

- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174: 677–687
- Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58: 823–831
- Macqueen DJ, Robb D, Johnston IA (2007) Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Exp Biol* 210: 2781–2794
- Maltby V, Somaiya A, French NA, Stickland NC (2004) In ovo temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. *Br Poult Sci* 45: 491–498
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493–495
- Melnikova IN, Bounpheng M, Schatterman GC, Gilliam D, Christy BA (1999) Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp Cell Res* 247: 94–104
- Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y (1993) Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364: 532–535
- Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, Matsuda R (2006) Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J Histochem Cytochem* 54: 375–384
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya M, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Soudi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8: 278–284
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8721–8726
- Riechmann V, van Crüchten I, Sablitzky F (1994) The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res* 22: 749–755
- Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ (2006) MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* 175: 77–85
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71: 383–390
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351–1359
- Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Flanders KC, Ohnishi Y, Nakajima Y, Muragaki Y, Ooshima A (2006) Adenoviral gene transfer of BMP-7, Id2, or Id3 suppresses injury-induced epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C282–289
- Saitoh O, Periasamy M, Kan M, Matsuda R (1992) cis-4-Hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression. *Exp Cell Res* 200: 70–76
- Sakuma K, Nakao R, Aoi W, Inashima S, Fujikawa T, Hirata M, Sano M, Yasuhara M (2005) Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta Neuropathol* 110: 269–280
- Schultz E, Gibson MC, Champion T (1978) Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 206: 451–456
- Shi L, Zhao G, Qiu D, Godfrey WR, Vogel H, Rando TA, Hu H, Kao PN (2005) NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *J Biol Chem* 280: 18981–18989
- Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M (2007) Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 27: 1566–1575
- Snow MH (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188: 201–217
- Sun XH, Baltimore D (1991) An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64: 459–470
- Sun L, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL (2007) E2A protein degradation by the ubiquitin-proteasome system is stage-dependent during muscle differentiation. *Oncogene* 26: 441–448
- Temple GK, Cole NJ, Johnston IA (2001) Embryonic temperature and the relative timing of muscle-specific genes during development in herring (*Clupea harengus* L.). *J Exp Biol* 204: 3629–3637
- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25: 1804–1815
- Uehara K, Goto K, Kobayashi T, Kojima A, Akema T, Sugiura T, Yamada S, Ohira Y, Yoshioka T, Aoki H (2004) Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol* 54: 263–271
- Vandenburgh HH, Hatfaludy S, Karlisch P, Shansky J (1991) Mechanically induced alterations in cultured skeletal muscle growth. *J Biomech* 24: 91–99
- Xie SQ, Mason PS, Wilkes D, Goldspink G, Fauconneau B, Stickland NC (2001) Lower environmental temperature delays and prolongs myogenic regulatory factor expression and muscle differentiation in rainbow trout (*Onchrhynchus mykiss*) embryos. *Differentiation* 68: 106–114
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 164: 588–603
- Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725–727
- Zammit P, Beauchamp J (2001) The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68: 193–204

(Received June 23, 2008 / Accepted August 4, 2008)

引き続きアスコルビン酸内服治療を開始したが副作用発現はなく、現在経過観察中である。今後1カ月、3カ月、6カ月時点でのCMT scoreと電気生理検査評価を行い、本治療法の最終的な効果判定を行う。

結論 アスコルビン酸内服当初は副作用の発現などの有害事象なく、20 mg/kg/日では安全に投与することができる。今後、経時的な評価を行い適正内服量を確立する。

第50回日本小児神経学会総会(平成20年、東京)P-008、
脳と発達40巻(総会号)S-276にて発表

第三部：新たな筋ジストロフィー治療戦略

鍼通電刺激によるミオスタチン発現抑制と筋ジストロフィー治療の可能性

高岡 裕

神戸大学大学院医学研究科ゲノム医療実践講座・
応用ゲノム科学研究室

鍼治療とは、わが国の伝統医学である東洋医学の治療法であり、生薬を用いた漢方治療と一対をなしている。その特徴は、「氣」という単一概念で総体的に生命現象をとらえることである。他方、ゲノム解析の進展は、分子レベルで総体的に生命現象を俯瞰可能にした。人間が作った概念という点で「氣」と「遺伝子」は類似しているが、「氣」は実態が不明確な認識の産物である。

そこでわれわれは、鍼治療の科学的根拠を明らかにするために、鍼治療のうち鍼通電刺激療法を対象に、マウスを用いた動物実験系で解析してきた。本講演では、鍼通電刺激した骨格筋のトランスクリプトーム解析結果から、①骨格筋に及ぼす鍼通電刺激の影響、②ミオスタチン

遺伝子発現の抑制効果、③鍼通電刺激の作用機序の仮説、を紹介する。そして、④麻用性筋萎縮マウスモデルでの鍼通電刺激の筋萎縮抑制効果を報告し、疾患治療などへの応用の可能性について考察したい。

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

塩塚 政孝 我妻 玲
松田 良一

東京大学大学院総合文化研究科

われわれはナンセンス変異型遺伝性筋疾患を克服するために、未熟終止コドンを読み飛ばす(リードスルー)薬物候補および、その薬物送達について検討している。独自に開発したリードスルー検出系のトランスジェニックマウスやDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)の疾患モデルであるmdxマウスを用い、これまでにシベプチド系抗生物質ネガマイシンやネガマイシンの三次元構造類似分子、ネガマイシン誘導体、未承認アミノグリコシドから新規リードスルー惹起薬物候補を数種特定している。その中には、ゲンタマイシンやネガマイシンよりもその効率が強く濃度依存的な活性をもち、経口投与可能であるうえ、安全性も高く、mdxマウスやDMD患者様由来培養細胞を用いた生化学的・免疫組織化学的解析結果も良好で薬物候補として有望な物質が含まれている。また、経皮吸収促進剤を用いることで皮下投与と同等のリードスルー活性を認める経皮吸収型薬物送達法を開発した。



ナンセンスコドンを読み飛ばせ

★[Nature誌2007年5月3日掲載記事を読む]

点変異により1つの塩基が置換し、本来の翻訳終結部位より上流に未熟終止コドン (premature termination codon) を生じ、その結果、分子量が小さいタンパク質が作られて細胞機能に重大な支障をきたすことがある。このようなナンセンス変異による遺伝性疾患は単一遺伝性疾患の5～15%程度 (多いものでは70%) を占めるといわれている。近年、このナンセンス変異型遺伝性疾患を克服するために未熟終止コドンを読み飛ばす治療法 (リードスルー療法 (readthrough therapy)) の研究が進んできた。

