

201224103A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成25(2013)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24年度 総括研究報告書

研究代表者 松尾 雅文

平成25(2013)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 -----	11

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確立されていない。私達は、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エクソンのスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正する DMD 治療法を着想し、着想通りに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。しかし、この方法で発現させるジストロフィンは一部領域を欠失した不完全なもので、完全な発現とはいえない。その為、完全型ジストロフィンを発現させる治療の確立が緊急課題となっている。

本研究では、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治療の開発を目指し、スプライシングを制御する化学物質の探索を行った。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を組み込んだスプライシングレポーター系を構築し、シュードエクソンスキッピングを誘導する化合物の探索を行った。そして、1部の患者については、シュードエクソンスキッピングの誘導を可能にするアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功した。また、このスプライシングを制御する化学物質の探索時に、他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常を修正する化学物質の同定にも成功した。

【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

る。しかし、未だ有効な治療法は確立されていない。私達は、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エクソンのスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正する DMD 治療法を着想し、着想通りに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 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、現在では世界標準の治療法となりつつある。

しかし、この方法で発現させるジストロフィンは一部領域を欠失した不完全なもので、完全な発現とはいえない。その為、完全型ジストロフィンを発現させる治療の確立が緊急課題となっている。

本研究では、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治療の開発を目指し、スプライシングを制御

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は最も頻度の高いかつ重篤な遺伝性筋疾患であ

する化学物質の探索を行った。また、このスプライシングを制御する化学物質の探索時に、他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常の修正についても検討できたので報告する。

B. 研究方法

本研究では、以下の研究を計画した。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の DMD 患者での同定。巨大なジストロフィン遺伝子のイントロン内の異常で、新たなエクソンを形成する遺伝子異常の探索をジストロフィン mRNA のシーケンス解析により行った。2) スプライシングレポーター評価系の構築と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。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した。このミニ遺伝子を HeLa 細胞に導入し、そのスプライシング産物を RT-PCR 法で解析した。そして、この解析系に様々な化学物質を加え、化学物質によるシュードエクソンスキッピング効果などスプライシングへの影響を解析した。3) 患者由来培養筋細胞の確立。完全型ジストロフィンの発現が可能な患者から培養筋細胞株の樹立をはかった。4) 他のジストロフィーのスプライシングを修正する化学物質の探索。

(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した。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および神戸学院大学倫理委員会で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イントロン内の点変異からシュードエクソンを形成する異常を有する例を探索した。DMD 患者で通常の遺伝子解析では異常の同定されなかった例で、mRNA の塩基配列解析を追加で行い、mRNA に取り込まれたシュードエクソンの検出をはかった。これまでに合計 5 種のイントロン内の塩基異常の蓄積をはかることができた(図 1)。5 種うち 4 種はアウトオブフレームのエクソンであり、このシュードエクソンの挿入がよりナンセンス変異が形成された。1 種は、イントロン 2 内のインフレームエクソンであった。これらのシュードエクソンをエクソンスキッピングにより mRNA から除くと全く正常の完全型ジストロフィン産生が期待された。

