

- regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 17:5400–5409
60. Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20:1868–1876
61. Wittwer M, Fluck M, Hoppeler H, Muller S, Desplanches D, Billeter R (2002) Prolonged unloading of rat soleus muscle causes distinct adaptations of the gene profile. *FASEB J* 6: 884–886
62. Grichko VP, Heywood-Cooksey A, Kidd KR, Fitts RH (2000) Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *J Appl Physiol* 88:473–478
63. Tomáška L, Nosek J, Kucejová B (2001) Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins: in search for new functions. *Biol Chem* 382:179–186
64. Bruni F, Polosa PL, Gadaleta MN, Cantatore P, Roberti M (2010) Nuclear respiratory factor 2 induces the expression of many but not all human proteins acting in mitochondrial DNA transcription and replication. *J Biol Chem* 285:3939–3948
65. Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 94:514–519
66. Bota DA, Van Remmen H, Davies KJ (2002) Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett* 532:103–106
67. Siu PM, Pistilli EE, Alway SE (2008) Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol* 105:1695–1705
68. Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C, Desplanches D (2007) Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med* 42:627–635
69. Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4:674–680
70. Fu GK, Markovitz DM (1998) The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* 37:1905–1909
71. Langer T, Neupert W (1996) Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia* 52:1069–1076
72. Andrianjafiniony T, Dupré-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D (2010) Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol* 299:C307–C315
73. Adhietty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, Hood DA (2005) Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol* 289:C994–C1001

解説

経皮吸収型薬物送達の新展開

塩塚 政孝 野々村 禎昭 松田 良一

古代ギリシャの医学者ガレノスが蜜蝋やオリーブオイルを混ぜクリームを開発して以降、薬物の皮膚への投与は古くから行われてきたが、これらは主に皮膚表面もしくは皮膚直下の組織に対する表在性皮膚疾患や細菌感染症治療のためのものであった。近年、局所効果だけでなく全身暴露を期待した薬物の投与部位として皮膚が注目され、皮膚表面から皮下の血管内に薬物を移行させ、全身的薬効を得ることを目的とした経皮薬物送達システム (Transdermal Drug Delivery System : TDDS) に関心が集まっている。経皮投与は、(1) 初回通過効果 (摂取された薬物は消化管で吸収され、門脈を経由して肝臓で代謝されるため、体循環血液中に到達する割合と速度が低下する現象) や消化管障害を回避できる、(2) 長時間にわたり一定の血中濃度を保持することができる、(3) 経口摂取が困難な薬物や患者への適用が可能で、投与が簡便なためコンプライアンス (服薬指示の遵守) の向上が見込める、といった利点が挙げられる¹⁾。

1965年に宇宙飛行士の酔い止めにスコポラミンが用いられ、79年にFDAから承認されて以降、現在までにニトログリセリンや硝酸イソソルビド (狭心症)、エストラジオール (更年期障害)、ニコチン (禁煙) などを含有したものが薬理効果の持続性を意図して利用されている。しかし、薬物が皮膚から吸収されるためには融点が低く (200℃以下)、分子量が小さく (500Da以下)、適度に脂溶性を示すというような物理化学的条件を整える

必要があった²⁾。皮膚は本来、生体外からの異物侵入に対する防御の働きがあり、化学物質を容易には透過しないため、単独適用しても十分な薬効が得られないものも多く、経皮吸収型製剤として開発される薬物の選択は厳しい制約を受けてしまう。そこで、薬物の皮膚透過性を改善するために種々の経皮吸収促進法の開発が盛んに行われており、TDDSのもつ多くのメリットが活用されつつある。

本稿では現在注目を集める経皮投与技術を紹介し、その一例として化学的皮膚透過促進処理を利用した、皮膚非透過性薬物の経皮吸収型薬物送達の有効性を示唆する結果を報告する。

I. 薬物の皮膚透過

皮膚は人体の表面を覆い、生命環境と外界との境界バリアを形成している。その構造は組織学的に表皮、真皮、皮下組織の三層より構成され、付属器官として毛包や汗腺、脂腺などが貫通している。表皮は内側から基底層 (基底膜上に配列し、円柱状をした1層の基底細胞からなる層)、有棘層 (多角形の細胞が細胞間橋で結合する最も厚い細胞層)、顆粒層 (好塩基性のケラトヒアリン顆粒をもつ細胞層)、淡明層 (厚い角層の無構造部)、角層 (核のない角化細胞層) の5層からなり、基底層の細胞は分裂により上方に移動すると共に分化し、最終的に角層になる。皮膚最外層の角層は疎水性の脂質多重構造であり、生きた表皮層は親水

Recent development in transdermal drug delivery

Masataka Shiozuka, Yoshiaki Nonomura, Ryoichi Matsuda : 東京大学大学院 総合文化研究科 (〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1)

性かつ分解酵素も多く異物は代謝分解される³⁾。つまり、角層が物理的バリア、生きた表皮層が化学的バリアとなって、水の蒸発や物質の侵入といった皮膚内外からの透過を阻止する働きを持っている。皮膚外用剤を適用した部位による経皮吸収性の違いは角層の厚さや毛包・汗腺の数や大きさが異なることに起因することが知られている。角層の層数が少なくなるほどバリア機能は低くなるため、頭部、前額、下顎、腋窩、陰囊は吸収性が高く、手掌、足関節部、足裏は低くなる傾向にある⁴⁾。真皮は乳頭層、乳頭下層、網状層の3層からなり、コラーゲンにより構成される膠原線維がその9割を占める。毛細血管は真皮の表皮側に位置しており、皮膚表面に塗布された薬剤が血管中に移行するには表皮、真皮を透過し、さらに毛細血管壁を透過しなければならない。

薬物の皮膚透過経路は、角層中を拡散する経路と毛包や汗腺などの付属器官を介し直接真皮に移行する経路の二通りが考えられるが、付属器官の有効面積が占める割合は0.1%程度(顔と頭皮は10%)であることから、皮膚透過に関与する貢献度は低いと考えられている。また、角層中の拡散経路には角質細胞内を通る経細胞経路(Transcellular route)と細胞間隙を通る細胞間経路(Inter-cellular route)がある。角層はレンガ(角質細胞85%)とモルタル(細胞間脂質15%)の関係に例えられるように、ケラチン化したタンパク質がブロック状に積み重なり、その間隙にセラミドやコレステロールからなる脂質分子が埋め込まれた構造をしている^{5,6)}。透過抵抗は細胞間経路のほうがより小さいと考えられるが、外力に対して抵抗性である角層の存在が経皮吸収の汎用化を困難なものにしており、角層の透過こそが薬物の皮膚透過の律速段階となる。

経皮投与薬物の剤形には、全身作用型の経皮吸収型製剤以外にも、油脂性軟膏剤(疎水性)やクリームのような乳剤性軟膏剤(親水性)、懸濁性のローション剤、貼付剤などが存在する。これらは主に局所作用型として用いられているが、ニトログリセリン軟膏のように全身作用型として用いられるものもある。薬物の経皮吸収性はその剤形によっても変化することが知られており、角層は脂

溶性が高いため、水溶性薬物は油脂性基剤のほうが皮膚との親和性は高まり、経皮吸収は高まる。しかし、脂溶性薬物は基剤との親和性が高いと薬物が放出されず経皮吸収は低くなるため、基剤と皮膚や薬物との親和性のバランスが重要になってくる⁷⁾。さらに、基剤が二相の剤形の場合では水中油型(水相中に油滴が分散)や油中水型によって薬物が均一に分散していないことや、基剤中の薬物の拡散性によっても影響がある。また、基剤中の薬物の状態によって、イオン化していない分子型、イオン型、飽和濃度を越えた結晶型の順に角層への分配が低くなる。しかし、敢えて結晶化させることで薬効の持続性を向上させているものもあり、経皮吸収性を高める基剤について一概には決められない。

II. 経皮薬剤投与を促進する技術

薬物の皮膚透過を促進する方法は化学的・物理的の二つに大別される。化学的促進法は溶媒の透過性や拡散性を高めたり、角層の軟化や溶解などによって透過・吸収を促進させる方法である。テルペン(リモネン、エッセンシャルオイル)、脂肪酸(オレイン酸やラウリン酸)、界面活性剤(Tweenやラウリル硫酸ナトリウム)、メントール、尿素、ジメチルスルホキシド、エタノールやプロピレングリコールのように従来から使用されてきたものに加え、ピロリドン、ラウロカプラム、レシチン、四級アンモニウム化合物、シリコン、アルカノアート等々に至る数多くの物質に促進能があると報告されているが、限定された利用しかされていないため、現在もより透過促進効果が高く、適用薬物の範囲拡大を可能にする促進剤の開発が盛んに行われている⁸⁾。中でも注目すべきは、ケラチンのジスルフィド結合を切断するチオグリコレート含有した、市販の除毛剤自身が非常にユニークな皮膚透過促進剤となることである。これについては後述する。