未熟終止コドンのリードスルー

原核細胞において、アミノグリコシドはrRNAの構造変化を引き起こし、mRNA上の未熟終止コドンとrRNAのA部位との結合を阻害する。その結果、未熟終止コドンを読み飛ばして翻訳を続行させることが知られていた。これを真核細胞で起こさせ、遺伝性疾患の治療可能性を示したのは、米国のBedwellらである。嚔胞性線維症の原因遺伝子にナンセンス変異をもつHeLa細胞や気管上皮細胞に対し、ゲンタマイシンやG418といったアミノグリコシド系抗菌物質の投与により、

正常遺伝子産物を発現させたという報告であった¹⁾²⁾。未熟終止コドンのリードスルーによって機能的な全長タンパク質が合成されるのである (図1)。

これらの研究成果の後、1999年米国のLee Sweeneyらはデュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物であるmdxマウスにゲンタマイシン (図2A) を投与し、リードスルーさせることにより、筋組織内に正常マウスの20%程度のジストロフィンの蓄積および筋力の上昇を認めた³⁾。しかし、ゲンタマイシンの血中濃度の安全域は狭く、聴覚毒性や腎毒性などの重篤な副作用を有するので、遺伝性疾患の治療薬として長期間ヒトに投与することは危険であるため、臨床的実用化には至っていない。

ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有し、機能的なジストロフィンを合成できず、筋変性を起こすマウス。

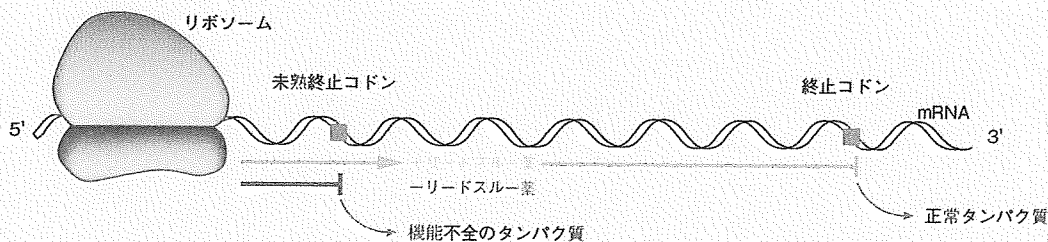


図1 リードスルーの概念



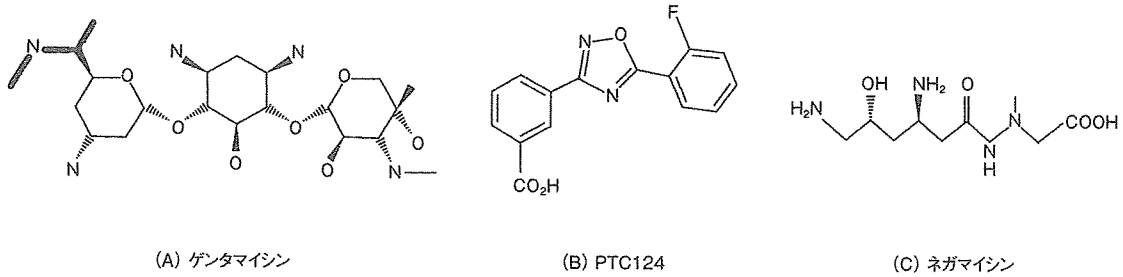


図2 ゲンタマイシン, PTC124, ネガマイシンの構造

ナンセンス変異型遺伝性疾患の治療薬としての新規物質

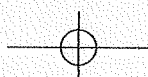
2007年Lee Sweeneyらは、リードスルー活性が高くリードスルー療法薬として有望な新規物質PTC124を*Nature*誌に発表した。このPTC124 (図2B)は、80万種の低分子化合物群から特定された分子で、毒性はほとんど認められず、しかも経口投与でも効果が認められる優れたリードスルー物質である。ナンセンス変異を含むレポーター細胞によって検出されたリードスルー活性は、濃度とコドンの種類 (UGA, UAG, UAA) に依存し、処理後20時間での最大活性はUGAに対して12倍、UAGには4倍、UAAには2倍であった。またゲンタマイシン有効濃度の100~1,000倍薄い濃度においても有意なリードスルー効果を示した。デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者およびmdxマウス由来の培養筋細胞をPTC124で処理したところ、それぞれ正常の40~60%、35%の回復をジストロフィン免疫染色から確認し、mdxマウスへの4週間の経口投与でも機能的な筋強度の修復、筋変性の保護、血清クレアチンキナーゼ活性の低下、筋組織内におけるジストロフィンの蓄積を認めた。さらに、彼らはレポーター細胞を用いた解析から、PTC124は未熟終止コドンの特異的に認識し、正常な終止コドンにおいてはリードスルーを誘起しないことを示唆する結果を報告した。

リードスルー薬の可能性

今回発表されたPTC124は、米国において健常人を対象とした第I相臨床試験において安全性が確認され⁵⁾、現在、ナンセンス変異を有するデュシェンヌ型筋ジストロフィーと嚢胞性線維症の患者を対象に、用量依存的な薬理効果を調べる第II相臨床試験が行われている。中間評価ですでに薬理効果を見出しているが、確実な治療効果を得るために、より高用量での試験が行われている。

一方、筆者らはゲンタマイシンより毒性が低いジペプチド系抗菌物質ネガマイシン (図2C) が、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや先天性筋ジストロフィーのモデル系においても高いリードスルー活性を有することを報告してきた⁶⁾⁷⁾(図3)。さらにネガマイシンと類似した構造をもつ分子群からリードスルー惹起物質を探索したところ、リードスルー活性が高く、安全性の高い新規物質を特定している。この分子の構造はPTC124

筋中に多量に存在する酵素。筋細胞の崩壊や筋細胞膜の透過性が亢進すると血中に漏出する。筋ジストロフィーの臨床的診断マーカーになっている。



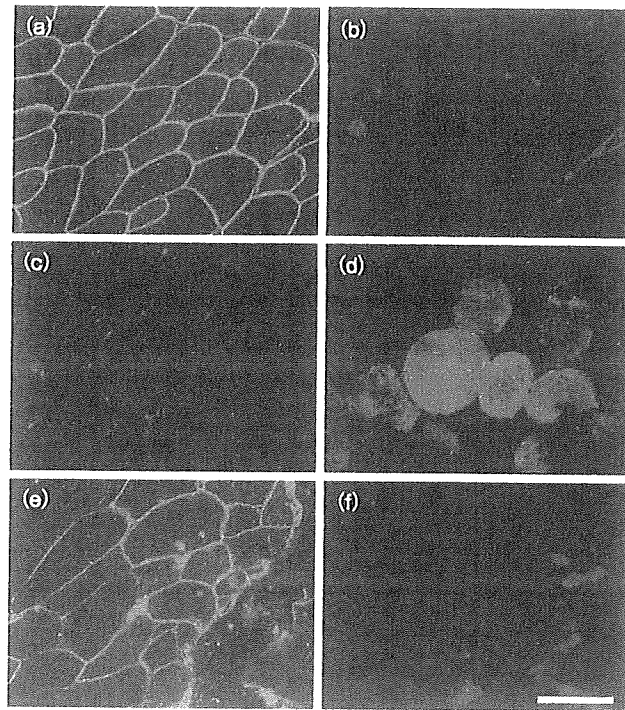
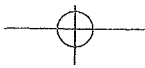