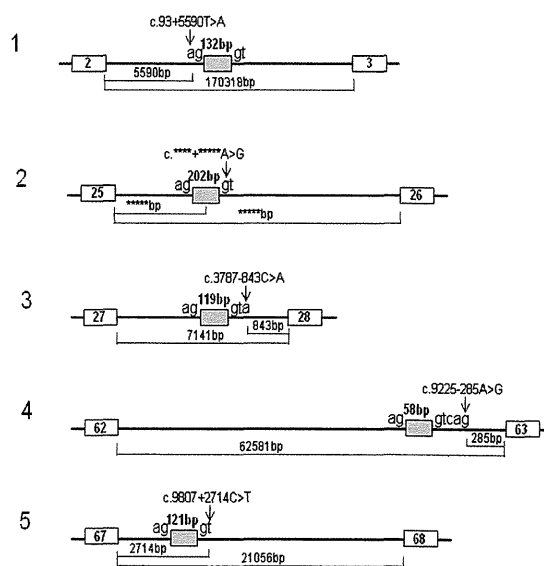


図 1 ; 5 種のシュードエクソン形成異常イントロンの内部に存在する 1 塩基異常がスプライスサイトを新たに形成し、そこが認識されてエクソン化していた。

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

5 個のシュードエクソンについて、異常を有したものと有されないもののそれぞれを H492 ベクターに挿入し、スプライシング解析を HeLa 細胞に導入して行った。さまざまな化学物質あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養液中に加え培養を行った。スプライシング産物を RT-PCR 法で解析した。一部の化学物質でシュードエクソンのスキッピング効果が得られた。しかしながら、その効果は以前得た TG003 によるエクソンスキッピング誘導効果と比較すると弱く、臨床応用するに十分な活性ではないと判断した。アンチセンスオリゴヌクレオチドによるエクソンスキッピングについても検討した。シュードエクソンの配列全体をカバーする様に 1 個のエクソンにつき 10 個近くの S-オリゴを作成し、それぞれのエクソンスキッピング誘導効果を解析した。しかしながら、有効なエクソンスキッピング誘導作用を得ることは出来なかった。そこで、修飾核酸を変更し、ENA を用いたところ、有効にシュードエクソンのスキッピング効果を得た。

3) 患者由来培養筋細胞の確立

治療対象となる症例の筋細胞株の樹立をはかった。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つ患者を対象として筋生検し、生検組織から筋培養細胞株を樹立をはかった。

4) 他の型の筋ジストロフィーでスプライシング異常を修正する化学物質の探索

他の型の筋ジストロフィーの中には、病態として遺伝子のスプライシング異常を合併する例がある。本研究のスプライシングを修飾する化学物質の探索時に、同時に他の型の筋ジストロフィーのスプライシング異常の修正の可能性を検討していった。驚くべきことに、スプライシング異常を修正する有力な化合物の同定に成功した。本化合物については今後

臨床応用をはかってゆく予定である。

D. 考察

1) 達成度について

本研究全体では、完全型ジストロフィンを発現させる治療法への道筋が示せた。修飾核酸を新しい型のものに変更することにより、シュードエクソンスキッピング誘導作用を発現することに成功した。今後、これを臨床応用することを検討する。

2) 研究成果の学術的意義について

完全型ジストロフィンの発現が可能となれば、従来手法によるジストロフィン発現との治療効果の差を明らかにすることができる。この両者の分子病態を明らかにすることにより、より一層明確な DMD の病態の解明となる。

3) 研究成果の行政的意義について

DMD で完全型ジストロフィンを発現させる方向性が見出せた。このことが完成された時には、DMD 患者が救われることとなる。DMD への医療・療育費の大幅な削減が期待される。

4) その他特記すべき事項について

本研究が世界初めて提唱し、その効果を報告していたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング誘導治療が外国製薬メーカーの手で治療されるようになった。また、その効果が実証されてきており、本治療法により利益を受ける患者は多い。本研究の成果をもとに早急に患者さんの利益へと具体化に結びつけたい。

E. 結論

DMD で欠損しているジストロフィンを完全な形で発現させる方法について道筋がつけられた。探索され、臨床応用されることが期待される。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエ

クソンスキッピング誘導による完全型ジストロフィンを発現させる治療法を確立することが可能となった。また、他の型のジストロフィーでもスプライシングを修正する治療法が応用可能なことが示され、明るい光明を見出した。

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/ DNA chimeric antisense oligonucleotides using in vitro splicing.	Aartsma-Rus A.	Exon skipping: Methods and protocols. Methods Mol Biol.	Human Press.	New Jersey	2012	131-141.
松尾雅文	筋ジストロフィー	松尾雅文	今日の治療指針 私はこう治療している V. 54	医学書院	東京	2012	1196

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rani Sasongko Sarina David Salmi Zilfalil <u>Matsuo,M</u> Zabidi-Hussin	Mutation Spectrum of Dystrophin Gene in Malaysian Patients with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy	Journal of Neurogenetics		in press	2013
Thu Tran,TH., Zhang,Z., Yagi,M., Lee,T., Awano,H., Nishida,A., Okinaga,T., Takeshima,Y., <u>Matsuo,M.</u>	Molecular characterization of an X(p21.2;q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28.	J Hum Genet	58	33-39	2012
Solyom S, Ewing AD, Hancks DC, Takeshima Y, Awano H, <u>Matsuo M</u> , Kazazian HH Jr.	Pathogenic orphan transduction created by a non-reference LINE-1 retrotransposon.	Hum. Mutat.	33	369-371	2012
Ota, M., Takeshima, Y., Nishida, A., Awano, H., Lee, T., Yagi, M., <u>Matsuo, M.</u>	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.	16	3-8	2012
Malueka,R.G., Takaoka,Y., Yagi,M., Awano,H., Lee,T., Dwianingsih,E. K., Nishida,A., Takeshima,Y., <u>Matsuo,M.</u>	Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers.	BMC Genetics.	31	13-23	2012

