

Yue, Y.; Ghosh, A.; Long, C.; Bostick, B.; Smith, B.F.; Kornegay, J.N. & Duan, D. (2008). A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol Ther*, Vol.16, No.12, pp. 1944-1952, ISSN 1525-0016

23章

筋ジストロフィー
モデルマウス

鈴木友子, 武田伸一

筋ジストロフィーとは、筋線維の変性・壊死と再生を繰り返しながら、筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称である。ジストロフィン (dystrophin) の異常で発症するX連鎖劣性のDuchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) が最も頻度が高く、3,500人の男児に1人の頻度で発症する。

dystrophinは骨格筋細胞膜直下の細胞骨格タンパク質で、骨格筋膜上でdystrophin・糖タンパク質複合体を形成しており、その1つdystroglycanは糖鎖を介して基底膜成分のラミニンに結合している(概略図1)。dystrophinのN端は細胞骨格のアクチンと結合しており、細胞骨格と細胞膜をつなぐ役割を担っているため、dystrophinが発現しないと、膜が脆弱になり、筋の収縮・弛緩に伴う機械的ストレスによって骨格筋線維が壊れていくと考えられている。

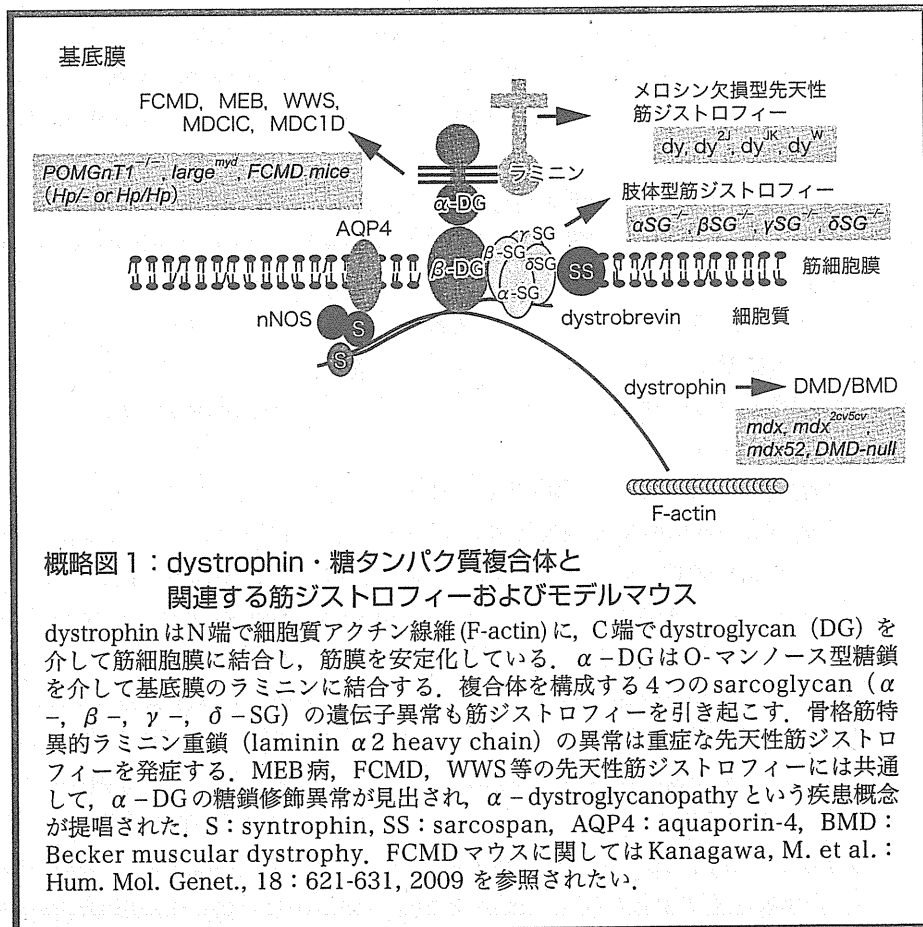
dystrophinと複合体を構成する分子の異常によっても筋ジストロフィーが発症する。骨格筋に発現する4つのsarcoglycan (α , β , γ , δ) のいずれの遺伝子異常でも、sarcoglycanの四量体複合体が膜から消失し、筋ジストロフィーが発症する。ラミニン α 2重鎖に異常があると、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) を発症する。 α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾の異常では脳奇形や眼球異常を合併するWalker-Warburg症候群 (WWS), muscle-eye-brain (MEB) 病, 福山型筋ジストロフィー (FCMD) 等の先天性筋ジストロフィーを発症する(概略図2)。

