

デュシェンヌ型筋ジストロフィー治療の最前線

第一部 エクソンスキッピング

2009年10月3日改訂

これは2009年4月30日に発表したエクソンスキッピングに関する報告の改訂第1弾です。エクソンスキッピングはデュシェンヌ型筋ジストロフィーに効果が期待される最先端の遺伝子治療法です。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さん、ご家族、そして看護・治療に関わるみなさんに、現在行われている最新の研究成果をお伝えするために、ドイツの生化学者であるギュンター・ショイヤーブラントは多くの報告を著しており、本稿はそのうちの1つです。この報告は科学論文ではなく、生化学や遺伝学の知識がない方たちにも研究室で行われていることを理解していただくためのもので、平易な言葉を使って書くことに努めました。

エクソンスキッピングについて述べた本稿は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に関する様々な研究を紹介するレポートの第1部です。第2部も数ヶ月以内に発表する予定です。今後は、筋肉へのジストロフィン遺伝子の導入、幹細胞の応用、ユートロフィンのアップレギュレーション、その他の薬物治療の可能性などエクソンスキッピング以外の治療法についての最新の情報や、筋ジストロフィーの診断方法について順次ご紹介する予定です。

情報は学会などで新しい報告があれば、その都度更新します。ここではデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療についての研究成果を発表しますが、私は医師ではありませんので患者さんのケアや医学的管理に関わることは他の資料を参照していただきたく存じます。

本稿では初版の内容に、英国とオランダでのエクソン51のスキッピングの治験結果、ペプチド抱合型アンチセンスオリゴでの非常に有望な結果、U1スプライシング因子による遺伝子のエクソンスキッピング、オクタ-グアニン型のアンチセンスオリゴについて加筆し、その他いくつかの修正を加えました。

この報告は当初英語で発表しましたが、その後ドイツ語に翻訳し、またメキシコ人のベッカ-型筋ジストロフィー患者であるRicardo Rojasによってスペイン語にも翻訳されました。私のウェブサイトでは日本語を含めた各国語の翻訳版を見ることができます。

www.duchenne-information.eu

これらの研究は様々な研究所でチームとして行われたものですが、本稿では簡潔を期するため研究所の責任者の名前だけを記しています。参加されているのは博士号を持った大学教授などですが、敬称は省略させていただきました。

重要な参考文献は巻末にリストし、カッコ内の番号で本文から検索できるように記載しまし

た。

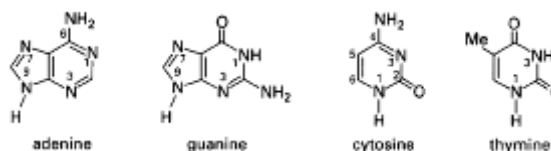
エクソスキッピングやその他のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの研究に関してのご質問は、電子メールgscheuerbrandt@t-online.deにて英語などで受け付けております。

遺伝子からたんぱく質が作られる



デオキシリボ核酸 (DNA) という遺伝物質からなる機能的な単位のことを、**遺伝子**といます。その構造は 1953 年に James Watson と Frances Crick によりねじ曲がった梯子のような形をしていることが発見され、二重らせん構造と呼ばれています。

はしごの棧にあたるそれぞれの横棒は、4 種類の**塩基**、すなわちアデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C) という小さな分子が 2 つずつ組み合わさってできています。これらの塩基を**遺伝文字**といます。横木を作ることのできる組み合わせは決まっており、**塩基対**とよばれる A-T または G-C の組み合わせでなくてはなりません。4 種類の塩基の化学式は図のようになっていきます。



たとえば一方の DNA が GGCTTAATCGT という塩基の配列を持っているとすれば、それに向かいあう DNA は対応する (相補的な) 塩基配列をもつことになります。A が T に対応し、G が C に対応すると、下の様な組み合わせができあがります。

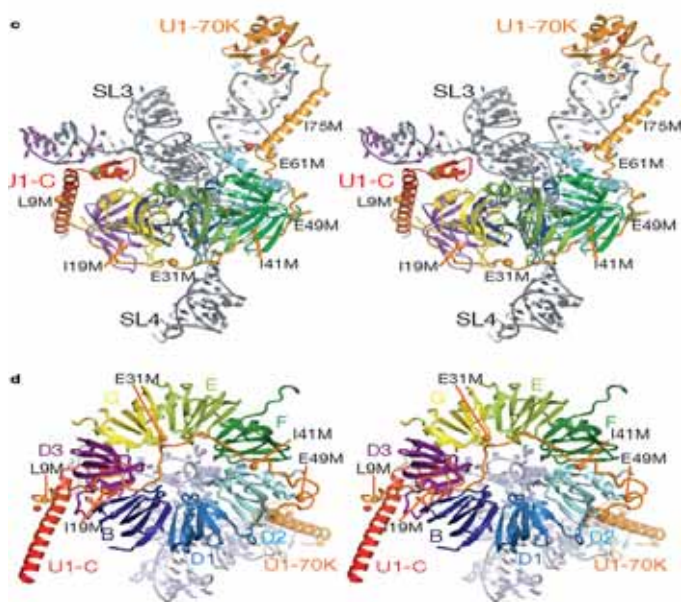


このような塩基の配列が**遺伝情報**で、生物の生命維持、発達に必要な不可欠で、さらに次の世代へと受け継がれていくものです。

遺伝子の大部分は生体内で**タンパク合成**のための指令を出します。細胞の中にある核では、活性化された遺伝子が発現し、次の段階の遺伝物質である**プレメッセンジャーリボ核酸 (pre-mRNA)** に**転写**されます。遺伝子の中で、このようにタンパク合成の情報を担う部分を**エクソン**といます。一方それよりも大きな、直接タンパクをコードしていない部分があり、これを**イントロン**といます。イントロンはかつて「不要な遺伝子」と考えられていましたが、今では遺伝子の活動をコントロールする重要な情報を含んでいることがわかってきています。**RNA** では、DNA の塩基である T の代わりにウラシル (U) という塩基が使われます。

核の中で転写された pre-mRNA は、次にイントロンが取り除かれ、タンパク情報を持った**エクソンのみ**から成る**メッセンジャーRNA (mRNA)** になります。この過程を**スプライシング**といます。

mRNA は合成されると核を出て、細胞質でタンパクを合成する場所であるリボソームに移動します。スプライス部位というのはエクソン内にある特定の配列で、pre-mRNA からイントロンを正しく取り除くために重要です。スプライシングはたくさんのタンパクと小さな RNA から成るスプライスソームにより行われます。



細胞の働きについて科学でどのくらい解明されたかを示す一例として、ヒトのスプライスソームの 5 通りの構造のうちの一つを立体図で示します。U1 snRNP と呼ばれるこの小さな複合体の構造は、2009 年 3 月に Nature 誌に発表されました(1)。この U1 複合体は、10 個のタンパクと 1 個の RNA からできています。左の図を左眼で、右の図を右眼で凝視してみてください。左右の図の間に立体図が見えてくるでしょう。オレンジの線で示した U1C-70K がエクソンとイントロンの境界を判断するのに最も重要で、スプライシング反応を制御する部分です。

る部分です。

この図は概念図です。実際には色がついているわけではなくて、全てが灰色のゼリーのように見えるのです。この最新の研究結果から、現代科学でものごとがどのように説明されているかという一例を見ていただきました。実際のエクソンスキッピングにも、これと類似した複合体である U7 snRNA という物質が使われているのです。(18 ページ)

遺伝コード . 遺伝文字の情報がタンパクに翻訳される過程について説明します。タンパクはアミノ酸からできていますが、mRNA の塩基は 3 つで一組のコドンとよばれる暗号になっていて、それぞれ 20 種類のアミノ酸をコードしています。例えば、GUU はバリン、AGC はセリン、AUG はメチオニン、CCA はプロリン、UUU はフェニルアラニン、GCA はアラニン、GCG はアラニンというアミノ酸を示しています。4 種類の遺伝文字 3 つの順列なので 64 のコドンがありますが、このうち 3 つは例外で、何もアミノ酸をコードしていません。

多くのアミノ酸は 2 つ以上の RNA コードに対応しています。コドンは句読点で区切られていませんから、どこから読み始めるのかを示す記号が必要です。これを読み取り枠 (reading frame) といって、必ず AUG から始まる決まりになっています。読み取り枠が 1 塩基または 2 塩基ずれてしまったら、その後続くコドンは意味が変わってしまい、全く別のアミノ酸を作り出してしまいます。このことは、エクソンスキッピング治療のしくみを理解するのに重要な点です。

リボソームでは、mRNA の遺伝コードの読み取りと翻訳が行われ、たくさんの、何千ものアミノ酸がつながってタンパクが作られます。上に述べたコドンの 3 つの例外というのは UAA、UAG、UGA で、これらは**停止コドン**と呼ばれ、タンパクの合成を終了させる合図になっています。

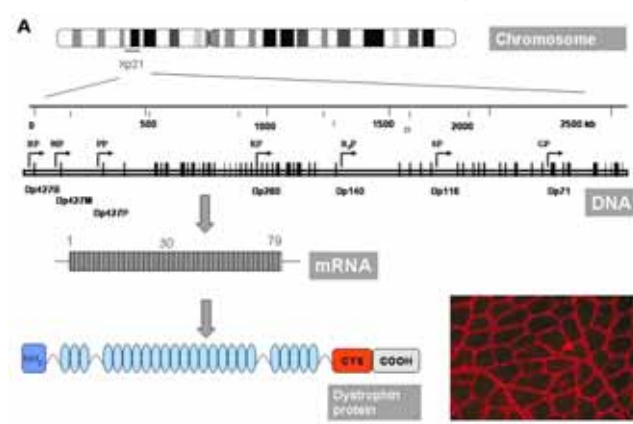
RNA からタンパクが作られるまでの過程を、生体内で実際に行われるのと同じ速度で再現した動画を、下記で見ることができます。Ctrl キーを押しながらアドレスをクリックするとリンクします。画面右下にある HQ ボタンの右側のボタンをクリックするとフルスクリーン表示になります。音声も聞くことができます。

www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM&feature=related

リボソームが mRNA の遺伝情報を読み取ってアミノ酸を組み立て、蛋白を合成するのに要する時間を測定した結果が最近発表されました (26)。それによると平均 2.9 秒でアミノ酸が 1 個追加されるのです。ジストロフィン蛋白は 3685 個のアミノ酸からできており、このとても大きな蛋白を合成するにはおよそ 3 時間かかると推測されます。

ジストロフィン遺伝子とタンパク

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは 3500 出生に 1 人の割合で男の子だけに発症します。女性は保因者となって、息子に発症する確率は 2 分の 1 になります。時々家族歴のない家系に突然発症することもあります。この病気を完治させる方法はまだ見つかっていませんが、**ジストロフィン遺伝子**という、現在知られている 20,488 のヒトの遺伝子のなかで最も大きな遺伝子の変異によって起こることが分かっています。次の図はこの遺伝子が X 染色体のどこに位置するかを示したものです。その DNA は 2,220,223 文字からできていて、**79 のエクソン**と、タンパクの合成開始に関する指令を出す 7 つのプロモーターという部分を持っています。スプライシングにより mRNA は 11,058 文字、DNA の 0.5% のサイズになります。リボソームでこの mRNA の情報は 3685 のアミノ酸に翻訳され、トランスファー RNA (tRNA) と呼ばれる別の RNA によってタンパク合成部位に運ばれて、**ジストロフィンタンパク**ができあがります。

