

the idea based on dystrophin Kobe, in which exon 19 is naturally skipped due to a 52-bp deletion within the exon<sup>8)9)</sup>.

Then, some experiments were carried out in cells from patients and a mouse model to demonstrate the feasibility of exon skipping. Two groups studied cultured muscle cells from the *mdx* mouse<sup>10)11)</sup>, which carries a nonsense point mutation in the in-frame exon 23<sup>12)13)</sup>. In both studies, skipping of exon 23 maintained the reading frame, at least at the RNA level as demonstrated by reverse transcription PCR. Another group showed restoration of dystrophin at the protein level after exon 46 skipping in cultured muscle cells from two DMD patients with an exon 45 deletion<sup>14)</sup>. These seminal reports paved the way for many other studies conducted in patient-derived cell cultures<sup>8)-14)</sup>. These, and numerous *in vivo* studies in DMD animal models (described below), have convincingly demonstrated the therapeutic potential of exon skipping<sup>15)-18), 25)26)</sup>.

### 1 ) Mdx mice

In experiments performed by Mann, et al<sup>15)</sup> and Lu, et al<sup>16)</sup>, 2'OMePS with the non-ionic polymer F127 were injected into the tibialis anterior muscles of *mdx* mice. The sequences of the 2'OMePS were complementary to the mouse *Dmd* exon/intron 23 boundary region. Dystrophin expression, with its correct subsarcolemmal cellular localization, was restored in 20% of the muscle fibers. Moreover, this led to the expression of DGC components and improved isometric force. Furthermore, systemic administration of the 2'OMePS with F127 revealed that dystrophin was expressed in the skeletal muscle of the whole body except the heart. There was no toxicity arising from the 2'OMePS. However, there were still two hurdles remaining : firstly, F127 was required to administer 2'OMePS into the muscle ; and secondly, dystrophin expression did not reach a therapeutic level.

Later, phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs), the new generation of antisense oligonucleotides (**Fig. 1**), were administrated into *mdx* mice<sup>17)18)</sup>. PMOs have morpholine rings instead of deoxyribose rings in DNA or ribose rings in RNA, and the morpholine rings bind to each other through phosphorodiamidate instead of phosphoric acid. PMOs are non-ionic, which minimizes protein interactions and nonspecific antisense effects, and they have several advantages over 2'OMePS such as high solubility in water and a high binding capacity to mRNA. Systemic induction of dystrophin expression was observed by PMO administration and it reached a useful level in skeletal muscle throughout the whole body except the cardiac muscle. One limitation of PMO-mediated exon-skipping therapy is that cardiac muscle cannot easily take up PMOs. Recently, to improve the uptake of PMOs

by cardiocytes, peptide-tagged PMOs (PPMOs ; Fig. 1) and octa-guanidine PMOs (Fig. 1) were developed. PPMOs are covalent conjugates of PMOs with cell-penetrating peptides such as  $\beta$ -alanine (B),  $\beta$ -arginine (R), or 6-aminohexane (X)<sup>19)</sup>. On the other hand, octa-guanidine PMOs are PMOs coupled with eight guanidinium head groups on dendrimer scaffolds that enable delivery into cells<sup>20)-22)</sup>. Both types of modified PMOs have been demonstrated to be more effective than native PMOs in inducing exon skipping in cardiac muscle after intravascular injection<sup>19)21)</sup>. However, there are potential concerns that PPMOs might elicit an immune response or demonstrate toxicity compared with PMOs because of the protein moiety.

## 2) Canine X-linked muscular dystrophy (CXMD<sub>J</sub>)

Golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs are characterized by progressive skeletal muscle weakness and atrophy, and carry a point mutation at the intron 6 splice acceptor site in the canine *DMD* gene. However, these dogs are too large to be maintained conveniently. Thus, we have developed a strain of medium-sized dystrophic Beagle dogs (canine X-linked muscular dystrophy in Japan ; CXMD<sub>J</sub>) at the National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, by artificial insemination of frozen GRMD semen<sup>23)24)</sup>. The mutation leads to skipping of exon 7, which leads to a premature stop codon in exon 8. As a result, no dystrophin is produced in the affected muscles. Recently, we reported systemic administration of a cocktail of three PMOs targeting exons 6 and 8 to restore in-frame dystrophin in CXMD<sub>J</sub> dogs<sup>25)</sup>. We showed that dystrophin was restored in the skeletal muscle of the entire body. The motor ability of treated dystrophic dogs was also improved with no side effects. This is the first report that multi exon skipping is feasible and effective in improving performance of dystrophic animals *in vivo*. However, the expression of dystrophin in cardiac muscle was not observed in CXMD<sub>J</sub> dogs, even at high doses, the same as in *mdx* mice<sup>25)</sup>.

