

201122051A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

完全型ジストロフィンを発現させる

Duchenne型筋ジストロフィーの治療法の開発

(H22-神経・筋一般-015) に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成24(2012)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

完全型ジストロフィンを発現させる

Duchenne型筋ジストロフィーの治療法の開発

(H22-神経・筋一般-015) に関する研究

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成 24 (2012) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告		
完全型ジストロフィンを発現させるDuchenne型筋ジストロフィーの 治療法の開発（H22-神経・筋一般-015）に関する研究	-----	1
松尾雅文		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	7
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	12

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

完全型ジストロフィンを発現させる Duchenne 型筋ジストロフィーの治療法の開発

研究代表者：松尾 雅文（神戸学院大学総合リハビリテーション学部・教授）

【研究要旨】

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は男児 3500 人に 1 人が発症する最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患である。しかし、未だ有効な治療法はなく、DMD 患者は 20 歳台に長い闘病生活のはてに死亡する。本研究は、スプライシング時に mRNA を修正して、完全型ジストロフィンの発現させる DMD 治療の開発を世界に先駆けてはかる画期的なものである。そのため、1) 完全型ジストロフィンの発現が可能なジストロフィン遺伝子の異常をさらに多くの DMD 患者で同定する。2) 同定した遺伝子の異常を対象としてスプライシングレポーター評価系を構築し、完全長ジストロフィン mRNA の産生を導く化学物質のスクリーニングを行う。3) 有効と同定した化学物質を患者由来培養筋細胞に投与し、その完全型ジストロフィンの発現を確認する、を計画している。平成 23 年度においては、平成 22 年度の成果をもとに 1) 及び 2) の課題を重点的に実施し、スプライシングレポーター評価系の構築に成功するなど、3) の課題に向けた研究を実施した。

【分担研究者】

松尾 雅文

神戸大学大学院医学研究科・教授

竹島 泰弘

神戸大学大学院医学研究科・特命教授

八木 麻理子

神戸大学大学院医学研究科・助教

栗野 宏之

神戸大学大学院医学研究科・特命助教

め世界中の数万の患者とその家族が治療法の確立を待望している。

申請者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のスプライシング時にエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィン mRNA を修正して骨格筋にジストロフィンを発現させることに世界で初めて成功した。その成果は、「Pediatric Research」誌の表紙に紹介され、DMD の最も有望な治療法として世界中から大きな注目を集めた (Takeshima, 2006)。現在では、このジストロフィン mRNA を修正する治療は世界標準の手法となりつつある。しかしながら、この手法では発現するジストロフィンは 1 部領域を欠失した不完全なタンパクで、完治とはいえない。そのため、完全型ジストロフィンを発現させる方法の確立が世界の研究者の解決すべき緊急の課題となっている。

本研究は、スプライシング時に mRNA を修正して、完全型ジストロフィンの発現させる DMD 治療の開発を世界に先駆けてはかる

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は男児 3500 人に 1 人が発症する最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患である。しかし、未だ有効な治療法はなく、DMD 患者は 20 歳台に長い闘病生活のはてに死亡する。そのた

画期的なものである。申請者は、スプライシング時にジストロフィン mRNA を修正することにより完全型ジストロフィンの発現が期待できる遺伝子の異常を多数発見してきた。さらに、申請者はこれまでの予備的な検討によりジストロフィン遺伝子の異常特異的にジストロフィンを発現させる化学物質の存在を示唆する結果をすでに得ている。

従って、本研究は以下の研究計画を実施することにより、当初の目標を達成できるものと確信している。1) 完全型ジストロフィンの発現が可能なジストロフィン遺伝子の異常をさらに多くの DMD 患者で同定する。2) 同定した遺伝子の異常を対象としてスプライシングレポーター評価系を構築し、完全長ジストロフィン mRNA の産生を導く化学物質のスクリーニングを行う。3) 有効と同定した化学物質を患者由来培養筋細胞に投与し、その完全型ジストロフィンの発現を確認する。平成 23 年度においては、平成 22 年度の成果をもとに 1) 及び 2) の課題を重点的に実施し、3) の課題に向けた研究を実施した。

