

アメリカ・筋ジストロフィー親の会
(American Parent Project Muscular Dystrophy ; PPMD) 年会議報告
(2007年7月12-14日、於；アメリカ・フィラデルフィア)

著 Guenter Scheuerbrandt

訳 神戸大学小児科

栗野宏之・八木麻里子・松尾雅文

<Duchenne 型筋ジストロフィーを撲滅するための運動>

フィラデルフィアで開催されたアメリカ PPMD の 2007 年会議には 400 人以上の参加者があった。3 日間で治療研究、医学・社会管理、法律上の問題に関する約 60 の発表があった。私、Gunter Scheuerbrandt はドイツの生化学者であるが、PPMD の会長である Patricia Furlong 氏に Duchenne 型筋ジストロフィー (以下 DMD) 患者やその家族のために、いま研究者や専門家がどのような有効な治療を確立させているかを報告するため、この会議のレポートをかくように依頼された。

これはPPMDについての書かれた3番目の報告で、以前に2006年7月にシンシナティで、また、2006年10月にロンドンで行われたPPUKについて報告してきた。これらは私のホームページ (www.duchenne-research.com) で見ることができ、ダウンロードも可能である。

私は医学や社会学の専門家ではないため、このレポートは科学的な報告の要約のみを掲載している。この報告書は科学的出版物ではなく、研究所等で何が起きているのかを皆さんに報告するために私が書いたものである。

私はこの要約の中で、発表者に肩書をつけていないがそのほとんどは教授であり、同時に医学博士号、博士号、またはその両方をもつ。またほとんどの発表者は研究所のトップである。発表されたプロジェクトのチームとして働く多くの研究協力者や研究者や学生がいるが、ここですべての方の名前まで触れることはできない。このレポートに書かれた発表をしたすべての科学者は私の原稿を検閲することができ、ほとんどの方が訂正をおこなっていることを述べておく。

<はじめに>

この会議の初めに、フィラデルフィアこども病院の Richard Finkel 氏と、ロンドンの帝国大学の Dominic Wells 氏、パースの西オーストラリア大学の Steve Wilton 氏は DMD の包括的な治療戦略について詳細に検討をおこなった。シンシナティでおこなった去年の会議の報告も同じような書き出しだったので、今回は初めのほうは手短かにのべ、新たな情報

を掲載することとする。また、どのようにしてタンパクが作られるか、なぜジストロフィンが重要なのか、どの研究が精力的に行われているか、エクソンスキッピングがどのようにしておこるのかについて繰り返しのべる。

[どのようにして遺伝子からタンパクが作られるか?]

遺伝子とは、遺伝子の素材であるデオキシリボ核酸 (DNA) があつまった機能的な単位である。その構造は二重らせん構造といわれ、ねじれた梯子のように見える。このはしごの横木は4つの小分子があり、それらは塩基とよばれアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトリン(C)のうちの2つのペアからなる。空間的な制限から、横木は2つの塩基の組み合わせしかもたない。その組み合わせとは、A・T と G・C である。よって、仮に-GGCTTAATCGT- という塩基配列があるとすると、反対側の配列は-CCGAATTAGCA-となっているはずであり、おのおのの配列はお互いに補完的なものとなっている。



この遺伝文字ともいえる塩基配列は生物の発達、維持のための遺伝情報であり、ある世代から次の世代へ受けつがれる。遺伝子の大部分はタンパク合成のための指令をだす。細胞の核の中では、遺伝子の指令が伝わると新たな遺伝物質—すなわちプレメッセンジャーRNA (転写産物ともよばれる) へ転写される。大部分の遺伝子はタンパクの情報をコードする領域—エクソンと、より長い領域であるイントロンからなる。このイントロンはかつては‘不要物な遺伝子’と考えられていたが、いまでは遺伝子の活動をコントロールする重要な情報を持つことがわかっている。転写の後には、プレメッセンジャーRNA からイントロンが取り除かれ、エクソンがスプライシングをうけ、メッセンジャーRNA (以下 mRNA) となる。mRNA は核外の細胞質に存在するタンパクを合成する場所であるリボソームに移動する。リボ核酸 (RNA) では、DNA の塩基である T のかわりに U (ウラシル) が用いられる。スプライス部位とはエクソン内にある特定の配列で、エクソンとイントロンの境目でプレ mRNA からイントロンを正しく取り除くために重要な配列である。スプライシングは、多くのタンパクと小さな RNA の複合体であるスプライソームにより行われる。mRNA では3つの連続した塩基 (コドン、トリプレット、遺伝文字と呼ばれる) があり、3つの例外を除き、塩基の組み合わせにより 20 の異なったアミノ酸をコードしている。コドンとコドンの間には余分なスペースは存在しない。リボソームで、mRNA のコドンが読み込まれそれぞれタンパクへと翻訳される。タンパクは多くの、時には何千ものアミノ酸から構成される。上述の3つの例外だが、UAA、UAG、UGA というコドンであり、ストップコドンとよばれ、タンパク合成停止の合図である。

[ジストロフィン遺伝子とタンパク]

Duchenne 型 (DMD)、Becker 型筋ジストロフィー (以下 BMD) はジストロフィン遺伝子の変異、または遺伝子がダメージを受け、正常とは異なるジストロフィンタンパクが作られることにより引き起こされる。この遺伝子配列は 2,220,223 塩基をもち、これまでに知られておりヒトの遺伝子では最も大きいものである。しかし、ジストロフィン遺伝子の 0.5% に当たる、79 のエクソン内にある 11508 塩基のみが、筋肉内の正常ジストロフィンタンパクの 3865 個のアミノ酸をコードしている。この遺伝子は 7、または 8 つの異なったプロモーターをもつ。プロモーターは、タンパクを合成の最初のステップである転写を開始するために遺伝子を活性化させ、タンパク合成を制御する配列である。多くのプロモーターの存在により、選択的スプライシングがおこり、さまざまな形のジストロフィンが存在する。さまざまな形のジストロフィンは正常のジストロフィンよりは短い配列であり、異なった臓器に存在し、そのうちの 1 つは脳に存在する。脳のジストロフィンの長さは正常の 32% にしかすぎず、変異により影響をうける。このため、DMD 患児で精神発達上の問題がおこる場合がある。

[ジストロフィン遺伝子とタンパクのサイズ]

ジストロフィン遺伝子の 2 重らせん構造は全長 0.75mm である。現在までに分かっているヒトに存在する 20488 の遺伝子とともにこれらは、0.01mm しかない細胞核のなかに存在するため、これらは非常に小さく凝縮されている。ジストロフィンタンパクの全長はジストロフィン遺伝子の長さに比べて非常に短く、0.000125mm しかない。それらをまっすぐにして並べると 80000 個で 1cm になる。また、筋肉 1g のなかには 1140 億ものジストロフィン分子がある。このため研究者たちの苦勞はつきない。なぜなら、一度ダメージを受け、筋肉の機能が低下したら、この病気の進行を止め、筋肉の機能を回復するためには、30% 以上のジストロフィンが必要となる。新しいジストロフィンは通常のものときっちり同じ大きさのものである必要はなく、短くてもよいが、適切に機能する必要がある。それには、1g あたり何十億ものジストロフィンが必要となり、子供の体重分となると途方もない量が必要となる。

[ジストロフィンの働き]

ジストロフィンは筋細胞の構造を支持するのに必要である。ジストロフィンは筋細胞膜の内側に存在し、その端は C 末端と呼ばれ膜タンパク群—ジストロフィン・グリコプロテイン複合体に属している。もう一方の端は N 末端と呼ばれ、筋細胞の中の収縮性をもつ構造と結合している。ジストロフィンの中心部のタンパクはロッドドメインと呼ばれ、ねじれたアミノ酸鎖からなる。筋肉の収縮が起こった場合、ジストロフィンタンパクはその長さを変え、その折りたたまれた構造はばねのような働きで衝撃緩和作用をもつ。このように、ジストロフィンはアクチン・ミオシン収縮機構が生じるエネルギーを筋細胞膜から筋細胞外の結合組織や腱に適切なバランスで伝える働きをもつ。

ジストロフィンには他にも機能がある。ジストロフィンとは複雑なジストロフィン・グリコタンパク複合体を構成し、他の多くのタンパクと共に存在する。ジストロフィンは細胞内のカルシウム濃度の複雑な調整や、筋肉の成長を制御している。しかし、細胞内の多くの構成成分で行われている複雑な相互作用については多くはまだ解明されていない。

DMD 患児はごく少量のジストロフィンしかもたないか、あるいはまったくジストロフィンを筋肉に持っていない。ジストロフィンがその機能を失うと、筋肉の収縮がおこった時に筋細胞膜が破壊され、多量のカルシウムが筋繊維に流入する。過剰のカルシウムはカルパインやほかのタンパク分解酵素を活性化させ、筋細胞を破壊しアポトーシスという細胞死を引き起こす。この結果、炎症のような一連の反応を引き起こし線維芽細胞を活性化させ、傷跡におこるような線維化を引き起こし筋肉の再生を阻害し、年長の DMD 患者で見られる典型的な症状をきたすようになる。

症状が軽症の BMD では、ジストロフィンの長さは正常より短い、その量に関しては正常より少ないか、または同じである。本来の機能を果たすこともあるが、有効に機能しないこともある。

ジストロフィン機能の喪失により骨格筋が障害されるだけでなく、平滑筋や心筋も障害される。心筋の障害は心筋症を引き起こす。また平滑筋の障害が障害されると、呼吸機能やさまざまな問題を引き起こす血管壁の障害をきたす。また消化管の運動が低下することにより、消化器も障害される。このようにたった 1 つの遺伝子の異常で、全身に問題が起こりうる。

[ジストロフィン遺伝子の変異]

ジストロフィンの機能の障害をきたす変異には通常 3 種類が知られている。‘欠失’は 1 つかそれ以上のエクソンが失われることである。‘重複’はエクソンが 2 重になって繰り返されることである。点変異は 1 つの塩基対がほかの塩基と置き換わったり、塩基がなくなったり、塩基が余分に加わったりすることである。その他の変異として、逆位や正常のスプライシングを阻害するイントロンの変異がある。

mRNA の 3 つの塩基からなるコドンはリボソームによりつぎつぎとタンパクに翻訳される。この正常のコドン単位の読み取り枠は、コドン単位の欠失や挿入といった変異がない限り正常に読み取られている。この読み取り枠が保たれている場合、‘インフレーム’の変異となり、ジストロフィンは正常より長かったり短かったりするが合成されうる。インフレームの変異は、ジストロフィンの重要ではない部分に異常が生じておらず、ジストロフィンの機能を一部保つことができ、軽症の BMD を発症する。

しかし、1 ないし 2 対の変異により読み取り枠にずれが生じた場合、アウトオブフレームとなる。読み取り枠がずれた場合、その場所から間違ったアミノ酸・タンパク質の合成がおこり、ついには本来存在しない停止コドンが生じる。不完全なジストロフィンは正常の機能を有さず、DMD を発症する。

[DMD の臨床経過]

最初の兆候は2～3歳にかけて、歩行困難や、階段が登りにくいといった症状で出現する。早期に診断がされない場合でも、今日では一般的に3～5歳の間に診断される。足や膝、股関節の拘縮が悪化するにつれ、10～12歳頃に歩行が不可能となる。脊椎の変形―側彎が進むにつれ、運動の制限がおこり介助を必要とするようになる。呼吸機能や心機能が障害をうけると、成人期の早期に心不全、循環不全で死亡する。副腎ステロイドや運動療法、拘縮や脊椎の変形に対する整形外科手術、呼吸リハビリにより寿命を延ばすことが期待できる。

医療ケアや社会ケアは今回の、または以前の **Parent-Project meeting** で討論されてきた。将来、専門家のチームがこのレポートのように要約をまとめて報告してほしいと願っている。DMD 患児自身が将来おこりうる問題について認識し、それらを解決し、生命予後を改善し、人生を意味のあるものにする必要がある。

<DMD に対する様々な治療戦略>

DMD の治療に関して、2つの遺伝子治療と多くの薬理的な手法が試されている。最初の遺伝子治療―エクソンスキッピングは傷害をうけた遺伝子に直接作用するものではない。遺伝子からタンパク合成の過程において、遺伝子の情報を操作するものである。この手法を用いると、プレ mRNA のエクソンが mRNA にスプライシングをうける過程で、読み取り枠がずれたアウトオブフレームであった異常が、読み取り枠を保ったインフレームに変換される。この効果は遺伝子導入と同じで、DMD を軽症の BMD と変える。まったく新しい治療 (様々な患者のグループに対して特別に開発されてきた遺伝子治療) もある。これは遺伝子の情報を書き換えることができ、アンチセンスオリゴと呼ばれる。

2つ目の遺伝子学治療は、筋細胞核内のジストロフィンタンパクを生産しうる新しいジストロフィン遺伝子を導入させる試みである。マウスでの実験では、修正を加えた病原性のないウイルス (アデノ関連ウイルス、以下 AAV) ―トランスポーター、またはベクターと呼ばれるもの―によって、ジストロフィン遺伝子の特に重要な機能を持つ部分が cDNA として筋細胞内に導入されたという結果を出している。しかし、AAV ベクターを用いてジストロフィン遺伝子の 79 のエクソンを完全に導入する事は出来ておらず、正常ジストロフィンの約 1/3 の cDNA を導入できるのみである。この方法では正常のジストロフィンタンパクの約 1/3 のサイズのものしか作れない。この通常より短いジストロフィンにより軽症の BMD となった場合、この治療は、DMD を完全に治癒するものではなく、BMD のように進行を遅くさせる効果が期待できる。新しく導入された遺伝子産物は核の染色体内に入らないため、変異ジストロフィン遺伝子は変化を受けず、X 染色体の短腕に存在し続ける。上述の2つの遺伝子治療はこれまでにない全く新しい治療で、その研究は非常に注意深く進めなくてはならない。この新しい治療をできるだけ早く病院で受けられるようにしなけ

ればならない反面、ヒトに重篤な副作用をもたらすような、今後の遺伝子治療全体に影響を及ぼすような失敗をおかさない必要がある。それゆえ、この研究は非常に厳密に行う必要がある、また多くの時間を要するのである。

3つ目の治療戦略は、ジストロフィンのない筋細胞が、タンパク分解酵素や膜の破壊、線維化、炎症により筋肉が破壊されることを阻害する治療である。DMD に対して効果が期待される薬は数多くあるが、一部はすでに、ほかの疾患にたいする治療薬として世にでてい

<なぜ臨床試験が必要なのか>

[新薬はどのようにして患者に投与されるようになるのか?]

