

200905019B

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

新規リードスルー惹起物質による

ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 松田 良一

平成22 (2010) 年 5月

はじめに

リードスルー薬物による治療法は、遺伝子が維持されたまま翻訳機構に干渉し、正常機能タンパク質の発現を回復させる試みとして国際的に注目されており、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィンの役割を回復するための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。ベッカー型症例の経験から、正常量の20%に相当するジストロフィンでも筋ジストロフィーの進行を遅延させ、患者様のQOLの向上と延命を図ることができるため、人類福祉への直接的還元として大きく寄与するものと考えられる。

我々は、未承認抗生物質ネガマイシンがマウス骨格筋に対してリードスルー活性を持つことを示してきた。本研究「新規リードスルー惹起物質による筋疾患治療のための前臨床試験」において、以下の研究成果を得たので報告する。

- 1) 新規リードスルー惹起物質#2および#4は、mdxマウスに経口投与することでジストロフィンの蓄積、血清クレアチンキナーゼ活性の低下、筋機能の回復を認めた。SPF施設における単回投与・連続投与/回復毒性試験において良好な結果を得た。
- 2) 新規リードスルー惹起物質#3および#4は培養細胞系において容量依存的かつアタルレンより高いリードスルー活性を示した。また#2はDMD患者由来培養筋細胞においてジストロフィン陽性を認めた。
- 3) 合成ネガマイシン誘導体N3やヒドロキシアミノブチリル誘導体薬剤A、カナマイシン誘導体からもリードスルー惹起作用をもつ化合物を特定した。

本研究実施にあたり、平成19～21年度厚生労働省科学研究費「こころの健康科学研究事業」のご援助をいただいたことに深く感謝いたします。

平成22年5月24日 研究代表者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）
交付総額 68,000千円（直接研究費のみ）

様式A (9)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成22年5月24日

厚生労働大臣 殿

住所 〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

マツダ リョウイチ

研究者 氏名 松田 良一

印

(所属機関 東京大学大学院 総合文化研究科)

平成19年度から実施した厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型
筋疾患治療のための前臨床試験（H19-こころ-020）

国庫補助金精算所要額：金 68,000,000円也（うち間接経費 0円）

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書
4. 研究成果の刊行に関する一覧表
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

目次

I. 総合研究報告

新規リードスルー惹起物質による

ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験

松田良一

.....1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....15

III. 研究成果の刊行物・別刷

.....17

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

新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型筋疾患治療法のための前臨床試験

研究代表者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科 准教授

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質やジペプチド系抗生物質ネガマイシンはリボソームに結合し、点変異により生じた未熟終止コドン（PTC）とrRNAのA部位との結合を阻害することでPTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、機能的な全長タンパク質分子を作らせることが知られている。この性質を応用したリードスルー薬物療法は2,400種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の包括的薬物療法としても有望であることから、遺伝子導入や幹細胞移植に次ぐ第3の革新的な有効かつ迅速な治療法として期待されている。本研究課題の目的は、ナンセンス変異型筋疾患治療のために、PTCを克服するリードスルー促進作用をもつ新薬を提案し、治療戦略を確立することにある。

本研究課題において個体レベルでのリードスルー活性検出系となるトランスジェニックマウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討、モデル動物や患者様由来培養細胞での薬効の検証、SPF施設での単回投与急性毒性試験・連続投与／回復毒性試験を行った。リードスルー薬物治療の臨床応用基盤の確立に向けた基礎的成果として、特許申請中のネガマイシン類似リードスルー惹起低分子化合物5種以外にも合成ネガマイシン誘導体N3やヒドロキシアミノブチリル誘導体薬剤A等数種の薬物候補を特定することが出来た。特に薬物候補#2や#4は急性・亜急性毒性が見られず、mdxマウスへの投与によってジストロフィンの回復や血清クレアチンキナーゼ活性の低下、筋機能改善等を確認し一定の治療効果を認めたことから、患者に負担を掛けない経口薬として有望であることがわかった。

研究分担者

微生物化学研究センター

山田茂（東京大学総合文化研究科准教授）

副センター長

池田大四郎（財団法人微生物化学研究会

高橋良和（財団法人微生物化学研究会

微生物化学研究センター
副センター長)

