

- 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. 特許申請済

「リードスルー誘導剤, 及びナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬」【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

Watanabe K, Fujiyama T, Mitsutake R, Watanabe M, Tazaki Y, Miyazaki T, and Matsuda R. Fabrication of growth factor array using an inkjet printer. In “Cell and Organ Printing”. Ringeisen BR, Spargo BJ, and Wu PK ed., pp 203-222. Springer 2010

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

Wada E, Kikkawa N, Yoshida M, Date M, Higashi T, and Matsuda R: Effects of dietary phosphate on ectopic calcification and muscle function in mdx mice. In “Muscular Dystrophy” In Tech d.o.o. Croatia. pp.217-234, 2012

### 雑誌

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of non-sense mutation-mediated disorders. J. Biochem. 147: 463-470, 2010

Nagata Y, Honda Y, and Matsuda R. FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation. Cell Struct. Funct. 35: 63-71, 2010

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

Tokura Y, Nakayama Y, Fukada SI, Nara N, Yamamoto H, Matsuda R, and Hara T. Muscle injury-induced thymosin  $\beta_4$  acts as a chemoattractant for myoblasts. *J. Biochem.* 149: 43-48, 2011

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

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

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

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

Sato H, Aoki R, Katsura T, Matsuda R, and Koizumi H: Correlation of within-individual fluctuation of depressed mood with prefrontal cortex

activity during verbal working memory task: optical topography study. J. Biomed. Opt., 16: 126007, 2012

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

塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一 経皮吸収型薬物送達の新展開, 生体の科学 61: 636-640, 2010

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

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

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況

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

「リードスルー活性を有する化合物及び該化合物を含む医薬組成物」(特願2011-263404) 林良雄，田口晃弘，薬師寺文華，山崎有理，松田良一，塩塚政孝・(2011/12/01)



## ナンセンス変異の抑制

### —リードスルーによる Duchenne 型筋ジストロフィーの治療

#### Therapeutic Readthrough Strategy for Suppression of Nonsense Mutations in Duchenne Muscular Dystrophy

塩塚 政孝\* 松田 良一\*

Masataka Shiozuka\*, Ryoichi Matsuda\*

#### Abstract

Effective treatment for Duchenne muscular dystrophy (DMD) is currently unavailable. Readthrough of disease-causing premature termination codons might alleviate the symptoms of genetic diseases caused by nonsense mutations. Several ribosome-binding compounds, including selective antibiotics and synthetic novel small molecules, induce translational readthrough, restoring full-length functional proteins. Here in this innovative therapeutic strategy has been summarized with a focus on DMD.

We have previously reported that negamycin restored dystrophin expression with less toxicity than gentamicin in *mdx* mice. To explore more potent readthrough inducers, we established the transgenic mouse called READ (readthrough evaluation and assessment by dural receptor) for readthrough-specific detection. Using READ mice, we discovered drug candidates, including sterically negamycin-like small molecules and aminoglycoside derivatives. The newly developed small molecules induced dose-dependent readthrough with greater potency than ataluren *in vitro* and promoted the expression of dystrophin and reduction in serum creatine kinase activity in *mdx* mice. Moreover, the aminoglycoside derivative restored both dystrophin protein and contractile function of *mdx* skeletal muscles with appreciably higher readthrough activity and lower toxicity than that of gentamicin. Furthermore, we confirmed the efficacy of a thioglycolate-based depilatory agent to enhance the topical delivery of skin-impermeable drugs, including aminoglycosides. These promising new chemotherapeutic agents with beneficial effects on readthrough action, lower toxicity, and transdermal delivery may have significant value in treating or preventing genetic diseases caused by nonsense mutations.

Key words : readthrough, nonsense mutations, muscular dystrophy, negamycin, aminoglycoside

#### はじめに

ナンセンス変異は塩基対が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蛋白質の生産が中断するため、適切な機能をもつ完全な蛋白質が合成されない。そのため、

重篤かつ生命に関わる多くの遺伝性疾患を引き起こす。単一遺伝性疾患の3割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。

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : 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蛋白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

\* 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 [〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1] Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo at Komaba, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902 Japan



終止コドンに薬物により抑制して翻訳を進行させ、正常機能を有する蛋白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。リードスルー療法では、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蛋白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ない。ジストロフィン蛋白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治療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。本稿では、国外の研究動向ならびに筆者らの最新の研究成果をもとに、DMDに対するリードスルー療法について記述する。

## I. リードスルーによる DMD 治療の試み

原核細胞においてアミノグリコシド系抗生物質は rRNA の構造変化を引き起こし、mRNA 上の未熟終止コドンと rRNA のアミノアシル部位との結合を阻害する。その結果、未熟終止コドンをリードスルーして翻訳を続行させることで、ナンセンス変異が抑制される。アミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンが酵母でナンセンス変異を抑制することを初めて報告したのは 1979 年であった<sup>1)</sup>。数年後に、哺乳類細胞においてもリードスルーにより機能的な全長蛋白質を復活させることが報告された<sup>2)</sup>。そして、1996 年に Bedwell らのグループは、アミノグリコシド系抗生物質の G418 やゲンタマイシン (gentamicin : GM) を用いて、ナンセンス変異型嚢胞性線維症のモデル細胞における正常遺伝子産物の発現に成功した<sup>3)</sup>。これにより、ナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療戦略としてリードスルー療法の概念が提唱された。

1999 年、Lee Sweeney らのグループは、*mdx* マウス (ジストロフィン遺伝子のエクソン 23 にナンセンス変異をもつ DMD のモデル動物) に GM を投与し、リードスルーを誘起させることにより筋組織内に正常マウスの最大 20% 程度のジストロフィンの回復を報告した<sup>4)</sup>。ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用可能性が示唆されて以降、GM を用いたいく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。しかしながらリードスルーによる治療概念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持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みられている<sup>5)</sup>。そのため、より安全

性が高く、点滴静脈注射よりも負担のない投与が可能な薬剤の確立が喫緊の課題となっている。

2007 年、Lee Sweeney らは PTC Therapeutics 社とともにハイスループット検出系を使い、80 万種の低分子化合物群から PTC124<sup>®</sup> (アタルレン) を同定した。*mdx* マウスと DMD 患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を回復させた報告は、第 I 相臨床試験結果と同時に公表された<sup>6,7)</sup>。1 日に 3 回服用での毒性は認められなかったものの、DMD と Becker 型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy : BMD) 患者を対象とした後期第 II 相臨床試験において、米食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) から治療の有効性に関する科学的証拠が得られていないと判断された。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィーの治療における安全性と有効性の基準を確立し、治験立案の知見を得られたことは非常に重要な貢献であると考えられる。特に小児に対する運動機能評価については、最終効果判定とされた 6 分間歩行距離の統計解析について現在も議論が続けており<sup>8)</sup>、筋ジストロフィーの臨床効果を見極める課題として、ジストロフィン発現や血清クレアチンキナーゼ活性だけによらない評価尺度の重要性が浮き彫りになっている。運動機能を評価する際、それ自身 (例えば 6 分間歩行が可能であること) が治験参加の前提となるため、熱心な保護者が患児に訓練を施すことで結果に悪影響を及ぼすこともあり、その条件設定には苦慮すべき問題を抱えている。

アタルレンは、DMD や BMD についての開発は頓挫しているが、肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型や三好型遠位型筋ジストロフィーに関連するジスフェリン欠損についても、効果をもたらすことが培養系で示されている<sup>9)</sup>。アタルレンは広範な適用可能性を潜在的にもつリードスルー誘起物質であり、経口投与可能な臨床応用に適した特性を有するため、嚢胞性線維症では第 III 相へ、血友病 A/B とメチルマロン酸血症では第 II 相へと治験は続行中である。

## II. 新規リードスルー誘起物質の開発～創薬

筆者らは 2001 年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシン (negamycin : NM) が、DMD やメロシン欠損型先天性筋ジストロフィーのモデル系において、有益なリードスルー誘起活性を有することを報告してきた<sup>10-12)</sup>。NM は、1970 年に日本の微生物化学研究所で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、GM より高い安全性を持つため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬と

