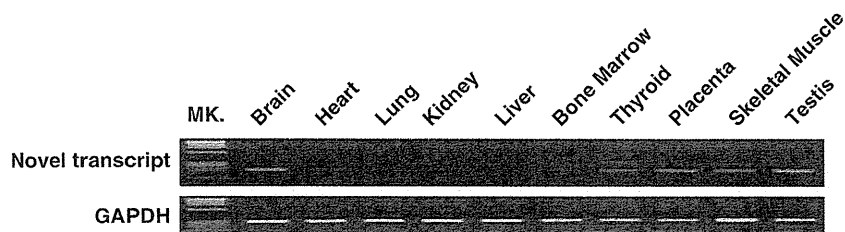


**Figure 3** The origin of the inserted sequence on chromosome 11. The normal sequence of chromosome 11 (5'–3') is shown on the top line (ch11). The bottom line shows the complement of the inserted sequence (shaded), and the upstream sequence obtained by 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) (novel). The vertical arrow indicates the 5' end of the 5'-RACE product. Vertical lines indicate nucleotide matches. Boxes indicate TATA boxes. The polyadenylation signal (AATAAA) is marked by dots over the nucleotides. The longest open-reading frame, encoding 29 amino acids (MTVKWGKKTCPASISMLLHHMKTEIFQF), is underlined. Vertical arrowheads indicate nucleotide numbers on chromosome 11 (GenBank accession no., NT\_033899.8).



**Figure 4** Expression of the inserted sequence. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products of a fragment of the inserted sequence from 10 human tissues (upper panel). A product of the expected size (206 bp) was observed clearly in the brain, thyroid, placenta, skeletal muscle and testis, but only faintly in the heart, lung and kidney. The validity of the amplified products was confirmed by sequencing (data not shown). No visible product was observed in the liver or bone marrow. The lower panel shows glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) RT-PCR products from the same samples. MK, DNA size marker.

As the inserted sequence corresponded to the 3' end of the unknown transcript, we cloned the 5' end of the transcript by 5'-RACE from the brain mRNA. This generated a single product with an additional 240 bp at the 5' end of the inserted sequence (Figure 3). In the genome, this additional sequence was contiguous with the inserted fragment. Therefore, we concluded that the entire 452-bp region was expressed in the human brain. Examination of the genomic sequence upstream of the transcribed sequence revealed four TATA boxes (Figure 3). These results indicated that this region contains an intronless gene structure.

When the novel transcript was examined for its protein coding ability, the longest open-reading frame encoded 29 amino acids (MTVKWGKKTCPASISMLLHHMKTEIFQF) (Figure 3). Homology searches for this peptide revealed no significantly homologous proteins and no significant domains. A strong consensus sequence for the translation initiation site<sup>18</sup> was not present in this frame. Taken together, these findings indicated no appreciable protein coding ability. The possibility of the transcript being a micro-RNA was examined by screening it against the miRBase database, but the results were negative. Therefore, this transcript is currently considered

a novel non-coding RNA transcribed from an apparently silent genomic region.

## DISCUSSION

We identified an approximately 330-bp insertion at the ninth nucleotide of exon 67 of the *dystrophin* gene (Figure 1). Even though the enlarged exon 67 maintained its wild-type splicing consensus sequences at either end, the full sequence of exon 67 was skipped during splicing (Figure 2). As a result, the dystrophin mRNA would contain a premature stop codon within exon 68. We concluded that this insertion mutation causes DMD by inducing a secondary splicing error. The exon 67-skipping is likely owing to the enlarged exon size (approximately 480 bp) that escapes proper recognition by the splicing machinery, as has been reported previously.<sup>11</sup>

The identified insertion sequence had the hallmarks of a retrotransposon: an approximately 115-bp T nucleotide stretch that would be complementary to the poly(A) tract of the mRNA and 3-bp (TTC) target site duplications (Figure 1b). In addition, sequences at the insertion site within exon 67 were well matched to the consensus cleavage site for the L1 endonuclease (TTTCAA) (Figure 1c). However, the inserted sequence did not encode any meaningful protein, including reverse transcriptase (Figure 3). We assume that the novel transcript was retrotransposed using autonomous L1 retrotranscriptase and endonuclease.<sup>9</sup> It has been shown that protein-coding mRNAs are occasionally reverse transcribed and integrated into genomic DNA, possibly as a by-product of L1 retrotransposition.<sup>19</sup> L1-encoded proteins bind to a processed cytoplasmic mRNA instead of L1 RNA. The abundance of cellular mRNAs and their 3' poly(A) tails are thus thought to be the critical factors allowing mRNAs to take advantage of L1-encoded proteins for retrotransposition.<sup>3</sup>

It has been previously reported that the L1 retrotransposon machinery retrotransposed a partial *ATM* gene sequence from chromosomes 11 to 7, although no full-length L1 has been identified around the *ATM* gene.<sup>20</sup> Considering that the *ATM* gene is 2614 kb centromeric to the novel transcript, it is likely that the same L1 that retrotransposed the *ATM* gene also retrotransposed the novel non-coding gene into dystrophin.

A total of 118 disease events attributable to retrotransposons of L1s, Alus and SVAs have been reported to date, comprising 0.27% of all human mutations identified.<sup>4</sup> In the *dystrophin* gene, four retrotransposons have been identified to cause DMD, the largest being a 1400-bp L1 insertion.<sup>12</sup> Previously, one L1 insertion was identified in our Japanese patient.<sup>11</sup> This report increases the number of retrotransposon-related insertions to two out of the 442 identified mutations in Japan,<sup>21</sup> and we calculated the rate of retrotransposon-related insertion to be 0.47% of the mutations identified in Japanese dystrophinopathy. This higher incidence may be owing to a detection bias for mutations in the *dystrophin* gene on the X chromosome, which are more easily detected than mutations in autosomal genes.<sup>5</sup>

One non-autonomous retrotransposon insertion causing human disease has been reported in the *SLC25A13* gene, resulting in citrin deficiency.<sup>10</sup> The 2667-bp sequence from a gene on chromosome 6 (chromosome 6 open-reading frame 68) was found inserted into intron 16 of the *SLC25A13* gene. This insertion has a repetitive sequence (17 nt) derived from *SLC25A13* at both ends of the insert. Even though it was inserted within an intron, this insertion created a novel exon that included a stop codon and a poly(A) addition signal. The insertion was identified not only in the Japanese, but also in other East Asian populations such as the Chinese and Koreans. Therefore, this is most likely an ancient retrotransposition that occurred before the Japanese and Chinese became separated. In contrast, our insertion

has two novel characteristics: (1) the insertion occurred in the patient, indicating contemporary non-autonomous retrotranspositional activity and (2) the inserted sequence was a transcript from a region where no gene has been mapped.