松尾雅文 (神戸大学医学部小児科 教授)

斎藤加代子 (東京女子医科大学遺伝子医療
センター 所長)

A. 研究目的

mRNAの翻訳中に点変異によって生じたPTCがくると、リボソームは正常の翻訳終止点と同様に認識し、遊離因子の作用によりmRNAを遊離し、タンパク質合成を終了してしまう。したがって機能的全長タンパク質が合成されず、種々の遺伝性疾患が生じる。遺伝性疾患の5~15%はナンセンス変異症例であり、薬物によりPTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、全長タンパク質分子を作らせることができれば、全長タンパク質の合成が回復し症状の改善が期待される。

本研究は、独自のリードスルー活性解析系として、3種のPTCをそれぞれ挿入した β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼのデュアルレポーター遺伝子を組み込んだ3種のREAD (Readthrough Evaluation and Assessment by Dual-reporter) マウス系統を作成し、これらを用いてネガマイシン誘導体や微生物化学研究会所蔵のアミノグリコシド類縁体から新規リードスルー惹起物質を特定することを第一の目的とした。第二に、リードスルー活性を測定することにより構造活性相関を検討し、現在治療に

用いられているゲンタマイシンを凌駕する薬剤を創製するため、リードスルー惹起物質の投与経路や投与量の最適化を行うことで、リードスルー惹起薬物候補のナンセンス変異型筋ジストロフィーに対する治療効果と安全性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

READマウスの確立

リードスルー活性の定量的検出系として、最初の治験対象であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物 (mdxマウス) を用いることは不都合が多い。指標となるジストロフィンが巨大分子 (427KDa) であるためイムノプロットでの転写効率も低く、その存在量は他の筋タンパク質に比べて少ないためである。そこで生体内でのリードスルー活性解析において、薬効評価を定量化かつ効率化する目的で、 β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼ遺伝子を連結し、その繋ぎ目に3種類のPTCを挿入した3種類のコンストラクト (mdxマウスのエクソン23のPTC前後12mer周辺配列を含む27mer) を含む、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーターを有する発現ベクター (pCAGGS) を生殖細胞系列に組み込んだREAD (Readthrough Evaluation and As-

assessment by Dual-reporter) マウス系統を作出した。PTC部位にはOchre, Amber, Opal (TAA, TAG, TGA)をそれぞれ挿入した。作出されたREADマウス全身切片のX-gal染色を行い、発現部位を特定した。

リードスルー惹起物質の探索

in silico三次元データ解析により105万種以上の化合物から選定されたネガマイシンの立体配位形成に適合する類似物質から選定した化合物群、カナマイシン類、ゲンタマイシン類縁体およびこれらに属さない擬二糖アミノグリコシド抗生物質群、合成ネガマイシン誘導體群をREADマウスに一週間連日皮下投与した。大腿部骨格筋組織抽出液のルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性をルミノメータで定量し、リードスルー活性をルシフェラーゼ活性/ β -ガラクトシダーゼ活性として算出した。リードスルー活性が認められた物質について、その投与方法を検討した。また新たなリードスルー惹起物質候補を得るため、ネガマイシン分子中に含まれる多くのヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素による電子授受に着目したin silico探索を試みた。

モデル動物を用いたリードスルー惹起物質の効果検討

特定したリードスルー惹起薬物候補に関し、薬効やその投与方法、亜急性毒性をデュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデル動物であるmdxマウスを用いて検討した。ジストロフィンタンパク質の蓄積や血清クレアチンキナーゼ活性測定による生化学的臨床指標を用いた解析と同時に、自発運動量、握力、等尺性収縮張力、単収縮張力測定、強収縮張力、疲労度を指標に機能回復について検討した。

自発的運動量測定

回転車輪のついた運動ケージ(シナノ製作所)に1匹毎入れて3日間予備飼育(自発的運動は行わせない)した後、自発的運動を開始させた。mdxマウスの野生型系統であるC57BL/10ScSnマウスを対照マウスとした。

