

each of the growth factors. To make the fabrication process simpler, immobilization process without modifying growth factors will be necessary. We have prepared the surface activated substratum by treating polystyrene substratum with tressyl activated dextran and we have made the growth factor array with 3 and 4 growth factors.

From the results of growth factor arrays using 3 factors, it was confirmed that myogenic differentiation of C2C12 myoblast was promoted by IGF-I, and suppressed by FGF-2, which is similar to the result from growth factor array with photoreactive growth factors. In both cases, promotion of myogenic differentiation by higher concentration of IGF-I was independent of the concentrations of FGF-2 and BMP-2. Ito [38] reported that immobilized insulin bound to a receptor stimulates the cells continuously, resulting in a stronger effect than in dissolved insulin. In this experiment, the effect of IGF-I might be enhanced in the same manner.

BMP-2, on the other hand, neither suppressed myogenic differentiation nor promoted osteogenic differentiation, when the immobilized amount was relatively small, close to the concentrations of other factors. However, when higher concentration of immobilized BMP-2 ($4,132 \text{ pg/mm}^2$) was used, osteogenic differentiation was promoted. The density of $4,132 \text{ pg/mm}^2$ in the immobilized state corresponds to 536 ng/mL in a soluble state, which is an extremely high concentration. At a concentration of $1,542 \text{ pg/mm}^2$ in immobilized system, suppression of myogenic differentiation was not significant, but promotion of osteogenic differentiation was observed at about the same extent as in the liquid system at a concentration of 33 ng/mL . This suggests that the activity of BMP-2 was not simply decreased by immobilization but rather changed.

Growth factor arrays composed of four factors (EGF, FGF-2, IGF-1, and PDGF-BB) were also examined. These factors were expected to exert synergic or combinatorial effects, because the downstream signal transduction pathways of these factors are slightly different. However, such effect was not detected. PDGF-BB showed lower activity compare to the native effect in liquid system. EGF and FGF-2, on the contrary, showed higher activity in the immobilized state. PDGF-BB at high concentration, however, showed suppression effects on growth and myogenic differentiation and also in the immobilized system, indicating that it is active in the immobilized system, though the activity is low. The low activity of PDGF-BB may be due to its binding mechanism to the receptors. PDGF-BB binds to the receptor as a dimer. It is known that one subunit of PDGF-BB binds to two receptors, whereas one receptor binds to two subunits. Because of this complicated binding, the affinity with the receptor may be lowered in immobilized system. As for EGF, it has been confirmed by previous work that the activity of EGF is higher in immobilized systems than in a liquid system, in agreement with this work [38]. The possible reason for elevated activity in the previously reported immobilized system is that the down regulation of the ligands does not occur in immobilized system, and thus activation of the receptors continues for a long period of time.

In some cases, the effect of growth factors in immobilized and liquid systems are different. For example, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), which belongs to the EGF family, acts in two forms in vivo as secretory form (paracrine) and transmembrane form (juxtacrine) which exert different effects. Growth of hepatocyte strain EPI70.7, for instance, is promoted by juxtacrine of HB-EGF [39].

With paracrine, on the other hand, promotion of growth was not detected at all, although the ligand was considered to be bounded to the receptor. Therefore, it is likely that both the actions of soluble and immobilized systems have different functions in vivo. In fact, in this work, the activity of BMP-2 seemed to have changed in the immobilized system. At some concentrations, suppression of myogenic differentiation was weaker, and osteogenic differentiation was stronger, in comparison with those in soluble state. Many growth factors are down regulated by endocytosis after binding to the receptor. EGF and TGF- β underwent endocytosis, activating signal transduction pathways downstream in endosome [40]. Furthermore, EGF, like other growth factors, activates multiple signal transduction pathways downstream by binding to the receptors, and the degree of activation is different depending on the signal transduction either across the cell membrane or from inside the endosome [41, 42]. For immobilized growth factors, the signal is continuously transmitted on the cell membrane, whereas both paracrine and juxtacrine signals are transmitted in soluble growth factors. Considering this fact, the effect of growth factors in immobilized and liquid systems were different at least in terms of the signal transduction pathway.

12.4.3 Growth Factor Array in Slow Release System

As discussed above, immobilizing growth factors on the substratum may change the activity of growth factors. To examine the effect of growth factors more natively, we further constructed the slow-release system for growth factor arrays with photoreactive gelatin as the retaining material. In this slow release system, growth factors are retained to the substratum but not tightly immobilized.

According to the result from retaining growth factors on the substratum using photoreactive gelatin, the slow release depends on the intensity of UV-irradiation. When the intensity of UV-irradiation was low (0.2 mJ/cm^2), most of the EGF was lost after the first wash. On the other hand, when the UV intensity was high (200 mJ/cm^2), EGF was released in the supernatant for the first 24 h, but much less was released thereafter. Ito et al. reported that release of erythropoietin immobilized by photoreactive gelatin was not observed by treating with UV-irradiation at 160 mJ/cm^2 . This implies that growth factors are firmly immobilized to the substratum by photoreactive gelatin with high UV intensity. On the contrary, when the UV intensity was 2 or 20 mJ/cm^2 , slow release continued for 1 week. At these intensities, it is possible to minimize the loss of EGF in the first washing, yet keep the ability to release EGF later on.

Culture of C2C12 myoblasts in the slow release system resulted in effects similar to that in liquid system. The possible concern about the immobilization of growth factors using photoreactive growth factors or surface activated substratum is the decrease in activity and changes in action of the growth factors. Slow-release systems by photoreactive gelatin may solve these problems. However, the increased effect of growth factors in a slow release system, as reported by Bhang, was not

observed in our experiments [43]. It may be because the culture duration was too short (4 days) in our experiment.

For the growth factor arrays in the slow-release system consisting of BMP-2 and IGF-I, suppression of myogenic differentiation for C2C12 myoblast was confirmed with BMP-2 at the concentration of 450 pg/mm², independent of the concentration of IGF-I. We have also prepared the slow-release system in a 96-well plate (data not shown). Compared with the results of slow release culture on a 96-well plate, the amount of BMP-2 per unit area was larger in arrays but suppression effect of myogenic differentiation was lower in the growth factor array. This is most likely due to the released BMP-2 remaining in the 96-well plate, whereas in the growth factor array, it flows out to culture medium, resulting in the decreased effect of BMP-2 on the BMP-2 retained area. Promotion of osteogenic differentiation was not observed as we had expected, neither by BMP-2 alone nor by BMP-2 and IGF-I together. Katagiri et al. stated that, in culture of C2C12 myoblast, BMP-2 suppresses the myogenic differentiation at 100 ng/mL and the promotion of ALP expression can be observed at 300 ng/mL or higher [44]. One possible reason for observing the osteogenic differentiation but not the myogenic differentiation is that the BMP-2 concentration was high enough to suppress myogenic differentiation but not high enough as to promote osteogenic differentiation.