タイン川に面したニューキャッスル大学の Kate Bushby 氏は、‘臨床試験の導入’というタイトルの発表の中で、新しい発想によりうまれた治療が、実際に DMD 患者に投与する薬になるにはどのようなステップを踏めばよいかについて発表した。このレポートでは Bushby 氏が 2006 年にロンドンで行われた PPUK で発表した内容について繰り返し述べるとともに、今回の会議で発表された新しい知見についても触れる。

臨床試験というのは、治療を発展させていく上で最も重要な過程であり、それには多くの年月が必要であるが DMD は進行性の疾患であるため患児には多くの時間が残されていない。しかし、これだけは理解してほしい。研究者たちは患者の置かれている状況を痛感している。研究している薬の安全性、有効性についての監査をうけつつ、この研究にたずさわる者達と共にできるだけ早く研究を進めているわけである。しかし、臨床試験にいたるまでのごく初期の段階から、研究を開始できるようにするために、一步一步慎重に仕事を進めなくてはならない。だから、多くの実験には長い年月が必要なのである。1例をあげると、遺伝疾患に対する有効な治療としてエクソンスキッピングが 1993 年にその理論が発見されたが、実際に DMD 患児に投与するまでに実に 13 年もの年月がかかっている。治療を開発している研究者はその理論が正しいかどうかを DMD のモデル動物をつかって実験し、データを集めることから仕事が始まる。DMD の場合は、試験管の中の筋細胞を使った実験、筋ジストロフィーの mdx マウスを使った実験、GRMD イヌを使った実験がおこなわれる。その治療が有効かどうかを確かめるために、生化学的な、または生物学的な手法で結果を評価する。これにはクレアチンキナーゼ (CK) 値や顕微鏡でみた筋肉の構造、ジストロフィンの存在の有無、mRNA などを用いて評価を行う。実験動物を用いて、筋肉の機能の改善を評価する実験を行い、また、その治療薬が、本当に効果があるのか、毒性を持っていないかなどについてもチェックを行う。

しかし、臨床試験前には良い結果であったとしても、その新薬はヒトに投与した場合も同様の素晴らしい結果をもたらすとは限らない。Mdx マウスはその筋肉の中にジストロフィンを全く有していないが、これらの小動物にとってそのことは大きな障害ではなく、ヒ

トに比べて症状が軽い場合が多い。より大きな動物であるゴールデンレトリバーの筋ジストロフィーモデル (GRMD) では、症状がよりヒトに近い。筋ジストロフィー犬では障害の程度は重く、立ち上がることが困難である。しかし、これらの動物をつかった実験結果のすべてはヒトに投与した場合、必ずしもヒトで同じ結果が得られるとは限らない。‘こどもは大きなマウスでもなく、また 2 本足のイヌでもないのである！’。このような理由から DMD 患児での臨床試験は必ず必要なのである。

通常、臨床試験は 3 つの段階を経なければならない。臨床試験 phase I と phase II では、おもに安全性とおおまかな効果についてのみ調べるように設定されているため、参加者が治療の恩恵を受けられるとは限らないことを強調しておく。おおまかに述べると、臨床試験 phase I では副作用などについて、phase II では投与量の確認や安全性の確認や、ある程度の治療効果の判定について、phase III では引き続き、安全性の確認を続けるとともに、正確に臨床効果があるかを判定し、治療の有用性を証明し、最終的にはその新しい治療が本当に機能を改善し、生活の質を向上できるかについて判定できるように設計されている。

DMD に対する治療の臨床試験には様々な数多くの問題がある。(1)治療薬の開発には、製薬会社の協力が必要であるが、この疾患の患者は多くないため、製薬会社のあいだで関心の高いとは限らないという問題である。製薬会社にとって利益は必要なものであり、十分な利益を生むかどうかということは大きな関心の一つである。よってこのレポートで後述する稀少疾患の規定 (orphan disease regulations) は重要である。(2)DMD は非常にめずらしい疾患であるため、ジストロフィン遺伝子の同じ異常をもった患者が非常に少なく、さらにほとんどの患者は正確な遺伝子診断をうけていないという問題がある。よって両親には可能な限り、自分の子供の正確な遺伝子診断を受けさせていただきたい。(3)可能な限り世界中から多くの患者の遺伝子のデータをあつめる国立登記所、または国際登記所が現在設立されてようとしている。この計画の詳細はwww.treat-nmd.euにて閲覧できる。家族にとって、これらの登録データを見て、自分の子供の登録されたデータを見ることで励みとなるだろう。

DMD は複雑な疾患であり、生活をかえるような機能を回復するには、筋肉内にあるジストロフィンをつくる機構に作用するものでないとならない。そのような働きをもつ遺伝子治療は今までにない新しい薬であり、長期間体の中で作用し、全身の筋肉のみならず肺や心臓にまで作用しなければならぬ。それゆえ、薬の安全性や効果が非常に厳密に要求される。

いろいろな研究者が新しい治療に対し、厳重な管理や規定を設けているが、それらは患者を有害事象から守るためのものである。またこれらの治療は潜在的に危険をはらんでいるため、やむを得ない結果が出た場合、医師たちに責任を負わせたいためのものである。臨床試験は求められたことにたいし、十分に足りるものであるように計画されねばならない。規定はまた、最終的な承認を得るための矛盾のない正確なデータを出すためのものである。膨大な書類や、遅々として進まない作業や臨床試験にかかる膨大な費用はすべて

DMD 患児とその家族のために必要なことなのである。

臨床試験ではよい結果より悪い結果のほうが多い。だからといって、現在可能な治療を受けることをやめたり拒否したりしてはいけない。厳密に計画され施行される臨床試験のみが、適切な期間内に有効な治療を確立することができる。またどんなに費用がかかっても失敗は避けなければならない。一度失敗がおこると、すべての研究が最初からやり直しとなり、無駄に時間のみがかかり、患児たちの重要な時間を無駄にすることとなる。

[臨床試験の結果は正確で、有意義なものでなくてはならない]

Richard Finkel 氏は 2 回目の発表で DMD 患者を対象とした臨床試験の評価と、他の研究で用いられた同様のまたは似たような作用をもつ薬と比較した結果を述べた。一般的に、効果判定 (outcome measure) をもいわれるものである。臨床試験では CK 値、ジストロフィンの有無・状態、筋力・持久力、呼吸機能、心機能、患児の生活の質などの医学的、遺伝学的、生化学的な側面から評価がなされた。これらの評価項目は統計学的に検討がおこなわれ、p 値が 0.05 以下のものを統計学的に有意差があるとする。これは、その結果が偶然に生じる確率が 5% 以下であることを意味する。

方法は、標準化され、研究に使用された薬が疾患にともなう症状を変え、臨床的に有効で DMD や BMD といった疾患に特異的なものかどうかを判定できるようになっている。その方法は安全であり実行が容易であり、少しの症状の変化を評価するのに十分なものであり、患者やその家族、審査をする側にとって受け入れが良好なものであるべきだ。この治療が、患児にとって完全な治癒でなくとも、症状の進行を遅らせるものであることを明確に示さなければならない。

[生物工学の会社は資金を必要としている]

モーガン・スタンレー投資銀行の Jeremy Gelber 氏は、DMD のような稀少疾患の新薬を開発するうえでの経済的な問題について言及している。新薬が承認されるまでにかかる平均的な費用は約 3 億ドルである。実際には 8 億ドル以上かかるといわれている。これらの費用は、失敗のリスクを承知で、市場にでた際の利益を計算した投資家により支払われる。投資会社は数 100 万ドルの資金を調達したり、新たな生物工学の会社を設立したり、市場の動きをみて投資家や顧客にリスクや利益に対する助言を行ったりする。これらの専門家にとって、臨床試験の結果はとても重要なことであり、常に注意を払っている。それゆえ、診療試験はとても注意深く計画され、実行される。なぜなら、もし臨床試験の結果が思わしくないものであれば、それは市場価格や会社の市場価値に大いに影響するからである。よくない結果であれば会社が倒産することもあるし、さらには DMD 患者が待ち望んでいる薬の開発にも影響を及ぼす。

[‘私たちの息子を最初の臨床試験に参加させてほしい’ という申し出について]

もし、息子の病気が治る可能性があるのなら、私たちはそのためなら、なんでもするし、どこにでもいく準備はできている。必死の訴えをつづった多くの e メールが、時には遠く離れた国々から私のところに送られてくる。この質問に対しての回答を述べていく。

アメリカ、オランダ、イギリスで行われた DMD を対象にした 3 つの臨床試験 phase I に参加した患児は 10 人以下ととても少ない人数である。臨床試験では、頻りに臨床データのチェックをうけ、またそのジストロフィン遺伝子の異常を正確に知る必要があるため、参加者たちは臨床試験センター近辺から集められた。

この臨床試験 phase I では 1 つの筋肉のみを対象に局所的な治療をおこなった。この結果が重要な副作用を認めず、新たなジストロフィンの発現をもたらし、のちにこの 1 つの筋肉が機能的に回復するという効果的なものであったとしても、患児は治療の恩恵を受けることはない。患児の筋ジストロフィーの症状は治癒するわけでも、軽快するわけでもないのだ！この phase I の臨床試験ではエクソンスキッピングと、遺伝子導入という 2 つの治療が本当に、ヒトの筋肉で作用するのかどうかを確かめるだけのものである。‘治療方法の確認’である。

一般的には、これらのことが確認された時のみ、次のステップである、全身投与が試されるのである。アンチセンスオリゴや、遺伝子導入に用いられるアデノウイルスベクターは、血管内に投与され、全身の筋肉に作用する。現在予定されている最初の全身投与の臨床試験はオランダで 2008 年に行われるものである。その試験にはオランダの臨床センター近辺の患児が参加する予定である。

これらの理由から、時には外国からといった遠く離れた土地から臨床センターの近辺に引っ越し、何か月も住み試験に参加するといったことは無意味なことである。費用がかかるだけで、子供の病気が治るわけではない。家族がいまできることは、治療が承認をうけ準備ができた場合、すぐに連絡がつくように、筋ジストロフィーの専門施設のメンバーとなっておくことである。また子供に遺伝子検査をうけさせ、その結果や臨床経過を現在設立されつつある DMD データバンクに登録しておくことである。臨床試験は 2008 年からつぎつぎと行われようとしているため、登録しておけば一般的でない変異や、非常にまれな変異をもつ患児であっても、これから行われる臨床試験に必要な変異をもつ患児には連絡が行くことであろう。家族は、いま何が行われているか、いつ、どこで有効な治療が受けられるかについて常に最新のレポートを読んでおく必要がある。

<エクソンスキッピングと遺伝子導入>

[エクソンスキッピングは完璧な治療法ではない]

エクソンスキッピングという治療は、重症の DMD をより症状の軽い BMD へと変える治療法である。遺伝子の持つ異常を変えるものではないが、異常のある遺伝子が読まれる段階に作用する。エクソンスキッピングは DMD に対する完璧な治療法になり得ないが、症状を改善する作用を有する治療法である。

遺伝子の欠失、重複、点変異といった変異が mRNA の読み取り枠を乱し、DMD を発症させるが、読み取り枠のずれはアンチセンスオリゴを用いて mRNA から 1 個から複数個のエクソンを人工的に取り除くことで修正は可能である。アンチセンスオリゴは短い RNA であり、その配列はプレ mRNA のエクソン内の相補的な配列、もしくはエクソンとイントロンの境界にある配列と正確に一致するように設計されており、それ以外の場所に一致するようなことはない。このアンチセンスオリゴはスプライシング機構に作用し、標的のエクソン mRNA から除去する働きをもつ。これがスキッピングである。

スキッピングが起こった結果、mRNA は通常のものよりは短くなり、mRNA がコードするアミノ酸も少なくなる。失われたアミノ酸がロッドドメイン (rod domain) のような重要な部分のものでない場合、通常より短いタンパクは筋細胞膜において膜構造を支持する本来の役割を果たすことができる。これにより重症の DMD がより症状の軽い BMD に変えられるのである。最初のエクソンスキッピングについての臨床試験では 2 種類の化学的に分解されないように処理をされたアンチセンスオリゴを用いた。そのような処理をした訳は、筋細胞の中では核酸分解酵素というものが存在し、アンチセンスオリゴを分解してしまうからである。2 種類のアンチセンスオリゴのうち、一つは 2'O-methyl-phosphorothioate であり (一般には 2'O-methyl)、もう一つはモルフォリンといわれるものである。これらは珍しい構造をしており、モルフォリンにいたっては厳密にはヌクレオチドでもなく、アンチセンスオリゴという略語は正確なものではない。しかし多くの科学雑誌に使われており、このレポートでも便宜上アンチセンスオリゴを使うこととする。

[オランダでのエクソンスキッピングの臨床試験]

現在、オランダのライデンにある生物工学の会社の Prosensa B.V. の社長である Judith van Deutekom 氏はフィラデルフィアの会議に出ることができなかつたため、international United Parent Project Muscular Dystrophy (UPPMD) の代表である Elizabeth Vroom が 2006 年末に終了したエクソンスキッピングを用いた臨床試験の報告を行った。

この臨床試験はエクソンスキッピングが DMD 患者で実行可能なものかどうかについて調べたものである。この試験は一つの筋肉の小さな一部分 (具体的には前脛骨筋という舗装筋肉) という限られた場所で行ったものであり、エクソン 51 をスキップさせる 2'O-methyl アンチセンスオリゴを用いた。この臨床試験は '治療方法の確認' であり、実際に患児を治療するものではない。

オランダの研究者たちはエクソン 51 に対して、2'O-methyl アンチセンスオリゴを選択したが、そのわけは化学的に安定したアンチセンスオリゴとしてこのタイプのアンチセンスオリゴについての経験を豊富に持っていたからである。彼らは試験管の中の筋細胞の治療で成功した経験や、実際に生物に対して全身投与を行い、全身の筋肉に作用させた経験を持っていた。エクソン 51 が選ばれた理由は、これをスキップさせることにより治療が可能なが、エクソン欠失の変異を持つ DMD 児の 25% 以上にいるからである。

エクソンスキッピングはいままでにはない技術であるため、臨床試験を始める前に、それぞれの患児において徹底的な臨床、あるいは分子遺伝学的な検討が必要である。オランダの監査機関は臨床試験前に筋生検を施行することを禁じた。細胞培養には皮膚生検を用いておこなった。

[イギリスでのエクソンスキッピングの臨床試験]

フィラデルフィアでの会議ではエクソンスキッピングの臨床試験 phase I についての討論は行われなかったが、その後しばらくして、2008年の初めにイギリスで臨床試験が開始されることになった。この臨床試験はとても重要であるため、ロンドンで行われた2006年のPPUKのレポートの内容からもう一度大切なことを繰り返しのべ、最近の状況をつけ加えて報告する。