As the novel transcript was expressed in the brain (Figure 4), it may be involved in brain function. Recently, it has been reported that normally quiescent 'jumping genes' can be activated in neural progenitor cells.<sup>22</sup> The novel transcript may be one of these quiescent genes, although its expression is probably under the control of a TATA box (Figure 3). Further studies are required to elucidate the physiological role of this novel non-coding gene.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Kanako Yokoyama for her secretarial help. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) and a Grant-in-Aid for Exploratory Research from the Japan Society for the Promotion of Science; a Health and Labour Sciences Research Grant for Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health; and a research grant for Nervous and Mental disorders from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

- 1 Deininger, P. L. & Batzer, M. A. Mammalian retroelements. *Genome Res.* **12**, 1455–1465 (2002).
- 2 Goodier, J. L. & Kazazian, Jr. H. H. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* **135**, 23–35 (2008).
- 3 Chen, J. M., Stenson, P. D., Cooper, D. N. & Ferec, C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum. Genet.* **117**, 411–427 (2005).
- 4 Callinan, P. A. & Batzer, M. A. Retrotransposable elements and human disease. *Genome Dyn.* **1**, 104–115 (2006).
- 5 Belancio, V. P., Deininger, P. L. & Roy-Engel, A. M. LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease. *Genome Med.* **1**, 97 (2009).
- 6 Ostertag, E. M. & Kazazian, Jr. H. H. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501–538 (2001).
- 7 Chen, J. M., Ferec, C. & Cooper, D. N. LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease: mutation detection bias and multiple mechanisms of target gene disruption. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 56182 (2006).
- 8 Drouin, G. Processed pseudogenes are more abundant in human and mouse X chromosomes than in autosomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 1652–1655 (2006).
- 9 Esnault, C., Maestre, J. & Heidmann, T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat. Genet.* **24**, 363–367 (2000).
- 10 Tabata, A., Sheng, J. S., Ushikai, M., Song, Y. Z., Gao, H. Z., Lu, Y. B. *et al.* Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in *SLC25A13* gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency. *J. Hum. Genet.* **53**, 534–545 (2008).
- 11 Narita, N., Nishio, H., Kitoh, Y., Ishikawa, Y., Ishikawa, Y., Minami, R. *et al.* Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **91**, 1862–1867 (1993).
- 12 Holmes, S. E., Dombroski, B. A., Krebs, C. M., Boehm, C. D. & Kazazian, Jr. H. H. A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nat. Genet.* **7**, 143–148 (1994).
- 13 Yoshida, K., Nakamura, A., Yazaki, M., Ikeda, S. & Takeda, S. Insertional mutation by transposable element, L1, in the DMD gene results in X-linked dilated cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1129–1132 (1998).
- 14 Musova, Z., Hedvicakova, P., Mohrmann, M., Tesarova, M., Krepelova, A., Zeman, J. *et al.* A novel insertion of a rearranged L1 element in exon 44 of the dystrophin gene: further evidence for possible bias in retroposon integration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 145–149 (2006).
- 15 Tran, V. K., Takeshima, Y., Zhang, Z., Yagi, M., Nishiyama, A., Habara, Y. *et al.* Splicing analysis disclosed a determinant single nucleotide for exon skipping caused by a novel intra-exonic four-nucleotide deletion in the dystrophin gene. *J. Med. Genet.* **43**, 924–930 (2006).
- 16 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.* **87**, 2127–2131 (1991).

- 17 Tran, V. K., Takeshima, Y., Zhang, Z., Habara, Y., Haginoya, K., Nishiyama, A. *et al*. A nonsense mutation-created intraexonic splice site is active in the lymphocytes, but not in the skeletal muscle of a DMD patient. *Hum. Genet.* **120**, 737–742 (2007).
- 18 Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125–8148 (1987).
- 19 Ding, W., Lin, L., Chen, B. & Dai, J. L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB Life* **58**, 677–685 (2006).
- 20 Ejima, Y. & Yang, L. Trans mobilization of genomic DNA as a mechanism for retrotransposon-mediated exon shuffling. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1321–1328 (2003).
- 21 Takeshima, Y., Yagi, M., Okizuka, Y., Awano, H., Zhang, Z., Yamauchi, Y. *et al*. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J. Hum. Genet.* **55**, 379–388 (2010).
- 22 Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T. *et al*. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* **460**, 1127–1131 (2009).

# 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

Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy



李 知子(写真) 松尾雅文

Tomoko LEE<sup>1</sup> and Masafumi MATSUO<sup>2</sup>

神戸大学大学院医学研究科小児科学<sup>1</sup>, 神戸学院大学総合リハビリテーション学部<sup>2</sup>

◎Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子の異常によって発症する遺伝性筋疾患であり、出生男児 3,500 人に 1 人という高頻度で発症し、症状も重篤であるが、いまだ根治治療は確立していない。DMD の 60%ではジストロフィン遺伝子の 1~数エクソンの欠失がみられ、欠失によりアミノ酸読み取り枠のずれが生じるために、機能を有するジストロフィン蛋白が産生されない。現在 DMD の治療として注目されているエクソンスキッピング誘導治療は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)を用いて mRNA 前駆体のスプライシングのレベルでエクソンのスキッピングを誘導し、アミノ酸の読み取り枠のずれを修正することでジストロフィン蛋白を産生させるものである。著者らは 2006 年に、DMD 症例に対して AS-oligo を静脈内投与しジストロフィン蛋白を発現させることが可能であることを、世界ではじめて明らかにした。著者らの報告に引き続き、イギリスやオランダでもエクソンスキッピング誘導治療の有効性が報告されている。さらに近年、著者らはエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物を見出した。エクソンスキッピング誘導治療は近い将来、DMD の標準的な治療になるものと期待される。

**Key word** : Duchenne型筋ジストロフィー(DMD), エクソンスキッピング, アンチセンスオリゴヌクレオチド, 低分子化合物

Duchenne 型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy : DMD)は小児で発症するもっとも頻度の高い遺伝性筋疾患であり、ジストロフィン遺伝子の異常によって発症する。出生男児 3,500 人に 1 人が発症する頻度の高い疾患で症状も重篤であるため、根治的な治療法の開発が望まれてきた。ジストロフィン遺伝子がクローニングされて以降、正常なジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子治療に注目が集まったが、現在もまだ臨床での治療としての実用化には至っていない。

一方で、著者らはアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)により遺伝情報を修復する分子治療の検討を進めてきた。これは、AS-oligo を用いて mRNA 前駆体のスプライシングレベルでエクソンのスキッピングを誘導することでアミノ酸の読み取り枠のずれを修正し、機能を有するジスト

ロフィン蛋白を発現させるものである。そして実際に DMD 症例に対して AS-oligo を静脈内投与し、ジストロフィン蛋白を発現させることが可能であることを 2006 年に世界ではじめて明らかにした<sup>1)</sup>。その後、オランダ、イギリスからも DMD 症例に対する AS-oligo 投与の有効性が報告された<sup>2-4)</sup>、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療研究が現在精力的に進められている。

本稿では、DMD に対するエクソンスキッピング誘導治療について概説する。

## Duchenne型およびBecker型筋ジストロフィーとジストロフィン遺伝子

DMD および Becker 型筋ジストロフィー(Becker muscular dystrophy : BMD)は、伴性劣性遺伝形式を示すもっとも頻度の高い遺伝性の進行

性筋萎縮症である。DMD は 4~5 歳ごろから筋力低下に気づかれ、その後筋力低下が進行し 12 歳までに歩行不能となり、20 歳代で心不全や呼吸不全により死に至る重篤な疾患である。一方、BMD は DMD に比べて筋力低下の程度は軽く進行も遅いため、壮年期になってはじめて症状を認める例もある。

DMD/BMD の責任遺伝子であるジストロフィン遺伝子は X 染色体短腕上に存在する 3,000 kb に及ぶ巨大な遺伝子であり、79 個のエクソンから構成される。DMD/BMD でみられるジストロフィン遺伝子の変異としては、エクソン単位の欠失や重複、ナンセンス変異、スプライシング変異などの微小変異があるが、エクソン単位の欠失がおおよそ 6 割を占め、もっとも多い<sup>5)</sup>。

ジストロフィン遺伝子にコードされているジストロフィン筋細胞膜を裏打ちする細長い棒状の蛋白である。骨格筋の免疫染色では、DMD ではジストロフィン筋細胞膜に染色されずジストロフィン欠損を示すが、症状の軽い BMD では筋細胞膜にジストロフィンが斑点状に染色される。