学会発表

発表者氏名	演題名	学会名	発行年
<u>R.G. Malueka</u> , M.yagi, H.Awano, T.Lee, E.K. Dwianingsih, A.Nishida, Y.Takeshima, M.Matsuo	Antisense oligonucleotide induced <i>dystrophin</i> exon 45 skipping at a low EC50 in a cell-free splicing system	17th International Congress of the World Muscle Society	2012
<u>R.G. Malueka</u> , Y.Takaoka, M.yagi, H.Awano, T.Lee, E.K. Dwianingsih, A.Nishida, Y.Takeshima, M.Matsuo	Categorization of 77 <i>dystrophin</i> exons into five groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors	17th International Congress of the World Muscle Society	2012
<u>Matsuo M</u>	Identification of mutations in a mammoth size gene	14th Asia Pacific Congress of Pediatrics and 4th Asia Pacific Congress of Paediatric Nursing	2012
<u>Matsuo M</u>	Modulation of splicing to restore a gene function	14th Asia Pacific Congress of Pediatrics and 4th Asia Pacific Congress of Paediatric Nursing	2012

III. 研究成果の刊行物・別刷

Optimizing RNA/ENA Chimeric Antisense Oligonucleotides Using In Vitro Splicing

Yasuhiro Takeshima, Mariko Yagi, and Masafumi Matsuo

Abstract

A molecular therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD) that converts dystrophin mRNA from out-of-frame to in-frame transcripts by inducing exon skipping with antisense oligonucleotides (AOs) is now approaching clinical application. To exploit the broad therapeutic applicability of exon skipping therapy, it is necessary to identify AOs that are able to induce efficient and specific exon skipping. To optimize AOs, we have established an in vitro splicing system using cultured DMD myocytes. Here, we describe the process of identifying the best AO.

Cultured DMD myocytes are established from a biopsy sample and the target exon is chosen. A series of AOs are designed to cover the whole target exon sequence. As AOs, we use 15–20-mer chimeric oligonucleotides consisting of 2'-*O*-methyl RNA and modified nucleic acid (2'-*O*, 4'-*C*-ethylene-bridged nucleic acid). Each AO is transfected individually into cultured DMD myocytes, and the resulting mRNA is analyzed by reverse transcription-PCR. The ability of each AO to induce exon skipping is examined by comparing the amount of cDNA with and without exon skipping. If necessary, having roughly localized the target region, another set of AOs are designed and the exon skipping abilities of the new AOs are examined. Finally, one AO is determined as the best for the molecular therapy.

Our simple and reliable methods using an in vitro splicing system have enabled us to identify optimized AOs against many exons of the *DMD* gene.

Key words: Antisense oligonucleotide, Duchenne muscular dystrophy, Dystrophin, Exon skipping, In vitro splicing, 2'-*O*, 4'-*C*-ethylene-bridged nucleic acid

1. Introduction

A molecular therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD), which converts dystrophin mRNA from out-of-frame to in-frame using antisense oligonucleotides (AOs) to induce exon skipping during splicing, is now approaching clinical application. The resultant in-frame mRNA enables the production of semifunctional, internally deleted dystrophin protein. In a previous study, we reported that intravenous administration of a phosphorothioate

AO against exon 19 resulted in dystrophin expression in the skeletal muscle of one DMD patient with an exon 20 deletion by producing in-frame mRNA lacking the exon 19 sequence (1). More recently, it has been reported that local administration of AOs against exon 51 induced exon skipping and dystrophin expression in the muscle of DMD patients (2, 3). These findings strongly support the rationale for the clinical application of AO therapy.

The exon skipping approach is mutation specific because different mutations require skipping of different exons. Genomic deletions of one or more exons of the *DMD* gene cluster in proximal (exons 2–20) or distal (exons 45–55) hot spots are categorized into various patterns (4). Therefore, a series of AOs inducing the skipping of various exons of the dystrophin transcript are required to treat the majority of DMD patients.