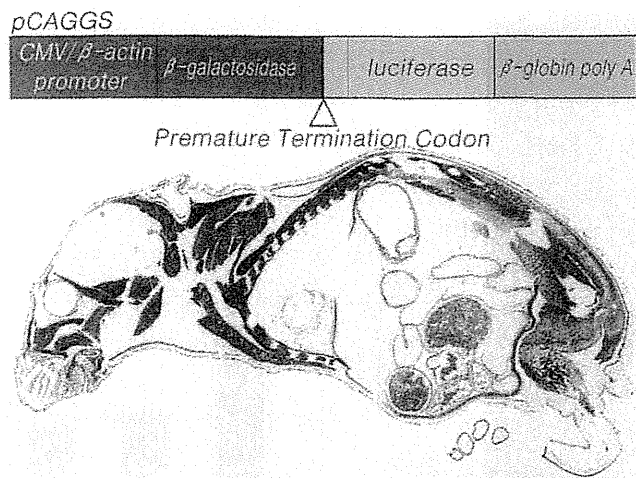


Fig. 1 READ マウスの全身 X-gal 染色像

READ マウスは  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) とルシフェラーゼ (*luc*) のレポーター遺伝子間に未熟終止コドン挿入したコンストラクトで作出されている。Kawamoto's film method による READ マウス全身凍結切片を X-gal 染色したところ、心筋や横隔膜を含む筋組織全般で  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を確認した。Bar = 1 cm

して有望と考えられた。しかし NM は未承認薬であり、その大量入手が困難であったことから、われわれは NM をリード物質とした新たな薬物候補を求めた。探索に先立ち、生体内での薬効評価を定量化かつ効率化するために遺伝子導入マウス (readthrough evaluation and assessment by dual-reporter: READ マウス) を作出した<sup>13)</sup> (Fig. 1)。mdx マウスを薬効評価系に使うと、含量が少なく 427 kDa と分子量が大きいジストロフィン (ジストロフィン遺伝子は 79 個のエクソンを有する全遺伝子中最大のもの) の検出定量性が問題となるためである。メリーランド大学薬学部の MacKerell 教授とともに、105 万種を超える低分子化合物データベースから NM の立体配位形成に適合する *in silico* 探索を行い、得られた NM 類似物質についてこの薬効評価系を用いることで、リードスルー治療薬候補を 5 種特定した<sup>14)</sup>。その中の薬物候補 #3 と #4 を READ マウスに皮下投与したところ、両者ともに既知のリードスルー誘起物質である GM や NM と同等以上のリードスルー活性を示した (Fig. 2)<sup>15)</sup>。次に、薬物候補 #3 と #4 を mdx マウスへ 3 週間連日投与 (50 mg/kg/day) することで、それぞれ 16.2%、18.8% のジストロフィン回復筋線維を確認した (Fig. 3 C, D)。mdx マウスのもつ未熟終止コドンとその直後のヌクレオチド "UAA A" は、最もリードスルーしにくい配列であることが示唆されている<sup>24)</sup>。それにもかかわらず、これらの染色像からは BMD 症例によく似たジストロフィンの発現様式がみとれる。Hoffman らは、

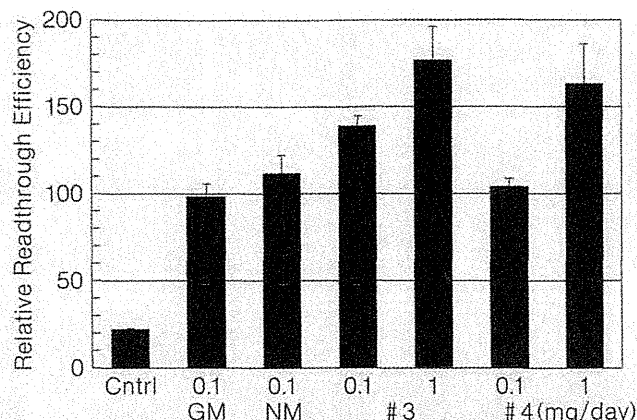


Fig. 2 薬物候補 #3 と #4 投与による READ マウスのリードスルー活性

1 週間連日皮下投与した READ マウス骨格筋でのリードスルー活性では、薬物候補 #3 と #4 が GM や NM と同等以上の薬効を示すことが確認された。対照 (Cntrl) は生理食塩水のみを投与した。

DMD より症状の穏やかな BMD 症例から、正常量の 20% 程度のジストロフィン回復によってその表現型が改善されると報告している<sup>16)</sup>。さらに、血清クレアチンキナーゼ活性は、薬物候補 #3 や #4 を投与することでおよそ半分の値にまで有意に減少した (Fig. 3 E)。

また、ヒト由来細胞に READ マウスで用いたコンストラクトを導入した培養系においては、#3 がアタルレンより高い効果を示した。そのため、薬物候補 #3 については東京薬科大学の林 良雄教授と共同研究を行い、低毒性化と薬効の増強を目指し、末端官能基と不飽和結合部に着目した、活性発現に寄与する部位の特定を試みている。特定した薬物候補や NM のさらなる誘導体展開から、より臨床現場に近い薬物候補を提案することが可能となっている<sup>17,18)</sup>。

薬物候補 #4 については、内服によっても用量依存的な活性を示し、mdx マウスにおける握力測定からも改善傾向を示す結果を得たことから、SPF (specific pathogen free) 施設において急性・亜急性毒性を検討したところ (Fig. 4)、単回・反復投与ともに体重、臓器重量、解剖所見、22 項目の血清生化学分析において異常はみられず、安全性が極めて高いことを確認した。現在、製剤化を目指した溶解性・安定性・吸収性の改善のための理化学的性状の改善を行っている。加えて、薬物候補 #2 については、東京女子医科大学附属遺伝子医療センターの斎藤加代子教授との共同研究により、DMD 患者由来培養細胞によるジストロフィン蛋白質の回復を確認している (投稿準備中)。

2009 年、Du らは、毛細血管拡張運動失調症をモデルと

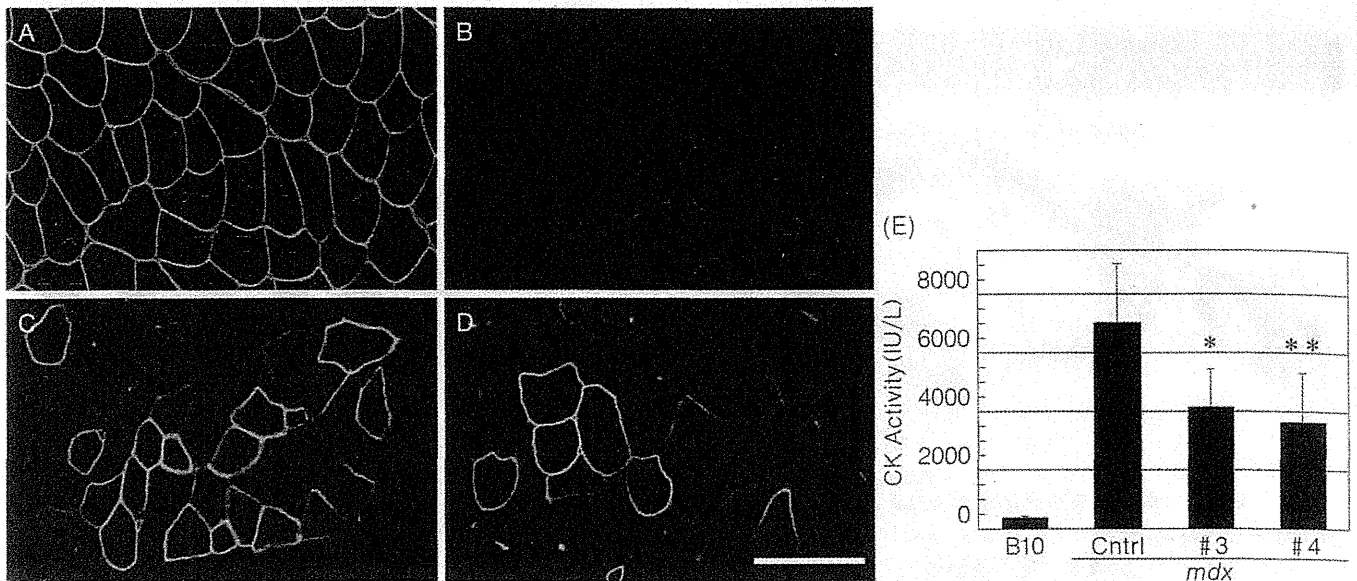


Fig. 3 薬物候補#3と#4投与による *mdx* マウス骨格筋のジストロフィン免疫染色像と血清クレアチンキナーゼ活性  
 マウス骨格筋組織のジストロフィンC末端に対する抗体を用いた免疫染色像である。正常B10マウスではみられるジストロフィン(A)が *mdx* マウスではみられない(B)。薬物候補#3(C)や#4(D)を *mdx* マウスに3週間連日皮下投与したところ、ジストロフィンの回復がみられ、それぞれ約16%, 19%のジストロフィン陽性筋線維数が確認された。Bar=100  $\mu$ m。血清クレアチンキナーゼ活性を測定したところ、未投与 *mdx* マウスに比べ、薬物候補#3や#4投与の *mdx* マウスでは約半分の値にまで低下した(E)。\*  $p=0.056$  (vs. Cntrl), \*\*  $p=0.039$  (vs. Cntrl)。