B. 研究方法

本研究は、これまでに申請者が世界に先駆けて実証してきたジストロフィン mRNA をスプライシング時に修正する DMD の治療法を発展させ、さらに有効性の高い完全型ジストロフィンを発現させる方法の開発をはかるものである。そのため、1) 完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子の異常を探索し、2) その異常を対象としてスプライシングレポーター評価系を用いて化学物質を探索すると共に、3) その化学物質の有効性について患者由来筋細胞を用いて完全型ジストロフィンの発現を証明するものである。そこで、以下の研究を計画している。

1) 完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子異常の探索 (担当: 竹島・八木・栗野)

完全型ジストロフィンの発現が期待されるジストロフィン遺伝子の異常は、ジストロフィン遺伝子の 79 ヶのエクソン全てが正常で、イントロンの異常によるものである。そのため、DMD 患者を対象として MLPA 法とジストロフィン cDNA 解析を用いた遺伝子診断を推進し、多くの治療対象候補となる遺伝子の異常を明らかにする。

2) スプライシングレポーター評価系を用いた化学物質スクリーニング

申請者はイントロン内の点突然変異により新たなエクソンが形成され、DMD の原因となっている例をすでに見い出している。この例では、この新たなエクソンのスキッピングが誘導されれば、全く正常なジストロフィン mRNA が産生され、完全型ジストロフィンの発現が期待される。この遺伝子異常をモデルとして、以下の様に化学物質の探索を行う。

①スプライシングレポーター評価系の構築

申請者が既に確立しているミニ遺伝子スプライシング解析系に、イントロン配列がエクソン化した遺伝子異常あるいはイントロン異常を有する配列を組み込み、ハイブリッドミニ遺伝子を作成する。

②化学物質存在下でのスプライシング解析

先に構築したハイブリッドミニ遺伝子を HeLa 細胞に導入し、そのスプライシング産物を RT-PCR 法で解析する。この解析系にすでに生体への投与の完全性が確認されている様々な化学物質を加え、化学物質によるスプライシングへの影響を解析する。そして、スプライシングを変化させ、完全型ジストロフィンを発現させる作用を有する化学物質を同定し、候補化学物質とする。

③完全型ジストロフィンを発現する化学物質の同定

先の検討で完全型ジストロフィンを発現する可能性があると考えられた候補化学物質について、さらにその作用時間・作用濃度などに検討を加え、最適・最強の化学物質を同定する。

3) 患者由来培養筋細胞での完全型ジストロフィン発現

①治療対象となる症例の筋細胞株の樹立

完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子の異常を持ち、さらに、正常ジストロフィン mRNA の産生作用を有する化学物質が同定された患者を対象として筋生検を実施する。そして、生検組織から、筋培養細胞株を樹立する。

②化学物質の投与による完全型ジストロフィン発現

先に確立した患者培養筋細胞培養液に、最適・最強の化学物質を加え、一定時間培養後、完全長のジストロフィン mRNA の産生を RT-PCR 法で確認する。ついで、蛍光免疫染色法を用いて培養細胞レベルで完全型ジストロフィンの発現を確認する。さらに、ウエスタンブロットでも完全型ジストロフィンの発現を確認する。

4) 化学物質パネルの完成

さらに、こうした 1)、2)、3) の遺伝子異常の探索、化学物質探索と培養筋細胞を用いた治療・評価の過程を他の完全型ジストロフィン発現候補遺伝子異常でも繰り返し実施し、完全型ジストロフィン発現化学物質パネルを完成させる。

平成 23 年度においては、平成 22 年度の成果をもとに研究計画 1)、2) に加え 3) に比重をおいた研究を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究の Duchenne 型筋ジストロフィー患者の遺伝子診断並びに患者細胞でのジストロフィン発現の検討については、神戸大学医学部附属病院においてインフォームドコンセントを得て実施する。こうした診断を実施すること及び筋バイオプシーから得た患者筋細胞の細胞株の樹立及びそのジストロフィン mRNA の解析などの実施については神戸大

学医学部医学倫理委員会及び神戸学院大学倫理委員会でもすでに審議され承認された。

C. 研究結果

1) 完全型ジストロフィンの発現が期待される遺伝子異常の探索

完全型ジストロフィンの発現が期待されるジストロフィン遺伝子の異常は、ジストロフィン遺伝子の 79 ヶのエクソン全てが正常で、イントロンの異常により、クリプチックエクソンが形成されたものである。そのため、DMD 患者を対象として MLPA 法とジストロフィン cDNA 解析を用いた遺伝子診断を推進し、治療対象候補となる遺伝子の異常例を探索を継続して実施した。しかし、本年度においてはジストロフィン遺伝子に通常の異常が同定されたのみであった。

