝子診断の項でも述べたように DMD 患者でジストロフィン遺伝子の遺伝子診断が必ずしも全員で精力的に行われておらず、ナンセンス変異を有している患者の特定できていないことである。神戸大学の集積では 1.5 割の患者がナンセンス変異を有しており、遺伝子診断がなされていないこうした患者が治療を受ける機会を逸することになる。治療薬の開発が目前となり、遺伝子診断の迅速な実施が緊急の課題となっている。

IX. 解決すべき課題

今回紹介した 2 つの分子標的療法は mRNA を標的としており、しかも両者ともナンセンスコドンをもつ mRNA である。ナンセンスコドンをもつ mRNA は生体から排除する仕組みの nonsense mediated mRNA decay (NMD) により破壊されると考えられてきていた。したがって、この NMD の活性の強さが 2 つの分子標的療法の効果を左右する可能性があり、NMD の活性制御法の開発が次の課題である。

また、DMD で開発されつつある分子標的療法は、ジストロフィン遺伝子のある特定の異常を有する患者のみが治療対象となる。そのため、男児 3,500 人に 1 人に発症する比較的稀な DMD の中で、さらに狭い領域の少数の患者のみが治療対象となり、オーダーメイド医薬になるものである。こうした新しい概念の薬剤の開発はわが国では例はなく、オーダーメイド医薬の認可手続きなどの確立が必要となっている。

おわりに

DMD は長く治療法のない病気として捉えられてきた。ジストロフィン遺伝子の異常に基づいた分子標的治療の開発が極めて精力的に行われ、治療が可能との光が見えてきた。ここ数年内には大きな展開が生じるものと期待される。

文献

- 1) Okizuka Y, Takeshima Y, Awano H, Zhang Z, Yagi M, et al: Small mutations detected by multiplex ligation-dependant probe amplification of the dystrophin gene. *Genet Test Mol Biomarkers* 13: 427-431, 2009
- 2) Yagi M, Takeshima Y, Wada H, Nakamura H, Matsuo M: Two alternative exons can result from activation of the cryptic splice acceptor site deep within intron 2 of the dystrophin gene in a patient with as yet asymptomatic dystrophinopathy. *Hum Genet* 112: 164-170, 2003
- 3) Matsuo M, Masumura T, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, et al: A very small frame-shifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 963-967, 1990
- 4) Takeshima Y, Nishio H, Sakamoto H, Nakamura H, Matsuo M: Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J Clin Invest* 95: 515-520, 1995
- 5) Takeshima Y, Yagi M, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, et al: Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 23: 788-798, 2001
- 6) Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, et al: Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 59: 690-694, 2006
- 7) van Deutekom JCT, Bremmer-Bout M, Janson AAM, Ginjaar IB, Baas F, et al: Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 10: 1547-1554, 2001
- 8) Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, et al: Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 12: 907-

914, 2003

9) Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, et al: Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 74: 83-92, 2004

10) Alter J, Lou F, Rabinowitz A, Yin H, Rosenfeld J, Wilton SD, et al: Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 12: 175-177, 2006

11) van Deutekom J, Janson A, Ginjaar I, Frankhuizen W, Aartsma-Rus A, et al: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357: 2677-2686, 2007

12) Yagi M, Takeshima Y, Suruno A, Takagi M, Koizumi M, et al: 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

13) Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, Inoue K, Yokota Y, et al: 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* 100: 2204-2210, 1997

14) Surono A, Tran VK, Takshima Y, Wada H, Yagi M, 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. *Hum Gene Ther* 15: 749-757, 2004

15) Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, et al: Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49: 706-711, 2001

16) Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, et al: Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 22: 15-21, 2003

17) Linde L, Kerem B: Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 24: 552-563, 2008

18) Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, et al: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-91, 2007

19) Allison M: Gunvalson decision sends shockwaves through industry. *Nat Biotechnol* 26: 1201-1202, 2008

20) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, et al: Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo)* 134: 751-758, 2003

BRAIN and NERVE
神経研究の進歩

2009年4月号 (増大号 Vol.61 No.4)

【月刊】特別定価3,990円(本体3,800円+税5%)
2009年 年間予約購読料 35,460円(税込)
電子ジャーナル閲覧オプション付 46,100円(税込)

増大
特集

大脳基底核—分子基盤から臨床まで

主要目次

概論 高田昌彦
 大脳基底核の構造—細胞構築と神経回路 藤山文乃
 大脳皮質—大脳規定回路の構造
 —平行ループ回路と収束・発散回路 宮地重弘
 直接路・間接路・ハイパー直接路の機能 南部 篤
 線状体におけるアセチルコリンとドーパミンの生理的相互作用 青崎敏彦, 他
 大脳基底核におけるグルコース代謝 山田勝也
 報酬機能における外側手綱核と中脳ドーパミンニューロンの役割 松本正幸
 大脳基底核の報酬機能—脚橋被蓋核の修飾機能 小林 康, 他
 線状体の強化学習機能 国里愛彦, 他
 イムノキシン細胞標的を用いた直接路・間接路の機能解析
 セブチン細胞骨格系の機能とドーパミン神経伝達における役割
 深堀良二, 他
 猪原匡史, 他

大脳基底核の病理学—神経変性疾患を中心に 若林孝一, 他
 パーキンソン病の発症機構 松井秀彰, 他
 パーキンソン病・ジストニアの関連遺伝子 長谷川一子, 他
 パーキンソン病の薬物治療 村田美穂
 パーキンソン病とジストニアに対する脳深部刺激療法 横地房子
 パーキンソン病遺伝子治療の現状 望月秀樹
 ●症例報告
 左手の拮抗性失行にかかわらず、右手の不自由さを主訴とした
 脳梁離断症候群の1例 岡本洋子, 他
 ●学会印象記
 World Federation of Neurology : Aphasia and
 Cognitive Disorder Research Group 鶴谷奈津子
 ●連載
 神経学を作った100冊(28) 作田 学

最近の特集テーマ

2009年 3月号 Microneurography(微小神経電図法)の臨床応用
 2月号 神経系の再興感染症と輸入感染症

1月号 脳神経倫理
 2008年 12月号 癌縮



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷1-28-23
 [販売部] TEL: 03-3817-5657 FAX: 03-3815-7804
 E-mail: sd@igaku-shoin.co.jp http://www.igaku-shoin.co.jp 振替: 00170-9-96693

携帯サイトはこちら



Duchenne 型 筋ジストロフィー

松尾雅文* (まつおまさふみ)
竹島泰弘* (たけしまやすひろ)
八木麻里子* (やぎまりこ)

*神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学

要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は男児 3,500 人に 1 人が発症するもっとも頻度の高い遺伝性進行性筋萎縮症で, ジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とする。DMD 症例では, 遺伝子診断によりジストロフィン遺伝子のアウトオブフレーム変異あるいはナンセンス変異が見出されている。DMD の治療として, ジストロフィン遺伝子のエクソン欠失のアウトオブフレーム変異に対してはエクソンスキッピング誘導治療, ナンセンス変異に対してはリードスルー誘導治療が提唱されている。これらの治療はいずれもジストロフィン遺伝子の異常に対応した非常に特異的な治療である。本稿では DMD の遺伝子診断とそれに基づいた治療法について紹介する。