To develop the broad therapeutic applicability of this exon skipping strategy, the identification of an AO that causes efficient skipping of a particular exon is a critical step. There are presumed target sequences to which AOs bind: exonic splicing enhancer (ESE) sequences and splicing consensus sequences. Many exons contain ESEs, which facilitate the inclusion of genuine exons (5). We found an ESE in exon 19 by analyzing one DMD patient in whom an intraexonal 52-bp deletion in exon 19 resulted in exon skipping (6). In vitro and in vivo splicing analysis revealed that the deleted sequence in the index case functioned as an ESE, and the skipping of exon 19 was induced by an AO against this ESE sequence in cultured cells and in a patient (1, 7–9). The mechanism of AO-mediated exon skipping is considered to be blocking the binding of splicing factors to the ESE.

An alternative mechanism is to use AOs to block the function of splicing consensus sequences. However, this approach runs the risk of unintentionally inducing the skipping of other exons because highly conserved sequences are present in most splice sites. Therefore, ESEs are favorable targets for AOs.

ESEs can, in theory, be identified by Web-based algorithms (10–12), but none has 100% predictive accuracy. Therefore, in general, a trial and error procedure is still required to identify potent AOs. This must be a reliable and simple process. In this chapter, we describe a method for AO optimization using an in vitro splicing system with cultured DMD myocytes. As examples, we show the optimization of AOs against exons 44 and 6. In this method, AOs are synthesized that cover the whole region of the target exon sequence. The AOs are then individually transfected into cultured DMD myocytes, and dystrophin mRNA expression is analyzed to determine the ability of each AO to induce exon skipping.

To select optimized AOs using in vitro splicing analysis with cultured DMD myocytes, the chemical characteristics of the AOs must also be considered. In antisense technology, phosphorothioate oligonucleotides have been most widely used, but these have a

number of limitations, such as a low affinity for RNA. Therefore, many studies have focused on developing modified oligonucleotides; phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) and 2'-*O*-methyl phosphorothioate oligomers (2OMePS) have been used in recent clinical trials (2, 3). A novel nucleotide with an ethylene bridge between 2'-*O* and 4'-*C* ribose (2'-*O*, 4'-*C*-ethylene-bridged nucleic acid [ENA]) was chemically synthesized and has been shown to be highly nuclease resistant and have a high binding affinity for the complementary RNA strand (13). Recently, we showed that the exon skipping ability of an AO consisting of 2'-*O*-methyl RNA and ENA (an RNA/ENA chimera) was more than 40 times higher than that of the corresponding phosphorothioate oligonucleotide (14). Therefore, for optimization of AOs, we have used RNA/ENA chimera oligonucleotides.

2. Materials

2.1. AO Design

No materials needed.

2.2. Myocyte Culture

1. Trypsin 250, 5% in phosphate-buffered saline (PBS). Stored in single-use aliquots at -20°C .
2. Sterilized scissors (to cut the muscle biopsies).
3. 100- μm nylon cell strainers (to make single-cell suspensions).
4. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS).
5. Growing medium: DMEM supplemented with 20% FBS, 2% Ultrosor-G, and 1% Antibiotics–Antimycotics.
6. Differentiation medium: DMEM supplemented with 2% horse serum (HS) and 1% Antibiotics–Antimycotics.
7. Gelatin (to coat tissue culture dishes).

2.3. Transfection of AO

1. Medium for transfection: OptiMEM (Invitrogen).
2. Reagents for transfection: Plus Reagent (Invitrogen) and Lipofectamine (Invitrogen).
3. Horse serum.
4. AOs.

2.4. mRNA Analysis

1. RNA isolation reagent, e.g., from ISOGEN.
2. PBS.
3. Reagents for reverse transcription (RT)-PCR: e.g., moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) (Invitrogen) and random hexamer primers.
4. Plasmid for subcloning of RT-PCR products, e.g., pT7 Blue T vector (Novagen).

3. Methods

3.1. Design of AOs for the First Screening Step

Design a series of 15–20-mer AOs to cover the whole target exon sequence (see Notes 1–3). AOs consist of 2'-*O*-methyl RNA and ENA residues, and ENA residues are incorporated at cytosines and thymines or at both the 5'-end and 3'-end. They are synthesized using a DNA synthesizer as described previously (15).

3.2. Myocyte Culture

The procedure for myocyte culture is shown in Fig. 1.

1. Obtain the muscle biopsy sample from the biceps or quadriceps muscle of DMD patients with informed consent (see Notes 4 and 5).