## 3) Mdx52 mice

The particular mutations found in the *mdx* mouse and CXMD<sub>J</sub> dog are very rare in humans. Since there is a significant genetic heterogeneity among patients with DMD, it will be necessary to target the mutational hotspots in the *DMD* gene for providing exon-skipping therapy to more patients. For instance, effective skipping of exon 51 could treat 13% of all DMD patients according to the Leiden muscular dystrophy database (<http://www.dmd.nl>). Fortunately, the *mdx52* mouse exists, in which exon 52 of the murine *Dmd* gene was deleted

by homologous recombination, leading to a lack of dystrophin and dystrophic changes with muscle hypertrophy. Using this mouse, we conducted a preclinical study of exon 51 skipping. We systemically delivered PMO into *mdx52* mice, seven times at weekly intervals. This induced 20–30% of wild-type dystrophin expression levels in the muscles of the whole body, and was accompanied by amelioration of the dystrophic pathology and improvement in skeletal muscle function<sup>26)</sup>.

#### 4 . Proof-of-concept of exon skipping in DMD patients

---

Following these studies of AONs *in vivo*, which demonstrated dystrophin expression and functional restoration, two groups in Europe have started to demonstrate the proof-of-concept in DMD patients. However, to use this therapy in a clinical trial for DMD, there was an important issue that had to be addressed. Normally, a small group of healthy volunteers would be selected to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics. However, because this therapy produces out-of-frame dystrophin in normal individuals, a clinical trial in healthy volunteers was not possible from a safety point of view. Therefore, the two groups conducted phase I clinical trials of exon 51-skipping in DMD patients in whom skipping of this exon could restore an in-frame and functional dystrophin protein. The Dutch group chose a 20-mer 2'OMePS (PRO051)<sup>27)</sup>. Four DMD patients received 0.8 mg of PRO051 injected into the tibialis anterior muscle. A biopsy performed 28 days later revealed restoration of subsarcolemmal dystrophin in 64–97% of the myofibers in each patient<sup>27)</sup>. Furthermore, PRO051 did not evoke any clinically apparent side effects.

On the other hand, a British group collaborating with AVI Biopharma selected a 30-mer PMOs (AVI-4658)<sup>28)</sup>. A single administration of AVI-4658 was injected unilaterally into the extensor digitorum brevis of seven patients, in a single-blind, dose-escalation study that included a placebo control administered to the contralateral same muscle. AVI-4658 successfully restored the expression of dystrophin at the higher dose (0.9 mg) received by five of the seven patients. No adverse events related to AVI-4658 were observed<sup>28)</sup>. These two studies have demonstrated the proof-of-concept of exon skipping for DMD patients.

#### 5 . Application of AON therapy for other neuromuscular diseases

---

The attempts at antisense therapy in DMD provide a useful platform to develop

experimental therapies for other neuromuscular diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), spinal muscular atrophy (SMA), and myotonic dystrophy type 1 (DM1)<sup>29)</sup>. Recently, ISIS Pharmaceuticals, a company focused on clinical applications for AONs, began a phase I study in familial ALS patients with a superoxide dismutase 1 (*SOD1*) mutation, attempting to knock down the mutant *SOD1* gene that causes disease<sup>30)</sup>.

### 1 ) Spinal muscular atrophy

SMA is an autosomal recessive neuromuscular disease characterized by degeneration of lower motor neurons, with resulting progressive muscle weakness. The clinical phenotype and disease severity can be varied. Absence of the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene is the cause of SMA ; however, its severity is mainly correlated with the copy number of the SMA modifier gene *SMN2*, which is nearly identical to *SMN1* but has a single nucleotide replacement<sup>31)</sup>. One *SMN2* copy produces only 10-20% of full-length protein identical to *SMN1*, whereas the remaining *SMN2* transcripts aberrantly splice out exon 7 because of a silent mutation within an SF2/ASF-binding site, resulting in a truncated, unstable version of the SMA protein. Therefore, exon inclusion, not skipping, in exon 7 of *SMN2* would be required for a therapeutic effect in SMA<sup>32)33)</sup>. Enhancing exon 7 inclusion within the *SMN2* pre-mRNA is predicted to result in more full-length SMN protein being expressed. AON-mediated inhibition of the intronic splice silencer site in intron 7 of the *SMN2* gene did affect pre-mRNA processing, leading to exon 7 inclusion in the mRNA and resulting in increased production of normal SMN protein<sup>34)</sup>. Thus, this approach has a therapeutic potential for SMA and other diseases caused by mutations that disrupt SF2/ASF-binding sites or induce exonic splicing silencers.