### ● アミノ酸読み取り枠則

同じジストロフィン遺伝子の異常であるにもかかわらず、DMD と BMD では臨床像が大きく異なる。重症の DMD と軽症である BMD の違いは、アミノ酸読み取り枠則で説明される。

mRNA から蛋白が翻訳される際、3 塩基で 1 つのアミノ酸をコードしている。ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失によって失われる塩基数が 3 の倍数であれば、mRNA のアミノ酸読み取り枠は維持されるため(インフレーム)、翻訳の際に遺伝子欠失部位に相当するアミノ酸は欠失するが、機能をもったジストロフィンが産生される。そのため症状の軽い BMD となる。欠失の塩基数が 3 の倍数でない場合は mRNA の読み取り枠がずれるため(アウトオブフレーム)、ストップコドンが出現し、機能的なジストロフィン蛋白は合成されず重症型の DMD となる。

この分子病態に注目し、DMD のアウトオブフレームをインフレームに変換させることができれば、機能を有するジストロフィン蛋白を産生し、

重症の DMD を軽症型へ変換することが可能となる。DMD に対するエクソンスキッピング誘導治療はまさにこの着想に基づき、患者自身のもつ遺伝子を活用してジストロフィンを発現させるものである。

### ● 神戸大学で行った

#### エクソンスキッピング誘導治療

著者らは、エクソン 19 内に部分欠失を有する症例(ジストロフィン神戸)<sup>6)</sup>の解析において、ゲノム DNA ではエクソン 19 内に 52 塩基の欠失が認められるのに対し、mRNA ではエクソン 19 全体が欠失しているエクソンスキッピングが生じていることを発見した。この例ではスプライシングのコンセンサス配列が維持されており、エクソンスキッピングの生じた原因が不明であった。In vitro スプライシング系を用いた検討により、エクソン 19 内の欠失している配列内に含まれるスプライシングを促進する配列(splicing enhancer sequence: SES, 「サイドメモ」参照)が欠失したためであることを明らかにした<sup>7)</sup>。さらに、SES に対する AS-oligo によりエクソン 19 のスキッピングを人工的に誘導しうることを世界ではじめて示した<sup>8)</sup>。

つぎに、エクソン 19 のスキッピングを誘導する

#### サイドメモ

#### スプライシング促進配列(splicing enhancer sequence: SES)

スプライシングは、mRNA 前駆体からイントロンが取り除かれ、エクソンとエクソンが結合する反応である。スプライシング部位決定には従来よりエクソン・イントロン境界部の 5'および 3'スプライシングコンセンサス配列が重要であるとされてきた。しかし、これらのコンセンサス配列の存在のみでは十分ではなく、エクソン内の配列がスプライシング部位決定に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。こうした配列はエクソン内スプライシング促進配列(exonic SES)とよばれ、この配列に核内のさまざまな核蛋白が結合することによりスプライシングが制御されている。AS-oligo は、これらの核蛋白の結合を阻害することにより、エクソンスキッピングを誘導すると考えられている。

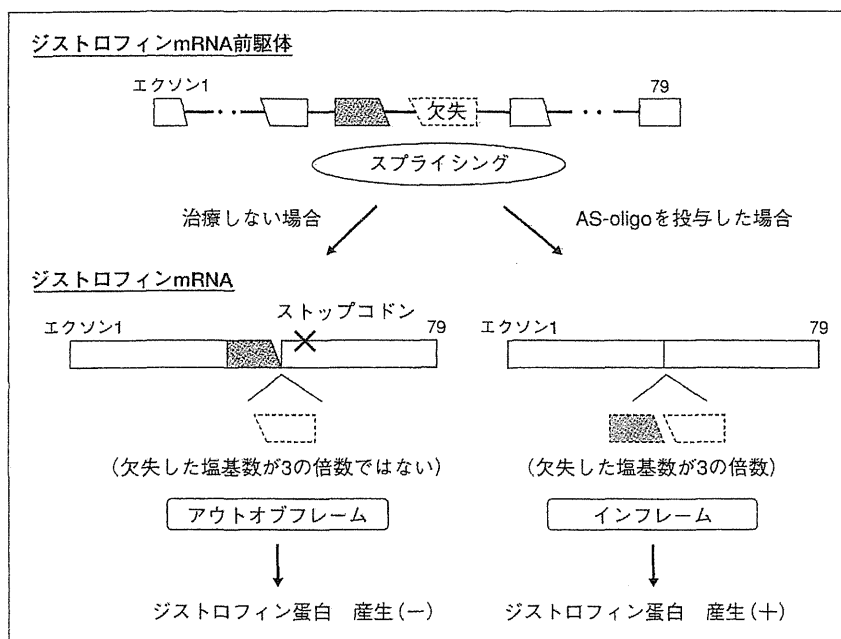


図 1 エクソンスキッピング誘導によるDMD治療モデル

欠失したエクソンに含まれる塩基数が3の倍数でない場合は(点線台形で示す)アウトオブフレームとなるためアミノ酸の読み取り枠にずれが生じ、ストップコドンが出現してジストロフィンが産生されない(図の左側)。アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-oligo)を用いて欠失したエクソンに隣接するエクソンのスキッピングを誘導し欠失する塩基数の合計を3の倍数とするとアミノ酸の読み取り枠をはずれないため(インフレーム)、ジストロフィンが産生される(図の右側)。

3の倍数の塩基数をコードするエクソンは四角、3の倍数でない塩基数をコードするエクソンは台形で示している。

ことによる治療を検討した(図1)。エクソン20欠失症例ではエクソン20の242塩基が欠失するためアウトオブフレームとなり、エクソン21内にストップコドンが出現しジストロフィンが産生されない。しかし隣接する88塩基からなるエクソン19のスキッピングを誘導すればエクソン19と20の合計330塩基が消失するためインフレームとなり、不完全ながらも機能を有するジストロフィンの産生が期待できる。エクソン20を欠失したDMD患者の培養筋細胞にAS-oligoを導入した結果、エクソン19のスキッピングが誘導されジストロフィンの発現がみられた<sup>9)</sup>。

この結果を踏まえ、エクソン20を欠失したDMD患者へのエクソンスキッピング誘導治療を行った。AS-oligo(0.5 mg/kg/回)を2時間かけて1週間に1回点滴静注し、これを4週間行ったところ、治療後の筋組織の解析ではジストロフィンmRNAにおいてエクソン19のスキッピングが誘

導されており、免疫組織染色ではジストロフィン蛋白の発現がみられた<sup>1)</sup>。この結果によって、AS-oligoを用いたエクソンスキッピング誘導治療の有効性を臨床の場ではじめて示すことに成功した。

## 世界における エクソンスキッピング誘導治療

著者らの報告に引き続き、海外からもエクソンスキッピング誘導治療の有効性が報告されている。著者らの報告を含め、これまでにAS-oligoを臨床応用した報告を表1に示す<sup>1-4)</sup>。

2007年には、オランダからエクソン51を標的としたスキッピング誘導治療が報告された<sup>2)</sup>。ここではAS-oligoとして2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide(2-OMePS)が用いられ、対象となるDMD患者の前脛骨筋に対して筋肉注射を行った。これによりエクソン51のスキッピングが

表 1 現在までに報告されているAS-oligoによるエクソンスキッピング誘導治療の臨床応用

	Takeshima ら (2006)	Van Deutekom ら (2007)	Kinali ら (2009)	Goemans ら (2011)
<症例> 数(人) 年齢(歳)	1 10	4 10~13	7 10~17	12 5~13
<AS-oligo> 標的エクソン 種類 塩基数 投与経路 投与量	19 S-oligo 31 静脈注射 0.5 mg/kg/wk×4 週間	51 2-OMePS 20 筋肉内注射 0.8 mg	51 PMO 30 筋肉内注射 0.09 mg または 0.9 mg	51 2-OMePS 20 皮下注射 0.5, 2.0, 4.0 または 6.0 mg/kg/wk ×5 週間
<結果> 評価時期 mRNA 蛋白発現 副作用	1 週間後 エクソン 19 スキップ (+) (-)	4 週間後 エクソン 51 スキップ (+) (-)	3~4 週間後 エクソン 51 スキップ (+)も不均一 (-)	2 週間後, 7 週間後 エクソン 51 スキップ 0.5 mg/kg 投与群はスキップ (-) (+) (-)

S-oligo: phosphorothioate oligonucleotide, 2-OMePS: 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide, PMO: phosphorodiamidate morpholino oligomers.