図3

とはまったく異なり、抗菌活性はなく、経口投与でも活性を示すことから、PTC124と同様に有望なリードスルー薬物候補であると考えている。

正常遺伝子の導入による遺伝子治療は、ベクターの安全性や導入効率などに問題があり、本格的な実用には至っていない。一方、ナンセンス変異症例は多くの遺伝性疾患に認められる。せめてナンセンス変異型遺伝性疾患やP53のナンセンス変異による癌だけでも薬物治療を可能にしたい。リードスルー活性は未熟終止コドンの種類や周辺塩基配列に影響を受け、薬物ごとに異なる傾向がある。リードスルー療法の確立のためには、リードスルー活性が高く、毒性が低い薬物分子をより多く特定するため、探索をさらに続けていく必要がある。遺伝性疾患が飲み薬で治せれば素晴らしいではないか！

[引用文献]

- 1) Howard, M. T., Frizzell, R. A. & Bedwell, D. M. *Nat. Med.*, **2**, 467-469 (1996).
- 2) Bedwell, D. M., Kaenjak, A., Benos, D. J., Bebok, Z., Bubien, J. K. *et al. Nat. Med.*, **3**, 1280-1284 (1997).
- 3) Barton, E. R., Cordiner, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. & Sweeney, H. L. *J. Clin. Invest.*, **104**, 375-381 (1999).
- 4) Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J. *et al. Nature*, **447**, 87-91 (2007).
- 5) Hirawat, S., Welch, E. M., Elfring, G. L., Northcutt, V. J., Paushkin, S. *et al. J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 430-444 (2007).
- 6) Arakawa, M., Shiozuka, M., Nakayama, Y., Hara, T., Matsuda, R. *et al. J. Biochem.*, **134**, 751-758 (2003).
- 7) Allamand, V., Bidou, L., Arakawa, M., Shiozuka, M., Matsuda, R. *et al. J. Gene Med. (In press)*

塩塚 政孝 Masataka Shiozuka

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 学術支援研究員

松田 良一 Ryoichi Matsuda

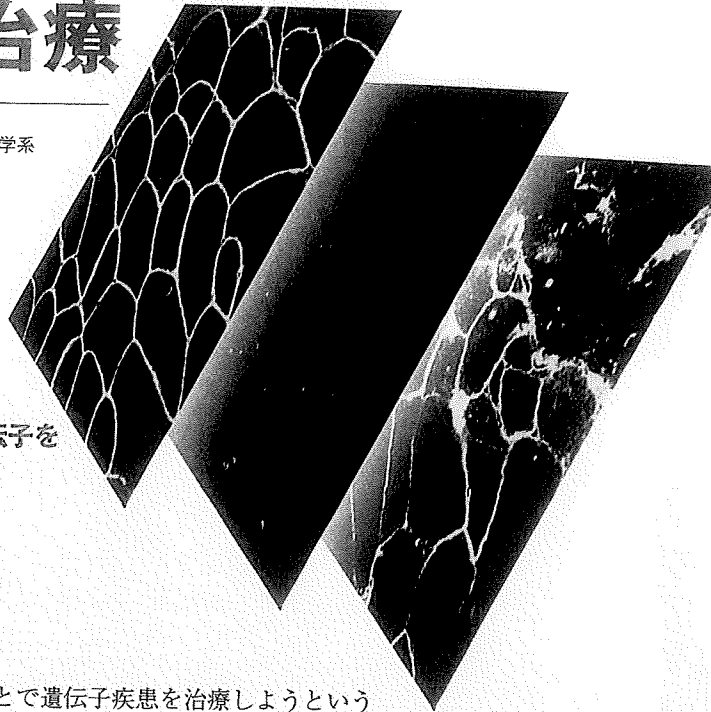
東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 准教授



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

松田良一 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

新生男児3500人に一人の割合で出現するデュシェンヌ型筋ジストロフィーは10代の少年を襲う致死的遺伝子疾患である。では、ジストロフィンの遺伝子導入以外にデュシェンヌ型筋ジストロフィーを治す方法はないのか？ せっかく存在する患者自身の欠陥があるジストロフィン遺伝子を有効活用しながら治療に結びつけることはできないのか？ ここでは近年、注目されているリードスルー療法とエキソン・スキップ療法の進展状況について紹介しよう。



デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) の原因タンパク質、ジストロフィンが発見されて20年が経った。発見当時は20年後にはDMDの遺伝子治療も実現しているであろうと予想されていたが、いまだ実現には至っていない。

残念ながらDMDに限らず、原因遺伝子が解明されても、遺伝子疾患を治療できた例は多くはなく、むしろ事故が目立つのが現状である。1999年、アメリカ・ペンシルベニア大学でアデノウイルスをベクターにして遺伝子治療を受けた18歳の男性患者が4日後に死亡した。遺伝子導入に使用した大量のウイルスに対する免疫ショックがおきたためであった。また、2002年にはフランスでレトロウイルスをベクターにした遺伝子治療を受けた免疫不全症の患者が白血病を発症した。これは患者のゲノムへのウイルス由来遺伝子の挿入部位に大きな問題があったと考えられている。

一方、遺伝子疾患をもつ患者から分離した幹細胞ないしはiPS細胞(人工多能性幹細胞)に対して正常遺伝子を導入し、それを同じ患者に再

移植することで遺伝子疾患を治療しようという戦略もある。患者自身の幹細胞を使えば免疫学的、倫理的問題を回避できる。しかし、幹細胞の分化運命の制御や体内に移植された後の組織構築の促進、さらに腫瘍化の回避などにはまだまだ多くの課題が残されている。

これらの遺伝子導入療法を補完する遺伝子疾患の治療戦略として注目されているのが、薬物によるリードスルー療法とアンチセンスオリゴヌクレオチドによるエキソン・スキップ療法である。

