

201122052A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業
(神経・筋疾患分野)

未熟終止コドンの抑制による
筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 松田 良一

平成24 (2012) 年 5月

様式A (7)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成24年5月25日

厚生労働大臣 殿

住所 〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

マツダ リョウイチ

研究者 氏名 松田 良一



(所属研究機関 東京大学)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
に係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の
臨床応用基盤の確立（H22-神経・筋-一般-016）

国庫補助金精算所要額：金 13,515,000円也（うち間接経費 3,118,000円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書
4. 研究成果の刊行に関する一覧表
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

はじめに

リードスルー薬物による治療法は、mRNAの翻訳機構に干渉し、正常機能タンパク質の発現を回復させる試みとして国際的に注目されており、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィンの機能を回復するための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。ベッカー型症例の経験から、リードスルーにより正常量の20%に相当するジストロフィンを合成させることができれば筋ジストロフィーの進行を遅延させ、患者様のQOLの向上と延命を図ることが期待できるため、人類福祉への直接的還元として大きく寄与するものと考えられる。

本研究「未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立」では、リードスルー誘起物質の探索と有機化学的展開から薬物候補を増やし、モデル動物や患者様由来細胞を用いた薬効薬理試験を実施した。平成23年度には以下の研究成果を得たので報告する。

- ・ ネガマイシン誘導体の構造活性相関から、薬効の増強に関する知見が得られ、ナンセンス変異の抑制効果をもつepi-デオキシネガマイシン誘導体の合成に成功した。
- ・ マクロライド系抗菌剤等の既承認薬に複数の薬物候補を特定した。
- ・ 通常は皮膚を透過しない薬物の経皮投与法を開発し、アミノグリコシド系抗菌薬や抗がん剤での適用可能性を検討した。
- ・ 筋ジストロフィーモデルマウスに抗MRSA薬アルベカシンを投与することで、生化学的・免疫組織化学的・運動機能解析学的に治療効果を認めた。
- ・ 患者様由来ヒト筋細胞をアルベカシン処理することで最大32%のジストロフィン発現の回復を確認した。

本研究実施にあたり、平成23年度厚生労働省科学研究費「障害者対策総合研究事業」のご援助を頂いたことに深く感謝致します。

平成24年5月25日 研究代表者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）
交付額平成23年度 13,515千円（うち間接経費 3,118千円）

目次

I. 総括研究報告

未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の

臨床応用基盤の確立 松田良一1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表12

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況14

IV. 研究成果の刊行物・別刷15

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
総括研究報告書

未熟終止コドンの抑制による筋ジストロフィー薬物治療の臨床応用基盤の確立
研究代表者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科 教授

研究要旨

ナンセンス変異はDNAに1塩基置換が生じ、アミノ酸コードが終止コドンに変化して機能的タンパク質が作られなくなる点突然変異である。この変異は全ての遺伝子にランダムに起こりうるため、重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。リードスルー療法は、薬物によりナンセンス変異を抑制し、翻訳を進行させて機能的タンパク質分子を作らせることで症状の改善を目指すものである。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は未だ有効な治療法が確立していない重篤な遺伝性筋疾患であり、一刻も早い臨床応用の実現が喫緊の課題となっている。リードスルー誘起物質はナンセンス変異の種類とその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くの候補物質を特定し、個々の患者様に最適なリードスルー誘起物質を選択かつ併用できるようにすることが求められている。

本研究の目的は、リードスルー誘起薬物候補を増やし、モデル動物や患者様由来ヒト筋細胞を用いた薬効薬理試験と安全性薬理試験を実施することで、薬開発コンセプトの実現性を確保し、その臨床応用基盤を固めることにある。

当該年度において、ネガマイシン誘導体や既存の抗菌薬剤等々から有益なリードスルー作用をもつ薬物候補を見出すことに成功した。また通常は皮膚を透過しないアミノグリコシドや抗がん剤の経皮投与法を開発した。

A. 研究目的

ナンセンス変異はDNAの塩基が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。この変異は全ての遺伝子にランダムに起こりうるため、重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。