誘導され、ジストロフィン蛋白の発現も確認された。

さらに phase I / IIa 臨床試験も実施され、対象患者 12 人に対し 2-OMePS の皮下注射を行った。患者 12 人を 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 mg/kg/wk の 4 つの投与群にそれぞれ 3 人ずつ分配して 5 週間投与を行い、効果を検討した。0.5 mg/kg/wk 投与群ではエクソン 51 スキップは認められなかったが、それ以外の症例ではエクソン 51 のスキッピング誘導、ジストロフィン蛋白の産生を認め、有効性が確認された<sup>3)</sup>。またその後の 12 週間に及ぶ投与では、6 分間歩行試験で平均 35.2±28.7 m の改善を認めた。経過中、蛋白尿や尿 α ミクログロブリンの上昇、接種部位の疼痛などが有害事象としてみられたものの、重篤な有害事象の発生は認められなかったと報告されている。

イギリスからも 2009 年に、Phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) を用いたエクソン 51 のスキッピング誘導が報告された。対象患者 7 人を低用量群 (0.09 mg) と高用量群 (0.9 mg) に分けてそれぞれ筋肉内注射を行い、その効果を検討した。その結果、局所投与した筋肉においてジストロフィン蛋白の発現が確認され、高用量群のほうがより強いジストロフィン蛋白の発現を認めた<sup>4)</sup>。

## ● エクソンスキッピング誘導治療の展開

AS-oligo はエクソン特異的にスキッピング誘導をもたらす。臨床応用のためには 1 つの AS-oligo で多くの患者が治療できることが望ましい。すでに、他のさまざまなエクソンにおける AS-oligo によるスキッピングの誘導は、著者らを含め Aartsma-Rus らや Wilton らによって報告されている<sup>10-12)</sup>。神戸大学での DMD 症例の解析結果<sup>5)</sup>をもとに、1 つの AS-oligo で多数の DMD 患者が治療できる標的エクソンを選択した。その結果、エクソン 51 で 11%、エクソン 53 で 11%、エクソン 45 で 9% の患者が治療できることが判明した。それぞれのエクソンスキッピング誘導治療により治療可能となる欠失パターンを表に示す(表 2)。

さらに 1 つのエクソンスキッピングを誘導するだけでなく、同時に複数のエクソンスキッピングを誘導する試みも検討されており、実際に DMD 症例の筋培養細胞で 2 つのエクソンスキッピング誘導に成功し、ジストロフィン蛋白の発現を確認した症例が報告されている<sup>13)</sup>。複数のエクソンスキッピングを誘導することが可能になれば、さらに多くの DMD 症例が治療対象となりうることが期待される。

また近年、より安定で標的への高い結合力をもち

表 2 エクソンスキッピング誘導治療の標的エクソンと欠失パターン  
(神戸大学での解析結果<sup>5)</sup>より)

標的エクソン	対象となるエクソン欠失	症例の割合
51	45~50, 47~50, 48~50, 49~50, 50, 52	11%
53	21~52, 45~52, 47~52, 48~52, 49~52, 52	11%
45	44, 46, 46~47, 46~48, 46~49, 46~51, 46~53, 46~55	9%
44	3~43, 42~43, 43, 45, 45~54, 45~56	4%
8	3~7, 5~7	3%
43	44, 44~47	3%
52	51, 53, 53~55, 53~60	3%
55	45~54, 47~54, 48~54, 50~54, 56, 56~62	3%

つさまざまな AS-oligo が開発されてきている。著者らは RNA/ENA キメラという新しい強力な AS-oligo を用いて、培養筋細胞においてエクソンスキッピングの誘導に成功した。この新しい AS-oligo を用いた検討では、従来の S-oligo を用いた場合と比較して 40 倍の効果がみられた<sup>14)</sup>。またエクソン 19 以外の多くのエクソンスキッピングを誘導できる AS-oligo を同定しており、現在エクソン 45 スキッピング誘導治療の準備を進めている。

最近では、マウスにおいてペプチドを結合させた AS-oligo を用いることで、より高い心筋への効果が認められたという報告もあり<sup>15)</sup>、DMD において重要な合併症である心筋障害への効果も期待したい。

また著者らは、エクソン 41 内に 1 塩基置換を有したナンセンス変異例についてもエクソンスキッピング誘導治療の検討を行った。患者由来の培養筋細胞に RNA/ENA キメラによる AS-oligo を導入したところ、ジストロフィン mRNA の約 90% でエクソン 41 のスキッピングが誘導されており、ジストロフィンの産生も確認された<sup>11)</sup>。これは、欠失変異のみならずナンセンス変異を有する DMD 症例も、AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療の対象となりうることを示すものであった。

### 低分子化合物による エクソンスキッピング誘導

これまで著者らは、高分子量の核酸医薬である AS-oligo を用いたエクソンスキッピング誘導治療の検討を行ってきたが、低分子化合物である

TG003 (a kinase inhibitor specific for Cdc-like kinases) がエクソンスキッピングを亢進し、さらに DMD 筋細胞においてジストロフィン蛋白発現を促進することを見出した<sup>16)</sup>。エクソン 31 内にナンセンス変異を有する患者由来の筋培養細胞に TG003 を添加したところ、エクソン 31 のスキッピングが増強され、さらにジストロフィンの発現も増強された。この結果は、低分子化合物によるエクソンスキッピング誘導治療という道を開く世界ではじめての成果であった。

### 今後の展望

現在、オランダでの phase I / II a 臨床試験に引き続き、エクソン 51 を標的としたエクソンスキップ誘導治療の phase III 臨床試験が開始されている。この無作為プラセボ対照試験は最大 18 カ国、180 名の患者が参加予定となっている。AS-oligo によるエクソンスキッピング誘導治療が DMD の標準治療となることを期待したい。

### おわりに

DMD は重篤な筋疾患であるが有効な治療法はなく、治療法の確立が強く待ち望まれてきた。近年、遺伝子診断と分子病態の解明の進歩に伴い、新しい治療法の開発が精力的に行われてきている。そのなかでもエクソンスキッピング誘導治療は DMD の治療として非常に注目されており、すでに臨床試験もはじまっている。mRNA を修飾する治療が臨床応用されていることを紹介した。



## 文献

- 1) Takeshima, Y. et al. : *Pediatr. Res.*, **59** : 690-694, 2006.
- 2) Van Deutekom, J. C. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **367** : 2677-2686, 2007.
- 3) Goemans, N.M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **364** : 1513-1522, 2011.
- 4) Kinali, M. et al. : *Lancet Neurol.*, **8** : 918-928, 2009.
- 5) Takeshima, Y. et al. : *J. Hum. Genet.*, **55** : 379-388, 2010.
- 6) Matsuo, M. et al. : *J. Clin. Invest.*, **87** : 2127-2131, 1991.
- 7) Takeshima, Y. et al. : *J. Clin. Invest.*, **95** : 515-520, 1995.
- 8) Pramono, Z. A. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226** : 445-449, 1996.
- 9) Takeshima, Y. et al. : *Brain Dev.*, **23** : 788-790, 2001.
- 10) Wilton, S. D. et al. : *Mol. Ther.*, **15** : 1288-1296, 2007.
- 11) Surono, A. et al. : *Hum. Gene. Ther.*, **15** : 749-757, 2004.
- 12) Aartsma-Rus, A. et al. : *Neuromuscul. Disord.*, **12** (Suppl. 1) : S71-77, 2002.
- 13) Aartsma-Rus, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **74** : 83-92, 2004.
- 14) Yagi, M. et al. : *Oligonucleotides*, **14** : 33-40, 2004.
- 15) Yin, H. et al. : Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx Mice. *Mol. Ther.*, Apr. 19, 2011. [Epub ahead of print]
- 16) Nishida, A. et al. : *Nat. Commun.*, **2** : 308, 2011.