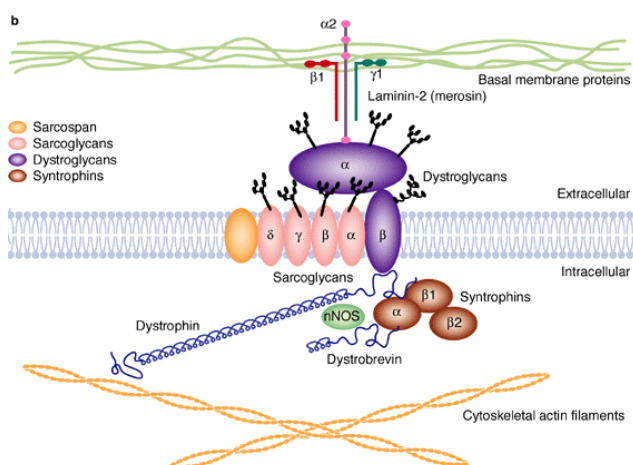


ジストロフィンタンパクは棒のような形をしていて、ちょうつがいのような連結部によって 4 つに分けられる 24 のアミノ酸のくりかえしからできています。両端の部分を N 末端、C 末端といい、またシステインやイオウを多く含む部分もあります。右端に示したのは、細胞膜のジストロフィンタンパクを蛍光抗体法で染色した筋肉の顕微鏡写真です。

ジストロフィン遺伝子・ジストロフィンタンパクの大きさ・ジストロフィン遺伝子の二重らせ

ん構造の大きさは、0.75mm です。これが細胞の核の中では、他の 2 万個のヒトの遺伝子とあわせて 0.01mm の大きさに圧縮されてしまっておりあります。ジストロフィンタンパクは遺伝子よりもさらに小さく、125nm (1mm = 100 万ナノメートル) しかありません。8000 個のジストロフィンタンパクを一行に並べても、たった 1 ミリメートルにしかありません。1 グラムの筋肉の中には、1140 億のジストロフィンタンパクが入っているのです。

ジストロフィンの役割 . ジストロフィンは筋肉の細胞を壊れにくくする役割を持っています。筋細胞の細胞膜の内側であって、ジストロフィンタンパクの C 末端は細胞膜の他のタンパクと



結合し、**ジストロフィン・グリコプロテイン複合体**を作っています。一方の N 末端は筋細胞の内部にある、細胞が収縮するための構造とつながっています。ジストロフィンタンパクの中央部分のアミノ酸は図のようにねじれた形になっていて、筋肉が収縮したり引き伸ばされたりするたびにバネのように伸縮して、緩衝材の役割をしています。このようにジストロフィンは、アクチン - ミオシンによる筋肉の収縮により生じ

る機械的なエネルギーから、細胞膜や周りの結合組織、腱などにバランスよく伝え、過度の衝撃が加わらないように調節する役割を担っています。

ジストロフィンの役割はこれだけではありません。ジストロフィン・グリコプロテイン複合体の構造は、他の多くのタンパクの細胞内での配置を決めるために重要です。さらに細胞内外でのカルシウムイオンの濃度を調節し、細胞の成長にも関与しています。このような複雑な細胞内の伝達物質については、まだ解明されていないことも多いのです。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんは、筋線維のなかに全く、あるいはほんの少ししかジストロフィンがないのです。ジストロフィンは筋細胞の構造を保つ役割を担っているので、これがなくなると細胞膜が壊れて、通常より多量のカルシウムイオンが筋線維の中に流れ込んでしまいます。過度のカルシウムはカルペインやプロテアーゼといったような、筋肉を壊したりアポトーシスと呼ばれる細胞死のプログラムを起動させる酵素を活性化します。その結果炎症と似たような反応が起こります。すなわち線維芽細胞が活性化されて線維化が起こります。すると組織が癒痕化して、筋細胞が再生されにくくなり、年長のデュシェンヌ型筋ジストロフィーにみられるような症状を来します。

進行がより緩徐なベッカー型筋ジストロフィーの患者さんでは、ジストロフィンの量が正常より少なく、大きさも正常より短いのです。このような不完全なジストロフィンは正常ほどしっかりと機能しませんが、何とかその役割を果たしています。

ジストロフィンがなくなると困るのは体を動かす骨格筋だけではありません。心臓の筋肉が弱ると心筋症をおこします。血管の平滑筋が弱ると血流の増加に対応できなくなって呼吸などの問題が起こりますし、消化管の平滑筋の障害により腸の動きが悪くなることもあります。たった一つの遺伝子の異常で、体の色々なところが異常を来たすのです。

エクソンスキッピング

研究の使命 . 5歳で30kgの健康な男子の筋肉は約12kgで、この中に1500兆個のジストロフィン分子が含まれています。5歳のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患児には、6kgしか筋肉がなく、ジストロフィンほとんど含まれていません。これは遺伝子に異常があって、正しくジストロフィタンパクを合成できないからです。残っている筋肉を正常に動かすためには、正常の30%のジストロフィンさえあればいいと言われていています(2)。筋肉の量が6kgだとすれば、必要なジストロフィンは200兆個です。完全に正常なジストロフィタンパクでなくて、少し短くても、働きさえすれば構わないのです。

エクソンスキッピング、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子治療 . 1990年代半ばに、オランダのライデン大学の **Gertjan van Ommen** が大きな副作用を起こさずに遺伝子治療を長期にわたって奏功させるにはどうすればよいかを説明してくれました。これが**エクソンスキッピング**と呼ばれる治療法で、この15年間日本のみならずオーストラリア、英国、アメリカ合衆国などで複数のグループによって研究されていて、マウスやイヌによる動物実験を経て、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんにも実際に試みられています。

エクソン51のスキッピングに関しては、局所または全身投与による臨床試験がオランダの **Prosensa** 社、アメリカの **AVI BioPharma** 社の協力を得て MDEX コンソーシアムの指揮下で進行しています。Van Ommen のほかに、オランダでは **Judith van Deutekom** や **Annemieke Aartsma-Rus** らのグループや、イギリスでは **Kate Bushby** や **Francesco Muntoni** らのグループがこの研究を行っています。

エクソンスキッピングの直訳は「エクソンの読み飛ばし」です。エクソンは遺伝子のタンパクをコードする部分です。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんの多くは、エクソンがいくつかなくなっていたり、重複していたり、あるいは遺伝文字が間違っていたりします。これにより遺伝子からのタンパクの合成が妨げられて、ジストロフィタンパクが作れなくなるのです。これらの間違いを正してやれば、つまり異常のあるエクソンを読み飛ばしてその先のエクソンへつなげることができれば、またタンパクが作れるようになるのです(3)。

このような読み飛ばしのために用いられるのが**アンチセンスオリゴヌクレオチド(AO)**です。これは20から30個の塩基からなる小さな遺伝物質で、異常のあるエクソンに相補的に作られて結合するように作られており、これを読み飛ばすことができます。AOはオーストラリアのパーズで **Steve Wilton** らによって79個全てのエクソンに対応するものが作成されており(4)。

オランダのライデンでも **Annemieke Aartsma-Rus** らによって 39 種類のエクソンに対する AO が作られています。AO は目的とするエクソンの翻訳を妨げ、他のエクソンには作用しないという特異性を持っています。

デュシェンヌ型からベッカー型筋ジストロフィーに変化させる . 変異およびその治療のためのエクソンスキッピングによって失われた部分のエクソンがコードしていたはずのアミノ酸は、新しく作られるジストロフィンからは失われることとなります。なのでこの治療で作られるようになるジストロフィンには正常のものより短いけれども、筋細胞を守る機能はいくらか残っているのです。そのため病気の症状は軽くなり、筋肉の変性のスピードもゆっくりになり、寿命ものびて一部では正常と同じくらい長生きできる人もでてきます。デュシェンヌ型筋ジストロフィーはこうして、より軽症のベッカー型筋ジストロフィーと同じような症状を呈するようになります。

完治というわけではない . この治療により症状はかなり軽快しますが、治療をしても病気が完治するわけではありません。いくらか症状は残りますが、ある程度の有効性がある治療法であることは確かです。異常のある遺伝子はこの治療をしても正常になるわけではありませんが、その遺伝子をうまく読み取ってなるべく症状を軽くするための方法です。

動物実験 . エクソンスキッピングは筋ジストロフィーのマウスやイヌで試され、成功しています。筋肉に AO を局所投与したり、さらには静脈投与をして、心臓や肺を含む全身の筋肉にいきわたるように試みました。全身投与の多くの例で、筋肉の機能の大きな改善が得られました。もっとも重要な論文として、mdx マウスに AO を静脈投与した 2005 年の **Terence Partridge** らの報告を挙げておきましょう (5)。

ジストロフィン遺伝子の変異 . ジストロフィンの変異にはどのようなものがあるのかを調べた報告は数多くあります。最も大規模なものとしては、2006 年に **Annemieke Aartsma-Rus** らがライデン大学に登録されている 4700 人の遺伝子変異のデータをまとめています (6) 。それによると、1 つ以上のエクソンの欠失が 72% を占めています。1 つ以上のエクソンの重複は 7% に見られました。点変異といって 1 文字単位の小さな欠失や挿入が 20% に認められ、残りの 1% はまれな変異、たとえばスプライス部位の異常や遺伝子の大きな構造変化などによるものでした。

著者らは 91% の例で読み枠ルールが当てはまると結論しています。読み枠ルールというのは、遺伝文字の読み枠がずれてしまう out-of-frame の変異はデュシェンヌ型、ずれの生じない in-frame の変異はベッカー型の筋ジストロフィーを起こすというものです。そしてこのルールの例外のように見える場合でも、mRNA レベルで調べてみるとこのルールに従うと言われています。しかし多くの例では、通常の遺伝子検査の段階では mRNA の配列までは分かりません。エクソンスキッピング治療を行う前には組織の培養実験をして、この治療により in-frame の

mRNA が作られるかどうかを確認することが望ましいようです。

エクソンスキッピングの適応 . デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状は多くの患者さんで共通していますが、遺伝子変異は大きなジストロフィン遺伝子の様々な場所で起こりえるため、人によって病気の原因は異なります。従ってエクソンスキッピング治療はどのような**遺伝子異常を持っているか**によって異なってきます。**オーダーメイド治療**が必要ということです。患者さんごとに、遺伝子異常の場所や種類に応じた AO が必要になりますが、多くの場合いくつかの条件が合えば共通の AO を使うことができるのです。

Annemieke Aartsma-Rus らは、2008 年 3 月 11 日までの時点でライデン大学に登録されていた遺伝子欠失、点変異、または重複をもつデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象に、1 つまたは 2 つのエクソンスキッピング治療の対象になるかどうかを検討しました。登録されていた 4770 人から、エクソンスキッピングの対象となる 120 のグループが抽出されました。そのうち人数の多かった上位 8 グループを示します。

Rank	Exon to be skipped	% of all patients
1	51	13.0
2	45	8.1
3	53	7.7
4	44	6.2
5	46	4.3
6	52	4.1
7	50	4.0
8	43	3.8
1-8		51.2%

このリストは 2009 年 3 月に論文として発表されています (7)。文献が必要な方は、私にご連絡ください。

この短いリストに示したように、患者さん全体の 13% はエクソン 51 のスキッピングが必要です。エクソン 51 用の AO は最も多くの患者さんのための治療薬となる可能性があります。そのためオランダとイギリスの科学者は、できるだけ早くこれに該当する患者さんに薬を届けるために、エクソン 51 を読み飛ばす薬の開発に力を注いできました。オランダの Prosensa 社はエクソン 51 のスキッピングが成功すれば、グループ 2~8 のためのエクソンスキッピングも開発する意向を示しています。この優先リストにあるすべてのエクソンスキッピングが可能になれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんの半分以上を治療することができます。

2 つ以上のエクソンスキッピング . デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、読み枠を正常にするために 2 つ以上のエクソンを読み飛ばさなければならないこともあります。

理論的には、エクソン 45 から 55 までの 11 個のエクソンを読み飛ばすことができれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの 63% にあたる患者さんをベッカー型の軽い症状に変えることが

できると考えられていました(8)。

Annemieke Aartsma-Rusらは健常人、エクソン 48-50 の欠失またはエクソン 46-50 の欠失を持つデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者 2 名の筋芽細胞を培養して、これら 11 個のエクソンを読み飛ばすことができるかどうか実験しました。11 個のエクソンに対応する 2' O-メチル AO 全てを加えたものなど様々な組み合わせを試してみました。すると目標としたエクソンが全て読み飛ばされたものから、一部の mRNA が低い濃度で検出されるものなどがでてきて、11 個の標的エクソンをうまく読み飛ばすことはできませんでした。長いイントロンによって短いエクソンのスプライシングが規則的に行われなかったのが原因の一つとして考えられました。

