

筋ジストロフィーに対する新しい低分子治療薬を発見

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) ^(※1) は進行性の筋萎縮を呈し、患者はほぼ 20 歳台に死亡する極めて重篤な遺伝病である。その原因はジストロフィン遺伝子 ^(※2) の異常により、骨格筋でジストロフィンが欠損するためである。現在 DMD に対する有効な治療法がなく、世界中の研究者がジストロフィンを発現させる治療法を確立するため様々な研究を行っている。

神戸大学ではこれまで DMD の治療法を確立する研究を精力的に実施してきた。そして、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導して、ジストロフィンを発現させる方法を世界に先駆けて開発してきた。この方法は、DMD 患者が有するジストロフィン mRNA のアウトオブフレームの遺伝子の異常を、エクソンのスキッピング誘導により mRNA のアミノ酸読み取り枠 ^(※3) を維持するインフレームに修正し、サイズの小さなジストロフィンの産生をはかるものである。このアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング誘導治療 ^(※4) は、世界で初めて神戸大学で実施された。現在では世界のトップ製薬会社がアンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床応用を図るまでになり、DMD に対する世界標準の治療法として確立されつつある。

一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドは分子量 ^(※5) が大きいという核酸医薬に特有の避けられない性質がある。そのため、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸修飾法・製造方法あるいは投与方法により一層の改善が今後も期待されている。こうしたことから、エクソンのスキッピング誘導能を有する低分子量化合物が発見できれば、高分子化合物の欠点が克服できる優れた治療薬となるものと大きく期待されていた。

今回、神戸大学名誉教授・神戸学院大学教授・先端医療センター客員研究員の松尾雅文と神戸大学大学院医学研究科特命教授の竹島泰弘らの研究グループは、京都大学の萩原正敏教授らとの共同研究で、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物を世界で初めて発見した。この成果は、DMD に対するエクソンスキッピング誘導治療を低分子化合物により可能とする、全く新しいしかも臨床応用性が極めて高い治療法の確立に大きく貢献するものである。

本研究成果は、Nature Communications 誌5月10日号 (米国東部標準時間) に「Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene」と題して掲載された。

【詳細】

Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は、幼児期に筋力低下で発症し、その後一貫して筋萎縮の進行する極めて重篤な遺伝性筋疾患である。現在その有効な治療法がなく、多くの患者は 20 歳代に心不全あるいは呼吸不全により死に至る。DMD はジストロフィン遺伝子の異常により骨格筋でジストロフィンが欠損するために発症する。そのため、ジストロフィンを発現させる DMD の治療の確立にむけて多くの研究がなされてきた。神戸大学の松尾雅文らはアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導することにより、mRNA のアミノ酸読み取り枠を回復させジストロフィンを発現させる治療法を提唱し、その臨床応用を世界で初めて実施した。すなわち、ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 を欠失した患者でエクソン 19 をスキップさせるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する治療を実施した。さらに、エクソン 45 のスキップを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床応用の準備をはかっている。一方、エクソン 51 のスキップを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床治験が GSK 社によって開始され、エクソンスキッピング誘導治療法は世界標準の DMD 治療法となりつつある。

しかし、アンチセンスオリゴヌクレオチドは核酸医薬で高分子量であるため、核酸修飾法・製造方法あるいは投与方法により一層の改善が期待されている。一日も早い治療を待つ患者にはもっと迅速に臨床応用される薬剤の開発が望まれ、低分子化合物によるエクソンスキップ誘導は世界から大きく期待されている。

そのため、本研究ではある患者が有するナンセンス変異に対し、エクソンスキッピングを誘導する低分子化合物のスクリーニングを行った。まず変異を持つジストロフィン遺伝子のエクソンおよび周辺イントロンをスプライシング解析用のベクターに挿入し、ハイブリッドミニ遺伝子プラスミドを構築した。次にこのプラスミドを HeLa 細胞へ遺伝子導入し、候補となる化合物の存在下で 24 時間培養を行い、得られた mRNA を RT-PCR により解析した。この解析の結果サイズの異なる mRNA を増幅産物が得られると、その化合物がエクソンスキッピングを誘導能を有する可能性がある。

このようなスクリーニングを行った結果、ジストロフィン遺伝子のエクソン 31 内の C.4303G>T というナンセンス変異を持つ時のみ、エクソン 31 のスキッピングを特異的にキナーゼ阻害作用を有する低分子化合物の TG003 が増幅することが明らかとなった。このエクソンスキッピング誘導作用は核タンパクの結合能の差によることも明らかにした。さらに、この変異を持つ患者から樹立した筋培養細胞に TG003 を導入したところ、エクソンスキッピングの亢進とジストロフィンタンパク質の発現促進を確認した。この結果は、DMD に対するエクソンスキッピング誘導治療に低分子化合物による道を開く世界で初めて

