

～神戸大学で実施する治療～

要約：

Duchenne 型筋ジストロフィー患者のジストロフィン mRNA を修正してそのアミノ酸読み取り枠を回復させてジストロフィンを産生させ、臨床症状の進行を抑えようとする世界で初めての治療を実施するものです。

今回の治療の特徴：

・患者が有する欠陥のある遺伝子から転写されたジストロフィン mRNA に手を加えて機能的なものとする方法です。

遺伝子治療といえば正常は遺伝子を様々な運び屋（遺伝学的にベクターと呼ばれる）を用いて外部からヒトの体に導入するものでした。したがって、今回の方法はより自然に近い遺伝子レベルでの治療法といえます。

・ mRNA の修正は、患者が欠失しているエクソンに隣接したエクソンを消失させることにより行ないます。

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）患者が有している mRNA 上のアミノ酸読み取り枠のずれを、欠失しているエクソンに隣接したエクソンをスキッピングさせることにより、その読み取り枠を元に戻すものです。このエクソンのスキッピングは、スプライシング促進配列の機能を疎外することにより誘導するものです。

・ アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた比較的簡単な方法です。

スプライシング促進配列に相補的な配列からなっている化学的に合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドを患者に投与します。オリゴヌクレオチドは 31 塩基から小さな DNA で大量生産することができ、必要な量だけ必要な時に入手できます。

スプライシング促進配列：

mRNA 前駆体からラインを切り取るスプライシング反応において、スプライシングの部位はエクソン・イントロンの境界部の塩基配列によって規定されています。さらに、近年、エクソン内に存在するプリン塩基に富んだ配列がスプライシングの部位決定に重要な機能を営んでいることが明らかとなり、スプライシング促進配列と呼ばれるようになりました。このスプライシング促進配列は、スプライシング部位決定に重要で、この機能をアンチセンスオリゴヌクレオチドによりブロックすると、そのエクソンのスキッピングが生じ、mRNA からそのエクソンの配列が消失します。

ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 内にはスプライシング促進配列が存在し、エクソン 18、19、20 のスプライシング反応が正確に進む上において重要な機能を発揮しています。このスプライシング促進配列の機能がアンチセンスオリゴヌクレオチドによりブロックされると、スプライシング反応の過程においてエクソン 19 が認識されなくなり、mRNA においてエクソン 19 のスキッピングが生じることとなります。

今回の治療は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの機能を有効に利用しようとするものです。

～神戸大学で実施する治療～

これまでの経過：

私たちは、長期間に亘り様々な研究成果を積み上げてきました。ここで、これまでの成果を紹介し、本治療法が有効なことをお示しします。こうした研究は世界でも神戸大学でしか行なわれておらず、本治療法はまさに世界最先端の治療といえます。

1. ジストロフィン神戸の発見

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の1例でジストロフィン遺伝子のエクソン 19 内の 52 塩基が欠失していることを見出しました。驚くべきことにこの患者では、ジストロフィン mRNA ではエクソン 19 の配列がすべて消失するエクソンのスキッピングが生じていることを見出しました。そして、遺伝子の異常から mRNA の異常が 2 次的に生じた極めて稀な現象で、ジストロフィン神戸と名付けて報告しました。（Matsuo M et al. 1990. Biochem Biophys Res. Com. 170:24; Matsuo M et al. 1991. J. Clin. Invest. 87: 2127）

2. スプライシング促進配列の解明

ジストロフィン神戸で見出されたエクソンのスキッピングの原因を明らかにするために、試験管の中でスプライシング反応を行ないました。これには、4 種類の mRNA 前駆体を作成し、これと HeLa 細胞の核抽出液を混じしました。（Takeshima Y et al. 1995. J. Clin. Invest. 95: 515）

正常のエクソン 19 の配列を有した mRNA 前駆体はスプライシングを受け、エクソンのみの配列からなる mRNA となります（1）。しかし、ジストロフィン神戸でみられた欠失を有するエクソンではスプライシング反応は進みませんでした（2）。ジストロフィン神戸の欠失領域を他の配列に置換した場合、プリン塩基に富む配列では比較的スプライシング反応が進みますが、このプリン塩基に富む配列をピリミジン塩基特に T 塩基によって断裂しますと反応が抑制されることが明らかとなりました。（3）。最も特徴的なことは、正常のエクソン 19 の配列を有していても、ジストロフィン神戸で欠失した領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加すると、スプライシング反応はみられなくなりました（4）。

このことからジストロフィン神戸のエクソン 19 内において欠失していた領域はスプライシング促進配列として機能していることが明らかになりました。さらに、その配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによってスプライシングを抑制することが可能であることが判りました。

3. リンパ芽球における検討

スプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞の核でも有効にスプライシング反応を抑えることができることをヒトリンパ芽球にこれを導入しました。また、エクソン 20 を欠失した DMD 患者にも導入しました。（Pramono ZAD et al. 1996. Biochem. Biophys. Res. Commun. 226: 445）

エクソン 19 内のスプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを正常培養細胞に導入することにより、エクソン 19 のスキッピングを誘導することが可能でありました。さらに、エクソン 20 の欠失している DMD の症例の培養細胞に対しても同様にエクソン 19 のスキッピングを誘導することが可能でした。

～神戸大学で実施する治療～

スプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することによって、培養細胞においてスプライシングの過程においてエクソンスキッピングを誘導することが可能でした。

4. マウスの生体における検討

筋ジストロフィーモデルマウスにエクソン 19 のスプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを腹腔内に投与すると、オリゴヌクレオチドは筋細胞の核内に到達し、さらにエクソン 19 のスキッピングが誘導されました。

5. DMD 患者でジストロフィンの発現

エクソン 20 を欠失した DMD 患者の筋細胞を得、これにアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しました。その結果、エクソン 19 を欠失しアミノ酸読み取り枠を回復したジストロフィン mRNA を得るとともに、筋細胞がジストロフィンで染色されるようになりました。(Takeshima et al Brain Dev 23 :788-798,2001)

6. DMD の軽症化の自然発生例

ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異があつて、本来 Duchenne 型筋ジストロフィーとなるべき患者が Becker 型筋ジストロフィーとして発見されました (Shiga N et al. 1997. J. Clin. Invest. 100: 2204)。その臨床症状の軽症化はナンセンス変異を有しているエクソンがスプライシング時にスキッピングされ、mRNA から消失していました。

投与方法：

化学的に合成したオリゴヌクレオチドを滅菌生理的食塩水で溶解し、10mg/ml 溶液を作成します。そして、滅菌操作をした後アンチセンスオリゴヌクレオチドを体重 1 kg 当たり 2mg/Kg の量で、2 時間かけて患者の静脈内に点滴投与します。

投与は、1 週間に 1 回行い、計 4 回行います。

合成したオリゴヌクレオチドを患者さんに投与した例は今までに、Duchenne 型筋ジストロフィー以外の他の疾患で報告されています。その結果をみますと、それ程重篤な副作用はみられておらず、合成した DNA は比較的安全な化学物質といえます。当然のことですが、今回の治療に当っては患者さんの状態の観察を頻繁に行い、様々な検査を行なって副作用の早期発見に努める予定です。