

201224104A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 松田 良一

平成25 (2013) 年 5月

## はじめに

リードスルー薬物による治療法は、mRNAの翻訳機構に干渉することで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いる。本治療法は遺伝子治療や核酸医薬によらず、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回復のための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。ベッカー型症例の知見から、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24年度には以下の研究成果を得たので報告する。

- ・ 生体内での顕著なリードスルー活性を示すネガマイシン誘導体TCP-112やTCP-126等の合成に成功した。
- ・ 経口吸収性に優れ、臨床使用の実績から安全性も担保されている抗菌剤から新規に薬物候補を特定した。
- ・ アルベカシンを筋ジストロフィーモデルマウスに投与することで、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、患者様由来ヒト筋細胞においても最大32%のジストロフィン発現回復を確認した。治療の科学的証拠を得るため、アルベカシンについて医師主導治験を平成25年度に始める準備をした。
- ・ リードスルー薬物との併用療法を鑑み、副腎皮質ステロイドとの相乗効果を検討した。

本研究実施にあたり、平成24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25年5月10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24年度 10,812千円（うち間接経費 2,495千円）

# 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 .....13

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TCP-112やTCP-126等の合成に成功し、経口吸収性に優れ、臨床使用の実績から安全性も担保されている抗菌剤からも顕著なリードスルー活性を示す薬物候補を特定した。アルベカシンについて、治療の科学的証拠を得るため医師主導治験を平成25年度に始める準備をした。

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體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は低く、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、 $\beta$ 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塩基配列を挟んで繋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 $\beta$ -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をそれぞれ含む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 $\beta$ 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體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 $\beta$ -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／ $\beta$ -

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、免疫組織化学やInGelWestern法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

研究代表者らが活性を見出した未承認抗生物質ネガマイシンの誘導体合成研究から、抗菌活性を示さないにも関わらず、(+)-ネガマイシンと同等あるいはそれ以上のリードスルー誘起作用を有する複数の誘導体の創製に成功した。5-deoxy-3-epi-

negamycinや3-leucyl-5-deoxy-3-epi-negamycinは天然から単離されているにも関わらず、活性不明の化合物であった。グラムスケールの合成後にその薬効をREADマウスによる高次薬理評価したところ、リードスルー促進活性を示すことを発見するとともに、更なる構造活性相関研究からより強力なTCP-112やTCP-126の創製にも成功した（特許出願済）。これらはネガマイシンが本来有している抗菌活性をほとんど示さず、薬効分離が進んだ化合物と位置づけられる。リードスルー治療では薬物の長期投与が必要となることから、耐性菌を生じ易い薬剤の使用には限界があり、この点からもネガマイシン誘導体は優れた潜在性を有していると言える。両者については、mdxマウスへ4週間連日投与し、ジストロフィン回復筋線維と血清クレアチンキナーゼ活性による薬効評価を継続中である。

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チルミコシン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。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ち、違う構造をもつ抗菌剤からも有益なリードスルー誘起活性を示す既存抗菌薬を特定した（特許申請準備中）。mdxマウスに4週間連日皮下・経口投与することにより、ジストロフィンの発現回復やクレアチンキナーゼ活性の低下、筋組織の大小不同や結合組織の減少等の筋変性の軽減を確認した。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。実地臨床上の弱点は、苦味が強いこととその強い匂い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である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。

「アルベカシン1用量とプラセボの無作為化二重盲検比較試験」において現在までに検討した評価項目は、【有効性】ジストロフィン発現と身体機能障害の進行抑制に関わる有効性の証明、主要評価：筋生検によるジストロフィンタンパク質発現量、副次評価：ジストロフィン発現（量・有無・割合）、機能評価：動作機能障害度：North Star Ambulatory Assessment, 時間機能検査：6分間歩行, 10m 歩行(m/

s), 階段の登りに要する時間, 仰臥位からの立ち上がりに要する時間, 徒手筋力検査：膝屈筋及び伸筋, 肘屈筋及び伸筋の合計, 定量的筋力検査：Hand hold dynamometerによる筋力検査, 活動量計による運動強度, 画像診断：1H MRSによる脂肪量評価, バイオマーカー（クレアチンキナーゼ, アルドラーゼ）, 【安全性】一般検査：診察・問診, 身体計測, バイタルサイン, 心機能検査：12誘導心電図, 心エコー 左室駆出率及び左室内径短縮率, 肺機能検査：スパイロメータ, ピークフローメータ, 努力性肺活量, %肺活量, 1秒量, 1秒率, 最大呼気流速, 最大咳嗽流速, 聴覚検査：純音聴覚検査, 歪成分耳音響放射検査, 聴性脳幹反応, 平衡感覚検査：注視眼検査・非注視眼検査, 臨床検査：血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査・ビタミンK分画及びB類, 抗ジストロフィン抗体, 有害事象（自覚症状, 他覚所見）である。