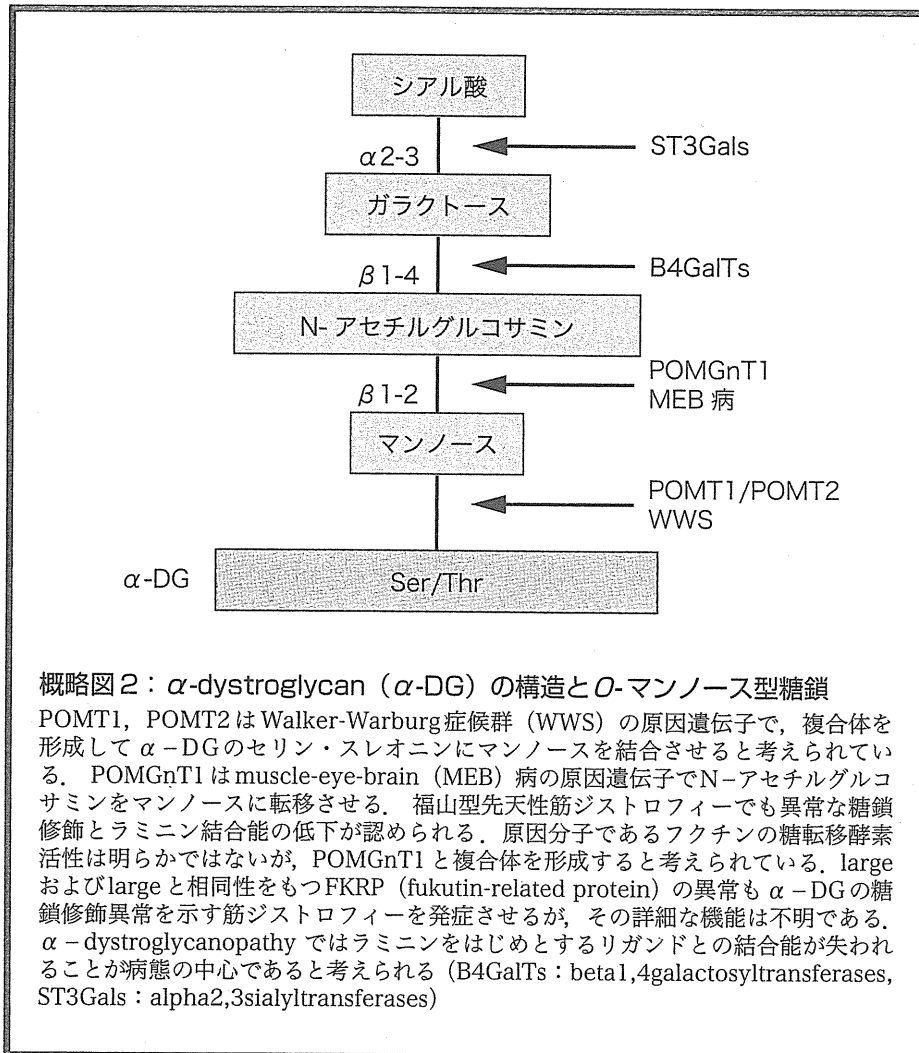
DMDの代表的モデルマウスは*mdx*マウスであるが、筋再生が旺盛で、骨格筋はむしろ肥大しており、筋力低下も軽度であり、治療研究に用いる場合、評価に注意が必要である。*mdx*をdystrophinのautosomal homologue

である utrophin を欠損するマウス (*Utr*^{-/-}) と交配して、あるいは MyoD 欠損マウスと交配して重量化したマウスを用いて、薬剤や遺伝子治療、細胞移植治療の効果を検証する論文も多く発表されている。dystrophin を欠損する筋ジストロフィー犬は DMD 様の重篤な症状を呈しモデルとしては優れているが、症状の個体差が大きく、また維持費用が高額となる。

参考文献

- 1) Willmann, R. et al. : Neuromuscul, Disord., 19 : 241-249, 2009
 ⇒ Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物に関する概説
- 2) Vainzof, M. et al. : Mol Neurosci., 34 : 241-248, 2008
 ⇒ 遺伝性神経・筋疾患のモデル動物に関する概説





Mdx マウス

【系統名】 C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J

【背景系統】 C57BL/10J

【系統の分類】 コアイジェニック系統, ミュータント系, 自然発生変異

【繁殖・維持】 mdx 同士 の 自然 交 配 (homozygote×hemizygote (female×male))

【作製の背景】 自然発生マウス

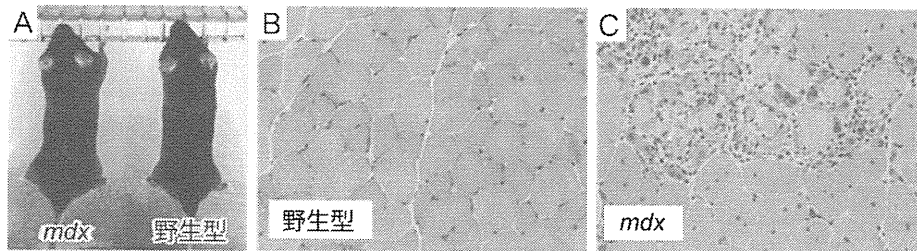
□ 特徴

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) の代表的モデルマウス。DMD 遺伝子のエクソン23の3185番目のCが1塩基置換によりTに置き換わったために終止コドンとなり、全長dystrophinが欠損するが、エクソンスキップによってdystrophin発現が部分復帰したりバートントファイバーがわずかに出現する。生後2～3週から骨格筋の壊死・再生、炎症性細胞の浸潤がみられ、生後10週以降は壊死・変性と再生像が混在する病理像を示す(図)。しかし、DMD患者と異なり、*mdx*では再生能力がよく維持されており、骨格筋の線維化・脂肪化、筋張力の低下が軽度で、野生型マウスと生存期間が17～19%程度しか差がない。例外的に横隔膜の変性・壊死・線維化・脂肪化は進行性である。

N-エチルニトロソウレアによって誘導された変異マウス (*mdx^{2Cv}*-*mdx^{5Cv}*) やDMD遺伝子全体を欠損するマウス³⁾、51番目のエクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入してDMD遺伝子を破壊したマウス (*mdx52*)⁴⁾ も作出されている。これらのマウスの表現型は*mdx*と類似している。