著者らは、この方法は理論的には非常に軽症のベッカー型筋ジストロフィーの状態を作り出すのに有効であるはずだが、現在の技術ではうまく 45-55 の全てのエクソンを読み飛ばすことはできなかったと結論しています(9)。

筋ジストロフィーのイヌの治療には 2 つのエクソンを同時に読み飛ばす必要があり、この試みがヒトのデュシェンヌ型筋ジストロフィーの複数のエクソンスキッピングに道を拓いてくれるかもしれません。イヌでの 3 つのエクソンスキッピングに成功した報告は 2009 年 3 月に発表されており、これについて少し述べます(10)。この成功は患者さんやご家族から非常に期待を寄せられました。しかしこの報告ではエクソンを 2 つか 3 つ読み飛ばすことは技術的に可能だということを示しているにとどまり、45-55 の 11 個のエクソンをうまく読み飛ばすにはまだ至っていないのが現実です。

イヌにおける複数のエクソンスキッピング。ワシントンの Children's National Medical Center の **Eric Hoffman** と **Terence Partridge**、東京の General Animal Research Facility の **Takeda**らは筋ジストロフィーの CXMD ビーグル犬にモルフォリノアンチセンスオリゴ(AO)の混合物を投与して、複数のエクソンスキッピングに成功しました(10)。Mdx マウスは非常に症状が軽症ですが、このイヌは臨床症状があり、しかも体格がマウスよりも大きいため実際の人間の患者により役立つ情報が得られると考えられます。またマウスよりイヌの方が寿命が長いので、投与後長期間の経過観察も可能になります。

このイヌでは、ジストロフィン遺伝子のエクソン 7 のスプライシング部位に変異があるため mRNA からエクソン 7 が失われ、それ以降の読み枠がずれた結果、すぐ後に停止コドンが出現してタンパクの合成が止まってしまう。この前後のエクソン 6 からエクソン 8 をスキップすれば、読み枠はずれずに不完全ながらもジストロフィンタンパクが合成できるはずだ。

生きたイヌに投与するまでに、これらのイヌから採取された筋芽細胞での予備試験を行いました。エクソン 6 と 8 の内部にある配列と、エクソン 6 とイントロン 6、エクソン 8 とイントロン 8 の境目にある配列をターゲットにして 4 種類の AO を作成しました。培養された細胞に取り込ませるために、電気的に中性のモルフォリノではなく電荷をもった 2' O-メチル AO を用いました。4 種類の AO 全ての混合物や、単独のものなどさまざまな組み合わせを試しました。

この実験の結果、筋芽細胞が筋管とよばれる組織に発育した 4 日後に、mRNA のエクソン 5

の次にエクソン 10 の始まりがつながっていることが分かりました。不思議なことに、欠失していたエクソン 7 と、AO によりスキップされたエクソン 6 と 8 のみならず、AO が結合していないはずのエクソン 9 も読み飛ばされていたのです。なぜこのようなことが起こったのかは分かっていません。しかしエクソン 9 を読み飛ばしても幸い読み枠は保たれていたため、この治療の効果に悪影響はありませんでした。発育した筋管からはジストロフィンタンパクが検出されました。単独の AO での実験ではエクソン 8 とイントロン 9 の境界に対する AO はこの読み飛ばしに関与しないことが示されたので、実際のイヌには 3 種類の AO、すなわち Ex6A、Ex6B、EX8A のみを投与しました。

次に、3 種類の AO の混合物を 0.5mg または 1.2mg ずつ前脛骨筋に局所注入する実験を行い、生後 6 ヶ月と生後 5 年のイヌにそれぞれ投与しました。今回は 2'O-メチル AO とモルフォリノをそれぞれ試しました。注射部位の周りでは、61 ~ 83% の mRNA でエクソン 6、7、8、9 が抜けていました。1.2mg のモルフォリノ投与により、ほぼ正常に近い量のジストロフィンタンパクが出現し、2'O-メチル AO でも同様の結果でした。ジストロフィンをもつ細胞の構造は有意に改善していて、若いイヌの方が 5 歳のイヌよりもより高い効果を得ました。

このように、筋肉の質によって作られるジストロフィンの量が変わるということは、エクソンスキッピング治療は可能な限り早期に行うのが望ましいということです。もう一つの注意点は、培養細胞ではエクソン 6 に対する AO だけでエクソン 6-9 のスキッピングが起こったのに対し、実際の局所注入試験ではこの現象はみられず、全領域に対する AO が必要だったことです。AO が有効かどうかのスクリーニングでは、培養試験の結果を鵜呑みにはできないことが分かりました。

全身投与の実験は、東京のタケダシンイチらが 3 匹の生後 2 ヶ月のイヌの足の静脈に 3 種類のモルフォリノ混合物を注射して行いました。1 匹目は 120mg/kg、週 1 回を 5 週間、2 匹目は同じ量を 2 週間に 1 回、全部で 11 回、5 ヶ月半かけて投与され、3 匹目は 200mg/kg 週 1 回を 7 週間投与されました。最終の注射から 2 週間後、筋肉を検査しました。

3 匹とも正常の 50% までのジストロフィンが作られていましたが、いくつかの筋肉、特に心臓の筋肉ではほんの少ししかジストロフィンが作られませんでした。最も大量の投薬を受けたイヌでは、平均して正常の 26% の量のジストロフィンが検出され、これだけあれば筋肉の機能を保つことができます。新しく作られたジストロフィンは mRNA のエクソン 6、7、8、9 に相当するアミノ酸が欠けていました。つまり、もともと欠損しているエクソン 7 と、スキッピングで飛ばされたエクソン 6、8 のみならず、なぜかエクソン 9 も読み飛ばされていたのです。

治療を受けないイヌでは時間とともに筋肉の破壊が進みますが、治療を受けたイヌはいくつかの筋肉の機能検査で治療後も状態が安定していることが確認されました。このように、全身投与による治療は筋肉の破壊を食い止めることができるようです。核磁気共鳴検査 (MRI) によって筋肉の構造を調べました。この検査は、筋生検のような体に傷をつける検査と同じくらい有益な情報を、痛みを伴わずに得ることができる検査です。エクソンスキッピング治療のあとの経過観察のための検査として、今後ますます有用性が増すことでしょう。

このように、モルフォリノアンチセンスオリゴ (AO) による治療は人間と似たからだの構造をもつ大型の哺乳類でも有効性が示されました。この薬品は毒性がなく、免疫反応も起こしません。しかし効果が長続きしないため繰り返しの投与が必要です。裏を返せば、もし問題が生じた場合には治療を中断することもできます。AO はジストロフィン遺伝子がプレ mRNA に転写される筋肉のような組織でのみ効果を発揮します。

私のウェブサイトで、この治療を受けたイヌの画像が見られます。

<http://www.duchenne-information.eu/home-en.htm>

重複へのエクソンスキッピングの応用 . 1 つ以上のエクソンの重複によって読み枠がずれてしまうタイプの変異は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの約 7% に見られます。原理的には、重複したもとの遺伝子には触れずに、余分の遺伝子だけ読み飛ばすことができれば正常と同じ mRNA が作られ、エクソンスキッピング治療によって根本治療ができるはずですが。

しかし現実はその単純にはいきません。もとの遺伝子と、重複した遺伝子を AO が見分ける方法がないからです。**Annemieke Aartsma-Rus** らは重複をもつデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋肉細胞を培養して研究をしました (11)。

この試験管内の実験では、重複したエクソン 45 の一方のみを読み飛ばすことに成功し、筋繊維のうちの 80% が 2 日後には正常のジストロフィンを持つようになりました。一方で、エクソン 44 の重複をもつ兄弟の筋肉を用いた実験では、2 つあるエクソン 44 のうち片方だけを読み飛ばすことはできませんでした。しかしこの場合には 2 つのエクソン 44 に加えてエクソン 43 も飛ばしてしまえば読み枠のずれを解消することができます。さらに大きなエクソン 52-62 の重複にも挑戦しましたが、うまくいきませんでした。

エクソン 8-11 の重複をもつ患者さんの家族からの要望に応じて、Annemieke は治療の難しさを以下のように説明しました。「必要なのはエクソン 8-11 を認識する AO ですが、この AO はもともとのエクソンと、重複による余分のエクソンを見分けることができません。すると読み飛ばされるのはもともとのエクソン 8 のみの場合、重複したエクソン 8 のみの場合、それに両方のエクソン 8 がスキップされる場合と 3 通りの可能性があります。エクソン 9 についても同じことが言えます。そうすると、組み合わせによって読み枠のずれが生じたり生じなかったりとならばらになって、治療の効果が薄まってしまいます。AO の量を増やしても状況は変わりません。何とかうまい手はないかと試行錯誤していますが、欠失の場合と同じように単純にはいきません。大きな重複を持つ患者さんに、エクソンスキッピングが適切な治療法なのかどうか、またそうだとすればどういう場合に有効なのか、まだ分かっていないのです。」

点変異に対するエクソンスキッピング治療 . 点変異というのは、遺伝子の 1 つまたは数個の文字が別のものに置き換わってしまう変異です。変異により 1 文字挿入されたり抜けたりするだけで、読み枠がずれてしまいます。あるいは、1 文字入れ変わっただけで読み枠はずれなくても、そこにコードされるアミノ酸が変わってしまう場合もあります。その変化がジストロフィンタ

ンパクの構造を変えるほどのものでなければ、何の症状も出ないこともあります。逆に停止コドンのような、その後のタンパク合成を止めてしまうコドンが生じるとデュシェンヌ型筋ジストロフィーが発症します。将来的には、このような停止コドンの生じるタイプはすでに臨床試験が始まっている PTC124 という新薬により治療が可能になるでしょう。もし停止コドンのできたエクソンが丸ごと抜け落ちて読み枠のずれを起こさない場所であれば、スキッピングで読み飛ばしてしまうこともできるでしょう。またそのエクソンのみ読み飛ばすと読み枠がずれてしまうのであれば、その前後のエクソンも一緒に読み飛ばして、枠がずれないようにすればよいのです (12)。

まれな変異に対するエクソンスキッピング . エクソンとイントロンの境目にあるスプライス部位といわれる部分の変異がある場合にも、エクソンスキッピングを応用することができます。例としてまた Annemieke Aartsma-Rus の話を引用します。アルゼンチン出身のトーマスという患者さんは、イントロン 46 のはじめにある塩基が A から T に変異したために比較的軽症のデュシェンヌ型筋ジストロフィーを発症しました。その理由を彼女はこう説明しています。

「この変異によって mRNA を作る時に自然のエクソンスキッピングが起こり、エクソン 46 が自動的に読み飛ばされているのでしょうか。このスプライス部位は正常ではこのエクソンを活性化させる働きをしていますが、変異によって働きが強く抑制されてしまったのでしょうか。この患者さんでは mRNA を調べればエクソン 46 のスキップが見つかるはずですが、しかしこれは仮説ですから、筋肉の mRNA を調べてみないことにはどの程度エクソン 46 が読み飛ばされているかはわかりません。完全なスキッピングではなくて部分的に翻訳されているのなら、トーマスはジストロフィンの量は少ないけれども症状が穏やかであることの説明がつかず。もし mRNA を調べてエクソン 46 が全く見当たらないなら、エクソン 46 の欠失が読み枠のずれを引き起こしているため、エクソン 45 を一緒に読み飛ばせば改善すると予想されます。」

私の息子にエクソンスキッピングは適応できますか? 世界中のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さん、ご家族からこの質問が寄せられています。エクソンスキッピングは変異の種類により異なる治療法なので、まずはどのような変異を持っているのか調べる必要があります。MLPA 法(multiplex ligation-dependent probe amplification)という検査で、患児や母系のご家族のジストロフィン遺伝子の 79 個のエクソンの異常をスクリーニングすることができます。