### 2 ) Myotonic dystrophy type 1

DM1 is the most common adult form of muscular dystrophy. Unlike any of the other muscular dystrophies, the muscle weakness is accompanied by myotonia (delayed relaxation of muscles after contraction) and by a variety of abnormalities in addition to those of muscle. DM1 is caused by an RNA gain-of-function due to an expanded CUG repeats in the 3'untranslated region of the dystrophin myotonia-protein kinase gene. Because the interaction of muscleblind-like 1 (MBNL1) protein with the expanded CUG repeat contributes to aberrant pre-mRNA splicing and pathogenesis in DM1 patients, Wheeler, et al. administered a 25-mer PMO (CAG25) complementary to the CUG repeat to *HSA*<sup>LR</sup> mice, which express high amounts of expanded CUG<sub>250</sub> repeats in the context of the skeletal  $\alpha$ -

actin gene and show similar patterns of aberrant alternative splicing to those seen in DM1 patients. Treatment of skeletal muscle redistributed the MBNL1 protein from nuclear RNA foci and normalized the aberrant splicing regulation, resulting in improved ion channel function and minimization of skeletal muscle myotonia<sup>35</sup>). Thus, this approach has therapeutic potential for DM1 and possibly other diseases caused by triplet repeat expansion such as spinocerebellar atrophy or Huntington disease.

## 6. Conclusions

---

Approximately 140 years after the first description of DMD patients and almost 25 years after the identification of dystrophin, a promising therapy for DMD patients is now emerging. The results of two recent phase I clinical trials in DMD patients are highly encouraging. Over the next few years, treatments specific to DMD will likely become available. Although additional basic and translational studies are required to develop safer and more effective treatment strategies, this therapy may have broad application for other neuromuscular diseases.

## References

---

- 1) Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations : one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003 ; 2 : 731-740.
- 2) Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP, Kunkel LM. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature.* 1987 ; 330 : 754-758.
- 3) Bushby K, Muntoni F, Bourke JP. 107th ENMC international workshop : the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2003 ; 13 : 166-172.
- 4) Emery A. E. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002 ; 359 : 687-695.
- 5) van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 ; 4 : 774-783.
- 6) Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping : a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA.* 2007 ; 13 : 1609-1624.
- 7) Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 ; 90 : 8673-8677.
- 8) Matsuo M, Masumura T, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, Nishio H, et al. A very small frameshifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 ; 170 : 963-967.
- 9) Matsuo M, Masumura T, Nishio H, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, et al. Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. *J Clin Invest.* 1991 ; 87 : 2127-2131.
- 10) Duncley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, Dickson G. Modification of splicing in the

- dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet.* 1998 ; 7 : 1083-1090.
- 11) Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, et al. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord.* 1999 ; 9 : 330-338.
  - 12) Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 ; 81 : 1189-1192.
  - 13) Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse : a point mutation. *Science* 1989 ; 244 : 1578-1580.
  - 14) van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, Ginjaar IB, Baas F, den Dunnen JT, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet.* 2001 ; 10 : 1547-1554.
  - 15) Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, Ly T, Lloyd F, Fletcher S, et al. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 ; 98 : 42-47.
  - 16) Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med.* 2003 ; 9 : 1009-1014.
  - 17) Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Wilton SD. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J Gene Med.* 2006 ; 8 : 207-216.
  - 18) Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Steinhaus JP, et al. Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse. *Mol Ther.* 2007 ; 15 : 1587-1592.
  - 19) Wu B, Moulton HM, Iversen PL, Jiang J, Li J, Li J, et al. Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 ; 105 : 14814-14819.
  - 20) Jearawiriyapaisarn N, Moulton HM, Buckley B, Roberts J, Sazani P, Fucharoen S, et al. Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Mol Ther.* 2008 ; 16 : 1624-1629.
  - 21) Yin H, Moulton HM, Seow Y, Boyd C, Boutilier J, Iverson P, et al. Cell penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum Mol Genet.* 2008 ; 17 : 3909-3918.
  - 22) Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 2009 ; 17 : 864-871.
  - 23) Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, et al. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD),” *Experimental Animals*, vol. 52, no. 2, pp93-97, 2003.
  - 24) Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology.* 2009 ; 29 : 494-501.
  - 25) Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol.* 2009a ; 65 : 667-676.
  - 26) Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S. In-frame Dystrophin Following Exon 51-Skipping Improves Muscle Pathology and Function in the Exon 52-Deficient mdx Mouse. *Mol Ther.* 2010 ; 18 : 1995-2005.
  - 27) van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007 ; 357 :