薬物の物理化学的性質を調節することで透過促進を目指すアプローチとして、プロドラッグ化がある。親油性に変換することで角層への分配性を高め、透過後に表皮の酵素反応で本来の薬物に戻す局所作用型のプロドラッグが実用化されてい

る。代謝されると活性化するプロドラッグに対し、代謝されると失活するアンテドラッグは全身性の副作用を軽減することを目的として研究されている。また、薬物運搬体として小胞体の概念を利用し、脂質二重膜を模して人工的に合成されたリポソームやその類似物質を用いた薬物のカプセル化(非イオン界面活性剤で構成されたニオソーム、アルコールを含むエソソーム、両者を含むトランスフェロソームなど)によっても到達性を改善することができる。

物理的促進法には、外部エネルギーを用いた透過推進力の増大や皮膚構造の一時的な変化による透過量の増大を狙った方法がある^{2,9)}。イオントフォレシス(イオノフォレシス、イオン泳動法)は、皮膚に微弱な電気を流すと電圧差や陽極から皮膚内側へ向かう水の流れが生じることを利用し、イオン性薬物の経皮吸収を促進させるものである。皮膚は中性領域においては負に帯電しており、正に帯電したイオンをより選択的に吸収すると考えられている。皮膚に陽極(酸性薬物)と陰極(塩基性・中性薬物)を配置し、低電圧を印加することで電気泳動の要領で薬物を皮膚深部へと移動させる。この時電流は電気抵抗の少ない毛包や汗腺に集中するため、薬物は付属器官を介した経路で吸収される。80年代から臨床の場で医療用具として使用されており、局所麻酔薬やステロイドを適用する器具として承認されている。冷却しながらのクライオエレクトロフォレシスや局所に焦点を当てたハイドロエレクトロフォレシスは美容目的でも用いられている。

エレクトロポレーション(電気穿孔法)は、高電圧パルスを一時的に皮膚に負荷することで角層構造を変化させ、一時的に皮膚に孔を生じさせるものであり、分子生物学分野において遺伝子を細胞内に導入する方法として用いられてきた技術を利用したものである。ソノフォレシス(フォノフォレシス)は、超音波を皮膚に適用することで角層の細胞間隙経路の脂質構造への干渉やキャビテーション(陰圧の気泡)効果により経皮吸収を促進させると考えられている。キャビテーションによって誘発される生物学的作用を排除するために、レーザー放射による圧縮波を用いる方法も開発されてい

る。これらの装置は携帯するには大きく高価だったが、ハンディサイズのものも開発され、より精密な薬物吸収制御が可能となる技術として期待されている。

マイクロニードルは、剣山のように配置した極微小な針を使用することで角層のみを貫通し、神経には達しない(痛みは感じない)よう小さな孔を開け吸収を促進させる方法である。現在では生体分解性のマイクロニードルによるパッチ剤も開発されている。サーマルアブレーションは、瞬間的に皮膚表面を選択的に加熱することで角層の水分を蒸発・除去し、孔を生じさせる方法である。さらに空気圧やバネ圧を利用した無針注射法も開発され、これら第三世代の経皮投与法は高分子やワクチンを注入できるため、表皮ランゲルハンス細胞に取り込ませることによって皮膚特有の免疫システムを利用した経皮ワクチンへの応用も期待されている。より簡便な方法として、外用剤塗布部を覆うことで角層を水和させ、温熱効果により血流を増加させる閉鎖密封法や、粘着テープで角層を剝離するテープストリッピング、サンドペーパーや微粒子を吹き付けて皮膚を擦傷させるマイクロダーマブレーションも物理的促進法に分類される。

エレクトロポレーションやソノフォレシスは積極的に薬物を移動させる駆動力が存在しないため、投与速度が制御可能なイオントフォレシスとの併用によって相乗効果が得られる。同様に化学的促進剤と物理的促進機器の併用もより一層効果的である¹⁰⁾。薬物によって吸収の程度が違ったり臨床実態を考慮し、これらの方法を効率的に組み合わせることで安全かつ高い透過促進効果を有する方法を選択することが必要である。

Ⅲ. 遺伝性疾患治療のための 経皮吸収型薬物療法の試み

リードスルー療法は、薬物により未熟終止コドンを抑止し翻訳を進行させ、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り、現在知られている2,400種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の包括的薬物療法として注目されている。これまでに、ゲンタマイシンやネガ

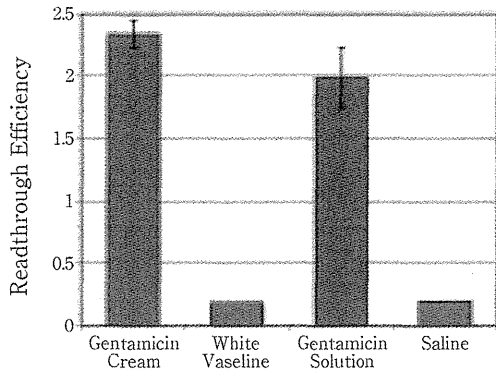


図 1 ゲンタマイシンの経皮・皮下投与におけるリードスルー活性
除毛剤処理後にゲンタマイシークリーム (Gentamicin Cream) を経皮投与したものと、同用量のゲンタマイシン注射液 (Gentamicin Solution) を皮下投与したもののリードスルー活性を比較した。除毛剤は一度だけ処理 (1 分間) し、ゲンタマイシンの投与は 7 日間連日行った。投与終了後に骨格筋抽出液のリードスルー活性を定量したところ、皮下投与と同等の活性を除毛剤処理後の経皮投与で確認した。陰性対照として、それぞれ白色ワセリン (White Vaseline) と生理食塩水 (Saline) を投与している。(文献 13 より引用)

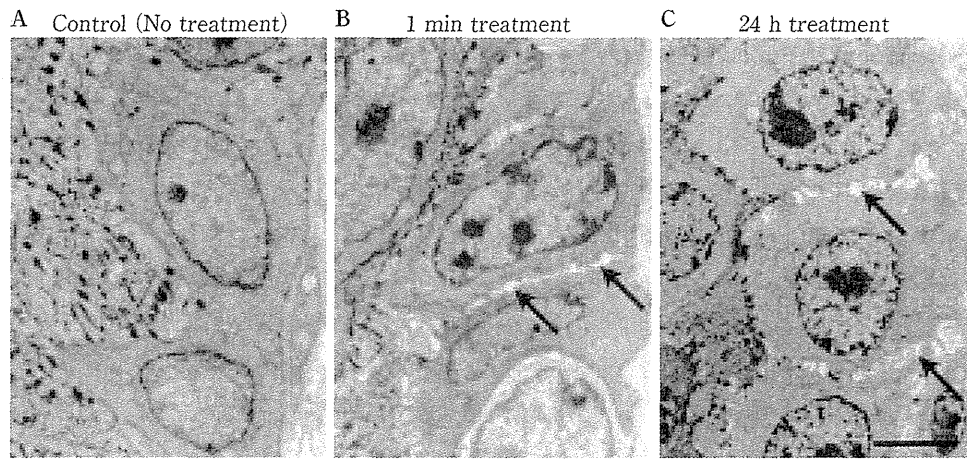


図 2 5 週齢雄性ヘアレスマウスの背側皮膚の透過型電子顕微鏡像

A は除毛剤処理をしていないもの、B は 1 分間の除毛剤処理後洗浄したもの、C は比較のため除毛剤処理を 24 時間連続 (放置) したものである。白く抜けて見える部分 (矢印部) に、基底層や有棘層の細胞間に隙間が空いているのが観察できる。Bar は 5 μ m。(文献 13 より引用)

マイシンなどの抗生物質をデュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデルマウスに投与することで、ナンセンス変異により生じた未熟終止コドン をリードスルーさせ、正常機能タンパク質の発現を回復させることを米国の Sweeney らのグループ¹¹⁾や筆者ら¹²⁾は示してきた。しかし、アミノグリコシド系抗生物質は経口・経皮投与が不可能なため、筋崩壊が進行している組織にさらに障害を与える筋中や静脈内投与しか方法がなく、対象患者が低年齢のため疼痛や通院頻度も問題視されている。

そこで筆者らは、新たに確立したリードスルー活性検出用遺伝子導入マウス (READ マウス) に対し、化学的皮膚透過促進処理としてチオグリコレートを含む市販の除毛剤を用い、経口投与では活性をもたず経皮投与では全身暴露が不可能であったアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシ

ンの皮膚外用剤 (ゲンタマイシークリーム) を連日投与した。その結果、骨格筋内に皮下注射と同等の薬効 (リードスルー活性) を認めた (図 1)¹³⁾。また、除毛剤を用いずに剃刀で体毛を除去してからゲンタマイシンを塗布したものでは活性は検出できなかった。除毛剤処理による皮膚透過促進作用を明らかにするため、体毛が著しく少ないヘアレスマウスに投与することで血清および骨格筋組織中のゲンタマイシンの存在を液体クロマトグラフトンデム質量分析により測定した。その結果、除毛剤処理をしていないヘアレスマウスではゲンタマイシンは検出されず、除毛剤処理を施したヘアレスマウスにおいてのみ血清および骨格筋抽出液中に高レベルのゲンタマイシンの存在を認めた。また、適用する剤形は軟膏よりもクリームのほうが有効性は高かった。除毛剤の皮膚への作用を詳細に透過電顕で観察したところ、1 分間の除毛剤

処理後洗浄したものに、基底層や有棘層の細胞間隙の増大が認められた(図2)¹³⁾。処理の有無やその程度による差異を明確にするため、過剰な除毛剤処理(24時間連続)したものは、細胞間の間隔がより明瞭になっているのがわかる。Leeら¹⁴⁾は除毛剤によって経細胞経路と経細胞間経路の両者の抵抗を減少させることで透過を上昇させたと報告しており、今回の結果で表皮の細胞間経路が拡大しているのは、細胞の縮小のためであるように観察できる。

チオグリコレートを基剤とした除毛剤処理による皮膚透過促進は、1984年にKushidaら¹⁵⁾がラットへのテオフィリン投与、1998年Zakzewskiら¹⁶⁾と1999年Kanikkannanら¹⁷⁾が糖尿病ラットにイオントフォレシスでのインスリン投与に有効な報告がある。また、Singhら¹⁸⁾は2004年にブタ表皮、Leeら¹⁴⁾は2008年にヒト包皮を用いて*in vitro*で解析している。*in vivo*で経皮吸収活性(薬効)と標的(血中や筋)組織中の投与物質の存在を確認し、投与時の皮膚の状態(基底層や有棘層への作用)を明らかにしたのは筆者らの研究が初めてである。

皮膚のもつ防御機能による薬物吸収を特殊な機器を必要とせず市販されている安全性の高い除毛剤により制御し、通常は皮膚を透過しない薬物の全身暴露の有効性が示されたことは、簡便かつ非侵襲的投与方法として臨床的使用に期待できる。また、高齢化社会における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と考えられる。

今後の経皮薬剤投与は既存薬物の経口剤や注射剤の代替投与方法としてだけでなく、薬物濃度を変動・制御することで生体の概日リズムに合わせ

るものや培養皮膚を用いた製剤等々のように、TDDSならではの利点を生かした開発展開が重要になってくるだろう。

本稿において紹介した筆者らの研究成果は「厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学推進事業」「厚生労働省精神・神経疾患研究委託費」によって行われたものである。

●文 献

- 1) Thong HY, Zhai H, Maibach HI : *Skin Pharmacol Physiol* **20** : 272-282, 2007
- 2) Prausnitz MR, Langer R : *Nat Biotech* **2** : 1261-1268, 2008
- 3) Proksch E, Brandner JM, Jensen JM : *Exp Dermatol* **17** : 1063-1072, 2008
- 4) Feldmann RJ, Maibach HI : *J Invest Dermatol* **48** : 181-183, 1967
- 5) Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R : *Nat Rev Drug Discov* **3** : 115-124, 2004
- 6) Nino M, Calabro G, Santoianni P : *Dermatol Online J* **16** : 4, 2010
- 7) Benson HAE : *Curr Drug Deliv* **2** : 23-33, 2005
- 8) Ahad A, Aqil M, Kohli K et al : *Expert Opin Ther Patents* **19** : 969-988, 2009
- 9) Subedi RK, Oh SY, Chun MK et al : *Arch Pharm Res* **33** : 339-351, 2009
- 10) Mitragotri S : *Pharm Res* **17** : 1354-1359, 2000
- 11) Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma D et al : *J Clin Invest* **104** : 375-381, 1999
- 12) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : *J Biochem* **134** : 751-758, 2003
- 13) Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T et al : *J Biochem* **147** : 463-470, 2010
- 14) Lee JN, Jee SH, Chan CC et al : *J Invest Dermatol* **128** : 2240-2247, 2008
- 15) Kushida K, Masaki K, Matsumura M et al : *Chem Pharm Bull* **32** : 268-274, 1984
- 16) Zakzewski CA, Wasilewski J, Cawley P, Ford W : *J Control Release* **50** : 267-272, 1998
- 17) Kanikkannan N, Singh J, Ramarao P : *J Control Release* **59** : 99-105, 1999
- 18) Rastogi SK, Singh J : *Pharm Dev Tech* **9** : 341-348, 2004

筋ジストロフィーに対するリードスルー治療

塩塚 政孝 松田 良一

1. リードスルー治療とは

ナンセンス変異によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) では、ジストロフィン遺伝子エクソン内で点変異により一つの塩基が置換し、本来の翻訳終結部位より上流に未熟終止コドン (premature termination codon) が生じることで、機能的な全長ジストロフィンタンパク質が合成されずに遺伝子欠損症状を呈す。この未熟終止コドンを薬物により抑制し翻訳を進行させ、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。ナンセンス変異症例は DMD では本邦において 19% を占め、2,400 種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の存在が明らかにされるとともに、それらの包括的薬学療法としてもリードスルー治療は注目されている。

2. ナンセンス変異型筋ジストロフィーへの適用

リードスルー誘起物質によるナンセンス変異の抑制は、酵母を用いた系でアミノグリコシド系抗生物質パロモマイシンによって 1979 年に最初に立証された¹⁾。その後、哺乳類細胞でもリードスルーにより機能的タンパク質の回復がみられることが報告され²⁾、1996 年にはアミノグリコシド系抗生物質の G418 やゲンタマイシンが、嚢胞性線維症の原因遺伝子にナンセンス変異をもつ細胞に

対して正常遺伝子産物を発現させることに成功した³⁾。これまで効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移植以外に方法はないと考えられていたナンセンス変異型遺伝性疾患に対する新しい治療手段として、リードスルーによる治療の可能性が拓けてきた。

1999 年、ペンシルバニア大学の Lee Sweeney らのグループが *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) にゲンタマイシンを投与し、リードスルーさせることにより筋組織内に正常マウスの 20% 程度のジストロフィンの回復および筋力の上昇を報告した⁴⁾。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、ゲンタマイシンを用いたいくつかの治験が行われたが、その重篤な副作用のために制限があり、いずれも治療効果は低かった。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⁵⁾。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課題となった。

2007 年、Lee Sweeney らはバイオベンチャー企業 PTC Therapeutics 社とともにハイスループット検出系を使い、80 万種類の低分子化合物群から高いリードスルー活性をもつ PTC124 (アタルレン) を同定した (図 A)。*mdx* マウスと DMD

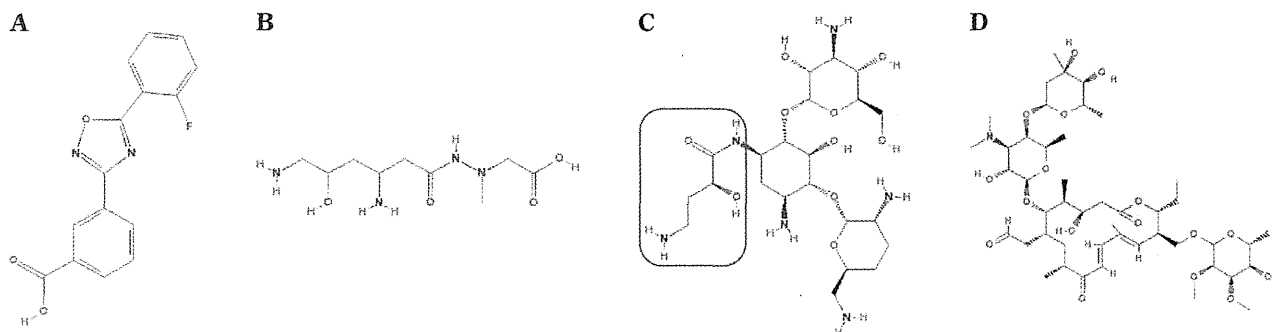


図 リードスルー誘起物質の構造

A. アタルレン(PTC124), B. ネガマイシン, C. アルベカシン(囲み部がAHB基), D. タイロシン。

患者由来培養細胞においてジストロフィン発現を復活させた報告は、第I相試験結果と同時に公表された^{6,7)}。1日に3回服用での第I相で毒性は認められなかったものの、DMDとベッカー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相試験において、治療の有効性に関する科学的証拠を得ることはできなかった。残念な結果ではあるが、筋ジストロフィー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され続け⁸⁾、ジストロフィンの発現だけではない臨床効果を評価する尺度の重要性が浮き彫りになっている。

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2B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、アタルレンは効果をもつことが培養系で示されている⁹⁾。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。

3. リードスルー誘起物質の探索

筆者らは2001年以降、ジペプチド系抗生物質ネガマイシンがDMDや先天性筋ジストロフィーのモデル系において高いリードスルー活性を有することを報告してきた(図B)¹⁰⁻¹²⁾。ネガマイシン