2) スプライシングレポーター評価系を用いた化学物質スクリーニング

イントロン内の点突然変異により新たなエクソンが形成され、DMD の原因となっているクリプチックエクソン形成異常例をすでに見い出している。これらの例では、このクリプチックエクソンのスキッピングが誘導されれば、全く正常なジストロフィン mRNA が産生され、完全型ジストロフィンの発現が期待される。これらの遺伝子異常を有するゲノム用いてスプライシング解析が可能なハイブリットミニ遺伝子を作成した。そして、クリプチックエクソンのスキッピングを誘導する化学物質の探索を行った。一部のクリプチックエクソンではそのスキッピングを誘導する候補化学物質の同定に成功した。

D. 考察

1) 達成度について

本年度に目標とした重点課題 1) 2) については当初の計画通りに進展した。一部エクソンスキッピングを誘導する化合物の候補も得ており、研究は順調に進んでいる。

この様に本研究計画の成果は順調に得られた。

2) 研究成果の学術的意義について

DMD の治療に全く新しい展開をはかると共に、分子病態の解析と治療法の確立に大きく貢献するものと期待される。

3) 研究成果の行政的意義について

DMD の治療法の確立は世界の DMD 患者が切望されているものである。DMD 患者の医療費の削減をはかり、国民の負担を大きく緩和される。

4) その他特記すべき事項について

なし

E. 結論

DMD において完全型ジストロフィンの発現を可能とするクリプチックエクソンを形成する遺伝子異常を組み込んだスプライシング評価系のハイブリッドミニ遺伝子の構築に成功した。そして、クリプチックエクソンのスキッピングを誘導する候補低分子化合物の同定に成功し、DMD 治療の確立へ新しい世界を切り開きつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

一覧表参照

2. 学会発表

一覧表参照

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takeshima, Y., Yagi, M., Matsuo, M.	Optimizing RNA/ENA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing.	Aartsma-Rus A.	Exon skipping: Methods and protocols. Methods Mol Biol.	Human Press.	New Jersey	in press	
Matsuo, M., Takeshima, Y., Yagi, M.	Treatment of Duchenne muscular dystrophy by induction of exon skipping with antisense oligonucleotides	Takeda S.	Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy.	IGAKU-SHOIN Ltd.	Tokyo	2011	103-109.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Solyom S, Ewing AD, Hancks DC, Takeshima Y, Awano H, Matsuo M, Kazazian HH Jr.	Pathogenic orphan transduction created by a non-reference LINE-1 retrotransposon.	Hum. Mutat.		in press	
Ota, M., Takeshima, Y., Nishida, A., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., Matsuo, M.	A G-to-T transversion at the splice acceptor site of dystrophin exon 14 shows multiple splicing outcomes that are not exemplified by transition mutations.	Genet Test Mol Biomarkers.		in press	
Malueka, R.G., Takaoka, Y., Yagi, M., Awano, H., Lee, T., Dwianingsih, E.K., Nishida, A., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers.	BMC Genetics.		in press	
Malueka, R., Yagi, M., Awano, H., Lee, T., Dwianingsih, E.K., Nishida, A., Takeshima, Y., Matsuo, M.	Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low half-maximal effective concentration in a cell-free splicing system.	Nucleic Acid Therapeutics.	21	347-353.	2011
Nishida, A., Kataoka, N., Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, M., Matsuo, M.	Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene.	Nat Commun	2	308.	2011

Rani, A.Q., Malueka, R.G., Sasongko, T.H., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., Zilfalil, B.A., Salmi, A.B., Takeshima, Y. Zabidi-Hussin, Z.A., <u>Matsuo, M.</u>	Two closely spaced non-sense mutations in the DMD gene in a Malaysian family.	Mol Genet Metab	103	303-304.	2011
李知子 <u>松尾雅文</u>	RNAを利用する新しい 医薬・医療 Duchenne型筋ジストロフィーに対するエクソンスキッピング誘導治療	医学のあゆみ	238	537-541	2011
<u>松尾雅文</u>	Duchenne型筋ジストロフィーのエクソンスキッピング誘導治療とリードスルー誘導治療	小児科	52	1750-1756	2011

