

～世界の情勢～

2002年10月3日	Duchenne型筋ジストロフィーへの骨髄移植による治療への道を開く論文が発表されました
2002年10月3日	ジストロフィン遺伝子の異常をエクソスキッピングを利用して修正する新たな論文が発表されました
2002年5月23日	キメラRNA/DNAが筋肉前駆細胞でもジストロフィン遺伝子の異常の修復効果を示しました
2002年4月3日	デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子治療への前進
2002年4月3日	ネガマイシンがジストロフィン産生に効果を発揮しました
2001年11月24日	DMD患者から得た筋細胞でアンチセンスによってジストロフィンのエクソンのスキッピングを誘導してジストロフィンを産生させることに成功
2001年10月27日	DMD患者から得た筋細胞内でのアンチセンスによるジストロフィンの exon スキッピングおよび蛋白発現の誘導
2001年10月22日	アグリンのミニ遺伝子導入による先天性筋ジストロフィーモデルマウスの筋萎縮症状の改善
2001年6月28日	筋ジストロフィーの骨髄移植による治療は mdx マウスでは有効ではなかった
2001年6月25日	筋芽細胞の移植を人で実施
2001年2月25日	キメラ RNA/DNA を用いた遺伝子異常の修正 (gunn rat)
2000年12月7日	AAV ベクターを用いたジストロフィン発現
2000年6月	キメラ RNA/DNA を用いた遺伝子異常の修正 (mdx マウス)
2000年10月30日	アンチセンスを用いた治療の試み

## ～世界の情勢～

・2002年10月3日

### Duchenne 型筋ジストロフィーへの骨髄移植による治療への道を開く論文が発表されました

1歳の時に骨髄移植を受けた Duchenne 型筋ジストロフィー患者で、13歳で筋線維の中に移植した細胞由来の核が存在していたという論文が発表されました。以下に要旨を記します。

Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. J Clin Invest 2002 Sep;110(6):807-14, Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, Stein J, Chan YM, Lidov HG, Bonnemann CG, Von Moers A, Morris GE, Den Dunnen JT, Chamberlain JS, Kunkel LM, Weinberg K.

【要旨】 Duchenne 型筋ジストロフィーは dystrophin 遺伝子の変異によって起こる重篤で進行性の筋変性疾患である。これまでの数々の研究から、DMD のモデルマウスである mdx マウスに致死的な放射線照射を行った後に骨髄細胞を移植すると、移植された骨髄細胞が骨格筋の筋線維の一部になることが明らかになってきた。しかしながらヒトにおいても同様に骨髄細胞から筋細胞が再生し得るかどうかは未だ分かっていない。今回筆者らは1歳時に伴性重症複合型免疫不全症に対して骨髄移植を施行され、12歳時に新たにDMDと診断された症例に対して筋生検を行い検討を行った。この患者の筋生検を行い解析を行った結果、筋線維の一部(0.5-0.9%)にドナー由来の核が証明された。また大部分の筋線維は dystrophin 遺伝子が exon44 と exon45 が in-frame で欠失していた。この患者の筋組織中にドナーの骨髄細胞由来の核がみられたことからヒトにおいても骨髄細胞が骨格筋細胞と融合し、移植後13年経ってもそれが維持されていることが分かった。

【緒言】 骨髄移植は重症複合型免疫不全症や Fanconi 貧血、骨形成不全、先天性の代謝異常症、先天性の組織球機能異常症のような様々な疾患の治療として行われている。成人の骨髄には間葉系幹細胞が存在するが、間葉系幹細胞は骨細胞や軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋になりうる。骨髄はその他にも神経細胞や肝細胞、心筋、上皮細胞などの前駆細胞を含んでおり、こうした事実は骨髄移植によって非血液組織を再生し得る可能性を示唆している。これまでもヒトで骨髄移植を受けた患者の非血液組織中にドナー由来の細胞が生着していることが報告されてきた。しかしながら最近、骨髄細胞が invitro で宿主の細胞と融合して、その結果宿主の形質を獲得することが明らかにされ、このことから in vivo で骨髄細胞が本当に形質転換し得るのかが疑問視されている。Duchenne 型筋ジストロフィーは dystrophin 遺伝子の変異によって起こる最も頻度が高く重症の筋ジストロフィーであり10歳頃に独立歩行が困難となる。DMD のモデルマウスである mdx マウスでは dystrophin 蛋白の欠損がみられる。mdx マウスや DMD 患者においては dystrophin の発現は revertant な筋線維の中に貯えられていて、これは変異を含んでいる exon の skipping が起こることによって in-frame の短い転写産物をつくり出されることに起因する。骨格筋の筋線維は単核の筋芽細胞が融合することによってできる多核の構造を持っている。筋芽細胞に加えてその他の細胞も in vitro では myotube の形成に携わる。筋疾患の治療にとって野生型の細胞が変性した筋線維と融合することは、正常な核の取込みをもたらし、正常な遺伝子産物の発現を可能にする。mdx マウスを用いた数々の研究によって in vivo では筋芽細胞や線維芽細胞、骨髄移植後の骨髄細胞などの様々な種類の細胞が変性した筋線維の修復に役立っていることが示されてきた。このように骨髄移植が筋ジストロフィーの治療となりうるか否かの検証は前臨床段階であるが現在も進んでいる。本稿では筆者らは伴性劣性重症複合型免疫不全の診断で1歳時に骨髄移植が施行された既往を持ち、12歳時に極めて症状の進行は緩徐であったがDMDと診断された男児について報告している。この希少な症例はヒトで骨髄細胞が骨格筋に生着することができるかどうか、さらに骨髄移植後13年間を経ても生着した細胞が残っているか、そしてこの患者の臨床症状の軽減に関わっているかどうかを調べる貴重な機会をもたらした。(訳 長谷川大一郎)

## ～世界の情勢～

・2002年10月3日

### ジストロフィン遺伝子の異常をエクソスキッピングを利用して修正する新たな論文が発表されました

Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in  $\Delta$ 48-50 DMD cells (PNAS 99, 9456-9461, 2002)

exon 51 の splice site に一致した配列を含む chimeric snRNAs を用いたエクソスキッピング及びジストロフィン合成の誘導

Fernanda Gabriella De Angelis, et al.