MDEX 協会はエクソンスキッピングによる治療の発展と臨床試験を行うことを目的に、イギリスで2005年1月に創立された。この協会の会員は Francesco Muntoni 氏、Kate Bushby 氏、Volker Staub 氏、Dominic Wells 氏、Jenny Morgan 氏、George Dickson 氏、Ian Graham 氏、Matthew Wood 氏、Steve Wilton 氏、Jenny Versnel 氏である。イギリスの健康、医学研究評議会(Department of Health, the Medical Research)とイギリス筋ジストロフィー協会と筋ジストロフィー運動もこの創立にかかわっている。

帝国大学の Francesco Muntoni 氏は MDEX の会長である。彼は、2006年のロンドン会議で、20%のDMD患者(具体的にはエクソン 45-5047-50、48-50、49-50、50、52、52-63の欠失をもつ患者)がエクソン 51 をスキップさせることで治療できる可能性があるため、この臨床試験では、エクソン 51 をスキップさせる予定であることを発表した。6種類の異なるアンチセンスオリゴ(AON)が正常のヒト筋細胞で、DMD患者の筋細胞、Steve Wilton 氏の筋肉標本、DMD患者の筋細胞を含む筋ジストロフィーマウスでテストされた。一番よい結果だったのは、Steve Wilton 氏の研究室で使ったモルフォリノアンチセンスオリゴ H51A であった。Dominic Wells 氏は mdx マウスを用いた実験で、このモルフォリノアンチセンスオリゴは DMD 患児を治療する上で長期に安定していることを示した。この結果はイギリス、オランダ、オーストラリアの4つの研究所と協力し得られたもので、2007年9月の Human Gene Therapy (18:798-810) で発表された。以前にも触れたように、モルフォリノ化合物は、科学的な性質は異なるが、2'O-methyl 化合物と構造は似かよっており、それゆえヌクレオチドではないが、混乱を避けるためこのレポートでは便宜上アンチセンスオリゴとする。

イギリスで使用されたモルフォリノアンチセンスオリゴは全長 30 ユニットで、オランダで使用された全長 20 ユニットの 2'O-methyl アンチセンスオリゴの配列を完全に含む。どちらのアンチセンス構成成分も正確にプレ mRNA エクソン 51 の内部に存在するエクソンスプライシングエンハンサー配列(ESE)と相補的に結合する。ESE を阻害することにより、RNA-タンパクスプライシング複合体の構成成分である SR タンパクの結合を阻害す

る。この結果、標的となるエクソンがプレ mRNA から取り除かれ、エクソンスキッピングが完成する。さまざまな遺伝子にあるエクソンの ESE 配列はいくつか似かよった配列をもつが、厳密には異なったものであり、それゆえ、選択的なエクソンスキッピングが可能となる。人間の全ゲノムで完全に相補的な配列が 2 箇所存在する可能性はほとんど無く、20000 以上のヒトの遺伝子で標的となる遺伝子の標的エクソンのみがスキップされる。それゆえ、この遺伝子治療がほかの遺伝子に影響する副作用が起こるということは考えにくい。

イギリスの臨床試験では各グループに 2 人ずつの 3 つのグループの 12-18 歳の DMD 患児が参加する予定である。0.9ml の液体に溶解された 3 つの異なった投与量 (0.09、0.297、0.9mg) のモルフォリノアンチセンスオリゴが各グループに投与される。場所は、つま先を動かすのに必要な足の外側にある 2 つの短指伸筋のうちの 1 つで筋肉 1 立方センチに 9 回投与される。仮に重大な副作用がでたとしても、この方法なら最悪の結果は避けることができるわけである。治療の結果を確認するために、治療前と治療後 30 日に筋生検を含む広範囲にわたる臨床のチェックが行われる。

オランダでの臨床試験のように、イギリスでも、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いた 1 つの筋肉への注入が安全に行えて、なんらかのジストロフィンの産生が可能であるという治療の原則の確認をするものにすぎない。さまざまな投与量で、筋繊維の最低でも 10% 以上に不完全なジストロフィンを認めることが期待される。参加者は治療効果をえることはない。しかし、この結果がのちに、すべての筋肉に作用する静脈内投与といった全身投与の是非にかかわってくるであろう。

数か月おくれて、2007 年 10 月にイギリスの監査者たちの認可があり、臨床試験前の検査が完了したのちの 2008 年の初めにアンチセンスオリゴの静脈内投与が開始される予定である。

Janet Rose Christensen 氏はアメリカのオレゴン州、ポートランドにある Regulatory Affairs and Quality of the company AVI BioParma 社の代表である。彼女はイギリスで DMD 患者を対象に行われたエクソンスキッピングの臨床試験における彼女の会社の役割についてのべた。何年ものあいだ、製薬会社は多くの心血管疾患、ウイルス性疾患、肝疾患に対する遺伝子治療薬としてモルフォリノアンチセンスオリゴを開発してきた。この種の化合物をもちい、11 の臨床試験がすでに 300 名以上を対象として行われてきた。それゆえ、製薬会社はアンチセンス薬に関して多くの科学的、臨床的な専門知識を有している。ジストロフィンを標的としてエクソンスキッピングを引き起こす配列はオーストラリアのパースの Steve Wilton 氏の協力のもと、すでに解明されている。MDEX 協会の協力のもと、治療は臨床試験 phase I で試され、現在、イギリスでの投与の準備がされている。エクソン 51 のスキッピングに使用される AVI-4658 と呼ばれるモルフォリノは 30 のサブユニットからなる。研究ではすでに AVI-4658 がエクソン 51 のスキッピングを誘導することが示され

ている。AVI-4658 はとても正確にエクソン 51 の中央にある標的となる配列に結合する。このモルフォリノは 1144 の炭素、水素、窒素、酸素、リン元素からなる。この AVI-4658 は‘神の手をもつ’とよばれる技術者たちが AVI 製造場で合成される。

イギリスの試験で AVI-4658 が使用される前に、イギリスにある Medicine’s Health Regulatory Authority (MHRA) の承認をうけなければならない。Janet Christensen 氏はアメリカにおける非常に複雑な承認のための手続きについて述べている。DMD は‘徐々に進行し衰弱していく生命にかかわる疾患‘として認識されているため、FDA 規定 21 CFR312 Part E ‘とよばれる規定が適用されることが予想される。曰く、’...安全性、有効性に関して適切な保証を維持すると同時に、法的な基準を適応するうえで、広く適応を行使するのは妥当である。これらの産物は、生命を脅かし、徐々に衰弱していく疾患を治す可能性のある薬が、より軽症の疾患を治す薬に比べて大きな危険性をはらみ、重篤な副作用をもつ可能性を患者や医者が理解していることを反映したものでなければならない。

Janet Christensen 氏はつぎの言葉で発表を締めくくった。「これらの規定により FDA は彼らがみえてきた頭痛薬とほんの少し異なった視点でしか、DMD 患者に対する適応についてみることができない。よって重要なことは、モルフォリノを用いた臨床試験を行い、よい結果を出すことである。われわれはエクソンスキッピングによる治療を待つ多くの DMD 患児のためにこの臨床試験が、早くに、承認手続きをすますことを望んでいる。」

[複数のエクソンスキッピングへの最初の試み]

ワシントンの Children’s National Medical Center の Terence Partridge 氏はエクソンスキッピングの問題について言及した。また、1つ以上のエクソンスキッピングを誘導し、ジストロフィンの読み取り枠を正常に戻す治療を必要とする DMD 患児に対するあたらしい治療である複数のエクソンスキッピングの可能性を開く、イヌをつかっ 2 つのエクソンスキッピングについての研究を報告した。

mdx マウスに対し、エクソン 23 を対象とした 2’O-methyl またはモルフォリノアンチセンスオリゴを、繰り返し全身投与を行ったところ効果があり、いくつかの筋肉では正常の 50%以上のジストロフィンの発現を認めた。しかし、モルフォリノは心筋には作用を認めず、その理由はまだ解明されていない。ロンドン大学の Dominic Wells 氏はロンドンで開催された 2006 年 PPUK のレポートで、初めて超音波を併用することでモルフォリノが心筋に作用することを述べた。Partridge 氏もこの問題に対して研究を行っている。

mdx マウスは筋肉にジストロフィンを有さないマウスであるが、その症状はとても軽症である。それゆえ、ヒトの DMD のモデルとしては理想的なものとは言い難い。さらに、このマウスの寿命は 2 年であるため、このマウスを使つての数年にわたる長期間の実験が行えない。イヌはマウスより寿命が長く、また筋ジストロフィーのゴールデンレトリバー (GRMD) は重い症状を呈するため、このイヌを用いた実験では、症状の進行した DMD 患者の臨床試験でみられる結果と同様の結果を出すことができるであろう。

GRMD イヌを使用した実験では、ほかにも利点がある。オランダとイギリスで行われた DMD 患者を用いてエクソン 51 をスキップさせる臨床試験では実際にエクソンスキッピングを誘導し、今後もさらなる結果がでると考える。これらの臨床試験では、1つのエクソンをスキップさせる実験しかおこなわれていない。しかし、ライデンの DMD データベースに登録されている欠失、重複、微小変異をもった DMD 患者の約 50%は、2つないしそれより多くのエクソンをスキップさせる治療を必要としている。複数のエクソンスキッピング治療を必要とする患者は多い。たとえば、エクソン 45-55 の 11 のエクソンのスキッピングは欠失をもつ DMD 患児の 63%をより軽症の BMD へと変える治療である。筋ジストロフィーのモデルイヌは 2つのエクソンスキッピングをする必要があるため、このイヌを使った実験はより多くタイプの変異に対して治療を行う道を開拓できる可能性がある。

ジストロフィン遺伝子エクソン 7 のスプライスに重要な部位に変異があるモデルイヌは、その mRNA ではエクソン 7 は欠失し、読み取り枠のずれを生じ、停止コドンを生じる。この場合、エクソン 6 と 8 の 2つのエクソンをスキップすることで、読み取り枠が修正できる。

エクソン 6 を標的としたモルフォリノアンチセンスオリゴとエクソン 8 を標的としたモルフォリノアンチセンスオリゴの混合物を様々な量で、若い GRMD イヌの前脛骨筋に局所投与した。治療の 2 週間後に筋生検を施行したところ、注射をした付近の筋肉に新しい筋繊維を認め、筋細胞の構造の正常化を認めた。

Partodge 氏は、最近、東京の General Animal Research Facility の Shiniichi Takeda 氏と共同研究を行い、イヌの全身投与でよい結果を得ることができた。この実験の詳細についてはまだ発表されていないため、ここでの要約はさける。

モルフォリノオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピングは様々な利点をもつ。(1) 全身投与が可能であり、すべての筋肉で効果を発揮する。ただし、心筋だけは例外である。(2) 有効性が高い。(3) いまのところ毒性は確認されていない。(4) 体内で代謝、分解を受けず、尿に排泄される。(5) 作用時間は短いため頻回の投与を必要とするが、ほかの代替治療が出た場合すぐに中止し新しい治療に移行できる (6) 生体にとって異物を含まないためアレルギー反応がおこらない。また新しく作られるジストロフィンも筋肉内にのみにしか存在しない。

モルフォリノアンチセンスオリゴはヒトと似かよった性質をもつ多くの哺乳類で効果があるが、ほかの哺乳類と同様に DMD 患児において十分な効果があるという保証にはならない。ここ数年の研究はすべてモルフォリノアンチセンスオリゴか、2'O-methyl アンチセンスオリゴを用いたものである。最終的に、将来、エクソンスキッピングの最大限の効果を発揮し、毒性のない薬となるものは、この 2つのタイプのアンチセンスオリゴの混合したものであろう。しかし、ほかのアンチセンスオリゴとの混合したものがよいのか、まったく別のアンチセンスオリゴと混合したほうがよいのかといった新たな問題がこれから発生するかもしれない。

＜いつ、DMD 患児を治療するエクソンスキッピングができるのか？＞

わたしは 2004 年 1 月のインタビューでライデンの Gertjan van Ommen 氏にこの質問を投げかけた。彼はながながと説明をしたがここではこのように省略する。‘10 年以内にはできるだろう’。詳細は 2004 年のモナコのレポートに記した。www.duchenne-research.com。10 年ということばは、正確に実際に 10 年という期間を表してはいない。新しい治療の研究には時間が必要であることや、実際には多くの解決しなければならない問題を抱えていることを知っている、非常にすぐれた科学者が出した見積もりである。2007 年も終わりにかかり、この言葉がでてから 4 年がたち、のこりは 6 年である。しかし、あなたたちにとっては、その年月すら待てないこともあるだろう。しかし、研究は 8 年、9 年、あるいは 10 年かかるかもしれない。うまく研究が進めば、3 年ないし 4 年で済むかもしれない。時間の猶予がない人もいるのだから、そういうひとのなかには、このような報告書の言葉を額面とおりにうけ、のこりの年月を数えはじめるかたがいるかもしれない。一方、現実の生活がどのようなものか、とくに現実の科学技術というものがどのようなものかを知っている方は今の状況をよく把握し、次の発表をよく理解している人もいる。その発表とは、Francesco Muntoni 氏と彼の盟友である van Ommen 氏の間で討論されたものである。

「現実的な情報を提供することがもっとも重要なことである、とわたしは考える。今後 6 年間の間に、エクソン 51 のスキッピングに成功し、そののち、ほかのいくつかのエクソンをスキップさせるアンチセンスオリゴの全身投与の治療を完成させることが期待できる。治療にむけた実験を決して中断させないようにすることが重要である。たとえば抗生剤はどの時代でも新しいものが生産されている。わたしには、最初の効果をみるまでに 6 年もかかるとは到底おもえない。しかし、それまでに現在使用しているタイプのアンチセンスオリゴや、今の薬の投与方法が変わっているかもしれないとは考えている。今後の 6 年間のうちに、実際に使用できる、すぐれた効果のある治療—アンチセンスオリゴの頻回投与が現実のものとなり、すぐれた臨床効果をあげることを望んでいる。同時にわれわれ科学者が、研究に励み、よりよい化学物質や、投与方法を開発しなければならない。そして、全く新しい効果のあるアンチセンスオリゴが開発され、それに年月が費やされること厭わんではない。

私が本当に強調したいポイントは、ゴールはひとつではなく、さまざまな道があるということだ。さらに、物事が前へ進めば必ず途中で何か待っているものであるということだ。どこからか天才が現れ、われわれの予想よりも早く、物事がすすむとしたら歓迎すべきことである。しかしそういうことはえてして予想できないものである。アンチセンスオリゴを用いた先の臨床試験から多くのことを学ばなければならない。今回われわれが得たことは、有効な投与方法、治療の普及、有効性、そして治療を待つ多くの人々の時間を明らかに少なくしたことである。」