\* \* \*

特集

小児医療における診断・治療の進歩 23  
治療技術

Key words

Duchenne 型筋ジストロフィー  
エクソンスキッピング  
リードスルー  
ジストロフィン

# 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

まつお まさみ  
松尾 雅文\*

要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の異常により筋肉のジストロフィンが欠損して発症する。そのため、DMD の治療としてはジストロフィンを発現させることが根本治療となる。現在、DMD の治療として患者のジストロフィン遺伝子の作用を発揮させてジストロフィンを発現させる方法が、遺伝子の異常に対応して2つ開発されてきている。ジストロフィン遺伝子のエクソン欠失によるアウトオブフレーム変異に対して、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と、ナンセンス変異に対するリードスルー誘導治療である。本稿ではこれら2つの DMD の治療法について、筆者らの成果を交えて紹介する。

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は重篤な進行性の筋萎縮で、いまだ有効な治療法はない。DMD は、ジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とし、ジストロフィンの発現をはかることが根本治療となる。そのため、正常な遺伝子を導入してジストロフィンを発現させる遺伝子治療の開発が試みられてきた。最近では、患者自身が生来持っているジストロフィン遺伝子を有効に活用してジストロフィンを発現させる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が有望視されている。前者はスプライシングのステップで、後者は翻訳のステップで異常のあるジストロフィン遺伝子の作用を修正し、機能的なジス

トロフィンを産生させるものである。エクソンスキッピング誘導はジストロフィン遺伝子の欠失の異常を有する例に、リードスルー誘導治療はナンセンス異常を有する例に用いられ、ともに遺伝子異常に対応した個別的治療法となっている。現在これらの2つの方法はともに臨床治験が実施されている。本稿では、筆者らの見出したエクソンスキッピング誘導能を有する低分子化合物にも触れ、DMD 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について紹介する。

## I Duchenne 型筋ジストロフィー

### 1. Duchenne 型筋ジストロフィー

DMD は、男児 3,500 人に 1 人が発症するもっとも頻度の高い伴性劣性遺伝性疾患である。DMD は幼児期に筋力低下を示し始め、年齢が長ずるに従い一貫して筋萎縮が進行し、12 歳までに車椅子生活となる。さらに、筋萎縮は

\* 神戸学院大学総合リハビリテーション学部医療リハビリテーション学科  
〒651-2180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 518

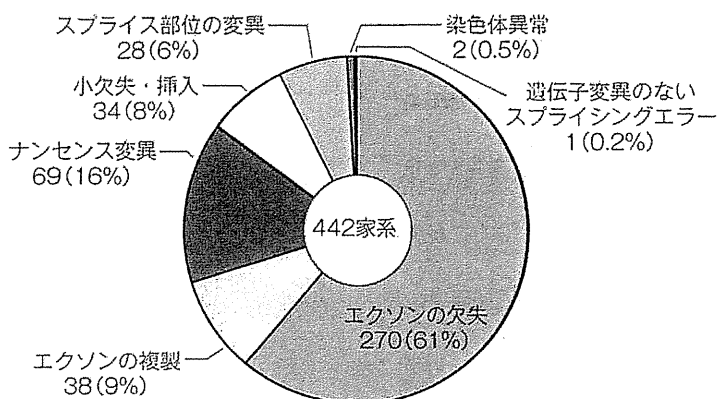


図1 ジストロフィン遺伝子異常  
DMD/BMD442家系の遺伝子異常の分布を示す。

進行し、20歳台に心不全・呼吸不全で死亡する。きわめて重篤な疾患であるが、現在有効な治療法がない。乳児期に筋力低下症状のみられない状態でも血液化学検査で偶然著明なクレアチンキナーゼ値の上昇を指摘され、DMDの診断に至る例が多い。DMDでは、筋生検組織のジストロフィン染色でジストロフィンが染色されないジストロフィン欠損を呈する。一方、Becker型筋ジストロフィー（BMD）は、成人期に筋力低下で発症し、筋萎縮の進行は比較的ゆるやかな軽症の筋萎縮症である。BMDでは、筋のジストロフィンが斑点状に染色され、ジストロフィン異常を呈する。重症のDMDと軽症のBMDはともにジストロフィン遺伝子の異常から発症する。

## 2. ジストロフィン遺伝子の異常

ジストロフィン遺伝子は79個のエクソンからなる巨大な遺伝子であるが、遺伝子の異常はエクソン単位に広がる大きな欠失がもっとも多く、しかもその異常は2カ所のホットスポットに集中するという特徴がある。日本人のDMD/BMD患者442家系のジストロフィン遺伝子の解析結果では、エクソン単位の欠失が遺伝子異常の6割を占める（図1）<sup>1)</sup>。エクソン単位の重複の異常も多いが、微細な遺伝子の異常としてナンセンス変異が16%を占めている。

エクソン欠失・重複はDMDでもBMDでも同定され、ナンセンス変異はほとんどがDMDで同定される。

## 3. アミノ酸読み取り枠則

DMDとBMDの表現型の違いはアミノ酸読み取り枠則により説明される。すなわちDMDではジストロフィン遺伝子の欠失あるいは重複したエクソンにコードされている塩基の総数が3の倍数ではないため、ジストロフィンmRNAのアミノ酸読み取り枠にずれを生じ（アウトオブフレーム）、その結果ストップコドンが出現しジストロフィンが産生されない。また、点変異でストップコドンを形成するナンセンス変異もDMDの原因となる。これに対し、症状の軽いBMDでは欠失あるいは重複したエクソンにコードされている塩基の総数が3の倍数で、ジストロフィンmRNAのアミノ酸読み取り枠は維持され（インフレーム）、サイズの小さなジストロフィンが産生される。したがって、個々の遺伝子異常でアミノ酸読み取り枠を検討することは予後を見るうえで重要である。

## II エクソンスキッピング誘導治療

### 1. エクソンスキッピング誘導治療とは

DMDでジストロフィンmRNAのアミノ酸

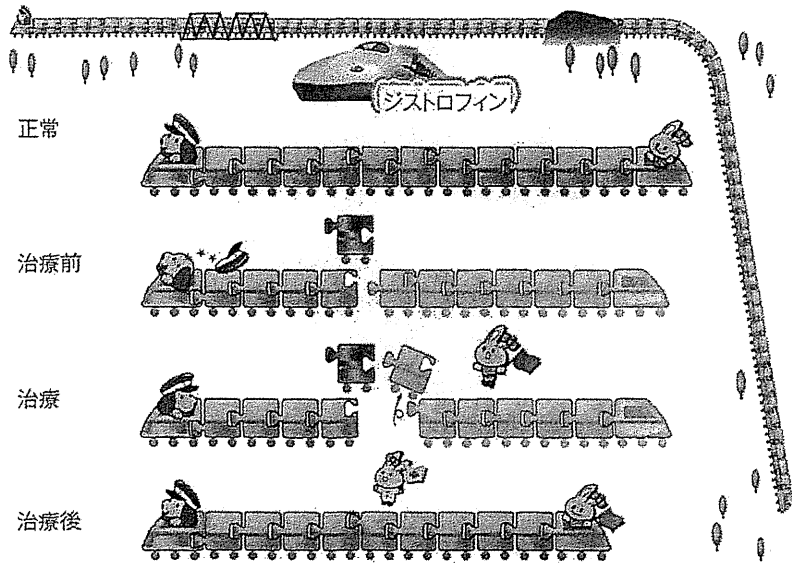


図2 エクソンスキッピング誘導治療

ジストロフィン遺伝子は79個のエクソンから構成されており、それを79両の車両に置き換えている。正常では、車両の連結に問題がない(正常)。しかし、ジストロフィン遺伝子で欠失が生じると車両の消失となり、アウトオブフレームのエクソンが欠失すると連結できなくなり、遺伝子の機能が失われる(治療前)。そこで、欠失のとなりのエクソンを取り除き(治療)、インフレームにかえてやると車両の連結はできるようになり、再び走り出す(治療後)。