遺伝性疾患のおよそ12%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) は未だ有効な治療法が確立されず、対症的治療法に限定されている重篤な遺伝性筋疾患である。その発症頻度や臨床経過から、難病の中でも特に過酷な疾患として知られ、患者は20～30歳で呼吸筋や心筋まで筋の変性・壊死が進展した結果、呼吸不全又は心不全により死亡するのが通常である。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。本療法では、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。本療法は、遺

伝子治療や核酸医薬によらず、ナンセンス変異症例の包括的治療が可能な、独創的かつ斬新な概念に基づくものである。

これまでに薬物候補としてアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンや低分子化合物アタルレンなどが研究代表者ら以外から報告されている。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。しかしながらナンセンス変異の抑制による治療戦略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。また、2007年にSweeneyらが80万種の低分子化合物群から同定したアタルレンは、良好な忍容性が確認されたものの、後期第II相臨床試験において治療の有効性に関する科学的証拠が得られずにその開発は中断している。そのため、現在まで国内外で承認されたナンセンス変異を抑制する薬剤は存在せず、その確立が喫緊の課題となっている。

リードスルー誘起物質は未熟終止コドンの種類とその周辺配列に対する特異性が異なるため、より多くの候補物質を特定し、個々の患者様に適したものを見出すことが求められている。そのため、独自のリードスルー活性解析系として作成したデュアルレポーター遺伝子導入マウス系統 (READ

マウス) やナンセンス変異型DMDのモデル動物 (mdxマウス), ナンセンス変異型DMD患者様由来筋細胞を用いて, これまでに特定した薬物候補の誘導体と既に上市されている薬剤のリードスルー誘起物質としての薬効評価を行い, 薬開発コンセプトの実現性を確保し, その臨床応用基盤を固めることが本研究の目的である。

B. 研究方法

リードスルー活性の定量的検出系として, mdxマウスを用いることは不都合が多い。指標となるジストロフィンが巨大分子 (427KDa) であるためイムノブロットでの転写効率も低く, しかもその存在量は他の筋タンパク質に比べて少ないためである。そこで生体内でのリードスルー活性解析における薬効評価を定量化かつ効率化する目的で, β ガラクトシダーゼ遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を直列に並べ, mdxマウスエクソン23の未熟終止コドンを含む27塩基配列をはさんでつないだデュアルレポーター遺伝子を作り, これをサイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーターにつないだコンストラクト (mdxマウスのエクソン23の未熟終止コドン前後12mer周辺配列を含む27mer) をマウス受精卵に導入し, TAA, TAG, TGAの3種類の未熟終止コドンそれぞれを含む3系統のREADマウスを構

築した。作出されたREADマウス全身切片のX-gal染色では, 横隔膜を含む骨格筋や心筋での強い発現を確認しており, 通常は β ガラクトシダーゼのみを翻訳するが, リードスルーが起きるとルシフェラーゼも翻訳され, ルシフェリン-ガラクトシダーゼとルシフェリンを用いてルミノメータにより測定することで, 両酵素活性の比でリードスルー活性を表すことができる。このマウスを用いることで投与経路・量と標的組織別感受性 (リードスルー活性と薬物動態) を同時に評価できるため, 単に薬効のみならず重篤な副作用をもたない薬物候補を特定することが可能である。またリードスルー誘起物質の投与経路毎ごとの薬効・動態を効率的かつ定量的に検討できる点でも独創性と優位性を示している。

薬効評価は, これまでに特定した薬物候補の誘導体や既に上市されておりリードスルー誘起活性が見込まれる薬剤等をREADマウスに一週間以上連日皮下投与し, 投与終了時に大腿部/下腿部骨格筋組織抽出液のルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性をルミノメータで定量した。リードスルー誘起活性はルシフェラーゼ活性/ β -ガラクトシダーゼ活性として算出し評価した。同様に, リードスルー誘起活性を見出した薬物候補について, 投与の経路・用