2677-2686.

- 28) Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy : a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2009 ; 8 : 918-928.
- 29) Wood MJ, Gait MJ, Yin H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain.* 2010 ; 133 : 957-972.
- 30) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, Wancewicz EV, Bennett CF, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2006 ; 116 : 2290-2296.
- 31) Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 1997 ; 16 : 265-269.
- 32) Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* 2007 ; 5 : e73.
- 33) Singh NN, Shishimorova M, Cao LC, Gangwani L, Singh RN. A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biol.* 2009 ; 6 : 341-350.
- 34) Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet.* 2008 ; 82 : 834-848.
- 35) Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, Osborne RJ, Lin X, Dirksen RT, et al. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science.* 2009 ; 325 : 336-339.

# プラセボ効果

placebo effects

## はじめに

「プラセボ」とは、包装、味、におい、感触、形、色および大きさ等の、外観上では実薬との識別が不可能で、薬理活性をもたないものことである。「プラセボ効果」は、治療効果にかかわらず治療を受けていることに対する正の反応、つまり好ましい反応を意味する。プラセボ効果とは逆に負の反応については、「ノセボ効果 (nocebo effect)」という造語が用いられることもある。手術に対するプラセボは基本的には存在しないため、主に薬剤に限定される。

臨床試験におけるプラセボの役割は薬効評価のための対照と盲検化である。プラセボ対照比較試験では、プラセボ群を対照として、被験薬とプラセボ群の効果の差 (effect size) を検討し、被験薬の有効性および安全性が推定される。近年は薬効評価を目的とした臨床試験の成績からも、プラセボ反応性自体に関するエビデンスも蓄積されつつある。また医療者が日常診療でプラセボを使用したことのある割合が高いことは複数で報告されており、プラセボ効果は身近な問題である。本項では臨床試験におけるプラセボの諸問題とエビデンスを取り上げ、日常診療での留意点について解説する。

## 臨床試験におけるプラセボとその効果

### プラセボを使用することの倫理性

臨床試験におけるプラセボの使用に関する倫理性はヘルシンキ宣言が基本となり、確立された治

療方法が存在しない場合や対象となる治療方法の有効性および安全性を検討するために科学的に必要な場合での使用に制限される。新薬の有効性および安全性を検討する治験等においては有効性および安全性を科学的に証明することが重要であることはいうまでもない。ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 日米 EU 医薬品規制調和国際会議) E10 ガイドライン<sup>1)</sup>では、うつ病や不安障害 (原文では「anxiety」) はプラセボに対する反応性が一定しないことが説明されており、そして、厚生労働省や欧州医薬品審査庁 (European Medicines Agency: EMA) が取りまとめた精神疾患領域の臨床試験ガイドライン<sup>2-4)</sup>でもプラセボ対照比較試験の必要性が具体的に説明されている。

### プラセボ反応性に関するエビデンス

プラセボ反応性は精神疾患ごとに異なり、特にうつ病や不安障害等ではプラセボ反応性が高いことが知られている (図 1)。これらの疾患領域の臨床試験では高いプラセボ反応性が effect size に影響し、プラセボに対する優越性を示すことは容易ではないことも報告<sup>6)</sup>されており、その大きさは無視できないものである。

一般的に、プラセボ効果は心理学的影響ととらえられがちであるが、神経疾患、心血管機能、呼吸器機能、消化器機能、免疫機能や内分泌機能等の広範な身体機能への影響も認められること<sup>7)</sup>から、その効果は心理学的影響にとどまらない。つまり、プラセボ効果には、臨床試験や治療環境下