Institute Pasteur Fondazione Cenci-Bolognetti, Department of Genetics and Molecular biology, University "La Sapienza," Rome, Italy

#### 【はじめに】

Duchenne型/Becker型筋ジストロフィーはジストロフィン遺伝子の欠失やナンセンス変異によって起こる。欠失やナンセンス変異によって、アミノ酸読み取り枠がずれると重症の Duchenne 型、アミノ酸読み取り枠が維持されていると軽症の Becker 型となる。mRNA の段階で、特定のエクソンをスキップさせることにより Duchenne 型から Becker 型へと表現型が変わるようにするために、合成したオリゴヌクレオチドを投与するという方法が試みられてきた。しかし、この方法はオリゴヌクレオチドを定期的に繰り返し投与しなければならない、という問題点があった。この問題点を克服するために、体内で安定した形で発現するように、snRNA (核内に存在し splicing に関与する) とアンチセンスオリゴを用いて chimeric snRNAs を合成した。Exon 51 の splice site に一致した配列を含む chimeric snRNAs を、Exon 48-50 の欠失によって発症した DMD 患者の筋細胞に投与し、Exon 51 をスキップさせることに成功した。

#### 【方法】

- 数種類の snRNA の plasmid と 5' splice site、3' splice site、branch point に一致したアンチセンスオリゴを用い、下記のような plasmid を作成した。  
U1-5': human U1 snRNA + exon 51 の 5' splice site に一致したアンチセンスオリゴ  
U7-3': mouse U7 snRNA + exon 51 の 3' splice site に一致したアンチセンスオリゴ  
U7-3'pl: mouse U7 snRNA + exon 51 の 3' splice site に一致したアンチセンスオリゴ (U1 promoter によりコントロール)  
U7-double: mouse U7 snRNA + exon 51 の 5' splice site に一致したアンチセンスオリゴ及び exon 51 の 3' splice site に一致したアンチセンスオリゴ (U1 promoter によりコントロール)  
U2-BP: human U2 snRNA + intron 50 の branch point に一致したアンチセンスオリゴ
- 作成した plasmid から U1-5'、U7-3'、U7-3'pl、U7-double、U2-BP の配列を取りだし、pBabe puro retroviral vector に導入した。pBabe puro retroviral vector は Phenix packaging cell line へ導入し培養。培養後、Phenix packaging cell line から抽出し、DMD 患者の筋生検組織から得、不死化させた筋細胞に導入した。
- *Xenopus laevis* の卵母細胞に chimeric snRNAs を注入し、核内あるいは細胞質内のどこに局在しているか、異なったタイプの snRNA が影響を及ぼしあうことが無いかどうかを検討した。
- Northern blot analysis により、筋細胞内で発現した chimeric snRNAs の解析を、RT-PCR 法によりエクソスキッピングの解析を、Western blot analysis によりジストロフィン蛋白の発現についての解析を行った。

## ～世界の情勢～

### 【結果】

今回の症例は、exon48-50 (397 塩基) が欠失しているため、ジストロフィン蛋白が作られず、DMD を発症している。この場合、exon 51 (233 塩基) をスキップさせることにより、計 630 塩基が欠失することになり、その結果、正常に比べて「210 アミノ酸」短いジストロフィン蛋白が作られるようになる。

Northern blot にて chimeric snRNAs の発現について検討したところ、すべての chimeric snRNAs がよく発現していた。U7 snRNA を用いた chimeric snRNAs では full-length のものと共に、短いものも発現していた。2 種類の転写産物が異なった安定性を持っているのかどうかは現時点ではわからない。また、U7 promotor によりコントロールされている chimeric U7 snRNAs の方がより多く発現していた。

Chimeric snRNAs はすべて核内に局在しており、また、異なったタイプの snRNAs が影響を及ぼし合うことも、snRNAs が過剰に発現することによって splicing 機構に影響を及ぼすことも無かった。

RT-PCR 法によりエクソンスキッピングが起こっているかどうか検討したところ、U1-5'では 10%でエクソンスキッピングが誘導されていた。U7-double では 60%でエクソンスキッピングが誘導されていた。U7-double では 5'、3'の 2 個所の splice site に対するアンチセンスオリゴが含まれており、このために、より効果的なエクソンスキッピングが誘導されたと思われる。

さらに、pBabe puro retroviral vector に 2 組の chimeric snRNAs を導入した、5'/BP; U2-BP+U1-5'、5'/3'; U1-5'+U7-3'pl、ものを作成し、この vector を筋細胞に導入し、chimeric snRNAs の発現、および、エクソンスキッピングについて検討した。5'/BP、5'/3'はそれぞれ、2 種類の chimric snRNAs が影響を及ぼしあうことなく発現していた。また、30~40%でエクソンスキッピングが誘導されていた。

Western blot により chimeric snRNAs を導入した筋細胞に、ジストロフィン蛋白が発現しているかどうかを検討した。U7-double、5'/3'、5'/BP、の chimeric snRNAs を導入した筋細胞について検討したところ、正常の筋細胞と比較すると少ないが、ジストロフィン蛋白の発現を確認した。正常のジストロフィン蛋白と比較すると、エクソン 48-51 が欠失しているため、210 アミノ酸短いジストロフィン蛋白が合成されるはずだが、大きさの違いは明らかではなかった。

### 【考察】

RNA の様々な特性が、遺伝子の発現をコントロールしている。先天的または後天的な遺伝子の異常を、この RNA の特性を利用して修正する方法が試みられている。RNA の特性の 1 つにアンチセンスがある。以前は、アンチセンスは mRNA から蛋白へ翻訳する過程を妨害するのに広く利用されていたが、最近、スプライシングのような核内で起こる過程を妨害するのにも使用されるようになってきた。今までは、アンチセンスとして、合成オリゴヌクレオチドを使用していたのだが、定期的に繰り返し投与しなければならないことが問題点だった。この問題点を克服するために、十分な量のアンチセンス配列を含んだ chimeric snRNAs が生体内で安定して発現する vector を作成した。

治療に利用できる効果的な RNA を得るにはいくつかの重要なポイントがある。発現させるのに有効な promotor、治療に有効な RNA 配列を持っており、それが安定して、細胞内の特定の位置で発現されなければならない。

snRNAs は強力な promotor によって転写され、細胞内のある特定の位置に運ばれるため、以前より vector として利用されている。

DMD ではエクソンの欠失や点変異によって、終止コドンが形成され、ジストロフィン蛋白が合成されない。エクソンの欠失や点変異など、遺伝子の異常に応じて、特定のエクソンをスキップさせることにより、正常に比べると短い機能が有するジストロフィン蛋白を合成する方法が考えられた。今回、ジストロフィン遺伝子エクソン 48-50 の欠失のために発症した DMD 患者の筋細胞でエクソン 51 のスキップを誘導することができた。エクソン 51 をスキップさせることで、アミノ酸読み取り枠の維持され

## ～世界の情勢～

た mRNA が合成され、正常よりは短い機能が有したジストロフィン蛋白が合成される。DMD-Leiden のデータベースに基づけば、エクソン 51 がスキップできるようになると約 15% の DMD の患者で、アミノ酸読み取り枠の維持された mRNA が合成されるようになる。

Carrier RNAs を選択する際、アンチセンスとそのターゲットとなる RNA とが共存することが必要だった。U1-sRNA と U2-sRNA は splicing に関与していることが知られており、アンチセンスとそのターゲットであるジストロフィン pre-mRNA とが共存できる見込みがあった。また、2 つの snRNAs は共に pre-mRNA の基質を認知することができた。U7-snRNA は以前、生体内でアンチセンスを発現させるのに利用されていた。

作成した chimeric snRNAs を筋細胞に導入し、エクソンスキッピングについて検討した。5' splice site と 3' splice site の両方に対するアンチセンスが筋細胞内でともに発現している時（つまり、U7-double を導入したとき）、効果的なスキッピングが誘導されていた。エクソン 51 のスキッピングを認めた細胞ではジストロフィン蛋白の合成が認められた。