□ 用途

- ・ dystrophin 欠損による筋ジストロフィーの病態研究。
 - ・ DMD に対する薬物治療法・遺伝子治療・細胞移植治療法の開発。
- 治療効果は、筋病理像の改善、血清CK値の低下、筋張力の回復等で検証する。



❖ mdx マウス

A) 8週齢の*mdx*マウスとC57BL/6マウス(♀). 外観では区別が付きにくく, 旺盛な筋再生能力を反映して*mdx*の骨格筋は, むしろ肥大傾向にある. B)とC)は前脛骨筋H.E.染色. *mdx*では小径の筋線維(再生線維), 中心核線維(再生の指標), 細胞浸潤, 壊死線維, 筋径の大小不同が顕著. *mdx*マウスでは筋再生能が比較的良好に保たれており, 脂肪化・線維化はあっても軽度である

□ 入手方法

【入手先】実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>), Jackson研究所 (<http://jaxmice.jax.org/strain/001801.html>; MGI: 1856328), あるいは日本チャールス・リバー社 (<http://www.crj.co.jp>) に注文できる. ライセンス等の制限等特にない. なお, 笹岡俊邦氏(北里大学医学部実験動物学)が, *mdx*マウスをC57BL/6へ戻し交配して得たC57BL/6-*mdx*の凍結受精卵は国立精神・神経医療研究センター神経研究所実験動物管理室 (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_ani/index.html) で維持されている (MTA要).

参考文献

- 1) Spurney, C. F. et al. : Muscle. Nerve., 39 : 591-602, 2009
⇒ Mdxを用いた治療研究の評価方法に関する論文
- 2) Amalfitano, A. et al. : Muscle. Nerve., 19 : 1549-1553, 1996
⇒ ジェノタイピングPCRの条件が記載されている
- 3) Kudoh, H. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 328 : 507-516, 2005
- 4) Areaki, E. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 238 : 492-497, 1997

utrophin・dystrophin・ダブルノックアウト マウス：*mdx; utr^{-/-}*

【系統名】 *mdx; utr^{-/-}*

【背景系統】 C57BL/10

【系統の分類】 コンジェニック系統

【繁殖・維持】 *mdx* と utrophin ノックアウトマウスの交配

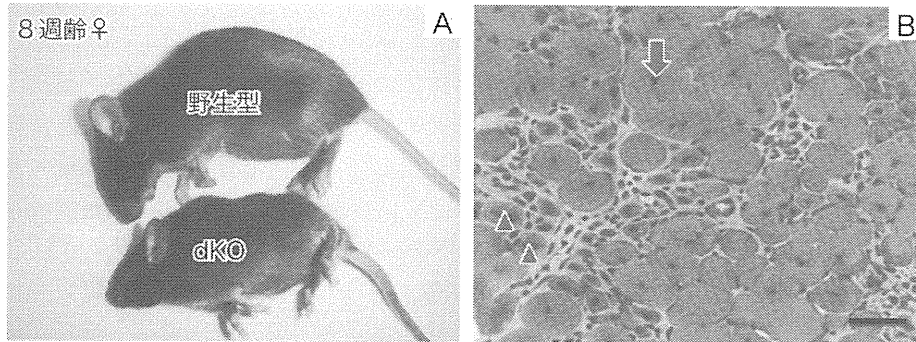
【作製の背景】 utrophin は dystrophin と相同性が高く、アクチンとの結合性、dystrophin 糖タンパク質複合体との結合能を有している。*mdx* マウスの筋線維膜では utrophin が発現増強していることから、*mdx* における dystrophin の欠損を utrophin が代償していると考えられていた。1997年、K. Davies 氏と J. R. Sanes 氏らの2グループが utrophin 欠損型マウスを作製したが、utrophin 欠損マウスは筋ジストロフィーの表現型を呈さなかった。しかし *mdx* マウスと utrophin 欠損型マウスを掛け合わせて *mdx; utr^{-/-}* マウスを作出すると、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者の症状に似た重い表現型を示した。utrophin がある程度 dystrophin の機能を補っていることが証明された

□ 特徴

mdx; utr^{-/-} は生存期間が4～20週であり、重度の筋力低下、体重減少、関節拘縮、脊柱後弯症が著しい(図)。また生後6日頃から横隔膜において筋線維の壊死と線維化が認められる。2週齢から骨格筋において壊死再生がみられるが、4～5週齢までの筋病理は *mdx* マウスと変わらない。しかし、*mdx* と異なり、5週齢以降も壊死・再生が盛んであり、10週齢時には四肢筋において明らかな線維化が生じる。進行の早い、重い表現型は DMD 患者の病態をより反映したモデルマウスであり、治療研究に用いられる。

□ 用途

dystrophin 欠損による筋ジストロフィーの病態研究と DMD に対する薬物治療法・遺伝子治療・細胞移植治療法の開発。



❖ utrophin・dystrophin ダブルノックアウトマウス

A) utrophin・dystrophin ダブルノックアウトマウスと同腹の野生型マウス (8週齢, ♀).
 B) 前脛骨筋の横断切片のH.E.染色像 (×400). 矢印は中心核, マウスでは再生した筋線維の核は長い間, 筋線維の中心に位置する. 矢頭は小径の再生中の筋線維