握力測定

小動物用の握力測定装置を参考にして市販のフォースゲージ(日本計測システム株式会社)に縦70 mm, 横55 mmのステンレス製の金網を取り付けたものを作製した。このフォースゲージは、精度 $\pm 0.2\%$ FS, 繰返し精度: $\pm 0.1\%$ FS, 最大100N(10kgf)測定可能で、0.01 N

(1gf) の1/10000分解能力をもち、ピーク測定が可能である。マウスの握力測定は以下の通りである。マウスを測定用の網の上に置き、尾を手で水平に引いた時、動物が引かれた力に耐え切れず掴んだ網を離してしまうまでの最大の力（握力）を測定する。実際の握力測定は、2分間のインターバルを挟みながら、5回測定を行い、その平均値を算出した。なお、測定された握力は体重で除することにより標準化した。

等尺性収縮張力測定

等尺性収縮による張力測定は、パーソナルコンピューター、AD/DAコンバーター、電極、フォースゲージにより構成される等尺性収縮張力測定システムにより行った。ネンブタール麻酔下でマウス下腿三頭筋を剖出し、下腿三頭筋の長さを測定した。次に、アキレス腱を踵骨部で切り離して木綿糸で縛り、フォースゲージに装着した。同時に電気刺激用の白金電極1本を膝の位置に挿入し診断用神経筋電気刺激装置（日本光電工業株式会社）により電気刺激を行った。測定に際し、最大等尺性収縮張力が得られるように筋長や刺激電圧量を調整した。等尺性収縮張力は、筋横断面積（筋重量、筋長、密度 $1.06\text{mg}/\text{mm}^3$ より算出）により標準化した。

なお、下腿三頭筋表面の乾燥を防ぐために、表面を生理食塩水で塗布した。

単収縮張力測定

単発電気刺激で発生した、単収縮張力が最大になるように、刺激電圧の大きさ（0～20V）と筋長を調節した。なお、筋長の測定はマイクロメーターで行った。

強収縮張力測定

最大単収縮張力を示す刺激電圧（0.5ms幅の短矩形波）の大きさと筋の長さで、振動数80～100Hz、200msバーストで行った。なお、発揮張力は、筋横断面積（筋重量、筋長、密度 $1.06\text{mg}\cdot\text{mm}^{-3}$ より算出）により標準化した。

筋疲労/回復力測定

筋疲労測定は、強収縮力測定条件で、刺激バーストを繰り返して行った（例えば150回の繰り返し）。筋回復力測定は、筋疲労測定後、安静時間を挟んだのち再び筋疲労測定を行い、収縮張力の回復の割合を求めた。

患者様由来培養細胞を用いたリードスルー惹起物質の効果検討

神戸大学小児科を受診したDMD患者のジストロフィン遺伝子異常の解析を行った。

まず Multiplex ligation probe amplification (MLPA) 法にてエクソン単位の比較的大きな遺伝子の異常をスクリーニングし、欠失・重複変異の検出を図った。このMLPAで変異が発見できなかった症例について、ジストロフィンmRNAの解析を行った。

ジストロフィンmRNAの解析はリンパ球か筋生検で行った筋組織のRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAに変換して行った。ジストロフィンcDNAの全長を10領域に分割し、それぞれをPCR増幅し、直接シーケンス法で塩基配列を解析した。

また、ナンセンス変異により2次的に生じたスプライシングの異常の解析は、ナンセンス変異を有するエクソンを中心に両側の2~3個のエクソンを含んだ領域をPCR増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定することにより解析した。

ジストロフィン遺伝子にTGAのナンセンス変異を有する、神戸大学小児科を受診中のDuchenne型筋ジストロフィー患者(KUCG****)から、筋生検によりえた筋組織を用いて培養筋細胞株を樹立した。そして、この培養筋細胞株を分化誘導培地に変更し、さらにこの培養液にリードスルー作用を有するコンパウンド2を添加した。添加後培養を24時間続けた後に以下の検討を行った。ジストロフィンモノク