量・間隔・期間の最適化について評価した。

特定したリードスルー誘起薬物候補については、mdxマウスへの4週間以上の投与を行い、生化学的・免疫組織化学的な薬効評価と運動機能回復試験を行った。具体的に、血清クレアチンキナーゼ活性、Western法や免疫組織化学によるジストロフィンタンパク質の蓄積といった臨床指標を用いた解析や、自発運動量・握力・疲労度の運動能力測定や、等尺性収縮張力、単収縮張力、強縮張力、筋力減衰率を指標とした機能回復について段階的に評価した。また患者様由来筋細胞を用いてそのジストロフィン発現回復を評価した。

患者様由来筋細胞については、研究協力者として神戸学院大学の松尾雅文教授と神戸大学の竹島泰弘特命教授、ネガマイシン誘導体合成については、東京薬科大学の林良雄教授を加え研究を遂行した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施する動物実験はすべて東京大学教養学部実験動物委員会および東京大学動物実験委員会の承認を得ている。動物愛護の観点に配慮しつつ科学的観点に基づく適正な動物実験を実施するため、目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、

遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減、安全性評価に関する動物実験代替法の活用を徹底し実施を図っている。また、実験実施者の教育訓練等を通じて安全確保及び健康保持、自主管理の周知徹底とその情報公開を行い、施設及び設備における実験動物の飼養・保管・輸送についても適切な方法で維持管理し、適正な動物実験が実施されることに相当の注意を払い監督した。

患者様由来筋細胞培養は、検体採取時に神戸大学の倫理委員会の承認を受けると共に患者様より文書同意を取得済みである。倫理的・法的・社会的問題に関わる全ての指針を遵守することで、研究が適正に推進されるよう十分に配慮した。

C. 研究結果/D. 考察

これまでに特定したネガマイシンの立体配位形成に適合する薬物候補#3と#4について、リードスルー誘起活性の増強を狙った誘導体化や製剤化を目指した理化学的性状の改善を行い、その薬効をREADマウスにより評価した。両者はmdxマウスへ3週間連日投与(50mg/kg/day)することで、各々16.2%、18.8%のジストロフィン回復筋線維を確認しており、血清クレアチンキ

ナーゼ活性はおよそ半分の値にまで有意に減少させうる薬物候補である。#3のオレフィン部幾何異性体誘導体を9種と#4の溶解性改善のための脂肪酸付加2種を合成したが、残念ながら顕著な活性の上昇は見られなかった。しかし、リードスルー誘起活性において、メチルエステルは活性発現に大きく関与していないこと、オレフィン部位はヒドラジド部位との共役構造をとることで活性発現に寄与している可能性があること、左翼ユニットのカルボン酸が活性発現に寄与している可能性があること等の示唆を得ることが出来た。今後、t-ブチル基やベンジル基等の誘導体化と、オレフィン部位を保持した構造における左翼ユニットやカルボン酸を極性官能基へと変換した検討が必要となった。

ネガマイシン誘導体として合成した5-epi-ネガマイシンやepi-デオキシネガマイシンにリードスルー誘起活性を見出したことから、epi-デオキシネガマイシンの誘導体化を行い、READマウスで用いたコンストラクトをサル腎臓由来COS7細胞に導入した培養系において薬効評価を行った。その結果、TCP-112>TCP-126>TCP-119>TCP-107の順に高活性を示す誘導体が見られ、現在TCP-112についてREADマウスを用いて精査しているところである。

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薬タイロシンにリードスルー活性があることを確認したことから、マクロライド系抗菌薬のリードスルー誘発物質としての薬効評価に重点的に取り組み、数多く存在する誘導体の網羅的探索から動物用医薬品16員環マクロライドの半合成物に際立った時間依存性のリードスルー誘起活性を見出した（未発表）。マクロライド系抗菌薬は比較的副作用が少なく、細胞内への浸透性が高いという特長を持つため、薬効を発揮する上での利点がある。加えて、同様の作用機序をもつ抗菌剤からも有益なリードスルー誘起活性がある薬剤2種を特定した（未発表）。本薬剤は経口吸収性に優れ、確立した安全性をもつ承認薬であるため、用途変更することで迅速な実用化が見込まれる。