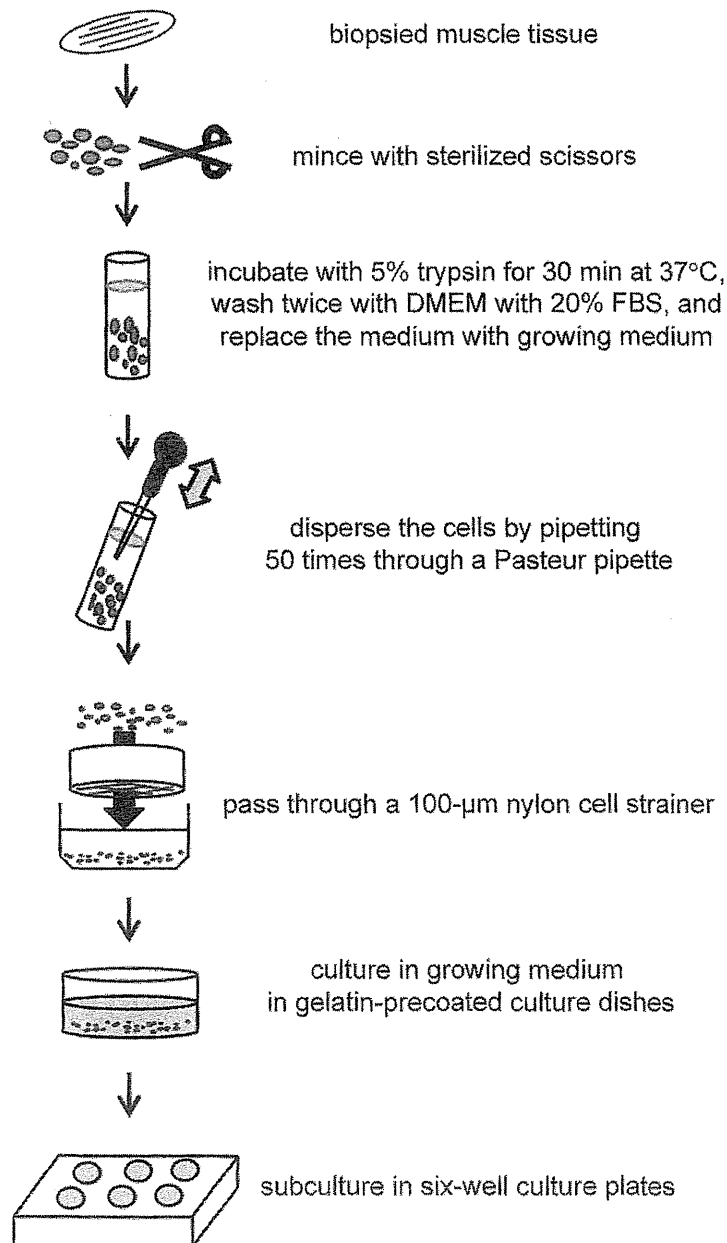


Fig. 1. The procedure for myocyte culture preparation.

2. Mince the muscle biopsy sample with sterilized scissors and wash three times with PBS.
3. Incubate minced tissue with 5% trypsin in PBS for 30 min at 37°C.
4. Collect dissociated cells by centrifugation at $200\times g$ for 2 min, wash twice with DMEM supplemented with 20% FBS, and then replace this medium with growing medium. Disperse cells by pipetting 50 times through a Pasteur pipette and then pass through a 100- μm nylon cell strainer to generate a single-cell suspension. Culture cells in growing medium in culture dishes precoated with gelatin (see Note 6).
5. When the number of primary myoblasts is sufficient, subculture by seeding in 6-well culture plates precoated with gelatin.
6. When the myoblasts reach semiconfluency, replace the medium to differentiation medium to induce cell differentiation (see Notes 7 and 8).

3.3. Transfection of AO

The procedure for the transfection of AOs is shown in Fig. 2.

1. On day 7, after induction of the differentiation, transfect DMD primary myotubes with an AO.
2. Dissolve the AO in 100 μl OptiMEM mixed with 6 μl Plus Reagent and incubate for 15 min at room temperature. Mix the incubated solution with 8 μl Lipofectamine dissolved in 100 μl OptiMEM and incubate for a further 15 min.
3. Add the mixture to culture medium (800 μl OptiMEM) to a final AO concentration of 200 nM.
4. After 3 h of incubation, add HS to a final concentration of 2% and incubate for another 2 days before RNA isolation.