The previous work showed that osteogenic differentiation of MSC is not promoted by BMP-2 alone but promoted by BMP-2 and FGF-2 together [45]. In other works, it has been reported that IGF-I induces expression of BMP-2, and BMP-2 and IGF-I together promote osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells more effectively than BMP-2 alone [46, 47]. In this work, it was confirmed that BMP-2 and IGF-I together exert compound effect on osteogenic differentiation of MSC.

12.5 Conclusion

We have developed techniques to analyze compound effects of growth factors in various states, including immobilized, soluble, and slow release. Inkjet printer technology was highly effective for changing the density and the combinations of immobilized growth factors. Chen and Ito reported the patterning of EGF with concentration gradient using photo lithography by changing the intervals of thin lines so that the number of growth factor molecules touching the cells change [48]. An inkjet printer, however, allows much easier preparation of concentration gradient by simply multiply the printing times. Also, *in vitro* control of cell patterning such as muscle cell alignment can be achieved easily. By combining various immobilization techniques, inkjet technology makes it possible to construct the conditions similar to *in vivo* in various states such as soluble and immobilized. By further combining the patterning and various cytokines, growth factor arrays will be a powerful and essential tool for multivariable analysis for tissue engineering and regenerative medicine, especially for the optimization of differentiation conditions for pluripotent cells to differentiate to various types of cells.

References

1. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282:148–152
2. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168–1170
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147
4. Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71–74
5. Mummery CL, van Rooyen M, Bracke M, van den Eijnden-van Raaij J, van Zoelen EJ, Alitalo K (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 191(1):188–195
6. Avila AM, Davila Garcia MI, Ascarrunz VS, Xiao Y, Kellar KJ (2003) Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Mol Pharmacol* 64:974–986
7. Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K (2003) Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 90(4):756–765
8. Florini JR, Magri KA (1989) Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am J Physiol* 256:C701–C711
9. Florini JR, Ewton DZ, Magri KA (1991) Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu Rev Physiol* 53:201–216
10. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 16:481–517
11. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(21):11307–11312
12. Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S (2003) The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 48:2188–2196
13. Ma R, Latif R, Davies T (2009) Thyrotropin-independent induction of thyroid endoderm from embryonic stem cells by Activin A. *Endocrinology* 150:1970–1975
14. Sulzbacher S, Schoroeder IS, Truong TT, Wobus AM (2009) ActivinA-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors – The influence of differentiation factors and culture conditions. *Stem Cell Rev* 5:159–173
15. Mironov V, Reis N, Derby B (2006) Review: bioprinting: a beginning. *Tissue Eng* 12(4):631–634
16. Alper J (2004) Bioengineering. Biology and the inkjets. *Science* 305(5692):1895
17. Allain LR, Askari M, Stokes DL, Vo-Dinh T (2001) Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system. *Fresenius J Anal Chem* 371(2):146–150
18. Goldmann T, Gonzalez JS (2000) DNA-printing: utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. *J Biochem Biophys Methods* 42:105–110
19. Okamoto T, Suzuki T, Yamamoto N (2000) Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology. *Nature Biotech* 18:438–441
20. Nilsson S, Lager C, Laurell T, Birnbaum S (1995) Thin-Layer immunoaffinity chromatography with bar code quantitation of C-reactive protein. *Anal Chem* 67:3051–3056
21. Roda A, Guardigli M, Russo C, Pasini P, Baraldini M (2000) Protein microdeposition using a conventional ink-jet printer. *Bio Techniques* 28:492–496
22. Klebe RJ (1988) Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Exp Cell Res* 179:362–373
23. Sanjana NE, Fuller SB (2004) A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *J Neurosci Methods* 136(2):151–163

24. Xu T, Gregory CA, Molnar P, Cui X, Jalota S, Bhaduri SB, Boland T (2006) Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. *Biomaterials* 27(19):3580–3588
25. Watanabe K, Miyazaki T, Matsuda R (2003) Growth factor array fabrication using a color ink jet printer. *Zool Sci* 20:429–434
26. Campbell PG, Weiss LE (2007) Tissue engineering with the aid of inkjet printers. *Expert Opin Biol Ther* 7(8):1123–1127
27. Phillippi JA, Miller E, Weiss L, Huard J, Waggoner A, Campbell P (2008) Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations. *Stem Cells* 26:127–134
28. Ito Y, Chen G, Imanishi Y (1996) Photoimmobilization of insulin onto polystyrene dishes for protein-free cell culture. *Biotechnol Prog* 12:700–702
29. Matsuda T, Sugawara T (1995) Photochemical protein fixation on polymer surfaces via derivatized phenyl azido group. *Langmuir* 11:2272–2276
30. Gregorius K, Mouritsen S, Elsner HI (1995) Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid phases. *J Immunol Methods* 181:65–73
31. Piwowarczyk W, Matsuda R (1990) A large scale dot blot ELISA using the 96-well culture plate. *J Immunol Methods* 132(1):147–149
32. Vande Vondele S, Voros J, Hubbell JA (2003) RGD-Grafted Poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol Bioeng* 82(7):784–790
33. Lennon DP, Haynesworth SE, Dennis JE, Caplan AI (1995) A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stemcells. *Exp Cell Res* 219:211–222
34. Ito Y, Li JS, Takahashi T, Imanishi Y, Okabayashi Y, Kido Y, Kasuga M (1997) Enhancement of the mitogenic effect by artificial juxtacrine stimulation using immobilized EGF. *J Biochem* 121:514–520
35. Milasincic DJ, Calera MR, Farmer SR, Pilch PF (1996) Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biol* 16(11):5964–5973
36. Vaidya TB, Rhodes SJ, Taparowsky EJ, Konieczny SF (1989) Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Mol Cell Biol* 9(8):3576–3579
37. Tollefsen SE, Sadow JL, Rotwein P (1989) Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1543–1547
38. Ito Y (1998) Tissue engineering by immobilized growth factors. *Mater Sci Eng C* 6(4):267–274
39. Higashiyama S, Iwamoto R, Goishi K, Raab G, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E (1995) The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol* 128:929–938
40. Le Roy C, Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:112–126
41. Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274:2086–2089
42. Wang Y, Pennock S, Chen X, Wang Z (2002) Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 22:7279–7290
43. Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS (2007) Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A* 80(4):998–1002
44. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 27:1755–1766

45. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI (1997) Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12:1606–1614
46. Li H, Bartold PM, Zhang CZ, Clarkson RW, Young WG, Waters MJ (1998) Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation? *Endocrinology* 139:3855–3862
47. Raiche AT, Puleo DA (2004) In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials* 25(4):677–685
48. Chen G, Ito Y (2001) Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation. *Biomaterials* 22:2453–2457

筋ジストロフィーに対するリードスルー治療

塩塚 政孝 松田 良一

1. リードスルー治療とは

ナンセンス変異によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) では、ジストロフィン遺伝子エクソン内で点変異により一つの塩基が置換し、本来の翻訳終結部位より上流に未熟終止コドン (premature termination codon) が生じることで、機能的な全長ジストロフィンタンパク質が合成されずに遺伝子欠損症状を呈す。この未熟終止コドンを薬物により抑制し翻訳を進行させ、正常機能を有するタンパク質分子の発現を回復させることで症状の改善を目指す治療法がリードスルー療法である。ナンセンス変異症例は DMD では本邦において 19% を占め、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されるとともに、それらの包括的治療法としてもリードスルー治療は注目されている。

2. ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用

リードスルー誘起物質によるナンセンス変異の抑制は、酵母を用いた系でアミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンによって 1979 年に最初に立証された¹⁾。その後、哺乳類細胞でもリードスルーにより機能的タンパク質の回復がみられることが報告され²⁾、1996 年にはアミノグリコシド系抗生物質の G418 やゲンタマイシンが、嚢胞性線維症の原因遺伝子にナンセンス変異をもつ細胞に

対して正常遺伝子産物を発現させることに成功した³⁾。これまで効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移植以外に方法はないと考えられていたナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療手段として、リードスルーによる治療の可能性が拓けてきた。

1999 年、ペンシルバニア大学の Lee Sweeney らのグループが *mdx* マウス (ジストロフィン遺伝子のエクソン 23 にナンセンス変異をもつ DMD のモデル動物) にゲンタマイシンを投与し、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回復および筋力の上昇を報告した⁴⁾。ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用可能性が示唆されて以降、ゲンタマイシンを用いたいくつかの治験が行われたが、その重篤な副作用のために制限があり、いずれも治療効果は低かった。しかしながらリードスルーによる治療概念の妥当性を支持する結果は得られており、投与前から少量のジストロフィンをもつ患児に対しての半年間の投与では、15% 程度のジストロフィンの発現回復が見られている⁵⁾。そのため、より安全性が高く、点滴静脈注射よりも負担のない投与が可能な薬剤の確立が課題となった。

2007 年、Lee Sweeney らはバイオベンチャー企業 PTC Therapeutics 社とともに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高いリードスルー活性をもつ PTC124 (アタルレン) を同定した (図 A)。*mdx* マウスと DMD

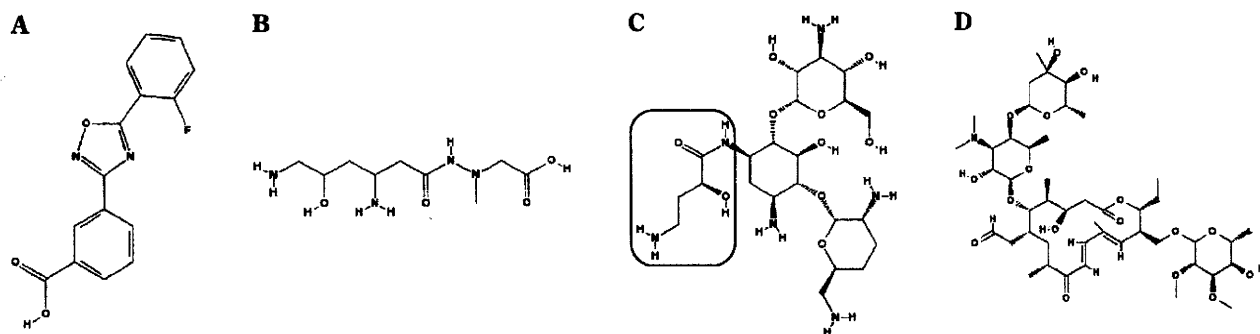


図 リードスルー誘起物質の構造

A. アタルレン(PTC124), B. ネガマイシン, C. アルベカシン(囲み部分が AHB 基), D. タイロシン。

患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を復活させた報告は、第 I 相試験結果と同時に公表された^{6,7)}。1日に3回服用での第 I 相で毒性は認められなかったものの、DMD とベッカー型筋ジストロフィー (Becker Muscular Dystrophy; BMD) 患者を対象とした後期第 II 相試験において、治療の有効性に関する科学的証拠を得ることはできなかった。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィー治療における安全性と有効性の基準を確立し、治験立案の知見を得られたことは重要な貢献であると考えられる。特に小児に対する運動機能評価については、最終効果判定とされた6分間歩行距離の統計解析について現在も議論され続け⁸⁾、ジストロフィンの発現だけではない臨床効果を評価する尺度の重要性が浮き彫りになっている。

DMD や BMD についての開発は頓挫しているが、肢帯型筋ジストロフィー 2B 型や三好型遠位型筋ジストロフィーに関連するジスフェリン欠損についても、アタルレンは効果をもつことが培養系で示されている⁹⁾。アタルレンは広範な適用可能性を潜在的にもつリードスルー誘起物質であり、経口投与可能な特性を有するため、嚢胞性線維症では第 III 相へ、血友病 A/B とメチルマロン酸血症では第 II 相へと治験は続行中である。

3. リードスルー誘起物質の探索

筆者らは 2001 年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシンが DMD や先天性筋ジストロフィーのモデル系において高いリードスルー活性を有することを報告してきた(図 B)¹⁰⁻¹²⁾。ネガマイシン