マクロライド系抗菌薬の実地臨床上の弱点は、苦味が強いことにより服薬コンプライアンスの維持が困難になり、不規則な服薬をすることで耐性菌の発生を助長してしまうことが指摘されている。軽視されがちではあるが、遺伝性筋疾患の場合、対象患者が低年齢のため深刻な問題である。またアミノグリコシドに代表される既知のリードスルー誘起物質は、経口・経皮投与による吸収が不可能であるため、筋疾患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なく、治療に伴う疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため化学的に皮膚透過促進処理をすることで、通常は皮膚を透過しない薬物に対する経皮投与を可能にする方法を既に確立している。その適用拡大を意図し、アントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質アドリアマイシン（ドキソルビシン）を用いた経皮投与による抗がん作用を検討した。エールリッヒ腫瘍細胞を移植したヘアレスマウスに3週間連日抗がん剤を投与し、その後取り出した腫瘍組織の大きさと重さを比較した。その結果、経皮投与された抗がん剤の皮膚からの浸透を確認し、経皮投与による有意な抗腫瘍効果も確認した。更に体重増加率から皮下投与に比べ安全性が高いことも示唆された。後述するアミノグリコシド系抗菌剤アルベカシンについても、皮下投与と同効率の経皮投与が可能なことを示す結果を得ている。本経皮吸収型薬物送達法の適用を検討することで、遺伝性筋疾患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る。

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(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基を導入すること

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た。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）薬として日本と韓国で上市されている承認薬であり、小児への適応も追加承認されている薬剤である。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mdxマウスに2~3週間連日皮下投与することにより、ジストロフィンの発現回復、臨床指標であるクレアチンキナーゼ活性の低下、及び筋組織の大小不同や結合組織の減少等の筋変性の軽減、さらには握力、等尺性収縮による張力、筋疲労耐性のいずれも回復傾向にあったことを確認した。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。またDMD患者由来の培養筋細胞を2週間処理することでジストロフィンの発現促進が見られ、その発現量は正常対照の最大32%に達することも確認した。両者ともリードスルー効果が最も得にくいことが示唆されているTAAナンセンス変異を有しているにも係わらず、DMDより症状の穏やかなベッ

カー型症例によく似たジストロフィンの発現様式がみられ、治療の有効性を支持する成績が得られた。そこで、薬事承認の取得に向けた開発をアルベカシンの製造販売を行っている大手製薬企業に要請したが、患者数が少なく採算性が取れないとの理由から実施協力を得ることができなかった。DMDは進行性の致死性疾患であり、一日も早く薬事承認を取得することが患者の治療に必須と判断し、適応外使用による医師主導型治験（プラセボ対照無作為化試験）として本剤の開発に着手することとした。実施については日本小児神経学会から推薦を受け、日本医師会で実施する治験推進研究事業の「治験の計画」に参加が認められた。なお、治験薬提供者からも当該治験に対する協力の了解を得ており、本剤の製造販売業者からも治験薬提供者に対する薬剤及び非臨床試験成績の開示等の内諾を得ている。医薬品医療機器総合機構との対面助言に基づき、治験に関する評価項目の設定と実施体制の構築を行い、治験計画を確定することで医師会治験センター支援の下で医師主導治験の実施を計画している。今後の本研究課題の遂行においては、モデル動物を用いた至適投与経路・用量・間隔・期間の精査と、相乗（増強）効果や減毒効果を狙った併用療法の可能性を検討すること

で、アルベカシンのリードスルー治療薬としての承認可能性を追求する。

E. 結論

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。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化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。本研究で特定し薬効薬理試験を行っているネガマイシン誘導体、アルベカシン、マクロライド系抗菌薬等々はリードスルー療法を確立するための重要な薬物候補である。リードスルー誘起物質は、ナンセンス変異の種類およびその周辺配列に対する特異性が異なる。したがって、より多くの治療薬候補物質を特定し、個々の患者様に最適な治療戦略を選択かつ併用できるようにすることが求められている。それ故、出来る限り薬物候補を増やし、その臨床応用基盤を固めることを今後も目指していくつもりである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, and Matsuda R. Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. 50th Anniversary Symposium "Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy" Takeda S. ed., National Center of Neurology and Psychiatry, pp93-102, 2011

Wada E, Kikkawa N, Yoshida M, Date M, Higashi T, and Matsuda R: Effects of dietary phosphate on ectopic calcification and muscle function in mdx mice. In "Muscular Dystrophy" In Tech d.o.o. Croatia. in press