□ 入手方法

【入手先】 実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>) から入手できる.
 utrophin-null マウスはK. Davies氏のラボで作出したものである

参考文献

- 1) Deconinck, A. E. et al. : Cell, 90 : 717-727, 1997
 ⇒モデルマウスとしての評価と, 交配の方法, ジェノタイピングPCRの条件が掲載されている

ラミニン $\alpha 2$ 重鎖欠損マウス (dy^{3K}/dy^{3K})

【系統名】 dy^{3K}/dy^{3K}

【背景系統】 C57BL/6

【系統の分類】 コンジェニック系統

【繁殖・維持】 ヘテロマウス同士の交配

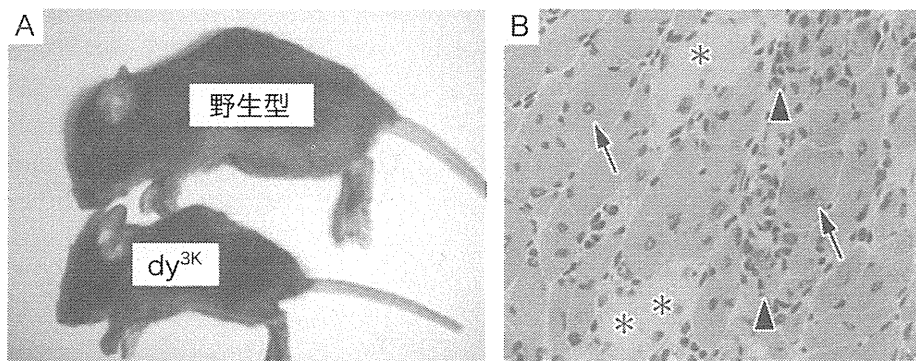
【作製の背景】 ジーンターゲティング法によりラミニン $\alpha 2$ 重鎖遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を挿入して遺伝子を不活化. メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) のモデルマウス

□ 特徴

メロシン欠損ヒト先天性筋ジストロフィー (MDC1A) のモデルマウス。ラミニンは通常 α 鎖 (現在5種類のアイソフォームが知られている), β 鎖 (3種), γ 鎖 (3種) のトリマー構造をしており, 心筋・骨格筋線維・末梢神経の周りにはラミニン $\alpha 2, \beta 1, \gamma 1$ で構成されるラミニン (laminin-211) が存在し, 神経筋接合部にはラミニン $\alpha 2, \beta 2, \gamma 1$ で構成されるラミニン (laminin-221) が存在する。ラミニン $\alpha 2$ 重鎖が完全に欠損する本モデルでは生後2週間以降, 骨格筋の変性・壊死が出現し, 進行が早く, 早期 (生後1~2カ月) に死亡する。従来使用されてきた自然発症の dy/dy マウスでは低レベルであるが, ラミニン $\alpha 2$ 重鎖の発現が認められ, やや筋ジストロフィーの進行が緩やかであるが, 本モデルには発現が全くない。やはり自然発症の dy^{2J}/dy^{2J} マウスではドメインVIを欠く短いラミニン $\alpha 2$ 重鎖が発現し, 軽症。

□ 用途

先天性筋ジストロフィーの病態研究, 薬物・遺伝子・細胞移植治療研究。他のラミニン重鎖の変異マウスや治療効果の期待される遺伝子の過剰発現トランスジェニックマウスとの交配等による機能の解析。



◆ dy^{3K}/dy^{3K} の外観と筋病理

A) 野生型と dy^{3K}/dy^{3K} (雄3週齢)。ホモ個体は小さく, 筋ジストロフィー症状が重く, 後弯が特徴的。B) 前脛骨筋の横断切片のHE染色像。壊死線維 (*), 中心核線維 (→), マクロファージ等の炎症性細胞浸潤 (矢頭)。ラミニン $\alpha 2$ 重鎖の異常による筋変性・壊死は激的で, 急速に筋線維の減少と筋萎縮が進む。

□ 補足

【注意点】メロシンはE. Engvall博士が発見した骨格筋・心筋・シュワン細胞・胎盤・精巣等に特異的に発現するラミニン α 2重鎖を含むラミニンである。ラミニン-2, M-ラミニンと呼ばれることもあるが, 最近の命名法ではラミニン-211, ラミニン-221, ラミニン-213, ラミニン-212, ラミニン-222等に相当すると思われる。餌の与え方を工夫することで, 寿命が多少伸びる

□ 入手方法

【入手先】*dy/dy* マウスは実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>) や Jackson 研究所 (MGI: 1856026) から入手可能。*dy^{3k}/dy^{3k}* マウスは国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部で凍結受精卵を維持している (要MTA) (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html)。

参考文献

- 1) Tomé, F. M. et al. : C. R. Acad. Sci. III., 317 : 351-357, 1994
 →メロシン欠損による先天性筋ジストロフィーのはじめての報告
- 2) Miyagoe, Y. et al. : FEBS. Lett., 415 : 33-39, 1997
 →ラミニン α 2重鎖欠損マウスの作出とマウス表現型の解析