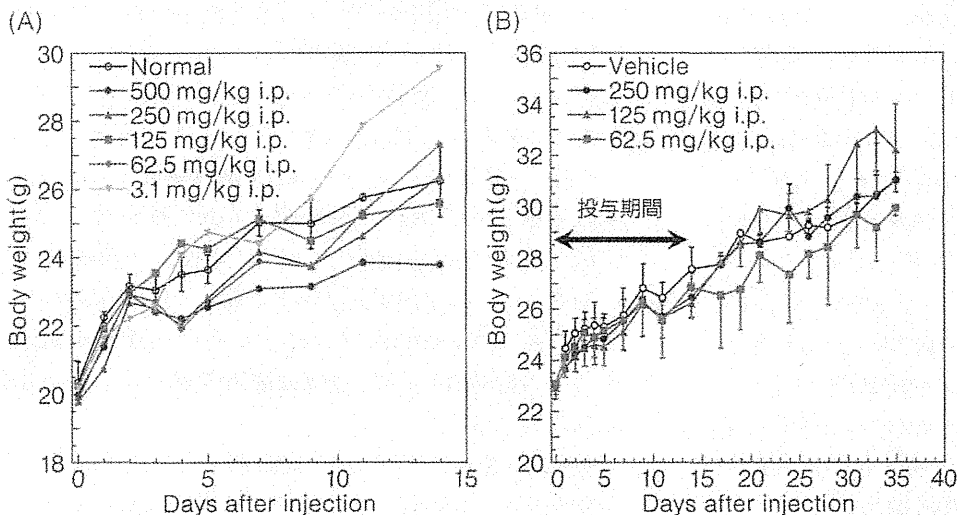


Fig. 4 薬物候補#4の単回・反復投与/回復安全性試験における体重変化

3.1~500 mg/kgでの単回腹腔内投与後、2週間の体重変化(A)、62.5~250 mg/kgでの2週間連日の反復腹腔内投与とその後3週間の体重変化(B)。単回・反復投与ともに、体重のみならず、臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析において異常はみられず、薬物候補#4の安全性は極めて高い。

した無細胞翻訳系 ELISA による完全自動化されたハイ  
 スループット探索から、アミノグリコシドではない化合物 RTC #13 や RTC #14 を特定した<sup>19)</sup>。 *mdx* マウスに  
 RTC #13 を筋注することで、GM やアタルレンよりも  
 効率的にリードスルー活性を示し、横隔膜や心臓を含む  
 筋組織でジストロフィンを回復させ、毒性もみられな  
 かったことを報告している(米筋ジストロフィー協会全  
 国科学会議, 2011)。

また、Baasov らのグループは、アミノグリコシドの構  
 造的な要素を切り離し、毒性の低減とリードスルー活性

の増強に成功した誘導体を報告した。パロモマイシンの  
 もつ 6-OH 基とプチロシンやアミカシンのもつ 6-  
 Methyl 基と (S)-4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル  
 (AHB) 基で修飾したパロマミン誘導体 NB54<sup>20)</sup> や、  
 AHB 基を導入した G418 誘導体 NB84<sup>21)</sup> である。DMD  
 を含む多種のナンセンス変異のコンストラクトを導入し  
 た哺乳類細胞培養系においては良好な結果を示してお  
 り、個体レベルでの解析が期待される物質である。

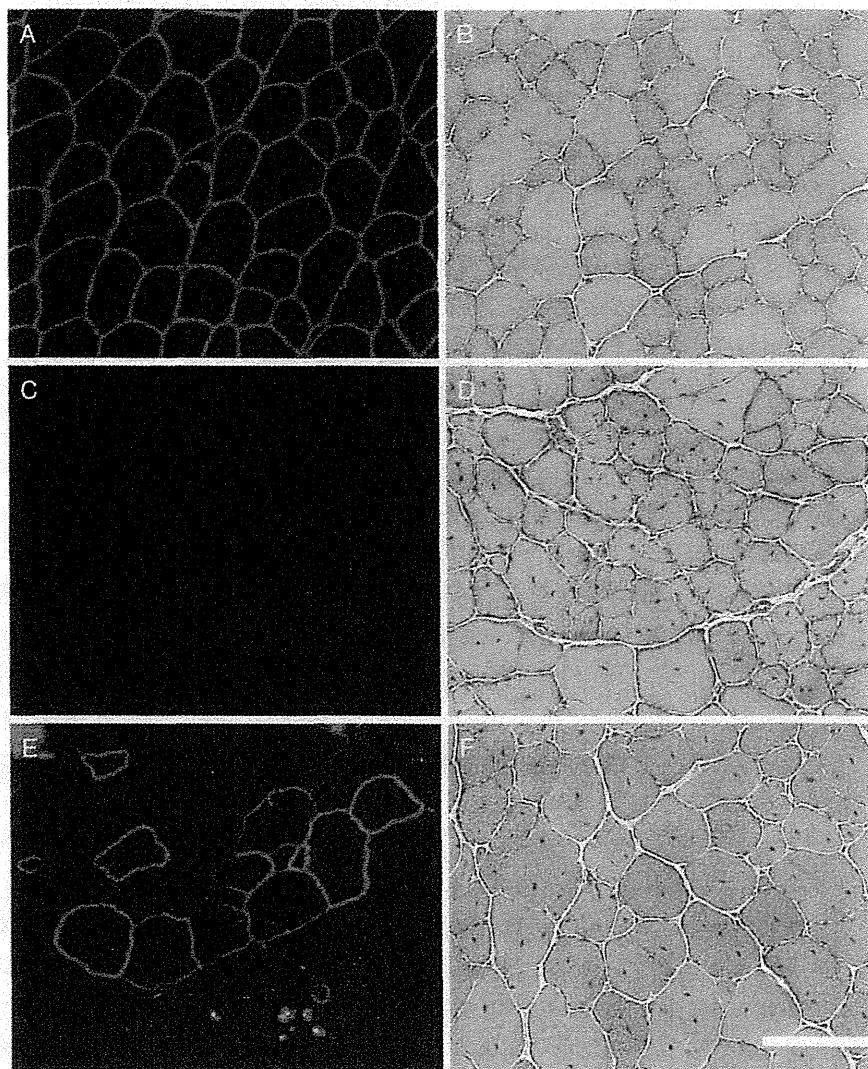


Fig. 5 アルベカシン投与による *mdx* マウス骨格筋の HE 染色像とジストロフィン免疫染色像

2w1mSC, ジストロフィン染色像 (A, C, E), HE (hematoxylin and eosin) 染色像 (B, D, F), B10 マウス (A, B), 未投与 *mdx* マウス (C, D), アルベカシン投与 *mdx* マウス (E, F)。アルベカシンを連日投与した *mdx* マウスの筋線維にジストロフィン発現の回復がみられ、その径に大小不同が少なく、結合組織量も少ない傾向が認められる。Bar = 100  $\mu$ m