は1970年に日本の微生物化学研究会で発見されたグラム陰性菌に対する抗生物質で、ゲンタマイシンより高い安全性をもつため、長期間投与が必須なリードスルー治療薬として有望と考えられた。しかしネガマイシンは未承認であり、その大量入手が不可能であったことから、ネガマイシン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¹³⁾。この薬効評価系を用いることで、ネガマイシンの化学構造に立脚した*in silico*探索からリードスルー治療薬候補を5種特定した¹⁴⁾。薬物候補#2や#4は、ゲンタマイシンやネガマイシンよりも高い濃度依存的なリードスルー活性を内服によっても示し、*mdx*マウスやDMD患者由来培養細胞を用いた生化学的・免疫組織化学的・運動機能解析学的解析や安全性試験結果も良好である。特定した薬物候補やネガマイシン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た^{15,16)}。

2009年Duらは、毛細血管拡張運動失調症をモデルとした無細胞翻訳系ELISAによる完全自動化されたハイスループット探索で、アミノグリコシドではない化合物RTC#13を報告した¹⁷⁾。*mdx*マウス骨格筋培養細胞への処理でゲンタマイシンと同等のジストロフィンの発現回復が見られている。

4. アミノグリコシドの再評価

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-NH₂基を(S)-4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸(AHB)基でアシル化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ている(図 C)。*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検証したところ有意な治療効果を認め¹⁸⁾。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 年に抗メチチリン耐性黄色ブドウ球菌(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(適用外使用)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。

ナンセンス変異型嚢胞性線維症患者の割合が多いイスラエルでは近年、急速にリードスルーに関する研究が発展している。イスラエルからのリードスルー治療薬に関する最新の報告を二つ紹介したい。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 基とブチロシンやアミカシンのもつ AHB 基で修飾したパロマミン誘導体 NB54¹⁹⁾や、6-Methyl 基と AHB 基を導入した G418 誘導体 NB84²⁰⁾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培養細胞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。

もう一つは、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、アミノグリコシド系やマクロライド系抗生物質にリードスルー活性があることを報告したものである²¹⁾。特筆されるべきは、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剤タイロシンである(図 D)。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、数多く存在するタイロシン誘導体からさらなる治療薬候補を特定しつつある。

しかし、リードスルー活性をもつアミノグリコシドは経口・経皮投与が不可能なため、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中や静脈内投与しか方法がなく、対象患者が低年齢のため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経皮投与法を開発した。チオグリコレートを基剤とした市販の除毛剤を化学的皮膚透過促進処理として用い、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薬効を認め^{13,22)}。皮膚のもつ防御機能による薬物吸収を特殊な機器を必要とせず市販されている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は、簡便かつ非侵襲的投与方法として臨床的使用に期待できる。また、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と考えられる。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り、他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る。

5. リードスルー治療の今後の展望

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²³⁾。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²⁴⁾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²⁵⁾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ため、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ものを見出すことが求められている。DMD はまだ有効な治療法が確立されていない重篤な遺伝性筋疾患であるが、BMD 症例に関する知見から正常量の 20%に相当するジストロフィンの回復で病態進行の遅延と QOL の向上や延命が期待できる。そのため、リードスルー治療は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を回復させる、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、テー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ろう。

本稿において紹介した筆者らの研究成果は、「厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学推進事業」, 「厚生労働省精神・神経疾患研究委託費」, 「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」(MS)によって行われたものである。

●文 献

- 1) Palmer E, Willhelm JM, Sherman F : *Nature* **277** : 148-150, 1979
- 2) Burke JF, Mogg AE : *Nucleic Acids Res* **13** : 6265-6272, 1985
- 3) Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM : *Nat Med* **2** : 467-469, 1996
- 4) Barton ER, Cordiner L, Shoturma DI et al : *J Clin Invest* **104** : 375-381, 1999
- 5) Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L et al : *Ann Neurol* **67** : 771-780, 2010
- 6) Welch EM, Barton ER, Zhuo J et al : *Nature* **447** : 87-91, 2007
- 7) Hirawat S, Welch EM, Elfring GL et al : *J Clin Pharmacol* **47** : 430-444, 2007
- 8) McDonald CM, Henricson EK, Han JJ et al : *Muscle Nerve* **42** : 966-974, 2010
- 9) Wang B, Yang Z, Brisson BK et al : *J Appl Physiol* **109** : 901-905, 2010
- 10) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T et al : *Acta Myol* **20** : 154-158, 2001
- 11) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : *J Biochem* **134** : 751-758, 2003
- 12) Allamand V, Bidou L, Arakawa M et al : *J Gene Med* **10** : 217-224, 2008
- 13) Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T et al : *J Biochem* **147** : 463-470, 2010
- 14) 松田良一, 塩塚政孝, Alex MacKerell : PCT/JP2007/63436
- 15) Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S et al : *Chem Comm* **20** : 2379-2381, 2008
- 16) 林良雄, 木曾良明, 西口茂信・他 : 特願 2008-317710
- 17) Du L, Damoiseaux R, Nahas S et al : *J Exp Med* **206** : 2285-2297, 2009
- 18) 松田良一, 塩塚政孝, 我妻玲・他 : 特願 2010-021817
- 19) Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavivsky M et al : *J Med Chem* **52** : 2836-2845, 2009
- 20) Nudelman I, Glikin D, Smolkin B et al : *Bioorg Med Chem* **18** : 3735-3746, 2010
- 21) Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R : *Gut* **59** : 496-507, 2009
- 22) 塩塚政孝, 野々村禎昭, 松田良一 : 生体の科学 **61** : 636-640, 2010
- 23) Martin R, Mogg AE, Heywood LA et al : *Mol Gen Genet* **217** : 411-418, 1989
- 24) Howard MT, Shirts BH, Petros LM et al : *Ann Neurol* **48** : 164-169, 2000
- 25) Namy O, Hatin I, Rousset JP : *EMBO Rep* **2** : 787-789, 2001

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

Akihiro Taguchi,[†] Shigenobu Nishiguchi,[‡] Masataka Shiozuka,[§] Takao Nomoto,[†] Mayuko Ina,[†] Shouta Nojima,[†] Ryoichi Matsuda,[§] Yoshiaki Nonomura,^{§,||} Yoshiaki Kiso,[‡] Yuri Yamazaki,[†] Fumika Yakushiji,[†] and Yoshio Hayashi^{*,†}

[†]Department of Medicinal Chemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

[‡]Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan

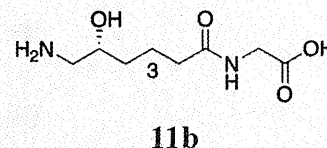
[§]Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Komaba, Tokyo 153-8902, Japan

^{||}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.¹ 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.² Presently, although the molecular basis for the disease is clear, there is no cure for DMD.³ 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.^{4–6}

Recently, a unique therapeutic strategy, so-called “read-through drugs”, was proposed to target genetic diseases caused by nonsense mutations.⁷ 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 ototoxicity⁸ and nephrotoxicity.⁹ Small molecules possessing readthrough-promoting activity have also been described for DMD treatment, including aminoglycosides,¹⁰ RTC compounds,¹¹ and an oxadiazole derivative, ataluren (PTC-124, phase IIB).¹²

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

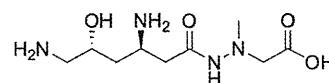


Figure 1. Structure of (+)-negamycin **1**.

the readthrough of PTCs in both a prokaryotic translational system¹⁵ and *mdx* mice.¹³ 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),¹⁶ 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 (%) ^a	Readthrough activity ^c	Antimicrobial activity ^d
Gentamicin		NA ^b	1.00 ± 0.24	NT ^e
1 (+)-negamycin		NA ^b	1.00 ± 0.25	32/128/2/32/8
6		32	1.01 ± 0.16	>50/>50/25/>50/50
11a		27	0.83 ± 0.13	-
11b		27	1.36 ± 0.14	-
11c		43	0.81 ± 0.11	-
11d		44	0.92 ± 0.09	NT ^e
11e		24	< 0.8	-
11f		13	< 0.8	NT ^e
14		24	< 0.8	-

^aSynthetic yields were calculated from intermediates 3 or 7 for analogues 6 or 11a–f and 14, respectively. ^bNA; not applicable, see ref 18. ^cRelative *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 ($n = 4$). ^dThe 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. ^eNT: not tested.