ローナル抗体を用いてジストロフィンを免疫染色してジストロフィン発現を解析した。同時にデスミン染色も行い筋細胞を検出した。そして、両染色結果の図を重ね合わせ、筋細胞特異的に発現するジストロフィンを同定した。

DMDの確定診断のための筋生検の施行に当たって、インフォームド・コンセントを得て、DMD患者の骨格筋の培養系を樹立し、dystrophin遺伝子exon60におけるTGA型未熟終止コドンを持つDMD患者由来筋細胞(125M)を用いた。正常対照は、human skeletal muscle myoblast (HSMM: Lonza社)を用いた。#2の最適濃度、細胞接着と増殖、dystrophinの発現と筋分化について観察し、蛍光抗体法により細胞を免疫学的に検討した。増殖培地としてSkGM-2 (GM: Lonza社) を用いて培養を行った。細胞はそれぞれ 1×10^4 cells/cm²になるようにMatri-gel (BD Biosciences社) を薄層コートしたcollagen I-coated dish (IWAKI社)に播種した。播種後1日目にGM培地交換を行い、細胞が70-80%confluentになり使用した。分化培地(differentiation medium (DM); DMEM F12 + 2% horse serum + penicillin, streptomycin, amphotericin B)に#2を0, 50, 100, 250, 500 μ g/mlとなる

よう調製し投与した。分化12日目における dystrophin (Abcam社)と myosin (MF20)の発現を蛍光抗体染色にて検出した。なお、東京女子医科大学の倫理委員会の審査承認を受けて実施された。この培養細胞を用いて生化学的・免疫組織化学的に薬効を評価した。

リードスルー惹起物質の安全性試験

投与実験は全て微生物化学研究センター沼津創薬医科学研究所内のSPF飼育施設内において実施した。4週齢ICRマウス（♀、日本チャールズリバー）に最終濃度500, 250, 125, 62.5, 31.5, 0mg/kgとなるよう生理食塩水で溶解したリードスルー惹起物質を静脈内、皮下、腹腔内および強制胃内へ単回投与した。経過観察、胸腺・心臓・肺・脾臓・腎臓の臓器重量測定と解剖所見から急性毒性を検討した。同様に、静脈内／腹腔内連続投与を行い、投与期間中（2週間）と投与後（3週間）の経過観察と体重測定、解剖所見と臓器重量測定（胸腺、心臓、肺、脾臓および腎臓）、血清の生化学分析（22項目；総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、乳酸脱水素酵

素、アミラーゼ、クレアチンキナーゼ、γ-グルタミルトランスペプチターゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、グルコース）から、重急性毒性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究課題の解決に当たっては、動物実験が必要不可欠かつ唯一の手段であったため動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験を実施した。

「動物の愛護及び管理に関する法律（改正動物愛護管理法、平成18年6月施行）」と「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（飼養保管基準、平成18年4月環境省告示第88号）」の規定を踏まえ策定された「東京大学動物実験マニュアル」に準拠し、東京大学大学院に設置された動物実験委員会と組み替えDNA実験委員会の指針に従い、承認を得て行われたものである。具体的に目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減等を徹底し適切に利用することに配慮した。そのため、実験実施者の教育訓練等を通じて、安全確保及び健康保持、自主管理とその情

報公開を行い、施設及び設備における実験動物の飼養・保管・輸送についても必要な方法で適切に維持管理し、適正な動物実験が実施されることに相当の注意を払い監督した。倫理的・法的・社会的問題に関わる全ての指針を遵守することで、研究が適正に推進されるよう十分に配慮した。

C. 研究結果

READマウスの確立

本研究で作出したデュアルレポーターREADマウスは、正常時は β -ガラクトシダーゼのみが発現しPTCをリードスルーすることでルシフェラーゼを発現するため摘出した組織抽出液から β ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性をルシフェリン-ガラクトシダーゼとルシフェリンを用いてルミノメータにより測定することで生体内の定量的かつ効率的な薬効評価が可能である。このREADマウス全身切片のX-gal染色から、横隔膜を含む骨格筋や心筋での強い発現を確認した。

