

＜シンポジウム 05—1＞筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線

デュシェンヌ型に対するエクソン・スキップ治療

武田 伸一

(臨床神経 2011;51:914-916)

Key words : Duchenne型筋ジストロフィー, ジストロフィン, エクソン・スキッピング, mdx52マウス, 臨床治験

はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は, ジストロフィン・糖タンパク質複合体 (dystrophin-glycoprotein complex : DGC) の中心分子であるジストロフィンが欠損することで発症し, ジストロフィンの欠損が不完全なばいはいはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) の表現型をとる. DMDは, X-染色体連鎖性遺伝形式をとり, 筋ジストロフィーの中でもっとも頻度が高く, 新生男児 3,500 人に 1 人の割合で発症する. 2~5 歳時に歩行異常で気付かれ, 進行性の筋力低下のため 11 歳前後に独立歩行が不可能になり, 以後呼吸不全や心不全で死亡にいたる. 最近, 呼吸管理の進歩により, 約 10 年間寿命が延長しているが, 有効とみとめられている治療はコルチコステロイドと脊椎変形に対する対症的手術治療, 呼吸補助のみであり, 未だ筋変性・壊死を阻止する決定的な治療法はない.

Anti-sense oligonucleotides (AOs) による エクソン・スキッピング

人工的に合成された短い核酸化合物である AOs をもちいておこなわれるエクソン・スキッピング誘導療法では, pre mRNA から mRNA へのスプライシング過程で, 遺伝子変異を持つ, あるいはその近傍のエクソンを人為的にスキップさせて, アウト・オブ・フレーム変異をイン・フレーム変異に変換することを企図する. 誘導されるジストロフィンは, 正常なジストロフィンのタンパク質構造を一部欠くことになるが, actin 結合ドメインや cysteine-rich-domain などの重要なドメインは保存される.

現在, 筋ジストロフィーのモデル動物をもちいた in vitro および in vivo での研究や臨床治験に使用されている代表的な AOs には, 2'-O-methyl phosphorothioate (2OMe), phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO あるいはモルフォリノ)がある. とくに, モルフォリノは, ヌクレアーゼなど生体内の酵素により分解を受けずに, 免疫応答を誘導しないモルフォリノ環構造を持つ核酸類似人工化合物である. し

かも, 水溶性であるため全身的な投与が可能であるが, 電荷を持たないため, 細胞膜の通過性が低い点が課題として指摘されていた.

近年, 国立精神・神経医療研究センターでコロニーを確立した DMD のモデル動物である筋ジストロフィー犬, CXMD_J に対してモルフォリノの筋肉内局所および全身投与がおこなわれた. 筋ジストロフィー犬は, ジストロフィン遺伝子のイントロン 6 のスプライス・サイトに点変異を持ち, エクソン 7 をスキップしてエクソン 8 にストップ・コドンを生ずるため, ジストロフィンを発現していない. そこで, アミノ酸の読み枠を修正するためにエクソン 6 および 8 を標的とした合計 3 種類の AOs をカクテルにして投与をおこなった. モルフォリノ投与筋ジストロフィー犬では, 心筋を除く全身骨格筋においてジストロフィンの発現が広範に回復し, 血清 CK 値も軽減し, 病理組織学所見も改善した. また, モルフォリノ非投与の筋ジストロフィー犬と比較し, 投与筋ジストロフィー犬では骨格筋の MRI で, 筋の変性や壊死の改善が示唆され, 運動機能をはじめとする臨床症状の改善もみとめられた. 一方で, 血液検査や諸臓器の病理組織学上, 副作用の徴候はまったくみとめられず, モルフォリノおよび発現誘導されたジストロフィンに対する免疫反応は観察されなかった. (Ann Neurol. 2009)

一方, エクソン 6/8 スキップを施行できる DMD 患者の数が少ないことから, より対象となる DMD 患者数が多いエクソンを検索したところ, エクソン 51 がそれに相当することが判明した. そこでエクソン 52 を欠くモデルマウス (mdx52) に対して週 1 回, 7 週にわたって尾静脈よりモルフォリノの全身投与をおこなった群では, とくに大腿四頭筋や腓腹筋で 70% 以上の陽性線維がみとめられた (Fig. 1). さらに筋張力の改善, 中心核線維数の減少, 血清クレアチン・キナーゼ (CK) 値が低下する一方, 毒性や副作用はみとめられなかった. (Mol Ther. 2010) この研究によって, 動物モデルをもちいてエクソン 51 スキップの有効性をはじめて示すことができた. 更に DMD 患者由来線維芽細胞に MyoD 遺伝子をもちいて筋芽細胞に変換することにより, in vitro エクソン・スキップにも成功している (PloS One. 2010).