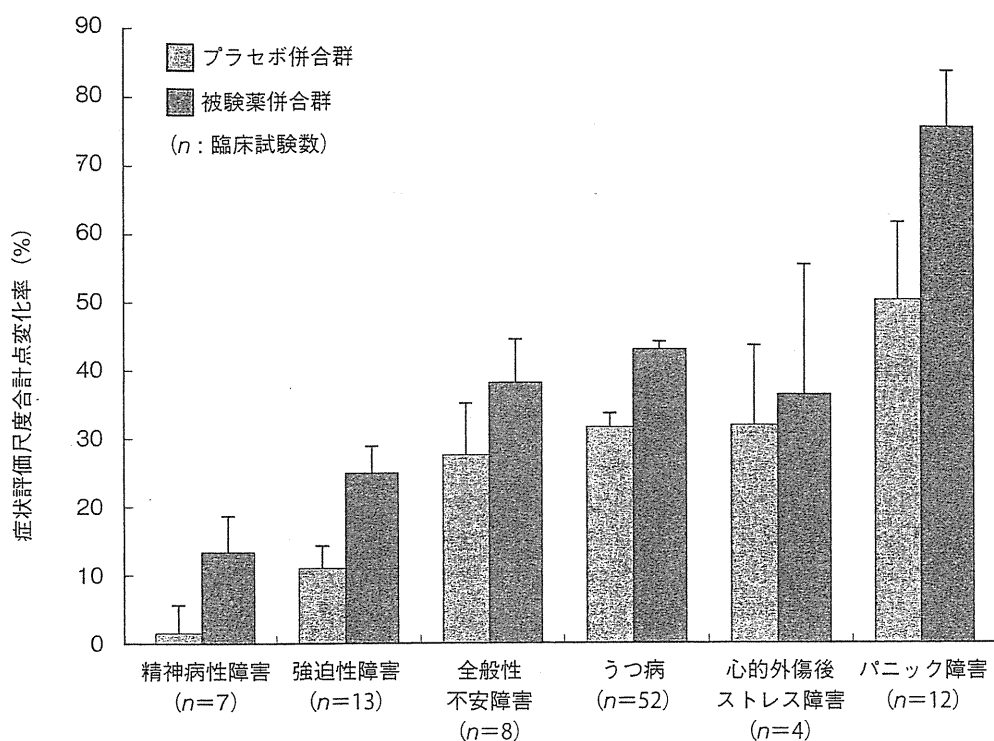


図1 疾患領域ごとのプラセボと被験薬の反応性

(Khan A, et al. *Psychol Med* 2005<sup>9)</sup>)

に入ったことで患者自身が食事や睡眠などの生活習慣を改善すること等の影響も含まれ<sup>8)</sup>, その機序は明確になっておらず, 患者ごとに異なるもので単純ではない。また, プラセボ反応性は個々の患者において異なり, これを識別する方法に乏しいだけでなく, 同一の患者においてもその反応性が変化することも知られている<sup>8)</sup>。そして, 抗うつ薬と薬効が期待できない少量の薬物を陽性プラセボとして投与された臨床試験のメタ解析では, 抗うつ薬と陽性プラセボの間での効果の差はきわめて小さいことが示されており<sup>9)</sup>, 実際はプラセボ効果の程度をとらえることが困難な場合があることを示唆している。

### プラセボ反応性に関するエビデンスの日常診療への応用

精神疾患領域の日常診療においても, 薬物療法の直接的な効果のほかに, 治療に対する知識, 社会心理学的要因や生活習慣等が影響することは

うまでもない。プラセボに関するエビデンスは, 精神疾患領域のプラセボ対照比較試験の投与期間が6~8週間<sup>2-4)</sup>であることが多く, 短期的効果に限定されることなど, エビデンスとしての限界はあるが, 前述したエビデンスからも臨床においては以下の点を考慮する必要があると思われる。

- ・社会心理学的影響や環境的要因等の薬物以外の影響の程度は各精神疾患ごとに異なることを考慮して, 病態を評価する必要がある。
- ・薬物療法以外の影響の程度を評価することは困難なこともあるが, 種々の要因が影響することもふまえて, 特に治療が奏効しない場合では, 病態としてのさまざまな可能性について検討する必要がある。
- ・以上の評価をもとに, 薬物療法と非薬物療法のバランスを含む治療戦略を検討する必要がある。