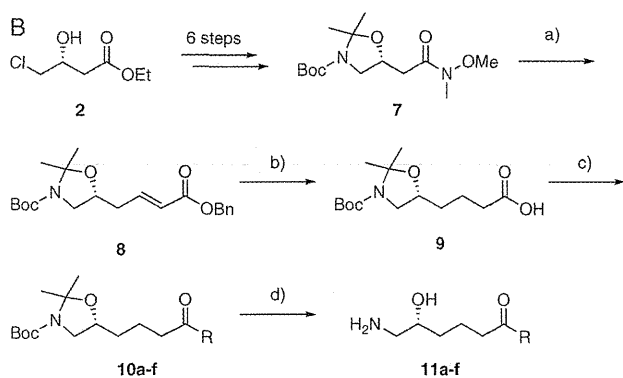
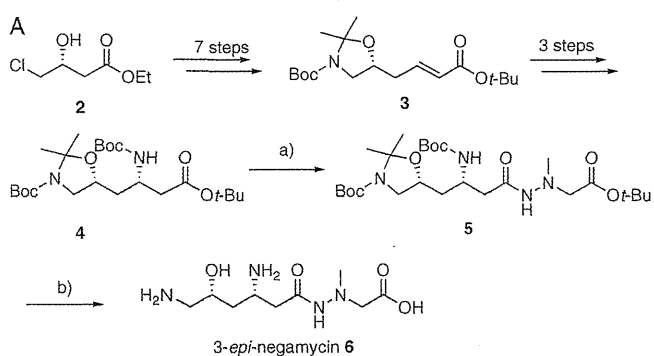
11b had been identified (Table 1), we used *mdx* mice to assess the effect on dystrophin expression, serum creatine kinase levels,¹⁷ which are a clinical indicator of DMD, and general toxicity. We found that 11b performed better than 1, with markedly reduced toxicity, thus making it a promising therapeutic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

(+)-Negamycin 1 was first isolated in 1970 from a microorganism closely related to *Streptomyces purpeofuscus*.¹⁴ In an attempt to synthesize chiral 1, we developed shortened, highly efficient synthetic routes.^{18,19} Using one of these routes as a starting point,¹⁹ 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.¹⁹ 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,²⁰ removal of the chiral auxiliary,²¹ 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) method²² 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, H_2O), literature data²³ $[\alpha]_{\text{D}}^{22.0} +8.5$ (c 0.70, H_2O)).

Next, analogues 11a–f were synthesized (Scheme 1B). Weinreb amide 7¹⁹ 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 H_2 atmosphere, the resultant 9 was coupled with various amino acid *tert*-butyl esters or a hydrazinoacid *tert*-butyl ester¹⁸ 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.

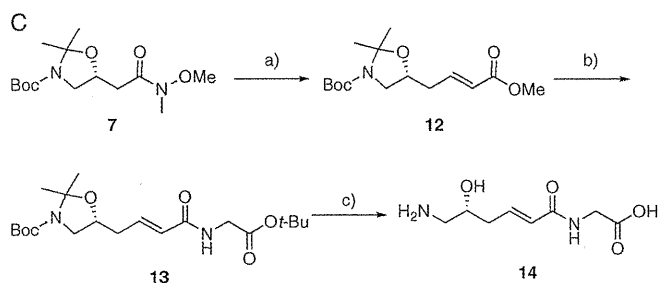
In the synthesis of analogue 14 (Scheme 1C), 7 was converted to the intermediate 12 by a procedure similar to that employed for 8 (Scheme 1B). Then, 12 was converted to the acid form by saponification and subsequently coupled with HCl-H-Gly-O t -Bu using an EDC-HOBt method to yield 13. Deprotection of 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.¹⁶ This system encodes β -galactosidase and luciferase genes connected with a PTC (see the Supporting Information). β -Galactosidase activity is present constitutively, but luciferase

Scheme 1. Synthesis of Analogue 6^a

10a: R = NHN(Me)CH₂CO₂*t*-Bu, 63%
 10b: R = NHCH₂CO₂*t*-Bu, 63%
 10c: R = NHCH₂CO₂Et, 95%
 10d: R = N(Me)CH₂CO₂*t*-Bu, 79%
 10e: R = NHCH₂CH₂CO₂*t*-Bu, 58%
 10f: R = N(CH₂CO₂*t*-Bu)₂, 63%

11a: R = NHN(Me)CH₂CO₂H, 63%
 11b: R = NHCH₂CO₂H, 62%
 11c: R = NHCH₂CO₂Et, 96%
 11d: R = N(Me)CH₂CO₂H, 81%
 11e: R = NHCH₂CH₂CO₂H, 59%
 11f: R = N(CH₂CO₂H)₂, 30%



^aReagents and conditions: (A) Synthesis of 6: (a) (i) KOH, MeOH, microwave (300 W), 100 °C, 10 min; (ii) PTSA·H₂N–N(Me)–CH₂CO₂*t*-Bu, HOBT·H₂O, Et₃N, EDC·HCl, CH₂Cl₂, 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) Ph₃P = CHCO₂Bn, THF, reflux, overnight, 69% (2 steps); (b) Pd/C, H₂, MeOH, rt, 1.5 h, quant; (c) amino acid *t*-Bu esters or hydrazinoacid *t*-Bu ester, HOBT·H₂O, Et₃N, 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) Ph₃P = CHCO₂Me, THF, reflux, overnight, 63% (2 steps); (b) (i) KOH, MeOH/H₂O (2:1), rt, 4 h; (ii) HCl·H-Gly-*Ot*-Bu, HOBT·H₂O, Et₃N, 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.²⁴ 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

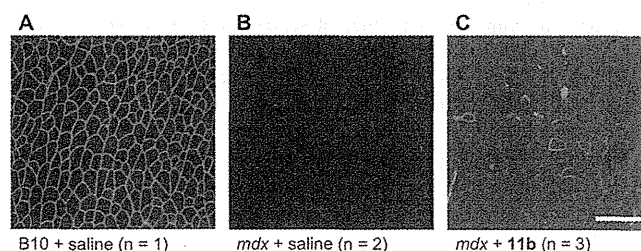


Figure 2. Dystrophin expression in skeletal muscles. Immunofluorescent staining of dystrophin in mouse muscle tissues was performed on 8 μm transverse cryosections.¹² (A) wild-type B10 mouse; (B) untreated *mdx* mouse; (C) 11b-treated *mdx* mouse. Bar = 200 μm.

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)¹⁷ in *mdx* mice treated subcutaneously with 11b at a dosage of 1 mg in PBS (0.2 mL)/day/20

g body-weight for 4 weeks. As controls, the CK level in a wild-type B10 mouse was very low, while levels in *mdx* mice were very high. A statistically significant reduction of serum CK levels in **11b**-treated *mdx* mice was observed in comparison to the case of the untreated controls (Figure 3A). This result

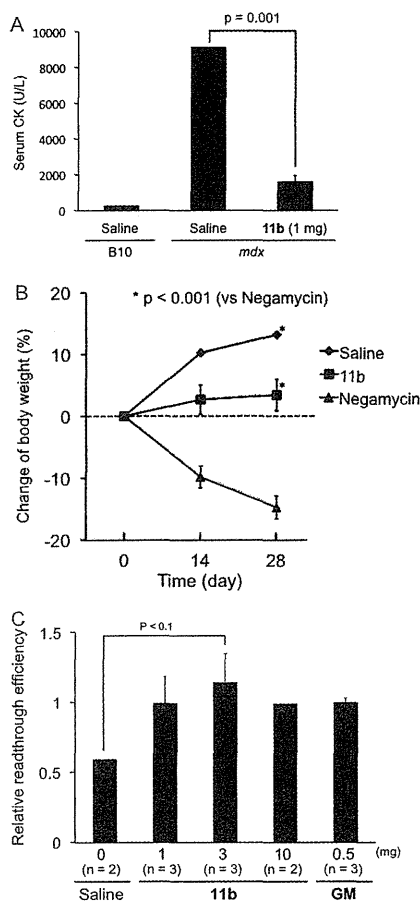


Figure 3. (A) Serum CK levels in *mdx* mice: wild-type B10 ($n = 1$); *mdx* ($n = 2$); **11b**-treated *mdx* ($n = 3$). (B) Effect of **11b** on the body-weight of *mdx* mice. The body-weight of 1- and **11b**-treated mice ($n = 4$, 1 mg/day/20 g body-weight) over the course of 4 weeks was measured in comparison to that of saline-treated mice ($n = 2$) as a control. (C) Effects of the administration of high doses of **11b** on the readthrough-promoting activity in READ mice. P: Probability-value. Error bar indicates SD.

suggested that **11b** could enhance the strength of muscle fibers by increasing functional protein expression.

Next, we examined the acute *in vivo* toxicity of **11b** as compared to **1** by measuring the body-weight change of *mdx* mice for 4 weeks. Improving the *in vivo* toxicity profile of **1** was an important goal for the development of readthrough drugs based on the negamycin structure. As shown in Figure 3B, over the course of 4 weeks, the body-weight of saline-treated mice gradually increased, while that of **1**-treated mice (1 mg in 0.2 mL saline/day/20 g body-weight) markedly decreased. Conversely, the body-weight of **11b**-treated mice (1 mg in 0.2 mL saline/day/20 g body-weight) slowly increased during this time frame, indicating that **11b** exhibited a lower toxicity profile than **1**. We postulate that this lower toxicity is due to the absence of the hydrazine structure in **11b**. This improved toxicity profile strongly supports the potential of **11b** for the long-term treatment of DMD.