Key words : Duchenne 型筋ジストロフィー, ジストロフィン, エクソンスキッピング, リードスルー

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は, ジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とする。DMD では遺伝子診断が進むとともに, 治療として患者の有するジストロフィン遺伝子の異常の型に対応して, エクソンスキッピング誘導治療とリードスルー誘導治療が提唱されている。DMD の遺伝子診断は病気の診断にとどまらず, 治療法の選択においても鍵となっている。本稿ではこれらの DMD の遺伝子診断とそれに基づいた治療法について紹介する。

I DMD の遺伝子診断

DMD は男児 3,500 人に 1 人が発症するもっとも頻度の高い遺伝性の進行性筋萎縮症である。筋萎縮は幼児期に発症し, その後も一貫して進行して, 20 歳代には心不全あるいは呼吸不全により死亡する。DMD の診断は血液中のクレアチンキナーゼ (CK) を測定するなど臨床的

に可能で, 時に筋生検によりジストロフィンの欠損が組織化学的手法で明らかにされる。一方, Becker 型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy : BMD) は, ジストロフィン遺伝子の異常を有するも成人期に筋力低下で発症し, 筋萎縮の進行は比較的ゆるやかな伴性劣性遺伝性疾患である。

DMD の遺伝子診断は, ジストロフィン遺伝子の 2 カ所のエクソン欠失のホットスポットにある多数のエクソンを, 同時に PCR 増幅するマルチプレックス法がもっとも容易な方法として頻用されてきた。しかし, 特定のエクソンのみを増幅するため, DMD 患者の約 5 割でしか遺伝子異常が同定できない欠点があった。最近では, ジストロフィン遺伝子の 79 のエクソンすべてを対象として, その欠失・重複が解析できる multiplex ligation-dependent probe amplification analysis (MLPA) 法が主流となっている。MLPA 法は比較的容易な方法で, しかも欠失のみならず重複の異常も検出可能となり, 遺伝子診断能力を向上させた。この MLPA 法により DMD/BMD の約 6 割の患者で遺伝子診断が可能となった。また, MLPA

60%	10%	15%	15%
欠失	重複	ナンセンス	他

図1 ジストロフィン遺伝子の異常

日本人 DMD/BMD で同定されたジストロフィン遺伝子異常のまとめ. 約 60% がエクソン単位の欠失, 15% がナンセンス変異であった (黒塗り枠). エクソン欠失ではエクソンスキッピング誘導治療が, ナンセンス変異ではリードスルー誘導治療あるいはエクソンスキッピング誘導治療が治療法となる.

法ではエクソン単位の欠失・重複の異常に加え, 微細な遺伝子の異常も検出されることもあり, MLPA 法の有用性はさらに高くなっている¹⁾.

しかし, DMD の残る 40% の例はナンセンス変異のような微細な遺伝子の異常を有している. こうした微細な遺伝子の異常の検出は, ゲノムを用いてジストロフィン遺伝子の各エクソンを PCR 増幅し, その塩基配列を明らかにしなければ同定できない. 79 のエクソンを個別にシーケンスすることは時間を要するため, ジストロフィン cDNA の全長の配列の塩基配列を決定することが行われる. こうしたことで, ほぼ全例で遺伝子診断は可能である.

われわれは, 従来よりジストロフィン遺伝子の異常を全患者で明らかにすることを目標に, 443 名の DMD/BMD 患者で詳細な遺伝子診断を進めて, 日本でのジストロフィン遺伝子異常の分布を明らかにすることに成功した (図 1). ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の大きな欠失・重複の異常を約 70% の患者が有し, さらに, 一塩基の置換がコドンをストックにかえるナンセンス変異を約 15% の患者が, その他の異常を 15% の患者が有することを明らかにしてきた (未発表データ). DMD のほとんどの症例でアウトオブフレームあるいはナンセンス変異が同定され, ジストロフィンが産生されないフレームシフト則が適合した.

II DMD のエクソンスキッピング誘導治療

われわれは, DMD 患者でジストロフィン遺伝子の解析を進めるなかで, きわめて特異な遺伝子異常を見出した. ジストロフィン神戸と命名したこのジストロフィン遺伝子の異常は, エクソン 19 内の 52 塩基の欠失であった²⁾. ところが, ジストロフィン神戸ではゲノムの異常から 2 次的にエクソン 19 のスキッピングがスプライシング時に生じていることが判明した. このエクソンスキッピングが 52 塩基の欠失部位に内在したスプライシング促進配列の機能が消失したことが原因とつきとめ, さらに, このスプライシング促進配列に相補的な配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド (AO) によりこの配列の機能を阻害すると, エクソン 19 のスキッピングが誘導されることを明らかにした.

AO を用いてエクソン 19 のスキッピング誘導が人為的に行うことが可能となり, DMD の治療への応用を考えこのエクソンのスキッピングによりアウトオブフレームの変異がインフレームとなるジストロフィン遺伝子の欠失異常を検討した. ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 を欠失した DMD では 242 塩基が欠失し, アウトオブフレームになっている (図 2 上段). この DMD 例で, エクソン 19 のスキッピングを誘導すると, エクソン 19 の 88 塩基がさらに mRNA から欠けることとなり, エクソン 20 と