副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン）は、対処療法として現在大多数の患児に投与されている。アルベカシンとの併用療法を鑑み、副腎皮質ステロイドとの相乗効果を検討したところ、mdxマウスへの4週間の投与では有意な治療効果は認められなかった。

## 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薬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。また、既承認薬から特定したアルベカシン以外の治療薬候補の相乗（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と共に、先行するアルベカシンと同様の手法で開発を進めることで、可及的速やかに臨床応用の実現と治療法の向上

が得られると考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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. 217-234, 2012

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

Aoki R, Sato H, Katura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation between prefrontal cortex activity during working memory tasks and natural mood independent of personality effects: An optical

topography study. *Psychiatry Res.* 212: 79-87, 2013

Shiozuka M, Nonomura Y, and Matsuda R: Transdermal delivery of adriamycin to transplanted Ehrlich ascites tumor in mice. Submitted

## 2. 学会発表

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Date M, Nonomura Y, and Matsuda R: Arbekacin as a therapeutic readthrough induce for treatment of nonsense mutation-mediated Duchenne muscular dystrophy. The 11th Annual Scientific Meeting of the AOMC, 2012

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Date M, Nonomura Y, and Matsuda R: Arbekacin suppress nonsense mutations in mouse model and human cells of Duchenne muscular dystrophy. The 5th New directions in biology and disease of skeletal muscle meeting, 2012

Nagata Y, Ohashi K, Matsuda R: Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell activation. *Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells FASEB Science Research Conferences*, 2012

Eiji Wada E, Yoshida M, Date M, Nagata Y, Nonaka I and Matsuda R: Dietary phosphate intake and exercise-induced stress induce severe muscle necrosis in adult mdx mice. *World Muscle Society*, 2012

Shiozuka M, Nishida A, Matsuo M, Yoshida M, Takeshima Y, Taguchi A, Hayashi Y, Yakushiji F, Yamazaki Y, Yoshida M, Nonomura Y, and Matsuda R: Recent progress on readthrough research -Arbekacin and Negamycin-related compounds as promising readthrough-drug. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012

Nagata Y, Ohashi K, Matsuda R: Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell

activation. Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells, FASEB Science Research Conferences, 2012

Nagata Y, Ohashi K, Matsuda R: Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell activation. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012

Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, and Hara T: Ectopic expression of Lhx2 in muscle satellite cells inhibits their myotube differentiation. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012

Wada E, Yoshida M, Date M, Higashi T, Matsuda R: Lowering phosphate intake ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012

Taguchi A, Shiozuka M, Takayama K, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, and Hayashi Y: Promotion of premature termination

codon-readthrough by (+)-negamycin derivatives for Duchenne muscular dystrophy chemotherapy. VIIIth Japanese-French symposium on muscular dystrophies, 2012

Shiozuka M, Nishida A, Takeshima Y, Yagi M, Lee T, Wagatsuma A, Yoshida M, Date M, Matsuo M, Nonomura Y, and Matsuda R: Treatment for inherited muscular diseases by antibiotics against nonsense mutations. The American Society for Cell Biology 52nd Annual Meeting, 2012

Takayama K, Taguchi A, Shiozuka M, Kotake M, Hamada K, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, and Hayashi Y: (+)-Negamycin derivatives promoting premature termination codon-readthrough. The American Society for Cell Biology 52nd Annual Meeting, 2012

Taguchi A, Nishiguchi S, Shiozuka M, Pillaiyar T, Yamazaki Y, Yakushiji F, Kiso Y, Nonomura Y, Matsuda R,

Hayashi Y: Identification of Negamycin Analogs with Readthrough-promoting Activity as Potential Drug Candidates for Duchenne Muscular Dystrophy. 244th ACS National Meeting & Exposition, 2012