知られている変異(欠失、重複、点変異など)が見つければ、ジストロフィン mRNA に含まれる 79 のエクソン、13990 塩基(文字)について調べることもできます。Leiden Muscular Dystrophy Pages というウェブサイトから、この塩基配列をダウンロードできます。

www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html

この配列を見ると、ある遺伝子異常が読み枠のずれを起こすかどうか、症状としてデュシェンヌ型になるのかベッカー型になるのかといった情報が得られます。

エクソンの端のほうの配列を見ることで、読み枠のずれを修正するためにどのエクソンを飛

ばすのが適切か調べることもできます。この報告の最後のページに、エクソン 50 の欠失による読み枠のずれをエクソン 51 のスキッピングにより修正する場合の詳しい説明を載せています。同様に、あなた方の息子さんにどのようなエクソンスキッピングが必要かを知ることができます。

ただこの作業を実行するには経験が必要です。Annemieke Aartsma-Rus は博士論文で、変異が分かったときにどのエクソンをスキップすればよいかという一覧表を作っており、ウェブサイトで見ることがもできます。

欠失：www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20deletions.pdf

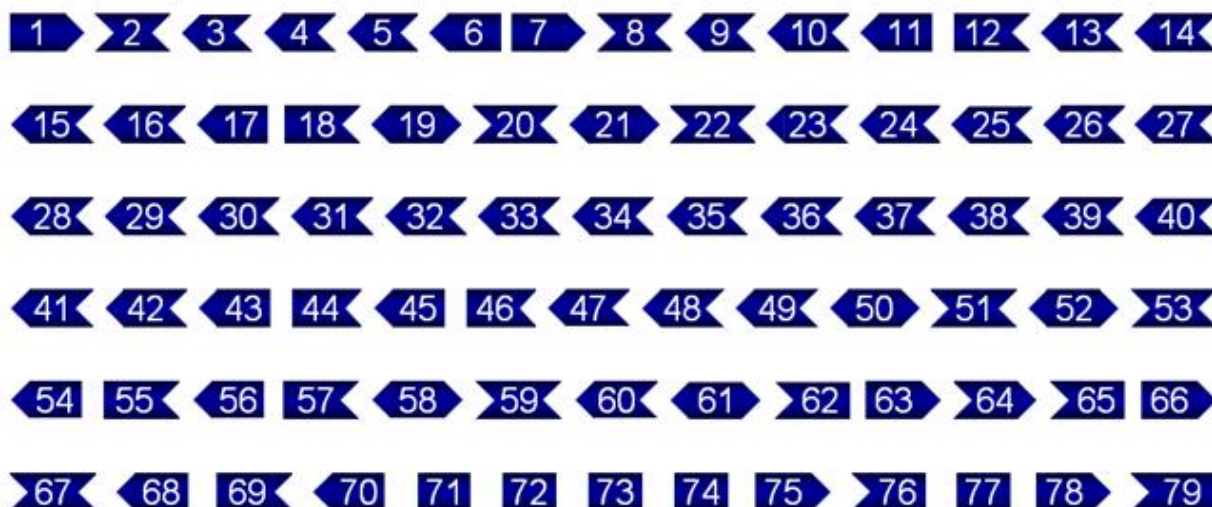
重複：www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20duplications.pdf

点変異：www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20point%20mutations.pdf

欠失の例について 10 個ほど抜粋します。

Deleted exons	Exon(s) to skip
40 – 43	44
43 – 45	46
43 – 50	51
43 – 52	53
44	43 or 45
44 – 50	43+51
46 – 47	45
46 – 52	45+53 or 53+54
48 – 50	51
51 – 53	50

ジストロフィン遺伝子の変異 欠失、重複、ナンセンス変異など が分かっているならば、他にも簡単にどのエクソンをスキップさせるべきかを見つける方法があります。下記に Annemieke が 2009 年の PPMD の定期集会で示したスライドから、79 個のエクソンの配置のコピーを示します。



この図において2つのエクソンの境目が左向きに凸であればエクソンの境目は3つ組みコードンの境目と一致しており、右に凸であればコードンの1文字目と2文字目の間、直線であれば2文字目と3文字目の間にエクソンの境目があることを示しています。

どのエクソンをスキップさせればよいかを調べるには、患者さんに欠失しているエクソンに斜線をひき、残ったエクソンが3通りの「自然な」結合をしようかどうかを見るのです。例えば、エクソン45から52の8つが欠失しているとしましょう。この時エクソン44とエクソン53は結合できません。しかしエクソン53をスキップさせれば、エクソン44の最後からエクソン54の始まりに正常な結合を作ることができます。あるいは、エクソン44から50の欠失ではエクソン43とエクソン51をスキップさせれば、エクソン42とエクソン52が結合しうることが分かります。また、例えばエクソン44は読み枠のずれを来たしデュシェンヌ型筋ジストロフィーを発症するのに対し、エクソン48から51の欠失では読み枠のずれを来たさないのでベッカー型筋ジストロフィーになるだろうと予想できます。このような考え方は、重複やナンセンス変異についても応用できます。

AnnemiekeはエクソンスキッピングやPTC124がどのようにして様々な変異に有効性をもつのかを彼女のウェブサイトで公開しています。

www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/index%20for%20parents.

興味深いことに、ジストロフィン遺伝子には「ホットスポット」と呼ばれる変異しやすい部分があります。変異の半分がエクソン45から53のいずれかの欠失で、20%がエクソン2から20に分布しているのです。

ご理解いただきたいのは、このリストとこれまでの説明からある患者さんのジストロフィンmRNAからどのエクソンをスキップさせればよいか分かっていても、この治療を行えば必ずデュシェンヌ型の重篤な症状がベッカー型筋ジストロフィーの軽度の症状に変わることを保証するものではないということです。ここで述べられているのは、理論的にこのような読み飛ばしをすれば読み枠のずれが修正されるはずだということだけのことです。前に述べたように「読み枠ルール」にはさまざまな例外があって、必ずしもこれらのエクソンを読み飛ばすだけでベッカー型のジストロフィンが作られるとは限らないのです。これについて **Terence Partridge**(13)と **Eric Hoffman**(14)が詳しく書いています。

すべての例外について、なぜ起こるのかまで解明されているわけではありません。例えば、欠失は必ずしもエクソンの内部で起こるとは限らず、大部分をエクソンとエクソンの間にあるイントロンが占める場合もあります。このような欠失の断端を見つけるには通常の遺伝子検査では不十分で、同じような欠失であっても切れ端は人により異なるかもしれません。イントロンは遺伝子の制御に重要な役割を果たしているため、イントロンの有無によって違った症状を引き起こすかもしれません。一方ジストロフィンタンパクの中にも重要な部分とそうでない部分があります。いくつかの欠失はエクソンスキッピングで読み枠を修正しても、出来上がったタンパクにおいて構造上重要な部分が失われ、正常に機能しないかもしれません。

このように、エクソスキッピングは筋ジストロフィーの症状を和らげるために有効である場合もありますが、一人ひとりの患者さんの治療においては何が起こるか分からないという面もあるのです。

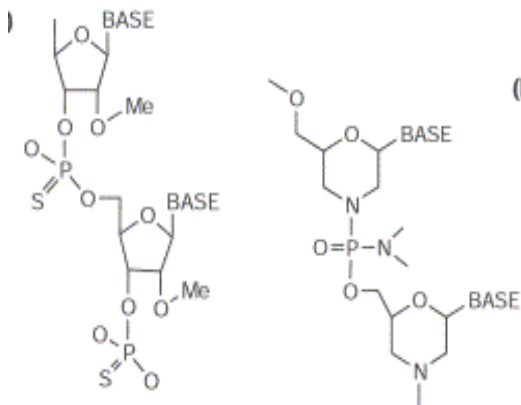
エクソスキッピングに用いられる様々な治療薬。現在アンチセンスオリゴは AO と略されるのが一般的で、合成されたヌクレオチドであるモルフォリノなどを含む様々なアンチセンス化合物のことを指します。

動物実験や臨床試験では 2 種類の化学的に安定化された AO が用いられました。細胞内には核酸を壊す酵素があるため、AO にあらかじめ壊れにくくするための処理をしておく必要があるのです。

オランダの研究者らは 2'-O-メチルフォスフォロチオエートという物質を使いました。これはリボースの 2 つ目の CO にメチル基(炭素と 3 つの水素の結合したもの)が付いていて、P に結合する酸素のうち 1 つがイオウ (S) に置き換わった構造をしています。モルフォリノは英国の研究者らが使ったもので、リンに結合する酸素原子の 1 つが 2 つのメチル基の付いた窒素 (N) から成るジメチルアミドに、リボース全体がモルフォリノリングという 4 つの炭素原子と酸素原子、窒素原子を 1 つずつ持つ構造に置き換わっています。化学式は下のようになります。(示してあるのは 2 塩基)

<2'-O-メチル AO>

<モルフォリノ AO>



オランダの治験に用いられた 2'-O-メチル AO は **PRO051** と呼ばれ、下のような 20 の遺伝文字を表しています。

UCUUUACGGUAGAAGGAACU

英国の治験に用いられたモルフォリノは **AVI-4658** といって、下線で示したようにオランダの AO と同じ配列を含む 30 文字からできています。

GAUCUUUACGGUAGAAGGAACUACAACCUC

いずれの AO もエクソン 51 の内部にあるエクソン-スプライシング-エンハンサー配列 (ESE) とその周囲の配列に相補的に作られて、ここに結合するようになっています。この配列は正常なスプライシングに重要で、ここを AO によって阻害されるとこのエクソンは mRNA に転写されなくなり、読み飛ばされることとなります。

これらの AO の化学的な構造はかなり大きく複雑です。例えば 2'-O-メチル PRO051 は 699 個の原子から、モルフォリノ AVI-4658 は 1000 個以上の原子からできています。このようにデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に用いられる薬剤は、いわゆる普通のお薬と化学的に異なっていて、製造するのも難しく、高価になってしまうのです。

最近オランダの研究者らはマウスのエクソン 23 のスキッピング実験で、2'O-メチルとモルフォリノの AO を比較検討しました (15)。その結果 mdx マウスの治療では、局所および全身投与において、2 種類の AO で効果に差があることが示されました。ただこの差は人間のエクソンに対する AO を hDMD というヒトのジストロフィン遺伝子を持つマウスに投与する場合にはほとんど目立たなくなります。ここから分かることは、あるエクソンの読み飛ばしにはモルフォリノのほうが効率がよく、別のエクソンの読み飛ばしには 2'O-メチルの方がよいということが起こりえるということです。いずれにせよこのことは動物実験からの類推にすぎません。

科学者と知り合いになろう。ここで何人かの、エクソンスキッピングの研究者たちを紹介しましょう。Annemieke の写真をまずお見せします。彼女の仕事についてはすでにいくつか挙げましたが、彼女とは頻繁に e メールを交換していて、とてもよい研究仲間です。



3 種類の新しい AO。現在デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に、これまで挙げた 2 種類の AO よりも有効かもしれない新しい AO が開発されています。1 つはペプチドと呼ばれる短いアミノ酸の鎖が後ろにつながったもので、もう 1 つはタンパクのような骨格を持っています。3 つめは分枝鎖構造が加わったものです。

ペプチド抱合型核酸によるエクソンスキッピング。モルフォリノ型 AO の問題点の 1 つに、筋細胞の中に取り込まれにくく、特に心臓の筋肉には届きにくいということがありました。これを解決するために、オクスフォード大学の **Matthew Wood** らはオレゴン州の AVI BioPharma との共同研究で、mdx マウスのエクソン 23 のスキッピング実験に使うモルフォリノ AO (PMO) を改造し、アンチセンス構造にペプチドと呼ばれる短いアミノ酸の鎖をつけ加えました。

様々なペプチドの組み合わせを試した結果、このマウスのエクソン 23 に対する 25 塩基のモルフォリノ AO に対して 2 つのペプチドを付けたペプチド抱合型 PMO が完成しました。mdx マウスはエクソン 23 の変異で停止コドンが出現し、タンパク合成をとめてしまうため筋肉にジストロフィンがありません。このエクソンを読み飛ばすことで、ジストロフィンの合成が再開されました。