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年
Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, <u>Matsuo M.</u>	Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene.	4th International Congress of Myology	2011
<u>Matsuo M</u>	Duchenne muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy	The 61st Autumn Annual Meeting of the Korean pediatric Society	2011
Yagi M, Lee T, Awano H, Takeshima Y, <u>Matsuo M.</u>	Antisense RNA/Ethylene bridged nucleic acid chimera induces exon 45 skipping in cultured myocytes from DMD patients with 6 different deletion mutations.	<i>The American Society of Human Genetics 61th Annual Meeting</i>	2011

III. 研究成果の刊行物・別刷

Treatment of Duchenne muscular dystrophy with antisense oligonucleotides

Masafumi Matsuo¹⁾, Yasuhiro Takeshima¹⁾, Mariko Yagi¹⁾

1) Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal disorder of childhood caused by deficiency of muscle dystrophin. Interestingly, a milder form of the disease called Becker muscular dystrophy (BMD) is distinguished from DMD by delayed onset, later dependence on wheelchair support and longer life span. Both DMD and BMD are caused by mutations in the dystrophin gene and their clinical difference can be explained by the reading frame rule. Many attempts have been made to express dystrophin in DMD patients, but an effective treatment has not yet been established. Identification of dystrophin Kobe promoted the understanding of the regulatory mechanism of dystrophin pre-mRNA splicing. As a result, the antisense oligonucleotides therapy whereby the correction of the translational reading frame of dystrophin mRNA is provided by inducing exon skipping has been proposed to transform severe DMD into the milder form. Consequently, a 31-mer phosphorothioate oligonucleotides against the splicing enhancer sequence of exon 19 of the *dystrophin* gene (antisense oligonucleotides : AO) was shown to be able to induce exon 19 skipping. Furthermore, the transfection of AO into cultured myocytes from a DMD case with an out-of-frame deletion of exon 20 promoted expression of dystrophin successfully. The peripheral infusion of the AO solution into a DMD case harboring an out-of-frame deletion of exon 20 produced in-frame dystrophin mRNA and led dystrophin expression in skeletal muscle.

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal disorder of childhood usually associated with a functional deficiency of dystrophin. Until now no effective treatment for DMD has been established. Currently much attention has been paid for antisense oligonucleotides

(AO) therapy that converts severe DMD to milder Becker muscular dystrophy (BMD) by inducing exon skipping. Present progress made in this area of research with particular reference to dystrophin Kobe is presented.

2 . Duchenne muscular dystrophy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common inherited muscular disease with a worldwide incidence of 1 in 3500 male births. DMD is a lethal disorder of childhood associated with a functional deficiency of dystrophin. The affected individuals are wheelchair-bound by the age of 12 and succumb to cardiac or respiratory failure in the mid to late 20s. Interestingly, a milder form of the disease called Becker muscular dystrophy (BMD) is distinguished from DMD by delayed onset, later dependence on wheelchair support and longer life span. Both DMD and BMD are caused by mutations in the *dystrophin* gene. The *dystrophin* gene is 3,000 kb in size and consists of 79 exons encoding a 14 kb mRNA. Nearly two-thirds of identified mutations in the *dystrophin* gene are deletions with a loss of one or more exons. Duplications with acquisition of one or more exons have been observed in 5-10% of DMD/BMD patients. The remaining 20-30% of cases are caused by small mutations including point mutations, microdeletions, microinsertions, and chromosomal abnormalities.

3 . Reading-frame rule

Although both DMD and BMD patients have been shown to have deletion mutations, the extent of the deletion does not always correlate with the severity of the disease : some BMD patients with mild symptoms have deletions encompassing numerous exons, whereas some DMD patients with severe symptoms lack a single exon. According to the reading-frame rule¹⁾, the BMD patients with the deletions might be able to produce an in-frame dystrophin mRNA that would still direct the production of an internally truncated semi-functional protein. The deletions harbored by severe DMD patients, on the other hand, would bring together exons that, when spliced, would shift the translational reading frame in the mRNA, such that premature stop codon is created. This rule predicts that milder BMD patients would produce a smaller semi-functional protein while DMD patients would not produce a protein at all. Based on this rule phenotype of dystrophinopathy can be explained by their genotype in more than 90% of cases.