3.4. mRNA Analysis

1. Two days after transfection of the AO, wash cultured myocytes twice with PBS, dissolve in 500 μl RNA isolation solution, and extract total RNA according to the manufacturer's instructions.

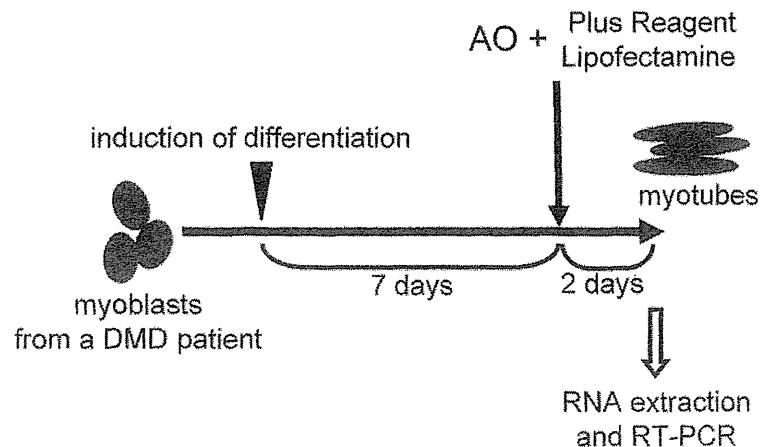


Fig. 2. The procedure for AO transfection.

2. Prepare cDNA from 2 μ g total RNA using, e.g., MMLV-RT and random hexamer primers according to the instructions of the RT enzyme supplier.
3. Perform a PCR amplification on cDNA spanning the AO-targeted exon, and confirm the nucleotide sequence of the amplified product by direct sequencing or after subcloning of the product into a plasmid vector, e.g., pT7 Blue T.
4. Examine the potency of each AO by comparing the amount of PCR product with and without the targeted exon, and assess the most effective AO for each exon.

3.5. The Second Screening Step

When an optimal AO cannot be selected in the first screening step (see Note 9), design another set of AOs based on the results of the first screening, in which a potential target region has been roughly identified. Analyze the ability of the new AOs to induce exon skipping using the same procedure, until an optimal AO is identified.

Examples of the optimization for exon 44 and exon 6 are shown in Figs. 3 and 4.

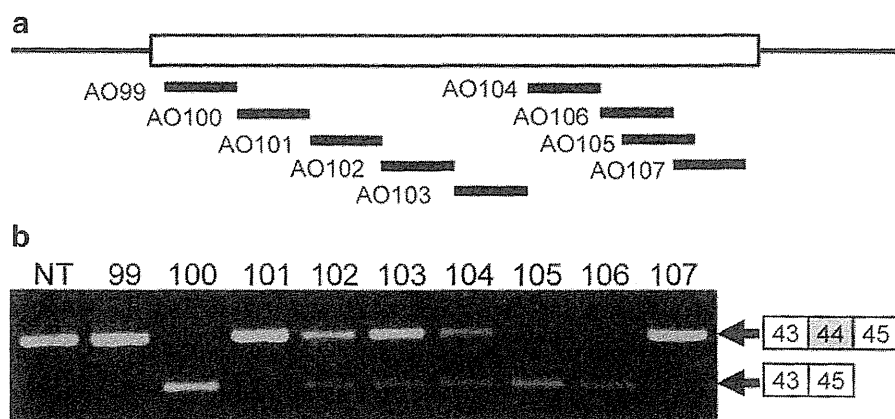


Fig. 3. Analysis of AOs designed to induce exon 44 skipping. (a) Bars represent the location of the AOs targeting exon 44, in which ENA residues are incorporated at cytosines and thymines, and 2'-*O*-methyl RNAs are incorporated at the other positions. The length of each AO is 18 mer, and the location is as follows: AO99 (6293–6310), AO100 (6311–6328), AO101 (6329–6346), AO102 (6347–6364), AO103 (6365–6382), AO104 (6383–6400), AO105 (6406–6423), AO106 (6400–6417), and AO107 (6418–6435), according to the cDNA reference sequence in GenBank, accession number NM_004006.1, in which the “A” of the start codon is nucleotide 1. The box and lines on either side represent exon 44 and its flanking introns, respectively. (b) RT-PCR results of AO-induced dystrophin exon 44 skipping. The RT-PCR products shown span exons 43–45 of the *DMD* gene after transfection of AOs designed to induce exon 44 skipping. Lane NT represents nontreated myocytes, and the numbers above each lane represent the name of the AO. The exons in the amplified products are shown schematically on the right, and the shaded box represents the AO target exon. AO100 induced exon skipping in 100% of the mRNAs, whereas AO99, AO101, and AO107 did not induce exon skipping. For the other AOs, both skipped and unskipped products were detected. AO102, AO103, and AO104 resulted in less skipped product than unskipped product, whereas AO105 and AO106 induced exon 44 skipping in the majority of mRNAs. Because AO100 induced complete exon skipping, further screening was not necessary and AO100 was selected as the optimal AO for exon 44.