### III. 既承認薬からのリードスルー誘起物質の発見～育薬

医薬品の開発は、薬の種となる物質の発見を目指した探索的基礎研究に始まり、動物における非臨床試験やヒトによる治験で安全性や有効性を評価し、その後行政当局の承認審査に至るプロセスを経るため、最低でも10年以上の開発期間と莫大な研究開発費が必要となる。新薬開発には、われわれ研究者の情熱と使命感だけでは越えられない障壁がまだまだ存在する。しかし、患者やその家族が直面している課題は現実であり、深刻であり、重大である。一刻も早い臨床応用の実現が切望されている。

DMD 診断は、血液生化学検査により乳幼児期の筋力低下症状のない時期でも可能であり、発症前に治療を始められればその効果は極めて大きいものと期待される。

筆者らは、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 AHB 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年に抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 薬として上市されている承認薬である。それゆえ、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得る。アルベカシンを連日投与した *mdx* マウスの筋線維径に大小不同が少なく、結合組織量も少ない傾向が認められることから、未熟終止コドンの抑制によりジストロフィン蛋白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 (Fig. 5)。*mdx* マウスでの生化学的臨床指標による解析と同時に筋機能回復について、握力、等尺性収縮張力、単収縮張力測定、強収縮張力、筋力減衰率を指標に検証したところ、有意

な治療効果を認めている。また、神戸学院大学総合リハビリテーション学部の松尾雅文教授との共同研究により、ナンセンス変異をもつ DMD 患者由来の培養筋細胞を 2 週間アルベカシン処理をすることで、ジストロフィン蛋白質の発現促進がみられたことを確認している（投稿準備中）。

ナンセンス変異型囊胞性線維症患者の割合が非常に多いイスラエルでは、近年急速にリードスルー療法に関する研究が発展している。Zilberberg らは、大腸腺腫をモデルとしたレポーターアッセイや移植癌細胞において、マクロライド系抗生物質タイロシンにもリードスルー活性があることを報告した<sup>22)</sup>。動物用医薬品および飼料添加物として承認されている本抗菌剤については、筆者らの薬効評価系でもそのリードスルー活性を確認しており、経口吸収性に優れ、数多く存在する誘導体の網羅的探索から 16 員環の半合成物に治療薬候補を特定しつつある。

#### IV. リードスルー薬の経皮投与

リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与による吸収が不可能であるため、筋ジストロフィー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、対象患者が低年齢のため治療に伴う疼痛や通院頻度も問題となっている。そのため筆者らは、通常は皮膚を透過しない薬物に対する簡便な経皮投与方法を開発した。すなわち、チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を用いて化学的皮膚透過促進処理を行い、アミノグリコシドの皮膚外用剤を連日投与することで、骨格筋内に皮下注射と同等のリードスルー効果を認めた<sup>13)</sup>。皮膚のもつ防御機能を特殊な機器を必要とせず安全性の高い除毛剤により制御し、皮膚非透過性の薬物の全身暴露の有効性が示されたことにより、筋ジストロフィー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非侵襲的投与方法として期待できる。経皮吸収型薬物送達法は患者への負担を軽減するだけでなく、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。また、ほかの薬物療法にも適用可能なため、その臨床的使用は大きな社会的成果が期待されている。

#### V. リードスルー効率の制御

薬物によってリードスルーした未熟終止コドンは、読

み飛ばされているのか、それとも意味をもつアミノ酸が挿入されているのか、実際のところその分子機構は混沌としており、いまだ一致した見解が得られていない。しかし、ジストロフィン蛋白質においては、健常個体の正常ヒトジストロフィンにおいても 1 塩基欠損や 1 塩基置換は頻発しており、ほとんどの単一アミノ酸置換には耐性があるため問題はないことが知られている。

リードスルー誘起物質を投与すると、正常な翻訳終結点までもリードスルーしてしまう可能性が考えられる。しかし、実際には本来の翻訳終結点の後にも終止コドンが連続して存在する 경우가多く、未熟終止コドンは通常の終止コドンよりも周囲の配列の特徴によって決まる終止効率の低いいため、選択的にリードスルーされやすい。現実には、リードスルー誘起物質によって正常蛋白質よりも大きな異常蛋白質が検出された例はなく、リードスルーによる副作用は少ないと思われる。

また、ナンセンス変異を有する異常な mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解 (nonsense-mediated mRNA decay: NMD) と呼ばれる品質管理機構により急速に分解、除去される。しかし、G418 や NM, アタルレンといった既知のリードスルー薬物候補は、NMD を阻害し mRNA を安定化する、つまり未熟終止コドンを特異的に認識し、正常な終止コドンでの翻訳終結には影響を及ぼさないことが示唆されている<sup>6,12,23)</sup>。NMD が抑制されることで、例えリードスルー自体の効率は低くとも多くの全長翻訳産物が得られるため、リードスルー薬物療法はより現実的な治療といえよう。

リードスルーの感受性は、一般に未熟終止コドンの種類が UGA (Opal) > UAA (Ochre) > UAG (Amber) の順に高いことが知られている<sup>24)</sup>。また、未熟終止コドン直後のヌクレオチドは C > U > A / G の順にリードスルーしやすいこと<sup>25)</sup> や、リードスルー効率にとって上流の 2 ヌクレオチドと下流の 6 ヌクレオチドが極めて重要であること<sup>26)</sup> などが報告されている。これらのようにリードスルー誘起物質は、未熟終止コドン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、より多くのリードスルー治療薬候補物質を特定し、個々の患者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。

#### おわりに

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<sup>25)</sup>。そのため、ナンセンス変異に起因するすべ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。その実現性を確保するためには、テラーメイド治療の前提となる詳細な遺伝子解析と着実な臨床応用への足場となる成果が肝要である。昨今、未承認薬・適応外薬促進加算制度が導入され、新薬の創製を加速する経済施策が始まり、大きな期待が寄せられている。多くの生物学・医学研究者の英知と不屈の精神をもってすれば、突きつけられている課題を克服していけるはずである。

本稿において紹介した筆者らの研究は、厚生労働省精神・神経疾患研究開発費、厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究推進事業(以上RM)、財団法人金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成金(MS)で得られた成果に基づいている。

#### 文 献

- Palmer E, Willhelm JM, Sherman F: Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277: 148-150, 1979
- Burke JF, Mogg AE: Construction of a vector, pRSVcatamb38, for the rapid and sensitive assay of amber suppression in human and other mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 13: 1317-1326, 1985
- Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM: Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 2: 467-469, 1996
- Barton-Davis ER, Cordiner L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL: Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 104: 375-381, 1999
- Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, et al: Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 67: 771-780, 2010
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, et al: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-91, 2007
- Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, et al: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol* 47: 430-444, 2007
- McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Abresch RT, Nicorici A, et al: The 6-minute walk test in Duchenne/Becker muscular dystrophy: longitudinal observations. *Muscle Nerve* 42: 966-974, 2010
- Wang B, Yang Z, Brisson BK, Feng H, Zhang Z, et al: Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol* 109: 901-905, 2010
- Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, Shiozuka M, Takeda S, et al: Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myol* 20: 154-158, 2001
- Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, et al: Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem* 134: 751-758, 2003
- Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Floquet C, Shiozuka M, et al: Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes. *J Gene Med* 10: 217-224, 2008
- Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, et al: Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J Biochem* 147: 463-470, 2010
- 松田良一, 塩塚政孝, MacKerell A: ナンセンス変異型遺伝性疾患の治療方法. PCT/JP2007/63436
- Shiozuka M, MacKerell Jr AD, Zhong S, Wagatsuma A, Nonomura Y, et al: Novel chemotherapeutic agents for readthrough of nonsense mutations in muscular dystrophy. "Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy" Takeda S, ed., National Center of Neurology and Psychiatry, in press
- Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, et al: Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology* 39: 1011-1017, 1989
- Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnés MO, Hashimoto D, et al: Efficient total synthesis of (+)-negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem Comm (Camb)* 20: 2379-2381, 2008
- 林 良雄, 木曾良明, 西口茂信, 松田良一, 塩塚政孝: リードスルー活性を有する化合物及び該化合物を含む医薬組成物. 特願2008-317710
- Du L, Damoiseaux R, Nahas S, Gao K, Hu H, et al: Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J Exp Med* 206: 2285-2297, 2009
- Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavsky M, Bellakhov V, Hainrichson M, et al: Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing pre-