[ジストロフィン遺伝子の導入ーウイルスベクターを用いた初めての臨床試験]

以下の文章はシンシナティとロンドン会議で Asklepios Biopharmaceuticals 社の Scott McPhee 氏と北カリフォルニア大学の Xiao Xiao 氏の発表の要約からのものである。オハイオ州コロンバスにある Muscle Gene Therapy センターの Christopher Shilling 氏はフィラデルフィア会議においてセンターで実施した臨床試験の新しいデータを発表した。ウイルスベクター (新しい遺伝子を運搬するウイルス) をもちいたジストロフィン遺伝子の導入は DMD に対する治療戦略の 1 つである。アデノ関連ウイルス (AAV) にはいくつかの長所がある。この治療は、筋肉や心筋によく作用し、DMD の変異のタイプに関係なく治療が可能である。この治療が有効かどうかを確認するために行った、筋ジストロフィーのマウスやイヌをつかった実験では、導入されたジストロフィン遺伝子を確認することができた。ベクターとして用いたのは AAV の 2.5 型であり、一般には Biostrophin とよばれ Asklepios が開発したものである。これらのウイルスは、細胞内に入るが、ウイルスの遺伝子はほとんど取り除いてあるため、体内で増殖することはない。こういった操作を行い、導入される遺伝子が標的の場所に組み込まれる。

しかし、AAV ベクターはそのサイズが小さいため、約 5000 塩基以上の長い配列を保持することができない。79 のエクソンからなる正常のジストロフィンの cDNA は約 14000 塩基あるため、ベクターに組み込むためにはそのサイズを小さくしなければならない。このようなミニ遺伝子 cDNA の導入では DMD を治癒することはできないが、より軽症の BMD へ変化させることはできる。

こうした理由から、最初の実験で使用されたベクターには、エクソン 17 の一部と、エクソン 18 から 59、エクソン 70 から 79 を除いた 3990 塩基のミニジストロフィン遺伝子が導入された。これは BMD になるには通常のジストロフィンの 1/3 程度があれば十分と予想されるからである。それは 1990 年に 61 歳で BMD と診断された例があるが、彼は十分歩くことができた。その彼のジストロフィン通常は 1/3 程度であったのである。

臨床試験 phase I a が、コロンバスにある、オハイオ州立大学医学部こども病院の Jerry Mendell 氏のもとで現在行われている。AAV のミニジストロフィン遺伝子ベクターは実験動物をつかった試験で、その安全性と毒性について米国食品医薬品局 (FDA) から承認を得ている。2006 年 3 月 28 日より最初の試験が開始された。上腕二頭筋に 0.5 センチ刻みに 3 か所 Biostrophin を注射した。また他方の上腕二頭筋には比較のため生理食塩水のみを注射した。この試験は二重盲目試験で行われ、被験者にもこの試験をおこなう研究者たちにも試験が終わるまでは、どちらの腕にどの薬を入れたかは知らされないようにした。

この試験でも参加した患児にとって治療の恩恵を受けることはない。マウスやイヌの骨格筋で効果のあったこの遺伝子治療法が、ヒトでも効果があるかどうかを試すためだけのものである。その他には安全性を確かめるという目的や、ミニジストロフィン遺伝子を発現させるのに必要な量を確かめる目的、ミニ遺伝子やベクターの成分に対するアレルギー反応の有無を確かめる目的がある。

ジストロフィン遺伝子異常が正確に診断されている、最小年齢が 5 歳の 6 人の DMD 患児がこの試験に参加している。現在、この 6 人は注射を受けているところである。6 人を 3 人ずつ 2 つのグループに分け、それぞれに 2 つの異なる投与量を試している。注射を行って 4 週後に、4 人の患児から注射した部位の筋組織を採取した。残りの 2 人は 12 週間投与したのちに筋組織を採取した。

遺伝子治療に関連した有害事象は認めず、この方法はよいということがわかった。二重盲目試験という形式をとっているため、臨床試験が終わり、新しく発現するジストロフィンが確認されるまでこの筋組織は冷凍で保管させる。この解析結果は、2007 年末にはわかる予定である。

次に行われる臨床試験 phase I b はイヌとサルをつかったもので、現在準備が進んでいる。遺伝子導入・発現を促進させるという結果はすでにわれわれは得ている。DMD 患児での試験は 2008 年か 2009 年には実施される予定である。この試験では、一時的に血流を止めた四肢に点滴をおこなう予定である。こうした、局所的な投与は、治療を受けた感じで、なんらかの機能を改善する可能性があると考ええる。最終的に、全身投与という方法で phase II、phase III の臨床試験をより多くの患児を対象として、2009—2010 年に行う予定である。

[筋肉幹細胞である周皮細胞を用いた遺伝子導入]

ミランにあるサンラファエル病院、幹細胞研究所の Giulio Cossu 氏の研究チームは DMD に対する幹細胞治療を研究している。

DMD に対して有効な幹細胞治療を行うため、安全性、倫理性に条件を満たした多量の幹細胞が必要となる。その幹細胞は筋細胞に分化することはあっても、腫瘍細胞のようなものとなつてはいけぬ。幹細胞による治療は全身にいきわたるために、血管内に投与する方法をとる。幹細胞は血管壁、筋細胞壁を通過し、筋線維の中に滞りなく移動しなければならない。この細胞の性質は中胚葉性血管芽細胞と似かよったものである。中胚葉性血管芽細胞は小血管壁の外側の筋繊維組織内から発見された幹細胞である。

動物を用いた最初の実験として、イタリアの研究者たちはジストロフィン—タンパク複合体の欠損した肢体型筋ジストロフィーのマウスを用いて研究を行った。正常なマウスの中胚葉性血管芽細胞を投与したところ、この正常な幹細胞は失われているはずのジストロフィン—タンパク複合体 (アルファサルコグリカン) を筋ジストロフィーのマウスの骨格筋内に 80% 以上生産することに成功した。

この DMD に対するあたらしい治療技術は、研究所内でウイルスベクターを用い、患者の中胚葉性血管芽細胞に正常なヒトのジストロフィンを導入し、のちに、正常のジストロフィンを含んだ幹細胞を増殖させ、患者に帰すというものである。このような自己由来の細胞による治療法はアレルギーの問題の心配がない。しかし、健康な血縁者のジストロフィンを含んだ幹細胞が用いられる場合、長期の免疫抑制が必要となる。

実験で用いられた中胚葉性血管芽細胞はイヌやマウスの血管壁から分離されたものであ

る。しかし、DMD 患児に対する治療としての次のステップを踏み出すには、ヒトから分離した幹細胞を用いて動物で実験をする必要がある。Cossu 氏らはこれに関する新しい結果を *Nature Cell Biology* の 2007 年 2 月号で発表している。

ヒトの幹細胞は同様に小血管壁に存在するが、その性質が若干動物のものとは異なる。それゆえ、ヒトから分離した細胞は‘周皮細胞由来細胞’または‘周皮細胞’と呼ばれる。この細胞の性質は、DMD 治療に使用される幹細胞としての特徴を有している。特に (1) 筋組織といった生体標本からの分離が容易である。(2) 小児の全身投与に必要な量を実験室内でつくり出すことができる。(3) ウイルスベクターを用いて、正常なジストロフィン遺伝子を導入することが可能である。(4) 血管内に投与すれば筋肉内に移動することが可能である。(5) 筋組織内で機能的な筋細胞に分化するといった利点がある。

ジストロフィンを持たず、遺伝子操作により免疫を不活化したマウスを使った実験で、決定的な結果を得ることができた。このマウス 5 匹の足の動脈に周皮細胞を 3 回注射し、1 ヶ月後に検査を行ったところ、断面あたり 200~450 のジストロフィンの新しい筋線維を認めました。また DMD 患者の変異ジストロフィン遺伝子をもつ周皮細胞を、ミニ遺伝子をもつウイルスベクターで治療し、それをこのマウスに投与したところ、ミニジストロフィン遺伝子をもつ 190~320 の新しい筋線維を認めた。この治療を受けたマウスの筋肉の機能を測定したところ、明らかな改善を認めた。

ヒトへの治療の適応のための次のステップとして、Cossu 氏の研究チームは正常なイヌと筋ジストロフィーのイヌから中胚葉性血管芽細胞分離し、試験管内で培養し、筋ジストロフィーのイヌの後ろ足の動脈に投与した。イヌの細胞については詳細には分かっておらず、ヒトの周皮細胞と同様の作用をもつかは不明である。このため、周皮細胞という名称でよばず、中胚葉性血管芽細胞とよぶことにする。自らの幹細胞にウイルスベクターを用いヒトの‘マイクロ’ジストロフィン遺伝子を導入し、4 匹のイヌが 5 か月に及ぶ全身投与治療をうけた。この場合、自らの細胞を用いているため免疫抑制は不要である。しかし、予想に反し、治療は失敗におわった。この原因は、イヌのような大きな動物で筋肉の機能を回復するには導入した遺伝子が小さく、機能の回復に十分なジストロフィンが産生されなかったと考える。自己の細胞を用いない研究もある。正常のイヌから得た幹細胞を免疫抑制剤であるシクロスポリンを用い筋ジストロフィーのイヌに同様に投与した。この実験では多くの正常ジストロフィンを認め、筋力の改善を認めた。1 匹のイヌでは、大動脈に留置したカテーテルから細胞を投与し、そうすることで全身に細胞が分布するということが分かった。この幹細胞の投与方法の結果は劇的であり、この動物では、筋力の著名な改善を認め、最後の治療から 5 か月たっても歩き続けることができた。他のイヌにおいても劣ってはいるが、症状の改善を認めた。‘マイクロ’ジストロフィン遺伝子の代わりに、より大きな‘ミニ’ジストロフィン遺伝子を自己幹細胞に導入した実験が計画されている。またフランスの Luis Garcia 氏が開発したエクソンスキッピングの手法をすることも計画されている。

Cossu 氏は次のように発表を締めくくっている「私たちは現在、DMD 患者での臨床試験を準備している。しかし、われわれが最初にすべきことは、イヌを使った長期間の研究であり、毒性を調べ、ヒトの細胞を準備しなければならない。この研究はすでに始まっているが、もう 1 年は必要である。臨床試験では、ヒトの幹細胞が、ヒトの筋肉のなかで、ヒトのジストロフィンを本当に産生するかを確認するために、3 人の患者で 1 つの筋肉への局所投与を試みる予定である。その後、別の 3 人の患者で他人のドナーから得た幹細胞を免疫抑制剤をもちいつつ、全身投与をこころみる予定である。最初のもっとも重要な確認事項は長期間の使用が安全であるかどうか点である。われわれはすでにイヌや、マウスでは有害事象がないこと確認している。しかし、実際に臨床試験でヒトに投与した場合に何が起こるかについてはわからない。2 つめに大切な確認事項は、筋力が保持されるか、または増加するかということである。われわれは 1 つの筋線維の筋力を測定するあたらしい技術を既に開発している。そして、TRAT-NMD の勧告にはしたがっていく。臍帯血を用いた幹細胞治療もある。しかしわれわれはそれがどれくらいの効果をもつか、またどれくらいの危険があるかについての知識がない。最後に、小児には多量の幹細胞が必要となるため深刻な問題があることを述べる。手続きが複雑であるため、それには数年かかることが予想され、また多くの費用がかかるであろう。しかし、この治療には未来があり、われわれはその可能性を信じている。われわれは子供たちのために、本当の治療の確立に向けて頑張ろうではないか。」

<薬物療法について>

[ユートロフィンを発現させる方法]

DMD に対する治療として、大きく 4 つの取り組みがなされている。

- (1) ジストロフィン蛋白の機能を回復させる。
- (2) ジストロフィン蛋白とよく似た働きをする蛋白(ユートロフィン等)を発現させる。
- (3) 心臓や肺を含めたすべての筋組織で、これらの蛋白を発現させる方法を検討する。
- (4) 発現させる蛋白に対する免疫反応を抑える。

Kay Davie 氏 s は、今から 20 年以上前に、ジストロフィンとよく似た構造と機能を持つ蛋白としてユートロフィン、及びその遺伝子を発見した。ユートロフィン遺伝子は、6 番染色体上に位置しており、75 個のエクソンで構成される。ジストロフィンと同様に、F-アクチンと結合しており、さらに膜で蛋白複合体とも結合している。また、ユートロフィンは多くの組織で発現しており、筋組織では、神経筋接合部に集中して発現している。

DMD 患者では、ユートロフィンが神経筋接合部から筋膜で発現しており、また、ユートロフィンの発現が多い患者の方が、車椅子を使用するようになる年齢が遅いことがわかっている。胎生 12 週では、ユートロフィンとジストロフィンが同程度発現しているが、その後ユートロフィンは徐々に減少し、出生時に筋細胞膜で見られるのはジストロフィンのみとなる。このことから、ユートロフィンはジストロフィンの胎生期型であることがわかる。

このユートロフィンを胎生期のように発現させることができれば、DMD の治療法となる可能性がある。

mdx マウス (DMD のモデルマウス) はジストロフィンが存在しないにもかかわらず、ヒトの DMD のような重篤な症状は出現しない。しかし **mdx** マウスでユートロフィンも発現しないようにする (ユートロフィンノックアウト **mdx** マウス) と、ヒトの DMD と同じような重篤な症状が出現し、すぐに死んでしまう。ユートロフィンの発現量を増やすことによって、**mdx** マウスの症状がより軽症化するかもしれない。

これらの実験結果から、DMD の治療法として、ユートロフィンの発現を誘導する方法が候補の一つとして考えられた。ユートロフィン遺伝子にはその発現を調節するプロモーターが 2 種類存在し、それぞれのプロモーターから 2 種類のアイソフォームが作られる。2 種類のうちのひとつ、A-ユートロフィンは筋細胞の神経筋接合部に特異的に発現している。研究者達は、神経筋接合部に特異的に発現している A-ユートロフィンを、筋細胞膜に発現させる方法について研究した。しかし、すぐに、「ユートロフィンの発現を増やす」という治療法は難しいことが判明し、大学の研究室では研究されなくなった。そこで、Dr.Davis は Sulmmit 社を設立し、研究をすすめた。