POMGnT1 欠損マウス

- 【系統名】 C57BL/6J Jcl.129/SvJ-*pomgnt1* [POMGnT1 : protein O-linked mannose beta1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase 欠損マウス (*Pomgnt1^{tm1Stk}*)]
- 【背景系統】 C57BL/6J Jcl (戻し交配による)
- 【系統の分類】 コンジェニック系統
- 【繁殖・維持】 heterozygote×heterozygote, ホモ個体は, 生後3週間までに死亡しやすいので, 多めに交配しておくことが必要である
- 【作製の背景】 ES細胞での相同組換えにより *pomgnt1* 遺伝子のエクソン18を含む配列を, ネオマイシン耐性遺伝子を含む配列に置換した

□ 特徴

POMGnT1 遺伝子の変異で先天性筋ジストロフィーと眼奇形、脳の形態形成異常（II型滑脳症）を特徴とする筋・眼・脳病（MEB: muscle-eye-brain disease）が発症する。当モデルではホモ個体は小さく、歩行障害があり、尾を持ち上げると四肢を折り曲げる行動（クラスピング）を示すなど、ホモ個体はすぐに識別できる。血清CK値の上昇や筋線維の壊死などは軽微である。眼球では網膜剥離の増発や網膜血管の走行の乱れ、角膜・水晶体の混濁などが確認されており、MEB病患者の眼奇形と同じく症状の幅が広い。MEB患者と同様に中枢神経系の異常（大脳層構造の乱れ等）があり、小脳では異所性の顆粒細胞が認められる。GFAP染色を行うと、変異マウスでその発現が広い範囲で上昇しており、glial limitans（グリア境界膜）の構造が失われている事が観察される。

□ 用途

MEB病および関連した α -DGの糖鎖異常を原因とする先天性筋ジストロフィーの病態および治療研究。

□ 補足

【注意点】 野性型と比較して体型が小さく、生後数週間までは死亡することが多く、飼育に注意が必要である。それ以降は安定している

□ 入手方法

【入手先】 国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html)

【入手条件】 要MTA

参考文献

- 1) Miyagoe-Suzuki, Y. et al. : Mech. Dev., 126 : 107-116, 2009
⇒筋肉学の観点からPOMGnT1欠損マウスがどんな特徴をもつのか解析した論文
- 2) Liu, J. et al. : Mech Dev., 123 : 228-240, 2006
⇒レトロウイルスベクターが第2エクソンに挿入されているPomgnt1ノックアウトマウスも作出されており、The Mouse Transgenics Core of the Consortium for Functional Glycomics から入手可能である (<https://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoref.shtml>)

Large^{myd} マウス

【系統名】 B6C3Fe a/a-Large^{myd}/J

【背景系統】 B6C3Fe-a/a

【系統の分類】 mutant stock

【繁殖・維持】 homozygous for Large^{myd}×B6C3Fe-a/a hybrid (female×male). 繁殖は, 変異ホモとヘテロでも可能だが, ヘテロ同士の間掛け合わせに比べて, 妊娠率は低下

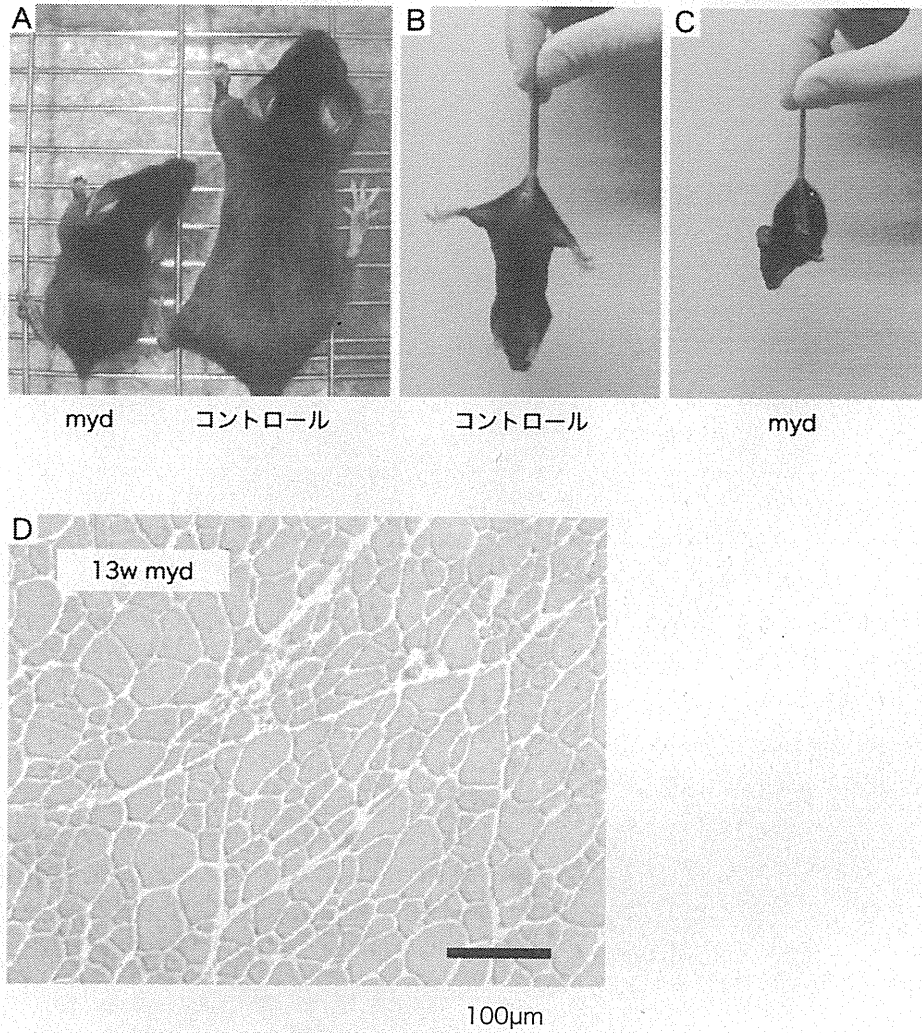
【作製の背景】 自然発症. *large* 遺伝子のエクソン5~7の欠失によるフレームシフト