Taguchi A, Shiozuka M, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y: Structure Activity Relationship Study of (+)-Negamycin with Readthrough-promoting Activity for Duchenne Muscular Dystrophy Chemotherapy. 32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, 2012

Taguchi A, Shiozuka M, Kotake M, Hamada K, Takayama K, Yamazaki Y, Yakushiji F, Matsuda R, Hayashi Y. Structure Activity Relationship Study of Dipeptide Antibiotic (+)-Negamycin for the Potent Readthrough Promoting Activity. 第49回ペプチド討論会, 2012

小竹優也, 田口晃弘, 濱田圭佑, 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一, 高山健太郎, 薬師寺文華, 林良雄 ナンセンス変

異読み飛ばし活性に着目したネガマイシン誘導体の合成 1: ネガマイシン3位アミノ基の誘導と生物活性評価 日本薬学会第133年会, 2013

濱田圭佑, 田口晃弘, 小竹優也, 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一, 高山健太郎, 薬師寺文華, 林良雄 ナンセンス変異読み飛ばし活性に着目したネガマイシン誘導体の合成 2: ネガマイシン3位アミノ基の誘導と生物活性評価 日本薬学会第133年会, 2013

森正樹, 松田良一, 竹内昌治: 赤血球の変形に及ぼす核の有無の影響 日本動物学会第65回関東支部大会, 2013

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 申請済特許

「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」【豪, 2011211744】, 【伯, 1120110195158】, 【加, 2788730】, 【中, 201180008253.8】【欧, 11739832.1】【尼, W-00201203541】【以, 221251】【印, 1990/KOLNP/2012】【日, 特願2011-552822】【韓, 10-2012-7022832】【墨, MX/a/2012/009028】【露, 2012137245】

【泰, 1201003953】【米, 13/563872】

【越, 1-2012-02595】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

「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」【日, 特願2011-262408】, 【国際, PCT/JP2012/81120】林良雄, 田口晃弘, 薬師寺文華, 山崎有理, 松田良一, 塩塚政孝

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

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. 217-234, 2012

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

Aoki R, Sato H, Katura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation between prefrontal cortex activity during working memory tasks and natural mood independent of personality effects: An optical topography study. Psychiatry Res. 212: 79-87, 2013

Shiozuka M, Nonomura Y, and Matsuda R: Transdermal delivery of adriamycin to transplanted Ehrlich ascites tumor in mice. Submitted



## 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」【豪，2011211744】，【伯，1120110195158】，【加，2788730】，【中，201180008253.8】【欧，11739832.1】【尼，W-00201203541】【以，221251】【印，1990/KOLNP/2012】【日，特願2011-552822】【韓，10-2012-7022832】【墨，MX/a/2012/009028】【露，2012137245】【泰，1201003953】【米，13/563872】【越，1-2012-02595】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

「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」【日，特願2011-262408】，【国際，PCT/JP2012/81120】林良雄，田口晃弘，薬師寺文華，山崎有理，松田良一，塩塚政孝

# Negamycin Analogue with Readthrough-Promoting Activity as a Potential Drug Candidate for Duchenne Muscular Dystrophy

Akihiro Taguchi,<sup>†</sup> Shigenobu Nishiguchi,<sup>‡</sup> Masataka Shiozuka,<sup>§</sup> Takao Nomoto,<sup>†</sup> Mayuko Ina,<sup>†</sup> Shouta Nojima,<sup>†</sup> Ryoichi Matsuda,<sup>§</sup> Yoshiaki Nonomura,<sup>§,||</sup> Yoshiaki Kiso,<sup>‡</sup> Yuri Yamazaki,<sup>†</sup> Fumika Yakushiji,<sup>†</sup> and Yoshio Hayashi<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Medicinal Chemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

<sup>‡</sup>Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan

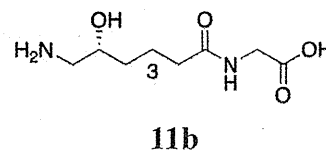
<sup>§</sup>Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Komaba, Tokyo 153-8902, Japan

<sup>||</sup>Institute of Microbial Chemistry, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan

## Supporting Information

**ABSTRACT:** A series of (+)-negamycin **1** analogues were synthesized, and their readthrough-promoting activity was evaluated for nonsense mutations in Duchenne muscular dystrophy (DMD). A structure–activity relationship study indicated that **11b** was the most potent drug candidate. Immunohistochemical analyses suggested that treatment with **11b** restored dystrophin expression in *mdx* mice, a DMD mouse model. Furthermore, **11b** decreased serum creatine kinase (CK) levels, an indicator of muscle fiber destruction. Most importantly, **11b** demonstrated lower toxicity than **1**, and thus, it could be a useful candidate for long-term treatment of DMD.