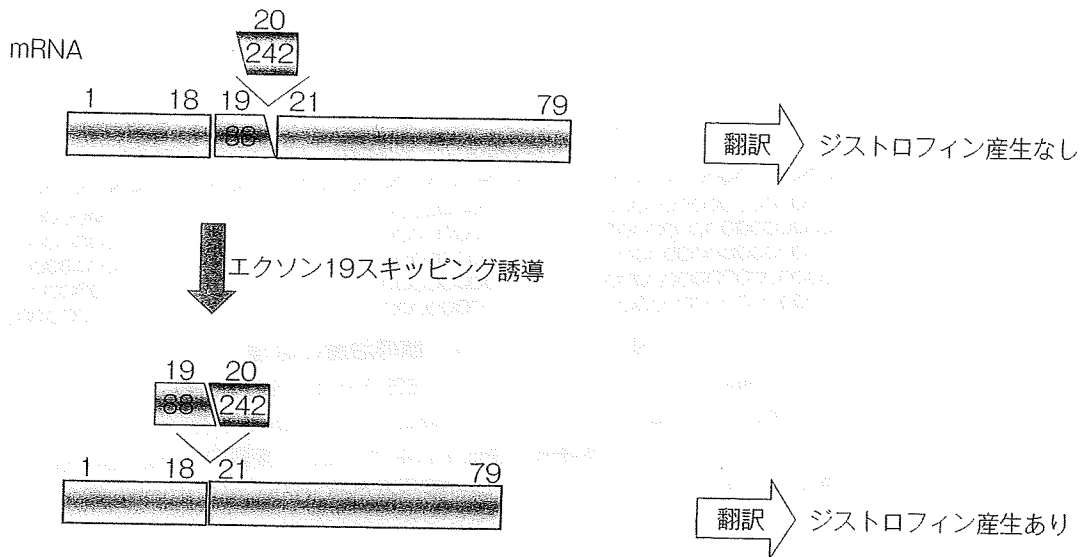


図2 DMDのエクソン19のスキッピング誘導治療モデル

19の合計330塩基がmRNAから消失する。その結果、mRNAはインフレームとなりこのDMD患者ではジストロフィンの産生が期待される(図2下段)。

そこで、エクソン20を欠失したDMD患者由来の培養筋細胞に先のAOを導入したところ、導入後の細胞でエクソン19のスキッピングが誘導されるとともに、ジストロフィン染色陽性細胞の出現を確認した³⁾。こうした成果とマウスで得られた結果を統合して、神戸大学ではエクソン20を欠失したDMD患者へのAOを用いた治療を計画し、倫理委員会にて審議され承認された。AOは31塩基のものでS化されたDNAからなり、米国のPrologo社において合成した。これを生理食塩水に溶いたものを、投与量として0.5 mg/kg/回を2時間かけて点滴静注した。1週間に1回点滴投与し、4回投与した1週間後に筋生検を実施した。患者骨格筋のジストロフィンmRNAをRT-PCR解析すると、治療前には検出できなかったエクソン19のスキッピングしたmRNAを検出し、AOによるエクソンスキッピングの誘導効果を確認した。さらに、骨格筋のジストロフィンを免疫染色すると、ジストロフィンの発現をも確認することに成功した。その成果は、まったく

新たなDMDの治療法としてPediatric Research誌の2006年5月号の表紙を飾るなど、世界から大きな注目を集めることとなった⁴⁾。

III エクソンスキッピング誘導による治療の展開

先にジストロフィン遺伝子のエクソン20を欠失したDMDの世界で初めての治療例を示した。ジストロフィン遺伝子のエクソン欠失の好発部位のエクソンスキッピングを誘導するAOを確立することができれば、この方法による治療例は飛躍的に増加する。すでにvan Deutekomらは、エクソン46、Aartsma-Rusらはエクソン44、49、50、51のスキッピングがAOにより誘導され、DMD由来の筋培養細胞にこれらのAOを導入することによって、ジストロフィンが合成されるようになったことを報告している⁵⁾⁶⁾。さらに、2つのエクソンを同時にスキッピング誘導する試みもなされており、1人の患者で2つのエクソンスキッピングの誘導に成功しジストロフィンの発現を確認している^{6)~8)}。こうした結果を踏まえ、オランダではジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する治療が臨床試験されてい

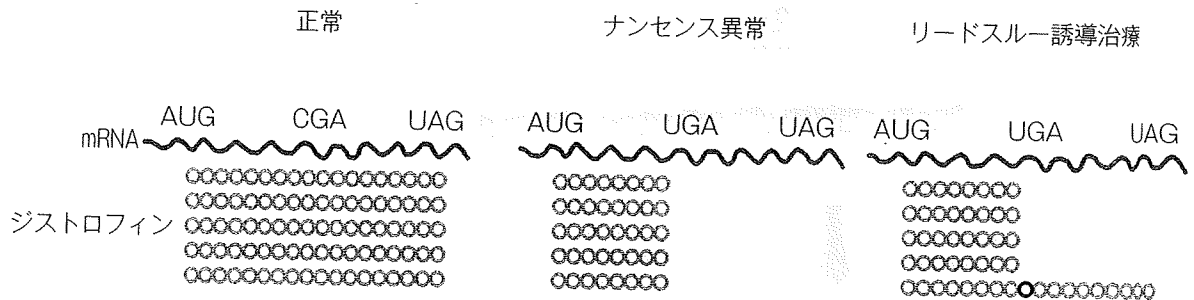


図3 リードスルー誘導治療の原理

正常では mRNA が翻訳されて、ジストロフィンが産生される (左)。しかし、ナンセンス変異があると翻訳の途中で停止し、開始コドンの AUG から終止コドンの UAG までジストロフィンは産生されない (中央)。一方、リードスルー誘導薬が存在すればナンセンス変異の一部が読み飛ばされ、新たなアミノ酸 (黒丸) が挿入されたジストロフィンが産生される (右)。

る⁹⁾。また、後章で紹介するジストロフィン遺伝子のナンセンス変異でも、インフレームのエクソン内に存在する時には、エクソンスキッピング誘導治療の対象となり、その応用性はより広いものと考えられる¹⁰⁾。

IV リードスルー誘導薬

DMD では、フレームシフト変異を有する例のほか、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有する例がある。後者については mRNA 上のナンセンス変異を読み飛ばすリードスルーを誘導する治療が提唱されている。抗生物質のゲンタマイシンはリボソーム RNA に結合し、ナンセンスコドンと終結因子の結合を弱め、ナンセンスコドンとどれかの tRNA との結合を可能とし、新たなアミノ酸の伸長を起し蛋白の合成が最後まで進行する。これが、リードスルー効果とよばれているものである (図3)。

ヒト DMD のゲンタマイシンによる治療成績は現在までに2つの報告にまとめられる¹¹⁾¹²⁾。ゲンタマイシンの有効性は両報告で異なり、その治療成績の差は治療対象の病型、患者、年齢、ゲンタマイシンの種類・投与量などあるいは変異の配列に違い (TGA, TAG あるいは TAA) があるためと考えられている¹³⁾。今後こうした違いなどを検討し、ゲンタマイシン治療のより

有効性の高い治療法の確立が図られるものと考えられる。しかしながら、ゲンタマイシンは腎臓、聴神経に高い毒性を有しており、臨床の現場で応用するには課題が残されている。

一方、米国の PTC 社はゲンタマイシンと同様にリードスルーを誘導する作用を有している化学物質の探索を行い、PTC124 という化合物を見出した。この PTC124 は、リードスルーを誘導する作用を有するものの、ゲンタマイシンとは異なり経口投与が可能で、しかも副作用も少ない。そのため、治療に応用しやすい化合物として大きな注目を集めている¹⁴⁾。PTC124 の臨床応用はすでに始まり、臨床試験が行われている。DMD では有効な治療がなく、PTC124 による治療が患者から大きく期待されている。そのため米国では臨床試験に参加できなかった患者から、PTC124 による治療を受けたいとする訴訟が起こされている¹⁵⁾。今後、この PTC124 の DMD 治療への展開がわが国でも大きく期待される。これとは別にわが国でもリードスルー誘導薬の探索が行われてきており、その候補化合物がリストアップされてきている¹⁶⁾。こうした領域の研究が進展することにより、より強力にリードスルーを誘導する薬剤の開発も期待される。

おわりに

DMD は長く治療法のない病気としてとらえられてきた。ジストロフィン遺伝子の異常に基づいた分子標的治療の開発がきわめて精力的に行われ、治療が可能との光がみえてきた。ここ数年の内には大きな展開が生じるものと期待される。

追記：最近のエクソンスキッピング誘導治療の動向については神戸大学小児科の HP (<http://pedata.med.kobe-u.ac.jp>) をご参照いただきたい。