Pre-mRNA

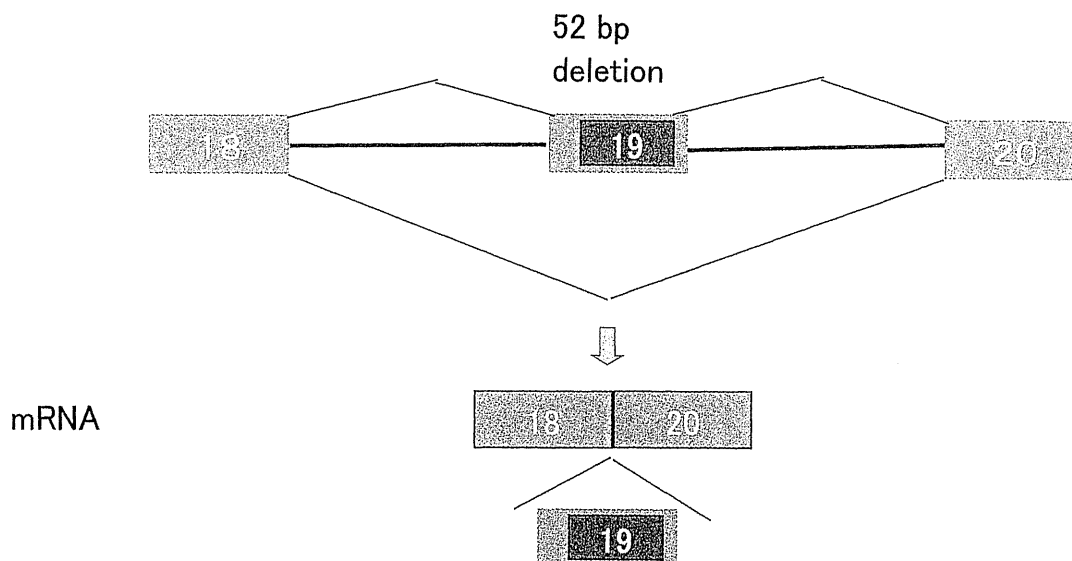


Fig. 1 Dystrophin Kobe

Splicing pathway of dystrophin Kobe is schematically described. In normal exon 19 is incorporated into dystrophin mRNA. In dystrophin Kobe the whole sequence of exon 19 disappeared from dystrophin mRNA. This exon skipping was induced even though all consensus sequences around the exon/intron junctions were maintained intact. Boxes and lines indicate exon and intron, respectively. Numbers inside the boxes indicate exon number. Diagonal lines indicate splicing pathways.

4. Dystrophin Kobe

In one particular *dystrophin* gene mutation named dystrophin Kobe²⁾, we found that exon skipping during splicing was induced by the presence of intra-exon deletion mutation in the genome, although all of the consensus sequences known to be required for splicing were unaffected. In dystrophin Kobe 52 bp out of 88 bp of exon 19 were found deleted and this 52 bp deletion was considered to cause DMD by shifting the reading frame³⁾. Unexpectedly, his dystrophin mRNA of dystrophin Kobe was found smaller than predicted when it was analyzed by reverse-transcription PCR amplification. Sequence analysis of the product disclosed that the whole 88 bp of exon 19 was missing from the dystrophin cDNA, instead of the shortened exon 19³⁾. This indicated that exon 19 of the dystrophin Kobe was skipped out during pre-mRNA splicing.

Taken it consideration that consensus sequences for splicing locating around the exon/intron junctions were maintained intact in the dystrophin Kobe³⁾, it was hypothesized that the deleted sequence of exon 19 in dystrophin Kobe may function as a cis-acting element for

exact splicing for the upstream and downstream introns. In order to exemplify this hypothesis, an *in vitro* splicing system using artificial dystrophin pre-mRNAs was constructed and the role of deleted sequence was examined. It was disclosed that splicing of intron 18 was almost completely abolished when the wild-type exon 19 was replaced by the dystrophin Kobe exon 19⁴. This indicated that the deleted region functioned as a splicing enhancer sequence. It was hypothesized that the antisense oligonucleotides may induce exon skipping by blocking the function of splicing enhancer. In fact, the 31-mer-phosphorothioate oligonucleotides (5'-GCCTGAGCTGATCTGCTGGCATCTTGCAGTT-3') (AO19) covering a splicing enhancer sequence of exon 19 was found to inhibit splicing in *in vitro* splicing⁴. Since the aforementioned result suggested a possibility of artificial induction of exon 19 skipping, AO19 was then transfected to normal lymphoblastoid cells. Remarkably exon 19 sequences disappeared from all dystrophin mRNAs at 24 hours after the transfection⁵. AO19 was thus proved to be a powerful tool with the ability to induce exon 19 skipping.