**KEYWORDS:** Negamycin, readthrough-promoting activity, Duchenne muscular dystrophy, nonsense mutations, hydrazino dipeptide, genetic disease



Duchenne muscular dystrophy (DMD), characterized by progressive muscle degeneration, is one of the most common hereditary disorders, affecting approximately 1 in 3500 live male births.<sup>1</sup> This disorder is caused by mutations in the DMD gene, located on the X-chromosome. The DMD gene encodes the protein dystrophin, which plays a crucial role linking the intracellular cytoskeleton and the extracellular matrix via the dystrophin-associated protein complex (DAPC). The loss of dystrophin function causes destabilization of the DAPC, which results in the breakdown of muscle fibers, loss of membrane integrity, and difficulty in walking and breathing, and it ultimately leads to death. Nonsense mutations, which lead to premature termination codons (PTCs) in the reading frame of the DMD gene, are responsible for up to 20% of DMD cases. The nonsense mutations yield truncated dystrophin proteins, which have no valuable biological function.<sup>2</sup> Presently, although the molecular basis for the disease is clear, there is no cure for DMD.<sup>3</sup> The only available treatment is glucocorticoid therapy, which can prolong ambulation and reduce the incidence of severe scoliosis, although it is limited to relatively short-term treatments due to severe side effects.<sup>4–6</sup>

Recently, a unique therapeutic strategy, so-called “readthrough drugs”, was proposed to target genetic diseases caused by nonsense mutations.<sup>7</sup> These drugs promote a translational “skip” of PTCs, but not of normal termination codons, resulting in the production of full-length proteins. Specifically, gentamicin, an aminoglycoside antibiotic, was reported to promote the readthrough of disease-causing PTCs in mammalian cells. Furthermore, its treatment partially restored dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx*

mice, an animal model of DMD with a nonsense mutation in the dystrophin gene. In spite of these positive results, long-term administration of gentamicin is not recommended, due to its severe side-effects including ototoxicity<sup>8</sup> and nephrotoxicity.<sup>9</sup> Small molecules possessing readthrough-promoting activity have also been described for DMD treatment, including aminoglycosides,<sup>10</sup> RTC compounds,<sup>11</sup> and an oxadiazole derivative, ataluren (PTC-124, phase IIB).<sup>12</sup>

In the same vein, Arakawa et al.<sup>13</sup> reported that the dipeptidic antibiotic (+)-negamycin (**1**, [2-(3,6-diamino-5-hydroxyhexanoyl)-1-methylhydrazino]acetic acid, Figure 1)<sup>14</sup> also induced

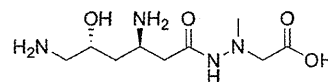


Figure 1. Structure of (+)-negamycin **1**.

the readthrough of PTCs in both a prokaryotic translational system<sup>15</sup> and *mdx* mice.<sup>13</sup> Therefore, **1** has been recognized as a potential therapeutic agent for diseases caused by nonsense mutations. Here, we designed and synthesized a series of negamycin analogues, and their biological activity was evaluated using a transgenic mouse strain, READ (readthrough evaluation and assessment by dual reporter),<sup>16</sup> which expresses a dual-reporter gene segmentalized with a PTC. Once the most potent

Received: October 19, 2011

Accepted: January 2, 2012

Published: January 2, 2012

Table 1. Readthrough-Promoting and Antimicrobial Activities of Synthetic Negamycin Analogues