の成果であった。

【用語解説】

1. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD)

DMD は、男児 3500 人に 1 人が発症する最も頻度の高い伴性劣性遺伝性疾患である。DMD は幼児期に筋力低下を示し始め、年齢が長ずるに従い一貫して筋萎縮が進行し、20 歳台に心不全・呼吸不全で死亡する極めて重篤な疾患である。DMD の診断は、血液化学検査で著明なクレアチンキナーゼ値の上昇から、乳児期の何も筋力低下症状のない時期でも可能となっている。この発症前に治療ができれば、その効果は極めて大きいものと期待される。

2. ジストロフィン遺伝子

DMD の責任遺伝子であるジストロフィン遺伝子はヒト最大の遺伝子で、79 々のエクソンから成っている。エクソンは実際にアミノ酸の配列を指令する情報を書き込んだ配列のことで、エクソンはイントロンという介在配列を有している。遺伝子が働くとき、まず遺伝子が転写されて mRNA 前駆体が産生される。この mRNA 前駆体はスプライシングを受けてイントロンが切り取られ、エクソン配列のみからなる mRNA となる。mRNA は、翻訳されてタンパクを産生する。DMD 患者の遺伝子診断では、エクソン単位の欠失が最も多くみられる。

3. アミノ酸読み取り枠則

遺伝子から産生される mRNA はエクソンのみからなり、アミノ酸の配列情報をアミノ酸読み取り枠のなかに書き込んでいる。DMD ではジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失により、ジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠がずれ(アウトオブフレーム)、mRNA 上にストップコドンが出現して翻訳が途中で停止してしまい、ジストロフィン産生が出来ない。そのため骨格筋でジストロフィン欠損症となっている。一方、エクソンが欠失してもアミノ酸読み取り枠が維持されていれば(インフレーム)、一部のアミノ酸配列を欠いたジストロフィンが産生される。

アウトオブフレームでは DMD に、インフレームでは症状の軽いベッカー型筋ジストロフィーになることが 9 割以上の患者で当てはまることから、両者の違いはアミノ酸読み取り枠則により決定されている。

4. エクソンスキッピング誘導治療の今

ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失異常により発症した DMD では、ジストロフ

イン mRNA 上のアミノ酸読み取り枠がアウトオブフレームになっている。エクソンスキッピング誘導治療は、この異常に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて欠失に隣接するエクソンのスキッピングを誘導して、エクソンの配列を mRNA から取り除き、アミノ酸読み取り枠をインフレームにかえ、サイズの小さなジストロフィンを発現させようとするものである。この方法については、私達が世界で初めて提唱した(1)。これは、遺伝子から転写された mRNA 前駆体からイントロンを切り取られるスプライシングの段階で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソン配列を認識させない様にして、エクソンをイントロンとともに切り取られる様にするものである。そして、ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定に成功し、これを用いてエクソン 20 を欠失した DMD 患者に対して世界で始めて治療を実施した(2)。この治療によりエクソン 19 のスキッピングの誘導された新しいジストロフィン mRNA の産生とそれに応じたジストロフィンの発現が患者骨格筋で認められた。この分子治療は、ジストロフィンを発現させる DMD の新しい治療として大きく注目され、最も応用性の高い DMD 治療として世界標準になりつつある。このエクソンスキッピングの標的となるエクソンは、それぞれの患者が有しているエクソン欠失に隣接しているもので、遺伝子の異常に対応したオーダーメイドとなっている。そのため、神戸大学ではエクソン 45 のスキッピング誘導を、オランダあるいはイギリスではエクソン 51 のスキッピング誘導に焦点を当てたアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が行われている(3-5)。

5. 分子量

化合物の大きさを表す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの一種である AO85 の分子量は 6262.27 である。一方 TG003 の分子量は 249.3 で、TG003 の分子量はアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較すると 25 分の 1 になる。

【参考文献】

- 1) Takeshima, Y. *et al.* 1995. Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J Clin Invest* 95:515-520.
- 2) Takeshima, Y. *et al.* 2006. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 59:690-694.
- 3) van Deutekom, J., *et al.* 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 357: 2677-2686.

- 4) Kinali, M. *et al.*. 2009. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study, *Lancet Neurol* 8: 918-928.
- 5) Goemans NM, *et al.* Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. 2011. *N Engl J Med.* 364:1513-22.