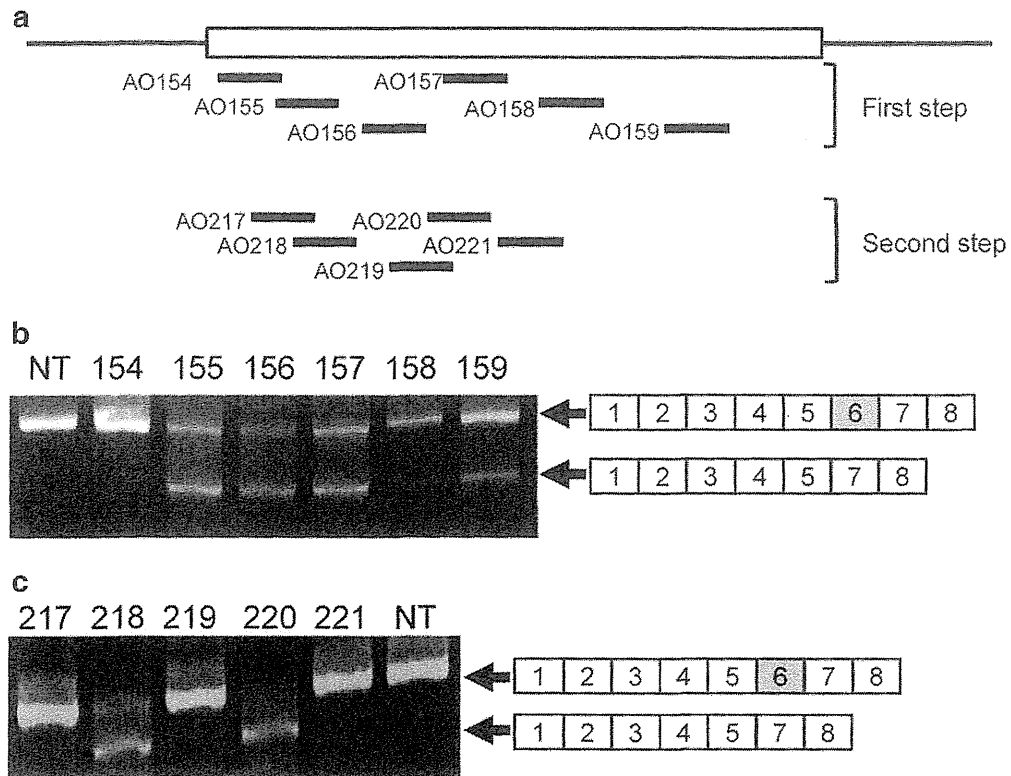


Fig. 4. Analysis of AOs designed to induce exon 6 skipping. (a) Bars represent the location of AOs targeting exon 6, in which ENA residues are incorporated at cytosines and thymines, and 2'-*O*-methyl RNAs are incorporated at the other positions. The AOs shown in the upper and the lower half were used in the first and second screening steps, respectively. The length of each AO is 18 mer, and the location is as follows: AO154 (360–377), AO155 (376–393), AO156 (399–416), AO157 (425–442), AO158 (449–466), AO159 (485–502), AO217 (369–386), AO218 (383–400), AO219 (407–424), AO220 (418–435), and AO221 (437–454), designated as described in the legend for Fig. 3. The box and lines on either side represent exon 6 and its flanking introns, respectively. (b) RT-PCR results of the first screening step for AO-induced dystrophin exon 6 skipping. The RT-PCR products shown span exons 1–8 of the *DMD* gene after transfection of AOs designed to induce exon 6 skipping. Lane NT represents nontreated myocytes, and the numbers above each lane represent the name of the AO. The exons in the amplified products are shown schematically on the right, and the shaded box represents the AO target exon. AO155, AO156, and AO157 induced exon skipping in half of the mRNAs, but an optimal AO could not be determined. (c) RT-PCR results of the second screening step for AO-induced dystrophin exon 6 skipping. For further screening, AOs 217–221 were designed around AO155, AO156, and AO157. AO220 induced exon skipping in almost all of the mRNAs, and was therefore selected as the best AO for exon 6.