文献

- 1) Okizuka Y et al : Small mutations detected by multiplex ligation-dependant probe amplification of the dystrophin gene. *Genetic Testing* 2009 (in press)
- 2) Matsuo M et al : A very small frame-shifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 170 : 963-967
- 3) Takeshima Y et al : Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 2001 ; 23 : 788-798
- 4) Takeshima Y et al : Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006 ; 59 : 690-694
- 5) van Deutekom JCT et al : Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 1547-1554
- 6) Aartsma-Rus A et al : Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 907-914
- 7) Aartsma-Rus A et al : Antisense-induced multi-exon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004;74:83-92
- 8) Alter J et al : Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006 ; 12 : 175-177
- 9) van Deutekom J et al : Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 2677-2686
- 10) Suroño 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. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 749-757
- 11) Wagner KR et al : Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001 ; 49 : 706-711
- 12) Politano L et al : Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 2003 ; 22 : 15-21
- 13) Linde L, Kerem B : Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 2008 ; 24 : 552-563
- 14) Welch EM et al : PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007 ; 447 : 87-91
- 15) Allison M : Gunvalson decision sends shockwaves through industry. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 121-122
- 16) Arakawa M et al : Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem* 2003 ; 134 : 751-758

= 総 説 =

Duchenne 型筋ジストロフィーの治療の最前線

松 尾 雅 文

要旨 Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は男児 3,500 人に 1 人が発症する最も頻度の高い遺伝性進行性筋萎縮症である。DMD はジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とする。多くの DMD では、このジストロフィン欠損はジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失の異常によりジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠にずれを生じ (アウトオブフレーム)、mRNA 上にストップコドンが新たに出現し、ジストロフィン合成が翻訳の途中で停止してしまうために生じる。また、一部の DMD ではジストロフィン遺伝子の 1 塩基置換のためにナンセンス変異を生じ、ジストロフィンの合成が停止し、そのためにジストロフィンが欠損する。

現在 DMD の治療としてジストロフィン遺伝子のエクソン欠失に対してはエクソンスキッピング誘導治療が、ナンセンス変異に対してはリボソーマルリードスルー誘導治療が提唱されている。ここでは DMD の治療の最近の動きについて紹介する。

見出し語 Duchenne 型筋ジストロフィー、治療、エクソンスキッピング、リードスルー

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD) は男児 3,500 人に 1 人が発症する最も頻度の高い遺伝性の進行性筋萎縮症である。DMD はジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とする。多くの DMD では、ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失の異常があり、その欠失がジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠をずれさせる (アウトオブフレーム)。そのため、mRNA 上にストップコドンが新たに出現しジストロフィン合成が翻訳の途中で停止し、ジストロフィン欠損となる。また、一部の患者ではジストロフィン遺伝子に生まれながらナンセンス変異の異常を有している例もある。DMD はこれらのようにジストロフィン mRNA 上にストップコドンが出現してジストロフィン合成が停止してしまうことが病態の基礎にある。そのため、このストップコドンを標的とした治療法が考案されている。1 つは、スプライシング時にエクソンのスキッピングを誘導してジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正するエクソンスキッピング治療であり¹⁾、もう 1 つはナンセンス変異を読み飛ばす

リードスルーと呼ばれる方法である²⁾。本稿ではこの 2 つを中心にして最新のデータを紹介する。

I. ジストロフィン遺伝子の遺伝子診断

1987 年に Kunkel らによって X 染色体短腕に欠失の異常を有する DMD 患者から逆行遺伝学の手法を用いることにより Xp21.2 に存在する DMD の責任遺伝子がクローニングされ、ジストロフィン遺伝子と命名された。このジストロフィン遺伝子の発見により、DMD の遺伝子診断は急速に臨床応用が進んだ。DMD 患者で詳細な遺伝子診断を行ったところではジストロフィン遺伝子のエクソン単位の大きな欠失・重複の異常が約 6 割で、ナンセンス変異が約 15% で、スプライシング異常が 10% で検出されている。

DMD の診断は臨床診断でも十分に可能で、遺伝子診断の重要性が認識されてこなかった。今回紹介するように DMD の治療法の選択に当たっては遺伝子診断結果は必須のものとなっている。

II. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) とフレームシフト則

DMD と軽症の Becker 型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy; BMD) の遺伝子診断の結果が集積され、フレームシフト則が DMD と BMD の表現型の違いを説明する基本原理となった。DMD では、ジストロフィン遺伝子から欠失したエクソンにコードされている塩基の数が 3 の倍数ではないため、ジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠にずれを生じ (アウトオブフレーム)、その結果ストップコ

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学

連絡先 〒 650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学

(松尾雅文)

E-mail: matsuo@kobe-u.ac.jp

(受付日: 2008. 2. 28)

ドンが出現しジストロフィンが産生されない。これに対し、症状の軽いBMDでは欠失したエクソンにコードされている塩基の数が3の倍数で、ジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠は維持され（インフレーム）、サイズの小さなジストロフィンが産生されている。この様に mRNA のアミノ酸の読み取り枠のずれからジストロフィンの産生の有無を判定することにより表現型が説明されることとなった。

フレームシフト則は、また、DMD の治療法があることを示唆するものであった。すなわち、ジストロフィン mRNA のアウトオブフレームをインフレームに変換する、つまり、欠失する塩基の数を3の倍数にすることによりストップコドン を解消して、ジストロフィンの産生を促す治療となることを示した。

Ⅲ. アンチセンスオリゴによるエクソンスキッピング誘導

私達は、遺伝子から転写された mRNA 前駆体から成熟 mRNA が産生されるスプライシング反応の際に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソンのスキッピングを誘導し、アウトオブフレームをインフレームに変換する治療方法を着想した。すなわち、ゲノムで欠失しているエクソンに隣接したエクソンのスキッピングを誘導することにより、ジストロフィン mRNA から新たにエクソンを欠失させ、欠失した全塩基数を3の倍数にするものである⁴。

このエクソンスキッピング誘導治療の発想は、ジストロフィン神戸の発見に源を発している⁵。ジストロフィン神戸ではジストロフィン遺伝子のエクソン 19 内の 52 塩基の欠失により、エクソン 19 のスキッピングが2次的に生じた。その原因は 52 塩基の欠失によりスプライシング促進配列が消失したことによることが明らかとなった⁵。このことからスプライシング促進配列の機能を人工的に阻害することにより、スプライシング反応を停止し、エクソンのスキッピングが誘

導されることが着想された。実際に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソン 19 内に存在するスプライシング促進配列機能を阻害すると、人工的にエクソン 19 のスキッピングが誘導された。

エクソン 19 のスキッピング誘導がアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて人為的に行うことが可能なり、その臨床応用の可能性を探った。エクソン 19 は 88 塩基からなり、このエクソンのスキッピングによりアウトオブフレームの変異がインフレームとなるジストロフィン遺伝子の欠失異常を検討した。ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 を欠失した DMD では 242 塩基が欠失し、アウトオブフレームになっている。この DMD 例で、エクソン 19 のスキッピングを誘導すると、エクソン 19 の 88 塩基がさらに欠けることとなり、エクソン 20 と 19 の合計 330 塩基が mRNA から消失してインフレームとなる。その結果、この DMD 患者ではジストロフィンの産生が期待され、エクソン 19 のスキッピング誘導治療の対象となる（図 1）。

そこで、患児由来の培養筋細胞に先のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しなかった筋細胞では全くジストロフィン は染色されなかったが、導入した筋細胞ではエクソン 19 のスキッピング誘導が確認されるとともにジストロフィン染色陽性細胞の出現をみた⁶。これらの結果は本 DMD 患者でアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入により、ジストロフィン発現を誘導できる治療法となることを示した。