ここで付加されたペプチドの 1 つは AVI Biopharma が開発した B-ペプチドという物質で、AO が細胞膜を通過するのを助けるはたらきをします。もう 1 つは筋特異的ペプチド (MSP) といって AO が寄り道せず特に筋肉組織にたどり着きやすくするためのペプチドです。B ペプチドは 14 個、MSP は 7 個のアミノ酸できていて、お互いに結合して一本のペプチド鎖を形成しています。興味のある方のために、筋ジストロフィーマウスに投与された薬剤の実際の

構造を略号で示しておきましょう。

RXRRBRRXRRBRXB-ASSLNIA-X-
GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT

これを週 1 回 6mg/kg、3 回全身投与された mdx マウスでは、骨格筋だけでなく心筋でも高いレベルのジストロフィンが出現し、筋細胞の細胞膜でジストロフィン関連タンパクによる複合体がよみがえり、血中の CK の値が正常化し、筋肉の機能も大幅に改善しました (16)。

この報告の完成する直前に、オクスフォードの **Kay Davies** の研究チームにいる **Aurélie Goyenvalle** から連絡がありました。ジストロフィン遺伝子のみならずユートロフィン遺伝子という別のタンパクの遺伝子にも異常をもつダブルノックアウトマウスがいて、これはデュシェンヌ型筋ジストロフィーのような非常に重篤な症状を示すのですが、このマウスにペプチド抱合型モルフォリノ AO を投与したところ、調べられた全ての骨格筋で正常に近いジストロフィンが合成され、筋肉の機能や臨床症状に著明な改善が見られたというのです。この筋ジストロフィーマウスの平均寿命は何もしなければ 8~9 週しかありません。抱合型モルフォリノ AO で治療されたマウスは 7 ヶ月以上生存し、元気に走り回っています。治療は始めに 6 週間の注射を行い、その後は 1 ヶ月に 1 回しか注射をしませんでした (26)。

AVI Biopharma はこれと同じタイプのペプチド抱合型 AO でヒトのエクソン 50 に対する AVI-5038 という薬剤を米国での臨床試験に向けて準備中です。

ペプチド核酸によるエクソンスキッピング .もう 1 つの新しい AO である、ペプチド核酸(PNA) によるエクソンスキッピングも現在研究が進んでいます。DNA や RNA はリン酸と糖からなる骨格を持っていますが、PNA の骨格はペプチドできています。これは水溶性で、化学的に安定ですが、簡単に变化させることができ、DNA や RNA の塩基を立体的に正しい配置で持たせることができるので、他の AO と同じように機能することができます。

Matthew Wood とオクスフォードのグループは、エクソン 23 を標的とした PNA が mdx マウスへの筋肉内投与で働きを持つことを初めて示しました (28) 。その後彼らは PNA の 25 量体が mdx マウスへの全身投与において非常に高い活性を持つことを証明しました (29) 。

Matthew Wood は現在、英国ケンブリッジ大学分子生物学教室の **Michael Gait** らとともにペプチド抱合、つまりペプチドと結合した mdx マウスのエクソン 23 に対する PNA や PMO について研究を進めています。彼らは様々な PNA 内因化ペプチド (Pip) の実験系を確立し、その第一の候補が PNA-Internalization peptide(Pip2b)と命名された物質で、抗マウス 23PNA20 単位に下記のような構造が結合したものです。

RAhxRRAhxRRAhxRIHILFQNdRRMKWHK AlaC

この Pip2b-PNA-AO をわずか 5 µg 筋肉内投与するだけで、生後 8 週の mdx マウスにおいて注射された筋肉にたくさんのジストロフィンを持つ筋線維がみられるようになりました (17) 。注

目すべきは、Pip5e とよばれる改良されたペプチドを PMO25 量体と抱合した物質が、mdx マウスへの 25mg/kg 単回筋肉内投与で様々な筋肉でのジストロフィンを増やす効果をもち、さらに初めて心筋に対しても効果がみられたということです (Yin, Saleh, Gait, Wood らにより論文投稿中)。これまで心筋に効果のある PMO 抱合型のペプチドを探すのは大変困難でしたが、Pip5e という Pip2b よりも短く単純化されたペプチドは、この壁を打ち破る新発見であり今後臨床応用にむけて準備が進められることでしょう。

オクタ グアニジンモルフォリノによるエクソンスキッピング : Oi Long Lu とノースカロライナ州シャーロットの Carolinas Medical Center のグループは、非常に効率よく筋細胞の膜を通過して、心筋でジストロフィンを産生することのできる別の AO について研究しています。

彼らは、通常のもルフォリノ AO にある分枝鎖構造 (ポリマー) で、8 つの分枝鎖の先端にグアニジンをもつ (オクタ グアニジン) 物質を結合させました。この先端の構造はアルギニンというアミノ酸の一部で、ここで述べるもう 2 種類の新しい AO にも含まれるものです。このオクタ グアニジンポリマーはモルフォリノと合わせて vivo (生体の) -モルフォリノと呼ばれています。ペプチド結合型のもルフォリノ (PPMO) と異なり、オクタ グアニジンポリマーはペプチドではありません。そのため体内で免疫反応によって排除されることもないと期待されます。

生きたマウスでの、mdx マウスのエクソン 23 に対する vivo-モルフォリノを用いた実験も行われています。6mg/kg の AO を週 2 回、10 週間静脈内に投与する実験では、骨格筋の全ての細胞で 50% まで新しいジストロフィンが作られ、心筋でも 10% まで、さらには血管や腸管の平滑筋でも産生されました。筋肉の機能は著明に改善し、副作用や免疫反応は見られませんでした。このような新しい AO によって、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療が現実的なものになりつつあります (21)。

遺伝子組み込みによるエクソンスキッピング

第一段階 : パリの Institut de Myologie の **Luis García** と **Aurélie Goyenville** (写真 : 現在はオクスフォード大学に所属) らは、エクソンスキッピング療法を遺伝子治療と組み合わせ、筋肉に AO を作る遺伝子を組み込んで自分自身で作らせることにより、何回も AO を注射しなくてよい方法を考えました。筋肉に AO を作るための遺伝情報をもった、U7-snRNA と命名された物質を注入するのです。U7-snRNA は細胞の核にある小さな RNA で、スプライシング因子と同じような構造をしています。

彼らは mdx マウスのエクソン 23 のスキッピングに必要な



2つのAOに当たる配列の相補的DNAを付け加えることによってU7-snRNAの遺伝子組換えを行いました。この短いsnRNAは遺伝子から作られることができます。この組換えU7遺伝子は、U7 SD23/BP22および対照とともにアデノ関連ウイルス2型(AAV)のDNAに組み込まれました。この輸送のためのベクターはまずマウスの筋肉に局所投与され、その後血管内投与による全身投与が行われました。筋細胞では、入ってきたDNAはRNAに転写され、エクソンスキッピングを誘導し、その結果遺伝子の読み枠のずれが修正されてエクソン23を持たないジストロフィンタンパクが合成されました。このジストロフィンタンパクは治療を受けた筋線維の80%で確認され、細胞内で正常のタンパクと同じ位置ではたらき、1年以上有害な免疫反応も見られませんでした。

mdxマウスの筋肉で見られる過剰な筋肉の破壊と線維化の過程は停止しました。全身治療を受けたmdxマウスにトレッドミルなどで身体的な負荷をかけてみましたが、筋肉への障害は見られなくなっていました(19)。

U7遺伝子組込みの技術は、次に臨床症状をもつゴールデンレトリバーGRMD犬に応用されました。このイヌはエクソン7のスプライス部位に変異があり、エクソン6と8のスキッピングにより治療することができます。そこでエクソン6、7、8に対して相補的な配列を持ったU7ベクターを筋肉に注射してから2ヵ月後に調べてみると、ほとんど正常と同じ量の短いジストロフィンが作られるようになっていました。駆血をして1本の足にだけ血管内投与をしたところ、6ヵ月後にもまだたくさんの新しいジストロフィンが作られていました。

第2段階:その後、**Aurélie Goyenvalle**はオクスフォードのKay Daviesの研究室でさらに新しい技術を生み出しました。この方法によると、エクソンスキッピングは新たな、そして「普遍的な」U7snRNAベクターが2つの機能をもつことによって引き起こされるのです。このU7snRNAは、読み飛ばしたいエクソンに対応する塩基配列に加えて、heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1/A2(hnRNP)と呼ばれるタンパクに結合する部位を持っています。このタンパクは、エクソン断端のスプライセオソームの近くに来ると、特定のエクソンのスプライシングを邪魔する性質があって、結果的にpre-mRNAを作る段階でそのエクソンを読み飛ばしてしまうのです。

ウイルスによって持ち込まれた多機能U7遺伝子の相補的なDNA鎖は、small RNAに転写されるとスキップしたいエクソンに結合し、hnRNPをスプライスサイトの近くに引き寄せてきます。これにより目的とするエクソンの正常なスプライスが抑制されます。このようにして、U7snRNAベクターによるエクソンスキッピングは、これまでの目的配列に特異的なAOによる方法と異なり、すべてのエクソンに対して共通する「普遍的な」タンパクを用いた方法といえます。

これまでのAOでは、スキップするエクソンごとに最適な物質を検討する長々とした過程が必要でした。たった1つの「普遍的な」タンパクに相補的なDNAを付加する今回の方法では、さまざまなエクソンのスキッピングへの応用が可能となり、開発期間を短縮できることが期待さ

れます。

エクソン 49 と 50 の欠失を持つ実際のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんから取られた筋芽細胞を用いたエクソン 51 のスキッピングの実験は既に成功しています。最も効果の高かったのは、A1(U7ex51-AON-A1)と命名されたタンパク結合部位をもつ U7snRNA でした。これにより筋芽細胞では正常とほぼ同量のジストロフィンタンパクが作られるようになりました。オランダの研究者らはヒトのジストロフィンをもつ組換え mdx マウスにこれを筋肉注射し、54%の確率でエクソンスキッピングが起こることを示しました。

この技術により、これまで読み飛ばすのが難しかったエクソンもスキップできるようになることが期待されます。ベクターを用いたこの方法は、2 個以上の U7snRNA を用いることで複数のエクソンスキッピングに可能性を開いてくれるかもしれません。

このような多機能 U7snRNA に関する論文が、最近 Molecular Therapy 誌に”Enhanced exon-skipping induced by U7snRNA carrying a splicing silencer sequence: promising tool for DMD therapy”という表題で発表されました(25)。

U1 によるエクソンスキッピング . ローマの La Sapienza 大学の Irene Bozzoni (写真)らは U1 snRNA をコードする遺伝子を用いたエクソンスキッピングで先進的な仕事をしています。U1 snRNA は 5'側のスプライス領域の識別やスプライス反応の開始に必要な核に存在する小さな RNA です。



彼らは U1 snRNA の 5'端の 9 塩基を、マウスジストロフィン遺伝子のエクソン 23 の境界領域に対して相補的な 54 塩基に置き換え、この物質を 2/1 型のアデノ関連ウイルスに挿入しました。そして 3~4 兆個のこうしたウイルスベクターを生後 6 週の mdx マウスに尻尾の静脈から注射しました。すると 12 週後には、注射されたマウスのさまざまな骨格筋や心筋、横隔膜などに正確にスキップを受けた mRNA が認められ、正常の 10~20%の量のジストロフィンも検出されました。さらにマウスの筋肉の機能も著明に改善していました。

別の実験では、1 回のウイルス注射の 18 ヶ月後に生後 80 週となった 2 匹のマウスの筋肉を調べました。この間、事実上自然死するまでの期間に、このマウスの骨格筋、心筋、横隔膜筋ではエクソン 23 のないインフレームの mRNA とやや短くなったものの正常に機能するジストロフィンが検出されただけでなく、筋肉の機能もしっかりと改善していたのです。これらの結果から、この遺伝子治療はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんに長期にわたって効果をもたらす治療法となりうるということが分かりました。

最近、U1 を使ったエクソンスキッピングの手法はオランダの Amsterdam Molecular Therapeutics(AMT)社が特許を取得し、非臨床試験および臨床試験の準備をしています。