読み取り枠のアウトオブフレームをインフレームに変換することにより、サイズの小さなジストロフィンが産生される。これは、エクソン欠失でスプライシング時に隣接するエクソンのスキッピングを誘導して欠失の範囲を広げ、欠失する塩基の総数を3の倍数にすることで可能となる(図2)。また、ナンセンス変異がインフレームのエクソンにあればそのエクソンのスキッピングを誘導することにより、ナンセンス変異の除かれたインフレームのmRNAが産生され、ジストロフィンの発現が促される。

## 2. エクソンスキッピング誘導治療の世界で初めての実施例

筆者らは、ジストロフィン神戸の詳細な分子病態の解明から、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)を用いてジストロフィン遺伝子のエクソン19のスキッピングが誘導できることを明らかにした。そして、このAOを用いたエ

クソンスキッピング誘導治療を世界に先駆けて着想した(図3)。すなわち、ジストロフィン遺伝子のエクソン20を欠失したDMDでは242塩基が欠失し、アウトオブフレームになっている。このDMD例で、エクソン19のスキッピングを誘導すると、エクソン19の88塩基がさらにmRNAから欠けることとなり、エクソン20と19の合計330塩基がmRNAから消失する。その結果、mRNAはインフレームとなりこのDMD患者ではジストロフィンの産生が期待される。実際、患者由来の培養筋細胞に先のAOを導入しジストロフィン染色陽性細胞の出現をみた<sup>2)</sup>。さらに、このAOを患者に投与したところ、筋のジストロフィンmRNAでエクソン19のスキッピングを確認し、免疫染色でもジストロフィンの発現を確認した<sup>3)</sup>。

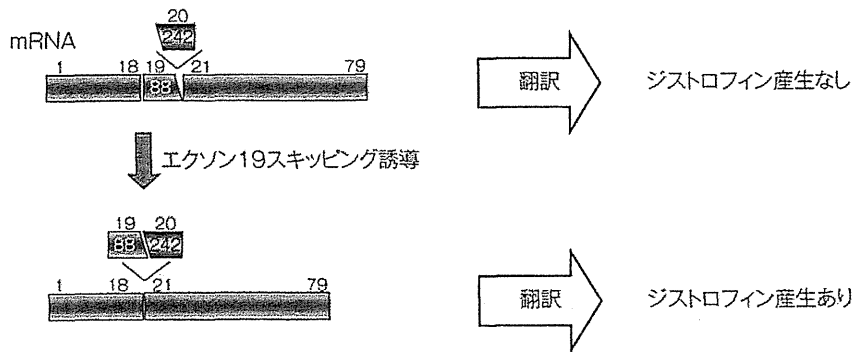


図3 エクソン19スキッピング誘導による治療

表 各エクソンスキッピングによる治療可能割合

エクソン	割合 (%)
51	11
53	11
45	9
44	4
8	3
43	3
52	3
55	3

### ③. AOを用いたエクソンスキッピング誘導治療の展開

#### a. 各エクソンごとの治療対象症例割合

エクソンスキッピング誘導治療は、エクソン19のスキッピングで紹介したように、各患者が有するエクソン欠失のパターンに合わせて隣接するエクソンをスキップさせるものである。そのために標的とするエクソンによって、治療できる症例数が異なってくる。そこで、ジストロフィン遺伝子の欠失のパターンからエクソンスキッピングによる治療可能な症例を検討した(表)。すると、エクソン51, 53, 45のスキッピングを誘導することで比較的多くの患者を治療できることが判明した。エクソン51のスキッピング誘導により治療できる割合は、欧米でももっとも高く13%となっている。そのため、欧米でエクソン51のスキッピングを誘導するAOの開発が勢力的になされた。そして、

PRO051とAVI-4658の開発が進められ現在フェーズIIまで進んでいる。

#### b. PRO051

PRO051は2'-O-methyl RNAをモノマーとした20塩基の核酸で、エクソン51のスキッピング誘導作用を有している。フェーズIIの治験では、5~13歳の12例の患者にPRO051が0.5~6 mg/kgの量で1週間に1回皮下投与された。このPRO051では蛋白尿が全員で出現したが、大きな問題にはならなかった。その他に特異的な副作用はみられていない。投与量が4 mg/kg以上であった例で、エクソン51のスキッピング誘導が確認されるとともに、ジストロフィンの発現増加も確認された<sup>4)</sup>。現在臨床治験がグローバルに実施されるところとなっている。

#### c. AVI-4658

AVI-4658はモルフォリノ核酸からなる30塩基のAOで、エクソン51のスキッピングを誘導する作用がある。最近報告されたフェーズIIの治験では、6~13歳の19例のDMD患者にAVI-4658が0.5~20 mg/kgの量で、1週間に1回計12回静脈内投与がなされた。このAVI-4658投与による副作用はみられず、エクソン51のスキッピングはすべての例で確認された。さらに、高投与群例を中心に7例にジストロフィン発現が増加した。そして、当初の目的である安全性と生化学的な有効性が確認され

た<sup>5)</sup>。

**d. 神戸大学の取り組み (エクソン 45 のスキッピング誘導)**

神戸大学では ethylene bridged nucleic acid (ENA) という生体での安定性を増した修飾核酸と RNA をキメラにした RNA/ENA キメラが強力なエクソンスキッピング誘導効果を有することに着眼して、RNA/ENA キメラのエクソン 45 のスキッピングを誘導治療への応用をはかっている。RNA/ENA からなるエクソン 45 のスキッピングを誘導する AO85 を合成し、DMD 患者培養細胞に導入したところ、ジストロフィンの有意な発現を確認している。また、AO85 の反応速度論的解析を実施し、低い EC50 であることを明らかにし、臨床応用にすぐれたものと報告した<sup>6)</sup>。今後、臨床への応用を計画しているところである。

**e. ナンセンス変異でのエクソンスキッピング誘導治療**

ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異では通常 DMD となるが、中に表現型が BMD となっている例が見出される。こうした例のジストロフィン mRNA を解析するとナンセンス変異をコードするエクソンのスキッピングが自然に誘導され、インフレームの mRNA が産生され、ジストロフィンが発現している<sup>7)</sup>。

したがって、AO を用いてナンセンス変異を有するインフレームのエクソンのスキッピングを誘導することが治療の標的となる。AO を用いてナンセンス変異をもつエクソンのスキッピングの誘導を行い、患者培養筋細胞でジストロフィンの発現が確認されている<sup>8)9)</sup>。

**f. 低分子化合物を用いたエクソンスキッピング誘導治療**

AO は分子量が大きく、定期的に筋注あるいは静脈内投与する必要があるなどの不便性がある。そのために、エクソンスキッピング誘導作用を有する低分子化合物の探索が次の課題となっている<sup>10)</sup>。筆者らは、ナンセンス変異を有