今後、さらに動物実験を行い、この方法によって生体内において恒久的に遺伝子変異の修正を続けるのかどうかを証明する必要がある。

**・ 2002 年 5 月 23 日**

### **キメラ RNA/DNA が筋肉前駆細胞でもジストロフィン遺伝子の異常の修復効果を示しました**

スタンフォード大学の Rando らのグループはキメラ RNA/DNA (キメラプラスト) を用いたデュシェンヌがた筋ジストロフィー (DMD) の治療について研究してきました。すでに DMD のモデルマウスである mdx マウスに筋注して、キメラプラストが遺伝子修復効果を有していることを確認していました。今回、効果の継続性を検証するため、筋前駆細胞でも同様な効果が得られるかを検証しました。その結果、筋前駆細胞でも遺伝子修復効果が確認されました。

このことは 1 回のキメラプラストの投与によりその後新たに筋細胞が形成されても、その細胞の遺伝子は修復されたものであることを示し、治療の長期効果が期待されます。

## ～世界の情勢～

・2002年4月3日

### デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子治療への前進

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は最も普通に見られるタイプの筋ジストロフィーであり、ジストロフィン遺伝子の変異が原因である。現時点では治療法がなく、遺伝子（2.4 Mb）および mRNA（1.4 kb）が非常に大きいことが遺伝子治療の開発にとって大きな障害となっている。本稿で、ワシントン大学の J.S. Chamberlain らは、ジストロフィンの構造ドメインの詳細な機能解析を行い、このタンパク質は複数の領域を様々な組み合わせで欠失させることが可能であることを明らかにした。この方法により、遺伝子治療に用いるための高い機能を持ったミニおよびマイクロジストロフィンを作ることができる。DMDのモデルであるトランスジェニック mdx マウスを用いた研究により、このような切りつめたジストロフィンのいくつかによりジストロフィーの様々な機能的特性が妨げられることがわかった。最も小型のジストロフィンを発現させた筋肉でも、筋肉の活動により生じる損傷は完全に防がれ、形態的にも正常な筋肉と変わらなかった。さらに重要なことに、マイクロジストロフィン遺伝子を担うアデノ随伴ウイルスを、免疫応答性 mdx マウスのジストロフィー症状を呈している筋肉に注入するといくつかの症状が著しく回復した。これらの結果は、ジストロフィーの病状は、マイクロジストロフィン遺伝子を用いた遺伝子治療により阻止・回復が可能であることを実証するものである。

・2002年4月3日

### ネガマイシンがジストロフィン産生に効果を発揮しました

東京大学の松田先生のグループはデュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスに抗生物質の1種のネガマイシンを治療効果を見るために投与しました。その結果、ネガマイシンがジストロフィンを産生させる効果有していることが明らかになりました。

ネガマイシンはゲンタマイシンと同様に mRNA からクレパクに翻訳をされる段階でストップコドンの読み飛ばし効果をもたらし、点突然意思でストップコドンを生じた例の治療に有効と考えられます。

現在、神戸大学では松田先生のグループと共同してデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんで実際にこのゲンタマイシンより治療が可能かどうかを検討しております。

・2001年11月24日

### 神戸大学からの報告

ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 の欠失した筋細胞株にアンチセンスオリゴを導入してジストロフィンの産生を誘導 **Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient** Takeshima et al. *Brain Dev* 23:788-790,2001

ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 のスプライシング促進配列の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドをもちいて、エクソン 19 のスキッピングを誘導。これによりジストロフィン mRNA でのアミノ酸読み取り枠を回復させ、ジストロフィンの産生をもたらした。

・2001年10月27日

### オランダのグループの報告

Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells  
(DMD患者から得た筋細胞内でのアンチセンスによるジストロフィンの exonスキッピングおよび蛋白発現の誘導)

Judith C. T. van Deutekom, Mattie Bremmer-Bout, Anneke A. M. Janson, Ieke B. Ginjaar, Frank Baas, Johan T. Dunnen and Gert-Jan B. van Ommen

Department of Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands and Department of Neurology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

(Human Molecular Genetics, 2001, vol .10, No.15, 1547-1554)

#### 【要旨】

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) では、ジストロフィン遺伝子での変異により、アミノ酸読み取り枠にずれが生じるためジストロフィン蛋白が合成されず、致死的な筋肉の変性をきたす。一方、Becker型筋ジストロフィー (BMD) ではジストロフィン遺伝子上変異があるが、アミノ酸読み取り枠は維持されているため、重症となることが少ない。今回の研究では DMD の患者から得た筋細胞を用い、ジストロフィン pre-mRNA のスプライシングを調節することにより、アミノ酸読み取り枠を修復する治療法について検討する。DMD の患者において、exon の単独欠失では exon45 が最も多い。一方、exon45、46 の欠失では軽症の BMD を呈する。我々は、ヒト及びマウスの筋管細胞系を用い、antisense oligo(ribo)nucleotides (AONs)により exon46 のスキッピングを誘導する実験系を作成した。exon45 が欠失している 2 名の患者から得た筋管細胞では、15% の mRNA で exon46 のスキッピングが誘導されており、また、少なくとも 75% の筋管細胞で正常量のジストロフィン蛋白が発現していた。これは DMD 患者から得た筋細胞においてジストロフィンの発現が効果的に修復されることを証明した初めての研究である。この方法は 65% 以上の DMD の患者に適応できるだけでなく、他の多くの遺伝子疾患に対しても適応できる可能性がある。

#### 【緒言】

DMD/BMD は X 染色体劣性遺伝の形式をとる筋疾患である。ジストロフィン遺伝子上の変異により、アミノ酸読み取り枠にずれが生じストップコドンが形成され、その結果ジストロフィン蛋白が発現しないものが DMD、ジストロフィン遺伝子上変異は存在するがアミノ酸読み取り枠が維持されており、ストップコドンが形成されず、不完全ではあるがジストロフィン蛋白が発現するものが軽症型の BMD を呈する。

DMD の治療法についての研究は多くなされている。まず、正常なジストロフィン遺伝子を筋細胞に導入するという方法について研究された。マウスを使った実験では、ジストロフィン遺伝子の導入によって筋細胞の変性を防ぐには十分な量である正常の 20?30% のジストロフィン遺伝子の発現を認めたが、臨床に至るにはジストロフィン遺伝子が大きいこと、導入する方法、長期間筋細胞内で発現させることに問題があった。

次に、ジストロフィン遺伝子の変異を修復する方法についての研究が注目された。Chimeric DNA/RNA oligonucleotide を導入し、細胞の DNA ミスマッチ修復機構を利用して、遺伝子の微小変異の修復が可能となることが判明した。DMD のモデル動物であるゴールデンレトリバー犬や mdx マウスに Chimeric DNA/RNA oligonucleotide を投与し、病態の原因となっているジストロフィン遺伝子の点変異が修復されることが示された。しかしこの方法は、細胞の修復活動程度に依存しており、その効果は限られている。