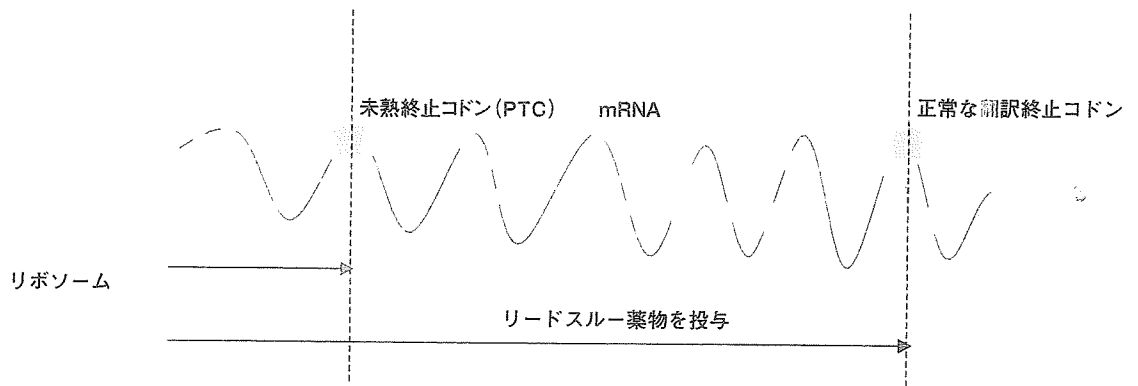
リードスルー療法とは？

mRNAの翻訳中に原因遺伝子上に点突然変異によって生じた未熟終止コドン (premature termination codon : 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、機能をもった全長タンパク質が合成されず、種々の遺伝子疾患が生じる。ほとんどの遺伝子疾患症例の5~15%はPTCによる翻訳の中断(ナンセンス突然変異)が原因といわれている。さらに囊胞

図1

リードスルーの概略

正常な翻訳は mRNA 3' 側にある翻訳終止コドンで終結する。もし、ナンセンス突然変異により未熟終止コドン (PTC) が生じると翻訳はそこで中断し、鎖長が短いタンパク質を生じる。多くの場合、このタンパク質は機能をもたず、細胞内で分解される。ゲンタマイシンやネガマイシンなどのリードスルー薬物は rRNA の A サイトに結合し、翻訳の効率や忠実度を低下させる。ときとして、PTC 部位に他の tRNA が付き、翻訳を続行させることがある。これがリードスルーである。



性線維症 (Cystic Fibrosis: CF) では、ナンセンス突然変異は症例の 40% に上るといわれている。もし、薬物により PTC を読み越えさせること (リードスルー) ができれば、機能的なタンパク質の合成が回復し症状の改善が期待される。これがリードスルー療法である (図1)。

リードスルーを惹起する薬物はどんなものがあるのだろうか。まず、その候補として挙げられているのは、ゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質である。この抗生物質は、細菌のタンパク質翻訳系を標的とし、翻訳忠実度を下げて異なったアミノ酸の挿入 (ミスリーディング) ⁽¹⁻³⁾ や終止コドンの読み越え (リードスルー) ^(4, 5) を誘導することで 3' 非翻訳領域まで翻訳が進み、正常より長いタンパク質分子を合成させることが大腸菌、酵母や無細胞翻訳系を用いて示されている。このリードスルー現象が、ナンセンス突然変異による遺伝子疾患をもつ患者の細胞内でもおきれば、PTC を翻訳過程で読み越えて機能的タンパク質を合成させることにより、治療法に応用できると予想できる。

候補薬物としてのゲンタマイシン

1997年、アメリカ・アラバマ大学の Bedwell らは、CF 患者由来細胞において CF 原因遺伝子である CF 膜貫通制御因子 (CFTR) 遺伝子上の PTC を、ゲンタマイシンを用いてリードスルーさせることに成功した⁽⁶⁾。さらにアデノウイルスベクターによる感染事故がおきた同じアメリカ・ペンシルベニア大学で、Barton-Davies と Lee H. Sweeney らは、ゲンタマイシンを DMD のモデ

ル動物である mdx マウス (ジストロフィン遺伝子のエキソン 23 にナンセンス突然変異がある) に投与すると欠損していたジストロフィンの発現が回復し、筋力が上昇したことを報告した⁽⁷⁾。しかし、アミノグリコシド系抗生物質は強い腎毒性と聴覚毒性をもち、短期間の抗菌剤としては使用できるものの長期間にわたる遺伝子治療薬として用いるには強い副作用が問題となることが予想される。

Made in Japan のネガマイシン

このゲンタマイシンと同様にリードスルー活性をもち、より副作用が少ない抗生物質はないだろうか。幸いなことに、1970年、わが国の微生物化学研究所で発見されたジペプチド系抗生物質ネガマイシンが、大腸菌においてミスコーディングやリードスルーをおこすことが証明されていた⁽⁸⁾。われわれは早速、ネガマイシンを入手し、mdx マウスへの投与実験をしたところ、ゲンタマイシン同様、ネガマイシン投与群の骨格筋と心筋組織においてジストロフィンの全長タンパク質の合成と蓄積を認めた (図2)。

ゲンタマイシンの場合、問題になる強い聴覚毒性がネガマイシンにもみられるかを知るため、ネガマイシンあるいはゲンタマイシンの投与を受けたマウスの聴性脳幹反応テストを実施した。その結果、ゲンタマイシン投与群において聴力のいちじるしい低下を認めたが、ネガマイシン投与群では正常レベルの聴力を維持しており、聴覚毒性は認められなかった。さらにネガマイシンの LD₅₀ はマウスではゲンタマイシ