オーダーメイド治療と規制

米国食品医薬局（FDA）、欧州医薬品庁（EMA）などの医薬品管理当局は、一般的な医薬品の承認には次のような手続きが必要としています。

まず、**非臨床試験**では、試験管内や動物実験で薬の安全性、薬効薬理、化学的組成などを評価します。

臨床試験(治験)第1相では 20～100 人の健康なボランティアにおいて、ヒトに対する安全性を評価します。

臨床試験第2相では 100～500 人の患者さんに投与して、最適な投与量、安全性、有効性を評価します。**臨床試験第3相**では 1000～5000 人の患者さんにおいて、長期投与での安全性や効果を確認します。

これら3つの治験にかかる費用は、1つの薬につき 5 億ドルともいわれており、新薬が開発されてから承認されるまでに 15 年もかかってしまうこともあります。

このような承認の手続きは、エクソンスキッピングのような患者さん一人ひとりに合わせた治療が生まれる前に制定されたものです。個人用に作られたデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬をこのような方法で承認するには多くの問題があります。

例えば、AOの毒性を評価するための第1相試験では、正常な人のジストロフィン遺伝子に読み枠のずれを起こすような薬品を投与することになり、患者さんには有益な作用であっても正常のボランティアにとっては危険な薬ということになってしまいます。このように、従来の意味での薬の毒性というものが、この治療には当てはまりません。もう1つの大きな問題は、off-target 効果といわれるもので、ジストロフィン以外の遺伝子でスキッピングが生じるかもしれないということです。

さらに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに特有の問題もあります。患者さんの筋肉は痛んでいて、その傷口から薬が細胞質、さらには核へと到達して効果を発揮します。そのため健常人では現れない副作用が、患者さんでは起こりうるかもしれません。このような理由で、通常の健常人ボランティアによる第1相試験があまり意味をなしません。

ワシントン DC の **Eric Hoffman** らは最近連邦防総省から 250 万ドルの研究費を与えられ、英国の臨床試験で用いられた AVI のエクソン 51 に対する AO の毒性についてマウスやサルを用いて調べています。

エクソンスキッピングの承認における別の問題点として、何億ドルもの費用と、治験にかかる歳月をどうするかということがあります。1つ1つのAOの配列は、ほんの少しの患者さんにしか使うことができません。多くの場合、治験に必要とされる人数の患者さんが存在しないのです。

もし現在進行中のエクソンスキッピングの治験が副作用をこの先も起こさないと確認されれば、当局は塩基配列の異なる同じ種類のAOを一括して承認してくれると期待されます。

それでも、物事には順序があります。エクソンスキッピングの研究成果には目覚ましいものがありますが、患者さんのもとに安全で効果的な治療薬が届くまでには課題がたくさんあります。

初めての治療薬となるエクソン 51 のスキッピング薬が成功し、認可されれば、他のエクソンをスキップさせる薬剤の開発をどのように進めるかが重要になってきます。同時に、適切な安全性を確保しながら世界中のできるだけ多くの患者さんの命を、できるだけ早く救う必要があります。

エクソンスキッピングの治験関係者を含む 98 名のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの専門家のグループである TREAT-NMD が、初めてのワークショップを 2009 年 9 月 25 日にロンドンの EMEA（欧州医薬品庁）で開催し、DMD のような遺伝疾患に対する治療の、先例のない高度な個別化に関する規制問題についての議論を深めていこうとする動きが出てきました。EMEA との会議では、許容できるスピードでの新規薬剤の安全性と有効性の確保にむけた話し合いが行われました。

この報告はワシントン DC の Children's Medical Center の Eric Hoffman による論文（13）と、TREAT-NMD のプレスリリースに基づいています。

治験

さてついに、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患児でのエクソン 51 のスキッピング治療についての 4 つの治験を紹介しましょう。2 つは局所治療で、あまり重要でない筋肉が用いられています。これではすべての筋肉の修復はできず、臨床的な効果を期待することはできません。他の 2 つは全身投与で、AO を血管内に投与しています。彼らには少し筋肉の機能的な改善が見られるかもしれません。

しかしこれら 4 つの研究の主な目的は、「安全かどうか」ということです。結局は、治療が成功し寿命が延びたとすれば、その分長期投与が必要となるのです。

この薬の開発に欠かせないステップは、うまくいくかどうか分かりません。エクソン 51 のスキッピングの対象となる患者さんをたくさん集めることが重要ですが、多くの患者さんや家族にとっては、わざわざ治験センターに出向くほどの価値があると思われないかもしれません。2009 年 3 月のインタビューで、**Kate Bushby** がこれについて詳しく述べています。

「現在の治験では、毎週注射のために医療施設に通う必要があり、遠方から参加することは現実的ではありません。血液検査も多いですし、家族は医療施設の近くに住まなければなりません。もし住居が施設に近くても、参加期間中は生活上の様々なことが停止してしまうでしょう。治験はあくまでも治験だということを理解していただく必要があります。有効性の評価のための治験では、プラセボ（偽薬）を投与される可能性もあります。予見できなかった副作用が生じる可能性もあります。治験というのは本当に大変な作業なのです。

治験に参加していただいているお子さんたちには、不利益のほうが大きいかもしれません。あとになって有効性が分かれば、多くの人の役に立ったということになります。治験に参加していただいている御家族には感謝していますし、研究の発展を願って止みません。」

Kate Bushby のインタビューの全文および Hans Shikan、Judith van Deutekom へのインタビューは私のウェブサイトで見ることができます。 www.duchenne-information.eu



左：Judith van Deutekom, PhD、研究主任

右：Hans Shikan, Pharm D.社長

Prosensa Therapeutics BV 社（ライデン）

オランダにおける局所でのエクソンスキッピング．初めてのヒトでのエクソンスキッピングは、2006年1月から2007年3月にかけてオランダのライデン大学病院において、Judith van Deutekom、Jan Verschuuren および Prosensa Therapeutics BV 社のもとで行われました。この治験は原則を示すためにのみデザインされ、患者さんに治療効果をもたらすことまでは期待されていませんでした。前脛骨筋（すねの筋肉）にエクソン 51 に対する 2'O-メチル AO である PRO051 という薬剤が局所投与されました。

この化学的な修飾をうけた AO は、オランダの研究者らによる非臨床試験においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋線維の培養細胞のみならず、さまざまな変異をもつ mdx や hDMD といったマウスのモデルで局所あるいは全身投与され、効果を挙げていました。

4名のオランダ人患者がこの治験に参加しました。年齢は10歳から13歳で、ジストロフィン遺伝子のエクソン 50、52、48-50、49-50 がそれぞれ欠失していました。治療は一人ずつ行われ、前の患者でよい結果が出た場合にのみ次の患者に進むという方法が取られました。すねの1.5cm程度の部分に局所麻酔をし、1回に0.8mgのPRO051を生理食塩水で溶解したものが投与されました。

4週間後、注射した場所の筋肉を生検し、mRNA とジストロフィンタンパクを調べました。ほとんどすべて、最高で94%の筋線維に新しいジストロフィンタンパクができていて、その量はそれぞれ正常の33%、35%、17%、25%でした。効果のあった筋肉は体のごく一部であったために、参加した患者さんの臨床症状の改善は得られませんでした。これは患者さんも家族も始めから了承していたことです。

この実験により初めて、エクソンスキッピングがマウスやイヌだけでなく、ヒトでも可能であることが示されました。さらに、もしこの治療ができるようになれば、なるべく多くの筋細胞が残されている状態、つまり診断直後から治療を開始すべきであることが推測されました。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者に対する初めてのエクソンスキッピング治療は、2007年12月27日のNew England Journal of Medicine に Eric Hoffman の解説付きで掲載されました（18）。

オランダでの PRO051 によるエクソン 51 スキッピングの治験．2007年にNew England

Journal of Medicine に発表された PRO051 の局所投与の治験結果から、この薬剤によるエクソンスキッピングは実験動物だけでなく、患者においても副作用なく効果が得られることが明らかになりました。次のステップは、皮下投与による全身投与によって全ての筋肉に薬剤の効果が期待できるかどうかです。現在、PRO051 を用いた初めての全身投与の治験が行われています。

2008 年 7 月から 2009 年 1 月の間に、Prosensa 社は 5 歳から 15 歳の 12 名のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象に PRO051 皮下投与によるエクソン 51 のスキッピング治療を行いました。皮下投与の利点は、反復投与が必要になっても毎回医療機関を受診せずに済むことです。治験はベルギーのルーバン大学小児神経科の Nathalie M. Goemans とスウェーデンのゴーテンブルグにある Queen Silvia 子供病院の Mar Tulinius が監修し、実施に当たりました。

この結果は 2009 年 9 月 12 日にジュネーブで開催された世界筋学会の国際学会で Natalie Goemans が発表しています。

注射は週 1 回、5 週間継続されました。この治験では徐々に投与量が増量され、初めの 3 人には毎回 0.5mg/kg の PRO051 を、次のグループは 2mg/kg、その次は 4mg/kg、そして最後の 3 人には 6mg/kg を注射しました。

筋生検は治療前に加えて、初めの 2 人に関しては治療後 2 週間で、その他の患者では治療後 2 週間および 7 週間で行われました。生検では筋肉での mRNA の構造と、新たなジストロフィンの有無を検査しました。

この解析結果により、PRO051 の皮下投与により新たにジストロフィンが作られ、その産生量は薬剤の投与量に比例することが初めて示されました。つまり、最大量の PRO051 を投与された患者で最も多くのジストロフィンが作られていました。

この治験の最大の目的は、エクソンスキッピングという遺伝子治療は安全なのか、という問いに答えることでした。答えはよいもので、新しく作られたジストロフィンは免疫による拒否反応を起こさず、参加した 12 人の患者すべてで安全に施行できました。このことは、12 人全員が非盲検化の追加試験にも参加し、9 月末までに治療 10 週目に入ったことからよく分かります。

この治験の成功をうけて、関係者は PRO051 の第 3 相試験の準備を進めており、エクソン 51 のスキッピングを必要とする 150 人以上のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者を対象に 2010 年の年始をめどに計画されています。

TREAT-NMD はこの治験に関してデュシェンヌ型筋ジストロフィーの世界的な申し込みデータをもとに、21 カ国約 300 人の対象患者を見つけています。50 の治験実施施設への患者割り当てもできています。選ばれた患者と治験実施施設にはもうすぐ連絡があるでしょう。

今回の治験の鍵となる問題点は、新しく産生されたジストロフィンによって筋肉の機能が回復しうるかということで、多くの生化学的・臨床的な検査が予定されています。歩行できる患児に関しては、筋疾患の評価に標準的に用いられている 6 分間の歩行テストが採用される見込みです。

英国での初めての局所投与試験 . 2007 年の秋から 2008 年の下半期にかけて、英国では MDEX コンソーシウムによって、ロンドン帝国大学の **Francesco Muntoni** とニューキャッスルの **Kate Bushby** のもとでエクソンスキッピングの治験が行われました。MDEX コンソーシウムは保健省の支援する団体で、9つの研究団体と慈善団体である Muscular Dystrophy Campaign、ActionDuchenne、Duchenne Parents Support Group などから資金援助を受けています。

オランダとイギリスの研究チームによって、8種類のリノアミン AO が正常とデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者およびヒトジストロフィン組換えマウスの筋肉の培養細胞に投与されました。その結果オーストラリアのパースの **Steve Wilton** とロンドンの **Dominic Wells** の作ったリノアミンである AO H51A が、最も長期の臨床的効果が期待できることが示されました。このリノアミン AO はオレゴン州ポートランドの AVI BioPharma 社で作られ、AVI-4658 と命名されています (20)。



左 : Kate Bushby 教授
(University Newcastle u.T.)
右 : Francesco Muntoni 教授
(Imperial College London)