は 1970 年に日本の微生物化学研究会で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、ゲンタマイシンより高い安全性をもつため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬として有望と考えられた。しかしネガマイシンは未承認であり、その大量入手が不可能であったことから、ネガマイシンをリード物質とした新たな薬物候補を求めた。探索に先立ち、生体内での薬効評価を定量化かつ効率化するために遺伝子導入マウス (Readthrough Evaluation and Assessment by Dual-reporter; READ マウス) を作出した¹³⁾。この薬効評価系を用いることで、ネガマイシンの化学構造に立脚した *in silico* 探索からリードスルー治療薬候補を 5 種特定した¹⁴⁾。薬物候補 #2 や #4 は、ゲンタマイシンやネガマイシンよりも高い濃度依存的なリードスルー活性を内服によっても示し、*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・運動機能解析学的解析や安全性試験結果も良好である。特定した薬物候補やネガマイシンのさらなる誘導体展開から、より臨床現場に近い薬物候補を提案することが可能となった^{15,16)}。

2009 年 Du らは、毛細血管拡張運動失調症をモデルとした無細胞翻訳系 ELISA による完全自動化されたハイスループット探索で、アミノグリコシドではない化合物 RTC#13 を報告した¹⁷⁾。*mdx* マウス骨格筋培養細胞への処理でゲンタマイシンと同等のジストロフィンの発現回復が見られている。

4. アミノグリコシドの再評価

筆者らは、カナマイシン類抗生物質群の探索から、ジベカシンの1-NH₂基を(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸(AHB)基でアシル化することで減毒化した抗生物質、アルベカシンに強力なリードスルー活性があることを見出している(図C)。*mdx*マウスでの生化学的臨床指標による解析と同時に、筋機能回復について検証したところ有意な治療効果を認めた¹⁸⁾。アルベカシンは1973年に微生物化学研究会によって合成され、1990年に抗メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)薬として上市されている承認薬である。それゆえ、オフラベルユース(適用外使用)の要件を満たすことで早期に臨床の場に送り込める薬物となりうる。

ナンセンス変異型嚢胞性線維症患者の割合が多いイスラエルでは近年、急速にリードスルーに関する研究が発展している。イスラエルからのリードスルー治療薬に関する最新の報告を二つ紹介したい。Baasovらのグループは、アミノグリコシドの構造的な要素を切り離し、毒性の低減とリードスルー活性の増強に成功した誘導体を報告した。パロモマイシンのもつ6-OH基とブチロシンやアミカシンのもつAHB基で修飾したパロマミン誘導体NB54¹⁹⁾や、6-Methyl基とAHB基を導入したG418誘導体NB84²⁰⁾である。DMDを含む多種のナンセンス変異のコンストラクトを導入した培養細胞系においては良好な結果を示しており、個体レベルでの解析が期待される物質である。

もう一つは、大腸腺腫をモデルとしたレポーターアッセイや移植癌細胞において、アミノグリコシド系やマクロライド系抗生物質にリードスルー活性があることを報告したものである²¹⁾。特筆されるべきは、動物用医薬品および飼料添加物として承認されているマクロライド系抗菌剤タイロシンである(図D)。筆者らの薬効評価系でもそのリードスルー活性を確認しており、経口吸収性に優れ、数多く存在するタイロシン誘導体からさらなる治療薬候補を特定しつつある。

しかし、リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与が不可能なため、筋ジストロフィー治療に用いる場合には筋崩壊が進行して

いる組織にさらに障害を与える筋中や静脈内投与しか方法がなく、対象患者が低年齢のため疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため筆者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する経皮投与法を開発した。チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を化学的皮膚透過促進処理として用い、アミノグリコシドの皮膚外用剤を連日投与することで、骨格筋内に皮下注射と同等の薬効を認め^{13,22)}。皮膚のもつ防御機能による薬物吸収を特殊な機器を必要とせず市販されている安全性の高い除毛剤により制御し、皮膚非透過性の薬物の全身暴露の有効性が示されたことは、簡便かつ非侵襲的投与方法として臨床的使用に期待できる。また、筋ジストロフィーにおける長期投与中の在宅医療や嚥下困難な患者にとっても利便性の向上を提供できると考えられる。患者への負担を軽減するだけでなく、初回通過効果や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化を提供できる点で魅力的であり、他の薬物療法にも適用可能なため、その臨床的使用は大きな社会的成果が期待される。

5. リードスルー治療の今後の展望

リードスルーの感受性は、一般に未熟終止コドンの種類がUGA(Opal) > UAA(Ochre) > UAG(Amber)の順に高いことが知られている²³⁾。また、未熟終止コドン直後のヌクレオチドはC > U > A/Gの順にリードスルーしやすいこと²⁴⁾や、リードスルー効率にとって上流の2ヌクレオチドと下流の6ヌクレオチドが極めて重要であること²⁵⁾などが報告されている。これらのように、リードスルー誘起物質は未熟終止コドンの種類およびその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くのリードスルー治療薬候補物質を特定し、個々の患者に最適な治療戦略を選択かつ併用できるものを見出すことが求められている。DMDはまだ有効な治療法が確立されていない重篤な遺伝性筋疾患であるが、BMD症例に関する知見から正常量の20%に相当するジストロフィンの回復で病態進行の遅延とQOLの向上や延命が期待できる。そのため、リードスルー治療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を回復させる、迅速かつ有

効な選択肢と考えられる。その実現性を確保するためには、テーラーメイド治療の前提となる詳細な遺伝子解析と、着実な臨床応用への足場となる成果が肝要であろう。

本稿において紹介した筆者らの研究成果は、「厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学推進事業」, 「厚生労働省精神・神経疾患研究委託費」, 「厚生労働省精神・神経疾患研究開発費」, 「厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業」(以上 RM), 「財団法人金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成」(MS) によって行われたものである。