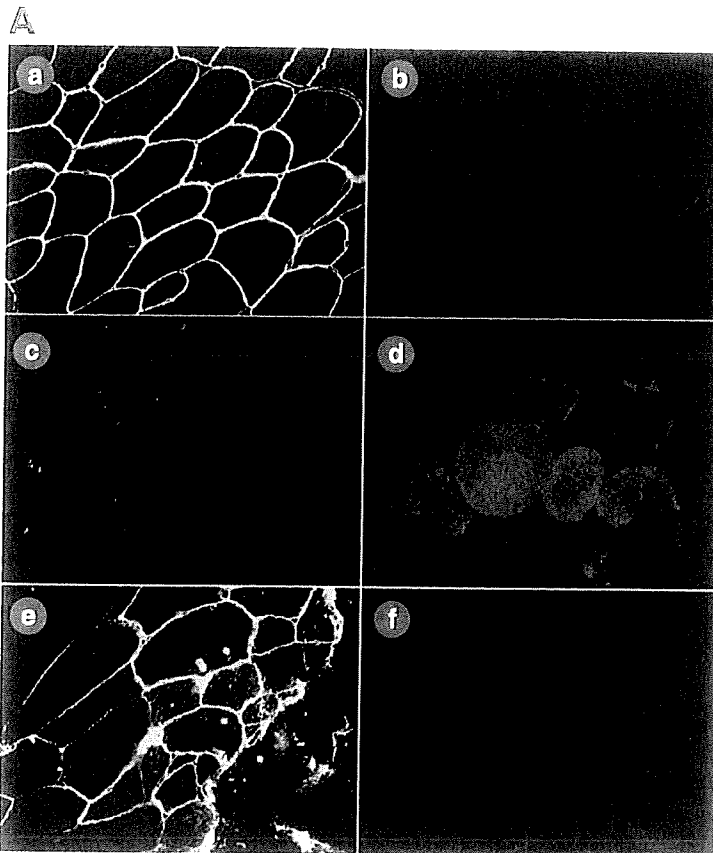


図3 ネガマイシンはmdxマウスの骨格筋にジストロフィン合成を促す

A. ジストロフィンの蛍光抗体染色像(a, c, e)とエバンスブルーによる生体染色像(b, d, f)

- (a) 1%エバンスブルー溶液0.2mLをB10対照マウスに静脈内注射により生体染色し、24時間後に採取した前頸骨筋から凍結横断切片(10 μ m厚)を作製し、無固定のまま抗ジストロフィンポリクローン抗体とFITC標識された抗ウサギIg抗体を用いて染色した。ジストロフィンは筋細胞膜直下にある裏打ちタンパク質であり、筋ファイバーの全周を染める。
- (b) aと同じ切片を560nmで励起し、580nmにて観察したエバンスブルーの蛍光像。正常な筋ファイバーの細胞膜にはエバンスブルーは透過しない。小静脈と一部の細胞間質だけにエバンスブルーの赤色蛍光が認められる。
- (c) エバンスブルーをaと同様に静脈内注射されたmdxマウスの前頸骨筋の凍結横断切片を抗ジストロフィン抗体で染色した。mdxマウスはジストロフィン(伝子にナンセンス変異があり、機能的ジストロフィンの発現と細胞膜直下への蓄積は見られない)。
- (d) cと同じ切片のエバンスブルー蛍光像。筋ジストロフィー変化により膜変性をおこした筋ファイバーの細胞膜はエバンスブルーを透過し、ファイバー細胞質が染色されている。
- (e) 2週間、連日ネガマイシンを皮下投与されたmdxマウスの前頸骨筋におけるジストロフィンの蛍光抗体染色像。f, eと同じ切片におけるエバンスブルー蛍光像。ネガマイシンによりジストロフィンが回復した筋ファイバーにはエバンスブルーによる染色は認められない。白線は100 μ mを示す。aからeまで同倍率で観察した。

B. B10対照マウス, 無処理mdxマウスおよびネガマイシンを投与されたmdxマウス前頸骨筋抽出液の抗ジストロフィン抗体によるイムノブロット像

- (a) ネガマイシンを投与されたmdxマウス下肢骨格筋抽出液(タンパク質量20 μ g)。
- (b) サンプルバッファーのみ。
- (c) aと同じサンプルを10倍量泳動した。
- (d) サンプルバッファーのみ。
- (e) 対照B10マウスの下肢骨格筋抽出液(タンパク質量20 μ g)。pタンは発光基質を用いて可視化した。文献⁽⁹⁾より引用。

の100分の1程度であった。質量分析法によりネガマイシンはゲンタマイシンと同様、リボソームRNAのAサイトに結合することがわかり、これによりmRNAの翻訳忠実度の低下をもたらすことが予想された⁽⁹⁾。その後、ネガマイシンは先天性筋ジストロフィー患者の筋細胞に対し、ゲンタマイシンの場合より高いリードスルー活性をもつなど、ネガマイシンはゲンタマイシンを代替するリードスルー薬としての有効であることが示された⁽¹⁰⁾。

しかし、残念ながらネガマイシンは未承認抗生物質であり、しかも収量も低く精製も困難な抗生物質である。ネガマイシンの生産は、抗生物質開発の熱が冷めた現在の日本ではむずかしい状況であった。しかし最近、東京薬科大学の

林らのグループにより効率が高い全合成系が確立されたことは特記に値する⁽¹¹⁾。われわれは、*in silico*検索で創薬開発を進めているアメリカ・メリーランド大学のA. マッケレル教授と共同で、ネガマイシンと立体構造が類似した化合物を105万種類の低分子量化合物の分子構造データライブラリからコンピュータ上でサーチし、28種類の化合物にたどり着いた⁽¹²⁾。

リードスルー活性測定用マウスの開発

一方、ジストロフィンを指標にする場合、ジストロフィンが42万ダルトン以上の巨大分子であるためイムノブロットでの転写効率は低く、その存在量は他の筋タンパク質に比べて少な

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⁽¹⁵⁾。

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⁽¹⁶⁾。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量は、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だ。

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、され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ス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

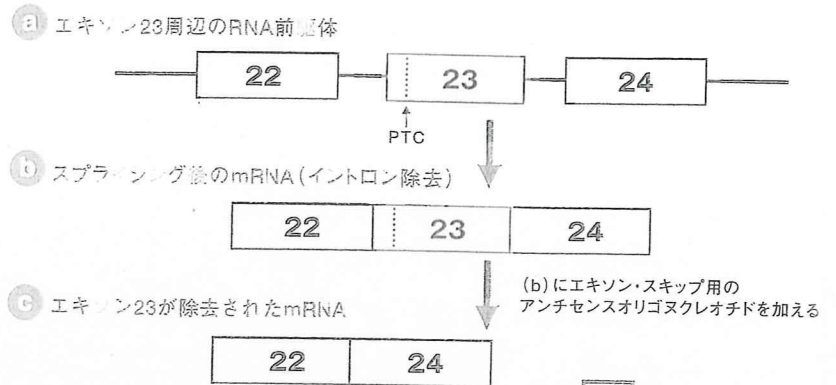


図3

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。まだ、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'-O,4'-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⁽²⁵⁾。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パ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・ジョーンズ細胞科学センター主任研究員、パーメ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* 17 (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* 17 (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] Bedwell 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. "Negamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phage t2 RNA in vitro" *Biochem Biophys Acta* 374 (1974) 82-95
- [9] Arakawa M et al. "Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscle of mdx mice" *J Biochem* 134 (2003) 751-758
- [10] Allmand 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 (-)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases" *J. Royal Soc Chem In press* (2008)
- [12] Shiozuka M et al. (2007) in preparation
- [13] Winnard 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'" pp1130-1187 (1996) McGrawhill, 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) McGrawhill, 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" *Kobe 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 (2008) 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] Hardling 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 oligonucleotide 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 I/II clinical trials in Duchenne muscular dystrophy using IM and IV delivered antisense oligonucleotides: The MDX consortium" *Neuromuscul Disord* 16 (2006) 685
- [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

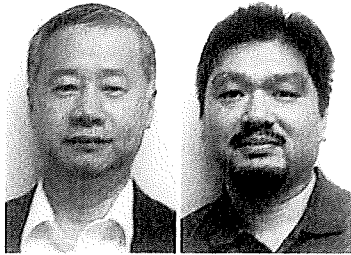
COLUMN 2

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、抗核酸抗体の出現である。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酸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。

リードスルー療法の最前線

Recent development of readthrough therapy for muscular dystrophy



松田良一(写真左) 塩塚政孝(写真右)

Ryoichi MATSUDA and Masataka SHIOZUKA

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系(生物学)