□ 特徴

myd マウスは, 重症の先天性筋ジストロフィータイプ1D (CMD1D) のモデルマウスであり, 進行性の筋ジストロフィー, 眼の異常, 大脳皮質, 小脳, 海馬での神経細胞の遊走異常と基底膜の亀裂を特徴とする中枢神経系の異常を起こす. muscle-eye-brain病 (MEB病) や福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) 患者と同様に, 骨格筋と脳で α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾低下が観察される. 野生型・ヘテロの同腹マウスよりも小さく, 歩行異常やクラスピングも認められる (図). *large* を過剰発現させると, POMGnT1 や Fukutin が欠損する筋細胞でも α -DG の糖鎖修飾が回復し, マウスでは筋ジストロフィーの表現型が改善することが知られており, 治療への応用が期待される.

□ 用途

α -DG の糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィーの病態研究・治療研究.



❖ myd マウス

A～C) mydと同腹の野生型マウス (5週齢). C) mydは身体が小さく, 尻尾を持ち上げると, 四肢を抱え込むようなクランプがみられる. D) 13週齢mydマウスの骨格筋のHE染色. 筋壊死と再生像, 細胞浸潤, 筋線維の大小不同, 中心核線維等がみられる

□ 補足

【注意点】 *large* のコードするタンパク質はおそらく α -DG の糖鎖修飾に関与すると思われるが、その機能は明らかではない。他に、 α -DG の糖鎖修飾の異常をきたす疾患のモデルマウスとして、POMGnT1-null mice (MEB 病のモデル) や、FCMD 患者の変異を導入したマウスが、作出されており、 α -DG の糖鎖修飾の異常による筋ジストロフィーの病態解明、治療法の開発に用いられる

□ 入手方法

【入手先】 Jackson 研究所 (<http://jaxmice.jax.org/strain/000226.html>; MGI: 1856965), あるいは日本チャールス・リバー社 (<http://www.crj.co.jp/>) から入手可能。特にライセンス等の制限なし

参考文献

- 1) Grewal, P. K. et al. : Nat. Genet., 28 : 151-154, 2001
⇒ *myd* マウスの異常が *large* 遺伝子であることを報告
- 2) Holzfeind, P. J. et al. : Hum. Mol. Genet., 11 : 2673-2687, 2002
⇒ *Large^{myd}* の表現型と糖鎖異常の解析
- 3) Michele, D. E. et al. : Nature, 418 : 417-422, 2002
⇒ *Large^{myd}* の表現型と糖鎖異常の解析

β -sarcoglycan ノックアウトマウス (BSG-KO (C57BL/6J))

【系統名】 B6.129S4-Sgcb<tm1Oza>, 理研 BRC 系統番号 #RBRC02268

【系統の分類】 戻し交配および戻し交配後の兄妹交配

【背景系統】 C57BL/6JJcl

【作製の背景】 129/SvJ 系統の J1 ES 細胞を用いて、標的遺伝子組換え法により欠損マウスを作製し、C57BL/6JJcl 系統に 10 世代以上戻し交配を行った

□ 特徴・注意点

dystrophin 複合体の構成分子の β -sarcoglycan の欠損マウス。ホモ変異マウスは、筋力低下、筋肥大、骨格筋と心筋に著しい筋壊死と再生を伴う筋ジストロフィーの所見を示す。

□ 用途

肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2E) の病態解明, 治療方法開発の基礎研究. 脳神経系における機能の解明研究.

参考文献

- 1) Araishi, K. et al. : Hum. Mol. Genet., 8 : 1589-1598, 1999
⇒ β -sarcoglycan 欠損マウス作出
- 2) Yoshida, M. et al. : Hum. Mol. Genet., 9 : 1033-1040, 2000
- 3) 理研バイオリソースセンターの本モデルのページ (http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02268&skey=%BA%FB%B2%AC&keito=&dna=&brcno=)

γ -sarcoglycan ノックアウトマウス (GSG-KO (C57BL/6J))

【系統名】 B6.129S4-Sgca^{tm1Oza}, 理研BRC系統番号 #RBRC02269

【系統の分類】 戻し交配および戻し交配後の兄妹交配

【背景系統】 C57BL/6JJcl

【作製の背景】 129/SvJ系統のJ1 ES細胞を用いて, 標的遺伝子組換え法により欠損マウスを作製し, C57BL/6JJcl系統に10世代以上戻し交配を行った

□ 特徴・注意点

dystrophin 複合体の構成分子の γ -sarcoglycan の欠損マウス。ホモ変異マウスは、筋力低下、筋肥大、骨格筋と心筋に著しい筋壊死と再生を伴う筋ジストロフィーの所見を示す。

□ 用途

肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2C) の病態解明, 治療方法開発の基礎研究.