Sulmmit 社では約 30000 種類の化合物についてユートロフィンの発現を誘導する作用があるかどうかを検討し、2007 年 7 月までに 31 種類の有望な化合物を同定した。現在、**mdx** マウスにこれらの化合物を実際に投与し、すべての筋組織でユートロフィンの発現が増えているかどうかを検討している。このうち、VOX A、および VOX B の 2 種類については、**mdx** マウスの腹腔内への投与実験を既に行っている。週に一度、計 12 週間、腹腔内に投与したところ、ユートロフィンの発現が増加していた。また、SMT C1100 を投与したマウスでは、筋の変性、線維化、脂肪変性、炎症所見が減少し、機能の改善が見られた。28 日間毎日投与しても、明らかな副作用は認められなかった。順調に毒性試験などをクリアできれば、2008 年中ごろには健常ボランティアによる臨床試験を、また 2009 年後半には DMD 患者に対する臨床試験を行える予定である。

[Biglycan によるユートロフィン発現誘導]

Justin Fallon 氏はユートロフィンの発現を誘導する **biglycan** について研究している。**biglycan** は、筋細胞膜に局在する α サルコグリカンと γ サルコグリカンを結合する役割を果たしている。また、筋細胞膜を構成する蛋白やシグナル伝達の調整を行っている。**mdx** マウスで、**biglycan** も発現しないようにすると、ジストロフィン複合体を形成する蛋白の多くが認められなくなった。このマウスに対し、人工的に合成した **biglycan** を投与したところ、 β シントロフィンの発現が回復し、ジストロフィン複合体も回復した。また、**mdx** マウスに **biglycan** を投与したところ、1 回の **biglycan** 投与でユートロフィンの発現は 2.5 倍となり、2~3 週間持続し、症状の改善も認めた。また、**biglycan** を繰り返し投与した 3 ヶ月後には、筋肉の機能の改善を認めた。

biglycan は発達途上のヒトでよく発現しており、薬剤として使用しても免疫反応が起こる心配は無い。また筋細胞外で作用を発揮するため、細胞膜を透過するかどうかについてを心配する必要も無い。biglycan に結合する α サルコグリカンと γ サルコグリカンは共に骨格筋と心筋にのみ存在するため、他の臓器に対する副作用は少ないと考えられる。具体的な投与法を検討する研究が進められている。また、ヒトに投与できる純度の高い biglycan の生産ラインの確立も 12~18 ヶ月あれば可能だろう。従って、2 年以内に、DMD に対する臨床試験が開始される可能性がある。

[ストップコドンを読み飛ばす PTC124 による治療]

Langton Miller 氏はストップコドンを読み飛ばす PTC124 についての研究をしている。PTC124 は、ナンセンス変異によって形成されたストップコドンを読み飛ばし、正常なジストロフィン合成させる作用を持つ低分子薬物である。DMD の 13~15% はナンセンス変異 (ストップコドン形成し、正常なジストロフィン合成を止める) を持っており、PTC124 はこのナンセンス変異をもつ DMD 患者に対してのみ有効な薬物とされる。

PTC124 は、800,000 種類の低分子化合物についてナンセンス変異を読み飛ばす作用があるかどうかを検討された結果、同定された化合物である。抗生物質のゲンタマイシンにストップコドンを読み飛ばす作用があることが既に明らかにされているが、PTC124 はゲンタマイシンとの関連性は無く、また、抗生物質でもない。PTC124 の詳細については、*Nature*, 447;87-91 (2007)、及び、*Nature*, 447;42-3 (2007) に記載されている。PTC124 はまだ市販されておらず、臨床試験の段階にある。PTC124 は経口薬であり、白い粉末でかすかなバナナ味であり、水、牛乳、ジュースと混ぜて服用できる。また、他の遺伝子のナンセンス変異によって起こる、線維性嚢胞症などの疾患にも有効であり、既にいくつかの臨床試験 (Phase II) が実施されている。

DMD に対する PTC124 の効果を判定するために、まず、筋細胞を用いた実験が行われた。mdx マウス由来の筋細胞に PTC124 を投与したところ、正常なジストロフィンの発現が認められた。次に、mdx マウスに PTC124 を 8 週間内服させたところ、骨格筋、心筋にジストロフィンが発現し、筋の脆弱性が改善、血清 CK 値も減少した。マウス、ラット、犬を用いて、PTC124 の毒性試験を行ったが、急性期には重篤な副作用は認められなかった。マウスでは腎臓で、犬では副腎で炎症反応を認めた。ラットで褐色脂肪腫を一度認めたが、追加実験では認められなかった。ヒトではこのような副作用は現時点では認められていないが、臨床試験では、特に腎、副腎に対する副作用について注意しなければならない。

第一回目の臨床試験は、18~30 歳の健常男性ボランティアに対して行われた。(尚、18 から 30 歳という年齢は、青年~成人の DMD を想定した年齢である。) 健常男性ボランティアに対し、1 日 3 回、2 週間 PTC124 の投与を行った。PTC124 の体内への吸収は良好で、mdx マウスで有効であった血中濃度 ($2\sim 10\ \mu\text{g/ml}$) に維持されていた。150mg/kg を超える量を投与した場合には、嘔気、下痢、頭痛などの副作用が認められた。軽度の肝機能障

害が見られる場合も合った。健常男性ボランティアでは、100mg/kg/日までは特に問題はなかったため、この範囲で DMD 患者に投与することとした。

健常者に対する臨床試験結果から、MD 患者に対する臨床試験が計画された (phase II)。5~16 歳の 26 名の DMD 患者がこの臨床試験に参加した。6 名は、16mg/kg/日を、残りの 20 名は 40mg/kg/日(分 3)を投与された。また、15 名は UGA、6 名は UAG、5 名は UAA のストップコドン、エクソン 6~70 のいずれかのエクソンに有していた。投与前の臨床所見の評価は 21 日前までに行い、28 日間 PTC124 を経口投与し、その後の 28 日間で最終的な臨床所見の評価を行った。筋生検は投与前後に 1 回ずつ実施し、治療効果の判定、副作用の評価のためにさまざまな検査を行った。

最初の 2 グループの DMD 患者に対しては、まず患者由来の筋細胞を用いて PTC124 の効果を検討した。細胞実験を行った全ての筋細胞で、PTC124 の濃度依存性にジストロフィンの発現量は増加した。16mg/kg/日を投与した 6 名中 3 名で、40mg/kg/日を投与した 20 名中 11 名で、投与後の筋組織でジストロフィンを検出できた。ジストロフィンが検出できなかった DMD 患者がいた理由として、成人と比較して、小児では PTC124 の分解が早く PTC124 の血中濃度が至適濃度としていた 2~10 μ g/ml よりも低かったことが考えられる。しかし、全ての DMD 患者で投与中 CK 値が低下し、投与終了後は上昇した。軽度から中等度の副作用 (下痢、嘔気、頭痛) を認めたが、検査所見上異常は認められなかった。DMD 患者の両親や学校の先生らの中には、PTC124 投与後、子ども達の活動性や持久力が増し、倦怠感を訴える頻度が減少したと感じていた者もいた。しかし、これらの所見は、両親や先生からの申告のみであり、さらに詳細な検討が必要である。

DMD 患者に対する臨床試験の結果から、さらに投与量を増量した臨床研究 (PTC124 : 80mg/kg/日(分 3)×28 日間) が新たな DMD 患者 12 名に対して行われた。80mg/kg/日を投与したところ、血中濃度は至適濃度である 2~10 μ g/ml に達していた。二回目の臨床試験は既に終了しており、現在、データの解析を行っている。近日中に二回目の臨床試験についての最終報告ができる予定である。

最後に、Miller 氏は次の 3 つの質問に対して以下のように述べた。(1) PTC124 短期間投与による良い結果が、長期的にも効果があり筋力が改善するなど DMD 患者の QOL の改善につながるのか？(2) 最も効果的でかつ副作用の少ない PTC124 の投与量はどのくらいか？(3) どの程度の期間、PTC124 を投与すれば、長期投与の効果として判定できるのか？

「これらの質問については、長期間投与の臨床試験を行うことによつてのみ解決できる問題である。まず、Phase II a 臨床試験の結果の解析を終了し、長期投与の臨床試験のための準備を 2007 年末までに行い、数ヶ月以内に臨床試験を開始したいと考えている。」

[DMD に対する 4 種類の新しい治療薬の開発]

DNA から RNA へ転写された後の修飾作用をもつ物質の発見・開発を行っている会社で

ある PTC Therapeutics の代表 Ellen Welch 氏は、DMD に対する治療薬となる可能性のある、新しい化合物を紹介した。

2004 年 5 月から行っているプロジェクトでは、数十万種類の化合物の中から、筋細胞に存在する 4 つのターゲットの発現を制御する因子をスクリーニングすることとなった。ターゲットとした 4 種類は、活性化あるいは不活化されることによって、DMD 患者の筋組織を改善または維持する効果を持つことが明らかとなっている因子である。ミオスタチンを不活化したり、IGF-1 を活性化することによって筋肉の成長や再生が促進され、ユートロフィンや $\alpha 7$ インテグリンを活性化することによって筋細胞膜が安定化し筋肉の機能が改善することが明らかとなっている。これまでにいくつかの化合物が候補として挙げる事ができた。現在、これらの化合物の構造を変化させたものについて検討して、より効果的な化合物の開発を目指している。最適な化合物を同定した後、筋培養細胞やモデル動物を用いた実験を行う予定である。PTC Therapeutics では、現在、低濃度でミオスタチンを不活化させる化合物や、IGF-1 を活性化させる化合物、ユートロフィンや $\alpha 7$ インテグリンを 2 倍活性化させる化合物をいくつか同定している。これら化合物についてさらに詳細な検討を行い、2009 年には DMD 患者に対する Phase I 臨床試験を行う予定である。

これらの薬剤によって、遺伝子変異自体を修正する治療ができるわけではないが、将来的に、他の薬剤やエクソスキッピングなどの治療と併用することでより効果のある治療が行えるようになると考えられる。

[NF κ B 阻害による筋構造や機能の改善]

George Carlson らは、ジストロフィンが欠損するとなぜ筋ジストロフィーを発症するのかについて、mdx マウスを用いて研究している。これまで、筋ジストロフィーの症状は筋細胞内へのカルシウムイオンの流入・増加が原因であるとされていた。しかし、実際にカルシウムの流入について計測したところ、筋ジストロフィー由来の筋線維と健常の筋線維とに違いは無いことが明らかとなった。このことは、カルシウムの筋細胞内への流入が、筋ジストロフィーを引き起こす原因とはなっていないことを示している。しかし、筋の伸縮によって筋組織の変性が起きていることは事実である。別の研究者は、筋の伸縮により筋組織における NF κ B を介したシグナル伝達経路が活性化されていることを示した。そこで、Carlson 氏らは、NF κ B を介したシグナル伝達経路の活性化が筋ジストロフィー発症の原因となっているのかどうかについての研究を開始した。

NF κ B は、ジストロフィンが発見されたのと同じ 1986 年に発見された。NF κ B はすべて細胞に存在するが、たいていの場合は不活化された状態で存在しており、細菌やウイルスの感染によって炎症が起こった場合に活性化される。活性化された NF κ B は細胞質から核内へ移行し、さまざまな遺伝子のプロモーターに結合し、遺伝子を活性化させる。炎症反応が必要ではなくなったときに、抗炎症因子によって NF κ B は不活化される。遺伝子変異などによって、NF κ B の不活化ができなくなった場合、動脈硬化、肺線維症、気管支喘

息、関節リウマチなどの慢性疾患を発症する。

Carlson 氏らは、NF κ B の活性化を阻害する薬剤の効果について研究した。Pyrrolidine dithiocarbamate は NF κ B の核内への移行を阻害する薬剤だが、これを投与することにより、筋組織の構造や機能を改善させることができた。若年性関節リウマチの治療薬として既に販売されている、Sulfasalazine も NF κ B を阻害する薬剤である。Carlson 氏らはこれら 2 つの薬剤 (Pyrrolidine dithiocarbamate、Sulfasalazine) について mdx マウスの筋組織を用いて研究しており、その径や機能が改善することを発見した。現在、NF κ B を介したシグナル伝達経路を阻害する、他の数種類の薬剤について研究している。Carlson 氏は、「すでに他の疾患の治療薬として使用されている NF κ B を介したシグナル伝達経路を阻害する薬剤について、臨床試験を始めるかもしれない。」と話している。

[DMD に対する治療薬としての β 作用薬]

Gordon Lynch 氏は、DMD 患者の筋肉を増強あるいは維持するために β 作用薬を使用する方法を研究している。 β 作用薬はホルモンのような作用を持っており、膜蛋白に存在する受容体に結合することによって細胞内にシグナルを伝達し、細胞内物質の活性化あるいは不活化し、細胞機能を調節している。

いくつかの β 作用薬は、既に気管支喘息患者に対する気管支拡張薬として広く試用されている。他にも骨格筋に対する強力な同化作用をもち、筋力増強剤としてドーピングに使用されることもある。

β 作用薬は老人の萎縮した筋肉を改善させる作用があることから、Lynch 氏らは月齢 28 の老齢ラットを用いて β 作用薬についての実験を行った。2004 年に、老齢ラット 1.4mg/kg の fenotarel を 4 週間腹腔内投与したところ、老化によって萎縮していた筋組織が改善したと報告した。月齢 16 の成人ラットでの結果と比較すると、筋容量や筋線維径、張力が有意に改善していた。この結果は、 β 作用薬が高齢者の筋萎縮に対して有効な治療薬となる可能性を示している。fenotarel は β 作用薬の一つであり、引き続き研究が行われている。Lynch 氏らは、より効果的な新しい世代の β 作用薬 (formoterl、salmeterol:共に喘息の治療薬として使用されている) についての研究を進めている。

もし、健常な高齢者の筋萎縮に対して、 β 作用薬が効果的であれば、DMD のように筋萎縮を認める患者に対しても有効であることが明らかである。実際、DMD/BMD 患者に対する第 1 回の臨床試験は既に行われている。DMD/BMD 患者に対して、albuterol を 8mg/日 \times 28 日間投与が行われている。8mg/日という少ない投与量であったのは、その前に 16~32mg/日を投与された顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの患者で心機能障害が認められたためである。DMD/BMD 患者に対して行った少ない投与量では、全く副作用は認められなかったが、十分な治療効果は得られなかった。

そのため、Lynch 氏らは、より強力な β 作用薬である fenotarel の有効性について mdx マウスを用いて検討した。極少量 (25 μ g/kg) の fenotarel で、筋線維サイズの増大、機能