## ～世界の情勢～

アンチセンスオリゴ[リボ]ヌクレオチド: Antiense oligo(ribo)nucleotides(AONs)は pre-mRNA から mRNA へのスプライシングの過程を妨害し、特定の exon スキッピングを誘導することにより、遺伝子の発現を調整する。最近、ジストロフィン遺伝子 exon23 内のナンセンス変異により発症する mdx マウスに対し、exon23 の 3'あるいは 5'スプライスサイトに対する AONs の投与して exon23 のスキッピングを誘導し、ジストロフィン蛋白の発現が見られた、と報告されている。この報告では、3'あるいは 5'スプライスサイトに対する AONs の投与することにより、隣接した exon に対しても予期しないスキッピングが起こる可能性がある。そこで我々は、さらに exon スキッピングの特異性を高めるために、exon 内の配列に注目した。purine-rich 配列、最適以下のスプライスサイトの有無に基づいて、AONs を投与することにより exon スキッピングを誘導できる可能性のある配列を持つ、ジストロフィン遺伝子の exon について検討した。DMD の患者で最も頻度の高い exon の単独欠失は、exon45 の欠失である。この場合、exon46 スキッピングを誘導することにより exon45 と 46 が欠失することになり、アミノ酸読み取り枠のずれが修復され、正常よりも短いジストロフィン蛋白が発現するようになり、軽症型の BMD を呈するようになる。我々は、exon46 内に存在する ploypurine-rich exon recognition sequence(ERS)に対応する AONs を投与することにより、より効果的に exon スキッピングを誘導したことを報告する。

### 【方法と結果】

#### 1. マウス筋細胞における exon46 スキッピングの誘導

exon46 内の ERS によく似た配列を 12 に分断し、それぞれに対応する AONs のうち pre-mRNA 結合しやすい 5 つ (mAON4、6、8、9、11) を作成した。AONs には 2'-O-methyl phosphorothioate modified oligoribonucleotide-AONs を用いた。Cationic polymer polyethylemine(PEI)を用いて、C2C12 細胞系から得たマウスの筋管細胞に導入した。5'側を蛍光ラベルした AONs を用いて調べた AONs の導入効率は 60~70%であった。24 時間後に細胞を回収、RNA を抽出した。この RNA を用いて RT-PCR を行い、発現した mRNA について検討を行った結果、mAON4、6、9、11 を導入した筋管細胞では exon46 のスキッピングが起こっていた。exon19 の配列に対応している mAON19 を導入した筋管細胞では exon スキッピングは起こっておらず、アンチセンスオリゴの導入による exon スキッピングは特異的なものであると考えられた。

#### 2. ヒト筋細胞における exon46 スキッピングの誘導

次に、ヒト筋管細胞における AONs 投与による exon46 スキッピングの誘導について検討した。健常人 1 名、および、ジストロフィン遺伝子 exon45 の単独欠失を有する DMD の患者 2 名から筋生検を行い、ここから得た筋組織から筋管細胞系を作成した。2 種類の抗ジストロフィン抗体 (MANDYS1: exon31-32、Dys2: exon 77-79) を用いて、投与前の DMD 患者のヒト筋管細胞にはジストロフィン蛋白が発現していないことを確認した。マウスでの結果に基づき、5 種類のアンチセンスオリゴ (hAON4、6、8、9、11) を作成した。導入効率は少なくとも 50%に達していた。24 時間後に細胞の回収、RNA の抽出を行い、RT-PCR 法にて解析した。hAON4、6、8 を導入した細胞では、正常コントロールでは exon46 のスキッピングを、患者から採取した筋管細胞系では exon45 欠失および exon46 のスキッピングを認めた。hAON8 のよるものが最も効率が良く、全 RT-PCR 産物のうちの 15%にのぼると考えられた。今回の hAON の投与では予想以外の exon スキッピングは起こっておらず、特異性の高いものであることが示唆された。また、exon46 のスキッピングによりアミノ酸読み取り枠のずれが修正され、ジストロフィン蛋白が発現しているかどうかを検討した。hAON8 を導入し 24 時間経過した筋管細胞に対して、前述の 2 種類の抗ジストロフィン抗体による染色を行ったところ、細胞質内に、正常コントロールと同じ程度のジストロフィ

## ～世界の情勢～

ン蛋白の発現を認めた。さらに 48 時間後に観察を行ったところ、今度は筋細胞膜の部位で発現していた。ジストロフィン蛋白の発現は、hAON 導入 4 日目以降、減少した。ジストロフィン蛋白の発現率は MANDYS1 による染色では 74%、Dys2 では 82%であった。

### 【考察】

Exon46 内に存在し、特異的に exon46 のスキッピングを誘導する AONs について検討し、マウス、および、ヒトの筋管細胞に導入した。exon45 の欠失した DMD 患者の筋管細胞では exon46 のスキッピングが起こり、少なくとも 75%の筋管細胞でジストロフィン蛋白の発現を認めた。AONs 導入後 24 時間では発現したジストロフィン蛋白は細胞質内に局在していたが、48 時間経過すると、細胞膜に局在していた。これは 2.4Mb に及ぶジストロフィン遺伝子の転写に 16 時間かかること、および、転写と共にスプライシングも起こっていることを示すと考えられる。ジストロフィン蛋白の発現は AONs 導入後、4 日目以降徐々に消失した。

以前に行われた、mdx マウスを用いた研究では、スキッピングの標的としていた exon23 以外の exon のスキッピングも同時に起こっていたが、今回の我々の研究では標的としていた exon46 以外のスキッピングは起こっていなかった。前者の研究で使用した AONs には、3'または 5'側のコンセンサス配列が含まれていた。3'または 5'側のコンセンサス配列を含まない、exon 内の配列であれば、より効率良くかつ特異的な exon スキッピングが誘導されると思われる。また我々が今回使用した AONs の配列について検索したところ、完全に一致するヒトの遺伝子配列は他に検出されなかった。偶発的な exon スキッピングが起きる可能性は低く、exon46 に特異的であることが示唆された。

exon46 のスキッピングの効果について、ジストロフィン免疫組織染色により解析した。exon45 単独欠失により発症した DMD の患者 2 名のから得た培養筋管細胞では、AONs の投与によってジストロフィン蛋白陽性となったのは、それぞれ 74%、82%であった。AONs 導入効率は約 50%、exon46 のスキッピングが起こっていた転写産物は 15%であった。すべての細胞の核内に AONs が導入される必要はなく、また、exon46 のスキッピングが起こった転写産物が相対的に少ない量であっても、筋線維では十分な量のジストロフィン蛋白が発現している。

今回の結果から、AONs を使った DMD に対する治療の原理を示すことが出来た。この方法はウイルスベクターを使った遺伝子治療よりも相対的に安全である。Leiden の DMD のデータベースに基づけば、特定の 10 個の exon について、それぞれ exon スキッピングが可能となれば、exon の欠失によって発症した DMD のうちの 65%以上が軽症型の BMD へと治療できる可能性がある。現在、ヒト筋細胞を用いてこれらの exon のスキッピングを誘導する AONs について、また、マウスを用いて AONs を体内へ投与する際の有効な輸送方法について、検討を進めている。(訳 八木麻里子)

・ 2001 年 10 月 22 日

**Nature 誌に報告された遺伝子治療に関する論文 (Nature 4193;302-307,2001)の抄録より**

【題】

アグリンのミニ遺伝子導入による先天性筋ジストロフィーモデルマウスの筋萎縮症状の改善

【抄録】

先天性筋ジストロフィーには多くの型があるが、いずれも重篤な進行性の筋萎縮症の疾患で、幼児期に死に至ることもしばしばである。先天性筋ジストロフィーの最も多い型は、筋線維の発現するラミニンのおもなイソ型に含まれる $\alpha 2$ 鎖を指令する遺伝子、LAMA2の変異によって起こるものである。この疾患での筋線維の変性は、基底膜構造に必要な一次ラミニン骨格の形成ができず、筋基底膜とジストロフィン-糖タンパク質複合体(DGC)との結合、または筋基底膜とインテグリン類との結合が失われるためと考えられている。