するエクソン 31 あるいは 1 塩基欠失を有するエクソン 27 を特異的にスキッピング誘導する低分子化合物の発見に成功した<sup>11)</sup>。さらに、この低分子化合物を用いて患者由来筋細胞においてジストロフィン発現の亢進を確認した。今後、AO にかわる低分子化合物を用いたエクソンスキッピング誘導治療の展開が大きく期待される。

### III リードスルー誘導治療

**1. リードスルーとは**

リードスルーとは、mRNA 上のナンセンス変異を読み飛ばして新たなアミノ酸の伸長をもたらす、mRNA から蛋白への翻訳を最後まで進めるものである。mRNA 上にナンセンスコドンがあれば、tRNA ではなく終結因子がリボソームに結合し、ペプチド鎖がリボソームから遊離されて蛋白合成が停止する。この時、ナンセンスコドンと終結因子の結合を弱めれば、ナンセンスコドンとどれかの tRNA との結合を促し、新たなアミノ酸の伸長が起こり蛋白の合成が最後まで進行する。これが、リードスルー効果とよばれているものである (図 4)。

**2. ゲンタマイシン**

ゲンタマイシンはリボソームに結合してナンセンス変異の認識性を弱め、翻訳を停止させることなく最後まで進めるリボソーマルリードスルー効果を有していることが古くより知られていた<sup>12)</sup>。しかしながら、ゲンタマイシンの特有の腎臓、聴神経に高い毒性の副作用のため、ゲンタマイシンを DMD の治療へ応用することは進まず、ヒト DMD のゲンタマイシンによる治療応用は 2 つの小規模な実施例にとどまっていた<sup>13)14)</sup>。

最近、ゲンタマイシンの有効性が 9~17 歳の 16 例の患者で検討された。投与量は 7.5 mg/kg で投与方法は週に 1 回あるいは 2 回で、6 か月間投与された。その結果、大きな副作用もなく、

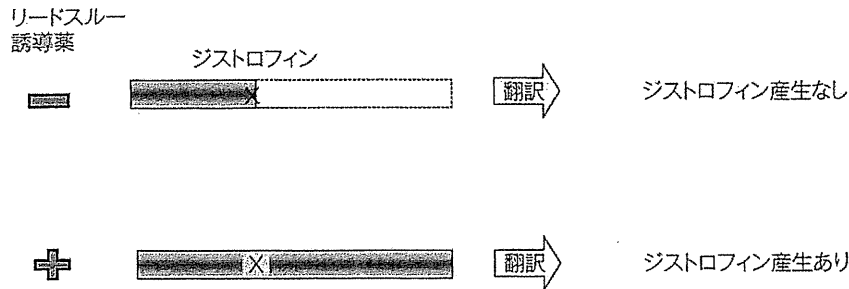


図4 リードスルー誘導治療

mRNA から蛋白への翻訳時に、mRNA にナンセンス変異 (X) があると、リボソームにおける蛋白合成はその場所で停止する (上段)。その時、リードスルー誘導薬が存在する (+) と、ナンセンス変異の認識が弱まり mRNA から蛋白への翻訳が最後まで進む (下段)。

ジストロフィンの発現が充進するとともに、血清中のクレアチンキナーゼの低下も認められた<sup>15)</sup>。これは、ヒトに副作用を生じさせない使用量でのゲンタマイシンの有効性を示すものであった。

### ③. PTC124

米国の PTC 社は、ナンセンス変異を翻訳時に読みとばすリボソームリードスルー作用を有する化合物を見出すことに成功した<sup>16)</sup>。この化合物は PTC124 と名づけられ、副作用もなく経口投与も可能な非常に臨床応用に適したもので、現在米国でジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を有する患者を対象とした治験が実施された<sup>17)</sup>。しかしながら、その結果は期待されたものとなっておらず、再検討されている ([http://www.ptcbio.com/May\\_DBMD\\_Trial\\_Update.htm](http://www.ptcbio.com/May_DBMD_Trial_Update.htm))。DMD の 1 割以上の患者が治療対象となり、多くの患者がその恩恵にあずかる期待の大きな薬剤である。

### ④. リードスルー誘導治療の展開

メラノコルチン 4 レセプター遺伝子のナンセンス変異に対するリードスルー効果がゲンタマイシンと PTC124 で比較されているが、この遺伝子ではゲンタマイシンのみに有効性が確認されている<sup>18)</sup>。また、PEX 遺伝子のナンセンス変異についても同様にゲンタマイシンでの有効性は確認されたが、PTC124 では確認できなかった<sup>19)</sup>。このように、リードスルー誘導治療の効果については一定せず、まだ多くの解決すべき課題があるようである。

一方、新たなアミノグルコシドの NB54 が開発され、Rett 症候群の治療に用いられようとしている<sup>20)</sup>。また、わが国でもリードスルー誘導薬の探索が行われてきており、その候補化合物がリストアップされてきている<sup>21)</sup>。

## おわりに

ジストロフィンを発現する 2 つの治療法について紹介した。DMD は長く治療法のない病気としてとらえられてきたが 2 つの方法ともに臨床治験の結果が出てきて、治療が可能との光がみえてきた。しかし、ジストロフィン発現をどのレベルを目指すかについて議論があった。最近、新たなマウスを使った検討により、ジストロフィンの低レベル (正常の 5% 未満) の発現でも有効なことが示された<sup>22)</sup>。ヒトでも同様であればさらにまた大きな希望となる。

いずれにしても DMD の治療は遺伝子異常の型に基づいたもので、患者の遺伝子の異常の解析が必須となっている。

## 文献

- 1) Takeshima Y et al: Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker mus-

- cular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet* 2010 ; 55 : 379-388
- 2) Takeshima Y et al : 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
  - 3) Takeshima Y et al : Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006 ; 59 : 690-694
  - 4) Cirak S et al : Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment : an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 2011 ; 378 : 595-605
  - 5) Goemans NM et al : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 1513-1522
  - 6) Maluekaa R et al : Antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 45 skipping at a low EC50 in a cell-free splicing system. *Nucleic Acid Ther* 2011 (in press)
  - 7) Shiga N et al : 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
  - 8) Aartsma-Rus A et al : Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 907-914
  - 9) Surono A et al : Chimeric RNA/ethylene bridged nucleic acids promote dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy by inducing skipping of the nonsense-mutation-encoding exon. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 749-757
  - 10) O'Leary DA et al : Identification of small molecule and genetic modulators of AON-induced dystrophin exon skipping by high-throughput screening. *PLoS One* 2009 ; 4 : e8348
  - 11) Nishida A et al : Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun* 2011 ; 2 : 308
  - 12) Mankin AS, Liebman SW : Baby, don't stop! *Nat Genet* 1999 ; 23 : 8-10
  - 13) Wagner KR et al : Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001 ; 49 : 706-711
  - 14) Politano L et al : Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 2003 ; 22 : 15-21
  - 15) Malik V et al : Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther Adv Neurol Disord* 2010 ; 3 : 379-389
  - 16) Welch EM et al : PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007 ; 447 : 87-91
  - 17) Nelson SF et al : Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 2009 ; 22 : 532-538
  - 18) Brumm H et al : Rescue of melanocortin 4 receptor (MC4R) nonsense mutations by aminoglycoside-mediated read-through. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jul 7. doi : 10.1038/oby.2011.202
  - 19) Dranchak PK et al : Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *J Cell Biochem* 2011 ; 112 : 1250-1258
  - 20) Vecsler M et al : Ex vivo treatment with a novel synthetic aminoglycoside NB54 in primary fibroblasts from Rett syndrome patients suppresses MECP2 nonsense mutations. *PLoS One* 2011 ; 6 : e20733
  - 21) Arakawa M et al : Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo)* 2003 ; 134 : 751-758
  - 22) Li D, Yue Y, Duan D : Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One* 2010 ; 5 : e15286