Taguchi A, Nishiguchi S, Shiozuka M, Nomoto T, Ina M, Nojima S, Matsuda R, Takahashi Y, Nonomura Y, Kiso Y, Yamazaki Y, Yakushiji F, and Hayashi Y: Identification of negamycin analogs with reathrough activity for Duchenne muscular dystrophy chemotherapy. ACS Med. Chem. Lett. 3: 118-122, 2012

Sato H, Aoki R, Katsura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation of within-individual fluctuation of depressed mood with prefrontal cortex activity during verbal working memory task: optical topography study. J. Biomed. Opt., 16: 126007, 2012

Wagatsuma A, Shiozuka M, Kotake N, Kawachi T, Honda Y, Mabuchi K, Matsuda R, and Yamada S: Pharmacological inhibition of HSP90 activity negatively modulates myogenic differentiation and cell survival in C2C12 cells. Mol. Cell Biochem., 358: 265-280, 2011

Aoki R, Sato H, Katsura T, Utsugi K, Koizumi H, Matsuda R, and Maki A: Relationship of negative mood with prefrontal cortex activity during working memory tasks: An optical topography study. Neurosci. Res. 70: 189-196, 2011

Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, and Matsuda R: Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol. Cell Biochem.* 350: 1-11, 2011

Shima A, Pham J, Blanco E, Barton ER, Sweeney HL, and Matsuda R. IGF-I and vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. *Exp. Cell Res.* 317: 356-366 (2011)

Tokura Y, Nakayama Y, Fukada SI, Nara N, Yamamoto H, Matsuda R, and Hara T. Muscle injury-induced thymosin β_4 acts as a chemoattractant for myoblasts. *J. Biochem.* 149: 43-48 (2011)

塩塚政孝, 松田良一 筋ジストロフィーに対するリードスルー治療, *生体の科学* 62: 134-137 (2011)

塩塚政孝, 松田良一 ストップコドン読み飛ばしによる遺伝疾患の治療-デュシェンヌ型筋ジストロフィーを中心に,

BRAIN and NERVE 63: 1253-1260 (2011)

2. 学会発表

塩塚政孝, 吉田瑞子, 野々村禎昭, 松田良一: 筋ジストロフィーの症状改善を目指したナンセンス変異の薬理的抑制, 日本動物学会第82回大会 (2011)

野々村禎昭, 大日方昂, 塩塚政孝, 松田良一: ニワトリ胚胸筋発生におけるプログラム細胞死, 日本動物学会第82回大会 (2011)

和田英治, 吉田瑞子, 伊達宗宏, 松田良一: リン摂取がmdxマウスに及ぼす影響, 日本動物学会第82回大会 (2011)

大橋和也, 長田洋輔, 松田良一: 筋衛星細胞活性化に関する情報伝達系と温熱刺激の影響, 日本動物学会第82回大会 (2011)

長田洋輔, 大橋和也, 松田良一: 上皮細胞成長因子による筋衛星細胞の活性化はスフィンゴシン-1-リン酸を媒介する, 日本動物学会第82回大会 (2011)

和田英治, 吉田瑞子, 伊達宗宏, 古寺敏子, 松田良一: リン食摂取がmdxマウス異所的石灰化と筋機能に与える影響, 第11回 東京大学生命科学シンポジウム (2011)

大橋和也, 長田洋輔, 松田良一: 筋衛星細胞活性化刺激の探索とその情報伝達系の研究, 第11回 東京大学生命科学シンポジウム(2011)

Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, and Hara T: Ectopic expression of Lhx2 in muscle satellite cells inhibits their myotube differentiation. 第34回分子生物学会年会 (2011)

Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, and Matsuda R: Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. Gordon Research Conference (2011)

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Nonomura Y, and Matsuda R: Arbekacin as a therapeutic readthrough induce for

treatment of nonsense mutation-mediated Duchenne muscular dystrophy. The American Society for Cell Biology 51st Annual Meeting (2011)

Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, and Hara T: Ectopic expression of Lhx2 in muscle satellite cells inhibits their myotube differentiation. The American Society for Cell Biology 51st Annual Meeting (2011)