この疾患のモデルマウスで筋機能を再生させる試みとして、神経筋接合部の形成に役割を持つことが知られているタンパク質アグリンのミニ遺伝子を設計した。今回、このミニアグリンが、基底膜およびDGCの一要素である $\alpha$ -ジストログリカンとに結合し、アグリンが仲介する $\alpha$ -ジストログリカンとラミニンの $\alpha 5$ 鎖の安定化を含む機構によって、筋病態を改善したことを報告する。

この知見は、生体と相同でないタンパク質も周到な設計を施して用いれば、ヒトの筋ジストロフィーでの筋機能再生のための治療手段となりうることを、個体レベルで示している。

バーゼル大学(スイス)、J Moll et al.

【解説】

今までの遺伝子治療は欠陥のある遺伝子の機能を補うため正常な遺伝子を導入することに主眼がおかれてきていた。この報告は、遺伝子治療で生体に導入する遺伝子を欠陥のある遺伝子ではなく、似たような機能を持つタンパクを発現させても、治療ができるということを示したもので、遺伝子治療の考えに新しい観点を導入するものです。

・ 2001 年 6 月 28 日

**筋ジストロフィーの骨髄移植による治療は mdx マウスでは有効ではなかった**

骨髄移植による筋ジストロフィーの治療の可能性がこれまでに提唱されてきた。しかし、Nature 誌(2001年6月22日号)に報告された論文によれば、骨髄移植による Duchenne 型筋ジストロフィーの治療は必ずしも有効ではない。

報告では、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx-4 cv マウスに骨髄移植を行い、骨格筋でのジストロフィン発現を検討した。移植後 10 ヶ月を経てもジストロフィンが発現した骨格筋細胞の存在、あるいはジストロフィン mRNA の解析において正常な配列を有したジストロフィン mRNA の発現を確認できた。しかし、ジストロフィン陽性細胞が 1% を超えることはなく、十分な治療効果を得ることは困難と考えられた。

これは、今までの報告とは少し異なるが、Revertant という自然にジストロフィン陽性細胞が出現しにくい mdx-4 cv マウスを使ったためと考えられる。このため、mdx マウス自体に特有な問題であるかもしれない、今後さらに検討を要する。

## ～世界の情勢～

・2001年6月25日

### 筋芽細胞の移植を人で実施

パリに筋疾患の遺伝子治療に関する調査に行ってきました。その中で最も進歩している部分について報告します。

驚くべきことは、筋芽細胞を用いた新しい治療法として、「虚血性心疾患の治療に筋芽細胞を移植するという」今までの考えとは異なった新しい方法が臨床展開されるまでになっていたことである。

Dr. Jean-Thomas Vilquin らは虚血性心疾患患者の患者の骨格筋を生検にて得た後、その筋芽細胞を CD65 という抗原をマーカーとして分離した。そして、その細胞を増幅して、患者の心筋障害部位に注射している。すでに、9例の患者で8億個以上の筋芽細胞が投与されその経過が観察されている。心筋での骨格筋の筋生成が確認されており、心筋自体の活動性もよくなっておりその治療効果がえられたとしている。

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子治療に大きな展開が見られない現時点では、正常のジストロフィン遺伝子を生体に導入する方法としてこの方法は注目すべきものである。今のところパリでの試みは自己から得た筋芽細胞を自分の心筋細胞の再生に応用しているのみである。筋芽細胞を増幅して大量の細胞数が得られれば Duchenne 型筋ジストロフィーの治療にも応用が可能であり、今後検討する必要がある方法です。

・2001年2月25日

### キメラ RNA/DNA を用いた遺伝子異常の修正 (Gunn rat)

最近キメラ RNA/DNA が動物で有効に機能して遺伝疾患の治療に用いられている報告を新たに見出したので、紹介します。

Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Cligler-Najjar syndrome type. with a chimeric oligonucleotide

Besty T. Kren, Bhupesh parashar, Paramita Bandyopadhyay et al.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.96,pp.10349-10354, August 1999

Cligler-Najjar 症候群 (CN 症候群) I 型は、UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) の 1 種で、ビリルビンの glucuronidation と胆汁の排出に関わる UGT1A1 酵素の欠損により、間接ビリルビン値が高値となる常染色体劣性遺伝の疾患である。CN 症候群には 2 つのタイプがあり、I 型では UGT1A1 酵素活性がほぼ完全に欠損しており重症である。II 型は UGT1A1 酵素活性の不完全な欠損であり、I 型に比べ軽症である。Gunn rat は、ugt1a1 遺伝子の 1026 番目の塩基 (G) の欠失があるためにフレームシフトが起こりストップコドンが形成され、UGT1A1 酵素活性が消失する、CN 症候群 I 型の動物モデルである。

以前、Gunn rat に対してアデノウイルスベクターを用いて ugt1a1 遺伝子を修復し、高ビリルビン血症の改善させる方法が試みられたが、その効果は 2 カ月しか持続せず、UGT1A1 酵素活性レベルを保つためにはこの治療を繰り返すこと、および免疫学的な調整が必要だった。今回、内因性の遺伝子の修復を促進させるような chimeric RNA/DNA oligonucleotide を用いて、培養肝細胞および、Gunn rat の肝細胞の ugt1a1 遺伝子上に 1206 番目の塩基 (G) を挿入し、遺伝子を修復する実験を行った。

#### 【方法】

chimeric RNA/DNA oligonucleotide を polythylenomine (PEI) との複合体、あるいは、anionic liposome に encapsulate した形で注入し、asialoglycoprotein 受容体を經由して肝細胞に導入するようにした。ugt1a1 遺伝子に塩基 (G) が挿入されたかどうかについて、以下の項目で検討した。

- ・ PCR による分析
- ・ hybridization による分析
- ・ 制限酵素を用いた分析
- ・ シークエンスによる分析
- ・ サザンブロット法およびウエスタンブロット法による分析

#### 【結果】

##### 1. 培養肝細胞での ugt1a1 遺伝子の修復

まず、蛍光ラベルした oligonucleotide を Gunn rat の肝細胞に注入し、oligonucleotide が十分に肝細胞へとり込まれ、核に局在していることを確認した。その後、PEI と複合体にした oligonucleotide、あるいは liposome で encapsulate された oligonucleotide を注入した。

1206A と 1206G の 2 種類のプローブを用いて hybridize を行った。oligonucleotide が 2-6 μg 注入された肝細胞では UGT1A1 遺伝子の 1206 番目の塩基として塩基 G が挿入されていたが、PEI あるいは liposome のみが注入された肝細胞や、非特異的な oligonucleotide が注入された肝細胞では認められなかった。0.5 から 1.5 μg の少量の oligonucleotide が注入されたものでは認められなかった。このことから塩基の挿入は、注入する oligonucleotide の濃度に依存しており、挿入率は 15.3% であった。oligonucleotide の注入を 2 回行ったものでは、塩基の挿入率は 23.7% となっていた。