●文 献

- 1) Palmer E, Wilhelm JM, Sherman F : *Nature* **277** : 148-150, 1979
- 2) Burke JF, Mogg AE : *Nucleic Acids Res* **13** : 6265-6272, 1985
- 3) Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM : *Nat Med* **2** : 467-469, 1996
- 4) Barton ER, Cordiner L, Shoturma DI et al : *J Clin Invest* **104** : 375-381, 1999
- 5) Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L et al : *Ann Neurol* **67** : 771-780, 2010
- 6) Welch EM, Barton ER, Zhuo J et al : *Nature* **447** : 87-91, 2007
- 7) Hirawat S, Welch EM, Elfring GL et al : *J Clin Pharmacol* **47** : 430-444, 2007
- 8) McDonald CM, Henricson EK, Han JJ et al : *Muscle Nerve* **42** : 966-974, 2010
- 9) Wang B, Yang Z, Brisson BK et al : *J Appl Physiol* **109** : 901-905, 2010
- 10) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T et al : *Acta Myol* **20** : 154-158, 2001
- 11) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : *J Biochem* **134** : 751-758, 2003
- 12) Allamand V, Bidou L, Arakawa M et al : *J Gene Med* **10** : 217-224, 2008
- 13) Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T et al : *J Biochem* **147** : 463-470, 2010
- 14) 松田良一, 塩塚政孝, Alex MacKerell : PCT/JP2007/63436
- 15) Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S et al : *Chem Comm* **20** : 2379-2381, 2008
- 16) 林良雄, 木曾良明, 西口茂信・他 : 特願 2008-317710
- 17) Du L, Damoiseaux R, Nahas S et al : *J Exp Med* **206** : 2285-2297, 2009
- 18) 松田良一, 塩塚政孝, 我妻玲・他 : 特願 2010-021817
- 19) Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavivsky M et al : *J Med Chem* **52** : 2836-2845, 2009
- 20) Nudelman I, Glikin D, Smolkin B et al : *Bioorg Med Chem* **18** : 3735-3746, 2010
- 21) Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R : *Gut* **59** : 496-507, 2009
- 22) 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一 : 生体の科学 **61** : 636-640, 2010
- 23) Martin R, Mogg AE, Heywood LA et al : *Mol Gen Genet* **217** : 411-418, 1989
- 24) Howard MT, Shirts BH, Petros LM et al : *Ann Neurol* **48** : 164-169, 2000
- 25) Namy O, Hatin I, Rousset JP : *EMBO Rep* **2** : 787-789, 2001

ナンセンス変異の抑制～リードスルーによるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療

塩塚政孝, 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

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

Masataka SHIOZUKA, Ryoichi MATSUDA

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo at Komaba

3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902 Japan

はじめに

ナンセンス変異は塩基対が1つ置換し、アミノ酸コードが終止コドンに変化する点突然変異である。ナンセンス変異の結果、未熟終止コドン (Premature Termination Codon) と呼ばれる異常な終止コドンが生じ、本来の翻訳終結部位より上流でタンパク質の生産が中断するため、適切な機能をもつ完全なタンパク質が合成されない。そのため重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異型遺伝性疾患の種類は2,400種を超えることが明らかにされている。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy: DMD) のナンセンス変異症例は、本邦において患者数の19%を占めており、機能的な全長ジストロフィンタンパク質が合成されないために遺伝子欠損症状を呈し、進行性の筋力低下と筋萎縮を示している。この未熟終止コドンを薬物により抑制して翻訳を進行させ、正常機能を有するタンパク質分子の発現を回復させることで症状の改善を目指す治療法がリードスルー療法である。リードスルー療法では、薬物によって翻訳機構に干渉し、生得のジストロフィン遺伝子を活かして正常機能タンパク質の発現を回復させるため、遺伝情報を変更したり体内に遺伝物質を導入することが無い。ジストロフィンタンパク質の発現自体が正常に制御されることで、その治療効果は大きくかつ副作用は少ないことが考えられるため、ナンセンス変異型筋疾患の有効かつ迅速な選択肢としてリードスルー療法は注目されている。本稿では、国外の研究動向ならびに筆者らの最新の研究成果をもとにDMDに対するリードスルー療法について記述する。

I. リードスルーによるDMD治療の試み

原核細胞においてアミノグリコシド系抗生物質はrRNAの構造変化を引き起こし、mRNA上の未熟終止コドンとrRNAのアミノアシル部位との結合を阻害する。その結果、未熟終止コドンをリードスルーして翻訳を続行させることでナンセンス変異が抑制される。アミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンが酵母でナンセンス変異を抑制することを初めて報告したのは1979年であった(1)。数年後に哺乳類細胞においてもリードスルーにより機能的な全長タンパク質を復活させることが報告され(2)、1996年にBedwellらのグループはアミノグリコシド系抗生物質のG418やゲンタマイシンを用いて、ナンセンス変異型嚢胞性線維症のモデル細胞における正常遺伝子産物の発現に成功した(3)。これにより、ナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療戦略としてリードスルー療法の概念が提唱された。

1999年、Lee Sweeneyらのグループは*mdx*マウス（ジストロフィン遺伝子のエクソン23にナンセンス変異をもつDMDのモデル動物）にゲンタマイシンを投与し、リードスルーを誘起させることにより筋組織内に正常マウスの最大20%程度のジストロフィンの回復を報告した（4）。ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用可能性が示唆されて以降ゲンタマイシンを用いた幾つかの治験が行われているが、その重篤な聴覚毒性や腎毒性のために制限があり、いずれも治療効果は低いのが現状である。しかしながらリードスルーによる治療概念の妥当性を支持する結果は得られており、投与前から少量のジストロフィンをもつ患児に対しての半年間の投与では、15%程度のジストロフィンの発現回復が見られている（5）。そのため、より安全性が高く、点滴静脈注射よりも負担のない投与が可能な薬剤の確立が喫緊の課題となっている。

2007年、Lee SweeneyらはPTC Therapeutics社とともにハイスルーブット検出系を使い、80万種の低分子化合物群からPTC124（アタルレン）を同定した。*mdx*マウスとDMD患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を回復させた報告は、第I相臨床試験結果と同時に公表された（6,7）。1日に3回服用での毒性は認められなかったものの、DMDとベッカー型筋ジストロフィー（Becker Muscular Dystrophy: BMD）患者を対象とした後期第II相臨床試験において、米食品医薬品局（FDA）から治療の有効性に関する科学的証拠が得られていないと判断された。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィーの治療における安全性と有効性の基準を確立し、治験立案の知見を得られたことは非常に重要な貢献であると考えられる。特に小児に対する運動機能評価については、最終効果判定とされた6分間歩行距離の統計解析について現在も議論され続けており（8）、筋ジストロフィーの臨床効果を見極める課題として、ジストロフィン発現や血清クレアチンキナーゼ活性だけによらない評価尺度の重要性が浮き彫りになっている。運動機能を評価する際、それ自身（例えば6分間歩行が可能であること）が治験参加の前提となるため、熱心な保護者が患児に訓練を施すことで結果に悪影響を及ぼすこともあり、その条件設定には苦慮すべき問題を抱えている。アタルレンはDMDやBMDについての開発は頓挫しているが、肢帯型筋ジストロフィー-2B型や三好型遠位型筋ジストロフィーに関連するジスフェリン欠損についても、アタルレンは効果をもつことが培養系で示されている（9）。アタルレンは広範な適用可能性を潜在的にもつリードスルー誘起物質であり、経口投与可能な臨床応用に適した特性を有するため、嚢胞性線維症では第III相へ、血友病A/Bとメチルマロン酸血症では第II相へと治験は続行中である。