Compound	Structure	Yield (%) <sup>a</sup>	Readthrough activity <sup>c</sup>	Antimicrobial activity <sup>d</sup>
Gentamicin		NA <sup>b</sup>	1.00 ± 0.24	NT <sup>e</sup>
<b>1</b> (+)-negamycin		NA <sup>b</sup>	1.00 ± 0.25	32/128/2/32/8
<b>6</b>		32	1.01 ± 0.16	>50/>50/25/>50/50
<b>11a</b>		27	0.83 ± 0.13	-
<b>11b</b>		27	1.36 ± 0.14	-
<b>11c</b>		43	0.81 ± 0.11	-
<b>11d</b>		44	0.92 ± 0.09	NT <sup>e</sup>
<b>11e</b>		24	< 0.8	-
<b>11f</b>		13	< 0.8	NT <sup>e</sup>
<b>14</b>		24	< 0.8	-

<sup>a</sup>Synthetic yields were calculated from intermediates 3 or 7 for analogues 6 or 11a–f and 14, respectively. <sup>b</sup>NA; not applicable, see ref 18. <sup>c</sup>Relative *in vivo* readthrough-promoting activity, which is expressed as a ratio compared to gentamicin. Samples were subcutaneously injected at the abdominal region of the READ mouse with a dosage of 0.1 mg/day/20 g body-weight for 7 days. Data are mean ± SD ( $n = 4$ ). <sup>d</sup>The antimicrobial activity (MIC) against several microorganisms (*Staphylococcus aureus* FDA 209P/*Bacillus subtilis* NRRL B-558/*Escherichia coli* BEM11/*Shigella dysenteriae* J S11910/*Pseudomonas aeruginosa* A3, respectively). “–” denotes >128  $\mu\text{g/mL}$  (MIC). See ref 24. <sup>e</sup>NT: not tested.

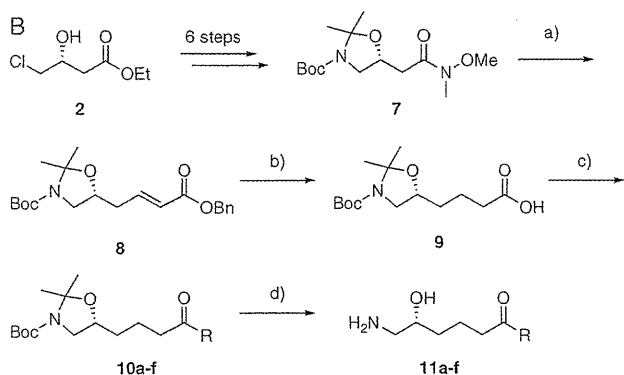
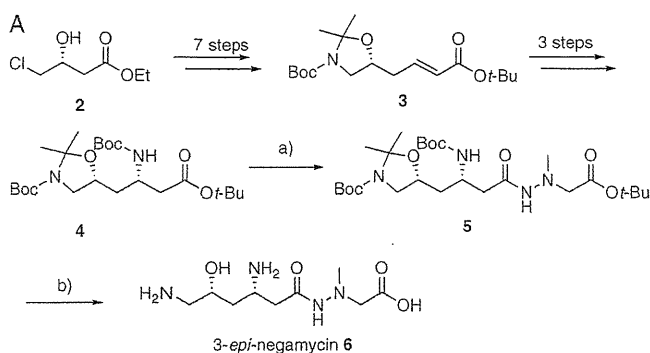
11b had been identified (Table 1), we used *mdx* mice to assess the effect on dystrophin expression, serum creatine kinase levels,<sup>17</sup> which are a clinical indicator of DMD, and general toxicity. We found that 11b performed better than 1, with markedly reduced toxicity, thus making it a promising therapeutic candidate.

(+)-Negamycin 1 was first isolated in 1970 from a microorganism closely related to *Streptomyces purpeofuscus*.<sup>14</sup> In an attempt to synthesize chiral 1, we developed shortened, highly efficient synthetic routes.<sup>18,19</sup> Using one of these routes as a starting point,<sup>19</sup> here, we synthesized a series of analogues. Briefly, for the synthesis of analogue 6 (Scheme 1A), intermediate 3 was prepared from the commercially available ester 2 over 7 steps.<sup>15</sup> Then, 3 was converted to the *N*-protected *tert*-butyl ester 4 as a single diastereomer (diastereomeric excess (de) >99%) over 3 steps using Node's asymmetric Michael addition,<sup>20</sup> removal of the chiral auxiliary,<sup>21</sup> and protection of the inserted 3-amino group. The obtained intermediate 4 was then efficiently converted to the acid form by a microwave-assisted saponification, and it was subsequently coupled with a hydrazino ester using an EDC-HOBt (EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole) method<sup>22</sup> to yield 5. Deprotection of 5 with 4 M HCl/dioxane and purification by ion exchange chromatography afforded 6 (specific rotation: found  $[\alpha]_{\text{D}}^{26.4} +14.0$  ( $c$  0.94,  $\text{H}_2\text{O}$ ), literature data<sup>23</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22.0} +8.5$  ( $c$  0.70,  $\text{H}_2\text{O}$ )).