◎点変異により遺伝子エクソン内で未熟終止コドン(premature termination codon: PTC)が生じると、機能的な蛋白質が合成されず遺伝子欠損症状を呈するようになる。このナンセンス変異は Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の場合、症例の 10~15%を占めるといわれている。たった 1カ所に PTC が生じただけで、あたかも遺伝子全体が欠損したような致死的症状を呈するようになる。PTC 以外には遺伝子の塩基配列に問題がないならばその遺伝子を有効利用することで患者を救う方法はなかろうか。答えは“yes!”。それを実現すべく今、薬物を用いて PTC を翻訳過程で読み飛ばすこと(リードスルー)により正常機能蛋白質の発現を回復させようというリードスルー療法が注目されている。



筋ジストロフィー, ナンセンス突然変異, リードスルー療法, ゲンタマイシン, ネガマイシン

遺伝子エクソン内で点変異により未熟終止コドン(たとえばグルタミンをコードする CAA の C が T に換わると終止コドンの TAA となる。このような変異をナンセンス変異とよび、形成された終止コドンを premature termination codon(PTC)とよぶ)が生じると、機能的な蛋白質が合成されず遺伝子欠損症状を呈するようになる。このナンセンス変異は Duchenne 型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: DMD)の場合、症例の 10~15%を占め、嚢胞性線維症では一部のユダヤ系患者集団の 4 割、Hurler 症候群(ムコ多糖症)では 7 割を占めるといわれている。たった 1カ所に PTC が生じただけで、あたかも遺伝子全体が欠損したような致死的症状を呈するようになる。

PTC 以外には遺伝子の塩基配列に問題がないならばその遺伝子を維持したまま有効利用することで患者を救うことはできないか?。答えは“yes!”。それを実現すべく今、薬物を用いて PTC を翻訳過程で読み飛ばすことにより正常機能蛋白質の発現を回復させようというリードスルー療法が注目されている。

ゲンタマイシンによるリードスルー

PTC を読み飛ばす? そんな便利な薬物があるのかと疑う人も多いであろうが、実はあるのである。有名なストレプトマイシンやカナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質がそれだ。この抗生物質は細菌の翻訳系を標的とする。これが働くと細菌の蛋白質合成が阻害され、抗菌活性を示す。しかし、この抗生物質は、真核生物においても mRNA の翻訳忠実度を低下させ、ときとしてコドンに指定されていないアミノ酸を組み込んだり(ミスコーディング)、あるいは翻訳終止コドンを読み越え(リードスルー)させることがある。

なかでもゲンタマイシン(図 1-A)はリードスルー活性が比較的高い。アメリカ・ペンシルバニア大学医学部の Lee Sweeney らは、DMD の疾患モデル動物である mdx マウス(DMD の原因遺伝子ジストロフィン上にナンセンス変異があり、機能的なジストロフィン合成できずに筋変性を起こしているマウス)にゲンタマイシンを投与し、ジストロフィン mRNA 上の PTC をリードスルーさせることにより、機能をもったジストロフィンの蓄積および筋力の上昇させることに成功した¹⁾。

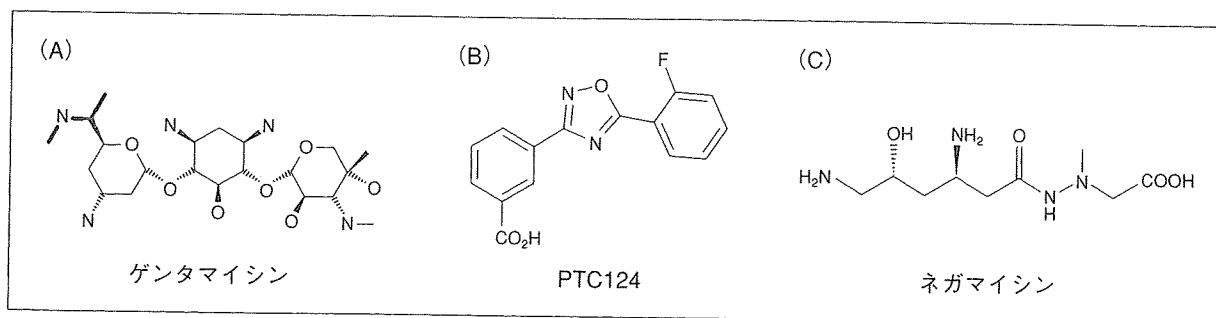


図1 ゲンタマイシン(A), PTC124(B), ネガマイシン(C)の構造

リードスルー療法は、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な選択肢のひとつである。たとえ少量の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、患者のQOLの向上と延命をはかることが期待できるからだ。筋ジストロフィー以外にも適用可能な2,400種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の存在が明らかになっている。しかし、ゲンタマイシンの血中濃度の安全域は狭く、強い腎毒性と聴覚毒性のため、投与が長期間に及ぶと予想される遺伝性疾患の治療薬としてのゲンタマイシンの使用は難しい。

PTC124によるリードスルー

ここではリードスルー薬物研究の2つの動向について述べる。

ひとつは、毒性が高いゲンタマイシンの代替物として Lee Sweeney らが推進している PTC124 (図1-B) という低分子を用いたリードスルー療法である。この PTC124 は PTC Therapeutics²⁾ が培養細胞系と無細胞系を用いたリードスルー活性のハイスループット検出系を使い、80万種類の低分子化合物群から同定されたものである。PTC124 は経口投与で効果を発揮し、mdx マウスにおいては4週間の投与で正常対照マウスの20~25%量のジストロフィンの蓄積を観察している。また、使用する PTC124 の量は同程度の効果をもたらすゲンタマイシン量の1/10~1/100ですむから安全性も高い³⁾。健常人を被験者とする第I相試験では毒性は認められず⁴⁾、現在 DMD と Becker 型筋ジストロフィー患者を対象とする後期第II相の臨床試験にかけられている。中間評価ではすでに薬理効果を見出しているが、確実な治療効果を得るた

めに、より高用量での治験が行われている。また、PTC124 は脳血液関門を通過できるため、ナンセンス変異型の遺伝性脳疾患にもその有効性が期待される。

これらの概要は開発者である Lee Sweeney により、さる2008年4月にニューオリンズで開催されたシンポジウム“The Third New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle”で発表された。それによると、12例のナンセンス変異型 DMD 患者に4週間投与したところ、約半数の患者で投与2週間後には血中クレアチンキナーゼ (creatine kinase: CK. 筋中に多量に存在する酵素。筋細胞の崩壊や筋細胞膜の透過性が亢進すると血中に漏出する。筋ジストロフィーの臨床的診断マーカーになっている)活性が低下、筋疲労も軽減し、症状の改善がみられたそうである。投与中止4週間後にCK活性は上昇に転じたことから、PTC124投与は明らかな治療効果があったと判断される。この PTC124 は全米が注目しており、アメリカ筋ジストロフィー協会(MDA)や筋ジストロフィー親の会(PPMD)、食品医薬品局(FDA)、国立衛生研究所(NIH)などから多額の研究資金が投入されている。