リードスルー惹起物質の探索

ネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物群から、現在までに5種の新規リードスルー惹起化合物を特定した。特定した低分子リードスルー惹起薬物候補（#2, #3, #4）は、これまでにリードスルーを

惹起することが知られているゲンタマイシンやネガマイシンよりもその効率が高く、濃度依存的な活性をもつことが確認された。また#2と#4は皮下注射だけでなく内服によってもその活性を示した。

READマウスと同様のデュアルレポーターコンストラクトをHeLa細胞に一過的に導入し、培養液に#3あるいは#4を加えて48時間培養し、それらのリードスルー活性を測定したところ、用量依存的なリードスルー活性を示した。

ネガマイシン誘導体25種を合成し評価したところ、ゲンタマイシンと同程度の活性をもつN3を特定した。

微生物二次代謝産物として単離された疑似二糖類IMC2970, IMC2974, AG-402, AG-501, AG-502の5種について、ゲンタマイシンと同程度のリードスルー活性をもつことを確認した。またネガマイシンの化学構造に立脚したバーチャルスクリーニングにより得られた300種の化合物から、50種の化合物を選定し生物活性を調べたところ、顕著な抗菌活性を示すVS32がゲンタマイシンと同程度のリードスルー活性を示した。

アミノグリコシド系抗生物質群についても、1) 擬二糖類の一部がゲンタマイシンと比較して良好なリードスルー活性を示すこと、2) 4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基

で修飾されたアミノグリコシド類の中にゲンタマイシンと同等以上のリードスルー活性を示す物質が存在すること、3) カナマイシン群にもリードスルー活性が見られること、4) 抗菌活性、毒性とリードスルー活性とは必ずしも相関しないこと、等が明らかになった。更に、抗菌活性を維持し且つその毒性を軽減させるべく微生物化学研究会において誘導体研究がなされたカナマイシン類化合物群の含フッ素誘導体およびヒドロキシアミノブチリル誘導体に顕著なリードスルー活性を見出した。

モデル動物や患者由来培養細胞を用いた リードスルー惹起物質の効果検討

#2を経口胃ゾンデを用いmdxマウスに2週間連日強制胃内投与した結果、血清クレアチンキナーゼ活性の低下と免疫染色によるジストロフィンタンパク質の蓄積を確認した。自発的運動量・握力・等尺性収縮張力を測定することにより、#2の皮下/強制胃内投与による筋力の回復を評価したところ、対照マウスとほぼ同等のレベルまでの回復傾向が見られ、飼育ケージ内での活動量や情動行動に特に異常は認められなかった。

またナンセンス変異型DMD患者由来培養細胞に#2を投与したところ、ジストロフィンの発現が僅かに促進されることがウエス

タンブロットにより確認された（神戸大）。同様に#2処理した患者由来培養細胞において、50, 100ug/mLの濃度でジストロフィン陽性の免疫染色像が得られ、筋分化の指標であるfusion index ならびにdystrophin:myosin ratioの比較においても、#2による筋分化、dystrophin発現ともに増加を認めた（東京女子医大）。

#3あるいは#4、ネガマイシン誘導体N3のmdxマウスへの皮下投与(1mgを3~4週間連日)により、16~18%の筋線維においてジストロフィンタンパク質の蓄積を認めた。血清クレアチンキナーゼ活性が未投与mdxマウスのそれに比べ有意に低下した。

ヒドロキシアミノブチリル誘導体薬剤Aのmdxマウスへの腹腔内投与（2.5mgを3~4週間連日）により、ジストロフィンタンパク質の蓄積、血清クレアチンキナーゼ活性の低下、握力・等尺性収縮張力・単収縮張力・強縮張力・疲労度といった筋機能の回復を確認した。

リードスルー惹起物質の安全性試験

SPF施設における#2の単回・反復投与/回復安全性試験では、500mg/kgのマウス静脈内単回投与において肝臓と脾臓の肥大が観察されたが、体重・臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析、聴性脳幹反