参考文献

- 1) Sasaoka, T. et al. : Neuromuscular Disorders, 13 : 193-206, 2003
⇒ γ -sarcoglycan マウス表現型の詳細
- 2) 理研パイオリソースセンターの本モデルのページ (http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02269&skey=%BA%FB%B2%AC&keito=&dna=&brcno=)

caveolin-3 ノックアウトマウス

【系統名】 cav3-KO/B6 (177) (B6/Jに戻し交配10世代). B6.129S4-Cav3<tm1Ncnp>, 理研BRC系統番号 #RBRC02374

【系統の分類】 戻し交配および戻し交配後の兄妹交配

【背景系統】 C57BL/6JJcl

【作製の背景】 129/SvJ系統のJ1 ES細胞を用いて, 標的遺伝子組換え法により欠損マウスを作製し, C57BL/6JJcl 系統に10世代以上戻し交配を行った

□ 特徴・注意点

dystrophin複合体の構成分子のcaveolin-3の欠損マウス. ホモ変異マウスは, 骨格筋に筋壊死と再生を伴う筋ジストロフィーの所見を示す. 骨格筋のカベオラ構造の減少を示す.

□ 用途

筋ジストロフィーの病態解明，治療方法開発の基礎研究．心臓における標的遺伝子の機能解明研究．

参考文献

- 1) Hagiwara, Y. et al. : Hum. Mol. Genet., 9 : 3047-3054, 2000
⇒マウスの作出に関する論文
- 2) 理研バイオリソースセンターの本モデルのページ (http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02374&skey=%BA%FB%B2%AC&keito=&dna=&brcno=)

ADVANCES IN MOLECULAR THERAPY RESEARCH ON DYSTROPHIN-DEFICIENT MUSCULAR DYSTROPHY*

TAKASHI OKADA^{†,§} and SHIN'ICHI TAKEDA^{†,§}

*Department of Molecular Therapy
National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology and Psychiatry
Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan*

[†]t-okada@ncnp.go.jp

[‡]takeda@ncnp.go.jp

Received 28 June 2010

Revised 31 August 2010

Accepted 1 September 2010

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal muscle disorder caused by mutations of the *DMD* gene, which encodes a 427-kDa spectrin-like cytoskeletal protein, dystrophin. Exon skipping induced by antisense oligonucleotides is a novel method to restore the reading frame of the mutated *DMD* gene and rescue dystrophin expression. We recently demonstrated that systemic delivery of antisense phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs) targeting exons 6 and 8 of the canine *DMD* gene efficiently recovered functional dystrophin at the sarcolemma of dystrophic dogs, and improved performance of the affected dogs without serious side effects. As a strategy to target hot spots of mutation in the *DMD* gene, we also tried exon 51-skipping using PMOs in *mdx52* mice to convert an out-of-frame mutation into an in-frame mutation with restoration of dystrophin expression in various muscles and improvement of pathology and function. Progress in adeno-associated virus vector serotype 9 (AAV-9)-mediated *DMD* gene therapy has enabled the delivery of the therapeutic gene to the whole musculature, including cardiac muscle, while evoking minimal immunological reactions in mice, dogs, and non-human primates. Furthermore, DMD-derived patient-specific induced pluripotent stem (iPS) cells could be a potential source for cell therapy, although there are at present hurdles to be overcome. In the future, this technology could be used in combination with exon skipping or AAV-mediated gene therapy to achieve clinical benefits.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; exon skipping; AAV vector; iPS cells.

Duchenne Muscular Dystrophy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common form of childhood muscular dystrophy. DMD is an X-linked recessive disorder with an incidence of 1 in

*Invited review article.

§Corresponding author.

3500 live male births (Emery, 1991). DMD causes progressive degeneration and regeneration of skeletal and cardiac muscles due to mutations in the dystrophin gene, which encodes a 427-kDa subsarcolemmal cytoskeletal protein (Hoffman *et al.*, 1987). DMD is associated with severe, progressive muscle weakness and typically leads to death between the ages of 20 and 35 years. Due to recent advances in respiratory care, much attention is now focused on treating the cardiac conditions suffered by DMD patients. Although various new therapeutic strategies, including new drug design, gene therapy and cell therapy, have been proposed, no effective treatment has yet been established (Table 1).

Impact of Exon-Skipping Therapy

Exon-skipping therapy is detailed in our previous reviews (Nakamura and Takeda, 2009; Miyagoe-Suzuki and Takeda, 2010). Here, we present an overview of the most specific impact of our approach. Dystrophin is essentially missing at the sarcolemma in DMD, although some dystrophin-positive fibers, called revertant fibers, are present. The number of revertant fibers increases with age due to the cycle of degeneration and regeneration (Wilton *et al.*, 1997). It is currently thought that the molecular mechanism underlying the revertant fibers is the skipping of the exon

Table 1. Clinical trials for DMD/BMD.*

Category	Drug/Genetic	Phase (ClinicalTrials.gov)
Drug interventions	Myostatin blocker	
	MYO-029	Completed; not effective
	Read-through	
	PTC124	Completed; not effective (Phase IIb)
	Gentamicin	Completed; not effective
	Others	
	Pentoxifylline	Completed; not effective
	Idebenone	Phase III
	Ramipril vs. Carvedilol	Phase VI
	CoQ10 and prednisone	Phase III
Gene therapy	Coenzyme Q10 and lisinopril	Phase II/III
	Debio-025 (cyclosporine analogue)	Phase IIb
	Exon skipping (systemic delivery)	
	PRO051 (21'-O-MePS AO)(exon 51 skipping)	Phase III
	PRO044 (2'-O-MePS AO)(exon 44 skipping)	Phase I/II
Cell therapy	AVI-4658 (PMO)(exon 51 skipping)	Phase IIb
	AAV vector	
	rAAV2.5-CMV-Mini-Dystrophin	Phase I
	Satellite cells (myoblasts)	Pending
	Mesoangioblasts	In preparation
	Mesenchymal stem cells	Ongoing
	Induced pluripotent stem (iPS) cells	Experimental