ネガマイシンによるリードスルー

もうひとつは、著者らが行っているネガマイシン(図1-C)、およびその関連物質を用いたリードスルー研究である。ネガマイシンは30年前にわが国で発見されたグラム陰性菌に対するジペプチド系抗生物質で、発見当初からミスコーディングとリードスルー惹起することが示されていた。そこで著者らは、このネガマイシンを mdx マウスへ連日皮下投与したところ、投与後4週間までに骨格

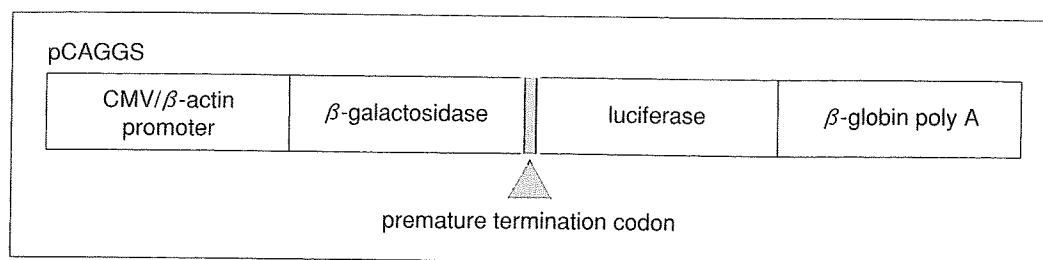


図 2 デュアルレポーター遺伝子コンストラクト

筋と心筋にジストロフィン蛋白質の蓄積(正常組織にみられるジストロフィン量の10%)を認め⁵⁾。また、先天性筋ジストロフィーのモデル系においても高いリードスルー活性をもつことを示した⁶⁾。ネガマイシンの毒性はゲンタマイシンよりはるかに低いため、長期間投与が予想されるリードスルー療法薬として有望である。しかし、ネガマイシンは未承認抗生物質であり、ゲンタマイシンに比べ実用化へのハードルは高い。

さらに問題なのは、現在ではネガマイシンの入手がほぼ不可能なことである。そこで著者らは、ネガマイシンをリード物質としたあらたな薬物候補の探索に着手した。mdx マウスを薬効評価系に使うと含量が少なく、分子量が大きいジストロフィンの検出定量性が問題となる。そこでリードスルー活性検出の評価に特化した解析系の開発からはじめた。著者らは、ルシフェラーゼ遺伝子の前方に PTC を挟んでβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を結合し、β-アクチンプロモーターをつけたデュアルレポーター遺伝子をつくり(図2)、これを導入したトランスジェニックマウスの作製に成功した。このマウスは骨格筋・心筋組織において普段はβ-ガラクトシダーゼのみを発現しているが、リードスルーが起こるとルシフェラーゼも発現する。そのため、このマウスを使えばルシフェラーゼ活性とβ-ガラクトシダーゼ活性の比を求めることで、リードスルー活性を定量化することができる。また、投与経路・量と標的組織別感受性(リードスルー活性と薬物動態)を同時に評価することが可能なため、単に薬効においてのみ注目したスクリーニングではなく、重篤な副作用をもたない化合物を特定することもできる。

著者らはアメリカ・メリーランド大学薬学部の MacKerell 教授とともに *in silico* 検索を行い、

105 万種類の低分子化合物データベースから、ネガマイシンに類似した三次元構造をもつ 29 種の分子を見出した。それらのうち 17 種を入手し、トランスジェニックマウスに皮下投与したところ、5 種類のリードスルー活性を有する物質を特定した(国際特許出願中)。そのなかの化合物#2 は内服によってもリードスルー惹起効果を示し、mdx マウスや DMD 患者由来培養細胞を用いた生化学的・免疫組織化学的解析結果も良好で、安全性も高いことから、PTC124 と同様にリードスルー療法薬として有望であると考えている(図3)。また、ネガマイシン誘導体⁷⁾や未承認アミノグリコシド系抗生物質からもリードスルー惹起活性をもつ分子を数種特定している。

リードスルー薬物の経皮投与

いまのところ、ゲンタマイシンや PTC124、ネガマイシンや化合物#2 においては自然終止コドンのリードスルーは認められていないが、リードスルーを惹起することにより生存に必須な蛋白質をコードした mRNA のミスコーディングや自然終止コドンのリードスルーも起こす可能性がある。また、それ以外の副作用についても未知なところが多い。薬物を患者の QOL の改善につながる筋肉に特異的に薬物を分配できれば、全身投与に比べて治療効率の向上と副作用の軽減につながると考えられる。さらに、注射による投与を回避できれば、注射による苦痛もなくなる。

そこで著者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する経皮的投与法を開発した。用いたのは、そのままでは経皮的投与によるリードスルーは起こらないゲンタマイシンと、先述したトランスジェニックマウスと体毛がないヘアレスマウスである。まずトランスジェニックマウスを剃毛し、

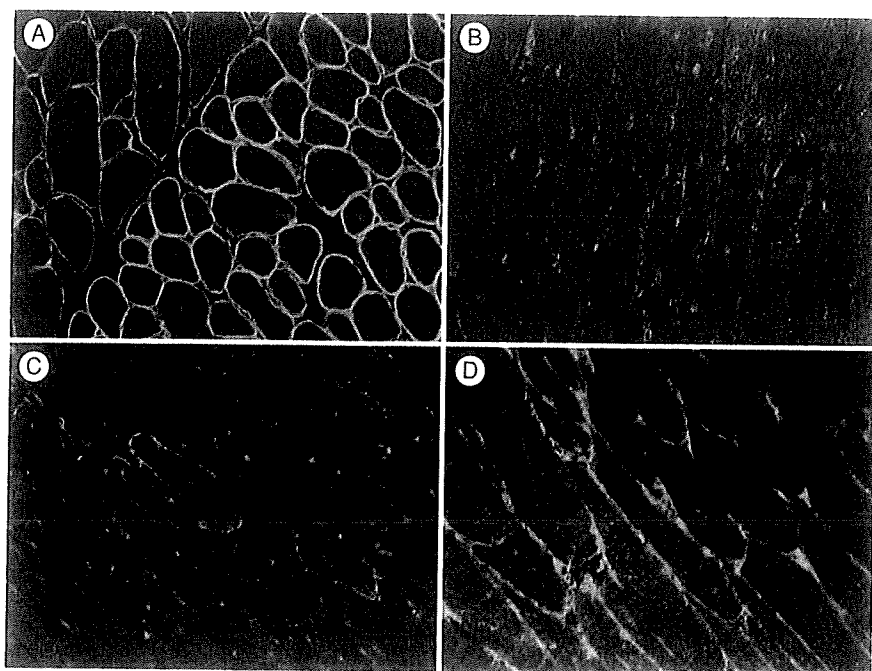


図 3 マウス骨格筋のジストロフィン免疫染色像
 A: 正常 B10 マウス, B: 未投与 mdx マウス, C: ゲンタマイシンを皮下投与した mdx マウス, D: 化合物#2 を経口投与した mdx マウス.