- mature stop mutations. *J Med Chem* 52: 2836-2845, 2009
- 21) Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, et al: Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem* 18: 3735-3746, 2010
- 22) Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R: Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut* 59: 496-507, 2010
- 23) Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, et al: Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 3: 1280-1284, 1997
- 24) Martin R, Mogg AE, Heywood LA, Nitschke L, Burke JF: Aminoglycoside suppression at UAG, UAA and UGA codons in *Escherichia coli* and human tissue culture cells. *Mol Gen Genet* 217: 411-418, 1989
- 25) Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, et al: Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 48: 164-169, 2000
- 26) Namy O, Hatin I, Rousset JP: Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* 2: 787-789, 2001

## 違法コピーに注意!!

### そのコピーは大丈夫ですか?

現代社会において、コピー（複写）はなくてはならないものになっていますが、その手軽さゆえに違法コピーが後を絶ちません。あなたが日常的に行っているコピーは大丈夫ですか？ 著作権法に定められた例外、つまり、個人または家庭内等で使うために自らコピーする場合や図書館において調査研究等のため一部分をコピーする場合（著作権法第30、31条等）のごく限られた範囲以外のコピーは、すべて著作権者の許諾を得なければ違法となります。企業や研究施設等で職務上利用するコピーはすべて許諾が必要となりますので、ご注意ください。

違法コピーは健全な創作活動、出版活動の障害となり、ひいては文化・学術の発展を阻害する大きな要因となります。今一度、著作権についてお考えください。

### 許諾の手続きは簡単です!

医学や関連領域の出版物の多くは、(社)出版者著作権管理機構 **JCOPY** に複写権の管理・運営が委託されています。複写される場合は事前に **JCOPY** に連絡し許諾を得てください。

**JCOPY** (社) 出版者著作権管理機構

TEL03-3513-6969 FAX03-3513-6979 info@jcopy.or.jp



一般社団法人

日本医書出版協会

## 不正なコピーは

## 許さない!

### Q&A サイト「それは違法かも。」

「これって違法?」著作権に関するよくある質問にわかりやすくお答えしています。

<http://www.ihokamo.net/>

### 情報受付窓口「不正コピー情報ポスト」

不正コピーなど、明らかに違法なものを見つけたら、こちらまで情報をお寄せください。

<https://www2.accsjp.or.jp/piracy/>  
フリーダイヤル 0120-765-175



社団法人 コンピュータソフトウェア著作権協会  
<http://www2.accsjp.or.jp/>

## Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders

Received July 13, 2009; accepted November 4, 2009; published online November 11, 2009

Masataka Shiozuka<sup>1</sup>, Akira Wagatsuma<sup>1</sup>,  
Tadafumi Kawamoto<sup>2</sup>, Hiroyuki Sasaki<sup>3</sup>,  
Kenichi Shimada<sup>1</sup>, Yoshikazu Takahashi<sup>4</sup>,  
Yoshiaki Nonomura<sup>4</sup> and Ryoichi Matsuda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Sciences, Graduate school of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902; <sup>2</sup>Radioisotope Research Institute, Tsurumi University, Yokohama 230-8501; <sup>3</sup>Institute of DNA Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461; and <sup>4</sup>Microbial Chemistry Research Foundation, Tokyo 141-0021, Japan

\*Ryoichi Matsuda, Department of Life Sciences, Graduate school of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan. Tel.: +81-3-5454-6637; Fax: +81-3-5454-4306; E-mail: cmatsuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

To induce the readthrough of premature termination codons, aminoglycoside antibiotics such as gentamicin have attracted interest as potential therapeutic agents for diseases caused by nonsense mutations. The transdermal delivery of gentamicin is considered unfeasible because of its low permeability through the dermis. However, if the skin permeability of gentamicin could be improved, it would allow topical application without the need for systemic delivery. In this report, we demonstrated that the skin permeability of gentamicin increased with the use of a thioglycolate-based depilatory agent. After transdermal administration, the readthrough activity in skeletal muscle, as determined using a *lacZ/luc* reporter system, was found to be equivalent to systemic administration when measured in transgenic mice. Transdermally applied gentamicin was detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the muscles and sera of mice only after depilatory agent-treatment. In addition, expansion of the intercellular gaps in the basal and prickle-cell layers was observed by electron microscopy only in the depilatory agent-treated mice. Depilatory agent-treatment may be useful for the topical delivery of readthrough-inducing drugs for the rescue of nonsense mutation-mediated genetic disorders. This finding may also be applicable for the transdermal delivery of other pharmacologically active molecules.

**Keywords:** Gentamicin/nonsense mutation/readthrough/thioglycolates/transdermal drug delivery.

**Abbreviations:** TEM, transmission electron microscopy; TCA, trichloroacetic acid.

More than 1800 distinctly inherited human diseases are caused by a single gene that carries nonsense

mutations (1). In *Duchenne* muscular dystrophy (DMD), up to 20% of patients carry nonsense mutations (2). Similarly, up to 10% of patients (>50% in Israel) with cystic fibrosis (CF) have nonsense mutations in the CF transmembrane regulator gene (3). Nonsense mutations in tumour-suppressor genes are also common during the development and progression of cancer (4). Despite advances in gene therapy, clinical success is pending. One limitation involves the inducing genes used in the therapy, which are often targeted by the patient's autoimmune system in response to the viral proteins encoded in the vector. An alternative, pharmacologic approach to induce translational readthrough involves blocking the nonsense mutations using antibiotics. It has been reported that aminoglycoside antibiotics can interfere with the fidelity of the translation machinery. Aminoglycosides cause extensive miscoding of the mRNA *in vitro* (5) and allow readthrough of premature termination codons, as demonstrated in *Escherichia coli* (6), tetrahymena (7), wheat embryos (8), yeast (9), cultured mouse cells (10) and human cells (11–14).

The *mdx* mouse, which is a naturally occurring animal model for DMD, carries a point mutation (from CAA to TAA) at position 3185 in exon 23 of the dystrophin gene. Barton-Davis *et al.* (1999) reported that gentamicin restored functional dystrophin in the *mdx* mouse (15). Moreover, clinical trials involving patients with DMD or CF caused by nonsense mutations have shown that aminoglycosides suppress premature termination mutations in some cases (16, 17).

Gentamicin is one of the most commonly used aminoglycoside antibiotics, and it is usually administered by intramuscular injection. However, it cannot be administered either orally or transdermally as it is a polarized water-soluble compound with very poor intestinal and dermal permeability. Less painful and simpler methods of gentamicin administration are needed to improve the care of patients with genetic disorders caused by nonsense mutations. To this end, transdermal drug delivery has several advantages: it: (i) bypasses gastrointestinal incompatibility and the hepatic 'first-pass' effect; (ii) reduces side-effects due to the optimization of the blood concentration-time profile; (iii) involves patient-activated/patient-modulated delivery which enhances patient compliance; and (iv) enhances target specificity (18). However, a major limitation of transdermal administration is the difficulty associated with delivering gentamicin through the skin barrier.



The objective of the present study was to evaluate the *in vivo*, chemically enhanced transdermal delivery of gentamicin as a readthrough-inducing drug. To this end, we established a novel transgenic mouse strain, named READ (Readthrough Evaluation and Assessment by Dual-reporter), that carries a dual-reporter gene composed of the *lacZ* and *luc* genes connected with a premature termination codon. In this system, only  $\beta$ -galactosidase can be translated without transcriptional readthrough, however, both enzymes would be translated when readthrough occurs. In addition, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to validate the effect of a depilatory agent on the *in vivo* permeation of gentamicin. Finally, ultrastructural studies using electron microscopy were performed to provide insight into the potential mechanism of barrier alterations in depilatory agent-treated skin.

## Materials and Methods

### Chemicals

Gentamicin solution (Gentacin injection) and cream (0.1% Gentacin cream) were purchased from Schering-Plough K. K. (Osaka, Japan). Hair removal gel mousse was obtained from Reckitt Benckiser Co., Ltd. (Tokyo, Japan). All other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) and Promega (Madison, WI, USA).