## ～世界の情勢～

野生型遺伝子と変異遺伝子のクローンについてシーケンスを行った。oligonucleotide を注入されなかった変異遺伝子のシーケンスでは 1206 番目の塩基は A のままであったが、oligonucleotide を注入した肝細胞から抽出した遺伝子のうち、野生型の 1206G のプローブで hybridize されたものでは 1206 番目の塩基は G となっていた。また、ターゲット以外の部分では変化はみられなかった。

### 2. Delivery System ( Liposome と PEI ) による違いについて

蛍光ラベルした oligonucleotide を静脈内に注入し、注入後の体内での分布状態を調べた。oligonucleotide は、注入後 2 時間では肝内に均一に分布していた。対照的に肺、心臓、腎にはすこししか分布していなかった。また、oligonucleotide が肝から消失する時間についても検討した。注入後 24 時間では明らかな変化はみられなかったが、48 時間までには減少し始め、120～168 時間後にはほとんど消えていた。他の臓器での消失も肝でみられたものと同じだった。PEI によるものでも liposome によるものでも、oligonucleotide の分布と消失について違いはなかった。

### 3. in vivo での ugt1a1 遺伝子の修復

PEI と結合させた oligonucleotide、あるいは liposome で capsulate した oligonucleotide を注入したあと、7 日目、4 ヶ月後、6 ヶ月後に肝組織から遺伝子を抽出し分析した。どちらの delivery system でも 1206 番目の塩基の約 20% が A から G に変わっていた。これは 4 ヶ月後、6 ヶ月後でも変わらず同じ割合だった。また、PCR による生成物を制限酵素 BstN を使って切断し、電気泳動を行い分析したところ、野生株型と同じサイズのバンドも検出された。シーケンスでは 1206 番目の塩基が G である野生株型と、A である変異株型の 2 種類が混在していた。

### 4. サザンブロット法およびウエスタンブロット法による分析

oligonucleotide を注入後、6 カ月経過した個体の肝組織から抽出された遺伝子について、サザンブロット法で分析したところ、制限酵素 BstN で切断される部分が一部で認められた。注入されていない個体では制限酵素 BstN で切断される部分はなく、野生株型では全てが制限酵素 BstN で切断されていた。delivery system による違いはなかった。

UGT1A1 蛋白を検出するために、肝組織から採取された蛋白についてウエスタンブロット法で分析した。oligonucleotide を注入された個体からは UGT1A1 酵素が検出され、ugt1a1 遺伝子の修復と関連があると思われた。検出された UGT1A1 酵素活性、および蛋白量はそれぞれ野生株型の 8～15% であった。

### 5. 血中ビリルビン濃度に対する ugt1a1 遺伝子修復の効果

oligonucleotide を注入したあと、Gunn rat の血中ビリルビン濃度は 25% 減少した。delivery system による違いはなかった。PEI のみ、liposome のみ、あるいは非特異的な oligonucleotide を注入した Gunn rat では血中ビリルビン濃度は変化なし、もしくは増加していた。oligonucleotide をくりかえし注入した Gunn rat では血中ビリルビン濃度が治療前の半分以下となった。

UGT1A1 酵素活性は胆汁排泄能、ビリルビンの glucuronidation に関わっている。これについて、HPLC で分析したところ、oligonucleotide を注入したは glucuronidate されたビリルビンが検出されたが、注入しなかった Gunn rat では検出されなかった。

### 【考察】

今回の研究の目的は、Gunn rat において、ugt1a1 遺伝子で 1 塩基 (G) が欠失しているために起こったフレームシフトを、chimeric oligonucleotide を用いて修復できるかどうか、ということである。研究の結果、chimeric oligonucleotide によって肝培養細胞、および生体の肝組織内で ugt1a1 遺伝子は特異的に修復されていた。6 カ月の観察期間中ずっと持続していたことから、この遺伝子の修復は永久に続くことが示唆された。また、修復量は、注入する chimeric oligonucleotide の濃度に依存していた。

## ～世界の情勢～

ugt1a1 遺伝子の修復により UGT1A1 酵素が出現し、血中のビリルビン濃度も低下した。血中のビリルビン濃度は徐々に減少し、この減少の仕方は、肝臓移植をした場合よりも、むしろ肝細胞を移植した場合とよく似ていた。このことは、完全にではなく部分的に、酵素欠損が修復されて、Gunn rat の体内に蓄積されたビリルビンが徐々に排泄されていることを示している。

肝臓の遺伝子疾患を治療する為に、chimeric RNA/DNA oligonucleotide を使用する方法は、ウイルスベクターを使う方法よりも有益であり、特に、ウイルスベクターでは random に遺伝子が組み込まれていること、免疫学的な抗原性が問題となること、修復遺伝子が永続的なものではないこと、という点で勝っている。今回の研究で、CN 症候群。型の血中のビリルビン濃度を減少させることができた。これは重症型の CN 症候群。型を軽症型の CN 症候群「型に変えることができるということを示している。この方法を繰り返して行うことにより、遺伝子治療の効果はさらに大きくなるだろう。chimeric oligonucleotide を使った CN 症候群。型に対する治療法は、ウイルスを用いた遺伝子組み換え、肝細胞移植に替わる魅力的な方法であると思われる。（八木麻里子 訳）

## ～世界の情勢～

・ 2000 年 12 月 7 日

### AAV ベクターを用いたジストロフィン発現

ピッツバーグ大学のグループが AAV ベクターを用いてミニジストロフィン遺伝子をマウスに導入し 90% の筋細胞にジストロフィンが発現していることを確認しました。この報告は AAV すなわち adeno associated virus をベクターとして用い、ジストロフィンの 4.2 kb の一部の配列を導入し、筋所見の消失をみたとするものです。

・ Science Daily:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2000/11/001129074702.html>

・ The Daily Telegraph 28/11/2000 'Gene implant hope for wasting disease'

・ The Daily Telegraph:

<http://www.telegraph.co.uk:80/et?ac=001432256857616&rtmo=wetKf55b&atmo=99999999&pg=/et/00/11/28/wgene28.html>

・ The Times 28/11/2000 'Muscle disease advance'

・ The Times: - The Times 28/11/2000 'Muscle disease advance'

・ The Times:

<http://www.thetimes.co.uk/article/0,,42488,00.html>

・ 2000 年 6 月

### キメラ RNA/DNA を用いた遺伝子異常の修正(mdx マウス)

Nature Biotechnology にキメラの RNA/DNA を使った治療法が紹介されました。

これはジストロフィン遺伝子の点突然変異をなおす方法です。犬でこの治療を試みてうまくいったという報告です。

文献題目 : In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide (八木麻理子 訳)

Duchenne 型筋ジストロフィーでは mdx-mouse とゴールデンレトリバー (GRMD) の 2 種類の動物モデルが存在し、どちらも点変異が原因となっている。mdx-mouse ではジストロフィン遺伝子の exon23 上のナンセンス変異があり、ゴールデンレトリバーではイントロン 6 の splice acceptor 部位での点変異により mRNA でエクソン 7 の欠失が起きる。遺伝子レベルでこれらの点変異の修復を証明したものは報告されていないが、out-of-frame となるエクソンをコードしている領域を除いてみることにより、ジストロフィンの発現を回復させるという治療方法が考えられている。