II. 新規リードスルー誘起物質の開発～創薬

筆者らは2001年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシンが、DMDやメロシン欠損型先天性筋ジストロフィーのモデル系において有益なリードスルー誘起活性を有することを報告してきた（10-12）。ネガマイシンは1970年に日本の微生物化学研究所で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、ゲンタマイシンより高い安全性をもつため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬として有望と考えられた。しかしネガマイシンは未承認薬であり、その大量入手が困難であったことから、我々はネガマイシンをリード物質とした新たな薬物候補を求めた。探索に先立ち、生体内での薬効評価を定量化かつ効率化するために遺伝子導入マウス（Readthrough Evaluation and Assessment by Dual-reporter: READマウス）を作出した（13）（図1）。*mdx*マウスを薬効評価系に使うと、含量が少なく427kDaと分子量が大きいジストロフィン（ジ

ストロフィン遺伝子は79個のエクソンを有する全遺伝子中最大のもの)の検出定量性が問題となるためである。メリーランド大学薬学部のMackereil教授とともに105万種を超える低分子化合物データベースからネガマイシンの立体配位形成に適合する*in silico*探索を行い、得られたネガマイシン類似物質についてこの薬効評価系を用いることで、リードスルー治療薬候補を5種特定した(14)。その中の薬物候補#3と#4をREADマウスに皮下投与したところ、両者共に既知のリードスルー誘起物質であるゲンタマイシンやネガマイシンと同等以上のリードスルー活性を示した(図2)(15)。次に*mdx*マウスへ3週間連日投与(50mg/kg/day)することで、それぞれ16.2%、18.8%のジストロフィン回復筋線維を確認した(図3C, D)。*mdx*マウスのもつ未熟終止コドンとその直後のヌクレオチド"UAA A"は、最もリードスルーしにくい配列であることが示唆されている(24)。にもかかわらず、これらの染色像からはBMD症例によく似たジストロフィンの発現様式が見てとれる。Hoffmanらは、DMDより症状の穏やかなBMD症例から、正常量の20%程度のジストロフィン回復によってその表現型が改善されると報告している(16)。さらに、血清クレアチンキナーゼ活性は、薬物候補#3や#4を投与することでおよそ半分の値にまで有意に減少した(図3E)。

また、ヒト由来細胞にREADマウスで用いたコンストラクトを導入した培養系においてはアタルレンより高い効果を示したため、薬物候補#3については東京薬科大学の林良雄教授と共同研究を行い、低毒性化と薬効の増強を目指し、末端官能基と不飽和結合部に着目した、活性発現に寄与する部位の特定を試みている。特定した薬物候補やネガマイシンの更なる誘導体展開から、より臨床現場に近い薬物候補を提案することが可能となっている(17, 18)。薬物候補#4については内服によっても用量依存的な活性を示し、*mdx*マウスにおける握力測定からも改善傾向を示す結果を得たことから、SPF施設において急性・亜急性毒性を検討したところ(図4)、単回投与、反復投与共に体重、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ず、安全性が極めて高いことを確認した。現在、製剤化を目指した溶解性・安定性・吸収性の改善のための理化学的性状の改善を行っている。加えて、薬物候補#2については東京女子医科大学附属遺伝子医療センターの斎藤加代子教授との共同研究により、DMD患者由来培養細胞によるジストロフィンタンパク質の回復を確認している(投稿準備中)。

2009年Duらは、毛細血管拡張運動失調症をモデルとした無細胞翻訳系ELISAによる完全自動化されたハイスループット探索から、アミノグリコシドではない化合物RTC#13やRTC#14を特定した(19)。*mdx*マウスにRTC#13を筋注することで、ゲンタマイシンやアタルレンよりも効率的にリードスルー活性を示し、横隔膜や心臓を含む筋組織でジストロフィンを回復させ、毒性もみられなかったことを報告している(米筋ジストロフィー協会全国科学会議, 2011)。またBaasovらのグループは、アミノグリコシドの構造的な要素を切り離し、毒性の低減とリードスルー活性の増強に成功した誘導体を報告した。パロマイシンのもつ6-OH基とブチロシンやアミカシンのもつ6-Methyl基と(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル(AHB)基で修飾したパロマミン誘導体NB54(20)や、AHB基を導入したG418誘導体NB84(21)である。DMDを含む多種のナンセンス変異のコンストラクトを導入した哺乳類細胞培養系においては良好な結果を示しており、個体レベルでの解析が期待される物質である。

III. 既承認薬からのリードスルー誘起物質の発見～育薬

医薬品の開発は、薬の種となる物質の発見を目指した探索的基礎研究に始まり、動物における非臨床試験やヒトによる治験で安全性や有効性を評価し、その後行政当局の承認審査に至るプロセスを経るため、最低でも10年以上の開発期間と莫大な研究開発費が必要となる。新薬開発には我々研究者の情熱と使命感だけでは越えられない障壁が未だ存在する。しかし、患者やその家族が直面している課題は現実であり、深刻であり、重大である。一刻も早い臨床応用の実現が切望されているのである。DMD診断は、血液生化学検査により乳幼児期の筋力低下症状の無い時期でも可能であり、発症前に治療を始められればその効果は極めて大きいものと期待される。

筆者らはカナマイシン類抗生物質群の探索から、ジベカシンの1位アミノ基にAHB基を導入することで滅毒化した抗生物質、アルベカシンに強力なリードスルー活性があることを見出した(22)。アルベカシンは1973年に微生物化学研究会によって合成され、1990年に抗メシチリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)薬として上市されている承認薬である。それ故、オフラベルユース(適応外使用)の要件を満たすことで早期に臨床の場に送り込める薬物となりうる。アルベカシンを連日投与したmdxマウスの筋線維径に大小不同が少なく、結合組織量も少ない傾向が認められることから、未熟終止コドンの抑制によりジストロフィンタンパク質の発現を誘導することで、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ていることが示唆される(図5)。mdxマウスでの生化学的臨床指標による解析と同時に、筋機能回復について、握力、等尺性収縮張力、単収縮張力測定、強収縮張力、筋力減衰率を指標に検証したところ有意な治療効果を認めている。また神戸学院大学総合リハビリテーション学部の松尾雅文教授との共同研究により、ナンセンス変異をもつDMD患者由来の培養筋細胞を2週間アルベカシン処理することで、ジストロフィンタンパク質の発現促進が見られたことを確認している(投稿準備中)。