の改善を認めた。また、筋力は改善したが、筋の疲れとは全く関連が無かったことは重要なことである。さらにこの研究を発展させていくためには、 β 作用薬によってもたらされる心臓への副作用を解消する必要がある。 β 作用薬は骨格筋だけでなく心筋にも作用することから、これらの作用を別々にする必要がある。結局、DMD 患者には心臓を拡張させる必要はないのである。また、 β 受容体の耐性獲得も防ぐ必要がある。これらの問題点がマウスや犬などのモデル動物を用いて解消された後に、DMD 患者に対する臨床試験を行うことが可能になる。

[炎症因子を阻害する]

筋ジストロフィーでは筋細胞の変性が起こり、その後、炎症細胞が浸潤する。ステロイドはこの炎症反応を抑制する作用を持ち、このことがステロイド (predonizone、predonisolone、deflazacort) によって筋量や筋力増強されることに関与していると考えられている。他方、ステロイドによる副作用もしばしば認められる。ステロイドは、DMD 患者に対して、筋力を維持させる目的で広く使用されている。しかし、実際の作用機序は明らかではない。

Melissa Spencer 氏は、ステロイドに代わる免疫抑制作用を持つ薬剤の研究を行っており、免疫反応さらには疾患の進行に関与する、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞、骨髄性細胞を増加させる研究について紹介している。DMD 患者や mdx マウスの筋組織において、これらの細胞はサイトカインを放出し炎症を促進させ、線維化を進行させる。健常なヒトでは、これらの反応は創を治癒させるための正常な反応だが、DMD 患者では、この反応が制御できなくなり、慢性炎症を引き起こしている。免疫細胞を阻害あるいは排除し、サイトカインを調整することによって、筋組織の変性・線維化を防ぐことができる可能性がある。現在、承認された抗炎症薬が多数存在する。もし、これらの抗炎症薬が DMD に対して有効なのであれば、DMD に対する治療薬として FDA の承認を得るのは、新薬の承認を得ることと比べると容易である。

Spencer 氏の研究室では、以下のような薬剤の効果について臨床研究を行っている。関節リウマチの治療薬である CTLA-4Ig や Galectin-1、パーキンソン病に対する抗体である抗 asialo GM1 抗体などである。また、関節リウマチ等の治療薬である Remicade(商品名)、Enbrel(商品名)については、mdx マウスを用いて実験を行っている。その他、抗炎症薬のターゲットとして $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が重要だが、これに関しては Carlson 氏が説明している。

Spencer 氏は、最後に、オステオポンチンが mdx マウスの血中で増加しており、またオステオポンチンを発現しないようにした mdx マウスでは筋力の改善、CK 値の低下を認めたことから、オステオポンチンを阻害することによって DMD 患者の治療ができる可能性があるとして述べている。

抗炎症薬が、ステロイドに代わる DMD に対する治療薬、あるいはエクソスキッピングなどの治療との併用薬として確立されるためには、長期間の臨床研究が必要だろう。

[ミオスタチン阻害作用を持つ薬について]

ミオスタチンは、375 アミノ酸で構成される蛋白で、筋細胞で合成され、筋の成長を制限する働きを持つ。このミオスタチンの働きを不活化することによって、筋を再生させ、変性を阻害することが可能になるかもしれない。健常マウスでミオスタチンを発現しないようにさせると、筋線維数、および、筋線維径が増大し、筋量が通常の 3 倍に増加する。ミオスタチン遺伝子の変異によってミオスタチンが不活化されたウシは、とても筋肉質なウシとなる。また、ミオスタチンの欠失によって、筋肉が極端に肥大したイヌも発見されている。ベルリンには、ミオスタチン遺伝子変異によって、正常のこどもの 2 倍の筋量をもつ 8 歳児が存在する。これらのことから、DMD 患者でも、ミオスタチンを不活化させることによって、筋の成長を増加させる可能性が考えられる。ミオスタチンをターゲットとする治療では、遺伝子変異自体を修復することはできないが、狭義の遺伝子治療やエクソスキッピング治療と組み合わせることによって治療効果を得られる可能性がある。

Kathryn Wagner 氏らは、ミオスタチンを発現しない mdx マウスを既に作成したと報告している。ミオスタチンを発現しない mdx マウスは、より正常に近い筋組織像を呈しており、筋再生は“普通の” mdx マウスよりも早かった。ミオスタチン阻害は心筋に対しては何の影響もなく、ミオスタチンの作用は骨格筋に限定されることが明らかとなった。

Wyeth Pharmaceuticals という企業と協力して、抗ミオスタチン抗体でミオスタチン阻害作用を持つ Myo029 の臨床試験が現在行われている。この抗体は免疫反応を引き起こさず、血中や皮下に注入できる。安全性と効果について検討するために、36 名ずつ 3 グループに分けられた成人の筋ジストロフィー患者に対し、それぞれ、1、3、10mg/kg の Myo029 を 2 週間ごとに 24 週間投与する臨床試験を行った。中間報告では、短期間の投与については安全であった。すべての評価、解析が終了した後、最終的な結果が発表される予定である。また、長期間投与の効果が重要であるため、モデル犬を用いた研究が計画されている。ミオスタチンを阻害する薬剤について開発を進めているのは Wyeth 社だけではなく、他の企業も開発をすすめている。

Wagner 氏は最後に、以下のような警鐘を鳴らした。「DMD 患者の両親は、ミオスタチン阻害剤とされるものをインターネットで購入するべきではない。インターネットで取り扱われているものは、臨床試験をされておらず、効果がないだけでなく有害なものさえあるからだ。」

[BBIC はプロテアーゼを阻害するが、Myodur(C101)は阻害しない]

Lee Sweeney 氏らは、プロテアーゼを阻害するという新しい研究について述べた。DMD 患者で認められる筋変性には、数種類のプロテアーゼやカルシウムやプロテアソームによって活性化されるカルパインなどの蛋白分解酵素が関与している。DMD 患者の筋細胞膜ではジストロフィンが欠損しているために、細胞外からカルシウムイオン等が透過しやすく、

これによってカルパインや他のプロテアソームを活性化しやすい。プロテアーゼなどの阻害剤のひとつとして、大豆から抽出された物質で 71 アミノ酸から構成される BBIC がある。BBIC は水に溶解しやすく、経口投与が可能である。筋細胞内に入りやすく、数種類のプロテアーゼの働きを阻害する作用を持つ。Mdx マウスを用いた実験では、BBIC 投与によって筋の変性が阻害されており、predonisone と同じような作用が認められた。BBIC の長期間投与により、筋量および筋力の増加、CK 値の低下、線維化の減少を認めた。また、他の治療目的でがん患者に投与されたことがあるが、大変安全性の高い薬剤だった。

現在、Fishbeck 氏と NIH が協力して、Phase I の臨床試験を始める準備を行っており、FDA より許可され次第、試験を開始する予定である。DMD 患者でも mdx マウスでの結果と同じような結果が得られた場合、筋の変性が減少する可能性がある。BBIC は、大豆から抽出された物質だが、他のプロテアーゼが混入しないように精製されている。大豆を直接食べても効果はない。

一方、leupeptin は 3 アミノ酸から成り、カルパイン活性を低下させる物質として最初に発見されたものである。CepTor 社が開発した Myodur は、leupeptin とカルニチンを混合した化合物である。カルニチンもカルパインの働きを阻害すると Michele 氏らによって報告されている。Sweeny 氏の研究室では、Myodur の効果についての実験を行った。結果は、残念ながら Myodur による治療 8 週間後、leupeptin による治療 6 週間後の検査では、筋の機能は改善されておらず、また、筋へのダメージも改善されていなかった。実際、これらの薬剤によってカルパインは阻害されるよりも、むしろ、活性化されてカルパスタチンなどのカルパイン阻害因子が不活化されていた。カルパインは DMD に対する治療の標的とはなりにくいようである。

[国際的臨床試験について]

アメリカ、カナダ、ベルギー、イタリア、スウェーデン、アルゼンチン、オーストラリア、インドの 22 病院が参加している国際的筋疾患研究グループ (CINRG) では、DMD に対する臨床試験を行っている。Diana Escolar 氏は最近終了したもの、及び、現在行っているものについて述べた。

Escolar 氏は、すでに論文として発表されている二つの臨床試験結果については言及しなかった。ひとつはクレアチンとグルタミンについての臨床研究であり、もうひとつは oxatomido についての臨床研究だが、どちらも十分な効果が得られていない。

Escolar 氏は、pentoxifylline についての臨床研究結果について述べた。17 名、4~7 歳のステロイドを投与されていない DMD 患者に対し、12 ヶ月間に渡って pentoxifylline による治療を行った。筋の機能をチェックしその効果を判定した。8 人の DMD 患者が白血球減少を発症し、臨床試験を離脱した。1 年間の pentoxifylline 投与後、筋力や筋の機能の改善は認められなかったが、症状の悪化も認められなかった。pentoxifylline には症状を安定化させる作用を持つ可能性があり、より規模の大きい臨床試験を行う必要がある。その後、7 歳

以上でかつ 10m 以上歩行可能な DMD 患者 64 名を対象として、二重盲検法を用いた臨床試験が行われており、2007 年 12 月に終了する予定である。

コエンザイム Q10 についての臨床試験も、7~11 歳でステロイドを内服しており、歩行可能な DMD 患者 13 名を対照して行われた。コエンザイム Q10 を 90mg/kg/日 で投与開始し、血中濃度が 2.5 μ g/ml となるように 400mg/kg/日 まで投与量を増量するという方法で行われた。血中濃度が高くなった 1 名で頭痛を認めたと、投与量を減らすと症状は改善した。コエンザイム Q10 による治療によって、筋の機能は 7.3% 増加した。この研究結果を基に、120 名の歩行不能となった 10~15 歳の DMD 患者を対象に、現在臨床試験が進められている。4 つのグループにわけ、それぞれ、0.75mg/kg の predonisone、血中濃度 2.5 μ g/ml となるコエンザイム Q10、0.75mg/kg の predonisone+血中濃度 2.5 μ g/ml となるコエンザイム Q10、プラセボを 12 ヶ月間毎日投与した。

これらの臨床試験の最終的な解析結果は、わかり次第発表される予定である。情報については、www.clinicaltrials.gov で得ることができる。

最後に、Escobar 氏は現在薦められる治療法について以下のように提示した。

DMD と診断されたら、できるだけ早く predonisone 0.75mg/kg/day、あるいは、flazacort 0.9mg/kg/day の内服を開始する。なお、患者自身や家族に肥満がある場合は、栄養についてのカウンセリングを受けた方がよい。2~4 歳の低年齢からステロイド投与を開始した場合、体重増加などの問題が軽減される場合がある。ビタミン D、カルシウム、高タンパク、低カロリーの食事、クレアチン 5g/日、グルタミン 0.6g/日(分 2)、コエンザイム Q10 200~400 mg/日などの投与も考える。しかし、緑茶成分、アルギニン、protandim のような抗酸化剤などは薦められない。

<FDA はどのように DMD に対する薬を認可するのか? >

FDA の Orphan Products(商品としては認可されていないが、一部の疾患によく効くとされている薬品)開発部門に所属している Tan Nguyen 氏は、次のように説明している。不治の病の子供を持つ家族の関心や熱心さを FDA はよく理解している。FDA は、DMD のような稀で重篤な疾患の治療薬の開発や、患者様の成長に伴う経済的負担の軽減に力をいれてきた。

スルファニルアミド・エリキシルによってアメリカで 107 人の患者が死亡した事件の後、1938 年に元来の連邦政府の食品・薬品・化粧品を扱う本部は司法に属することになった。しかし、1962 年まで FDA は製品の安全性を証明するのみの機関であった。サリドマイドによってドイツで 10,000 人以上の障害を持った子供が生まれた後、アメリカにおいては十分な安全性示すデータがなかったためにその薬の認可を遅らせ、大きな被害をほとんど防いでいる。FDA における薬の認可の過程は Kefauver-Harris の修正案のおかげで 1962 年 10 月以降、劇的に変化している。これ以降、製造者たちには、薬の安全性だけではなく、FDA が薬を認可した後、市場で採算が取れるかを考慮する必要性も求められている。

non-orphan drug の開発は以下のステージを経なければならない。

- (1) 臨床試験に入る前に実施する実験室や動物実験の過程。その安全性、生物学的活性度、定型化を確認するために平均で 6.5 年の期間と 100 万から 12,00 万ドルの経費がかかる。
- (2) Phase I の臨床試験。20 から 100 人の健常ボランティアを対象とし、平均 1.5 年かけてその薬のヒトでの安全性を評価する。
- (3) Phase II の臨床試験。100 から 500 人の患者を対象とし、平均 2 年間かけてその薬の適量、安全性、効果を評価する。
- (4) Phase III の臨床試験。1,000 から 5,000 人の患者を対象とし、平均 3.5 年間かけて薬の安全性と長期投与の効果を確定する。

これら 3 段階の臨床試験にかかる経費の合計は約 15,00 万から 3 億ドルである。つまり、開発にかかる期間は平均で 15 年、平均経費は 3.6 億ドルになる。一般に 5,000 の化合物のうち実際に市場に出回るのはたった 1 つである。DMD のような患者数に制限がある疾患で orphan drug を開発するためには、いくつかの段階は適応にならないかもしれない。そのため、患者数が限られている稀な疾患においては、もう少し柔軟に対応し、堅く定型化した枠組みが緩和されなければならない。

臨床前の研究が完了したとき、開発者は IND (Investigational New Drug Application) を提示し、FDA がその薬を用いた臨床研究の許可を出す。すべての臨床研究が達成された後、開発者は NDA (New Drug Application) をまとめ、最終的な市場での販売認可について審査される。FDA の認可の過程では、臨床前の実験データと臨床データの両方を考慮してその薬の安全性と効果を評価される。多くの場合、この過程では期間は一年以内で 10 万ドルの経費が必要である。

いわゆる orphan drug はアメリカ国内で 200,000 人以下の稀な疾患で投与される傾向にある。アメリカでは現在 10,000 人の DMD 患児がいる。DMD は稀な疾患であり orphan drug の適応と考えられる。すでに 6 つの薬剤(mazindol、oxandrolone、PTC124、2'-O-メチルアンチセンスオリゴ(エクソンスキップ治療に用いる)、leupeptin、idebenone)が DMD に対して効果があるかも知れない orphan drug として候補に挙がっている。この中にはすでに様々な理由で臨床的な開発が中止になったものもある。これまで、FDA は 300 以上の orphan drug を約 180 の他の稀な疾患に認可している。

企業が orphan drug を開発するとき、orphan drug を指定する過程において多大な財政的な援助を受ける。(1) 臨床開発の 50%の費用が連邦政府の税金から貸し付けられる、(2) FDA が科している市場への適応料金の免除、(3) 市場での認可後に 7 年間の市場での独占権。以上の 3 点である。企業にとっては orphan drug の認可にかかる費用は一年間で 40 万ドル、4 年間では 1,60 万ドルにも及ぶが、これらは臨床試験にかかる費用に匹敵する金額である。Subpart E approval を用いることで、あるケースでは 3 年以内に認可を取得することも可能であることは明らかにされるべきである。これは主に十分な Phase II の

臨床研究の結果に基づいて薬を認可することで可能となる。有効な治療法が他に存在せず、なおかつ重篤な状態で生命の危険にさらされている患者に限られて入るが、研究の途中でまだ認可はされていないが、安全で有効な薬でありそうなものは特別な配慮により患者に投与することが出来る。

Nguyen 氏は臨床試験での患者の安全性の確保や薬の効果の表現を確かなものにするために、如何に FDA が薬の開発全体を考えているかについて細かく議論していた。

“Orphan drugs, too, have to be safe and effective.”