Cole-Straus らは、chimeric RNA /DNA oligonucleotide を用いて mismatch repair を起こし、鎌型ヘモグロビン遺伝子での点変異を修復する実験を行った。これにより染色体の点変異が修復され、修復された mRNA が産生される。この研究では、20% の染色体が野生株型に修復された。

今回、chimeric oligonucleotide によって、GRMD の生体の骨格筋内でエクソン 7 を含んだ dystrophin mRNA が回復されるかどうかについて研究した。

#### 【方法】

生後 6 週の雄イヌの左肢に chimeric oligonucleotide を注射し、同部位から 8 週、15 週、54 週 (注射後、2 週、9 週、48 週) に生検を行った。右肢には生後 15 週に、Fugene carrier を含まない chimeric oligonucleotide を注射し、21 週 (右肢に注射後 6 週) に生検を行った。54 週に安楽死させ剖検を行った。

## ～世界の情勢～

chimeric oligonucleotide には野生株や突然変異株とは異なった配列の 2 塩基が含まれている。一方の mismatch はヒトの intron junction に相当する部分の塩基と適合し、chimeric oligonucleotide と染色体との T/G pairing が作り出し、点変異を修復する。もう一方の mismatch は点変異の 5'側に位置する。

chimeric oligonucleotide を筋肉内に注射することによって、遺伝子の変異が修復されたかどうかについて、以下の項目で検討した。

1. 骨格筋内の dystrophin mRNA についての RT-PCR による分析
2. 骨格筋内の dystrophin mRNA についての RT-PCR による定量的解析
3. 治療後の骨格筋に対する in situ RT-PCR
4. 治療後の骨格筋に対する Western blotting
5. 治療後の骨格筋に対する免疫組織化学的染色
6. 治療後の骨格筋の DNA について

### 【結果】

1. 骨格筋内の dystrophin mRNA についての RT-PCR による分析  
mRNA を抽出し、RT-PCR を行った。注射後 2 週の生検組織では mRNA は認められなかったが、9 週の生検組織では正常サイズの mRNA が認められ、シーケンスでも同じ正常と配列が認められた。48 週の剖検組織の PCR でも正常サイズの mRNA が認められた。
2. 骨格筋内の Dystrophin mRNA についての RT-PCR による定量的解析  
fluorescent activated thermocycler を用いて、生検あるいは剖検組織からの mRNA 中の exon7 を定量した。治療されていない組織からは exon7 を含んだ mRNA は認められなかった。右肢の剖検組織からも exon7 を含んだ mRNA は認められず、exon7 特異抗体による染色でも陰性だった。右肢の注射後 6 週の生検組織では弱陽性反応が認められた。注射された右肢では早期には修復された部分もあったが、その後続しなかったと考えられる。左肢の 9 週の生検組織では、右肢の 2 倍の exon7 を含んだ dystrophin mRNA を認めた。左肢の剖検組織からは、exon7 を含んだ dystrophin mRNA が検出され、exon7 特異抗体による染色でも陽性だった。
3. 治療後の骨格筋に対する in situ RT-PCR  
注射された筋肉での修復について調べるため、正常、注射されていない GRMD、および注射後 6 週経過した GRMD の右肢からの凍結組織に対して in situ RT-PCR をおこなった。exon7 を含む mRNA は、注射されない GRMD では完全に欠損、正常イヌでは線維全体に分布、注射された GRMD の組織からは注射部位を中心に軽度の分布が認められた。
4. 治療後の骨格筋に対する Western blotting  
RT-PCR により exon7 を含む生成物が、正常の dystrophin の修復の程度と相関して増えるかどうかを調べるため、MANEX7B(exon 7 に特異的なモノクローナル抗体)をもちいて western blotting を行った。左肢の剖検検体からは正常サイズの dystrophin が検出され、注射後 48 週でも軽度検出された。右肢の剖検組織からは全く認められなかった。
5. 治療後の骨格筋に対する免疫組織化学的染色  
治療した骨格筋内での dystrophin 分布状況を調べるために、生検および剖検組織の凍結標本を MANEX7B でラベルした。左右両方の検体で線維の周囲の一部が染色されていた。右肢の剖検組織では exon7 は認められなかったが、左肢の剖検組織では exon7 の部分的な分布が認められており、GRMD の遺伝子が chimeric oligonucleotide によって明らかに修復されていた。左右を比較した結果から、Fugene carrier を用いることで、より迅速に筋細胞核に移植でき、また、長期間持続すると考えられる。

## ～世界の情勢～

### 6. 治療後の骨格筋の DNA について

遺伝子修復の過程で変異が修正されている事確かめるために、凍結組織から DNA を分離した。GRMD ではその変異により Sau96I を認識する新たな部位が合成されており、このことを利用して Sau96I による 310bp の代謝物質が変異遺伝子の診断に用いられる。左肢から生成した 50 のクローンの実験からは、正常のイヌの組織と区別できない Sau96I による代謝物質が 3 つに認められた。この 3 つのクローンをシーケンスしたところ、それぞれ機能的な splice acceptor site を含む野生株 DNA が分離された。

以上のことから、chimeric oligonucleotide を筋肉注射することにより、GRMD の DNA の点変異は修復され、mRNA の exon7 が回復し、筋組織内に正常の dystrophin が合成されることが示された。

#### 【考察】

隣り合った 2 ヶ所に塩基の mismatch があり、その配列が野生株とも GRMD 株とも異なっている chimeric oligonucleotide を注射しているにもかかわらず、なぜその 2 塩基の部分が発見できないのかは明らかではない。ある一定の条件下で、chimeric oligonucleotide によって遺伝子の変異を修正し、修正された遺伝子の範囲にコードされている蛋白を長期間にわたって正常に表現させることが可能となり、GRMD モデルでも欠失によって起きた frame shift を修復するのに、chimeric oligonucleotide が有効であることが証明された。イヌにおける点変異による dystrophin mRNA での exon7 の欠失は、ヒトにおける DNA での exon7 の欠失と似ている。exon6 からの reading frame と一致させるために、chimeric oligonucleotide を使って exon8 の塩基配列を部分的に修正する方法によって、exon7 が欠失するにも関わらず exon6 から exon8 へ reading frame が継続され、蛋白の合成を維持することが可能になるだろう。

#### 【コメント】

この方法は点突然変異をなおす方法として注目されていました。今回の報告は犬で実際に治療に用いたことです。今後人にも応用されることでしょう。日本ではジストロフィン遺伝子の点突然変異の診断が進んでおりません。もっと力をおいてやる必要があるでしょう。この方法は今いわれています、オーダーメイド医療の先駆けといえるもので、遺伝子の異常の違いにより治療が異なるものです。

・2000年10月30日

### アンチセンスによる治療の試み

Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse

(mdx マウスにおける、アンチセンスによる dystrophin のエクソンスキッピングと蛋白発現の誘導)

Christopher J. Mann, Kaite Honeyman, Andy J. Cheng, Tina Ly, Frances Lloyd, Sue Fletcher, Jennifer E. Morgan, Terry A. Partridge, and Stephen D. Wilton