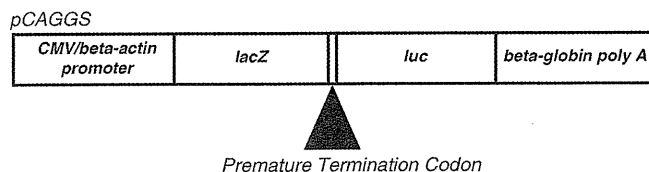
### Animals

A dual-reporter transgenic mouse strain on a C57/BL6 background was generated by the Bioindustry Division of Oriental Yeast Co., Ltd (Tokyo, Japan). The dual-reporter gene consisted of the genes encoding  $\beta$ -galactosidase and luciferase connected with the premature termination codon 'Opal (TGA)' region (a 27-mer that contains the sequence surrounding the premature termination codon of exon 23 of the *mdx* gene for mouse dystrophin; TTGAAAGAG CAATAAAATGGCTTCAAC), and was driven by a cytomegalovirus/ $\beta$ -actin hybrid promoter (Fig. 1). Transgene DNA was injected into the male pronuclei of fertilized eggs which were then incubated at 37°C and transferred into the uteri of pseudopregnant ICR recipient female mice. Founder mice bearing the transgene were identified by PCR analysis of the DNA isolated from partially excised tails. Homozygous transgenic mice were obtained after crossing heterozygous littermates.

Male hairless (HR1) and normal (C57/BL6) mice (5 weeks old; ~25 g body weight) were obtained from Japan SLC, Inc. The mice were housed individually under controlled conditions of temperature and humidity and had free access to water and food. The mice were procured after approval for the present study from the University of Tokyo Animal Ethics Committee.

### Skin treatment and readthrough analysis

A thioglycolate-based depilatory cream was applied for 1 min to the mouse skin, which was then rinsed with warm water to remove the cream. Gentamicin cream (1 mg gentamicin/day) was then applied and rubbed gently onto the skin daily for 7 days. At the completion



**Fig. 1** Schematic structure of the dual-reporter gene construct. The dual reporter was composed of the *lacZ* and *luc* genes connected with a premature termination codon region derived from exon 23 of the *mdx* mouse dystrophin gene and driven by a cytomegalovirus/ $\beta$ -actin hybrid promoter. Although the premature termination codon was originally TAA, we used TGA in the present study.

of the treatment, the mice were euthanized with an overdose of ether. Tissue samples were collected from the latissimus dorsi, gluteus major, femoris lateralis, biceps femoris and quadriceps femoris. Dissected tissues were minced with scissors and homogenized in three volumes of the reporter lysis buffer (Promega) with thin glass fragments using a tissue grinder (Physcotron, Niti-on, Japan). Tissue homogenates were subjected to one round of freeze-thawing. For the readthrough assay, the lysate supernatants were collected after centrifugation at 17710g for 10 min, and then analyzed using the Beta-Glo and Bright-Glo luciferase assay systems (Promega).

The  $\beta$ -galactosidase and luciferase activities were measured according to the manufacturers' instructions using a luminometer (Luminescencer-JNR11, AB-2300; Atto, Japan). The readthrough efficiency was determined as the ratio of luciferase activity to  $\beta$ -galactosidase activity.

### Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

To trace the gentamicin introduced into the mice, LC-MS/MS analysis was performed using the 1100 Quaternary HPLC System (Agilent Technologies, USA) coupled to the API 5000 (Applied Biosystems, CA, USA). Gentamicin solution (10 ng/ml in 5% TCA), 5% TCA and blank mouse serum or muscle tissue extract in reporter lysis buffer were added in equal quantities to serve as the gentamicin standard samples. To prepare the samples for LC-MS/MS, the supernatant of the serum or muscle tissue extract was mixed with 5% TCA (twice the volume of the sample). Chromatographic separation was performed on an XTerra column (3.5  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  50 mm, Waters, MA, USA) maintained at 30°C in a column oven. Five millimolar heptafluorobutyric acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were used as the mobile phase under the condition of 10% B (0–2 min), 10–30% B (2–4 min, linear gradient), 30% B (4–10 min), 10–30% B (10–12 min, linear gradient), and 10% B (12–15 min) at a flow rate of 0.2 ml/min with an injection volume of 10  $\mu$ l. The parent to product ion transitions for gentamicin (*m/z* 478.39  $\rightarrow$  322.30 as gentamicin C1) was monitored on a triple quadrupole mass spectrometer, operating in the multiple reaction monitoring (MRM) with a positive ion mode of electrospray ionization (ESI) and a data collection time of 15 min. The relative quantitative value was calculated using the single-level, calibration-curve method.

### Histochemical and electron microscopic analyses

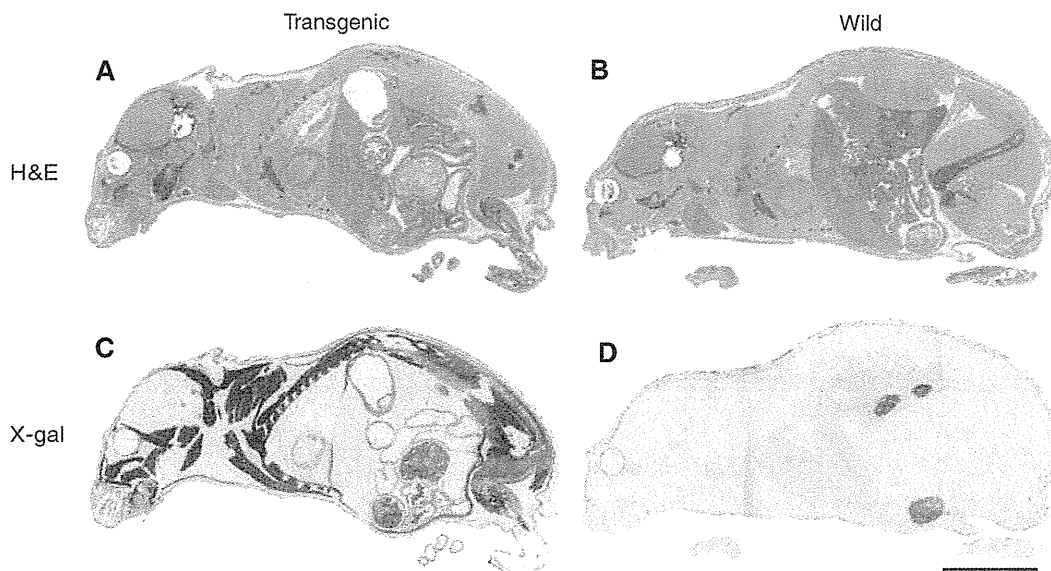
Serial fresh-frozen sections (10  $\mu$ m thickness) from the whole body of a mouse were prepared according to Kawamoto's film method (19). The whole-body sections were freeze-dried and then incubated in X-Gal solution (Nakarai, Japan) overnight at 37°C, and then placed in PBS. The adjacent sections were stained with Hematoxylin and Eosin.

For TEM analysis, small pieces (10 mm  $\times$  10 mm) of the dorsal side of the skin were excised from the hairless mice with a single-edge razor blade. To prepare ultra-thin sections for electron microscopy, tissues were doubly fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer and 1% osmium tetroxide (in 0.1 M phosphate buffer), and then dehydrated with a graded series of ethanol. The tissues were then embedded in epoxy resin. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under an electron microscope (H-7500; Hitachi, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 100 kV. The images were optimized for contrast and brightness using Photoshop CS3 software (Adobe Inc., San Jose, USA).

## Results

### Establishment of a transgenic mouse for transcriptional readthrough evaluation

In order to measure transcriptional readthrough activity, we established a novel transgenic mouse strain, named READ, which expressed a dual-reporter gene. The dual reporter construct was composed of the *lacZ* and *luc* genes connected with a premature termination codon region (Fig. 1). Although the premature termination codon of the *mdx* mouse was originally TAA, we adopted TGA-centered sequences because



**Fig. 2 Whole-body X-gal staining of a transgenic mouse.** Whole-body fresh sections of 5-week-old transgenic (A and C) and control (B and D) mice were stained with Hematoxylin-Eosin (A and B) and X-gal (C and D). The transgenic mouse expressed  $\beta$ -galactosidase in the skeletal and cardiac muscles. The contents of the digestive tracts stained positive with X-gal due to the native bacterial  $\beta$ -galactosidase of flora (D). Bar = 1 cm.