皮膚の透過性を増すために簡単な前処理を施した。その後、市販のゲンタマイシンクリームを連日塗付し、7日後に塗布した皮膚直下にある筋肉におけるリードスルー活性を測定した。薬物処理していない皮膚にゲンタマイシンを塗布したマウスを対照として測定したところ、皮膚に前処理を受けたマウスのみ高いリードスルー活性を示した。剃毛による皮膚の微小な擦過傷を回避するためヘアレスマウスを用い、前処理あるいは対照として、処理していないマウスの皮膚にゲンタマイシンクリームを塗布し、血中と骨格筋内におけるゲンタマイシン分子の定量を HPLC と質量分析により行った。その結果、皮膚を前処理した後ゲンタマイシン塗擦したマウスのみ、その血中と筋組織中に高濃度のゲンタマイシンを認めた。

経皮吸収型薬物送達法は、初回通過効果(経口投与した薬物は消化管で吸収され、門脈を經由して肝で代謝されてから代循環血液中に到達するため、到達する割合と速度が低下する現象)や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化や苦痛の解消、患者コンプライアンスの向上を提供できる点で魅力的である。この経皮投与法はリードスルー療法のみならず、他の薬物療法にも適用可能なため大きな社会的成果が期待される。

リードスルー療法以外の薬物療法

そのほか、ニューオリンズでの会議で発表されたなかで注目されるものがいくつかあったので、ここに簡単に紹介したい。

DMD の場合、欠損しているジストロフィンをリードスルーにより補充する以外に、ユートロフィン(ジストロフィンの胎児型アイソフォーム、ヒト第6染色体にコードされているためジストロフィン遺伝子に異常がある場合でもユートロフィン遺伝子は正常である。胎児ではジストロフィンの代りに筋細胞膜直下の裏打ち蛋白質として存在するが、成体では神経筋接合部にのみ局在する)の発現を上昇させて、症状悪化を回避する戦略も考えられる。イギリスの Davies らは、ユートロフィン・プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したレポーター遺伝子をつくり、その遺伝子を導入した細胞培養系を用いてユートロフィン発現惹起活性を検出する系を確立した。この細胞に多数の低分子化合物をロボットを用いてハイスループット実験を行い、ユートロフィン発現を惹起する薬物候補 SMT C1100 を見出した。これを mdx マウスに投与するとユートロフィン mRNA 量が2倍に増加し、筋変性の指標である再生筋線維数と血中 CK 値がともに低下し、筋組織における線

維化、脂肪変性と炎症の減少がみられた。さらに、プレドニゾンとの併用では筋疲労の軽減もみられた。この薬物の長期的副作用は不明であるが、注目すべき結果である。彼らは Summit PLC⁸⁾ というベンチャー会社を起し、これを薬物として実用化すべく、2008 年中期には第 I 相臨床試験を行う予定である。

また、Biglycan の補充療法も提案された。この Biglycan は筋細胞膜に局在する α サルコグリカンと γ サルコグリカンを結合する役割を担う細胞外基質で、筋細胞膜を構成する蛋白質やシグナル伝達の調整を行っている。Biglycan 欠損マウスでは軽度な筋変性を生じる。mdx マウスではジストロフィン関連糖蛋白質複合体の形成が阻害され、筋基底膜との結合に障害が生じているため、Biglycan も不足している。アメリカ・ブラウン大学医学部の Fallon らは、Biglycan 欠損マウスに Biglycan を腹腔注射により補充すると、ジストロフィン糖蛋白質複合体が正常に形成され、筋変性が軽減することを示した⁹⁾。さらに、ヒトリコンビナント Biglycan を mdx マウスに腹腔内投与すると 5 週間後に対照 mdx マウスに比べ筋力低下が抑制され、ユートロフィン蛋白質の含量が 2.5 倍増加し、横隔膜において筋変性が軽減し、浸潤細胞も減少するなど治療効果を示した。また、ユートロフィンノックアウトマウスと mdx マウスとの交配で作製したダブルノックアウトマウスにおいても、Biglycan 投与の効果は認められた。今後、この Biglycan 補充療法はおおいに期待できそうである。

おわりに

本稿ではリードスルー療法を中心に薬物による遺伝性疾患、とりわけ DMD の治療開発についての最近の知見を概観した。リードスルー薬物はいまのところ PTC124 の独壇場になりつつあるが、PTC124 のみでは多様なナンセンス変異型遺伝性

疾患への臨床応用は個々の患者の PTC に対する有効性、PTC 周辺の塩基配列の違いによる特異性および副作用の蓄積など、不安要素がある。そこで著者らの見出した化合物 #2 のように、できるだけ多くの薬物候補分子の探索を今後とも続けていく必要がある。また、Biglycan の補充療法にみられるように、DMD の治療には筋変性メカニズムの基本的理解により筋変性を抑制するあらたな分子標的が浮かび上がってくる場合もある。原因遺伝子の欠損が、いかにして病状を呈するに至るかの解明は今後も続けていかなければならない。

DMD の根本治療にはまず正常ジストロフィン遺伝子あるいは短縮型ジストロフィンの遺伝子導入が推進されるべきものである。また、最近注目されている幹細胞による移植治療も有望である。点変異型の DMD にはリードスルーやエクソスキップによる治療も適応できる。さらに、抗炎症薬/ステロイドや蛋白質分解酵素阻害剤、抗酸化物質などによる筋ジストロフィー症状の軽減も期待できる。DMD では患者ごとに遺伝子異常のパターンが異なる。患者ごとに適した戦略を組み合わせることで DMD の効果的治療につながると思われる。

文献/URL

- 1) Barton, E. R. et al. : *J. Clin. Invest.*, **104** : 375-381, 1999.
- 2) <http://www.ptcbio.com/>
- 3) Welch, E. M. et al. : *Nature*, **447** : 87-91, 2007.
- 4) Hirawat, S. et al. : *J. Clin. Pharmacol.*, **47** : 430-444, 2007.
- 5) Arakawa, M. et al. : *J. Biochem.*, **134** : 751-758, 2003.
- 6) Allamand, V. et al. : *J. Gene Med.*, **10** : 217-224, 2008.
- 7) Hayashi, Y. et al. : *Chem. Commun.*, **20** : 2379-2381, 2008.
- 8) <http://www.summitplc.com/>
- 9) Amenta, A. et al. : *Neuromuscul. Disord.*, **17** : 804, 2007.

* * *