Nguyen 氏のプレゼンテーション後の質問に対する回答の中に次のような2つがあった。

- ① “様々な配列に対応する多種類のアンチセンスオリゴが、新薬としてすべての認可の過程を経なければならぬのかどうかについては、現時点では、確かなことは言えない。最初の一つが認可の過程を合格したのであれば、その次からは、いくつかの過程を短縮するのがよいのではないだろうか。DMD 協会がこのことについて前向きな意見やアドバイスを公の場で示してくれることが理想的ではないだろうか。”

“FDA は orphan drug の認可について、他の non-orphan drug と同じ高いレベルの安全性と有効性を指標としている。疾患が大変重篤であり患者の親の意見に FDA は敏感になっている。その意見とは、たとえ子供たちが抱えるリスクが増えたり、何か不都合なことが起こったとしても、これ以上長い期間待たされるよりも、有望な薬なのであれば未認可であってもすぐに子供たちに投与したいというものである。”

Kate Bushby 氏の発言を引用する。「早く何らかの仕事を患者様にしてあげないといけないうことは分かっています。しかし、私たちはすべてのリスクを最小化しなければなりません。おそらく有効ではないであろうと考えられるものを 6 歳の男の子に投与したくはありません。なぜなら、DMD によって 6 歳の子供が明日命を失うということはないからです。Phase I の臨床試験だけでは長期的な効果について十分な推定をすることはできません。それぞれのステージで異なった結果がでます。あってほしくないことですが、どこかのステージで不合格となることは実際には起こりうることなのです。致命的なことも起こりうるのです。もし、Phase I の後に医者が薬を投与して Phase II で危険な出来事がおけると、その医者は法的に問題となります。広く世間に薬を広めたいのであれば通常のプロセスを経る必要があります。その場合のみ、その薬を必要とする患者様すべてに投与することが出来ます。もしも、あなたがそのプロセスを省略したり、間違っただけのプロセスを経たならば、問題を後回しにしていることになるでしょう。一つの薬の開発には時間をかける必要があるし、すべての必要な情報を一度に集める必要があります。短縮したプロセスで認可された薬が長い期間の治療の間に、実は安全でないことが判明することは、大変遺憾なことです。そのような薬は直ちに引き上げないといけないうでしょう。そして、ご両親はその責任を受け入れることは出来ないし、権利放棄書に直ちにサインするでしょう。このよ

うなことは倫理にもとります。あなたのお子様がお亡くなりになるようなことがあれば、いったいどうしますか。私たちは患者様とそこへ両親の両方に対して責任があるのです。」

<TREAT-NMD : ヨーロッパにおけるネットワーク>

フランス筋ジストロフィー協会 (AFM) の科学部ディレクターである Starge Braun 氏が初めに国家的な患者の組織 AFM を立ち上げた。1958 年に設立し、現在フランス国内に 75 のクリニカルセンターを持ち、毎年 12 月の 30 時間に及ぶ慈善番組で知られている。1987 年にアメリカの慈善番組を参考にして Jerry Lewis 氏の援助でこの慈善番組を開始したところ、募金活動だけで毎年平均 1.4 億ドルが集まる。2006 年の協会の予算は 1.7 億ドルでそのうち 88,00 万ドルは神経筋疾患の治療のための研究費に使われている。その中にはアメリカのプロジェクトを含む 100 の海外プロジェクトがある。

Braun 氏は以下のように説明している。神経筋疾患の治療、診断、患者ケアの研究においてヨーロッパ内の様々の国でバラバラに研究し協力関係が出来ていないこと、つまり稀ではあるが重篤な結果になるこれらの疾患に対する認識の中での受け入れがたい状況に AFM や他のヨーロッパの患者協会が気づくようになってきた。AFM の会員である Françoise Salama 氏には DMD の子供がいるが、たくさんのヨーロッパの仲間達と一緒にヨーロッパ委員会にロビー活動を行い、この地域における活動の統合資金を要求した。この活動は大成功し、2004 年に素晴らしいネットワークとして完成した。このネットワークの目的は次のようなものである。“ネットワークを形成するパートナー達の研究能力を進歩的にさらに永続的に続くように統合するときに必要な情報や技術をヨーロッパレベルで集積する。これにより特殊な研究課題において科学的にも技術的にも卓越したものを造ることを強化すること”。このあと、長い申請過程を経てこのプログラム、TREAT-NMD が 2006 年 12 月に認可され、5 年間で 10,00 万ユーロ (約 15,00 万ドル) の予算がつき 2007 年 1 月から本格的な活動が始まった。

今では TREAT-NMD は卓越したネットワークとなり、そのおかげで、神経筋疾患の新しい治療の開発を促進するために必要な様々な技術や手法を進歩させ、基礎や臨床の学者や勤勉な会員達の間で専門技術を共有していくだろう。

TREAT-NMD の事務局はイギリスのニューキャッスル大学にある。Kate Bushby 氏と Volker Straub 氏が中心となってアムステルダム大学マリアンヌに科学技術のアドバイス支部があります。Website は www.treat-nmd.eu で大変たくさんの情報が掲載されており、メンバーリストに載っている 1,000 人以上の方に頻回にニュースを発行している。

Kate Bushby 氏のプレゼンテーションの後に「最初の 6 ヶ月の TREAT-NMD の活動」と題して Braun 氏による説明が行われた。その中でもっとも大切な TREAT-NMD の目的について以下のように述べられている。

- (1) 脊髄性筋萎縮症と同様に DMD や先天性筋ジストロフィーにおいても更なる国際協力を促進していくこと。

- (2) 臨床試験を提案したりコーディネートしたりすることによって様々な治療法を開発すること
- (3) 国際的なデータバンクを作ることによって研究に参加してくれる患者を探すこと
- (4) 臨床試験において標準化を行うことで研究成果を他の似た研究と比較できるようにすること
- (5) 診断とケアの面において、国際標準を進歩させること
- (6) 研究・診断・ケアについて最新の情報をすべての患者・家族・治療センターなどに広く周知させること。十分な恩恵を受けていない地域には特に周知させること

TREAT-NMD には 21 の活動的なパートナーがいる。一大学、患者団体、政府の関連機関、バイオテクノロジー関連会社、そして個人である。ヨーロッパにまたがって存在しておりネットワークの目的を分配することが第一の責任である。世界中のグループが協力し一緒になって活動しており、この重要な分野での新たな協力は歓迎する。

Bushby 氏は現在から未来にかけての活動について 4 つの例を挙げて説明した。

- (1) すでに登録されているものとあわせて国際的な患者登録を行い、それにより臨床や診断に関する標準化された情報をつくり、国を超えたデータバンクの開発や管理がなされるようにする。これにより、長期間異なった治療を受けた患者や家族の情報を集めたりモニタリングしたり比較したりする臨床試験に適切な患者を決定することができる。
- (2) アメリカのアトランタにある疾病管理センター (CDC) と協力して、最も進歩したケアの方法をスタンダードとして確立すること。このプロジェクトはすでに始まっており患者の医療と社会性の両面の管理がカバーされている。すべての治療センターにおいてそのアドバイスに従って加療できるように手法が確立されねばならない。
- (3) 臨床試験における臨床結果の評価方法を標準化すること。臨床変化は評価されなければならない、2 つのワークショップが 2007 年の 5 月と 6 月に開催された。
- (4) 臨床研究の共同センター (CTCC) がドイツのフライベルク大学に設立され、製薬会社やその分野の大家と協力し稀な疾患における臨床研究の企画のアドバイスをしている。

プレゼンテーションの最後に Bushby 氏は以下のようにコメントした。「TREAT-NMD は DMD の共同体全体にとって前向きに物事を進める素晴らしい機会となりました。TREAT-NMD のニューキャッスルの事務所のメールアドレスは info@treat-nmd.eu です。なんらかのコメントをいただけたら幸いです。」

<なぜ正確な遺伝子診断が必要なのか？>

2006年にKevin Flanigan氏がシンシナティの学会ですでに答えたのと同様にユタ大学のRobert Weiss氏が回答した。ここではFlanigan氏の話の要約に少し新しい情報を加えて示す。

DMDが疑われる少年は遺伝子検索を行い、遺伝子変異を明確にする必要がある。肢体型筋ジストロフィーなど他の筋疾患においてもDMDとよく似た症状をきたす疾患もある。遺伝子変異によってジストロフィンのmRNAがフレームシフトをきたすのであればDMDだが、フレームシフトをきたさないのであればBMDである。正確に遺伝子変異を同定することで患者の家族や母方の親類により進んだ遺伝子相談をすることが出来るし、DMDの保因者検索も出来る。最後に、エクソンをスキップさせたり、PTC124でストップコドンを読みとばしたりするようないくつかの可能性のある新しい治療法が適応となるかどうかを判断するためには、ジストロフィン遺伝子の変異について詳しい情報が必須である。

遺伝子の欠失や重複を検索するには、現在MLPA法(multiplex ligation-dependent probe amplification method、MRC-Holland社のJan Schouten氏の開発)が広く用いられている。他の遺伝子検査と同様にMLPA法ではたった5~10mlの血液で十分な遺伝子を白血球から取り出すことが出来ます。患者様はわざわざ研究所にくる必要は無く、検体を郵送していただければ十分である。

このMLPA法について簡単な手順を説明する。79個のジストロフィン遺伝子のエクソンに対してそれぞれ特異的に結合するプライマーを計158個用いる。対象となるエクソンが存在している状態では、デザインされた1組のプライマーは酵素によってその特異的配列に結合しPCR反応でそのエクソンを増幅する。増幅産物は電気泳動によって分離しチャートにそのピークが刻まれる。もし対象となるエクソンが欠失し存在しない状態では、プライマーはエクソンの特異的配列に結合することが出来ず、PCR反応で増幅されずその結果チャート上にピークは刻まれない。

この検査法ではDMD患者のジストロフィン遺伝子における欠失とほとんどの重複を見つけることは出来るが、一塩基置換などは見つけることが出来ません。量的なものを見る検査法であり、発端者のDMD患者の欠損や重複部位が分かっている場合でも、女性保因者のジストロフィン遺伝子の欠失や重複を見つめることができるかもしれない。この点はこの検査法の最も優れた点の一つである。

しかし、欠失があるという結果であっても一エクソンのみの欠失では、エクソンが実際に欠失している場合だけでなく、MLPA法のプライマーが結合する個所に、一塩基置換が存在していることがある。以上のことからMLPA法で一エクソンのみの欠失を示唆しているときには、他の検査方法によって一エクソンの欠失が本当なのか確認する必要がある。

MLPA法で異常が見つからない場合、その患者には一塩基変異があるのかもしれない。SCAIP法(Flanigan氏)を用いれば、ナンセンス変異や微小な欠失・挿入、イントロンのスプライスサイトの変異など見つけることが出来る。ジストロフィン遺伝子のすべての完

全なエクソンとスプライスシグナルを含むイントロン-エクソン境界領域とすべてのプロモーター領域の配列を PCR で増幅した後、ダイレクトシーケンスを用いて一塩基置換などの変異を見つける。

正確で効果的なジストロフィン遺伝子の検査法で最も新しいものは、遺伝子チップを参考に考案されたマイクロアレイである。CETT については次のチャプターで触れるが、アトランタのエモリー大学では遺伝子チップを用いた検査法が実用化され、大きな欠失・重複、そして小さな変異も検査されている。さらに、国際的な臨床研究所のネットワークによって遺伝子チップを用いた検査法が提供される計画がある。

これらの検査法 (MLPA、SCAIP、遺伝子チップ法) によって 95~98% の遺伝子異常を見つけることが出来る。しかし、残りの 2~5% の異常は見つけることが出来ない。もし、患者が明らかに DMD や BMD の症状があるにもかかわらず、血液検査で遺伝子の異常を見つけることが出来なかったときには、筋生検を行いジストロフィン蛋白が実際には存在しているのかどうか調べる必要がある。ウェスタンブロット法を用いるとジストロフィン蛋白の大きさを知ることが出来るが、ジストロフィン蛋白は免疫染色をすると顕微鏡でははっきりと見えるため通常はこちらの方法をよく用いる。筋生検で得た筋組織を見ると、DMD の患者では細胞膜は暗い色のままですが、健常な人の筋組織ではきれいに明るくふちどられている。BMD の患者では部分的に明るい細胞膜を認める。ライデン医科大学の Johan den Dunnen 氏は DNA の情報だけでは mRNA レベルでどのようなことが起こっているのかを理解することは不十分である、と述べている。そのため、アンチセンスオリゴを用いたエクソンスキッピング治療を行うかどうかを決めるのは困難である。報告されているデータでは欠失または重複の遺伝子異常を持つ DMD の患者のうち 5~10% では期待されるような結果は得ることは出来ない。以上の事から、エクソンスキッピングのような治療が始まる前には、筋組織か皮膚組織から mRNA を抽出し、欠失や重複が起こっているブレイクポイント周辺の配列を調べておくべきである。オランダでエクソンスキップの治療を行う際には、すべての DMD の患者で以上のことを事前に調べている。さらに、培養細胞もエクソンスキッピング治療の評価に用いられている。欠失直前のエクソンの最後の塩基は欠失した直後のエクソンの最初の塩基とフレームシフトすることなく結合する。mRNA を解析することにより、スプライシング異常によってエクソンとエクソンの間にイントロンが残ってしまうような特殊な遺伝子異常を見つけることにも利用される。

< CETT (Collaboration, Education and Test Translation Program : 新しい DMD 遺伝子診断法の時代が始まっている >

このプログラムはエモリー大学の Madhuri Hedge 氏によって説明された。このプログラムに参加している組織は、the Centers for Disease Control and Prevention (CDC)、the Office of Rare Disorders of the National Institutes of Health in Bethesda、Emory University in Atlanta、the American Society of Human Genetics、the American College

of Medical Genetics, the Society for Inherited Metabolic Disorders, the Genetic Alliance である。このプログラムは、稀な疾患に対する遺伝子解析結果が、臨床の現場に十分還元されていない状況を改善する目的で 2006 年に始まった。

- (1) 臨床と研究の協力関係を強化することで遺伝子検査の質を向上させる。
- (2) 公的なデータベースにある遺伝情報と臨床情報を収集し治療研究に役立てる。
- (3) 検査機関のガイドラインを向上させる。
- (4) 患者に役立つ最新の情報を患者・家族・医療従事者・その他の関係者に提供する。

CETT のホームページは www.cettprogram.org である。

DMD は CETT プログラムを用いて、臨床・研究・患者擁護の分野で協力関係を強化した初めてのグループの一つである。元 MDA の Jerry Lewis 氏や PPMD の Patricia Furlong 氏のようなたくさんの擁護者の努力によって一般市民だけでなく、ワシントンの政治家に至るまで、「10,000 人の DMD 患児にとって今何が問題で、何を必要としている」について周知させることが出来た。CETT-PPMD の協力関係によって、「エモリー大学において、遺伝子チップを用いた DMD 遺伝子解析法の妥当性と実用性示す」という、最初の重要な目的を達成している。遺伝子チップを用いた DMD 遺伝子解析法は大変鋭敏で迅速な検査である。“妥当性”については、様々な遺伝子変異を持つ DMD 患者または保因者の検体を用い遺伝子チップで検査したところ、すでに確立された検査法とまったく同じ結果を得たことで確認された。

<新しい遺伝子チップを用いた遺伝子解析>

第 2 部では、Hedge 氏が 2 つの過程を持つこの新しい検査法について説明した。ステップ 1 では 220 万塩基のジストロフィン遺伝子全体について CGH 法で検査する。これによりエクソンの欠失や重複を見つけることが出来る。ステップ 1 において欠失や重複を認めなかったものがステップ 2 に進む。

ステップ 1.