ナンセンス変異型嚢胞性線維症患者の割合が非常に多いイスラエルでは、近年急速にリードスルー療法に関する研究が進展している。Zilberbergらは、大腸腺腫をモデルとしたレポーターアッセイや移植癌細胞において、マクロライド系抗生物質タイロシンにもリードスルー活性があることを報告した(23)。動物用医薬品および飼料添加物として承認されている本抗菌剤については筆者らの薬効評価系でもそのリードスルー活性を確認しており、経口吸収性に優れ、数多く存在する誘導体の網羅的探索から16員環の半合成物に治療薬候補を特定しつつある。

IV. リードスルー薬の経皮投与

リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与による吸収が不可能であるため、筋ジストロフィー治療に用いる場合には筋崩壊が進行している組織にさらに障害を与える筋肉内や静脈内投与しか方法が無く、対象患者が低年齢のため疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため筆者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する簡便な経皮投与法を開発した。即ち、チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を化学的皮膚透過促進処理として用い、アミノグリコシドの皮膚外用剤を連日投与することで、骨格筋内に皮下注射と同等のリードスルー効果を認めた(13)。皮膚のもつ防御機能を特殊な機器を必要とせず安全性の高い除毛剤により制御し、皮膚非透過性の薬物の全身暴露の有効性が示されたことにより、筋ジストロフィーにおける長期投与中の在宅医療や嚥下困難な患者にとっても利便性の向上を提供できる非侵襲的投与

方法として期待できる。経皮吸収型薬物送達法は患者への負担を軽減するだけでなく、初回通過効果や消化管障害を回避でき、血中濃度の持続化を提供できる点で魅力的であり、他の薬物療法にも適用可能なため、その臨床的使用は大きな社会的成果が期待されている。

V. リードスルー効率の制御

薬物によってリードスルーした未熟終止コドンは、読み飛ばされているのか、それとも意味をもつアミノ酸が挿入されているのか、実際のところその分子機構は混沌としており、未だ一致した見解が得られていない。しかし、ジストロフィンタンパク質においては、健康個体の正常ヒトジストロフィンにおいても1塩基欠損や1塩基置換は頻発しており、ほとんどの単一アミノ酸置換には耐性があるため問題は無いことが知られている。

リードスルー誘起物質を投与すると、正常な翻訳終結点までもリードスルーしてしまう可能性が考えられる。しかし実際には本来の翻訳終結点の後にも終止コドンが連続して存在する 경우가多く、未熟終止コドンは通常の終止コドンよりも周囲の配列の特徴によって決まる終止効率が高いため、選択的にリードスルーされやすい。現実的にリードスルー誘起物質によって正常タンパク質よりも大きな異常タンパク質が検出された例は無く、リードスルーによる副作用は少ないと思われる。またナンセンス変異を有する異常なmRNAは、ナンセンス変異依存mRNA分解 (Nonsense-mediated mRNA decay : NMD) と呼ばれる品質管理機構により急速に分解、除去される。しかしG418やネガマイシン、アタルレンといった既知のリードスルー薬物候補は、NMDを阻害しmRNAを安定化する、つまり未熟終止コドンを特異的に認識し、正常な終止コドンでの翻訳終結には影響を及ぼさないことが示唆されている (24, 12, 6)。NMDが抑制されることで、たとえリードスルー自体の効率は低くとも多くの全長翻訳産物が得られるため、リードスルー薬物療法はより現実的な治療と言えよう。

リードスルーの感受性は、一般に未熟終止コドンの種類がUGA (Opal) > UAA (Ochre) > UAG (Amber) の順に高いことが知られている (25)。また未熟終止コドン直後のヌクレオチドはC>U>A/Gの順にリードスルーしやすいこと (26) や、リードスルー効率にとって上流の2ヌクレオチドと下流の6ヌクレオチドが極めて重要であること (27) などが報告されている。これらのようにリードスルー誘起物質は未熟終止コドンの種類およびその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くのリードスルー治療薬候補物質を特定し、個々の患者に最適な治療戦略を選択かつ併用できるものを見出すことが求められている。

おわりに

DMDは医療需要の高い重篤な遺伝性筋疾患である。しかも正常量の20%に相当するジストロフィンの回復によって病態進行の遅延とQOLの向上や延命が期待できる (26)。そのため、ナンセンス変異に起因する全ての疾患の包括的薬学療法ともなる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迅速かつ有効な選択肢と考えられる。その実現性を確保するためには、テーラーメイド治療の前提となる詳細な遺伝子解析と着実な臨床応用への足場となる成果が肝要である。昨今、未承認薬・適応外薬促進加算制度が導入され、新薬の創製を加速する経済施策が始まり、大きな期待が寄せられている。多くの生物学・

医学研究者の英知と不屈の精神をもってすれば、突きつけられている課題を克服していけるはずである。

本稿において紹介した筆者らの研究は、厚生労働省精神・神経疾患研究開発費、厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業（以上RM）、財団法人金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成（MS）で得られた成果に基づいている。

図の説明

図1：READマウスの全身X-gal染色像

READマウスはβ-ガラクトシダーゼ (*lacZ*) とルシフェラーゼ (*luc*) のレポーター遺伝子間に未熟終止コドン挿入したコンストラクトで作出されている。Kawamoto's film methodによるREADマウス全身凍結切片をX-gal染色したところ、心筋や横隔膜を含む筋組織全般でβ-ガラクトシダーゼの発現を確認した。Bar=1cm

図2：薬物候補#3と#4投与によるREADマウスのリードスルー活性

1週間連日皮下投与したREADマウス骨格筋でのリードスルー活性では、薬物候補#3と#4がゲンタマイシン (GM) やネガマイシン (NM) と同等以上の薬効を示すことが確認された。対照 (Cntrl) は生理食塩水のみを投与した。