応による聴力検査においても特に異常は観察されなかった。

コンベンショナル施設における#3の反復投与 (50mg/kg) において、PBS投与の対照マウスに比べ体重変化や血清生化学検査では異常は認められなかった。

SPF施設における#4の単回投与安全性試験では、500mg/kgの濃度まで腹腔内、皮下および強制胃内投与において問題は無く、反復投与/回復安全性試験では、臓器に試料不溶物の沈着が見られた以外は250mg/kgの濃度まで体重・臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析において異常はみられなかった。

D. 考察

生体内でのリードスルー活性の薬効評価を効率化する解析系として、PTC (TAA, TAG, TGA) をそれぞれ挿入した3種のデュアルレポーターREADマウスを保有しており、これらを用いて、三次元データ解析により105万種以上から特定したネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物から5種の新規リードスルー惹起化合物を特定した。これら5種の新規リードスルー惹起物質とリードスルー解析系となるREADマウスについてはPCTに基づく国際特許出願中である (PCT/JP2007/063436)。これらは今後の創薬研究に貢献し、その技術

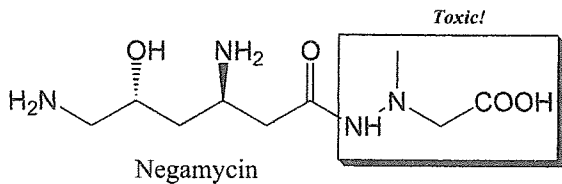
開発に提供しうる強力な知的財産となる。

特に#2 (分子量: 174) および#4 (分子量: 217) はゲンタマイシンやネガマイシンよりもリードスルー効率と安全性が高く濃度依存的な活性をもち経口投与可能である。またmdxマウスを用いた解析においてもジストロフィンタンパク質の蓄積やクレアチンキナーゼ活性の低下を認めている。更に握力や等尺性収縮による張力、筋疲労耐性いずれも回復傾向が認められた。これは、リードスルー惹起物質が、ジストロフィンタンパク質の発現を誘導することにより日常活動での筋収縮による筋損傷を軽減し、過剰な炎症反応が抑制され、正常な筋線維が多数存在しているからと推測される。このことは、リードスルー惹起物質を投与されたmdxマウスの筋線維径に大小不同が比較的少なく、結合組織量も少ない傾向が認められる結果と一致する。

#3 (分子量: 274) および#4は、リードスルー検出コンストラクトを導入したHeLa細胞の培養系でAtaluren (旧名PTC124, 分子量: 284) よりも高いリードスルー活性を示し、ヒト由来細胞においても活性を示すことが確認された。

ネガマイシンのバーチャルスクリーニングにより得られたVS32や合成ネガマイシン誘導体N3、ヒドロキシアミノブチリル誘導体薬剤Aの構造は、毒性を回避する新しい

ネガマイシン誘導体創製の可能性を示した。



This hydrazino acetic acid portion should be changed to another functional group.

The results of the *Virtual Screening* is used for further derivatization.

New Negamycin

E. 結論

リードスルー活性検出系となるREADマウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討、モデル動物での薬効検証、SPF施設での安全性試験を行った結果、特許申請中のネガマイシン類似リードスルー惹起低分子化合物5種以外に合成ネガマイシン誘導体N3やヒドロキシアミノブチリル誘導体薬剤A等数種の薬物候補を特定することが出来た。更なる構造活性相関研究を実施することで、より臨床現場に近い薬物候補の提案が期待できる。特に薬物候補#2と#4は急性・亜急性毒性が見られず、mdxマウスへの投与によってジストロフィンの回復や血

清クレアチンキナーゼ活性の低下、筋機能改善等を確認し一定の治療効果が認められたことから、患者に負担を掛けない経口薬として有望であることがわかった。

本研究は臨床応用基盤の確立に向けた基礎的成果を挙げ、その達成度は8割程度と考える。リードスルー薬物による治療は、ナンセンス変異型遺伝性筋疾患において筋細胞膜でのジストロフィンの機能を回復するための有効且つ迅速な選択肢である。リードスルー惹起薬物はナンセンス変異の種類とその周辺配列に対する特異性や副作用が異なることが知られており、候補物質は数多く存在した方が患者にとって有利と考えられるため、今後、特定した薬物候補の安全性試験を含む有効性についての詳細な検討を進めながらリードスルー惹起薬物候補物質を可能な限り増やすつもりである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Shiozuka M, Hatin I, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, and Guicheney P Antibiotic-mediated readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of

laminin 2 chain mRNA in congenital muscular dystrophy myotubes. *J. Gene Med.*, 10: 217-224 (2008)

Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnes MO, Hashimoto D, Hasegawa J, Katoh T, Kajimoto T, Shiozuka M, Matsuda R, Noda M, and Kiso Y. Efficient total synthesis of (+)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem. Comm.* 20: 2379-81 (2008)

Shima A and Matsuda R, The Expression of Myogenin, but Not of MyoD, is Temperature-Sensitive in Mouse Skeletal Muscle Cells., *Zool. Sci.* 25 : 1066-1074 (2008)

Kikkawa N, Ohno T, Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, and Matsuda R. Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. *Cell Struc. Func.*, 34: 77-88 (2009)

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new

approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J. Biochem.* 147: 463-470 (2010)

塩塚政孝, 松田良一 ナンセンスコドンを読み飛ばせ *遺伝* 61: 10-12 (2007)

松田良一, 塩塚政孝 リードスルー療法の最前線, *医学の歩み* 226: 397-401 (2008)

松田良一, 抗生物質とエキソン・スキップによる筋ジストロフィーの治療, *メディカルバイオ* 5: 26-31 (2008)

塩塚政孝, 我妻玲, 松田良一, 筋ジストロフィーの薬物治療 -リードスルー薬物による挑戦-, *小児科診療* 72: 763 (2009)

2. 学会発表

Shiozuka M, Arakawa M, Takahashi Y, Ikeda D, Nonomura Y, and Matsuda R. Pharmacological suppression of nonsense mutations by orally administered novel drug candidates. FASEB Summer Research Conference 5th "Muscle satellite and stem cells" (2007)

Shima A and Matsuda R. Expression of Myogenin, but Not of MyoD, Is Temperature-sensitive in Mouse Skeletal Muscles. *The American*

- Society for Cell Biology 46th Annual Meeting (2007)
- Kikkawa N, Shiozuka M, and Matsuda R. Ectopic calcification in mdx mouse skeletal muscle IV. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting (2007)
- 塩塚政孝, 荒川正行, 高橋良和, 池田大四郎, 野々村禎昭, 松田良一 ナンセンスコドンの無効化を誘発する分子によるmdxマウスのジストロフィン発現回復 日本動物学会第78回大会 (2007)
- 島亜衣, 松田良一 筋分化制御因子 myogeninの温度依存的発現 日本動物学会第78回大会 (2007)
- 吉川奈美子, 松田良一 mdxマウス骨格筋の異所的石灰化4 日本動物学会第78回大会 (2007)
- 長田洋輔, 松田良一 スフィンゴ脂質によって媒介される筋衛星細胞活性化の制御機構 日本動物学会第78回大会 (2007)
- 林良雄, 西口茂信, 橋本大佑, Magne O Sidnes, Thomas Regner, 長谷川純也, 加藤哲也, 塩塚政孝, 松田良一, 野出学, 木曾良明 Duchenne型ジストロフィー治療薬を目指したネガマイシンおよびその誘導体の合成研究 第44回ペプチド討論会 (2007)
- 島亜衣, 松田良一 筋分化制御因子 myogeninの温度依存的発現 日本動物学会関東支部大会 (2008)
- Shima A and Matsuda R, Expression of myogenin, but not of MyoD, is temperature-sensitive in mouse skeletal muscles. 第41回日本発生生物学会 (2008)
- 島亜衣, 松田良一, マウス骨格筋における温度依存性分化制御機構, 日本動物学会第79回大会 (2008)
- 塩塚政孝, 川本忠文, 我妻玲, 嶋田健一, 佐々木博之, 野々村禎昭, 松田良一, ナンセンス変異を無効化する経皮的薬剤投与の評価, 日本動物学会第79回大会 (2008)
- 島亜衣, 松田良一, マウス骨格筋における温度依存性分化制御機構, 東京大学生命科学ネットワークシンポジウム (2008)
- Shiozuka M, Kawamoto T, Wagatsuma A, Sasaki H, Nonomura Y, and Matsuda R, Readthrough-inducing ointment: the new approach for the treatment of genetic disorders caused by nonsense mutations., The 3rd New directions in biology and disease of skeletal muscle meeting (2008)