Next, analogues 11a–f were synthesized (Scheme 1B). Weinreb amide 7<sup>19</sup> was prepared from 2 over six steps, and then it was reduced with diisobutylaluminum hydride (DIBAL-H) to the corresponding aldehyde, directly followed by treatment with (benzyloxycarbonylmethylene)triphenylphosphorane in THF under reflux conditions. After purification by flash chromatography on silica (Silica Gel 60N, KANTO CHEMICAL), we obtained 8 in 69% yield over two steps. After 8 was treated with Pd/C under a  $\text{H}_2$  atmosphere, the resultant 9 was coupled with various amino acid *tert*-butyl esters or a hydrazinoacid *tert*-butyl ester<sup>18</sup> using an EDC-HOBt method to obtain 10a–f. Deprotection of 10a–f with 4 M HCl/dioxane and purification by reversed-phase HPLC afforded 11a–f with 30–96% yield.

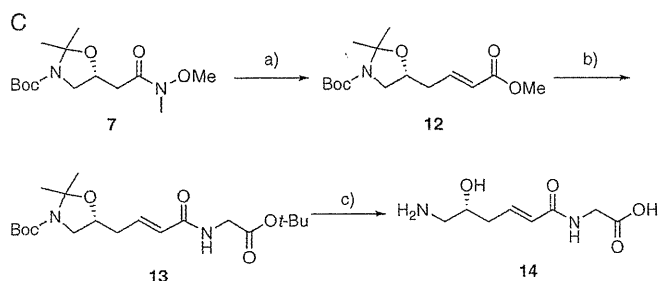
In the synthesis of analogue 14 (Scheme 1C), 7 was converted to the intermediate 12 by a procedure similar to that employed for 8 (Scheme 1B). Then, 12 was converted to the acid form by saponification and subsequently coupled with HCl-H-Gly-O-*t*-Bu using an EDC-HOBt method to yield 13. Deprotection of 13 with 4 M HCl/dioxane and purification by reversed-phase HPLC afforded 14 with 85% yield. The purity of each synthesized analogue for biological evaluation was over 95%.

To evaluate the readthrough-promoting activity, we adapted an *in vivo* dual-reporter gene expression system using READ mice.<sup>16</sup> This system encodes  $\beta$ -galactosidase and luciferase genes connected with a PTC (see the Supporting Information).  $\beta$ -Galactosidase activity is present constitutively, but luciferase

Scheme 1. Synthesis of Analogue 6<sup>a</sup>

10a: R = NHN(Me)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu, 63%  
 10b: R = NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu, 63%  
 10c: R = NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, 95%  
 10d: R = N(Me)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu, 79%  
 10e: R = NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu, 58%  
 10f: R = N(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu)<sub>2</sub>, 63%

11a: R = NHN(Me)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, 63%  
 11b: R = NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, 62%  
 11c: R = NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, 96%  
 11d: R = N(Me)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, 81%  
 11e: R = NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, 59%  
 11f: R = N(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>, 30%



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (A) Synthesis of 6: (a) (i) KOH, MeOH, microwave (300 W), 100 °C, 10 min; (ii) PTSA·H<sub>2</sub>N–N(Me)–CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu, HOBt·H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, EDC·HCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 h, 62% (2 steps); (b) (i) 4 M HCl/dioxane, rt, 1 h; (ii) ion exchange chromatography, 98%. (B) Synthesis of 11a–f: (a) (i) DIBAL-H, toluene, –78 °C, 2 h; (ii) Ph<sub>3</sub>P = CHCO<sub>2</sub>Bn, THF, reflux, overnight, 69% (2 steps); (b) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, rt, 1.5 h, quant; (c) amino acid t-Bu esters or hydrazinoacid t-Bu ester, HOBt·H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, EDC·HCl, DMF, rt, 3 h to overnight, 58–95%; (d) (i) 4 M HCl/dioxane, rt, 1 h; (ii) reversed-phase HPLC, 30–96%. (C) Synthesis of 14: (a) (i) DIBAL-H, toluene, –78 °C, 2 h; (ii) Ph<sub>3</sub>P = CHCO<sub>2</sub>Me, THF, reflux, overnight, 63% (2 steps); (b) (i) KOH, MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1), rt, 4 h; (ii) HCl·H-Gly-Ot-Bu, HOBt·H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, EDC·HCl, DMF, rt, overnight, 44% (2 steps); (c) (i) 4 M HCl/dioxane, rt, 1 h; (ii) reversed-phase HPLC, 85%.