Wada E, Yoshida M, Date M, Higashi T, and Matsuda R: Effects of Dietary Phosphate on Ectopic Calcification and Muscle Function in mdx Mice. The American Society for Cell Biology 51st Annual Meeting (2011)

Ohashi K, Nagata Y, and Matsuda R: PI3K and Akt play an essential role for quiescent myogenic cell activation. The American Society for Cell Biology 51st Annual Meeting (2011)

Wada E, Yoshida M, Date M, and Matsuda R: Effects of Dietary

Phosphate on Extensive Ectopic Calcification in mdx Mouse Skeletal Muscle and Muscle Function. 16th World Muscle Society (2011)

我妻玲, 西田篤史, 松尾雅文, 高橋良和, 池田大四郎, 野々村禎昭・(2011/02/03)

Taguchi A, Shiozuka M, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y: Development of (+)-Negamycin Derivatives with Potent Readthrough Activity for Duchenne Muscular Dystrophy Chemotherapy, 第48回ペプチド討論会 (2011)

「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2011-263404) 林良雄, 田口晃弘, 薬師寺文華, 山崎有理, 松田良一, 塩塚政孝・(2011/12/01)

Taguchi A, Ina M, Shiozuka M, Sakurai Y, Hiroshima M, Kamiya M, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y: Development of Readthrough Peptidomimetics from Dipeptidic Antibiotics (+)-Negamycin for Duchenne Muscular Dystrophy Chemotherapy, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2011)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許申請済

「リードスルー誘導剤, 及びナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬」(PCT/JP2011/052263) 松田良一, 塩塚政孝,

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, and Matsuda R. Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. 50th Anniversary Symposium “Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy” Takeda S. ed., National Center of Neurology and Psychiatry, pp93-102, 2011

Wada E, Kikkawa N, Yoshida M, Date M, Higashi T, and Matsuda R: Effects of dietary phosphate on ectopic calcification and muscle function in mdx mice. In “Muscular Dystrophy” In Tech d.o.o. Croatia. in press

雑誌

Taguchi A, Nishiguchi S, Shiozuka M, Nomoto T, Ina M, Nojima S, Matsuda R, Takahashi Y, Nonomura Y, Kiso Y, Yamazaki Y, Yakushiji F, and Hayashi Y: Identification of negamycin analogs with reathrough activity for Duchenne muscular dystrophy chemotherapy. ACS Med. Chem. Lett. 3: 118-122, 2012

Sato H, Aoki R, Katsura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation of within-individual fluctuation of depressed mood with prefrontal cortex activity during verbal working memory task: optical topography study. J. Biomed. Opt., 16: 126007, 2012

Wagatsuma A, Shiozuka M, Kotake N, Kawachi T, Honda Y, Mabuchi K, Matsuda R, and Yamada S: Pharmacological inhibition of HSP90 activity negatively modulates myogenic differentiation and cell survival in C2C12 cells. Mol. Cell Biochem., 358: 265-280, 2011

Aoki R, Sato H, Katsura T, Utsugi K, Koizumi H, Matsuda R, and Maki A:
Relationship of negative mood with prefrontal cortex activity during working
memory tasks: An optical topography study. *Neurosci. Res.* 70: 189-196, 2011

Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, and Matsuda R:
Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol. Cell
Biochem.* 350: 1-11, 2011

Shima A, Pham J, Blanco E, Barton ER, Sweeney HL, and Matsuda R. IGF-I and
vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal
muscle cells at low temperatures. *Exp. Cell Res.* 317: 356-366, 2011

Tokura Y, Nakayama Y, Fukada SI, Nara N, Yamamoto H, Matsuda R, and Hara
T. Muscle injury-induced thymosin β_4 acts as a chemoattractant for
myoblasts. *J. Biochem.* 149: 43-48, 2011

塩塚政孝, 松田良一 筋ジストロフィーに対するリードスルー治療, *生体の科学* 62: 134-
137, 2011

塩塚政孝, 松田良一 ストップコドン読み飛ばしによる遺伝疾患の治療-デュシェンヌ型筋
ジストロフィーを中心に, *BRAIN and NERVE* 63: 1253-1260, 2011