Briefly, for exon 44, nine 18-mer AOs were designed to cover the whole exon sequence as shown in Fig. 3a. Representative examples of AO-induced exon 44 skipping are shown in Fig. 3b. AO100 induced complete exon skipping in the first screening step, and then AO100 was selected as the optimal AO for exon 44. In the case of exon 6, six 18-mer AOs were designed as shown in Fig. 4a (first step); however, an optimized AO could not be determined after first screening step (Fig. 4b). Therefore, another set of AOs were designed as shown in Fig. 4a (second step), and AO220 was selected as the best AO for exon 6 as shown in Fig. 4c (see legends to Figs. 3 and 4 for more details).

3.6. Modification of the Position of the ENA Residues (See Fig. 5)

For exon 44 and exon 6, the optimal AO induced exon skipping in almost all the mRNAs (Figs. 3 and 4). For other exons, such as exon 46, unskipped mRNA still remained even after transfection

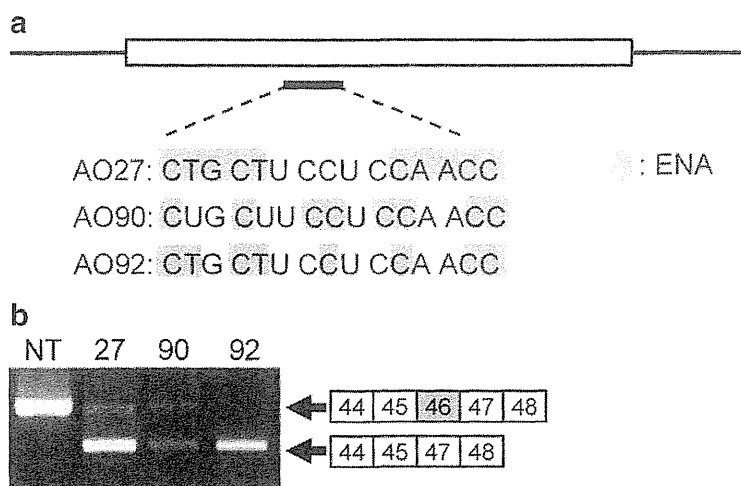


Fig. 5. The ability of modified AOs to induce exon skipping of exon 46. (a) The location and nucleotide sequence of each AO. AO27, AO90, and AO92 were designed at the same position (nt. 6677–6691), but with differing patterns of ENA residue incorporation. *Shaded letters* represent ENA-modified residues; *nonshaded letters* represent 2'-O-methyl RNAs. The *box and lines on either side* represent exon 46 and its flanking introns, respectively. (b) RT-PCR results of the modified AO-induced dystrophin exon 46 skipping. The RT-PCR products shown span exons 44–48 of the dystrophin mRNA after transfection of the modified AOs. *Lane NT* represents nontreated myocytes and the numbers above each lane represent the name of the AO. AO92 induced the skipping of exon 46 in almost 100% of the mRNAs, whereas unskipped mRNA still remained after AO27 transfection. The exons in the amplified products are shown schematically *on the right*, and the *shaded box* represents the AO target exon.

of the best AO, AO27 (Fig. 5b, lane 27). The position of the ENA residues within the AO might affect exon skipping ability. Therefore, the potency of the modified AOs in which nucleotide sequence was same but the ENAs were incorporated at different positions was examined when the optimal AO could not be determined. Modified AOs are shown in Fig. 5a (AO90 and AO92). Representative examples of modified AO-induced exon 46 skipping are shown in Fig. 5b. AO92 induced exon skipping in almost mRNA, and then AO92 was selected as the optimal AO for exon 46.

4. Notes

1. AOs that are complementary to ESEs are thought to be most effective at inducing exon skipping. There are Web-based algorithms to identify ESEs, such as ESEfinder (10), RESCUE-ESE (11), and SpliceAid (12), but none has 100% predictive accuracy (16–19). Therefore, using these Web-based programs alone runs the risk of missing the optimal AO.
2. The nucleotide sequences of AOs should be designed to cover the whole target exon sequence, and the ability of each AO to