*Detailed information can be retrieved by using a registry of the clinical trials conducted in the United States and around the world (<http://www.clinicaltrials.gov>).

around the original mutation, which gives rise to the correction of the reading frame and expression of dystrophin. Consequently, exon skipping has attracted attention as a strategy for restoration of dystrophin expression in DMD. To induce skipping of specific exons during mRNA splicing, antisense oligonucleotides (AOs) against exonic and intronic splicing regulatory sequences have been generated. This use of these AOs has been shown to correct the open reading frame of the DMD gene and thus to restore truncated yet functional dystrophin expression *in vitro* (Takeshima *et al.*, 1995). In order to overcome the unstable disposition of single-stranded DNA or RNA, the AOs were designed using various chemical modifications of natural nucleic acid structure (Fig. 1).

Intravenous infusion of an antisense phosphorothioate oligonucleotide created an in-frame dystrophin mRNA via exon skipping in a 10-year-old DMD patient possessing an out-of-frame exon 20 deletion of the *dystrophin* gene (Takeshima *et al.*, 2006). Also, the adverse-event profile and local dystrophin-restoring effects of a single intramuscular injection of an antisense 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide (2OMeAO), PRO051, in patients with DMD were explored (Table 1). Four patients received a dose of 0.8 mg of PRO051 in the tibialis anterior (TA) muscle. Each

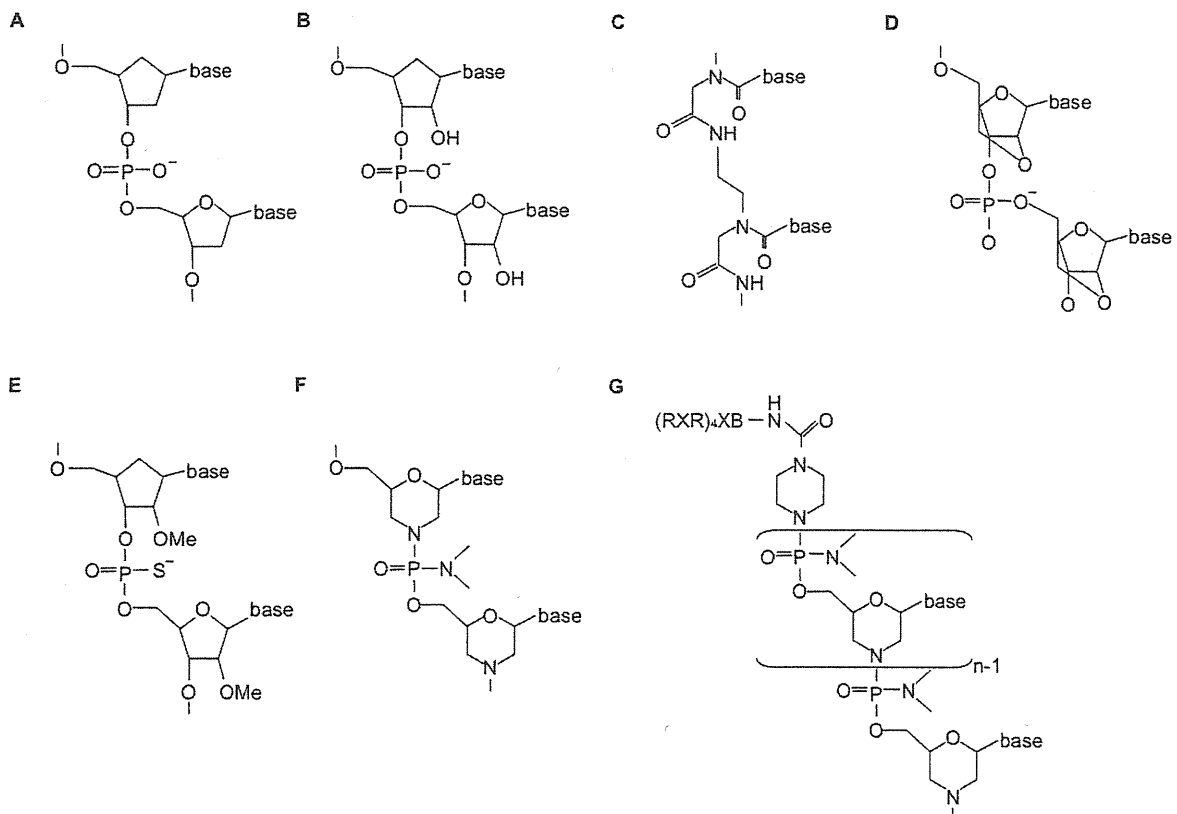


Fig. 1. Nucleic acid variations used for exon skipping. (redrawn from Nakamura and Takeda, 2009, with modifications). A, DNA; B, RNA; C, peptide nucleic acid; D, ethylene-bridged nucleic acid; E, 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide; F, phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO); G, peptide-linked PMO (PPMO).