塩塚政孝, 我妻玲, 松田良一, 筋ジストロフィーの薬物治療ーリードスルー薬物による挑戦ー, 第25回小児神経筋疾患懇話会 (2008)

Shima A and Matsuda R, Mouse skeletal muscle differentiation is controlled in a temperature-dependent manner., The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting (2008)

Shiozuka M, Kawamoto T, Wagatsuma A, Shimada K, Sasaki H, Nonomura Y and Matsuda R, Readthrough-inducing ointment: the new approach for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders., The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting (2008)

Shima A and Matsuda R, Low temperature-induced inhibition of myogenic differentiation is cancelled by IGF-I and vitamin C. 14th International Congress of the World Muscle Society (2009)

島垂衣, 松田良一, IGF-IとビタミンCは低温におけるマウス骨格筋細胞の分化を回復させる, 日本動物学会第80回大会 (2009)

吉川奈美子, 大野智久, 長田洋輔, 塩塚政孝, 松田良一, 高濃度リン酸培養は骨格筋細胞に骨分化を誘導する, 日本動物学会第80回大会 (2009)

長田洋輔, 本田悠介, 松田良一, 筋衛星細胞のモデルであるリザーブ細胞培養系を用いた筋衛星細胞活性化の研究, 日本動物学会第80回大会 (2009)

島垂衣, ER Burton, HL Sweeney, 松田良一, ビタミンCとIGF-Iは低温におけるマウス骨格筋細胞分化を回復させる, 第32回日本分子生物学会 (2009)

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting (2009)

吉川奈美子, 松田良一, 小暮敏博, 塩塚政孝, Mdxマウス骨格筋の異所的石灰化, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

島垂衣, ER Burton, HL Sweeney, 松田良一, ビタミンCとIGF-Iは低温におけるマウス骨格筋細胞分化を回復させる, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

塩塚政孝，我妻玲，川本忠文，佐々木博
之，野々村禎昭，松田良一，皮膚外用剤
を用いたナンセンス変異型遺伝性疾患の
新しい治療法，東京大学生命科学シンポ
ジウム（2010）

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

「ナンセンス変異型疾患の治療方法」

PCT出願（PCT/JP2007/063436）

「リードスルー誘導剤，及びナンセンス変
異型遺伝性疾患治療薬」特願2010-021817

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of non-sense mutation-mediated disorders. *J. Biochem.* 147: 463-470 (2010)

Kikkawa N, Ohno T, Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, and Matsuda R. Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. *Cell Struc. Func.*, 34: 77-88 (2009)

塩塚政孝, 我妻玲, 松田良二, 筋ジストロフィーの薬物治療 -リードスルー薬物による挑戦-, *小児科診療* 72: 763 (2009)

Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Shiozuka M, Hatin I, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, and Guicheney P Antibiotic-mediated readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin 2 chain mRNA in congenital muscular dystrophy myotubes. *J. Gene Med.* 10: 217-224 (2008)

Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnés MO, Hashimoto D, Hasegawa J, Katoh T, Kajimoto T, Shiozuka M, Matsuda R, Noda M, and Kiso Y. Efficient total synthesis of (+)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem. Comm.* 20: 2379-81 (2008)

Shima A and Matsuda R, The Expression of Myogenin, but Not of MyoD, is Temperature-Sensitive in Mouse Skeletal Muscle Cells., *Zool. Sci.* 25 : 1066-1074 (2008)

松田良一, 塩塚政孝 リードスルー療法の最前線, 医学の歩み 226: 397-401 (2008)

松田良一 抗生物質とエキソン・スキップによる筋ジストロフィーの治療, メディカルバイオ 5: 26-31 (2008)

塩塚政孝, 松田良一 ナンセンスコドンを読み飛ばせ, 遺伝 61: 10-12 (2007)