Ⅳ. 神戸大学での治療

こうした成果に基づいて神戸大学ではエクソン 20 を欠失した DMD のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療を計画し、倫理委員会にて審議され承認された。アンチセンスオリゴヌクレオチドは 31 塩基のもので S 化された DNA から

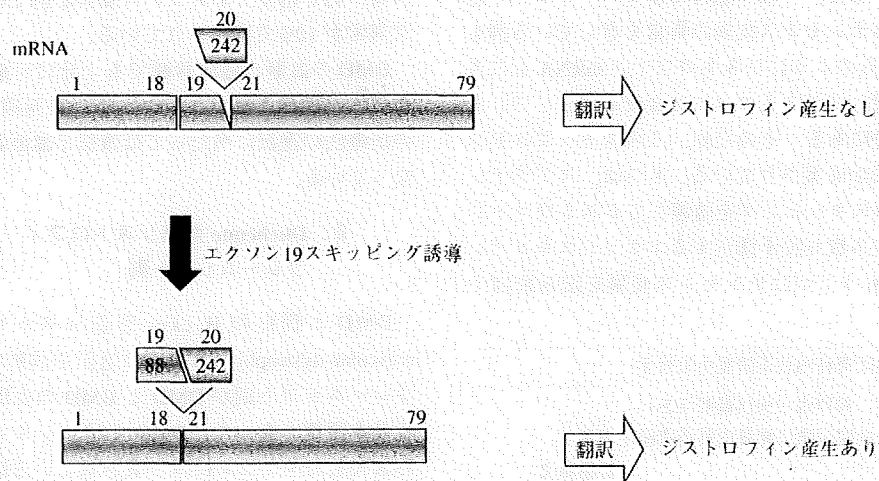


図 1 エクソンスキッピング誘導による DMD 治療モデル

なり、アメリカの Proligo 社において合成した。これを生理食塩水に溶いたものを、投与量として 0.5 mg/kg/回を 2 時間かけて点滴静注した。1 週間に 1 回点滴投与し、投与後に血中リンパ球中のジストロフィン mRNA を解析、4 回投与後に筋生検を実施してその効果を検討した。そして、患者骨格筋のジストロフィン mRNA でエクソン 19 のスキッピングの誘導効果を確認するとともに、ジストロフィンの発現をも確認することに成功した。その成果は、Pediatric Research 誌の 2006 年 5 月号の表紙を飾るなど世界から大きな注目を集めることとなった⁷⁾。

V. エクソンスキッピング誘導による治療の展開

ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 を欠失した DMD の治療例を示した (図 1)。しかし、エクソン 20 を欠失した DMD の症例数は極めて少なく、ほとんどの DMD ではエクソン 19 のスキッピング誘導治療の対象とならない。ジストロフィン遺伝子には 5' 端と中央部にエクソンの欠失する好発部位があり、この領域のエクソンに対して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確立することが出来れば、この方法による治療は多くの欠失症例で適応となる。エクソン欠失好発部位で、スキッピングを誘導することによりアウトオブフレームからインフレームになるエクソンは 17 個である。すでに van Deutekom らは、2001 年にエクソン 46、Aartsma-Rus らは、2003 年にエクソン 44、49、50、51 のスキッピングがそれぞれに対応したアンチセンスオリゴヌクレオチドにより誘導され、DMD 由来の筋培養細胞にこれらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することによってジストロフィンが合成されるようになったことを報告している^{8,9)}。最新の報告によれば、2 つのエクソンを同時にスキッピング誘導する試みもなされており、1 人の患者で 2 つのエクソンのスキッピングの誘導に成功しジストロフィンの発現を確認している⁹⁻¹¹⁾。

神戸大学では RNA/ENA キメラという新しい強力なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソン 45 のスキッピング誘導に成功し、臨床応用の準備を整えている。エクソン 45 のスキッピング誘導により、エクソン 46 の欠失例をはじめ多くの例で治療が可能となる。したがって、エクソン 45 のスキッピング誘導の確立により、DMD が治療し得る疾病になることに大きく前進する。

最近では、このエクソンスキッピング誘導治療に関する報告が数多くなされており、2007 年のみでも 10 報告以上になる。こうした研究成果の積み重ねにより、近い将来 DMD が治療しうる病気になることも夢ではない。

VI. ナンセンス変異治療

先にも紹介したように、DMD ではジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つ例が少なからず存在する。ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異では通常 DMD となるが、中

に表現型が BMD となっている例が見出される。この例ではナンセンスのあるエクソンのスキッピングにより、インフレームの mRNA が産生されていることが明らかにされ、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてナンセンス変異を有するエクソンのスキッピングを誘導することが治療の標的となった。実際、ジストロフィン遺伝子のエクソン 49 内にナンセンス変異を有した例で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてナンセンス変異をもつエクソンのスキッピングの誘導を行い、患者培養筋細胞でジストロフィンの発現が確認されている⁹⁾。

私達は、ジストロフィンのエクソン 41 内に 1 塩基の置換を有したナンセンス変異例を対象として検討した。患者由来培養筋細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したところ、ジストロフィン mRNA からエクソン 41 の消失した産物を得た。さらに、ジストロフィン陰性であった細胞がジストロフィン陽性となった。このようにナンセンス変異でもアンチセンス治療の対象となりうる事が判明した¹²⁾。

VII. リードスルー誘導薬

ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つ DMD に対するもう 1 つの治療が提唱されている。mRNA 上のナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー現象を応用するものである。その作用を発揮することが期待されるのが、抗生物質の gentamicin である。Gentamicin は細菌のタンパク合成を阻害することにより抗菌作用を発揮する。タンパク合成は、細胞内のリボソームで mRNA のコドンに対応した tRNA が新たなアミノ酸を選び、それが合成途上のペプチド鎖に結合することにより進行する。一方、mRNA 上にナンセンスコドンがあれば、tRNA ではなく終結因子がリボソームに結合し、ペプチド鎖がリボソームから遊離されてタンパク合成が停止する。Gentamicin はリボソーム RNA に結合し、ナンセンスコドンと終結因子の結合を弱め、ナンセンスコドンとどれかの tRNA との結合を促し、新たなアミノ酸の伸長が起こり、タンパクの合成が最後まで進行する。これが、gentamicin のリードスルー効果と呼ばれているものである。

ヒト DMD の gentamicin による治療成績は、現在までに 2 つの報告にまとめられる^{13,14)}。Gentamicin の有効性は両報告で異なり、その治療成績の差は治療対象の病型、患者、年齢、gentamicin の種類・投与量等あるいは変異の配列の違いがあるためと考えられている。今後こうした違いなどを検討し、gentamicin 治療のより有効性の高い治療法の確立が図られるものと考えられる。しかしながら、gentamicin は高い毒性を有しており、臨床の現場で応用するには課題が残されている。

一方、アメリカの PTC 社は gentamicin と同様にリードスルーを誘導する作用を有している化学物質の探索を行い、1 つの化合物を見出した。この PTC124 と名付けられた化合物は、リードスルーを誘導する作用を有するものの、gentamicin とは異なり経口投与が可能で、しかも副作用も少ない。その

ため、治療に応用しやすい化合物として大きな注目を集めている¹⁵⁾。今後のこの薬品の臨床への展開が大きく期待される場所である。

ま と め

DMDは長く治療法のない病気としてとらえられてきた。ジストロフィン遺伝子の異常に基づいた治療法の開発がきわめて精力的に行われ、治療が可能との光が見えてきた。ここ数年内には大きな展開が生じるものと期待される。