### まとめ

プラセボ効果は身近な問題であるが, その特徴

や機序は単純ではない。うつ病や統合失調症等の精神疾患領域の治療の中心は薬物療法であるが、プラセボ反応性に関するエビデンスからも、日常診療においては個々の患者の病態を適切に評価し治療戦略を決定していく必要があると考える。

(中林哲夫)

## ■文献

- 1) 厚生省医薬局審査課長. 「臨床試験における対照群の選択とそれに関連する諸問題」について. 医薬審発第136号, 平成13年2月27日.
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「抗うつ薬の臨床評価方法に関するガイドライン」について. 薬食審査発1116第1号, 平成22年11月16日.
- 3) European Medicines Agency. Note for Guidance on Clinical Investigation of Medical Products in the Treatment of Depression. Doc. Ref. CPMP/EWP/518/97, Rev. 1 : 2002. available online at <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ewp/051897en.pdf>
- 4) European Medicines Agency. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Treatment of Schizophrenia. Doc. Ref. CPMP/EWP/559/95, 1998. available online at <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ewp/055995en.pdf>
- 5) Khan A, et al. Magnitude of placebo response and drug-placebo differences across psychiatric disorders. *Psychol Med* 2005 ; 35 : 743-749.
- 6) Finnis DG, et al. Biological, clinical, and ethical advances of placebo effects. *Lancet* 2010 ; 375 : 686-695.
- 7) Benedetti F. Placebo Effect. Understanding the Mechanisms Health and Disease. Oxford : Oxford University Press ; 2009.
- 8) Laughren TP. The scientific and ethical basis for placebo-controlled trials in depression and schizophrenia : An FDA perspective. *Eur Psychiatry* 2001 ; 16 : 418-423.
- 9) Moncrieff J, Wessely S, Hardy R. Active placebos versus antidepressants for depression. *Cochrane Database Syst Rev* 2004 ; (1) : CD003012.

## 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。

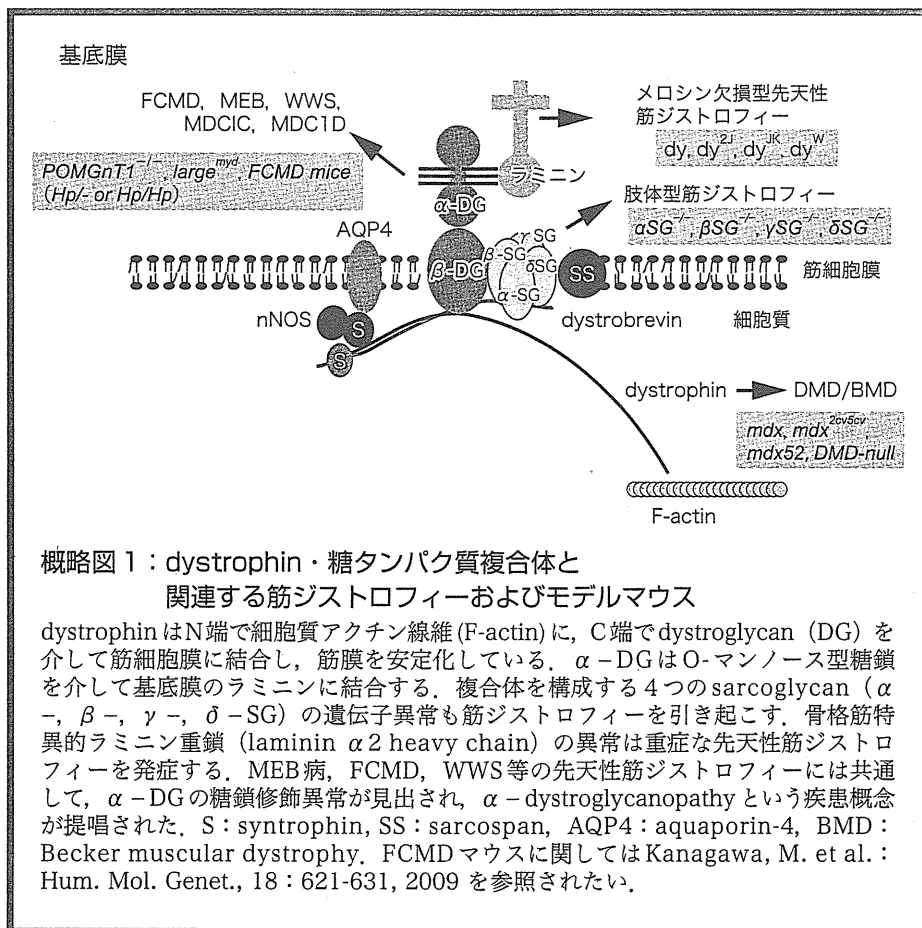
dystrophinと複合体を構成する分子の異常によっても筋ジストロフィーが発症する。骨格筋に発現する4つのsarcoglycan ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) のいずれの遺伝子異常でも、sarcoglycanの四量体複合体が膜から消失し、筋ジストロフィーが発症する。ラミニン $\alpha$ 2重鎖に異常があると、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) を発症する。 $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) の糖鎖修飾の異常では脳奇形や眼球異常を合併するWalker-Warburg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