この治験は足の小指側にある短指伸筋という小さな、あまり重要でない筋肉にエクソン 51 をスキップするリノアミンを 1 回注射して、安全性と生化学的な作用を評価するために行われました。12 歳から 18 歳の 7 人のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者が治験に参加し、中には車椅子を要する患者もいました。遺伝子変異の内訳は、2 人がエクソン 48-50 の欠失、2 人がエクソン 45-50 の欠失で、49-50 の欠失が 1 人、エクソン 50 の欠失が 1 人、さらにイントロン 49 内の小さな変異によりエクソン 50 の転写異常をきたしたものが 1 人で、いずれもエクソン 51 のスキッピングにより読み枠が回復するものでした。治療前に皮膚の細胞を培養し、患者の体内でジストロフィン mRNA からエクソン 51 が取り除かれ、短くなった mRNA とジストロフィン蛋白が産生されるのが AVI-4658 の作用であることを確認しました。

診断時の筋生検では、参加者全員で機能をもつ筋線維は 5% 以下でした。これは自然のエクソンスキッピングにより、量はごくわずかで個人差がありますが筋線維の一部でジストロフィンが産生されるためです。こうした自然回復したジストロフィンの量は、偽薬を投与された対照群では治療後に減っているはずですが。

他にも多くの臨床検査によって、結果が科学的に正しく、治療以外の影響はないことが裏付けられました。例えば、筋肉を検査する研究者は、検体が治療群のものかどうかを知らされて

いません。このような研究を単盲検化試験といいます。

始めの2人は0.09mgのモルフォリノ AO を0.9mlの生理食塩水に溶解し片足の短指伸筋に9箇所に分けて筋肉注射されました。反対の足の同じ部位には対照として生理食塩水が注射されました。他の5人はその10倍量である0.9mgのAOを同様に投与されました。投与後3週から4週の間治療した筋肉の生検を行いました。

この治療では、投与量の多い方が多くのジストロフィンが作られることが分かりました。薬剤を注射した針の通り道にあたる部位では44~79%の筋線維でジストロフィンが増えています。いくつかの部位での平均的なジストロフィンの量は正常の22~32%で、治療前に11~21%であったのに対し増加しており、また治療部位以外の筋肉と比べても増加していました。ジストロフィンが発現している筋線維1本について見てみると、正常の42%程度までジストロフィンが発現していました。さらなる検査により、産生されたジストロフィンは予想どおり分子量が小さくなった、ベッカー型のジストロフィンであることもわかりました。

この研究の目的は、モルフォリノ AO の筋肉注射の安全性と生化学的な効果を調べることでした。こうした局所投与の研究の例に漏れず、投与された患者で実際の治療効果は期待できませんので、機能回復を調べるような検査は行われませんでした。参加者とその家族は、このことについて事前に説明を受けていました。

この生体投与実験により、AVI-4658 というアンチセンス薬がエクソン 51 のスキッピングを誘導し、新たなジストロフィンが産生され、それが筋細胞の膜という正常な位置まで移動し、ジストロフィン・グリコプロテイン複合体として働きうることが明らかになりました。治療による副作用や免疫による拒絶反応は見られませんでした。

非常に少ない量の投与を受けた患者の筋組織では、エクソンスキッピングのおこった mRNA は見られましたがジストロフィン蛋白の増加は観察されませんでした。これは、蛋白の評価に用いたウェスタンブロット法という検査方法の感度に増加量が達しなかったためと考えられました。

この臨床試験の目的は、2007年12月に New England Journal of Medicine に掲載されたオランダの 2'O-メチル型 AO の治療と同じで、エクソンスキッピングがマウスやイヌといった実験動物のみでなく、ヒトでも起こるのだという原則を示すことでした。どちらの治療もそれを示すことができました。2つの治療の違いとしては、オランダでは治療した筋肉の生検は1回しかできなかったのに対し、イギリスでは治療した筋肉と治療しなかった筋肉の両方を生検することができました。その他にも様々な違いがあり、2つの臨床試験は全く同じものではなかったといっていいいでしょう。

イギリスの治療結果は2009年8月26日に **Maria Kinali**、 **Virginia Arechavala-Gomez**、 **Francesco Muntoni**、その他23人の研究者ら(23)によってインターネット上に公開されました。著者らは、「どちらの研究においても同様の量のジストロフィンが産生されることがはっきりと示された」と述べています。 **Annemieke Aartsma-Rus** と **Gertjan B. van Ommen** (24) は同時期に発表されたコメントで「次はアンチセンスオリゴヌクレオチドを全身に行き渡らせ

るのが課題であり、2つの局所投与の治験結果を詳細に比較することはあまり重要ではない。この治療法の効果は、全身投与によってしか評価できず、さらなる研究により機能的な回復や、少なくとも病気の進行を遅らせる効果をみななければならない」と述べています。



左：Maria Kinali, MD.

右：Virginia Arechavala-Gomez, PhD.
(University College London)

英国での初めての全身投与 . この治験の予備試験として最も重要な動物実験は、mdx マウスの尻尾の静脈から週 1 回×7 回の AO 投与を行い、正常の 50%の大きさのジストロフィンがつくられたというものでした。このジストロフィンは 14 週間以上保たれていることが分かっています (27)。

英国で 3 つの監督機関である MHRA、GTAC、GOSH から 2008 年 8 月から 11 月にかけて許可が下りて、2009 年初頭に 2 人の患者さんが AVI-4658AO の静脈内投与を受けました。全体で 12 人の、まだ自立歩行のできる、エクソン 51 のスキッピング治療の適応があるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんが 4 組にふりわけられ、毎週 1 回の注射を 12 週間受ける予定です。治療は順番に行われ、前の患者で何か起これば次からの患者への投与はすぐに中止されます。

この治験も投与量を漸増させる試験で、始めの患者は 0.5mg/kg と大変少ない量で、徐々に増やして最後のグループでは 4.0mg/kg 投与されました。最後のグループでは 30kg の 10 歳児であれば、治験終了までに 1.44g の AO を投与されたこととなります。他の病気に対する臨床試験の結果から、AO は 300mg/kg/日まで副作用をみることなく投与できることが分かっています。この試験の目的は、薬剤の安全性と耐性を確認することと、筋肉の機能や強度を調べることでした。さらに 4 人×2 グループの患者を追加することが承認され、それぞれ 10mg/kg、20mg/kg の投与を受けており、現在 5 つ目のグループの治療が進行中です。

AO が本当に到達しているかどうか、ジストロフィンが作られているかどうかといった判断のためには繰り返して筋生検を施行したいところですが、治験の後には 1 回しか施行することができません。生検には上腕二頭筋が用いられました。

この治験はロンドンの Great Ormond Street 病院とティン川沿いのニューキャッスルにある王立病院で行われました。AVI BioPharma の主任医官である **Stephen B. Shrewsbury** は 9 月 12 日にジュネーブの世界筋学会でこの予備試験について報告しました。AVI-4658 をこれまでに投与された患者では、今のところ副作用などの問題は見られていないとし、「デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療は小児期早期から開始し、恐らく一生継続しなければならないと考えられ、投与量が増えても安全であるというデータは非常に重要なものである」と結論しています。

この治験については、結果が発表され次第この報告にも載せる予定です。

AVI BioPharma はこの治験のスポンサーで、**Francesco Muntoni** は英国の Medical Research Council から 130 万ドルの研究資金を得ています。

国際協力計画 ICE . DMD のための国際協力計画 (ICE) という機関はフランス、イタリア、英国、アメリカ合衆国などの 12 の団体が提携しており、**Jean-Claude Kaplan** (フランス)、**Terry Partridge** (アメリカ)、**Adrian Thrasher** (イギリス)、**Luis García** (フランス)、**Gerch Griggs** (アメリカ) らの指揮によって組換え遺伝子のエクソスキッピングの発展のために活動しています。ICE は 2008 年に発足し、フランスの Duchenne Parent Project や Association Monégasque contre les Myopathies から 170 万ユーロの資金援助を受けています。ICE に参加する 105 人の研究者や臨床医のうち 14 人が 2009 年 6 月 6 日にモナコに集まり、それぞれの研究成果について議論しました。

さいごに

世界中の友人へ : 始めに申し上げたように、この報告および以前に書いた報告は、患者さんやご家族にこの病気の進行を止めるためにどのようなことが行われているのかをよりよく理解していただくためのものです。なるべく平易に書いたつもりですが、ご理解いただけただけでしょうか。病気のことを理解しようとして、すでに基本的な知識をお持ちの方も多いでしょう。もし分かりにくいことがあれば、医学や生物学の専門家に尋ねる事ができる方もいらっしゃるでしょう。そうでなければ、私に英語、フランス語、ドイツ語、スペイン語、イタリア語のいずれかで e メールを下されば、お返事いたします。

科学研究 . この報告を最後までお読みいただければ、治療を見つけるために研究者たちができる限りのことをできる限り迅速に進めていることをお分かりいただけるでしょう。1986/1987 年にジストロフィンタンパクとその遺伝子が発見された時には、私たちはすぐにでも治療が可能になるだろうと期待したものでした。しかし 20 年以上経った今でも、病気の進行を遅らせる方法すら開発途中です。この病気のみならず、のう胞性線維症やガンといったほかの遺伝子による病気の治療も、当初予想されていたよりも難しいことが分かってきています。実際のところ、私たちのデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、あまりまれでない遺伝性疾患としては遺伝子治療が可能になる初めての病気となるかもしれないのです。

かつて Annemieke Aartsma-Rus と話した際に、彼女は「デュシェンヌ型筋ジストロフィーは私たちが治療法を見つける手助けをしてくれる」と話していました。そこで私は彼女の言葉をこの病気に関わる人たちに届けますと言いました。すると彼女は、これは Gert-Jan van Ommen の引用だと明かしてくれたのです。Ommen は「この病気は治されたがっている」と言ったのだということです。そのような現象は実際あるのです、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの筋細胞は傷ついて穴だらけで、治療薬である AO が容易に目的の場所にたどり着けるようになっています。正常の筋肉にこの薬剤を作用させるのは、もっと難しかったですよ。

遺伝子診断 . これまでにお読みいただいたように、エクソスキッピングは変異ごとに異なる治療法です。患者さんが治療の恩恵を受けるには、まず正確にどのような変異があるのかを調べなくてはなりません。MLPA 法は欠失の場所を調べる手段として患者さんのみならず、女性の保因者診断にも広く用いられています。ある家系の患者さんがこれまでに知られていない変異を持っていたり、調べることができなくても、患者さんのお母さんや親戚の女性に MLPA 法を行うことで遺伝子の欠失を見つけることができます。これは遺伝カウンセリングや出生前診断に有用なことです。保因者である可能性のある女性が検査を受けて保因者でないことが確認されれば、出産のときに余計な不安を持たなくて済みます。

登録 . デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんは、居住する国のデータバンクに医療情報を登録していただくと、国際的なネットワークを通じて TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry) や Duchenne Connect (www.duchenneconnect.org) と連携することができます。これらを通じてまれな遺伝子変異に対する治療の治験参加者を募ったり、治療や研究に関する最新の情報を提供することができます。

奇跡の治療薬には気をつけて . 長期的に見て安全で効果のある治療法は、厳密な科学的手法によってのみ開発されます。インターネットで、何十万円もするような高価な「奇跡の治療法」が多く提供されていますが、お子さんのために購入される前に必ずその奇跡を起こした方に確認してください。何人のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんが実際にその治療でよくなったのか、彼らはどのような方法で何と診断されていたのか、治療後どのくらいの量のジストロフィンが増えたのか、筋肉の機能はどれほど回復したのか、そしてどの専門誌にその治療法が掲載されたのか、といったようなことです。もし価値がありそうだと思うのなら、なぜ他の患者さんはその治療を受けていないのかをよく考えてみて下さい。金銭トラブルや薬品による副作用には、十分注意して下さい。

執筆活動についての評価 . 私の書いてきたものに対して、ドイツ首相である **Horst Köhler** からわが国の勲章である功労賞が授与され、2009年2月5日に我々の住むシュヴァルツヴァルトで **Gundolf Fleischer** 大臣によるすばらしい授賞式が行われました。この機会に120名あまりの出席者に対して、ドイツ国内のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんやご家族の置かれて

いる環境について説明をしました。以来、首相とその妻で稀有疾患についての仕事をしている **Eva Luise Köhler** を含む 12 名の政府高官とやり取りをしていて、保健省の高官とも連絡があります。この冬にはドイツで新しい内閣が活動し始めますが、私はできる限りの人脈を利用してデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の 80% を占める「エクソン 51 以外の」エクソンスキッピングの研究を推し進めるための経済的な支援を求めていくつもりです。