図3：薬物候補#3と#4投与によるmdxマウス骨格筋のジストロフィン免疫染色像と血清クレアチンキナーゼ活性

マウス骨格筋組織のジストロフィンC末端に対する抗体を用いた免疫染色像である。正常B10マウスでは見られるジストロフィン (A) がmdxマウスでは見られない (B)。薬物候補#3 (C) や#4 (D) をmdxマウスに3週間連日皮下投与したところ、ジストロフィンの回復が見られ、それぞれ約16%、19%のジストロフィン陽性筋線維数が確認された。bar = 100um。血清クレアチンキナーゼ活性を測定したところ、未投与mdxマウスに比べ、薬物候補#3や#4投与のmdxマウスでは約半分の値にまで低下した (E)。*p = 0.056 (vs. Cntrl), **p = 0.039 (vs. Cntrl)。

図4：薬物候補#4の単回・反復投与/回復安全性試験における体重変化

3.1~500mg/kgでの単回腹腔内投与後、2週間の体重変化 (A)、62.5~250mg/kgでの2週間連日の反復腹腔内投与とその後3週間の体重変化 (B)。単回投与、反復投与共に体重のみならず、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ず、薬物候補#4の安全性は極めて高い。

図5：アルベカシン投与によるmdxマウス骨格筋のH&E染色像とジストロフィン免疫染色像

2w1mSC, ジストロフィン染色像 (A, C, E), ヘマトキシリン・エオシン染色像 (B, D, F), B10マウス (A, B), 未投与mdxマウス (C, D), アルベカシン投与mdxマウス (E, F)。アルベカシンを連日投与

した*mdx*マウスの筋線維にジストロフィン発現の回復が見られ、その径に大小不同が少なく、結合組織量も少ない傾向が認められる。Bar= 100um

【欧文タイトル】

Therapeutic readthrough strategy for suppression of nonsense mutations in Duchenne muscular dystrophy

【欧文キーワード】

readthrough, nonsense mutations, muscular dystrophy, negamycin, aminoglycoside

【欧文要旨】

Effective treatment for *Duchenne* muscular dystrophy (DMD) is not available yet. Readthrough of disease-causing premature termination codons might alleviate the symptom of genetic diseases caused by nonsense mutations. Several ribosome-binding compounds, including selective antibiotics and synthetic novel small molecules, induce translational readthrough, restoring full-length functional protein. In this article, this innovative therapeutic strategy with a focus on DMD have been summarized.

We previously reported that negamycin restored dystrophin expression with less toxicity than gentamicin in *mdx* mice. In order to explore more potent readthrough inducer, we have established the transgenic mouse for readthrough-specific detection, named READ (Readthrough Evaluation and Assessment by Dual reporter). Using READ mice, we found some drug candidates such as sterically negamycin-like small molecules and aminoglycoside-derivatives. The newly developed sterically negamycin-like small molecules induced dose-dependent readthrough with greater potency than Ataluren *in vitro* and promoted the expression of dystrophin and reduction of serum creatine kinase activity in *mdx* mice. Moreover, aminoglycoside-derivative exhibits both restoration of dystrophin protein and contractile function of *mdx* skeletal muscles by appreciably higher readthrough activity, and lower toxicity than gentamicin. Furthermore, we confirmed the efficacy of a thioglycolate-based depilatory agent to enhance the topical delivery of skin-impermeable drug including aminoglycosides. These promising new chemotherapeutic agents that have a beneficial effect on readthrough action with less toxicity and transdermal delivery may provide significant value in treating or preventing genetic diseases caused by nonsense mutations.

文献

1. Palmer E, Willhelm JM, Sherman F: Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* **277**: 148-150, 1979
2. Burke JF, Mogg AE: Construction of a vector, pRSVcatamb38, for the rapid and sensitive assay

- of amber suppression in human and other mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **13**: 6265-6272, 1985
3. Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM: Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* **2**: 467-469, 1996
 4. Barton ER, Cordiner L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL: Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* **104**: 375-381, 1999
 5. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, et al: Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* **67**: 771-780, 2010
 6. Welch EM, Barton ER, Zhuo J: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**: 87-91, 2007
 7. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, et al: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol* **47**: 430-444, 2007
 8. McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Abresh RT, Nicoroci A, et al: The 6-minute walk test in Duchenne/Becker muscular dystrophy: longitudinal observations. *Muscle Nerve* **42**: 966-974, 2010
 9. Wang B, Yang Z, Brisson BK, Feng H, Zhang Z, et al: Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol* **109**: 901-905, 2010
 10. Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, et al: Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myol* **20**: 154-158, 2001
 11. 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* **134**: 751-758, 2003
 12. Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Floquet C, Shiozuka M, et al: Drug induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes. *J Gene Med* **10**: 217-224, 2008
 13. Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki M, Shimada K, et al: 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
 14. 松田良一, 塩塚政孝, Alex MacKerell ナンセンス変異型遺伝性疾患の治療方法, PCT/JP2007/63436
 15. Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, et al: Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. "Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy" Takeda S. ed., National Center of Neurology and Psychiatry, *in press*
 16. Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, et al.: Improved diagnosis of Becker

muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology* **39**: 1011-1017, 1989

17. Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnés MO, Hashimoto D, et al: Efficient total synthesis of (+)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem Comm* **20**: 2379-2381, 2008

18. 林良雄, 木曾良明, 西口茂信, 松田良一, 塩塚政孝 リードスルー活性を有する化合物及び該化合物を含む医薬組成物, 特願2008-317710

19. Du L, Damoiseaux R, Nahas S, Gao K, Hu H, et al.: Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J Exp Med* **206**: 2285-2297, 2009

20. Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavivsky M, Bellakhov V, Hainrichson M, et al.: Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *J Med Chem* **52**: 2836-2845, 2009

21. Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, et al.: Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem* **18**: 3735-3746, 2010

22. 松田良一, 塩塚政孝, 我妻玲, 高橋良和, 池田大四郎, 他 PCT/JP2011/052263

23. Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R: Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut* **59**: 496-507, 2009

24. Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, et al.: Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* **3**: 1280-1284, 1997

25. Martin R, Mogg AE, Heywood LA, Nitschke L, Burke JF: Aminoglycoside suppression at UAG, UAA and UGA codons in *Escherichia coli* and human tissue culture cells. *Mol Gen Genet* **217**: 411-418, 1989

26. Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, et al: Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop condon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* **48**: 164-169, 2000

27. Namy O, Hatin I, Rousset JP: Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* **2**: 787-789, 2001

bCAGGS



Premature Termination Codon



Fig. 1