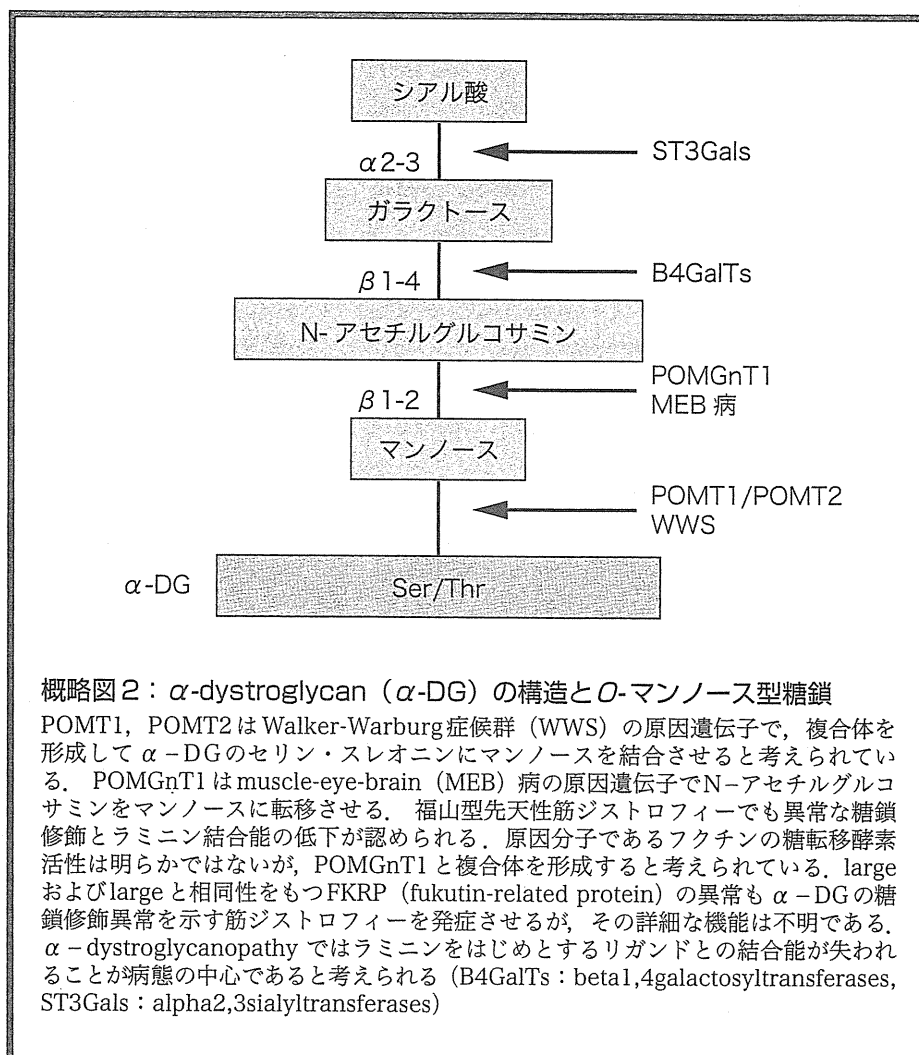
DMDの代表的モデルマウスは*mdx*マウスであるが、筋再生が旺盛で、骨格筋はむしろ肥大しており、筋力低下も軽度であり、治療研究に用いる場合、評価に注意が必要である。*mdx*をdystrophinのautosomal homologue

である utrophin を欠損するマウス (*Utr<sup>-/-</sup>*) 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<sup>mdx</sup>/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