activity is only detected when readthrough occurs. Therefore, the activities of both enzymes in skeletal muscle were measured to calculate the activity ratio of luciferase to β-galactosidase after negamycin analogues (0.1 mg) were subcutaneously administered in the abdominal region of READ mice for 7 days.

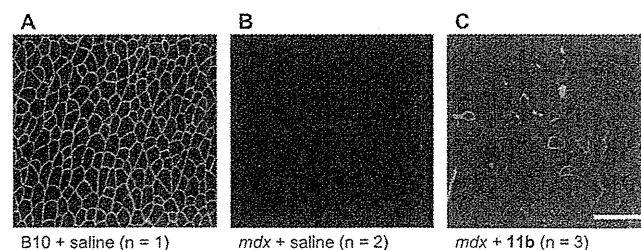
The antimicrobial activity was also measured.<sup>24</sup> The results of these biological evaluations are shown in Table 1.

Since synthetic 1 showed similar levels of readthrough-promoting activity to the extracted native 1 (data not shown) and gentamicin, we first evaluated the importance of stereochemistry at the 3-amino group. The (+)-3-epi-negamycin 6 exhibited equipotent activity to 1, suggesting that the stereochemistry of the 3-amino group might not be important for the activity. Next, analogue 11a with no 3-amino group was prepared (Table 1). However, complete removal of the amino group led to a decrease and a loss of the readthrough-promoting and antimicrobial activities, respectively. Thus, the presence, but not the stereochemistry, of the 3-amino group was important for both biological activities.

In striking contrast, however, we observed that when both the N-methyl and amino groups were omitted from 11a, the corresponding glycine analogue 11b was a potent promoter of readthrough activity, demonstrating a 1.4-fold increase in functionality as compared to the case of 1. Importantly, 11b also did not display antimicrobial activity, making it a more selective readthrough-promoting analogue than 1. In other words, it means that the readthrough-promoting activity can be distinguished from the antimicrobial activity.

Encouraged by these results, we synthesized additional analogues based on the chemical structure of 11b. However, both the ethyl ester analogue 11c and the N-methyl glycine analogue 11d demonstrated decreased activities. From these results, we inferred that the glycine residue with a free carboxylic acid was functionally important, a hypothesis that we confirmed using 11e and 11f. Moreover, 14, with the unsaturated amide structure, did not show any significant activity.

To understand the biological effects in detail, the most active 11b was chosen for further *in vivo* immunohistochemical and biochemical evaluations. Regarding the immunohistochemical evaluation, 11b was subcutaneously injected in the abdominal region of *mdx* mice at a dosage of 1 mg in phosphate-buffered saline (PBS, 0.2 mL)/day/20 g body-weight for 4 weeks. Dystrophin expression was clearly observed in the skeletal muscle of wild-type B10 mice (Figure 2A), while *mdx* mice



**Figure 2.** Dystrophin expression in skeletal muscles. Immunofluorescent staining of dystrophin in mouse muscle tissues was performed on 8 μm transverse cryosections.<sup>12</sup> (A) wild-type B10 mouse; (B) untreated *mdx* mouse; (C) 11b-treated *mdx* mouse. Bar = 200 μm.

lacked this signal (Figure 2B). In contrast to these controls, dystrophin expression was only partially restored in the skeletal muscle of 11b-treated *mdx* mice (Figure 2C). However, this result suggested that 11b promotes PTC readthrough and is therefore a potential therapeutic candidate for DMD.

Regarding biochemical evaluation, we assessed levels of serum creatine kinase (CK)<sup>17</sup> in *mdx* mice treated subcutaneously with 11b at a dosage of 1 mg in PBS (0.2 mL)/day/20