Finally, inspired by the low toxicity observed with **11b**, we tested the effects of high doses of **11b** on PTC readthrough-promoting activity. Accordingly, **11b**, or gentamicin or saline, as positive and negative controls, respectively, was administered subcutaneously in READ mice for 7 days. As shown in Figure 3C, the readthrough-promoting activity of **11b** was not dose-dependent at the levels tested. However, at a 3 mg dose, **11b** was more effective than gentamicin. For unknown reasons, there appeared to be a reduction in readthrough-promoting activity at the highest dosage of **11b**, an observation that we will pursue in the near future.

In summary, we have synthesized a series of (+)-negamycin analogues and evaluated their readthrough-promoting activity for DMD. On the basis of SAR studies, we identified **11b** as the most potent candidate. This analogue was then taken forward through immunohistochemical and biochemical studies, which demonstrated that treatment with **11b** restored some dystrophin expression in *mdx* mice and decreased their serum CK levels, indicating that the drug was protecting muscular tissues from collapse. Most importantly, **11b** was shown to have a lower toxicity profile than **1**, which might be useful for the long-term treatment of DMD. Further SAR studies to develop more efficient derivatives are under investigation.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Synthetic procedures, characterization of new products, biological assay protocols, and NMR data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: yhayashi@toyaku.ac.jp. Telephone: +81-42-676-3275. Fax: +81-42-676-3275.

Funding Sources

This research was supported by an Intramural Research Grant (23-5) for Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP, a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 20390036) from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology), the Ichiro Kanehara Foundation, Sasakawa Grants for Science Follows (to M.S.) partly, and a Health and Labor Sciences Research Grant for Research, Comprehensive Research on Disability Health and Welfare (19A-020 and H22-016) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms. Miyuki Hiroshima and Ms. Yumi Sakurai, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, for technical assistance and Dr. Minoru Ozeki and Emeritus Professor Manabu Node, Kyoto Pharmaceutical University, for technical advice regarding the asymmetric Michael addition.

REFERENCES

- (1) Nowak, K. J.; Davies, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 2004, 5, 872–876.
- (2) Malik, V.; Rodino-Klapac, L. R.; Viollet, L.; Mendell, J. R. Aminoglycoside-induced mutation suppression as a therapeutic

strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2010**, *3*, 379–389.

(3) Monaco, A. P.; Neve, R. L.; Colletti-Feener, C.; Bertelson, C. J.; Kurnit, D. M.; Kunkel, L. M. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **1986**, *323*, 646–650.

(4) Granchelli, J. A.; Pollina, C.; Hudecki, M. S. Pre-clinical screening of drugs using the *mdx* mouse. *Neuromuscular Disord.* **2000**, *10*, 235–239.

(5) Griggs, R. C.; Moxley, R. T. III; Mendell, J. R.; Fenichel, G. M.; Brooke, M. H.; Pestronk, A.; Miller, J. P.; Cwik, V. A.; Pandya, S.; Robinson, J. Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone and azathioprine. *Neurology* **1993**, *43*, 520–527.

(6) Khurana, T. S.; Davies, K. E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 379–390.

(7) Barton-Davis, E. R.; Cordier, L.; Shoutourma, D. I.; Leland, S. E.; Sweeney, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 375–381.

(8) Hutchin, T.; Cortopassi, G. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2517–2520.

(9) Mingeot-Leclercq, M. P.; Tulkens, P. M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1003–1012.

(10) Nudleman, I.; Rebibo-Sabbah, A.; Cherniavsky, M.; Belakhov, V.; Hainrichson, M.; Chen, F.; Schacht, J.; Pilch, D. S.; Ben-Yosef, T.; Baasov, T. Development of novel aminoglycoside (NBS4) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2836–2845.

(11) Du, L.; Damoiseaux, R.; Nahas, S.; Gao, K.; Hu, H.; Pollard, J. M.; Goldstine, J.; Jung, M. E.; Henning, S. M.; Bertoni, C.; Gatti, R. A. Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2285–2297.

(12) Welch, E. M.; Barton, E. R.; Zhuo, J.; Tomizawa, Y.; Friesen, W. J.; Trifillis, P.; Paushkin, S.; Patel, M.; Trotta, C. R.; Hwang, S.; Wilde, R. G.; Karp, G.; Takasugi, J.; Chen, G.; Jones, S.; Ren, H.; Moon, Y.; Corson, D.; Turpoff, A. A.; Campbell, J. A.; Conn, M. M.; Khan, A.; Almstead, N. G.; Hedrick, J.; Mollin, A.; Risher, N.; Weetall, M.; Yeh, S.; Branstrom, A. A.; Colacino, J. M.; Babiak, J.; Ju, W. D.; Hirawat, S.; Northcutt, V. J.; Miller, L. L.; Spatrick, P.; He, F.; Kawana, M.; Feng, H.; Jacobson, A.; Peltz, S. W.; Sweeney, H. L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **2007**, *447*, 87–91.

(13) Arakawa, M.; Shiozuka, M.; Nakayama, Y.; Hara, T.; Hamada, M.; Kondo, S.; Ikeda, D.; Takahashi, Y.; Nonomura, Y.; Sheykholslami, K.; Kondo, K.; Kaga, K.; Kitamura, T.; Suzuki-Miyagoe, Y.; Takeda, S.; Matsuda, R. Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J. Biochem.* **2003**, *134*, 751–758.

(14) Hamada, M.; Takeuchi, T.; Kondo, S.; Ikeda, Y.; Naganawa, H.; Maeda, K.; Okami, Y.; Umezawa, H. A new antibiotic, negamycin. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 170–171.

(15) Uehara, Y.; Hori, M.; Umezawa, H. Negamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phage ϕ 2 RNA in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *374*, 82–95.

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

(17) Ebashi, S.; Toyokuma, Y.; Momoi, H.; Sugita, H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. *J. Biochem.* **1959**, *46*, 103–104.

(18) Hayashi, Y.; Regnier, T.; Nishiguchi, S.; Magne, O. S.; Hashimoto, D.; Hasegawa, J.; Katoh, T.; Kajimoto, T.; Shiozuka, M.; Matsuda, R.; Node, M.; Kiso, Y. Efficient total synthesis of (+)-negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem. Commun.* **2008**, 2379–2381.

(19) Nishiguchi, S.; Magne, O. S.; Taguchi, A.; Regnier, T.; Kajimoto, T.; Node, M.; Yamazaki, Y.; Yakushiji, F.; Kiso, Y.; Hayashi, Y. Total

synthesis of (+)-negamycin and its 5-*epi*-derivative. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 314–320.

(20) Node, M.; Hashimoto, D.; Katoh, T.; Ochi, S.; Ozeki, M.; Watanabe, T.; Kajimoto, T. Asymmetric Michael addition of a recyclable chiral amine: inversion of stereoselectivity caused by the difference of ethereal solvents. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2653–2656.

(21) Katoh, T.; Watanabe, T.; Nishitani, M.; Ozeki, M.; Kajimoto, T.; Node, M. Selective C-N bond oxidation: demethylation of *N*-methyl groups in *N*-arylmethyl-*N*-methyl- α -amino esters utilizing *N*-iodosuccinimide (NIS). *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 598–600.

(22) Konig, W.; Geiger, R. A. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.

(23) Davies, S. G.; Ichihara, O.; Robert, P. M.; Thomson, J. E. Asymmetric syntheses of (+)-negamycin, (+)-3-*epi*-negamycin and sperabillin C via lithium amide conjugate addition. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 216–227.

(24) The antimicrobial activity (MIC) was measured with the routine screening system at the Institute of Microbial Chemistry (IMC), Tokyo, Japan, using the agar dilution streak method (2-fold dilution) in Mueller Hinton agar (Difco) at 37 °C for 18 h against 34 microorganisms.