これらの遺伝子チップは Roche-NimbleGen Systems 社によって造られている。1x3 インチ (25x76mm) のガラス板の上に、約 40 万の DNA オリゴヌクレオチドがマスクレス・アレイ合成法と呼ばれる独占的な技術によって合成され、プローブオリゴとして規則正しく接着されている。プローブオリゴは約 45~60 塩基の大きさにジストロフィン遺伝子の 220 万塩基を 2 重に対応している。プローブオリゴは板の上で自動的に必要な配列に合成される。患者からの DNA を含む検体はまず始めに、プローブオリゴとほぼ同じ大きさに切断され蛍光色素で標識される。患者由来の DNA がアレイ上で相補的な配列のプローブオリゴと結合すると、紫外線を当てることで蛍光色素により光を放つ。もし、患者の遺伝子に欠失がある場合は、欠失した部分に相補的な配列のプローブオリゴには結合するものが無く、光を放つことは出来ない。プローブオリゴが結合している配列や場所がわかるので、欠失の境界部分やブレイクポイントを大変高い精度で決定することができる。いくつかのエク

ソンが重複している場合は、プローブオリゴに結合する蛍光色素で標識された検体が増え、蛍光色素により 2 倍の強さの光を放つことになる。

この手法では結果を量的に評価できるため、欠失や重複を DMD 患児からだけではなく二本のジストロフィン遺伝子を持つ女性においても検出することが出来る。つまり、遺伝子チップの検査では女性が DMD の保因者であるかどうか調べる事が出来る。このことは正確な遺伝相談において大変重要である。この手法では遺伝子自体の変異を見つけることができるので、欠失や重複の正確なブレイクポイントを同定することができる。多くの場合、ブレイクポイントの始めと終わりはイントロン内に存在することが多い。このことは同じエクソンの欠失あるいは重複変異であるにもかかわらず、異なった症状を呈する原因を探る重要な手がかりなるかもしれない。イントロンが遺伝子の単なる“ガラクタ”ではなく遺伝子の働きを調節する塩基配列を含んでおり、欠失変異によって障害された結果、症状の進行に影響を与えているのかもしれない。

ステップ 2.

もし、ステップ 1 において欠失や重複が見つからなかったときには、ステップ 2 において小さな欠失や挿入などの微小変異を見つけることが出来るかもしれない。ステップ 2 の解析では、47,000 塩基のアレイを用いて以下の配列を検索し微小変異を探す。

- (1) すべてのジストロフィン遺伝子のエクソンを含む 14,000 塩基
- (2) 8 箇所のジストロフィン遺伝子のプロモーター領域
- (3) 全エクソン-イントロンの境界領域のイントロン 100 塩基配列
- (4) イントロン内に存在する 5 つの稀な微小変異が報告されている配列

ステップ 2 では、対象となるすべての塩基配列において、正常塩基が存在しているのか、他の塩基に置換されているのか、欠失や挿入があるのかについてチェックできる。

微小変異、小さな欠失や挿入は以下のことを引き起こす可能性がある。

- (1) mRNA における読み取り枠がずれることで DMD を引き起こす (フレームシフト変異)
- (2) ジストロフィン蛋白の中のアミノ酸が置き換わることで DMD または BMD を引き起こすかもしれない。(ミスセンス変異)
- (3) ストップコドンの形成されることによりジストロフィン蛋白の合成が阻害される。(ナンセンス変異)
- (4) スプライシングの機能を阻害することで、mRNA においてエクソンが欠失する。(スプライスサイトの変異)
- (5) プロモーター領域が障害されて、ジストロフィン蛋白の合成がストップし DMD となる。

例外：すべての遺伝子検査と同様に、いくつかの稀なケースでは DMD が強く疑われる少年であるにもかかわらず遺伝子チップの検査で遺伝子異常を発見できないかもしれない。

遺伝子変異が検索した領域以外に存在しているのかもしれない。これを調べるために密集したアレイに 210 万のプローブオリゴを含んだ遺伝子チップが開発中である。他の神経筋疾患や新生児の濾紙血や唾液を用いたスクリーニング検査においても遺伝子チップによる検査法は現在開発中である。

有用性：この新しい検査法において優れている点は、ほとんど全ての患者や保因者においてジストロフィン遺伝子の変異を見つけることが出来る事に加えて、検査時間が短く鋭敏で正確な検査であることである。ステップ 1 には約 7 日間を必要とするが、DMD 患者の 60% を占める欠失、5% を占める重複を見つけることが出来る。さらに、14 日間で残りの 35% の微小変異を見つけることが出来る。

すでにこの新しい検査法は実用化されている。もし、あなたがこの検査法を使ってあなたの息子さんや女性の親類を調べたいと考えるなら、エモリー大学遺伝子研究所の連絡してください。ホームページアドレスは www.geneticslab.emory.edu、電話番号は 404 778-8500 である。検査にかかる費用や保険の適応についても答えることが出来る。遺伝子変異が全く認められなかった症例では、mRNA を用いた cDNA の解析も行っている。尚、mRNA を用いる検査では筋生検が必要となる。アメリカ以外からの血液や筋肉の検体も受け付けている。

今後の CETT の活動：あと数年で CETT はアメリカにおける臨床研究のネットワークを整備し、後にアメリカ以外の研究機関ともネットワークを整備したいと考えている。ここでは DMD 患者や保因者に対して迅速で正確な検査が施行されることになる。新しい DMD 連盟を持つ PPMD は DMD に関わる共同体全体に対して、このプログラムや情報を率先して提供することになるだろう。

<DMD 連盟は協力と遺伝子解析を促進する>

DMD 連盟は DMD/BMD 共同体の革新的な情報の中心で、患者・家族・医療従事者・製薬会社を一つに集約し、最新の研究や治療法の情報だけではなく、データやアイデア、ガイダンスの情報の更新をしている。

イノリスト社の Kyle Brown 氏は、“非営利目的の研究共同体”を作るために、CETT のプログラムと協力する新しい PPMD の DMD 連盟プログラムを作成した。これには出来るだけ多くの DMD/BMD 患者の臨床情報や遺伝子情報を集める必要がある。Kyle Brown 氏は会合の中で患者家族に次のように話した。

「私たちは病気のお子様やそのご家族についてもっと知りたいと思っています。あなたの情報を DMD 連盟や CETT プログラムに登録していただきたいのです。あなたのお子様の臨床データや遺伝子データが必要です。またあなたがどちらにお住まいなのかも知りたいのです。しかし、プライバシーを守る為、これらの情報はあなたの許可があるときのみ、研究社・製薬会社・他の参加者にお知らせします。私たちが知りたい質問表は大変長いです。どのように診断したのですか？遺伝子検査や他の検査結果はどうでしたか？どの

ようにして彼は歩いていますか？関節拘縮や側弯のために整形外科的な手術を受けましたか？どのような補助具を使っていますか？どのような呼吸の補助がいますか？心臓に何か問題はありますか？ご家族に同様の疾患を持っている人はいますか？

これだけの質問では不十分なので、近い将来、質問を追加する予定です。私たちはあなたの方と長くお付き合いをしていかなければならないでしょうから、この経過の中で変化する情報は質問と回答という形で続いていくことでしょう。

DMD 連盟を通じて、あなたのお子さんが他の DMD 患者と比べて病気の進行具合を比較することが出来ます。そして、あなたがお住まいの地区でどこが遺伝相談をしてくれるのかを案内することが出来るでしょう。そして、私たちの仕事がより有意義なものにする為に、私たちはあなたの意見やアイデアを必要としており、それをいつでも受け付ける準備があります。

あなたの名前や住所を伏せた、匿名のあなたの情報はそれを必要とする DMD 研究者に提供されることでしょう。そして、私たちと同じような基準を守っている世界の他の参加者とも一緒に仕事をしていくことになるでしょう。臨床試験の過程で特殊な遺伝子変異を持っている患者が必要などきなどには、製薬会社もこの情報にアクセスすることでしょう。しかし、彼らがあなたの方と接触が必要などきには、彼らはまず私たちにあなた方が情報提供を許可しているかどうかを確認しなければなりません。従って、いかなるときにおいても、あなた方は自分たちの個人情報をも自分の管理下においているのです。

これらすべての結果は国内のだけでなく、後には国際的なレベルで大きな協力体制が構築され、その中で、あなたのお子様やご家族全体が大きな役割を担うことになるでしょう。

PPMDの新しいインターネット情報センターに参加していただき、強力なネットワークの一員になってください。(<http://www.duchenneconnet.org>) 近年、英語がインターネットの世界では広く使われるようになりましたが、他の言語への翻訳も近い将来可能となるでしょう。」

<この会議における“Connect... (結束)”の意味は？>

Patricia Furlong 氏による総括の言葉。「DMD 患者にとって、家族・医者・医療従事者など彼らを有意義な人生に導いてあげることが出来る人たちや治療法を開発している研究たちは大変重要です。通常であれば 70 年 25,000 日ある人生が、DMD の患者では 20 年 7,300 日の人生に短縮されます。もうこれ以上 DMD 患者の人生が短縮されないようにするために DMD 共同体の人たち全て一つになって働くことが“結束”の言葉の本当の意味です。それほど遠くない未来に完全に治療できないまでも大変有効な治療法が完成するとき、現在のこの 50 年間という隔たりは徐々に短くなっていかねばなりません。わたしの 2 人の子供は 15 歳と 17 歳で亡くなりました。彼らは 7,300 日も生きることは出来ませんでした。それは 10 年も前の話です。現在この 10 年間の間に、1,500 日間 DMD の患者様の寿命は延長し合計で 8,800 日、25 年相当にまで伸びました。つまり、そこには進歩があり、そのこと

がさらに世界中の研究所や病院におけるありとあらゆる治療法を促進することでしょう。

研究戦略のリストは大変長いものです。それらの多くは今回の会議で話し合われました。現在も臨床的な研究がどんどん行われておりますが、有効であった事柄を蓄積することで私たちが如何に前に進んでいっていることがお分かり頂けたでしょう。エクソンスキッピングやストップコドンの読みとばしなど数年後に期待できる治療法が一つ以上存在していることもご理解頂けたでしょう。

しばしば、私たちの待機する姿勢が無意味なのではないかと心配になります。しかし、今回の会議に参加してみて、研究面の進歩だけではなく、患者へのケアという面もずいぶん良くなっていることが分かりました。さらに、極めて重要なことなのですが、多くの国において市民や政府、政府の健康に関する関連機関が、DMD が世界的な問題であることを理解し、これを根絶させるために一つにならねばならないことに気づきました。しっかりと資金が利用可能になってきており、我々の努力でさらに資金は増強させねばなりません。そしてそれらによって新しい研究プログラム可能となったり、長期間でより成熟した戦略を構築したり出来るようになります。

いくつかの DMD 患児に対する臨床試験において、エクソンスキッピング、ストップコドンの読みとばし、ユートロピンの活性化、遺伝子導入などの最も重要な治療法には新しい技術が使われています。そのため、これらの臨床試験では安全性と有効性を絶対的に確保するために細心の注意が必要です。交通のことや、治療的な意味が少ないときでも筋生検を何回もしなければならぬなど様々な困難があると思いますが、研究者がより多くの研究を行うためにはこのようなあなたの協力が必要となるでしょう。あなたのお子様がより多く参加して下さることが重要なのです。

DMD は単純な疾患ではありません。おそらく、一つの治療法ですべての患者を救うことは不可能でしょう。いくつかの異なった技術を組み合わせることで最も有効な治療法になることでしょう。そして、すべての人が救われるでしょう。PTC124 は Phase III の臨床試験に入りました。臨床試験においてエクソン 51 が初めにスキップされました。この後、他のエクソンが追従し、難治で稀な変異についても行われることでしょう。疾患の根治は出来ないが進行を遅くすることが出来る治療法でよい結果を示した臨床試験は準備されています。この治療により患者はより有効で永続的な治療法が出来るまでの間、待つことが出来ます。

多くの現在開発されつつある治療法は変異の種類に対応した個別なものになるでしょう。どの治療法を選択すべきか決定するために、DMD 患者の遺伝子変異を正確に調べておくことが大変重要です。遺伝子異常を正確に解析する強力な検査法が存在しており、この検査法によって母親や彼女の女性の親類の遺伝相談においても大変信頼性のあるアドバイスを行うことが出来ます。

従って、以下のことが私たちの見解です。『DMD 患者の子供や少年はどこに住んでいても、正確で時期を逸しない診断、遺伝子検査、人工的な補助具を使ったケア、臨床試験に

参加する機会、そして有望な治療法を受ける必要がありますし、またその権利もあります。
DMD を根絶するために、私たちは一つになって 8,800 日しかない DMD 患者の人生を
25,000 日以上にしなければなりません。』