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況

「リードスルー誘導剤，及びナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬」（PCT/JP2011/052263）松田良一，塩塚政孝，我妻玲，西田篤史，松尾雅文，高橋良和，池田大四郎，野々村禎昭・(2011/02/03)

「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2011-263404）林良雄，田口晃弘，薬師寺文華，山崎有理，松田良一，塩塚政孝・(2011/12/01)

Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy

Masataka Shiozuka¹⁾, Alexander D. MacKerell Jr.²⁾, Shijun Zhong²⁾, Akira Wagatsuma¹⁾, Yoshiaki Nonomura¹⁾, and Ryoichi Matsuda¹⁾

1) Department of Life Sciences, Graduate school of Arts and Sciences, the University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

2) Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Maryland, MD 21201, USA

Abstract

Readthrough of disease-causing premature termination codons might alleviate the pathologies of genetic disease caused by nonsense mutations. 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 transgenic mouse for readthrough-specific detection and tested several sterically related negamycin-like molecules searched by *in silico* screenings. Therefore, we found two compounds, which have a beneficial effect on readthrough action and confirmed that these readthrough-inducing compounds promote the dystrophin accumulation by immunohistochemistry and reduction of serum creatine kinase activity in *mdx* mice. We conclude that these compounds are promising new therapeutic candidates for nonsense mutation-mediated disorders including *Duchenne* muscular dystrophy.

This paper is to dedicate to Dr. Hideo Sugita for his 50th anniversary of the discovery of serum creatine kinase activity as a diagnostic marker of muscular dystrophy.

Key words : muscular dystrophy, Evans blue dye, creatine kinase, readthrough drug, nonsense mutation suppression

1 . Introduction

Creatine kinase (CK), an abundant soluble enzyme in striated muscle became a strong diagnostic marker in serum of muscular dystrophy patients 50 years ago by the report of Sugita and colleagues¹⁾. The leakage of this enzyme into blood stream reflects the elevated permeability or damage of muscle membrane, leading “membrane damage hypothesis” of dystrophic muscle more than 30 years before the discovery of dystrophin which resides underneath the membrane. We have demonstrated that vital staining dye, Evans blue dye (EBD), can be used as a marker of degenerating fibers with elevated membrane permeability in *mdx* mouse when the dye injected via intravenously²⁾. This method facilitates quantitative analyses of degenerating muscle fibers in *mdx* mouse, which does not develop severe symptom as compared with the case of human *Duchenne* muscular dystrophy (DMD). Since then many therapeutic analyses of gene transfer, myoblast transfer and drug administration were reported by using this method. It is easy to imagine that using the same leakiness of degenerating muscle membrane, CK comes out from and EBD comes into the degenerating muscle fiber (Fig. 1).

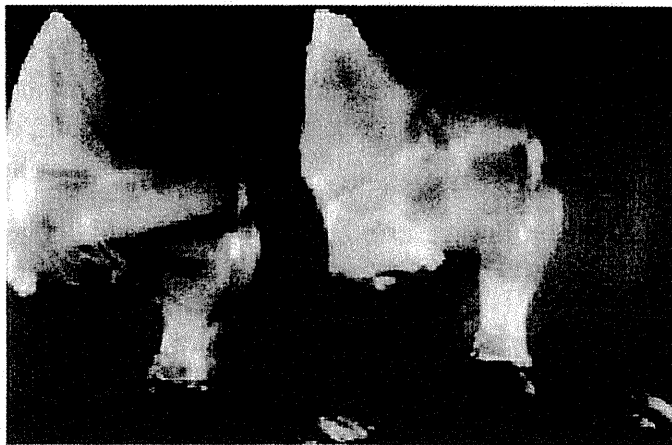


Fig. 1 Vital staining of Evans blue dye in dystrophic muscle

Permeable muscle fibers that have become damaged as a result of muscular dystrophy, in the skeletal muscle of *mdx* mouse were visualized by vital staining with Evans blue dye (A). In comparison with B10 normal mouse has no staining (B).

To rescue DMD, we are currently working on the development of readthrough drugs with less toxicity than known readthrough drug, gentamicin.