Effects of Dietary Phosphate on Ectopic Calcification and Muscle Function in mdx Mice

Eiji Wada, Namiko Kikkawa, Mizuko Yoshida,
Munehiro Date, Tetsuo Higashi and Ryoichi Matsuda
*The University of Tokyo,
Japan*

1. Introduction

Calcium deposits in extra-skeletal tissues are highly correlated with lifestyle diseases. The mechanisms and clinical effects of such deposition have been widely studied due to increase mortality rate. Vascular calcification is a major complication in a number of diseases, including chronic kidney disease (CKD) and diabetes (Giachelli, 2009). The number of regulation mechanisms affecting calcium precipitation in soft tissues remains underestimated, as many regulators are considered to be involved in this complex process (Hu et al., 2010; Kendrick et al., 2011). Elevated serum phosphate levels which leads hyperphosphatemia is one of the prevalent factors of vascular calcification in CKD (El-Abbadi et al., 2009). The kidneys play a central role in the regulation of phosphate homeostasis. In individuals with normal renal function, serum phosphate levels are strictly controlled through dietary intake, intestinal absorption, renal excretion, and bone metabolism. When the kidneys are either mechanically or functionally impaired, phosphate metabolism is imbalanced. Abnormalities of phosphate metabolism related to kidney malfunction may play a central role in the deposition of calcium and phosphate in extra-skeletal tissues. Ectopic calcification in skeletal muscle has been reported to occur in three Duchenne muscular dystrophy (DMD) animal models; mdx mice (Coulton et al., 1987; Kikkawa et al., 2009), dystrophic puppies (Nguyen et al., 2002), and hypertrophic muscular dystrophy cats (Gaschen et al., 1992). In this chapter, we review the mechanisms of ectopic calcification in mdx mice and report a new finding of effects of dietary phosphate intake on calcium deposits and muscle function in mdx mice.

2. Ectopic calcification in animal models of muscular dystrophy

The mdx mouse, dystrophic canine, and hypertrophic muscular dystrophy feline develop progressive muscle lesions and calcium deposits in skeletal muscle during muscle regeneration. The pathological features of dystrophic golden retriever puppies are particularly severe and are similar to those of DMD boys, who are characterized by progressive muscle necrosis that leads to early death. Nguyen et al. (2002) detected early ectopic calcification in muscles from 4-day-old and 2-month-old puppies. Thus calcium deposition in skeletal muscle appears to be an early event associated with muscle degeneration.

In mdx mice, the observed muscle pathology is relatively mild compared with DMD patients but calcifying lesions are commonly seen in the lower limbs and diaphragm of mice from

approximately five weeks of age. Recently, ectopic calcification (Fig. 1) has been reported to be a characteristic feature of muscular pathology (Korff et al., 2006; Verma et al., 2010). For example, Korff et al. (2006) found that myocardial calcification commonly occurs in mice following necrosis induced by mechanical stresses and proposed that calcification in the heart is dependent upon genetic background. Verma et al. (2010) suggested that the absence of ectopic calcification in the diaphragm serves as a marker of amelioration of mdx pathology. In addition, one of the prednisone-induced side effects in a canine model of DMD is skeletal muscle calcification (Liu et al., 2004). However, a palliative glucocorticoid therapy using prednisone is a feasible and effective treatment approach for DMD despite of the serious potential side effects (Wong et al., 2002; Khan, 1993). Studies in these animals have revealed that the percentages of calcified myofibers in necrotic lesions increase dose dependently. It is speculated that calcium deposits in skeletal muscle are occurred as results of abnormal calcium and phosphate homeostasis and delayed muscle degeneration and regeneration cycle.

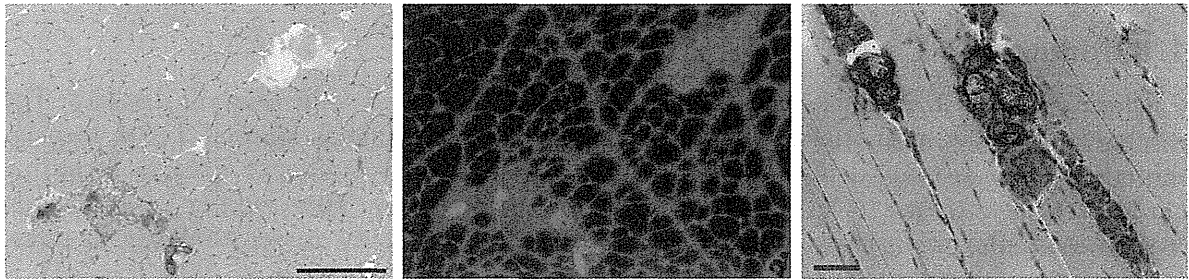


Fig. 1. Ectopic calcification in mdx mice (90 days old). Transverse (left and center) and longitudinal (right) sections, stained with H&E (left and right) and Evans blue (center). The bar represents 100 μm .

3. Identification of calcium deposits in mdx mice skeletal muscle

Our group is actively studying ectopic calcification in mdx mice skeletal muscle (Kikkawa et al., 2009). We performed experiments with 90-day-old mdx and control mice (C57BL/10: B10) fed a commercial standard chow (CE-2; Clea Japan, Tokyo, Japan) and water *ad libitum*. Following sacrificed of the mice, high-resolution X-ray micro-computed tomography (CT) imaging of the hind limbs of mdx and B10 mice using a SkyScan-1074 scanner (SkyScan, Kontich, Belgium) revealed that all mdx mice had muscle calcification in the hind limb, whereas no calcium precipitation was observed in the control mice (Fig. 2).

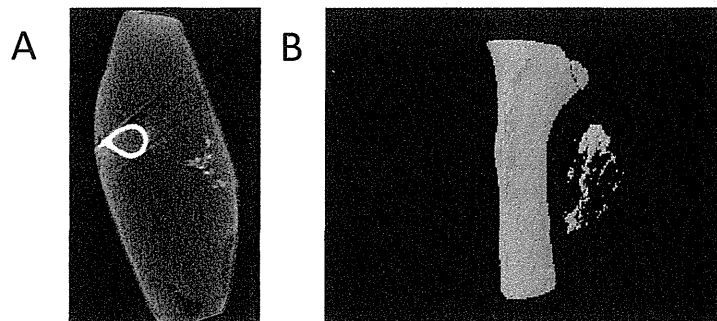


Fig. 2. Images of the hind limb of a two-month-old mdx mouse. X-ray-absorbing materials are shown as gray shadows and the femur can be seen in the center of the X-ray image. (A) CT image. (B) Reconstructed 3D image. (Kikkawa et al., 2009)

The main composition of calcium deposits in the skeletal muscle was identified using an back-scattered electron imaging and energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS) analysis by S-4500 SEM (Hitachi, Tokyo, Japan). In a cross-section of the muscle from an mdx mouse, spotty and bright crystals were observed. The EDS spectra obtained from the crystals indicated the presence of both calcium and phosphorus (Fig. 2A-B). To determine whether the composition of the deposits consisted of a calcium phosphate phase, muscle samples were analyzed using a JEM-2010 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with an EDS detector. The electron diffraction pattern from an obtained TEM image of the specimen nearly was an identical match with a simulated diffraction pattern of hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$; HA) (Fig. 3C). Based on these results, we concluded that the calcification of mdx skeletal muscles is due to the precipitation of hydroxyapatite.

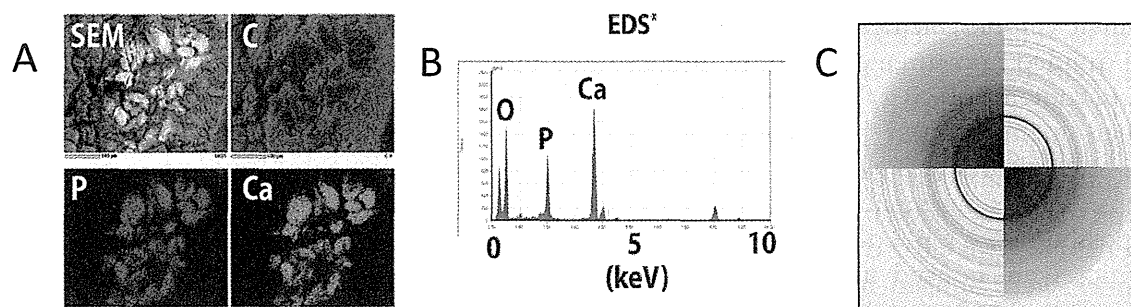


Fig. 3. SEM and TEM analyses of ectopic calcification in mdx mice skeletal muscle. (A) Electron probe microanalysis identified the particles as calcium phosphate. (B) Energy dispersive X-ray spectroscopy. (C) Identical match of X-ray diffraction of the particles and HA. (Kikkawa et al., 2009).

4. Serum biochemistry of mdx and B10 mice fed a commercial diet

As we determined that ectopic calcification is composed of HA, the main component of bones, we suspected that mdx mice have a metabolic disorder of calcium (Ca) and phosphate (Pi) homeostasis. To examine the levels of Ca and Pi in blood, serum samples were collected from two-month-old mdx and B10 mice fed a commercial diet (CE-2 containing 1.0 g/100 g Pi and 1.0 g/100 g Ca) and water *ad libitum*. The two minerals were measured using an automated clinical chemistry analyzer Fuji Dri-chem 4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Comparison of the serum mineral components of mdx and B10 mice revealed that mdx mice had significantly higher serum Pi levels (1.41 fold; $P < 0.05$) than the control mice, whereas no significant differences in serum Ca levels were detected. These results are supported by a previous study in mdx and B10 mice by Brazeau et al. (1992).