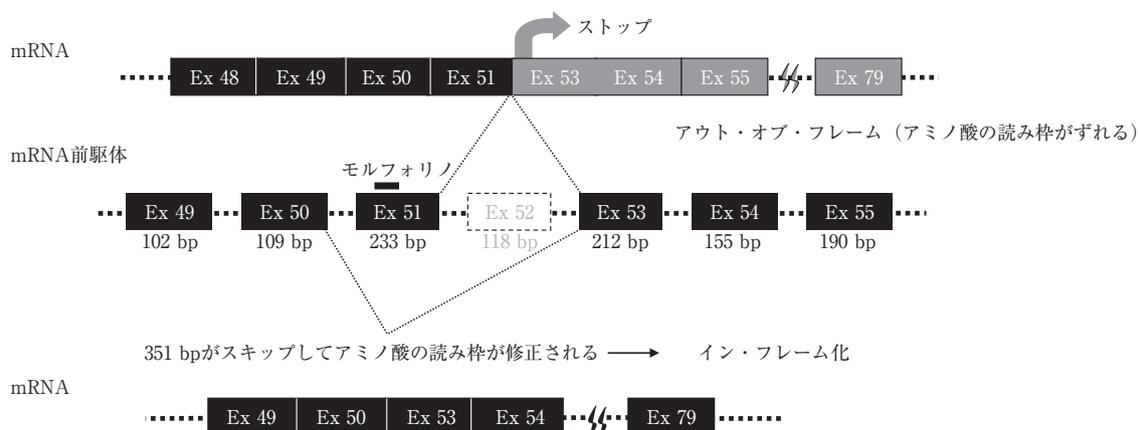


Fig. 1 mdx52 マウスに対するエクソン・スキップのストラテジー.

エクソン・スキッピング治療の今後の見通しと問題点

エクソン 51 をスキップさせることにより治療効果がえられると予想される患者の割合は、遺伝子欠失による DMD 患者の約 16% である。

モデル動物をもちいてえられた成果を下に、DMD 患者に対するエクソン・スキップの臨床応用を考え、DMD 患者の登録制度 (REMUDY) の樹立を提案し (<http://www.remudy.jp/index.html>), また、標準的な臨床評価法を確立するために、国際的なネットワークである CINRG (Coordinated International Neuromuscular Research Group) の一員となった。こうした臨床治験への取り組みを続けたところ、DMD 患者に対するジストロフィン遺伝子のエクソン 51 スキップの国際共同治験に phase 3 から、参加する機会をえた。その結果が注目されるとともに、今後、エクソン・スキッピング誘導療法を、AOs をもちいた他の疾患に対する治療に発展させることが重要である。現在 AOs をもちいて研究が進められている疾患には、脊髄性筋萎縮症、筋強直性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、福山型先天性筋ジストロフィーなどがある。

結 論

ジストロフィン欠損による DMD 患者に関しては呼吸不全、心不全対策の発展にともない寿命が延長しているものの、疾患の本態に根ざした治療はいまだ確立されておらず、治療法の開発が急務である。近年、DMD 患者に対する新たな治療法としてエクソン・スキッピングが注目されているが、AOs をもちいたエクソン 51 スキップの国際共同治験を我が国で開始することができた。その結果が注目されると共に、AOs をもちいた他の疾患への応用の可能性が注目される。

文 献

- 1) Yokota T, et al. Efficacy of systemic morpholino exon skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 2009; 65:667-676.
- 2) Aoki Y, et al. In-frame dystrophin following exon 51 skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther* 2010;18:1995-2005.
- 3) Saito T, et al. Antisense PMO found in dystrophic dog model was effective in cells from exon 7-deleted DMD patient. *PLoS One* 2010;5:pii: e12239.

Abstract**Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy**

Shin'ichi Takeda, M.D.

Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by the lack of dystrophin at the sarcolemma. Exon skipping by antisense oligonucleotides is a novel method to restore the reading frame of the mutated *DMD* gene, and rescue dystrophin expression. We recently reported that systemic delivery of Morpholino antisense oligonucleotides targeting exon 6 and 8 of the canine *DMD* gene, efficiently recovered functional dystrophin at the sarcolemma of dystrophic dogs, and improved phenotypes of affected dogs without serious side effects (*Ann Neurol*. 65: 667-676, 2009). To optimize therapeutic antisense Morpholinos for more frequent mutations of the *DMD* gene, we designed antisense Morpholinos targeting exon 51 of the mouse *DMD* gene, and injected them separately or in combination into the muscles of mdx52 mice, in which exon 52 has been deleted by a gene targeting technique. We also tried systemic delivery of antisense Morpholino to skip exon 51 in mdx 52 mice and found the amelioration of the phenotypes (*Mol Ther*, 2010). Clinical trials of exon 51 skipping for DMD patients is now going in our country and application of antisense strategy to other hereditary neuromuscular diseases is largely expected.

(Clin Neurol 2011;51:914-916)

Key words: Duchenne muscular dystrophy, Dystrophin, Exon skipping, mdx52 mice, clinical trial