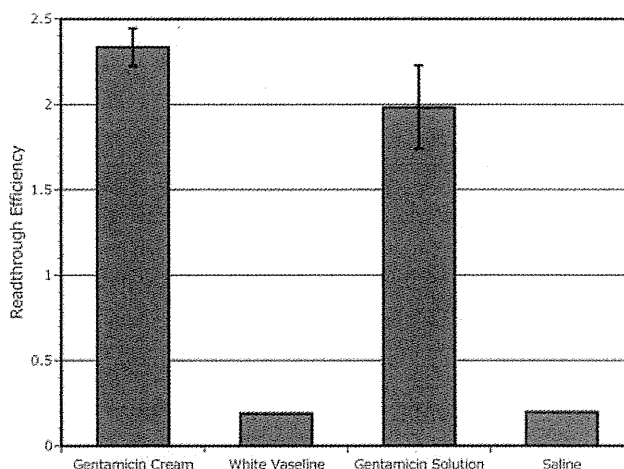
aminoglycoside antibiotics tend to exhibit the highest readthrough activity for TGA (20). When a test substance without readthrough activity was administered to READ mice, only  $\beta$ -galactosidase was translated. We confirmed  $\beta$ -galactosidase expression in striated muscles, including the diaphragm and heart, by X-gal staining of whole-body sections (Fig. 2C). The readthrough efficiency was determined as the ratio of luciferase activity to  $\beta$ -galactosidase activity.

#### **Readthrough activity of gentamicin in READ mice**

The readthrough activities of gentamicin following single, daily subcutaneous injections (1 mg in 0.1 ml,  $n=6$ ) and transdermal administration (1 mg in 1 g,  $n=5$ ) after depilatory treatment were compared after 7 days. The mice used for transdermal administration were treated with depilatory cream on day zero. A commercially available topical cream containing 0.1% gentamicin was then applied daily to the skin of the back, hip and thigh of each transgenic mouse. Gentamicin applied to the depilatory agent-treated skin induced readthrough in the muscle tissues at the same level as that observed after subcutaneous injection (Fig. 3). Transdermally administered gentamicin resulted in readthrough activity only in depilatory agent-treated READ mice, but not in untreated ones.

#### **Detection of gentamicin in muscle and serum of subcutaneously and transdermally treated mice**

To study the permeability of gentamicin into the muscle tissues, LC-MS/MS analysis was performed. The presence of gentamicin C1 was confirmed in both the subcutaneously and transdermally treated groups (Fig. 4). The gentamicin components C1a and C2 were also detected in the same manner (data not shown). To evaluate whether pretreatment with the thioglycolate-based depilatory agent enhances gentamicin permeation through the skin, the detection of

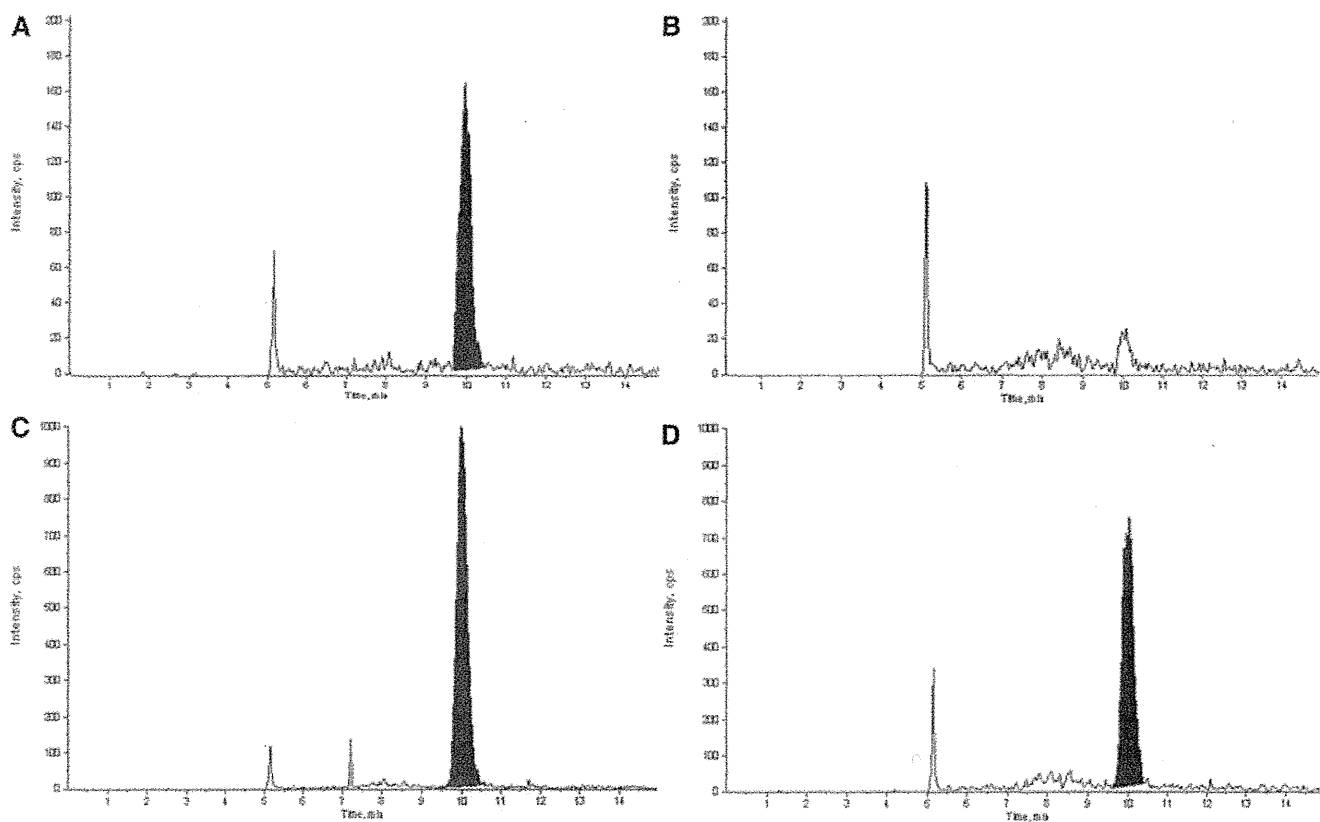


**Fig. 3 Effects of topical and subcutaneous administration of gentamicin on readthrough activity in READ mice.** The readthrough activity of gentamicin was compared between mice that were treated by daily topical administration (1 mg in 1 g,  $n=5$ ) onto depilatory-treated skin and those treated by subcutaneous injection (1 mg in 100  $\mu$ l,  $n=6$ ) for 7 days. The data for gentamicin cream administration showed the same increase in readthrough efficiency as that observed for subcutaneous injection (gentamicin solution). Error bars indicate SDs.

gentamicin in the sera and muscle tissue extracts of hairless mice was carried out using LC-MS/MS. We confirmed that the LC-MS/MS peak observed for the depilatory-treated group was in the identical position as that of the reference material, whereas the peak associated with gentamicin C1 was undetectable in the untreated group (Fig. 5). The results indicate that the depilatory agent significantly increased the absorption of gentamicin by the skin.

#### **Ultrastructure of depilatory agent-treated skin**

To examine whether ultrastructural changes in the skin were caused by treatment with the depilatory agent,



**Fig. 4** LC-MS/MS detection of gentamicin in the muscle tissue extracts from gentamicin-treated mice. The mass chromatograms of gentamicin C1 in muscle tissue extracts from C57/BL6 mice: gentamicin standard sample (A); no administration (B); subcutaneous injection of gentamicin daily for 7 days (C); transdermal administration of gentamicin cream daily for 7 days after one-time depilatory treatment (D). The major (black-painted) peak obtained for both administration groups was identical to the gentamicin standard sample.