The concentrations of serum fibroblast growth factor-23 (FGF-23), which is an important regulator of phosphorus, were also measured using an FGF-23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan). The serum level of FGF-23 of mdx mice was significantly higher (1.5 fold; $P < 0.05$) than that of B10 mice.

Nearly all of the identified functions of FGF-23 are activated or operate through Klotho, a single transmembrane protein of the β -glycosidase family that is expressed in the distal kidney tubules and parathyroid gland (Kuro-o, 2010). Both FGF-23 and Klotho have emerged as responsible factors for mediating phosphate homeostasis. It has been reported

that soft tissue calcification and hyperphosphatemia are observed in mice lacking either FGF-23 (Razzaque et al., 2006) or *Klotho* (Kuro-o et al., 1997). *Klotho* mutant mice also exhibit multiple age-associated disorders, such as arteriosclerosis, osteoporosis, short-life span, and ectopic calcification. However, as these phenotypes are rescued by the restriction of dietary phosphorus alone in male *Klotho* mice (Morishita et al., 2010) we predicted that the amount of dietary Pi intake influences the precipitation of calcium in mdx mice, and that the restriction of dietary Pi may improve mdx muscle pathology and function.

5. Influence of phosphate diet

Based on our findings that mdx mice have calcium deposits composed of HA and exhibit higher serum phosphate levels, we speculated that dietary phosphate intake might modulate ectopic calcification in mdx mice. To test this speculation, mdx mice and B10 mice were divided into three diet groups (n=30) from weaning (20 days old) that were fed diets with Pi contents of 2.0 g/100 g (high-Pi diet), 1.0 g/100 g (mid-Pi diet), and 0.7 g/100 g (low-Pi diet) manufactured by Oriental Yeast Company (Tokyo, Japan). Other ingredients, including calcium (1.2 g/100 g) in the diets were present in the same amounts among the groups. The experimental diets were based on the CE-2 and mid-Pi diet was a same composition with CE-2 diet which was fed to pregnant and nursing mice of both genotypes. All mice were housed in cages with pulp bedding (Palmas- μ ; Material Research Center, Tokyo, Japan) in a controlled room with a 12-h light/dark cycle and a temperature of 25°C. The experimental chows and water were available *ad libitum*. Mice were either sacrificed with an overdose of diethylether at age 30, 60, or 90 days or used for measurements of muscular function at age 60 days. Twenty-four hours before euthanasia, mice were received an intraperitoneal injection of Evans blue dye (EBD, 100 mg/kg) which incorporates into regenerating myofibers with permeable membranes (Matsuda et al., 1995). All procedures were performed in accordance with the ethical guidelines of the University of Tokyo.

5.1 Changes in ectopic calcification in skeletal muscle

Changes in ectopic calcification in mdx mice skeletal muscle induced by dietary phosphate content were observed using a modified whole body double-staining method involving alizarin red S and alcian blue, which stain bones and cartilage respectively (Dingerkus et al., 1977; McLeod, 1980; Webb et al., 1994). Briefly, 90-day-old mice were sacrificed and fixed in 95% ethanol (EtOH) for 7 days after the skin and organs were removed. The EtOH was then replaced in acetone and the samples were further incubated for 3~4 days. After partial drying, samples were stained in a mixed solution of 0.3% alcian blue 8GX (Fluka, Germany) in 70% EtOH, 0.1% alizarin red S (WAKO, Osaka, Japan) in 95% EtOH, and 2.0% potassium hydrogen phthalate in 70% EtOH for 3 days. Each stained mouse was washed in distilled water and placed in 0.75% potassium hydroxide (KOH) in MilliQ water for 2 days to initiated maceration and clearing. Clearing was continued by adding increasing concentration of glycerol (20%, 50%, 70% and 100%) in 0.75% KOH to obtain a completely cleared specimen (Fig. 4A). Calcified regions were stained reddish violet, similar to appearance of stained bones.

Imaging of the stained and cleared samples showed that no bone-like red staining was present in the skeletal muscles of B10 mice fed any of the three phosphate diets (Fig. 4A-a). However, in mid-Pi fed mdx mice, striped and spotty red stained areas, particularly in the

back, gluteus, and lower limbs muscles, were detected (Fig. 4A-b), while excessive calcification was clearly observed in the samples from high-Pi fed mdx mice (Fig. 4A-c, Fig. 4B). The staining revealed severe calcification, particularly in the diaphragm, back, gluteus, and lower limbs muscles, where severely degenerated muscle fibers were visible macroscopically by EBD staining (Fig. 4C). In contrast, bone-like red staining was rarely seen in the whole bodies of the low-Pi fed mdx mice (Fig. 4A-d, Fig. 4B).

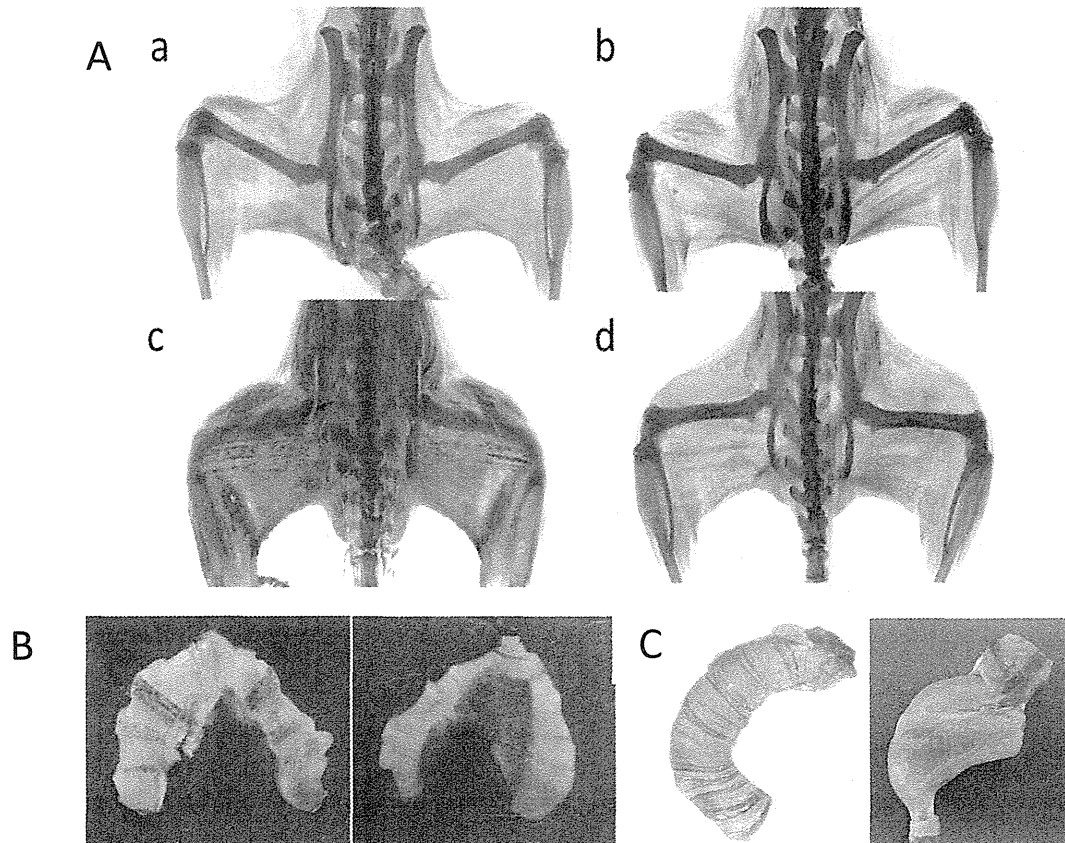


Fig. 4. Results of whole-body double staining of mdx and B10 mice, and Evans blue dye staining of mdx mice. (A) Images of the whole-body double staining of the lower body. (A-a) Lower body of a B10 mouse fed a high-Pi diet. The lower body of mdx mice (A-b) fed a mid-Pi diet, (A-c) high-Pi diet and (A-d) low-Pi diet. (B) Pictures of the whole body double staining of diaphragm. Diaphragm of an mdx mouse fed a high-Pi diet (left) and low-Pi diet (right). (C) Evans blue dye in the diaphragm (left) and lower limb (right) of an mdx mouse. Evans blue-positive lesions are seen in blue.

Quadriceps muscle samples from low-Pi, mid-Pi, and high-Pi fed mdx mice at 30, 60, and 90 days of age were sectioned at 8 μm thickness to determine the onset of calcifying lesions. Hematoxylin and eosin (H&E) and alizarin red S (1%) staining were used to observe pathology and detect calcification in the samples (Fig. 5). Histology showed early mineralization in degenerating myofibers in high-Pi fed mdx mice at 30 days of age (only fed a high-Pi diet only for 10 days), whereas no alizarin red-positive areas were present in either mid-Pi or low-Pi fed mdx mice of the same age. In addition, few calcium deposits were seen in mid-Pi fed mdx mice by the age of 60 days or in low-Pi fed mdx mice even by