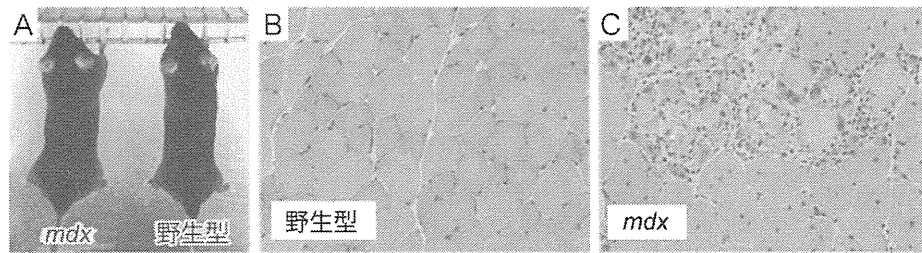
### □ 特徴

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<sup>2Cv</sup>-mdx<sup>5Cv</sup>*) やDMD遺伝子全体を欠損するマウス<sup>3)</sup>、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*)<sup>4)</sup> 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 (♀). 外観では区別がつきにくく, 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よく保たれており, 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](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<sup>-/-</sup>*

【系統名】 *mdx; utr<sup>-/-</sup>*

【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<sup>-/-</sup>* 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。

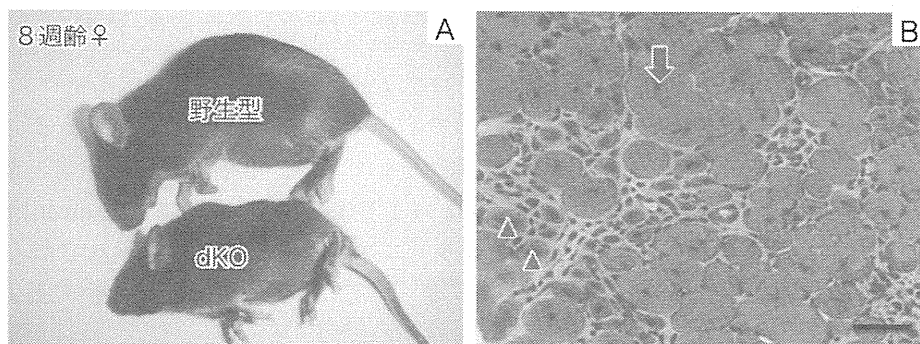
### □ 特徴

*mdx; utr<sup>-/-</sup>* 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

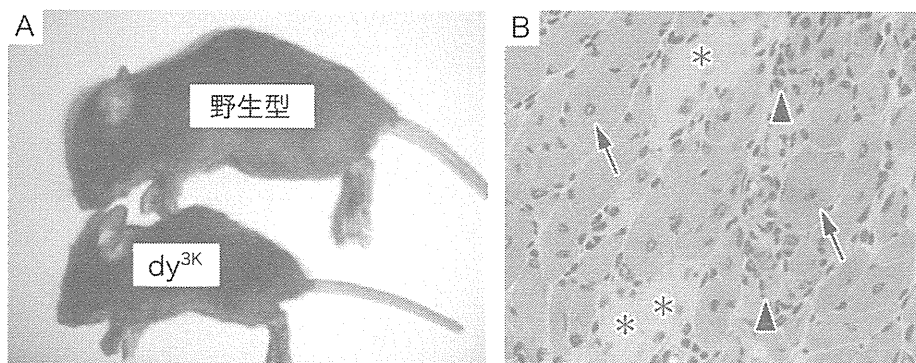
【作製の背景】 ジーンターゲティング法によりラミニン  $\alpha 2$  重鎖遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を挿入して遺伝子を不活化. メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) のモデルマウス

## □ 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  $\alpha$  鎖 (現在5種類のアイソフォームが知られている),  $\beta$  鎖 (3種),  $\gamma$  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<sup>2J</sup>/dy<sup>2J</sup>* 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<sup>3K</sup>/dy<sup>3K</sup>* の外観と筋病理

A) 野生型と *dy<sup>3K</sup>/dy<sup>3K</sup>* (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・壊死は激烈で, 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 $\alpha 2$ 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<sup>3k</sup>/dy<sup>3k</sup>* 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](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 $\alpha 2$ 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/6JJcl.129/SvJ-*pomgnt1* [POMGnT1 : protein O-linked mannose beta1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase 欠損マウス (Pomgnt1<sup>tm1Stk</sup>)]

【背景系統】 C57BL/6JJcl (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 $\alpha$ -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](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>)