文 献

- 1) Matsuo M. Duchenne/Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev* 1996; **18**: 167-72.
- 2) van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 774-83.
- 3) Howard MT, Anderson CB, Fass U, et al. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* 2004; **55**: 422-6.
- 4) Matsuo M, Masumura T, Nishio H, et al. Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy Kobe. *J Clin Invest* 1991; **87**: 2127-31.
- 5) Takeshima Y, Nishio H, Sakamoto H, Nakamura H, Matsuo M. Modulation of *in vitro* splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J Clin Invest* 1995; **95**: 515-20.
- 6) Takeshima Y, Yagi M, Ishikawa Y, et al. Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 2001; **23**: 788-98.
- 7) Takeshima Y, Yagi M, Wada H, et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006; **59**: 690-4.
- 8) van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1547-54.
- 9) Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 907-14.
- 10) Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 83-92.
- 11) Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006; **12**: 175-7.
- 12) Surono A, Van Khanh T, Takeshima Y, 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. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 749-57.
- 13) Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001; **49**: 706-11.
- 14) Politano L, Nigro G, Nigro V, et al. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 2003; **22**: 15-21.
- 15) Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; **447**: 87-91.

Frontline Studies on Duchenne Muscular Dystrophy Treatment

Masafumi Matsuo, MD

Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Hyogo

Duchenne muscular dystrophy is the most common inherited muscular disease, characterized by progressive muscle wasting, commonly leading to death in the twenties due to cardiac or respiratory failure. In order to establish treatment for Duchenne muscular dystrophy, many kinds of studies including gene transfer strategies have been conducted, but no effective treatment has been established. Two plausible ways have been proposed. One is the induction of exon skipping to correct out-of-frame to in-frame dystrophin mRNA, thereby leading to the production of truncated dystrophin. The other one is the induction of read-through of nonsense mutation which ignores a premature stop codon to translate dystrophin mRNA into dystrophin. Here, these two ways are presented and discussed.

No To Hattatsu 2009; **41**: 92-5

Duchenne型筋ジストロフィーに対する エクソン・スキッピング誘導治療

Molecular therapy inducing exon skipping for Duchenne muscular dystrophy



竹島泰弘(写真) 松尾雅文

Yasuhiro TAKESHIMA and Masafumi MATSUO

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学

◎Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィン遺伝子異常により発症する筋疾患であり、筋ジストロフィーのなかでもっとも頻度が高く、また症状も重篤であるため、根治治療に対する取組みが注目されている。著者らは、正常な遺伝子を導入する“従来型の遺伝子治療”ではなく、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)により遺伝情報を修復する“分子治療”の検討をこれまで進めてきた。これは AS-oligo を用いて欠失部位に隣接するエクソンのスキッピングを誘導することにより、DMD でみられるアミノ酸読み取り枠のずれを修復し、機能的なジストロフィン蛋白を産生させるものである。そして 2006 年に、DMD 症例に AS-oligo を静脈内投与することによってジストロフィン蛋白を発現させることが可能であることを世界ではじめて明らかにした。さらに 2007 年には、オランダからも、DMD 症例に対する AS-oligo 投与の有効性を示す結果が報告された。AS-oligo によるエクソン・スキッピング誘導治療の臨床応用はすでに動き出しており、今後多くの症例に適応されることが期待される。

Key word : Duchenne型筋ジストロフィー, ジストロフィン, アンチセンスオリゴヌクレオチド,
: スプライシング, 分子治療

Duchenne 型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy : DMD)は、ジストロフィン遺伝子異常によりジストロフィン蛋白が産生されないために発症する筋疾患である。ジストロフィン遺伝子がクロニングされたときには正常な遺伝子を導入する“従来型の遺伝子治療”への期待が集まったが、現在もまだ実験段階である。

そのような中、著者らは“従来型の遺伝子治療”ではなく、アンチセンスオリゴヌクレオチド(antisense oligonucleotide : AS-oligo)により遺伝情報を修復する“分子治療”の検討を進めている。これは AS-oligo によりスプライシングの過程でエクソン・スキッピングを誘導し、DMD でみられるアミノ酸読み取り枠のずれを修復することにより、機能を有するジストロフィン蛋白を発現させるものである。そして 2006 年に、DMD 症例に AS-oligo を静脈内投与することによってジストロ

フィン蛋白を発現させることが可能であることを世界ではじめて明らかにした¹⁾。さらに 2007 年には、オランダからも、DMD 症例に対する AS-oligo 投与の有効性を示す結果が報告された²⁾。

本稿では、DMD に対するエクソン・スキッピング誘導治療の臨床への応用に関して概説する。

Duchenne型/Becker型筋ジストロフィー とジストロフィン遺伝子

DMD は伴性劣性遺伝形式を示す進行性の筋萎縮症で、12 歳までに車いす生活となり、10 歳代後半から 20 歳前後になると呼吸不全・心不全を呈する重篤な疾患である。一方、Becker 型筋ジストロフィー(Becker muscular dystrophy : BMD)は車いすが必要となるのは通常 16 歳以降で、中には壮年期になってはじめて症状を認める症例もある。DMD/BMD の責任遺伝子であるジストロフィン

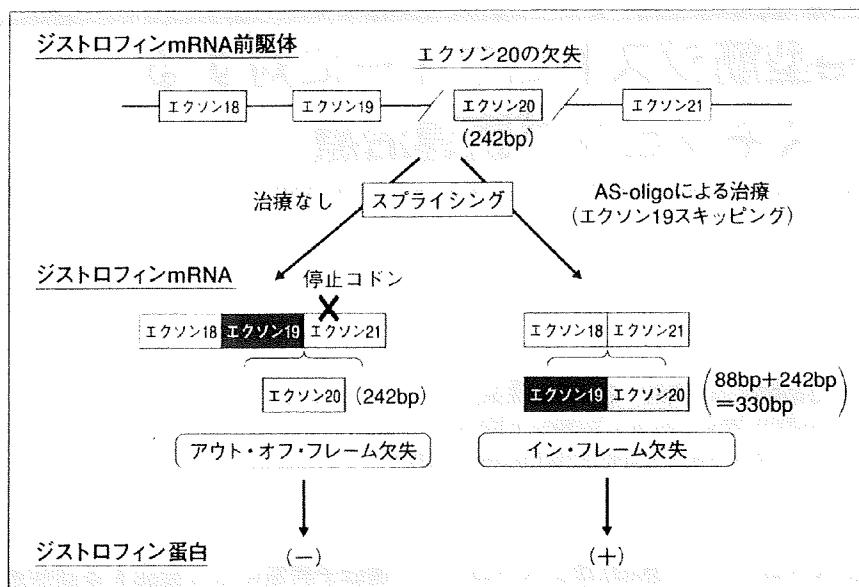


図1 エクソン20の欠失したDMD症例におけるAS-oligoによるエクソン・スキッピング誘導治療

ゲノムより転写された mRNA 前駆体を上段に示す。治療を行わない場合、左に示すようにスプライシングによって産生される mRNA において、エクソン 20 (灰色四角で示す) に相当する 242 塩基が欠失している。その結果、アミノ酸読み取り枠がずれ(アウト・オフ・フレーム欠失)エクソン 21 内に停止コドン(X印)が出現してジストロフィン蛋白が産生されない。この症例で AS-oligo によってエクソン 19 (斜線四角で示す) のスキッピングを誘導すると、右に示すようにスプライシングの過程でエクソン 19 が消失するため、mRNA ではエクソン 19 と 20 の 2 つのエクソン (88+242=330 塩基) が欠失し、イン・フレーム欠失となる。この場合、欠失より後ろに停止コドンが現れることなく、ジストロフィン蛋白が産生される。