3 月 21 日にはイタリアの Gaetano-Conte-Academiy of Naples によるキプロスでの Mediterranean Society of Myology の学術集会の席で、2009 年の社会的研究に対する賞をいただきました。ここではエクソン 51 のスキッピングについて私が患者さんにどのような説明を行っているかについて講演しました。この時発表に用いた 55 枚のスライドは、メールで御連絡いただければお送りすることもできます。スライドは詳しく、動画も多いのでぜひご覧下さい。

私はこの受賞に対する御礼の意味をこめて、「The Progress Reports on the Development of Therapies of Duchenne Muscular Dystrophy」という題で私の仕事について解説した論文を書き、Reinhard Rüdell 氏の編集により Acta Myologica 誌 2009 年 10 月号に掲載されました。

イラストを入れたこと .今回初めて本文中にイラストを入れました。「私たちの」患者さんのためにエクソンスキッピングの研究に尽力されている科学者の写真も入っています。この報告の初版では、患者家族など多くの読者から反響がありました。

ここで、3 人の子供と写っているととても特別な女性の写真をお見せしましょう。彼女は **Pat Furlong** さんといい、米国 Parent Project Muscular Dystrophy(PPMD)の会長で、フィラデルフィアでのミーティングの際に取った写真です。彼女のことをよくご存知の方もいらっしゃるでしょうが、彼女はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの研究を推し進めるために多大な努力をされています。ここに大きな感謝を捧げます。



最後に、最も難しいこの質問に対する私なりの考えをお話します。

どうしてうちの子がこんな病気になってしまったのですか？ 私のところにはこの切実な質問が世界中から寄せられます。私はこの答えを専門に学んだわけではありませんが、何とかお答えしようとして努力しています。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエイズのような新しい病気ではありません。ヒトだけでなくマウス、ラット、ネコ、イヌ、ウマなど他の動物にもみられ、恐らくすべての筋肉をもつ動物に起こりえるのでしょうか。ですから私たち人間が祖先から分かれるより以前から、この病気はあったはずで、これは進化の途中で起きた事故です。変異、すなわちランダムな遺伝子の変化がなければ、私たちは動物の祖先からヒトへと進化することもなかったのです。進化の

役に立つ「有益な」変異もありますが、多くは病気や死につながる「有害な」変異なのです。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの変異は、病気にかかったあなたや、その遺伝子をあなたに受け渡したかもしれないお母さんに対する罰なんかではありません。変異というのは細胞が分裂する際に、ちょっとした間違いでたまたま起こるものなのです。あなたがたには何の責任もないのです。

ここは宗教的な話をする場ではありませんが、一言だけ加えさせて下さい。自然は誰かを意図して傷つけようなどとは思っていません。自然が気まぐれに生み出した変異は多くの有益な進化をもたらし、この世でいちばん複雑な、人間の脳を発達させました。その結果、この脳がデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療を生み出す能力を持つことになったのです。この報告は、そのことをあなたに伝えるために書いたのです！

夏のスペインの避暑地より、



Gunter Scheuerbrandt, PhD

住所：Im Talgrund 2

79874 Breitnau, Germany

Tel：*49-7652-1777

E-mail：gscheuerbrandt@t-online.de

ウェブサイト：www.duchenne-information.eu

2009年10月3日

日本語訳：神戸大学医学部大学院医学研究科小児科

山内裕美子

日本語監訳：神戸大学医学部大学院医学研究科小児科

松尾雅文

E-mail: matsuo@kobe-u.ac.jp

Home page: <http://pedata.med.kobe-u.ac.jp>

参考文献

文献検索を希望される方は、
www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez という検索サイトを利用して、著者名などのキーワードを入力して"search"をクリックすると、関連する文献が英語で検索できます。新しい文献の閲覧には 10~20 ドル必要なものもあります。

(1) Pomeranz-Krummel DA, Oubridge C, Leung AKW, Li J, Nagai K. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* 2009; 458; 475-480), Query CC. Spliceosome subunit revealed. *Nature* 2009; 458; 418-419.

(2) Neri M, Torelli S, Brown S, Ugo I, Sabatelli P, Merlini L, Spitali P, Rimessi P, Gualandi F, Sewry C, Ferlini A, Muntoni F. Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromusc. Disorders* 2007; 17: 913-8.

(3) van Ommen GJ, van Deutekom JT, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10; 140-149.

(4) Wilton SD, Fall AM, Harding PL, McClorey G, Coleman C, Fletcher S. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. *Molecular Therapy* 2007; 15; 1288-96.

(5) Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, Jadoon A, Bou-Gharios G, Partridge T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102; 198-203.

(6) Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, Fokkema IF, van Ommen G-JB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that conform the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 2006; 135-144.

(7) Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen G-J, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations; *Human Mutation* 2009; 30; 293-299.

(8) Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202.

(9) Van Vliet L, de Winter C, van Deutekom JCT, van Ommen G-JB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2008; 9; 105

(10) Yakota T, Lu Q, Partridge, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, and Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of Neurology* 2009; 65; 667-676.

(11) Aartsma-Rus A, Janson AAM, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT. Antisense-induced exon skipping

for duplications in Duchenne muscular dystrophy. BMC Medical Genetics 2007; 8; 43.

(12) Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders by nonsense mutations. Nature 2007; 447; 87-91. Comment: Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense. Nature 2007; 447, 42-43.

(13) Yakota T, Takeda S, Lu Q-L, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman, EP. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology, exon skipping brakes new ground. Archives of Neurology, 2009; 66; 32-38.

(14) Yokota T, Duffy W, Partridge T. Optimizing exon skipping therapies for DMD. Acta Myologica 2007; 26; 179-184.

(15) Heemskerk HA, de Winter CL, de Kimpe SJ, van Kuik-Romeijn P, Heuvelmans N, Platenburg GJ, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT, Aartsma-Rus, A. *In vivo* comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy skipping. J. of Gene Medicine 2009; 11; 257-266.

(16) Yin H, Moulton HM, Scow Y, Boyd C, Boutilier J, Iverson P, Wood MJA. Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restores systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. Human Molecular Genetics 2008; 17; 3909-3918.

(17) Ivanova GD, Arzumanov A, Abes R, Yin H, Wood MJA, Lebleu B, Gait MJ. Improved cell-penetrating

peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle. Nucleic Acid Research 2008; 20; 6318-6428.

(18) Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. N Engl J Med 2007; 357; 2677-86. Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. N Engl J Med 2007; 357; 2719-22.

(19) Goyenvalle A, Vulin A, Fougere F, Leturcq F, Kaplan J-C, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 2004; 306; 1796-99.

(20) Arechavala-Gomez V, Graham IR, Popplewell LJ, Adams AM, Aartsma-Rus A, Kinali M, van Deutekom JC, Wilton SD, Dickson G, and Muntoni F. Comparative Analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted exon skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. Human Gene Therapy 2007; 18; 798-810.

(21) Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. Molecular Therapy 2009; 17; 864-71.

(22) Denti MA, Rosa A, D'Antona G, et al. and Bozzoni I. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. Proc Natl Acad Sci 2006; 103; 3758-63. Denti MA, Incitti T, Sthandier O, et al, and Bozzoni I. Long-term benefit of adeno-associated

virus/ antisense-mediated exon skipping in dystrophic mice.

(23) Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, et al. and Muntoni F. 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. *The Lancet Neurology* 2009; 8; 918-928,

(24) Aartsma-Rus A, van Ommen G-J B. Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *The Lancet Neurology*, published online 26 August 2009.

(25) Goyenvalle A, Babbs A, van Ommen G-JB, Garcia L, Davies KE. Enhanced exon-skipping induced U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol. Ther.* 2009; 17; 1234-40.

(26) Goyenvalle A, Babbs A, Powell D., Kole R., Fletcher S., Wilton SD., Davies KE. Prevention of Dystrophic Pathology in Severely affected Dystrophin/Utrophin deficient mice by

Morpholino-Oligomer mediated exon skipping. *Mol. Ther.* 2009. (In press).

(27) Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. and Lu QL. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nature Medicine* 2006; 12; 175-177.

(28) Yin H, Lu Q, Wood M. Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Molecular Therapy* 2008; 16; 38-45.

(29) Yin H, Betts C, Saleh AF, Ivanova GD, Lee H, Seow Y, Kim D, Gait MJ, Wood MJA. Optimisation of peptide nucleic acid antisense oligonucleotides for local and systemic dystrophin splice correction in the mdx mouse. *Molecular Therapy*, 2009, in press.

エクソン 51 スキッピングの詳細

オランダでの局所治療の治験では、エクソン 51 のスキッピングが行われました。ここではエクソン 50 の欠失した患者さんで、エクソン 51 のスキッピングによりどのように読み枠が保たれるのかを詳しく説明します。

エクソン 49 の終わりから、エクソン 52 のはじまりの部分にかけて、正常のジストロフィン遺伝子の配列を示します。エクソン 50 には 29 個、51 には 52 個の三つ組みコドンが含まれていますが一部省略しています。三つ組みのコドンの下に、それぞれが意味するアミノ酸の略号を示します。(実際のアミノ酸はリボソームで作られ、RNA コドンにくっついているわけではありません)コドンは句読点なく並んでいるのですが、ハイフン (-) は読み枠、縦の棒はエクソンの区切りを分かりやすくするために示しています。隠れた停止コドンとなる UGA を赤で示します。エクソン 50 は最後の三つ組みコドンの始めの塩基のあとで終わっていて、エクソン 51 の始めにある青色で示した CU とつながって UCU となります。

```

      End Exon 49 | Start Exon 50                End Exon 50 | Start Exon 51
--CAG-CCA-GUG-AAG | AGG-AAG-UUA-GAA---AUU-GGA-GCC-U | CU-CCU-ACU-CAG-ACU-
  Gln pro val lys | arg lys leu glu   ile gly ala ser|   pro thr gln thr

      隠れた停止コドン
--GUU-ACU-CUG-GUG-ACA-CAA---AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---
  Val thr leu val thr gln   lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu

      End Exon 51 | Start Exon 52
---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
  met ile ile lys gln lys | ala thr met gln asp leu
```

エクソン 50 が遺伝子または mRNA から欠失すると、エクソン 49 のあとにすぐエクソン 51 が始まります。このためエクソン 51 の読み枠は 1 塩基分右にずれます。そうすると 8 個のまちがったアミノ酸につづいて先ほど赤で示した停止コドンが現れ、ジストロフィンの合成が途中で停止します。作りかけのジストロフィンが破壊されて、デュシェンヌ型筋ジストロフィーが発症します。

```

      End Exon 49 | Start Exon 51
---CAG-CCA-GUG-AAG | CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA-
  gln pro val lys | leu leu leu arg leu leu

      停止コドン                アンチセンスオリゴヌクレオチド
                                UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU
-CUC-UGG-UGA-CAC AAG---AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
  leu trp STOP!

      End Exon 51 | Start Exon 52
---AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G | GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU---
```

エクソンスキッピングに用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドである AON PRO051 を青で示します。これがワトソン-クリックの塩基の組み合わせに従ってエクソン 51 の 20 塩基

と結合すると、変異した mRNA、つまりこの場合エクソン 50 を含まない mRNA においてエクソン 51 を読み飛ばすようになります。

もし、欠失したエクソン 50 に加えて、スキッピングによりエクソン 51 も飛ばすことができると、エクソン 52 がエクソン 49 に続くこととなります。この場合読み枠は移動せず、3 つ組みコドンが保たれます。

End Exon 49 | Start Exon 52
---CAG-CCA-GUG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
gln pro val lys | ala thr met gln asp leu

この場合停止コドンは出現しませんが、エクソン 50 とエクソン 51 にコードされていた 77 のアミノ酸がもとのタンパクから抜け落ちる形になります。そのため不完全なジストロフィンが合成され、重症のデュシェンヌ型ではなくベッカー型筋ジストロフィーのような症状を来たします。