5. Production of dystrophin in DMD derived muscle cells

Induction of exon 19 skipping with AO19 was assessed for DMD treatment. An alternative strategy for DMD treatment might be to retard progression of the clinical symptoms, i. e., to convert DMD into BMD phenotype. Theoretically, this therapy can be done by changing a frame-shift mutation causing DMD into an in-frame mutation characteristic of BMD by modifying the dystrophin mRNA. Since transfection of the AO19 has been shown to induce exon 19 skipping⁵, we subsequently investigated whether AO19 can be used to treat a DMD case with a 242 nucleotide deletion of exon 20 (Fig. 2). If exon 19 (88 bp) skipping is induced in this case, the translational reading frame of dystrophin mRNA will be restored by enlarging the deletion from 242 to 330 bp. As a result, this modulation of splicing should lead to the production of internally deleted dystrophin in muscle cells from the case. A Japanese DMD patient was identified to have a deletion of exon 20 of the *dystrophin* gene. A primary muscle culture cell established from his muscle biopsy sample was treated with AO19. Introduction of AO19 into the nuclei of cultured cells led to skipping of exon 19 in a proportion of total mRNA. As expected dystrophin-positive cells were identified. The percentage of dystrophin positive cells was nearly 20% at the 10th day after the transfection⁶. These results showed that dystrophin expression was promoted by editing dystrophin mRNA and strongly indicated a possibility of DMD treatment with

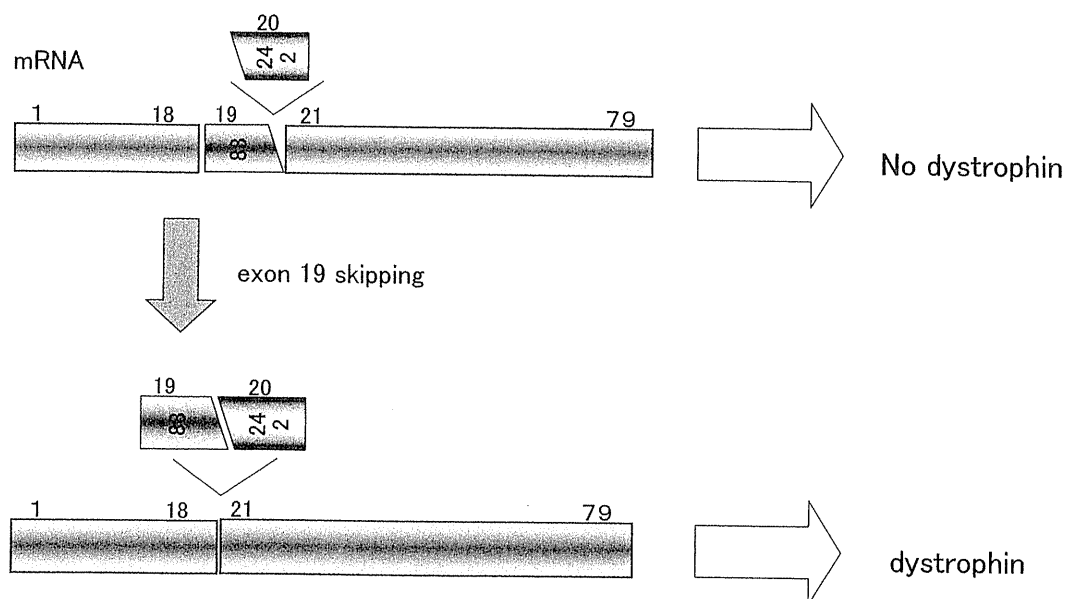


Fig. 2 Correction of translational reading-frame using antisense oligonucleotides

In DMD with a deletion of exon 20 (242 bp), splicing of dystrophin pre-mRNA proceeds to produce out-of-frame mRNA lacking exon 20 and no dystrophin is produced (top). In the presence of the antisense oligonucleotide against the splicing enhancer sequence, recognition of exon 19 (88 bp) is inhibited and splicing proceeds unrecognizing exon 19 to produce in-frame mRNA (bottom). Boxes and number in boxes indicate exon and exon number, respectively.