遺伝子は X 染色体短腕上に存在する 3,000 kb に及ぶ巨大な遺伝子であり、79 個のエクソンよりなる。ジストロフィン遺伝子でみられる遺伝子異常はエクソン単位の欠失がもっとも多く 5~6 割を占め、残りが重複やナンセンス変異・スプライシング変異などの微小変異である。DMD と BMD が同じジストロフィン遺伝子の異常であるにもかかわらず、このように重症度の差がみられる機構は、以下に示すフレームシフト則によって説明される³⁾。

mRNA から蛋白が翻訳されるときには 3 塩基によって 1 アミノ酸がコードされている。ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失がある症例において、ゲノムの欠失によって生じる mRNA における欠失の塩基数が 3 の倍数であると、翻訳の際に遺伝子欠失部位のアミノ酸は欠失するが、それ以降はアミノ酸の読み取り枠は維持されているため C 末端まで蛋白が合成され、機能をもった蛋白が産生される(イン・フレーム欠失)。一方、

mRNA における欠失の塩基数が 3 の倍数でない場合は欠失領域以降のアミノ酸読み取り枠にずれが生じるため終止コドンが現れ、機能的な蛋白が合成されない(アウト・オフ・フレーム欠失)。イン・フレーム欠失では軽症型の BMD となるが、アウト・オフ・フレーム欠失では重症型の DMD となる。

フレームシフト則によれば、mRNA を産生するスプライシングの過程でエクソンのスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠のずれを修正することにより DMD でみられるアウト・オフ・フレーム欠失をイン・フレーム欠失に変換し、重症型である DMD を軽症型へと変換することが可能となると考えられる。今回紹介する DMD に対するエクソン・スキッピング誘導治療は、まさに、このアウト・オフ・フレーム欠失をイン・フレーム欠失に変換するものである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる エクソン・スキッピングの誘導治療

遺伝子より転写された mRNA 前駆体はイントロン部分が切り取られるスプライシングを受け、エクソンとエクソンが結合し成熟 mRNA となる。著者らが発見した DMD 症例“ジストロフィン神戸”⁴⁾ではゲノム DNA においてエクソン 19 内に 52 塩基の欠失が認められたが、mRNA ではエクソン 19 全体が欠失していた。このことはエクソン内の欠失している配列がスプライシング部位決定に重要な機能を有していることを示している。この症例から得られた知見をもとに *in vitro* スプライシング系を用いて検討を行い、エクソン 19 内の欠失している配列がスプライシングにおいて重要な機能を有した配列であること〔スプライシング促進配列 (splicing enhancer sequence : SES) とよばれる〕を明らかにした⁵⁾。さらに、その配列に相補的な 31 塩基の AS-oligo によってエクソン 19 のスキッピングを誘導しうることを世界ではじめて明らかにした⁶⁾。

AS-oligo を用いることによってエクソン 19 のスキッピングを人為的に誘導し、mRNA から除くことが可能となった。この 88 塩基からなるエクソン 19 のスキッピングの誘導によってアウト・オフ・フレーム欠失からイン・フレーム欠失に変換することが可能な遺伝子変異を検討した。図 1 の左に示すようにゲノム上でエクソン 20 を欠失した DMD 症例では mRNA においてエクソン 20 に相当する 242 塩基が欠失している。その結果、アミノ酸読み取り枠がずれ (アウト・オフ・フレーム欠失)、エクソン 21 内に停止コドンが出現してジストロフィン蛋白が産生されない。この症例で AS-oligo によってエクソン 19 のスキッピングを誘導すると、図 1 の右に示すように、スプライシングの過程でエクソン 19 が消失し、mRNA ではエクソン 19 と 20 の 2 つのエクソン (88+242=330 塩基) が欠失する。その結果、イン・フレーム欠失となり、アミノ酸読み取り枠を修正できる。この場合、欠失より後ろに停止コドンが現れることなく、ジストロフィン蛋白が産生され、症状が軽症化すると考えられる。こうしたことから、人為的なエクソン・スキッピング誘導が有効な治療

法になりうるものと考えられた。

この治療法が有効であることを明らかにするために、著者らはまず、培養筋細胞による検討を行った。エクソン 20 の欠失を有する DMD 症例から採取した筋組織より筋芽細胞初代培養系を作成し、AS-oligo を添加した。その結果、AS-oligo によって mRNA においてエクソン 19 のスキッピングが誘導され、さらにジストロフィン蛋白が発現することが確認された⁷⁾。

つぎに、AS-oligo の生体内での動態を検討するために、DMD のモデル動物である mdx マウスを用いて検討を行った。何らかの担体を用いることなく、AS-oligo を単独で mdx マウスに腹腔内投与したところ、全身の筋細胞の核内に AS-oligo が到達していること、さらに mRNA においてエクソン 19 のスキッピングが誘導されていることが明らかとなった⁸⁾。

神戸大学における治療

以上の結果より、エクソン 20 を欠失した DMD 症例 (10 歳男児) に対するエクソン・スキッピング誘導治療を計画し、倫理委員会で審議され、承認された。AS-oligo は 31 塩基の S 化された DNA であり、アメリカの Proligo 社において合成した。生食に溶解した AS-oligo 0.5 mg/kg を 2 時間かけて週 1 回点滴静注し、これを 4 週間行った。そして治療後の筋組織を解析したところ、mRNA においてエクソン 19 のスキッピングが誘導されており、さらに免疫組織染色にてジストロフィン蛋白が発現していることが明らかとなった。明らかな副作用は認められなかった¹⁾。これは AS-oligo を用いたエクソン・スキッピング誘導治療の有効性を臨床において世界ではじめて明らかにしたものであった。

臨床における世界での取り組み

著者らのエクソン・スキッピング誘導治療の報告に引き続き、2007 年、オランダの Leiden 大学において、AS-oligo 治療の臨床応用が報告された²⁾。著者らの報告とオランダからの報告を合わせて表 1 に示す。オランダから報告されている症例は 10~13 歳の DMD 症例 4 例で、遺伝子欠失は、

表 1 いままでに報告されているジストロフィンに対するAS-oligoによる
エクソン・スキッピング誘導治療の臨床応用^{1,2)}

症例	Takeshima ら (2006)		van Deutekom ら (2007)			
	1		1	2	3	4
年齢(歳)	10		10	13	13	11
欠失エクソン	20		50	48~50	49~50	52
独歩不能年齢(歳)	9		9	11	7	10
AS-oligo 標的エクソン	19				51	
核酸の種類	S-oligo				2-OMePS	
塩基数	31				20	
投与経路	静脈内投与				筋肉内投与	
投与量	0.5 mg/kg w × 4				0.8 mg	
担体	(-)				(-)	
結果	評価の時期	1週間後			4週間後	
	mRNA	エクソン 19 スキッピング			エクソン 51 スキッピング	
蛋白発現	(+)				(+)	
副作用	(-)				(-)	

S-oligo : phosphorothioate oligonucleotide, 2OMePS : 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide.