◦ ◦ ◦



## 小児科学

Duchenne型筋ジストロフィーの  
新しい治療戦略

New strategies for Duchenne muscular dystrophy treatment

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は男児 3,500 人に 1 人が発症する、もっとも頻度の高い伴性劣性遺伝性疾患である。DMD は幼児期に筋力低下を示しはじめ、年齢が長じるに従い一貫して筋萎縮が進行し、20 歳代に心不全・呼吸不全で死亡するきわめて重篤な疾患である。いまだ有効な治療法がなく、治療法の確立が急務となっている。DMD はジストロフィン遺伝子の異常により、骨格筋でジストロフィンが欠損することにより発症する。ジストロフィン遺伝子が 1986 年にクローニングされて以来、この重篤な DMD は体内に正常な遺伝子を導入する遺伝子治療により治療が可能と考えられてきた。しかし遺伝子治療は、DMD 治療においてはいまだ広く臨床応用されるには至っていない。一方、DMD の遺伝子診断と分子病態の解明の進歩に伴い、分子治療が DMD の新しい治療として有望視されてきている。ここでは最近開発されつつある、DMD の 2 つの新しい分子治療法を紹介する。

## DMD の分子病態

DMD では、ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失の異常によりジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠がずれ(アウトオブフレーム)、mRNA 上にストップコドンが出現する場合がもっとも多い。ついで、ジストロフィン遺伝子にストップコドン形成する 1 塩基置換のナンセンス変異が多い。こうしたストップコドンの存在によりジストロフィン産生が阻害され、ジストロフィン欠損を導いている。

こうしたストップコドンの作用を解除するため、ジストロフィン遺伝子の欠失変異に対してはエクソンスキッピング誘導治療が、そしてナンセンス変異に際してはリボソーマルリードスルー治療が開発されてきている。

## エクソンスキッピング誘導治療

ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失により、アウトオブフレームになっている例には、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて欠失に隣接する 1 つのエクソンのスキッピングを誘導して mRNA をインフレームに変え、機能を発揮するサイズの小さなジストロフィンを発現させるものである。著者らは“ジストロフィン神戸”(著者らが報告したエクソンのスキッピングを起こす症例)の分子病態解析結果から、世界ではじめてこの方法を提唱した<sup>1,2)</sup>。これは遺伝子から転写された mRNA 前駆体からイントロンを切り取るスプライシングの段階で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソン配列を認識させないようにしてエクソンをイントロンとともに切り取られるようにし、エクソンのスキッピングを誘導するものである。そしてジストロフィン遺伝子のエクソン 19 のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功し、これを用いてエクソン 20 を欠失した DMD 患者に対して世界ではじめてエクソンスキッピング誘導治療を実施した<sup>3)</sup>。この治療により、エクソン 19 のスキッピングの誘導された新しいジストロフィン mRNA の産生と、それに応

じたジストロフィンの発現が患者骨格筋で認められた<sup>3)</sup>。

この分子治療はジストロフィンを発現させる DMD の新しい治療として大きく注目され、現在ではもっとも実用化の可能性の高い DMD 治療として世界標準になりつつある<sup>4)</sup>。このエクソンスキッピングの標的となるエクソンはそれぞれの患者が有しているエクソン欠失に隣接しているもので、遺伝子の異常に対応したオーダーメイドとなっている。そのため、できるだけ多くの患者が治療できるように神戸大学ではエクソン 45、オランダあるいはイギリスではエクソン 51 のスキッピング誘導に焦点を当てたアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が行われ、臨床治験がはじまっている例もある<sup>5)</sup>。

## リボソーマルリードスルー誘導治療

ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異があると、リボソームでの mRNA から蛋白への翻訳が停止し、ジストロフィンが産生されずジストロフィン欠損となる。このとき、抗生物質のゲンタマイシンをリボソームに作用させると翻訳が停止することなく最後まで進む。これはリボソーマルリードスルー効果とよばれ、ナンセンス変異の治療手段として有望視されている<sup>6)</sup>。しかし、ゲンタマイシンに特有の強い副作用のため、DMD の治療への応用は進まなかった。一方、アメリカの PTC 社は、このリボソーマルリードスルー作用を有する化合物 PTC124 を見出すことに成功した<sup>7)</sup>。この PTC124 は副作用もなく経口投与も可能な非常に臨床応用に適したもので、現在アメリカでジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を有する DMD 患者を対象とした治験が実施されている<sup>8)</sup>。近々わが国でもその治験が開始される予定となっ

ていたが、残念ながら治験の結果が思わしくなく、日本での治験の開始は延期されてしまった。DMD の 1 割以上の患者が治療対象となり、多くの患者がその恩恵にあずかる期待の大きな治療法であり、早期の臨床応用が望まれる。

1) Takeshima, Y. et al. : Modulation of *in vitro* splicing of the up-stream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J. Clin. Invest.*, **95** : 515-520, 1995.  
 2) Matsuo, M. : Duchenne/Becker

muscular dystrophy : from molecular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev.*, **18** : 167-172, 1996.

3) Takeshima, Y. et al. : Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.*, **59** : 690-694, 2006.  
 4) van Deutekom, J.C. and van Ommen, G.J. : Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.*, **4** : 774-783, 2003.  
 5) van Deutekom, J. et al. : Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.*, **357** : 2677-2686, 2007.

6) Mankin, A. S. and Liebman, S. W. : Baby, don't stop! *Nat. Genet.*, **23** : 8-10, 1999.

7) Welch, E.M. et al. : PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, **447** : 87-91, 2007.

8) Nelson, S.F. et al. : Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurology*, **22** : 532-538, 2009.

松尾雅文 / Masafumi MATSUO  
 神戸大学大学院医学研究科内科系講座  
 小児科学

\* \* \*

\*\*\* 次号の特集予告 (235 巻 10 号) \*\*\*

【12 月第 1 土曜特集】

## ◆エピゲノム研究最前線

【企画：児玉龍彦 / 東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリー】

\*\*\*\*\*

ゲノムは外界の刺激をうけて DNA やヒストンのメチル化などの修飾をうける。これらをエピゲノム情報というが、この情報は驚くべきことに、一代の間は細胞分裂で保持され、細胞の記憶を作る。これまで、遺伝子配列がわかれば個別化医療が可能になると誤解されていたのだが、遺伝子配列は外界の刺激をもとにしたこれらエピゲノム修飾をうけて働きが決まっていることがわかってきた。たとえば生活習慣病ではヒストン 3 の 9 番目のリジンのメチル化が、低栄養・低酸素などの状況を反映して書きかえられる。そこで、生活習慣病の治療ではコレステロールや血糖の数値の是正だけでなく、これまで“体質”などとよばれていたエピゲノム情報を書きかえる重要性が注目されている。いま、世界で一斉に DNA のメチル化の診断応用や、ヒストン修飾酵素を標的とした抗がん剤の開発がスタートしている。本特集では、エピゲノムというあらたな概念の基礎と、とりわけ医学への応用が著しい分野を中心に各専門の先生方に解説いただく。

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial data. This includes not only sales and purchases but also expenses and income. The document provides a detailed explanation of how to categorize these transactions and how to use a double-entry system to maintain the accounting equation.

The second part of the document focuses on the preparation of financial statements. It outlines the steps involved in calculating the net income for a period and how this information is used to prepare the income statement. It also discusses the importance of the balance sheet and how it provides a snapshot of the company's financial position at a specific point in time. The document includes examples of how to calculate and present these statements.

The final part of the document covers the process of closing the books at the end of an accounting period. It explains how to transfer the net income from the income statement to the retained earnings account and how to close the temporary accounts (sales, expenses, and dividends) to the permanent accounts. This process ensures that the accounts are ready for the start of the next period and that the financial statements are accurate and complete.