Australian Neuromuscular Research Institute, Centre for Neuromuscular and Neurological Disorders, University of Western Australia; and Muscle cell Biology group, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital (UK)

Pro. Natl. Acad. Sci. USA (2001) vol.98, no.1, 42-47

大部分のディシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) では、dystrophin の遺伝子変異によって mRNA のタンパク翻訳領域途中で停止コドンが生じ、機能的な dystrophin 蛋白の発現が阻害されている。一方、より軽症なベッカー型筋ジストロフィー (BMD) では、同じく dystrophin 遺伝子の変異だが翻訳領域途中で停止コドンが生じていない。このため、部分的に欠失があっても機能的な dystrophin 蛋白の発現が維持されている。これらのことから、機能的な dystrophin 蛋白の発現が DMD 治療を可能にすると考えられている。正常型 dystrophin 遺伝子の導入による遺伝子治療が試みられているが、未だ成功には至っていない。一方、遺伝子導入とは異なる治療方法として、アンチセンスオリゴ(AO)を用いたエクソンスキッピング法が研究されている。

エクソンスキッピング法では、患者の dystrophin 遺伝子から転写された mRNA 前駆体が mRNA に成熟する過程において、標的エクソンをイントロンと共に除外することによって mRNA の翻訳領域途中で停止コドンが生じるのを防ぐ。これにより、BMD で見られるような、部分的に欠失があっても機能を保った dystrophin 蛋白の発現が誘導され、DMD 症状が緩和されると考えられている。

本研究では、mdx マウス (DMD モデルマウス) において、AO-RNA によるエクソン 23 (ナンセンス変異が存在する) のスキッピングを誘導し、正常型よりやや短い、機能を保った dystrophin 蛋白を発現することに成功した。

#### 【実験方法】

AO-RNA は 2- $\mu$ O-メチル化したものを用いた。AO-RNA の標的は、通常 RNA スプライシングにおいて重要な役割をもつ部分とした。すなわち、イントロン 22 のブランチ部位 (25 塩基)、3'スプライス部位 (イントロン 22 とエクソン 23 の境界部位、30 塩基) そしてイントロン 23 の 5'スプライス部位 (エクソン 23 とイントロン 23 の境界部位、20 または 25 塩基) に対する AO-RNA を作製した。

マウスを用いた実験を行う前に、mdx マウス由来の筋芽細胞 (H-2Kb-tsA58) を用いて各 AO-RNA のエクソンスキッピング効果を試験した。細胞への AO-RNA の導入には、試薬 Lipofectin (Life Technologies 社製)を用いた。AO-RNA 導入より 72 時間後に細胞を回収、RNA を抽出した。この RNA を用いて RT-PCR 法により dystrophin 遺伝子転写産物の解析を行った。

mdx マウスを用いた実験では、上記細胞実験においてエクソンスキップが高効率で検出された“5'スプライス部位の 25 塩基に対する AO-RNA (AO-5' SS-25)”を用いた。AO-RNA 1 $\mu$ g と Lipofectin 2 $\mu$ g との複合体を mdx マウス (21 日齢 C57BL/10ScSn-mdx) に 4 週間 (週 1 回 x 4 回) 投与した。前半 2 週は右大腿四頭筋に、後半 2 週は左右両大腿四頭筋に注射した (計、右肢 4 回、左肢 2 回)。注射箇所がわかるように、2 週目と 4 週目の注射液には組織染色液を加えた。最後の注射より 1 週間後にマウスを安楽死させ、筋肉組織における dystrophin 蛋白の発現を免疫組織化学的染色法およびウエスタンブロット法によって解析した。

## ～世界の情勢～

### 【結果】

#### （細胞での実験）

イントロン 22 のブランチ部位（25 塩基）、31 スプライス部位（30 塩基）に対する AO-RNA を導入した細胞では、各 AO-RNA 単独で導入しても、2 つ同時に導入しても、エクソンスキッピングは検出されなかった。イントロン 23 の 51 スプライス部位（25 塩基）に対する AO-RNA（AO-51 SS-25）を導入した細胞では、高効率なエクソン 23 のスキッピングが検出された。この時、エクソン 21-23（in-frame）、エクソン 22-23（out-of-frame）のスキッピングも検出された。

AO-51 SS-25 の 51 側（イントロン側）を 5 塩基短くした AO-51 SS-20 では、エクソンスキッピング効率が激減した。AO-51 SS-20 の 51 末端を FITC 標識した AO-RNA では、AO-51 SS-25 ほど高効率ではないが、AO-51 SS-20 より高い効率でエクソンスキッピングが見出された。これらのことは、標的である 51 スプライス部位のうちのイントロン部分が、エクソンスキッピング誘導に非常に重要であることを示唆している。

#### （マウスでの実験）

AO-RNA（AO-51 SS-25）を注射した mdx マウスの筋肉は、左右肢ともに抗 dystrophin C 末端抗体（DYS2 抗体）で染色され、左右肢間の顕著な差は見られなかった。その組織染色像は正常型マウスのものと同じであった。AO-RNA を注射しなかった mdx マウスの筋肉では染色されなかった。また、注射液中の組織染色液により染色された部分だけが、DYS2 抗体で染色された。

dystrophin-glycoprotein 複合体（DGC）の構成成分の一つである  $\gamma$ -sarcoglycan 蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色でも同様の結果が得られた。抗  $\gamma$ -sarcoglycan 抗体による染色像は、DYS2 抗体によるそれと同様であった。

ウエスタンブロット法による解析においても、免疫組織化学的染色法と同様の結果が得られた。すなわち、アンチセンスオリゴ RNA を注射した mdx マウスの左右肢筋肉については、dystrophin 蛋白発現を示すバンドが一本だけ検出された。左右肢間の顕著な差は見られなかった。アンチセンスオリゴ RNA を注射しなかった mdx マウスでは dystrophin 蛋白は検出されなかった。誘導された蛋白のバンドの位置は、正常型 dystrophin 蛋白（分子量約 427k）のそれとあまり差は無かった。計算上、エクソン 23 のスキッピングによって誘導される蛋白の大きさは約 420k で、正常型と約 7k しか差がない。実験の結果は計算と一致する。

### 【考察】

本実験では、mdx マウスにおいて、イントロン 23 の 51 スプライス部位に対する AO-RNA を用いてエクソン 23 をスキップさせた。そして、正常な C 末端部分を保持する dystrophin 蛋白の発現を誘導した。発現した蛋白は、正常型蛋白同様の細胞内局在、dystrophin-glycoprotein 複合体形成することが示唆された。恐らく、誘導された dystrophin 蛋白は、途中部分に欠失があるものの、正常型と同様またはそれに近い機能を保持していると考えられる。これらのことは、AO を用いたエクソンスキッピング法が機能的 dystrophin 蛋白の発現誘導に有効であることを示している。

本実験では、AO-RNA を筋内注射により導入し、最初の注射から 5 週目には生検している。実験結果は、発現組織も期間も限定された条件で得られており、また免疫反応等は解析できていない。ヒトへの応用のためには、AO 投与の手段・条件等、さらに研究が必要である。（亀井正一郎 訳）