TEM analysis was performed with control, 1 min- and 24h-treated samples. In the non-treated control sample, the cells were closely packed together and intercellular spaces were not observed (Fig. 6A). However, even after just 1 min of treatment with the depilatory agent, the formation of gaps could be observed when the control (Fig. 6A) and experimental sample (Fig. 6B) were compared. In the sample treated 24 h with the depilatory agent, a large expansion of the intercellular gaps and extraordinary spaces in the basal and prickle-cell layers were clearly evident (Fig. 6C).

## Discussion

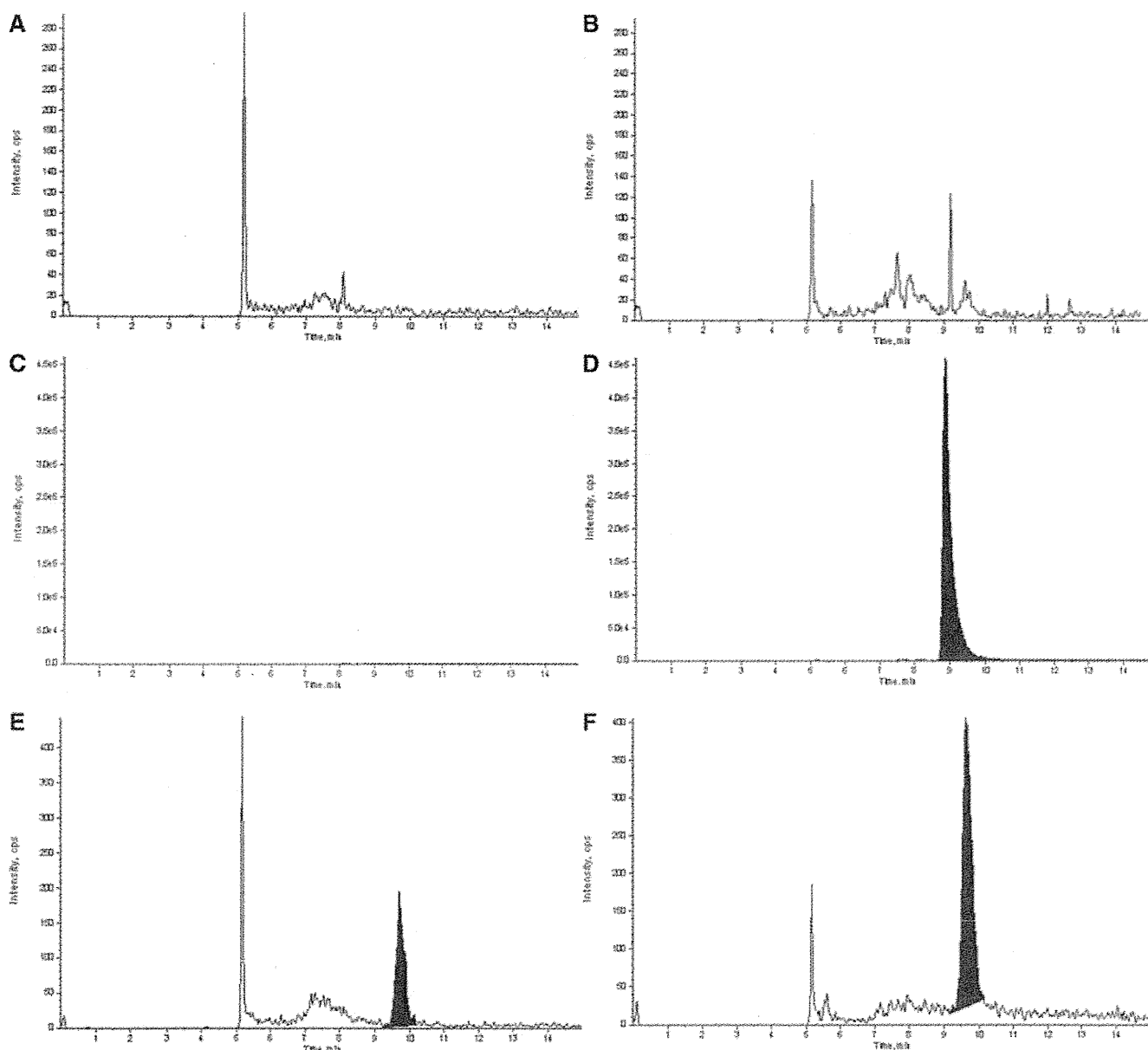
### **Establishment of a transgenic mouse for the *in vivo* assay of readthrough activity**

We established and demonstrated the efficacy of a dual-reporter transgenic mouse strain, named READ, which can be used for the detection of readthrough activity *in vivo* for the first time. It is difficult to measure the amount of dystrophin quantitatively because it is relatively large (molecular weight of 427 kDa) and is only present in small amounts in striated muscles. Therefore, the reporter assay with READ mouse is quantitative and efficient in comparison to the detection of dystrophin using a *mdx* mouse. In rare cases, some luciferase inhibitors, a compound such as PTC124, acting through post-translational *luc* reporter stabilization, appear to activate gene expression (21). We consider the importance of implementing the appropriate control assays. The READ mouse assay

system used in this study makes it possible not only to screen new molecules which induce readthrough, but also to examine the pharmacokinetics and side effects associated with such molecules. This system can also be used for the optimization of various routes of drug administration. Our READ mouse provides a powerful and valuable tool for the development of novel readthrough therapeutics.

### **Depilatory agent-treatment enhances dermal permeability and is useful for transdermal drug delivery**

Transdermal drug delivery systems offer many advantages over conventional dosage forms, such as improved patient compliance, reduced side effects, no hepatic first pass effects, and the possibility to easily interrupt or terminate treatment (22–24). Moreover, compared with oral administration, such a non-invasive drug delivery route significantly reduces drug degradation due to the lower metabolic activity at the site of administration. It also bypasses hepatic circulation which is a major site of potential drug metabolism (25). However, given the low permeability of external molecules, such as gentamicin, the skin remains a minor portal of entry for drugs (26). Therefore, various approaches aimed at decreasing the resistance of skin to drug penetration have been investigated (27). The effects of a depilatory agent on the percutaneous absorption of testosterone and theophylline in Guinea pigs (28) and rats (29), respectively, and on the



**Fig. 5** LC-MS/MS detection of gentamicin in the sera and muscle tissue extracts of hairless mice with or without depilatory treatment. Mass chromatograms of gentamicin C1 in the sera (A, C and E) and muscle tissue extracts (B, D and F) from hairless mice: non-depilatory-treated and gentamicin-administrated daily for 7 days (A and B); one-time depilatory-treated 24 h prior to administration and gentamicin-administrated daily for 7 days (C and D); part of (C) at a higher magnification (E); gentamicin standard sample (F). The black-painted peak showed the existence of gentamicin. Gentamicin was not detected in the non-depilatory-treated group, whereas gentamicin was present in the depilatory-treated-group, as assessed by comparison with the reference material in LC-MS/MS.

iontophoretic delivery of insulin in diabetic rats (30, 31), porcine epidermis (32, 33), and on the human stratum corneum (34) have been reported. As shown in Fig. 3, topically applied gentamicin cream induced the readthrough of a premature termination codon and was as effective as subcutaneous injection.

#### **Presence of transdermally delivered gentamicin in muscle and serum**

To determine whether a depilatory agent could influence the permeability of skin, we next investigated the permeation of gentamicin following transdermal administration using a validated LC-MS/MS system (Fig. 4). The quantity of gentamicin was calculated from the peak area and when appropriate, we

normalized the measured levels to a peak area of known concentration in a gentamicin standard sample. In the muscle tissue extracts, the concentration of gentamicin was  $\sim 2$ -fold higher on average ( $n=3$ ) for transdermal administration when compared to subcutaneous injections. It is likely that transdermal administration can extend the duration of treatment with gentamicin, which has a short half-life.

The administered gentamicin was present in both the sera and muscle tissue extracts of depilatory agent-treated mice (Fig. 5). Furthermore, LC-MS/MS results indicated that the amount of gentamicin was significantly higher ( $\sim 7000$ -fold) in the muscle tissue than in the serum. *In vivo* transdermal absorption experiments demonstrated that the depilatory agent drastically reduced the barrier function of the skin