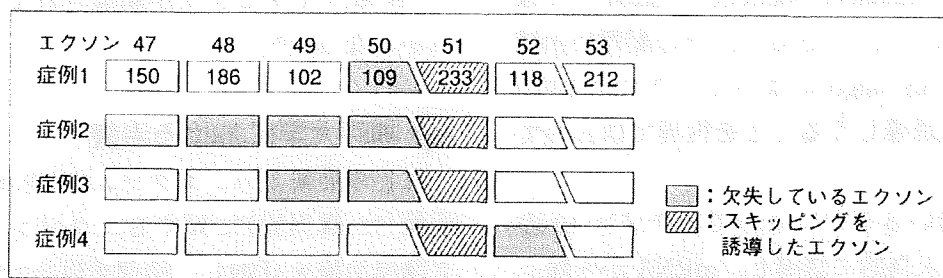


図 2 オランダから報告された4症例の欠失遺伝子およびスキッピングを誘導した遺伝子

四角がエクソンを表し、四角上の数字がエクソンの番号、四角中の数字がエクソンの塩基数を示す。長方形はイン・フレームのエクソンを、斜め四角はアウト・オフ・フレームのエクソンを示す。灰色四角は各症例でみられた欠失エクソンを示し、斜線四角はスキッピングを誘導したエクソン 51 を示す。欠失している灰色四角はいずれの症例においてもアウト・オフ・フレーム欠失であるが、斜線四角(エクソン 51)の欠失が合わるとイン・フレーム欠失になる。症例 4 においても欠失の両端でフレームが合うために、イン・フレーム欠失となる。

表 1 に示すようにエクソン 50 欠失、48-50 欠失、49-50 欠失、52 欠失である。これらの欠失に対するエクソン 51 のスキッピングの誘導を模式的に図 2 に示す。各症例における欠失領域は異なっているが、エクソン 51 のスキッピングが誘導されることによって、アウト・オフ・フレーム欠失からイン・フレーム欠失に修正されることがわかる。これらの症例の前脛骨筋にエクソン 51 に対する AS-oligo の筋注を行ったところ、エクソン 51 のスキッピングが誘導され、さらにジストロフィン蛋白の発現も確認された。この治療法の有効性をさらに明確にするものであった。

表 1 に示すように、著者らが用いた AS-oligo はエクソン 19 のスキッピングを誘導するものであり、van Deutekom らの用いた AS-oligo はエクソン 51 のスキッピングを誘導するものであった。投与経路や用いていた核酸は異なっている。治療を考えるうえでは著者らの行った静脈内投与が実際的である。一方、より有効な核酸に関しては後述するように、今後さらに検討する余地がある。また、投与年齢はいずれも 10 歳以降で、独歩不能になってからであるが、今後はさらに低年齢の症例への投与も検討されると思われる。

いずれの報告においても、何らかの担体を用い

ることなく AS-oligo を投与することによってエクソン・スキッピングを誘導し、ジストロフィン蛋白を発現させることに成功している。また、明らかな副作用は認められていない。今後さらに臨床への応用が進められると考えられる。

将来への展望

臨床的な取組みが進む一方、AS-oligo によるエクソン・スキッピング誘導治療の適応をさらに拡大し、その有効性をさらに高めるための基礎的な検討も多く報告されるようになってきている。van Deutekom らはエクソン 46 内の SES に対する AS-oligo によってエクソンスキッピングを誘導しうることを報告している⁹⁾。その後、他のエクソンにおける AS-oligo によるスキッピングの誘導も、著者らも含め、Aartsma-Rus ら、Wilton らによって報告されている¹⁰⁻¹²⁾。さらに、ひとつのエクソンのスキッピングのみではアウト・オフ・フレーム欠失をイン・フレーム欠失に修復できない欠失変異に対し複数のエクソンをスキップさせ、ジストロフィン蛋白の発現を誘導することも報告されており¹³⁾、エクソン・スキッピング誘導による分子治療の適応はさらに広がりを見せている。

また、著者らのこれまでの検討は、AS-oligo として Phosphorothioate oligonucleotide を用いて行ってきた。また、2'-O-methyl oligonucleotide も従来よりよく用いられているが、近年、より結合力が強く、よりヌクレアーゼに対する耐性の強い人工的な核酸が開発されている。著者らはこのようなあらたに開発された核酸のなかで、2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) に関する検討を進めている。ENA を用いた AS-oligo を用いて筋培養細胞におけるエクソン・スキッピングを検討したところ、従来の S-oligo を用いた場合の 40 倍の効果がみられた¹⁴⁾。また、locked nucleic acid (LNA)¹⁵⁾、phosphorodiamidate morpho-

lino oligomer (PMO)¹⁶⁾、peptide nucleic acid (PNA)¹⁷⁾ など、あらたな化合物による AS-oligo がより有効に作用することが報告されており、今後の臨床における効果が期待されている。

臨床応用における重要な点のひとつに、AS-oligo をいかに筋組織に到達させるか、という点がある。多くの報告で AS-oligo は何らかの担体とともに投与されているが、著者らは、特にそのような担体を用いなくとも AS-oligo が有効に筋ジストロフィーの筋組織に到達することを明らかにしている⁸⁾。生体においてより安全に治療をしていくうえで重要な点である。

文献

- 1) Takeshima, Y. et al. : *Pediatr. Res.*, **59** : 690-694, 2006.
- 2) van Deutekom, J. C. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **357** : 2677-2686, 2007.
- 3) Monaco, A. P. et al. : *Genomics*, **2** : 90-95, 1988.
- 4) Matsuo, M. et al. : *J. Clin. Invest.*, **87** : 2127-2131, 1991.
- 5) Takeshima, Y. et al. : *J. Clin. Invest.*, **95** : 515-520, 1995.
- 6) Pramono, Z. A. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226** : 445-449, 1996.
- 7) Takeshima, Y. et al. : *Brain Dev.*, **23** : 788-790, 2001.
- 8) Takeshima, Y. et al. : *Brain Dev.*, **27** : 488-493, 2005.
- 9) van Deutekom, J. C. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **10** : 1547-1554, 2001.
- 10) Aartsma-Rus, A. et al. : *Neuromuscul. Disord.*, **12** (Suppl. 1) : S71-S77, 2002.
- 11) Surono, A. et al. : *Hum. Gene Ther.*, **15** : 749-757, 2004.
- 12) Wilton, S. D. et al. : *Mol. Ther.*, **15** : 1288-1296, 2007.
- 13) Aartsma-Rus, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **74** : 83-92, 2004.
- 14) Yagi, M. et al. : *Oligonucleotides*, **14** : 33-40, 2004.
- 15) Aartsma-Rus, A. et al. : *Gene Ther.*, **11** : 1391-1398, 2004.
- 16) Fletcher, S. et al. : *Mol. Ther.*, **15** : 1587-1592, 2007.
- 17) Yin, H. Q. Lu, and Wood, M. : *Mol. Ther.*, **16** : 38-45, 2008.

* * *