AO19.

However, delivery of AO19 into skeletal muscle was puzzled. When injection of labeled AO19 into peritoneum of *mdx* mouse was conducted, nucleus of muscle cells became fluorescent positive. Remarkably exon 19 skipping was observed in cardiac and skeletal muscle⁷⁾. It thus can be concluded that AO19 can be delivered to muscle cells by directly injecting into venous system.

6. Treatment with antisense oligonucleotides

After obtaining the permission from the Ethical Committee of Kobe University Graduate School of Medicine and the informed consent from parents, a 10-year-old DMD patient possessing an out-of-frame, exon 20 deletion of the *dystrophin* gene received a 0.5 mg/kg intravenous infusion of AO19 that was synthesized under the GMP guideline. AO19 was administered at one-week intervals for 4 weeks. No side effects attributable to infusion were

observed. Remarkably, exon 19 skipping appeared in a portion of the dystrophin mRNA in peripheral lymphocytes after the infusion. In a muscle biopsy one week after the final infusion, the novel in-frame mRNA lacking both exons 19 and 20 was identified and found to represent approximately 6% of the total reverse transcription PCR product. Dystrophin was identified histochemically in the sarcolemma of muscle cells after oligonucleotide treatment. These findings demonstrate that phosphorothioate oligonucleotides may be administered safely to children with DMD, and that a simple intravenous infusion is an effective delivery mechanism for oligonucleotides that lead to exon skipping in DMD skeletal muscles⁸⁾.

7 . Exon skipping therapy for DMD

Correction of the dystrophin reading frame from out-of-frame into in-frame by induction of exon skipping is now considered as the most promising treatment for DMD⁹⁾. Therefore, this strategy has been applied for treatment of DMD with deletion in the deletion hot-spot¹⁰⁾. In addition, this strategy can be applied to DMD cases with a nonsense mutation as natural rescue by exon skipping has been reported in some nonsense mutations^{11,12)}. Therefore, exon skipping by AO is considered widely applicable than expected. However, it should be careful in assessing the effect of AO, because unanticipated splicing error may ensue the altered splicing by AO¹³⁾.

References

- 1) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988 ; 2 : 90-95.
- 2) Matsuo M, Masumura T, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, Nishio H, Koga J, Nakamura H. A very small frame-shifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 ; 170 : 963-967.
- 3) Matsuo M, Masumura T, Nishio H, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, Koga J, Nakamura H. 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.
- 4) Takeshima Y, Nishio H, Sakamoto H, Nakamura H, Matsuo M. 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*. 1995 ; 95 : 515-520.
- 5) Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 ; 226 : 445-449.

- 6) Takeshima Y, Yagi M, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev.* 2001 ; 23 : 788-798.
- 7) Takeshima Y, Pramono ZAD, Nakamura H, Matsuo M. Intraperitoneal administration of antisense oligonucleotide to a mdx mouse. *Jap J Inborn Errors.* 1999 ; 15 : 231.
- 8) Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, Sakaeda T, Saura R, Okumura K, Matsuo M. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy *Pediatr Res.* 2006 ; 59 : 690-694.
- 9) van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 ; 4 : 774-783.
- 10) van Deutekom J, Janson A, Ginjaar I, Frankhuizen W, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen J, Koop K, van der Kooi A, Goemans N, de Kimpe S, Ekhart P, Venneker E, Platenburg G, Verschuuren J, van Ommen G. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007 ; 357 : 2677-2686.
- 11) Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, Inoue K, Yokota Y, Yokoyama M, Matsuo M. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 1997 ; 100 : 2204-2210.
- 12) Nishiyama A, Takeshima Y, Zhang Z, Habara Y, Tran TH, Yagi M, Matsuo M. Dystrophin nonsense mutations can generate alternative rescue transcripts in lymphocytes. *Ann Hum Genet.* 2008 ; 72 : 717-724.
- 13) Habara Y, Takeshima Y, Awano H, Okizuka Y, Zhang Z, Saiki K, Yagi M, Matsuo M. In vitro splicing analysis reveals that availability of a cryptic splice site is not a determinant for alternative splicing patterns caused by +1G>A mutations in introns of the dystrophin gene. *J Med Genet.* 2009 ; 46 : 542-547.